

# **Dopaminerge Modulation kortexabhängiger Lernprozesse**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)**

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Diplom-Biologin Nicole Reichenbach  
geboren am 08.04.1980 in Bernburg

Gutachter:  
Prof. Dr. Eckart D. Gundelfinger  
Prof. Dr. med. Oliver Schmitt

eingereicht am: 18.12.2012  
verteidigt am: 11.06.2013

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Zuerst möchte ich mich bei Dr. Wolfgang Tischmeyer für seine Betreuung und sein stetes Interesse an meiner Arbeit, seine kontinuierliche Diskussionsbereitschaft und immer gewährte Unterstützung sehr herzlich bedanken.

Prof. Dr. Eckart Gundelfinger danke ich für die Möglichkeit, in der Abteilung Neurochemie meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen, sowie für seine stete Diskussionsbereitschaft und konstruktive Kritik.

Prof. Dr. Daniela Dieterich sei herzlich gedankt für die Kollaboration und den wissenschaftlichen Austausch mit ihrer Nlomics-Gruppe, für die konstante Diskussionsbereitschaft sowie ihr kontinuierliches Interesse an meiner Arbeit.

Bei Dr. Karl-Heinz Smalla bedanke ich mich für Einführung in die 2D-Gelelektrophorese und andere Methoden der Proteinbiochemie sowie für seine kontinuierliche Diskussionsbereitschaft, Unterstützung und stete Hilfsbereitschaft.

Dr. Thilo Kähne, Prof. Dr. Ka Wan Li und Yvonne Ducho danke ich für die Einführung in die massenspektrometrischen Methoden sowie für die massenspektrometrischen Untersuchungen meiner Proben.

Bei Dr. Werner Zuschratter und Oliver Kobler bedanke ich mich für die Einführung in die konfokale Mikroskopie und Analysesoftware IMARIS.

Dr. Horst Schicknick und Chris Theuerkauf gilt mein besonderer Dank für die Hilfe bei den tierexperimentellen Untersuchungen sowie der Genotypisierung von Mäusen.

Ulrike Herrmann möchte ich herzlich für ihre Mitarbeit an meinem Projekt danken.

Dr. Rainer Pielot danke ich für seine Hilfe bei der Datenanalyse mittels der Datenbank SynProt.

Kathrin Pohlmann und Kathrin Hartung danke ich für ihre methodische Unterstützung, ständige Hilfsbereitschaft sowie ihre Aufmunterungen in allen Phasen meiner Promotionsarbeit.

Meinen Kollegen Dr. Rashmi Ahuja, Elmer R. Antileo Ibarra, Dr. Elavarasi Dharmalingam, Dr. Akvile Häckel, Dr. Rodrigo A. Herrera Molina, Diana Hübler, Nora John, Anne-Christin Lehmann, Anke Müller und Dr. Roser Pinyol sei für die immerwährende Hilfsbereitschaft und vieles, vieles mehr gedankt.

Mein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern der Abteilung Neurochemie für die Unterstützung und das gute Arbeitsklima.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern für die immerwährende Unterstützung und ihren Glauben an mich danken.

## Summary

Prior studies on gerbils revealed protein synthesis dependent changes after pharmacological activation of dopamine receptors in the auditory cortex, facilitating long term memory formation in an auditory discrimination paradigm over several days. In the present work, protein patterns of different fractions of the auditory cortex, the frontal cortex, hippocampus and striatum were analyzed after local injection of different D1/D5 dopamine receptor selective agonists into the auditory cortex of gerbils in order to identify brain structures, proteins and signaling pathways potentially relevant for such processes. Proteomic differences in comparison to control-treated animals were detectable in all analyzed brain regions. After injection of the adenylyl cyclase and phospholipase C stimulating agonist SKF38393 into the auditory cortex, the most prominent proteomic changes appeared in the auditory cortex, hippocampus, and striatum, whereas least changes were detectable in the frontal cortex. In contrast, the selective phospholipase C stimulating agonist SKF83959 induced the strongest changes in the frontal cortex and less changes in the hippocampus. Primarily both agonists caused changes in cytoskeleton/ scaffolding proteins, proteins of energy metabolism, and nucleic acid binding proteins. Quantity and direction of the proteomic changes seemed to depend on the signaling pathway selectivities of the used agonists. Analyses of the dopaminergic regulation of one of the candidate proteins,  $\alpha$ -Synuclein, implied an increased expression as well as a reduced colocalization with the presynaptic cytomatrix protein Bassoon after SKF38393-treatment. Behavioral experiments with mutant mice pointed to the involvement of  $\alpha$ -Synuclein in mechanisms initiated during auditory discrimination learning via D1/D5 dopamine receptor activation that influence the acquisition rate during the first training days as well as the late memory performance differently via adenylyl cyclase and phospholipase C dependent signaling.

In summary, the present findings imply that dopaminergic activity in the auditory cortex might induce  $\alpha$ -Synuclein-modulated mechanisms of plasticity in cortical, hippocampal, and striatal brain structures that are implicated in different aspects of memory consolidation.

## Zusammenfassung

Frühere Befunde am Gerbil zeigten, dass die pharmakologische Aktivierung von Dopaminrezeptoren im auditorischen Kortex proteinsyntheseabhängige Veränderungen induziert, die die Langzeitgedächtnisbildung in einem auditorischen Diskriminierungsparadigma über mehrere Tage erleichtern. Zur Identifizierung von Hirnstrukturen, Proteinen und Signalwegen, die potentiell an solchen Prozessen beteiligt sind, wurden in der vorliegenden Arbeit am Tag nach lokaler Injektion von D1/D5-Dopaminrezeptoragonisten unterschiedlicher Signalweg-Selektivität in den Hörkortex von Gerbils Proteinmuster in verschiedenen Fraktionen des auditorischen Kortex, frontalen Kortex, Hippokampus und Striatum analysiert. Proteomunterschiede im Vergleich zu Kontrolltieren waren in allen untersuchten Hirnregionen nachweisbar. Nach Injektion des die Adenylatzyklase und Phospholipase C stimulierenden Agonisten SKF38393 in den Hörkortex waren die deutlichsten Proteomveränderungen im auditorischen Kortex, Hippokampus und Striatum, die geringsten im frontalen Kortex nachweisbar. Dagegen induzierte der selektiv die Phospholipase C stimulierende Agonist SKF83959 die stärksten Veränderungen im frontalen Kortex und wesentlich geringere im Hippokampus. Beide Agonisten führten in erster Linie zu Veränderungen bei Zytoskelett-/Gerüstproteinen, Proteinen des Energiestoffwechsels und nukleinsäurebindenden Proteinen. Quantität und Richtung der Proteomveränderungen in den untersuchten Hirnregionen schienen von der Signalwegselektivität des verwendeten Agonisten abzuhängen. Untersuchungen zur dopaminergen Regulation eines der Kandidatenproteine,  $\alpha$ -Synuclein, wiesen auf eine erhöhte Expression sowie eine verminderte Kollokalisierung relativ zum präsynaptischen Zytomatrixprotein Bassoon nach SKF38393-Behandlung hin. An mutanten Mäusen erhobene Verhaltensbefunde lassen vermuten, dass  $\alpha$ -Synuclein in Mechanismen involviert ist, die im Verlaufe auditorischen Diskriminierungslernens durch D1/D5-Dopaminrezeptor-Aktivierung angestoßen werden und über Adenylatzyklase- und Phospholipase C-abhängige Signalwege die Lernrate während der ersten Trainingstage sowie die spätere Gedächtnisleistung unterschiedlich beeinflussen können.

Zusammengenommen lassen die Befunde vermuten, dass dopaminerge Aktivität im Hörkortex unter Einbeziehung von  $\alpha$ -Synuclein zu plastischen Veränderungen in kortikalen, hippocampalen und striatalen Hirnstrukturen führen kann, die mit der Modulation unterschiedlicher Aspekte der Gedächtniskonsolidierung einhergehen.



2.2.2.3.1.3 SDS-PAGE zur Trennung in der ersten Dimension.....	21
2.2.2.3.2 Isoelektrische Fokussierung und SDS-PAGE zur Trennung in der zweiten Dimension.....	21
2.2.2.3.2.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF) .....	22
2.2.2.3.2.2 Äquilibration der IPG-Streifen.....	22
2.2.2.3.2.3 SDS- PAGE zur Trennung in der zweiten Dimension.....	23
2.2.2.4 Proteinfärbungen in Polyacrylamid-Gelen und auf Nitrozellulosemembranen .....	24
2.2.2.4.1 Coomassie Brilliantblau R-250 Färbung.....	24
2.2.2.4.2 Ponceau S-Färbung .....	24
2.2.2.4.3 Silberfärbung.....	24
2.2.2.4.4 Coomassie Brilliantblau G-250 Färbung.....	25
2.2.2.5 Datenevaluierung und Bildanalyse der 2D-Gele.....	26
2.2.2.6 Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie .....	27
2.2.2.6.1 Trypsinverdau.....	27
2.2.2.6.2 ZipTip-Reinigung.....	28
2.2.2.6.3 Massenspektrometrische Analyse .....	28
2.2.2.7 Immunblot-Analyse.....	28
2.2.3 Zellkultur.....	30
2.2.3.1 Präparation und Kultivierung primärer hippokampaler Neuronen.....	30
2.2.3.2 Behandlung primärer hippokampaler Neuronen mit SKF38393 .....	30
2.2.3.3 Immunzytochemie .....	31
2.2.4 Bildanalyse .....	32
2.2.4.1 Begrädigung der Dendriten mittels ImageJ.....	32
2.2.4.2 Dekonvolution mittels AutoQuant X2 .....	32
2.2.4.3 Lokalisationsanalyse mittels IMARIS 6.4.2 .....	33
2.2.5 Verhaltensexperimente.....	33
2.2.5.1 Lernparadigma.....	34
2.2.5.2 Lernapparatur .....	34
2.2.5.3 Lernexperiment .....	34
2.2.5.4 Intraperitoneale Injektionen .....	35
2.2.5.5 Genotypisierung .....	35
2.2.5.5.1 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	35

2.2.5.5.2	Agarose-Gelelektrophorese .....	36
2.2.6	Statistische Auswertung .....	37
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>38</b>
3.1	Dopaminerg vermittelte Proteomänderungen im Gerbilhirn.....	38
3.1.1	Proteintrennung und -quantifizierung .....	39
3.1.2	Massenspektrometrische Identifizierung von Proteinen .....	41
3.1.3	Rohdaten.....	43
3.1.4	Vergleichende Analyse der Proteomdaten .....	43
3.1.4.1	Anzahl regulierter Spots – regionale Unterschiede.....	43
3.1.4.2	Proteine in regulierten Spots – regionale und molekulare Unterschiede .....	44
3.1.4.2.1	Proteinanzahl.....	46
3.1.4.2.2	Anzahl von Proteinen, die in mehreren Spots identifiziert wurden .....	48
3.1.4.2.3	Funktionelle Klassifizierung identifizierter Proteine .....	50
3.1.4.2.4	Verifikation der Regulation ausgewählter Proteine mittels Immunblot...	60
3.2	$\alpha$ -Synuclein: Dopaminerge Regulation und FM-Diskriminierungslernen .....	62
3.2.1	Dopaminerge Regulation der Abundanz von $\alpha$ -Synuclein <i>in vivo</i> .....	63
3.2.2	Dopaminerge Regulation der Lokalisation von $\alpha$ -Synuclein <i>in vitro</i> .....	64
3.2.3	FM-Diskriminierungslernen $\alpha$ -Synuclein-defizienter Mäuse .....	70
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>76</b>
4.1	Dopaminerg vermittelte Proteomänderungen im Gerbilhirn.....	76
4.1.1	Regionale Unterschiede der Proteomänderungen .....	78
4.1.2	Molekulare Unterschiede der Proteomänderungen .....	82
4.2	$\alpha$ -Synuclein: Dopaminerge Regulation und FM-Diskriminierungslernen.....	87
4.2.1	Dopaminerge Regulation der Abundanz von $\alpha$ -Synuclein <i>in vivo</i> .....	87
4.2.2	Dopaminerge Regulation der Lokalisation von $\alpha$ -Synuclein <i>in vitro</i> .....	88
4.2.3	FM-Diskriminierungslernen $\alpha$ -Synuclein-defizienter Mäuse .....	89
4.3	Ausblick .....	91
<b>5.</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>93</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>107</b>
6.1	Abkürzungsverzeichnis .....	107
6.2	Identifizierte Proteine, die 24 h nach lokaler Injektion von SKF38393- bzw. SKF83959 in den Gerbil-Hörkortex in regulierten Spots der untersuchten Hirnregionen und Proteinfractionen identifiziert wurden .....	108

6.3 Coomassie-Gele zur Angleichung einzusetzender Proteinmengen für die Immunblot-Analyse.....	109
6.4 Ermittelte Gruppenmittelwerte für die Anzahl der CR+, CR-, ITC und Fluchtreaktionen pro Trainingssitzung für Abschnitt 3.2.3 .....	111

**LEBENS LAUF**

**PUBLIKATIONEN**

**ERKLÄRUNG**

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>Abb. 1.1:</b> Schematische Darstellung der Synapse .....	2
<b>Abb. 1.2:</b> D1-Klasse Dopaminrezeptor Signalwege via Gαq/11- und Gas-Proteinaktivierung .....	6
<b>Abb. 1.3:</b> Strukturformeln ausgewählter D1/D5-Dopaminrezeptoragonisten und –antagonisten .....	7
<b>Abb. 1.4:</b> Lernkinetik der Unterscheidung der Richtung linear-frequenzmodulierter Töne in einer Shuttle-Box unter Einfluss der Dopaminagonisten SKF38393 (A) bzw. SKF8395 (B) nach Injektion in den Hörkortex von Gerbils im Vergleich zu Vehikel-behandelten Kontrollen .....	12
<b>Abb. 2.1:</b> Dissektion des Gerbilhirns für Proteom-analytische Untersuchungen in „auditorischer Kortex“ (AC), „frontaler Kortex“ (FC), „Hippokampus“ (HC) und „Striatum“ (ST) .....	16
<b>Abb. 3.1:</b> Ablaufschema zur Gewinnung von Peptiden für die massenspektrometrische Analyse. ....	38
<b>Abb. 3.2:</b> Silbergefärbte 2D-Gele mit Proteinen der TP-Fraktion des Hippokampus 24 h nach Injektion von SKF38393 (A) oder Vehikel (B) in den Hörkortex von Gerbils .....	40
<b>Abb. 3.3:</b> Beispiel für die 2D-Gel-Analyse .....	41
<b>Abb. 3.4:</b> Beispiel für die massenspektrometrische Identifizierung eines Proteins .....	42
<b>Abb. 3.5:</b> Anzahl der nach Injektion von SKF38393 (A) oder SKF83959 (B) in den Hörkortex von Gerbils in regulierten Spots ( $p \leq 0,1$ ) der untersuchten Hirnregionen und Proteinfractionen identifizierten Proteine .....	48
<b>Abb. 3.6:</b> Anzahl der nach Injektion von SKF38393 (A) oder SKF83959 (B) in den Hörkortex von Gerbils in zwei oder mehreren regulierten Spots ( $p \leq 0,1$ ) pro untersuchter Hirnregion und Proteinfraction identifizierten Proteine.. ....	50
<b>Abb. 3.7:</b> Gesamtzahl der Proteine innerhalb der einzelnen Kategorien 1-11 nach SKF38393- bzw. SKF83959-Gabe in den Hörkortex von Gerbils in den regulierten Spots aller Hirnregionen und Proteinfractionen .....	51
<b>Abb. 3.8:</b> Anzahl der Proteine verschiedener funktioneller Kategorien, die 24 h nach Injektion von SKF38393 oder SKF83959 in den Hörkortex von Gerbils in regulierten Spots ( $p \leq 0,1$ ) der untersuchten Proteinfractionen im AC (A), FC (B), HC (C) und ST (D) identifiziert wurden .....	52
<b>Abb. 3.9:</b> Immunblot-Analyse ausgewählter Proteine 24 h nach Injektion von SKF38393 oder Vehikel (NaCl) in den AC von Gerbils.....	62
<b>Abb. 3.10:</b> Identifizierung von $\alpha$ -Synuclein in der TP-Fraktion des AC 24 h nach Injektion von SKF38393 oder Vehikel (NaCl) in den AC von Gerbils.....	63
<b>Abb. 3.11:</b> Immunzytochemischer Nachweis der Lokalisation von $\alpha$ -Synuclein in kultivierten hippokampalen Primärneuronen verschiedener Entwicklungsstadien .....	65
<b>Abb. 3.12:</b> Immunzytochemischer Nachweis von Bassoon, $\alpha$ -Synuclein und D1-Rezeptoren in hippokampalen Primärneuronen (DIV21). ....	66
<b>Abb. 3.13:</b> Konfokale Lokalisationsanalyse von Bassoon- und $\alpha$ -Synuclein-Immunfluoreszenz in hippokampalen Primärneuronen unter Kontrollbedingungen und nach SKF38393-Behandlung ....	68

<b>Abb. 3.14:</b> Quantitative Analyse der Kolo-kalisation von $\alpha$ -Synuclein- und Bassoon-Immunfluoreszenz in hippokampalen Neuronen nach 3 h Inkubation unter Kontrollbedingungen oder in 100 $\mu$ M SKF38393. ....	69
<b>Abb. 3.15:</b> Genotypisierung der verwendeten C57BL/6J-Maus-Substämme .....	71
<b>Abb. 3.16:</b> Vergleich der FM-Diskriminierungsleistung D von Mäusen der Substämme C57BL/6JCrI (Wildtyp), C57BL/6JRccHsd (Wildtyp), und C57BL/6J0laHsd ( $\alpha$ -Synuclein-defizient) über alle Behandlungsgruppen und Trainingstage .....	72
<b>Abb. 3.17:</b> Initiale Lernrate und asymptotische Gedächtnisleistung $\alpha$ -Synuclein-defizienter ( <i>snca</i> <sup>-/-</sup> ) und nicht-defizienter ( <i>snca</i> <sup>+/+</sup> ) Mäuse im FM-Diskriminierungsparadigma und deren Modulierbarkeit durch D1/D5-Dopaminrezeptor-selektive Pharmaka .....	74
<b>Abb. 4.1:</b> Schematische Zusammenfassung der dopaminerg vermittelten regionalen Unterschiede der Proteomänderungen in den betrachteten Hirnregionen in Bezug auf das FM-Diskriminierungslernen nach SKF38393- bzw. SKF83959-Injektion in den Hörkortex von Gerbils. ....	81
<b>Abb. 6.1:</b> Coomassie-Gele des AC zur Angleichung der einzusetzenden Proteinmengen für die Immunblot-Analyse 24 h nach Injektion von SKF38393 oder Vehikel (NaCl) in den AC von Gerbils .....	109
<b>Abb. 6.2:</b> Coomassie-Gele des HC zur Angleichung der einzusetzenden Proteinmengen für die Immunblot-Analyse 24 h nach Injektion von SKF38393 oder Vehikel (NaCl) in den AC von Gerbils .....	110
<b>Tab. 2.1:</b> Verwendete Antikörper .....	14
<b>Tab. 2.2:</b> Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel .....	21
<b>Tab. 2.3:</b> Spannungsstufen ( <i>step-n-hold</i> ) der isoelektrischen Fokussierung .....	22
<b>Tab. 2.4:</b> Eigenschaften der zu dekonvolvierenden Datensätze .....	33
<b>Tab. 2.5:</b> Einstellungen für die 3D-Dekonvolution .....	33
<b>Tab. 2.6:</b> Primerssequenzen für die Genotypisierung von $\alpha$ -Synuclein-defizienten Mäusen .....	36
<b>Tab. 2.7:</b> PCR-Programm für die Genotypisierung von $\alpha$ -Synuclein-defizienten Mäusen .....	36
<b>Tab. 3.1:</b> Anzahl der nach initialer PDQest-Analyse pro Hirnregion und Proteinfraction ermittelten Spots und der darin massenspektrometrisch identifizierten Proteine 24 h nach Injektion von SKF38393 bzw. SKF83959 in den Hörkortex von Gerbils .....	43
<b>Tab. 3.2:</b> Anzahl der nach verifizierendem <i>U</i> -Test pro Hirnregion ermittelten Spots 24 h nach Injektion von SKF38393 bzw. SKF83959 in den Hörkortex von Gerbils .....	44
<b>Tab. 3.3:</b> Anzahl der pro Hirnregion und Proteinfraction für weitere Auswertungen berücksichtigte Spots und Proteine 24 h nach Injektion von SKF38393 bzw. SKF83959 in den Hörkortex von Gerbils .....	46
<b>Tab. 3.4:</b> Übersicht über Proteine, die 24 h nach lokaler Injektion von SKF38393 bzw. SKF83959 in den Gerbil-Hölkortex in regulierten Spots der untersuchten Hirnregionen und Proteinfractionen identifiziert wurden .....	55
<b>Tab. 6.1:</b> Proteine, die 24 h nach lokaler Injektion von SKF38393 bzw. SKF83959 in den Gerbil-Hölkortex in regulierten Spots der untersuchten Hirnregionen und Proteinfractionen identifiziert wurden .....	108

---

<b>Tab. 6.2:</b> Data recorded during FM discrimination training of $snca^{+/+}$ (n=10) and $snca^{-/-}$ (n=7) control mice ...	111
<b>Tab. 6.3:</b> Data recorded during FM discrimination training of SCH23390-treated $snca^{+/+}$ (n=12) and $snca^{-/-}$ (n=11) mice .....	112
<b>Tab. 6.4:</b> Data recorded during FM discrimination training of SKF38393-treated $snca^{+/+}$ (n=15) and $snca^{-/-}$ (n=8) mice .....	113
<b>Tab. 6.5:</b> Data recorded during FM discrimination training of SKF83822-treated $snca^{+/+}$ (n=13) and $snca^{-/-}$ (n=7) mice .....	114
<b>Tab. 6.6:</b> Data recorded during FM discrimination training of SKF83959-treated $snca^{+/+}$ (n=6) and $snca^{-/-}$ (n=3) mice .....	115
<b>Tab. 6.7:</b> Data recorded during FM discrimination training of (SKF83822+SKF83959)-treated $snca^{+/+}$ (n=6) and $snca^{-/-}$ (n=4) mice .....	116

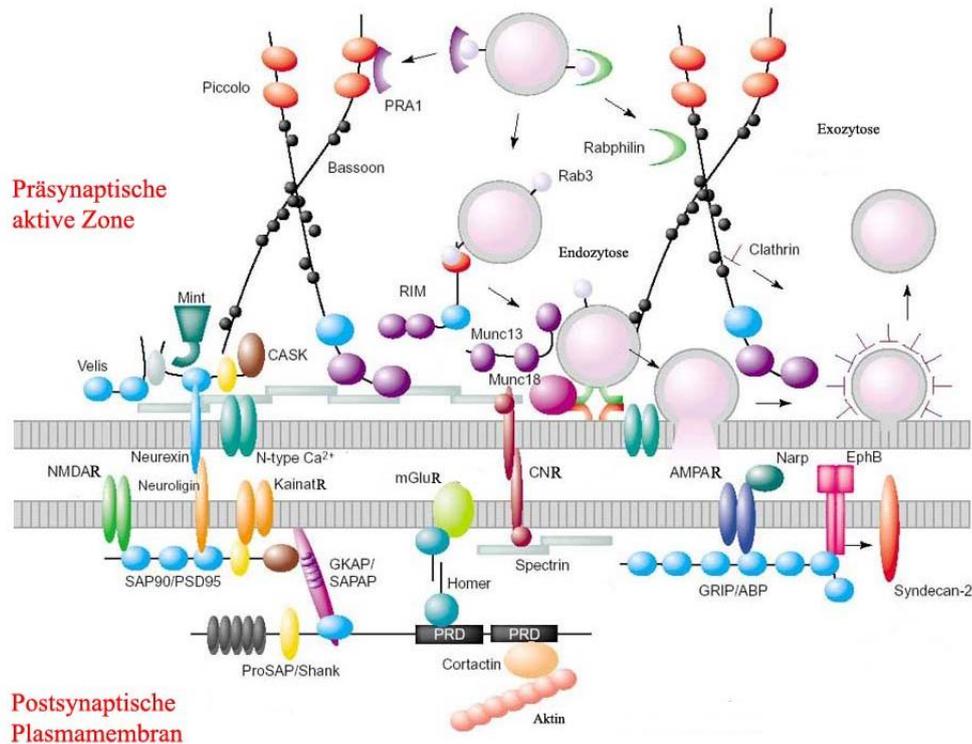
# 1. Einleitung

Das Säugerhirn verarbeitet hochdifferenziert Sinneseindrücke und ermöglicht eine Vielzahl kognitiver, sensorischer und motorischer Leistungen. Die zellulären Hauptbestandteile des Gehirns stellen Neuronen und Gliazellen dar, wobei Erstere als funktionelle Grundeinheit des Gehirns betrachtet werden und ein komplexes Kommunikationsnetzwerk bilden. Die Kommunikation zwischen den Neuronen findet an hochspezialisierten Zell-Zell-Kontaktstellen, den Synapsen, statt. Die Signalübertragung zwischen den Synapsen kann auf elektrischem oder chemischem Weg erfolgen. Chemische Synapsen nehmen eine Schlüsselstellung für Prozesse der Informationsübertragung und -speicherung in neuronalen Netzwerken ein (Raine, 2006).

## 1.1 Die Synapse

Diese im Elektronenmikroskop (EM) elektronendicht erscheinende, asymmetrisch organisierte Struktur setzt sich aus der Präsynapse eines Signal sendenden Neurons, der präsynaptischen aktiven Zone, und der Postsynapse eines Empfängerneurons zusammen. Prä- und Postsynapse beinhalten verschiedene multi-molekulare Proteinkomplexe. Präsynaptisch konnten drei unterschiedliche Komplexe identifiziert werden. Der erste Komplex beinhaltet die Zytomatrix der aktiven Zone (CAZ) und enthält Zelladhäsionsmoleküle sowie zytoskelettale und Gerüstproteine, wie Bassoon und Piccolo/Aczonin. Der zweite Proteinkomplex ist am synaptischen Andocken der Vesikel und der Vesikelfusion beteiligt. Dieser Komplex enthält SNARE (*soluble NSF attachment protein receptor*)-Komplex-Komponenten (z.B. Syntaxin, SNAP25 (*synaptosomal-associated protein 25*), RIM (*Rab3A interacting molecules*), Munc13 (*mammalian homolog of Unc-13*), Kalziumkanäle). Zum dritten Komplex zählen Proteine, die in Prozesse der synaptischen Vesikelexo- und endozytose involviert sind. Zu diesem gehören Dynamin, Clathrin und Proteine mit SH<sub>3</sub> (*Src homology 3 domain*)-Domänen (Garner, 2002; Schoch & Gundelfinger, 2006; Südhof & Rizo, 2011; Gundelfinger & Fejtova, 2012). Die PSD (postsynaptische Dichte) enthält essentielle Proteinkomponenten der postsynaptischen Membran und des darunterliegenden Zytoskeletts. Sie stellt ein dichtes Netzwerk zahlreicher Proteine dar und verknüpft Neurotransmitterrezeptoren, Zelladhäsionsmoleküle und Signaltransduktionskomponenten mit dem Zytoskelett (Ziff, 1997; Gundelfinger & tom Dieck, 2000; Boeckers, 2006; Sheng & Hogenraad, 2007). Prä- und postsynaptische Zytomatrizes haben sehr ähnliche physiko-chemische Eigenschaften, sodass sie oft in einer gemeinsamen Fraktion vorliegen können.

Abbildung 1.1 gibt einen Einblick in die molekulare Struktur der PSD und der präsynaptischen aktiven Zone.



**Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Synapse.** Das Schema zeigt ionotrope (AMPA, NMDAR, KainatR) und metabotrope Glutamaterezeptoren (mGluR), die in der PSD über Gerüstproteine wie Shank/ProSAP, SAP90/PSD-95, SAP97 und Homer verankert und positioniert sind. Diese Proteine bilden die Basis für Verbindungen zum subsynaptischen Zytoskelett. Zelladhäsionsmoleküle wie Neuroigin sind zur Stabilisierung der Zell-Zell-Kontakte an SAP90/PSD-95 gebunden. Interaktionen sind als Überlappungen dargestellt (modifiziert nach Garner, 2002).

Die Signalübertragung kann mittels chemischer Botenstoffe erfolgen – den Neurotransmittern. Diese können in der Präsynapse gebildet, dort in synaptischen Vesikeln gespeichert und in den synaptischen Spalt ausgeschüttet werden, um dann über spezifische Rezeptoren an der postsynaptischen Zelle ein Signal zu übermitteln (Abb.1.1). Neurotransmitter können exzitatorische (erregende) oder inhibitorische (hemmende) Wirkungen auslösen oder modulieren. Dementsprechend wird zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen differenziert. Inhibitorische Synapsen im zentralen Nervensystem (ZNS) erscheinen im EM prä- und postsynaptisch gleich dick, weshalb sie auch als symmetrisch bezeichnet werden. Sie verwenden Transmitter wie Glyzin und  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA). Exzitatorische Synapsen nutzen überwiegend Glutamat als Transmitter, was zur Depolarisation der nachgeschalteten Zelle führen kann. Glutamaterge Synapsen sind durch eine unterschiedlich dicke Prä- und Postsynapse im EM gekennzeichnet, daher werden sie als asymmetrisch beschrieben. Oft umgibt die Postsynapse das

präsynaptische Endknöpfchen. Man spricht von einem dendritischen Dorn (*Spine*). Proteine mit PDZ (*PSD95/ Discs large/ Zonula occludentes-1*)-Domänen bilden spezifische dynamische Proteingerüste zur räumlich-zeitlichen Organisation der Anordnung ionotroper und metabotroper Glutamatrezeptoren (Garner, 2002). Ionotrope Glutamatrezeptoren sind ligandengesteuerte Kationenkanäle, deren Öffnung durch die Glutamatbindung an den Rezeptor verstärkt wird. Entsprechend ihrer unterschiedlichen Affinität für Glutamat werden sie in  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure-Rezeptoren (AMPArs), Kainat- und N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDARs) klassifiziert (Asztély & Gustafsson, 1996; Kim & Huganir, 1999). AMPARs sind im ZNS weit verbreitet und vermitteln eine schnelle synaptische, glutamaterge Transmission. Kainat-Rezeptoren sind hetero- oder homotetramere Ionenkanäle. Beide Rezeptortypen desensitivieren innerhalb von Millisekunden. NMDARs sind ebenfalls heteromer. Die Öffnung des Ionenkanals setzt die gleichzeitige Bindung von Glutamat und Glyzin oder Glyzinanaloga wie z.B. D-Serin sowie eine vorrangegangene Depolarisation der postsynaptischen Membran voraus. Nach Aktivierung strömen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ein und erhöhen die intrazelluläre Kalziumkonzentration. Die Ionen induzieren zahlreiche Signalkaskaden. Metabotrope Glutamatrezeptoren aktivieren über trimere G-Proteine intrazelluläre Enzyme, die verschiedene Signalwege einschalten. (Kleckner & Dingledine, 1988; Kim & Huganir, 1999; Hassel & Dingledine, 2006). Die Rezeptoren sind untereinander und mit den Aktin-angereicherten dendritischen *Spines* durch Adapterproteine (MAGUKs (*membrane-associated guanylate kinase*), GKAP/SAPAPs (*guanylate-kinase-associated protein/SAP-associated protein*), ProSAP/Shanks (*proline-rich synapse-associated protein/Shanks*)) verbunden (Garner *et al.*, 2002). Weiterhin sind Kinasen, Phosphatasen sowie andere Proteine der Signaltransduktion in der PSD vorhanden. Sie bilden die molekulare Grundlage für die Regulation von Veränderungen der Synapse als Antwort auf interne oder externe Stimuli.

Die Synapse kann durch diese Aktivierung bzw. Hemmung funktionelle und strukturelle Veränderungen erfahren. Diese können durch Regulation der Genexpression auf Ebene der Transkription, Translation und posttranslationaler Prozesse gesteuert werden. Solche Phänomene synaptischer Plastizität, wie die langandauernde Verstärkung (Langzeitpotenzierung) bzw. Abschwächung (Langzeitdepression) der synaptischen Übertragung werden als eine Grundlage für Lern- und Gedächtnisprozesse angesehen (Bear & Malenka, 1994; Kim & Huganir, 1999).

## 1.2 Der Neurotransmitter Dopamin

Dopamin ist ein biogenes Amin und bildet mit Norepinephrin und Epinephrin die Gruppe der Katecholamine. Seit der Entdeckung der physiologischen Funktionen von 3-Hydroxytyramin (Dopamin) vor über 50 Jahren (Carlsson et al., 1957) erweckt dieser Neurotransmitter großes Interesse. Im Säugerhirn wurden vier dopaminerge Signalwege nachgewiesen: das nigrostriatale, mesolimbische, mesokortikale und tuberoinfundibulare System, welche von den A9- (nigrostriatal), A10- (mesolimbisch und mesokortikal) und A8- (tuberoinfundibular) dopaminergen Zellgruppen entspringen (Anden *et al.*, 1964; Dahlstroem & Fuxe, 1964; Beaulieu & Gainetdinov, 2011). Diese Neuronen sind an zahlreichen Funktionen des ZNS beteiligt wie z.B. Steuerung von Bewegung, Schlaf, Aufmerksamkeit, Lernen und Gedächtnis. Dopamin spielt außerdem eine wichtige Rolle in der Hormonregulation, Olfaktionsregulation und retinalen Prozessen, bei kardiovaskulären Funktionen, im Immunsystem und renalen Funktionen (Snyder *et al.*, 1970; Missale *et al.*, 1998; Sibley, 1999; Carlsson, 2001; Iversen & Iversen, 2007; Beaulieu & Gainetdinov, 2011).

### 1.2.1 Dopaminrezeptoren

Dopamin wird exozytotisch aus der Präsynapse in den synaptischen Spalt abgegeben, interagiert mit den Dopaminrezeptoren oder wird durch Dopamintransporter wieder in die präsynaptische Endigung aufgenommen. Es kann jedoch auch von der Synapse weg diffundieren und extrasynaptische Rezeptoren aktivieren. Man spricht von einer „*volume transmission*“ (Smiley *et al.*, 1994; Kuhar *et al.*, 2006; Rice & Cragg, 2008).

Nach der Ausschüttung aus der Präsynapse aktiviert Dopamin eine Familie von G-Proteingekoppelten Rezeptoren, die in zwei Klassen untergliedert werden: die D1- und D2-Klasse Rezeptoren. Zu den D1-Klasse Rezeptoren zählen die D1- und D5-Rezeptoren (Tiberi *et al.*, 1991) und zu den D2-Klasse Rezeptoren gehören die D2-, D3- und D4-Rezeptoren (Andersen *et al.*, 1990; Niznik & Van Tol, 1992; Civelli *et al.*, 1993; Vallone *et al.*, 2000).

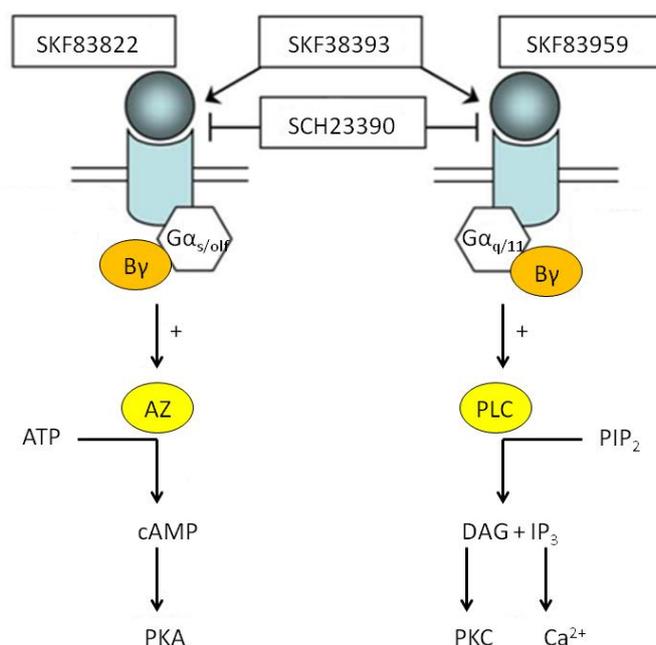
Die D1-Dopaminrezeptoren werden abundant in striatalen, limbischen und kortikalen Regionen (z.B. im *Caudate-Putamen* (Striatum (ST)), *Nucleus accumbens*, *Substantia nigra*, *Bulbus olfactorius*, Amygdala sowie frontalem Kortex (FC) und im geringen Umfang auch im Hippokampus (HC), Zerebellum, thalamischen und hypothalamischen Regionen exprimiert. Die Expression von D5-Rezeptoren ist schwächer. Sie kommen z.B. in pyramidalen Neuronen des präfrontalen Kortex, des Prämotorikortex, des zingulären Kortex, des entorhinalen Kortex, der *Substantia nigra*, des Hypothalamus, des HC und des *Gyrus dentatus* und im geringen

Maße im *Nucleus caudatus* und *Nucleus accumbens* vor (Missale *et al.*, 1998; Sokoloff *et al.*, 2006; Beaulieu & Gainetdinov, 2011).

D2-Dopaminrezeptoren werden u.a. zahlreich im Striatum, in der *Substantia nigra*, Hypothalamus, kortikalen Regionen, im Septum, in der Amygdala und im HC (Missale *et al.*, 1998) gefunden. Die Expression von D3-Dopaminrezeptoren auf die limbische Region, den olfaktorischen Tuberkel und die Calleja-Inseln begrenzt. D4-Dopaminrezeptoren werden u.a. im FC, Amygdala, HC, Hypothalamus, *Substantia nigra pars reticulata* und Thalamus exprimiert (Missale *et al.*, 1998; Beaulieu & Gainetdinov, 2011).

Dopaminrezeptoren gehören zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Sie besitzen sieben Transmembrandomänen und können heterotrimere G-Proteine mit dem Ziel der Regulation intrazellulärer Signalwege aktivieren (Gingrich & Caron, 1993; Missale *et al.*, 1998). Zahlreiche G-Protein-Subtypen bilden die Grundlage für eine hohe Versatilität der Signalübertragung (Pierce *et al.*, 2002). D1-Klasse Rezeptoren können einerseits über  $G_{\alpha_s/olf}$  (Sokoloff *et al.*, 2006; Rondou *et al.*, 2010) und Adenylatzyklase (AZ) die Bildung des sekundären Botenstoffs cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) stimulieren und somit die Proteinkinase A (PKA) aktivieren. PKA-vermittelte Proteinphosphorylierung kann zur Aktivitätsänderung von Substratproteinen führen, was im Falle von Transkriptionsfaktoren wie CREB (*cAMP response element-binding protein*) Änderungen auf der Ebene der Genexpressionsregulation nach sich ziehen kann (Kebabian & Greengard, 1971; Enjalbert & Bockaert, 1983; Missale *et al.*, 1998).

Eine andere Möglichkeit der Signalübertragung durch D1-Klasse Rezeptoren geht über den  $G_{\alpha_{q/11}}$ -gekoppelten Weg, in dem die Phospholipase C (PLC) aktiviert wird. Diese hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) zu Diazylglyzerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ). DAG ist ein Aktivator der Proteinkinase C (PKC).  $IP_3$  kann an Rezeptoren des glatten Endoplasmatischen Retikulum (ER) binden, was zu einem Austritt von Kalziumionen ( $Ca^{2+}$ ) aus dem ER in das Zytoplasma führt.  $Ca^{2+}$  agiert als sekundärer Botenstoff und reguliert weitere intrazelluläre Proteine. (Felder *et al.*, 1989; Friedman *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2004; Sahu *et al.*, 2009). In Abbildung 1.2 werden beide Möglichkeiten der Regulation von D1- Klasse Rezeptoren schematisch dargestellt.



**Abb. 1.2: D1-Klasse Dopaminrezeptor Signalwege via  $G\alpha_{q/11}$ - und  $G\alpha_{s/olf}$ -Proteinaktivierung.**

Die in dieser Arbeit verwendeten D1-Klasse Dopaminrezeptoragonisten und -antagonisten sind entsprechend ihrer stimulierenden bzw. inhibierenden Wirkung auf AZ- bzw. PLC-gekoppelte D1-Klasse Dopaminrezeptoren ebenfalls angegeben. Abkürzungen: ATP, Adenosintri-phosphat; AZ, Adenylatzyklase; cAMP, zyklisches Adenosinmonophosphat; DAG, Diacylglycerol; IP<sub>3</sub>, Inositol-1,4,5-phosphat; PLC, Phospholipase C; PIP<sub>2</sub>, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PKA, Proteinkinase A; PKC, Proteinkinase C.

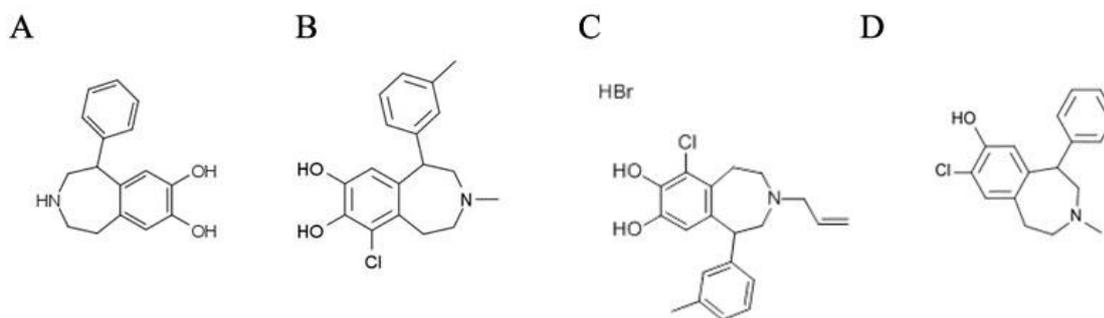
Im Gegensatz zu D1-Klasse Rezeptoren sind D2-Klasse Rezeptoren an  $G\alpha_{i_o}$  gekoppelt und hemmen die Produktion von cAMP, was zu einer Abnahme der PKA-Aktivität führt (Kebabian & Greengard, 1971; Kebabian & Calne, 1979; Enjalbert & Bockaert, 1983; Missale *et al.*, 1998). D2-Klasse Rezeptoren werden postsynaptisch in Dopaminzielzellen und präsynaptisch in dopaminergen Neuronen exprimiert (Sokoloff *et al.*, 2006; Rondou *et al.*, 2010). D1-Klasse Rezeptoren haben im Gegensatz zu den D2-Klasse Rezeptoren eine hohe Affinität für Benzazepine, die im Folgenden vorgestellt werden.

### 1.2.2 D1/D5-Dopaminrezeptor-selektive Agonisten und Antagonisten

Die gezielte Untersuchung der Dopaminrezeptoren mit selektiven Agonisten und Antagonisten eröffnete die Möglichkeit, dopaminerge Transmission und dopaminabhängige Funktionen durch Verstärken oder Inhibieren des Dopamineffektes zu beeinflussen. Es wurden zahlreiche pharmakologisch aktive Substanzen entwickelt, die Dopaminrezeptoren auf der Ebene der Ligandenbindung beeinflussen können (Beaulieu & Gainetdinov, 2011).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Agonisten sind synthetisch hergestellte Benzazepine. SKF38393 ((±)-1-Phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-(1H)-3-benzazepin-7,8-diol Hydrochlorid), SKF83959 (6-Chloro-7,8-dihydroxy-3-methyl-1-(3-methylphenyl)-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepin Hydrobromid) und SKF83822 (6-Chloro-2,3,4,5-tetrahydro-1-(3-methylphenyl)-3-(2-propenyl)-1H-3-benzazepin-7,8-diol Hydrobromid) stellen Agonisten mit hoher Selektivität für D1-Klasse Rezeptoren (also D1- und D5-Rezeptoren) dar (Zhang *et al.*,

2009). SKF38393 stimuliert sowohl AZ- als auch PLC-gekoppelte Rezeptoren (Undie *et al.*, 1994). SKF83959 aktiviert Rezeptoren, die über das  $G\alpha_{q11}$ -Protein selektiv die PLC stimulieren, während es die dopaminvermittelte Aktivierung der AZ vermindern kann (Panchalingam & Undie, 2001; Jin *et al.*, 2003). SKF83822 stimuliert selektiv AZ-gekoppelte, nicht aber  $PIP_2$ -Hydrolyse-gekoppelte Rezeptoren (Undie *et al.*, 1994; O'Sullivan *et al.*, 2004). SCH23390 (R(+)-7-Chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepin Hydrochlorid) ist ein starker und selektiver D1-Klasse Rezeptorantagonist (Briggs *et al.*, 1991; Millan *et al.*, 2001; Bourne, 2001). Die in dieser Arbeit verwendeten D1/D5-Dopaminrezeptoragonisten und -antagonisten sind in Abbildung 1.2 entsprechend ihrer stimulierenden bzw. inhibierenden Wirkung auf AZ- und PLC-gekoppelte Rezeptoren dargestellt. Abbildung 1.3 zeigt die Strukturformeln dieser D1/D5-Dopaminrezeptoragonisten und -antagonisten.



**Abb. 1.3: Strukturformeln ausgewählter D1/D5-Dopaminrezeptoragonisten und -antagonisten.**  
 (A) SKF38393 (Agonist) (B) SKF83959 (Agonist) (C) SKF83822 (Agonist) (D) SCH23390 (Antagonist).

### 1.3 Gedächtnisbildung und synaptische Plastizität

Um sich auf dauernd wechselnde Umweltbedingungen neu einstellen zu können, muss neues Wissen erworben werden (Lernen) und dieses Wissen muss wiederabrufbar gespeichert werden (Gedächtnisbildung). Der Prozess der Gedächtnisbildung beinhaltet verschiedene, zeitlich getrennte Phasen (Abel & Lattal, 2001). Zunächst werden Informationen aus der Umwelt über die Sinnesorgane aufgenommen. Es erfolgt eine Auswahl der zu speicherenden Informationen und eine Verschlüsselung in abrufbare Informationen während des Lernens (Akquisition) einer Aufgabe. Es schließt sich die Speicherung und Festigung der Informationen (Konsolidierung) an. Die Gedächtnisleistung definiert sich als Behalten (Retention) und Wiederabrufbarkeit der gespeicherten Informationen. Bei der Wiederaanwendung gespeicherter Informationen spricht man von Abrufung (Dudai, 2004). Um

adaptive Veränderungen des Gedächtnisinhaltes zu ermöglichen, kann bereits gefestigtes Gedächtnis durch Abrufung wieder in eine labile Phase treten und muss dann nochmals gefestigt werden (Rekonsolidierung).

Im Wesentlichen werden zwei Gedächtnisformen unterschieden: das explizite (deklarative) und das implizite (nicht-deklarative) Gedächtnis (Thompson & Kim, 1996; Sutherland *et al.*, 2010). Das bewusste Abrufen von Fakten (semantisches Gedächtnis) und Ereignissen (episodisches Gedächtnis) kennzeichnet das explizite Gedächtnis (Squire & Knowlton, 1999; Thompson & Kim, 1996), während das Abrufen von motorischen, sensorischen oder anderen Fähigkeiten als implizites Gedächtnis bezeichnet wird (Squire & Knowlton, 1999). Für Vertebraten konnte gezeigt werden, dass explizites und implizites Lernen verschiedene neuronale Verschaltungen und Teile des Gehirns beteiligen. HC, Kortex und Regionen des Dienzephalons sind für die Verarbeitung und Abspeicherung des expliziten Gedächtnisses verantwortlich, während das implizite Gedächtnis den Temporallappen für die Konsolidierung, Abrufung und Stabilisierung des Gelernten nicht benötigt (Thompson & Kim, 1996; Squire & Knowlton, 1999).

Explizite und implizite Gedächtnisformen lassen sich in zwei zeitliche Abschnitte teilen: das Kurzzeitgedächtnis, welches zwischen wenigen Minuten bis zu einigen Stunden andauern kann, und das Langzeitgedächtnis, das dauerhaft für einige Tage, Monate, Jahre oder ein ganzes Leben besteht (Barondes & Cohen, 1968; Goelet *et al.*, 1986; McGaugh, 2000). Für die Bildung eines Kurzzeitgedächtnisses ist keine *de novo* Proteinsynthese nötig; lediglich posttranslationale Modifikationen von bereits vorhandenen Proteinen wie z.B. Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Enzymen, Rezeptoren und Ionenkanälen. Diese Modifikationen führen zu einer schnellen und kurzzeitigen Änderung der synaptischen Transmission (Matthies, 1989a; Matthies 1989b; Izquierdo *et al.*, 1999; Rose, 2000; Dineley *et al.*, 2001).

