

# **Untersuchungen zur Arc/Arg3.1-Expression nach N-Methyl-D-Aspartat-induzierter Langzeitdepression**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht an der

Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Jerome Gruhlich

Hamburg, 2014



1. Gutachter: Prof. Dr. Dietmar Kuhl

2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Lohr

Tag der Disputation: 06.06.2014



---

<b>Danksagung</b>	<b>9</b>
<b>Zusammenfassung / Summary</b>	<b>10</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Der Hippocampus, eine wichtige Hirnregion für die Gedächtnisbildung</b>	<b>16</b>
<b>1.2 Synaptische Transmission: die Informationsweiterleitung in neuronalen Netzwerken</b>	<b>17</b>
<b>1.3 Synaptische Plastizität ist ein zelluläres Korrelat für Prozesse des Lernens und der Gedächtnisbildung</b>	<b>20</b>
<b>1.4 Molekulare Mechanismen der synaptischen Plastizität</b>	<b>20</b>
<b>1.4.1 NMDA-Rezeptoren regulieren die synaptische Plastizität bidirektional</b>	<b>21</b>
<b>1.4.2 Der MAP-Kinase-Signalweg</b>	<b>24</b>
<b>1.4.3 NMDA-Rezeptoren regulieren die Expression von AMPA-Rezeptoren an der neuronalen Zelloberfläche</b>	<b>25</b>
<b>1.5 Das aktivitätsregulierte Gen Arc/Arg3.1</b>	<b>26</b>
<b>1.5.1 Die Arc/Arg3.1-Expression ist aktivitätsabhängig reguliert</b>	<b>27</b>
<b>1.5.2 Regulationsmechanismen der Arc/Arg3.1-Protein- und mRNA-Synthese</b>	<b>28</b>
<b>1.5.3 Arc/Arg3.1 fördert die Endozytose von AMPA-Rezeptoren aus der postsynaptischen Membran</b>	<b>29</b>
<b>1.6 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>31</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>33</b>
<b>2.1 Geräte und Materialien</b>	<b>34</b>
<b>2.2 Zellbiologische Methoden</b>	<b>35</b>
<b>2.3 Biochemische Methoden</b>	<b>39</b>
<b>2.4 Auswertung, Analyse und Quantifizierung</b>	<b>47</b>

---

<b>3 Ergebnisse</b>	<b>49</b>
<b>3.1 NMDA induziert eine chemische Form der Langzeitdepression (NMDA-LTD) in hippocampalen Schnitten des Maushirns</b>	<b>50</b>
3.1.1 Eine kurzfristige NMDA-Applikation induziert eine langanhaltende Depression exzitatorischer, postsynaptischer Feldpotentiale in hippocampalen Hirnschnitten der Maus	50
3.1.2 NMDA-LTD korreliert mit einer reduzierten GluA1-Expression an der neuronalen Zelloberfläche	51
<b>3.2 Die Arc/Arg3.1-Expression in Neuronen wird auf verschiedenen molekularen Ebenen über vielfältige Prozesse dynamisch reguliert</b>	<b>54</b>
<b>3.3 Die LTD-produzierende NMDA-Applikation vermittelte eine Reduktion der Arc/Arg3.1-Expression</b>	<b>57</b>
3.3.1 Die NMDA-Applikation vermindert die Arc/Arg3.1-Proteinexpression in hippocampalen Gewebeschnitten sowie primären Neuronenkulturen des Maushirns	57
3.3.2 Die Reduktion der Arc/Arg3.1-Proteinexpression wird vermittelt durch die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren mit der GluN2B-Untereinheit	60
3.3.3 Die NMDA-vermittelte Reduktion der Arc/Arg3.1-Proteinexpression benötigt freies Calcium	62
3.3.4 Die Verminderung der ERK1/2-Kinaseaktivität spielt eine Schlüsselrolle bei der NMDA-vermittelten Reduktion der Arc/Arg3.1-Expression	63
3.3.5 Neben der Proteinexpression ist auch die Arc/Arg3.1-mRNA-Expression durch den LTD-produzierenden NMDA-Stimulus vermindert	66
3.3.6 Die NMDA-vermittelte Reduktion der Arc/Arg3.1-Expression erfolgt auf Transkriptions- und Translationsebene	68
3.3.7 Die NMDA-abhängige Reduktion der Arc/Arg3.1-Proteinexpression ist unabhängig vom UPS-vermittelten Proteinabbau	70
<b>3.4 Arc/Arg3.1-Knockout Mäuse zeigen keine Beeinträchtigung in der NMDA-vermittelten Reduktion der GluA1-Expressionslevel</b>	<b>72</b>

---

<b>4 Diskussion</b>	<b>75</b>
<b>4.1 Korreliert mit der bidirektionalen Regulation der synaptischen Plastizität führt die Aktivierung der NMDA-Rezeptoren zur bidirektionalen Veränderung der Arc/Arg3.1-Expression</b>	<b>77</b>
4.1.1 NMDA-Rezeptoren: der Initiator für die Plastizität-korrelierte dynamische Änderung der Arc/Arg3.1-Expression	77
4.1.2 Calcium: der klassische sekundäre Botenstoff	79
4.1.3 Die MAP-Kinase ERK1/2: ein zentraler enzymatischer Schalter der Arc/Arg3.1-Expression	79
4.1.4 Arc/Arg3.1-Transkription und -Translation: das Ziel der dynamischen Regulation	81
<b>4.2 Ungewisse funktionelle Rolle von Arc/Arg3.1 für die Induktion und Expression der NMDA-LTD</b>	<b>84</b>
<b>4.3 Arc/Arg3.1, ein Plastizitätsmarker mit metaplastischer Funktion</b>	<b>86</b>
<b>5 Anhang</b>	<b>89</b>
5.1 Literaturverzeichnis	90
5.2 Abkürzungsverzeichnis	99
5.3 Eidesstattliche Versicherung	103



---

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mit ihrer Unterstützung zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dietmar Kuhl für die Überlassung des faszinierenden Themas, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und die gewährte Freiheit für die Durchführung aller notwendigen Experimente. Bei Herrn Prof. Dr. Christian Lohr bedanke ich mich für die Übernahme der Gutachterfunktion. Herrn Dr. Xiasong Mao danke ich besonders für seinen immer kritischen und wissenschaftlichen Rat, sowie die sehr gute Betreuung! Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Kollegen des „Institute for Molecular and Cellular Cognition“ für die nette Arbeitsatmosphäre bedanken. Vielen Dank an Lars, Tiemo, Daniel, Sandra, Sergio, Xiaoyan und Karin – für wissenschaftlich, erfrischende Diskussionen und die DoSe-freie Zeit!

Vielen Dank an Äxl, Jobsti, Mani, Mode-Ronald, Dieter und Horst, Michael Night, Florian, Schanine, Caro und Lea – ihr habt die Zeit unvergesslich gemacht! Bei meiner Familie und Lea möchte ich mich für die niemals endende Unterstützung, Geduld und die immer offenen Ohren bedanken.

Vielen Dank!

## Zusammenfassung

Eine entscheidende Grundlage für die Fähigkeit unseres Gehirns Informationen zu speichern, stellt die aktivitätsabhängige Veränderbarkeit der synaptischen Transmission dar. Eine besondere Rolle spielen dabei NMDA-Rezeptoren. Aufgrund ihrer molekularen Eigenschaften können NMDA-Rezeptoren Hebb'sche Formen der synaptischen Plastizität (LTP und LTD) bidirektional regulieren. Für die langanhaltende Modifizierung der synaptischen Transmission ist eine Neusynthese von mRNA und Proteinen notwendig. Eine der ersten Prozesse in synaptischer Plastizität ist daher die unmittelbare Expression aktivitätsregulierter Gene. Ein solches aktivitätsreguliertes Gen ist Arc/Arg3.1. Die Arc/Arg3.1-Expression wurde gezeigt durch verschiedene Plastizität-produzierende Stimulationen induziert zu werden. In diesem Zusammenhang wurde demonstriert, dass die Arc/Arg3.1-Expression im Hippocampus durch LTP-induzierende, elektrische Stimulationen induziert werden kann. Die Expression von Arc/Arg3.1 wird dabei durch NMDAR-abhängige Mechanismen erhöht und trägt zur Stabilisierung der LTP bei. Interessanterweise konnten verschiedene Studien einen Einfluss der Arc/Arg3.1-Expression auf NMDAR-abhängige Formen der LTD nachweisen. Die Regulation der Arc/Arg3.1-Expression durch LTD-produzierende, NMDAR-abhängige Stimuli, sowie die physiologische Wirkung von Arc/Arg3.1 auf die NMDAR-abhängige LTD stellen die zentrale Fragestellung dieser Arbeit dar.

Basierend auf einem chemischen Protokoll zur LTD-Induktion konnte ich durch kurzfristige Applikation von NMDA, die Veränderung der Arc/Arg3.1-Expression auf Protein-, als auch mRNA-Ebene quantitativ analysieren. Überraschenderweise bewirkte dieser Stimulus eine Reduktion der Arc/Arg3.1-Expression in primären Neuronenkulturen und hippocampalen Gewebeschnitten des Maushirns. In weiteren Experimenten konnte ich darlegen, dass die Reduktion der Arc/Arg3.1-Expression durch die Aktivierung GluN2B-haltiger NMDA-Rezeptoren, den sekundären Botenstoff Calcium und die Deaktivierung der ERK1/2-Kinase reguliert wird. Interessanterweise konnte ich neben der Arc/Arg3.1-Transkription auch die Arc/Arg3.1-Translation als Ziel der NMDAR-initiierten Signalübertragung identifizieren. Ein Modell zur Erklärung der synaptischen Plastizität ist die regulierte Expression von AMPA-Rezeptoren an der neuronalen Zelloberfläche. Um die Funktion von Arc/Arg3.1 für NMDAR-abhängige Formen der LTD zu analysieren wurden AMPAR-Expressionslevel in hippocampalen Hirnschnitten von Arc/Arg3.1-Wildtyp- und Arc/Arg3.1-Knockout-Mäusen per Oberflächen-Biotinylierung biochemisch analysiert. Meine Ergebnisse legen dar, dass die NMDAR-abhängige Form der LTD, ähnlich der elektrischen oder DHPG-induzierten LTD, mit einer reduzierten Expression GluA1-haltiger AMPA-Rezeptoren an der neuronalen Zelloberfläche einhergeht. Im Gegensatz zu den anderen Formen der LTD zeigte der Verlust des Arc/Arg3.1-Gens in den

Arc/Arg3.1-Knockout-Mäusen, keine Beeinträchtigungen in der Reduktion der GluA1-Expression. Diese Beobachtung ließ sich darüber hinaus in elektrophysiologischen Untersuchungen in unserem Labor bestätigen. Dies zeigt, dass die NMDA-LTD in den hippocampalen Hirnschnitten der Arc/Arg3.1-Knockout-Mäuse intakt ist.

Zusammengefasst ließ sich in dieser Arbeit feststellen, dass die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren eine bidirektionale Regulation der synaptischen Effizienz und parallel eine Veränderung der Arc/Arg3.1-Expression bewirkt. So zeigt sich, dass eine LTP mit einer Erhöhung und umgekehrt eine LTD mit einer Reduktion der Arc/Arg3.1-Expression einhergeht. Es bleibt jedoch zu klären, inwieweit eine Reduktion der Arc/Arg3.1-Expression eine Voraussetzung für die Induktion und Konsolidierung der NMDA-LTD darstellt. Alternativ könnte die Reduktion eine wichtige Funktion bei anschließenden metaplastischen Prozessen spielen. Die Funktion von Arc/Arg3.1 in der Endozytose von AMPA-Rezeptoren scheint nicht für alle Formen der LTD notwendig zu sein. So kann im Gegensatz zum mGluR-LTD, die Konsolidierung der NMDA-LTD unabhängig von der Arc/Arg3.1-Expression vermittelt werden. Dies lässt vermuten, dass in Neuronen Arc/Arg3.1-unabhängige Mechanismen zur Endozytose von AMPA-Rezeptoren existieren.



## Summary

Activity-dependent expression of immediate-early genes (IEGs) is essential for enduring forms of synaptic plasticity. Arc/Arg3.1 transcription is robustly induced by plasticity-producing stimulations which require activation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors and mitogen-activated protein kinases / extracellular signal-regulated kinase (ERK). Arc/Arg3.1 protein is involved in diverse forms of synaptic plasticity, for example in both long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD). One of Arc/Arg3.1's major functions is the regulated expression of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) receptors on the neuronal surface. However, the precise mechanism of Arc/Arg3.1's molecular action and its regulation in NMDA receptor-dependent LTD remains unknown.

In this study I monitored Arc/Arg3.1 expression in primary cultured neurons and acute hippocampal slices at mRNA and protein levels. I show, that a short-term application of low-dose NMDA, a chemical stimulus to induce NMDAR-dependent LTD, leads to a significant reduction of both Arc/Arg3.1 mRNA and protein. This NMDA-triggered downregulation is based on the downregulation of both transcription and translation of Arc/Arg3.1, requires activation of GluN2B-containing NMDARs and is dependent on NMDA-induced deactivation of ERK. Functional analysis in acute hippocampal slices shows that NMDA treatment decreases GluA1-AMPA receptor surface expression in Arc/Arg3.1-wildtype mice. In contrast to electrically-induced and metabotropic glutamate receptor-dependent forms of LTD, I found that the NMDA-mediated decrease in AMPAR expression was not impaired in Arc/Arg3.1-knockout mice. Moreover, this finding was corroborated in electrophysiological recordings in our lab.

Thus I elucidated a new function of NMDA receptors for bidirectional regulation of Arc/Arg3.1 expression during NMDA receptor-dependent forms of synaptic plasticity. Whereas, LTP is accompanied by an induction of Arc/Arg3.1, NMDA-induced LTD is associated with a reduction of Arc/Arg3.1 expression. However, it is not known whether the reduction of Arc/Arg3.1 expression is required for NMDA-induced LTD. Alternatively, reduction of Arc/Arg3.1-expression might play a role in subsequent metaplastic events. In contrast to mGluR-induced LTD my data suggest that Arc/Arg3.1's function in AMPAR-trafficking is not required for NMDA-LTD. Indicating that Arc/Arg3.1-independent mechanisms for endocytosis of AMPA receptors exist.

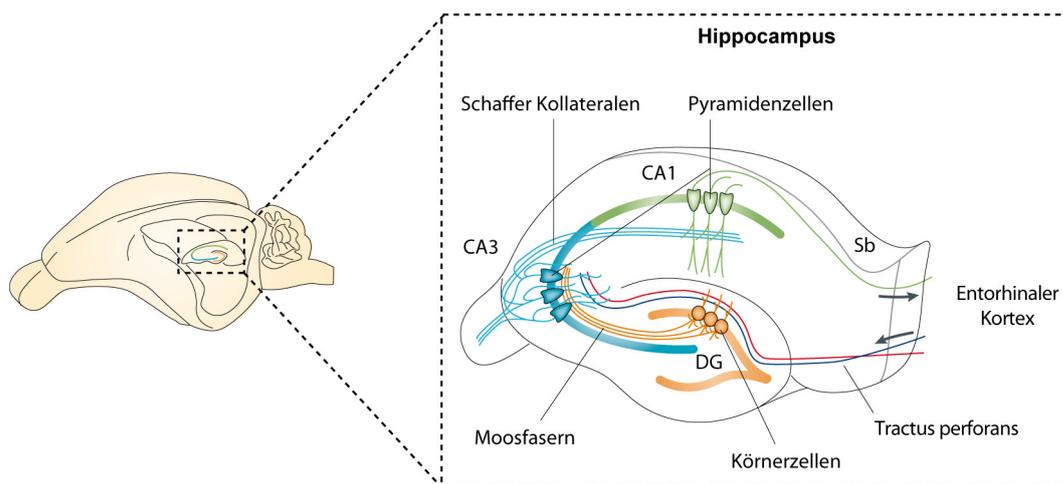


# **1 Einleitung**

## 1.1 Der Hippocampus, eine wichtige Hirnregion für die Gedächtnisbildung

Eine der wichtigsten und rätselhaftesten Fragen in der Wissenschaft ist die Frage, wie das Gehirn Informationen kodiert, speichert und wieder abrufen kann. Grundlegende Funktionen unseres Gehirns zum Erlernen neuer Informationen stellen die Assoziierung und Verarbeitung, sowie die anschließende Speicherung sensorischer Informationen da. Sensorische Reize werden aus unserer Umwelt über verschiedene Sinnesorgane, zum Beispiel dem Auge, der Zunge oder der Haut perzipiert. Anschließend werden die Informationen über sensorische Neurone von den Sinnesorganen zum Zentralnervensystem (ZNS) weitergeleitet. Dort werden die verschiedenen Typen von sensorischen Informationen assoziiert, verarbeitet und gespeichert. Grundlegend für diese Prozessierung der Informationen sind die neuronalen Netzwerke in diversen Gehirnregionen, zum Beispiel dem Hippocampus.

Der Hippocampus stellt eine der am meisten untersuchten Hirnregionen für Lern- und Gedächtnisprozesse dar. Anatomisch liegt der Hippocampus im Temporallappen des Gehirns und lässt sich in folgende Unterregionen einteilen: Das Subiculum (Sb), den Gyrus dentatus (DG) und den Cornu ammonis 1-3 (CA1 – CA3), (vgl. Abb. 1). Die Zellen innerhalb dieser Regionen zeigen eine Laminar-spezifische Organisation. Afferenzen aus verschiedenen sensorischen Arealen des Cortex, z.B.: Sehen, Hören, Riechen, Schmecken, erreichen den Hippocampus über die perirhinalen und entorhinalen Kortizes. Über den Tractus perforans gelangen die Nervenfasern zu den Dendriten der Körnerzellen des Dentate Gyrus. Von dort projizieren die Axone der Körnerzellen (sog. Moosfasern) auf die Dendriten der Pyramiden-



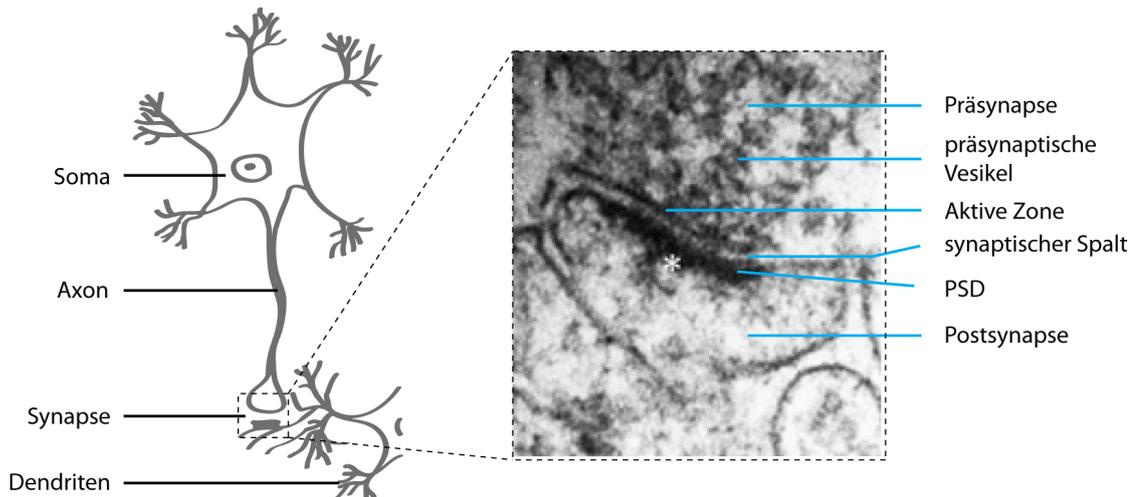
**Abbildung 1: Schematische Darstellung zur Anatomie des Hippocampus.** Als Hippocampus werden heute im Allgemeinen der Gyrus dentatus (DG), das Cornu ammonis mit den Regionen CA1-3, sowie das Subiculum zusammengefasst. Die Abbildung stellt schematisch die neuronale Verschaltung innerhalb des Hippocampus, sowie die wichtigsten Faserverbindungen zu anderen Teilen des Gehirns dar. Informationen aus dem entorhinalen Kortex erreichen den Hippocampus über den Tractus perforans und projizieren in den Gyrus dentatus (DG). Über Moosfasern wird die Information von den Körnerzellen des DGs zu Pyramidalzellen der CA3-Region weitergeleitet. Die Axone der CA3-Pyramidenzellen wiederum projizieren über die Schaffer-Kollateralen auf Pyramidalzellen der CA1-Region. Die CA1-Pyramidenzellen weisen über das Subikulum zurück in den entorhinalen Kortex. Aufgrund dieser trisynaptischen Verschaltung wird dem Hippocampus eine wichtige Funktion zur Integration und Speicherung von Informationen zugeschrieben. (Adaptierte Abbildung aus Neves et al., 2008).

zellen der CA3-Region. Die Axone dieser Pyramidenzellen bilden über sogenannte Schaffer-Kollaterale synaptische Kontakte mit den Dendriten der Pyramidenzellen der CA1-Region aus. Die Axone der Pyramidalzellen verlassen die CA1-Region wiederum über das Subiculum und gelangen erneut in den entorhinalen Kortex. Aufgrund dieser trisynaptischen Verschaltung der Neurone wird dem Hippocampus eine wichtige Funktion als Integrationsschnittstelle für verschiedene sensorische Informationen zugeschrieben. Läsionsstudien konnten erste Hinweise für eine wichtige Rolle des Hippocampus bei der Gedächtnisbildung liefern. Einer der bekanntesten Fälle ist der Patient H.M., der als junger Mann an einer schweren Form der Epilepsie erkrankte. Zur Heilung unterzog er sich einer bilateralen Entfernung seiner medialen Temporallappen. Bei diesem Eingriff wurden zudem große Teile beider Hippocampi entfernt. Dies führte dazu, dass H.M. keine neuen episodischen Gedächtnisinhalte mehr bilden konnte. Interessanterweise waren Informationen, die bereits ins Langzeitgedächtnis überführt wurden, nicht verloren. H.M. erlitt somit eine anterograde Amnesie (Scoville et al., 1957; Squire und Zola-Morgan 1991; Eichenbaum 2013). Tierversuche zur gezielten Läsion, der pharmakologischen Inaktivierung des Hippocampus oder dem Knockout einzelner Gene, konnten die essentielle Funktion des Hippocampus für die Gedächtnisbildung bestätigen.

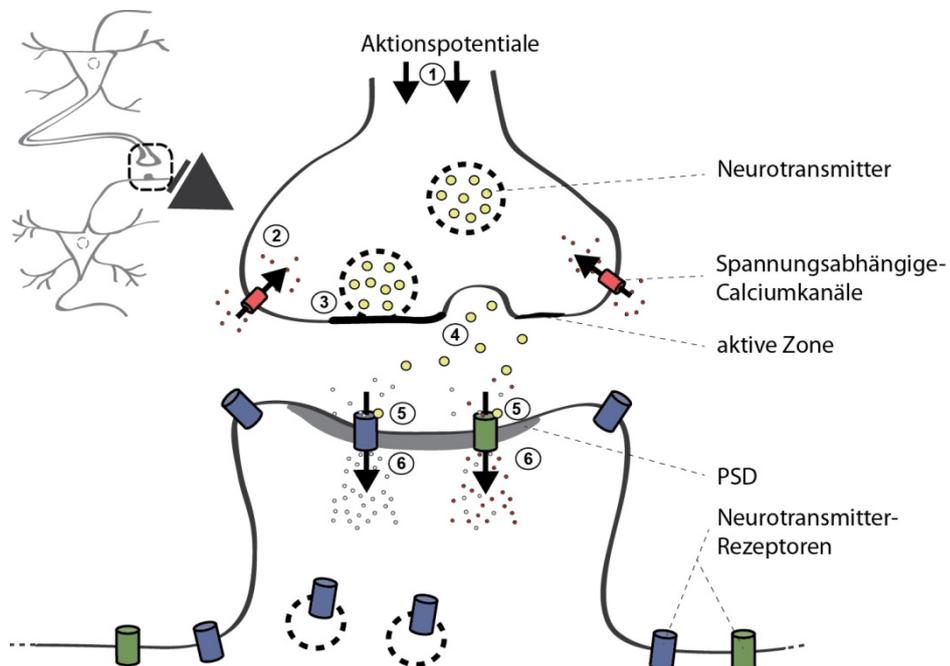
## **1.2 Synaptische Transmission: die Informationsweiterleitung in neuronalen Netzwerken**

Neurone sind in hochkomplexen Netzwerken im Gehirn miteinander verknüpft. Die Kontaktstelle, an der zwei Neurone miteinander in Verbindung stehen, bezeichnet man als Synapse. Je nach Art der Informationsweiterleitung unterscheidet man elektrische und chemische Synapsen. Chemische Synapsen sind dadurch charakterisiert, dass die ankommende Information (in Form von Aktionspotentialen) in ein chemisches Signal (Neurotransmitterfreisetzung) umgewandelt wird. Jede Synapse besteht aus einem präsynaptischen und einem postsynaptischen Bereich (Abb.2). Dies indiziert die Richtung des Informationsflusses – von „prä“ zu „post“. Die Präsynapse wird am verästelten Ende eines Axons gebildet (Bouton). Die Postsynapse hingegen kann sowohl am dendritischen, somatischen als auch axonalen Bereich eines Neurons geformt werden. Die prä- und postsynaptischen Bereiche sind durch einen extrazellulären Raum voneinander getrennt, dem synaptischen Spalt (Abb. 2). Dieser ist seitlich von Gliazellen umgeben, weshalb man zunehmend auch von „Tripartiten Synapsen“ spricht (Perea et al., 2009). Die Übertragung der Information von einem Neuron auf das nächste bezeichnet man als synaptische Transmission. Information wird entlang des Axons in Form von elektrischen Impulsen – den

Aktionspotentialen weitergeleitet. Sie führt zur Depolarisation der präsynaptischen Membran und dadurch zur Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle (vgl. Abb. 3). Calciumionen strömen durch die geöffneten Kanäle und lösen über weitere Signalwege die Fusion von synaptischen Vesikeln mit der präsynaptischen Membran aus. Diese Vesikel enthalten den chemischen Botenstoff, den Neurotransmitter, der die chemische Weiterleitung der Information über den synaptischen Spalt vermittelt. Die freigesetzten Neurotransmitter diffundieren von dem präsynaptischen Fusionsbereich, auch als „aktive Zone“ bezeichnet, durch den synaptischen Spalt und binden auf der postsynaptischen Seite an Rezeptoren (vgl. Abb. 3). Abhängig von den Rezeptortypen, die auf der postsynaptischen Seite exprimiert werden, unterscheiden wir (1) erregende (exzitatorische) und (2) inhibierende (inhibitorische) Synapsen. Charakteristisch für exzitatorische Synapsen ist eine elektronendichte Struktur auf der postsynaptischen Seite, die postsynaptische Dichte (PSD), (vgl. Abb. 3). In der PSD sind die Neurotransmitter-Rezeptoren über verschiedene Adapter- und Gerüstproteine in dem postsynaptischen Bereich verankert (Husi et al., 2000; Sheng & Kim, 2002; Feng und Zhang, 2009). Die Bindung der Neurotransmitter an ihren Rezeptor führt zur Öffnung des Rezeptors und vermittelt einen Einstrom von Natriumionen in die Postsynapse. Solche Rezeptoren werden ionotrope Rezeptoren oder ligandengesteuerte Ionenkanäle genannt. Der Influx von Natriumionen führt zur Depolarisation der postsynaptischen Membran und bewirkt die Öffnung weiterer spannungsabhängiger Ionenkanäle. Das chemische Signal, vermittelt durch die Neurotransmitterfreisetzung, wird somit wieder in ein elektrisches Signal umgewandelt. Diese elektrisch-chemisch-elektrische Transformation der Information ermöglicht es unserem Gehirn erworbene sensorische Informationen zu integrieren. Modifizierungen der synaptischen Transmission, Verstärkung oder Abschwächung, sind entscheidend für die Fähigkeit unseres Gehirns zu lernen und neue Informationen zu speichern (Hebb, 1949; Stent, 1973; Bliss & Lomo, 1973; Bliss & Collingridge, 1993; Pastalkova et al., 2006). Diese Eigenschaft der aktivitätsabhängigen Veränderung der synaptischen Effizienz wird als synaptische Plastizität bezeichnet (Ho et al., 2011).



**Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Neurons.** Links: Das Neuron wird unterteilt in einen somatischen, axonalen und dendritischen Teil. Der Dendrit ist die "Input"- und das Axon die "Output"-Region der Nervenzelle. Die Übertragung der Information von einem Neuron auf das nächste erfolgt an Synapsen. Eine Synapse ist gekennzeichnet durch einen präsynaptischen und einen postsynaptischen Bereich. Beide Bereiche sind durch einen synaptischen Spalt voneinander getrennt. Rechts: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer exzitatorischen glutamatergen Synapse. Charakteristisch für den präsynaptischen Bereich ist die große Anzahl präsynaptischer Vesikel. Der postsynaptische Bereich hingegen lässt sich deutlich an einer elektronendichten Struktur erkennen. Diese Struktur wird als postsynaptische Dichte (PSD) bezeichnet.



**Abbildung 3: Grundprinzip der synaptischen Transmission an einer exzitatorischen chemischen Synapse.** (1) Aktionspotentiale werden über das Axon zur Präsynapse weitergeleitet. (2) Depolarisierung der präsynaptischen Membran und Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle. (3) Calcium vermittelt die Fusion von Neurotransmittervesikeln mit der präsynaptischen Membran. (4) Freisetzung und anschließende Diffusion der Neurotransmitter durch den synaptischen Spalt. (5) Neurotransmitter binden an Liganden-gesteuerte Rezeptoren auf der postsynaptischen Membran. (6) Einstrom von Ionen in die Postsynapse und Depolarisation der postsynaptischen Membran.

### **1.3 Synaptische Plastizität ist ein zelluläres Korrelat für Prozesse des Lernens und der Gedächtnisbildung**

Im menschlichen Gehirn sind ca.  $8,6 \times 10^{10}$  Neurone über  $10^{14}$  bis  $10^{15}$ -Synapsen miteinander verknüpft. Das bedeutet, dass jedes Neuron durchschnittlich 10.000 bis 100.000 Synapsen mit anderen Neuronen bildet (Herculano-Houzel, 2009 und 2012). Dieses hochkomplexe neuronale Netzwerk, das bereits während der Entwicklung des Gehirns angelegt wird, ist nicht starr, sondern unterliegt ständigen Veränderungen. Bereits 1949 postulierte der kanadische Psychologe Donald O. Hebb, dass die korrelierte Aktivierung eines prä- und postsynaptischen Neurons zur Verstärkung ihrer synaptischen Verbindung führt. Eine unkorrelierte Aktivierung beider Neurone wurde hingegen angenommen, eine Abnahme der synaptischen Effizienz zu vermitteln (Stent, 1973). Bis heute ließen sich unterschiedlichste molekulare Mechanismen identifizieren, die eine Verstärkung, Abschwächung, Auflösung oder Neubildung von Synapsen regulieren (Malenka & Bear, 2004; Citri & Malenka, 2008). Diese Modifizierungen der synaptischen Effizienz werden durch molekulare Prozesse auf prä- und postsynaptischer Seite vermittelt und können zu kurzfristigen (Sekunden bis Stunden) oder langfristigen (Tage bis Wochen) Veränderungen der synaptischen Transmission führen. Eine langfristige Verstärkung der synaptischen Effizienz bezeichnet man als Langzeitpotenzierung (LTP, vom engl.: *long-term potentiation*), eine langfristige Abschwächung hingegen als Langzeitdepression (LTD, vom engl.: *long-term depression*). Es wird angenommen, dass diese Phänomene ein Korrelat für Lern- und Gedächtnisvorgänge auf zellulärer Ebene darstellen (Malenka & Bear, 2004; Citri & Malenka, 2008). Zellbiologische und biochemische Methoden ermöglichen es die zellulären und molekularen Veränderungen beim Lernen und der Gedächtnisbildung detailliert zu erforschen.

### **1.4 Molekulare Mechanismen der synaptischen Plastizität**

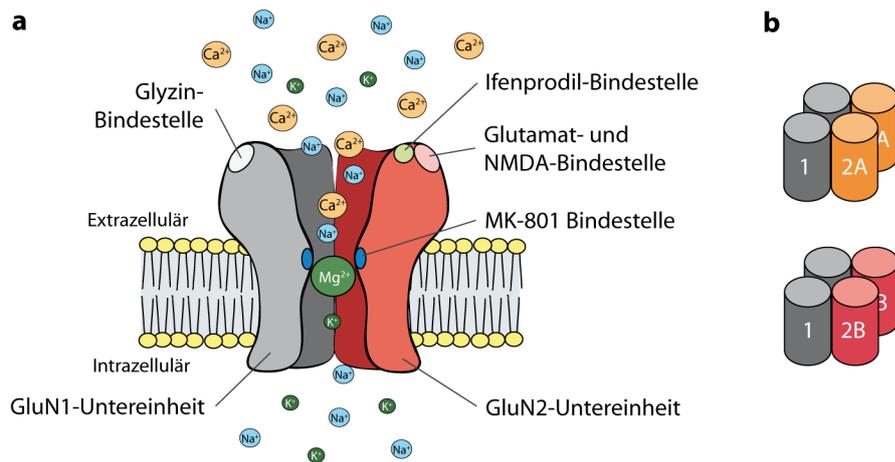
Der meist vertretene exzitatorische Neurotransmitter im ZNS von Vertebraten ist die Aminosäure Glutamat. Glutamat wird von verschiedenen Rezeptoren auf der postsynaptischen Membran gebunden. Neben den Ionenkanal-gekoppelten (ionotropen) Glutamatrezeptoren aktiviert Glutamat auch metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluRs), die über G-Proteine und nachgeschalteten Signalkaskaden die Signalverarbeitung in der Synapse beeinflussen. Die zwei Hauptklassen der ionotropen Glutamatrezeptoren bilden der *N-Methyl-D-Aspartat* (NMDA)-Rezeptor und der  *$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionat* (AMPA)-Rezeptor. AMPA-Rezeptoren vermitteln nach Aktivierung durch Glutamat einen schnellen Natriumioneneinstrom und damit eine Depolarisation der postsynaptischen Membran. Die

Aktivierung der NMDA-Rezeptoren benötigt hingegen ein zusätzliches Signal, damit sich der Ionenkanal öffnet. So ist der Ionenkanal des NMDA-Rezeptors im Ruhezustand durch  $Mg^{2+}$ -Ionen blockiert (vgl. Abb. 4b). Erst durch die Depolarisierung der postsynaptischen Membran wird dieser  $Mg^{2+}$ -Block freigesetzt und Calciumionen können in den postsynaptischen Bereich einströmen. Der NMDA-Rezeptor wird deshalb auch als Koinzidenz-Detektor für eine korrelierte prä- und postsynaptische Aktivierung bezeichnet. Eine Besonderheit des NMDA-Rezeptors besteht darin, dass er die Stärke der synaptischen Verbindung bidirektional regulieren kann. Abhängig vom Aktivitätszustand der beteiligten Neurone bewirkt er so eine Potenzierung (LTP) oder Depression (LTD) der synaptischen Effizienz (Bear & Malenka, 2004; Lüscher & Malenka, 2012).

