
Bachelorarbeit

Höhne, Eric

BI12w2-b

Matrikel: 31709

Pharmakabehandlung von primären kortikalen Neuronenkulturen
zur Beeinflussung der Proteinsyntheserate

Magdeburg 18. August 2015

Bachelor thesis

Höhne, Eric

BI12w2-b

Matrikel: 31709

Pharmacological treatment on primary cortical culture to
stimulate the protein synthesis

Magdeburg 18.August.2015

Zusammenfassung

Die Lern- und Gedächtnisforschung gehört zu den wichtigsten Forschungsgebieten. Die Neusynthese von Proteinen, welche im Laufe des Alterungsprozesses abnimmt, spielt dabei eine wichtige Rolle für die Lernprozesse. Für die Proteinbiosynthese ist der eukaryotischer Elongationsfaktor 2 (eEF2)-Signalweg essentiell. Dieser ist für die Regulation des eEF2 verantwortlich. Der eukaryotische Elongationsfaktor 2 liegt im Alter vermehrt in der inaktiven Form vor, was ein potenzieller Grund für die verminderte Proteinbiosyntheserate sein könnte.

Mögliche Untersuchungsansätze bieten hierfür bestimmte Pharmaka die einen Einfluss auf den eEF2-Signalweg haben. Aber auch andere Wirkstoffe, die keinen Einfluss auf den eEF2-Signalweg haben, könnten für die Proteinsynthese förderlich sein.

In dieser Arbeit wurden ausgewählte Wirkstoffe und deren möglicher Einfluss auf die Proteinsynthese sowie den Alterungsprozess auf Neuronenkulturen untersucht. Dies geschah mittels der Immunocytochemie/ Immunofluoreszenz, bioorthogonal non-canonical amino acid tagging (BONCAT) und fluoreszent non-canonical aminoacid tagging (FUNCAT) sowie der Western-Blot Analyse. Für diese Arbeit wurden unterschiedlich lang kultivierte primäre kortikale Neuronenkulturen verwendet.

Die in dieser Arbeit aufgelisteten Ergebnisse zeigen, dass die eingesetzten Wirkstoffe einen bestimmten Effekt auf die verwendeten primären kortikalen Neuronenkulturen besitzen. Weiterhin wurden in den 60 Tage alten Neuronen ein erhöhtes Signal *de novo* synthetisierter Proteinen in den dendritischen Spines festgestellt.

Jedoch war es mit den verwendeten Konditionen nicht möglich einen Eingriff in den eEF2-Signalweg aus zu üben. Nach den jeweiligen Stimulationen der eingesetzten Wirkstoffe, kam es weder zu einer Veränderung des eEF2-Signalwegs noch zu einer großen Veränderung der Proteinbiosynthese.

Diese Arbeit zeigt, dass die eingesetzten Wirkstoffe einen eventuell erhöhten Informationsaustausch bewirken. Des Weiteren wurde die Hypothese der im Alter abnehmenden Proteinbiosynthese bekräftigt.

Inhalt

Zusammenfassung	I
Inhalt III	
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 <i>Immunohisto- / Immunozytochemie</i>	2
1.2 <i>Prinzip der FUNCAT & BONCAT-Methode</i>	2
1.3 <i>Translation und Translokation sowie die Rolle der Elongationsfaktoren eEF-1 und eEF-2</i>	5
1.4 <i>Einfluss des Alterungsprozesses auf Neuronen</i>	6
2 Zielsetzung	8
3 Material	9
3.1 <i>Chemikalien</i>	9
3.2 <i>Lösungen</i>	9
3.3 <i>Material</i>	12
3.4 <i>Gradientengele</i>	12
3.5 <i>Medium</i>	12
3.6 <i>Primär-Antikörper</i>	13
3.7 <i>Sekundär-Antikörper</i>	13
3.8 <i>Zellkulturen</i>	13
3.9 <i>Geräte</i>	14
4 Methoden	15
4.1 <i>Pharmakologische Behandlung</i>	15
4.1.1 <i>Behandlung der primären kortikalen Neuronenkultur in Kulturflaschen</i>	15
4.1.2 <i>Behandlung der Zellkulturen auf Glass-Coverslips</i>	15

4.2	<i>Immunozytische Methoden</i>	16
4.2.1	Immunofluoreszenz.....	16
4.2.2	FUNCAT	17
4.3	<i>Biochemische Methoden</i>	18
4.3.1	Zellernte.....	18
4.3.2	Zelllyse	18
4.3.3	Amidoblack-Protein-Assay	19
4.3.4	BONCAT.....	20
4.3.5	SDS-Strecke	21
4.4	<i>Software-Arbeit</i>	22
5	Ergebnisse	23
5.1	<i>Immunofluoreszenz</i>	23
5.1.1	Pharmakologische Behandlung: eEF2-Kinase Inhibitor A484954.....	23
5.1.2	Pharmakologische Behandlung: Antioxidationsmittel DMF	25
5.1.3	Pharmakologische Behandlung: NMDA-Rezeptor Antagonisch Memantine hydrochlorid..	27
5.1.4	Pharmakologische Behandlung NMDA-Rezeptor Antagonist ZD 9379.....	29
5.2	<i>FUNCAT-Signale</i>	31
5.2.1	<i>De novo</i> Proteinsynthese – DIV 21 Neurone.....	31
5.2.2	<i>De novo</i> Proteinsynthese – DIV 60 Neurone.....	36
5.3	<i>Western & Immunoblot</i>	41
5.4	<i>BONCAT-Signale</i>	42
6	Diskussion	43
6.1	<i>Morphologische Veränderungen nach pharmakologischen Behandlung</i>	43
6.2	<i>In situ</i> Proteinsynthese.....	44
6.3	<i>Einfluss der Wirkstoffe auf den eEF2-Signalweg und der globalen Proteinsynthese</i>	45
7	Fazit	47
8	Ausblick	48
9	Danksagung	49
	Literaturverzeichnis	50
	Selbstständigkeitserklärung	55

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung <i>de novo</i> synthetisierter Proteine mittels BONCAT und FUNCAT [modifiziert nach Hinz et al., 2010]	3
Abbildung 2: Strukturformeln von Methionin, AHA und HPG in der L-Isomeren-Form [Hinz et al. 2013].....	3
Abbildung 3: Mechanismus der kovalenten Bindung des Signalstoffes durch „Klick-Reaktion“ [Hinz et al., 2010].....	4
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Translation und den Einfluss von eEF-1 und eEF-2 bei diesen Prozessen[URL-3]	6
Abbildung 5: Regulation der Proteinsynthese durch den eEF2-Pathway.....	7
Abbildung 6: Verarbeitung des Coomassie-Scans mit ImageJ	22
Abbildung 7: Vergleich DIV 14 Neuronen unter basalen Kondition und der Behandlung von A484954	23
Abbildung 8: Abbildung 8: Vergleich DIV 60 Neuronen unter basalen Kondition und der Behandlung von A484954.....	24
Abbildung 9: Vergleich DIV 14 Neuronen unter basalen Kondition und der Behandlung von DMF	25
Abbildung 10: Vergleich DIV 60 Neuronen unter basalen Kondition und der Behandlung von DMF	26
Abbildung 11: Vergleich DIV 14 Neuronen unter basalen Kondition und der Behandlung von Memantin hydrochloride.....	27
Abbildung 12: Vergleich DIV 60 Neuronen unter basalen Kondition und der Behandlung von Memantin hydrochloride.....	28
Abbildung 13: Vergleich DIV 14 Neuronen unter basalen Kondition und der Behandlung von ZD 9379.....	29
Abbildung 14: Vergleich DIV 60 Neuronen unter basalen Kondition und der Behandlung von ZD 9379.....	30
Abbildung 15: Ergebnisse der FUNCAT-Methode für A484954 5µM, 10 µM, 20 µM und ohne Behandlung von A484954 21 Tage alten Neuronen.....	31
Abbildung 16: Ergebnisse der FUNCAT-Methode für Spermidin 10µM, 20 µM, 50 µM und ohne Behandlung von Spermidin 21 Tage alten Neuronen	32
Abbildung 17: Vergrößerung der <i>de novo</i> Proteinsynthese-Bilder der DIV 21 Neuronen, die mit A484954 behandelt wurden	33
Abbildung 18: Vergrößerung der <i>de novo</i> Proteinsynthese-Bilder der DIV 21 Neuronen, die mit Spermidin behandelt wurden	34