Die Umwandlung des Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis bedarf Veränderungen auf zellulärer und synaptischer Ebene (Hebb *et al.*, 1949; McCough, 2000; Yuste & Bonhoeffer, 2001), die durch verschiedene Eingriffe wie z.B. Hypoxie, Hypothermie, Elektroschocks sowie durch Inhibitoren der Transkription oder Translation beträchtlich beeinflusst werden können (Davis & Squire, 1984; Storck & Welzl, 1999; Sutherland *et al.*, 2010). Studien in Invertebraten (z.B. Stollhoff *et al.*, 2008), Vögeln (z.B. Rose, 2000) und Nagetieren (z.B. Flood *et al.*, 1986) zeigten, dass diese Inhibitoren die Langzeitgedächtnisbildung, nicht aber

die Akquisition und die Kurzzeitgedächtnisbildung beeinflussen. Für zelluläre Mechanismen der Gedächtniskonsolidierung werden also Genexpressionsänderungen und *de novo* Proteinsynthese benötigt. Es ist zu vermuten, dass neu gebildete Proteine zur Reorganisation bereits vorhandener Synapsen verwendet werden, um deren Effizienz zu verändern. Andererseits könnten diese Proteine aber auch zur Bildung neuer synaptischer Verbindungen dienen (Moser, 1999).

Die Neurotransmissionssysteme und intrazellulären Signalwege, die in die Gedächtnisbildung involviert sind, sind bisher teilweise untersucht: die glutamaterge exzitatorische Neurotransmission, der Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Postsynapse und die Aktivierung nachgeschalteter Proteinkinasekaskaden mit PKC, PKA und Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) (Rosenblum *et al.*, 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sowohl die Bildung eines Kurzzeitgedächtnisses als auch des Langzeitgedächtnisses durch modulatorisch wirkende Neurotransmitter wie Dopamin, Noradrenalin, Acetylcholin und Serotonin beeinflusst werden kann (Greengard, 2001; Lee *et al.*, 2002). Über die Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren können diese Neurotransmitter zum einen in der Präsynapse u.a. die Regulation der Transmitterfreisetzung regulieren. Zum anderen steuern sie in der Postsynapse z.B. die Regulation der Glutamaterezeptoren und damit die exzitatorische Signalübertragung. Damit sind sie in synaptische Plastizitätsmechanismen involviert (Greengard, 2001; Lee *et al.*, 2002; Perroy *et al.*, 2002), die als eine Grundlage für die Speicherung spezifischer Gedächtnisinhalte angesehen werden können.

Darüber hinaus gehen heutige Sichtweisen neuraler Plastizitätsphänomene im Rahmen der Gedächtnisbildung vom kombinierten Wirken verschiedener lerninduzierter Prozesse aus (Redondo & Morris, 2011), die neben gedächtnisstabilisierenden Mechanismen auch permissive Mechanismen einschließen, also Mechanismen, die die Fähigkeit zu lang anhaltenden plastischen Veränderungen erhöhen. Sowohl permissive als auch stabilisierende Mechanismen können Prozesse erfordern, die durch Neuromodulatoren (z.B. Dopamin) und Proteinkinasen (z.B. mTOR, *mammalian target of rapamycin*) kontrolliert werden, wie Translation, Transkription, Proteolyse und Dynamik zytoskeletaler Komponenten (Jaworski & Sheng, 2006; Redondo & Morris, 2011).

Auf systemischer Ebene scheinen über einen längeren Zeitraum hinweg mehrere Hirnregionen an der Konsolidierung expliziten Gedächtnisses beteiligt zu sein (Wiltgen *et al.*, 2004; Lesburguères *et al.*, 2011). Heutigen Hypothesen zufolge werden Informationen im

Kortex prozessiert und enkodiert und an den HC weitergeleitet. In Ruhephasen und während des Schlafes aktiviert der HC Areale des Neokortex, die in die anfängliche Gedächtnisbildung involviert sind. Eine simultane Aktivierung dieser neokortikalen Areale ermöglicht eine graduelle Verschaltung zwischen diesen. Wenn diese neokortikalen Verschaltungen ausreichend stark sind, ist das Gedächtnis konsolidiert und vom HC unabhängig, während die Rolle verschiedener Regionen des Kortex, insbesondere frontaler Bereiche, für Organisation und Abrufung des Gedächtnisses immer mehr zunimmt (Wiltgen *et al.*, 2004).

#### **1.4 Der auditorische Kortex der Mongolischen Wüstenrennmaus**

Die Mongolische Wüstenrennmaus (*Meriones unguiculatus*, Mongolischer Gerbil) stellt ein wichtiges Tiermodell für die Erforschung des auditorischen Systems, seiner Physiologie und plastischen Veränderungen dar. Einer der Gründe dafür ist die Ähnlichkeit der Hörschwellenkurve des Gerbils mit der des Menschen im niederfrequenten Bereich (Ryan, 1976). Für die Untersuchung des funktionellen Aufbaus des auditorischen Kortex (AC) wurden sowohl Töne mit einer Frequenzkomponente (Hess & Scheich, 1996; Sugimoto *et al.*, 1997) als auch frequenzmodulierte Töne (Zuschratter *et al.*, 1995; Schulze *et al.*, 1997) verwendet. Es konnten acht auditorische Felder identifiziert werden (Scheich *et al.*, 1993; Thomas *et al.*, 1993; Budinger *et al.*, 2000a; Budinger *et al.*, 2008). Vier dieser Felder sind durch eine tonotope Organisation charakterisiert, d.h. die Töne mit einer Frequenzkomponente werden in einer räumlichen Ordnung dargestellt. Diese Felder sind der primäre auditorische Kortex (AI), das rostral gelegene anteriore auditorische Feld (AAF) und zwei kaudale Felder, das dorsoposteriore (DP) und ventroposteriore (VP) Feld (Budinger *et al.*, 2000a; Budinger *et al.*, 2000b). Für den AI sind vielfältige Verbindungen mit kortikalen und subkortikalen Strukturen nachgewiesen worden (Scheich *et al.*, 2007; Budinger *et al.*, 2006; Budinger *et al.*, 2008), u.a. auch mit solchen, die in Prozesse des Lernens und der Gedächtnisbildung involviert sind, wie z.B. parahippokampale, präfrontale und striatale Regionen und Areale des dopaminergen Mittelhirns (VTA).

Läsionsstudien an Gerbils wiesen darauf hin, dass die tonotopen Felder AI, AAF und DP/VP maßgebend für die Unterscheidung der Modulationsrichtung von symmetrisch gepaarten, linear-frequenzmodulierten Tönen (FM) sind (Ohl *et al.*, 1999). Hierbei werden die Gerbils in einer zweigeteilten Kammer, der Shuttle-Box, daraufhin trainiert, zur Vermeidung eines milden elektrischen Fußreizes auf aufwärts und abwärts modulierte Töne mit dem Verzicht bzw. der Ausführung eines Kompartimentwechsels zu reagieren. Mittels lokaler pharmakologischer Intervention in AI, AAF und DP/VP konnte gezeigt werden, dass die

Retention des Gelernten bis zur Trainingssitzung am nächsten Tag sowohl der NMDA-Rezeptoraktivität als auch der *de novo* Proteinsynthese im AC während der Postakquisitionsphase bedarf (Kraus *et al.*, 2002; Schicknick & Tischmeyer, 2006). Der Hörkortex des Gerbils ist also offenbar nicht nur für rein sensorische Mechanismen der FM-Prozessierung, sondern auch für Aspekte des Lernens und der Langzeitgedächtnisbildung in diesem Paradigma von kritischer Bedeutung. Ferner zeigte sich, dass durch die lokale Hemmung der Proteinsynthese im Hörkortex kurz nach der ersten Trainingssitzung die Langzeitgedächtnisbildung (nicht aber Akquisition und Kurzzeitgedächtnisbildung) auch an nachfolgenden Trainingstagen gestört ist. Durch das initiale Lernereignis induzierte Proteinsynthese-abhängige Prozesse im Hörkortex scheinen also nicht nur für die Festigung der frisch erworbenen Gedächtnisspur von Bedeutung zu sein, sondern – offenbar unter Einbeziehung mTOR-vermittelter Signalwege (Tischmeyer *et al.*, 2003) – auch für Veränderungen in gedächtnisrelevanten Netzwerken, die über mehrere Tage hinweg die Gedächtnisbildung im gewählten Paradigma erleichtern. So konnten kürzlich im Hörkortex, Frontalkortex, Hippokampus und Striatum von Mäusen Veränderungen des synaptischen Proteoms nach FM-Diskriminierungstraining gezeigt werden, die lerninduzierte Reorganisationsprozesse erleichtern könnten (Kähne *et al.*, 2012). Mikrodialyseuntersuchungen zeigten ferner, dass Dopamin während und kurz nach dem Lernexperiment insbesondere bei solchen Gerbils kortikal erhöht freigesetzt wird, die danach eine hohe Diskriminierungsleistung aufweisen (Stark *et al.*, 1997; Stark *et al.*, 2004). Dopamin könnte also u.a. an der Regulation von Proteomänderungen beteiligt sein, welche die Langzeitgedächtnisbildung unterstützen. Tatsächlich wirkt sich die pharmakologische Aktivierung von D1/D5-Dopaminrezeptoren im Hörkortex mittels lokaler Injektion von SKF38393 nach FM-Diskriminierungstraining positiv auf die Langzeitgedächtnisbildung aus (Schicknick *et al.*, 2008). Interessanterweise ist dieser Effekt auch dann nachweisbar, wenn der Agonist bereits einen Tag vor dem ersten Lernexperiment verabreicht wird (Abb. 1.4 A). Die gleichzeitige Applikation von Proteinsyntheseinhibitoren unterdrückt diese Wirkung. Offensichtlich werden also über die SKF38393-vermittelte Aktivierung von D1/D5-Rezeptoren im AC proteinsyntheseabhängige Veränderungen induziert, die über ein bis zwei Tage andauern und in diesem Zeitraum Mechanismen der Gedächtnisbildung im gewählten Paradigma unterstützen. In einer Pilotstudie zur Wirkung eines weiteren D1/D5-Agonisten, SKF83959, zeigte sich dagegen ein gänzlich anderer zeitlicher Verlauf (Abb.1.4 B).

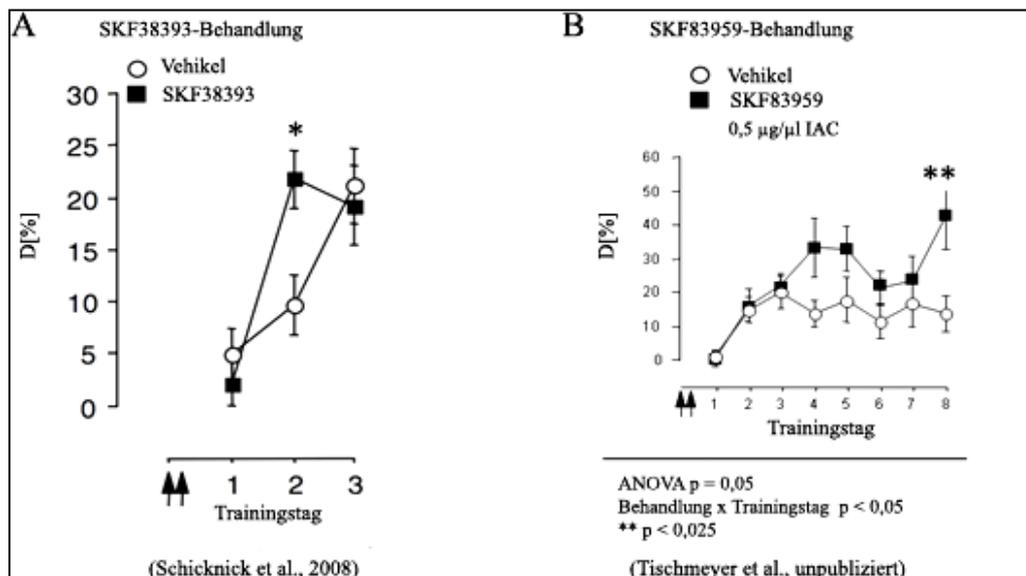


Abb. 1.4: Lernkinetik der Unterscheidung der Richtung linear-frequenzmodulierter Töne in einer Shuttle-Box unter Einfluss der Dopaminagonisten SKF38393 (A) bzw. SKF8395 (B) nach Injektion in den Hörkortex von Gerbils im Vergleich zu Vehikel-behandelten Kontrollen.

Nach Injektion dieses selektiv die PLC-vermittelte Phosphoinositid-Hydrolyse stimulierenden Agonisten in den Hörkortex am Tag vor dem ersten FM-Diskriminierungstraining war die Wirkung auf das FM-Diskriminierungsverhalten im Vergleich zu Kontroll-Gerbils erst um mehrere Tage verzögert nachweisbar.

### 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Frühere Studien am Gerbil zeigten, dass lokale Aktivierung von D1/D5-Dopaminrezeptoren mittels SKF38393 im Hörkortex proteinsyntheseabhängige Veränderungen induziert, die über ein bis zwei Tage anhalten und die Gedächtnisbildung im FM-Diskriminierungsparadigma erleichtern.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war das Auffinden von Kandidatenproteinen in verschiedenen Hirnstrukturen, die potentiell an dopaminerg im Hörkortex induzierten gedächtnisunterstützenden Prozessen beteiligt sind. Dazu wurden einen Tag nach lokaler Injektion von SKF38393 in den auditorischen Kortex (AC) des Gerbils Proteomveränderungen in verschiedenen Proteinfractionen des AC, Frontalkortex (FC), Hippokampus (HC) und Striatum (ST) mit Hilfe von zweidimensionaler Gelelektrophorese und Massenspektrometrie im Vergleich zu einer Kontrollgruppe analysiert. Analoge Experimente unter Einsatz des D1/D5-Agonisten SKF83959 sollten eine Abschätzung der Beteiligung PLC-vermittelter dopaminergener Signalwege im AC für die Modulation solcher Prozesse erlauben.

Ein weiteres Ziel war die genauere Charakterisierung eines der mittels Proteomanalyse im Hörkortex identifizierten Kandidatenproteine. Im zweiten Teil der Arbeit werden daher Befunde zur dopaminergen Regulation der Expression und Lokalisation von  $\alpha$ -Synuclein, einem in Neuronen vorwiegend präsynaptisch lokalisierten Protein, vorgestellt. Unter Einsatz eines  $\alpha$ -Synuclein-defizienten Mausstammes im Vergleich zu Wildtyp-Stämmen wurde ferner geprüft, ob  $\alpha$ -Synuclein im FM-Diskriminierungsparadigma für den Lernprozess selbst bzw. für dessen dopaminerge Modulation von Bedeutung ist.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Sämtliche Chemikalien wurden von den Firmen Biorad, Calbiochem, GE Healthcare Life Sciences, Invitrogen, Merck, Pierce, Roche, Roth, Serva, Sigma-Aldrich oder Thermo Fisher Scientific bezogen und in der Qualität *pro analysi* eingesetzt. Spezielle Chemikalien und benutzte Lösungen werden im zugehörigen Methodenabschnitt beschrieben. Für proteinbiochemische Arbeiten wurde bidestilliertes Wasser (Milli-Q® System, Millipore) und für zellbiologische Arbeiten Reinstwasser (Roth) verwendet.

#### 2.1.2 Antikörper

In der folgenden Übersicht (Tabelle 2.1) sind die primären und sekundären Antikörper, die für Immunblot- (IB) und Immunfluoreszenz-Analysen (IF) verwendet wurden, tabellarisch dargestellt.

**Tab. 2.1: Verwendete Antikörper**

Primäre Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller/Firma
anti-β-Aktin	Maus, monoklonal	IB: 1:4000	Sigma
anti-Bassoon (SAP7f)	Kaninchen, polyklonal	IF: 1:1500	Dr. Wilko Altmann/ LIN
anti-Bassoon (SAP7f407)	Maus	IF: 1:400	Stressgen
anti-D1D-Rezeptor	Kaninchen, polyklonal	IF: 1:200	Santa Cruz
anti-GAPDH	Kaninchen, polyklonal	IB: 1:2000	Abcam
anti-hnRNP K	Kaninchen, polyklonal	IB: 1:500	Abcam
anti-hnRNP L	Maus, monoklonal	IB: 1:2000	Abcam
anti-map2	Maus, monoklonal	IF: 1:1000	Sigma Aldrich
anti-NEFL	Kaninchen, monoklonal	IB: 1:50000	Novus Biologicals
anti-α-Synuclein	Meerschwein, polyklonal	IF: 1:1500	Abcam
anti-α-Synuclein	Maus, monoklonal	IB 1:1000	BD Biosciences
Sekundäre Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller/Firma
anti-Maus IgG, HRP-gekoppelt	Ziege, polyklonal	IB: 1:4000	Dako
anti-Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt	Maus, monoklonal	IB: 1:8000	Sigma Aldrich
anti-Maus IgG, Cy5-gekoppelt	Ziege, polyklonal	IF: 1:1000	Jackson Immuno Research, Dianova
anti-Kaninchen IgG, Cy5-gekoppelt	Ziege, polyklonal	IF: 1:1000	Jackson Immuno Research, Dianova
anti-Maus IgG, Alexa Fluor™ 488-gekoppelt	Ziege, polyklonal	IF: 1:1000	Molecular Probes Invitrogen
anti-Kaninchen IgG, Alexa Fluor™ 488-gekoppelt	Ziege, polyklonal	IF: 1:1000	Molecular Probes Invitrogen
anti-Meerschweinchen IgG, Cy3-gekoppelt	Ziege, polyklonal	IF: 1:1000	Jackson Immuno Research, Dianova

Abkürzungen: IF = Immunfluoreszenz; IB = Immunblot

### 2.1.3 Versuchstiere

Für proteinbiochemische Untersuchungen wurden männliche, drei Monate alte mongolische Wüstenrennmäuse (*Meriones unguiculatus*, Gerbil) verwendet. Sie stammten aus der Eigenzucht des Leibniz-Institutes für Neurobiologie. Die Gerbils wurden in Gruppen mit jeweils fünf Tieren in einer Plastikschiene (58 cm x 36 cm x 20 cm) gehalten. Die Lufttemperatur variierte zwischen 21 °C und 24 °C, die relative Luftfeuchte zwischen 40% und 50%. Es herrschte ein Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 h Phasenlänge (Licht an: 7:00 Uhr).

Verhaltensbiologische Untersuchungen wurden mit männlichen, drei Monate alten  $\alpha$ -Synuclein-defizienten Mäusen (*Mus musculus*) (C57BL/6JOLA<sup>Hsd</sup>) und Wildtypmäusen (C57BL/6JR<sup>c</sup>Hsd) durchgeführt, welche über Harlan Laboratories bezogen wurden. Mäuse eines weiteren Wildtyp-Substammes (C57BL/6JCr<sup>l</sup>) stammten aus der Eigenzucht des Leibniz-Institutes für Neurobiologie.

Für die Präparation hippokampaler Primärkulturen wurden Ratten (*Rattus norvegicus*) des Stammes Wistar aus der Eigenzucht des Leibniz-Institutes für Neurobiologie in Magdeburg verwendet.

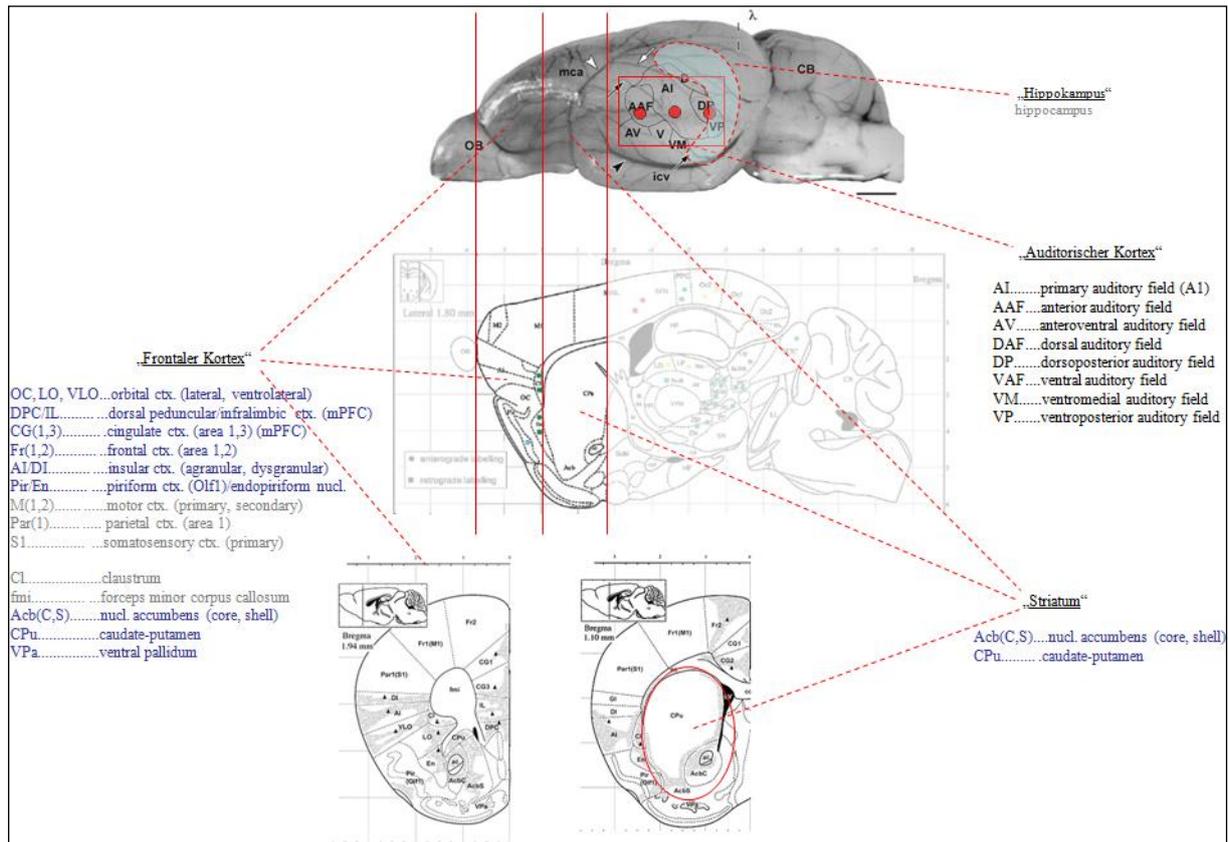
## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Operative Eingriffe, intrakortikale Injektionen und Dissektion des Gerbilhirns

In zwei unabhängigen Versuchsserien wurde den Gerbils (n=6 je Gruppe) SKF38393 bzw. SKF83959 bilateral in den Hörkortex verabreicht. Gerbils der Kontrollgruppen wurde intrakortikal 0,9%ige Natriumchloridlösung (Vehikel) injiziert. Am folgenden Tag wurden die Versuchstiere getötet und die Hirnregionen AC, FC, HC und ST entnommen.

Einen Tag vor der intrakortikalen Injektion erfolgte eine Operation, um den Zugang zum AC zu ermöglichen. Dazu wurden die Tiere durch intraperitoneale Injektion von 0,5 ml/100 g Körpermasse einer Mischung aus 2% Rompun (Bayer) und 25 mg/ml Ketanest (Parke-Davis) im Verhältnis 0,5:4 anästhesiert. Danach wurde die Kopfhaut rasiert, desinfiziert und zwischen Auge und Ohr eingeschnitten. Der dort befindliche Temporalmuskel wurde entfernt und der Knochen gesäubert. Pro Hemisphäre wurden drei Bohrungen mit ca. 1 mm Durchmesser oberhalb des primären auditorischen Feldes (AI), des anterioren auditorischen Feldes (AAF) und des dorsoposterioren auditorischen Feldes/ventroposterioren auditorischen Feldes (DP/VP) gesetzt (Richter *et al.*, 1999; Budinger *et al.*, 2000a). Dabei diente das sichtbare, kortikale Gefäßmuster des Schädelknochens als Orientierungshilfe (Hess &

Scheich, 1996; Sugimoto *et al.*, 1997). Die Wundränder wurden schließlich mit Volon A Salbe (Sqibb) behandelt. Abbildung 2.1 zeigt u.a. eine Übersicht über die Positionierung der Injektionen in die auditorischen Felder AI, des AAF und des DP/VP des Gerbils.



**Abb. 2.1:** Dissektion des Gerbilhirns für Proteom-analytische Untersuchungen in „auditorischer Kortex“ (AC), „frontaler Kortex“ (FC), „Hippokampus“ (HC) und „Striatum“ (ST). Rote Kreise: Positionierung der lokalen Injektionen in die Felder AI, AAF und DP/VP des AC. Blaue Schrift: Regionen des FC und ST mit nachgewiesenen Projektionen von AI (modifiziert nach Budinger *et al.*, 2006; Budinger *et al.*, 2008).

Die intrakortikalen Injektionen erfolgten am Tag nach der Operation unter leichter Halothan-Narkose (1,5-2% Halothan in der Atemluft; Eurim-Pharma). Die Injektionen wurden mittels eines Nanoliter-Injektionssystems (WPI) und einer dort befestigten Glaspipette durchgeführt, die zuvor mit einem *Micropipette Puller* auf einer Seite künstlich verengt worden war (Durchmesser an der Spitze: 20 µm). Die genaue Positionierung der Injektionen erfolgte anhand stereotaktischer Koordinaten aus früheren Arbeiten (Kraus *et al.*, 2002; Tischmeyer *et al.*, 2003). Die Mikropipette wurde 1 mm tief in dorsoventraler Richtung und tangential zur Kortexoberfläche eingestochen. Es wurde jeweils 1 µl des D1/D5-Dopaminrezeptoragonisten SKF38393 (0,2 mM = 0,06 µg/µl in Vehikellösung; Sigma) bzw. SKF83959 (1,25 mM = 0,5 µg/µl in Vehikellösung; Sigma) pro Bohrung mit einer Geschwindigkeit von 23 nl pro 5 s injiziert. Die unterschiedlich hohen Dosen der beiden Dopaminrezeptoragonisten wurden

gewählt, weil SKF38393 Gαq wesentlich effizienter stimuliert als SKF83959 (Panchalingam & Undie, 2001). Um den Einfluss der operativen Eingriffe und der intrakortikalen Injektionsprozedur konstant zu halten, wurde den Gerbils der Kontrollgruppen die als Vehikel verwendete 0,9%ige Natriumchloridlösung (B. Braun, Melsungen) in gleicher Weise verabreicht. Die Injektionen wurden nach 2 h wiederholt. 24 h nach der ersten Injektion wurden die Tiere durch Überstrecken der Halswirbelsäule getötet. Anschließend wurden die Tiere dekapitiert und der Schädel geöffnet, das Gehirn entnommen und AC, FC, HC und ST entsprechend Abbildung 2.1 auf einer eisgekühlten Petrischale präpariert. Das Hirngewebe wurde sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Operative Eingriffe, Injektionen und Dekapitation der Tiere wurden von Dr. Horst Schicknick durchgeführt.

## 2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.2.1 Präparation subzellulärer Proteinfractionen

<b>Homogenisierungspuffer:</b>	<b>5 mM TRIS/HCl (Roth) (pH 8,1)</b> <b>0,5% (v/v) Triton X 100 (Roth)</b> <b>1 Tablette Complete mini PI/10 ml mit EDTA (Roche)</b> <b>Halt Protease &amp; Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific)</b> <b>1 mM Natriummolybdat (Roth)</b> <b>2 mM Imidazol (Sigma)</b> <b>4 mM Natriumtartratdihydrat (Roth)</b> <b>10 µM Cantharidin (Roth)</b> <b>ddH<sub>2</sub>O</b>
<b>Waschlösungen:</b>	<b>Aceton (Merck)</b> <b>80% (v/v) Ethanol (Roth)</b> <b>Aqua B. Braun Ecotainer® (B. Braun Melsungen AG)</b>
<b>4xSDS-Probenpuffer:</b>	<b>250 mM TRIS/HCl (Roth) (pH 6,8)</b> <b>1% (w/v) SDS (Roth)</b> <b>40% (v/v) Glycerol (Roth)</b> <b>20% (v/v) β-Mercaptoethanol (Merck)</b> <b>0,004% (w/v) Bromphenolblau (Serva)</b> <b>ddH<sub>2</sub>O</b>
<b>Rehydratisierungspuffer:</b>	<b>9 M hochreines Urea plus one (GE Healthcare)</b> <b>4% (w/v) CHAPS plus one (GE Healthcare)</b> <b>20 mM TRIS plus one (GE Healthcare)</b> <b>64 mM Dithiothreitol (DTT) plus one (GE Healthcare)</b> <b>0,5% (v/v) IPG-Puffer 3-11 NL (Amersham)</b> <b>ca. 0,002% (w/v) Bromphenolblau (Serva)</b> <b>ddH<sub>2</sub>O</b>

Die Präparation einer mit synaptischen Proteinen angereicherten (SP) und einer tritonlöslichen Proteinfraction (TP) wurde nach Smalla *et al.* (2000) durchgeführt. Dazu wurden die einzelnen Hirngewebeproben (vgl. 2.2.1) unter Zugabe von 300 µl Homogenisierungspuffer mit Hilfe eines Handhomogenisators EWL K9 mit 12 Doppelhüben

bei 1000 rpm homogenisiert. Anschließend wurden die Proben 1 h bei 4 °C inkubiert und danach 1 h mit 100.000 x g bei 4 °C in der Ultrazentrifuge Optima Max (Rotor TLA 100.2; Beckmann) zentrifugiert. Der die tritonlöslichen Bestandteile enthaltende Überstand wurde abgenommen und aufbewahrt. Die tritonunlöslichen Bestandteile sedimentierten als Pellet, welches in 300 µl Homogenisierungspuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert wurde (1 h, 100.000 x g, 4 °C). Die Überstände beider Zentrifugationen wurden vereint und stellten die TP-Fraktion (tritonlösliche Proteine) dar. Nach der zweiten Zentrifugation wurde das Pellet, die SP-Fraktion (tritonunlösliche Proteine), mit 200 µl Homogenisierungspuffer resuspendiert. Proben für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Trennung in der ersten Dimension (vgl. 2.2.2.3.1) wurden anschließend mit 4xSDS-Probenpuffer solubilisiert, entsalzt (vgl. 2.2.2.3.1.1) und dialysiert (vgl. 2.2.2.3.1.2). Darauf folgend wurde die Proteinkonzentration nach Popov bestimmt (vgl. 2.2.2.2.1). Die resuspendierten SP-Proben sowie die TP-Proben für die isoelektrische Fokussierung (IEF) (vgl. 2.2.2.3.2.1) wurden mit jeweils 10 ml -20 °C kalten Acetons über Nacht bei -20 °C zur Fällung der Proteine inkubiert. Um für die elektrophoretischen Trennungen störende Komponenten wie z.B. Lipide und Ionen zu entfernen, wurden die TP-Proben dreimal mit Aceton sowie dreimal mit 80%igen (v/v) Ethanol und die SP-Proben dreimal mit Aceton sowie dreimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Zwischen den Waschschrritten erfolgte eine zehnmünütige Zentrifugation der Proben bei 4 °C und 15.200 x g (Sorvall RC6; Rotor SLA 1500). Das finale Pellet wurde im Lyophilisator (Freezone; Labconco) getrocknet. Anschließend wurden die Proben in Rehydratisierungspuffer für die IEF (vgl. 2.2.2.3.2.1) aufgenommen und die Proteinkonzentration nach Bradford (vgl. 2.2.2.2.2) bestimmt.

## 2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

### 2.2.2.2.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Popov (Amidoschwarz-Proteinbestimmung)

<b>Amidoschwarz-Lösung:</b>	<b>23mM Amidoschwarz 10B (Merck) in Methanol/Eisessig</b>
<b>Methanol/Eisessig:</b>	<b>1:9 Eisessig (Roth)/Methanol (Roth)</b>
<b>0,1 M NaOH (Roth)</b>	
<b>2 mg/ml BSA-Ausgangslösung (Interchim)</b>	

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration für die Proben der SDS-PAGE in der ersten Dimension (vgl. 2.2.2.3.1) wurde eine Amidoschwarz-Proteinbestimmung in einer 96-well-Mikrotiterplatte durchgeführt (Popov *et al.*, 1975). Als Standard wurde Rinderserumalbumin (BSA) in einer Ausgangskonzentration von 2 mg/ml verwendet. Zur Normalisierung wurden

davon Verdünnungen (Gesamtmenge pro *well*: 0 µg, 2 µg, 4 µg, 8 µg, 16 µg, 20 µg BSA) für eine BSA-Eichgerade hergestellt und eine Dreifachbestimmung der Proben durchgeführt. Es erfolgte eine zehninütige Inkubation der Proben mit der Amidoschwarz-Lösung bei RT. Anschließend wurde die Platte 10 min bei 3200 x g (Centrifuge 5810R; Eppendorf) zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes, wurde das Pellet dreimal mit 300 µl Methanol/Eisessig gewaschen und dazwischen erneut zentrifugiert. Danach trocknete das Pellet bei RT und wurde in 300 µl 0,1 M NaOH gelöst. Die Extinktionsmessung wurde mit Hilfe des Mikrotiterplatten-Photometers VERSAmax microplate reader (Molecular Devices) bei einer Wellenlänge von 620 nm durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels der Software Soft Max Pro 4.8.

#### **2.2.2.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford**

**BioRad Protein Assay Färbereagenzkonzentrat (BioRad)**  
**Aqua B. Braun Ecotainer® (B. Braun Melsungen AG)**  
**0,1 M HCl (Roth)**  
**2 mg/ml BSA-Ausgangslösung (Interchim)**

Die Proteinkonzentration der Proben für die IEF mit anschließender SDS-PAGE in der zweiten Dimension (vgl. 2.2.2.3.2) wurde mittels der Methode nach Bradford (1976) bestimmt. Als Standard diente BSA. Die Proben wurden mit dem Protein Assay Färbereagenzkonzentrat (BioRad) im Verhältnis 1:5 gemischt und 3 min bei RT inkubiert. Der Farbstoff Coomassie Brilliantblau G-250 bildet in leicht saurer Lösung kolloidale Strukturen, die ein Absorptionsmaximum bei 465 nm besitzen. Wenn der Farbstoff an Proteine bindet, verschiebt sich dieses Maximum zu einer Wellenlänge von 595 nm. Die Proteinkonzentration wurde daher durch Messung der Absorption bei 595 nm mit Hilfe des Spektralphotometers Ultraspec 2100 pro (Amersham) ermittelt. Nach den errechneten Werten wurde die totale Proteinmenge pro Probe mit Rehydratisierungspuffer auf 0,7 mg für Experimente mit anschließender Silberfärbung bzw. auf 2 mg für Experimente mit anschließender Coomassie-Brilliantblau-Färbung der Gele eingestellt. Anschließend wurde ein Ampholyte enthaltender 0,5%iger (v/v) IPG-Puffer (3-11 NL; Amersham; vgl. 2.2.2.1) hinzugefügt und die Proben wurden 15 min mit 20.800 x g bei RT zentrifugiert (Centrifuge 5415 R; Eppendorf). Daran schloss sich die IEF an (vgl. 2.2.2.3.2.1).

### 2.2.2.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-PAGE wurde unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt und ermöglichte die Trennung von Proteinen entsprechend ihrer molekularen Masse (Laemmli, 1970). Das Prinzip der SDS-PAGE besteht darin, dass das im Gel enthaltene negativ geladene Detergenz SDS an Proteine bindet und fast alle nicht kovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen zerstört. Die Reduktion der Disulfidbrücken geschieht durch 2-Mercaptoethanol. Die Auftrennung erfolgt beinahe ausschließlich nach der molekularen Masse in einem nahezu konstanten Masseverhältnis von 1,4 mg SDS zu 1 mg Protein aufgrund des Molekularsiebeffektes des porösen Polyacrylamid-Gels.

#### 2.2.2.3.1 Probenvorbereitung und SDS-PAGE zur Trennung in der ersten Dimension

##### 2.2.2.3.1.1 Entsalzen der Proben

Zeba™ Desalting Spin Columns (2 ml; Thermo Scientific)  
4xSDS-Probenpuffer: 250 mM TRIS/HCl (Roth) (pH 6,8)  
1% (w/v) SDS (Roth)  
40% (v/v) Glycerol (Roth)  
20% (v/v) β-Mercaptoethanol (Merck)  
0,004% (w/v) Bromphenolblau (Serva)  
ddH<sub>2</sub>O

Die Proben wurden in 4xSDS-Probenpuffer solubilisiert (vgl. 2.2.2.1), 10 min bei 95 °C inkubiert und 20 min bei 20.800 x g und bei 4 °C zentrifugiert (Centrifuge 5417R; Eppendorf) und anschließend entsalzt. Hierfür wurden Desalting Spin Columns verwendet. Diese Entsalzungssäulen wurden zunächst 2 min bei 1000 x g zentrifugiert (Megafuge 3.0R; Thermo Scientific), um die 0,05%ige Natriumazidlösung zu entfernen. Danach wurden die Säulen dreimal mit 1 ml 1xSDS-Probenpuffer äquilibriert und wie zuvor zentrifugiert. Schließlich wurden die Säulen mit maximal 700 µl Probe beladen. Die Elution der umgepufferten Probe erfolgte durch eine Zentrifugation bei 1000 x g. Es schloss sich die Dialyse der Proben an.

##### 2.2.2.3.1.2 Dialyse der Proben

Xpress MicroDialyzerKit (Scienova)  
4xSDS-Probenpuffer: 250 mM TRIS/HCl (Roth) (pH 6,8)  
1% (w/v) SDS (Roth)  
40% (v/v) Glycerol (Roth)  
20% (v/v) β-Mercaptoethanol (Merck)  
0,004% (w/v) Bromphenolblau (Serva)  
ddH<sub>2</sub>O

Für die Dialyse der Proben wurden 1400 µl 1xSDS-Probenpuffer und maximal 100 µl Probe in die Dialysegmente gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde die Proteinkonzentration der Proben nach Popov bestimmt (vgl. 2.2.2.2.1), die anschließend für die SDS-PAGE in der ersten Dimension verwendet wurden.

### 2.2.2.3.1.3 SDS-PAGE zur Trennung in der ersten Dimension

**Elektrophoresepuffer:** 1,92 mM Glyzin (Roth)  
1% (w/v) SDS (Roth)  
250 mM TRIS-Base (Roth) (pH 8,3)  
**Molekulargewichtsmarker:** Precision Plus Protein™ Standard Dual Color (BioRad)

Für die SDS-PAGE wurden 5-20%ige Gradienten-Minigele (10 cm x 8 cm x 0,075 cm) (Zusammensetzung in Tabelle 2.2) in einem Hoefer Mighty Small System SE250 (Amersham Biosciences) verwendet. Es wurden 15 µg Protein pro Probe sowie der Marker auf die Gele geladen. Die elektrophoretische Auftrennung des Proteingemisches erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 8 mA pro Gel. Die Gele wurden anschließend entweder mit Coomassie Brilliantblau R-250 gefärbt (2.2.2.4.1) oder geblottet (2.2.2.7).

Tab. 2.2: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

Bestandteil	Trenngel (pH 8,8)		Sammelgel (pH 6,8)
	Acrylamid T=20%	Acrylamid T=5%	Acrylamid T=5%
1,5 M TRIS/HCl pH 8,8	8,25 ml	8,25 ml	-
0,5 M TRIS/HCl pH 6,8	7 ml	-	6 ml
ddH <sub>2</sub> O	-	17,94 ml	7,95 ml
87% (v/v) Glycerol	7,5 ml	1,89 ml	5,52 ml
Acrylamid T=40%	16,5 ml	4,12 ml	-
Acrylamid T=30,8%	-	-	3,9 ml
0,2 M EDTA	330 µl	330µl	240 µl
TEMED	22 µl	22 µl	17,2 µl
0,5% (w/v) Bromphenolblau	60 µl	-	-
Phenolrot	-	-	10 µl
10% (w/v) APS	75 µl	118 µl	137 µl

### 2.2.2.3.2 Isoelektrische Fokussierung und SDS-PAGE zur Trennung in der zweiten Dimension

Die Auftrennung von Proteingemischen durch zweidimensionale Gelelektrophorese wurde einerseits für den Vergleich der aus unterschiedlich pharmakologisch vorbehandelten Tieren gewonnenen Proteinproben genutzt. Für diese quantitativ-analytischen Zwecke wurden Proteinmengen von 0,7 mg pro Probe eingesetzt und die resultierenden Proteinmuster mittels der hochempfindlichen Silberfärbung sichtbar gemacht (vgl. 2.2.2.4.3). Andererseits wurde die 2D-Gelelektrophorese zur Probengewinnung für massenspektrometrische Analysen

genutzt. Zur Erhöhung der Wahrscheinlichkeit der Proteinidentifikation wurden hierfür Proteinmengen von 2 mg pro Probe mit anschließender Coomassiefärbung (vgl. 2.2.2.4.4) eingesetzt.

### 2.2.2.3.2.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die Auftrennung der Proteine in der ersten Dimension erfolgte mittels isoelektrischer Fokussierung. Dabei werden Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) in einem Polyacrylamidgelstreifen mit immobilisiertem pH-Gradienten (IPG) elektrophoretisch aufgetrennt.

Die IPG-Gelstreifen (18 cm; pH 3-11 NL; Amersham) wurden zur Rehydratisierung mit 400 µl Probe inkubiert und anschließend mit 600 µl Öl (Plus One Öl; *dry strip cover fluid*) überschichtet, um eine Verdunstung der Probe und Kristallisation des Harnstoffes zu vermeiden. Die Fokussierung wurde mit einem Ettan-IPGphor (Amersham) bei einer konstanten Temperatur von 20 °C sowie einer maximalen elektrischen Stromstärke von 50 µA pro Streifen in definierten Spannungsstufen (*step-n-hold*, vgl. Tab. 2.3) durchgeführt.

**Tab. 2.3: Spannungsstufen (*step-n-hold*) der isoelektrischen Fokussierung**

Stufe	Spannung	Dauer	Volt-Stunden
Rehydration	0 V	10 h	-
S1	30 V	12 h	360
S2	500 V	1 h	500
S3	1 000 V	1 h	1 000
S4	8 000 V	-	74 000

### 2.2.2.3.2.2 Äquilibration der IPG-Streifen

<b>Äquilibrationpuffer 1:</b>	<b>10 mM TRIS/HCl (BioRad) (pH 8,8)</b> <b>9 M hochreines Urea plus one (GE Healthcare)</b> <b>4% (v/v) CHAPS (GE Healthcare)</b> <b>30% (v/v) Glycerol (Roth)</b> <b>2% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS; Roth)</b> <b>ca.0,002% (w/v) Bromphenolblau (Serva)</b> <b>32 mM DTT plus one (GE Healthcare)</b> <b>ddH<sub>2</sub>O</b>
<b>Äquilibrationpuffer 2:</b>	<b>50 mM TRIS/HCl (BioRad) (pH 8,8)</b> <b>6 M hochreines Urea plus one (GE Healthcare)</b> <b>30% (v/v) Glycerol (Roth)</b> <b>2% (w/v) SDS (Roth)</b> <b>ca. 0,002% (w/v) Bromphenolblau (Serva)</b> <b>Iodoacetamid (250 mg/10 ml) (Sigma)</b> <b>ddH<sub>2</sub>O</b>

Vor der Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension (vgl. 2.2.2.3.2.3) mussten die Streifen äquilibriert werden. Dazu wurden die Proteine zunächst im Äquilibrierungspuffer 1 schüttelnd inkubiert (15 min bei RT). Das darin enthaltene Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) führt zur Denaturierung und einheitlich negativen Ladung der Proteine, während Dithiothreitol (DTT) durch Reduktion der Disulfidbrücken eine vollständige Entfaltung der Proteine ermöglicht. Danach wurden die Proben mit dem Iodoacetamidhaltigen Äquilibrierungspuffer 2 schüttelnd inkubiert (15 min bei RT), um durch Alkylierung der Cysteinreste eine erneute Bildung von Disulfidbrücken zu unterbinden.

### 2.2.2.3.2.3 SDS- PAGE zur Trennung in der zweiten Dimension

<b>12 vertikale DALT 11 % SDS-Polyacrylamid Gele:</b>	<b>30% (v/v) Duracryl (Biorad)</b>
	<b>5 M TRIS/HCl (Roth) (pH 8,8)</b>
	<b>436 ml ddH<sub>2</sub>O</b>
	<b>10% (w/v) SDS (Roth)</b>
	<b>10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS; Serva)</b>
	<b>0,436 ml TEMED (International Biotechnologies Inc.)</b>
<b>Verdrängungslösung:</b>	<b>375 mM TRIS/HCl (Roth) (pH 8,8)</b>
	<b>50% (v/v) Glycerol (Roth)</b>
	<b>0,002% (w/v) Bromphenolblau (Pharmacia Biotech)</b>
	<b>ddH<sub>2</sub>O</b>
<b>Übersichtungspuffer:</b>	<b>Isopropanol (Roth)</b>
	<b>ddH<sub>2</sub>O</b>
<b>Molekulargewichtsmarker:</b>	<b>Precision Plus Protein™ Standard Dual Color (BioRad)</b>
<b>1 % (w/v) Agarose in SDS-PAGE Elektrophoresepuffer</b>	
<b>SDS-PAGE Elektrophoresepuffer:</b>	<b>10xTGS-Puffer (BioRad)</b>

Die Denaturierung der Proteine erfolgte bereits beim Prozess der Äquilibrierung (vgl. 2.2.2.3.2.2). Die mit SDS gesättigten IPG-Streifen sowie der Marker wurden auf das Gel (200 mm x 250 mm x 1,5 mm) aufgebracht und mit 1%iger (w/v) Agarose fixiert. Danach wurden die Gelkassetten in den DALT Tank überführt. Die Elektrophorese wurde in 1xSDS-PAGE Elektrophoresepuffer bei 16 °C und konstanter Spannung von 80 V durchgeführt. Anschließend erfolgte entweder die Silberfärbung (vgl. 2.2.2.4.3) oder Coomassiefärbung (vgl. 2.2.2.4.4).

## 2.2.2.4 Proteinfärbungen in Polyacrylamid-Gelen und auf Nitrozellulosemembranen

### 2.2.2.4.1 Coomassie Brilliantblau R-250 Färbung

<b>Coomassie Brilliantblau R-250- Färbelösung:</b>	<b>20%(v/v) Methanol (Roth)</b> <b>10%(v/v) Essigsäure (Roth)</b> <b>0,1%(w/v) Coomassie Brilliantblau R-250 (Serva)</b> <b>ddH<sub>2</sub>O</b>
<b>Entfärbungslösung:</b>	<b>10% (v/v) Essigsäure (Roth)</b> <b>20% (v/v) Ethanol (Roth)</b> <b>ddH<sub>2</sub>O</b>
<b>Konservierungslösung:</b>	<b>35% (v/v) Ethanol (Roth)</b> <b>3% (v/v) Glycerol (Roth)</b> <b>ddH<sub>2</sub>O</b>
<b>Scanner:</b>	<b>GS-800 Calibrated Densitometer (BioRad)</b>
<b>Software:</b>	<b>QuantityOne 4.6.9 (BioRad)</b>

Der an basische Aminosäureseitenketten bindende Farbstoff Coomassie Brilliantblau R-250 wurde zur Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE in der ersten Dimension eingesetzt. Dazu wurden die Gele über Nacht in Färbelösung geschwenkt. Ungebundener Farbstoff wurde am Folgetag mittels der Entfärbungslösung aus dem Gel entfernt. Danach wurden die Gele gescannt und die optischen Dichten (ODs) der einzelnen Banden mit Hilfe der Software QuantityOne bestimmt. Nach Inkubation für 20 min in Konservierungslösung wurden die Gele zur Aufbewahrung zwischen zwei Mini Zellophan<sup>TM</sup>-Folien (Roth) in einem Gelrocknungsrahmen eingespannt und für mindestens einen Tag bei RT getrocknet.

### 2.2.2.4.2 Ponceau S-Färbung

<b>Ponceau S- Färbelösung:</b>	<b>0,5% (w/v) Ponceau S (Sigma)</b> <b>1% (v/v) Essigsäure (Roth)</b>
--------------------------------	--

Mit dieser Methode wurde der elektrophoretische Transfer der Proteine nach der SDS-PAGE in der ersten Dimension auf die Nitrozellulosemembran (2.2.2.7) überprüft. Hierfür wurde die Nitrozellulosemembran 10 min in Ponceau S-Färbelösung inkubiert. Danach erfolgte ein vorsichtiges Waschen der Membran mit ddH<sub>2</sub>O. Transferierte Proteine erschienen in roten Banden auf der Membran.