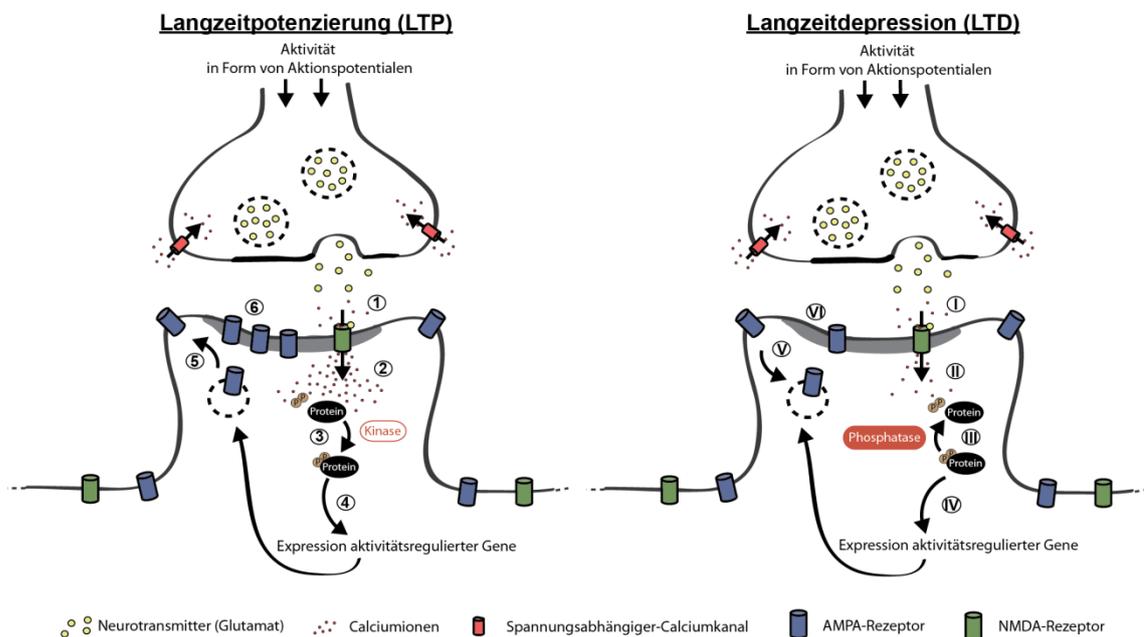
#### 1.4.1 NMDA-Rezeptoren regulieren die synaptische Plastizität bidirektional

NMDA-Rezeptoren bilden heterotetramere Transmembranproteine aus den GluN1 und GluN2-Untereinheiten des NMDA-Rezeptors (Cull-Candy & Leszkiewicz, 2004). Die vorwiegend im Hippocampus exprimierten Subtypen des NMDA-Rezeptors sind die GluN1/GluN2A-haltigen und die GluN1/GluN2B-haltigen NMDA-Rezeptoren (Monyer et al., 1992 und 1994), (vgl. Abb. 4a). Die Expression GluN2C- bzw. GluN2D-haltiger NMDA-Rezeptoren ist auf das Cerebellum bzw. den Hirnstamm beschränkt (Monyer et al., 1992 und 1994). Die GluN1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors vermittelt die Bindung des Kofaktors Glycin bzw. Serin (Johnson & Ascher, 1987; Klecker & Dingledine, 1988; Cull-Candy & Leszkiewicz, 2004; Papouien et al., 2012). Die GluN2-Untereinheit formt die Bindungsstelle für den Neurotransmitter Glutamat bzw. dem Agonisten *N-Methyl-D-Aspartat* (NMDA), (Abb. 4b), (Laube et al., 1997; Cull-Candy & Leszkiewicz, 2004). Die Applikation von NMDA ermöglicht somit eine Glutamat-unabhängige Aktivierung des NMDA-Rezeptors. Darüber hinaus ließen sich eine Vielzahl weiterer Bindungsstellen identifizieren, die die Aktivität des NMDA-Rezeptors modulieren können (vgl. Abb. 4b). So bindet der nicht-kompetitive NMDAR-Antagonist *Dizocilpine* (MK-801) im Ionenkanal des NMDA-Rezeptors und inhibiert unter anderem den Calciumstrom über aktivierte NMDA-Rezeptoren. Der NMDAR-Antagonist *2-Amino-5-phosphonovaleriansäure* (APV) bindet kompetitiv an die Glutamat/NMDA-Bindestelle und verhindert somit die Aktivierung des NMDA-Rezeptors (Laube et al., 1997). In weiteren Untersuchungen ließen sich selektive Inhibitoren für einzelne Subtypen des NMDA-Rezeptors identifizieren. Ein selektiver nicht-kompetitiver Antagonist für GluN2B-haltige NMDA-Rezeptoren ist Ifenprodil (Perin-Dureau et al., 2002). Ifenprodil wurde gezeigt an den N-terminalen Bereich der GluN2B-Untereinheit zu binden und dadurch die Öffnungswahrscheinlichkeit GluN2B-haltiger NMDA-

Rezeptoren zu reduzieren (Legendre & Westbrook, 2001; Perin-Dureau et al., 2002). Durch die Verwendung dieser spezifischen Antagonisten konnte die Bedeutung des NMDA-Rezeptors für verschiedene Formen der synaptischen Plastizität aufgedeckt werden. So konnten im Hippocampus der Maus und Ratte NMDAR-abhängige Formen der LTP und LTD identifiziert werden (Mulkey und Malenka., 1992; Malenka & Bear, 2004; Malenka und Lüscher et al., 2012). In pharmakologischen Studien ließen sich zudem chemische Stimulationsprotokolle zur Induktion NMDAR-abhängiger LTP und LTD etablieren (Musleh et al., 1997; Lee et al., 1998; Lu et al., 2001). Zur Erklärung der NMDAR-abhängigen bidirektionalen Regulation von synaptischer Plastizität wurden verschiedene Modelle aufgestellt, die im Folgenden näher erläutert werden. Das „Lisman Modell“ nimmt einen unterschiedlichen Grad der NMDAR-Aktivierung während der LTP- bzw. LTD-Induktion an (Lisman et al., 1989; Malenka et al., 1994; Cummings 1996; Nishiyama 2000). Dabei ist die Richtung der synaptischen Plastizität (LTP oder LTD) an die intrazelluläre Konzentration von Calcium gekoppelt. So bewirkt eine starke Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration die Aktivierung von Kinasen und induziert eine Potenzierung der synaptischen Effizienz (LTP). Ein leichter Einstrom von Calcium in die Zelle fördert hingegen die Aktivierung von Phosphatasen und induziert eine LTD (Lisman et al., 1989; Mulkey & Malenka, 1992; Malenka et al., 1994; Bear & Malenka, 2004), (vgl. Abb. 5). Alternative Modelle erklären die Bidirektionalität auf Grundlage unterschiedlicher biophysikalischer Eigenschaften der einzelnen NMDAR-Subtypen (Liu et al., 2004; Massey et al., 2004). Durch die Verwendung Subtyp-spezifischer Inhibitoren ließ sich zeigen, dass die Aktivierung GluN2B-haltiger NMDA-Rezeptoren für die Induktion der hippocampalen, NMDAR-abhängigen LTD notwendig ist. GluN2A-haltige NMDA-Rezeptoren scheinen hingegen eine wichtige Funktion für die Stabilisierung des NMDAR-abhängigen LTPs zu haben (Massey et al., 2004; Liu et al., 2004). Durch welche Mechanismen die einzelnen NMDAR-Subtypen die synaptische Plastizität bidirektional regulieren können, ist bislang nicht geklärt. Es ist jedoch anzunehmen, dass Unterschiede in den carboxyterminalen Enden der GluN2A- und GluN2B-Untereinheit eine wichtige Funktion für die Regulation der synaptischen Plastizität haben (Wang et al., 2011). So ließen sich unterschiedliche Interaktions- und Phosphorylierungsmotive in der carboxyterminalen Aminosäuresequenz der GluN2A- und GluN2B-Untereinheit identifizieren. Diese Motive sind für die Lokalisation des NMDA-Rezeptors in der Zelle, für Protein-Interaktionen und die Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden wichtig (Salter und Kalia, 2004; Kim et al., 2005; Wang et al., 2013). Eine wichtige, vom NMDA-Rezeptor regulierte, Signalkaskade ist der Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalweg (Thomas & Huganir et al., 2004; Kim et al., 2005; Wang et al., 2013).



**Abbildung 4: Schematischer Aufbau des NMDA-Rezeptors.** (a) NMDA-Rezeptoren bilden heterotetramere Proteinkomplexe aus den NMDAR-Untereinheiten GluN1-GluN3. Die im Hippocampus vorwiegend exprimierten Subtypen des NMDA-Rezeptors sind die GluN1/GluN2A-haltigen und die GluN1/GluN2B-haltigen NMDA-Rezeptoren. (b) Schematischer Aufbau des NMDA-Rezeptors und einiger Bindungsstellen. Magnesiumionen ( $Mg^{2+}$ ) blockieren unter basalen Bedingungen den Ionenstrom über den NMDA-Rezeptor. Durch Depolarisation der Membran löst sich der Magnesium-Block und Calcium-, Natrium- und Kaliumionen können durch den Ionenkanal des NMDA-Rezeptors diffundieren. Neben Bindestellen für Glutamat und NMDA konnten modulatorisch wirkende Bindungsstellen für Antagonisten des NMDA-Rezeptor identifiziert werden (MK-801, Ifenprodil, APV).



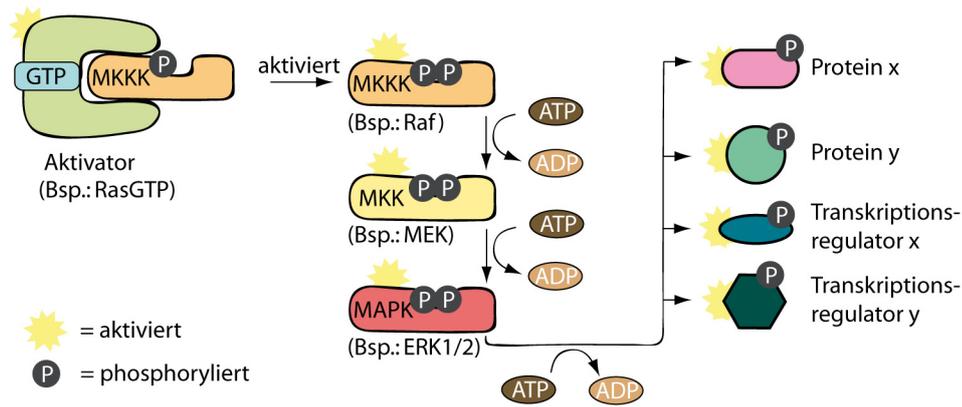
**Abbildung 5: Synaptische Plastizität an exzitatorischen, chemischen Synapsen.** (1) (I) Die Präsynaptische Glutamatfreisetzung führt zur Depolarisation der postsynaptischen Membran und anschließend zur Glutamat-abhängigen Öffnung der NMDA-Rezeptoren. NMDA-Rezeptoren vermitteln einen Einstrom von Kalziumionen in den postsynaptischen Bereich. Abhängig vom Aktivierungszustand der beteiligten Neurone bewirkt er eine Potenzierung oder Depression der synaptischen Effizienz. Ein starker Einstrom von Kalziumionen (2) führt zur Aktivierung von Kinasen (3) und stimuliert die Expression aktivitätsregulierter Gene (4). Hingegen führt eine leichte Erhöhung der Kalziumkonzentration (II) zur Aktivierung von Phosphatasen (III), die wiederum die Expression aktivitätsregulierter Gene beeinflussen können (IV). Durch die Kontrolle der Genexpression können AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran insertiert (5) bzw. von der postsynaptischen Membran internalisiert (V) werden. Dies führt zur Potenzierung (6) bzw. Depression (VI) der synaptischen Effizienz.

### 1.4.2 Der MAP-Kinase-Signalweg

Eine der am meist untersuchten Signalkaskaden der neuronalen Signaltransduktion ist der Mitogen-aktivierte-Proteinkinase (MAPK)-Signalweg. Der MAPK-Signalweg ist ein Phosphor-Relay-System, bei dem Phosphatgruppen über nacheinander geschaltete Kinasen auf ein Substrat übertragen werden (vgl. Abb. 6). So phosphorylieren MAP-Kinasen (MAPK) Serine und Threonine entsprechender Zielproteine. Die Aktivität der MAP-Kinasen wird über weitere Kinasen, den sogenannten MAPK-Kinasen (MKK) kontrolliert, die wiederum einer aktivitätsabhängigen Regulation durch MAPK-Kinase-Kinasen (MKKKs) unterliegen (vgl. Abb. 6). Die Aktivierung von MAPK-Phosphatasen (MKPs) können diesen Prozess negativ regulieren und eine Dephosphorylierung entsprechender Substrate vermitteln. Das Zusammenspiel von Kinasen und Phosphatasen ermöglicht so die gezielte Aktivierung und Inaktivierung nachgeschalteter Enzyme.

Arbeiten von John E. Lisman und Robert C. Malenka konnten darlegen, dass der aktivitätsabhängige Calciumstrom über den NMDA-Rezeptor die Aktivierung nachgeschalteter Kinasen und Phosphatasen reguliert (Lisman et al., 1989; Mulkey & Malenka, 1992; Malenka et al., 1994; Bear & Malenka, 2004). Nachfolgende Studien konnten zeigen, dass NMDA-Rezeptoren die Aktivität der Extrazellulären-Signalregulierten Kinase (ERK) 1/2, eine MAP-Kinase beeinflussen können (Thomas & Huganir, 2004). Neuere Untersuchungen von Morgan Sheng und Benjamin Hall konnten darüber hinaus erstmals Hinweise für eine unterschiedliche Regulation der ERK1/2-Kinase durch einzelne Subtypen des NMDA-Rezeptors demonstrieren. So ließ sich in primären Neuronenkulturen zeigen, dass die pharmakologische Inhibition bzw. der Knockout GluN2B-haltiger NMDA-Rezeptoren die Aktivität der ERK1/2-Kinase verstärkt (Kim et al., 2005; Wang et al., 2013). Dies lässt vermuten, dass GluN2B-haltige NMDA-Rezeptoren für (1) die Inaktivierung oder (2) Inhibition der ERK1/2-Kinaseaktivität erforderlich sind.

Ferner ist bekannt, dass die Aktivierung der ERK1/2-Kinase eine essentielle Funktion für NMDAR-abhängige Formen der synaptischen Plastizität hat. Durch die Verwendung spezifischer MAPK/ERK-Kinase (MEK)-Inhibitoren (vgl. Abb. 6) ließ sich die Expression stabiler Formen der NMDAR-abhängigen LTP, aber nicht LTD in akuten hippocampalen Hirnschnitten blockieren (English and Sweatt, 1996 und 1997; Atkins et al., 1998; Bolshakov et al., 2000; Ohno et al., 2001; Gallagher et al., 2004). NMDA-Rezeptoren scheinen somit nicht nur die Effizienz der synaptischen Übertragung, sondern auch grundlegende molekulare Mechanismen, wie die Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden, bidirektional regulieren zu können.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Signalwegs.** Der MAPK-Signalweg ist ein Phosphor-Relay-System, bei dem Phosphatgruppen über nacheinander geschaltete Kinasen auf ein Substrat übertragen werden. Die Stimulation eines „Aktivators“ (z.B.: RasGTP) führt zur Phosphorylierung und damit Aktivierung einer MAPK-Kinase-Kinase (MKKK, z.B.: Raf). Die MKKK phosphoryliert und aktiviert eine MAPK-Kinase (MKK, z.B.: MEK), die anschließend die nachgeschaltete MAP-Kinase (MAPK, z.B.: ERK1/2) phosphoryliert. Die aktivierte MAP-Kinase kann schließlich Serine und Threonine entsprechender Zielproteine phosphorylieren. Zielproteine können z.B. Transkriptions- oder Translationsfaktoren, weitere Kinasen oder Transportproteine sein. Durch die Aktivierung von MAPK-Phosphatasen (MKPs) können aktivierte MAP-Kinasen wieder inaktiviert werden.

#### 1.4.3 NMDA-Rezeptoren regulieren die Expression von AMPA-Rezeptoren an der neuronalen Zelloberfläche

AMPA-Rezeptoren bilden heterotetramere Proteinkomplexe aus den Untereinheiten GluA1 bis GluA4. Die vorwiegend im Hippocampus exprimierten Konformationen sind die homodimeren GluA1/GluA2- bzw. GluA2/GluA3-haltigen AMPA-Rezeptoren (Keinänen et al., 1990; Wenthold et al., 1996). Unterschiede in den funktionellen Eigenschaften der AMPAR-Subtypen basieren auf den unterschiedlichen intrazellularen, carboxyterminalen Enden der einzelnen AMPAR-Untereinheiten (Malinow and Malenka et al., 2002; Collingridge et al., 2004; Derkach et al., 2007). So können die C-Termini durch Interaktionen mit anderen Proteinen posttranslational modifiziert werden und dadurch den Transport, die Lokalisierung, die Stabilität und die elektrophysiologischen Eigenschaften des Rezeptors regulieren (Benke et al., 1998; Lee et al., 1998; Kameyama et al., 1998; Lee et al., 2003). Eine besondere Rolle für die Funktion der AMPA-Rezeptoren scheint die GluA2-Untereinheit zu spielen. So sind homomere AMPA-Rezeptoren, die ausschließlich aus der GluA1-Untereinheit bestehen, permeabel für Calciumionen (Isaac et al., 2007; Man, 2011; Shepherd, 2012). Die homodimeren GluA1/GluA2- bzw. GluA2/GluA3-haltige AMPA-Rezeptoren zeigen hingegen keine Calciumpermeabilität (Isaac et al., 2007; Man, 2011; Shepherd, 2012). Während GluA2/GluA3-haltige AMPA-Rezeptoren eine wichtige Funktion für den basalen Turnover von AMPA-Rezeptoren an der neuronalen Zelloberfläche haben, ist die Insertion und Internalisierung GluA1/GluA2-haltiger

AMPA-Rezeptoren aktivitätsabhängig reguliert (Shi et al., 2001; Shepherd & Huganir, 2007; Kessel & Malinow, 2009).

Ein Modell zur Erklärung der synaptischen Plastizität bezieht sich auf die regulierte Expression von AMPA-Rezeptoren an der postsynaptischen Membran. Es ist bereits bekannt, dass NMDA-Rezeptoren die Richtung der synaptischen Plastizität bidirektional regulieren können (siehe 1.4.1.). So ließ sich demonstrieren, dass diese bidirektionale Regulation der synaptischen Stärke mit einer bidirektionalen Veränderung der AMPAR-Anzahl an der neuronalen Zelloberfläche einhergeht (Song et al., 2002; Shepherd & Huganir, 2007; Kessel & Malinow, 2009). Es konnte dargelegt werden, dass NMDAR-induzierte Formen des LTPs mit einer Insertion von AMPA-Rezeptoren an der neuronalen Zelloberfläche assoziiert sind. (Shi et al., 1999; Lu et al., 2001; Liao et al., 2001; Park et al., 2004; Williams et al., 2007; Shepherd & Huganir, 2007; Kessel & Malinow, 2009). LTD-induzierende, NMDAR-abhängige Stimulationen wurden hingegen gezeigt eine Internalisierung von AMPA-Rezeptoren aus der postsynaptischen Membran zu vermitteln (Lee et al., 2003; Colledge et al., 2003; Snyder et al., 2005; Waung et al., 2008). NMDA-Rezeptoren können somit die Expression von AMPA-Rezeptoren an der neuronalen Zellmembran aktivitätsabhängig regulieren (vgl. Abb. 5).

## 1.5 Das aktivitätsregulierte Gen Arc/Arg3.1

Um Veränderungen der synaptischen Transmission zu stabilisieren, ist eine Neusynthese von mRNA und Proteinen notwendig (Kelleher III et al., 2004). Eine der ersten Mechanismen in synaptischer Plastizität ist daher die Expression aktivitätsregulierter Gene. Eine besondere Klasse dieser aktivitätsregulierten Genen sind die sogenannten „unmittelbar früh exprimierten Gene“ (IEG, vom engl.: *immediate early gene*). IEGs sind von besonderer Bedeutung, da deren Expression unmittelbar durch neuronale Aktivität angeschaltet wird. Dabei ist die Expression der IEGs unabhängig von einer neuen Proteinsynthese und basiert lediglich auf posttranslationalen Modifikationen bereits existierender Proteine, wie Transkriptionsfaktoren. Je nach ihrer Funktion unterscheiden wir zwei verschiedene Klassen der IEGs: (1) IEGs als Genregulator und (2) IEGs als Effektor. Regulatorische IEGs, wie c-fos, Egr-1 oder Npas4 kontrollieren die Expression weiterer nachgeschalteter Gene, die sogenannten „*late response genes*“ (Morgan et al., 1987; Cole et al., 1989; Lin et al., 2008). Effektor-IEGs hingegen wirken direkt in der Stabilisierung von kurzfristigen in die langfristigen Veränderungen der synaptischen Effizienz. Ein Effektor-IEG, mit dem ich mich in dieser Arbeit beschäftigt habe ist das „*activity-regulated gene of 3.1kb transcript length*“ (Arg3.1), auch bekannt als „*activity-regulated cytoskeleton-associated protein*“ (Arc).

### 1.5.1 Die Arc/Arg3.1-Expression ist aktivitätsabhängig reguliert

Das Gen Arc/Arg3.1 wurde zeitgleich in den Laboren von Prof. Dietmar Kuhl bzw. Prof. Paul Worley identifiziert (Link et al., 1995; Lyford et al., 1995). Wie bei vielen IEGs der Fall, wurde die aktivitätsregulierte Genexpression von Arc/Arg3.1 nach Einsetzen eines pharmakologisch bzw. elektrisch ausgelösten epileptischen Krampfanfalls gefunden. Nachfolgende Untersuchungen konnten eine Vielzahl weiterer Stimuli identifizieren, die die Expression des Arc/Arg3.1-Gens induzieren.

Experimente in akuten hippocampalen Hirnschnitten konnten zeigen, dass die Arc/Arg3.1-Expression durch elektrische, LTP-produzierende Stimulationen aktiviert wird (Link et al., 1995; Steward et al., 1998; Waltereit et al., 2001; Steward & Worley, 2001; Messaoudi et al., 2007; Panja et al., 2009; Yilmaz-Rastoder et al., 2011). Durch die Verwendung von NMDAR-Antagonisten ließ sich eine NMDAR-Abhängigkeit der Arc/Arg3.1-Expression bestätigen (Steward & Worley, 2001; Panja et al., 2009; Yilmaz-Rastoder et al., 2011). Pharmakologische Experimente konnten eine Reihe weiterer chemischer Stimulationsprotokolle beschreiben, die eine NMDAR-abhängige Arc/Arg3.1-Expression in primären Neuronenkulturen induzieren. So ließ sich zeigen, dass der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Antagonist Bicucullin die Arc/Arg3.1-Expression NMDAR-abhängig reguliert (Rao et al., 2006; Kawashima et al., 2009; Pintchovski et al., 2009; Karpova et al., 2013). Weiterführende Untersuchungen von Rao et al. (2006) lassen zudem eine NMDAR-abhängige Regulation der Arc/Arg3.1-Expression durch den „brain-derived neurotrophic factor“ (BDNF) vermuten (Rao et al., 2006; Park et al., 2008). Arbeiten von Paul F. Worley und Kimberly M. Huber konnten darüber hinaus demonstrieren, dass auch LTD-produzierende Stimulationen die Arc/Arg3.1-Expression induzieren können. So aktiviert die Applikation des metabotropen Glutamat-Rezeptor (mGluR)-Agonisten *Dihydroxyphenylglycin* (DHPG) die mRNA- und Proteinsynthese des Arc/Arg3.1-Gens in akuten hippocampalen Hirnschnitten und dissoziierten Neuronenkulturen (Park et al., 2008; Waung et al., 2008). Weitere Bestätigung für eine aktivitätsabhängige Regulation von Arc/Arg3.1 liefern Studien zu homöostatischen Formen der synaptischen Plastizität. So bewirkt eine langanhaltende Reduktion der neuronalen Aktivität, durch Applikation des Kugelfischtoxins Tetrodotoxin (TTX), eine Reduktion der Arc/Arg3.1-Expression in dissoziierten Neuronenkulturen (Shepherd et al., 2006). Welche molekularen Mechanismen diese Reduktion der Arc/Arg3.1-Expression bewirken, ist bisher nicht bekannt. Eine mögliche Erklärung liefern Studien von Steven Finkbeiner. So ließ sich zeigen, dass die Applikation des kompetitiven AMPAR-Antagonists NBQX eine Erhöhung des aktivitäts-induzierten Arc/Arg3.1-Expressionslevels in dissoziierten Neuronenkulturen vermittelt (Rao et al., 2006). Dahingehend ist anzunehmen, dass AMPA-Rezeptoren die aktivitätsinduzierte Arc/Arg3.1-Expression negativ regulieren können.

### 1.5.2 Regulationsmechanismen der Arc/Arg3.1-Protein- und mRNA-Synthese

Bislang ist unklar, wie Veränderungen der neuronalen Aktivität in eine Änderung der Arc/Arg3.1- Expression übersetzt werden. Der MAPK-Signalweg scheint dabei eine Schlüsselrolle für die Regulation der Arc/Arg3.1-Expression zu spielen (Korb & Finkbeiner et al., 2011). Arbeiten in unserem Labor konnten erste Hinweise für eine ERK1/2-abhängige Regulation der Arc/Arg3.1-mRNA-Synthese in dissoziierten, hippocampalen Neuronenkulturen liefern (Waltereit et al., 2001). Diese Beobachtungen ließen sich in akuten, hippocampalen Hirnschnitten bestätigen. So konnten Untersuchungen von Clive Bramham zeigen, dass die HFS-LTP-induzierte Arc/Arg3.1-Transkription durch Applikation des MEK-Inhibitors U0126 blockiert wird. Weitere Unterstützung finden diese Beobachtungen durch genomische Analysen der Arc/Arg3.1-Promotorsequenz. So ließen sich Bindungsstellen für das „cAMP-response-element [CRE] binding protein“ (CREB) und den „Serum response factor“ (SRF) identifizieren (Waltereit et al., 2001; Kawashima et al., 2009; Pintchovski et al., 2009). Vorangegangene Studien konnten darlegen, dass die MAP-Kinase ERK1/2 den Aktivitätszustand von SRF und CREB regulieren kann (Xia et al., 1996; Davis et al., 2000). Zudem zeigten Reporter-Gen-Analysen, bei denen die Expression des Luciferase-Gens durch den Arc/Arg3.1- Promotor kontrolliert wird, eine ERK1/2-abhängige Regulation des Arc/Arg3.1-Promotors in dissoziierten Neuronenkulturen (Kawashima et al., 2009; Pintchovski et al., 2009). Die Generierung konditionaler SRF-Knockout Mäuse bestätigte die SRF-abhängige Regulation der Arc/Arg3.1-Expression *in vivo* (Ramanan et al., 2005). Neben Bindestellen für SRF und CREB ließen sich zudem weitere, bisher nicht näher charakterisierte, Bindungsstellen nachweisen. So konnten unter anderem Bindungsstellen für repressorisch wirkende Transkriptionsfaktoren identifiziert werden (Pintchovski et al., 2009). Die Transkripte des Arc/Arg3.1-Gens zeigen ein interessantes Verteilungsmuster. So ist Arc/Arg3.1 das einzige aktivitätsregulierte Gen, dessen mRNA nach neuronaler Stimulation in den Dendriten lokalisiert. Oswald Steward und Paul Worley konnten darüber hinaus zeigen, dass diese Verteilung gerichtet ist, und die Arc/Arg3.1-mRNA spezifisch in solchen dendritischen Bereichen akkumuliert, in denen die synaptische Aktivierung stattgefunden hat (Wallace et al., 1998; Steward und Worley, 2001). Weiter ließ sich zeigen, dass die Lokalisierung des Arc/Arg3.1-Proteins an aktivierten dendritischen Bereichen durch die ERK1/2-Kinase reguliert wird (Huang et al., 2007). Weitere Experimente konnten eine Koregulation der Arc/Arg3.1-Expression und ERK1/2-Phosphorylierung darlegen (Ying et al., 2002; Whittington et al., 2013; Bateup et al., 2013). Arbeiten von Clive Bramham konnten darüber hinaus eine ERK1/2-abhängige Regulation der Arc/Arg3.1-Translation demonstrieren (Panja et al., 2009). So blockiert die Applikation des MEK-Inhibitor PD98059 die HFS-induzierte, NMDAR-abhängige Synthese des Arc/Arg3.1-Proteins in akuten hippocampalen Hirnschnitten (Panja et al., 2009).

Diese Reduktion der Arc/Arg3.1-Expression korrelierte mit einer Dephosphorylierung des eukaryontischen Initiationsfaktor (eIF) 4E (Panja et al., 2009). Studien von Paul Worley konnten zudem eine vom eukaryontischen Elongationsfaktor (eEF) 2 abhängige Regulation der Arc/Arg3.1-Translation für mGluR-abhängige Formen der LTD demonstrieren (Park et al., 2008). Untersuchungen zum Turnover des Arc/Arg3.1-Proteins und der Arc/Arg3.1-mRNA konnten Halbwertszeiten unter einer Stunde beobachten (Rao et al., 2006; Park et al., 2008; Bateup et al., 2013). Dies spricht für eine schnelle Degradation des Arc/Arg3.1-Proteins und der Arc/Arg3.1-mRNA. Ferner ließ sich zeigen, dass das Arc/Arg3.1-Protein ein Substrat des Ubiquitin-Proteasomen-System (UPS)-vermittelten Proteinabbaus darstellt (Greer et al., 2010). Bislang ist unklar, ob Arc/Arg3.1 durch weitere Degradationsmechanismen abgebaut wird. Ein Mechanismus, der die Stabilität der Arc/Arg3.1-mRNA reguliert ist der „Nonsense-mediated Decay“ (NMD), (Giorgi et al., 2007). Der NMD stellt einen Prozess da, bei dem die Degradation der mRNA an ihre Translation gekoppelt ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Expressionslevel in der Zelle durch Translations-, Transkriptions- und Degradationsprozesse fein reguliert werden kann. Eine zentrale Bedeutung für die Regulation der Arc/Arg3.1-mRNA- und Proteinsynthese scheint die MAP-Kinase ERK1/2 zu haben.

### 1.5.3 Arc/Arg3.1 fördert die Endozytose von AMPA-Rezeptoren aus der postsynaptischen Membran

Durch die Generierung von Arc/Arg3.1-Knockout-Mäusen in unserem Labor ließ sich zeigen, dass die Arc/Arg3.1-Expression für die Konsolidierung NMDAR-abhängiger Formen der synaptischen Plastizität (LTP und LTD) notwendig ist (Plath et al., 2006). Weitere Studien konnten diese Beobachtungen für HFS- und BDNF-induzierter Formen der LTP bestätigen. So bewirkte eine akute *in vivo* Infusion Arc/Arg3.1-spezifischer Antisense-Oligodeoxynukleotide eine Destabilisierung von HFS- und BDNF-induzierten Formen der LTP im Gyrus Dentatus von Mäusen (Messaoudi et al., 2007). Weitere Unterstützung findet diese Hypothese durch Analysen zum DHPG induzierten mGluR-LTD. So ließ sich durch DHPG-Applikation eine stabile Form des mGluR-LTDs in CA3-CA1-Synapsen akuter hippocampaler Hirnschnitte von Arc/Arg3.1-Wildtyp, aber nicht Arc/Arg3.1-Knockout-Mäusen induzieren (Park et al., 2008). Diese Ergebnisse korrelieren mit der Beobachtung, dass Arc/Arg3.1-Knockout-Mäuse nicht in der Lage sind, ein stabiles Langzeit-Gedächtnis für verschiedene explizite und implizite Lernaufgaben zu bilden (Plath et al., 2006).

Bis dato ist ungeklärt, welche molekulare Funktion Arc/Arg3.1 in Neuronen hat. Bisherige Ergebnisse konnten demonstrieren, dass Arc/Arg3.1 eine wichtige Funktion für die

Internalisierung von AMPA-Rezeptoren aus der neuronalen Zellmembran hat. Mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems konnten im Labor von Paul Worley die Arc/Arg3.1 Interaktionspartner Dynamin2 und Endophilin3 identifiziert werden (Chowdhury et al., 2006). In Experimenten zur Arc/Arg3.1-Überexpression ließ sich zeigen, dass Arc/Arg3.1 durch Interaktion mit Dynamin2 und Endophilin3 die Expression GluA1-haltiger AMPA-Rezeptoren an der neuronalen Zelloberfläche reduziert. Im Gegensatz dazu zeigten Arc/Arg3.1-Knockout-Mäuse eine gesteigerte Expression GluA1-haltiger AMPA-Rezeptoren an der neuronalen Zelloberfläche und eine verminderte AMPA-Rezeptor-Internalisierung (Chowdhury et al., 2006). Untersuchungen zur AMPAR-Expression in kultivierten hippocampalen Hirnschnitten konnten zeigen, dass eine gesteigerte Expression von Arc/Arg3.1 die Internalisierung GluA2-haltiger AMPA-Rezeptoren stimuliert (Rial-Verde et al., 2006). Diese Beobachtungen ließen sich auch in nachfolgenden Studien bestätigen (Waung et al., 2008). So konnte in primären Neuronenkulturen gezeigt werden, dass Arc/Arg3.1 die DHPG-vermittelte Internalisierung von GluA1-AMPA-Rezeptoren reguliert (Park et al., 2008; Waung et al., 2008). Untersuchungen zur chemisch induzierten NMDAR-LTP ließen hingegen keine Arc/Arg3.1-Abhängigkeit erkennen. So zeigten sowohl Arc/Arg3.1-Wildtyp, als auch -Knockout Neuronenkulturen eine gesteigerte Expression GluA1-haltiger AMPA-Rezeptoren (Shepherd et al., 2006).

Studien zu homöostatischen Formen der synaptischen Plastizität konnten demonstrieren, dass chronische Veränderungen der neuronalen Aktivität einen Ein- bzw. Ausbau von AMPA-Rezeptoren aus der neuronalen Zellmembran bewirken. Dieser fundamentale Prozess zur Anpassung der neuronalen Erregbarkeit scheint in Arc/Arg3.1-Knockout-Neuronen beeinträchtigt zu sein. So bewirkt die chronische Applikation von Bicucullin eine Reduktion der AMPAR-Expression an der Zelloberfläche von Arc/Arg3.1-Wildtyp-, aber nicht Arc/Arg3.1-Knockout-Neuronen. Die chronische Applikation von Tetrodotoxin (TTX) führten hingegen zu einem Anstieg der AMPAR-Expression an der Zelloberfläche von Arc/Arg3.1-Wildtyp-, aber nicht Arc/Arg3.1-Knockout-Neuronen (Shepherd et al., 2006; Plath et al., 2006).

Diese Beobachtungen legen dar, dass Arc/Arg3.1 eine wichtige Funktion für die regulierte Expression von AMPA-Rezeptoren an der neuronalen Zelloberfläche hat. Zudem ist Arc/Arg3.1 essentiell für die stabile Expression verschiedener Formen der synaptischen Plastizität. Eine Deregulation der Arc/Arg3.1-Expression ist assoziiert mit: (1) Beeinträchtigungen der AMPAR-Expression, (2) Beeinträchtigungen bei der Stabilisierung verschiedener Formen der synaptischen Plastizität und (3) Beeinträchtigungen in der Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses.

---

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Modifizierungen der synaptischen Transmission, synaptische Plastizität genannt, werden als zelluläre Grundmechanismen für die kognitiven Prozesse des Lernens und der Gedächtnisbildung im Gehirn verstanden. Für die Ausbildung Hebb'scher Formen der synaptischen Plastizität spielen NMDA-Rezeptoren eine zentrale Rolle. So können NMDA-Rezeptoren, abhängig von der synaptischen Aktivierung, plastische Prozesse an den Synapsen bidirektional regulieren.

Als ein aktivitätsreguliertes Gen wird die Arc/Arg3.1-Expression durch verschiedenste Plastizität-produzierende Stimuli induziert. Speziell wird die Arc/Arg3.1-Expression parallel zur Induktion der LTP durch die NMDAR-Aktivierung induziert und trägt somit zur LTP-Konsolidierung bei. Darüber hinaus demonstrieren einige Studien, dass Arc/Arg3.1 die Expression NMDAR-abhängiger Formen der LTD beeinflusst.

In dieser Arbeit sollen mittels NMDA-Stimulationen ein NMDAR-abhängiges chemisches LTD induziert werden und die LTD-vermittelte Veränderung der Arc/Arg3.1-Expression, sowie in weiteren Schritten die zuständigen Komponenten analysiert werden. Weiter soll die Rolle von Arc/Arg3.1 für diese Form der LTD mit Hilfe der Arc/Arg3.1-Knockout-Mäuse auf zellulärer und biochemischer Ebene untersucht werden.