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 19: De novo Proteinsynthese in den Dendriten und Spines der DIV 60 Neurone.....	35
Abbildung 20: Ergebnisse der FUNCAT-Methode für A484954 5µM, 10 µM, 20 µM und ohne Behandlung von A484954 60 Tage alten Neuronen.....	36
Abbildung 21: Ergebnisse der FUNCAT-Methode für Spermidin 10µM, 20 µM, 50 µM und ohne Behandlung von Spermidin 60 Tage alten Neuronen.....	37
Abbildung 22: Vergrößerung der <i>de novo</i> Proteinsynthese der DIV 60 Neuronen, die mit A484954 behandelt wurden.....	38
Abbildung 23: Vergrößerung der <i>de novo</i> Proteinsynthese der DIV 60 Neuronen, die mit Spermidin behandelt wurden.....	39
Abbildung 24: <i>De novo</i> Proteinsynthese in den Dendriten und Spines der DIV 60 Neurone.....	40
Abbildung 25: Detektion der Proteine im eEF2-Pathway.....	41
Abbildung 26: Biotin-Signal der <i>de novo</i> synthetisierten Proteine von den primären kortikalen Neuronenkulturen aus Kulturflaschen (n=2).....	42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Komponentenzusammensetzung für 12 Gradientengele	12
Tabelle 2: Liste der verwendeten Primär-Antikörper für die ICC	13
Tabelle 3: Liste der verwendeten Sekundär-Antikörper.....	13
Tabelle 4: Pharmakologische Behandlung der einzelnen Wirkstoffe und die dazugehörigen Inkubationszeiten.....	15
Tabelle 5: Pharmakologische Behandlung bei den immunocytischen Methoden.....	16
Tabelle 6: Schematische Darstellung der Zellbehandlung in einer 24 Well-Platte	17
Tabelle 7: Pipettierschema zum kalibrieren des Photometers ASYS ExpertPlus.....	19
Tabelle 8: Waschvorgang beim Immunoblot	21

Abkürzungsverzeichnis

A484954	7-Amino-1-cyclopropyl-3-ethyl-1,2,3,4-tetrahydro-2,4-dioxypyrido[2,3-d]pyrimidine-6-carboxamide
AHA	Azidohomoalanin
BSA	Bovine Serum Albumin
BONCAT	Bioorthogonal non-canonical amino acid tagging
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DIV	days <i>in vitro</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethyl Fumerat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eEF-1	eukaryotischer Elongationsfaktor 1
eEF-2	eukaryotischer Elongationsfaktor 2
peEF2	Phospho eukaryotischer Elongationsfaktor 2
FUNCAT	fluorescent non-canonical amino acid tagging
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	Hank's balanced salt solution
HPG	Homopropargylglycin
HRP	Meerrettich Peroxidase
ICC	Immunocytochemie
IF	Immunofluoreszenz
IHC	Immunohistochemie
IPT	Institut für Pharmakologie und Toxikologie
kDa	Kilo-Dalton
L-Leu	L-Leucin
L-Glu	L-Glutamin
Mem	Memantin hydrochloride
Met	Methionin
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
n	Anzahl der unabhängigen Experimente
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PBS	Phosphat gepufferter Saline

Abkürzungsverzeichnis

PFA	Paraformaldehyd
PI	Phosphatase-Inhibitor
P-Stopp	Phosphostopp
RF1	Regulations-Faktor 1
RF2	Regulations-Faktor 2
RT	Raumtemperatur
SDS-Page	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Sper	Spermidin
SyPhy	Synaptophysin
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
w/o	ohne
ZD9379	7-Chloro-2,3-dihydro-2-(4-methoxy-2-methylphenyl)pyridazino [4,5- <i>b</i>] quinoline-1,4,10(5 <i>H</i>)trione

1 Einleitung

Das Gehirn besitzt eine der komplexesten Strukturen auf der Welt. Nicht nur, dass es verschiedene Regionen besitzt, die unterschiedliche Funktionen innehaben, sondern auch, dass diese Funktionen durch ein Zusammenspiel von Nervenzellen und Glia-Zellen hervorgerufen werden.

Speziell Kortex und Hippocampus sind die Regionen, die für die kognitiven Prozesse verantwortlich sind. Der Lernprozess per se wird durch neue Reizeinflüsse entwickelt. Jeder neue Reiz bewirkt eine Veränderung des neuronalen Netzwerks. Neue Verknüpfungen werden ausgebildet oder weniger frequentierte Verknüpfungen wieder aufgelöst, wodurch ein verbesserter Informationsaustausch stattfinden kann [Deng et al., 2010].

Die wohl wichtigsten Zellen sind die Nervenzellen. Sie sind verantwortlich für die Informations- und Reizübertragung [Shadlen & Newsome, 1998]. Eine Besonderheit der Neuronen ist es, sich an unterschiedliche Strukturen anzupassen. Durch die Fähigkeit der Neuronen, sich morphologisch und adaptiv zu verändern, können verbesserte Signalübertragungen erfolgen. Diese Fähigkeit wird als synaptische Plastizität bezeichnet. Die synaptische Plastizität ist ein wichtiger Forschungsgegenstand in der Neurowissenschaft und ist wahrscheinlich für die Ausbildung von kognitiven Prozessen essentiell [Henley & Wilkinson, 2013]. Durch die synaptische Plastizität sind die Neuronen in der Lage bei Lernprozessen ein komplexeres neuronales Netzwerk auszubilden.

Glia-Zellen sind die vielseitigen Zellen im zentralen Nervensystem. Sie sind für die Regulation von Neurotransmittern, für die Drosselung des oxidativen Stresses und für anti-inflammatorische Prozesse verantwortlich [Souza et al., 2015; Kimelberg, 2007].

Außerdem verstärken die Glia-Zellen die Ausbildung der neuronalen Synapsen, indem sie spezifische Botenstoffe absondern [Ricci et al., 2009]

Um die kognitiven Prozesse und das Zusammenspiel der Neuronen und der Glia-Zellen besser verstehen zu können reichen *in vivo* Modelle oftmals nicht aus. Sie sind zeitaufwendig, kostspielig und zeigen nur begrenzte molekularbiologische Untersuchungsansätze. Deshalb ist es von Vorteil, ein Zellkulturmodell zu entwickeln, welches nicht nur geeignet für die Untersuchung der kognitiven Prozesse ist, sondern zusätzlich die Entwicklung dieser Prozesse, unter dem Einfluss von Altersaspekten, widerspiegelt.

1.1 Immunohisto- / Immunozytochemie

Die Immunohistochemie (IHC) und die Immunozytochemie (ICC) sind artverwandte Methoden, die jeweils auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion beruhen. Die IHC befasst sich mit Gewebeschnitten und die ICC mit Zelllinien oder primären Zellkulturen. Die zu behandelten Proben sind zwar unterschiedlich, die Vorgehensweise ist jedoch annähernd gleich.

Die Verwendung dieser Techniken hat in den letzten 30 Jahren akut zugenommen und findet auch in Publikationen einen großen Zuwachs [de Matos et al., 2010].

Um Zellstrukturen einer Zelle in Kultur genauer auf ihre Eigenschaften untersuchen zu können, wird die Methode der Immunozytochemie genutzt. Dabei werden Proteine der Zelle mit einem primären Antikörper spezifisch gekoppelt. Zur Sichtbarmachung dieser Koppelung werden sekundäre Antikörper genutzt, welche einen Farbstoff besitzen, der durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und dadurch unter dem Mikroskop sichtbar wird.

Die Immunocytochemie kann genutzt werden, um sowohl morphologische Veränderungen der Zellstruktur, als auch Veränderungen des Proteoms nach Zugabe von bestimmten Wirkstoffen festzustellen.

1.2 Prinzip der FUNCAT und BONCAT-Methode

Die BONCAT und FUNCAT-Methoden ermöglichen es, *de novo* synthetisierten Proteine darzustellen.

Dies wird es bei der FUNCAT-Methode durch eine Kombination mit der ICC ermöglicht [Dieterich et al., 2010]. BONCAT-„geklickte“ Zelllysate aus Zellkulturen können mit Hilfe der Westernblot-Analyse sichtbar gemacht werden (siehe Abbildung 1) [Dieterich et al., 2006].

Wichtig für diese Methoden sind die molekularen Sonden. Für das fluorescent non-canonical amino acid tagging (FUNCAT) wird der Peg-TAMRA-Tag verwendet. Dieser besitzt einen Fluoreszenzfarbstoff, welcher nach Anregung mit Licht unter dem Mikroskop sichtbar wird. Bei dem bioorthogonal non-canonical amino acid tagging wird der Biotin-Tag verwendet. Dieser kann mit dem Primär-Antikörper anti- α -Biotin gekoppelt und durch einen Sekundärantikörper aufgezeigt werden.

Durch diese Sonden ist es möglich, *de novo* synthetisierte Proteine aufzuzeigen.