### 2.2.2.4.3 Silberfärbung

<b>Fixierlösung:</b>	<b>50% (v/v) Ethanol (Roth)</b> <b>5% (v/v) Essigsäure (Roth)</b>
<b>Waschlösung 1:</b>	<b>50% (v/v) Ethanol (Roth)</b>
<b>Waschlösung 2:</b>	<b>ddH<sub>2</sub>O</b>
<b>Sensibilisierungslösung:</b>	<b>0,02% (w/v) Natriumthiosulfat (Merck)</b>
<b>Silber-Imprägnierlösung:</b>	<b>0,15% (w/v) Silbernitrat (Merck)</b>
<b>Entwicklerlösung:</b>	<b>0,04% (v/v) Formaldehyd (Sigma)</b>

<b>Abstopplösung:</b>	<b>2% (v/w) Natriumkarbonat (Merck)</b>
<b>Aufbewahrungslösung:</b>	<b>5% (v/v) Essigsäure (Roth)</b>
	<b>0,2% (v/v) Essigsäure (Roth)</b>
	<b>10% (v/v) Methanol (Roth)</b>

Die Silberfärbung ist eine sehr sensitive Proteinfärbemethode (unteres Detektionslimit bei 1 ng Protein), die Quantifizierung und Vergleich von Proteinmustern nach 2D-Gelelektrophorese ermöglicht. In der vorliegenden Arbeit wurde sie nach einem Standardprotokoll (Shevchenko *et al.*, 1996) mit geringfügigen Modifikationen für 2D-Gele mit 0,7 mg Protein pro Probe eingesetzt. Zunächst erfolgte die Fixierung der im Gel enthaltenen Proteine für 60 min in Fixierlösung. Danach wurden die Gele in Waschlösung 1 und in Waschlösung 2 für je 15 min gewaschen. Es schloss sich eine Inkubation für 3 min in Sensitiserungslösung an, gefolgt von einem zweiminütigen und einem einminütigen Waschschriff mit ddH<sub>2</sub>O. Anschließend wurden die Gele für 30-45 min in Silber-Imprägnierlösung geschwenkt. Überschüssiges Silbernitrat wurde durch Waschen mit ddH<sub>2</sub>O entfernt. Danach erfolgte die Entwicklung der Gele mit formaldehydhaltiger Entwicklerlösung. Nach ca. 8-10 min (je nach visuellem Eindruck) wurde die Reaktion mittels der Abstopplösung beendet. Mit Hilfe eines BioRad-Gelscanners GS-800 und der 2D-Gelauswertungssoftware PDQuest (BioRad) wurden zwecks Quantifizierung digitale Gelbilder erzeugt. Anschließend wurden die Gele in Aufbewahrungslösung bei 4 °C gelagert. Da es sich bei dem hier gewählten Protokoll um eine Massenspektrometrie-kompatible Proteinfärbemethode handelt, können aus silbergefärbten Gelen prinzipiell auch Proben extrahiert und der massenspektrometrischen Analyse zugeführt werden.

#### 2.2.2.4.4 Coomassie Brilliantblau G-250 Färbung

<b>Fixierlösung:</b>	<b>50% (v/v) Ethanol (Roth)</b>
	<b>3% (v/v) Phosphorsäure (Roth)</b>
	<b>ddH<sub>2</sub>O</b>
<b>Coomassie-Brilliantblau G-250-Färbelösung:</b>	<b>34% (v/v) Methanol (Roth)</b>
	<b>3% (v/v) Phosphorsäure (Roth)</b>
	<b>15% (w/v) Ammoniumsulfat (Roth)</b>
	<b>0,1% (w/v) Coomassie Brilliantblau G-250 (Fluka)</b>
	<b>ddH<sub>2</sub>O</b>
<b>Aufbewahrungslösung:</b>	<b>5% (v/v) Essigsäure (Roth)</b>
	<b>ddH<sub>2</sub>O</b>

Für die Erhöhung der Sicherheit der massenspektrometrischen Analyse wurden hierfür in der Regel 2D-Gelelektrophoresen unter Einsatz von 2 mg Protein pro Probe durchgeführt. Die resultierenden Gele wurden vorzugsweise einer Färbung mit Coomassie Brilliantblau G-250

unterzogen, da hierfür die eingesetzten Proteinmengen erheblich höher als für Silberfärbung sein können (die untere Detektionsgrenze liegt bei ca. 40 ng Protein). Die Gele wurden über Nacht in der Fixierlösung inkubiert und anschließend dreimal für 15 min mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Danach wurden sie in die Färbelösung überführt, 24 h darin belassen und eingescannt. Die Lagerung der Gele erfolgte in der Aufbewahrungslösung bei 4 °C. Nach der digitalen Auswertung der eingescannten Gele mittels PDQest (BioRad) wurden Gelbereiche aus den Coomassie-gefärbten Gelen extrahiert, die nach Auswertung korrespondierender silbergefärbter Gele aufgefallen waren (vgl. 2.2.2.4.3)

### **2.2.2.5 Datenevaluierung und Bildanalyse der 2D-Gele**

**Scanner:** GS-800 Calibrated Densitometer (BioRad)  
**Software:** QuantityOne 4.6.9 (BioRad)  
PDQuest Advanced 8.0 (BioRad)

In der vorliegenden Arbeit wurden Gruppen von n=6 Tieren verwendet, die entweder mit einem der D1/D5-Dopaminrezeptoragonisten (SKF38393 bzw. SKF83959) oder Vehikel behandelt wurden. Diese Gruppenstärke wurde gewählt, um den Einfluss von biologischen Varianzen, Veränderungen, welche durch die Probenpräparation und Gelherstellung erzeugt wurden, möglichst gering zu halten.

Ziel war es, im Vergleich zu Kontrollgruppen hoch- oder herunterregulierte Proteine nach Behandlung mit einem der D1/D5-Dopaminrezeptoragonisten zu identifizieren. Die in den 2D-Gelen hinsichtlich ihres isoelektrischen Punktes und ihres Molekulargewichtes getrennten Proteine wurden nach Anfärbung in so genannten Spots sichtbar. Zur Quantifizierung wurden zunächst digitale Bilder der 2D-Gele erzeugt. Unter Einsatz des Bildanalyse-Programms PDQuest (Bio-Rad, Version 8.1) wurden die sechs Gele der Kontrollgruppe mit den sechs Gelen der entsprechenden Agonist-behandelten Tiere verglichen. Zum Abgleich der individuellen Unterschiede der Einzelgele wurden diese auf einem „Master-Gel“ abgebildet, wodurch kleine Dislokationen von Spots korrigiert wurden. Pro Hirnregion und Fraktion wurden zwei *Matchsets* mit unterschiedlichen PDQuest-internen Parametern erzeugt, um Varianzen in der Spotauswahl zu verringern. Danach konnten mit Hilfe von PDQuest die ODs der einzelnen Spots ermittelt und statistisch ausgewertet werden. Spots, deren ODs durch einen der von PDQuest unterstützten statistischen Tests (Mann-Whitney *U*-Test, Partial-Least-Squares-Regression-Test, Student's *t*-Test) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,1$  Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen aufwiesen, wurden als potentiell

interessant eingestuft und aus den Coomassie-Brilliantblau G-250 gefärbten Gelen extrahiert. Die in den extrahierten Gelproben enthaltenen Proteine wurden mittels Trypsin verdaut, und die daraus resultierenden Peptidgemische wurden der massenspektrometrischen Analyse zugeführt.

## 2.2.2.6 Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie

### 2.2.2.6.1 Trypsinverdau

<b>Waschlösung 1:</b>	<b>25 mM Ammoniumhydrogenkarbonat in 50% (v/v) Acetonitril (Roth)</b>
<b>Waschlösung 2:</b>	<b>100% (v/v) Acetonitril (Roth)</b>
<b>Waschlösung 3:</b>	<b>25 mM Ammoniumhydrogenkarbonat (Sigma) in Aqua B. Braun Ecotainer® (B. Braun Melsungen AG)</b>
<b>Trypsin (Promega) 0,05 mg/ml in 25 mM Ammoniumhydrogenkarbonat (Sigma)</b>	
<b>Abstopplösung:</b>	<b>0,1% (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) (Merck)</b>
	<b>50% (v/v) Acetonitril (Roth)</b>
	<b>ddH<sub>2</sub>O</b>
<b>Elutionslösung:</b>	<b>50% (v/v) Acetonitril (Roth)</b>
	<b>ddH<sub>2</sub>O</b>

Um die in den extrahierten Gelproben enthaltenen Proteine zu entfärben, wurden die Waschlösungen 1-3 mit einem Volumen von jeweils 200 µl eingesetzt. Jede Gelprobe wurde jeweils 10 min in Waschlösung 1, Waschlösung 2, Waschlösung 3, Waschlösung 1 und Waschlösung 2 unter Schütteln inkubiert und anschließend in einem Lyophilisator getrocknet. Für den Trypsinverdau wurden die Proben mit je 5 µl der Trypsinlösung versetzt, leicht anzentrifugiert und 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden 25 µl von Waschlösung 3 hinzugegeben. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37 °C und wurde am nächsten Tag unter Zugabe von 50 µl Abstopplösung beendet. Die Proben wurden anschließend 15 min in einem Ultraschallbad (Branson 3610) inkubiert. Die Überstände mit den darin enthaltenen Peptiden wurden abgenommen und in frische Eppendorfgefäße überführt. Die verbleibenden Gelproben wurden mit je 50 µl Elutionslösung versetzt und erneut 15 min mit Ultraschall behandelt. Die Überstände wurden abgenommen und mit den vorherigen vereinigt. Zuletzt wurden die Gelproben in je 50 µl Waschlösung 2 erneut im Ultraschallbad inkubiert. Die Überstände wurden wiederum abgenommen und mit den vorherigen vereinigt. Die gesammelten Überstände wurden für 90 min gefriergetrocknet.

### 2.2.2.6.2 ZipTip-Reinigung

**C<sub>18</sub> ZipTip 10 µl Pipettenspitzen (Millipore)**  
**1% (v/v) TFA (Merck)**  
**90% (v/v) Acetonitril (Roth)**  
**0,1% (v/v) TFA (Merck)**  
**0,1% (v/v) TFA/70% (v/v) Acetonitril**

Die getrockneten Proben wurden in je 15 µl einer 1%igen (v/v) TFA-Lösung aufgenommen. Die Aktivierung der ZipTip-Säulen erfolgte durch zweimaliges Waschen mit 90%igen (v/v) Acetonitril sowie zweimaliges Waschen mit einer 0,1%igen (v/v) TFA-Lösung. Anschließend wurden die Proben zehnmal über die ZipTip-Säule pipettiert, so dass die Peptide an die Matrix gebunden werden konnten. Die Säulen wurden erneut zweimal mit 90%igen (v/v) Acetonitril gewaschen, bevor die Peptide mittels 0,1%igen (v/v) TFA/70% (v/v) Acetonitrillösung eluiert und anschließend gefriergetrocknet werden konnten.

### 2.2.2.6.3 Massenspektrometrische Analyse

Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden nahezu ausschließlich durch Dr. Thilo Kähne am Institut für Innere Medizin, Otto-von-Guericke Universität in Magdeburg, mittels nano-LC-ESI-Ionenfallen-Tandem-Massenspektrometrie (Bruker) durchgeführt. Ein geringer Teil der massenspektrometrischen Analysen erfolgte im Department of Molecular and Cellular Neurobiology, Center for Neurogenomics & Cognitive Research (CNCR), Neuroscience Campus Amsterdam, VU University, Amsterdam, Niederlande durch Prof. Ka Wan Li. Diese Messungen wurden mittels MALDI-TOF-TOF (AB Sciex) durchgeführt.

### 2.2.2.7 Immunblot-Analyse

Für ausgewählte Proteine wurden die durch 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie erhobenen Daten mittels Immunblot-Analyse überprüft. Die Untersuchungen erfolgten an Hirnregionen von Gerbils, denen 24 h zuvor SKF38393 oder Vehikel, wie unter 2.2.1 beschrieben, lokal in den Hörkortex verabreicht worden waren (n=6 pro Gruppe). Daraus gewonnene Proteine der SP- und TP-Fractionen wurden mittels SDS-PAGE in der ersten Dimension aufgetrennt (vgl. 2.2.2.3.1).

<b>Blot-Puffer:</b>	<b>192 mM Glyzin (Roth)</b> <b>0,2% (w/v) SDS (Roth)</b> <b>20% (v/v) Methanol (Roth)</b> <b>25 mM TRIS-Base (pH 8,3) (Roth)</b>
<b>Ponceau S-Färbelösung:</b>	<b>0,5% (w/v) Ponceau S (Roth) in 3 % (v/v) Trichloressigsäure (Merck)</b> <b>1,4 M Natriumchlorid (Roth)</b> <b>0,25 M TRIS/HCl (Roth) (pH 7,6)</b>
<b>10xTBS</b>	

---

<b>TBS-T:</b>	<b>0,1% (v/v) Tween-20 (Roth) in 1 x TBS</b>
<b>TBS-A:</b>	<b>0,05% (w/v) Natriumazid (NaN<sub>3</sub>; Roth) in 1xTBS</b>
<b>Blockierlösung:</b>	<b>5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-T</b>
<b>Nitrozellulosemembran:</b>	<b>PROTRAN<sup>®</sup> Porengröße 0,45 µm (Whatman<sup>®</sup>)</b>
<b>ECL:</b>	<b>Pierce<sup>®</sup> ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific)</b>
<b>Lichtsensitive Filme:</b>	<b>Amersham Hyperfilm<sup>™</sup> ECL (GE Healthcare)</b>
<b>Scanner:</b>	<b>GS-800 Calibrated Densitometer (BioRad)</b>
<b>Software:</b>	<b>QuantityOne 4.6.9 (BioRad)</b>

Der Transfer der gelelektrophoretisch getrennten Proteine vom SDS-Gel auf die Nitrozellulosemembran wurde nach der Methode von Towbin *et al.* (1979) durchgeführt. Die Überführung der Proteine auf die Nitrozellulosemembran erfolgte bei einer Stromstärke von 200 mA und 4 °C im Hoefer TE 22 Mini Tank Transphor Unit-System (Amersham Bioscience) für 1,5 h. Mittels der Ponceau S-Färbung wurde der Proteintransfer geprüft (vgl. 2.2.2.4.2). Transferierte Proteine erschienen in roten Banden auf der Membran. Danach wurde die Nitrozellulosemembran mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen, bis die rote Färbung der Banden nicht mehr sichtbar war. Im nächsten Schritt erfolgte die Blockierung nicht gesättigter Proteinbindungsstellen auf der Membran mit 5%igen (w/v) Magermilchpulver in TBS-T für 1 h bei RT. Nach drei Waschschritten mit 1xTBS wurde die Nitrozellulosemembran mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Alle verwendeten Primärantikörper wurden mit TBS-A verdünnt. Ungebundene Primärantikörper wurden durch dreimaliges Waschen für je 10 min mit TBS-T entfernt und die Membran für 1 h bei RT mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper in Blockierlösung inkubiert. Es folgten drei Waschschrritte mit 1xTBS für 10 min. Alle Primär- und Sekundärantikörper wurden in den angegebenen Verdünnungen (vgl. 2.1.2) eingesetzt. Anschließend erfolgte die Detektion der Proteine mittels ECL Immunblotting Substrat nach Herstellerangaben. Hierbei wurde das chemilumineszierende und chemifluoreszierende Substrat zur Detektion von Peroxidaseaktivität HRP-konjugierter Antikörper verwendet. Beide Substrate wurden in einem Verhältnis 1:1 gemischt, 1 min bei RT inkubiert und die Nitrozellulosemembran anschließend 1 min darin schüttelnd inkubiert. Das Pierce ECL Plus-Substrat erzeugt bei der Reaktion mit HRP Acridiniumester. Da diese Ester-Intermediate mit Peroxid reagieren, erzeugen sie ein starkes und anhaltendes Chemilumineszenzsignal, das durch lichtensitive Filme erfasst werden kann. Folgend wurden lichtensitive Filme aufgelegt und mit einer Entwicklermaschine Curix 60 (Agfa) entwickelt. Die Filmer wurden anschließend gescannt und die Intensität der Banden mit der Software QuantityOne quantifiziert.

### 2.2.3 Zellkultur

#### 2.2.3.1 Präparation und Kultivierung primärer hippokampaler Neuronen

<b>Kulturmedium 1:</b>	<b>DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>; Gibco)</b> <b>10% (v/v) fötales Kälberserum (Gibco)</b> <b>2 mM L-Glutamin (Gibco)</b> <b>Antibiotika (Gibco) (100 U Penizillin und 100 µg Streptomycin)</b>
<b>Kulturmedium 2:</b>	<b>Neurobasal™ (Gibco)</b> <b>0,08 mM Glutamin™ (Gibco)</b> <b>1xB27 (50x) (Gibco)</b>
<b>Trypsin (Gibco):</b>	<b>0,1% (w/v) in HBSS</b>
<b>DNase (Roche):</b>	<b>0,01% (w/v; 200U) in HBSS</b> <b>2,4 mM Magnesiumsulfat</b>
<b>HBSS (Gibco)</b>	
<b>Trypanblue Stain 0,4% (w/v; Gibco)</b>	
<b>Poly-D-Lysin Hydrobromide (Sigma):</b>	<b>100 mg/l in 100 mM Borsäure (Roth) (pH 8,5)</b>

Die Präparation und Kultivierung primärer hippokampaler Neuronen von Rattenembryonen des Embryonalstadiums E18 erfolgte nach einer Methode von Goslin und Banker (1998). Die Hippokampi wurden zunächst auf Eis in HBSS präpariert und dann fünfmal mit jeweils 5 ml HBSS gewaschen. Es schloss sich ein 20-minütiger Trypsinverdau (0,1% (w/v) Trypsin in HBSS) bei 37 °C an. Danach erfolgten fünf weitere Waschschrte mit jeweils 5 ml HBSS. Die anschließende Dissoziation des Gewebes erfolgte biochemisch durch eine DNase-Behandlung und mechanisch durch jeweils dreimaliges Auf- und Abbewegen der Suspension durch zwei Kanülen mit unterschiedlichem Durchmesser (0,9 mm x 40 mm bzw. 0,45 mm x 25 mm). Um die Hippokampi von Zelltrümmern zu befreien, wurde die Suspension letztlich durch ein Zellsieb (100 µm Porenweite) filtriert. Die Zellen wurden im Kulturmedium 1 aufgenommen und die Zelldichte der mit Trypanblue angefärbten Neuronen mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 20.000 Zellen pro Poly-D-Lysin beschichtetem Deckgläschen in 24-well-Platten im Kulturmedium 1 ausgesät. Die Aufbewahrung der Kulturen erfolgte in einem Inkubator (Heraeus-Instruments; Thermo Fisher Scientific) bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% H<sub>2</sub>O-gesättigter Luft. Nach 24 h erfolgte ein kompletter Medienaustausch gegen das Kulturmedium 2. Einmal pro Woche erhielten die Kulturen frisches Kulturmedium 2 (50 µl pro Platte), um das Medium wieder mit Nährstoffen anzureichern.

#### 2.2.3.2 Behandlung primärer hippokampaler Neuronen mit SKF38393

<b>Kulturmedium 2:</b>	<b>Neurobasal™ (Gibco)</b> <b>0,08 mM Glutamin™ (Gibco) (= 200 µl/ 50ml)</b> <b>1xB27 (50x) (Gibco)</b>
<b>SKF38393 (Sigma)</b>	

Hippokampale Neuronen (DIV 7, DIV14, DIV21) wurden für 3 h mit 100  $\mu\text{M}$  SKF38393 (in Kulturmedium 2) inkubiert. Hierfür wurde das auf den Neuronenkulturen befindliche Medium gegen frisches, SKF38393-haltiges Medium ausgetauscht. Kontrollkulturen erhielten ebenfalls frisches, aber SKF38393-freies Kulturmedium 2. Die Inkubationen erfolgten im Inkubator bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% H<sub>2</sub>O-gesättigter Luft. Die Zellen wurden anschließend immunzytochemisch untersucht.

### 2.2.3.3 Immunzytochemie

<b>10xPBS:</b>	<b>1,4 M Natriumchlorid (Roth)</b> <b>0,83 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Merck)</b> <b>17 mM Natriumdihydrogenphosphat (Merck)</b> <b>(pH 7,4)</b>
<b>PBS /Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> -Puffer:</b>	<b>0,1 mM Kalziumchlorid (Roth)</b> <b>1mM Magnesiumchlorid (Roth)</b> <b>in 1xPBS</b>
<b>Fixierlösung:</b>	<b>4% (w/v) Paraformaldehyd (PFA; Serva) in 1xPBS</b>
<b>Glyzinpuffer:</b>	<b>25 mM Glyzin (Roth) in 1xPBS (pH 7,4)</b> <b>0,5 mM Kalziumchlorid (Roth)</b> <b>0,5 mM Magnesiumchlorid (Roth)</b>
<b>Saponin (Roth):</b>	<b>10 mg/ml in 1xPBS</b>
<b>Blockierlösung:</b>	<b>5% (w/v) BSA (Invitrogen)</b> <b>10% (v/v) Pferdeserum (Invitrogen) in 1xPBS (pH 7,4)</b> <b>0,2 mg/ml Saponin</b>
<b>Mowiol:</b>	<b>10% (w/v) Mowiol (Roth)</b> <b>25% (v/v) Glycerol (Roth)</b> <b>100 mM TRIS/HCl (Roth) (pH 8,5)</b>

Um das Verhalten von  $\alpha$ -Synuclein nach Inkubation hippokampaler Neuronen in SKF38393 zu untersuchen, wurden immunzytochemische Färbungen der Kulturen angefertigt. Als präsynaptischer Marker diente dabei Bassoon (zur Verfügung gestellt von Dr. Wilko Altrock/LIN). Anti- $\alpha$ -Synuclein wurde von Abcam bezogen (Clinton *et al.*, 2010). In einem Vorversuch erfolgten Färbungen mit dem D1D-Rezeptor-Antikörper (Santa Cruz) zum Nachweis der D1-Dopaminrezeptoren in den hippokampalen Kulturen.

Die auf den Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläschen befindlichen Zellen wurden in 0,5 ml PBS/ Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-Puffer 10 min gewaschen und für 7 min mit 4% (w/v) PFA fixiert. Danach wurden die Zellen 30 min mit Glyzinpuffer gewaschen, um die unspezifische Hintergrundfärbung durch Absättigung freier Bindungsstellen des Paraformaldehyds (PFA) zu reduzieren. Das Blockieren und Permeabilisieren erfolgte für 1 h bei RT mit einer saponinhaltigen Blockierlösung. Die Inkubation der Neuronen mit dem in der Blockierlösung verdünnten Primärantikörper (vgl. 2.1.2) geschah für 1 h bei RT in einer feuchten Kammer. Es schlossen sich drei Waschschritte mit Blockierlösung für je 10 min an. Die Zellen wurden

dann mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert, der ebenfalls mit Blockierlösung verdünnt wurde (vgl. 2.1.2). Die Neuronen wurden jeweils einmal für je 10 min mit Blockierlösung, 1xPBS bzw. ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Das Einbetten der Deckgläschen erfolgte auf Objektträgern mit 4 µl Mowiol. Die Dokumentation der Zellen erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Zeiss Observer.Z1 (Zeiss) und der Bildbearbeitungssoftware Autovision release 4.8. Die konfokale Bildanalyse wurde mit dem Laserscanningmikroskop TCS SP5 (Leica) sowie der dazugehörigen Softwarepackage Leica TCS durchgeführt.

#### **2.2.4 Bildanalyse**

Für die Analyse der unter 2.2.3.2 beschriebenen Experimente an hippocampalen Neuronen wurden aus vier unabhängigen Versuchen jeweils zehn Neuronen pro Behandlungsgruppe ausgewählt und mittels des Laserscanningmikroskops (TCS SP5; Leica) analysiert (2048 x 2048 Pixel; 12 bit; 63x Objektiv; 1,5x Zoom; 3x Bildmittelung; optische Schnittdicke = 0,13 µm; 400 Hz).

##### **2.2.4.1 Begradigung der Dendriten mittels ImageJ**

In den Bildaufnahmen wurden alle Dendriten eines Neurons zunächst mittels ImageJ begradigt. Dazu wurden die Bildstapel (*Stacks*) in den einzelnen Kanälen in ImageJ geöffnet. Zunächst wurden die Kanäle miteinander verknüpft mit Hilfe des *Plugins Concatenate*. Die Bassoönfärbung (Kanal 1) diente als Maske für die Begradigung der Dendriten. Diese erfolgte mittels des *Plugins Straighten*. Die Dendriten wurden mit einer Breite von 60 µm markiert und anschließend begradigt. Die einzelnen Kanäle eines Dendriten wurden danach wieder geteilt und jeder Kanal einzeln abgespeichert.

##### **2.2.4.2 Dekonvolution mittels AutoQuant X2**

Ein Mikroskop ist durch seine *Point Spread Function* (PSF) charakterisiert. Die PSF beschreibt die durch das Mikroskop transformierte zwei- oder dreidimensionale Darstellung eines einzigen Lichtpunktes eines Objektes. Jedes Bildgebungssystem weist eine spezifische PSF auf, die durch die Kombination von Probe, Deckgläschen, Objektivlinsen, Wellenlänge und die optischen Komponenten des Mikroskops festgelegt wird. Beispielsweise sind konfokale Mikroskope durch eine ellipsoide PSF in axialer Richtung gekennzeichnet. Das Objekt kann als Sammlung von Punktquellen Lichtes unterschiedlicher Wellenlängen, an unterschiedlichen Positionen mit unterschiedlichen Intensitäten betrachtet werden. Das sich

dem Benutzer präsentierte Bild im Mikroskop kann als Summe von PSFs beschrieben werden. Dies bezeichnet man als Konvolution. Anstelle eines klaren Bildes ergibt sich eine Überlappung der PSFs und es entsteht ein verzerrtes und unscharfes Bild. Die Dekonvolution ist ein computerbasiertes Verfahren, mit dem das verzerrte und unscharfe Bild korrigiert wird (Biggs, 2004).

Die einzelnen Kanäle des Dendriten wurden dazu in AutoQuant X2 (MediaCybernetics) geöffnet und die folgenden Eigenschaften der Datensätze festgelegt (vgl. Tab. 2.4).

**Tab. 2.4: Eigenschaften der zu dekonvolvierenden Datensätze**

Parameter	Festgelegte Parameter
Pixeldimensionen	wurden automatisch aus der Datei entnommen
Emissionswellenlängen der Fluorophore	Alexa 488 (519 nm), Cy3 (570 nm)
Modalität	Laser Scanning Confocal
Objektiv	63x1.4 NA oil
Immersionsmedium	Oil 1.515

Es erfolgte eine 3D-Dekonvolution. Die verwendeten Einstellungen sind in Tabelle 2.5 zusammengefasst.

**Tab. 2.5: Einstellungen für die 3D-Dekonvolution**

Einstellungen	Festgelegte Einstellungen
Dekonvolutionsmethode	<i>Adaptive blind</i>
PSF-Einstellungen	Theoretische PSF
Dekonvolutions-Einstellungen	15 Iterationen unter mittlerem Rauschniveau

### 2.2.4.3 Lokalisationsanalyse mittels IMARIS 6.4.2

Für die Lokalisationsanalyse von  $\alpha$ -Synuclein und Bassoon wurde das Kolokalisationsmodul von IMARIS 6.4.2 (Bitplane Scientific Solutions) basierend auf der Methode von Costes *et al.* (2004) verwendet. Hierzu wurden mit Hilfe der *Mask Dataset* Funktion *Regions of interest* bestimmt, die u.a. die synaptischen Strukturen beinhalteten. Dies wurde mit allen Datensätzen in gleicher Weise durchgeführt. Danach wurde ein Kolokalisationskanal erzeugt und die einzelnen Kolokalisationswerte in einer Tabelle abgespeichert. Für die statistische Auswertung wurde der Prozentsatz des Volumens des Bassoonkanals verwendet, welches mit dem des  $\alpha$ -Synucleinkanals kolokalisiert.

### 2.2.5 Verhaltensexperimente

Die nachfolgend beschriebenen Verhaltensexperimente und ihre Auswertung wurden in Zusammenarbeit mit Frau Chris Theuerkauf, Dr. Horst Schicknick und Dr. Wolfgang Tischmeyer durchgeführt.

### 2.2.5.1 Lernparadigma

Im verwendeten Lernmodell, dem FM-Diskriminierungsparadigma, wurden Mäuse daraufhin trainiert, die Richtung der Modulation linear-frequenzmodulierter Töne (FM) zu unterscheiden. In Abhängigkeit von der Modulationsrichtung des Signals sollten sie in der Lernapparatur innerhalb einer vorgegebenen Zeit das Kompartiment wechseln (GO) bzw. im gleichen sitzen bleiben (NO GO) (Wetzel *et al.*, 1998).

### 2.2.5.2 Lernapparatur

Die Lernapparatur (Hasomed) bestand aus einem computergestützten Steuerteil und einer Shuttle-Box, die sich in einer schallgeschützten Kammer befand. Die Shuttle-Box (38 cm x 19 cm x 22 cm) wurde durch eine 2 cm hohe Metallhürde in zwei Kompartimente unterteilt. Als Bodenfläche diente ein Metallgitter, über das ein elektrischer Fußreiz appliziert werden konnte. Am Deckel der Shuttle-Box befanden sich zwei Lautsprecher (Visaton). Die präsentierten Frequenzen wurden künstlich digitalisiert und über eine Soundkarte analog umgewandelt. Die Abgabe der Töne über die Lautsprecher wurde mit einem Spektrumanalysator kontrolliert (Bruel & Kjaer).

### 2.2.5.3 Lernexperiment

Das Training erfolgte täglich zwischen 8.00 und 14.00 Uhr. Der Zeitraum zwischen zwei Trainingssitzungen betrug  $24 \pm 1$  h. Zu Beginn wurden die Tiere für 3 min in die Shuttle-Box gesetzt, damit sie sich an die Umgebung gewöhnen konnten (Habituation). Das Training bestand aus 60 Läufen. Die Tiere hatten die Aufgabe, zwischen Sequenzen (250 ms Intervall) zweier linear-frequenzmodulierter Tönen als bedingte Reize zu unterscheiden (CS = bedingter Reiz, 65-70 dB). Die Töne nahmen den gleichen Frequenzbereich zwischen 4 und 8 kHz ein und unterschieden sich lediglich in der Richtung der Modulation (aufwärts, abwärts). Beide CS wurden den Versuchstieren für je 6 s präsentiert. Bei dem aufwärtsmodulierten FM (CS+; 4-8 kHz) mussten die Mäuse innerhalb von 6 s das Kompartiment wechseln, da sie sonst einen bis zu 4 s andauernden elektrischen Fußreiz von ca. 300  $\mu$ A (UCS = unbedingter Reiz) bekamen. Sobald sie im gegenüberliegenden Kompartiment waren, endeten Ton und Fußreiz. Wenn die Versuchstiere aber die Hürde innerhalb der 6 s nach Tonpräsentation überquerten, wurde dies als korrekte konditionierte Reaktion (*corrected conditioned response*, CR+) gewertet. Bei Präsentation eines abwärtsmodulierten FM (CS-; 8-4 kHz) sollten sie das Kompartiment nicht wechseln. Wenn die Mäuse jedoch die Seite während 6 s nach

Tonpräsentation überquerten, bekamen sie auf der anderen Seite einen Strafreiz von ca. 300  $\mu$ A. Diese Reaktion wurde als CR- (falsche Antwort) gewertet. CS+ und CS- wurden pseudorandomisiert dargeboten. Die Pausen zwischen den einzelnen Läufen variierten zwischen 5 und 15 s. Kompartimentwechsel der Tiere während dieser Zeit wurden vom Computer als ITC (*intertrial crossing*) gemessen. Als Maß für die Diskriminierungsleistung wurde der Wert D, d.h., die Differenz aus der Anzahl CR+ (Kompartimentwechsel nach bekräftigtem Ton) und der Anzahl CR- (Kompartimentwechsel nach unbekräftigtem Ton), ermittelt. Für jedes Experiment sind die für die Anzahl der CR+, CR-, ITC und Fluchtreaktionen (*escape reactions*, d.h., Kompartimentwechsel nach Einsetzen des Fußreizes) ermittelten Gruppenmittelwerte pro Trainingssitzung in Tabellen 6.2-6.7 im Anhang dokumentiert.

#### **2.2.5.4 Intraperitoneale Injektionen**

Unmittelbar nach Beendigung der ersten Trainingssitzung wurde den Mäusen, je nach Experiment, entweder physiologische Kochsalzlösung (Vehikel) oder der D1/D5-Dopaminrezeptorantagonist SCH23390 (0,1 mg/kg Körpergewicht; Sigma) oder einer der D1/D5-Dopaminrezeptorantagonisten SKF38393 (5 mg/kg; Sigma), SKF83822 (0,625 mg/kg; Sigma) und SKF83959 (2,5 mg/kg; Sigma) intraperitoneal verabreicht.

#### **2.2.5.5 Genotypisierung**

##### **2.2.5.5.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

**Invisorb® Spin Tissue Mini Kits (Invitek)**  
**Proteinase K (Invitek)**  
**Desoxynukleosidtriphosphat Set (dNTPs) (Fermentas)**  
**Oligonucleotide (Primer) (Biomers)**  
**Magnesiumchlorid (Quiagen)**  
**10xPCR-Puffer (Quiagen)**  
**Q-Solution (Quiagen)**  
**Taq DNA Polymerase (Quiagen)**

Nach Beendigung der Verhaltensexperimente wurden die  $\alpha$ -Synuclein-defizienten Mäuse (C57BL/6JOLA<sup>Hsd</sup>) und Wildtypmäuse (C57BL/6JCrI bzw. C57BL/6JR<sup>ccHsd</sup>) genotypisiert (Siegmond *et al.*, 2005). Dafür wurden die Schwanzspitzen der Mäuse zunächst in 40  $\mu$ l Proteinase K (Invitek) mit 400  $\mu$ l Lysis Buffer G (Invisorb® Spin Tissue Mini Kit/Invitek) über Nacht bei 52 °C lysiert. Danach erfolgte die Elution der DNA mittels des Invisorb® Spin Tissue Mini Kits (Invitek) gemäß dem Protokoll des Herstellers. Die PCR wurde mit 21  $\mu$ l des Mastermixes für Wildtyp und  $\alpha$ -Synuclein-defiziente Mäuse mit frisch hinzugefügter Taq

Polymerase und 4 µl des DNA-Eluates durchgeführt. Die finalen Konzentrationen der PCR-Reagenzien waren: 1 pM Forward Primer, 1 pM Reverse Primer (vgl. Tab. 2.6 für die Sequenzen), 2,5 mM Magnesiumchlorid, 0,1 Units/µl Taq-Polymerase, 0,2 mM dNTPs in 5xQ-Solution und 10xPCR Buffer. Der Temperaturverlauf der PCR ist in Tabelle 2.7 dargestellt.

**Tab. 2.6: Primerssequenzen für die Genotypisierung von  $\alpha$ -Synuclein-defizienten Mäusen (nach Siegmund *et al.*, 2005)**

Primer	Sequenz
NR 001 ( <i>Forward</i> )	ATCGGAGTTCTTCAGAAGCC
NR 002 ( <i>Reverse</i> )	CTTTTGTCTTTCCAGCTGCC

**Tab. 2.7: PCR-Programm für die Genotypisierung von  $\alpha$ -Synuclein-defizienten Mäusen**

Prozess	Zeit und Temperatur	Zyklen
<i>Initial denaturation</i>	2 min bei 95 °C	1
<i>Denaturation</i>	30 s bei 94 °C	33
<i>Annealing</i>	30 s bei 60 °C	
<i>Extension</i>	1 min 10 s bei 72 °C	
<i>Final extension</i>	7 min bei 72 °C	

### 2.2.5.5.2 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose (Biozym LE)

50xTAE:

40 M Tris (Roth)  
0,2 mM Essigsäure (Roth)  
1 mM EDTA (Roche) (pH 7,6)

Ethidiumbromid-Lösung:

1 mg/ml (Roth)

6xDNA-Probenpuffer:

30% (v/v) Glycerol (Roth)  
0,25% (w/v) Bromphenolblau (Serva)  
0,25% (w/v) Xylencyanol (Roth)  
50 mM EDTA (Roche) (pH 8,0)

DNA-Molekulargewichtsmarker: GeneRuler™ 1 kb DNA Leiter (Fermentas)

Die Trennung der Nukleinsäuren für die Genotypisierung erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Um die DNA mittels UV-Licht detektieren zu können, wurde 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zu den 1%igen (w/v) Agarosegelen hinzugegeben. Die Proben wurden mit 6xDNA-Probenpuffer auf die Gele geladen. GeneRuler™ 1 kb DNA Leiter diente als Standardreferenz. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte bei einer konstanten Spannung von 65 V pro Gel. Die anschließende Visualisierung geschah mit dem Dokumentationssystem Gel Doc (BioRad). Es ergab sich bei  $\alpha$ -Synuclein exprimierenden Mäusen eine Bande von 1200 bp; Proben der  $\alpha$ -Synuclein-defizienten Mäuse enthielten diese Bande nicht.

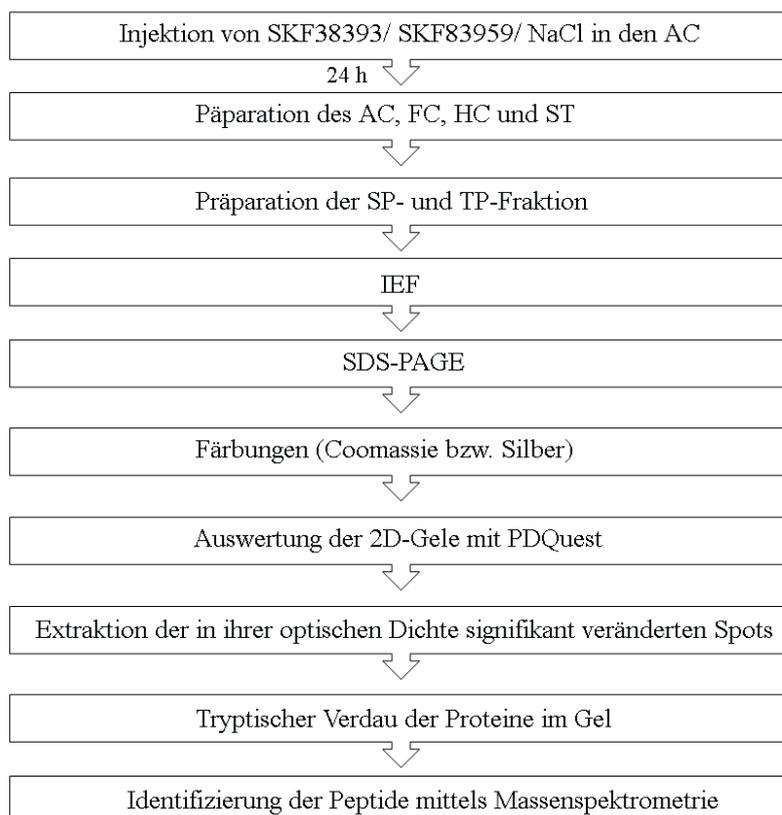
### **2.2.6 Statistische Auswertung**

Bei den statistischen Analysen wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  zu Grunde gelegt. Die statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Programm StatView 5.0.1 (SAS). OD-Werte der Spots von 2D-Gelen sowie ECL-Signale von Immunblots wurden mittels des Mann-Whitney  $U$ -Tests auf Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen geprüft. Die in immunzytochemischen Untersuchungen und in Verhaltensexperimenten gewonnenen Daten wurden einer Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messungen unterzogen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Dopaminerg vermittelte Proteomänderungen im Gerbilhirn

Frühere Studien am Gerbil zeigten, dass lokale Aktivierung von D1/D5-Dopaminrezeptoren mittels SKF38393 im Hörkortex proteinsyntheseabhängige Veränderungen induziert, die über ein bis zwei Tage anhalten und die Gedächtnisbildung im FM-Diskriminierungsparadigma erleichtern (Schicknick *et al.*, 2008). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war daher das Auffinden von Hirnstrukturen und Kandidatenproteinen, die potentiell an dopaminergen, im Hörkortex induzierten gedächtnisunterstützenden Prozessen beteiligt sind. Abbildung 3.1. zeigt das experimentelle Vorgehen. Einen Tag nach Injektion von SKF38393 oder Vehikel in den Hörkortex (AC) von Gerbils wurden die Hirnregionen AC, Frontalkortex (FC), Hippokampus (HC) und Striatum (ST) entnommen. Daraus angereicherte Proteine einer löslichen (TP) bzw. synaptischen Fraktion (SP) wurden mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt, aus differenziell regulierten Spots extrahiert und massenspektrometrisch identifiziert. Ein analoges Experiment mit dem D1/D5-Agonisten SKF83959 sollte eine Abschätzung der Beteiligung PLC-vermittelter dopaminergere Signalwege im AC für die Modulation solcher Prozesse erlauben. Dieses wurde durch Ulrike Herrmann im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt (Herrmann, 2011).



**Abb. 3.1:** Ablaufschema zur Gewinnung von Peptiden für die massenspektrometrische Analyse.

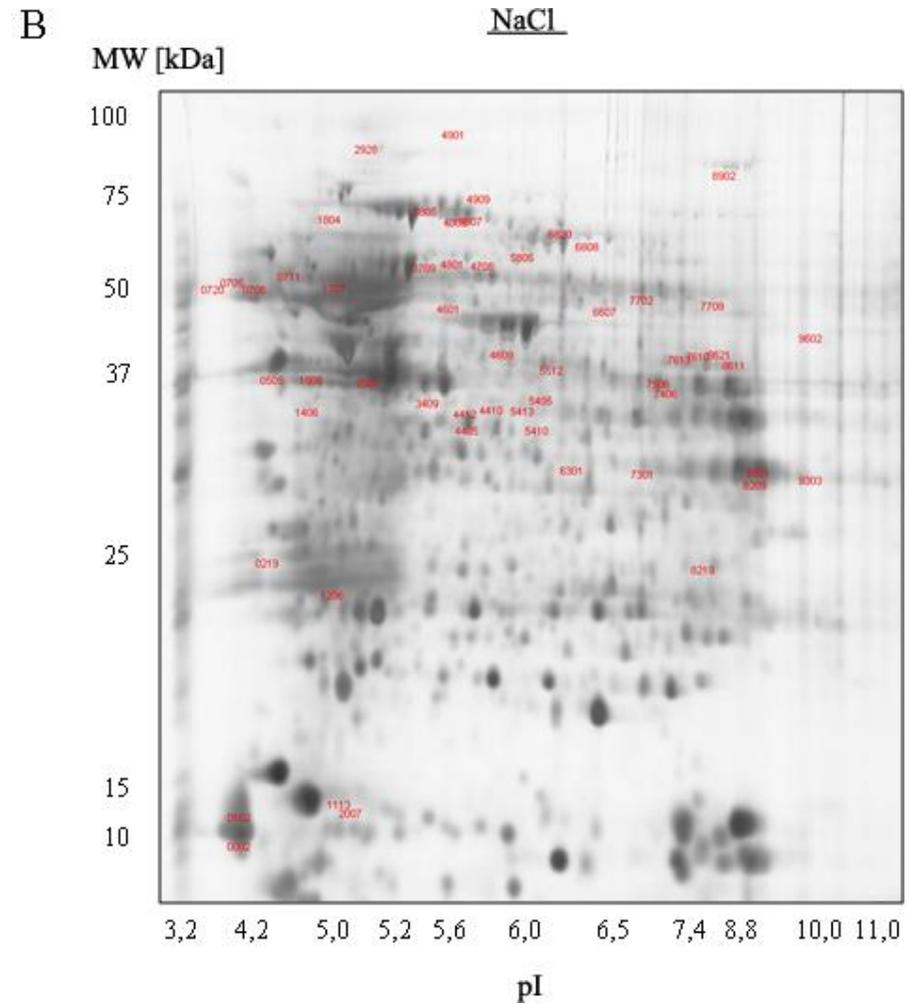
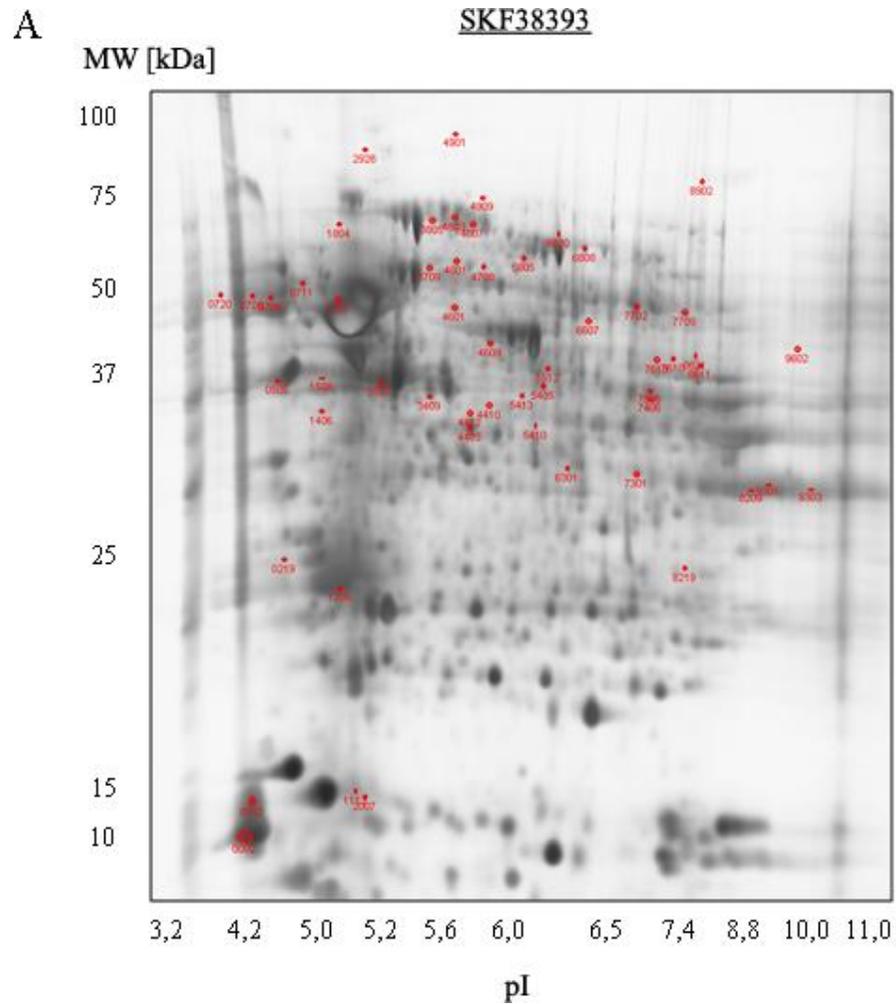
### 3.1.1 Proteintrennung und -quantifizierung

Proteine der TP- und SP-Fractionen der einzelnen Hirnregionen wurden durch 2D-Gelelektrophorese bezüglich ihres isoelektrischen Punktes (erste Dimension: IEF) und Molekulargewichtes (zweite Dimension: SDS-PAGE) aufgetrennt. Nach Silber- oder Coomassiefärbung der Gele waren die Proteine als dunkle Punkte (Spots) sichtbar. Alle Gele wurden anschließend digitalisiert.

Mit Hilfe der Software PDQuest erfolgten die Quantifizierung der optischen Dichte (OD) der einzelnen Spots und ein erster statistischer Vergleich der ODs der Agonist-behandelten Gruppen mit denen der entsprechenden Vehikel-behandelten Kontrollgruppe zwecks Auswahl von potentiell für weiterführende Untersuchungen interessanten Spots. Spots, deren ODs durch einen der von PDQuest unterstützten statistischen Tests mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,1$  als zumindest tendenziell verändert ermittelt worden waren, wurden mit einer Nummer gekennzeichnet. Sie bildeten das Ausgangsmaterial für die massenspektrometrische Analyse (vgl. Abschnitt 3.1.2). Ferner wurde für jeden dieser Spots die OD relativ zum entsprechenden Kontrollwert berechnet. Mit diesen normierten OD-Werten kann leichter eine Aussage über die Regulation im Vergleich zur Kontrollgruppe getroffen werden (Regulation = Mittelwert der OD der Agonist-behandelten Gruppe dividiert durch den Mittelwert der OD der entsprechenden Vehikel-behandelten Gruppe).

Abbildung 3.2 zeigt exemplarisch silbergefärbte 2D-Gele der TP-Fraktion des HC 24 h nach Injektion von SKF38393 bzw. Vehikel in den Hörkortex. Durch PDQuest-Analyse ermittelte potentiell regulierte Spots sind durch einen roten Punkt markiert. Für die gezeigten Gele des HC nach Applikation von SKF38393 wurden für die TP-Fraktion 51 Spots bezüglich ihrer ODs als unterschiedlich von der entsprechenden Kontrollgruppe ermittelt.