## **2 Material und Methoden**

## **2.1 Geräte und Materialien**

### **Materialien**

Alle nicht besonders vermerkten Substanzen und Chemikalien wurden als analysenreine Reagenzien von den Firmen Roche, AppliChem, Invitrogen (Gibco), Merck, Serva oder Sigma-Aldrich bezogen. Verwendete Plastikware stammt von Greiner, Sarstedt oder Eppendorf.

### **Geräte für Zellkultur**

Die Präparation embryonaler Gehirne erfolgte mit Hilfe eines Stereomikroskop (Zeiss). Steril-Arbeiten erfolgten unter einer Heraeus Sterilwerkbank. Zentrifugenschritte wurden mit einer Eppendorf-Tischzentrifuge durchgeführt. Die Inkubationen erfolgten in Binder-CO<sub>2</sub>-Brutschränken.

### **Geräte für Gewebeschnitt-Präparation**

Zur Herstellung akuter hippocampaler Hirnschnitte wurde ein Microm HM 650 V Microtome (Thermo Scientific) mit vibrierender Klinge verwendet. Inkubationsschritte bei definierten Temperaturen erfolgten im Wasserbad (GFL).

### **Geräte für qRT-PCR, Analyse und Handhabung**

Zur Bestimmung der mRNA- und DNA-Konzentration wurde ein NanoDrop2000 Spektrophotometer (Thermo Scientific) verwendet. Die Reverse-Transkription erfolgte mit einem PTC-200 Thermocycler (MJ Research). Für die quantitative Bestimmung entsprechender cDNA-Level wurde ABI Prism 7900HT Real-Time PCR System genutzt.

### **Geräte für die Western-Blot-Analyse**

Die Ultraschallbehandlung von Proteinproben erfolgte mit einem BRANSON Sonifier 250 (BRANSON Ultrasonics Corporation). BCA-Ansätze zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurden mit einem SLT Rainbow Scanner (SLT Labinstruments) analysiert. Für die SDS-PAGE wurden Minigel-Twin Kammern (Biometra) verwendet. Western-Blots wurden in Mini-Trans-Blot-Kammern (Bio-Rad) durchgeführt. Chemilumineszenzsignale wurden mit einem ImageQuant LAS4000mini (GE Healthcare) detektiert.

### **Software zur Analyse und Auswertung**

Zur Analyse der erhaltenen qRT-PCR-Daten wurde die Programm SDS Version 2.4 (Applied Biosystems) verwendet. ImageJ wurde zur densitometrischen Quantifizierung von Chemilumineszenz-Signalen genutzt. Berechnungen erfolgten mit Hilfe von Excel (Microsoft). Graphen und statistische Analysen wurden mit Hilfe des Programms SigmaPlot 11 (Systat Software Inc.) durchgeführt. Abbildungen wurden mit den Programmen Photoshop (Adobe)

und Illustrator (Adobe) zusammengestellt. Diese Arbeit wurde in Word (Microsoft) und InDesign (Adobe) geschrieben.

## 2.2 Zellbiologische Methoden:

### 2.2.1 Primäre Neuronenkultur

#### Wachstumsmedium

500 µM Glutamax (Invitrogen)  
2% B27 Supplement (Invitrogen)  
1% Penicillin / Streptomycin (Biochrom)  
in Neurobasalmedium (Invitrogen)

#### PBS-Puffer

137 mM NaCl (Roth)  
2,70 mM KCl (Roth)  
8,10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O (Roth)  
1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Roth)

#### HANKS-Puffer

1 Flasche HANKS-Salz (Sigma H9394)  
4,17 NaHCO<sub>3</sub> (Merck)  
1 mM HEPES (Roth)  
mit Aqua dest. Auffüllen; pH 7,3-7,4

#### HANKS + FCS

80 % HANKS-Puffer  
20 % FCS

#### Verdaupuffer

137 mM NaCl (Roth)  
5 mM KCl (Roth)  
7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O (Roth)  
25 mM HEPES (Roth)  
gelöst in Aqua dest, pH-Wert 7,2

#### Dissoziationsmedium

12 mM MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
In HANKS-Puffer

#### 2.2.1.1 Präparation und Kultivierung

Für die Herstellung primärer dissoziierter Neuronenkulturen wurden Mäuse des Stammes C57Bl/6J verwendet. Trächtige Mäuse wurden 18,5 Tage nach der Verpaarung mit Wildtyp Männchen geopfert. Jegliche Behandlung der Tiere erfolgte nach dem Tierschutzgesetz. Embryonen wurden der Mutter entnommen und die Köpfe durch Dekapitation vom Körper getrennt. Gehirne wurden mit Hilfe von Mikroscheren und Pinzetten aus den Köpfen herauspräpariert und auf Eis in HANKS Medium mit 20% FCS gelagert. Unter einem Stereomikroskop wurden die Hippocampi und Kortizes vom Embryogehirn isoliert und in Hanks + FCS gesammelt. Zur Herstellung von Kulturen des Mausvorderhirns wurden Hippocampi und Kortizes gepoolt. Für die Präparation von hippocampalen und kortikalen Kulturen wurden die beiden Hirnregionen getrennt voneinander weiterverwendet. Alle weiteren Schritte wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Gehirnproben wurden zweimal mit HANKS Medium

gewaschen. 2 mg Papain und 1 mg DNase (3 kU in 0,15 M NaCl) wurden zu 2ml Verdaupuffer hinzugegeben und anschließend für 30 Minuten mit den Gehirnproben bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit HANKS Medium. Die Gehirnproben wurden mit 2ml Dissoziationspuffer und 1mg DNase versetzt. Zellen wurden durch Trituration aus ihrem Zellverband gelöst. Gehirnproben wurden 20 Mal mit einer Pasteurpipette auf- und abpipettiert. Mit einer feuerpolierten Pasteurpipette mit schmalerer Öffnung wurden die Proben weitere 20 Mal trituriert. Die Zellen wurden anschließend in 12 ml HANKS + FCS resuspendiert und für 5 Minuten bei 1000g sedimentiert. Das Zellpellet wurde in Wachstumsmedium resuspendiert. Zellen wurden mit einer Neubauer Zählkammer gezählt. Neurone wurden zu einer Dichte von 62.000 – 82.000 Zellen pro cm<sup>2</sup> in 60mm-Petrischalen ausgesät. Petrischalen wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> mit 5mg/ml Poly-L-Lysin beschichtet. Die Kultivierung der Neurone erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator. Das Wachstumsmedium wurde zweimal pro Woche jeweils zur Hälfte durch frisches Wachstumsmedium ersetzt.

#### 2.2.1.2 Pharmakologische Behandlung

Vorbereitend für die Stimulation wurden Neuronenkulturen über Nacht mit frischem Neurobasalmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Wärmeschrank inkubiert. Zu Versuchsbeginn wurde ein Teil des Mediums abgenommen und im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> aufbewahrt.

##### *NMDA Stimulation primärer dissoziierter Neuronenkulturen*

Neuronenkulturen wurden mit entsprechenden Inhibitoren bzw. Trägersubstanzen (siehe Tabelle 1) vorbehandelt. Durch Zugabe von NMDA (EK 20 µM) bzw. H<sub>2</sub>O (als Kontrolle) wurden die Neurone für drei Minuten in Anwesenheit der Inhibitoren bzw. deren Trägersubstanzen stimuliert. Das Medium wurde anschließend abgesaugt und durch das zuvor entnommene Neurobasalmedium ersetzt. Je nach Versuchsbedingung enthielt dieses Medium wiederum dieselbe Konzentration des Inhibitors bzw. dessen Trägersubstanz (siehe Tabelle 1). Die Kulturen wurden für weitere 60 Minuten im Wärmeschrank inkubiert. Für die Untersuchung der Zeitabhängigkeit der NMDA-Effekte wurden Kulturen 5, 15, 30 und 60 Minuten nach der NMDA-Stimulation aus dem Inkubator genommen. Am Ende der Inkubationsphase wurde das Medium entfernt und durch eiskaltes 1xPBS ersetzt. Für die Präparation von mRNA-Proben wurde 1xPBS + 0,1% DEPC verwendet. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis.

**Tabelle 1: Inkubationsbedingungen verwendeter Stimulantien**

	EK in $\mu\text{M}$	Trägersubstanz	Präinkubation (min)	Bei Postinkubation anwesend
NMDA	20 $\mu\text{M}$	H <sub>2</sub> O	-	-
MK-801	10 $\mu\text{M}$	DMSO	-	nein
APV	50 $\mu\text{M}$	H <sub>2</sub> O	-	nein
Ifenprodil	5 $\mu\text{M}$	H <sub>2</sub> O	-	nein
EGTA	2,5 mM	Neurobasalmedium	30 min	ja
BAPTA-AM	33 $\mu\text{M}$	DMSO	30 min	ja
PD98059	50 $\mu\text{M}$	DMSO	30 min	ja
ActD	10 $\mu\text{M}$	DMSO	10 min	ja
CHX	50 $\mu\text{M}$	H <sub>2</sub> O	10 min	ja
MG-132	10 $\mu\text{M}$	DMSO	60 min	ja

*DHPG Stimulation primärer dissoziierter Neuronenkulturen*

Neurone wurden durch Zugabe von (RS)-3,5-DHPG (EK 50  $\mu\text{M}$ ) fünf Minuten stimuliert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und durch das zuvor abgenommene Neurobasalmedium ersetzt. 60 Minuten nach der weiteren Inkubation im Wärmeschrank wurden die Inkubation beendet, das Medium entfernt und durch eiskaltes 1xPBS ersetzt. Alle weiteren Schritte zur Homogenisierung erfolgten auf Eis.

*Bic/4AP Stimulation primärer dissoziierter Neuronenkulturen*

Neurone sollten mit einem synaptischen Stimulationsprotokoll stimuliert werden. Dazu wurden entsprechend Okuno et al., 2012 und Kawashima et al., 2009 Neuronenkulturen zwei Stunden mit 20  $\mu\text{M}$  Bicucullin (in H<sub>2</sub>O), 100  $\mu\text{M}$  4AP (in H<sub>2</sub>O), 1  $\mu\text{M}$  Strychnine (in DMSO) und 100  $\mu\text{M}$  Glycin (in H<sub>2</sub>O) stimuliert. Im weiteren Verlauf wird diese Stimulation als Bic/4AP-Stimulation bezeichnet. Nach der Inkubation wurden die Kulturen aus dem Inkubator genommen, das Medium entfernt und durch eiskaltes 1xPBS ersetzt. Die Homogenisierung erfolgt wie nachfolgend beschrieben.

## 2.2.2 Präparation akuter Hirnschnitte

<u>Sucrose-ACSF</u>		<u>ACSF</u>	
Sucrose	212.7 mM	NaCl	124 mM
KCl	2.6 mM	KCl	5 mM
NaHCO <sub>3</sub>	26 mM	NaHCO <sub>3</sub>	26 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.23 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25 mM
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	3 mM	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1,5 mM
Glucose	10 mM	Glucose	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM	CaCl <sub>2</sub>	4 mM
In Aqua dest.		In Aqua dest.	

### 2.2.2.1 Präparation

Zur Anfertigung hippocampaler Hirnschnitte wurden juvenile, 11-12 Wochen alte C57Bl6 oder Arc/Arg3.1-Knockout Mäuse mit dem Inhalationsnarkotika Isofluran (Abbott) betäubt und durch Dekapitation getötet. Der Kopf der Maus wurde in pürierte, halbgefrorene und mit Carbogen (Gemisch aus 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>) begaste, physiologische Sucrose-ACSF gehalten und der Schädel entlang der sagittalen Linie geöffnet. Das Gehirn wurde herauspräpariert und für 1-2 Minuten in frische pürierte Sucrose-ACSF überführt. Anschließend wurden Reste des Kleinhirns entfernt und die Hemisphären mittels einer Rasierklinge getrennt. Die Hälften wurden auf ihre mediale Schnittfläche gelegt und jeweils dorsal ein Teil des Kortex entfernt. Beide Hemisphären wurden mit Cyanacrylat-Kleber (UHU Sekundenkleber) auf die entstandene Schnittfläche geklebt, mit püriertem Sucrose-ACSF bedeckt und in die Schneidekammer überführt. Die Schneidekammer wurde mit püriertem, Carbogen-begastem Sucrose-ACSF aufgefüllt. Mit Hilfe eines Microm HM 650 V Microtome (Thermo Scientific) wurden pro Hemisphäre circa sieben 350 µm dicke Schnitte in transversaler Orientierung angefertigt. Fertig geschnittene Hirnschnitte wurden in Bechergläsern mit Carbogen-begaster ACSF-Lösung überführt. Um eine allseitige Umspülung der Schnitte mit dem begastem ACSF zu gewährleisten, wurden die Schnitte auf Netzkonstruktionen positioniert. Nach Abschluss des Schneidevorganges wurden die Hirnschnitte zur Regeneration 90 Minuten mit begastem-ACSF bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit dem Inkubationsgefäß in ein auf 30°C temperiertes Wasserbad (GFL) gestellt. Nach einer 30 minütigen Inkubation erfolgte die pharmakologische Behandlung der Hirnschnitte.

### 2.2.2.2 Pharmakologische Behandlung

Vorbereitend zur pharmakologischen Stimulation akuter hippocampaler Hirnschnitte wurde ein zusätzliches Becherglas mit einer 20 µM NMDA / ACSF-Lösung angesetzt, mit Carbogen begast und auf 30°C im Wasserbad (GFL) temperiert. Für die NMDA-Stimulation wurden die

Schnittpräparate einer Hemisphäre samt Netzkonstruktion in das Becherglas mit NMDA / ACSF-Lösung überführt. Drei Minuten nach dieser Prozedur wurde die Stimulation beendet und die Schnitte wieder in ihr ursprüngliches Becherglas zurückgesetzt. Um Kontaminationen der ACSF-Lösung mit NMDA zu vermeiden, wurden die Schnitte und Netzkonstruktion vor dem Umsetzen dreimal kurz mit der NMDA / ACSF bzw. der ACSF-Lösung gewaschen. Um unspezifische Effekte durch das Umsetzen der Schnittpräparate auszuschließen, wurden die Hirnschnitte der anderen Hemisphäre, parallel zur NMDA-Stimulation, ebenfalls aus ihrer ACSF-Lösung entnommen, gewaschen und anschließend wieder zurückgesetzt. Nach der Behandlung wurden die Schnitte für weitere 60 Minuten in carbogen-begastem ACSF bei 30°C inkubiert. Die weitere Behandlung erfolgte entsprechend Punkt 2.3.1.2 bzw. 2.3.3.1.

## 2.3 Biochemische Methoden

### 2.3.1 Herstellung Zell- und/oder Gewebelysate

#### Lysispuffer

5 mM EDTA (Roth)  
5 mM EGTA (Roth)  
50 mM NaF (Sigma)  
1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Sigma)  
1 % [v/v] Triton-X100 (Roth)  
1 mM PMSF (AppliChem)  
4 µg/ml Aprotinin (AppliChem)  
1 µg/ml Leupeptin (AppliChem)  
200 ng/ml Pepstatin A (AppliChem)  
in 1x PBS

#### 2.3.1.1 Herstellung Zelllysate

Für Western-Blot-Analysen wurden in dieser Arbeit Lysate aus kultivierten, dissoziierten Primärneuronen aus dem Vorderhirn der Maus hergestellt. Neuronenkulturen wurden einmal mit 1x PBS gewaschen und mittels Zellschaber in Lysispuffer aufgenommen. Nach einer kurzen Ultraschallbehandlung (3x 15s bei 30% Wirkungsgrad) wurden die Proben bis zur Proteinbestimmung bei 4°C inkubiert.

#### 2.3.1.2 Herstellung Gewebelysate

Akute hippocampale Hirnschnitte wurden eine Stunde nach der Stimulation aus der ACSF-Lösung entnommen und auf Eis präpariert. Hippocampi wurden aus den akuten Hirnschnitten herauspräpariert und für nachfolgende Untersuchungen zu jeweils fünf Hippocampi pro Kondition gepoolt. Hippocampi wurden mit Lysispuffer homogenisiert. Die Homogenisierung

erfolgte durch mehrmaliges Aufziehen in 21G, 23G und 27G-Kanülen (Braun Sterican). Größere Gewebetrümmer wurden durch zentrifugieren sedimentiert, und durch einen weiteren Homogenisierungsschritt entfernt. Nach kurzer Ultraschallbehandlung (3x 15s bei 30% Wirkungsgrad) wurden die Proben bis zur Proteinbestimmung bei 4°C auf Eis inkubiert.

## 2.3.2 Nucleinsäure-Biochemische Methoden

### 2.3.2.1 mRNA-Aufreinigung

Neuronenkulturen wurden eine Stunde nach der pharmakologischen Behandlung mit 1x PBS + 0,1% DEPC gewaschen. Die Isolierung der zellulären Gesamt-RNA erfolgt nach dem Standardprotokoll des „High Pure RNA Isolierungskit“ (Roche). Kurz: Neuronen wurden mit einem Zellschaber in 200 µl PBS + 0,1% DEPC aufgenommen, anschließend mit 400 µl Lysepuffer (4,5 M Guanidiniumchlorid, 50 mM Tris-HCl, 30% Triton X-100 (w/v), pH 6,6) für eine Minute gevortexet, auf den „High Pure Filter“ eines Filtrationsgefäßes pipettiert und für 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Anschließend wurden 90 µl DNase-Inkubationspuffer (1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 10 mM MnCl<sub>2</sub>, pH 7) und 10 µl DNase 1 in das Filtrationsgefäß pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. DNA und Proteinverunreinigungen wurden durch anschließende Waschschriffe mit dem Waschpuffer 1 (5 M Guanidiniumchlorid, 29 mM Tris-HCl, pH 6,6 in Ethanol) und Waschpuffer 2 (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5 in Ethanol) entfernt. Die Elution erfolgte mit 20 µl Elutionspuffer.

### 2.3.2.2 Konzentrationsbestimmung Nucleinsäure

RNA-Ausbeuten wurde photometrisch mit Hilfe eines NanoDrop (Thermo Scientific) bei 260 nm bestimmt. Die Reinheit der isolierten RNA wurde anhand des Verhältnisses OD<sub>260</sub> : OD<sub>280</sub> überprüft.

### 2.3.2.3 cDNA-Synthese aus neuronaler mRNA (Reverse Transkriptase-PCR)

Für die Generierung komplementärer DNA (cDNA) aus den in Punkt 2.3.2.1 erhaltenen RNA-Proben wurde das „First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Roche) verwendet. 1 µg RNA, 1 µl Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer und 2 µl dNTPs (1 mM EK) wurden in einem PCR-Reaktionsgefäß (200 µl) gemixt. 4 µl 5xReaktionspuffer, 0,5 µl Rnase Inhibitor (1 U/µl EK), 2 µl DEPC-behandeltes Wasser und die Reverse Transkriptase (0,5 U/µl EK) wurden hinzugefügt. Die cDNA-Synthese erfolgt für 30 Minuten bei 55°C im Thermocycler. Anschließend wurde die Reverse

Transkriptase für 5 Minuten bei 85 °C denaturiert. Für die nachfolgende qPCR wurden 1:10 Verdünnungen der erhaltenen cDNA-Proben angesetzt. Als Kontrollen wurden jeweils RT-PCR-Ansätze ohne Template (-RNA) und ohne Reverse-Transkriptase (-RT) mitgenommen.

#### 2.3.2.4 qPCR

Die quantitative Bestimmung von RNA-Expressionslevel erfolgte mit Hilfe des ABI Prism 7900HT Real-Time PCR Systems. Dazu wurden die RNA-Proben in ihre komplementäre cDNA umgeschrieben (vgl. 2.3.2.2). Für den qPCR-Ansatz wurden „MicroAmp Optical 96 well“-Reaktionsplatten (Applied Biosystems) verwendet. Hierzu wurden in jedem einzelnen Reaktionsansatz 25,0 µl „2x FastStart Universal Probe Master (Rox)“ (Roche) und 0,5 µl der „Fam“-markierten Sonde #79 aus der „Universal Probe Library“ (Roche) pipettiert. Zusätzlich wurden jeweils 0,25 µl der q-ArgFor und q-ArgRev Primer (Metabion), sowie je 0,5 µl der „Yellow-555“-markierten beta-Aktin-Sonde und beta-Aktin-Primer aus dem „Mouse ACTB Gene Assay Kit“ der „Universal ProbeLibrary“ (Roche) gegeben (vgl. Tabelle 2). Der Ansatz wurde auf 45 µl mit autoklaviertem Wasser aufgefüllt und 5 µl der 1:10-verdünnten cDNA-Probe bzw. der entsprechenden Kontrolle hinzugegeben. Die Kontrollen umfassten Ansätze „-RNA“, „-RT“ und Ansätze mit autoklaviertem Wasser. So war es möglich Verunreinigungen, die zu unspezifischen Reaktionen mit den eingesetzten Primern hätten führen können, auszuschließen. Zu relativen Quantifizierung und Bestimmung der Reaktionseffizienz wurde eine Eichgerade mit verschiedenen Verdünnungen (1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64; 1:128, 1:256) angesetzt. Die einzelnen Verdünnungen und Kontrollen wurden jeweils in 3er Replikaten aufgetragen. Von den einzelnen Proben wurden hingegen mindestens 5fach-Bestimmungen durchgeführt. Die 96-Well Platte wurde mit einer Folie versiegelt und bis zur Analyse auf Eis gekühlt. Die Analyse erfolgte im ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems). Die Programmierung des ABI PRISM 7900 HT erfolgte nach Angabe des Handbuchs. Tabelle 3 zeigt das hier verwendete PCR-Protokoll.

**Tabelle 2: Verwendete Primer für die qPCR**

Primer	Sequenz	Länge (nt)	T <sub>m</sub> in °C	GC-Gehalt in %
Q-ArgFor	3'ggtgagctgaagccacaaat'5	20	60	50
q-ArgRev	3'ttactggtatgaatcactgctg'5	23	60	43
ACTB 1	3'gccaacctgaaaagatgac'5	20	60	50
ACTB 2	3'gaggcatcacaggacagcac'5	20	60	60

**Tabelle 3: Verwendetes qPCR-Protokoll**

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklus
Initiale Aktivierung	15 min	95°C	1
Denaturierung	15 sec	95°C	40
Annealing / Extension	1 min	60°C	
Ende			

Die Datenverarbeitung erfolgte mit der Software SDS 2.4 RQ (Applied Biosystems). Zur Quantifizierung der eingesetzten cDNA mittels Fluoreszenz wurden relative Quantifizierungen bezogen auf das Haushaltsgen beta-Aktin durchgeführt. Die Berechnungen erfolgten entsprechend Pfaffl et al., 2001.

### 2.3.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 2.3.3.1 Biotinylierung von Proteinen der Zelloberfläche

Um Proteine an der Zelloberfläche zu markieren, wurden N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Biotinester verwendet. Diese reagieren mit primären Aminogruppen und bilden stabile Amidbindungen. Die negativ geladene Form Sulfo-NHS-LC-Biotin kann nicht in die Zelle eindringen und reagiert daher selektiv mit Proteinen an der neuronalen Zelloberfläche. Mit Hilfe immobilisierten Avidins können die biotin-markierten Proteine von unmarkierten Proteinen getrennt werden.

Akute hippocampale Hirnschnitte des Maushirns wurden 75 min nach der NMDA-Stimulation einmal mit ACSF gewaschen und für 45 Minuten bei 4°C in 100 µM EZ-Link-Sulfo-NHS-LC-Biotin-Lösung (Pierce, Thermo Scientific) inkubiert. Die Biotinylierungsreaktion wurde durch zweimaliges Waschen mit einer eiskalten 100 µM Lysin / ACSF-Lösung gestoppt. Die Schnitte wurden anschließend homogenisiert und die Proteinkonzentration der einzelnen Proben bestimmt. Für die Gesamtproteinfraktion wurden 50 µg des Homogenats abgenommen, mit 5x Proteinprobenpuffer versetzt und bei -80°C bis zu weiteren Verwendung gelagert.

Um die Fraktion biotinylierter Oberflächenprotein zu gewinnen, wurde immobilisierte NeutrAvidin-Agarose („NeutrAvidin UltraLink Resin“ Thermo Scientific) dreimal mit 1 ml Lysispuffer äquilibriert und anschließend mit 200 µg des Homogenats über Nacht im Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Die Neutravidin-Agarose-gebundenen Proteine wurden 3 min bei 500 g in der Tischzentrifuge sedimentiert, dreimal mit 1 ml Lysispuffer gewaschen, in 50 µl 2x Proteinprobenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95°C gekocht. Die Analyse der

Proben erfolgte durch quantitative Western-Blot-Analysen. Als Kontrolle wurden Expressionslevel des intrazellulären Proteins Beta-Aktin detektiert. Beta-Aktin war in der Fraktion biotinylierter Oberflächenproteine nicht nachweisbar.

### 2.3.3.2 BCA – Proteinkonzentrationsbestimmung

Die BCA ist eine spektrophotometrische Methode zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen. Sie stellt eine Modifikation des von Lowry 1951 beschriebenen Prinzips dar. Dabei werden Metallionen in alkalischer Lösung durch Proteine reduziert. Aus zweiwertigen entstehen einwertige Kupferionen, die mit einem spezifischen Reagenz, der 2,2'-Bis(chinolin-4-carbonsäure) (BCA) einen violett gefärbten Komplex bilden. Die Extinktion dieses Komplexes kann bei 562 nm gemessen werden.

#### Pierce-Reagenz A

1% 2,2'-Bis(chinolin-4-carbonsäure)-Na<sub>2</sub>  
0,4% NaOH  
2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> x H<sub>2</sub>O  
0,16% Na<sub>2</sub>-Tartrat  
0,95% NaHCO<sub>3</sub>

#### Pierce-Reagenz B

4% CuSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O  
  
BSA-Standards  
0,2, 4, 6, 8, 10, 14, 30µg BSA / 200µl

Da die Intensität der Färbung von Reaktionszeit und Temperatur abhängt, musste bei jeder Bestimmung eine Eichkurve mit BSA-Lösung (2 bis 30 µg) angefertigt werden. Zudem wurden 3 µl der Zell- bzw. Gewebelysate mit Aqua dest. auf 25 µl aufgefüllt. Die verdünnten Proben wurden anschließend mit 200µl der BCA-Reagenz (Pierce-Lösung A und B im Verhältnis 50:1) versetzt und für 30 min bei 37°C im Inkubator inkubiert. Die Absorption wurde bei 550 nm photometrisch ermittelt. Zur Vorbereitung der nachfolgenden SDS-PAGE wurden die Proben durch Zugabe von 5x Probenpuffer und Lysispuffer auf eine definierte Konzentration eingestellt, fünf Minuten bei 95°C denaturiert und bei -80°C eingefroren.

### 2.3.3.3 SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen und Proteinkomplexen nach ihrer Größe erfolgte im elektrischen Feld mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Das SDS erfüllt dabei zwei entscheidende Aufgaben, zum einen denaturiert es die Proteine und dissoziiert Komplexe in ihre Untereinheiten, zum anderen lagert sich das Detergens im konstanten Gewichtsverhältnis (1 SDS-Molekül pro 2 Aminosäure-Reste) an die Oberfläche der Proteine, wodurch ein negatives Ladungsgleichgewicht zwischen den einzelnen Proteinen erzeugt wird und gleichzeitig eine Linearisierung erfolgt. Somit wird lediglich eine Auftrennung nach Masse, nicht aber der Ladung der Proteine erzielt. Die Trennung im Gel erfolgt durch den sogenannten Molekularsiebeffekt anhand der Größe des Proteins im elektrischen Feld. Durch

die Änderung des Vernetzungsgrades des Acrylamid (AA) mit Bisacrylamid (BA) lassen sich die Trenneigenschaften des Gels variieren. Die Polymerisation des Gels erfolgt durch eine radikalische Reaktion durch den Zusatz von Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalstarter und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator.

**APS (Ammoniumpersulfat)**

10% [w/v] APS (Biorad) in Aqua dest.

**SDS-Laufpuffer**

0,25 M Tris Base (Roth)

1,92 M Glycin (Roth)

1% [w/v] SDS (Roth)

**Lower Tris**

1,5 M Tris pH 8,8 (Roth)

0,4% [w/v] SDS (Roth)

**Upper Tris**

0,5 M Tris pH 6,8 (Roth)

0,4% [w/v] SDS (Roth)

**Probenpuffer (5x)**

0,25 M Tris/HCl (pH 6,8) (Sigma)

10% [w/v] SDS (Roth)

50% [w/v] Glycerin (Roth)

0,50 M DTT (Roth)

0,05% [w/v] Bromphenolblau (Merck)

Das SDS-Polyacrylamidgel besteht aus Trenn- und Sammelgel, wobei die Proteine erst das Sammelgel durchlaufen, in dem sie fokussiert und vorsortiert werden, um dann im Trenngel aufgetrennt zu werden. Je nach Größe des zu untersuchenden Proteins wurden unterschiedliche SDS-Polyacrylamidgele hergestellt. Die genaue Zusammensetzung vom Sammel- und Trenngel ist den nachfolgenden Tabellen (4 und 5) zu entnehmen.

**Tabelle 4: Zusammensetzung des Trenngels**

<b>Trenngel</b>	<b>8,00%</b>	<b>10,00%</b>
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) (Serva)	2,0 ml	2,5 ml
Aqua dest.	3,6 ml	3,1 ml
Lower Tris	1,9 ml	1,9 ml
10% [w/v] APS (Biorad)	37,5 µl	37,5 µl
TEMED ( Biorad)	3,75 µl	3,75 µl

**Tabelle 5: Zusammensetzung des Sammelgels**

<b>Sammelgel</b>	<b>4,00%</b>
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) (Serva)	350 µl
Aqua dest.	1,4 ml
Upper Tris	585 µl
10% [w/v] APS (Biorad)	17 µl
TEMED ( Biorad)	2 µl

Die Zell- und Gewebelysate wurden aus dem -80°C Tiefkühler geholt und vor dem Auftragen auf die Gele ein weiteres Mal bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Um stimulationsbedingte

Unterschiede in den Proteinleveln bestimmen zu können, wurde für alle Proben eines Versuchs dieselbe Proteinmenge auf das Gel getragen. Als Proteingrößenstandard diente der PageRuler Prestained (Thermo Scientific). Nach der Auftragung der Proben in die einzelnen Taschen des Sammelgels (15er Kamm) wurde die Elektrophorese im SDS-Laufpuffer mit 80V gestartet und nach Erreichen des Trenngels auf 130V erhöht.

#### 2.3.3.4 Western-Blot

Western-Blot-Analysen erlauben den spezifischen Nachweis eines bestimmten Proteins in Proben, die zuvor über eine Gelelektrophorese aufgetrennt wurden. Dabei werden die aufgetrennten Proteine in einem elektrischen Feld aus dem Gel auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran übertragen, welche dann mit spezifischen Antikörpern inkubiert werden kann.

##### **Blotpuffer**

25 mM Tris Base (Roth)  
192 mM Glycin (Roth)  
10% [v/v] Methanol (Merck)

Der Proteintransfer erfolgt in vertikalen Puffertanks (Mini-Trans-Blot -Kammern von Biorad). Gel und PVDF-Membran (Immobilon-P Transfer Membran, Millipore) wurden zwischen blotpuffergetränkte Whatman-3MM-Filterpapiere gelegt und in eine Gitterkassette eingeklemmt (Sandwich-Aufbau). Die gepackten Kassetten wurden anschließend senkrecht in die mit Blotpuffer gefüllte Blotkammer gehängt. Der Transfer der Proteine aus den Polyacrylamidgelen auf die PVDF-Membran erfolgte für anderthalb Stunden bei 100 Volt. Aufgrund der Zunahme des Ohmschen Widerstandes mit der Blotzeit ist eine kontinuierliche Kühlung und Umwälzung des Puffers notwendig.

#### 2.3.3.5 Immunologische Proteindetektion auf PVDF-Membranen

##### **PBST**

0,1% [v/v] Tween (Roth) in 1x PBS

##### **Magermilch-Lösung**

5% [w/v] Magermilch in 1x PBST

Im Western-Blot können Proteine nach Auftrennung durch SDS-PAGE mit spezifischen Antikörpern identifiziert und durch einen gekoppelten Enzymassay sichtbar gemacht werden. Diese Methode setzt sich aus drei Schritten (SDS-PAGE-Elektroblot-Immundetektion) zusammen und ermöglicht je nach Qualität des verwendeten Antikörpers eine sehr sensitive und spezifische Detektion eines Proteins. Um unspezifische Bindungen zu minimieren, wurde die PVDF-Membran für eine Stunde in 5%iger Magermilch-Lösung blockiert und anschließend mit einem spezifischen Antikörper (primärer Antikörper) über Nacht bei 4°C auf einem

Schwenkschüttler inkubiert (vgl. Tabelle 5). Der Blot wurde in PBST gewaschen (3x 10 min) und für eine weitere Stunde mit einem an Peroxidase gekoppelten Anti-Immunglobulin-Antikörper (sekundärer Antikörper) inkubiert (vgl. Tabelle 5). Nach erneutem Waschen mit PBST (3x 10 min) wurde der Antigen-Antikörperkomplex durch eine Chemilumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht.

**Tabelle 5: Eingesetzte Antikörper und Antikörperkonzentrationen**

Antikörper	Verdünnung	Spezies	Firma
Arc/Arg3.1	1 : 15.000	Kaninchen	SynapticSystem
PSD-95	1 : 2.500	Maus	Dianova
beta-Aktin	1 : 500.000	Maus	SigmaAldrich
GAPDH	1 : 100.000	Maus	Millipore
Phos. ERK	1 : 4.000	Maus	Cell Signaling
Gesamt ERK	1 : 1.000	Kaninchen	Cell Signaling
GluA1	1 : 4.000	Kaninchen	Millipore
GluA2	1 : 15.000	Kaninchen	BD Biosciences
Cadherin	1 : 5.000	Maus	Abcam
Anti-Maus	1 : 10.000	Pferd	Vector
Anti-Kaninchen	1 : 10.000	Ziege	Vector

Antikörper wurden von den folgenden Firmen bestellt: **Cell Signaling Technology** (Cell Signaling Technology, Inc., 3 Trask Lane, Danvers, MA 01923, USA); **Dianova** (DIANOVA GmbH, Warburgstraße 45, 20354 Hamburg, Deutschland) 65824 Schwalbach, Deutschland); **Millipore** (verkauft durch Merck Chemicals, Am Kronberger Hang 5, 65824 Schwalbach, Deutschland); **NEB** (New england Biolabs, Brüningstr. 50 Geb. G 810, 65926 Frankfurt am Main, Deutschland); **SySy** (Synaptic Systems, Rudolf-Wissell-Str. 28, 37079 Göttingen, Deutschland).

### 2.3.3.5 „Strippen“ von Western-Blot-Membranen

#### „Stripping“-Puffer

62,5 mM Tris Hcl pH 6,8

2 % SDS

100 mM 2-Mercaptoethanol

Um eine Membran nacheinander mit verschiedenen Antikörpern analysieren zu können, wurden die nicht denaturierten Proteine nach dem ersten Proteinnachweis durch „stripfen“ entfernt. PVDF-Membranen wurden nach der Erstdetektion mit PBST gewaschen. Anschließend wurde die Blotmembran in 100% Methanol inkubiert, getrocknet und ein weiteres Mal mit Methanol inkubiert. Methanolreste wurden in anschließenden Waschschrinen mit PBS entfernt und die Membran 30 Minuten bei 50°C mit Stripping-Puffer inkubiert. Reste des Stripping-Puffers wurden durch nachfolgende Waschschrine mit PBST entfernt und die Membran erneut für den immunchemischen Nachweis der Proteine

verwendet. Somit ließ sich auf einer Membran das Proteinsignal des phosphorylierten, als auch Gesamt-ERK1/2-Proteins detektieren.

#### 2.3.3.6 ECL

Die Detektion der Proteinsignale erfolgte durch eine Peroxidase-katalysierte Reaktion mit Hilfe des Pierce-SuperSignal Pico Kit (Thermo Scientific). Die Blotmembran wurde für anderthalb Minuten mit einem 2:1-Gemisch aus Lösung A und B inkubiert. Chemilumineszenzsignale vom Antigen-Antikörperkomplex wurden mit Hilfe des ImageQuant LAS4000mini (GE Healthcare) detektiert.