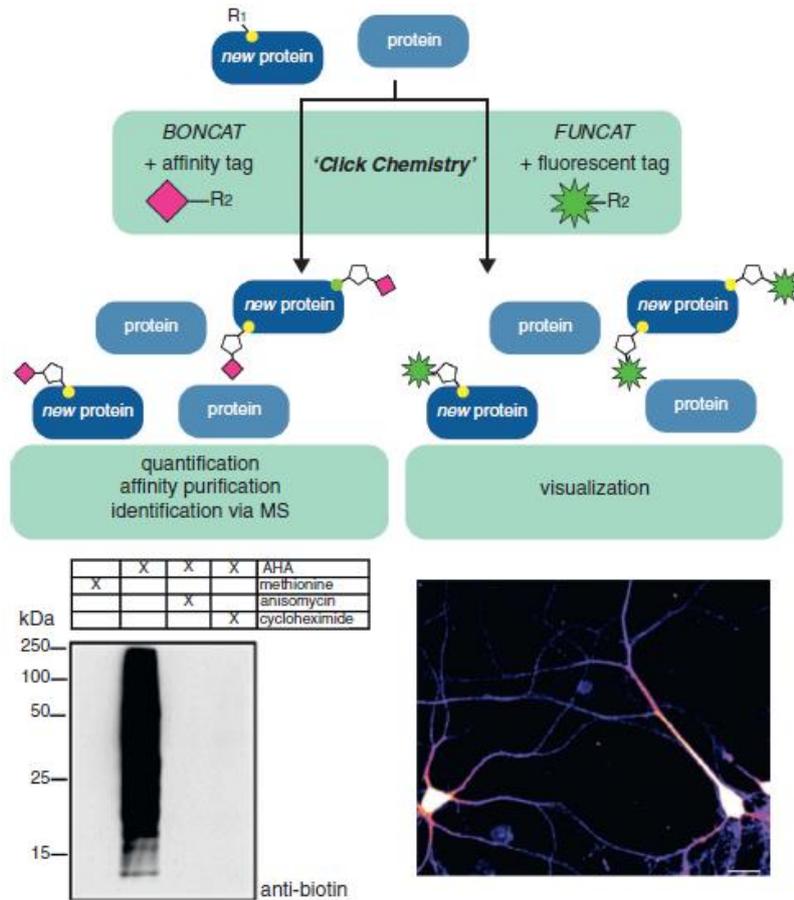


Abbildung 1: Darstellung von *de novo* synthetisierten Proteine mittels BONCAT und FUNCAT [modifiziert nach Hinz et al., 2010]

Das Konzept dieser Methoden beruht sowohl auf der sogenannten „Klick-Chemie“ als auch auf das Einbinden von nicht natürlich vorkommenden Aminosäuren in neu synthetisierten Proteinen. Verwendet werden die Aminosäuren Azidohomoalanin (AHA) und Homopropargylglycine (HPG). Diese besitzen eine Methionin ähnliche Struktur (siehe Abbildung 2).

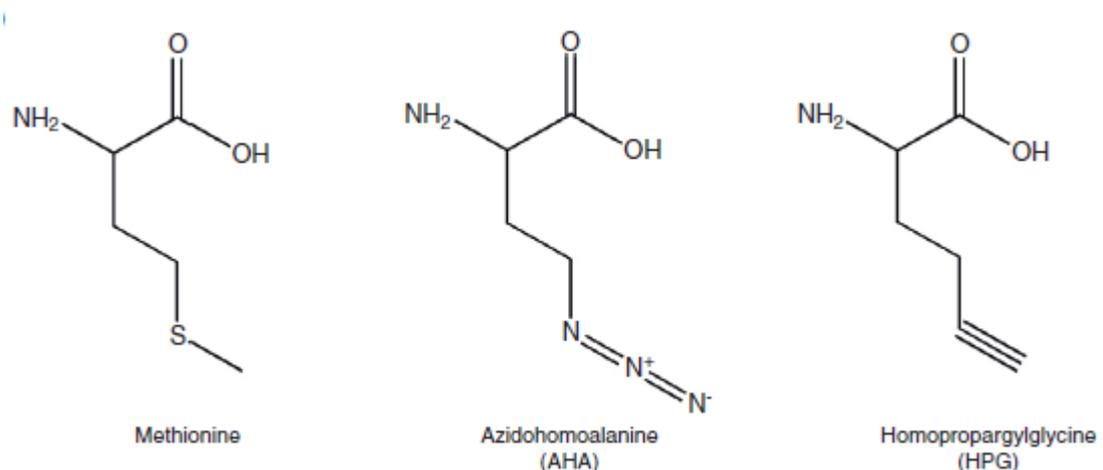


Abbildung 2: Strukturformeln von Methionin, AHA und HPG in der L-Isomeren-Form [Hinz et al. 2013]

Durch diese Struktur ist es den Zellen mit Hilfe von AHA oder HPG, anstelle von Methionin möglich Proteine neu zu synthetisieren. Durch die sogenannte „Klick-Reaktion“ bzw. „Klick-Chemie“ können anschließend molekulare Sonden, wie der Peg-TAMRA-Tag oder der Biotin-Tag, kovalent an die funktionelle Azid- bzw. Alkin-Gruppe von AHA oder HPG angekoppelt werden. Der TAMRA-Tag und der Biotin-Tag besitzen wiederum die funktionelle Alkin-Gruppe (siehe Abbildung 3).

Die „Klick-Reaktion“ beruht auf der Katalyse durch Kupfer(I) und einem Triazol-Liganden.

Diese bewirken die Azid-Alkin-[3+2]Cycloaddition (siehe Abbildung 3) [Kolb et al., 2001; Hinz et al., 2010].

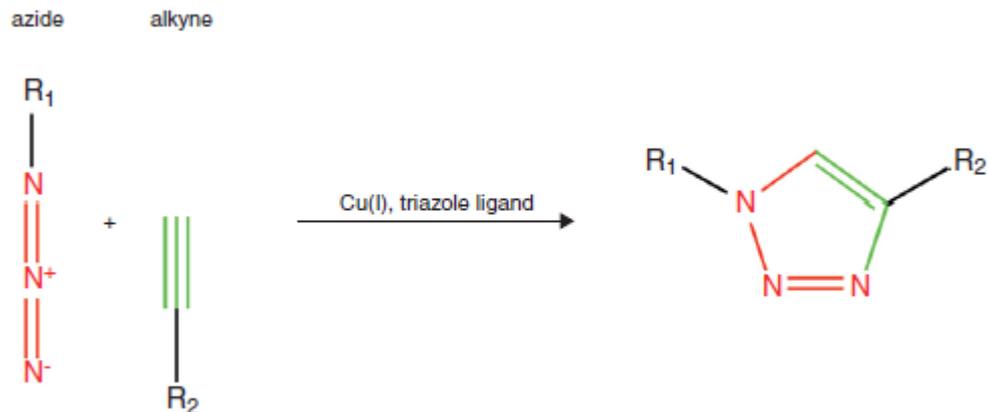


Abbildung 3: Mechanismus der kovalenten Bindung des Signalstoffes durch „Klick-Reaktion“
[Hinz et al., 2010]

Die „Klick-Reaktion“ bietet viele Vorteile. Sie ist sehr effizient und stereotypisch, da diese nur bei bestimmten funktionellen Gruppen abläuft. Die bei der Reaktion entstehenden Nebenprodukte sind leicht zu isolieren [Kolb et al., 2001]. Zudem ist keine radioaktive Markierung notwendig. Zum einen können durch den Einbau der molekularen Sonden die markierten Proteine einfacher identifiziert und visualisiert werden. Zum anderen lassen sich durch diese Sonden markierte Proteine leichter isolieren und gereinigt werden.

Einer der wichtigsten Vorteile ist, dass sich diese Methoden auf jedes Zellkultur-System übertragen lassen. Somit ist es möglich, dass die *de novo* Proteinsynthese bei jeder Zelllinie sichtbar gemacht werden kann.

Nachteil dieser beiden Methoden ist, dass sie sehr kostenintensiv sind. Durch die aufwendige Synthese der nicht natürlich vorkommenden Aminosäuren, entsteht bei beiden Methoden ein immenser Kostenfaktor.

1.3 Translation und Translokation sowie die Rolle der Elongationsfaktoren eEF-1 und eEF-2

Jede Proteintranslation läuft in drei spezifischen Schritten - die Initiation, Elongation und die Termination - ab.

Bei der Initiation bindet die 40s-Untereinheit des Ribosoms an das 5'-Cap-Ende der mRNA. Anschließend liest das Ribosom die mRNA ab, bis dieses ein AUG-Triplet findet, womit die Translation mit einer Initiator-Met-tRNA starten kann.

Die Elongation beschreibt die Verlängerung des zu entstehenden Polypeptids. Dabei „wandert“ das Ribosom auf dem mRNA-Fragment entlang und fügt für jedes neue Basen-Triplet, mit Hilfe einer spezifischen Aminoacyl-tRNA, dem Polypeptid eine Aminosäure hinzu.

Bei diesem Prozess spielen die Elongationsfaktoren eEF-1 und eEF-2 eine wichtige Rolle.

Der eukaryotische Elongationsfaktor 1, kurz eEF-1, besteht aus zwei verschiedenen Untereinheiten, die beide eine wichtige Rolle in der Elongation besitzen.

Die eEF-1 α 1 Untereinheit transportiert und navigiert die Aminoacyl-tRNA zu den Ribosomen und dort werden diese verbraucht [Sanders et al., 1991].