Um Informationen über die Identität der Proteine in regulierten Spots zu erhalten, wurden diese aus den Gelen extrahiert, mit Trypsin verdaut und die sich daraus ergebenden Peptide mit Hilfe der Massenspektrometrie (in Kollaboration mit PD Dr. Thilo Kähne, Otto-von-Guericke-Universität in Magdeburg) analysiert.



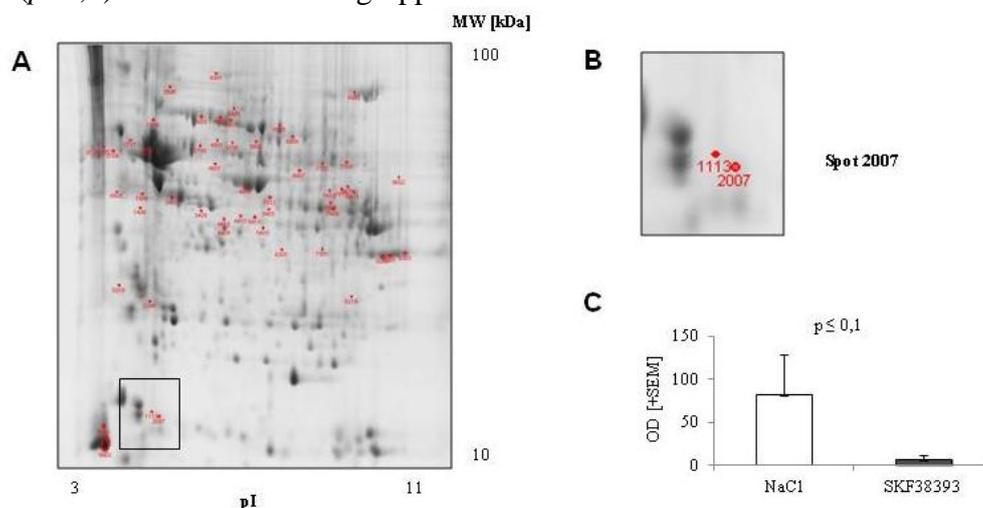
**Abb. 3.2:** Silbergefärbte 2D-Gele mit Proteinen der TP-Fraktion des Hippokampus 24 h nach Injektion von SKF38393 (A) oder Vehikel (B) in den Hörkortex von Gerbils. Die Trennbereiche bezüglich des isoelektrischen Punktes (pI) und des Molekulargewichtes (MW) sind angegeben. Spots, deren ODs nach PDQuest-Analyse Behandlungsunterschiede aufwiesen ( $p \leq 0,1$ ), sind rot markiert.

### 3.1.2 Massenspektrometrische Identifizierung von Proteinen

Die im Folgenden ausgeführte massenspektrometrische Analyse der tryptischen Peptide sollte Aufschluss darüber geben, welche Proteine der untersuchten Hirnregionen AC, FC, HC und ST 24 h nach Gabe eines der Dopaminrezeptoragonisten in den Hörkortex aus solchen Spots extrahiert wurden, die Veränderungen im Vergleich zur entsprechenden Vehikel-behandelten Kontrollgruppe aufwiesen.

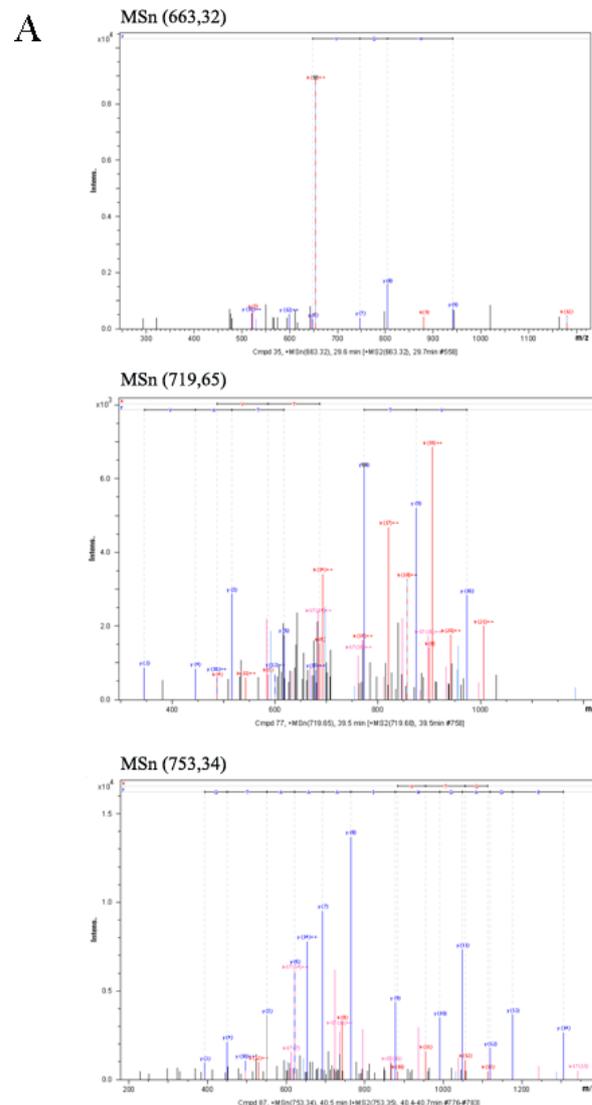
Die ermittelten Spektren wurden durch die Software ProteinScape® (Bruker Daltonics) katalogisiert. Über eine Verbindung zum Mascot Server (Matrix Science) erfolgte der Abgleich des experimentellen Massenspektrums mit der Proteindatenbank UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). Damit wurden die aus dem jeweiligen Spot extrahierten Proteine identifiziert. Ferner wurde die Qualität dieser Identifizierung durch eine Wertung ("Score") der Angaben beurteilt. Die Ergebnisse dieser Suche wurden dann an ProteinScape rückübermittelt. Pro untersuchtem Spot wurden meist mehrere Proteine mit unterschiedlich hohen Scores ermittelt. Ein Score von 40 stellte den Grenzwert dar, d.h. Daten mit Scores < 40 wurden nicht in die weitere Auswertung einbezogen. Des Weiteren wurde der prozentuale Anteil der identifizierten Peptide am Gesamtprotein angegeben.

Spot 2007 in 2D-Gelen der TP-Fraktion des HC sei hier als Beispiel für die Gel-Analyse und massenspektrometrische Proteinidentifizierung herausgegriffen. Wie in Abbildung 3.3 gezeigt, war die mittlere OD dieses Spots in der SKF38393-behandelten Gruppe tendenziell niedriger ( $p \leq 0,1$ ) als in der Kontrollgruppe.



**Abb. 3.3: Beispiel für die 2D-Gel-Analyse.** In der TP-Fraktion des Gerbil-HC war die mittlere OD des Spots 2007 24 h nach Injektion von SKF38393 in den Hörkortex tendenziell niedriger als nach Injektion von Vehikel (NaCl). (A) Coomassiegefärbtes 2D-Gel; (B) Vergrößerter Ausschnitt des 2D-Gels mit dem Spot 2007; (C) Vergleich der mittleren ODs (+ S.E.M) des Spots 2007 der SKF38393- bzw. Vehikel-behandelten Gruppe.

In Abbildung 3.4 ist die massenspektrometrische Identifizierung eines der aus diesem Spot extrahierten Proteine dokumentiert. Es wurden drei Peptide identifiziert, die mit einem *Score* von 140 dem Protein  $\alpha$ -Synuclein zuzuordnen waren.



**B**

663,32 m/z: **KEGVVHGVTTVAEKT**  
 719,65 m/z: **KTKEQVTVN VGGAVVTGVTAVAQKT**  
 753,34 m/z: **KTVEGAGNIAAATGFVKK**

**C**

MDVFMKGLSKAKEGVVAAA E KTKQGVAEAA  
 GKTKEGVLYVGSKT**KEGVVHGVTTVAEKTKE**  
**QVTVN VGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGNIAAATG**  
**FVKKD**QMGKGEEGYPQEGILEDMPVDPGSEA  
 YEMPSEEGYQDYEPEA

**Abb. 3.4: Beispiel für die massenspektrometrische Identifizierung eines Proteins.** Aus Spot 2007 des in Abbildung 3.3 gezeigten Beispiel-Gels wurden 3 Peptide extrahiert, die dem Protein  $\alpha$ -Synuclein zuzuordnen sind. **(A)** Massenspektren; **(B)** identifizierte Peptidsequenzen; **(C)** Vergleich der identifizierten Peptidsequenzen (farbig markiert wie in B) mit der Aminosäuresequenz von  $\alpha$ -Synuclein [*Mus musculus*].

### 3.1.3 Rohdaten

Tabelle 3.1 zeigt die Anzahl der in die massenspektrometrische Analyse eingegangenen Spots und der darin identifizierten Proteine. Aus der initialen Analyse mittels PDQuest gingen 376 Spots nach SKF38393-Behandlung und 457 Spots nach SKF83959-Behandlung hervor, die im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,1$  veränderte OD-Werte aufwiesen. Mittels der Massenspektrometrie wurden innerhalb dieser Spots insgesamt 1676 Proteine nach SKF38393 bzw. 2064 Proteine nach SKF83959 identifiziert.

**Tab. 3.1: Anzahl der nach initialer PDQuest-Analyse pro Hirnregion und Proteinfraction ermittelten Spots und der darin massenspektrometrisch identifizierten Proteine 24 h nach Injektion von SKF38393 bzw. SKF83959 in den Hörkortex von Gerbils**

Hirnregion Proteinfraction	SKF38393		SKF83959	
	Anzahl Spots	Anzahl Proteine	Anzahl Spots	Anzahl Proteine
AC SP	82	177	40	100
AC TP	68	261	56	216
FC SP	16	45	67	150
FC TP	26	138	61	173
HC SP	34	133	56	290
HC TP	53	428	75	365
ST SP	30	84	60	438
ST TP	67	410	42	332

### 3.1.4 Vergleichende Analyse der Proteomdaten

#### 3.1.4.1 Anzahl regulierter Spots – regionale Unterschiede

Vor den nachfolgend beschriebenen vergleichenden Untersuchungen erfolgte eine weitere, verifizierende statistische Analyse der OD-Werte der aus Agonist- und Vehikel-behandelten Gruppen stammenden Spots mittels des Mann-Whitney *U*-Tests. In Tabelle 3.2 A sind für die verschiedenen Hirnregionen und Agonisten die Anzahlen solcher Spots aufgelistet, deren OD-Werte Gruppenunterschiede mit statistischer Signifikanz ( $p < 0,05$ ) in diesem Test aufwiesen. Insgesamt wurden nach Injektion von SKF38393 in den Hörkortex mehr signifikant regulierte Spots (171) ermittelt als nach SKF83959-Injektion (117). Dabei waren Behandlungsunterschiede im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe nicht nur in Extrakten aus dem Hörkortex selbst, also dem Zielareal der Injektionen, nachweisbar, sondern auch in den Extrakten, die aus den drei entfernteren Hirnregionen gewonnen worden waren.

**Tab. 3.2: Anzahl der nach verifizierendem *U*-Test pro Hirnregion ermittelten Spots 24 h nach Injektion von SKF38393 bzw. SKF83959 in den Hörkortex von Gerbils**

	Hirnregion	Anzahl Spots		
		SKF38393	SKF83959	SKF38393/SKF83959
<b>A</b> ( $p < 0,05$ )	<b>AC</b>	60	33	1,82
	<b>FC</b>	19	37	0,51
	<b>HC</b>	36	30	1,20
	<b>ST</b>	56	17	3,29
<b>B</b> ( $p \leq 0,1$ )	<b>AC</b>	100	49	2,04
	<b>FC</b>	25	68	0,37
	<b>HC</b>	67	54	1,24
	<b>ST</b>	75	42	1,79

Bei näherer Betrachtung der in den einzelnen Hirnregionen ermittelten Zahlen werden interessante Unterschiede deutlich. Nach SKF38393-Injektion in den AC waren die meisten signifikant regulierten Spots im AC selbst und im ST nachweisbar, die wenigsten im FC. Dagegen waren nach SKF83959-Injektion in den AC die meisten signifikant regulierten Spots im FC und die wenigsten im ST detektiert worden. Zur besseren Verdeutlichung regionaler Unterschiede in den Proteomveränderungen nach lokaler Injektion der unterschiedlichen Dopaminagonisten in den Hörkortex wurde für jede Region ein Quotient aus der Zahl signifikant regulierter Spots nach SKF38393-Behandlung und der nach SKF83959-Behandlung ermittelten Zahl gebildet (Tab. 3.2). Dieser Quotient liegt für AC und ST deutlich über 1, für FC dagegen deutlich unter 1.

Gemessen an der Anzahl signifikant regulierter Spots induziert also die Aktivierung von D1/D5-Dopaminrezeptoren im AC mittels SKF38393 die deutlichsten Proteomveränderungen im AC selbst und im ST, wesentlich geringere Veränderungen dagegen im FC. Umgekehrt zieht die lokale Injektion von SKF83959 in den AC die stärksten Proteomveränderungen im FC und die geringsten im ST nach sich.

### 3.1.4.2 Proteine in regulierten Spots – regionale und molekulare Unterschiede

Für die anschließenden Betrachtungen auf Proteinebene ist zu beachten, dass ein in 2D-Gelen nach Proteinfärbung durch Messung der optischen Dichte analysierter Spot mehrere, möglicherweise unterschiedlich regulierte Proteine enthalten kann, deren ODs mit unterschiedlicher Gewichtung in den Gesamtmesswert des Spots eingehen dürften. Das kann einerseits bedeuten, dass nicht alle in einem signifikant regulierten Spot enthaltenen Proteine auch gleichermaßen reguliert worden sein müssen. Andererseits ist es denkbar, dass in Spots,

die eine deutliche – aber statistisch nicht gesicherte – Regulation aufweisen, ein oder mehrere Proteine signifikant reguliert sein können, jedoch Veränderungen des OD-Gesamtwertes eines solchen Spots durch abweichend regulierte Proteine abgeschwächt wurden. Diese Annahme wird durch die für einzelne Beispiel-Proteine im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Immunblot-Analyse gestützt (vgl. 3.1.4.2.4). Bei striktem Ausschluss von Spots mit Gruppenunterschieden einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \geq 0,05$  würden daher möglicherweise wertvolle Daten potentieller Kandidatenproteine verloren gehen. Ein Hauptziel der vorliegenden Proteomstudie war es jedoch, mittels exploratorischer Analyse (Berkvist *et al.*, 2010) die Suche nach Kandidatenproteinen, die in die dopaminerge Modulation von Gedächtnisprozessen involviert sein könnten, im Hinblick auf künftige, über den Rahmen der vorliegenden Arbeit hinausgehende Untersuchungen zu erleichtern. Aus diesem Grund war es also wünschenswert, auch Proteine aus solchen Spots einzubeziehen, deren Regulation zwar nicht das Kriterium statistischer Signifikanz erreicht hat, aber doch eine deutliche Tendenz aufweist. Um das Risiko einer „Verwässerung“ behandlungsbedingter Unterschiede durch Einbeziehung solcher Spots abzuschätzen, wurden für die untersuchten Hirnregionen und Agonisten die Anzahlen all jener Spots analysiert, deren OD-Gruppenunterschiede im verifizierenden *U*-Test eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,1$  aufwiesen. Wie aus Tabelle 3.2 B ersichtlich wird, sind die behandlungsbedingten regionalen Unterschiede in der so ermittelten Anzahl regulierter Spots denen solcher Spots sehr ähnlich, deren OD-Gruppenunterschiede mit  $p < 0,05$  statistische Signifikanz aufwiesen. Daher wurden in die nachfolgenden Auswertungen auf Proteinebene die Daten von Spots einbezogen, deren Regulation im verifizierenden *U*-Test entweder mit  $p < 0,05$  statistische Signifikanz oder mit  $0,05 \leq p \leq 0,1$  eine deutliche, statistisch jedoch nicht gesicherte Tendenz aufwies.

Es wurden also solche Proteine von weiteren Analysen ausgeschlossen, deren Spots Regulationen mit Irrtumswahrscheinlichkeiten von  $p > 0,1$  aufwiesen. Ferner wurden Proteine nicht weiter berücksichtigt, wenn deren theoretisches Molekulargewicht (MW)  $> 100$  kDa war (Proteine dieser Größen sind unter den gegebenen experimentellen Bedingungen nicht nachweisbar) oder mehr als 10 kDa vom experimentell ermittelten MW des Spots abwich. Ebenso wurden Proteine mit einem isoelektrischen Punkt (pI) unter 3 oder über 11 nicht zu weiteren Auswertungen hinzugezogen. Die Proteine Keratin und Trypsin wurden als Verunreinigungen externen Ursprungs betrachtet und von weiteren Auswertungen ausgeschlossen. Weiterhin wurden Mehrfachnennungen von Proteinen mit derselben UniProt-

Eintragsnummer in einzelnen Spots korrigiert. Die Daten der nachfolgend berücksichtigten Proteine wurden in Tabelle 6.1 (enthalten auf der dieser Arbeit beigefügten DVD „Dopaminerge Modulation kortexabhängiger Lernprozesse- 6. Anhang“) unter Angabe von Agonist, Hirnregion, Proteinfraktion sowie Nummer und Regulation des Ursprungspots aufgelistet und nach Proteinnamen sortiert. Sie umfasst weiterhin die Eintragsnummer (*Accession Number*) in UniProt, den *Proteinscore* und die Anzahl der identifizierten Peptide. Ferner wurden aus der UniProt-Datenbank MW und pI der identifizierten Proteine entnommen; diese theoretischen Werte und die anhand der 2D-Gele experimentell ermittelten MW und pI der jeweiligen Spots sind ebenfalls in Tabelle 6.1 angegeben.

### 3.1.4.2.1 Proteinzahl

Somit gingen nach Behandlung mit SKF38393 644 identifizierte Proteine (aus 267 Spots) bzw. nach Behandlung mit SKF83959 682 Proteine (aus 213 Spots) in die nachfolgenden Auswertungen ein. In Tabelle 3.3 sind die Anzahlen der weiterhin berücksichtigten Proteine für die verschiedenen Agonisten und Hirnregionen gegenübergestellt.

**Tab. 3.3: Anzahl der pro Hirnregion und Proteinfraktion für weitere Auswertungen berücksichtigte Spots und Proteine 24 h nach Injektion von SKF38393 bzw. SKF83959 in den Hörkortex von Gerbils**

Hirnregion Proteinfraktion	SKF38393		SKF83959	
	Anzahl Spots	Anzahl Proteine	Anzahl Spots	Anzahl Proteine
AC SP	55	95	24	49
AC TP	45	97	25	86
FC SP	6	15	30	113
FC TP	19	55	38	141
HC SP	27	56	30	67
HC TP	40	123	24	54
ST SP	22	48	22	84
ST TP	53	155	20	88

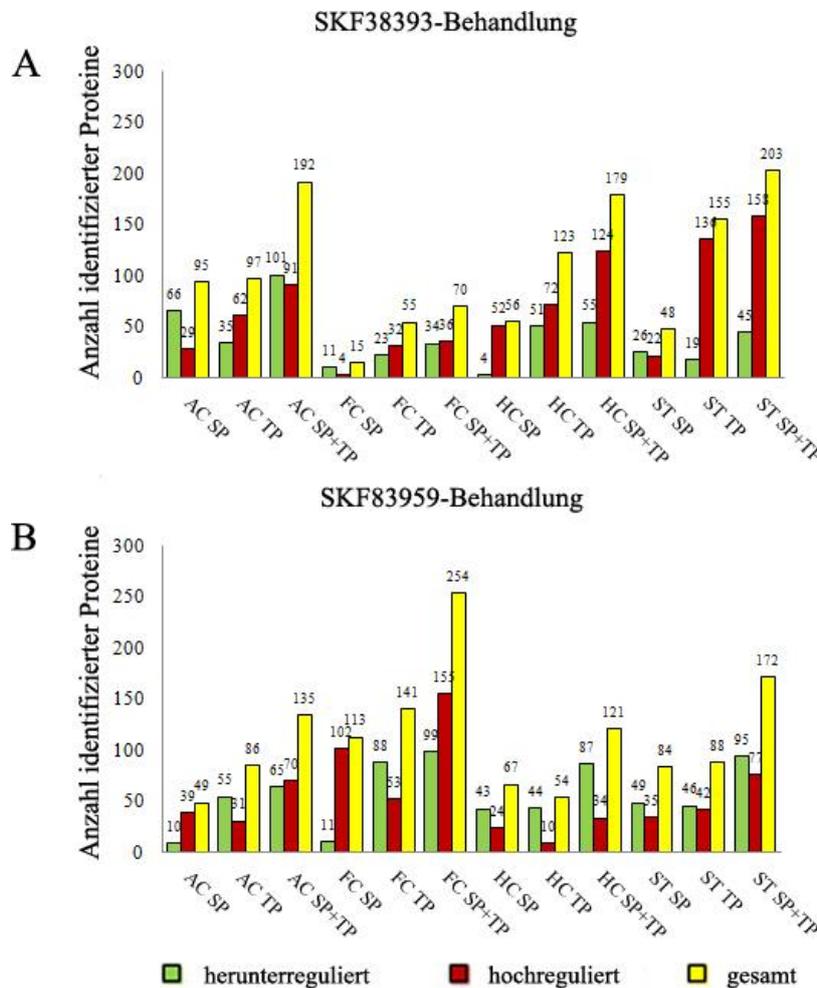
In Abbildung 3.5 sind die nach Injektion von SKF38393 oder SKF83959 in den Hörkortex von Gerbils in regulierten Spots ( $p \leq 0,1$ ) der untersuchten Hirnregionen und Proteinfractionen identifizierten Proteinzahlen vergleichend dargestellt. Nach Behandlung mit SKF38393 (Abb. 3.5 A) waren die meisten Proteine in regulierten Spots des ST (203 Proteine), AC (192 Proteine) und HC (179 Proteine) nachweisbar, die wenigsten (70 Proteine) im FC. Bei der Gegenüberstellung der vier Hirnregionen hinsichtlich der Zahl der nach SKF38393-Behandlung in hoch- bzw. herunterregulierten Spots identifizierten Proteine werden einige Unterschiede deutlich. Im HC und ST waren deutlich mehr Proteine in hoch- als in

herunterregulierten Spots nachweisbar. Eines dieser in hochregulierten Spots gefundenen Proteine der SP-Fraktion des HC stellt das neuronale zytoskelettale Protein NEFL (*neurofilament protein light*) dar. Im AC und FC dagegen waren die Proteinzahlen in hoch- und herunterregulierten Spots annähernd ausgeglichen. In der TP-Fraktion des AC konnte u.a. in hochregulierten Spots das multifunktionale Protein GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) sowie  $\alpha$ -Synuclein identifiziert werden. Weiterhin wurden in der SP-Fraktion des Hörkortex die Ribonukleoproteine hnRNP K und L (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins K/ L*) in herunterregulierten Spots detektiert werden. Beim Vergleich der SP- und TP-Fraktionen der vier Hirnregionen wird deutlich, dass im HC in beiden Fraktionen weniger Proteine in herunter- als in hochregulierten Spots detektiert wurden, wobei in der SP-Fraktion auffällig wenig Proteine (vier von insgesamt 56 Proteinen) in herunterregulierten Spots zu finden waren. In den Hirnregionen AC, FC und ST sind zwischen den Fraktionen gegenläufige Proteinzahlen in hoch- und herunterregulierten Spots identifiziert worden. Auffällig ist dabei jedoch, dass in den SP-Fraktionen dieser Hirnregionen stets mehr Proteine in herunterregulierten als in hochregulierten Spots bzw. in der TP-Fraktion mehr Proteine in hoch- als herunterregulierten Spots zu finden sind.

Nach Behandlung mit SKF83959 (Abb. 3.5 B) wurden insgesamt mehr Proteine als nach SKF38393 identifiziert. Die meisten Proteine wurden im FC detektiert (254 Proteine). Im ST wurden 172 Proteine und im AC 135 Proteine identifiziert. Im HC wurden mit 121 die wenigsten Proteine nach SKF83959 in regulierten Spots nachgewiesen. Dieses Ergebnis ist gegenläufig zur Proteomanalyse nach SKF38393, bei der die wenigsten Proteine im FC identifiziert wurden.

Beim Vergleich der vier Hirnregionen bezüglich der Zahl der nach SKF83959 in hoch- und herunterregulierten Spots identifizierten Proteine ist auffällig, dass im HC und ST eine Herunterregulation (HC: 87 herunterregulierte Proteine von 121 Proteinen, ST: 95 herunterregulierte Proteine von 172 Proteine), im FC dagegen eine Hochregulation zu überwiegen scheint (154 von 254 Proteinen). Im AC sind annähernd gleich viele Proteine (65 bzw. 70) in herunter- und hochregulierten Spots vorhanden. Bei der Betrachtung der SP- und TP-Fraktionen ist zu erkennen, dass im HC und ST eine Herunterregulation in der SP-Fraktion zu überwiegen scheint (HC: 43 herunterregulierte Proteine von 67 Proteinen in der SP-Fraktion; 44 herunterregulierte Proteine von 54 Proteinen in der TP-Fraktion; ST: 49 herunterregulierte Proteine von 84 Proteinen in der SP-Fraktion; 46 herunterregulierte

Proteine von 88 Proteinen in der TP-Fraktion). Im AC und FC liegt eine Gegenregulation innerhalb der beiden Fraktionen vor. In der SP-Fraktion ergibt sich eine Hochregulation (AC: 39 hochregulierte Proteine von 49 Proteinen; FC: 102 hochregulierte Proteine von 113 Proteinen), während in der TP-Fraktion eine Herunterregulation zu finden ist (AC: 55 herunterregulierte Proteine von 86 Proteinen; FC: 88 herunterregulierte Proteine von 141 Proteinen).



**Abb. 3.5:** Anzahl der nach Injektion von SKF38393 (A) oder SKF83959 (B) in den Hörkortex von Gerbils in regulierten Spots ( $p \leq 0,1$ ) der untersuchten Hirnregionen und Proteinfraktionen identifizierten Proteine.

Gemessen an der Anzahl der in regulierten Spots identifizierten Proteine induziert also die Aktivierung von D1/D5-Dopaminrezeptoren im Hörkortex mittels SKF38393 die deutlichsten Proteomveränderungen im AC, HC und ST, wesentlich geringere dagegen im FC. Umgekehrt zieht die lokale Injektion von SKF83959 in den Hörkortex die stärksten Veränderungen im FC, die geringsten dagegen im HC nach sich.

### 3.1.4.2.2 Anzahl von Proteinen, die in mehreren Spots identifiziert wurden

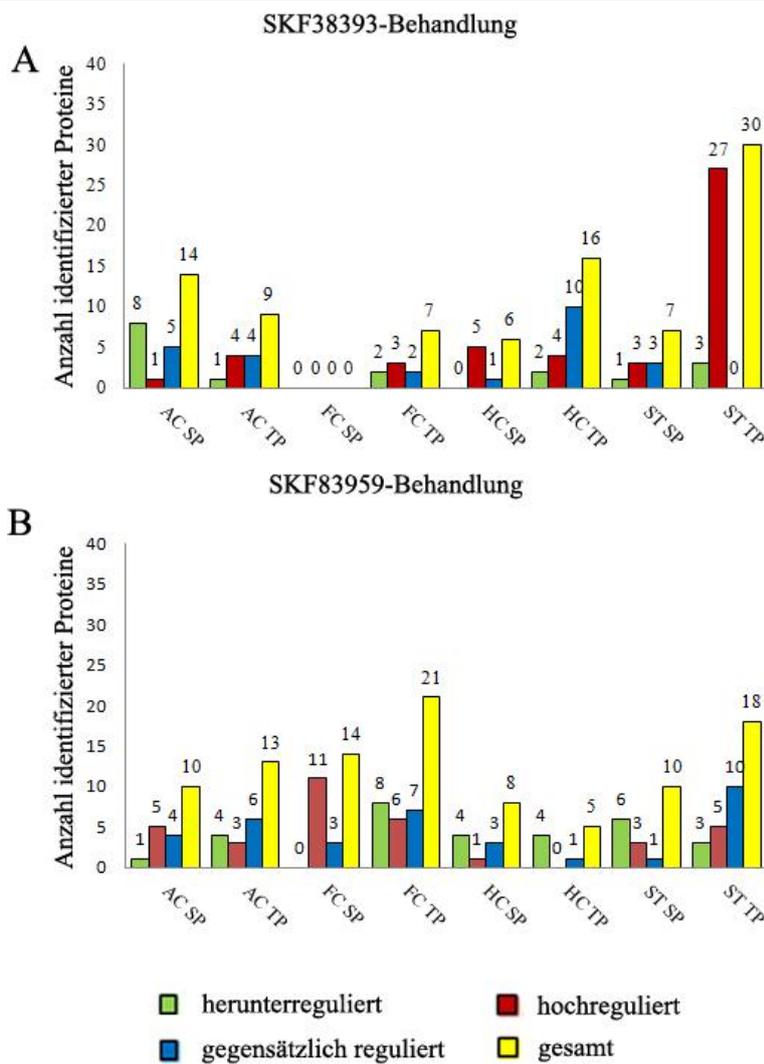
Posttranslationale Modifikationen führen in der Regel zu Veränderungen der elektrophoretischen Eigenschaften eines Proteins (Halligan *et al.*, 2009). So entstandene

Proteinisoformentypen können daher mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese separiert werden. Überwiegend ist dies die Ursache für das Auftreten eines Proteins in verschiedenen Spots in 2D-Gelen.

In den vorliegenden Untersuchungen wurden verschiedentlich Proteine in zwei oder mehreren Spots eines 2D-Gels identifiziert, die gleichsinnige oder gegensinnige Regulation aufweisen konnten. Als Kriterium für die Identität der Proteine wurden die UniProt-Eintragsnummern herangezogen. In Abbildung 3.6 ist die Anzahl der in mehreren Spots identifizierten Proteine und deren Regulation in den untersuchten Hirnregionen und Proteinfractionen nach Applikation von SKF38393 bzw. SKF83959 in den Hörkortex graphisch dargestellt. Nach SKF38393-Behandlung (Abb. 3.6 A) waren die meisten (37) dieser Proteine innerhalb des ST nachweisbar. AC und HC wiesen mit 23 bzw. 22 ebenfalls relativ hohe Zahlen an Proteinen auf, die in verschiedenen Spots identifiziert wurden, während der Frontalkortex durch die geringste Anzahl (7) solcher Proteine auffällt. Im Gegensatz dazu wurden nach SKF83959-Behandlung (Abb. 3.6 B) die meisten in mehreren Spots identifizierbaren Proteine im FC nachgewiesen (35 Proteine) und die wenigsten (13 Proteine) im HC.

Die Detektion eines Proteins in gegensinnig regulierten Spots dürfte mit hoher Wahrscheinlichkeit auf behandlungsbedingte Unterschiede im Grad und/oder in der Qualität seiner posttranslationalen Modifikation hinweisen. Die Anzahl solcher Proteine ist in Abbildung 3.6 in blau eingefärbten Säulen dargestellt. Nach SKF38393 (Abb. 3.6 A) waren die meisten in gegensinnig regulierten Spots identifizierten Proteine im HC (11) und AC (10), die wenigsten im FC (2) nachweisbar. Dagegen waren nach SKF83959 (Abb. 3.6 B) lediglich vier Proteine in gegensätzlich regulierten Spots des HC nachweisbar, aber 10-11 jeweils in Spots des AC, FC und ST.

Auf einzelne Proteine, die nach Injektion der Dopaminrezeptoragonisten in den Hörkortex in mehreren im Vergleich zur Kontrollgruppe veränderten Spots der jeweils untersuchten Proteinfraction und Hirnregion identifiziert wurden, wird in Tabelle 3.4. im folgenden Abschnitt 3.1.4.2.3 hingewiesen.



**Abb. 3.6:** Anzahl der nach Injektion von SKF38393 (A) oder SKF83959 (B) in den Hörkortex von Gerbils in zwei oder mehreren regulierten Spots ( $p \leq 0,1$ ) pro untersuchter Hirnregion und Proteinfraktion identifizierten Proteine.

### 3.1.4.2.3 Funktionelle Klassifizierung identifizierter Proteine

Die in Tabelle 6.1 aufgeführten, in regulierten Spots identifizierten Proteine wurden anhand von Kriterien funktionell klassifiziert, die der Datenbank SynProt (Pielot *et al.*, 2012; [www.synprot.de](http://www.synprot.de)) entlehnt wurden (vgl. auch Kähne *et al.*, 2012). Kategorie 1 stellen Proteine des Zytoskeletts, Gerüstproteine und ECM (Extrazelluläre Matrix)-Proteine dar („Zytoskelett-, Gerüst- und ECM-Proteine“). Hierzu gehören Aktin-, Tubulin- und Intermediärfilament-Isoformen und assoziierte Proteine, Gerüst- und Adapterproteine sowie Komponenten der extrazellulären Matrix. Zur Kategorie 2 zählen Proteine, die in Exozytose-, Endozytose- und Transportmechanismen involviert sind („Endozytose, Exozytose und Transport“). Dazu zählen u.a. auch präsynaptische Vesikelproteine. Kategorie 3 beinhaltet Proteine, die in Mechanismen der posttranslationalen Modifikation (ohne Kinasen und Phosphatasen) und/oder Proteindegradation involviert sind („Proteinmodifikation und/oder Degradation (ohne Kinasen/Phosphatasen)“). Kategorie 4 umfasst DNA-/RNA-bindende

Proteine, wie Transkriptions- und Translationsfaktoren sowie Regulatoren von RNA-Prozessierung und Transport („DNA- und RNA-bindende Proteine, Transkription, Translation“). Zur Kategorie 5 zählen Proteine der „Signaltransduktion“, wie Ionenkanäle, Kinasen/Phosphatasen und deren Regulatoren, GTPasen und deren Regulatoren sowie Kalziumbindungsproteine. Die Klasse 6 stellen „Chaperone und Hitzeschockproteine“ dar. In Kategorie 7 sind verschiedene „Regulatorische Proteine“ zusammengefasst und in Kategorie 8 „Mitochondriale Proteine und/oder Proteine des Energiemetabolismus“. Kategorie 9 umfasst „Gliale Proteine“ und die Kategorie 10 Proteine, die in die Biochemie niedermolekularer Verbindungen involviert sind („Biochemie niedermolekularer Verbindungen“). Unter Klasse 11 wurden Proteine mit hier nicht näher definierten bzw. mit unbekanntem Funktionen zusammengefasst („Andere/ unbekannt Funktion“).

In Abbildung 3.7 sind die Gesamtzahlen von Proteinen der einzelnen Kategorien dargestellt, die 24 h nach Dopaminrezeptoragonist-Injektion in den Hörkortex in regulierten Spots ( $p \leq 0,1$ ) der untersuchten Hirnregionen und Proteinfractionen identifiziert wurden. Sowohl nach SKF38393 als auch nach SKF83959 sind mit jeweils weit mehr als 100 Vertretern die Kategorien 1 (Zytoskelett-, Gerüst- und ECM-Proteine) und 8 (Mitochondriale Proteine und Proteine des Energiemetabolismus) am häufigsten detektiert worden.

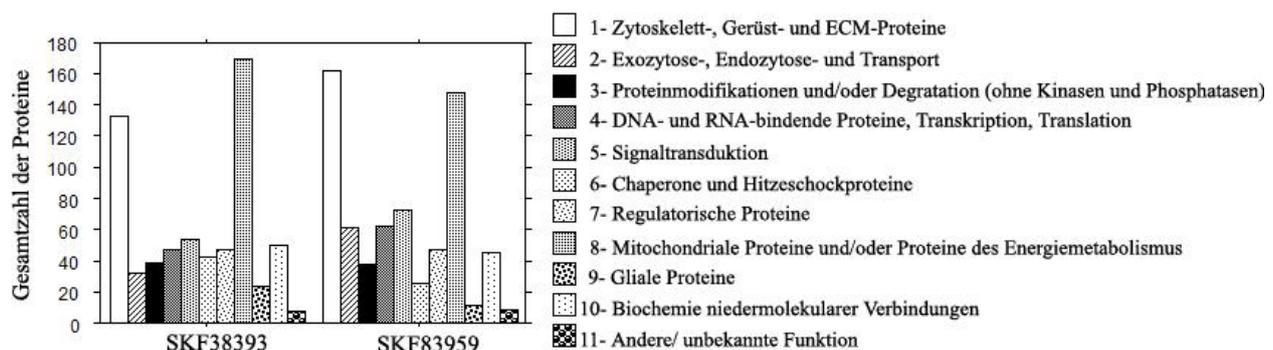
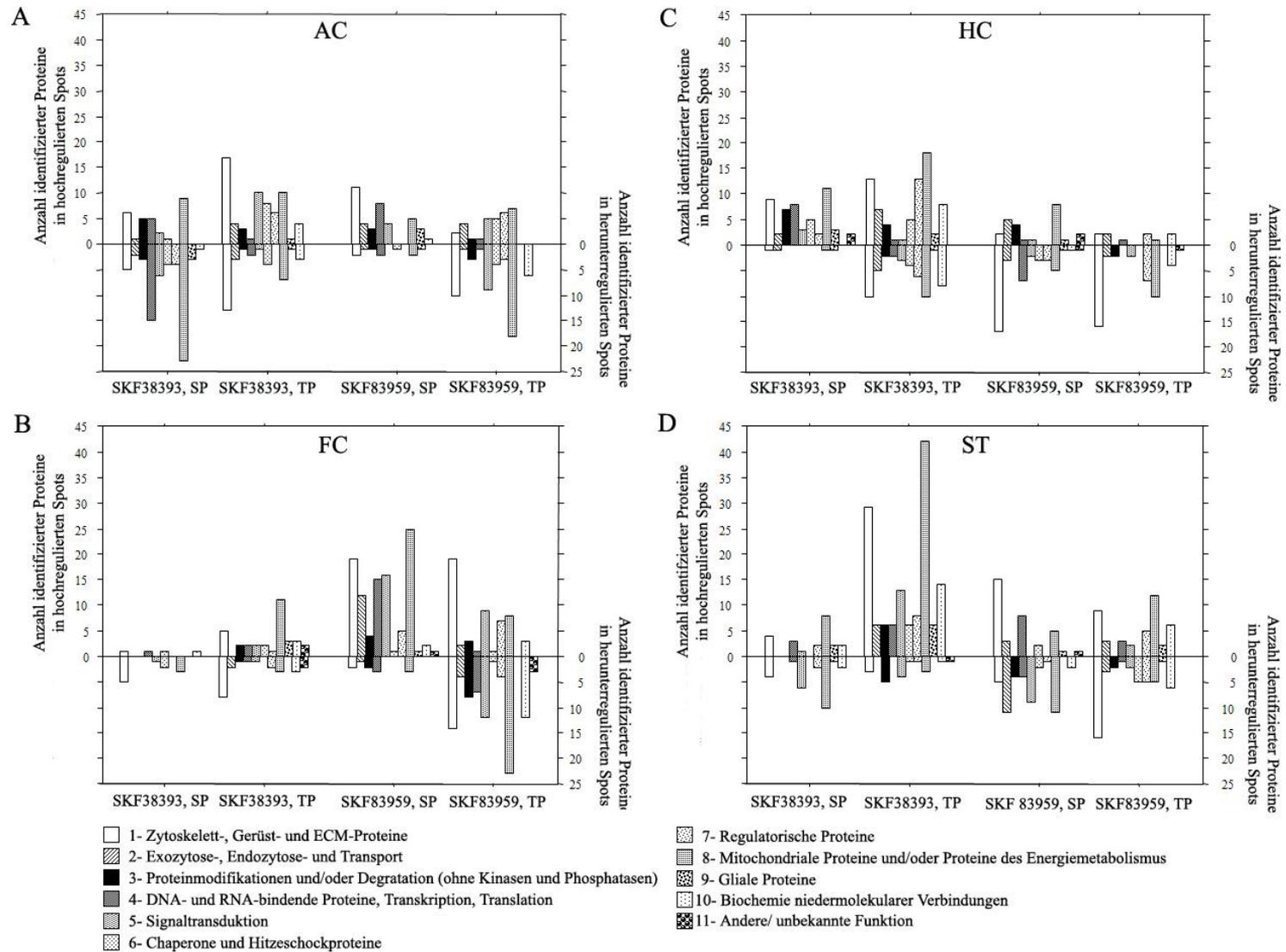


Abb. 3.7: Gesamtzahl der Proteine innerhalb der einzelnen Kategorien 1-11 nach SKF38393- bzw. SKF83959-Gabe in den Hörkortex von Gerbils in den regulierten Spots aller Hirnregionen und Proteinfractionen.



**Abb. 3.8:** Anzahl der Proteine verschiedener funktioneller Kategorien, die 24 h nach Injektion von SKF38393 oder SKF83959 in den Hörkortex von Gerbils in regulierten Spots ( $p \leq 0,1$ ) der untersuchten Proteinfraktionen im AC (A), FC (B), HC (C) und ST (D) identifiziert wurden.

Abbildung 3.8 zeigt die nach Agonistbehandlung für die verschiedenen Kategorien ermittelten Proteinzahlen aufgeschlüsselt nach Hirnregionen und Proteinfractionen. Darüber hinaus wird in Tabelle 3.4 ein Überblick über Vertreter der verschiedenen funktionellen Proteinkategorien gegeben, die in regulierten Spots der untersuchten Proteinfractionen und Hirnregionen 24 h nach Injektion von SKF38393 bzw. SKF83959 in den Hörkortex im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe identifiziert wurden. Richtung und statistische Signifikanz der Regulation der Ursprungssots wurden hier mittels einer Farb- und Buchstabenkodierung dargestellt. Rottöne/Großbuchstaben stehen für Regulation  $>1$ , Grüntöne/Kleinbuchstaben für Regulation  $<1$ . Satte Farben/Buchstaben „A“ oder „a“ stehen für statistisch signifikante Regulation ( $p < 0,05$ ), helle Farbtöne/Buchstaben „B“ oder „b“ für statistisch nicht gesicherte Trends ( $0,05 \leq p \leq 0,1$ ). Ferner weisen unterbrochene und durchgehende schwarze Umrahmungen von Feldern auf Proteine hin, die in mehreren gleichsinnig bzw. gegensinnig regulierten Spots von 2D-Gelen einer Hirnregion und Proteinfraction identifiziert wurden (vgl. 3.1.4.2.2). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in Tabelle 3.4 teilweise Daten (z. B. von Protein-Isoformen und -Familien) stark vereinfachend zusammengefasst. Auf die UniProt-Eintragsnummer und die experimentellen Originaldaten jedes einzelnen Proteins kann über Tabelle 6.1 (im Anhang) unter Zuhilfenahme von Proteinname, Agonist, Hirnregion und Proteinfraction zugegriffen werden. Diese Ergebnisse unterstützen die in den vorangegangenen Abschnitten (vgl. Tab. 3.2 und Abb. 3.5) beschriebenen Befunde und lassen die folgenden Schlüsse zu: Die Aktivierung dopaminergischer Rezeptoren im AC mittels SKF38393 induzieren die deutlichsten Proteomveränderungen im AC, HC und ST, die geringsten dagegen im FC, während umgekehrt die Injektion von SKF83959 in den AC die stärksten Veränderungen im FC und die geringsten im HC nach sich zieht.

Veränderungen in der SP-Fraction könnten Plastizitätsphänomene widerspiegeln, die mit veränderter synaptischer Kommunikation einhergehen. Einen Tag nach SKF38393-Injektion sind in der SP-Fraction des AC die meisten Proteine insbesondere der Kategorien 4 (DNA- und RNA-bindende Proteine, Transkription, Translation) und 8 (Mitochondriale Proteine und/oder Proteine des Energiemetabolismus) in herunterregulierten Spots detektiert worden (Abb. 3.8 A). In der SP-Fraction des HC dagegen wurden die meisten Proteine nach SKF38393-Injektion in den Hörkortex in hochregulierten Spots ermittelt (Abb. 3.8 C); hier waren die stärksten Veränderungen ebenfalls in den Kategorien 4 und 8, aber auch 1 (Zytoskelett-, Gerüst- und ECM-Proteine) auffällig. Interessanterweise scheint 24 h nach

SKF38393-Injektion in den AC eine Reihe nukleinsäurebindender Proteine (vornehmlich RNA-Prozessierungs- und -Transportproteine) in der synaptischen Fraktion des AC in herunterregulierten, in der des HC dagegen in hochregulierten Spots nachweisbar zu sein (vgl. Tab. 3.4). Im ST waren die prominentesten Veränderungen nach SKF38393-Injektion in den Hörkortex in der TP-Fraktion detektierbar (Abb. 3.8 D). Die meisten Proteine insbesondere der Kategorien 1 (Zytoskelett-, Gerüst- und ECM-Proteine) und 8 (Mitochondriale Proteine und/oder Proteine des Energiemetabolismus) waren hier in hochregulierten Spots ermittelt worden.

Einen Tag nach SKF83959-Injektion in den Hörkortex waren in der SP-Fraktion des AC zwar deutlich weniger Proteine identifiziert worden als nach SKF38393, die meisten davon aber in hochregulierten Spots. Dazu zählen insbesondere Proteine der Kategorien 1 (Zytoskelett-, Gerüst- und ECM-Proteine) und 4 (DNA- und RNA-bindende Proteine, Transkription, Translation). Verschiedene der nukleinsäurebindenden Proteine, die in der SP-Fraktion des AC nach SKF38393 in herunterregulierten Spots nachgewiesen worden waren, wurden nach SKF83959 in hochregulierten Spots detektiert (vgl. Tab. 3.4). Auffällig im Vergleich zur Behandlung mit SKF38393 ist ferner, dass nach SKF83959-Injektion in den Hörkortex eine Reihe dieser RNA-Prozessierungs- und -Transportproteine in der synaptischen Fraktion des HC eher abnimmt, dafür jedoch in der des FC deutlich angereichert zu sein scheint (vgl. Tab. 3.4).

Zusammenfassend weist eine funktionsbezogene Analyse der Anzahl von Proteinen in regulierten Spots darauf hin, dass sowohl die Injektion von SKF38393 als auch die von SKF83959 in den Hörkortex in erster Linie zu Veränderungen bei Zytoskelett-/Gerüstproteinen, Proteinen des Energiestoffwechsels, aber auch nukleinsäurebindenden Proteinen führt. Quantität und Richtung der in den verschiedenen Hirnregionen detektierten Proteomveränderungen scheinen dabei in hohem Maße von der Art des in den Hörkortex injizierten Agonisten abzuhängen. Zu beachten ist, dass diese Art der Auswertung möglicherweise wenig sensitiv ist für Veränderungen, die zahlenmäßig weniger prominent sind, bei denen aber die Funktion der betroffenen Proteine von besonderer Relevanz auf Verhaltensebene sein dürfte, wie z.B. Proteine der Kategorien 2 (Exozytose-, Endozytose- und Transport) und 5 (Signaltransduktion).









Tab. 3.4 (Fortsetzung)

Protein	SP-Fraktion								TP-Fraktion							
	SKF38393				SKF83959				SKF38393				SKF83959			
	AC	FC	HC	ST	AC	FC	HC	ST	AC	FC	HC	ST	AC	FC	HC	ST
<b>10. Biochemie niedermolekularer Verbindungen</b>																
2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase						B	b									
20-beta-hydroxysteroid dehydrogenase-like																
3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1																
Aflatoxin aldehyde reductase																
Aminoacylase-1A																
Aspartate aminotransferase isoforms	a															
Carbonyl reductase [NADPH] 1																
Citrate synthase																
Creatine kinase B-type																
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase																
Dihydrolipoyl dehydrogenase																
Dihydropteridine reductase																
Dimethylarginine dimethylaminohydrolase isoforms																
Ester hydrolase C11orf54 homolog																
Flavin reductase isoforms																
Glutamate dehydrogenase 1 variant																
Glutathione S-transferase isoforms																
Glyoxalase I																
Guanine deaminase																
Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protei																
Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase type II																
Hydroxypyruvate isomerase homolog																
Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase																
Inorganic pyrophosphatase																
Inositol-3-phosphate synthase																
Isovaleryl coenzyme A dehydrogenase																
Monoglyceride lipase																
Nitrilase homologs																
Nucleoside diphosphate kinase isoforms																
Phosphoglycolate phosphatase																
Phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phos																
Prostaglandin reductase 2																
Pyridoxal kinase																
Pyrophosphatase																
Pyrraline-5-carboxylate reductase 3																
Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1																
S-adenosylmethionine synthetase isoforms																
Selenophosphate synthetase																
Sialic acid synthase																
Superoxide dismutase																
<b>11. Andere/unbekannte Funktion</b>																
Canopy 2 homolog																
Hemoglobin subunits																
Lactoglobulin beta																
Long palate, lung and nasal epithelium carcinoma-associated p																
Low density lipoprotein receptor-related protein associated prot																
Protein CDV3 homolog																
R envelope protein																
UPF0510 protein INM02																
UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase																
WD repeat-containing protein 37																

A  $p < 0,05$ , B  $0,05 \leq p \leq 0,1$ : Spot-OD nach Agonist-Injektion > Spot-OD nach Vehikel-Injektion; a  $p < 0,05$ , b  $0,05 \leq p \leq 0,1$ : Spot-OD nach Agonist-Injektion < Spot-OD nach Vehikel-Injektion (Mann-Whitney *U*-Test).  
 Unterbrochen schwarz gerahmt: Proteine mit identischer UniProt-Eintragsnummer wurden in mehreren gleichsinnig veränderten Spots detektiert. Durchgehend schwarz gerahmt: Proteine mit identischer UniProt-Eintragsnummer wurden in mehreren gegensinnig veränderten Spots detektiert.