### **2.4 Auswertung, Analyse und Quantifizierung**

#### 2.4.1 Relative Quantifizierung der mRNA-Daten

Die relative Quantifizierung der erhaltenen qPCR-Daten erfolgte nach der von Pfaffl et al. (2001) beschriebenen Methode. Dazu wurden die erhaltenen Daten aus der qPCR für die Effizienz der Arc/Arg3.1- und beta-Aktin-PCR-Reaktion korrigiert. Die Effizienz-korrigierten Werte wurden anschließend auf das Referenzgen beta-Aktin normalisiert. Stimulationsbedingte Unterschiede in den Arc/Arg3.1-Signalen wurden relativ zur Kontrolle ausgedrückt. Die Ergebnisse mehrerer unabhängiger Versuche wurden gepoolt und mit Hilfe von Sigma Plot 11.0 und Adobe Illustrator abgebildet.

#### 2.4.2 Relative Quantifizierung von Chemilumineszenz-Signalen

Chemilumineszenz-Signale wurden mit Hilfe des ImageQuant LAS4000mini (GE Healthcare) detektiert. Die detektierten Signale wurden mit Hilfe des Programms ImageJ densitometrisch analysiert. Die so erhaltenen Werte wurden auf die des Referenzproteins beta-Aktin, im Fall von Arc/Arg3.1 oder PSD-95 normalisiert. Chemilumineszenzsignale für die Proteine GluA1 bzw. GluA2 wurden auf Cadherin und Proteinsignale des phosphorylierten ERK1/2-Proteins auf Gesamt-ERK1/2-Proteinlevel normalisiert. Stimulationsbedingte Unterschiede wurden relativ zur Kontrolle dargestellt. Die Ergebnisse mehrerer unabhängiger Versuche wurden gepoolt und mit Hilfe von Sigma Plot 11.0 und Adobe Illustrator abgebildet.

### 2.4.3 Statistik

Statistische Analysen der erhaltenen Quantifizierungsdaten erfolgten unter Verwendung des Programms Sigma Plot 11.0. Die in einzelnen, unabhängigen Experimenten erhaltenen Daten wurden nach der Normalisierung gepoolt und im Hinblick auf ihre Normalverteilung analysiert. Im Fall der Normalverteilung wurden die Proben mit Hilfe des student-t-Tests verglichen. Nicht-normalverteilte Stichproben wurden mittels „Mann-Whitney-Rank-Sum“-Test auf ihre Signifikanz überprüft. Werte von  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen. Signifikante Unterschiede sind in den abgebildeten Grafiken eingefügt.

## **3 Ergebnisse**



Schnitten des Maushirns. Elektrophysiologische Messungen wurden von Ora Ohana in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt und ausgewertet. Wie der Abbildung 1 zu entnehmen ist, induziert die dreiminütige Badapplikation des NMDA-Rezeptor-Agonisten eine sofortige und langanhaltende Depression postsynaptischer Feldpotentiale in der CA1-Region des Hippocampus. Die Depression ist charakterisiert durch eine starke Reduktion der fEPSP-Anstiege („slope“) in der Induktionsphase (Abb. 1, vgl. b). Im zeitlichen Verlauf zeigt sich eine Erholung der initialen Depression. 30 Minuten nach der NMDA-Stimulation stabilisiert sich die Depression. Messungen in hippocampalen Hirnschnitten, denen zur Kontrolle die Trägersubstanz (H<sub>2</sub>O) appliziert wurde, zeigen keine Schwankungen in den abgeleiteten Feldpotentialen.

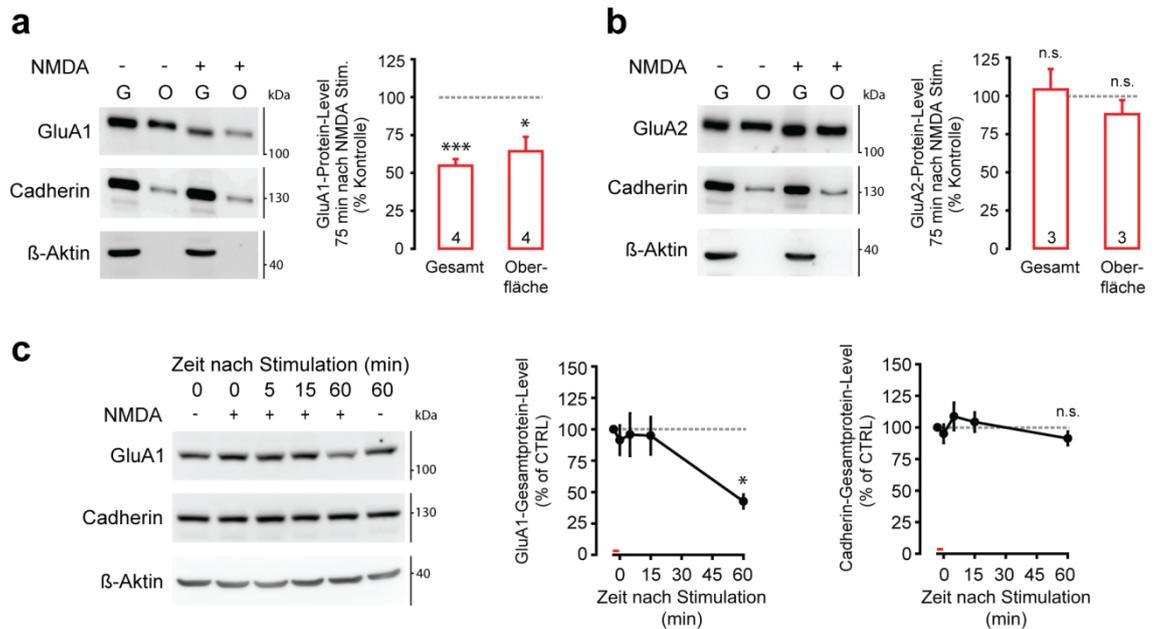
### 3.1.2 NMDA-LTD korreliert mit einer reduzierten GluA1-Expression an der neuronalen Zelloberfläche

Langanhaltende Depressionen der synaptischen Transmission können durch verschiedene zelluläre Prozesse hervorgerufen werden. Ein Model zur Erklärung langanhaltender Formen der synaptischen Plastizität ist die veränderte postsynaptische Expression von AMPA-Rezeptoren. Mehrere unabhängige Studien konnten zeigen, dass eine NMDA-Applikation das Expressionslevel von GluA1-haltigen AMPA-Rezeptoren an der Oberfläche von Neuronen reduziert (Lee et al. 2003; Colledge et al., 2003; Snyder et al., 2005; Waung et al., 2008). Um dies zu überprüfen wurden akute hippocampale Hirnschnitte der Maus entsprechend des NMDA-LTD-Protokolls mit NMDA (20 µM) stimuliert. Proteine der neuronalen Zelloberfläche wurden eine Stunde nach der Stimulation mit Biotin markiert und durch Avidin-Pulldown aus der Gesamtproteinfraction separiert. Durch Western-Blot-Analysen konnten das Expressionslevel der einzelnen Oberflächenproteine („O“), sowie deren Gesamtproteinlevel („G“) bestimmt werden (vgl. Abb. 2). Der Fokus der Untersuchung lag auf den Proteinen GluA1 und GluA2, die zwei Untereinheiten des AMPA-Rezeptors darstellen. Als stimulationsunabhängige Ladekontrolle wurde das Expressionslevel des Oberflächenproteins Cadherin bestimmt. Zur Überprüfung der Spezifität der Biotinylierung wurde zusätzlich das Expressionslevel des Proteins beta-Aktin analysiert, dass nicht an der neuronalen Zelloberfläche exprimiert wird. Die Abbildung 2 zeigt, dass die NMDA-LTD mit einer Veränderung des GluA1-Expressionslevels einhergeht. So führt die kurzfristige NMDA-Applikation zu einer Reduktion des GluA1-Expressionlevels an der neuronalen Zelloberfläche (Abb. 2a, KTRL: 100,00 ± 0,00 % und NMDA: 64,24 ± 9,46 %, n=4; \*P=0,029). Interessanterweise ist parallel eine Reduktion des GluA1-Gesamtproteinlevels durch NMDA zu

beobachten (Abb. 2a, KTRL:  $100,00 \pm 0,00$  % und NMDA:  $54,80 \pm 4,29$  %,  $n=4$ ;  $***P \leq 0,001$ ). Die GluA2-Untereinheit des AMPA-Rezeptors zeigt hingegen keine signifikanten NMDA-abhängigen Unterschiede im Expressionslevel (Abb. 2b Oberfläche, KTRL:  $100,00 \pm 0,00$  % und NMDA:  $87,78 \pm 9,20$  %,  $n=3$ ;  $P=0,700$ ), (Abb. 2b Gesamt, KTRL:  $100,00 \pm 0,00$  % und NMDA:  $102,01 \pm 11,08$  %,  $n=3$ ;  $P=0,394$ ). Für die Proteine Cadherin und beta-Aktin konnten ebenfalls keine NMDA-abhängigen Veränderungen des Expressionslevels nachgewiesen werden.

Zur näheren Charakterisierung der GluA1-Gesamtproteinreduktion wurden primäre Neuronenkulturen aus dem Vorderhirn der Maus verwendet. Diese wurden 14 Tage kultiviert („day *in vitro*“, DIV 14) und anschließend nach dem NMDA-LTD-Protokoll stimuliert. Das GluA1-Gesamtproteinlevel wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Stimulation untersucht (Abb. 2c). Dazu wurden gleiche Proteinmengen für jeden Zeitpunkt per Western-Blot analysiert. Die Ergebnisse der kinetischen Analyse deuten auf einen zeitabhängigen Prozess der GluA1-Reduktion hin. So konnte bis zu 15 Minuten nach der Stimulation keine Reduktion der GluA1-Gesamtexpression festgestellt werden (0 min:  $100,00 \pm 0,00$  % und 15 min:  $94,89 \pm 14,88$  %,  $n=5$ ;  $P=0,374$ ). 60 Minuten nach der Stimulation lässt das reduzierte GluA1-Gesamtproteinlevel einen langsamen NMDA-abhängigen Prozess vermuten (0 min:  $100,00 \pm 0,00$  % und 60 min:  $42,53 \pm 5,52$  %,  $n=5$ ;  $*P=0,030$ ). Die Negativkontrolle Cadherin zeigt über den gesamten Versuchszeitraum keine signifikanten Expressionsunterschiede (0 min:  $100,00 \pm 0,00$  % und 60 min:  $91,32 \pm 5,36$  %,  $n=5$ ;  $P=0,374$ ). Expressionslevel des Proteins beta-Aktin dienten in allen Versuchen als stimulationsunabhängige Ladekontrolle.

Zusammenfassend konnte ich bestätigen, dass NMDA eine chemische Form der LTD induziert. Diese Form der NMDA-LTD ist mit einer Reduktion der GluA1-haltigen AMPAR-Expression an der neuronalen Zelloberfläche assoziiert. Ferner konnte ich zeigen, dass NMDA die neuronale GluA1-Gesamtexpression runterreguliert.

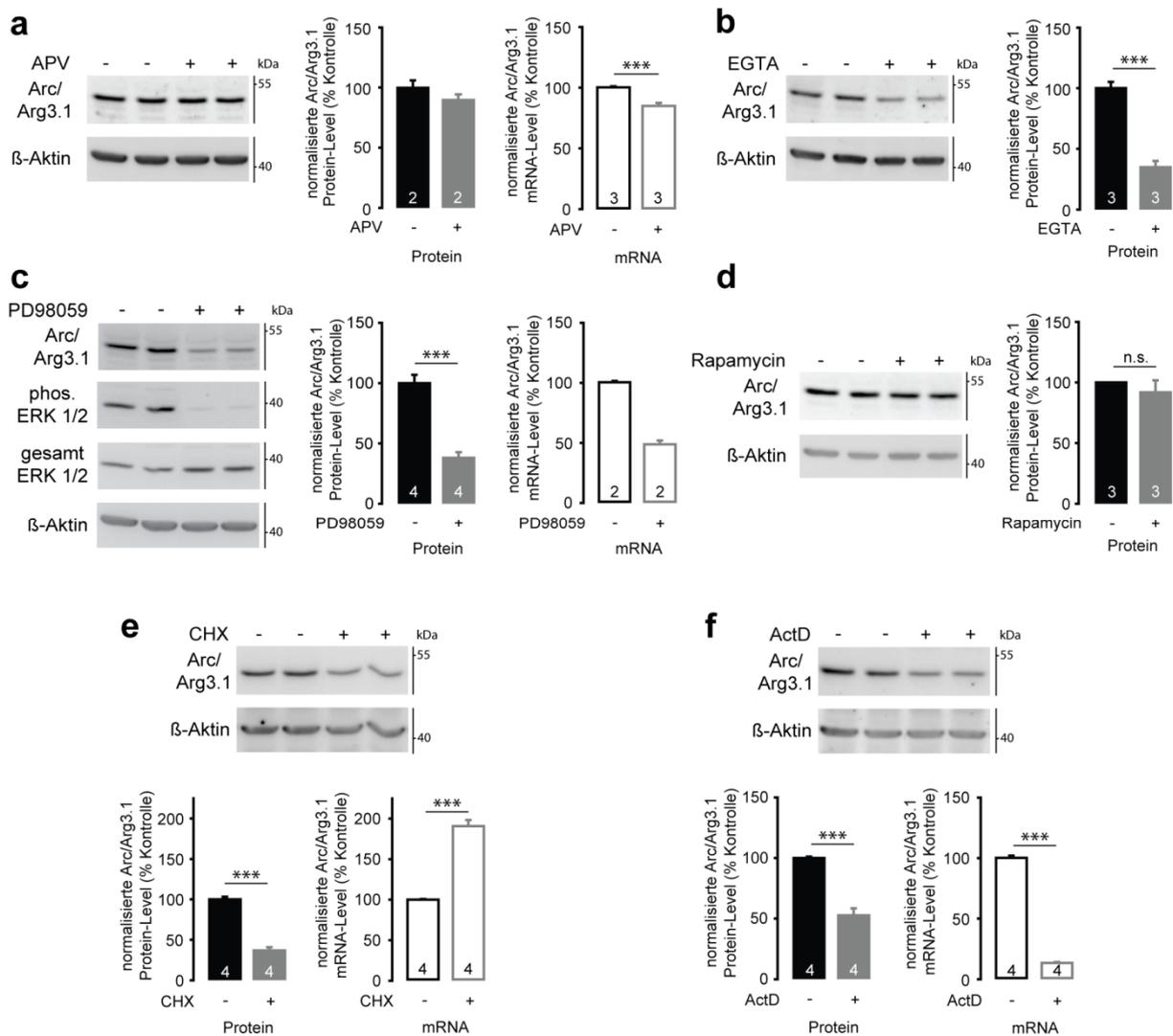


**Abbildung 2 Die NMDA-induzierte, chemische LTD ist mit einer reduzierten GluA1-haltigen AMPAR-Expression an der neuronalen Zelloberfläche assoziiert. (a)** NMDA-Stimulation reduziert die neuronale Oberflächenexpression von GluA1-haltigen AMPA-Rezeptoren (n=4), **(b)** beeinflusst hingegen nicht die Oberflächenexpression der GluA2-enthaltenden AMPA-Rezeptoren (n=3). **(a,b)** Hippocampale Hirnschnitte der Maus wurden drei Minuten durch NMDA-Badapplikation (20  $\mu$ M) stimuliert „+“. Proteinsignale wurden durch Western-Blot-Analyse detektiert. Western-Blots zeigen repräsentative Chemilumineszenz-Signale der Proteine: GluA1 bzw. GluA2, Cadherin und beta-Aktin. beta-Aktin dient als Biotinylierungskontrolle. „G“ kennzeichnet die Gesamtprotein-Fraktion, „O“ symbolisiert die Fraktion biotinylierter Proteine. Die Quantifizierung der Chemilumineszenz-Signale erfolgte mit Hilfe des Programmes ImageJ. Die Ergebnisse der Quantifizierung sind grafisch dargestellt. GluA1- und GluA2-Signale wurden auf Cadherin normalisiert und sind relativ zur Kontrolle „-“ abgebildet. **(c)** NMDA reduziert das totale GluA1-Proteinlevel 60 Minuten nach der Stimulation. Dissoziierte Neuronenkulturen aus dem Vorderhirn der Maus wurden drei Minuten durch NMDA-Badapplikation (20  $\mu$ M) stimuliert. Proteinproben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (0, 5, 15 und 60 min) nach der Stimulation genommen. Immunoblots zeigen Proteinsignale der Proteine GluA1, Cadherin und beta-Aktin. beta-Aktin dient als Ladekontrolle, Cadherin als Negativkontrolle. Mitte und rechts: Darstellung der quantifizierten Chemilumineszenz-Signale für GluA1 und Cadherin in Abhängigkeit von der Zeit (n=5). **(a-c)** Abgebildet sind der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests (2a,b) und dem Kruskal-Wallis-One-Way-Annova-Test (2c) überprüft. \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001; n.s. = nicht signifikant unterschiedlich.

### 3.2 Die Arc/Arg3.1-Expression in Neuronen wird auf verschiedenen molekularen Ebenen über vielfältige Prozesse dynamisch reguliert

Ein Gen, das an der Regulation der Expression und Verteilung von AMPA-Rezeptoren beteiligt ist, ist das IEG Arc/Arg3.1 (Shepherd et al., 2006; Chowdhury et al., 2006; Waung et al., 2008; Korb et al., 2013). Bekannterweise wird die Arc/Arg3.1-Expression durch synaptische Aktivierung induziert (Link et al., 1995; Waltereit et al., 2001; Shepherd et al., 2006; Messaoudi et al., 2007; Park et al., 2008; Kawashima et al., 2009; Bateup et al., 2013). Pharmakologische Untersuchungen konnten zeigen, dass die Hemmung synaptischer Aktivität zu einer Reduktion des basalen Arc/Arg3.1-Expressionslevels in primären Neuronenkulturen führt (Shepherd et al., 2006; Bateup et al., 2013).

Zur Charakterisierung der molekularen Mechanismen für die Regulation der Arc/Arg3.1-Expression wurden dissoziierte Neuronenkulturen aus dem Vorderhirn der Maus mit pharmakologischen Inhibitoren für einzelne molekulare Vorgänge behandelt. Für die Analyse wurden die Neuronenkulturen bis zum Tag 14-17 kultiviert („day *in vitro*“, DIV 14-17). Arc/Arg3.1-mRNA und Protein wurden mittels qRT-PCR- und quantitativer Western-Blot-Analysen untersucht. Als Ladungskontrolle wurden die Expressionslevel von beta-Aktin überprüft. Einer der wichtigsten Detektoren für synaptische Aktivität ist der NMDA-Rezeptor (Lüscher & Malenka et al., 2012). Um die Abhängigkeit der basalen Arc/Arg3.1-Expression von der NMDA-Rezeptor-Aktivität zu untersuchen, wurden Neuronenkulturen mit 2-Amino-5-Phosphonovaleriansäure (APV) inkubiert. APV ist ein kompetitiver NMDAR-Antagonist, der selektiv die Glutamatbindestelle des NMDA-Rezeptors blockiert. Abbildung 3a ist zu entnehmen, dass die einstündige Inkubation primärer Neuronen mit APV (50  $\mu$ M) keine signifikante Reduktion des basalen Arc/Arg3.1-Proteinlevels bewirkte (Abb. 3a, KTRL: 100,00  $\pm$  6,24 % und APV: 89,87  $\pm$  4,64 %, n=2). Hingegen konnte eine geringe Reduktion des Arc/Arg3.1-mRNA-Levels detektiert werden (Abb. 3a, KTRL: 100,00  $\pm$  0,85 % und APV: 84,90  $\pm$  2,48 %, n=3; \*\*\*P $\leq$ 0,001). Ein weiteres wichtiges Molekül für die Weiterleitung synaptischer Signale ist der sekundäre Botenstoff Calcium. Vorangegangene Untersuchungen konnten *in vitro* eine Calciumabhängigkeit der Arc/Arg3.1-Expression feststellen (Zheng et al., 2009). Diese Beobachtungen ließen sich in Experimenten mit dem Calciumchelator EGTA (2,5 mM) bestätigen (Abb. 3b). So führte die anderthalbstündige Badapplikation von EGTA zu einer signifikanten Reduktion des Arc/Arg3.1-Proteinlevels (KTRL: 100,00  $\pm$  5,21 % und EGTA: 34,91  $\pm$  5,11 %, n=3; \*\*\*P $\leq$ 0,001). In weiteren Versuchen konnte die Notwendigkeit der ERK1/2-Aktivierung für eine stabile basale Arc/Arg3.1-Expression dargelegt werden (Abb. 3c). So induzierte die anderthalb-stündige Applikation des MEK-Inhibitors PD98059 (50  $\mu$ M) eine signifikante Reduktion der Arc/Arg3.1-Protein- (KTRL: 100,00  $\pm$  6,83 % und PD98059: 38,12  $\pm$



**Abbildung 3** Das basale Arc/Arg3.1-Expressionlevel wird auf der mRNA- und der Proteinebene über vielfältige Prozesse rasch und dynamisch reguliert. **(a)** NMDA-Rezeptoraktivität ist notwendig zur Aufrechterhaltung des basalen Arc/Arg3.1-mRNA-, aber nicht des Proteinlevels. Dissoziierte Neuronenkulturen aus dem Vorderhirn der Maus wurden eine Stunde mit APV (50  $\mu$ M) inkubiert und anschließend lysiert. **(b)** Inkubationen primärer Neuronenkulturen mit dem Calciumchelator EGTA (2,5 mM) führen zu einer Reduktion des Arc/Arg3.1-Proteinlevels. Dissoziierte Neuronenkulturen wurden anderthalb Stunden durch EGTA-Badapplikation behandelt. Nach der Inkubation wurden die Zellen lysiert. **(c)** Applikation des MEK-Inhibitors PD98059 (50  $\mu$ M) resultiert in einer Dephosphorylierung der ERK1/2-Kinase und einer Runterregulierung des Arc/Arg3.1-Protein und mRNA-Leveln. Dissoziierte Neuronenkulturen aus dem Vorderhirn der Maus wurden anderthalb Stunden mit PD98059 inkubiert. Nach der Behandlung wurden die Zellen lysiert. **(d)** Inhibition der mTOR Kinase mit Rapamycin (10 nM) bewirkt keine signifikante Veränderung des Arc/Arg3.1-Proteinlevels. Neuronenkulturen wurden zwei Stunden mit Rapamycin inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen lysiert. **(e)** Blockierung der Proteintranslation mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid (CHX) resultiert in einer Reduktion des Arc/Arg3.1-Proteinlevels und einer Steigerung des Arc/Arg3.1-mRNA-Leveln. Dissoziierte Neuronenkulturen aus dem Vorderhirn der Maus wurden eine Stunde mit CHX (50  $\mu$ M) behandelt. Nach der Behandlung wurden die Zellen lysiert. **(f)** Inhibition der Transkription mit ActinomycinD (ActD) vermittelt eine Reduktion des Arc/Arg3.1-Protein- und mRNA-Leveln. Dissoziierte Neuronenkulturen wurden eine Stunde mit ActD (10  $\mu$ M) inkubiert und die Zellen anschließend lysiert. **(a-f)** Proteine wurden per Western-Blot analysiert. mRNA wurde durch qRT-PCR detektiert. Immunoblots zeigen Chemilumineszenz-Signale der Proteine Arc/Arg3.1, beta-Aktin, phosphoryliertes ERK1/2 und ERK1/2-Gesamtprotein. Dargestellte Graphen zeigen quantifizierte Protein- (ausgefüllte Balken) und mRNA-Level (leere Balken). Abgebildet sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Stimulationen (grau), Kontrollstimulation mit Trägersubstanz (schwarz). Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests überprüft. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; n.s. = nicht signifikant unterschiedlich.

4,62 %, n=4; \*\*\*P≤0,001) und mRNA-Level (KTRL: 100,47 ± 1,22 % und PD98059: 48,86 ± 3,19 %, n=2). Die zweistündige Inkubation mit Rapamycin (10 nM), einem Inhibitor der mTOR-Kinase, bewirkte hingegen keine signifikante Veränderung des basalen Arc/Arg3.1-Proteinlevels (Abb. 3d, KTRL: 100,00 ± 0,00 % und Rapa: 91,89 ± 9,84 %, n=3; P=0,456). Unabhängige Studien konnten für das Arc/Arg3.1-Protein und die Arc/Arg3.1-mRNA eine geringe Halbwertszeit nachweisen (Rao et al., 2006; Park et al., 2008; Bateup et al., 2013). Um dies zu überprüfen, wurden Inhibitoren für Translations- oder Transkriptionsprozesse verwendet. Der Translationsinhibitor Cycloheximid (CHX) hemmt selektiv die Funktion eukaryotischer Ribosomen durch Blockierung des Translokationsschrittes der Elongation. Die einstündige Inkubation dissoziierter Kulturen mit CHX (50 µM) bewirkte eine Reduktion des basalen Arc/Arg3.1-Proteinlevels (Abb. 3e, KTRL: 100,00±3,22 % und CHX: 36,81 ± 3,88 %, n=4; \*\*\*P≤0,001). Diese Reduktion auf der Proteinebene ist an eine Erhöhung des Arc/Arg3.1-mRNA-Level durch CHX gekoppelt (Abb. 3e, KTRL: 100,11 ± 0,78 % und CHX: 190,77 ± 7,57 %, n=4; \*\*\*P≤0,001). Diese Beobachtung wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Giorgi et al., 2007; Barker-Haliski et al., 2012; Bateup et al., 2013). Zur Blockierung des Transkriptionsprozesses wurde ActinomycinD (ActD) verwendet. ActD interkaliert mit den Guanin-Nucleotiden der DNA und blockiert dadurch die RNA-Polymerase. Nach der einstündigen Badapplikation von ActD (10µM) konnte eine Reduktion der Arc/Arg3.1-mRNA (Abb. 3f, KTRL: 100,18 ± 1,83 % und ActD: 13,45 ± 0,75 %, n=4;\*\*\*P≤0,001), sowie des Arc/Arg3.1-Proteinlevels (Abb. 3f, KTRL: 100,00 ± 0,98 % und ActD: 52,66 ± 5,67 %, n=4; \*\*\*P≤0,001) beobachtet werden. Die Ergebnisse deuten somit auf eine Halbwertszeit von unter einer Stunde für die Arc/Arg3.1-mRNA, als auch das Arc/Arg3.1-Protein hin. Darüber hinaus ließ sich nachweisen, dass die basale Arc/Arg3.1-Proteinexpression zusätzlich über die Proteasomen-vermittelte Proteindegradation kontrolliert werden kann (vgl. Abb. 11a).

Zusammengefasst wird das basale Arc/Arg3.1-Expressionslevel durch Calcium- und ERK1/2-beteiligte Synthese- und Abbauprozesse auf der mRNA, als auch Proteinebene rasch und dynamisch reguliert. Darüber hinaus, weisen die Experimente mit dem NMDAR-Antagonisten APV auf eine geringe Bedeutung der NMDAR-Aktivität für die Einstellung der basalen Arc/Arg3.1-Expression hin.

### 3.3 Die LTD-produzierende NMDA-Applikation vermittelte eine Reduktion der Arc/Arg3.1-Expression

Seit der Entdeckung des Arc/Arg3.1-Gens (1995) wurde eine Vielzahl verschiedener Stimulationsprotokolle beschrieben, die zur Induktion der Arc/Arg3.1-Expression sowie zur synaptischen Plastizität führen. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Induktion der chemischen Form der mGluR-abhängigen LTD durch DHPG-Zugabe mit einer Erhöhung der Arc/Arg3.1-Expression einhergeht (Wang et al., 2008; Park et al., 2008).

Ein weiterer Rezeptor, der die aktivitätsabhängige Arc/Arg3.1-Expression reguliert, ist der NMDA-Rezeptor. So wurde herausgefunden, dass elektrische Stimulationen zur Induktion NMDAR-abhängiger LTP die Arc/Arg3.1-Expression induzieren (Steward & Worley et al., 2001; Messaoudi et al., 2007). Eine charakteristische Eigenschaft des NMDA-Rezeptors besteht darin, dass er synaptische Effizienz bidirektional regulieren kann. Neben der NMDAR-abhängigen LTP ist auch die NMDAR-abhängige LTD beschrieben (Malenka & Bear et al., 2004). Neuere Studien demonstrierten, dass die Arc/Arg3.1-Expression durch die Induktion der NMDAR-abhängigen LTD eher vermindert wird (Yilmaz-Rastoder et al., 2011). Im Folgenden beschriebene Experimente dienen somit zur Charakterisierung der mit der NMDA-LTD korrelierten Regulation der Arc/Arg3.1-Expression.

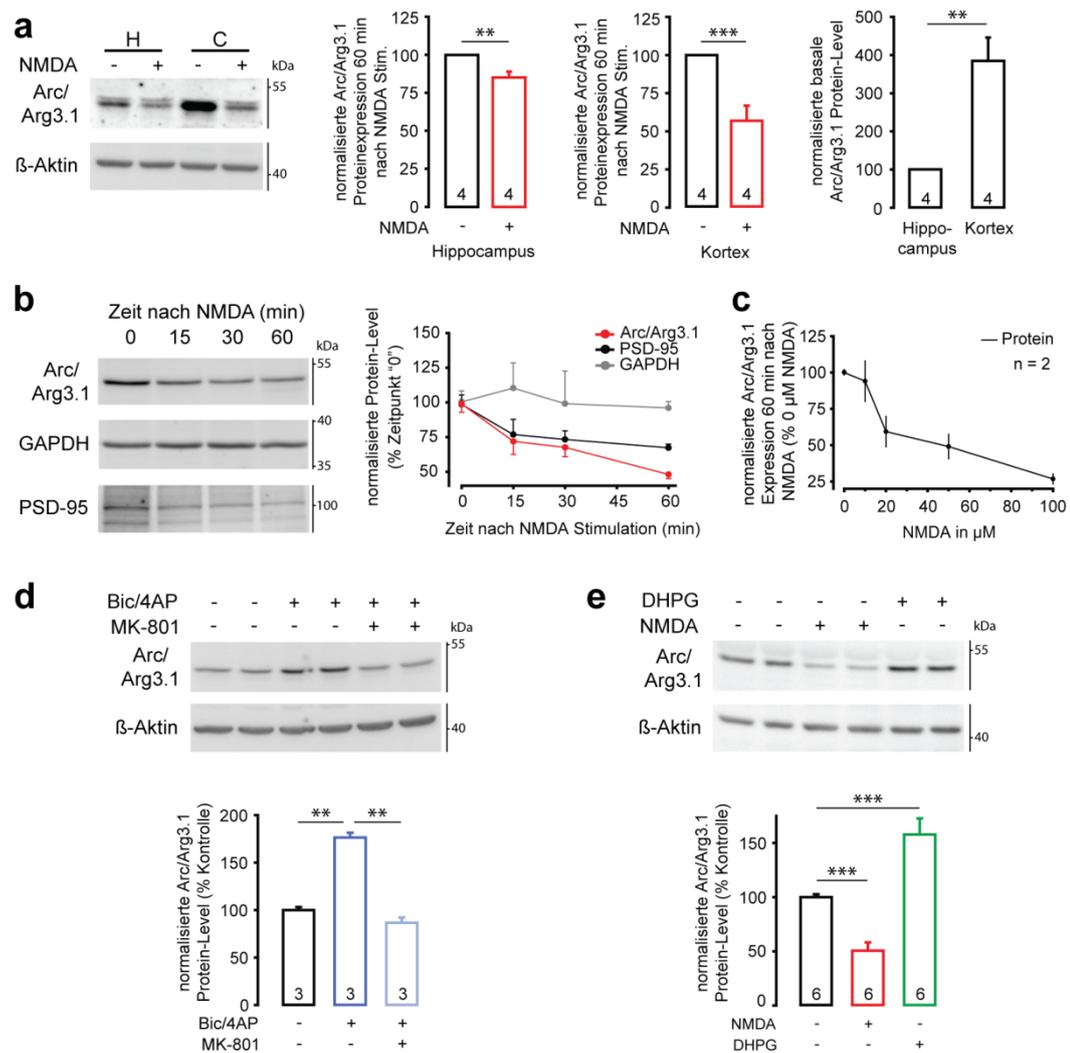
#### 3.3.1 Die NMDA-Applikation vermindert die Arc/Arg3.1-Proteinexpression in hippocampalen Gewebeschnitten sowie primären Neuronenkulturen des Maushirns

Um die Änderung der Arc/Arg3.1-Expression bei der NMDAR-abhängigen LTD zu untersuchen, wurden akute hippocampale Hirnschnitte der Maus nach dem NMDA-LTD-Protokoll stimuliert. Eine Stunde nach der Stimulation wurden die Gewebeschnitte homogenisiert und Arc/Arg3.1-Proteinsignale per Western-Blot-Analyse quantifiziert. Beta-Aktin wurde als Ladungskontrolle der SDS-PAGE eingesetzt. Die Abbildung 4a legt dar, dass die kurzfristige Badapplikation von NMDA verminderte Arc/Arg3.1-Proteinlevel sowohl im Hippocampus, als auch im Kortex hervorruft. Interessanterweise ist die durch NMDA ausgelöste Arc/Arg3.1-Reduktion im kortikalen Gewebe stärker ausgeprägt (Kortex KTRL:  $100,00 \pm 0,00$  % und Kortex NMDA:  $56,62 \pm 10,07$  %,  $n=4$ ;  $***P \leq 0,001$ ), (Hippo KTRL:  $100,00 \pm 0,00$  % und Hippo NMDA:  $85,16 \pm 3,84$  %,  $n=4$ ;  $**P=0,010$ ). Ferner zeigt der Kortex unter der Kontrollbedingung ein fast vierfach höheres Arc/Arg3.1-Proteinlevel (Abb. 4a, Hippo KTRL:  $100,00 \pm 0,00$  % und Kortex KTRL:  $384,12 \pm 61,04$  %,  $n=4$ ;  $**P=0,008$ ).

Zur Untersuchung der zeitlichen Dynamik der NMDA-abhängigen Arc/Arg3.1-Reduktion wurden

dissoziierte Neuronenkulturen aus dem Vorderhirn der Maus verwendet. Diese wurden dem NMDA-LTD-Protokoll nach an DIV 14 stimuliert. Die Proteinlevel wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Stimulation bestimmt. Als stimulationsunabhängige Ladungskontrolle fungierte das Protein Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Colledge et al. (2003) konnten zeigen, dass NMDA zu einer Reduktion der PSD-95-Proteinmenge führt. Zur Positivkontrolle der NMDA-Stimulation wurden deshalb die Expressionslevel vom PSD-95-Protein zusätzlich überprüft. Der Abbildung 4b ist zu entnehmen, dass die NMDA-Applikation eine fortschreitende Reduktion der Arc/Arg3.1- als auch PSD-95-Proteinmenge über den gesamten Versuchszeitraum von 60 Minuten bewirkt (Arc/Arg3.1 0 min:  $98,90 \pm 5,94$  % und Arc/Arg3.1 60 min:  $48,11 \pm 2,97$  %,  $n=8$ ;  $***P=0,001$ ), (PSD-95 0 min:  $98,53 \pm 6,75$  % und PSD-95 60 min:  $67,27 \pm 2,69$  %,  $n=6$ ;  $***P=0,001$ ). Ein Unterschied im zeitlichen Verlauf lässt sich jedoch erkennen. So erreicht PSD-95 bereits ein stabiles, reduziertes Level 15 Minuten nach der Stimulation (15 min:  $76,82 \pm 10,93$  %, 30 min:  $73,30 \pm 6,24$  % und 60 min:  $67,27 \pm 2,69$  %,  $n=6$ ). Die Arc/Arg3.1-Proteinmenge ist hingegen zwischen der 30. und 60. Minute weiter reduziert (15 min:  $72,00 \pm 9,41$  %, 30 min:  $67,66 \pm 6,76$  % und 60 min:  $48,11 \pm 2,97$  %,  $n=8$ ). Die Expression der Negativkontrolle GAPDH zeigte keine signifikanten Änderungen nach der NMDA-Stimulation (0 min:  $100,30 \pm 7,98$  %, 15 min:  $110,26 \pm 18,17$  % und 30 min:  $99,06 \pm 23,52$  % und 60 min:  $96,00 \pm 4,53$  %,  $n=8$ ).