Untereinheit zwei wird als eEF-1 β γ bezeichnet. Sie ist für die Hydrolyse des am eEF-1 α 1 gebundenen GTP verantwortlich. Der Prozess der Hydrolyse erfolgt sobald die spezifische Aminoacyl-tRNA am passenden Anticodon der mRNA angekoppelt wurde. Danach wird das GTP zu GDP und einem Phosphatrest gespalten. Durch die entstandene Energie kann eEF-1 von der Aminoacyl-tRNA getrennt werden. Damit steht die Aminoacyl-tRNA für den Bau des Polypeptids frei zur Verfügung [Walsh & Mohr, 2001; Sanders et al., 1991]

Der zweite Elongationsfaktor eEF-2 nutzt die aus der Hydrolyse von GTP entstehende Energie ebenfalls. Dieser eEF-2 ist für die Translokation der Aminoacyl-tRNA verantwortlich. Die in die A-Stelle des Ribosoms eingebaute tRNA wandert durch den Prozess der Translokation zur P-Stelle bis hin zur E-Stelle der Ribosoms weiter (siehe Abbildung 4).

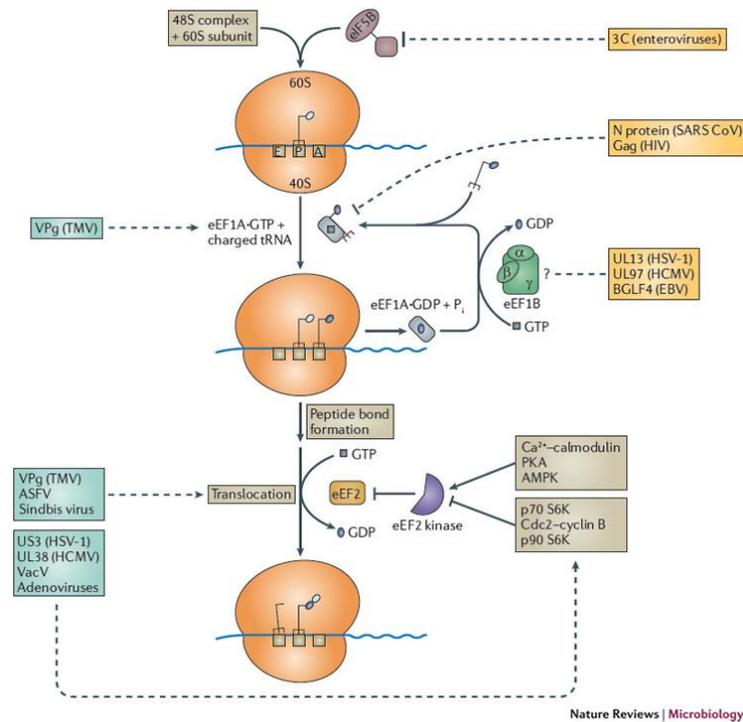


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Translation und den Einfluss von eEF-1 und eEF-2 bei diesen Prozessen [Walsh & Mohr, 2011]

Die Termination ist der abschließende Prozess der Translation. Dabei erreicht das Ribosom das Ende der mRNA, gekennzeichnet durch eines der Stopp-Triplets UAG, UAA oder UGA. Für diese drei Triplets sind keine passenden tRNAs codiert. Bei diesem Prozess spielen die Faktoren RF1 und RF2 eine wichtige Rolle. Sie sind dafür verantwortlich, dass sich die letzte eingebaute tRNA von der gebundenen Aminosäure abtrennt. Dadurch entsteht am Ende der Translation ein vollständiges Polypeptid.

1.4 Einfluss des Alterungsprozesses auf Neuronen

Alterungsprozesse schlagen sich nicht nur auf den Körper, sondern auch auf den Geist nieder. Im Laufe des Alterungsprozesses nehmen die kognitiven Fähigkeiten, wie Lernen und Gedächtnisbildung nach und nach ab. Der Grund dafür ist noch weitestgehend ungeklärt.

Fakt ist jedoch, dass die Proteinsynthese in den Neuronen und deren synaptische Plastizität eine große Rolle für die kognitiven Fähigkeiten spielen.

Die Proteinsynthese nimmt mit dem Alter generell ab [Lerner & Johnson., 1970]. Reguliert wird dies unter anderem durch den eEF2-Signalweg (siehe Abbildung 5).

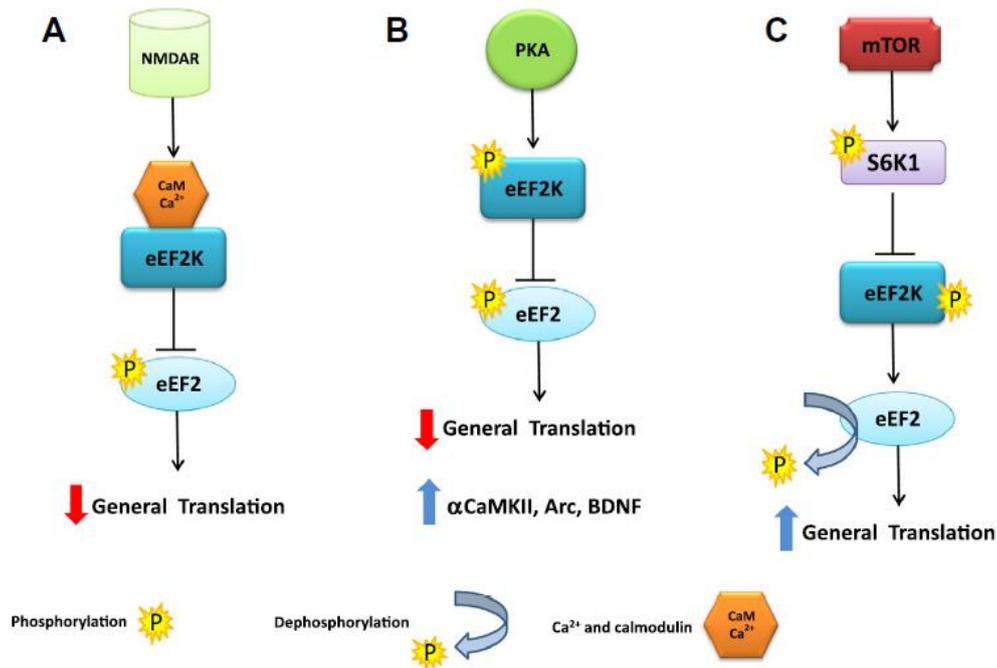


Abbildung 5: Regulation der Proteinsynthese durch den eEF2-Pathway (A) genereller Abfall der Proteinbiosynthese, reguliert durch den NMDA-Rezeptor; Aktivierung der eEF2-Kinase durch Ca²⁺ und Calmodulin; Inaktivierung durch Phosphorylierung des eEF2 durch aktivierte eEF2-Kinase (B) Phosphorylierung von eEF2 und eEF2.Kinase (C) Anstieg der Proteinsynthese durch inaktivierte phosphorylierte eEF2-Kinase [Taha et al., 2013]

Der eukaryotische Elongationsfaktor 2 spielt für die synaptische Plastizität ebenfalls eine wichtige Rolle [Taha et al., 2013]. Allerdings liegt die aktive dephosphorylierte Form eEF2 im Alter vermindert vor [Kimball et al., 1992; Syntichaki et al., 2007]. Damit eEF2 wieder vermehrt aktiv in alten Zellen vorliegen kann, gibt es bestimmte Untersuchungsansätze, die in dieser Arbeit geprüft werden sollen.

Der Wirkstoff A484954 inhibiert beispielsweise die eEF2-Kinase [Chen et al., 2011], welche im Alter zunehmend in der aktiven Form vorliegt [Gal-Ben-Ari et al., 2012]. Durch die Inaktivierung der eEF2-Kinase wird verhindert, dass eEF2 phosphoryliert wird.

Des Weiteren kann ein Eingriff durch die NMDA-Rezeptor-Antagonisten Memantine hydrochlorid und ZD 9379, auf diesen eEF2-Signalweg erfolgen. Diese Wirkstoffe bewirken, dass vermindert Ca²⁺- Ionen und Calmodulin in die Zellen, beziehungsweise in die Neuronen transportiert werden [Slomka et al., 2014; Tatlisumak et al., 2000]. Dies führt zu einer Reduktion der eEF2-Kinaseaktivität und somit zu einer erhöhten eEF2-Aktivität.

Wird der Elongationsfaktor eEF2, wie auch andere Proteine, durch oxidativen Stress beschädigt [Arguelles et al., 2011] Ein potenzieller Kandidat, um dies zu unterbinden ist DMF (Dimethyl Fumarat). DMF ist ein Antioxidationsmittel und verhindert die Beschädigung der Proteine durch oxidativen Stress [Linker et al., 2010].

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss der Wirkstoffe A484954, ZD9379, Memantine hydrochlorid, DMF und Spermidin auf primäre kortikale Neuronenkulturen heraus zu finden und diesen Effekt zu analysieren.