#### 3.1.4.2.4 Verifikation der Regulation ausgewählter Proteine mittels Immunblot

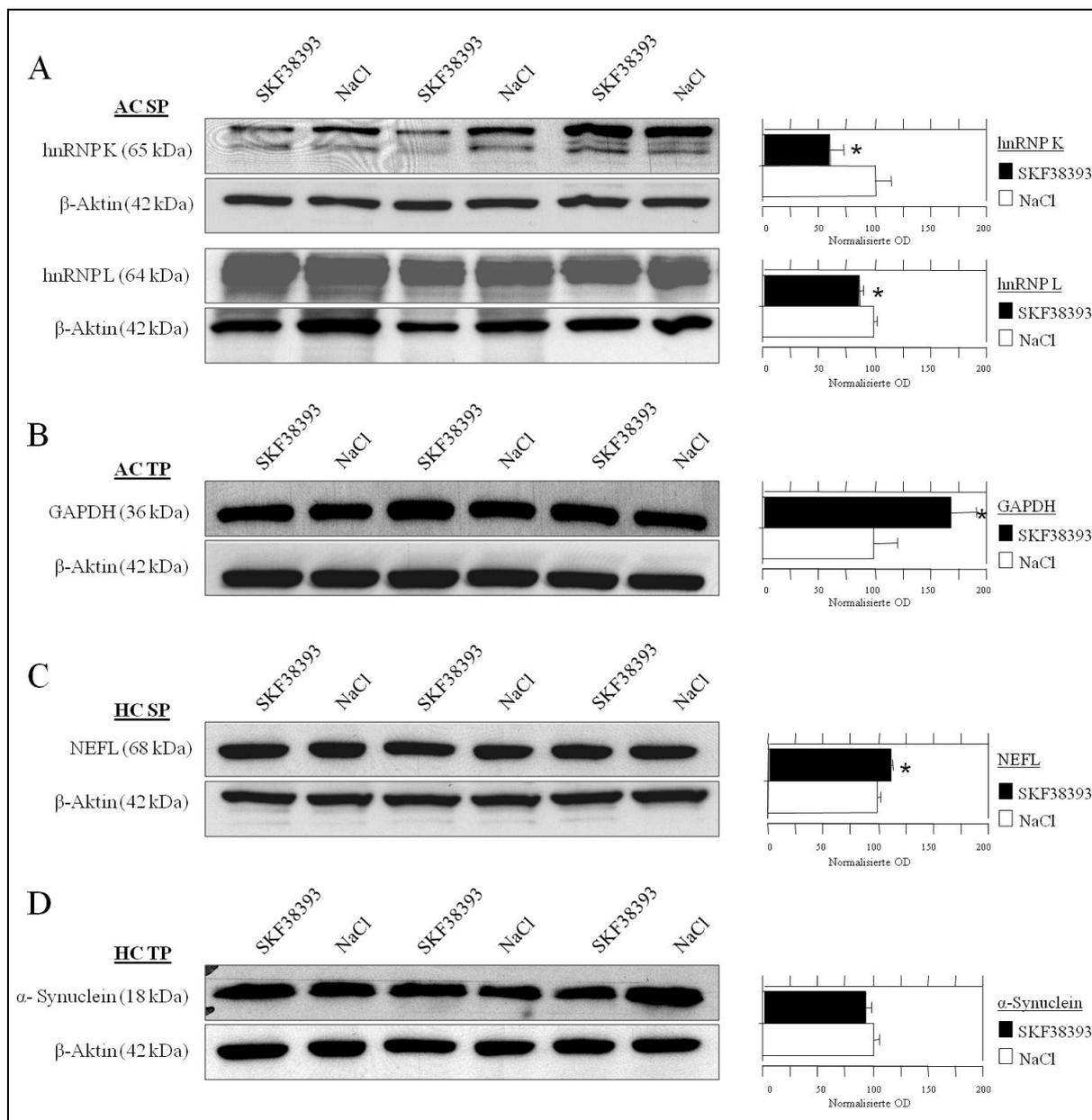
Die Regulation einiger der in der Proteomanalyse nach Aktivierung von D1/D5-Rezeptoren im Hörkortex in regulierten Spots detektierten Proteine wurde exemplarisch einer Validierung mittels Immunblot-Analyse unter Einsatz spezifischer Antikörper unterzogen.

Analog den Experimenten zur Proteomanalyse wurden die Untersuchungen an Gerbils durchgeführt, denen SKF38393 oder Vehikel lokal in den Hörkortex verabreicht worden waren ( $n=6$  pro Gruppe). Einen Tag später wurden AC, FC, HC und ST entnommen, Proteine der SP- und TP-Fractionen gewonnen (vgl. 2.2.2.1), mittels SDS-PAGE aufgetrennt (vgl. 2.2.2.3.1) und auf Nitrozellulosemembranen gebロットet (vgl. 2.2.2.7). Quantitative Immunblot-Analyse erfolgte mittels spezifischer Primärantikörper und der ECL-Detektionstechnik. Die Angleichung der einzusetzenden Proteinmengen erfolgte durch SDS-PAGE, Coomassiefärbung (2.2.2.4.1) und Quantifizierung mittels QuantityOne. Diese Coomassiegefärbten Gele (Abb. 6.1-6.2 im Anhang) wurden auch zur Normalisierung der ECL-Signale in den Immunblots herangezogen. Von Normalisierungen auf üblicherweise benutzte Referenzproteine, wie Aktin, Tubulin oder GAPDH, wurde abgesehen, weil Varianten dieser Proteine nach Lernexperimenten eine dynamische Regulation erfahren können (Monopoli *et al.*, 2011; Kähne *et al.*, 2012) bzw. in der vorliegenden Studie teilweise selbst Veränderungen in ihrer Abundanz nach D1/D5-Agonistbehandlung aufwiesen (vgl. Tab. 3.4). Dennoch wurde zur Kontrolle grober Beladungsfehler eine Aktin-Detektion für jeden Blot mitgeführt. Die statistische Analyse der normierten ECL-Signale hinsichtlich behandlungsbedingter Unterschiede erfolgte mit dem Mann-Whitney *U*-Test.

In Abbildung 3.9 sind die Ergebnisse der Immunblot-Analyse zusammenfassend dargestellt. Mittels Proteomanalyse (vgl. Tab. 3.4). waren die Ribonukleoproteine hnRNP K und L in der SP-Fraktion des AC nach Behandlung mit SKF38393 im Vergleich zur Kontrollgruppe in statistisch signifikant ( $p<0,05$ ) herunterregulierten Spots detektiert worden. Diese Befunde werden durch die Immunlot-Analyse unter Einsatz spezifischer Antikörper zum Nachweis von hnRNP K bzw. hnRNP L bestätigt (Abb. 3.9 A). Nach Proteomanalyse war GAPDH in der TP-Fraktion des AC nach SKF38393 in einem tendenziell ( $p<0.1$ ) hochregulierten Spot identifiziert worden (vgl. Tab. 3.4). Diese Regulation wird durch die Immunblot-Analyse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p<0,05$  verifiziert (Abb. 3.9 B). Ferner war NEFL mittels Proteomanalyse in der SP-Fraktion des HC nach SKF38393-Injektion in den AC in tendenziell ( $p<0.1$ ) hochregulierten Spots identifiziert worden (vgl. Tab. 3.4). Die Regulation

dieses Proteins konnte mittels Immunblot-Analyse ebenso mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  bestätigt werden (Abb. 3.9 C). Die beiden letztgenannten Beispiele stützen die eingangs zum Abschnitt 3.1.4.2 gemachte Annahme, dass in 2D-Gelen Spots mit deutlich – aber statistisch nicht gesichert – veränderten OD-Werten einzelne Proteine enthalten können, deren Abundanz in der betreffenden Fraktion statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen aufweist.

Einen Tag nach Injektion von SKF38393 in den AC wurde das Protein  $\alpha$ -Synuclein in der TP-Fraktion des AC in einem signifikant hochregulierten Spot, in der TP-Fraktion des HC dagegen in einem tendenziell herunterregulierten Spot identifiziert (vgl. Tab. 3.4). Diese Befunde, die auf eine gegenläufige Regulation eines vorwiegend präsynaptisch lokalisierten, Vesikel-assoziierten Proteins im AC und im HC hinzuweisen schienen, wurden mittels Immunblot-Analyse überprüft. Es zeigte sich, dass die 24 h nach SKF38393-Injektion in den Hörkortex aufgrund der Proteomanalyse vermutete Veränderung der  $\alpha$ -Synuclein-Abundanz in der TP-Fraktion des HC im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht bestätigt werden konnte (Abb. 3.9 D). Im AC dagegen, also in der Zielregion der Dopaminagonist-Injektion, war in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Proteomanalyse eine signifikante Hochregulation der  $\alpha$ -Synuclein-Abundanz in der TP-Fraktion nachweisbar. Diese Befunde und daran anknüpfende weiterführende Untersuchungen zur dopaminergen Regulation und potenziellen Rolle von  $\alpha$ -Synuclein für FM-Diskriminierungslernen werden im folgenden Teil der vorliegenden Arbeit vorgestellt (Abschnitt 3.2).



**Abb. 3.9: Immunblot-Analyse ausgewählter Proteine 24 h nach Injektion von SKF38393 oder Vehikel (NaCl) in den AC von Gerbils.** (A) SP-Fraktion des AC; (B) TP-Fraktion des AC, (C) SP-Fraktion des HC; (D) TP-Fraktion des HC. Links: Immunblots mit ECL-Signalen der untersuchten Proteine. Rechts: Normierte ECL-Signale (OD) relativ zur Kontrollgruppe; Mittelwerte + S.E.M.;  $n=6$  je Gruppe; \*  $p<0,05$  signifikant verschieden von NaCl (Mann-Whitney  $U$ -Test).

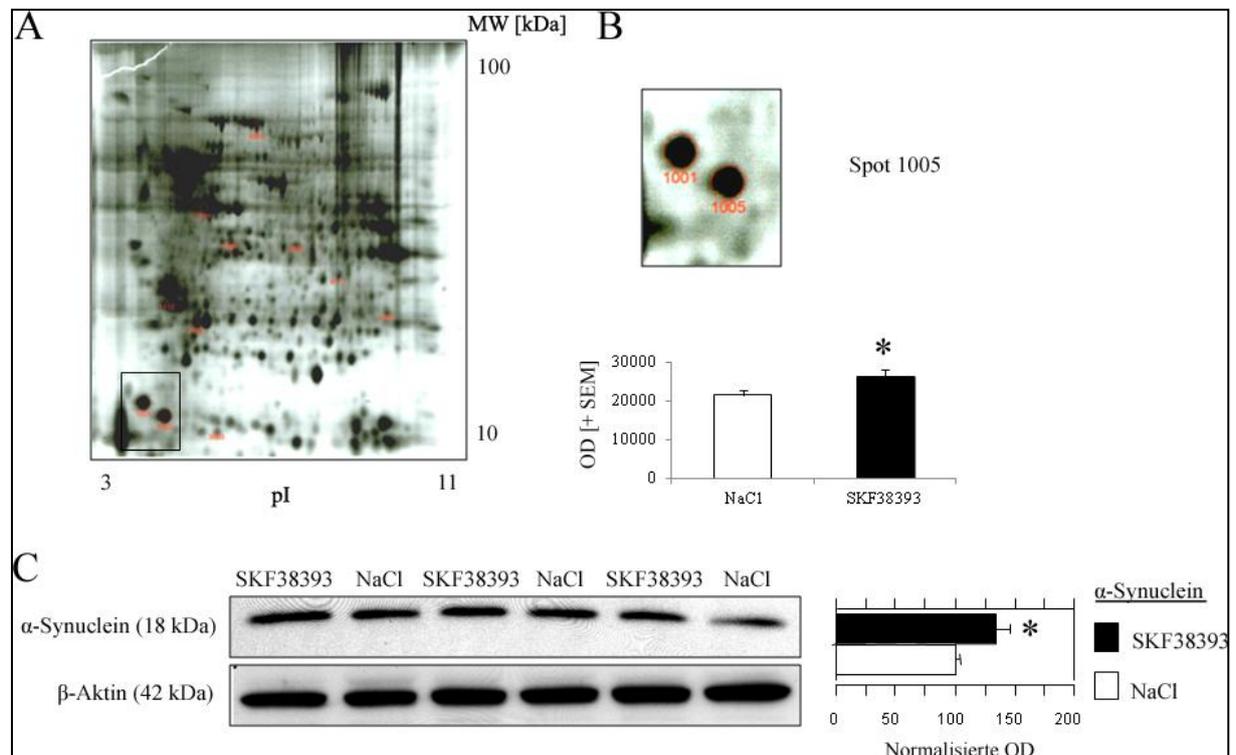
### 3.2 α-Synuclein: Dopaminerge Regulation und FM-Diskriminierungslernen

Eines der mittels Proteom-Analyse im Gerbil-Hörkortex einen Tag nach SKF38393-Injektion in einem signifikant hochregulierten Spot identifizierten Kandidatenproteine ist α-Synuclein (vgl. Tab. 3.4). α-Synuclein ist ein in Neuronen vorwiegend präsynaptisch lokalisiertes Protein, dem u.a. modulatorische Funktionen bei glutamatergen und dopaminergen Neurotransmissionsprozessen zugeschrieben werden (Nemani *et al.*, 2010; Burré *et al.*, 2010; Surmeier *et al.*, 2010). Da glutamaterge und dopaminerge Mechanismen im Hörkortex von

hoher Relevanz für FM-Diskriminierungslernen sind (Schicknick & Tischmeyer, 2006; Schicknick *et al.*, 2008; Schicknick *et al.*, 2012), wurden im weiteren Verlauf dieser Studie dopaminerge Mechanismen der Regulation sowie die mögliche funktionelle Bedeutung von  $\alpha$ -Synuclein für FM-Diskriminierungslernen untersucht.

### 3.2.1 Dopaminerge Regulation der Abundanz von $\alpha$ -Synuclein *in vivo*

Abbildung 3.10 gibt einen Überblick über die Identifikation von  $\alpha$ -Synuclein als SKF38393-reguliertes Protein.



**Abb. 3.10: Identifizierung von  $\alpha$ -Synuclein in der TP-Fraktion des AC 24 h nach Injektion von SKF38393 oder Vehikel (NaCl) in den AC von Gerbils.** (A) Coomassiegefärbtes 2D-Gel der TP-Fraktion des AC; (B) vergrößerter Ausschnitt und OD des Spots 1005; (C) Immunblot der TP-Fraktion des AC. Rechts: Normierte ECL-Signale relativ zur Kontrollgruppe. Mittelwerte + S.E.M.; \*  $p < 0,05$  signifikant verschieden von NaCl (Mann-Whitney *U*-Test).

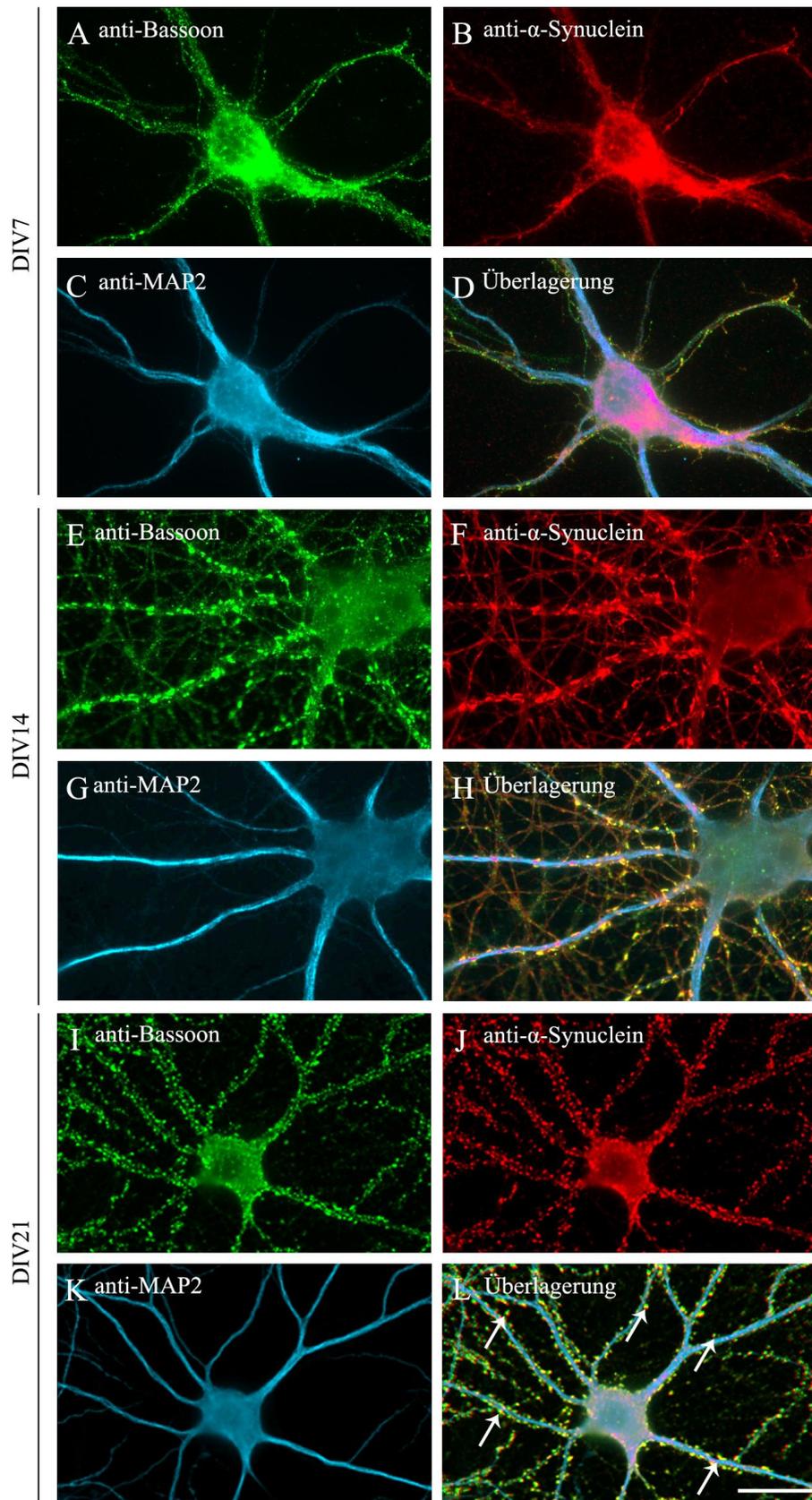
Wie mittels 2D-Gelelektrophorese und massenspektrometrischer Analyse gezeigt werden konnte, war  $\alpha$ -Synuclein einen Tag nach lokaler Injektion des Agonisten in den Hörkortex von Gerbils in der TP-Fraktion dieser Hirnregion in einem Spot mit signifikant erhöhter OD im Vergleich zu den Werten Vehikel-injizierter Kontrollen nachweisbar (Abb. 3.10 B; Spot 1005). Diese Regulation konnte mittels Immunblot-Analyse bestätigt werden (Abb. 3.10 C).

Diese Befunde weisen auf eine erhöhte Abundanz von  $\alpha$ -Synuclein in der löslichen Proteinfraction des Hörkortex 24 h nach pharmakologischer Aktivierung von D1/D5-Dopaminrezeptoren in derselben Hirnregion mittels SKF38393 hin.

### 3.2.2 Dopaminerge Regulation der Lokalisation von $\alpha$ -Synuclein *in vitro*

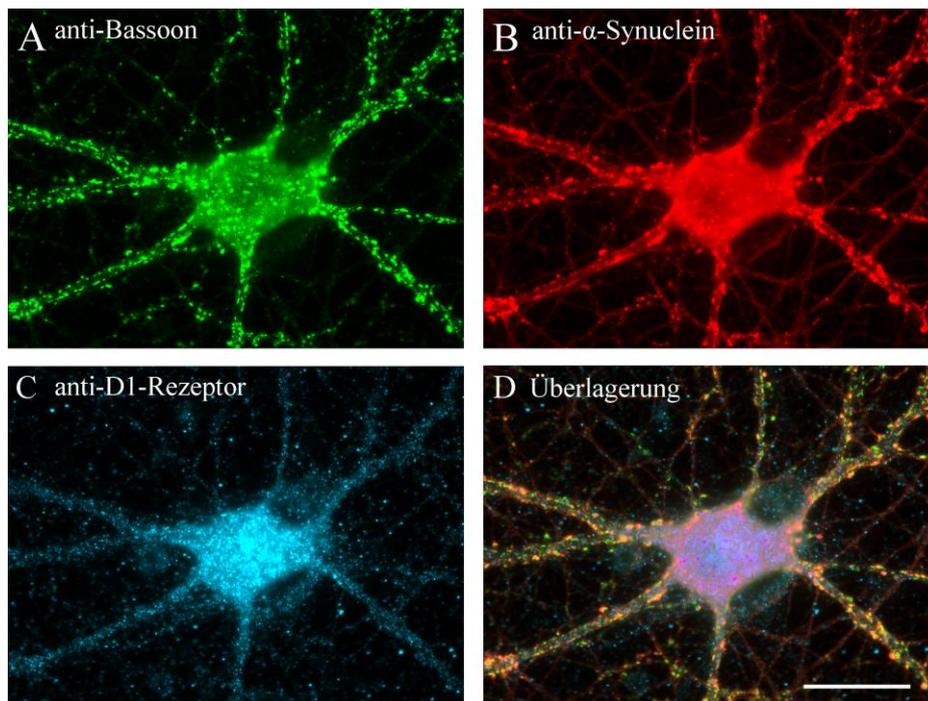
$\alpha$ -Synuclein ist u.a. bekannt als ein Protein mit hoher Mobilität und aktivitätsabhängig kontrollierter Translokation an die Präsynapse, wo es an synaptische Vesikel binden und über die Modulation von *Clustering* und SNARE-Komplex-Bildung die Freisetzung von Neurotransmittern, wie Glutamat und Dopamin, negativ beeinflussen kann (Burré *et al.* 2010; Fortin *et al.*, 2010; Nemani *et al.*, 2010). Bei biochemischen Fraktionierungen von Hirnextrakten allerdings verhält sich  $\alpha$ -Synuclein nahezu ausschließlich wie ein lösliches Protein (Fortin *et al.*, 2010). Die in Abschnitt 3.2.1 der vorliegenden Arbeit nach biochemischer Fraktionierung beschriebenen Befunde zur Regulation von  $\alpha$ -Synuclein dürften somit kaum Rückschlüsse über Änderungen der subzellulären Verteilung dieses Proteins im Rahmen möglicher synaptischer Umorganisationsprozesse nach Dopaminrezeptoragonist-Behandlung erlauben. Daher wurde an hippocampalen Neuronenkulturen mittels Immunfluoreszenztechnik der Einfluss von SKF38393 auf die Lokalisation von  $\alpha$ -Synuclein relativ zum präsynaptischen Zytomatrixprotein Bassoon untersucht, dem u.a. ebenfalls Funktionen beim *Clustering* synaptischer Vesikel zugeschrieben werden (Mukherjee *et al.*, 2010).

Die nachfolgenden Versuche wurden an hippocampalen Primärneuronenkulturen der Ratte mit dem Fluoreszenzmikroskop Observer.Z1 (Zeiss) durchgeführt und mit der Bildbearbeitungssoftware Autovision release 4.8 dokumentiert. Zur Etablierung der Methode wurde zunächst die Expression von  $\alpha$ -Synuclein im Verlauf der Synaptogenese untersucht und mit Literaturdaten verglichen. Hierfür wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit einem  $\alpha$ -Synuclein-Antikörper (Abcam) an hippocampalen Neuronen durchgeführt, die 7, 14 oder 21 Tage in Kultur (*days in vitro*; DIV) waren. Bassoon diente als präsynaptischer Marker und MAP2 (*microtubule-associated Protein 2*) als neuronaler Marker. Abbildung 3.11 zeigt die Expressions- und Lokalisationsunterschiede von  $\alpha$ -Synuclein innerhalb der verschiedenen Entwicklungsstadien.  $\alpha$ -Synuclein wurde am DIV7 bereits exprimiert und befand sich zu diesem Zeitpunkt vorwiegend im Zytosol des Zellkörpers. In Übereinstimmung mit Literaturbefunden (Murphy *et al.*, 2000) war  $\alpha$ -Synuclein ab DIV14 synaptisch lokalisiert.



**Abb. 3.11: Immunzytochemischer Nachweis der Lokalisation von  $\alpha$ -Synuclein in kultivierten hippocampalen Primärneuronen verschiedener Entwicklungsstadien.** Hippokampale Zellen (DIV7, DIV14, DIV21) wurden mit PFA fixiert. Die Immunfärbungen erfolgten mit den angegebenen Antikörpern. Die Pfeile zeigen exemplarisch Kolokalisation von  $\alpha$ -Synuclein und Bassoon an. Balken = 20  $\mu$ m.

Die Expression von D1-Dopaminrezeptoren in hippocampalen Primärneuronen wurde bereits von verschiedenen Autoren beschrieben (Lezcano & Bergson, 2002; Bloomer *et al.*, 2008; Beaulieu & Gainetdinov, 2011). Um zu prüfen, ob die unter unseren experimentellen Bedingungen kultivierten hippocampalen Primärneuronen ebenfalls D1-Dopaminrezeptoren exprimieren, wurden Immunofluoreszenzfärbungen mit einem D1-Rezeptor-Antikörper durchgeführt. Abbildung 3.12 zeigt  $\alpha$ -Synuclein-, Bassoon- sowie D1-Rezeptor-Immunoreaktivität in hippocampalen Neuronen (DIV21). D1-Dopaminrezeptoren sind u.a. gemeinsam mit  $\alpha$ -Synuclein und Bassoon entlang der Dendriten exprimiert.



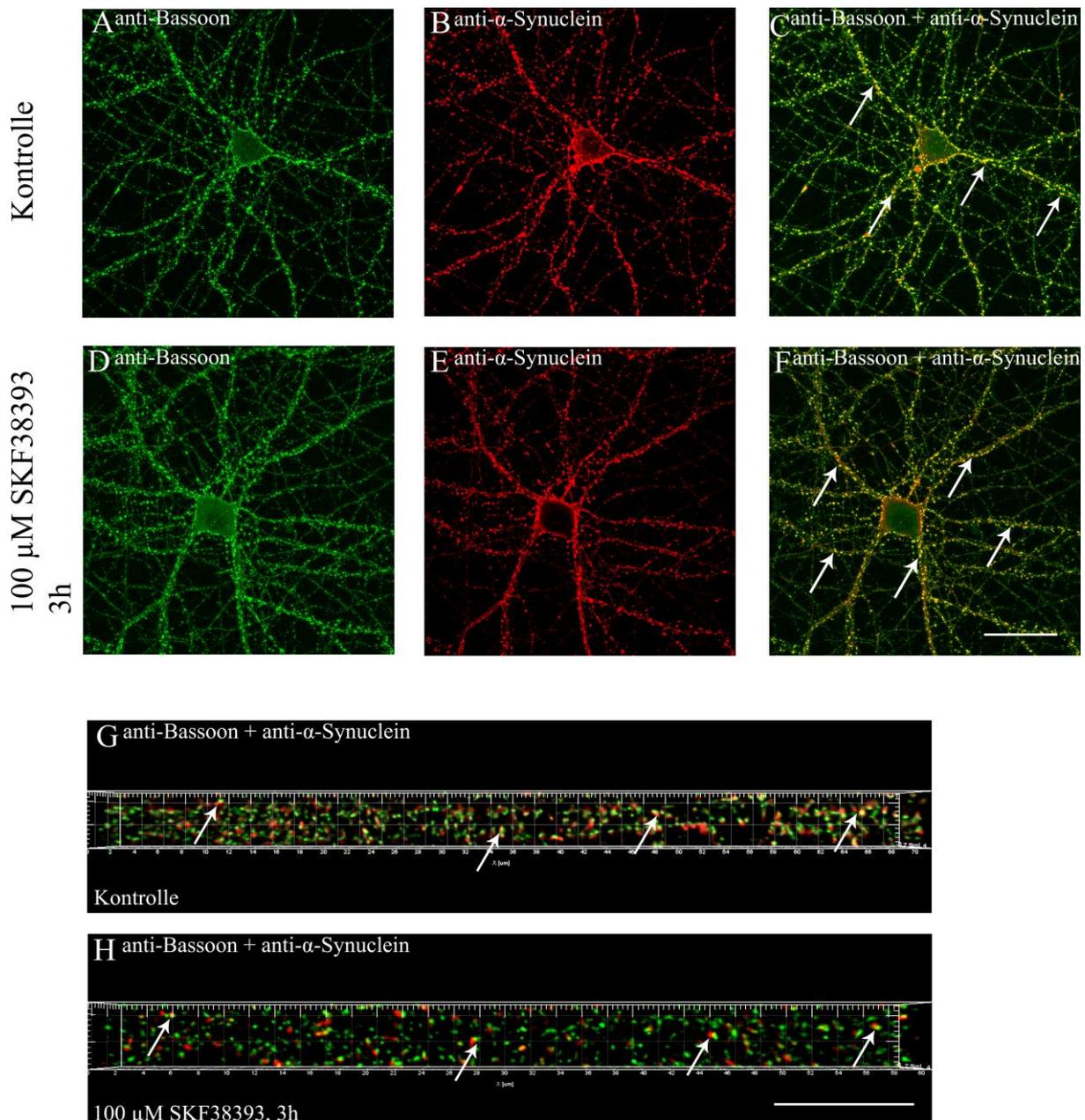
**Abb. 3.12: Immunzytochemischer Nachweis von Bassoon,  $\alpha$ -Synuclein und D1-Rezeptoren in hippocampalen Primärneuronen (DIV21).** PFA-fixierte Zellen wurden mit den angegebenen Antikörpern gefärbt. Balken = 20  $\mu$ m.

Die nachfolgend verwendeten experimentellen Parameter (SKF38393-Konzentration 100  $\mu$ M, Inkubationszeit 3 h) basieren auf Studien an reifen (DIV18-21) hippocampalen Neuronenkulturen, in denen nach 0,25-4 h Inkubation in 100  $\mu$ M SKF38393 Veränderungen dendritischer Proteinsynthese und/oder -lokalisation beschrieben wurden (Ji *et al.*, 2005; Bloomer *et al.*, 2008). Ferner wurde an Labornagern *in vivo* gezeigt, dass die Elimination von Benzazepinen in einem Zeitraum von 1-3 h nach intrazerebraler Applikation erfolgt (Vezina *et al.*, 1994; Granon *et al.*, 2000). Molekulare und gedächtnisfördernde Einflüsse von lokal in den Gerbil-Hörkortex appliziertem SKF38393 (Schicknick *et al.* 2008; Schicknick *et al.*,

2012; vorliegende Arbeit) dürften also auf pharmakologischen Wirkungen innerhalb eines solchen Zeitfensters nach Injektion basieren.

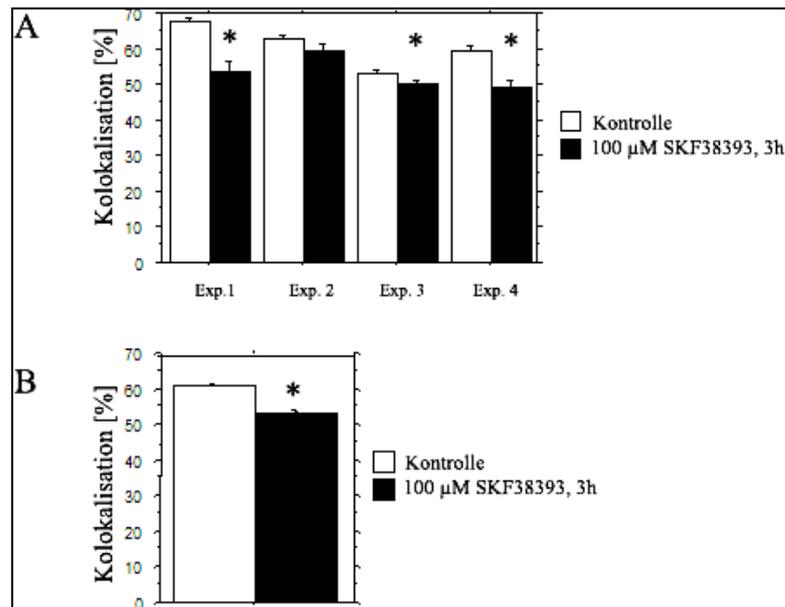
In vier unabhängigen Versuchen wurde die Lokalisation von  $\alpha$ -Synuclein und Bassoon relativ zueinander in hippokampalen Neuronenkulturen (DIV21) 3 h nach Wechsel auf ein 100  $\mu$ M SKF38393 enthaltendes Medium untersucht. In Kontrollkulturen erfolgten die Untersuchungen ebenfalls 3 h nach Mediumwechsel, hier wurde jedoch ausschließlich SKF38393-freies Medium verwendet. Nach der Fixierung wurden die Neuronen einer Immunfluoreszenzfärbung mit  $\alpha$ -Synuclein- bzw. Bassoon-spezifischen Antikörpern unterzogen. Als postsynaptischer Marker sollte PSD-95 (PSD-Protein-95) dienen; Immunfärbungen mit einem entsprechenden Antikörper stellten sich jedoch als nicht auswertbar heraus, so dass auf weitere Analysen dieser Daten verzichtet werden musste. Je Versuch wurden zehn Neuronen mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie analysiert (vgl. 2.2.4). In Abbildung 3.13 sind exemplarisch konfokale Bildaufnahmen eines SKF38393-behandelten Neurons und eines Kontroll-Neurons dargestellt. Gezeigt sind die Immunfluoreszenzfärbungen für Bassoon und  $\alpha$ -Synuclein sowie die Überlagerung der zwei Kanäle. Kolokalisationen beider Proteine entlang der Dendriten sind exemplarisch durch Pfeile gekennzeichnet.

Unterschiede in der Kolokalisation der untersuchten Proteine zwischen Kontroll- und SKF38393-behandelten Neuronen sind zunächst visuell nicht erkennbar. Daher wurden die Aufnahmen der Dendriten der einzelnen Neuronen unter Zuhilfenahme des Bildbearbeitungsprogrammes ImageJ begradigt und mittels der 3D-Bildbearbeitungssoftware AutoQuant X2 dekonvolviert. Die anschließende Lokalisationsanalyse erfolgte mittels des Kolokalisationsmodus der 3D-Bildbearbeitungssoftware IMARIS 6.4.2. Hierfür wurde ein Kolokalisationskanal von Bassoon und  $\alpha$ -Synuclein erstellt. Somit konnten Lokalisationsänderungen beider Proteine relativ zueinander nach Inkubation mit SKF38393 untersucht werden, wie sie in Abbildung 3.13 (G, H) dargestellt sind. Pfeile kennzeichnen exemplarisch Kolokalisationen von Bassoon- und  $\alpha$ -Synuclein-Immunfluoreszenz.



**Abb. 3.13: Konfokale Lokalisationsanalyse von Bassoon- und  $\alpha$ -Synuclein-Immunfluoreszenz in hippocampalen Primärneuronen unter Kontrollbedingungen und nach SKF38393-Behandlung.** (A-F) Hippokampale Neuronen (DIV21) wurden 3 h in SKF38393-freiem Medium (A-C, Kontrolle) bzw. in 100  $\mu$ M SKF38393 enthaltendem Medium (D-F) inkubiert und anschließend mit PFA fixiert und einer Immunfluoreszenzfärbung mit spezifischen Antikörpern unterzogen. Dargestellt sind Färbungen mit anti-Bassoon (A, D) und anti- $\alpha$ -Synuclein (B, E) und deren Überlagerung (C, F) Balken = 20  $\mu$ m. (G, H) Überlagerung der Zweifachfärbung mit anti-Bassoon (grün) und anti- $\alpha$ -Synuclein (rot) in begradierten, dekonvolvierten Aufnahmen von Dendriten nach 3 h Inkubation in Kontrollmedium (G) bzw. in 100  $\mu$ M SKF38393 (H). Balken = 10  $\mu$ m. Pfeile in C, F, G und H markieren exemplarisch Kolokalisationen der Immunfluoreszenzen beider Proteine.

Wie in Abbildung 3.14 A dargestellt, war der prozentuale Anteil der mit  $\alpha$ -Synuclein-Immunfluoreszenz als kolokalisiert ermittelten Bassoon-Immunfluoreszenz in jedem der vier unabhängig durchgeführten Experimente nach Inkubation mit SKF38393 gesenkt.



**Abb. 3.14: Quantitative Analyse der Kolokalisation von  $\alpha$ -Synuclein- und Bassoon-Immunfluoreszenz in hippocampalen Neuronen nach 3 h Inkubation unter Kontrollbedingungen oder in 100  $\mu$ M SKF38393.** (A) Separate Darstellung der vier unabhängig durchgeführten Experimente; (B) Gemeinsame Auswertung der Messwerte aller Experimente. Mittelwerte + S.E.M. des prozentualen Anteils der mit  $\alpha$ -Synuclein-Immunfluoreszenz kolokalisierten Bassoon-Immunfluoreszenz. \*Signifikant verschieden vom entsprechenden Kontrollwert (Fisher's PLSD *post hoc* Test).

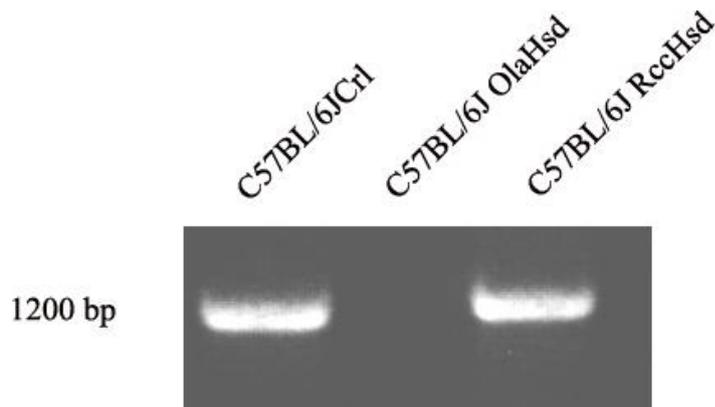
Ein Vergleich dieser Werte mittels ANOVA über die vier Experimente ließ einen signifikanten Einfluss der Behandlung ( $F_{1,499}=49,39$ ;  $p<0,0001$ ) erkennen. Über alle Experimente hinweg besteht also ein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen. Das wird durch gemeinsame Auswertung der Messwerte aller Experimente bestätigt (Abb. 3.14 B;  $F_{1,505}=43,29$ ;  $p<0,0001$ ). Ferner ließ die ANOVA einen signifikanten Einfluss des Faktors Experiment ( $F_{3,499}=19,14$ ;  $p<0,0001$ ) sowie eine signifikante Interaktion [Experiment x Behandlung] erkennen ( $F_{3,499}=6,41$ ;  $p<0,0005$ ). Der signifikante Einfluss des Faktors Experiment weist auf Unterschiede zwischen den zu unterschiedlichen Zeiten in unabhängigen Versuchsreihen gewonnenen Daten hin, die auf biologische und methodische Schwankungen (z.B. in Neuronenkulturen, Medien, Pharmaka, Versuchsbedingungen) zurückzuführen sein dürften. Die Interaktion [Experiment x Behandlung] könnte daraufhin weisen, dass die Behandlungsunterschiede nicht in allen Experimenten das Niveau statistischer Signifikanz erreichen. Tatsächlich zeigt ein Vergleich innerhalb der Einzelexperimente, dass signifikante Behandlungsunterschiede in den Experimenten 1 ( $p<0,0001$ ), 3 ( $p<0,05$ ) und 4 ( $p<0,0001$ ) nachweisbar waren, während in Experiment 2 der behandlungsbedingte Unterschied mit  $p=0,08$  zwar eine deutliche Tendenz aufweist, das Kriterium für statistische Signifikanz jedoch verfehlt.

Zusammengenommen sprechen diese Befunde für eine verminderte Kollokalisierung von  $\alpha$ -Synuclein und Bassoon nach D1/D5-Dopaminrezeptoraktivierung mittels SKF38393. Da beiden Proteinen Funktionen im Rahmen präsynaptischer Mechanismen zugeschrieben werden, deren  $\alpha$ -Synuclein-vermittelte Modulation die Freisetzung von Neurotransmittern wie Glutamat und Dopamin negativ beeinflussen kann (Nemani *et al.*, 2010; Mukherjee *et al.*, 2010), weist eine dopaminerg induzierte Verminderung der  $\alpha$ -Synuclein-Bassoon-Kollokalisierung möglicherweise auf eine Verminderung des Einflusses von  $\alpha$ -Synuclein auf solche Mechanismen hin, die von kritischer Bedeutung für Lern- und Gedächtnisprozesse sein könnte. Die Relevanz von  $\alpha$ -Synuclein für FM-Diskriminierungslernen und seine dopaminerge Modulation war daher Gegenstand der nachfolgend beschriebenen Untersuchungen (Abschnitt 3.2.3).

### 3.2.3 FM-Diskriminierungslernen $\alpha$ -Synuclein-defizienter Mäuse

Die vorangegangenen Experimente weisen auf deutliche Veränderungen der Expression und Lokalisation von  $\alpha$ -Synuclein nach pharmakologischer dopaminerg Aktivierung hin. Unter Einsatz eines  $\alpha$ -Synuclein-defizienten Mausstammes im Vergleich zu Wildtyp-Stämmen sollte daher am FM-Diskriminierungsparadigma geprüft werden, ob  $\alpha$ -Synuclein für den Lernprozess selbst bzw. für dessen dopaminerge Modulation von Bedeutung ist. Für diese Experimente wurden C57BL/6JolaHsd-Mäuse eingesetzt, die eine chromosomale Deletion (Del(6)*Sncal*Slab) des  $\alpha$ -Synuclein-Locus tragen. Zu Vergleichszwecken wurden Mäuse zweier C57BL/6J-Substämme herangezogen, die diese Deletion nicht aufweisen (C57BL/6JCrI, C57BL/6JRccHsd). Alle Mäuse wurden an 16 Tagen einmal täglich in einer Shuttle-Box daraufhin trainiert, zur Vermeidung elektrischer Fußreize auf das Ertönen aufwärts und abwärts modulierter Töne mit Ausübung bzw. Unterlassung von Kompartimentwechseln zu reagieren. Als Maß für die Diskriminierungsleistung wurde der Wert D, d.h. die Differenz aus der Anzahl CR+ (Kompartimentwechsel nach bekräftigtem Ton) und der Anzahl CR- (Kompartimentwechsel nach unbekräftigtem Ton), ermittelt.

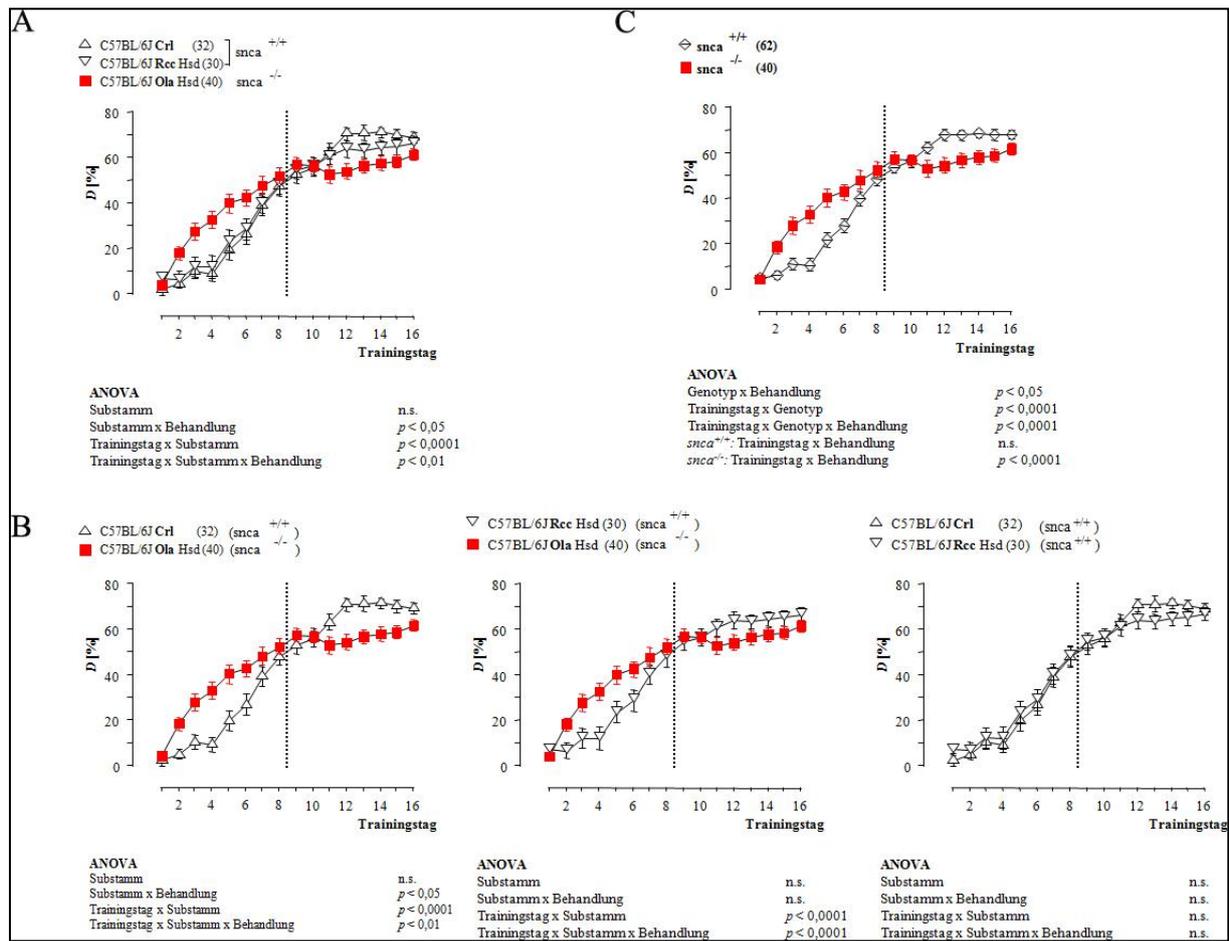
Abbildung 3.15 zeigt ein Beispiel für die Genotypisierung der drei verwendeten Substämme, die regelmäßig entsprechend dem im Abschnitt 2.2.5.5.1 beschriebenen PCR-Protokoll durchgeführt wurde. In Übereinstimmung mit Literaturdaten (Siegmond *et al.*, 2005) war bei Wildtypmäusen eine Bande bei ca. 1200 bp nachweisbar, die bei den  $\alpha$ -Synuclein-defizienten Mäusen fehlte.



**Abb. 3.15: Genotypisierung der verwendeten C57BL/6J-Maus-Substämme.** Links C57BL/6JCrI; Mitte C57BL/6J OlaHsd; rechts C57BL/6JRccHsd. Das erwartete PCR-Produkt bei 1200 bp fehlt bei C57BL/6J OlaHsd.

Vorversuche zur Übertragung des Lernmodells vom Gerbil auf die Maus (Schicknick *et al.*, unveröffentlicht) ließen vermuten, dass C57BL/6J OlaHsd-Mäuse die FM-Diskriminierung zwar erlernen, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen aber Unterschiede in der Lernkinetik, d.h., in der Veränderung der Diskriminierungsleistung über die Trainingstage, aufweisen. Insbesondere ein schnellerer Lernerfolg während der ersten Trainingstage, der Ähnlichkeiten mit der Wirkung von SKF38393 auf das FM-Diskriminierungslernen des Gerbils aufwies, ließ Unterschiede in der dopaminergen Modulation des Lernverhaltens zwischen den Substämmen vermuten, deren verhaltenspharmakologische Untersuchung Gegenstand der vorliegenden Arbeit war. Diese Versuche fanden in Zusammenarbeit mit Dr. Horst Schicknick und Frau Chris Theuerkauf statt. Die Stamm-Unterschiede in der Lernkinetik wurden unter optimierten Trainingsbedingungen zunächst an Mäusen verifiziert, denen unmittelbar nach der ersten Trainingssitzung physiologische Kochsalzlösung (Vehikel) intraperitoneal (i.p.) verabreicht wurde. Nachfolgend wurde der Einfluss einer i.p. Injektion des D1/D5-Dopaminrezeptor-selektiven Antagonisten SCH23390 bzw. der D1/D5-Dopaminrezeptor-selektiven Agonisten SKF38393, SKF83822 oder SKF83959 nach der ersten Trainingssitzung auf die Unterschiede in der Lernkinetik zwischen den Substämmen untersucht.