Zur Überprüfung eines möglichen Dosis-abhängigen Effekts von NMDA auf die Arc/Arg3.1-Expression, wurden dissoziierte Neuronenkulturen des Mausvorderhirns mit NMDA in verschiedenen Konzentrationen (10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 50  $\mu$ M und 100  $\mu$ M) für jeweils drei Minuten stimuliert. Die Proteinexpression wurde 60 Minuten nach der Stimulation analysiert. Die Abbildung zeigt, dass NMDA in Konzentrationen niedriger als 20  $\mu$ M keine Reduktion der Arc/Arg3.1-Proteinexpression bewirkte (Abb. 4c, 0  $\mu$ M NMDA:  $100,00 \pm 1,59$  %, 10  $\mu$ M NMDA:  $94,13 \pm 13,91$  % und 20  $\mu$ M NMDA:  $59,36 \pm 10,42$  %,  $n=2$ ). NMDA in höheren Konzentration (über 20  $\mu$ M) vermittelte starke reduzierende Effekte auf die Arc/Arg3.1-Expression (Abb. 4c, 20  $\mu$ M NMDA:  $59,36 \pm 10,42$  %, 50  $\mu$ M NMDA:  $49,08 \pm 8,41$  % und 100  $\mu$ M NMDA:  $26,76 \pm 3,39$  %,  $n=2$ ). Ein häufig verwendetes neuronales Stimulationsprotokoll ist die gleichzeitige Applikation des kompetitiven GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Antagonisten Bicucullin (Bic, 20  $\mu$ M) und des Kaliumkanalblockers 4-Aminopyridin (4AP; 100  $\mu$ M). Die Blockierung von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren führt zu einer gesteigerten synaptischen Transmission, da die Bildung inhibitorischer, postsynaptischer Potentiale in Neuronen blockiert ist. Die zusätzliche Applikation von 4AP verhindert die Repolarisation postsynaptischer Potentiale und bewirkt somit eine Verlängerung der postsynaptischen Depolarisation. Es ist bereits gut untersucht, dass eine Bic/4AP-Stimulation eine Erhöhung der Arc/Arg3.1-Proteinexpression in primären Neuronenkulturen



**Abbildung 4 Die NMDA-induzierte, chemische LTD geht mit einer Reduktion der Arg3.1 Proteinexpression einher.** (a) NMDA (20  $\mu\text{M}$ ) reduziert das Arc/Arg3.1-Proteinlevel in akuten hippocampalen Hirnschnitten der Maus. Der Vergleich hippocampaler und kortikaler Hirnregionen zeigt eine stärkere Reduktion des Arc/Arg3.1-Expressionslevels im Kortex. Dies korreliert mit einer höheren basalen Arc/Arg3.1-Proteinexpression im Kortex. Hippocampale Hirnschnitte der Maus wurden durch dreiminütige NMDA-Badapplikation stimuliert (n=4). Proteinproben wurden eine Stunde nach der Behandlung genommen. Immunoblots zeigen Chemilumineszenz-Signale der Proteine Arc/Arg3.1 und beta-Aktin. beta-Aktin dient als Ladungskontrolle. Abgebildete Graphen zeigen die Ergebnisse der quantifizierten Arc/Arg3.1-Proteinbanden für die entsprechenden Hirnregionen bzw. im Vergleich. (b) Die Reduktion des Arc/Arg3.1-Proteins in dissoziierten Neuronenkulturen ist abhängig von der Zeit. Das Arc/Arg3.1-Proteinlevel wird innerhalb einer Stunde nach der NMDA-Inkubation sukzessiv reduziert, das Minimum wird nach einer Stunde erreicht. Die Behandlung dissoziierter Neuronenkulturen des Mausvorderhirns erfolgte durch dreiminütige NMDA-Badapplikation (20 $\mu\text{M}$ ). Die Kulturen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (0, 15, 30 und 60 min) nach der Stimulation lysiert, per Western-Blot-Analyse ausgewertet (Immunoblot links) und Proteinsignale quantifiziert (Graph rechts). (c) Die Dosis-Wirkungskurve demonstriert, dass die Stimulation mit einer NMDA-Konzentration höher als 20 $\mu\text{M}$  eine stärkere Reduktion des Arc/Arg3.1-Proteinlevels bewirkt. Die Stimulation erfolgte entsprechend (b). Es wurden folgende NMDA-Konzentrationen verwendet: 0, 10, 20, 50 und 100 $\mu\text{M}$ . Proteinproben wurden eine Stunde nach der Behandlung genommen. Der Graph zeigt die quantifizierten Ergebnisse der Western-Blot-Analyse. (d) Inkubation dissoziierter Neuronenkulturen mit Bicucullin/4-Aminopyridin (20 $\mu\text{M}$  Bic/ 100 $\mu\text{M}$  4-AP) erhöht, im Gegensatz zu NMDA, das Arc/Arg3.1-Expressionslevel. Die parallele Inkubation mit dem NMDAR-Inhibitor MK-801 (10 $\mu\text{M}$ ) blockiert die Erhöhung des Arc/Arg3.1-Proteinlevels. Dissoziierte Neuronenkulturen wurden zwei Stunden mit Bic/4AP stimuliert (n=3). Die Inkubation mit MK-801 erfolgte parallel zur Stimulation. Die Kulturen wurden anschließend lysiert und per Western-Blot-Analyse ausgewertet. Die Ergebnisse der Quantifizierung sind im Graph dargestellt. (e) Arc/Arg3.1-Proteinexpression wird bidirektional reguliert. So induziert die kurzfristige Stimulation mit DHPG, im Gegensatz zu NMDA, eine Erhöhung des Arc/Arg3.1-Proteinlevels in dissoziierten Neuronenkulturen. DHPG findet Anwendung zur Induktion der mGluR-abhängigen LTD in Neuronen. Dissoziierte Neuronenkulturen des Mausvorderhirns wurden fünf Minuten mit NMDA bzw. DHPG (50 $\mu\text{M}$ ) stimuliert (n=6). Die Kulturen wurden eine Stunde nach der Stimulation lysiert. Der Graph zeigt die quantifizierten Proteinsignale. (a-e) Abgebildet sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests (a,d,e) bzw. durch One-way-Annova (b) überprüft. \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001; n.s. = nicht signifikant unterschiedlich.

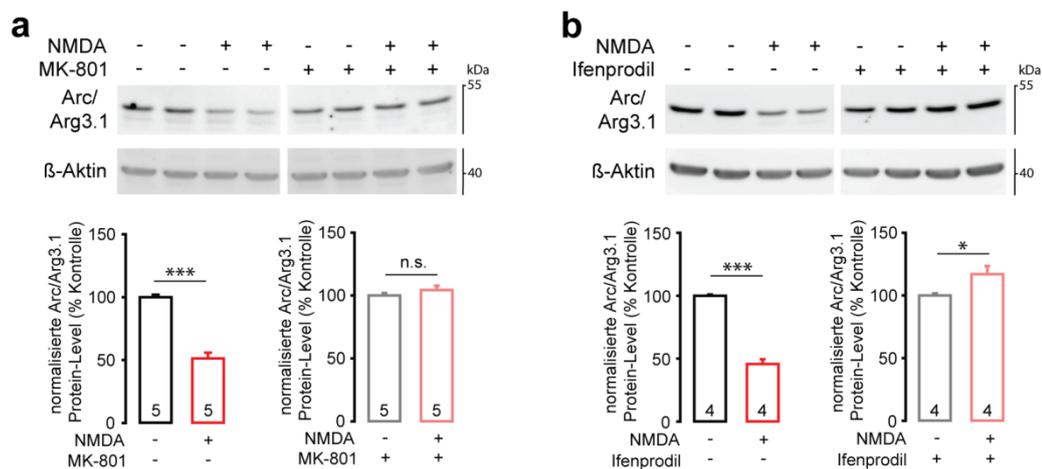
induziert (Kawashima et al., 2009; Alberi et al., 2011; Okuno et al., 2012). Diese Beobachtung ließ sich in eigenen Experimenten bestätigen (Abb. 4d, KTRL:  $100,00 \pm 3,12$  % und Bic/4AP:  $176,50 \pm 5,02$  %,  $n=3$ ;  $**P=0,002$ ). Dazu wurden primäre Neuronenkulturen für zwei Stunden mit Bic/4AP stimuliert und anschließend lysiert. Die Expressionslevel wurden per quantitativer Western-Blot-Analyse überprüft. beta-Aktin diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinauftragung. Interessanterweise ist die Erhöhung der Arc/Arg3.1-Proteinexpression ebenfalls abhängig von der Aktivierung des NMDA-Rezeptors. So blockierte die gleichzeitige Inkubation mit dem nicht-kompetitiven NMDAR-Antagonisten MK-801 ( $10 \mu\text{M}$ ) die Induktion des Arc/Arg3.1-Proteinlevels durch Bic/4AP (Abb. 4d, KTRL:  $100,00 \pm 3,12$  % und Bic/4AP+MK-801:  $86,76 \pm 5,46$  %,  $n=3$ ;  $P=0,065$ ).

Ein weiteres etabliertes pharmakologisches Stimulationsprotokoll ist die Aktivierung der Arc/Arg3.1-Expression durch die Applikation des mGluR-Antagonists Dihydroxyphenylglycin (DHPG), (Park et al., 2008; Waung et al., 2008). Dazu wurden primäre Neuronen aus dem Mausvorderhirn für fünf Minuten mit DHPG ( $50 \mu\text{M}$ ) stimuliert. Die Proteinexpression wurde eine Stunde nach der Stimulation per quantitativer Western-Blot-Analyse überprüft. Die Ergebnisse zeigen, dass die Applikation von DHPG eine Erhöhung der Arc/Arg3.1-Proteinlevel induzierte (Abb. 4d, KTRL:  $100,00 \pm 2,75$  % und DHPG:  $157,92 \pm 14,90$  %,  $n=6$ ;  $***P \leq 0,001$ ).

Zusammenfassend konnte dargelegt werden, dass der LTD-produzierende chemische Stimulus mit NMDA eine signifikante Reduktion der Arc/Arg3.1-Proteinexpression hervorruft. Interessanterweise deuten die Ergebnisse auf eine bidirektionale Regulation der Arc/Arg3.1-Expression durch die Aktivierung des NMDA-Rezeptors hin. Darüber hinaus führen die beiden LTD-induzierenden chemischen Stimuli mit NMDA und DHPG zu einer Verminderung bzw. einer Erhöhung der exprimierten Arc/Arg3.1-Proteinmenge.

### 3.3.2 Die Reduktion der Arc/Arg3.1-Proteinexpression wird vermittelt durch die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren mit der GluN2B-Untereinheit

Zur weiteren Charakterisierung der NMDA-induzierten Arc/Arg3.1-Reduktion wurde zunächst die Abhängigkeit dieses Regulationsprozesses vom NMDA-Rezeptor überprüft. Dizocilpine (MK-801) ist ein nicht-kompetitiver Antagonist des NMDA-Rezeptors, der im Ionenkanal des Rezeptors bindet und selektiv den Ionenstrom von aktivierten NMDA-Rezeptoren inhibiert. Dissoziierten Neuronenkulturen aus dem Vorderhirn der Maus wurde während der NMDA-Applikation MK-801 ( $10 \mu\text{M}$ ) zugegeben. Eine Stunde nach der Stimulation wurden die Zellen lysiert. Abbildung 5a zeigt die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse. Als Ladungskontrolle



**Abbildung 5 Aktivierung des GluN2B-haltigen NMDA-Rezeptors ist notwendig für die NMDA-vermittelte Reduktion der Arc/Arg3.1-Expression.** (a) Applikation von MK-801 (10  $\mu$ M) blockiert die NMDA-abhängige Reduktion des Arc/Arg3.1-Proteinlevels in dissoziierten Neuronenkulturen. MK-801 ist ein nicht-kompetitiver Antagonist, der selektiv im Ionenkanal des NMDA-Rezeptors bindet und dadurch den Ionenstrom durch den Rezeptor blockiert. (b) Inkubation von dissoziierten Neuronenkulturen mit Ifenprodil blockiert ebenfalls die Reduktion des Arc/Arg3.1-Proteinlevels durch NMDA. Ifenprodil ist ein nicht-kompetitiver Antagonist der GluN2B-haltige NMDA-Rezeptoren selektiv blockiert. (a,b) Dissoziierte Neuronenkulturen aus dem Vorderhirn der Maus wurden drei Minuten mit NMDA inkubiert. Eine Stunde nach der Inkubation wurden die Kulturen lysiert. Inkubationen mit den NMDAR-Antagonisten MK-801 bzw. Ifenprodil erfolgten während der dreiminütigen NMDA-Applikation. Proben wurden per Western-Blot analysiert und erhaltene Chemilumineszenz-Signale quantifiziert. Graphen zeigen die Ergebnisse der Quantifizierung. Abgebildet sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests überprüft. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; n.s. = nicht signifikant unterschiedlich.

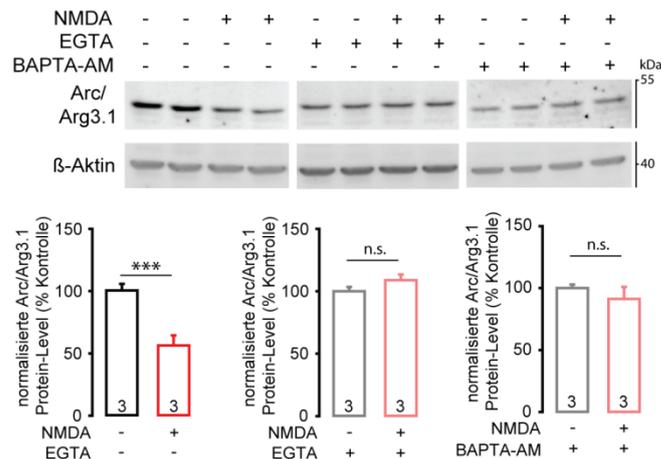
wurden die Banden des beta-Aktin-Proteins detektiert. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass MK-801 die NMDA-vermittelte Reduktion des Arc/Arg3.1-Proteinlevels blockiert (KTRL:  $100,00 \pm 2,01$  % und NMDA:  $51,24 \pm 4,52$  %,  $n=5$ ; \*\*\* $P \leq 0,001$ ), (MK-801:  $100,00 \pm 1,89$  % und NMDA MK-801:  $104,40 \pm 3,38$  %,  $n=5$ ;  $P=0,345$ ).

Es ist bekannt, dass verschiedene Subtypen des NMDA-Rezeptors in Neuronen exprimiert werden (Monyer et al., 1992, 1994; Cull-Candy & Leszkiewicz et al., 2004). Neuere Modelle gehen davon aus, dass diese Subtypen jeweils unterschiedliche Funktion für die synaptischen Modifizierungen im Hippocampus ausüben. So wurde demonstriert, dass die Induktion der NMDAR-abhängigen LTD von der Aktivierung des GluN2B-haltigen, aber nicht GluN2A-haltigen NMDA-Rezeptoren abhängig ist (Liu et al., 2004). Antagonisten für den GluN2A-haltigen NMDA-Rezeptor konnten hingegen die Induktion der NMDAR-abhängigen LTP, aber nicht der LTD, verhindern (Liu et al., 2004). Der NMDAR-Antagonist Ifenprodil wird als selektiver Antagonist für NMDA-Rezeptoren mit der GluN2B-Untereinheit beschrieben (Perin-Dureau et al., 2002; Amico-Ruvio et al., 2012). Basierend auf diesen Erkenntnissen haben wir die GluN2B-Abhängigkeit der NMDA-LTD-induzierten Arc/Arg3.1-Reduktion überprüft. Dazu wurden dissoziierte Neuronenkulturen während der NMDA-Stimulation zusätzlich mit Ifenprodil (5  $\mu$ M) inkubiert. Eine Stunde nach der Stimulation wurden die Neurone lysiert. Die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse sind in Abbildung 5b dargestellt. Es ist zu erkennen, dass Ifenprodil

die NMDA-abhängige Arc/Arg3.1-Reduktion spezifisch blockiert (KTRL:  $100,00 \pm 1,02$  % und NMDA:  $45,75 \pm 3,76$  %,  $n=4$ ;  $***P \leq 0,001$ ), (Ifenprodil:  $100,00 \pm 1,70$  % und NMDA Ifenprodil:  $116,99 \pm 6,52$  %,  $n=4$ ;  $*P=0,03$ ). Darüber hinaus zeigte der selbe NMDA-Stimulus bei der Anwesenheit von Ifenprodil sogar eine leichte, jedoch signifikante potenzierende Wirkung auf die Arc/Arg3.1-Expression, was vermutlich auf eine vermehrte Aktivierung des GluN2A-haltigen NMDARs zurückzuführen sein könnte.

### 3.3.3. Die NMDA-vermittelte Reduktion der Arc/Arg3.1-Proteinexpression benötigt freies Calcium

Calcium ist ein wichtiger Bestandteil der elektrisch-chemisch-elektrischen Transformation von Informationen in unserem Gehirn. Als sekundärer Botenstoff („second messenger“) ist Calcium essentiell für die Ausbildung der synaptischen Plastizität (Bading et al., 2013). Der Influx von Calciumionen in die Zelle wird unter anderem aktivitätsabhängig durch den NMDA-Rezeptor reguliert (Lisman et al., 1989; Malenka et al., 1994). Dabei wird angenommen, dass ein schwächerer Calciumeinstrom für die Induktion der NMDAR-LTD entscheidend ist, während ein stärkerer Calciumeinstrom eher zur LTP-Induktion führt (Malenka & Malenka, 1992). Zur Überprüfung einer Calciumabhängigkeit der NMDA-LTD-korrelierten Arc/Arg3.1-Reduktion, wurden primäre Neuronenkulturen mit den Calciumchelatoren EGTA (2,5 mM) bzw. BAPTA-AM



**Abbildung 6 Die NMDA-induzierte Reduktion der Arc/Arg3.1-Proteinexpression ist abhängig von freien Calciumionen.** Bindung freier Calciumionen durch EGTA (2,5 mM) oder BAPTA-AM (33  $\mu$ M) blockiert die NMDA-abhängige Reduktion des Arc/Arg3.1-Proteinlevels. EGTA ist wie BAPTA-AM ein Chelator mit hoher Affinität für Calciumionen. Dissoziierte Neuronenkulturen des Mausvorderhirns wurden 30 Minuten vor der NMDA-Behandlung mit EGTA bzw. BAPTA-AM vorinkubiert. Anschließend wurden die Kulturen drei Minuten mit NMDA (20  $\mu$ M) stimuliert. Eine Stunde nach der Behandlung wurden die Kulturen lysiert. EGTA bzw. BAPTA-AM war für die gesamte Versuchszeit im Medium vorhanden. Die erhaltenen Proben wurden per Western-Blot-Analyse ausgewertet. Arc/Arg3.1-Proteinlevel wurden auf beta-Aktin normalisiert und quantifiziert. Graphen zeigen die Ergebnisse der Quantifizierung. Abgebildet sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Student-T-Tests überprüft. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; n.s. = nicht signifikant unterschiedlich.

(33  $\mu$ M) inkubiert. Während dieser Inkubation wurden die Kulturen nach dem NMDA-LTD-Protokoll behandelt. Eine Stunde nach der Behandlung wurden die Proteinlevel von Arc/Arg3.1 und beta-Aktin bestimmt. beta-Aktin wurde als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinauftragung genutzt. Abbildung 6 zeigt, dass sowohl EGTA, als auch BAPTA-AM die NMDA-vermittelte Reduktion des Arc/Arg3.1-Proteinlevels blockieren (KTRL:  $100,00 \pm 5,21$  % und NMDA:  $55,97 \pm 8,01$  %,  $n=3$ ;  $***P \leq 0,001$ ), (EGTA:  $100,00 \pm 3,49$  % und NMDA EGTA:  $108,87 \pm 4,63$  %,  $n=3$ ;  $P=0,157$ ), (BAPTA:  $100,00 \pm 2,90$  % und NMDA BAPTA:  $91,24 \pm 9,63$  %,  $n=3$ ;  $P=0,404$ ). Die Ergebnisse lassen auf eine Calciumabhängigkeit der NMDA-vermittelten Arc/Arg3.1-Reduktion schließen.

### 3.3.4 Die Verminderung der ERK1/2-Kinaseaktivität spielt eine Schlüsselrolle bei der NMDA-vermittelten Reduktion des Arc/Arg3.1-Expression

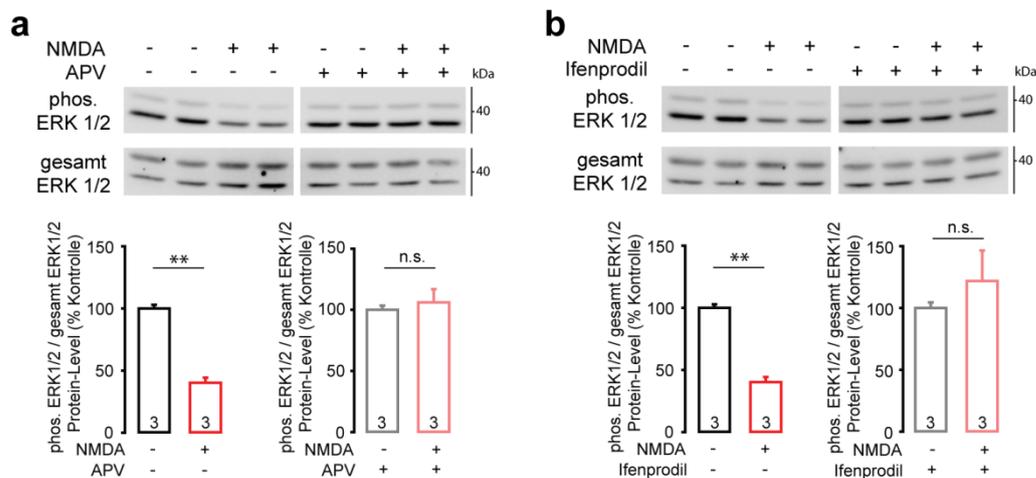
Eine der am häufigsten untersuchten Signalkaskaden ausgehend vom NMDA-Rezeptor ist die MAP-Kinase-vermittelte Signaltransduktion (Thomas & Huganir et al., 2004).

#### 3.3.4.1 NMDA-Applikation führt zur Dephosphorylierung und somit auch zur Deaktivierung der Extrazellulären Signal-regulierten Kinase (ERK) 1/2

Neuere Studien geben erste Hinweise, dass NMDA-Rezeptoren den Aktivierungszustand der ERK1/2-Kinase bidirektional regulieren können (Kim et al., 2005; Ivanov et al., 2006; Karpova et al., 2013). So fanden Kim et al., 2005 heraus, dass die Aktivierung des GluN2B-haltigen NMDA-Rezeptors mit einer Inhibition der ERK1/2-Kinaseaktivität einhergeht. Zur Überprüfung dessen wurden primäre Neuronenkulturen nach dem NMDA-LTD-Protokoll mit NMDA stimuliert und nach einer Stunde lysiert. In der anschließenden SDS-PAGE wurden für alle Konditionen die gleichen Proteinmengen aufs Gel aufgetragen. Die Analyse erfolgte per Western-Blot. Der Phosphorylierungszustand der ERK1/2-Kinase wurde mittels spezifischer Antikörper überprüft, die jeweils das phosphorylierte - (phos. ERK1/2), oder das Gesamt-ERK1/2-Protein detektieren. Abbildung 7a und 7b zeigen jeweils die Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten.

Der Abbildung 7a ist zu entnehmen, dass eine kurzfristige NMDA-Stimulation zur Dephosphorylierung des ERK1/2-Proteins führt (KTRL:  $100,00 \pm 2,87$  % und NMDA:  $40,23 \pm 4,10$  %,  $n=3$ ;  $**P=0,002$ ). Um die NMDAR-Abhängigkeit der ERK1/2-Dephosphorylierung zu testen, wurden Neurone während der NMDA-Stimulation mit dem kompetitiven NMDAR-Antagonisten 2-Amino-5-Phosphonovaleriansäure (APV) inkubiert. Die Abbildung 8a zeigt, dass APV die NMDA-vermittelte Dephosphorylierung der ERK1/2-Kinase blockiert (APV:  $100,00 \pm 3,40$  % und NMDA:  $106,02 \pm 10,83$  %,  $n=3$ ;  $P=0,818$ ). Durch Verwendung des GluN2B-

spezifischen NMDAR-Antagonisten Ifenprodil konnte die GluN2B-Abhängigkeit der ERK1/2-Dephosphorylierung untersucht werden. Wie in der Abbildung 7b dargestellt, wird die NMDA-abhängige Dephosphorylierung der ERK1/2-Kinase durch Ifenprodil blockiert (Ifenprodil:  $100,00 \pm 4,53 \%$  und NMDA:  $121,77 \pm 24,67 \%$ ,  $n=3$ ;  $P=0,589$ ).

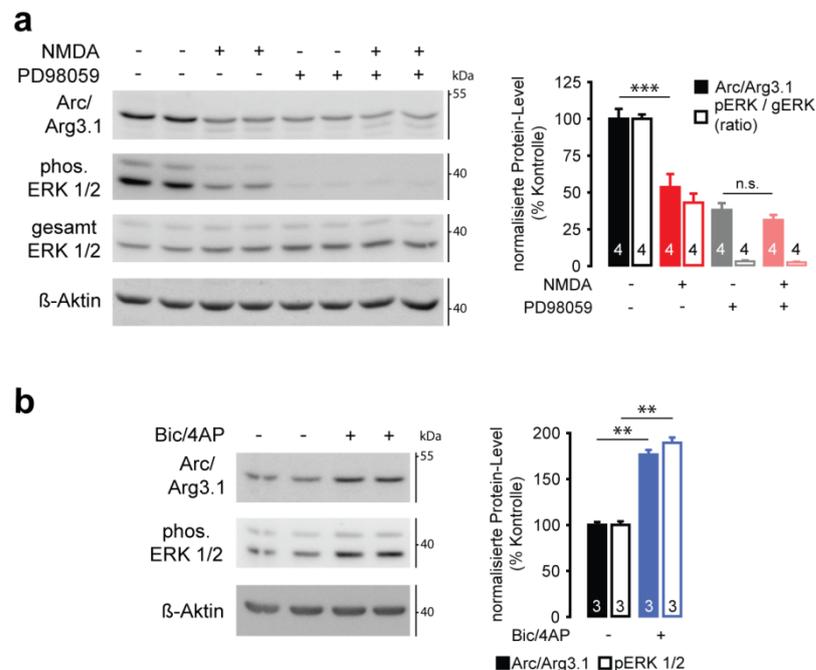


**Abbildung 7 NMDA-Applikation führt zur Dephosphorylierung und somit auch zur Deaktivierung der MAP-Kinase ERK1/2.** (a) NMDA-Applikation führt zu einer Dephosphorylierung der MAP-Kinase ERK1/2. Die ERK1/2-Gesamtproteinlevel werden nicht durch NMDA reduziert. Parallele Applikation von APV (50  $\mu$ M) blockiert die NMDA-abhängige Dephosphorylierung von ERK1/2. APV ist ein kompetitiver Antagonist des NMDA-Rezeptors. (b) Inkubation dissoziierter Neuronenkulturen mit Ifenprodil (5  $\mu$ M) blockiert ebenfalls die Dephosphorylierung von ERK1/2. Ifenprodil ist ein nicht-kompetitiver Antagonist für GluN2B-haltige NMDA-Rezeptoren. (a,b) Dissoziierte Neuronenkulturen aus dem Vorderhirn der Maus wurden drei Minuten mit NMDA inkubiert. Eine Stunde nach der Inkubation wurden die Kulturen lysiert. Inkubationen mit den NMDAR-Antagonisten APV bzw. Ifenprodil erfolgten während der dreiminütigen NMDA-Stimulation. Proben wurden per Western-Blot analysiert und erhaltene Chemilumineszenz-Signale quantifiziert. Graphen zeigen die Ergebnisse der Quantifizierung. Abgebildet sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests überprüft. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; n.s. = nicht signifikant unterschiedlich.

### 3.3.4.2 Die NMDA-vermittelte Deaktivierung der ERK1/2-Kinase ist notwendig für die Reduktion der Arc/Arg3.1-Expression

Abbildungen 5 und 7 zeigen, dass die NMDA-Applikation zur ERK1/2-Dephosphorylierung sowie zur Reduktion des Arc/Arg3.1-Proteinlevels führt. Vorangegangene Studien konnten demonstrieren, dass die ERK1/2-Kinase eine zentrale Bedeutung bei der Regulation der Arc/Arg3.1-Expression hat (Waltereit et al., 2001; Ying et al., 2002; Huang et al., 2007; Wang et al., 2009; Panja et al., 2009; Pintchowski et al., 2009). Zur Überprüfung der ERK1/2-Abhängigkeit der Arc/Arg3.1-Reduktion wurden primäre Neuronen während der NMDA-LTD Stimulation mit dem MEK-Inhibitor PD98059 (50  $\mu$ M) inkubiert. Eine Stunde nach der Stimulation wurden die Kulturen lysiert und die Proteinlevel per Western-Blot analysiert. Der Phosphorylierungszustand der ERK1/2-Kinase wurde durch spezifische Antikörper überprüft. Um die gleichmäßige Proteinauftragung zu kontrollieren, wurden zusätzlich die Expressionslevel des beta-Aktin-Proteins detektiert. Abbildung 8a zeigt, dass PD98059 den

Anteil der phosphorylierten ERK1/2-Kinase stark reduziert (Abb. 8a, KTRL:  $100,00 \pm 2,99$  % und PD98059:  $3,19 \pm 0,79$  %,  $n=4$ ;  $***P \leq 0,001$ ). Dies korreliert mit einer Reduktion des Arc/Arg3.1-Protein- (Abb. 8a, KTRL:  $100,00 \pm 6,83$  % und PD98059:  $38,12 \pm 4,62$  %,  $n=4$ ;  $***P \leq 0,001$ ) und mRNA-Level (vgl. Abb. 3c, KTRL:  $100,47 \pm 1,22$  % und PD98059:  $48,86 \pm 3,19$  %,  $n=2$ ). Ferner schließt die PD98059-Applikation eine weitere Reduktion des Arc/Arg3.1-Proteinlevels durch NMDA aus (Abb. 8a, PD98059:  $38,12 \pm 4,62$  % und NMDA PD98059:  $31,26 \pm 3,51$  %,  $n=4$ ;  $P=0,279$ ). Abbildung 4d zeigte, dass die Stimulation primärer Neuronenkulturen mit Bic/4AP zu einer NMDAR-abhängigen Erhöhung der Arc/Arg3.1-Expression führt. Diese Erhöhung der Arc/Arg3.1-Proteinlevel korreliert mit einer vermehrten Phosphorylierung der ERK1/2-Kinase (Abb. 8b phos. ERK, KTRL:  $100,00 \pm 3,76$  % und Bic/4AP:  $189,31 \pm 5,77$  %,  $n=4$ ;  $**P=0,002$ ), (Abb. 8d Arc/Arg3.1, KTRL:  $100,00 \pm 3,12$  % und Bic/4AP:  $176,50 \pm 5,02$  %,  $n=3$ ;  $**P=0,002$ ). Die Ergebnisse lassen uns somit zurückschließen, dass eine NMDAR-Aktivierung die Arc/Arg3.1-Expression über die Modifizierung der ERK1/2-Kinaseaktivität reguliert.

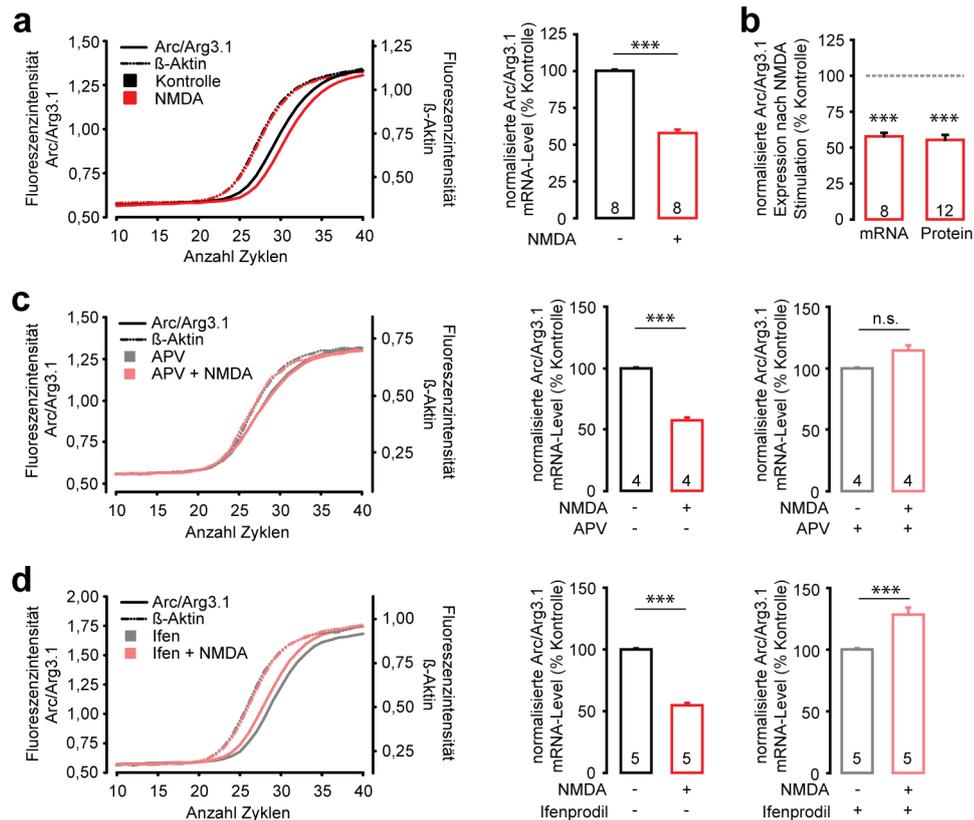


**Abbildung 8 Veränderung der ERK1/2-Aktivität ist notwendig für die NMDAR-vermittelte Änderung der Arc/Arg3.1-Expression.** (a) Inkubation dissoziierter Neuronenkulturen mit PD98059 reduziert den Anteil des phosphorylierten ERK1/2-Proteins, führt zu einer Reduktion des Arc/Arg3.1-Proteinlevels und schließt eine weitere Reduktion der Arc/Arg3.1-Proteinexpression durch NMDA aus ( $n=4$ ). Der Vergleich mit Abb. 3c zeigt, dass PD98059 zudem eine Reduktion des Arc/Arg3.1-mRNA-Level induziert. 30 Minuten vor der NMDA-Stimulation wurden dissoziierte Neuronenkulturen des Mausvorderhirns mit PD98059 ( $50 \mu\text{M}$ ) vorinkubiert. Die Kulturen wurden drei Minuten mit NMDA ( $20 \mu\text{M}$ ) behandelt und eine Stunde nach der Behandlung lysiert. PD98059 war für die gesamte Versuchszeit im Medium vorhanden. Die erhaltenen Proben wurden per Western-Blot ausgewertet, Proteinsignale normalisiert und quantifiziert (Graph rechts). (b) Stimulation dissoziierter Neuronenkulturen mit Bicucullin ( $20 \mu\text{M}$ ) / 4-Aminopyridin ( $100 \mu\text{M}$ ) erhöht die Menge an phosphoryliertem ERK1/2-Protein. Diese Erhöhung geht einher mit einer Steigerung des Arc/Arg3.1-Proteinlevels. Dissoziierte Neuronenkulturen wurden zwei Stunden mit Bic/4AP stimuliert ( $n=3$ ). Die Kulturen wurden anschließend lysiert, per Western-Blot ausgewertet, normalisiert und quantifiziert (Graph rechts). (a-b) Abgebildet sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests überprüft. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; n.s. = nicht signifikant unterschiedlich.