Die dabei auftretenden Effekte sollen mit Hilfe der Immunocytochemie und des Westernblot / Immunoblots gezeigt werden.

Es wird mit jungen und gealterten primären kortikalen Kulturen gearbeitet. Somit können Aussagen darüber getroffen werden, ob die eingesetzten Wirkstoffe einen spezifischen Einfluss auf die gealterte Neuronenkultur ausübt. Dabei ist das Ziel die Signalkaskade des eEF2 zu beeinflussen. Durch diesen Eingriff könnte eine generelle Steigerung der Proteinsynthese erfolgen. Dieser generelle Aufschwung könnte zu einer erhöhten Vitalität der Zellen führen und somit zu einer Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten im Alter beitragen.

3 Material

Alle Chemikalien, die für diese Forschungsarbeit verwendet wurden, sind von Roth GmbH & Co KG., Sigma Aldrich Co. und Merck KGaA. Falls ein Hersteller von einer verwendeten Chemikalie, Lösung oder eines Produktes abweicht, so wird dies explizit erwähnt.

3.1 Chemikalien

DMF	Tocris Bioscience
Memantine Hydrochlorid	Tocris Bioscience
Spermidin	Sigma Aldrich Co.
A 484954	Tocris Bioscience
ZD 9379	Tocris Bioscience
Phosphostopp	Roche Deutschland Holding GmbH
Phosphatase Inhibitor	Roche Deutschland Holding GmbH
Reinstwasser (Nuklease frei)	
Azidohomoalanin	Universitätsklinikum Magdeburg, IPT
Methionin	
Benzonase	
PEG-TAMRA-Tag	Click Chemistry Tools LLC
DAPI	
Tris-Base	Bio-Rad Laboratories Inc
Page-Ruler	Thermo Fisher Scientifics Inc
Puromycin	

3.2 Lösungen

1x PBS (pH: 7,4 oder 7,8)

NaCl	37 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	4,3 mM
KH ₂ PO ₄	1,4 mM

1x PBS (pH: 7,4) + 0,3 % (v/v) Triton-X-100

Material

PBS-MC

1x PBS (pH: 7,8)	
MgCl ₂	0,1 mM
KCl	1 mM

PBS + Phosphostopp + Phosphatase Inhibitor

1x PBS (pH: 7,4)	
Phosphostopp	2 % (v/v)
PI	10 % (v/v)

FUNCAT Reaktions-Lösung

PBS (pH: 7,8)	10 ml
Triazol-Ligand	10 µl von 200mM Stocklösung
TCEP	10 µl von 500mM Stocklösung (143,3 mg/ml)
PEG-TAMRA-TAG	1 µl (1:10000 gelöst)
CuSO ₄	10 µl (49,94 mg/ml)

Methanol-Essigsäure-Lösung

Methanol	90% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)

2% (v/v) BSA-Lösung

Amidoblack-Lösung

Amidoblack	1,44% (w/v) in Methanol-Essigsäure-Lösung
------------	---

B-Block

Horse-Serum	10% (w/v)
Saccharose	5% (w/v)
BSA	2% (w/v)
1x PBS (pH: 7,4)	

Mowiol

Mowiol (w/v)	10% (w/v)
Glycerol	25% (v/v)
Tris-HCl (ph: 8,5)	100 mM
Triethylendiamin	2,5% (w/v)

PLP-Fix

Lösung A

0,84 g Glucose
10 ml 10% PFA

Material

Lösung B

0,054 g Natrium(meta)peroxid

Lösung A

30ml Lysin-Phosphat-Puffer

1x HBSS Thermo Fisher Scientific Inc

FUNCAT-Wash-Puffer

1X PBS (pH: 7,8)

EDTA 0,5 mM

Tween-20 1% (v/v)

1x Elphopuffer (pH: 8,8)

Tris-Base 25 mM

Glycin 192 mM

SDS 0,1% (w/v)

1x WB-Puffer

Tris-Base 25 mM

Glycin 192 mM

SDS 0,02 % (w/v)

Coomassie Brilliant Blut

Methanol 50% (v/v)

Essigsäure 10 % (v/v)

Coomassie Brilliant Blue R250 0,5% (w/v)

Destaining Solution

Essigsäure 7% (v/v)

Methanol 5% (v/v)

PonceauS

PonceauS 5% (w/v)

Essigsäure 3% (v/v)

1x TBS

Tris-Base 20 mM

NaCl 0,8 % (w/v)

1x TBS-T

Tris-Base 20 mM

NaCl 0,8 % (w/v)

Tween-20 0,1 (v/v)

Material

4x SDS-Probenpuffer

20% SDS	4% (w/v)
Glycerol	40% (v/v)
β -Mercaptoethanol	20% (v/v)
Tris (pH: 6,2)	250 mM
Bromphenolblau	0,004% (v/v)

3.3 Material

Odyssey®Nitrocellulose Membran	Li-cor Inc
SuperSignal®West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc
1. Stable Peroxide Buffer	
2. Luminol Enhance Solution	
Pierce® ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc
1. Peroxide Solution	
2. Luminol Enhance Solution	

3.4 Tris-Glycin- 5-20% Gradientengele

Tabelle 1: Komponentenzusammensetzung für 12 Gradientengele

Komponenten	Trenngel 5 %	Trenngel 20 %	Sammelgel
4x Puffer	6,84 ml	6,84 ml	6 ml
Acrylamid 40 %	4,056 ml	16,2 ml	-
Acrylamid 30 %	-	-	3,84 ml
0,2 M EDTA	316,8 μ l	316,8 μ l	214 μ l
10 % SDS	316,8 μ l	316,8 μ l	214 μ l
Reinstwasser	18,94 ml	1,392 ml	7,95 ml
Glycerol 87%	1,8 ml	7,2 ml	5,52 ml
Bromphenol Blau	-	48 μ l	-
Phenolrod	-	-	12 μ l
TEMED	21,6 μ l	21,6 μ l	18,2 μ l
APS 10 %	115,2 μ l	72 μ l	148,2 μ l

3.5 Medium

1x Hibernat A Medium (methionin- und leucinfrei) – BrainBits LLC

+ B27	2 % (v/v)
+ L-Glu	0,4 % (v/v)
+ L-Leu	1 % (v/v)

3.6 Primär-Antikörper

Tabelle 2: Liste der Verwendeten Primär-Antikörper für ICC und WB

Antikörper	Spezies	Verdünnung
anti-eEF2	mouse	1:1000 (WB)
anti-peEF2	mouse	1:1000 (WB)
anti-eEF2-Kinase	rabbit	1:1000 (WB)
anti-peEF2-Kinase	rabbit	1:1000 (WB)
anti-S6K1	rabbit	1:1000 (WB)
anti-pSK1	rabbit	1:1000 (WB)
anti- α -Biotin	goat	1:1000 (WB)
anti-GFAP	chicken	1:1000 (ICC)
anti-Synaptophysin	guinea pig	1:1000 (ICC)
anti-MAP2	rabbit	1:1000 (ICC)
anti-Puromycin	mouse	1:250 (ICC)

Hersteller: Abcam plc.

3.7 Sekundär-Antikörper

Tabelle 3: Lister der verwendeten Sekundär-Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung
HRP	rabbit	1:7500 (WB)
HRP	mouse	1:7500 (WB)
HRP	guinea pig	1:7500 (WB)
Alexa Fluor® 550	rabbit	1:1000 (ICC)
Alexa Flour® 555	mouse	1:1000 (ICC)
Alexa Fluor® 488	guinea pig	1:1000 (ICC)
Alexa Fluor® 647	chicken	1:1000 (ICC)

Hersteller: Jackson Immunoresearch Inc

3.8 Zellkulturen

Verwendet wurden primäre neuronale Zellkulturen (Region: Kortex) von *Rattus norvegicus* des Stammes *Wistar*; kultiviert bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt [Banker & Goslin, 1988] – Universitätsklinikum Magdeburg, Institut für Pharmakologie und Toxikologie.

Die Zellen wurden in HBSS + 0,25% Trypsin dissoziiert und zum einen auf Poly-D-Lysin beschichteten Coverslips und zum anderen in Kulturflaschen ausgesät. Die Dichte für die Coverslips betrug 20.000 Zellen und für die Kulturflaschen 3 Millionen Zellen. Die Zellen wuchsen zunächst für 24 Stunden in DMEM, danach wurde dieses Medium durch ein Neurobasal Medium, welches mit B27 und 0,08 mM Glutamin versetzt wurde, ausgetauscht. Zu den Zellen auf den Coverslips kam außerdem ein konditioniertes Medium hinzu. Die Zellen wurden jede Woche mit 50 µl (pro Coverslips) oder mit 5 ml (pro Kulturflasche) gefüttert.