Für die Verhaltensversuche wurden 40 C57BL/6J OlaHsd-Mäuse, 32 C57BL/6JCrI-Mäuse und 30 C57BL/6JRccHsd-Mäuse eingesetzt. Ein Vergleich der über alle Verhaltensexperimente gemittelten Diskriminierungsleistung  $D$  ist in Abbildung 3.16 dargestellt.

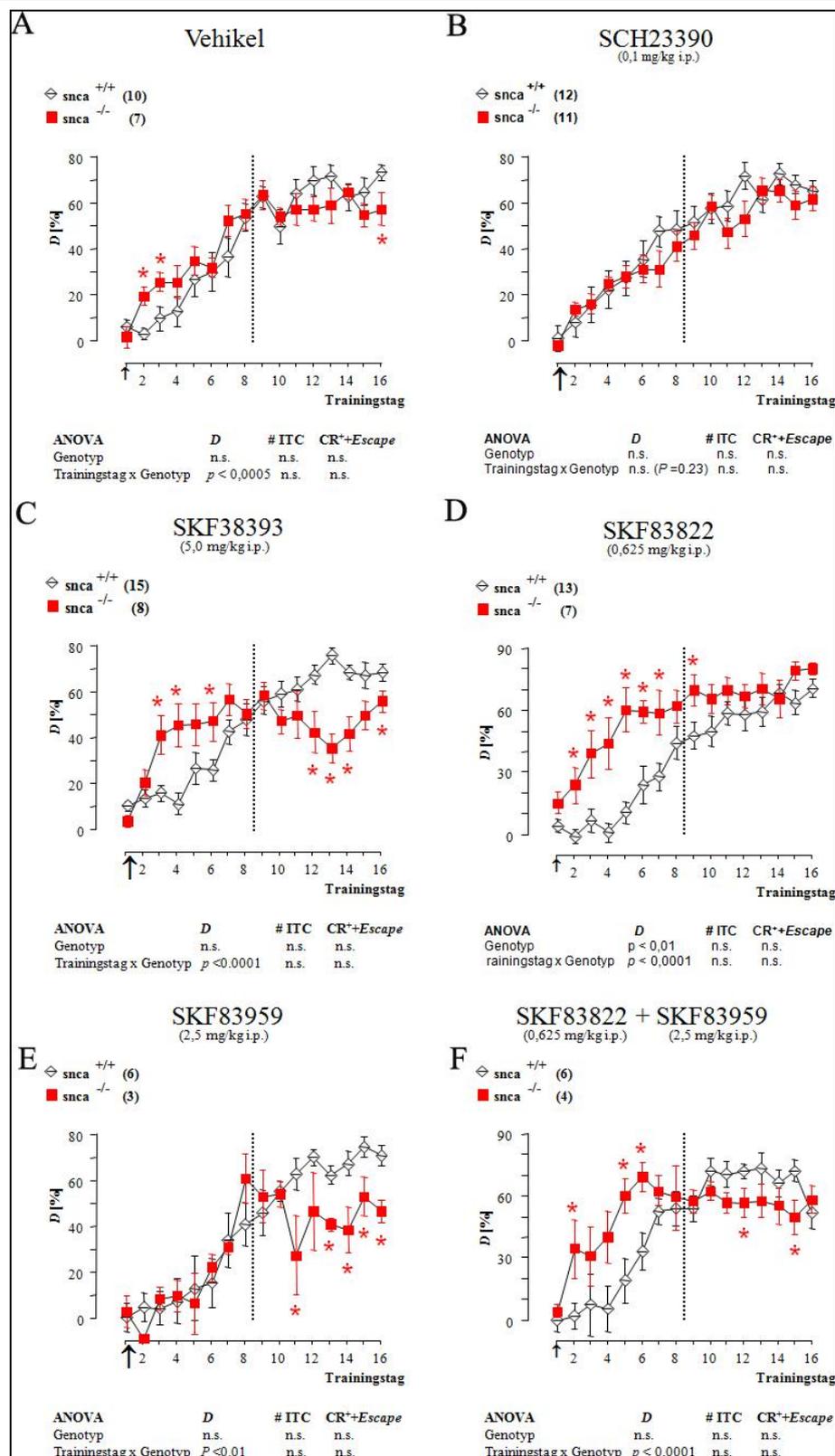


**Abb. 3.16: Vergleich der FM-Diskriminierungsleistung D von Mäusen der Substämme C57BL/6JCrI (Wildtyp), C57BL/6JRccHsd (Wildtyp), und C57BL/6JolaHsd ( $\alpha$ -Synuclein-defizient) über alle Behandlungsgruppen und Trainingstage. (A) Vergleich der drei Substämme. (B) Vergleich von C57BL/6JCrI und C57BL/6JolaHsd (links), C57BL/6JRccHsd und C57BL/6JolaHsd (Mitte) sowie C57BL/6JCrI und C57BL/6JRccHsd (rechts). Beachte die große Ähnlichkeit der Daten der Wildtyp-Substämme. (C) Vergleich der zu einer Gruppe ( $snca^{+/+}$ ) zusammengefassten Daten beider Wildtyp-Substämme mit denen des Substammes C57BL/6JolaHsd ( $snca^{-/-}$ ). Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.**

Mittels ANOVA von D zwischen den drei Substämmen (Abb. 3.16 A) oder zwischen C57BL/6JolaHsd und je einem der Wildtypstämmen (Abb. 3.16 B links und Mitte) waren signifikante Interaktionen von [Tag x Stamm] und [Tag x Stamm x Behandlung] nachweisbar, die auf die Substamm-Unterschiede in der Lernkinetik und in deren pharmakologischer Beeinflussbarkeit hinweisen. Dagegen erbrachte ein Vergleich zwischen den Wildtyp-Substämmen (Abb. 3.16 B rechts) keinerlei signifikante Einflüsse oder Interaktionen der Faktoren Substamm und Behandlung (Stamm:  $F_{1,50} < 1$ ; Behandlung:  $F_{5,50} < 1$ ; [Stamm x Behandlung]:  $F_{5,50} = 1,46$ ; Tag:  $F_{15,750} = 133,17$   $p < 0,0001$ ; [Tag x Stamm]:  $F_{15,750} = 1,18$ ; [Tag x Behandlung]:  $F_{75,750} = 1,04$ ; [Tag x Stamm x Behandlung]:  $F_{75,750} < 1$ ). Die Daten der Wildtyp-Substämme wurden daher für nachfolgende Analysen zusammengefasst und als Genotyp

snca<sup>+/+</sup> bezeichnet, die des Substammes C57BL/6J OlaHsd als Genotyp snca<sup>-/-</sup> (Abb. 3.16 C). ANOVA von D zwischen den pharmakologisch unterschiedlich behandelten Gruppen eines jeden der Genotypen offenbarte eine Interaktion von [Tag x Behandlung] im Genotyp snca<sup>-/-</sup>, nicht aber im Genotyp snca<sup>+/+</sup>. Das spricht dafür, dass in den nachfolgend beschriebenen Einzelexperimenten vornehmlich die Lernkinetik des Genotyps snca<sup>-/-</sup> durch die verwendeten dopaminergen Pharmaka beeinflusst wurde.

In Abbildung 3.17 sind die zwischen den Mäusen der Genotypen snca<sup>+/+</sup> und snca<sup>-/-</sup> bestehenden Unterschiede in der Lernkinetik über 16 Trainingstage und deren Beeinflussbarkeit durch D1/D5-selektive Pharmaka, die lediglich nach der ersten Trainingssitzung systemisch verabreicht wurden, vergleichend dargestellt. Nach Kontrollinjektion von Vehikel (Abb. 3.17 A) zeigte sich, dass snca<sup>-/-</sup>-Mäuse zwar initial schneller lernten, aber letztlich ein geringeres Diskriminierungsniveau erreichten als snca<sup>+/+</sup>-Mäuse (ANOVA, Genotyp:  $F_{1,15} < 1$ ; [Tag x Genotyp]:  $F_{15,225} = 2,93$   $p < 0,0005$ ). Diese Unterschiede zwischen  $\alpha$ -Synuclein-defizienten und nicht-defizienten Mäusen waren durch die verwendeten D1/D5-Dopaminrezeptor-selektiven Pharmaka in unterschiedlicher Weise modulierbar. So führte der Antagonist SCH23390 (Abb. 3.17 B) zu einer nahezu vollständigen Unterdrückung (ANOVA, Genotyp:  $F_{1,21} < 1$ ; [Tag x Genotyp]:  $F_{15,315} = 1,25$ ), der Agonist SKF38393 (Abb. 3.17 C) dagegen zu einer deutlichen Verstärkung der Unterschiede sowohl im ansteigenden Bereich als auch im asymptotischen Teil der Lernkurve (ANOVA, Genotyp:  $F_{1,21} < 1$ ; [Tag x Genotyp]:  $F_{15,315} = 9,41$   $p < 0,0001$ ). Im Gegensatz zur Wirkung von SKF38393, das sowohl an AZ-gekoppelte als auch an PLC-gekoppelte D1/D5-Rezeptoren bindet, führten die Signalweg-selektiven D1/D5-Agonisten entweder zu einer Verschärfung der frühen sowie Nivellierung der späten Unterschiede (Abb. 3.17 D: SKF83822, AZ-stimulierend. ANOVA, Genotyp:  $F_{1,18} = 9,25$   $p < 0,01$ ; [Tag x Genotyp]:  $F_{15,270} = 3,26$   $p < 0,0001$ ) oder umgekehrt (Abb. 3.17 E: SKF83959, PLC-stimulierend. ANOVA, Genotyp:  $F_{1,7} < 1$ ; [Tag x Genotyp]:  $F_{15,105} = 2,23$   $p < 0,01$ ). Die Kombination von SKF83822 und SKF83959 (Abb. 3.17 F. ANOVA, Genotyp:  $F_{1,8} < 1$ ; [Tag x Genotyp]:  $F_{15,120} = 4,32$   $p < 0,0001$ ) hatte ähnliche Wirkung wie SKF38393 (vgl. Abb. 3.17 F und 3.17 C). Die Analyse der Anzahl konditionierter Reaktionen (Tabellen 6.2-6.7 im Anhang) lässt im ansteigenden Bereich der Lernkurve vornehmlich Unterschiede in der Anzahl CR-, im asymptotischen Teil dagegen eher Unterschiede in der Anzahl CR+ zwischen den Genotypen erkennen.



**Abb. 3.17: Initiale Lernrate und asymptotische Gedächtnisleistung  $\alpha$ -Synuclein-defizienter ( $snca^{-/-}$ ) und nicht-defizienter ( $snca^{+/+}$ ) Mäuse im FM-Diskriminierungsparadigma und deren Modulierbarkeit durch D1/D5-Dopaminrezeptor-selektive Pharmaka.** Mäuse wurden einmal täglich für 16 Tage im FM-Diskriminierungsparadigma trainiert. Vehikel (A), der D1/D5-selektive Antagonist SCH23390 (B), die D1/D5-selektiven Agonisten SKF38393 (C), SKF83822 (D), SKF83959 (E) oder eine Kombination aus SKF83822 und SKF83959 (F) wurden unmittelbar nach der ersten Trainingssitzung intraperitoneal verabreicht (Pfeile). Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. der Diskriminierungsleistung D. \*  $p < 0,05$  (Fisher's PLSD *post hoc* Test).

Zur Abschätzung sensorimotorischer oder motivationeller Defizite der Tiere wurde die Anzahl der Seitenwechsel zwischen den Trainingsläufen (ITC, *intertrial crossings*) sowie die relative Anzahl der absolvierten Fluchtreaktionen nach Einsetzen des Fußreizes (*escape reactions*) aufgezeichnet (Tabellen 6.2–6.7 im Anhang). Für beide Parameter waren in keinem der Experimente signifikante Unterschiede zwischen  $\alpha$ -Synuclein-defizienten und nicht-defizienten Mäusen nachweisbar.

Zusammenfassend lassen die an  $\alpha$ -Synuclein-defizienten und nicht-defizienten Mäusen erhobenen Befunde vermuten, dass  $\alpha$ -Synuclein im Verlaufe des FM-Diskriminierungslernens in Mechanismen involviert ist, die durch Aktivierung von D1/D5-Dopaminrezeptoren während und kurz nach dem initialen Lernereignis angestoßen werden und über die Interaktion von AZ- und PLC-abhängigen Signalwegen die Lernrate während der ersten Trainingstage sowie die spätere Gedächtnisleistung in unterschiedlicher Weise beeinflussen können.

## 4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung von Hirnstrukturen, Proteinen und Signalwegen, die potentiell an dopaminerg im Gerbil-AC induzierten gedächtnisunterstützenden Prozessen beteiligt sind. Dazu wurden einen Tag nach lokaler Injektion der D1/D5-Agonisten SKF38393 (AZ- und PLC-stimulierend) oder SKF83959 (selektiv PLC-stimulierend) in den AC Proteine verschiedener Fraktionen der Hirnregionen AC, FC, HC und ST im Vergleich zu Kontrollgruppen analysiert. Nach SKF38393-Applikation waren die deutlichsten Proteomänderungen im AC, HC und ST, die geringsten dagegen im FC nachweisbar, während nach SKF83959-Behandlung die stärksten Veränderungen im FC und wesentlich geringere im HC induziert wurden. Die Analyse der identifizierten Proteine ließ vermuten, dass beide Agonisten zu Veränderungen bei Proteinen führten, die in erster Linie den Kategorien „Zytoskelett-, Gerüst- und ECM-Proteine“, „Mitochondriale Proteine und/oder Proteine des Energiemetabolismus“, aber auch „DNA- und RNA-bindende Proteine, Transkription, Translation“ zugeordnet werden konnten. Quantität und Richtung der in den verschiedenen Hirnregionen detektierten Proteomveränderungen schienen von der Signalweg-Selektivität des verwendeten Agonisten abzuhängen. Weiterführende Untersuchungen eines der dopaminerg regulierten Kandidatenproteine,  $\alpha$ -Synuclein, wiesen auf eine Erhöhung seiner Expression sowie auf eine Verminderung seiner Kolo-kalisation relativ zum präsynaptischen Zytomatrixprotein Bassoon nach SKF38393-Behandlung hin. Verhaltensbefunde defizienter Mäuse lassen vermuten, dass  $\alpha$ -Synuclein im Verlaufe des FM-Diskriminierungslernens in Mechanismen involviert ist, die durch Aktivierung von D1/D5-Dopaminrezeptoren durch das initiale Lernereignis angestoßen werden und über AZ- und PLC-abhängige Signalwege die Lernrate während der ersten Trainingstage sowie die spätere Gedächtnisleistung unterschiedlich beeinflussen können.

### 4.1 Dopaminerg vermittelte Proteomänderungen im Gerbilhirn

Heutige Sichtweisen neuraler Plastizitätsphänomene im Rahmen der Gedächtnisbildung gehen vom kombinierten Wirken verschiedener lerninduzierter Prozesse aus (Redondo & Morris, 2011), die neben gedächtnisstabilisierenden Mechanismen auch permissive Mechanismen einschließen, also Mechanismen, die die Fähigkeit zu lang anhaltenden plastischen Veränderungen erhöhen. So zeigte sich beispielsweise in olfaktorischen Diskriminierungsparadigmen lerninduzierte kortikale Plastizität, die über mehrere Tage anhielt und mit einer erhöhten Lernfähigkeit einher ging (Saar & Barkai, 2009). Auch im

Hörkortex wurden Plastizitätsphänomene beschrieben, die auditorischem Diskriminierungslernen förderlich sind (Reed *et al.*, 2011). Da sich solche Modifikationen über ganze Neuronen-Ensembles ausbreiten und nach einiger Zeit wieder ohne Gedächtnisverlust verschwinden können, stellen sie vermutlich nicht Mechanismen dar, die für die dauerhafte Speicherung spezifischer Gedächtnisinhalte in Frage kommen. Vielmehr dürften sie für einen gewissen Zeitraum die Anzahl reaktiver neuronaler Netzwerke in multiplen Hirnregionen für aktivitätsabhängige plastische Veränderungen erhöhen, sie in eine Art „Lern-Modus“ versetzen. Sowohl permissive als auch stabilisierende Mechanismen können Prozesse erfordern, die durch Neuromodulatoren (z.B. Dopamin) und nachgeschaltete Proteinkinasen (z.B. mTOR) kontrolliert werden, wie Transkription, Translation, Proteolyse und Dynamik zytoskelettaler Komponenten (Jaworski & Sheng, 2006; Redondo & Morris 2011).

Ähnliche Mechanismen dürften auch während des FM-Diskriminierungslernens bei Labornagern angestoßen werden. Hier führt das Lernereignis zu erhöhter Ausschüttung von Dopamin und anderen Neurotransmittern im Hörkortex (Stark & Scheich, 1997). Durch Aktivierung von NMDA-Typ-Glutamatrezeptoren (Schicknick & Tischmeyer, 2006) und von D1-Klasse Dopaminrezeptoren (Schicknick *et al.*, 2008; Schicknick *et al.*, 2012), die vorwiegend in den infragranulären Schichten 5 und 6 nachweisbar sind, scheinen translationsabhängige Prozesse mit unterschiedlichen Kinetiken und unterschiedlichen Konsequenzen auf Verhaltensebene induziert zu werden (Kraus *et al.*, 2002; Tischmeyer *et al.*, 2003; Schicknick *et al.*, 2008). Während ein Prozess offenbar die Stabilität und Abrufbarkeit des Gedächtnisses bis zur nächsten Trainingssitzung sichert, erhöhen andere Prozesse, vermittelt über mTOR, möglicherweise die Prädisposition relevanter Netzwerke in multiplen Hirnregionen – wie dem Hörkortex selbst, aber auch dem Frontalkortex, Hippokampus und Striatum (Kähne *et al.*, 2012) – für Mechanismen der Gedächtnisbildung an den darauf folgenden Tagen. Molekulare Prozesse, die im Rahmen solch lerninduzierter permissiver Mechanismen in unterschiedlichen Hirnregionen angestoßen werden können, dürften auch im Zentrum der pharmakologischen Beeinflussung durch die in der vorliegenden Arbeit lokal in den Hörkortex applizierten D1/D5-Rezeptor-selektiven Agonisten gestanden haben.

#### 4.1.1 Regionale Unterschiede der Proteomänderungen

Wie vorangehend im Ergebniskapitel gezeigt wurde, sind Proteomänderungen nach lokaler Applikation von Dopaminrezeptoragonisten in den AC nicht nur auf den AC selbst, also auf die Zielregion der Injektion, beschränkt, sondern auch im FC, HC und ST detektiert worden. Als eine Erklärung dafür wäre zunächst die Möglichkeit einer weitläufigen Verteilung der topisch applizierten Agonisten in Betracht zu ziehen. Wie jedoch an Ratten gezeigt werden konnte (Vezina *et al.*, 1994; Granon *et al.*, 2000), erfolgt die Elimination von Benzazepinen nach intrazerebraler Applikation in einem Zeitraum von 1-3 h, ihre Diffusion beträgt kaum mehr als 1,5 mm. Setzt man ein ähnliches Penetrationsverhalten für den Hörkortex des Gerbils voraus, dann lassen sich die nach lokaler Injektion von SKF38393 bzw. SKF83959 in diese Hirnregion beschriebenen, teils beträchtlichen regionalen Unterschiede in den Proteomänderungen kaum durch rein pharmakokinetische Aspekte, wie Diffusion oder Transport, erklären. Vielmehr dürften sie durch Agonist-Rezeptor-Interaktion kurz nach der Injektion und nahe dem Zielort der Injektion induziert worden sein. Molekulare Veränderungen in teilweise relativ weit von der Zielregion der Injektion – dem Hörkortex – entfernten Hirnregionen, wie sie in der vorliegenden Arbeit beschrieben wurden, dürften also mit hoher Wahrscheinlichkeit auf lokal im Hörkortex vermittelte plastische Einflüsse auf die Kommunikation mit und zwischen verschiedenen Hirnregionen hinweisen.

In Übereinstimmung mit dieser Annahme ist für den primären Hörkortex des Gerbils eine bedeutende Zahl von Verbindungen zu kortikalen und subkortikalen Hirnstrukturen nachgewiesen worden (Budinger *et al.*, 2008). Ein Teil davon entfällt auf meist reziproke kortikokortikale Verbindungen zu Strukturen, die in der vorliegenden Arbeit als „FC“ analysiert wurden (vgl. Schema in Abb. 2.1), wie orbitale, medial-präfrontale und frontale Kortextbereiche. Rückkoppelnde Verbindungen aus diesen Regionen können wiederum in die supra- und infragranulären Schichten des Hörkortex projizieren. Weiterhin schlagen die perirhinalen und entorhinalen Kortizes eine Brücke zwischen AI und der Hippokampusformation. Hörkortexneuronen projizieren ferner zu subkortikalen Bereichen, wie dem ventralen und dorsalen Striatum (häufig sind Schicht-5-Neuronen Ausgangspunkt für solche kortikostriatalen Verbindungen (Reiner *et al.*, 2010)), und erhalten Projektionen von modulatorischen Mittelhirnbereichen, z.B. der VTA.

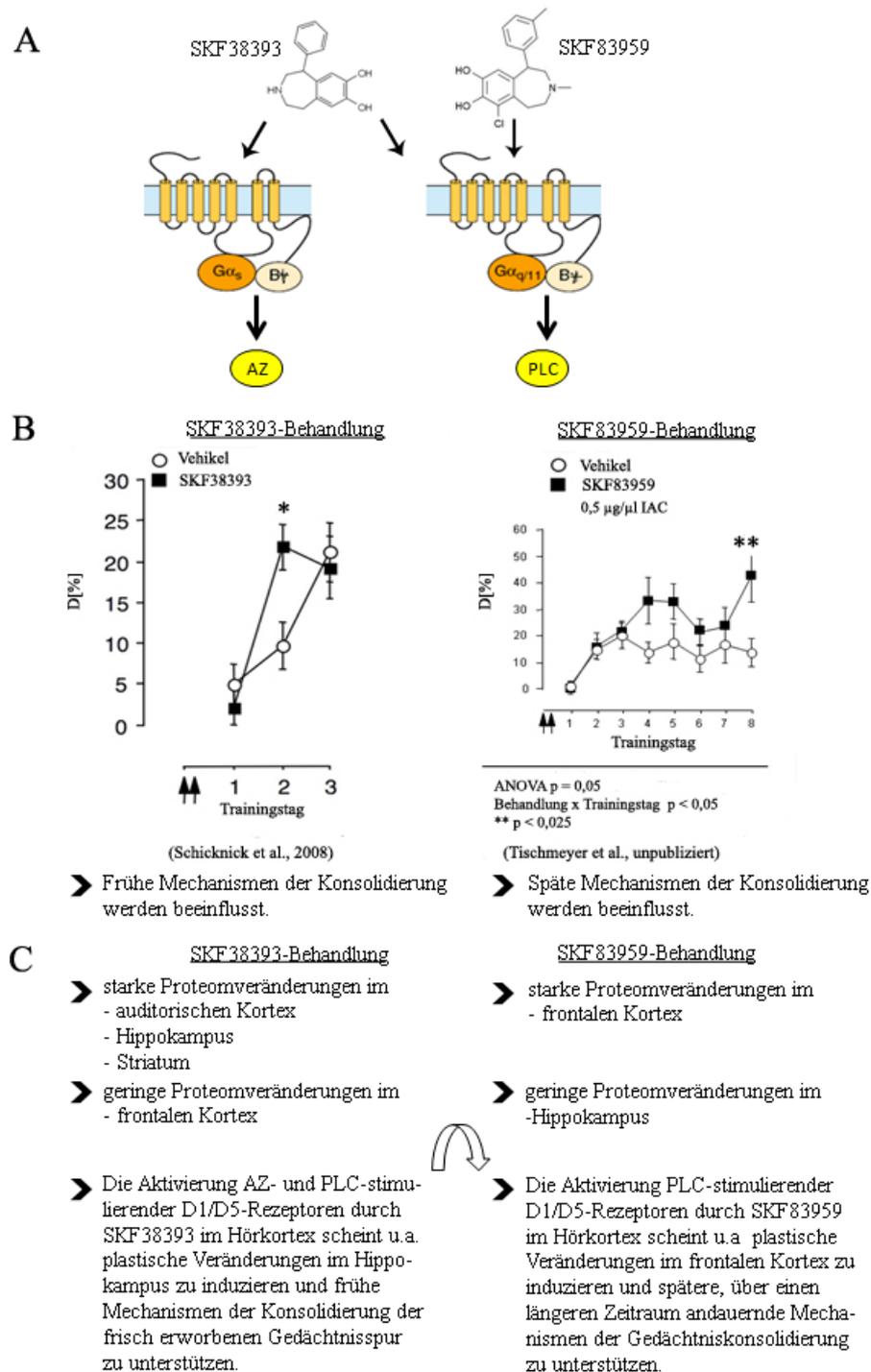
FM-Diskriminierungslernen in der Shuttle-Box ist eine operante Konditionierung, in der die Bedeutung („springen“ oder „nicht springen“) zweier verschiedener Töne anhand der

Wahrscheinlichkeit der Vermeidung elektrischer Strafreize erlernt wird. Hörkortexneuronen scheinen dabei nicht nur in die Unterscheidung der Töne und ihrer unterschiedlichen Bedeutung involviert zu sein, sondern auch in die Wahl geeigneter Verhaltensstrategien und die Bewertung des Strafreizes (Scheich *et al.*, 2011). Zu den anatomischen Substraten solcher nicht-auditorischer und kognitiver Einflüsse zählen die bereits erwähnten Verbindungen des Hörkortex mit multiplen kortikalen und subkortikalen Hirnregionen, denen u.a. nicht-sensorische, multimodale, assoziative und modulatorische Funktionen zugeschrieben werden (Budinger *et al.*, 2008). So scheint die FM-Diskriminierung u.a. eine Interaktion des Hörkortex und präfrontaler Kortexbereiche zu erfordern. Das wurde aus Mikrodialysuntersuchungen geschlossen, die erhöhte kortikale Dopaminantworten während und kurz nach Konditionierung von Gerbils auf FMs zeigten (Stark & Scheich, 1997; Stark *et al.*, 2004). Eine Erhöhung der Dopaminausschüttung in präfrontalen Arealen durch (direkte oder indirekte) Interaktion mit dem AC könnte sich positiv auf kognitive Leistungen, wie Aufmerksamkeit und Arbeitsgedächtnis, auswirken (Robbins & Arnsten, 2009; Granon *et al.*, 2000), sowie auf neuromodulatorische Einflüsse subkortikaler Bereiche im Rahmen kortikaler Plastizitätsprozesse (Fritz *et al.*, 2007). Ferner haben präfrontaler Dopaminflux und Hörkortexaktivität Auswirkungen auf nachgeschaltete dopaminerge Zielregionen, insbesondere das Striatum (Arnauld *et al.*, 1996; Carr & Sesack, 2000; Takahata & Moghaddam, 2000). Striatalen Substrukturen werden u.a. Funktionen in der motorischen Kontrolle, der Verstärker-Evaluierung sowie der Entwicklung geeigneter Verhaltensstrategien bei operanter Konditionierung zugeschrieben (Morris *et al.*, 2010).

Denkbar wäre, dass die pharmakologische Aktivierung von Hörkortex-Dopaminrezeptoren plastische Veränderungen induziert, die ein leichteres Zusammenspiel sensorischer (z.B. AC), Aufmerksamkeit steuernder (z.B. FC), Neuheit evaluierender (z.B. HC), Verstärker evaluierender und motorischer (z.B. ST) und modulatorischer Systeme (z.B. VTA) während des Lernprozesses ermöglichen und somit den Lernprozess selbst und die Gedächtnisbildung erleichtern (Lisman & Grace, 2005). Da nach SKF38393-Injektion in den Gerbil-Hörkortex keine Einflüsse auf die Akquisition der FM-Diskriminierung und die Kurzzeitgedächtnisbildung während der darauf folgenden Trainingssitzung nachweisbar waren, wohl aber auf die Gedächtnisleistung am nächsten Tag (Schicknick *et al.*, 2008), dürften durch eine Aktivierung von D1/D5-Dopaminrezeptoren im Hörkortex vornehmlich Veränderungen induziert werden, welche die Konsolidierung der neu erworbenen Gedächtnisspur erleichtern.

An Mechanismen der Gedächtniskonsolidierung scheinen über einen längeren Zeitraum hinweg mehrere Hirnregionen beteiligt zu sein (Wiltgen *et al.*, 2004; Frankland & Bontempi, 2005; Lesburguères *et al.*, 2011). So sprechen experimentelle Daten dafür, dass in zeitlicher Nähe zur Enkodierung der Hippokampus eine schnelle, aber transiente Rolle bei der Integration von Informationen verschiedenster kortikaler Hirnregionen zu einer Gedächtnisspur, deren Speicherung und Abrufung spielt. Als Voraussetzung für die permanente Einbettung der Gedächtnisspur erfolgt in dieser frühen Periode bereits eine Markierung entsprechender kortikaler Netzwerke. Die Konsolidierung auf kortikalem Niveau erfolgt dann langsam, über wiederholte Reaktivierung hippokampal-kortikaler Netzwerke, wodurch intrakortikale Verbindungen mehr und mehr gestärkt werden. Über Tage oder Wochen verringert sich die Bedeutung des Hippokampus für die Organisation und Abrufung des Gedächtnisses, während die Rolle verschiedener Regionen des Kortex, insbesondere frontaler Bereiche, immer mehr zunimmt.

Betrachtet man die in der vorliegenden Arbeit ermittelten regionalen Unterschiede der Proteomänderungen unter diesem Aspekt, werden interessante Unterschiede deutlich. Wurde SKF38393 in den AC injiziert, dann waren einen Tag später wesentlich stärkere Proteomänderungen im HC nachweisbar als im FC. Geht man von der Annahme aus, dass der HC auch im FM-Diskriminierungsparadigma eine schnelle, aber transiente Rolle in der Konsolidierung der neu erworbenen Gedächtnisspur spielt und dass sich die im HC detektierten Proteomänderungen förderlich auf diesen Prozess auswirken, dann wären diese Befunde eine plausible Erklärung für den schon innerhalb der ersten eins bis zwei Tage messbaren förderlichen Einfluss von SKF38393 auf die Gedächtnisleistung (Schicknick *et al.*, 2008). Wurde SKF83959 in den AC appliziert, dann waren einen Tag später wesentlich stärkere Proteomveränderungen im FC als im HC detektierbar. Geht man von der Annahme aus, dass der FC auch im FM-Diskriminierungsparadigma noch während der Enkodierung Veränderungen erfahren muss, die eine spätere Konsolidierung auf kortikalem Niveau ermöglichen oder doch zumindest erleichtern, und dass sich die beobachteten Proteomänderungen im FC förderlich auf diesen Prozess auswirken, dann wären diese Befunde auf molekularer Ebene eine plausible Erklärung für die erst nach mehreren Tagen messbare Verhaltenswirksamkeit von SKF83959 im FM-Diskriminierungsparadigma (Tischmeyer *et al.*, unveröffentlicht).



**Abb. 4.1: Schematische Zusammenfassung der dopaminerg vermittelten regionalen Unterschiede der Proteomänderungen in den betrachteten Hirnregionen in Bezug auf das FM-Diskriminierungslernen nach SKF38393- bzw. SKF83959-Injektion in den Hörkortex von Gerbils.** (A) Darstellung der in dieser Arbeit für die Proteom-analytischen Untersuchungen verwendeten D1-Klasse Dopaminrezeptoragonisten entsprechend ihrer stimulierenden Wirkung auf AZ- bzw. PLC-gekoppelte D1/D5-Rezeptoren; (B) Lernkinetik der Unterscheidung der Richtung linear-frequenzmodulierter Töne in einer Shuttle-Box unter Einfluss der Dopaminagonisten SKF38393 bzw. SKF8395 nach Injektion in den Hörkortex von Gerbils im Vergleich zu Vehikel-behandelten Kontrollen; (C) Mögliche zusammenfassende Schlussfolgerungen der dopaminerg vermittelten regionalen Proteomänderungen im Gerbilhirn nach SKF38393- bzw. SKF83959-Behandlung bezugnehmend auf das FM-Diskriminierungslernen nach SKF38393-bzw. SKF83959-Injektion in den Hörkortex von Gerbils.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen den dopaminerg vermittelten regionalen Proteomänderungen im Gerbilhirn nach SKF38393- bzw. SKF83959-Behandlung und dem FM-Diskrimierungslernen nach SKF38393-bzw. SKF83959-Injektion in den Hörkortex von Gerbils ist schematisch in Abbildung 4.1 dargestellt.

Regionale Unterschiede zwischen den Proteomänderungen nach SKF38393 und SKF83959 lassen also in Übereinstimmung mit früheren Verhaltensbefunden Einflüsse auf unterschiedliche Aspekte systemischer Gedächtniskonsolidierung vermuten. So scheint die gemeinsame Aktivierung AZ- und PLC-stimulierender D1/D5-Rezeptoren mittels SKF38393 im Hörkortex Prozesse anzustoßen, die u.a. plastische Veränderungen im HC induzieren und frühe Mechanismen der Konsolidierung der frisch erworbenen Gedächtnisspur unterstützen. SKF83959 dagegen, das selektiv PLC-gekoppelte D1/D5-Rezeptoren aktivieren und die dopaminvermittelte Aktivierung AZ-gekoppelter Signalwege sogar vermindern kann, scheint im Hörkortex Prozesse anzustoßen, die vornehmlich plastische Veränderungen im FC induzieren und spätere, über einen längeren Zeitraum andauernde Mechanismen der Gedächtniskonsolidierung modulieren.

#### **4.1.2 Molekulare Unterschiede der Proteomänderungen**

In der vorliegenden Arbeit wurden Proteine einer mit löslichen (TP) und einer mit synaptischen Proteinen angereicherten Fraktion (SP) der verschiedenen Hirnregionen analysiert. Die TP-Fraktion beinhaltet hauptsächlich integrale Membranproteine, membranassoziierte Proteine, zytosolische Proteine sowie ECM-Proteine. Die SP-Fraktion enthält vornehmlich Zytoskelett- und Gerüst-Proteine sowie Membranproteine und Komponenten intrazellulärer Signalsysteme, die fest mit der synaptische Zytomatrix assoziiert sind, und ECM-Proteine (Smalla *et al.*, 2000). Diese Proteine zeigen überraschend hohe Umsatzraten und Mobilität (Bingol & Sheng, 2011; Sheng & Hoogenraad, 2007; Ehlers, 2003). Sie können einer dynamischen Regulation durch posttranslationale Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierung und Ubiquitinierung, unterliegen, die für Umverteilung, Proteasom-vermittelten Abbau oder lokale Neusynthese einzelner Proteine entscheidend sein können. Die Abundanz eines Proteins in den untersuchten biochemischen Fraktionen kann also sowohl von seinen Synthese- und Abbauraten abhängen als auch von der Stärke von Protein-Protein-Interaktionen, die durch posttranslationale Modifikationen reguliert werden können.

Sowohl nach SKF38393-Injektion als auch nach SKF83959-Injektion in den Gerbil-Hörkortex sind durch die vorliegenden Proteomanalysen in großer Anzahl mitochondriale

Proteine in regulierten Spots der untersuchten Hirnregionen und Proteinfractionen identifiziert worden. Mitochondrien sind hochmobile Organellen eukaryotischer Zellen, die neben ihrer bekannten Rolle als „Kraftwerk der Zelle“ in eine Reihe weiterer vitaler Zellfunktionen, wie z.B. Regulation von Kalziumhomöostase und Apoptose, involviert sind. In Neuronen können sich Mitochondrien aktivitätsabhängig innerhalb und zwischen somatischen, dendritischen und axonalen Zellkompartimenten bewegen, wo sie u.a. als Plattform für Signaltransduktionskomponenten dienen und durch ATP-Bereitstellung plastizitätsrelevante Prozesse, wie Transport von RNA- und Proteinpartikeln und Reorganisation des Zytoskeletts, unterstützen können (Übersicht bei Cheng *et al.*, 2010).

Die Kategorie der Zytoskelett- und Gerüstproteine zählte mit weit mehr als 100 in regulierten Spots identifizierten Vertretern ebenfalls zu den am stärksten modulierten Proteingruppen, unabhängig von der untersuchten Hirnregion. Zusammen mit dem Auffinden verschiedener Komponenten Proteasom-vermittelter Proteinabbaus könnte das darauf hindeuten, dass Elemente der Zellstruktur, des subsynaptischen Zytoskeletts und seiner Verbindungen zu Gerüstproteinen der prä- und postsynaptischen Zytomatrix in verschiedenen Hirnregionen in hohem Maße der Modulation durch kortikale dopaminerge Aktivität unterliegen, in deren Folge Reorganisationsprozesse im Rahmen lerninduzierter Plastizitätsphänomene erleichtert sein könnten. Tatsächlich erfahren solche Proteine auch eine lerninduzierte Modulation. So wurden Expressionsveränderungen von Zytoskelettproteinen 4 h nach Induktion von Langzeitpotenzierung nachgewiesen (McNair *et al.*, 2006), einer gut untersuchten Form synaptischer Plastizität, die als ein Modell für Lern- und Gedächtnis-relevante Plastizität angesehen wird. Ferner wurde im Hippokampus der Ratte nach Erlernen einer räumlichen Aufgabe ein frühes Ansteigen Proteasom-vermittelter Proteindegradation, gefolgt von einer dynamischen Regulation verschiedener Vertreter der Aktin-, Tubulin- und Neurofilament-Familien über einen Zeitraum von 24 h hinweg beobachtet (Monopoli *et al.*, 2011). Diese Befunde weisen darauf hin, dass lerninduzierte Prozesse die Monomer-Polymer-Balance der Hauptkomponenten des Zytoskeletts über mindestens 24 h verändern können.

In Übereinstimmung damit wurde kürzlich im AC, FC, HC und ST der Maus 6 h und 24 h nach FM-Diskriminierungslernen das verminderte Auftreten einer Reihe großer Multidomänenproteine in der synaptisch angereicherten Proteinfraction (SP) detektiert (Kähne *et al.*, 2012). Da für solche Proteine u.a. Funktionen in der Regulation von Zusammenhalt und Dynamik verschiedener zytoskelettaler Elemente bekannt sind, könnten

die beobachteten Veränderungen auf eine lerninduzierte „Auflockerung“ prä- und postsynaptischer Zytomatrizes als Voraussetzung für Umorganisationsprozesse im Rahmen künftiger Lernereignisse hindeuten. Interessanterweise waren diese Veränderungen fast ausschließlich in den Mäusen nachweisbar, die auch wirklich die Möglichkeit hatten, die FM-Diskriminierung zu erlernen, nicht aber in Kontrolltieren, denen lediglich eine entsprechende Zahl von Ton- oder Strafreizen verabreicht wurde. Berücksichtigt man, dass konditionierte Tiere im Gegensatz zu kontrollstimulierten Tieren u.a. eine erhöhte kortikale Dopaminfreisetzung aufweisen (Stark & Scheich, 1997; Stark *et al.* 2004), dann wäre auch in dieser Studie die kortikale Dopaminrezeptoraktivierung als ein Modulator permissiver Mechanismen in den untersuchten kortikalen und subkortikalen Hirnregionen in Betracht zu ziehen. Aus methodischen Gründen konnten diese riesigen Multidomänenproteine nicht Gegenstand der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sein. Interessant wäre aber z.B. die Frage, ob die Abundanz solcher Proteine in der SP-Fraktion der verschiedenen Hirnregionen auch durch pharmakologische Aktivierung von Dopaminrezeptoren im Hörkortex modulierbar ist.

Betrachtet man Veränderungen der Zytoskelett- und Gerüstproteine in der SP-Fraktion von HC und FC, dann fällt eine gegenläufige Regulation durch die verschiedenen in den AC injizierten Agonisten auf. Während nach SKF38393 die meisten dieser Proteine im HC in hochregulierten und im FC in herunterregulierten Spots detektiert wurden, war die Richtung der Veränderungen nach SKF83959 umgekehrt. Geht man davon aus, dass Veränderungen in der SP-Fraktion einer Hirnregion Plastizitätsphänomene widerspiegeln, die mit veränderter synaptischer Kommunikation einhergehen, dann könnten die nach Injektion der verschiedenen Agonisten in den AC detektierten Modulationen von Zytoskelett- und Gerüstproteinen in der SP-Fraktion des HC und FC wiederum auf funktionelle Unterschiede hinweisen, wie sie im vorangegangenen Abschnitt mit Blick auf den förderlichen Einfluss auf systemische Mechanismen der Gedächtniskonsolidierung diskutiert worden sind.

Im FM-Diskriminierungsparadigma kann der einen Tag nach lokaler Injektion von SKF38393 in den Gerbil-Hörkortex nachweisbare gedächtnisfördernde Effekt entweder durch Ko-Injektion des Proteinsynthese-Inhibitors Anisomycin oder des mTOR-Inhibitors Rapamycin unterdrückt werden (Schicknick *et al.*, 2008). Die Induktion des gedächtnisfördernden Effekts durch SKF38393 erfordert also offenbar mTOR-vermittelte, translationsabhängige Veränderungen im AC. Erfolgt die Inhibitor-Injektion in den AC erst kurz nach der ersten

Trainingssitzung, also einen Tag nach der SKF38393-Injektion, dann ist der gedächtnisfördernde Effekt zwar noch durch den generellen Proteinsyntheseblocker Anisomycin unterdrückbar, aber nicht mehr durch Rapamycin, das nur den mTOR-kontrollierten Teil der mRNA-Translation hemmt. Das heißt offenbar, wenn durch SKF38393 bereits einen Tag vor dem Lernereignis mTOR-vermittelte, translationsabhängige Veränderungen im Hörkortex induziert werden, dann ist zusätzliche mTOR-abhängige (Rapamycin-sensitive) Translation im Hörkortex für Prozesse der Gedächtnisbildung während der Postakquisitionsphase nicht weiter erforderlich, während andere Anisomycin-sensitive Translationsmechanismen immer noch intakt sein müssen. Die Proteinkinase mTOR gilt u.a. als ein Regulator lokaler, dendritischer Proteinsynthese (neuere Übersicht bei Troca-Marín *et al.*, 2012). Zu den Funktionen von mTOR zählt die Kontrolle der Translation bestimmter mRNA-Klassen, z.B. solcher, die Komponenten und Regulatoren der Translationsmaschinerie selbst kodieren. Eine denkbare Erklärung für den gedächtnisfördernden Effekt von SKF38393 war daher (Schicknick *et al.*, 2008), dass Dopaminrezeptor-vermittelte mTOR-Aktivierung im Hörkortex einen Anstieg der Translationskapazität in Synapsen des Hörkortex bewirken könnte, der dann über einen Zeitraum von Stunden oder Tagen eine bei Bedarf schnellere Verfügbarkeit plastizitätsrelevanter Proteine durch vermehrte (Rapamycin-insensitive) Synthese ermöglicht.

Tatsächlich waren in der vorliegenden Arbeit nach Behandlung mit SKF38393 verschiedene RNA-bindende Proteine (z.B. hnRNPs der Familien A, H, K, L) in der SP-Fraktion des AC identifiziert worden, was auf einen Einfluss der Agonistwirkung auf lokale (dendritische, synaptische) Translationsprozesse hindeuten könnte. HnRNP K beispielsweise weist eine Vielzahl nukleärer und zytoplasmatischer Funktionen auf. Als eine Art „Andockstation“ ermöglicht es die Integration verschiedener Signalkaskaden und erleichtert somit die Kommunikation zwischen Kinasen und Faktoren, die in die Regulation der Genexpression auf Ebene der Transkription und posttranskriptionaler Prozesse involviert sind (Bomsztyk *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2010). In Neuronen spielt hnRNP K u.a. eine Rolle in der posttranskriptionalen Regulation der Expression zytoskelettaler Komponenten (Thyagarajan & Szaro, 2008). Entgegen der Erwartung waren diese Proteine, die u.a. in die Regulation von Stabilität, Transport und Translation von mRNAs involviert sein können, aber im Hörkortex SKF38393-behandelter Gerbils der vorliegenden Studie fast ausnahmslos in herunterregulierten Spots detektiert worden. Dagegen waren die meisten dieser Proteine in hochregulierten Spots der SP-Fraktion des HC nachweisbar. Sieht man die Abundanz solcher

RNA-bindenden Proteine in der SP-Fraktion als einen Indikator für lokale Translationsaktivität an, dann könnten diese Befunde darauf hinweisen, dass SKF38393-Injektion in den AC nicht im AC zu einer länger anhaltenden Aktivierung des lokalen Translationsapparates führt, sondern im HC. D1/D5-Rezeptoraktivierung im AC mittels SKF38393 könnte also über eher schnelle, transiente, mTOR-vermittelte Translationsprozesse zu Änderungen synaptischer Signalübertragung im AC führen, in deren Folge in anderen, direkt oder indirekt mit dem AC verbundenen Hirnregionen, wie dem HC, Kapazität und/oder Aktivität des lokalen Translationsapparates erhöht wird. Ähnliche Mechanismen, allerdings vermutlich an andere intra- und interneuronale Signalwege gekoppelt, wären für die Wirkung von lokal in den AC injiziertem SKF83959 zu postulieren. Hier waren in der SP-Fraktion des FC verschiedene dieser RNA-bindenden Proteine in hochregulierten Spots identifiziert worden, während sie in der SP-Fraktion des HC kaum auffällig wurden.

Ein denkbarer Mechanismus der dopaminergen Modulation synaptischer Signalübertragung im AC könnte sein, dass – wie für hippocampale Neuronen beschrieben (Smith *et al.*, 2005) – D1/D5-Rezeptoraktivierung über Rapamycin-sensitive lokale Proteinsynthese die Insertion von AMPA-Rezeptoren und somit die synaptische Transmission kontrolliert. Ferner wurde an kortikalen Neuronen gezeigt, dass eine pharmakologische Aktivierung von D1/D5-Rezeptoren offenbar über präsynaptische Mechanismen zur Erhöhung der spontanen Glutamatfreisetzung und somit der Frequenz von Miniaturereignissen auf postsynaptischer Seite, so genannten mEPSCs, führen kann (Chu *et al.*, 2010). Solche mEPSCs wiederum haben das Potential, über die Regulation lokaler Translationsprozesse synaptische Übertragungseigenschaften dynamisch zu verändern (Sutton *et al.*, 2006).

Zusammenfassend scheint die Analyse identifizierter Proteine darauf hinzuweisen, dass sowohl die Injektion von SKF38393 als auch von SKF83959 in den Hörkortex die Interaktion mit anderen gedächtnisrelevanten Hirnstrukturen in einer Weise moduliert, die auf zellulär-molekularer Ebene ähnliche Mechanismen anspricht. Hier sind in erster Linie Veränderungen im Bereich von Proteinen auffällig, die möglicherweise im Zusammenhang mit strukturellen Reorganisationsprozessen zu sehen sind, wie Zytoskelett-/Gerüstproteine und RNA-bindende Proteine. Hirnregion und Richtung der detektierten Proteomveränderungen scheinen dabei von der Art des in den Hörkortex injizierten Agonisten abzuhängen.

## 4.2 $\alpha$ -Synuclein: Dopaminerge Regulation und FM-Diskriminierungslernen

Eines der mittels Proteom-Analyse im Gerbil-Hörkortex einen Tag nach SKF38393-Injektion in einem signifikant hochregulierten Spot identifizierten Kandidatenproteine ist  $\alpha$ -Synuclein.

$\alpha$ -Synuclein ist ein kleines (140 Aminosäuren) peripheres Membranprotein, das ursprünglich in Verbindung mit synaptischen Vesikeln entdeckt wurde (Maroteaux *et al.*, 1988).  $\alpha$ -Synuclein wird in einer Reihe von neuronalen und nicht-neuronalen Zelltypen exprimiert (Dev *et al.*, 2003). Es ist offenbar ubiquitär im Gehirn exprimiert (Iwai *et al.*, 1995). Im Verlaufe der Embryonalentwicklung ist die Expression von  $\alpha$ -Synuclein während Zeiten der Synapsenbildung erhöht (George *et al.*, 1995). Bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer, akkumuliert  $\alpha$ -Synuclein in Lewy *bodies* und dystrophischen Neuriten in der *Substantia nigra* (Spillantini *et al.*, 1997). Im  $\alpha$ -Synuclein-Molekül bilden sieben sich wiederholende, aus 11 Aminosäuren bestehende Motive eine N-terminale amphipathische Helix (Davidson *et al.*, 1998), die über Membranbindung zur präsynaptischen Lokalisation des Proteins und seiner Assoziation mit synaptischen Vesikeln beiträgt (Jensen *et al.*, 1998; Fortin *et al.*, 2004).