### 3.3.5 Neben der Proteinexpression ist auch die Arc/Arg3.1-mRNA-Expression durch den LTD-produzierenden NMDA-Stimulus vermindert

Die ERK1/2-Kinase ist eine bekannter Regulator für die Arc/Arg3.1-mRNA-Synthese (Waltereit et al., 2001; Pintchovski et al., 2009; Panja et al., 2009). Zudem demonstrierten eigene Experimente eine wichtige Rolle der ERK1/2-Aktivität für die basale Arc/Arg3.1-mRNA-Expression in primären Neuronen (vgl. Abb. 1c). Zur Erklärung, ob die beobachtete, NMDA-initiierte Verminderung der Arc/Arg3.1-Expression auf mRNA-Ebene stattfindet, wurden primäre Neuronenkulturen nach dem NMDA-LTD-Protokoll mit NMDA stimuliert. Eine Stunde nach der Stimulation wurde die gesamte mRNA aus den Kulturen extrahiert, in cDNA umgeschrieben und per qPCR analysiert. Es wurde für alle Proben die gleiche cDNA-Menge eingesetzt. Als Ladungskontrolle wurden mRNA-Level von beta-Aktin überprüft. Die Amplifikationsgraphen in der Abbildung 9 a,c und d stellen die Rohdaten für die gemessenen Arc/Arg3.1- und  $\beta$ -Actin-mRNA-Level da. Daneben sind die jeweiligen Ergebnisse für die Quantifizierung der Arc/Arg3.1-mRNA angegeben. Die abgebildeten Daten resultieren aus acht (Abb. 9a), vier (Abb. 9c) bzw. fünf (Abb. 9d) unabhängigen Experimenten.

Abbildung 9a zeigt, dass die Inkubation primärer Neuronenkulturen mit NMDA zu einer Reduktion des Arc/Arg3.1-mRNA-Levels führt (KTRL:  $100,17 \pm 0,84$  % und NMDA:  $57,89 \pm 2,35$  %,  $n=8$ ;  $***P \leq 0,001$ ). Die Negativkontrolle beta-Aktin weist hingegen keine NMDA-abhängigen Veränderungen im Expressionslevel auf. Beim Vergleich ist eine Reduktion im 40-45 % sowohl für die Arc/Arg3.1-mRNA als auch für das Protein zu erkennen (vgl. Abb. 9b mRNA, KTRL:  $100,17 \pm 0,84$  % und NMDA:  $57,89 \pm 2,35$  %,  $n=8$ ;  $***P \leq 0,001$ ), (Abb. 9b Protein, KTRL:  $100,00 \pm 1,69$  % und NMDA:  $55,33 \pm 3,53$  %,  $n=12$ ;  $***P \leq 0,001$ ). In weiteren Versuchen konnte eine NMDAR-Abhängigkeit der Arc/Arg3.1-mRNA-Reduktion bestätigt werden. So blockiert die gleichzeitige Inkubation von NMDA und APV ( $50 \mu\text{M}$ ) die Arc/Arg3.1-mRNA-Reduktion in primären Neuronen (Abb. 9c, KTRL:  $100,08 \pm 0,74$  % und NMDA:  $57,23 \pm 2,43$  %,  $n=4$ ;  $***P \leq 0,001$ ), (Abb. 9c, APV:  $100,07 \pm 0,68$  % und NMDA APV:  $114,67 \pm 4,14$  %,  $n=4$ ;  $P=0,554$ ). Ferner ließ sich durch die Verwendung des NMDAR-Antagonisten Ifenprodil ( $5 \mu\text{M}$ ) eine GluN2B-Abhängigkeit der Arc/Arg3.1-mRNA-Reduktion nachweisen (Abb. 9d, KTRL:  $100,11 \pm 0,75$  % und NMDA:  $54,80 \pm 1,96$  %,  $n=5$ ;  $***P \leq 0,001$ ), (Abb. 9d, Ifenprodil:  $100,17 \pm 0,92$  % und NMDA Ifenprodil:  $128,42 \pm 5,74$  %,  $n=4$ ;  $***P \leq 0,001$ ). Darüber hinaus zeigt der selbe NMDA-Stimulus bei der Anwesenheit von Ifenprodil sogar eine leichte, signifikante Erhöhung der Arc/Arg3.1-mRNA-Level, was vermutlich auf eine vermehrte Aktivierung der GluN2A-haltigen NMDA-Rezeptoren zurückzuführen sein könnte.



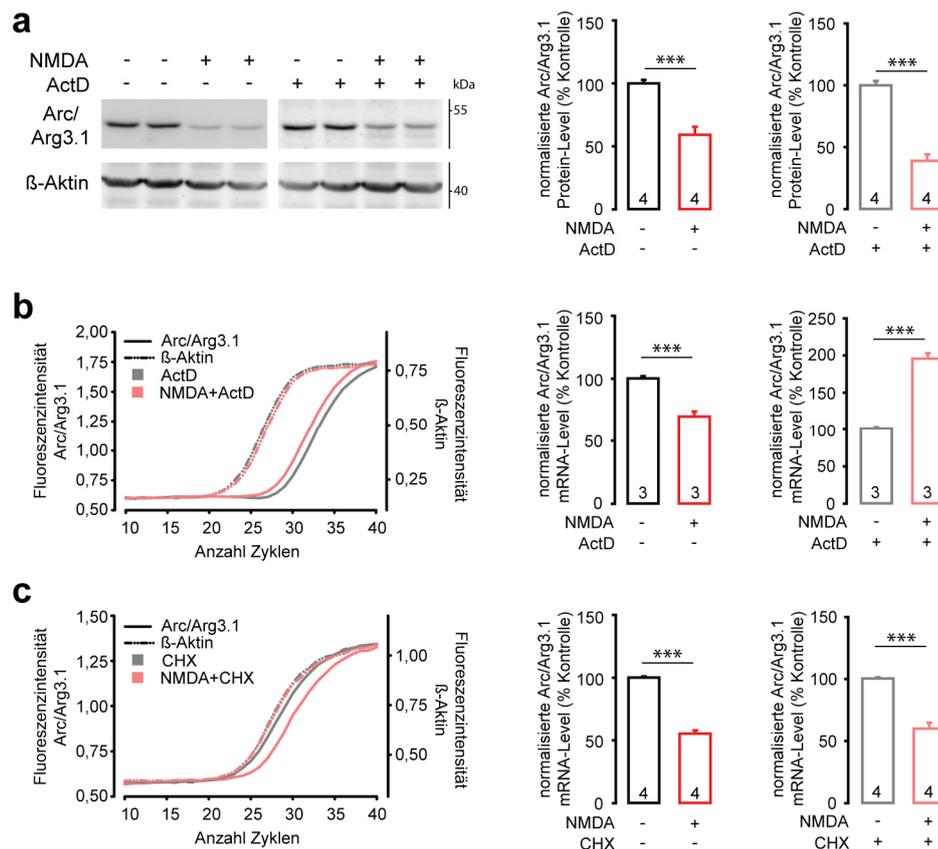
**Abbildung 9** Auch die Arc/Arg3.1-mRNA-Expression ist durch die NMDA-Applikation vermindert. **(a, b)** NMDA reduziert das Expressionslevel der Arc/Arg3.1-mRNA. Die Reduktion auf der mRNA-Ebene ist vergleichbar zu der auf der Protein-Ebene. Dissoziierte Neuronenkulturen wurden drei Minuten mit NMDA (20  $\mu$ M) behandelt. Protein- und mRNA-Proben wurden eine Stunde nach der Behandlung genommen und per Western-Blot bzw. qRT-PCR analysiert. Amplifikationsgraph (links) zeigt ein repräsentatives Beispiel der qPCR-Rohdaten. Aufgetragen ist die Fluoreszenz der Arc/Arg3.1- und beta-Aktin-spezifischen Hydrolysesonden gegen die Anzahl der PCR-Zyklen. beta-Aktin dient als Ladungskontrolle. Die Quantifizierung der mRNA-Signale erfolgte nach der Pfaffl-Methode. Ergebnisse der Quantifizierung sind im Graph rechts dargestellt. **(b)** Quantifizierungsergebnisse der Arc/Arg3.1-mRNA- und -Proteinlevel 60 Minuten nach der NMDA-Behandlung. **(c)** Applikation von APV (50  $\mu$ M) blockiert die NMDA-abhängige Reduktion des Arc/Arg3.1-mRNA-Level in dissoziierten Neuronenkulturen. APV ist ein kompetitiver Antagonist des NMDA-Rezeptors. **(d)** Inkubation von dissoziierten Neuronenkulturen mit Ifenprodil (5  $\mu$ M) blockiert ebenfalls die Reduktion des Arc/Arg3.1-mRNA-Level durch NMDA. Ifenprodil ist ein nicht-kompetitiver Antagonist der GluN2B-haltigen NMDA-Rezeptoren. **(c,d)** Dissoziierte Neuronenkulturen aus dem Vorderhirn der Maus wurden drei Minuten mit NMDA stimuliert. Eine Stunde nach der Stimulation wurden die Kulturen lysiert. Inkubationen mit den NMDAR-Antagonisten APV und Ifenprodil erfolgten parallel zur dreiminütigen NMDA-Stimulation. Amplifikationsgraphen (links in c und d) zeigen ein repräsentatives Beispiel der qPCR-Rohdaten unter Antagonisteneinwirkung. Aufgetragen ist die Fluoreszenz der Arc/Arg3.1- und beta-Aktin-spezifischen Hydrolysesonden gegen die Anzahl der PCR-Zyklen. beta-Aktin dient als Ladungskontrolle. Die Quantifizierung der mRNA-Signale erfolgte nach der Pfaffl-Methode. Ergebnisse der Quantifizierung sind in den Graphen rechts dargestellt. **(a-d)** Abgebildet sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, sofern nicht anders beschrieben. Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests überprüft. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; n.s. = nicht signifikant unterschiedlich.

### 3.3.6 Die NMDA-vermittelte Reduktion der Arc/Arg3.1-Expression erfolgt auf Transkriptions- und Translationsebene

Der Fakt, dass die Arc/Arg3.1-mRNA-Expression durch den NMDA-Stimulus reduziert ist, spricht für einen Regulationsmechanismus, der auf die Transkription des Arc/Arg3.1-Gens einwirkt.

Um dies näher zu untersuchen, wurden primäre Neuronenkulturen aus dem Vorderhirn der Maus nach dem NMDA-LTD-Protokoll mit NMDA (20  $\mu$ M) behandelt und gleichzeitig mit spezifischen Inhibitoren für die Translation bzw. Transkription inkubiert. Als spezifischer Inhibitor der Transkription wurde Actinomycin D (ActD, 10  $\mu$ M), (vgl. Abb. 1f.), als Inhibitor für die Translation Cycloheximid (CHX; 50  $\mu$ M), (vgl. Abb. 1e) verwendet. Eine Stunde nach der Stimulation wurden die Kulturen lysiert und mRNA- und Proteinlevel per qRT-PCR bzw. Western-Blot analysiert. Als Ladungskontrolle wurden Expressionslevel von beta-Aktin überprüft. Amplifikationsgraphen in Abbildung 10b und c stellen Rohdaten für die gemessenen Arc/Arg3.1- und beta-Aktin-mRNA-Level da. Daneben sind die Ergebnisse der Quantifizierung der Arc/Arg3.1-Signale abgebildet. Die Daten resultieren aus drei (Abb. 10b) bzw. vier (Abb. 10a und 10c) unabhängigen Experimenten. Abbildungen 10a und 10b zeigen die Wirkung von NMDA auf die Arc/Arg3.1-Expression unter ActD-Bedingung. So ist Abbildung 10a zu entnehmen, dass die NMDA-vermittelte Reduktion des Arc/Arg3.1-Proteinlevels nicht durch ActD blockiert werden kann (KTRL:  $100,00 \pm 2,77$  % und NMDA:  $59,18 \pm 6,28$  %,  $n=4$ ;  $***P \leq 0,001$ ), (ActD:  $100,00 \pm 3,50$  % und NMDA:  $38,95 \pm 5,28$  %,  $n=4$ ;  $***P \leq 0,001$ ). Die Analyse der Arc/Arg3.1-mRNA-Level hingegen deutet auf eine umgekehrte NMDA-abhängige Wirkung durch ActD hin. So vermittelt NMDA unter Bedingung der Transkriptionsblockade eine Erhöhung des Arc/Arg3.1-mRNA-Levels (Abb. 10b, KTRL:  $100,18 \pm 1,83$  % und NMDA:  $69,87 \pm 4,16$  %,  $n=3$ ;  $***P \leq 0,001$ ), (ActD:  $100,89 \pm 2,64$  % und NMDA ActD:  $195,74 \pm 7,49$  %,  $n=4$ ;  $***P \leq 0,001$ ). Eine ähnliche Wirkung konnte für CHX auf das basale Arc/Arg3.1-Expressionslevel beobachtet werden (vgl. Abb. 3f).

Um eine transkriptionsabhängige Wirkung von NMDA zu identifizieren, wurde die Translation mit CHX blockiert. Abbildung 10c zeigt, dass die NMDA-vermittelte Reduktion der Arc/Arg3.1-mRNA nicht durch CHX blockiert werden kann (KTRL:  $100,11 \pm 0,78$  % und NMDA:  $55,44 \pm 2,48$  %,  $n=4$ ;  $***P \leq 0,001$ ), (CHX:  $100,35 \pm 0,97$  % und NMDA CHX:  $59,91 \pm 4,87$  %,  $n=4$ ;  $***P \leq 0,001$ ). NMDA bewirkt somit eine Reduktion der Arc/Arg3.1-mRNA-Synthese. Eine mögliche Degradation der Arc/Arg3.1-mRNA durch NMDA ist auszuschließen, da die NMDA-vermittelte Reduktion des Arc/Arg3.1-mRNA-Levels durch ActD blockiert werden kann. Die Ergebnisse legen dar, dass NMDA die Reduktion der Arc/Arg3.1-Expressionslevel durch eine Blockierung der Arc/Arg3.1-Translation und Transkription induziert.

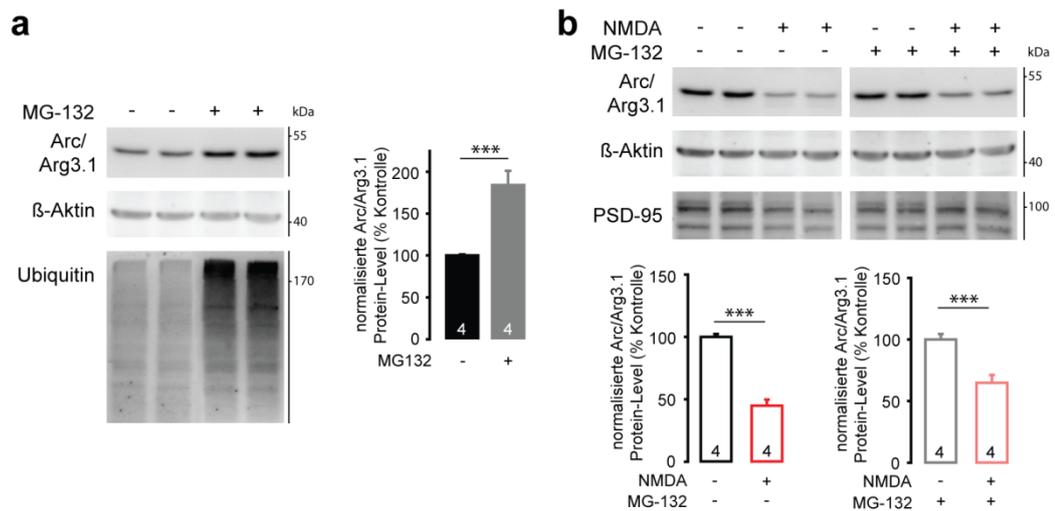


**Abbildung 10 Die NDMA-vermittelte Reduktion der Arc/Arg3.1-Expression erfolgt auf Transkriptions- und Translationsebene. (a)** Inkubation dissoziierter Neuronenkulturen mit dem Transkriptionsinhibitor Actinomycin D (ActD) blockiert nicht die NDMA-vermittelte Reduktion des Arc/Arg3.1-Proteinlevels. **(b)** Hingegen wird die NDMA-vermittelte Reduktion des Arc/Arg3.1-mRNA-Level durch ActD inhibiert. Ferner konnte eine NDMA-induzierte Erhöhung des Arc/Arg3.1-mRNA-Level unter Bedingung der Transkriptioninhibition beobachtet werden. **(c)** NDMA vermittelt eine Reduktion des Arc/Arg3.1-mRNA-Level unter Bedingungen der Translationsinhibition. **(a-c)** Dissoziierte Neuronenkulturen des Mausvorderhirns wurden 10 Minuten vor der NDMA-Stimulation mit CHX (50  $\mu$ M) bzw. ActD (10  $\mu$ M) vorinkubiert. Anschließend wurden die Kulturen drei Minuten mit NDMA (20  $\mu$ M) behandelt. Eine Stunde nach der Behandlung wurden die Kulturen lysiert. CHX und ActD waren für die gesamte Versuchszeit im Medium vorhanden. Die erhaltenen Proben wurden durch quantitative Western-Blots (a) bzw. qRT-PCRs (b,c) analysiert. **(a)** Proteinsignale wurden auf beta-Aktin normalisiert. Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in den Graphen (rechts) dargestellt. **(b,c)** Amplifikationsgraphen zeigen ein repräsentatives Beispiel der qRT-PCR-Rohdaten unter Inhibitorbedingung. Abgebildet ist die Fluoreszenz der Arc/Arg3.1- und beta-Aktin-spezifischen Hydrolysesonden gegen die Anzahl der PCR-Zyklen. beta-Aktin dient als Ladungskontrolle. Die Quantifizierung der mRNA-Signale erfolgte nach der Pfaffl-Methode. Ergebnisse der Quantifizierung sind in den Graphen rechts dargestellt. **(a-c)** Abgebildet sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, sofern nicht anders beschrieben. Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests überprüft. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; n.s. = nicht signifikant unterschiedlich.

### 3.3.7 Die NMDA-abhängige Reduktion der Arc/Arg3.1-Proteinexpression ist unabhängig vom UPS-vermittelten Proteinabbau

Colledge et al., 2003 konnten zeigen, dass die NMDA-induzierte Reduktion des PSD-95-Proteins (vgl. Abb. 4b) auf einen vom Ubiquitin-Proteasomen-System (UPS)-vermittelten Proteinabbau basiert. Die zu degradierenden Proteine werden dabei mit Ubiquitin markiert und anschließend Proteasomen-abhängig degradiert. Eine Ubiquinierung und UPS-abhängige Proteindegradation konnte auch für das Arc/Arg3.1-Protein nachgewiesen werden (Park et al., 2008; Greer et al., 2010). Um dies zu verifizieren wurden primäre Neuronenkulturen aus dem Vorderhirn der Maus mit dem Proteasomenblocker MG-132 (10  $\mu$ M) inkubiert. Durch NMDA-Stimulationen sollte die UPS-Abhängigkeit der NMDA-vermittelten Arc/Arg3.1-Reduktion überprüft werden. Eine Stunde nach der Stimulation wurden die Kulturen lysiert und Proteinlevel per Western-Blot analysiert. Als Ladungskontrolle wurden Expressionslevel von beta-Aktin detektiert. Abbildung 11a ist zu entnehmen, dass die Applikation des Proteasomen-Inhibitors MG-132 eine Erhöhung des Arc/Arg3.1-Proteinlevels induziert (KTRL:  $100,00 \pm 1,28$  % und MG-132:  $184,23 \pm 16,87$  %,  $n=4$ ;  $***P \leq 0,001$ ). Gleichzeitig ist eine Anreicherung Ubiquitin-markierter Proteine durch MG-132-Applikation zu beobachten. Behandlungen mit MG-132 ließen darüber hinaus keine UPS-Abhängigkeit der NMDA-vermittelten Arc/Arg3.1-Reduktion feststellen (Abb. 12b, KTRL:  $100,00 \pm 2,24$  % und NMDA:  $44,85 \pm 4,91$  %,  $n=4$ ;  $***P \leq 0,001$ ), (MG-132:  $100,00 \pm 4,45$  % und NMDA MG-132:  $64,82 \pm 6,36$  %,  $n=4$ ;  $***P \leq 0,001$ ). Hingegen konnte die NMDA-induzierte Reduktion des PSD-95-Proteinlevels durch MG-132 blockiert werden (Abb. 11b, KTRL:  $100,00 \pm 1,72$  % und NMDA:  $80,93 \pm 6,42$  %,  $n=4$ ;  $*P=0,011$ ), (MG-132:  $100,00 \pm 4,39$  % und NMDA MG-132:  $104,21 \pm 8,28$  %,  $n=4$ ;  $P=0,317$ ). Dies bestätigt die Ergebnisse von Colledge et al., 2003.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der UPS-vermittelte Proteinabbau keine entscheidende Rolle bei der NMDA-vermittelten Reduktion der Arc/Arg3.1-Proteinexpression spielt.



**Abbildung 11: Die NMDA-abhängige Reduktion des Arc/Arg3.1-Proteinlevels ist unabhängig vom UPS-vermittelten Proteinabbau. (a)** Die Inkubation primärer Neuronenkulturen mit dem Proteasomenblocker MG-132 erhöht das Arc/Arg3.1-Proteinlevel. Die Applikation von MG-132 (10  $\mu$ M) führt zudem zu einer Anreicherung Ubiquitinmarkierter Proteine. Dissoziierte Kulturen des Mausvorderhirns wurden zwei Stunden mit MG-132 inkubiert (n=4). Anschließend wurden die Kulturen lysiert und per Western-Blot-Analyse ausgewertet (Immunoblot links). Die Proteinsignale wurden quantifiziert und grafisch dargestellt (Graph rechts). **(b)** Die Inhibition des Proteasomalen-Proteinabbaus bewirkt keine Blockierung der NMDA-vermittelten Arc/Arg3.1-Reduktion. Eine Stunde vor der NMDA-Stimulation wurden dissoziierte Neuronenkulturen des Mausvorderhirns mit MG-132 (10  $\mu$ M) vorinkubiert. Die Kulturen wurden drei Minuten mit NMDA (20  $\mu$ M) behandelt und eine Stunde nach der Stimulation lysiert (n=4). MG-132 war für die gesamte Versuchszeit im Medium vorhanden. Die erhaltenen Proben wurden per Western-Blot-Analyse ausgewertet. Proteinsignale wurden normalisiert und quantifiziert. Graphen zeigen die Ergebnisse der Quantifizierung. **(a,b)** Abgebildet sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests überprüft. \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001; n.s. = nicht signifikant unterschiedlich.

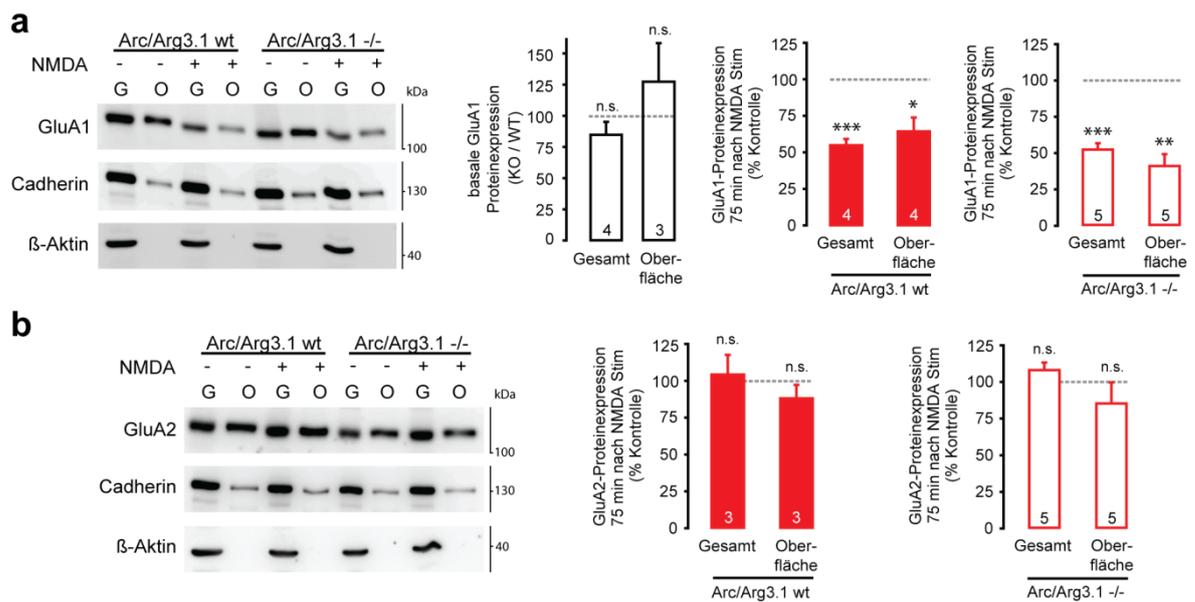
### 3.4 Arc/Arg3.1-Knockout Mäuse zeigen keine Beeinträchtigung in der NMDA-vermittelten Reduktion der GluA1-Expressionslevel

In vorangegangenen Studien konnte eine Beeinträchtigung der LTD in Arc/Arg3.1-Knockout Mäusen beschrieben werden. So zeigen Arc/Arg3.1 defiziente Mäuse eine reduzierte Depression der mGluR-abhängigen LTD und eine Beeinträchtigung in der Langzeitstabilisierung der NMDAR-abhängigen LFS-LTD in hippocampalen Hirnschnitten der Maus (Park et al., 2008; Plath et al., 2006).

Ein Modell zur Erklärung langfristiger synaptischer Veränderungen der NMDA-LTD ist die reduzierte Expression von AMPA-Rezeptoren an der neuronalen Zelloberfläche (Lee et al., 2003; Colledge et al., 2003; Snyder et al., 2005; Oh et al., 2006; Smith et al., 2006; Waung et al., 2008). Experimente in akuten hippocampalen Schnitten von Arc/Arg3.1-Wildtyp-Mäusen konnten zeigen, dass die NMDA-LTD mit einer Reduktion der GluA1-Expression korreliert (vgl. Abb. 2). Vorangegangene Studien konnten belegen, dass Arc/Arg3.1 eine wichtige Funktion für eine regulierte AMPAR-Expression in Neuronen hat (Shepherd et al., 2006). Dabei wird angenommen, dass Arc/Arg3.1 die Endozytose von GluA1-haltigen AMPA-Rezeptoren von der neuronalen Zelloberfläche reguliert (Chowdhury et al., 2006). Neuere Studien gehen davon aus, dass Arc/Arg3.1 zudem eine Funktion für die Regulation der GluA1-Expression im Zellkern hat (Korb et al., 2013). Um Hinweise für eine mögliche Arc/Arg3.1 Funktion während der NMDA-LTD zu erhalten, wurden GluA1- und GluA2-Expressionslevel in Arc/Arg3.1-Knockout Mäusen überprüft.

Dazu wurden akute hippocampale Hirnschnitte der Maus entsprechend des NMDA-LTD-Protokolls stimuliert. Proteine der neuronalen Zelloberfläche wurden eine Stunde nach der Stimulation mit Biotin markiert und durch Avidin-Pulldowns aus der Gesamtproteinfraktion separiert. Durch Western-Blot-Analysen wurden Expressionslevel der einzelnen Oberflächenproteine („O“), sowie deren Gesamtproteinlevel („G“) bestimmt. Als stimulationsunabhängige Ladungskontrolle wurden Expressionslevel des Proteins Cadherin analysiert. Zur Überprüfung der Oberflächen-Biotinylierung wurden zusätzlich Expressionslevel des intrazellulären Proteins beta-Aktin kontrolliert.

Wie in Abbildung 12a dargestellt, induziert die NMDA-Stimulation in Arc/Arg3.1-Knockout Mäusen eine signifikante Reduktion der GluA1-Expression. So konnte eine Reduktion des GluA1-Proteinanteils an der neuronalen Zelloberfläche gemessen werden (Abb. 12a Arc/Arg3.1 -/-, KTRL:  $100,00 \pm 0,00$  % und NMDA:  $40,93 \pm 8,16$  %,  $n=5$ ;  $**P=0,008$ ). Darüber hinaus ließ sich im Arc/Arg3.1-Wildtyp eine NMDA-abhängige Reduktion der GluA1-Gesamtproteinlevel beobachten (vgl. Abb. 2). Interessanterweise zeigen auch Arc/Arg3.1-Knockout Mäuse eine NMDA-abhängige Reduktion des GluA1-Gesamtproteinlevels (Abb. 12a Arc/Arg3.1 -/-;



**Abbildung 12 Arc/Arg3.1-Knockout-Mäuse zeigen keine Beeinträchtigungen in der NMDA-vermittelten Reduktion der GluA1-Expression.** (a) Die NMDA-Stimulation reduziert die neuronale Oberflächenexpression von GluA1-haltigen AMPA-Rezeptoren in Arc/Arg3.1 wt und knockout (-/-) Mäusen. Die NMDA-abhängige Reduktion des GluA1-Gesamtproteinlevels wird durch einen Arc/Arg3.1-unabhängigen Mechanismus getriggert. (b) Die Oberflächenexpression von GluA2-haltigen AMPA-Rezeptoren wird weder im Arc/Arg3.1 wt, noch im Arc/Arg3.1-Knockout durch NMDA beeinflusst. (a,b) Hippocampale Hirnschnitte der Maus wurden drei Minuten durch NMDA-Badapplikation (20  $\mu$ M) stimuliert „+“. Proteinsignale wurden durch Western-Blot-Analyse detektiert. Western-Blots zeigen repräsentative Chemilumineszenz-Signale der Proteine: GluA1 bzw. GluA2, Cadherin und beta-Aktin. beta-Aktin dient als Biotinylierungskontrolle. „G“ kennzeichnet die Gesamtprotein-Fraktion, „O“ symbolisiert die Fraktion biotinylierter Proteine. Die Quantifizierung der Chemilumineszenz-Signale erfolgte mit Hilfe des Programmes ImageJ. Die Ergebnisse der Quantifizierung sind grafisch dargestellt. GluA1- und GluA2-Signale wurden auf Cadherin normalisiert und sind relativ zur Kontrolle „-“ dargestellt. (a-c) Abgebildet sind der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests überprüft. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; n.s. = nicht signifikant unterschiedlich.

KTRL:  $100,00 \pm 0,00$  % und NMDA:  $52,31 \pm 4,38$  %,  $n=5$ ; \*\*\* $P \leq 0,001$ ). Der Vergleich beider Genotypen ließ zudem keine signifikanten Unterschiede im basalen Expressionslevel der GluA1-Untereinheit von AMPA-Rezeptoren in der Gesamt- oder Oberflächenproteinfraktion erkennen (Abb. 12a Gesamt-Fraktion, Arc/Arg3.1 wt:  $100,00 \pm 0,00$  % und Arc/Arg3.1 -/-:  $84,72 \pm 10,43$  %,  $n=4$ ;  $P=0,343$ ), (Abb. 12a Oberflächen-Fraktion, Arc/Arg3.1 wt:  $100,00 \pm 0,00$  % und Arc/Arg3.1 -/-:  $127,09 \pm 30,89$  %,  $n=3$ ;  $P=0,343$ ). Darüber hinaus konnten keine NMDA-abhängigen Veränderungen des GluA2-Proteinlevels im Arc/Arg3.1-Knockout beobachtet werden (Abb. 12b Oberfläche, KTRL:  $100,00 \pm 0,00$  % und NMDA:  $85,17 \pm 14,51$  %,  $n=5$ ;  $P=0,690$ ), (Abb. 12b Gesamt: KTRL:  $100,00 \pm 0,00$  % und NMDA:  $108,09 \pm 5,13$  %,  $n=5$ ;  $P=0,115$ ). Auch die Proteinlevel von Cadherin bzw. beta-Aktin zeigten keine NMDA-abhängigen Expressionsunterschiede (Abb. 12a und b). Zusammenfassend geben die Ergebnisse Hinweise auf einen Arc/Arg3.1-unabhängigen Endozytose-mechanismus von GluA1-haltigen AMPA-Rezeptoren in Neuronen. Die Reduktion der GluA1-Gesamtexpression deutet ebenfalls auf einen Arc/Arg3.1-unabhängigen Regulationsmechanismus hin. Darüber hinaus bestätigen die Ergebnisse die elektrophysiologischen Beobachtungen zum NMDA-LTD (Karin Kähler, in Vorbereitung).



## **4 Diskussion**

Die Hauptaufgaben unseres Gehirns sind die Assoziierung, Verarbeitung und Speicherung verschiedener sensorischer Informationen. Grundlegend für diese Prozessierung der Informationen sind neuronale Netzwerke in diversen Gehirnregionen, zum Beispiel dem Hippocampus. In diesen Netzwerken sind die Neurone über Synapsen miteinander verknüpft. Die Eigenschaft, dass die Stärke der synaptischen Übertragung modifiziert werden kann, stellt eine entscheidende Grundlage für Lern- und Gedächtnisvorgänge auf synaptischer Ebene dar. So können Synapsen, abhängig vom Aktivitätszustand der beteiligten Neuronen verstärkt, abgeschwächt, aufgelöst oder neu gebildet werden. Eine langfristige Verstärkung der synaptischen Effizienz bezeichnet man als Langzeitpotenzierung (LTP), eine langfristige Abschwächung hingegen als Langzeitdepression (LTD). Entscheidend dafür sind komplexe Veränderungen in der molekularen Zusammensetzung und in der Struktur der Synapsen. Diese werden unter anderem durch eine Neusynthese von mRNA und Proteinen vermittelt. Ein aktivitätsreguliertes Gen, das für die Induktion und Stabilisierung synaptischer Plastizität notwendig ist, ist das IEG *Arc/Arg3.1* (Plath et al., 2006; Messaoudi et al., 2007; Park et al., 2008). *Arc/Arg3.1* hat eine wichtige Funktion für die regulierte Expression von GluA1-haltigen AMPA-Rezeptoren an der neuronalen Zelloberfläche (Chowdhury et al., 2006; Shepherd et al., 2006; Waung et al., 2008). Die Expression des *Arc/Arg3.1*-Gens wird durch verschiedene plastizitätsinduzierende Stimulationen aktiviert. NMDA-Rezeptoren konnte eine wichtige Funktion für die Induktion der *Arc/Arg3.1*-Expression nachgewiesen werden (Link et al., 1995; Waltereit et al., 2001; Steward & Worley, 2001; Kawashima et al., 2009; Pintchovski et al., 2009). Darüber hinaus können NMDA-Rezeptoren die Richtung der synaptischen Plastizität bidirektional regulieren. Mögliche Funktionen und Regulationsmechanismen der *Arc/Arg3.1*-Expression während NMDAR-abhängiger Formen der LTD sind bisher jedoch nur wenig charakterisiert. Vor diesem Hintergrund sollte ein chemisches Stimulationsprotokoll zur Induktion einer NMDAR-abhängigen LTD etabliert werden. Durch quantitative Western-Blot- und qRT-PCR-Analysen wurden Regulationsmechanismen der *Arc/Arg3.1*-Expression untersucht. Um Hinweise auf eine mögliche Funktion von *Arc/Arg3.1* für NMDAR-abhängige Formen der LTD zu erhalten, wurden mögliche Beeinträchtigungen der NMDAR-abhängigen LTD im *Arc/Arg3.1*-Knockout identifiziert. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten neue Erkenntnisse zur NMDAR-abhängigen Regulation der *Arc/Arg3.1*-Expression demonstrieren. So konnte ich zeigen, dass NMDA-Rezeptoren die *Arc/Arg3.1*-Expression bidirektional über einen ERK1/2-vermittelten Prozess regulieren können. Mit Hilfe von Karin Kähler ließ sich darlegen, dass NMDA eine chemische Form der NMDAR-abhängigen LTD induziert. Weitere Analysen konnten keine Beeinträchtigung der NMDA-LTD in *Arc/Arg3.1*-Knockout Mäusen aufzeigen. Eine mögliche Funktion von *Arc/Arg3.1* für die NMDA-LTD bleibt somit ungewiss.