3.9 Geräte

eppendorf centrifuge 5810 R	Eppendorf AG
eppendorf centrifuge 5417 R	Eppendorf AG
ASYS ExpertPlus	Biochrom
Axioplan 2 Imaging	Carl Zeiss
Heidolph duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH
Milli-Q System	Merck Millipore Corporation
Bioshaker IQ	Thermo Fisher Scientific Inc
Hofer Mighty Small System SE250	General Electric
Hofer Mighty Small Transphor Unit TE22	General Electric
Power Supply Consort EV 261	Bio-Rad Laboratories Inc.
Odyssey Fc	Li-Cor Inc.
Zeiss Observer.Z1	Carl Zeiss Deutschland

4 Methoden

4.1 Pharmakologische Behandlung

4.1.1 Behandlung der primären kortikalen Neuronenkultur in Kulturflaschen

Für das Kapitel 4.3 Biochemische Behandlung wurden primäre kortikale Neuronenkulturen aus Kulturflaschen benutzt (DIV 21, 30 und 60). Diese Neuronen wurden mit den Wirkstoffen A484954, DMF, ZD 9379 und Memantine hydrochlorid behandelt. Zu beachten ist, dass die pharmakologische Behandlung der primären kortikalen Neuronenkulturen mit unterschiedlichen Dosierungen durch die oben genannten Wirkstoffe vorgenommen wurde. Die Inkubationszeiten waren ebenfalls different (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Pharmakologische Behandlung der einzelnen Wirkstoffe und die dazugehörigen Inkubationszeiten

Wirkstoff	Konzentrationen niedrig-/ hohe-Dosis in μM	Inkubationszeit in Stunden
A 484954	5 / 20	6
DMF	10 / 100	chronisch: 1x pro Woche
ZD 9379	5 / 18	24
Memantine hydrochlorid	5 / 18	6

Davon abweichend lag bei der BONCAT-Methode die Inkubationszeit bei drei Stunden für jeden der Wirkstoff.

4.1.2 Behandlung der Zellkulturen auf Glass-Coverslips

Für die Immunfluoreszenz und FUNCAT-Methode wurden die Neuronen in 24 Wellplatten (DIV 14, 21 und 60) mit den schon aufgelisteten Wirkstoffen behandelt. Dabei erfolgte die Behandlung nach folgendem Schema (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Pharmakologische Behandlung bei den immunocytyischen Methoden

Wirkstoff	Konzentration in μM niedrig- / mittlere- / hohe- Do- sis	Inkubationszeiten in Stunden
A 484954	5 / 10 / 20	6
Spermidin (FUNCAT)	10 / 25 / 50	3
DMF	10 / 50 / 100	24
ZD 9379	5 / 10 / 18	24
Memantine hydrochlorid	5 / 10 / 18	6

Die Inkubationszeiten der Wirkstoffe für die FUNCAT-Methode betragen drei Stunden.

4.2 Immunozytische Methoden

4.2.1 Immunofluoreszenz

Um morphologische Veränderungen der Neuronen betrachten zu können, wurden immunozytische Färbungen durchgeführt.

Dabei wurden sowohl 14 Tage alte, als auch 60 Tage alte Neuronen verwendet. Die entsprechende pharmakologische Behandlung erfolgte nach Kapitel 4.1.2 Behandlung der Zellkulturen auf Glass-Coverslips.

Anschließend wurden die Coverslips dreimal mit sterilem PBS (pH. 7,4) gewaschen und 20 Minuten mit PLP-Fix fixiert. Eine Blockierung von unspezifischen Bindungen geschah mit B-Block für 1,5 Stunden.

Um die Neuronenstruktur anfärben zu können wurde MAP2 verwendet. Für die synaptischen Vesikel wurde Synaptophysin und für die Gliazellen wurde GFAP verwendet. Die Primär-Antikörper MAP2, SyPhy und GFAP wurden in B-Block gelöst und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die Sekundär-Antikörper Alexa Flour®550, 637 und 488 wurden ebenfalls in B-Block gelöst und nach der Inkubationszeit der Primär-Antikörper sowie nach dreimaligem waschen mit PBS (pH: 7,4) + 0,3 % Triton dazu pipettiert. Die Inkubationszeit betrug zwei Stunden bei Raumtemperatur.

Im Anschluss daran, wurden die Zellen noch zweimal mit PBS (pH: 7,4) + 0,3 % Triton gewaschen. Nach dem zweimaligen Waschen wurde DAPI (Zellkernfärbung) in PBS (pH: 7,4) gelöst und ebenfalls auf die Zellen gegeben. Nach einmaligen waschen mit PBS (pH: 7,4) erfolgte eine Fixierung der Coverslips auf Objektträgern mit Hilfe von Mowiol (7 μl pro Coverslip). Die Aufnahme erfolgte mit dem Mikroskop Observer.Z1.

4.2.2 FUNCAT

Die FUNCAT- Methode wurde angewendet um die *de novo* Proteinsynthese in primären kortikalen Zellkulturen erkennen und analysieren zu können.

Im ersten Schritt wurden die Zellen mit angewärmten 1x HBSS (37°C) gewaschen und anschließend für 30 Minuten mit einem Methionin-freiem Hibernat Medium inkubiert, sodass die Zellen das restliche vorhandene Methionin für die Proteinsynthese verbrauchen konnten.. Nach 30 Minuten wurden zu dem Hib-Met Medium (vorgewärmt) sowohl Spermidin und A484954 als auch AHA und Met zu den Zellen hinzugegeben (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Schematische Darstellung der Zellbehandlung in einer 24 Well-Platte

AHA w/o	AHA w/o	AHA w/o	Met	Met	Met
A48 5 µM + AHA	A48 5 µM + AHA	A48 5 µM + AHA	Sper 10µM + AHA	Sper 10µM + AHA	Sper 10µM + AHA
A48 10 µM + AHA	A48 10 µM + AHA	A48 10 µM + AHA	Sper 25 µM + AHA	Sper 25 µM + AHA	Sper 25 µM + AHA
A48 20 µM + AHA	A48 20 µM + AHA	A48 20 µM + AHA	Sper 50 µM + AHA	Sper 50 µM + AHA	Sper 50 µM + AHA

Nach dreistündiger Inkubationszeit wurden die Neuronen mit PLP-Fix für 20 Minuten bei RT fixiert. Danach wurde dreimal mit PBS (pH: 7,4) für jeweils 10 Minuten bei RT gewaschen. Mit B-Block wurde für 1,5 Stunden blockiert. Nach der Blockierung wurde wieder dreimal mit PBS (pH. 7,8) für jeweils 10 Minuten bei RT auf dem Heidolph duomax 1030 gewaschen

Für die FUNCAT-Methode wurden etwa 10 ml einer FUNCAT-Reaktionslösung angesetzt. Dabei war zu beachten, dass nach der Zugabe jeder Chemikalie (Triazol-Ligand, TCEP und PEG-TAMRA-Tag) die Lösung für 10 Sekunden bei voller Geschwindigkeit durchmischt wird. Nach der Zugabe von CuSO₄ wurde 30 Sekunden lang bei voller Geschwindigkeit durchmischt. Kupfer(II)Sulfat ist für die Katalyse der „Klick-Reaktion“ essentiell, damit der Fluoreszenzfarbstoff Peg-TAMRA-Tag kovalent an die funktionelle Gruppe von AHA binden kann. Für die „Klick-Reaktion“ wird Kupfer (I) benötigt. Kupfer (I) entsteht bei der Reduktion von Kupfer(II)Sulfat (CuSO₄) und dem Reduktionsmittel TCEP. Für die Stabilisation des einwertigen Kupfers ist der Triazol-Ligand zuständig.

In jedes Well einer neuen 24 Wellplatte wurden 400 µl dieser Reaktionslösung pipettiert. Die mit Neuronen bewachsenen und fixierten Coverslips kamen anschließend über Kopf in die neue 24 Wellplatte und wurden bei RT über Nacht inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden die Coverslips auf Objektträger transferiert, welche vorher mit Parafilm abgedeckt wurden.

Danach wurden die Coverslips zunächst mit FUNCAT-Wasch-Puffer dreimal, für jeweils 10 Minuten gewaschen und im Anschluss daran, zweimal mit PBS (pH: 7,4) gewaschen. Die darauf folgende Vorgehensweise erfolgte nach Kapitel 4.2.1 Immunfluoreszenz.

4.3 Biochemische Methoden

Für die nachfolgenden Experimente wurden primäre kortikale Neuronenkulturen verwendet, welche in Kulturflaschen gewachsen sind. Die Neuronen wurden nach demselben Schema wie in Kapitel 4.1.1 Behandlung der primären kortikalen Neuronenkultur in Kulturflaschen behandelt.

4.3.1 Zellernte

Als erster Schritt für die weitere biochemische Behandlung erfolgte die Zellernte.

Dabei wurde zunächst das überschüssige Medium verworfen und durch kaltes 5 ml PBS-MC ersetzt. Diese Lösung wurde vorsichtig an den Flaschenrand gegeben und nach kurzem Waschen verworfen.