$\alpha$ -Synuclein ist u.a. in die Regulation verschiedener Aspekte des Dopaminmetabolismus wie Synthese, vesikuläre Speicherung und Freisetzung involviert (neuere Übersicht bei Cheng *et al.*, 2011a). So kann es als Gegenspieler von 14-3-3-Proteinen Phosphorylierung und Aktivität der Tyrosinhydroxylase und somit die Dopaminsynthese regulieren. Ferner greift  $\alpha$ -Synuclein meist inhibierend in verschiedene Schritte des synaptischen Vesikelzyklus ein. Das kann über eine Hemmung der Phospholipase D2 geschehen, über eine Modulation des Polymerisationsstatus von Aktin, oder über eine Chaperonfunktion bei der SNARE-Komplex-Bildung.  $\alpha$ -Synuclein gilt als negativer Regulator der aktivitätsabhängigen Dopaminfreisetzung, ist aber auch in die Regulation der Freisetzung anderer Transmitter (darunter Glutamat, Noradrenalin) involviert (Abeliovich *et al.*, 2000; Cabin *et al.*, 2002; Perez *et al.*, 2002; Sidhu *et al.*, 2004; Yavich *et al.*, 2004; Bonini & Giasson, 2005; Peng *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2005; Gureviciene *et al.*, 2007; Bellani *et al.*, 2010; Lou *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011).

### 4.2.1 Dopaminerge Regulation der Abundanz von $\alpha$ -Synuclein *in vivo*

In der vorliegenden Arbeit wurde  $\alpha$ -Synuclein nach Applikation von SKF38393 in den AC in der TP-Fraktion des AC in einem hochregulierten Spot nachgewiesen. Diese Regulation

wurde in der Immunblot-Analyse bestätigt.  $\alpha$ -Synuclein ist vornehmlich präsynaptisch lokalisiert (Maroteaux *et al.*, 1988) und wurde im Proteomscreen in der tritonlöslichen Fraktion identifiziert. Dies stimmt mit Angaben der Literatur überein: biochemische Gehirnfractionen weisen darauf hin, dass  $\alpha$ -Synuclein zur löslichen Proteinfraction gehört (George *et al.*, 1995; Kahle *et al.*, 2000). Die Hochregulation von  $\alpha$ -Synuclein im AC nach SKF38393-Applikation könnte als direkter Effekt der Agonist-Rezeptor-Interaktion gedeutet werden, da dieser lokal in den AC injiziert wurde.

Nach Applikation von SKF83959 konnte  $\alpha$ -Synuclein nicht in regulierten Spots identifiziert werden. Möglicherweise ist  $\alpha$ -Synuclein über die Aktivierung des AZ-gekoppelten Signalweges im AC reguliert. Ein Weg, diese Vermutung zu bestätigen, wäre eine weitere Immunblot-Analyse, in der SKF83822, welches nur den AZ-vermittelten Signalweg reguliert, appliziert würde. Somit würde der AZ-basierte Signalweg selektiv aktiviert werden. Falls  $\alpha$ -Synuclein in dieser Analyse als reguliert gefunden würde, wäre dies ein Indiz der Regulation von  $\alpha$ -Synuclein über den AZ-Signaltransduktionsweg nach D1/D5-Dopaminrezeptor-Aktivierung.

Die vorliegenden Befunde weisen also auf eine erhöhte Abundanz von  $\alpha$ -Synuclein in der löslichen Proteinfraction des Hörkortex 24 h nach pharmakologischer Aktivierung von D1/D5-Dopaminrezeptoren in derselben Hirnregion mittels SKF38393 hin. Die modulatorischen Funktionen von  $\alpha$ -Synuclein bei glutamatergen und dopaminergen Neurotransmissionsprozessen und die Bedeutung dieser Transmissionsysteme für FM-Diskriminierungslernen (Schicknick & Tischmeyer, 2006; Schicknick *et al.*, 2008; Schicknick *et al.*, 2012) waren ausschlaggebend für weiterführende Untersuchungen der Regulation dieses Proteins.

#### **4.2.2 Dopaminerge Regulation der Lokalisation von $\alpha$ -Synuclein *in vitro***

Zunächst wurden mittels Immunfluoreszenztechnik an Neuronenkulturen mögliche Änderungen der subzellulären Verteilung dieses Proteins im Rahmen synaptischer Umorganisationsprozesse nach Dopaminagonistbehandlung untersucht. Es zeigte sich eine verminderte Kolokalisation von  $\alpha$ -Synuclein relativ zu dem präsynaptischen Zytomatrixprotein Bassoon nach SKF38393-Behandlung. Da beiden Proteinen Funktionen im Rahmen präsynaptischer Mechanismen zugeschrieben werden, deren  $\alpha$ -Synuclein-vermittelte Modulation die Freisetzung von Neurotransmittern wie Glutamat und Dopamin beeinflussen kann (Burré *et al.*, 2010; Fortin *et al.*, 2010; Nemani *et al.*, 2010; Mukherjee *et al.*, 2010),

weist eine dopaminerg induzierte Verminderung der  $\alpha$ -Synuclein-Bassoon-Kolokalisation möglicherweise auf eine Verminderung dieses Einflusses von  $\alpha$ -Synuclein im Rahmen plastischer Mechanismen hin, die von kritischer Bedeutung für Lern- und Gedächtnisprozesse sein könnte.

Tatsächlich sprechen verschiedene experimentelle Daten für eine Rolle von  $\alpha$ -Synuclein bei synaptischen Plastizitätsphänomenen (Übersicht bei Cheng *et al.*, 2011a). Bei Singvögeln wird es beispielsweise in distinkten Populationen präsynaptischer Terminalien im Verlauf des Gesanglernens verstärkt exprimiert (Hartman *et al.*, 2001). Verschiedene Modelle mit manipulierter  $\alpha$ -Synuclein-Expression sprechen für eine Modulation sowohl von Kurzzeit- als auch von Langzeit-Plastizität in verschiedenen Hirnregionen, einschließlich kortikaler, hippocampaler und striataler Areale (Abeliovich *et al.*, 2000; Steidl *et al.*, 2003; Gureviciene *et al.*, 2007, Gureviciene *et al.*, 2009; Watson *et al.*, 2009). Eine Bedeutung von  $\alpha$ -Synuclein sowohl für hippocampale Langzeitpotenzierung als auch für präsynaptische Formen von Langzeitdepression sind beobachtet worden (Liu *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007, Watson *et al.*, 2009). Meist werden die Mechanismen der Modulation synaptischer Plastizität durch  $\alpha$ -Synuclein mit seinen präsynaptischen Funktionen in Zusammenhang gebracht. Vor dem Hintergrund der in der vorliegenden Arbeit nach SKF38393 beobachteten, scheinbar gegenläufigen Veränderungen in der Abundanz von  $\alpha$ -Synuclein und seiner Kolokalisation mit dem präsynaptischen Protein Bassoon ist zu beachten, dass  $\alpha$ -Synuclein auch wichtige Funktionen in anderen Zellkompartimenten zugeschrieben werden. Dazu gehören u.a. Einflüsse auf die SNARE-Komplexbildung bei ER (Endoplasmatisches Retikulum)-Golgi-Transportmechanismen (Thayanidhi *et al.*, 2010) sowie auf Clathrin-vermittelte Endozytose von Rezeptoren (Cheng *et al.*, 2011b).

#### **4.2.3 FM-Diskriminierungslernen $\alpha$ -Synuclein-defizienter Mäuse**

Die vorangegangenen Experimente weisen auf deutliche Veränderungen der Expression und Lokalisation von  $\alpha$ -Synuclein nach pharmakologischer dopaminergischer Aktivierung hin. Die Relevanz von  $\alpha$ -Synuclein für FM-Diskriminierungslernen und seine dopaminerge Modulation wurde daher an  $\alpha$ -Synuclein-defizienten Mäusen (C57BL/6JOLA<sup>Hsd</sup>; *snca*<sup>-/-</sup>) und nicht-defizienten Mäusen (C57BL6/6JR<sup>c</sup><sup>Hsd</sup> und C57BL/6JCr<sup>l</sup>; *snca*<sup>+/+</sup>) untersucht.  $\alpha$ -Synuclein-defiziente Mäuse weisen eine Deletion im Chromosom 6 auf. Diese Deletion wurde bereits gut untersucht und ist dafür bekannt, dass sie zwei Gene beinhaltet: eins für  $\alpha$ -Synuclein und eins für Multimerin-1 (Specht & Schöpfer, 2001; Specht & Schöpfer, 2004).

Die Multimerin-1-Expression konnte bisher im Gehirn nicht nachgewiesen werden und dürfte daher mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht zum Verhaltensphänotyp der Mäuse beitragen. C57BL/6JolaHsd-Mäuse haben eine normale Lebenserwartung, weisen keine offensichtlichen sensorimotorischen oder motivationellen Defizite auf und sind in der Lage, räumliche und olfaktorische Aufgaben normal zu erlernen (Chen *et al.*, 2002; Jüch *et al.*, 2009).

Im FM-Diskriminierungsparadigma lernten  $snca^{-/-}$ -Mäuse zwar während der ersten Trainingstage schneller, erreichten aber letztlich ein geringeres Diskriminierungsniveau als  $snca^{+/+}$ -Mäuse. Die höhere Akkuratess der  $snca^{-/-}$ -Mäuse während der ersten Trainingstage ist vornehmlich auf eine geringere Zahl falscher Antworten zurückzuführen (vgl. Tabelle 6.2-6.7 im Anhang). Das könnte auf eine mögliche förderliche Rolle von  $\alpha$ -Synuclein für impulsives Verhalten hinweisen, wie sie kürzlich nahegelegt wurde (Peña-Oliver *et al.*, 2012) –  $snca^{-/-}$ -Mäuse könnten also weniger spontane Reaktionen zeigen als  $snca^{+/+}$ -Mäuse und dadurch eine höhere Fehlerfreiheit erreichen. Allerdings wiesen die Intertrial-Aktivitäten in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Mäusen auf, und die Anzahlen falscher Antworten glichen sich an den folgenden Trainingstagen an, sodass Unterschiede in der Impulsivität als alleinige Erklärung für die Unterschiede im Lernverhalten kaum in Frage kommen dürften. Gemessen an der Intertrial-Aktivität und am Fluchtverhalten nach Einsetzen des Strafreizes ist es ferner unwahrscheinlich, dass Unterschiede sensorimotorischer und/oder motivationeller Art messbar zu den Unterschieden im Diskriminierungsverhalten beigetragen haben.

Für  $snca^{-/-}$ -Mäuse konnte allerdings eine erhöhte Rate operanten Verhaltens während intrakranialer Selbststimulation gezeigt werden (Oksman *et al.*, 2006), die durch einen Wegfall des negativen Einflusses von  $\alpha$ -Synuclein auf die dopaminerge Transmission erklärt wird. Tatsächlich wurden die Unterschiede im FM-Diskriminierungslernen zwischen  $snca^{-/-}$ - und  $snca^{+/+}$ -Mäusen durch den D1/D5-Antagonisten SCH23390 unterdrückt, wenn dieser lediglich nach der ersten Trainingssitzung systemisch appliziert wurde, und durch den D1/D5-Agonisten SKF38393 verstärkt. SKF83822, das selektiv den AZ-gekoppelten Signalweg stimuliert, beeinflusst vornehmlich das Diskriminierungsverhalten an den ersten Trainingstagen, während SKF83959, welches selektiv PLC-gekoppelte D1/D5-Rezeptoren aktivieren und die dopaminvermittelte Aktivierung AZ-vermittelter Signalwege sogar vermindern kann, Einfluss auf die spätere Gedächtnisleistung nimmt. Offenbar werden

während der ersten Trainingssitzung AZ- und PLC-gekoppelte Mechanismen dopaminerg induziert, die ihrerseits die Lernrate an den darauf folgenden Trainingstagen bzw. die letztlich erreichte Gedächtnisleistung unterschiedlich beeinflussen.

$\alpha$ -Synuclein scheint also im Verlaufe des FM-Diskriminierungslernens in Mechanismen involviert zu sein, die durch Aktivierung von D1/D5-Dopaminrezeptoren während und kurz nach dem initialen Lernereignis angestoßen werden und über die Interaktion von AZ- und PLC-abhängigen Signalwegen die Lernrate während der ersten Trainingstage sowie die spätere Gedächtnisleistung in unterschiedlicher Weise beeinflussen können. Trotz methodisch bedingter Unterschiede (Spezies Maus, systemische Applikationstechnik) befinden sich die Zeitverläufe der Verhaltenswirksamkeit AZ-stimulierender und PLC-stimulierender D1/D5-Agonisten im Einklang mit den früheren, am Gerbil nach topischer Agonistapplikation erhobenen Verhaltensbefunden (Schicknick *et al.*, 2008; Tischmeyer *et al.*, unveröffentlicht). Zusammen mit den im ersten Teil der Arbeit beschriebenen Ergebnissen der Proteomanalysen könnten sie auf permissive Prozesse hinweisen, die unterschiedliche Mechanismen der systemischen Gedächtniskonsolidierung unter Einbeziehung hippokampaler und kortikaler Strukturen unterstützen.

### 4.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte aus methodischen Gründen nicht zwischen neuronalem und gliärem Proteom unterschieden werden. Eine Zelltyp-spezifische Methode, die GINCAT-Methode (*genetically introduced non-canonical amino acid tagging*) (Ngo *et al.*, 2009; Dieterich, 2010), mit der eine Differenzierung der Proteinsynthese zwischen Neuronen und Glia möglich ist, könnte hier im Rahmen künftiger pharmakologischer und verhaltensexperimenteller Studien Anwendung finden. Darüber hinaus sollte die Protein-Identifikationstechnik BONCAT (*bioorthogonal amino acid tagging*) eine spezifische und zeitauflösende Identifikation neu synthetisierter Proteine erlauben (Dieterich *et al.*, 2006). Diese Fragen sind u.a. Gegenstand weiterführender Untersuchungen im Rahmen des SFB779. Desweiteren stellt sich die Frage, inwieweit Proteine, die mittels 2D-Gelelektrophorese nicht erfasst werden, wie z. B. Bassoon und Piccolo, dopaminerg reguliert werden. Weiterführende Arbeiten könnten daher mit der von Kähne *et al.* (2012) verwendeten Technik der Identifizierung ICPL (*Isotope-coded protein label*)-markierter Peptide (Schmidt *et al.*, 2005) mittels nano-LC-ESI-Ionenfallen-Tandem-Massenspektrometrie durchgeführt werden. Ferner wäre die Frage interessant, über welchen Signalweg nach D1-Klasse Rezeptor-Aktivierung  $\alpha$ -

Synuclein reguliert wird. Proteinanalytische Untersuchungen im Rahmen pharmakologischer Experimente, in denen z.B. SKF83822 in den Hörkortex injiziert würde, welches selektiv den AZ-gekoppelten Signalweg aktiviert, könnten diese Frage einer Beantwortung näher bringen.

## 5. Literatur

Abel, T. and Lattal, K.M. (2001) Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol*, **11**, 180-187.

Abeliovich, A., Schmitz, Y., Farinas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W.H., Castillo, P.E., Shinsky, N., Garcia Verdugo, J.M., Armanini, M., Ryan, A., Hynes, M., Philips, H., Sulzer, D. and Rosenthal, A. (2000) Mice lacking  $\alpha$ -Synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine System, *Neuron*, **25**, 239-252.

Anden, N.E., Carlsson, A., Dahlstroem, A., Fuxe, K., Hillarp, N.A. and Larsson, K. (1964) Demonstration and mapping out of nigro-neostriatal dopamine neurons. *Life Sci*, **3**, 523-530.

Andersen, P.H., Gingrich, J.A., Bates, M.D., Dearry, A., Falardeau, P., Senogles, S.E. and Caron, M.G. (1990) Dopamine receptor subtypes: beyond the D1/D2 classification. *Trends Pharmacol Sci*, **11**, 231-236.

Arnauld, E., Jeantet, Y., Arsaut, J. and Demotes-Mainard, J. (1996) Involvement of the caudal striatum in auditory processing: c-fos response to cortical application of picrotoxin and to auditory stimulation. *Brain Res Mol Brain Res*, **41**, 27-35.

Asztély, F. and Gustafsson, B. (1996) Ionotropic glutamate receptors. Their possible role in the expression of hippocampal synaptic plasticity. *Mol Neurobiol*, **12**, 1-11.

Barondes, S.H. and Cohen, H.D. (1968) Arousal and the conversion of “short-term” and “long-term” memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **61**, 923-929.

Bear, M.F. and Malenka, R.C. (1994) Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol*, **4**, 389-99.

Beaulieu, J.M. and Gainetdinov, R. (2011) The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev*, **63**, 182-217.

Bellani, S., Sousa, V.L., Ronzitti, G., Valtorta, F., Meldolesi, J. and Chierigatti, E. (2010) The regulation of synaptic function by alpha-synuclein. *Commun Integr Biol*, **3**, 106-109.

Bergkvist, A., Rusnakova, V., Sindelka, R., Andrade Garda, J.M., Sjögren, B., Lindh, D., Forootan, A. and Kubista, M. (2010) Gene expression profiling – Clusters of possibilities. *Methods*, **50**, 323-335.

Biggs, D.S.C. (2004) Clearing up deconvolution. Biophotonics International<sup>®</sup>, Photonic Solutions for Biotechnology and Medicine, A Laurin Publication.

Bingol, B. and Sheng, M. (2011) Deconstruction for reconstruction: the role of proteolysis in neural plasticity and disease. *Neuron*, **69**, 22-32.

Bloomer, W.A., VanDongen, H.M. and VanDongen, A.M. (2008) Arc/Arg3.1 Translation is controlled by convergent N-Methyl-D-aspartate and Gs-coupled receptor signaling pathways. *J Biol Chem*, **283**, 582-592.

- Boeckers, T.M. (2006) The postsynaptic density. *Cell Tissue Res*, **326**, 409-422.
- Bomsztyk, K., Denisenko, O. and Ostrowski, J. (2004) hnRNP K: One protein multiple processes. *Bioessays*, **26**, 629-638.
- Bonini, N.M. and Giasson, B.I. (2005) Snaring the function of alpha-synuclein. *Cell*, **123**, 359-361.
- Bourne, J.A. (2001) SCH 23390: the first selective dopamine D1-like receptor antagonist. *CNS Drug Rev*, **7**, 399-414.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Briggs, C.A., Pollock, N.J., Frail, D.E., Paxson, C.L., Rakowski, R.F., Kang, C.H. and Kebabia, J.W. (1991) Activation of the 5-HT<sub>1C</sub> receptor expressed in *Xenopus* oocytes by the benzazepines SCH 23390 and SKF 38393. *Br J Pharmacol*, **104**, 1038-1044.
- Budinger, E., Heil, P. and Scheich, H. (2000a) Functional organization of auditory cortex in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). III. Anatomical subdivisions and corticocortical connections. *Eur J Neurosci*, **12**, 2425-2451.
- Budinger, E., Heil, P. and Scheich, H. (2000b) Functional organization of auditory cortex in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). IV. Connections with anatomically characterized subcortical structures. *Eur J Neurosci*, **12**, 2452-2474.
- Budinger, E., Heil, P., Hess, A. and Scheich, H. (2006) Multisensory processing via early cortical stages: Connections of the primary auditory cortical field with other sensory systems. *Neuroscience*, **143**, 1065-1083.
- Budinger, E., Laszcz, A., Lison, H., Scheich, H. and Ohl, F.W. (2008) Non-sensory cortical and subcortical connections of the primary auditory cortex in Mongolian gerbils: bottom-up and top-down processing of neuronal information via field AI. *Brain Res*, **1220**, 2-32.
- Burré, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M. and Südhof, T.C. (2010)  $\alpha$ -Synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science*, **329**, 1663-1667.
- Cabin, D.E., Shimazu, K., Murphy, D., Cole, N.B., Gottschalk, W., McIlwain, K.L., Orrison, B., Chen, A., Ellis, C.E., Paylor, R., Lu, B. and Nussbaum, R.L. (2002) Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *J Neurosci*, **22**, 8797-8807.
- Carlsson, A., Lindqvist, M. and Magnusson, T. (1957) 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature*, **180**, 1200.
- Carlsson, A. (2001) A paradigm shift in brain research. *Science*, **294**, 1021-1024.

- Carr, D.B. and Sesack, S.R. (2000) Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. *J Neurosci*, **20**, 3864-3873.
- Chen, P.E., Specht, C.G., Morris, R.G. and Schoepfe, R. (2002) Spatial learning is unimpaired in mice containing a deletion of alpha-synuclein locus. *Eur J Neurosci*, **16**, 154-158.
- Cheng, A., Hou, Y. and Mattson, M.P. (2010) Mitochondria and neuroplasticity. *ASN Neuro*, **2**, art:e00045.doi:10.1042/AN20100019.
- Cheng, F., Vivacqua, G. and Yu S (2011a) The role of alpha-synuclein in neurotransmission and synaptic plasticity. *J Chem Neuroanat*, **42**, 242-248.
- Cheng, F., Li X., Li, Y., Wang, C., Wang, T., Liu, G., Baskys, A., Uéda, K., Chan, P. and Yu, S. (2011b)  $\alpha$ -Synuclein promotes clathrin-mediated NMDA receptor endocytosis and attenuates NMDA-induced dopaminergic cell death. *J Neurochem*, **119**, 815-825.
- Chu, H.Y., Yang, Z., Zhao, B., Jin, G.Z., Hu, G.Y. and Zhen, X. (2010) Activation of phosphatidylinositol-linked D1-like receptors increases spontaneous glutamate release in rat somatosensory cortical neurons in vitro. *Brain Res*, **1343**, 20-27.
- Civelli, O., Bunzow, J.R. and Grandy, D.K. (1993) Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **33**, 281-307.
- Clinton, L.K., Blurton-Jones, M., Myczek, K., Trojanowski, J.Q. and LaFerla, F.M. (2010) Synergistic Interactions between Abeta, tau, and alpha-synuclein: acceleration of neuropathology and cognitive decline. *J Neurosci*, **30**, 7281-7289.
- Costes, S.V., Daelemans, D., Cho, E.H., Dobbin, Z., Pavlakis, G. and Lockett, S. (2004) Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophys J*, **86**, 3993-4003.
- Dahlstroem, A. and Fuxe, K. (1964) Evidence for the existence of monoaminecontaining neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand Suppl*, **232**, 1-255.
- Davidson, W.S., Jonas, A., Clayton, D.F. and George, J.M. (1998) Stabilization of a-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem*, **273**, 9443-9449.
- Davis, H.P. and Squire, L.R. (1984) Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull*, **96**, 518-559.
- Dev, K.K., Hofele, K., Barbieri, S., Buchman, V.L. and van der Putten, H. (2003) Part II:  $\alpha$ -synuclein and its molecular pathophysiological role in neurodegenerative disease. *Neuropharmacology*, **45**, 14-44.

- Dieterich, D.C., Link, A.J., Graumann, J., Tirrell, D.A. and Schuman, E.M. (2006) Selective identification of newly synthesized proteins in mammalian cells using bioorthogonal noncanonical aminoacid tagging (BONCAT). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 9482-9487.
- Dieterich, D.C. (2010) Chemical reporters for the illumination of protein and cell dynamics. *Curr Opin Neurobiol*, **20**, 623-630.
- Dineley, K.T., Weeber, E.J., Atkins, C., Adams, J.P., Anderson, A.E. and Sweatt, J.D. (2001) Leitmotifs in the biochemistry of LTP induction: amplification, integration and coordination. *J Neurochem*, **77**, 961-971.
- Dudai, Y. (2004) The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol*, **55**, 51-86.
- Ehlers, M.D. (2003) Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nat Neurosci*, **6**, 231-242.
- Enjalbert, A. and Bockaert, J. (1983) Pharmacological characterization of the D2 dopamine receptor negatively coupled with adenylate cyclase in rat anterior pituitary. *Mol Pharmacol*, **23**, 576-584.
- Felder, C.C., Jose, P.A. and Axelrod, J. (1989) The dopamine-1 agonist, SKF 82526, stimulates phospholipase-C activity independent of adenylate cyclase. *J Pharmacol Exp Ther*, **248**, 171-175.
- Flood, J.F., Smith, G.E., Bennett, E.L., Alberti, M.H., Orme, A.E. and Jarvik, M.E. (1986) Neurochemical and behavioral effects of catecholamine and protein synthesis inhibitors in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, **24**, 631-645.
- Fortin, D.L., Troyer, M.D., Nakamura, K., Kubo, S., Anthony, M.D. and Edwards, R.H. (2004) Lipid rafts mediate the synaptic localization of  $\alpha$ -Synuclein. *J Neurosci*, **24**, 6715-6723.
- Fortin, D.L., Nemani, V.M., Nakamura, K. and Edwards, R.H. (2010) The behavior of alpha-synuclein in neurons. *Mov Disord*, **25**, S21-S26.
- Frankland, P.W. and Bontempi, B. (2005) The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 119-130.
- Friedman, E., Jin, L.Q., Cai, G.P., Hollon, T.R., Drago, J., Sibley, D.R. and Wang HY (1997) D1-like dopaminergic activation of phosphoinositide hydrolysis is independent of D1A dopamine receptors: evidence from D1A knockout mice. *Mol Pharmacol*, **51**, 6-11.
- Fritz, J.B., Elhilali, M., David, S.V. and Shamma, S.A. (2007) Does attention play a role in dynamic receptive field adaptation to changing acoustic salience in A1? *Hear Res*, **229**, 186-203.
- Garner, C.G. (2002) Microposter. *Trends Neurosci*, **25**, 251.

- Garner, C.C., Zhai, R.G., Gundelfinger, E.D. and Ziv, N.E. (2002) Molecular mechanisms of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci*, **25**, 243-251.
- George, J.M., Jin, H., Woods, W.S. and Clayton, D.F. (1995) Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron*, **15**, 361-372.
- Gingrich, J.A. and Caron, M.G. (1993) Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu Rev Neurosci*, **16**, 299-321.
- Goelet, P., Castellucci, V.F., Schacher, S. and Kandel, E.R. (1986) The long and the short of long-term memory – a molecular framework. *Nature*, **322**, 419-422.
- Goslin, K., Asmussen, H. and Banker, G. (1998) Rat hippocampal neurons in low density culture., in *Culturing Nerve Cells* (Banker, G. and Goslin, K. eds.), pp 339-370. MIT Press, Cambridge, MA.
- Granon, S., Passetti, F., Thomas, K.L., Dalley, J.W., Everitt, B.J. and Robbins, T.W. (2000) Enhanced and impaired attentional performance after infusion of D1 dopaminergic receptor agents into rat prefrontal cortex. *J Neurosci*, **20**, 1208-1215.
- Greengard, P. (2001) The neurobiology of dopamine signaling. *Biosci Rep*, **21**, 247-269.
- Gundelfinger, E.D. and tom Dieck, S. (2000) Molecular organization of excitatory chemical synapses in the mammalian brain. *Naturwissenschaften*, **87**, 513-523.
- Gundelfinger, E.D. and Fejtová, A. (2012) Molecular organization and plasticity of the cytomatrix at the active zone. *Curr Opin Neurobiol*, **22**, 423-430.
- Gureviciene, I., Gurevicius, K. and Tanila, H. (2007) Role of alpha-synuclein in synaptic glutamate release. *Neurobiol Dis*, **28**, 83-89.
- Gureviciene, I., Gurevicius, K. and Tanila, H. (2009) Aging and alpha-synuclein affect synaptic plasticity in the dentate gyrus. *J. Neural Transm*, **116**, 13-22.
- Halligan, B.D. (2009) ProMoST: A tool for calculating the pI and molecular mass of phosphorylated and modified proteins on 2 dimensional gels. *Methods Mol Biol*, **527**, 283-298.
- Han, S.P., Tang, Y.H. and Smith, R. (2010) Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *Biochem J*, **430**, 379-392.
- Hartman, V.N., Miller, M.A., Clayton, D.F., Liu, W.C., Kroodsma, D.E. and Brenowitz, E.A. (2001) Testosterone regulates alpha-synuclein mRNA in the avian song system. *Neuroreport*, **12**, 943-946.
- Hassel, B. and Dingle, R. (2006) Glutamate, in *Basic Neurochemistry. Molecular, cellular, and medical aspects* (Siegel, G., Albers, R.W., Brady, S., Price, D. eds) pp. 267-290. Elsevier Academic Press. 7<sup>th</sup> Edition.

- Hebb, D.O. (1949) The organization of Behavior. Wiley and Sons, New York.
- Herrmann, U. (2011) Dopaminerg induzierte Proteinänderungen im Hirn der Wüstenrennmaus. Diplomarbeit/ Speziallabor Molekularbiologische Techniken (LIN).
- Hess, P. and Scheich, H. (1996) Optical and FDG mapping of frequency-specific activity in auditory cortex. *Neuroreport*, **7**, 2643-2647.
- Iversen, S.D. and Iversen, L.L. (2007) Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci*, **30**, 188-193.
- Iwai, A., Masliah, E., Yoshimoto, M., Ge, N., Flanagan, L., de Silva, H.A., Kittel, A. and Saitoh, T. (1995) The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron*, **14**, 467-475.
- Izquierdo, I., Medina, J.H., Vianna, M.R., Izquierdo, L.A. and Barros, D.M. (1999) Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res*, **103**, 1-11.
- Jaworski, J. and Sheng, M. (2006) The growing role of mTOR in neuronal development and plasticity. *Mol Neurobiol*, **34**, 205-219.
- Jensen, P.H., Nielsen, M.S., Jakes, R., Dotti, C.G. and Goedert, M. (1998) Binding of alpha-synuclein to brain vesicles is abolished by familial Parkinson's disease mutation. *J Biol Chem*, **273**, 26292-26294.
- Ji, Y., Pang, P.T., Feng, L. and Lu, B. (2005) Cyclic AMP controls BDNF-induced TrkB phosphorylation and dendritic spine formation in mature hippocampal cultures. *Nat Neurosci*, **8**, 164-172.
- Jin, L.Q., Goswami, S., Cai, G., Zhen, X. and Friedman, E. (2003) SKF83959 selectively regulates phosphatidylinositol-linked D1 dopamine receptors in rat brain. *J Neurochem*, **85**, 378-386.
- Jüch, M., Smalla, K.H., Kähne, T., Lubec, G., Tischmeyer, W., Gundelfinger, E.D. and Engelmann, M. (2009) Congenital lac of nNOS impairs long-term social recognition memory and alters the olfactory bulb proteome. *Neurobiol Learn Mem*, **92**, 469-484.
- Kähne, T., Kolodziej, A., Smalla, K.H., Eisenschmidt, E., Haus, U.U., Weismantel, R., Kropf, S., Wetzell, W., Ohl, F.W., Tischmeyer, W., Naumann, M. and Gundelfinger, E.D. (2012) Synaptic proteome changes in mouse brain regions upon auditory discrimination learning. *Proteomics*, **12**, 2433-2444.
- Kahle, P.J., Neumann, M., Ozmen, L., Müller, V., Jacobsen, H., Schindzielorz, A., Okochi, M., Leimer, U., van der Putten, H., Probst, A., Kremmer, E., Kretschmar, H.A. and Haass, C. (2000) Subcellular localization of wild-type and Parkinson's Disease-associated mutant alpha-synuclein in human and transgenic mouse brain. *J Neurosci*, **20**, 6365-6373.
- Kebabian, J.W. and Greengard, P. (1971) Dopamine-sensitive adenylyl cyclase: possible role in synaptic transmission. *Science*, **174**, 1346-1349.

- Kebabian, J.W. and Calne, D.B. (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature*, **277**, 93-96.
- Kim, J.H. and Huganir, R.L. (1999). Organization and regulation of proteins at synapses. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 248-254.
- Kleckner, N.W. and Dingledine, R. (1988) Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science*, **241**, 835-837.
- Kraus, M., Schicknick, H., Wetzell, W., Ohl, F., Staak, S. and Tischmeyer, W. (2002) Memory consolidation for the discrimination of frequency-modulated tones in the Mongolian gerbils is sensitive to protein-synthesis inhibitors applied to the auditory cortex. *Learn Mem*, **9**, 293-303.
- Kuhar, M.J., Minneman, K. and Muly, E.C. (2006) Catecholamines, in Basic Neurochemistry. Molecular, cellular, and medical aspects (Siegel, G., Albers, R.W., Brady, S., Price, D. eds) pp. 211-225. Elsevier Academic Press. 7<sup>th</sup> Edition.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lee, F.J., Xue, S., Pei, L., Vukusic, B., Chéry, N., Wang, Y., Wang, Y.T., Niznik, H.B., Yu, Y.M. and Liu, F. (2002) Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell*, **111**, 219-230.
- Lee, S.P., So, C.H., Rashid, A.J., Varghese, G., Cheng, R., Lanca, A.J., O'Dowd, B.F. and George, S.R. (2004) Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *J Biol Chem*, **279**, 35671-35678.
- Lesburguères, E., Gobbo, O.L., Alaux-Cantin, S., Hambucken, A., Trifilieff, P. and Bontempi, B. (2011) Early tagging of cortical networks is required for the formation of enduring associative memory. *Science*, **331**, 924-928.
- Lezcano, N. and Bergson, C. (2002) D1/D5 dopamine receptors stimulate intracellular calcium release in primary cultures of neocortical and hippocampal neurons. *J Neurophysiol*, **87**, 2167-2175.
- Lisman, J.E. and Grace, A.A. (2005) The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron*, **46**, 703-713.
- Liu, S., Ninan, I., Antonova, I., Battaglia, F., Trinchese, F., Narasanna, A., Kolodilov, N., Dauer, W., Hawkins, R.D. and Arancio, O. (2004) alpha-Synuclein produces a longlasting increase in neurotransmitter release. *EMBO J*, **23**, 4506-4516.
- Liu, S., Fa, M., Ninan, I., Trinchese, F., Dauer, W. and Arancio, O. (2007) Alpha-synuclein involvement in hippocampal synaptic plasticity: role of NO, cGMP, cGK and CaMKII. *Eur J Neurosci*, **25**, 3583-3596.
- Lou, H., Montoya, S.E., Alerte, T.N.M., Wang, J., Wu, J., Peng, X., Hong, C.S., Friedrich, E.E., Mader, S.A., Pedersen, C.J., Marcus, B.S., McCormack, A.L., Di Monte, D.A., Daubner

- S.C. and Perez, R.G. (2010) Serine 129 phosphorylation reduces the ability of  $\alpha$ -Synuclein to regulate tyrosine hydroxylase and protein phosphatase 2A in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, **285**, 17648-17661.
- Maroteaux, L., Campanelli, J.T. and Scheller, R.H. (1988) Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci*, **8**, 2804-2815.
- Matthies, H. (1989a) In search of cellular mechanisms of memory. *Prog Neurobiol*, **32**, 277-349.
- Matthies, H. (1989b) Neurobiological aspects of learning and memory. *Annu Rev Psychol*, **40**, 381-404.
- McGaugh, J.L. (2000) Memory – a century of consolidation. *Science*, **287**, 248-251.
- McNair, K., Davies, C.H. and Cobb, S.R. (2006) Plasticity-related regulation of the hippocampal proteome. *Eur J Neurosci*, **23**, 575-580.
- Millan, M.J., Newman-Tancredi, A., Quentric, Y. and Cussac, D. (2001) The "selective" dopamine D1 receptor antagonist, SCH23390, is a potent and high efficacy agonist against cloned human serotonin<sub>2C</sub> receptors. *Psychopharmacology (Berl)*, **156**, 58-62.
- Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., and Caron, M.G. (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*, **78**, 189-225.
- Monopoli, M.P., Raghnaill, M.N., Loscher, J.S., O'Sullivan, N.C., Pangalos, M.N., Ring, R.H., von Schack, D., Dunn, M.J., Regan, C.M., Pennington, S. and Murphy, K.J. (2011) Temporal proteomic profile of memory consolidation in the rat hippocampal dentate gyrus. *Proteomics*, **11**, 4189-4201.
- Morris, G., Schmidt, R. and Bergman, H. (2010) Striatal action-learning based on dopamine concentration. *Exp Brain Res*, **200**, 307-317.
- Moser, M.B. (1999) Making more synapses: a way to store information? *Cell Mol Life Sci*, **55**, 593-600.
- Mukherjee, K., Yang, X., Gerber, S.H., Kwon, H.B., Ho, A., Castillo, P.E., Liu, X. and Südhof, T.C. (2010) Piccolo and bassoon maintain synaptic vesicle clustering without directly participating in vesicle exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 6504-6509.
- Murphy, D.D., Rueter, S.M., Trojanowski, J.Q. and Lee, V.M.Y. (2000) Synucleins are developmentally expressed, and  $\alpha$ -synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J Neurosci*, **20**, 3214-3220.
- Nemani, V.M., Lu, W., Berge, V., Nakamura, K., Onoa, B., Lee, M.K., Chaudhry, F.A., Nicoll, R.A. and Edwards, R.H. (2010) Increased expression of  $\alpha$ -synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis. *Neuron*, **65**, 66-79.

- Ngo, J.T., Champion, J.A., Mahdavi, A., Tanrikulu, I.C., Beatty, K.E., Connor, R.E., Yoo, T.H., Dieterich, D.C., Schuman, E.M. and Tirrell, D.A. (2009) Cell-selective metabolic labeling of proteins. *Nat Chem Biol*, **5**, 715-717.
- Niznik, H.B. and Van Tol, H.H. (1992) Dopamine receptor genes: new tools for molecular psychiatry. *J Psychiatry Neurosci*, **17**, 158-180.
- Ohl, F.W., Wetzel, W., Wagner, T., Rech, A. and Scheich, H. (1999) Bilateral ablation of auditory cortex in Mongolian gerbil affects discrimination of frequency modulated tones but not of pure tones. *Learn Mem*, **6**, 347-362.
- Oksman, M., Tanila, H. and Yavich, L. (2006) Brain reward in the absence of alpha-synuclein. *Neuroreport*, **17**, 1191-1194.
- O'Sullivan, G.J., Roth, B.L., Kinsella and A., Waddington, J.L. (2004) SK&F 83822 distinguishes adenylyl cyclase from phospholipase C-coupled D1-like receptors: behavioural topography. *Eur J Pharmacol*, **486**, 273-280.
- Panchalingam, S. and Undie, A.S. (2001) SKF83959 exhibits biochemical agonism by stimulating [(35)S]GTP gamma S binding and phosphoinositide hydrolysis in rat and monkey brain. *Neuropharmacology*, **40**, 826-837.
- Peña-Oliver, Y., Buchman, V.L., Dalley, J.W., Robbins, T.W., Schumann, G., Ripley, T.L., King, S.L. and Stephens, D.N. (2012) Deletion of alpha-synuclein decreases impulsivity in mice. *Genes Brain Behav*, **11**, 137-146.
- Peng, X.M., Tehranian, R., Dietrich, P., Stefanis, L. and Perez, R.G. (2005)  $\alpha$ -synuclein activation of protein phosphatase 2A reduces tyrosine hydroxylase phosphorylation in dopaminergic cells. *J Cell Sci*, **118**, 3523-3530.
- Perez, R.G., Waymire, J.C., Lin, E., Liu, J.J., Guo, F. and Zigmond, M.J. (2002) A role for  $\alpha$ -synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J Neurosci*, **22**, 3090-3099.
- Perroy, J., Richard, S., Nargeot, J., Bockaert, J. and Fagni, L. (2002) Permissive effect of voltage on mGlu 7 receptor subtype signaling in neurons. *J Biol Chem*, **277**, 1223-1228.
- Pielot, R., Smalla, K.H., Müller, A., Landgraf, P., Lehmann, A.C., Eisenschmidt, E., Haus, U.U., Weismantel, R., Gundelfinger, E.D. and Dieterich, D.C. (2012) SynProt: A database for proteins of detergent-resistant synaptic protein preparations. *Front Synaptic Neurosci*, **4**, 1.
- Pierce, K.L., Premont, R.T. and Lefkowitz, R.J. (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 639-650.
- Popov, N., Schmitt, M., Schulzeck, S. and Matthies, H. (1975) Reliable micromethod for determination of the protein content in tissue homogenates. *Acta Biol Med Ger*, **34**, 1441-1446.

- Raine, C.S. (2006) Neurocellular Anatomy, in Basic Neurochemistry. Molecular, cellular, and medical aspects (Siegel, G., Albers, R.W., Brady, S., Price, D. eds) pp. 3-19. Elsevier Academic Press. 7<sup>th</sup> Edition.
- Redondo, R.L. and Morris, R.G. (2011) Making memories last: the synaptic tagging and capture hypothesis. *Nat Rev Neurosci*, **12**, 17-30.
- Reed, A., Riley, J., Carraway, R., Carrasco, A., Perez, C., Jakkamsetti, V. and Kilgard, M.P. (2011) Cortical map plasticity improves learning but is not necessary for improved performance. *Neuron*, **70**, 121-131.
- Reiner, A., Hart, N.M., Lei, W. and Deng, Y. (2010) Corticostriatal projection neurons – dichotomous types and dichotomous functions. *Front Neuroanat*, **4**, 142.
- Rice, M.E. and Cragg, S.J. (2008) Dopamine spillover after quantal release: rethinking dopamine transmission in the nigrostriatal pathway. *Brain Res Rev*, **58**, 303-313.
- Richter, K., Hess, A. and Scheich, H. (1999) Functional mapping of transsynaptic effects of local manipulation of inhibition in gerbil auditory cortex. *Brain Res*, **831**, 184-199.
- Robbins, T.W. and Arnsten, A.F.T. (2009) The neuropsychopharmacology of fronto-executive function: monoaminergic modulation. *Annu Rev Neurosci*, **32**, 267-287.
- Rondou, P., Haegeman, G. and Van Craenenbroeck, K. (2010) The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties. *Cell Mol Life Sci*, **67**, 1971-1986.
- Rose, S.P. (2000) God's organism? The chick as a model system for memory studies. *Learn Mem*, **7**, 1-17.
- Rosenblum, K., Futter, M., Jones, M., Hulme, E.C. and Bliss, T.V. (2000) ERK1/II regulation by the muscarinic acetylcholine receptors in neurons. *J Neurosci*, **20**, 977-985.
- Ryan, A. (1976) Hearing sensitivity of the mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *J Acoust Soc Am*, **59**, 1222-1226.
- Saar, D. and Barkai, E. (2009) Long-lasting maintenance of learning-induced enhanced neuronal excitability: mechanisms and functional significance. *Mol Neurobiol*, **39**, 171-177.
- Sahu, A., Tyeryar, K.R., Vongtau, H.O., Sibley, D.R. and Undieh, A.S. (2009) D5 dopamine receptors are required for dopaminergic activation of phospholipase C. *Mol Pharmacol*, **75**, 447-453.
- Scheich, H., Heil, P. and Langner, G. (1993) Functional organization of auditory cortex in the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). II. Tonotopic 2-deoxyglucose. *Eur J Neurosci*, **5**, 898-914.
- Scheich, H., Brechmann, A., Brosch, M., Budinger, E. and Ohl, F.W. (2007) The cognitive auditory cortex: task-specificity of stimulus representations. *Hear Res*, **229**, 213-224.

- Scheich, H., Brechmann, A., Brosch, M., Budinger, E., Ohl, F.W., Selezneva, E., Stark, H., Tischmeyer, W. and Wetzel, W. (2011) Behavioral semantics of learning and crossmodal processing in auditory cortex: the semantic processor concept. *Hear Res*, **271**, 3-15.
- Schicknick, H. and Tischmeyer, W. (2006) Consolidation of auditory cortex-dependent memory requires N-methyl-D-aspartate receptor activation. *Neuropharmacology*, **50**, 671-676.
- Schicknick, H., Schott, B.H., Budinger, E., Smalla, K.H., Riedel, A., Seidenbecher, C.I., Scheich, H., Gundelfinger, E.D. and Tischmeyer, W. (2008) Dopaminergic modulation of auditory cortex-dependent memory consolidation through mTOR. *Cereb Cortex*, **18**, 2646-2658.
- Schicknick, H., Reichenbach, N., Smalla, K.H., Scheich, H., Gundelfinger, E.D. and Tischmeyer, W. (2012) Dopamine modulates memory consolidation of discrimination learning in the auditory cortex. *Eur J Neurosci*, **35**, 763-774.
- Schmidt, A., Kellermann, J. and Lottspeich, F. (2005) A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics*, **5**, 4-15.
- Schoch, S. and Gundelfinger, E.D. (2006). Molecular organization of the presynaptic active zone. *Cell Tissue Res*, **326**, 379-391.
- Schulze, H., Ohl, F.W., Heil, P. and Scheich, H. (1997) Field-specific responses in the auditory cortex of the unanaesthetized Mongolian gerbil to tones and slow frequency modulations. *J Comp Physiol A*, **181**, 573-589.
- Sheng, M. and Hoogenraad, C.C. (2007) The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu Rev Biochem*, **76**, 823-847.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*, **68**, 850-858.
- Sibley, D.R. (1999) New insights into dopaminergic receptor function using antisense and genetically altered animals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **39**, 313-341.
- Sidhu, A., Wersinger, C. and Vernier, P. (2004) Does alpha-synuclein modulate dopaminergic synaptic content and tone at the synapse? *FASEB J*, **18**, 637-647.
- Siegmund, A., Langnaese, K. and Wotjak, C.T. (2005) Differences in extinction of conditioned fear in C57BL/6 substrains are unrelated to expression of alpha-synuclein. *Behav Brain Res*, **157**, 291-298.
- Smalla, K.H., Matthies, H., Langnäse, K., Shabir, S., Böckers, T.M., Wyneken, U., Staak, S., Krug, M., Beesley, P.W. and Gundelfinger, E.D. (2000) The synaptic glycoprotein neuroplastin is involved in long-term potentiation at hippocampal CA1 synapses. *P Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4327-4332.

- Smiley, J.F., Levey, A.I., Ciliax, B.J. and Goldman-Rakic, P.S. (1994) D1 dopamine receptor immunoreactivity in human and monkey cerebral cortex: predominant and extrasynaptic localization in dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 5720-5724.
- Smith, W.B., Starck, S.R., Roberts, R.W. and Schuman, E.M. (2005) Dopaminergic stimulation of local protein synthesis enhances surface expression of GluR1 and synaptic transmission in hippocampal neurons. *Neuron*, **45**, 765-779.
- Snyder, S.H., Taylor, K.M., Coyle, J.T. and Meyerhoff, J.L. (1970) The role of brain dopamine in behavioral regulation and the actions of psychotropic drugs. *Am J Psychiatry*, **127**, 199-207.
- Sokoloff, P., Diaz, J., Le Foll, B., Guillin, O., Leriche, L., Bezard, E. and Gross, C. (2006) The dopamine D3 receptor: a therapeutic target for the treatment of neuropsychiatric disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, **5**, 25-43.
- Specht, C.G. and Schoepfer, R. (2001) Deletion of the alpha-synuclein locus in a subpopulation of C57BL/6J inbred mice. *BMC Neurosci*, **2**, 11.
- Specht, C.G. and Schoepfer, R. (2004) Deletion of multimerin-1 in alpha-synuclein-deficient mice. *Genomics*, **83**, 1176-1178.
- Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M.Y., Trojanowski, J., Jakes, R. and Goedert, M. (1997)  $\alpha$ -Synuclein in Lewy bodies. *Nature*, **388**, 839-840.
- Squire, L.R. and Knowlton, B.J. (1999) The medial temporal lobe, the hippocampus, and the memory systems of the brain., in *The New Cognitive Neurosciences* (Gazzaniga, M. ed.), pp. 765-779. MIT Press, Cambridge MA.
- Stark, H. and Scheich, H. (1997) Dopaminergic and serotonergic neurotransmission systems are differentially involved in auditory cortex learning: a long-term microdialysis study of metabolites. *J Neurochem*, **68**, 691-697.
- Stark, H., Rothe, T., Wagner, T. and Scheich, H. (2004) Learning a new behavioral strategy in the shuttle-box increase prefrontal dopamine. *Neuroscience*, **126**, 21-29.
- Steidl, J.V., Gomez-Isla, T., Mariash, A., Ashe, K.H. and Boland, L.M. (2003) Altered shortterm hippocampal synaptic plasticity in mutant alpha-synuclein transgenic mice. *Neuroreport*, **14**, 219-223.
- Stollhoff, N., Menzel, R. and Eisenhardt, D. (2008) One retrieval trial induces reconsolidation in an appetitive learning paradigm in honeybees (*Apis mellifera*). *Neurobiol Learn Mem*, **89**, 419-425.
- Stork, O. and Welzl, H. (1999) Memory formation and the regulation of gene expression. *Cell Mol Life Sci*, **55**, 575-592.
- Südhof, T.C. and Rizo, J. (2011) Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, a005637.