#### **4.1 Korreliert mit der bidirektionalen Regulation der synaptischen Plastizität führt die Aktivierung der NMDA-Rezeptoren zur bidirektionalen Veränderung der Arc/Arg3.1-Expression**

##### 4.1.1 NMDA-Rezeptoren: der Initiator für die Plastizität-korrelierte dynamische Änderung der Arc/Arg3.1-Expression

NMDA-Rezeptoren werden als Koinzidenz-Detektoren für synaptische Aktivität in neuronalen Netzwerken beschrieben. So vermitteln NMDA-Rezeptoren aktivitätsabhängige Veränderungen molekularer Netzwerke an Synapsen (Lüscher & Malenka et al., 2012). Durch die Verwendung verschiedener NMDAR-aktivierender-Stimuli ließ sich erstmals eine bidirektionale Regulation der aktivitätsabhängigen Arc/Arg3.1-Expression demonstrieren. So konnte durch Bic/4AP-Stimulation eine NMDAR-abhängige Erhöhung der Arc/Arg3.1-Proteinexpression in primären Neuronenkulturen induziert werden (vgl. Abb. 4d). Dieses Resultat bestätigt Beobachtungen vorangegangener Studien zur NMDAR-Abhängigkeit der Arc/Arg3.1-Expression (Steward & Worley, 2001; Rao et al., 2006; Panja et al., 2009; Kawashima et al., 2009; Pintchovski et al., 2009; Yilmaz-Rastoder et al., 2011). In weiteren Experimenten konnte zudem eine NMDAR-vermittelte Reduktion der Arc/Arg3.1-Expression dargelegt werden. So reduziert die Applikation des NMDAR-Agonists N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) die Arc/Arg3.1-Protein- und mRNA-Expression in primären Neuronenkulturen (Abb. 4b,c und 9a). Diese Beobachtungen ließen sich durch NMDA-Behandlung akuter hippocampaler Hirnschnitte bestätigen (Abb. 4a). Mit Hilfe spezifischer Antagonisten des NMDA-Rezeptors, konnte eine NMDAR-Abhängigkeit der Arc/Arg3.1-Expression nachgewiesen werden. So ließ sich sowohl die Bic/4AP-induzierte Erhöhung, als auch die NMDA-vermittelte Reduktion der Arc/Arg3.1-Expression durch MK-801 bzw. APV blockieren (Abb. 4d, 5a, 9c).

Es ist bekannt, dass NMDA-Rezeptoren Heterotetramere aus zwei GluN1- und einem Typ der GluN2-Untereinheit (GluN2A-GluN2D) bilden. Expressionsanalysen konnten unterschiedliche Expressionsmuster der einzelnen NMDAR-Untereinheiten feststellen (Monyer et al., 1997; Wenzel et al., 1997). Mittels *in situ* Hybridisierungen ließ sich auf diese Weise eine ubiquitäre Expression der GluN1-Untereinheit im Gehirn beobachten. Die Expression der GluN2A- und GluN2B-Untereinheiten ist hingegen auf kortikale und hippocampale Hirnregionen beschränkt (Monyer et al., 1997). Durch die Entwicklung selektiver Inhibitoren für einzelne Subtypen des NMDA-Rezeptors konnten Fortschritte bei der funktionellen Charakterisierung dieser Subtypen gemacht werden. Extrazelluläre Ableitungen exzitatorischer, postsynaptischer Feldpotentiale (fEPSPs) konnten eine wichtige Funktion der GluN2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors für die Stabilisierung der NMDAR-LTD nachweisen (Liu et al., 2004). Ein spezifischer Antagonist der

GluN2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors ist Ifenprodil (Williams et al., 1993). In eigenen Experimenten ließ sich zeigen, dass die NMDA-vermittelte Reduktion der Arc/Arg3.1-Expression durch Applikation von Ifenprodil verhindert wird (Abb. 5b, 9d). Interessanterweise zeigt derselbe NMDA-Stimulus bei Anwesenheit von Ifenprodil eine leichte, signifikante Erhöhung der Arc/Arg3.1-Expression. Es lässt sich somit annehmen, dass NMDA-Rezeptoren, die nicht die GluN2B-Untereinheit enthalten, eine Erhöhung der Arc/Arg3.1-Expression induzieren. Dies lässt vermuten, dass die Arc/Arg3.1-Expression durch verschiedenen Subtypen des NMDA-Rezeptors bidirektional reguliert werden kann. Hinweise für eine NMDAR-abhängige bidirektionale Regulation der Arc/Arg3.1-Expression konnten zudem in Arbeiten von Michael Kreuz und Hilmar Bading präsentiert werden. Sie konnten durch spezielle Stimulationsprotokolle zeigen, dass die Aktivierung synaptischer bzw. extrasynaptischer NMDA-Rezeptoren die Arc/Arg3.1-Expression in primären Neuronenkulturen unterschiedlich regulieren (Zhang et al., 2007; Karpova et al., 2013). Inwiefern diese Beobachtungen durch die Aktivierung unterschiedlicher Subtypen des NMDA-Rezeptors hervorgerufen wurden, ließ sich bisher jedoch nicht demonstrieren. Im Gegensatz zu den hier erzielten Ergebnissen, wurden in vorangegangenen Studien unterschiedliche Wirkungen von NMDA auf die Arc/Arg3.1-Expression in primären Neuronenkulturen beschrieben. So konnten Bloomer et al (2008) zeigen, dass eine vierstündige Applikation von NMDA die Arc/Arg3.1-Expression induziert. Es ist unklar, inwieweit diese Beobachtung auf homöostatischen oder neurotoxischen Mechanismen basiert. Zudem wird langfristigen NMDA-Badapplikationen eine exzitotoxische Wirkung zugeschrieben (Lu et al., 1996; Shehata et al., 2012). Arbeiten von Kimberly Huber untersuchten die Arc/Arg3.1-Expression 10 Minuten nach NMDA-Applikation (Waug et al., 2008). Mittels immunzytochemischer Arc/Arg3.1-Färbungen ließ sich weder eine induzierende, noch eine reprimierende Wirkung der NMDA-Applikation in primären Neuronenkulturen beobachten (Waug et al., 2008). Eigene Experimente konnten diesbezüglich eine Zeitabhängigkeit der NMDA-vermittelten Arc/Arg3.1-Reduktion nachweisen (Abb. 4b). Eine mögliche Ursache für die gegensätzlichen Beobachtungen können zudem durch Unterschiede in der Kultivierung und Stimulation der Kulturen hervorgerufen werden. So werden primäre Neuronenkulturen vor Stimulationen oft mit Tetrodotoxin (TTX) vorinkubiert, um das Aktivitätslevel in den primären Neuronenkulturen zu senken (Waug et al., 2008; Okuno et al., 2012). Diese Vorinkubationen können bereits metaplastische Veränderungen in Neuronen induzieren, die die Wirkung von NMDA auf die Arc/Arg3.1-Expression beeinflussen könnten (Arendt et al., 2013). Weitere Unterschiede können durch Auflösungsunterschiede der angewendeten Methoden hervorgerufen werden. Zudem ist unklar, ob die NMDA-Applikation eine globale Reduktion der Arc/Arg3.1-Expression in allen Neuronen oder nur einzelnen, stark Arc/Arg3.1 exprimierenden Zellen vermittelt. Dies bedarf somit weiterer Überprüfung.

#### 4.1.2 Calcium: der klassische sekundäre Botenstoff

Einer der wichtigsten zellulären Botenstoffe für die Weiterleitung von Informationen in unserem Gehirn ist Calcium. Schon frühe Untersuchungen konnten die Notwendigkeit von Calcium für biochemische Prozesse der neuronalen Signaltransduktion darlegen. Es ist bekannt, dass Calcium die Ausschüttung von Neurotransmittern an der Präsynapse reguliert. Zudem konnte die Notwendigkeit von Calcium für die Ausbildung der synaptischen Plastizität demonstriert werden (Lisman et al., 1989; Malenka et al., 1994; Bading et al., 2013).

Der Einstrom von Calciumionen in die Zelle wird von unterschiedlichen Rezeptoren kontrolliert. Einer dieser Rezeptoren ist der NMDA-Rezeptor. Der NMDAR-Antagonist Dizocilpine (MK-801) bindet selektiv im Ionenkanal aktivierter NMDA-Rezeptoren und inhibiert dadurch den NMDAR-abhängigen Calciumeinstrom in die Zelle. Eigene Experimente mit MK-801 konnten demonstrieren, dass sowohl die Bic/4AP-induzierte Erhöhung, als auch die NMDA-vermittelte Reduktion der Arc/Arg3.1-Expression durch MK-801 inhibiert wird (Abb. 4d, 5a). Dies zeigt, dass die aktivitätsabhängige Regulation der Arc/Arg3.1-Expression durch einen Ionenstrom über den NMDA-Rezeptor kontrolliert wird. Weitere Experimente deuten auf eine Calcium-abhängige Regulation der Arc/Arg3.1-Expression hin. So konnte durch die Applikation der Calciumchelatoren EGTA bzw. BAPTA-AM die NMDA-vermittelte Reduktion des Arc/Arg3.1-Proteinlevels blockiert werden (Abb. 6). Diese Beobachtungen bestätigen Untersuchungen von Zheng et al (2009) zur Calcium-Abhängigkeit der aktivitätsregulierten Arc/Arg3.1-Expression. Ferner ließ sich darlegen, dass auch die basale Arc/Arg3.1-Expression durch Calcium reguliert wird (Abb. 3b). So reduzierte die Applikation von EGTA bzw. BAPTA-AM das basale Arc/Arg3.1-Expressionslevel in primären Neuronenkulturen. Da basale Arc/Arg3.1-Expressionslevel nicht durch den NMDA-Rezeptor reguliert werden, ist anzunehmen, dass weitere Rezeptoren an der Regulation der basalen Arc/Arg3.1-Expression beteiligt sind. Waltereit et al (2001) konnten demonstrieren, dass die Arc/Arg3.1-Expression in transfizierten PC12-Zellen durch spannungsabhängige Calciumkanäle reguliert werden kann (Waltereit et al., 2001). Inwieweit dies für die hier gemachten Beobachtungen zutrifft, bleibt jedoch zu prüfen.

#### 4.1.3 Die MAP-Kinase ERK1/2: ein zentraler enzymatischer Schalter der Arc/Arg3.1-Expression

Signalkaskaden, die die Arc/Arg3.1-Expression dynamisch regulieren sind komplex und bisher nicht ausreichend untersucht. Erste Hinweise für eine MAP-Kinase-abhängige Regulation der Arc/Arg3.1-Expression lieferten Untersuchungen von Waltereit et al. (2001). Sie konnten

zeigen, dass die Arc/Arg3.1-Expression in primären dissoziierten Neuronenkulturen durch den MEK-Kinase Inhibitor PD98059 beeinträchtigt werden kann. Weiterführende Versuche bestätigten eine Schlüsselrolle der ERK1/2-Kinase für die dynamische Regulation der Arc/Arg3.1-Expression (Ying et al., 2002; Huang et al., 2007; Wang et al., 2009; Panja et al., 2009; Kawashima et al., 2009; Pintchovski et al., 2009). Die Ergebnisse der hier durchgeführten Versuche können diese Beobachtungen weiter unterstützen. So induzierte die Applikation des MEK-Inhibitors PD98059 eine Reduktion der Arc/Arg3.1-mRNA- und Proteinlevel in dissoziierten Neuronenkulturen (Abb. 3c). Darüber hinaus ließ sich darlegen, dass NMDA-Rezeptoren den Phosphorylierungsstatus der ERK1/2-Kinase regulieren. So konnte durch Bic/4AP Stimulationen eine NMDAR-abhängige Phosphorylierung der ERK1/2-Kinase induziert werden (Abb. 8b). Dies bestätigt vorangegangene Untersuchungen, die demonstrieren, dass eine Aktivierung der ERK1/2-Kinase an eine Erhöhung der Arc/Arg3.1-Expression gekoppelt ist (Abb. 4d; Panja et al., 2009). Neuere Modelle nehmen an, dass NMDA-Rezeptoren die Phosphorylierung der ERK1/2-Kinase bidirektional regulieren können (Kim et al., 2005). In Übereinstimmung dazu konnte in dieser Arbeit eine NMDA-vermittelte Dephosphorylierung der ERK1/2-Kinase demonstriert werden (Abb. 7). Untersuchungen von Kim et al. (2005) konnten den einzelnen Subtypen des NMDA-Rezeptors unterschiedliche Funktionen in der ERK1/2-Regulation zuschreiben. So fanden sie heraus, dass GluN2B-haltige NMDA-Rezeptoren die Aktivierung der ERK1/2-Kinase inhibieren. Ein spezifischer Antagonist der GluN2B-haltigen NMDA-Rezeptoren ist Ifenprodil. In Übereinstimmung dazu konnte ich in meiner Arbeit zeigen, dass die NMDA-vermittelte Dephosphorylierung der ERK1/2-Kinase durch Applikation von Ifenprodil verhindert wird (vgl. Abb. 7b). Interessanterweise korrelieren diese Beobachtungen mit den Ergebnissen der Arc/Arg3.1-Expressionsanalyse. So konnte auch die NMDA-vermittelte Reduktion der Arc/Arg3.1-Expression durch Ifenprodil-Applikation inhibiert werden (Abb. 5b, 9d). Die erhaltenen Ergebnisse zeigen somit eine NMDAR-abhängige Koregulation der ERK1/2-Phosphorylierung und der Arc/Arg3.1-Expression. Experimente mit dem MEK-Inhibitor PD98059 konnten zeigen, dass PD98059 und NMDA die Arc/Arg3.1-Expression über denselben Mechanismus regulieren. So schließt die PD98059 Inkubation eine weitere NMDA-vermittelte Reduktion der Arc/Arg3.1-Expression aus (Abb. 8a).

Neuere Studien konnten weitere Hinweise für eine Erk1/2-abhängige Regulation der Arc/Arg3.1-Expression liefern. Es ließ sich zeigen, dass eine Anästhesie-induzierte Hypothermie die Dephosphorylierung der ERK1/2-Kinase *in vivo* induziert. Weitere Überprüfungen konnten darlegen, dass die ERK1/2-Dephosphorylierung mit einer Reduktion der Arc/Arg3.1-Expression korreliert (Whittington et al., 2013). Ferner ließ sich demonstrieren, dass hochfrequente, elektrische Stimulationen (HFS) hippocampaler Hirnschnitte die Arc/Arg3.1-Expression aktivieren (Steward & Worley 2001; Messaoudi et al., 2007; Panja et al., 2009). Überprüfungen

dieser Ergebnisse konnten eine NMDAR- und ERK1/2-Abhängigkeit der HFS-induzierten Arc/Arg3.1-Expression nachweisen (Panja et al., 2009). Ferner wird angenommen, dass die Aktivierung der ERK1/2-Kinase essentiell ist für die Lokalisation des Arc/Arg3.1-Proteins in aktivierten dendritischen Bereichen des Hippocampus ist (Huang et al., 2007).

#### 4.1.4 Arc/Arg3.1-Transkription und –Translation: das Ziel der dynamischen Regulation

Bateup et al (2013) konnten in Übereinstimmung mit anderen Studien darlegen, dass Transkriptions- und Translationsprozesse die Arc/Arg3.1-Expression dynamisch regulieren (Park et al., 2008; Greer et al., 2010). Es ließ sich zeigen, dass die Applikation des Transkriptionsinhibitors Actinomycin D (ActD) eine Reduktion der Arc/Arg3.1-mRNA-Menge vermittelt (Rao et al., 2006; Bateup et al., 2013). Diese Reduktion auf mRNA-Ebene geht einher mit einer Reduktion der Arc/Arg3.1-Proteinmenge. Die Beobachtungen ließen sich in den hier durchgeführten Versuchen bestätigen (vgl. Abb. 3f). Weitere Experimente konnten eine translationsabhängige Regulation der Arc/Arg3.1-Expression beschreiben (vgl. Abb. 3e). So wurde gezeigt, dass die Applikation des Translationsinhibitors Cycloheximid (CHX) eine Reduktion der Arc/Arg3.1-Proteinmenge bewirkt. Interessanterweise korreliert diese CHX-vermittelte Reduktion auf Proteinebene mit einer Erhöhung der Arc/Arg3.1-mRNA-Menge (vgl. Abb. 3e; Bateup et al., 2013). Es wird angenommen, dass Arc/Arg3.1-mRNA- und Proteinlevel über Feedback-Mechanismen miteinander verbunden sind. So konnte in Untersuchungen von Giorgi et al., 2007 dargelegt werden, dass die Arc/Arg3.1-mRNA ein physiologisches Substrat des „Nonsense“-vermittelten-mRNA-Abbaus („nonsense-mediated decay“; NMD) darstellt. Die NMD ist somit ein Prozess, bei dem die Degradation der mRNA an ihre Translation gekoppelt ist. Durch die Verwendung von Translationsinhibitoren, wie Cycloheximid (CHX), eine Stabilisierung der Arc/Arg3.1-mRNA und folglich eine Erhöhung der Arc/Arg3.1-mRNA-Level induziert (Giorgi et al., 2007; Bateup et al., 2013). Weitere Studien konnten eine Regulation der Arc/Arg3.1-Proteinmenge durch Ubiquitin-Proteasomen-abhängige Degradationsprozesse beschreiben (Park et al., 2008; Greer et al., 2010).

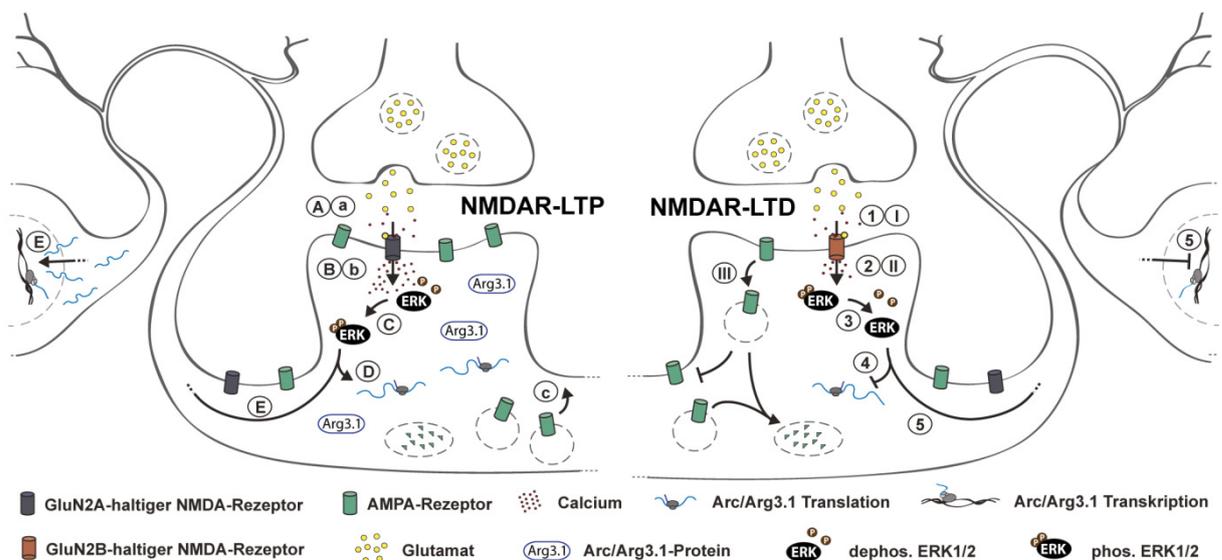
Um die NMDA-abhängige Wirkung auf die Arc/Arg3.1-Expression zu analysieren, wurden primäre Neuronenkulturen gleichzeitig mit CHX bzw. ActD inkubiert. Dies ermöglichte es, translations- und transkriptionsabhängige Prozesse von NMDA auf die Arc/Arg3.1-Expression zu identifizieren. Weiter konnte NMDA durch die Inkubation mit ActD eine repressorische Funktion für die Arc/Arg3.1-Translation nachgewiesen werden. Es ließ sich zeigen, dass die NMDA-Applikation unter ActD-Bedingung eine weitere Reduktion der Arc/Arg3.1-Proteinmenge induziert (Abb. 10a). Interessanterweise ist diese Reduktion auf Proteinebene an

eine Erhöhung der Arc/Arg3.1-mRNA-Menge gekoppelt (Abb. 10b). Dies lässt annehmen, dass NMDA und CHX dieselbe Wirkung auf die Arc/Arg3.1-Expression haben (Abb. 3e, 10a,b). Eine syntheseabhängige Erhöhung der Arc/Arg3.1-mRNA-Menge kann durch die parallele Inkubation mit dem Transkriptioninhibitor ActD ausgeschlossen werden. Darüber hinaus konnte die NMDA-vermittelte Reduktion der Arc/Arg3.1-Proteinmenge nicht durch Applikation des Proteasomeninhibitor MG-132 blockiert werden (Abb. 11). Diese Beobachtung schließt eine NMDA-induzierte Degradation des Arc/Arg3.1-Proteinlevels aus. Es ist unklar, auf welcher Ebene NMDA-Rezeptoren die Arc/Arg3.1-Translation regulieren. Arbeiten von Clive Bramham postulieren eine NMDAR-abhängige Regulation der Arc/Arg3.1-Translation auf Initiationsebene durch die MAP-Kinase-interagierenden-Kinase 1 (MNK1) und den eukaryontischen Initiationsfaktors 4E (eIF4E) (Panja et al., 2009). Weitere Untersuchungen konnten einen eukaryontischen Elongationsfaktor 2 (eEF2)-abhängigen Mechanismus zur Regulation der Arc/Arg3.1-Translation für mGluR-abhängige Formen der LTD demonstrieren (Park et al., 2008). Dies bedarf jedoch weiterer Überprüfungen.

Anfängliche Experimente zur Arc/Arg3.1-Expression konnten darlegen, dass NMDA nicht nur eine Reduktion der Arc/Arg3.1-Proteinexpression, sondern auch eine Reduktion der Arc/Arg3.1-mRNA-Expression bewirkt. Durch die Inkubation primärer Neuronenkulturen mit dem Translationsinhibitor CHX ließ sich eine repressorische Wirkung von NMDA auf die Arc/Arg3.1-Transkription nachweisen. So vermittelt NMDA unter Bedingung der Translationsinhibition eine Reduktion der Arc/Arg3.1-mRNA-Menge (Abb. 10c). Vorangegangene Experimente mit ActD legen dar, dass NMDA nicht die Degradation der Arc/Arg3.1-mRNA beschleunigt. Vielmehr scheint NMDA einen geringen Anteil der Arc/Arg3.1-mRNA vor Abbauprozessen zu schützen (Abb. 10b). Ob dies durch einen NMD-abhängigen Prozess erfolgt, bleibt zu prüfen. Es ist bislang nicht bekannt durch welchen Mechanismus NMDA die Arc/Arg3.1-Transkription reprimiert. Auf der Suche nach genomischen Regionen, die Arc/Arg3.1-Expression aktivitätsabhängig regulieren, ließ sich ein als SARE Element („*synaptic activity-responsive element*“) bezeichneter Abschnitt im Arc/Arg3.1-Promotor identifizieren (Kawashima et al., 2009). Mittels EMSA- (Electrophoretic Mobility Shift Assay) und CHIP- (Chromatin-Immunoprecipitation) Analysen konnten Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren: SRF („*serum response factor*“) und CREB („*camp response element binding protein*“) nachgewiesen werden (Waltereit et al., 2001; Kawashima et al., 2009). Weitere Analysen konnten zudem Bindungsstellen für repressorische Transkriptionsfaktoren in der Arc/Arg3.1-Promotorregion identifizieren (Pintchovski et al., 2009). Arbeiten von Hilmar Bading beschreiben einen NMDAR-abhängigen Mechanismus zur CREB-Dephosphorylierung (Hardingham et al., 2002). Eigene Experimente konnten eine NMDA-vermittelte Dephosphorylierung des CREB-Proteins bestätigen (hier nicht gezeigt). NMDA könnte somit die

CREB-abhängigen Transkription blockieren. Weitere Studien konnten eine MAP-Kinase-abhängige Regulation der SRF-vermittelten Transkription darlegen. So wurde gezeigt, dass ERK1/2 die Phosphorylierung des SRF Koaktivators Elk-1 reguliert (Xia et al., 1996; Davis et al., 2000). Die hier beobachtete Reduktion der Arc/Arg3.1-mRNA-Expression könnte somit das Resultat einer inhibierten SRF-Transkription sein. Luciferase-Analysen konnten zudem eine ERK1/2-Abhängigkeit der Arc/Arg3.1-Transkription durch den MEK-Inhibitor U0126 bestätigen (Pintchovski et al., 2009; Kawashima et al., 2009).

Durch welche Mechanismen NMDA die Arc/Arg3.1-Transkription und Translation reguliert, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Jedoch konnte ich zeigen, dass die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren den Aktivierungszustand der ERK1/2-Kinase bidirektional regulieren kann. Weiter ließ sich darlegen, dass die Arc/Arg3.1-Expression durch die Phosphorylierung der ERK1/2-Kinase kontrolliert wird. Somit konnte ich erstmals einen NMDAR-abhängigen Mechanismus identifizieren, der die Expression von Arc/Arg3.1 bidirektional regulieren kann (vgl. Abb. 14).



**Abbildung 14: NMDA-Rezeptoren vermitteln eine bidirektionale Regulation der Arc/Arg3.1-Expression über die MAP-Kinase ERK1/2.** Links: NMDAR-aktivierende LTP-produzierende Stimuli vermitteln die Aktivierung GluN2A-haltiger NMDA-Rezeptoren (A) (a). Die Aktivierung des NMDA-Rezeptors bewirkt einen Calciumeinstrom in die Zelle (B) (b). Der Calciumeinstrom führt zur Aktivierung des MAPK-Kinase-Signalweges und der Phosphorylierung der ERK1/2-Kinase (C). Die Aktivierung der ERK1/2-Kinase aktiviert die Arc/Arg3.1-Protein- (D) und mRNA-Synthese (E). In einem parallelen Prozess bewirkt die Aktivierung GluN2A-haltiger NMDA-Rezeptoren die Insertion von AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran (c). Rechts: NMDAR-aktivierende, LTD-produzierende Stimuli vermitteln die Aktivierung GluN2B-haltiger NMDA-Rezeptoren (1) (I). Die Aktivierung des NMDA-Rezeptors bewirkt einen Calciumeinstrom in die Zelle (2) (II). Der Calciumeinstrom führt zur Aktivierung von Phosphatasen und zur Dephosphorylierung der ERK1/2-Kinase (3). Die Deaktivierung der ERK1/2-Kinase vermittelt eine Inhibition der Arc/Arg3.1-Protein- (4) und mRNA-Synthese (5). In einem parallelen Prozess bewirkt die Aktivierung GluN2B-haltiger NMDA-Rezeptoren die Reduktion von AMPA-Rezeptoren an der neuronalen Zelloberfläche (III).

## 4.2 Ungewisse funktionelle Rolle von Arc/Arg3.1 für die Induktion und Expression der NMDA-LTD

Die LTD-induzierende Wirkung der NMDA-Badapplikation ist bereits mehrfach in akuten hippocampalen Hirnschnitten demonstriert worden (Lee et al., 1998; Kameyama et al., 1998; Braun et al., 2005; Delgado et al., 2007). Mit Hilfe von Karin Kähler ließen sich diese Beobachtungen in unserem Labor bestätigen. So konnte durch extrazelluläre Ableitungen eine Depression der exzitatorischen, postsynaptischen Feldpotentiale (fEPSPs) in der CA1 Region des Hippocampus nachgewiesen werden. Intrazelluläre Ableitungen geben Hinweise, dass die NMDA-abhängigen Veränderungen der synaptischen Transmission auf Einzelzellebene getriggert werden. Karin Kähler konnte zeigen, dass NMDA eine LTD der Amplituden evozierter, exzitatorischer, postsynaptischer Ströme (eEPSCs) in Pyramidalzellen der CA1-Region des Hippocampus vermittelt. Weitere Versuche bestätigten grundlegende Veränderungen molekularer Netzwerke auf postsynaptischer Ebene. So bewirkte NMDA eine Depression der Amplituden spontaner, exzitatorischer, postsynaptischer Ströme (mEPSCs) in Pyramidalzellen der CA1-Region.

Die Modifizierung der synaptischen Effizienz basieren Veränderungen hinsichtlich der Rezeptordichte, der exprimierten Rezeptortypen und Veränderungen der biophysikalischen Eigenschaften exprimierter Rezeptoren (Anggono & Huganir et al., 2012). Ein Modell zur Erklärung langanhaltender Formen der synaptischen Plastizität ist die veränderte postsynaptische Expression von AMPA-Rezeptoren. AMPA-Rezeptoren bilden tetramere Proteinkomplexe aus zwei identischen Hetero-dimeren. Die vorwiegend im Hippocampus exprimierten Subtypen sind die GluA1/GluA2-haltigen und die GluA2/GluA3-haltigen AMPA-Rezeptoren. Erste Experimente zur NMDA-vermittelten LTD konnten eine Dephosphorylierung der GluA1-Untereinheit des AMPA-Rezeptors nachweisen (Lee et al., 1998; Lee et al., 2003; Smith et al., 2006). Ferner ließ sich zeigen, dass NMDA die Expression GluA1-haltiger AMPA-Rezeptoren an der neuronalen Zelloberfläche reduziert (Lee et al., 2003; Colledge et al., 2003; Waung et al., 2008). Diese Beobachtung konnte ich durch Biotinylierungsexperimente in hippocampalen Hirnschnitten der Maus bestätigen. So konnte durch die Applikation von NMDA eine spezifische Reduktion des GluA1-Expressionslevels an der neuronalen Zelloberfläche beobachtet werden (Abb. 2a). GluA2-Expressionslevel zeigten hingegen keine NMDA-vermittelten Veränderungen (Abb. 2b). Es ließ sich demonstrieren, dass die GluA2-Untereinheit die biophysikalischen Eigenschaften von AMPA-Rezeptoren reguliert. So ist bekannt, dass Homodimere AMPA-Rezeptoren, die keine GluA2-Untereinheit enthalten, permeabel für Calciumionen sind (CP-AMPA-Rezeptoren) (Isaac et al., 2007; Shepherd et al., 2012). Die Funktion und Regulation dieser besonderen Form der AMPA-Rezeptoren ist jedoch weitgehend ungeklärt.

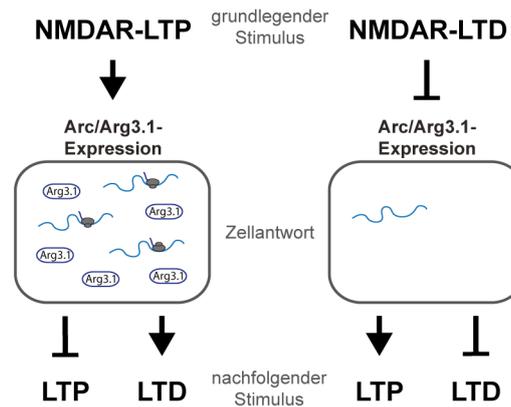
Neuere Studien konnten zeigen, dass die NMDAR-LTD im Hippocampus mit einem Verlust der Sensitivität für den CP-AMPA-Inhibitor Philanthotoxin (PhTx) assoziiert ist (He et al., 2009). So könnte die hier beobachtete Reduktion der GluA1-Expressionslevel an der neuronalen Zelloberfläche das Resultat einer NMDA-vermittelten CP-AMPA-Endozytose sein. Eine Reduktion der GluA1-Expression durch eine reduzierte Insertion von GluA1-haltigen AMPA-Rezeptoren kann jedoch nicht ausgeschlossen werden (Oh et al., 2006). Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass die reduzierte GluA1-Expression an der neuronalen Zelloberfläche mit einer Reduktion der GluA1-Gesamtexpression einhergeht (Abb. 2). Diese Beobachtung ließ sich auch in neueren Studien zur chemischen NMDA-LTD bestätigen. So konnte gezeigt werden, dass NMDA eine Autophagosomen-abhängige Degradation der GluA1-Untereinheit des AMPA-Rezeptors induziert (Shehata et al., 2012). Neuere Erkenntnisse deuten zudem auf eine CREB und Arc/Arg3.1-abhängige Regulation der GluA1-Synthese im Nucleus von Neuronen hin (Korb et al., 2013). Weitere biochemische Analysen konnten Arc/Arg3.1 eine wichtige Funktion für die regulierte Expression von AMPA-Rezeptoren an der neuronalen Zelloberfläche nachweisen (Shepherd et al., 2006). Es wird dabei angenommen, dass Arc/Arg3.1 durch Interaktionen mit den Proteinen Dynamin2 und Endophilin3 die Endozytose von AMPA-Rezeptoren reguliert (Chowdhury et al., 2006). Durch die Generierung von Arc/Arg3.1-Knockout-Mäusen ließ sich schließlich zeigen, dass Arc/Arg3.1 essentiell für die Stabilisierung verschiedener Formen der LTD ist (Plath et al., 2006; Park et al., 2008). Untersuchungen von Arc/Arg3.1-Knockout-Mäusen durch Karin Kähler konnten jedoch keine Beeinträchtigung der NMDA-LTD feststellen. So zeigten sowohl extrazelluläre Ableitungen von fEPSPs, als auch intrazelluläre Ableitungen von eEPSCs und mEPSCs keine signifikanten Beeinträchtigungen in der NMDA-vermittelten LTD (Karin Kähler, in Vorbereitung). Biotinylierungsexperimente konnten in Übereinstimmung dazu keine Beeinträchtigung der NMDA-vermittelten AMPAR-Endozytose in hippocampalen Hirnschnitten und primären Neuronenkulturen (letzteres nicht gezeigt) feststellen (Abb. 12). Darüber hinaus korreliert diese Beobachtung mit den Ergebnissen der Arc/Arg3.1-Wildtyp-Analyse. So ließ sich im Wildtyp eine NMDA-vermittelte Reduktion der Arc/Arg3.1-Expression beobachten. Arbeiten von John Scott konnten zudem darlegen, dass die NMDA-LTD durch eine Proteasomen-abhängige Degradation des PSD-95-Proteins reguliert wird (Colledge et al. 2003). Eigene Experimente konnten eine proteasomale Degradation des Arc/Arg3.1-Proteins jedoch ausschließen (Abb. 11). Dies lässt vermuten, dass die Arc/Arg3.1-Expression nicht essentiell für die Induktion und Stabilisierung der NMDA-LTD ist. Bis dato ist jedoch nicht geklärt, inwiefern eine Erhöhung der Arc/Arg3.1-Expression die Induktion bzw. Konsolidierung des NMDA-LTDs beeinflusst. Erste Hinweise hierfür konnten durch Experimente zur Arc/Arg3.1-Überexpression in hippocampalen Neuronenkulturen geliefert werden. So konnten Kimberly Huber und Kollegen demonstrieren, dass die Überexpression des Arc/Arg3.1-Gens eine NMDA-abhängige

Endozytose von GluA1-haltigen AMPA-Rezeptoren von der neuronalen Zelloberfläche blockiert (Wang et al., 2008). Arc/Arg3.1 scheint somit eine zelluläre Funktion zu besitzen, die vermutlich die Expression der NMDA-LTD verhindern würde. Um die Funktion von Arc/Arg3.1 für NMDAR-abhängige Formen der LTD zu verstehen, bedarf es weitergehender Untersuchungen.

Ein möglicher Kritikpunkt von NMDA-Badapplikationen ist die Induktion irreversibler neuronaler Schäden durch Exzitotoxizität (Choi, 1992, 94). Aufgrund dessen könnte angenommen werden, dass die Reduktion der Arc/Arg3.1- und GluA1-Expression das Resultat einer neuronalen Schädigungen ist. Experimente von Lu et al. (1996) konnten demonstrieren, dass die hier verwendete NMDA-Inkubationszeit und NMDA-Konzentration unterhalb der liegt, die zur Induktion von Exzitotoxizität notwendig ist. Intrazelluläre Ableitungen von Pyramidalzellen der CA1 Region des Hippocampus konnten zudem NMDA-abhängige Veränderungen auf Einzelzellebene nachweisen. Dies zeigt, dass die Depression der fEPSPs nicht das Resultat einer NMDA-abhängigen Degradation einzelner postsynaptischer Zellen ist. Ferner ließen sich keine signifikanten Veränderungen des Input-Widerstandes während der intrazellulären Ableitungen beobachten (Karin Kähler, in Vorbereitung). In Übereinstimmung damit, ließ sich in Oberflächen-Biotinylierungsexperimenten keine Biotinylierung intrazellulärer Proteine nachweisen. Dies bestätigt, dass die Integrität der Zelle durch die NMDA-Applikation nicht beeinträchtigt wird. Weiterhin ließ sich in biochemischen Experimenten zeigen, dass Expressionslevel der Proteine GluA2, beta-Aktin, Cadherin, GAPDH und ERK1/2 durch die NMDA-Applikation nicht verändert werden. Eine neurotoxische Wirkung des hier verwendeten NMDA-Stimulationsprotokolls kann somit ausgeschlossen werden (Shehata et al., 2012).