Es wurden 1ml PBS + P-Stopp + PI direkt auf den Zellrasen pipettiert so, dass die Zellen mit dieser Lösung leicht benetzt waren. Danach wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt, damit die abgelösten Zellen in die PBS + P-Stopp+ PI -Lösung gelangen konnten. Daraufhin wurden die gelösten Zellen mit der Lösung aus der Kulturflasche entnommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieses Reaktionsgefäß wurde so lang auf Eis gelagert bis jede Kulturflasche abgeerntet war.

Nach der Zellernte wurden die Zellen bei 4°C, 3000 x g für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und abschließend wurde das Pellet für mindestens einen Tag eingefroren.

4.3.2 Zellyse

Um die Proteine aus den Neuronen zu gewinnen, wurden die Zellen lysiert. Dabei wurde zunächst das Pellet, aus Kapitel 4.3.1 Zellernte, aufgetaut.

Das Pellet wurde anschließend mit 47,5 µl PBS (pH: 7,8) + P-Stopp + PI resuspendiert. Hinzu kamen 2,5 µl 20 %iges SDS und 0,5 µl Benzonase. Weiterhin wurden 50 µl PBS + P-Stopp + PI hinzu pipettiert. Bei jedem Schritt wurde die Lösung gevortext. Nach diesen Schritten wurden die Reaktionsgefäße in den Bioshaker (IQ) transferiert und verweilten in diesem für 7 Minuten bei 97°C und 800 rpm.

Als letztes wurden 395 µl PBS + P-Stopp + PI und 5 µl 20 %iges Triton zu der Lösung hinzugegeben. Danach wurde die Lösung bei 3000 x g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Zu diesem Überstand kam 4x SDS-Probenpuffer in einem 1:3 Verhältnis hinzu.

4.3.3 Amidoblack-Protein-Assay

Mit Hilfe des Amidoblack-Protein-Assay kann die Proteinkonzentration von den Lysaten der primären kortikalen Neuronenkulturen bestimmt werden.

Dabei wurde zunächst eine Kalibrierlösung angefertigt. Hierbei wurde eine BSA-Stocklösung (2 mg/ml) verwendet. Die Stocklösung wurde in einem Verhältnis von 1:4 verdünnt.

Diese Lösung wurde nach dem Schema (siehe Tabelle 6) jeweils dreimal in eine 96 Well-Platte pipettiert.

Tabelle 7: Pipettierschema zum kalibrieren des Photometers ASYS ExpertPlus

Reihe	µg BSA	µl H ₂ O	µl verdünnte BSA-Stocklösung
A	0	100	0
B	2	96	4
C	4	92	8
D	8	84	16
E	12	76	24
F	16	68	32
G	20	60	40
H	0	100	0

Nach diesem Schritt wurden dreimal sowohl 10 µl der jeweiligen Zelllysate in die schon benutzte 96 Well-Platte pipettiert als auch 90 µl Reinstwasser zur Verdünnung.

Danach wurde jede Probe mit 200 µl der Amidoblacklösung behandelt. Dieses inkubierte für 10 Minuten mit den Proben

Nach der Inkubationszeit wurden die Proben bei 4°C, 3220 x g und für 10 Minuten zentrifugiert.

Im Anschluss daran wurde der Überstand verworfen und das entstandene Pellet mit 300 µl Methanol-Essigsäure gewaschen. Im Folgenden wurden die Proben wieder bei 4°C, 3220x g für 10 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde entsorgt, sodass der Waschschrift mit Methanol-Essigsäure, zu denselben Konditionen, wie zuvor beschrieben, einmal wiederholt werden konnte.

Danach wurde das Pellet beim Raumtemperatur für 30 Minuten getrocknet. Anschließend sind 300 µl NaOH (0,1 M) dazu gegeben worden, sodass das entstandene Pellet resuspendiert werden konnte. Diese Proben wurden mit dem Photometer (ASYS ExpertPlus) bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen. Anschließend wurden die Probevolumen für 10 µg Protein bestimmt.

4.3.4 BONCAT

Die BONCAT-Methode wurde, wie die FUNCAT-Methode, dazu verwendet, um *de novo* synthetisierte Proteine nachzuweisen.

Zunächst wurde das Medium für die primären kortikalen Neuronenkulturen aus den Kulturflaschen entnommen. Anschließend wurden die Neuronen mit angewärmten HBSS gewaschen. Nach diesem Waschgang wurde das HBSS mit vorgewärmtem Hib-Met Medium ersetzt, welches für eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert. Dadurch waren die Neuronen gezwungen das restlich vorhandene Methionin für die Proteinsynthese zu verbrauchen.

Nach einer halben Stunde kamen sowohl die Wirkstoffe A484954, Memantine hydrochlorid, ZD 9739 und DMF als auch AHA und Met (analog zu Kapitel 4.1.1 Pharmakologische Behandlung der primären kortikalen Neuronenkulturen in Kulturflaschen) hinzu. AHA und Methionin wurde mit einer finalen Konzentration von 4mM zu den Zellen hinzugegeben. Die eingesetzten Wirkstoffe verweilten mit den primären kortikalen Neuronenkulturen für drei Stunden in der Kulturflasche bei 37°C. Nach dieser Inkubationszeit erfolgte die Vorgehensweise wie in Kapitel 4.3.1 Zellernte und 4.3.2 Zellyse.

Die entstandenen Zellproben wurden halbiert. Die eine Hälfte wurde eingefroren und die andere Hälfte weiterbehandelt. Zur Hälfte, die weiterbehandelt wurde, kamen 0,3 µl Triazol-Ligand und 0,3 µl Biotin-Tag hinzu. Diese wurden nacheinander zugegeben und nach jeder Zugabe wurden die Proben für 10 Sekunden durchmischt. Damit der Biotin-Tag an das AHA geklickt werden konnte, wurde außerdem noch 5 µl Cu(II)Br hinzugegeben. Nach dieser Zugabe wurden die Proben für 30 Sekunden durchmischt.

Jede Probe wurde einzeln behandelt und kam nach dem Cu(II)Br für 1,5 Stunden auf ein Drehrad. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben bei 4°C und 3000 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 1 Minute bei 95°C gekocht.

4.3.5 SDS-PAGE

Für die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe wurde die SDS-Page verwendet. Diese wurden nach dem Standard von Laemmli [Laemmli, 1970] durchgeführt. Dabei wurden Tris-Glycin 5 – 20 % Gradientengele verwendet. Die SDS-Page wurde mit konstanten 12 mA pro Gel betrieben und erreichte ihr Ende, nachdem die Bromphenol-Blau-Bande das Trenngel verließ.

Die aufgetrennten Proteine konnten entweder mit Coomassie Brilliant Blue fixiert und gefärbt werden oder auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert werden. Die Übertragung der aufgetrennten Proteine, auf die Nitrozellulose-Membran, erfolgte per Westernblot.

Die Nitrozellulose-Membran wurde direkt nach dem Westernblot für sieben Minuten mit Ponceau S behandelt, um die Proteine, die sich darauf befinden, fixieren zu können. Die Blockierung der unspezifisch bindenden Proteine erfolgte mit 5% BSA in 1x TBS-T für 1,5 Stunden. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Primärantikörper in 1x TBS-T und 0,1% BSA gelöst und dazu gegeben. Diese Primärantikörper inkubierten über Nacht bei 4°C.

Am nächsten Tag erfolgte ein spezifischer Waschvorgang (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Waschvorgang beim Immunoblot

Waschlösung	Inkubationszeit
1x TBS	spülen
1x TBS	10 Minuten
1x TBS-T	10 Minuten
1x TBS-T	5 Minuten
1x TBS	5 Minuten

Nach diesem Vorgang wurde der Sekundärantikörper auf die Membran gegeben. Der Sekundärantikörper inkubierte für 1,5 Stunden. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Lösung mit dem Sekundärantikörper verworfen und es erfolgte der Waschvorgang wie in Tabelle 8 aufgezeigt. Damit die gekoppelten Proteine sichtbar gemacht werden konnten, wurden die Membran am Ende der Methode mit ECL oder High-ECL (für 10 Minuten) behandelt.

Nach der Behandlung mit ECL und / oder High-ECL erfolgte die Bilderfassung mit dem Licor-System.

4.4 Software-Arbeit

Die entstanden Scanbilder aus Kapitel 4.3.5 SDS-PAGE wurden mit Hilfe des Programmes ImageJ bearbeitet um die finalen Probevolumen berechnen zu können. Dabei wurde über jede Protein-Lane, nachfolgend zu sehen, ein Quadrat gelegt (siehe Abbildung 6).