- Sugimoto, S., Sakurada, M., Horikawa, J. and Taniguchi, I. (1997) The columnar and layer specific response properties of neurons in the primary auditory cortex of Mongolian gerbils. *Hear Res*, **112**, 175-185.
- Surmeier, D.J., Guzman, J.N., Sanchez-Padilla, J. and Goldberg, J.A. (2010) The origins of oxidant stress in Parkinson's disease and therapeutic strategies. *Antioxid Redox Signal*, **14**, 1289-1301.
- Sutherland, R.J., Sparks, F.T. and Lehmann, H. (2010) Hippocampus and retrograde amnesia in the rat model: a modest proposal for the situation of systems consolidation. *Neuropsychologia*, **48**, 2357-2369.
- Sutton, M.A., Ito, H.T., Cressy, P., Kempf, C., Woo, J.C. and Schuman, E.M. (2006) Miniature neurotransmission stabilizes synaptic function via tonic suppression of local dendritic protein synthesis. *Cell*, **125**, 785-799.
- Takahata, R. and Moghaddam, B. (2000) Target-specific glutamatergic regulation of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *J Neurochem*, **75**, 1775-1778.
- Thayanidhi, N., Helm, J.R., Nycz, D.C., Bentley, M., Liang, Y. and Hay, J.C. (2010) Alpha-synuclein delays endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi transport in mammalian cells by antagonizing ER/Golgi SNAREs. *Mol Biol Cell*, **21**, 1850-1863.
- Thomas, H., Tillein, J., Heil, P. and Scheich, H. (1993) Functional organization of auditory cortex in the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). I. Electrophysiological mapping of frequency representation and distinction of fields. *Eur J Neurosci*, **5**, 882-897.
- Thompson, R.F. and Kim, J.J. (1996) Memory systems in the brain and localization of memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13438-13444.
- Thyagarajan, A. and Szaro, B.G. (2008) Dynamic endogenous association of neurofilament mRNAs with K-homology domain ribonucleoproteins in developing cerebral cortex. *Brain Res*, **1189**, 33-42.
- Tiberi, M., Jarvie, K.R., Silvia, C., Falardeau, P., Gingrich, J.A., Godinot, N., Bertrand, L., Yang-Fengt, T.L., Freneau, R.T. and Caron, M.G. (1991) Cloning, molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D1A receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 7491-7495.
- Tischmeyer, W., Schicknick, H., Kraus, M., Seidenbecher, C.I., Staak, S., Scheich, H. and Gundelfinger, E.D. (2003) Rapamycin-sensitive signalling in long-term consolidation of auditory cortex-dependent memory. *Eur J Neurosci*, **18**, 942-950.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4354.

- Troca-Marín, J.A., Alves-Sampaio, A. and Montesinos, M.L. (2012) Deregulated mTOR-mediated translation in intellectual disability. *Prog Neurobiol*, **96**, 268-282.
- Undie, A.S., Weinstock, J., Sarau, H.M. and Friedman, E. (1994) Evidence for a distinct D1-like dopamine receptor that couples to activation of phosphoinositide metabolism in brain. *J Neurochem*, **62**, 2045-2048.
- Vallone, D., Picetti, R. and Borrelli, E. (2000) Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev*, **24**, 125-132.
- Vezina, P., Blanc, G., Glowinski, J. and Tassin, J.P. (1994) Blockade of D-1 dopamine receptors in the medial prefrontal cortex produces delayed effects on pre- and postsynaptic indices of dopamine function in the nucleus accumbens. *Synapse*, **16**, 104-112.
- Watson, J.B., Hatami, A., David, H., Masliah, E., Roberts, K., Evans, C.E. and Levine, M.S. (2009) Alterations in corticostriatal synaptic plasticity in mice overexpressing human alpha-synuclein. *Neuroscience*, **159**, 501-513.
- Wetzel, W., Wagner, T., Ohl, F.W. and Scheich, H. (1998) Categorical discrimination of direction in frequency-modulated tones by Mongolian gerbils. *Behav Brain Res*, **91**, 29-39.
- Wiltgen, B.J., Brown, R.A., Talton, L.E. and Silva, A.J. (2004) New circuits for old memories: the role of the neocortex in consolidation. *Neuron*, **44**, 101-108.
- Wu, B., Liu, Q., Duan, C., Li, Y., Yu, S., Chan, P., Uéda, K. and Yang H (2011) Phosphorylation of alpha-synuclein upregulates tyrosine hydroxylase activity in MN9D cells. *Acta Histochem*, **113**, 32-35.
- Yavich, L., Tanila, H., Vepsäläinen, S. and Jäkälä, P. (2004) Role of alpha-synuclein in presynaptic dopamine recruitment. *J Neurosci*, **24**, 11165-11170.
- Yu, S., Uéda, K. and Chan, P. (2005) a-synuclein and dopamine metabolism. *Mol Neurobiol*, **31**, 243-254.
- Yuste, R. and Bonhoeffer, T. (2001) Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*, **24**, 1071-1089.
- Zhang, J., Xiong, B., Zhen, X. and Zhang, A. (2009) Dopamine D1 receptor ligands: where are we now and where are we going. *Med Res Rev*, **29**, 272-294.
- Ziff, E.B. (1997) Enlightening the postsynaptic density. *Neuron*, **19**, 1163-1174.
- Zuschratter, W., Gass, P., Herdegen, T. and Scheich, H. (1995) Comparison of frequency-specific c-Fos expression and fluoro-2-deoxyglucose uptake in auditory cortex of gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Eur J Neurosci*, **7**, 1614-1626.

## 6. Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

AAF	anteriores auditorisches Feld
AC	auditorischer Kortex
AI	primäres auditorisches Feld
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure-Rezeptoren
ANOVA	Varianzanalyse
ATP	Adenosintriphosphat
AZ	Adenylatzyklase
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAZ	Zytomatrix der aktiven Zone
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propan-sulfonat
CR+	korrekte konditionierte Antwort
CR-	falsche Antwort
CS+	konditionierter Stimulus (aufwärtsmodulierter Ton 4-8 kHz)
CS-	konditionierter Stimulus (abwärtsmodulierter Ton 4-8 kHz)
D	Diskriminierungsleistung
dd	zweifach destilliert
DAG	Diazylglyzerol
DIV	<i>days in vitro</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DP	dorsoposteriores auditorisches Feld
DTT	Dithiothreitol
ECL	verstärkte Chemilumineszenz
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamin-tetraazetat
EM	Elektronenmikroskop
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	<i>electrospray ionization</i>
FC	frontaler Kortex
FM	linear-frequenzmodulierte Töne
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HC	Hippokampus
hnRNP	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>
HRP	Meerrettich Peroxidase
IB	Immunblot
IEF	isoelektrische Fokussierung
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
i.p.	intrapertoneal
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
IPG	immobilisierter pH Gradient
ITC	<i>intertrial crossing</i>
LC	Flüssigchromatographie
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MAP2	<i>microtubule-associated Protein 2</i>
mEPSCs	<i>miniature excitatory spontaneous postsynaptic currents</i>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MSn	<i>multiple mass spectrometry</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MW	Molekulargewicht

NEFL	<i>neurofilament protein light</i>
NL	nicht linear
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor
n.s.	statistisch nicht signifikant
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
pI	isoelektrischer Punkt
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PSD	postsynaptische Dichte
PSF	<i>Point Spread Function</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
S.E.M.	Standardfehler des Mittelwertes
SNARE	<i>soluble NSF attachment protein receptor</i>
snca	$\alpha$ -Synuclein
SP	tritonunlösliche Proteine
ST	Striatum
TAE	TRIS-Azetat-EDTA-Puffer
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TGS	TRIS-Glyzin-SDS-Puffer
TOF	<i>time of flight</i>
TP	tritonlösliche Proteine
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VP	ventroposteriores auditorisches Feld
VTA	<i>area tegmentalis ventralis</i>
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
ZNS	Zentrales Nervensystem
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional

## **6.2 Identifizierte Proteine, die 24 h nach lokaler Injektion von SKF38393- bzw. SKF83959 in den Gerbil-Hörkortex in regulierten Spots der untersuchten Hirnregionen und Proteinfractionen identifiziert wurden**

Die Tabelle 6.1 befindet sich als Excel-Datei auf der DVD „Dopaminerge Modulation kortexabhängiger Lernprozesse- 6. Anhang“, die dieser Arbeit beigelegt wurde.

### 6.3 Coomassie-Gele zur Angleichung einzusetzender Proteinmengen für die Immunblot-Analyse

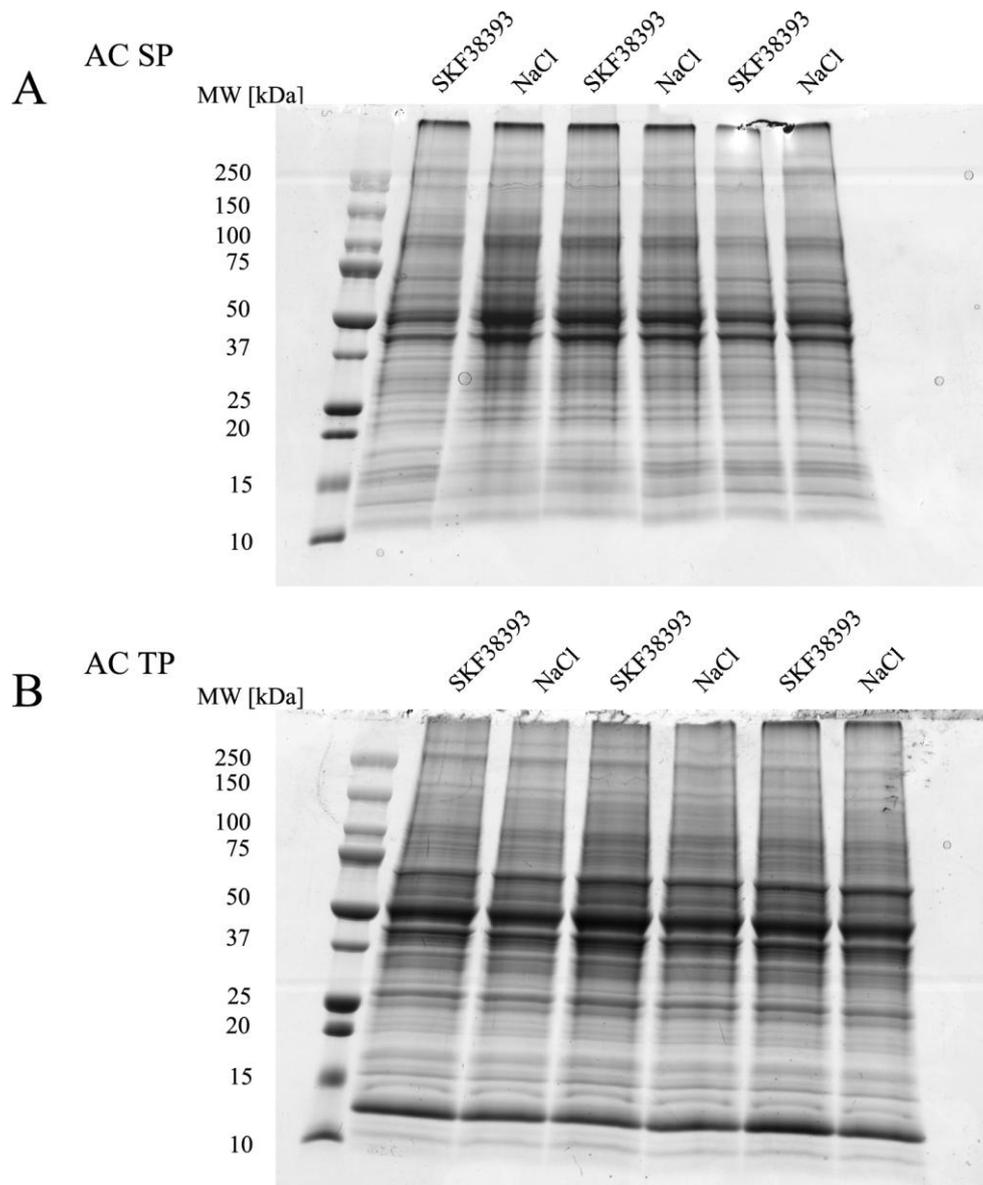
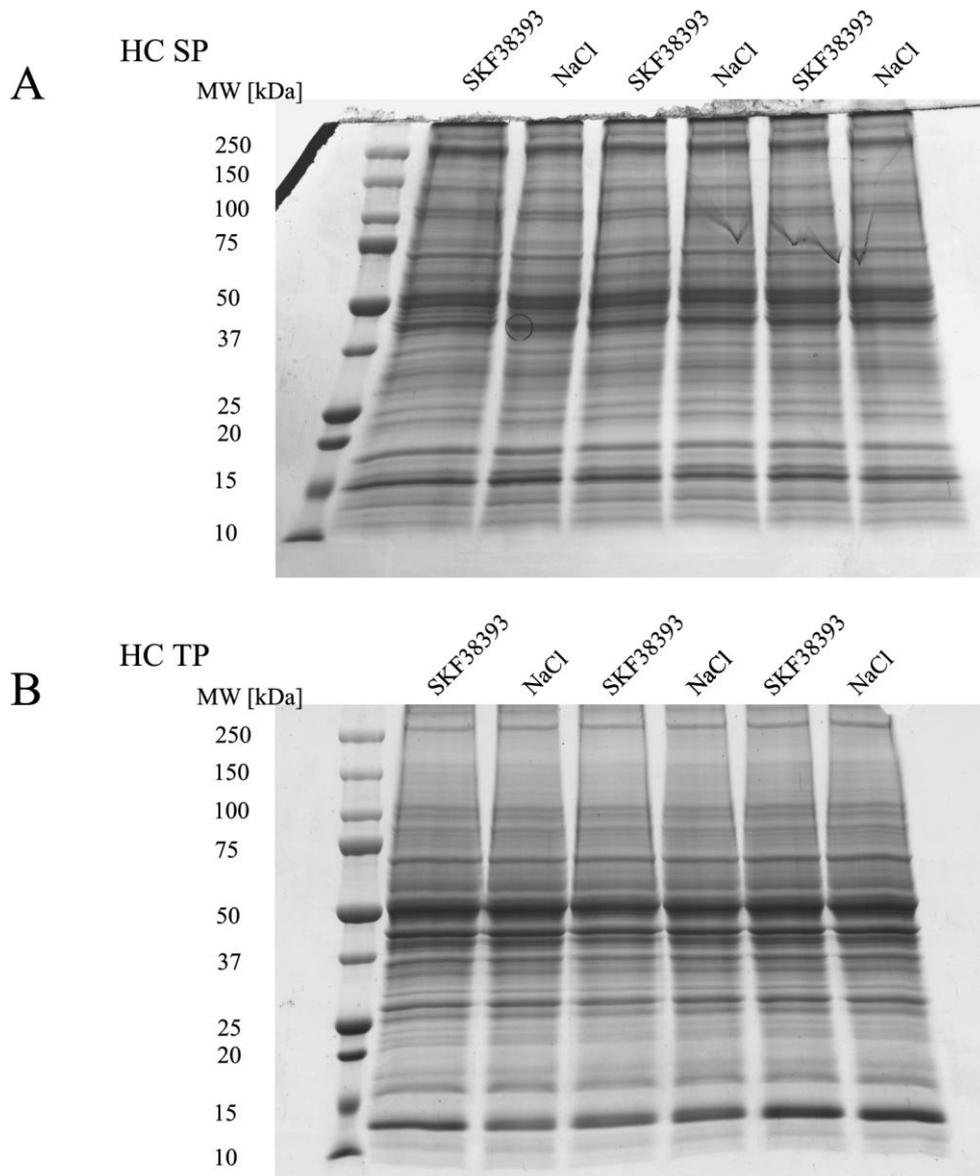


Abb. 6.1: Coomassie-Gele des AC zur Angleichung der einzusetzenden Proteinmengen für die Immunblot-Analyse 24 h nach Injektion von SKF38393 oder Vehikel (NaCl) in den AC von Gerbils. (A) SP-Fraktion des AC; (B) TP-Fraktion des AC.



**Abb. 6.2:** Coomassie-Gele des HC zur Angleichung der einzusetzenden Proteinmengen für die Immunblot-Analyse 24 h nach Injektion von SKF38393 oder Vehikel (NaCl) in den AC von Gerbils. (A) SP-Fraktion des HC; (B) TP-Fraktion des HC.

## 6.4 Ermittelte Gruppenmittelwerte für die Anzahl der CR+, CR-, ITC und Fluchtreaktionen pro Trainingssitzung für Abschnitt 3.2.3

Tab. 6.2: Data recorded during FM discrimination training of *snca*<sup>+/+</sup> (n=10) and *snca*<sup>-/-</sup> (n=7) control mice

Genotype	Session	No. of conditioned reactions		Number of intertrial crossings	Escape reactions [%]
		CR+	CR-		
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	1	9,50 ± 1,73	7,80 ± 1,53	3,30 ± 0,79	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	2	12,00 ± 2,05	11,20 ± 2,25	2,10 ± 0,77	98,89 ± 1,11
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	3	11,50 ± 1,46	8,70 ± 2,38	2,00 ± 0,68	96,67 ± 3,33
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	4	10,20 ± 1,21	6,50 ± 1,82	1,60 ± 0,37	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	5	11,50 ± 1,59	3,60 ± 1,26#	1,90 ± 0,80	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	6	11,50 ± 2,41	2,60 ± 0,82#	2,10 ± 0,96	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	7	13,30 ± 2,05	2,50 ± 1,03#	3,00 ± 1,63	99,13 ± 0,87
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	8	17,60 ± 1,45	1,60 ± 0,90#	2,20 ± 1,05	97,74 ± 1,57
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	9	20,90 ± 1,28	2,20 ± 0,96#	1,40 ± 0,50	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	10	17,70 ± 1,96	2,90 ± 1,82#	2,30 ± 1,33	96,52 ± 3,48
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	11	20,40 ± 1,51	1,30 ± 0,84#	2,20 ± 1,36	98,33 ± 1,67
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	12	23,50 ± 1,36	2,70 ± 1,00#	2,70 ± 0,56	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	13	23,30 ± 0,83	1,90 ± 0,89#	2,70 ± 0,98	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	14	21,50 ± 1,04	2,80 ± 1,25#	3,20 ± 1,01	93,66 ± 5,68
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	15	20,90 ± 1,69	1,50 ± 0,60#	4,30 ± 2,66	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	16	23,30 ± 0,92	1,40 ± 0,48#	2,60 ± 0,62	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	1	2,86 ± 0,77*	2,57 ± 0,95*	1,57 ± 0,30	96,19 ± 3,81
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	2	8,86 ± 2,01	3,14 ± 0,96#*	2,00 ± 0,54	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	3	12,29 ± 1,41	4,71 ± 1,25#	1,71 ± 0,61	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	4	11,71 ± 2,04	4,14 ± 0,96#	1,29 ± 0,68	99,38 ± 0,62
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	5	13,86 ± 2,05	3,57 ± 1,95#	1,00 ± 0,31	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	6	11,86 ± 1,37	2,43 ± 0,65#	0,86 ± 0,40	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	7	18,86 ± 1,68	3,29 ± 1,30#	2,29 ± 0,78	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	8	17,14 ± 1,98	0,71 ± 0,42#	1,71 ± 0,92	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	9	20,86 ± 1,93	1,86 ± 0,46#	6,00 ± 3,08	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	10	18,71 ± 1,06	2,57 ± 0,57#	3,00 ± 0,87	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	11	18,29 ± 2,31	1,14 ± 0,46#	4,29 ± 2,20	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	12	18,57 ± 1,59*	1,43 ± 0,81#	4,86 ± 1,37	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	13	19,86 ± 1,87	2,29 ± 1,02#	5,14 ± 1,46	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	14	20,71 ± 1,13	1,43 ± 0,37#	4,29 ± 0,92	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	15	18,71 ± 1,63	2,43 ± 0,48#	5,29 ± 1,15	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	16	19,43 ± 1,99	2,29 ± 1,09#	5,71 ± 1,97	100,00 ± 0,00
Main effect of group		F(1,15)<1 P>0.05, n.s.	F(1,15)=1.35 P>0.05, n.s.	F(1,15)<1 P>0.05, n.s.	F(1,15)=3.83 P>0.05, n.s.
Main effect of session		F(15,225)=22.69 P<0.0001	F(15,225)=6.81 P<0.0001	F(15,225)=2.04 P<0.05	F(15,225)<1 P>0.05, n.s.
Group x session		F(15,225)=2.17 P<0.01	F(15,225)=2.92 P<0.0005	F(15,225)=1.35 P>0.05, n.s.	F(15,225)<1 P>0.05, n.s.

Data were collected in Experiment 3.2.3. During FM discrimination training, correct conditioned reactions (CR+), false alarms (CR-), intertrial crossings, and the relative numbers of escape reactions were monitored. Upper part: experimental data expressed as group means ± S.E.M. Lower part: ANOVA values; n.s., not significant. (\*) Significantly different from the corresponding value of genotype *snca*<sup>+/+</sup>. (#) Significantly different from the corresponding value of CR+.

**Tab 6.3: Data recorded during FM discrimination training of SCH23390-treated *snca*<sup>+/+</sup> (n=12) and *snca*<sup>-/-</sup> (n=11) mice**

Genotype	Session	No. of conditioned reactions		Number of intertrial crossings	Escape reactions [%]
		CR+	CR-		
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	1	8,92 ± 1,03	8,67 ± 1,38	4,67 ± 0,78	99,60 ± 0,40
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	2	11,33 ± 1,71	9,00 ± 1,91	3,42 ± 1,03	98,72 ± 1,28
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	3	14,00 ± 2,36	9,42 ± 2,25	7,17 ± 3,07	99,65 ± 0,35
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	4	13,58 ± 2,29	7,00 ± 2,37#	3,42 ± 0,93	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	5	14,50 ± 1,50	6,42 ± 2,09#	4,92 ± 1,64	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	6	15,08 ± 1,91	4,50 ± 0,85#	7,50 ± 2,92	97,96 ± 1,75
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	7	19,00 ± 1,66	4,83 ± 1,10#	10,33 ± 3,46	99,31 ± 0,69
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	8	19,67 ± 1,79	5,25 ± 1,69#	9,75 ± 2,84	99,05 ± 0,64
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	9	19,92 ± 1,11	4,50 ± 0,95#	15,83 ± 7,43	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	10	21,25 ± 1,90	4,08 ± 1,05#	19,83 ± 6,40	98,00 ± 2,00
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	11	20,08 ± 1,77	2,58 ± 0,85#	13,17 ± 3,63	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	12	23,92 ± 1,13	2,50 ± 0,77#	19,83 ± 7,94	97,63 ± 1,63
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	13	21,58 ± 1,32	3,17 ± 1,05#	16,17 ± 5,46	99,31 ± 0,69
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	14	23,75 ± 1,17	2,08 ± 0,91#	22,17 ± 7,90	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	15	24,08 ± 0,88	3,75 ± 1,37#	19,75 ± 7,36	99,36 ± 0,64
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	16	22,67 ± 1,26	3,08 ± 1,03#	20,75 ± 7,10	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	1	2,91 ± 0,86*	3,64 ± 0,89*	2,91 ± 0,64	98,15 ± 0,83
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	2	7,18 ± 1,57	3,18 ± 1,21#*	0,73 ± 0,33	97,88 ± 1,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	3	8,36 ± 1,33	3,64 ± 0,75#*	2,55 ± 0,73	98,83 ± 0,84
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	4	11,82 ± 1,89	4,46 ± 1,64#	3,18 ± 1,88	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	5	11,46 ± 1,86	3,18 ± 1,29#	5,82 ± 3,53	98,99 ± 1,01
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	6	11,36 ± 1,71	2,09 ± 0,71#*	3,91 ± 2,63	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	7	12,09 ± 1,95*	2,82 ± 1,39#	3,91 ± 1,85	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	8	13,36 ± 2,12*	1,09 ± 0,34#*	5,91 ± 2,81	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	9	14,73 ± 1,66*	1,09 ± 0,42#*	4,64 ± 1,38	96,55 ± 2,29
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	10	19,00 ± 1,45	1,64 ± 0,51#*	15,09 ± 7,22	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	11	15,91 ± 1,47	1,91 ± 0,67#	7,46 ± 2,87	96,17 ± 3,83
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	12	18,64 ± 1,63*	2,82 ± 1,16#	10,00 ± 3,24	99,52 ± 0,48
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	13	20,46 ± 1,47	1,00 ± 0,56#	4,27 ± 1,18	99,35 ± 0,65
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	14	20,91 ± 1,24	1,46 ± 0,67#	6,18 ± 2,37	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	15	19,55 ± 1,68	1,91 ± 0,58#	6,46 ± 1,89	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	16	19,36 ± 1,40	0,91 ± 0,34#	3,46 ± 0,99	100,00 ± 0,00
Main effect of group		F(1,21)=7.73 P<0.05	F(1,21)=8.16 P<0.01	F(1,21)=4.01 P>0.05, n.s.	F(1,21)<1 P>0.05, n.s.
Main effect of session		F(15,315)=31.35 P<0.0001	F(15,315)=4.75 P<0.0001	F(15,315)=3.49 P<0.0001	F(15,315)<1 P>0.05, n.s.
Group x session		F(15,315)<1 P>0.05, n.s.	F(15,315)=1.39 P>0.05, n.s.	F(15,315)=1.27 P>0.05, n.s.	F(15,315)=1.29 P>0.05, n.s.

Data were collected in Experiment 3.2.3. During FM discrimination training, correct conditioned reactions (CR+), false alarms (CR-), intertrial crossings, and the relative numbers of escape reactions were monitored. Upper part: experimental data expressed as group means ± S.E.M. Lower part: ANOVA values; n.s., not significant. (\*) Significantly different from the corresponding value of genotype *snca*<sup>+/+</sup>. (#) Significantly different from the corresponding value of CR+.

**Tab. 6.4: Data recorded during FM discrimination training of SKF38393-treated *snca*<sup>+/+</sup> (n=15) and *snca*<sup>-/-</sup> (n=8) mice**

Genotype	Session	No. of conditioned reactions		Number of intertrial crossings	Escape reactions <sup>a</sup> [%]
		CR+	CR-		
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	1	9,73 ± 1,05	6,80 ± 1,09#	8,73 ± 2,70	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	2	13,60 ± 1,51	9,73 ± 1,64#	2,87 ± 0,49	99,71 ± 0,29
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	3	13,47 ± 1,62	8,80 ± 1,74#	2,07 ± 0,41	98,93 ± 1,07
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	4	8,93 ± 1,43	5,67 ± 1,58#	2,33 ± 0,53	99,45 ± 0,38
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	5	9,40 ± 1,97	1,47 ± 0,41#	2,33 ± 0,75	99,75 ± 0,26
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	6	10,40 ± 1,68	2,80 ± 1,77#	1,87 ± 0,67	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	7	15,13 ± 1,69	2,40 ± 1,03#	3,00 ± 0,72	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	8	16,33 ± 1,47	2,13 ± 0,98#	2,67 ± 0,85	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	9	18,87 ± 1,76	2,13 ± 0,65#	2,87 ± 0,92	99,64 ± 0,36
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	10	19,60 ± 1,51	1,93 ± 0,68#	2,87 ± 0,68	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	11	19,47 ± 1,66	1,20 ± 0,33#	4,60 ± 2,95	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	12	21,20 ± 1,19	1,07 ± 0,42#	4,60 ± 1,72	99,45 ± 0,55
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	13	24,07 ± 0,95	1,47 ± 0,61#	5,60 ± 2,78	96,60 ± 2,52
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	14	21,93 ± 0,95	1,47 ± 0,53#	3,93 ± 0,85	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	15	24,07 ± 0,96	3,93 ± 2,11#	3,20 ± 0,89	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	16	22,13 ± 0,93	1,67 ± 0,72#	2,20 ± 0,85	99,11 ± 0,89
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	1	2,63 ± 0,68*	1,63 ± 0,87*	0,50 ± 0,38	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	2	6,25 ± 1,60*	0,25 ± 0,16##*	0,13 ± 0,13	95,71 ± 3,71
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	3	13,38 ± 2,56	1,13 ± 0,40##*	1,25 ± 0,62	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	4	15,13 ± 2,80*	1,63 ± 0,78#	1,00 ± 0,38	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	5	14,63 ± 2,82	1,00 ± 0,50#	0,75 ± 0,49	95,24 ± 4,76
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	6	14,88 ± 2,77	0,88 ± 0,30#	1,38 ± 0,57	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	7	18,25 ± 1,95	1,38 ± 0,84#	2,38 ± 1,13	97,92 ± 1,47
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	8	16,00 ± 1,87	1,00 ± 0,42#	1,75 ± 0,70	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	9	17,75 ± 1,95	0,38 ± 0,26#	0,75 ± 0,41	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	10	14,75 ± 1,22*	0,75 ± 0,75#	3,25 ± 2,11	97,60 ± 1,56
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	11	14,88 ± 3,11	0,00 ± 0,00##*	0,50 ± 0,27	99,32 ± 0,68
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	12	13,38 ± 2,82*	0,75 ± 0,25#	2,88 ± 1,47	96,92 ± 1,87
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	13	12,13 ± 1,70*	1,63 ± 0,68#	4,13 ± 1,06	91,69 ± 5,26
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	14	12,88 ± 2,13*	0,50 ± 0,38#	3,63 ± 1,24	97,96 ± 2,04
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	15	15,25 ± 1,78*	0,50 ± 0,33#	1,50 ± 0,46	98,81 ± 1,19
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	16	17,38 ± 1,35*	0,75 ± 0,41#	3,88 ± 2,18	96,83 ± 3,18
Main effect of group		F(1,21)=3.81 P>0.05, n.s.	F(1,21)=7.68 P<0.05	F(1,21)=2.12 P>0.05, n.s.	F(1,19)=3.18 P>0.05, n.s.
Main effect of session		F(15,315)=13.90 P<0.0001	F(15,315)=4.23 P<0.0001	F(15,315)=1.38 P>0.05, n.s.	F(15,285)=2.76 P=0.0005
Group x session		F(15,315)=7.70 P<0.0001	F(15,315)=3.82 P<0.0001	F(15,315)=1.36 P>0.05, n.s.	F(15,285)=1.07 P>0.05, n.s.

Data were collected in Experiment 3.2.3. During FM discrimination training, correct conditioned reactions (CR+), false alarms (CR-), intertrial crossings, and the relative numbers of escape reactions were monitored. Upper part: experimental data expressed as group means ± S.E.M. Lower part: ANOVA values; n.s., not significant. (\*) Significantly different from the corresponding value of genotype *snca*<sup>+/+</sup>. (#) Significantly different from the corresponding value of CR+. a) Missing values due to mice that failed to perform an escape reaction per session.

**Tab: 6.5: Data recorded during FM discrimination training of SKF83822-treated *snca*<sup>+/+</sup> (n=13) and *snca*<sup>-/-</sup> (n=7) mice**

Genotype	Session	No. of conditioned reactions		Number of intertrial crossings	Escape reactions [%]
		CR+	CR-		
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	1	10,00 ± 1,80	8,77 ± 1,76	4,92 ± 1,51	99,41 ± 0,59
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	2	12,15 ± 1,58	12,46 ± 1,99	4,92 ± 1,91	98,29 ± 1,71
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	3	14,00 ± 1,96	12,00 ± 2,01	8,15 ± 3,95	93,59 ± 6,41
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	4	8,69 ± 1,65	8,46 ± 2,06	8,08 ± 4,73	97,87 ± 0,97
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	5	11,31 ± 1,65	8,15 ± 2,25	22,23 ± 16,54	91,53 ± 4,11
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	6	11,31 ± 2,60	4,08 ± 1,12#	13,15 ± 8,86	99,17 ± 0,44
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	7	11,85 ± 2,19	3,46 ± 0,81#	11,54 ± 4,51	97,09 ± 2,16
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	8	17,54 ± 2,02	4,23 ± 0,87#	14,62 ± 8,90	99,23 ± 0,77
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	9	19,00 ± 1,41	4,62 ± 1,09#	17,08 ± 11,12	99,41 ± 0,59
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	10	18,00 ± 1,99	3,00 ± 0,57#	10,62 ± 2,62	88,02 ± 6,56
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	11	20,85 ± 1,15	3,15 ± 0,83#	7,54 ± 3,05	98,72 ± 1,28
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	12	20,85 ± 2,23	3,46 ± 0,87#	11,08 ± 2,09	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	13	21,92 ± 1,49	4,15 ± 1,38#	11,54 ± 4,13	99,15 ± 0,86
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	14	23,46 ± 0,90	2,85 ± 0,85#	21,46 ± 10,33	98,90 ± 1,10
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	15	23,62 ± 1,09	4,46 ± 1,48#	12,54 ± 7,03	99,36 ± 0,64
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	16	24,69 ± 0,85	3,46 ± 0,97#	9,39 ± 2,40	99,04 ± 0,96
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	1	5,14 ± 1,64	0,57 ± 0,30#*	1,00 ± 0,38	99,49 ± 0,51
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	2	8,57 ± 2,79	1,43 ± 0,69#*	2,29 ± 1,67	96,00 ± 4,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	3	12,71 ± 3,62	1,00 ± 0,49#*	1,43 ± 0,81	98,03 ± 1,97
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	4	14,14 ± 3,50	0,86 ± 0,55#*	1,43 ± 1,27	96,89 ± 3,11
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	5	18,57 ± 3,37*	0,43 ± 0,30#*	1,71 ± 0,81	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	6	19,00 ± 1,35	1,14 ± 0,40#	2,71 ± 1,25	97,32 ± 1,86
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	7	18,57 ± 2,92	0,86 ± 0,40#*	3,00 ± 1,54	93,39 ± 4,69
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	8	20,29 ± 2,48	1,71 ± 0,61#	5,29 ± 2,36	98,05 ± 1,95
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	9	22,57 ± 2,16	1,57 ± 1,02#	2,86 ± 0,86	96,70 ± 3,30
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	10	21,00 ± 2,09	1,29 ± 0,68#	3,00 ± 0,87	94,80 ± 2,94
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	11	22,00 ± 2,04	1,14 ± 0,40#	3,43 ± 1,46	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	12	21,86 ± 1,53	1,71 ± 0,92#	7,14 ± 3,85	97,96 ± 2,04
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	13	21,43 ± 2,40	0,29 ± 0,18#	4,57 ± 1,72	95,13 ± 3,59
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	14	20,86 ± 2,91	1,14 ± 0,51#	4,43 ± 2,27	88,42 ± 6,70
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	15	24,29 ± 1,44	0,43 ± 0,20#	5,43 ± 2,64	96,60 ± 2,43
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	16	25,43 ± 0,75	1,29 ± 0,81#	3,14 ± 0,96	95,83 ± 2,73
Main effect of group		F(1,18)<1 P>0.05, n.s.	F(1,18)=20.60 P<0.0005	F(1,18)=1.70 P>0.05, n.s.	F(1,18)<1 P>0.05, n.s.
Main effect of session		F(15,270)=18.54 P<0.0001	F(15,270)=3,23 P<0.0001	F(15,270)<1 P>0.05, n.s.	F(15,270)=1.11 P>0.05, n.s.
Group x session		F(15,270)=2.50 P<0.005	F(15,270)=3,55 P<0.0001	F(15,270)<1 P>0.05, n.s.	F(15,270)=1.21 P>0.05, n.s.

Data were collected in Experiment 3.2.3. During FM discrimination training, correct conditioned reactions (CR+), false alarms (CR-), intertrial crossings, and the relative numbers of escape reactions were monitored. Upper part: experimental data expressed as group means ± S.E.M. Lower part: ANOVA values; n.s., not significant. (\*) Significantly different from the corresponding value of genotype *snca*<sup>+/+</sup>. (#) Significantly different from the corresponding value of CR+.

**Tab. 6.6: Data recorded during FM discrimination training of SKF83959-treated *snca*<sup>+/+</sup> (n=6) and *snca*<sup>-/-</sup> (n=3) mice**

Genotype	Session	No. of conditioned reactions		Number of intertrial crossings	Escape reactions [%]
		CR+	CR-		
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	1	11,33 ± 1,28	11,17 ± 1,49	8,17 ± 1,92	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	2	19,33 ± 2,33	17,83 ± 3,48	4,50 ± 1,18	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	3	17,00 ± 3,51	15,67 ± 4,72	4,50 ± 1,84	99,21 ± 0,79
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	4	15,50 ± 3,55	13,17 ± 5,74	10,67 ± 5,94	93,06 ± 4,52
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	5	11,83 ± 1,91	7,83 ± 4,43	29,83 ± 19,73	98,55 ± 0,92
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	6	9,00 ± 2,31	4,33 ± 2,81	20,17 ± 13,14	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	7	15,00 ± 2,34	4,67 ± 2,33#	18,67 ± 7,88	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	8	16,17 ± 3,09	3,83 ± 1,45#	33,50 ± 18,19	98,72 ± 1,28
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	9	17,33 ± 2,69	3,50 ± 0,89#	11,33 ± 4,97	99,28 ± 0,73
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	10	19,67 ± 1,33	3,00 ± 0,82#	19,50 ± 10,08	98,33 ± 1,67
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	11	20,33 ± 2,01	1,33 ± 0,33#	11,17 ± 4,96	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	12	22,50 ± 0,99	1,33 ± 0,80#	24,00 ± 10,19	98,49 ± 1,52
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	13	21,17 ± 1,14	2,33 ± 0,67#	17,67 ± 7,15	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	14	22,50 ± 1,61	2,17 ± 0,54#	17,00 ± 5,30	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	15	25,67 ± 0,99	3,17 ± 1,11#	15,83 ± 5,72	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>+/+</sup>	16	22,67 ± 1,65	1,33 ± 0,62#	6,17 ± 1,58	98,33 ± 1,67
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	1	2,33 ± 1,20*	1,33 ± 0,88	1,67 ± 1,67	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	2	4,67 ± 1,33*	7,33 ± 0,67	1,33 ± 0,88	98,61 ± 1,39
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	3	9,33 ± 0,67	6,67 ± 1,67	1,33 ± 0,33	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	4	8,33 ± 0,67	5,33 ± 2,60	2,00 ± 1,16	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	5	7,33 ± 1,86	5,33 ± 2,19	2,00 ± 0,58	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	6	9,67 ± 2,85	3,00 ± 1,16	2,00 ± 1,00	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	7	12,67 ± 0,67	3,33 ± 0,33#	3,33 ± 1,86	98,15 ± 1,85
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	8	20,33 ± 3,18	2,00 ± 0,00#	11,67 ± 6,06	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	9	18,67 ± 3,53	2,67 ± 0,88#	3,00 ± 0,58	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	10	19,33 ± 1,76	3,00 ± 0,58#	9,00 ± 5,86	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	11	13,67 ± 3,38	5,33 ± 1,86	2,00 ± 0,58	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	12	14,33 ± 5,24	0,33 ± 0,33	1,67 ± 1,67	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	13	16,33 ± 3,38	4,00 ± 4,00#	2,67 ± 0,33	97,92 ± 2,08
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	14	16,67 ± 2,33	5,00 ± 1,16	4,67 ± 1,45	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	15	16,67 ± 2,33*	0,67 ± 0,33#	4,33 ± 1,45	100,00 ± 0,00
<i>snca</i> <sup>-/-</sup>	16	14,67 ± 1,76*	0,67 ± 0,33#	6,33 ± 4,84	100,00 ± 0,00
Main effect of group		F(1,7)=7.42 P<0.05	F(1,7)=1.36 P>0.05, n.s.	F(1,7)=3.29 P>0.05, n.s.	F(1,7)=1.41 P>0.05, n.s.
Main effect of session		F(15,105)=7.50 P<0.0001	F(15,105)=4.18 P<0.0001	F(15,105)<1 P>0.05, n.s.	F(15,105)<1 P>0.05, n.s.
Group x session		F(15,105)=2.22 P<0.01	F(15,105)=1,68 P>0.05, n.s.	F(15,105)<1 P>0.05, n.s.	F(15,105)<1 P>0.05, n.s.

Data were collected in Experiment 3.2.3. During FM discrimination training, correct conditioned reactions (CR+), false alarms (CR-), intertrial crossings, and the relative numbers of escape reactions were monitored. Upper part: experimental data expressed as group means ± S.E.M. Lower part: ANOVA values; n.s., not significant. (\*) Significantly different from the corresponding value of genotype *snca*<sup>+/+</sup>. (#) Significantly different from the corresponding value of CR+.

**Tab. 6.7: Data recorded during FM discrimination training of (SKF83822+SKF83959)-treated  $snca^{+/+}$  (n=6) and  $snca^{-/-}$  (n=4) mice**

Genotype	Session	No. of conditioned reactions		Number of intertrial crossings	Escape reactions [%]
		CR+	CR-		
$snca^{+/+}$	1	8,00 ± 3,15	8,00 ± 3,61	4,67 ± 1,43	97,92 ± 2,08
$snca^{+/+}$	2	12,17 ± 3,92	11,67 ± 4,31	3,33 ± 1,15	94,44 ± 5,56
$snca^{+/+}$	3	12,00 ± 3,79	9,83 ± 5,14	1,00 ± 0,52	100,00 ± 0,00
$snca^{+/+}$	4	7,67 ± 2,29	6,17 ± 2,94	3,00 ± 1,37	100,00 ± 0,00
$snca^{+/+}$	5	9,00 ± 2,42	3,33 ± 2,01	1,33 ± 0,56	100,00 ± 0,00
$snca^{+/+}$	6	11,50 ± 2,71	1,50 ± 0,67#	6,33 ± 4,62	98,33 ± 1,67
$snca^{+/+}$	7	17,00 ± 1,65	1,33 ± 0,49#	2,33 ± 1,02	100,00 ± 0,00
$snca^{+/+}$	8	20,50 ± 1,75	4,33 ± 1,59#	3,50 ± 1,69	96,67 ± 3,33
$snca^{+/+}$	9	18,00 ± 1,07	1,83 ± 1,28#	2,50 ± 1,46	100,00 ± 0,00
$snca^{+/+}$	10	23,67 ± 1,23	2,17 ± 1,60#	2,67 ± 1,50	100,00 ± 0,00
$snca^{+/+}$	11	22,00 ± 1,86	0,83 ± 0,40#	2,83 ± 1,56	97,92 ± 2,08
$snca^{+/+}$	12	22,67 ± 0,80	1,00 ± 0,37#	2,67 ± 1,48	100,00 ± 0,00
$snca^{+/+}$	13	23,67 ± 1,84	1,67 ± 0,67#	2,83 ± 2,07	100,00 ± 0,00
$snca^{+/+}$	14	20,67 ± 1,91	0,83 ± 0,31#	2,17 ± 1,08	97,35 ± 1,76
$snca^{+/+}$	15	23,50 ± 1,48	1,83 ± 0,65#	8,67 ± 5,28	98,61 ± 1,39
$snca^{+/+}$	16	21,50 ± 2,50	6,00 ± 1,79#	4,83 ± 1,49	100,00 ± 0,00
$snca^{-/-}$	1	2,00 ± 1,00	0,75 ± 0,25	1,25 ± 0,75	98,28 ± 1,72
$snca^{-/-}$	2	11,00 ± 4,14	0,75 ± 0,48	0,75 ± 0,48	100,00 ± 0,00
$snca^{-/-}$	3	9,75 ± 4,13	0,50 ± 0,29	0,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
$snca^{-/-}$	4	12,50 ± 3,66	0,50 ± 0,50#	0,25 ± 0,25	100,00 ± 0,00
$snca^{-/-}$	5	19,75 ± 2,18*	1,75 ± 0,48#	2,50 ± 0,87	97,92 ± 2,08
$snca^{-/-}$	6	23,25 ± 2,14*	2,50 ± 0,29#	2,00 ± 1,35	100,00 ± 0,00
$snca^{-/-}$	7	20,00 ± 1,47	1,25 ± 0,75#	2,75 ± 0,95	100,00 ± 0,00
$snca^{-/-}$	8	19,50 ± 5,27	1,75 ± 1,11#	2,75 ± 0,75	100,00 ± 0,00
$snca^{-/-}$	9	18,50 ± 1,94	1,25 ± 0,75#	3,50 ± 1,56	100,00 ± 0,00
$snca^{-/-}$	10	23,50 ± 1,44	4,75 ± 1,80#	4,25 ± 1,11	96,43 ± 3,57
$snca^{-/-}$	11	19,00 ± 1,08	2,00 ± 0,91#	2,00 ± 0,91	100,00 ± 0,00
$snca^{-/-}$	12	19,75 ± 1,89	2,75 ± 0,75#*	4,00 ± 0,71	100,00 ± 0,00
$snca^{-/-}$	13	20,25 ± 2,63	3,00 ± 0,58#	6,00 ± 3,11	100,00 ± 0,00
$snca^{-/-}$	14	17,75 ± 3,07	1,25 ± 0,95#	1,50 ± 0,96	98,75 ± 1,25
$snca^{-/-}$	15	18,00 ± 2,48	3,00 ± 1,29#	4,00 ± 1,35	100,00 ± 0,00
$snca^{-/-}$	16	20,00 ± 2,04	2,50 ± 0,65#	5,00 ± 1,08	100,00 ± 0,00
Main effect of group		F(1,8)<1 P>0.05, n.s.	F(1,8)=1.57 P>0.05, n.s.	F(1,8)<1 P>0.05, n.s.	F(1,8)<1 P>0.05, n.s.
Main effect of session		F(15,120)=9.77 P<0.0001	F(15,120)=1.40 P>0.05, n.s.	F(15,120)=1.30 P>0.05, n.s.	F(15,120)<1 P>0.05, n.s.
Group x session		F(15,120)=2.39 P<0.005	F(15,120)=2.78 P=0.001	F(15,120)<1 P>0.05, n.s.	F(15,120)<1 P>0.05, n.s.

Data were collected in Experiment 3.2.3. During FM discrimination training, correct conditioned reactions (CR+), false alarms (CR-), intertrial crossings, and the relative numbers of escape reactions were monitored. Upper part: experimental data expressed as group means ± S.E.M. Lower part: ANOVA values; n.s., not significant. (\*) Significantly different from the corresponding value of genotype  $snca^{+/+}$ . (#) Significantly different from the corresponding value of CR+.

## LEBENS LAUF

**Name** Nicole Reichenbach  
**Geburtstag** 8. April 1980  
**Geburtsort** Bernburg  
**Staatsangehörigkeit** deutsch  
**Eltern** Gerlinde Reichenbach, geb. Siegel und  
Hilmar Reichenbach

### **Bildungsweg:**

1986 - 1991 Besuch der Friedrich-Engels-Schule in Nienburg  
1991 - 1998 Besuch des Friederiken-Gymnasiums in Bernburg  
10. Juli 1998 Abitur  
Oktober 1998 - September 2000 Studium der Tourismuswirtschaft an der Hochschule Harz in Wernigerode  
Oktober 2000 - Mai 2006 Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in Halle  
4. Mai 2006 Diplom  
August 2006 - Dezember 2007 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der AG „Membrantransport und Zytoskelett“ (Leibniz-Institut für Neurobiologie, in Magdeburg) unter der Leitung von Prof. Britta Qualmann  
Januar 2008 – Dezember 2011 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der AG „Molekularbiologische Techniken“ (Leibniz-Institut für Neurobiologie, in Magdeburg) unter der Leitung von Dr. Wolfgang Tischmeyer zur Anfertigung der Promotionsarbeit

Magdeburg, den 18.12.12

.....  
Nicole Reichenbach

## PUBLIKATIONEN

Ahuja, R., Pinyol, R., **Reichenbach, N.**, Custer, L., Klingensmith, J., Kessels, M.M. and Qualmann, B. (2007) Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology. *Cell*, **131**, 337-350.

Schicknick, H., **Reichenbach, N.**, Smalla, K.H., Scheich, H., Gundelfinger, E.D. and Tischmeyer, W. (2012) Dopamine modulates memory consolidation of discrimination learning in auditory cortex. *Eur J Neurosci*, **35**, 763-774.

George, S., Rey, N.L., **Reichenbach, N.**, Steiner, J.A., Brundin, P. (2013)  $\alpha$ -Synuclein: the long distance runner. *Brain Pathol*, **23**, 350-357.

## ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zu dem Thema

**„Dopaminerge Modulation kortexabhängiger Lernprozesse“**

selbständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, 18.12.12

---

Nicole Reichenbach