### **4.3 Arc/Arg3.1, ein Plastizitätsmarker mit metaplastischer Funktion**

Seit der Entdeckung des IEGs Arc/Arg3.1 (1995) wurden verschiedene plastizitätsinduzierende Stimulationsprotokolle beschrieben, die die Arc/Arg3.1-Expression aktivieren. Erste Hinweise, dass die Arc/Arg3.1-Expression durch den NMDA-Rezeptor reguliert wird, lieferten Untersuchungen zur HFS-induzierten LTP in hippocampalen Hirnschnitten der Maus (Steward & Worley, 2001). Weiterführende Untersuchungen konnten eine ERK1/2-abhängige Regulation des HFS-LTPs und der Arc/Arg3.1-Expression demonstrieren (Huang et al., 2007; Panja et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit ließ sich zeigen, dass die ERK1/2-Phosphorylierung bidirektional durch NMDA-Rezeptoren reguliert werden kann. Dies bestätigt vorangegangene Studien zur NMDAR-abhängigen ERK1/2-Regulation (Kim et al., 2005). Darüber hinaus konnte dargelegt werden, dass diese bidirektionale Regulation der ERK1/2-Aktivität mit einer bidirekt-



**Abbildung 15: Arc/Arg3.1, ein Plastizitätsmarker mit metaplastischer Funktion.** NMDA-Rezeptoren können die synaptische Effizienz bidirektional regulieren. Die Induktion einer NMDAR-abhängigen LTP geht mit einer Erhöhung der Arc/Arg3.1-Expression einher. Die Induktion einer NMDAR-abhängigen LTD korreliert hingegen mit einer Repression der Arc/Arg3.1-mRNA- und Proteinsynthese. Die Arc/Arg3.1-Expression könnte somit die Induktionsschwelle für nachfolgende, plastizitätsinduzierende Stimulationen regulieren. So fördert Arc/Arg3.1 die Induktion stabiler LTD, beeinträchtigt jedoch die Induktion der LTP.

ionalen Regulation der Arc/Arg3.1-Expression einhergeht. Somit ließ sich erstmals demonstrieren, dass die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren eine Reduktion der Arc/Arg3.1-Expression auf Translations- und Transkriptionsebene vermitteln kann. Elektrophysiologische Ableitungen konnten zudem zeigen, dass die NMDA-vermittelte LTD mit einer Reduktion der Arc/Arg3.1-Expression in hippocampalen Hirnschnitten der Maus assoziiert ist. Weitere Studien konnten die LTD-induzierende Wirkung der NMDA-Applikation im hippocampalen Netzwerk bestätigen (Lee et al., 1998; Kameyama et al., 1998; Braun et al., 2005; Delgado et al., 2007). Darüber hinaus ließ sich zeigen, dass NMDAR-abhängige Formen der LTD nicht auf einer Phosphorylierung der ERK1/2-Kinase basieren (Gallagher et al., 2004). Diese Erkenntnisse stehen in Übereinstimmung zu vorangegangenen Modellen, die eine bidirektionale Regulation der synaptischen Plastizität durch den NMDA-Rezeptor annehmen (Lisman et al., 1989; Malenka et al., 1994; Lüscher & Malenka et al., 2012). Arc/Arg3.1 kann somit als ein Marker für NMDAR-abhängige Formen der synaptischen Plastizität verstanden werden (vgl. Abb. 15). Über eine mögliche Funktion der bidirektionalen Arc/Arg3.1-Regulation lässt sich bisher nur mutmaßen. So könnte die Erhöhung bzw. Reduktion der Arc/Arg3.1-Expression die Wirkung nachfolgender Stimulationen beeinflussen. Studien zum DHPG-LTD konnten erste Hinweise, für eine solche metaplastische Funktion von Arc/Arg3.1 liefern (Jakkamsetti et al., 2013). So ließ sich zeigen, dass mGluR-abhängige Formen der LTD durch eine vorangegangene Arc/Arg3.1-Expression stabilisiert werden. Arc/Arg3.1 könnte somit ein Schlüsselprotein der Metaplastizität sein (vgl. Abb. 15).

Weiter ließ sich zeigen, dass mGluR- und NMDA-abhängige Formen der LTD auf unterschiedlichen molekularen Prozessen beruhen (Collingridge et al., 2010). So konnten vorangegangene Untersuchungen der mGluR-LTD eine Arc/Arg3.1-Abhängigkeit nachweisen

(Park et al., 2008). Es wird angenommen, dass Arc/Arg3.1 die Expression von AMPAR-Rezeptoren während der mGluR-LTD reguliert (Waung et al., 2008). Diese Funktion von Arc/Arg3.1 in der Endozytose von AMPA-Rezeptoren scheint jedoch nicht für alle Formen der LTD notwendig zu sein. So kann im Gegensatz zum mGluR-LTD, die Konsolidierung der NMDA-LTD unabhängig von der Arc/Arg3.1-Expression vermittelt werden. Dies lässt vermuten, dass in Neuronen Arc/Arg3.1-unabhängige Mechanismen zur Endozytose von AMPA-Rezeptoren existieren.

## **5 Anhang**

## 5.1 Literaturverzeichnis

**Anggono, V., and R. L. Huganir. 2012.** "Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity." *Current opinion in neurobiology*.

**Arendt, Kristin L, Federica Sarti, and Lu Chen. 2013.** "Chronic inactivation of a neural circuit enhances LTP by inducing silent synapse formation." *The Journal of Neuroscience* 33 (5): 2087-2096.

**Atkins, Coleen M, Joel C Selcher, Joseph J Petraitis, James M Trzaskos, and J David Sweatt. 1998.** "The MAPK cascade is required for mammalian associative learning." *Nature neuroscience* 1 (7): 602-609.

**Bading, Hilmar. 2013.** "Nuclear calcium signalling in the regulation of brain function." *Nature Reviews Neuroscience* 14 (9): 593-608.

**Bateup, Helen S, Cassandra L Deneffrio, Caroline A Johnson, Jessica L Saulnier, and Bernardo L Sabatini. 2013.** "Temporal dynamics of a homeostatic pathway controlling neural network activity." *Frontiers in molecular neuroscience* 6.

**Benke, Tim A, Andreas Lüthi, John TR Isaac, and Graham L Collingridge. 1998.** "Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity." *Nature* 393 (6687): 793-797.

**Bliss, Tim VP, and Terje Lømo. 1973.** "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." *The Journal of physiology* 232 (2): 331-356.

**Bliss, Tim VP, Graham L Collingridge, and others. 1993.** "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus." *Nature* 361 (6407): 31-39.

**Bloomer, W. A. C., H. VanDongen, and A. M. J. VanDongen. 2008.** "Arc/Arg3.1 translation is controlled by convergent N-methyl-D-aspartate and Gs-coupled receptor signaling pathways." *Journal of Biological Chemistry* 283 (1): 582.

**Bolshakov, VY, L Carboni, MH Cobb, SA Siegelbaum, and F Belardetti. 2000.** "Dual MAP kinase pathways mediate opposing forms of long-term plasticity at CA3-CA1 synapses." *Nature neuroscience* 3 (11): 1107-1112.

**Brown, T. C., I. C. Tran, D. S. Backos, and J. A. Esteban. 2005.** "Supplement - NMDA receptor-dependent activation of the small GTPase Rab5 drives the removal of synaptic AMPA receptors during hippocampal LTD." *Neuron* 45 (1): 81-94.

**Choi, Dennis W. 1992.** "Excitotoxic cell death." *Journal of neurobiology* 23 (9): 1261-1276.

**Choi, Dennis W. 1994.** "Calcium and excitotoxic neuronal injury." *Annals of the New York Academy of Sciences* 747 (1): 162-171.

**Chowdhury, S., J. D. Shepherd, H. Okuno, G. Lyford, R. S. Petralia, N. Plath, D. Kuhl, R. L. Huganir, and P. F. Worley. 2006.** "Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking." *Neuron* 52 (3): 445-459.

**Citri, Ami, and Robert C Malenka. 2008.** "Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms." *Neuropsychopharmacology* 33 (1): 18-41.

- Cole**, Andrew J, David W Saffen, Jay M Baraban, and Paul F Worley. **1989**. "Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation." *Nature* 340 (6233): 474-476.
- Colledge**, M., E. M. Snyder, R. A. Crozier, J. A. Soderling, Y. Jin, L. K. Langeberg, H. Lu, M. F. Bear, and J. D. Scott. **2003**. "Ubiquitination regulates PSD-95 degradation and AMPA receptor surface expression." *Neuron* 40 (3): 595-607.
- Collingridge**, Graham L, John TR Isaac, and Yu Tian Wang. **2004**. "Receptor trafficking and synaptic plasticity." *Nature Reviews Neuroscience* 5 (12): 952-962.
- Collingridge**, G. L., S. Peineau, J. G. Howland, and Y. T. Wang. **2010**. "Long-term depression in the CNS." *Nature Reviews Neuroscience* 11 (7): 459-473.
- Cull-Candy**, S. G., and D. N. Leszkiewicz. **2004**. "Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses." *Science Signalling* 2004 (255): re16.
- Cummings**, Dana D, Karen S Wilcox, and Marc A Dichter. **1996**. "Calcium-dependent paired-pulse facilitation of miniature EPSC frequency accompanies depression of EPSCs at hippocampal synapses in culture." *The Journal of neuroscience* 16 (17): 5312-5323.
- Davis**, Sabrina, Peter Vanhoutte, Christiane Pagès, Jocelyne Caboche, and Serge Laroche. **2000**. "The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo." *The Journal of neuroscience* 20 (12): 4563-4572.
- Delgado**, J. Y., M. Coba, C. N. G. Anderson, K. R. Thompson, E. E. Gray, C. L. Heusner, K. C. Martin, S. G. N. Grant, and T. J. O'Dell. **2007**. "NMDA receptor activation dephosphorylates AMPA receptor glutamate receptor 1 subunits at threonine 840." *The Journal of Neuroscience* 27 (48): 13210-13221.
- Derkach**, V. A., M. C. Oh, E. S. Guire, and T. R. Soderling. **2007**. "Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity." *Nature Reviews Neuroscience* 8 (2): 101-113.
- Eichenbaum**, H. **2013**. "What H.M. taught us." *Journal of cognitive neuroscience* 25.: 14–21.
- English**, Joey D, and J David Sweatt. **1996**. "Activation of p42 mitogen-activated protein kinase in hippocampal long term potentiation." *Journal of Biological Chemistry* 271 (40): 24329-24332.
- English**, Joey D, and J David Sweatt. **1997**. "A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation." *Journal of Biological Chemistry* 272 (31): 19103-19106.
- Feng**, Wei, and Mingjie Zhang. **2009**. "Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in the postsynaptic density." *Nature Reviews Neuroscience* 10 (2): 87-99.
- Gallagher**, S. M., C. A. Daly, M. F. Bear, and K. M. Huber. **2004**. "Extracellular signal-regulated protein kinase activation is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression in hippocampal area CA1." *The Journal of neuroscience* 24 (20): 4859.
- Giorgi**, Corinna, Gene W Yeo, Martha E Stone, Donald B Katz, Christopher Burge, Gina Turrigiano, and Melissa J Moore. **2007**. "Supplement - The EJC factor eIF4AIII modulates synaptic strength and neuronal protein expression." *Cell* 130 (1): 179-191.

**Greer, P. L., R. Hanayama, B. L. Bloodgood, A. R. Mardinly, D. M. Lipton, S. W. Flavell, T. K. Kim, et al. 2010.** "The Angelman Syndrome protein Ube3A regulates synapse development by ubiquitinating arc." *Cell* 140 (5): 704-716.

**Hardingham, G. E., and H. Bading. 2002.** "Coupling of extrasynaptic NMDA receptors to a CREB shut-off pathway is developmentally regulated." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics* 1600 (1-2): 148-153.

**He, Kaiwen, Lihua Song, Laurel W Cummings, Jonathan Goldman, Richard L Huganir, and Hey-Kyoung Lee. 2009.** "Stabilization of Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors at perisynaptic sites by GluR1-S845 phosphorylation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (47): 20033-20038.

**Hebb, D. O. 1949.** "The Organization of behavior: A neuropsychological theory." John Wiley & Sons, New York

**Herculano-Houzel, S. 2009.** "The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain." *Frontiers in Human Neuroscience* 3.

**Herculano-Houzel, Suzana. 2012.** "The remarkable, yet not extraordinary, human brain as a scaled-up primate brain and its associated cost." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (Supplement 1): 10661-10668.

**Ho, V. M., J. A. Lee, and K. C. Martin. 2011.** "The cell biology of synaptic plasticity." *Science* 334 (6056): 623-628.

**Huang, F., J. K. Chotiner, and O. Steward. 2007.** "Actin polymerization and ERK phosphorylation are required for Arc/Arg3. 1 mRNA targeting to activated synaptic sites on dendrites." *The Journal of Neuroscience* 27 (34): 9054-9067.

**Husi, H., M. A. Ward, J. S. Choudhary, W. P. Blackstock, and S. G. N. Grant. 2000.** "Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes."

**Isaac, John TR, Michael C Ashby, and Chris J McBain. 2007.** "The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity." *Neuron* 54 (6): 859-871.

**Jakkamsetti, Vikram, Nien-Pei Tsai, Christina Gross, Gemma Molinaro, Katie A Collins, Ferdinando Nicoletti, Kuan H Wang, et al. 2013.** "Experience-Induced Arc/Arg3. 1 Primes CA1 Pyramidal Neurons for Metabotropic Glutamate Receptor-Dependent Long-Term Synaptic Depression." *Neuron* 80 (1): 72-79.

**Johnson, JW, and P Ascher. 1987.** "Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons."

**Kähler, Karin.** Dissertation in Vorbereitung.

**Kameyama, K., H. K. Lee, M. F. Bear, and R. L. Huganir. 1998.** "Involvement of a postsynaptic protein kinase A substrate in the expression of homosynaptic long-term depression." *Neuron* 21 (5): 1163-1175.

**Karpova, Anna, Marina Mikhaylova, Sujoy Bera, Julia Bär, Pasham Parameshwar Reddy, Thomas Behnisch, Vladan Rankovic, et al. 2013.** "Encoding and transducing the synaptic or extrasynaptic origin of NMDA receptor signals to the nucleus." *Cell* 152 (5): 1119-1133.

- Kawashima**, T., H. Okuno, M. Nonaka, A. Adachi-Morishima, N. Kyo, M. Okamura, S. Takemoto-Kimura, P. F. Worley, and H. Bito. **2009**. "Synaptic activity-responsive element in the Arc/Arg3.1 promoter essential for synapse-to-nucleus signaling in activated neurons." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (1): 316.
- Keinanen**, Kari, William Wisden, Bernd Sommer, Pia Werner, Anne Herb, Todd A Verdoorn, Bert Sakmann, and Peter H Seeburg. **1990**. "A family of AMPA-selective glutamate receptors." *Science* 249 (4968): 556-560.
- Kelleher**, R. J., A. Govindarajan, H. Y. Jung, H. Kang, and S. Tonegawa. **2004**. "Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory." *Cell* 116 (3): 467-479.
- Kessels**, Helmut W, and Roberto **Malinow**. **2009**. "Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior." *Neuron* 61 (3): 340-350.
- Kim**, M. J., A. W. Dunah, Y. T. Wang, and M. Sheng. **2005**. "Differential roles of NR2A-and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking." *Neuron* 46 (5): 745-760.
- Kleckner**, Nancy W, and Raymond **Dingledine**. **1988**. "Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes." *Science* 241 (4867): 835-837.
- Korb**, E., and S. **Finkbeiner**. **2011**. "Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior." *Trends in Neurosciences*.
- Korb**, Erica, Carol L Wilkinson, Ryan N Delgado, Kathryn L Lovero, and Steven Finkbeiner. **2013**. "Arc in the nucleus regulates PML-dependent GluA1 transcription and homeostatic plasticity." *Nature neuroscience* 16 (7): 874-883.
- Laube**, Bodo, Hirokazu Hirai, Mike Sturgess, Heinrich Betz, and Jochen Kuhse. **1997**. "Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit." *Neuron* 18 (3): 493-503.
- Lee**, H. K., K. Kameyama, R. L. Huganir, and M. F. Bear. **1998**. "NMDA induces long-term synaptic depression and dephosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors in hippocampus." *Neuron* 21 (5): 1151-1162.
- Lee**, H. K., K. Takamiya, J. S. Han, H. Man, C. H. Kim, G. Rumbaugh, S. Yu, et al. **2003**. "Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory." *Cell* 112 (5): 631-643.
- Legendre**, PASCAL, and GARY L **Westbrook**. **1991**. "Ifenprodil blocks N-methyl-D-aspartate receptors by a two-component mechanism." *Molecular pharmacology* 40 (2): 289-298.
- Liao**, Dezhi, Robert H Scannevin, and Richard Huganir. **2001**. "Activation of silent synapses by rapid activity-dependent synaptic recruitment of AMPA receptors." *The Journal of Neuroscience* 21 (16): 6008-6017.
- Lin**, Yingxi, Brenda L Bloodgood, Jessica L Hauser, Ariya D Lapan, Alex C Koon, Tae-Kyung Kim, Linda S Hu, Athar N Malik, and Michael E Greenberg. **2008**. "Activity-dependent regulation of inhibitory synapse development by Npas4." *Nature* 455 (7217): 1198-1204.

**Link, W., U. Konietzko, G. Kauselmann, M. Krug, B. Schwanke, U. Frey, and D. Kuhl. 1995.** "Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (12): 5734-5738.

**Lisman, J. 1989.** "A mechanism for the Hebb and the anti-Hebb processes underlying learning and memory." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86 (23): 9574-9578.

**Liu, L., T. P. Wong, M. F. Pozza, K. Lingenhoehl, Y. Wang, M. Sheng, Y. P. Auberson, and Y. T. Wang. 2004.** "Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity." *Science's STKE* 304 (5673): 1021.

**Lu, W. Y., H. Y. Man, W. Ju, W. S. Trimble, J. F. MacDonald, and Y. T. Wang. 2001.** "Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons." *Neuron* 29 (1): 243-254.

**Lu, You Ming, Hong Zhen Yin, Juna Chiang, and John H Weiss. 1996.** "Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA/kainate and NMDA channels: high rate of Ca<sup>2+</sup> influx underlies potent induction of injury." *The Journal of neuroscience* 16 (17): 5457-5465.

**Lüscher, Christian, and Robert C Malenka. 2012.** "NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD)." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4 (6): a005710.

**Lyford, G. L., K. Yamagata, W. E. Kaufmann, C. A. Barnes, L. K. Sanders, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, A. A. Lanahan, and P. F. Worley. 1995.** "Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites." *Neuron* 14 (2): 433-445.

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

**Malinow, Roberto, and Robert C Malenka. 2002.** "AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity." *Annual review of neuroscience* 25 (1): 103-126.

**Man, Heng-Ye. 2011.** "GluA2-lacking, calcium-permeable AMPA receptors—inducers of plasticity?" *Current opinion in neurobiology* 21 (2): 291-298.

**Massey, P. V., B. E. Johnson, P. R. Moulton, Y. P. Auberson, M. W. Brown, E. Molnar, G. L. Collingridge, and Z. I. Bashir. 2004.** "Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression." *The Journal of neuroscience* 24 (36): 7821-7828.

**Messaoudi, E., T. Kanhema, J. Soulé, A. Tiron, G. Dageyte, B. da Silva, and C. R. Bramham. 2007.** "Sustained Arc/Arg3.1 synthesis controls long-term potentiation consolidation through regulation of local actin polymerization in the dentate gyrus in vivo." *The Journal of Neuroscience* 27 (39): 10445-10455.

**Monyer, H., R. Sprengel, R. Schoepfer, A. Herb, M. Higuchi, H. Lomeli, N. Burnashev, B. Sakmann, P. H. Seeburg, and others. 1992.** "Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes." *Science (New York, NY)* 256 (5060): 1217.

**Monyer, Hannah, Nail Burnashev, David J Laurie, Bert Sakmann, Peter H Seeburg, and others. 1994.** "Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors." *Neuron* 12 (3): 529.

- Morgan**, JAMES I, DONNA R Cohen, JAMES L Hempstead, and Tom Curran. **1987**. "Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure." *Science* 237 (4811): 192-197.
- Mulkey**, R. M., S. Endo, S. Shenolikar, and R. C. Malenka. **1994**. "Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression." *Nature* 369 (6480): 486-488.
- Mulkey**, Rosel M, and Robert C Malenka. **1992**. "Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus." *Neuron* 9 (5): 967-975.
- Musleh**, Wael, Xiaoning Bi, Georges Tocco, Shahriar Yaghoubi, and Michel Baudry. **1997**. "Glycine-induced long-term potentiation is associated with structural and functional modifications of alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (17): 9451-9456.
- Neves**, G., Cooke, S.F. and Bliss, T.V.P. **2008**. "Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality". *Nature Reviews Neuroscience* 9: 65-75.
- Nishiyama**, Makoto, Kyonsoo Hong, Katsuhiko Mikoshiba, Mu-Ming Poo, and Kunio Kato. **2000**. "Calcium stores regulate the polarity and input specificity of synaptic modification." *Nature* 408 (6812): 584-588.
- Oh**, M. C., V. A. Derkach, E. S. Guire, and T. R. Soderling. **2006**. "Extrasynaptic membrane trafficking regulated by GluR1 serine 845 phosphorylation primes AMPA receptors for long-term potentiation." *Journal of Biological Chemistry* 281 (2): 752-758.
- Ohno**, Masuo, Paul W Frankland, Adele P Chen, Rui M Costa, and Alcino J Silva. **2001**. "Inducible, pharmacogenetic approaches to the study of learning and memory." *Nature neuroscience* 4 (12): 1238-1243.
- Okuno**, H., K. Akashi, Y. Ishii, N. Yagishita-Kyo, K. Suzuki, M. Nonaka, T. Kawashima, et al. **2012**. "Inverse Synaptic Tagging of Inactive Synapses via Dynamic Interaction of Arc/Arg3. 1 with CaMKII beta." *Cell* 149 (4): 886-898.
- Panja**, D., G. Dagyte, M. Bidinosti, K. Wibrand, Å. M. Kristiansen, N. Sonenberg, and C. R. Bramham. **2009**. "Novel translational control in Arc-dependent long term potentiation consolidation in vivo." *Journal of Biological Chemistry* 284 (46): 31498-31511.
- Papouin**, T., L. Ladépêche, J. Ruel, S. Sacchi, M. Labasque, M. Hanini, L. Groc, L. Pollegioni, J. P. Mothet, and S. H. R. Oliet. **2012**. "Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors Are Gated by Different Endogenous Coagonists." *Cell* 150 (3): 633-646.
- Park**, Mikyoung, Esther C Penick, Jeffrey G Edwards, Julie A Kauer, and Michael D Ehlers. **2004**. "Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP." *Science* 305 (5692): 1972-1975.
- Park**, S., J. M. Park, S. Kim, J. A. Kim, J. D. Shepherd, C. L. Smith-Hicks, S. Chowdhury, et al. **2008**. "Elongation factor 2 and fragile X mental retardation protein control the dynamic translation of Arc/Arg3. 1 essential for mGluR-LTD." *Neuron* 59 (1): 70-83.
- Pastalkova**, Eva, Peter Serrano, Deana Pinkhasova, Emma Wallace, André Antonio Fenton, and Todd Charlton Sacktor. **2006**. "Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP." *Science* 313 (5790): 1141-1144.

- Perea**, Gertrudis, Marta Navarrete, and Alfonso Araque. **2009**. "Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information." *Trends in neurosciences* 32 (8): 421-431.
- Perin-Dureau**, Florent, Julie Rachline, Jacques Neyton, and Pierre Paoletti. **2002**. "Mapping the binding site of the neuroprotectant ifenprodil on NMDA receptors." *The Journal of neuroscience* 22 (14): 5955-5965.
- Pfaffl**, M. W. **2001**. "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic acids research* 29 (9): e45-e45.
- Pintchovski**, Sean A, Carol L Peebles, Hong Joo Kim, Eric Verdin, and Steven Finkbeiner. **2009**. "The serum response factor and a putative novel transcription factor regulate expression of the immediate-early gene Arc/Arg3.1 in neurons." *The Journal of Neuroscience* 29 (5): 1525-1537.
- Plath**, N., O. Ohana, B. Dammermann, M. L. Errington, D. Schmitz, C. Gross, X. Mao, et al. **2006**. "Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories." *Neuron* 52 (3): 437-444.
- Ramanan**, Narendrakumar, Ying Shen, Sarah Sarsfield, Thomas Lemberger, Günther Schütz, David J Linden, and David D Ginty. **2005**. "SRF mediates activity-induced gene expression and synaptic plasticity but not neuronal viability." *Nature neuroscience* 8 (6): 759-767.
- Rao**, Vikram R, Sean A Pintchovski, Jeannie Chin, Carol L Peebles, Siddhartha Mitra, and Steven Finkbeiner. **2006**. "AMPA receptors regulate transcription of the plasticity-related immediate-early gene Arc." *Nature neuroscience* 9 (7): 887-895.
- Rial Verde**, E. M., J. Lee-Osbourne, P. F. Worley, R. Malinow, and H. T. Cline. **2006**. "Increased Expression of the Immediate-Early Gene Arc/Arg3.1 Reduces AMPA Receptor-Mediated Synaptic Transmission." *Neuron* 52 (3): 461-474.
- Salter**, Michael W, and Lorraine V Kalia. **2004**. "Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation." *Nature Reviews Neuroscience* 5 (4): 317-328.
- Scoville**, William Beecher, and Brenda Milner. **1957**. "Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions." *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 20 (1): 11.
- Shehata**, Mohammad, Hiroyuki Matsumura, Reiko Okubo-Suzuki, Noriaki Ohkawa, and Kaoru Inokuchi. **2012**. "Neuronal stimulation induces autophagy in hippocampal neurons that is involved in AMPA receptor degradation after chemical long-term depression." *The Journal of Neuroscience* 32 (30): 10413-10422.
- Sheng**, Morgan, and Myung Jong Kim. **2002**. "Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms." *Science* 298 (5594): 776-780.
- Shepherd**, J. D., G. Rumbaugh, J. Wu, S. Chowdhury, N. Plath, D. Kuhl, R. L. Huganir, and P. F. Worley. **2006**. "Supplement - Arc/Arg3.1 mediates homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors." *Neuron* 52 (3): 475-484.
- Shepherd**, Jason D. **2012**. "Memory, Plasticity and Sleep-A role for calcium permeable AMPA receptors?" *Frontiers in Molecular Neuroscience* 5.
- Shi**, Song-Hai, Yasunori Hayashi, José A Esteban, and Roberto Malinow. **2001**. "Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons." *Cell* 105 (3): 331-343.

- Shi**, Song-Hai, Yasunori Hayashi, Ronald S Petralia, Shahid H Zaman, Robert J Wenthold, Karel Svoboda, and Roberto Malinow. **1999**. "Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation." *Science* 284 (5421): 1811-1816.
- Smith**, K. E., E. S. Gibson, and M. L. Dell'Acqua. **2006**. "cAMP-dependent protein kinase postsynaptic localization regulated by NMDA receptor activation through translocation of an A-kinase anchoring protein scaffold protein." *The Journal of neuroscience* 26 (9): 2391-2402.
- Snyder**, E. M., M. Colledge, R. A. Crozier, W. S. Chen, J. D. Scott, and M. F. Bear. **2005**. "Role for A kinase-anchoring proteins (AKAPS) in glutamate receptor trafficking and long term synaptic depression." *Journal of Biological Chemistry* 280 (17): 16962-16968.
- Song**, Insuk, and Richard L Huganir. **2002**. "Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity." *Trends in neurosciences* 25 (11): 578-588.
- Squire**, Larry R, and Stuart Zola-Morgan. **1991**. "The medial temporal lobe memory system." *Science* 253 (5026): 1380-1386.
- Stent**, Gunther S. **1973**. "A physiological mechanism for Hebb's postulate of learning." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70 (4): 997-1001.
- Steward**, O., and P. F. Worley. **2001**. "Selective Targeting of Newly Synthesized Arc mRNA to Active Synapses Requires NMDA Receptor Activation." *Neuron* 30 (1): 227-240.
- Steward**, Oswald, Christopher S Wallace, Gregory L Lyford, and Paul F Worley. **1998**. "Synaptic Activation Causes the mRNA for the IEG *Arc* to Localize Selectively near Activated Postsynaptic Sites on Dendrites." *Neuron* 21 (4): 741-751.
- Thomas**, G. M., and R. L. Huganir. **2004**. "MAPK cascade signalling and synaptic plasticity." *Nature Reviews Neuroscience* 5 (3): 173-183.
- Wallace**, Christopher S, Gregory L Lyford, Paul F Worley, and Oswald Steward. **1998**. "Differential intracellular sorting of immediate early gene mRNAs depends on signals in the mRNA sequence." *The Journal of neuroscience* 18 (1): 26-35.
- Waltereit**, R., B. Dammermann, P. Wulff, J. Scafidi, U. Staubli, G. Kauselmann, M. Bundman, and D. Kuhl. **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." *The Journal of Neuroscience* 21 (15): 5484-5493.
- Wang**, Chih-Chieh, Richard G Held, and Benjamin J Hall. **2013**. "SynGAP Regulates Protein Synthesis and Homeostatic Synaptic Plasticity in Developing Cortical Networks." *PloS one* 8 (12): e83941.
- Wang**, Chih-Chieh, Richard G Held, Shiao-Chi Chang, Lingling Yang, Eric Delpire, Anirvan Ghosh, and Benjamin J Hall. **2011**. "A critical role for GluN2B-containing NMDA receptors in cortical development and function." *Neuron* 72 (5): 789-805.
- Wang**, Y., F. Zheng, X. Zhou, Z. Sun, and H. Wang. **2009**. "Converging signal on ERK1/2 activity regulates group I mGluR-mediated *Arc* transcription." *Neuroscience letters* 460 (1): 36-40.

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

**Wenthold, Robert J, Ronald S Petralia, AS Niedzielski, and others. 1996.** "Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons." *The Journal of neuroscience* 16 (6): 1982-1989.

**Wenzel, Andreas, Jean Marc Fritschy, Hanns Mohler, and Dietmar Benke. 1997.** "NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins." *Journal of neurochemistry* 68 (2): 469-478.

**Whittington, Robert A, Alexis Bretteville, László Virág, Charles W Emala, Thomas O Maurin, Francois Marcouiller, Carl Julien, et al. 2013.** "Anesthesia-induced hypothermia mediates decreased ARC gene and protein expression through ERK/MAPK inactivation." *Scientific reports* 3.

**Williams, Joanna M, Diane Guévremont, Sara E Mason-Parker, Carthika Luxmanan, Warren P Tate, and Wickliffe C Abraham. 2007.** "Differential trafficking of AMPA and NMDA receptors during long-term potentiation in awake adult animals." *The Journal of neuroscience* 27 (51): 14171-14178.

**Williams, Keith. 1993.** "Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors." *Molecular pharmacology* 44 (4): 851-859.

**Xia, Zhengui, Henryk Dudek, Cindy K Miranti, and Michael E Greenberg. 1996.** "Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism." *The Journal of neuroscience* 16 (17): 5425-5436.

**Yilmaz-Rastoder, E., T. Miyamae, A. E. Braun, and E. Thiels. 2011.** "LTP-and LTD-inducing stimulations cause opposite changes in arc/arg3.1 mRNA level in hippocampal area CA1 in vivo." *Hippocampus* 21: 1290-1301.

**Ying, Shui-Wang, Marie Futter, Kobi Rosenblum, Mark J Webber, Stephen P Hunt, Timothy VP Bliss, and Clive R Bramham. 2002.** "Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis." *The Journal of neuroscience* 22 (5): 1532-1540.

**Zhang, S. J., M. N. Steijaert, D. Lau, G. Schütz, C. Delucinge-Vivier, P. Descombes, and H. Bading. 2007.** "Decoding NMDA receptor signaling: identification of genomic programs specifying neuronal survival and death." *Neuron* 53 (4): 549-562.

**Zheng, F., Y. Luo, and H. Wang. 2009.** "Regulation of BDNF-mediated transcription of immediate early gene Arc by intracellular calcium and calmodulin." *Journal of neuroscience research* 87 (2): 380.

## 5.2 Abkürzungsverzeichnis

+/+	Wildtyp (Tier, das zwei funktionelle Allele eines Gens trägt)
-/-	Knockout (Tier, das zwei funktionslose Allele eines Gens trägt)
3'UTR	3' nichttranslatierte Region
4AP	4-Aminopyridin
ActD	Actinomycin D
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazol-4-Propionsäure
AMPA-R	AMPA-Rezeptor
APS	Ammoniumpersulfat
Arc	<i>activity-regulated, cytoskeleton-associated protein</i> (= Arg3.1)
Arg3.1	<i>activity-regulated gene, 3,1 kb in length</i> (= Arc)
AS ODN	antisense Oligodeoxynukleotiden
BAPTA-AM	Membran-permeabler Calciumchelator
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
Bic	Bicucullin
BSA	Rinderserum Albumin
CA1-CA3 Region	Cornu ammonis Region 1-3 des Hippokampus
CHX	Cycloheximid
CP-AMPA-R	calcium-permeable AMPA-Rezeptoren
CRE	<i>cAMP response element</i>
CREB	<i>CRE binding protein</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHPG	Dihydroxyphenylglycine
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiotreitol
eEF2	eukaryontischer Elongationsfaktor 2
eEF2K	eEF2-Kinase
egr1	<i>early growth response 1</i> (= zif268)
EGTA	Calciumchelator
eIF4E	eukaryontischer Initiationsfaktor 4E
EPSC	<i>excitatory postsynaptic currents</i>
eEPSC	evozierte EPSCs
EK	Endkonzentration

ERK1/2	<i>extracellular signal regulated kinase 1/2</i>
fEPSP	<i>excitatory postsynaptic field potentials</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GluA1, 2, 3	AMPA-Rezeptor Untereinheit 1, 2, 3
GluN1, 2A, 2B	NMDA-Rezeptor-Untereinheit 1, 2A, 2B
h	Stunde(n)
HFS	<i>high frequency stimulation</i>
IEG	<i>immediate early gene</i>
kDa	Kilodalton
ko	Knockout
LTD	Langzeit-Depression
LTP	Langzeit-Potenzierung
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEK	MAP/ERK1/2-Kinase
mEPSC	<i>miniature excitatory postsynaptic currents</i>
min	Minute(n)
MG-132	Membran-permeabler Proteasomeninhibitor
MK-801	<i>open channel blocker</i> ; nicht-kompetitiver NMDAR-Antagonist
MKK	MAPK-Kinase
MKKK	MAPK-Kinase Kinase
MNK1	MAP-Kinase-interagierende Kinase 1
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NMD	<i>nonsense-mediated decay</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR	NMDA-Rezeptor
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , isoosmotischer und isotonischer Phosphatpuffer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD98059	MEK-Inhibitor
PSD-95	Postsynaptische Density Protein of 95 kDa
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSD	Postsynaptische Dichte
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase - PCR
SDS	Natrium Dodecylsulfat
SRF	<i>serum response factor</i>
TCF	<i>ternary complex factor</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
ü/N	über Nacht
UO126	MEK-Inhibitor
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
ZNS	Zentralnervensystem



### 5.3 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

---

Hamburg, den

---

Unterschrift