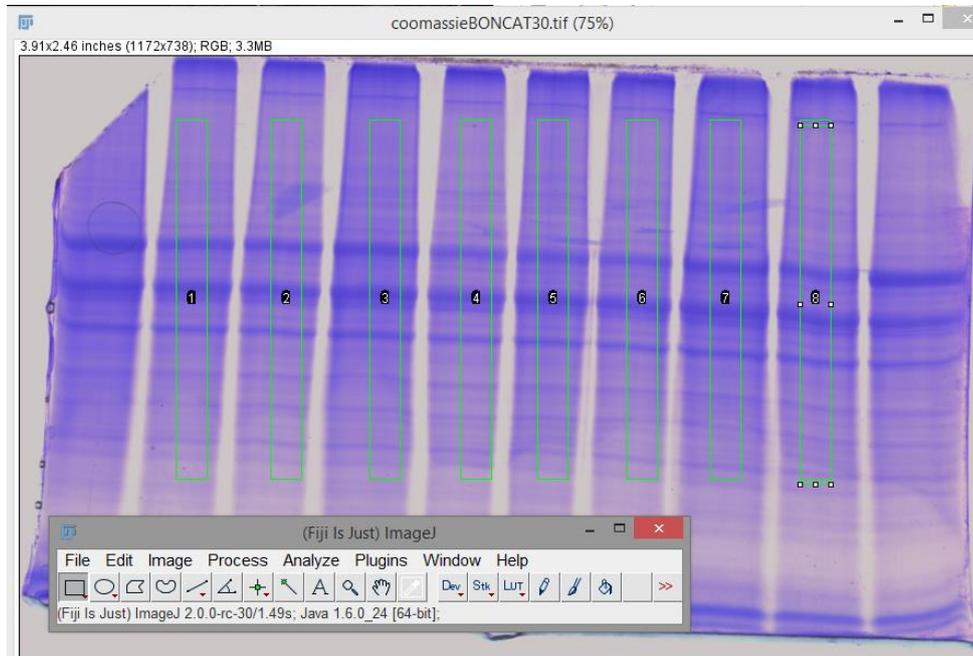


Abbildung 6: Verarbeitung des Coomassie-Scans mit ImageJ

Anschließend wurde die Fläche in den Quadraten durch „Plot-Lanes“ ausgegeben. Mit dem „Wand (tracing) tool“ konnte der Flächeninhalt unterhalb der entstandenen Kurve bestimmt werden. Dieser Flächeninhalt wird verwendet, um das finale Probevolumen für 10 µg Protein zu bestimmen.

Das Programm Fiji wurde benutzt um die aufgenommen Immunofluoreszenz-Bilder zu öffnen und weiter zu be- und verarbeiten.

Die begradigten Dendriten wurden mit einer fixen Breite von 0,8 µm und einer fixen Länge von 70 µm erstellt. Davor wurden die Bilder zusätzlich mit der Option „Maximum Intensity Protection“ ausgegeben.

Die Quantifizierung der TAMRA- und Synaptophysin-Signale bei den begradigten Dendriten erfolgte mit dem Programm OpenView.

Dabei wurden die RGB Bilder in 8 Bit Bilder umgewandelt. Die Ergebnisbilder der Synaptophysin- und TAMRA-Tag-Färbung wurden anschließend in zwei unterschiedliche Kanäle gelegt. Die Intensität der Synaptophysin-Signale wurde berechnet und zugleich über den TAMRA-Kanal gelegt. Signale innerhalb und außerhalb der Dendrite wurden gelöscht und die überlagerten Signale (Synaptophysin auf dendritischen Spines) ausgezählt.

5 Ergebnisse

5.1 Immunofluoreszenz

5.1.1 Pharmakologische Behandlung: eEF2-Kinase Inhibitor A484954

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Immunofluoreszenz, welche mit MAP2, Synaptophysin, DAPI und GFAP durchgeführt wurden. Neben den pharmakologisch behandelten neuronalen Kulturen wurden unbehandelte Kulturen zur Kontrolle benutzt.

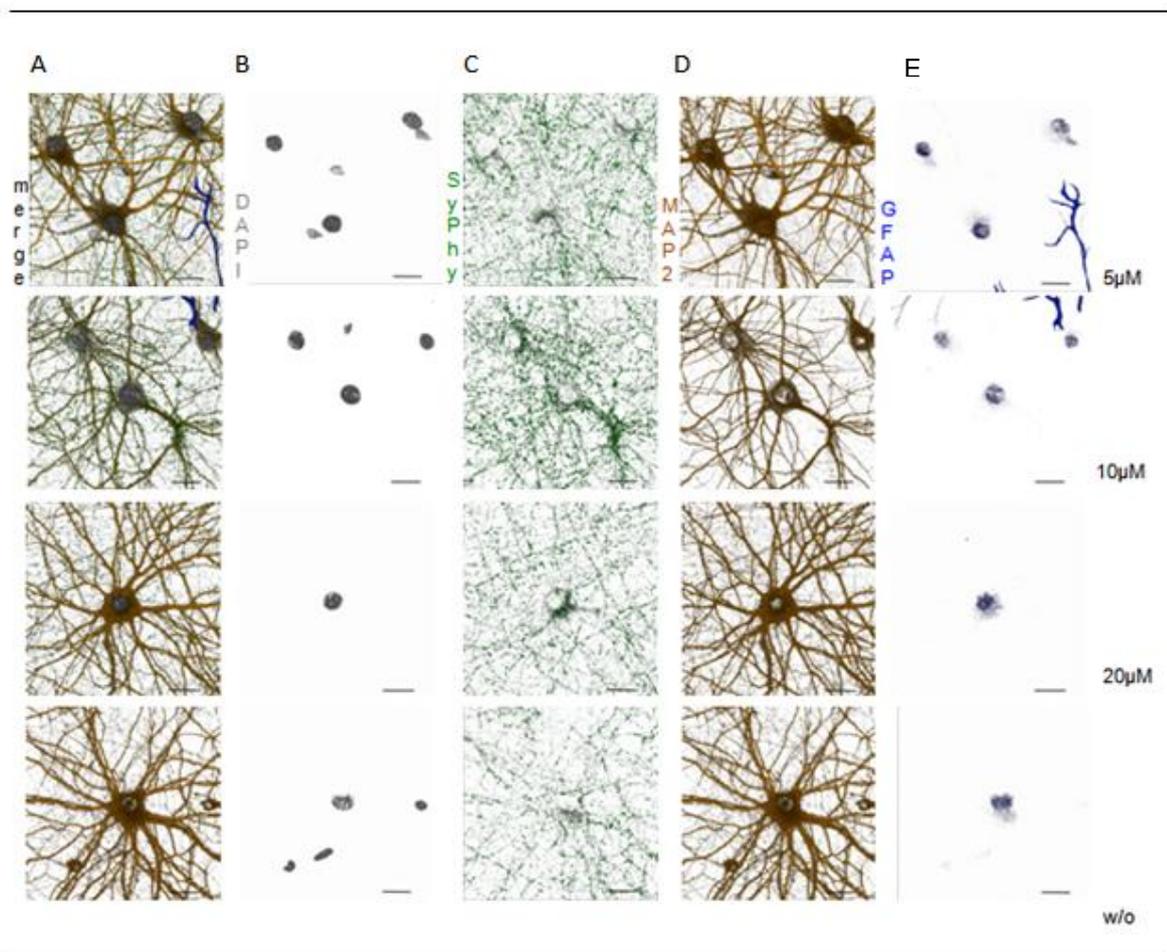


Abbildung 7: Vergleich DIV 14 Neuronen unter basalen Kondition und der Behandlung von A484954; Maßstab: 20 µm (A) Vereinigung der Bilder von Spalte B, C, D und E, (B) Kernfärbung durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI, (C) durch anti-Synaptophysin angefärbte synaptische Vesikel, (D) allgemeine Färbung der Neuronenstruktur mit MAP2, (E) Anfärbung von Astroglia mit Hilfe von GFAP (n = 2)

Ergebnisse

Bei den 14 Tage alten Neuronen und der Behandlung mit A484954 ist keine Veränderung der Morphologie zu erkennen. Es ist keine Zu- oder Abnahme an synaptischen Vesikeln sichtbar.

DAPI interkaliert in DNA, welche sich in den Zellkernen der Neuronen oder auch in den Astroglia befindet, zu sehen in Spalte B. Astroglia wurden mit GFAP gefärbt und zeigen eine typische Varianz in ihrer Erscheinungsform.

In Abbildung 8 wiederum sind die Ergebnisse der DIV 60 Neuronen zu denselben Konditionen wie in Abbildung 7 zu sehen. Hier sind deutlichere Unterschiede in den Neuronenkulturen zu erkennen. Vor allem die Färbung von Synaptophysin (Spalte C) zeigt dies. Hierbei hat sich, nach Zugabe von dem eEF-2-Kinase Inhibitor A484954, die Anzahl der synaptischen Vesikel scheinbar erhöht. Morphologisch gesehen sind kaum Veränderungen aufgetreten. Die einzig markante Veränderung ist bei der MAP2-Färbung bei der Behandlung mit 20 μM A484954 zu beobachten (Spalte D, Reihe 3). Bei dieser Kondition haben die Neuronen, im Vergleich zu den anderen Bildern in Spalte D, weniger Dendriten ausgebildet und haben eher eine lineare Erscheinungsform.

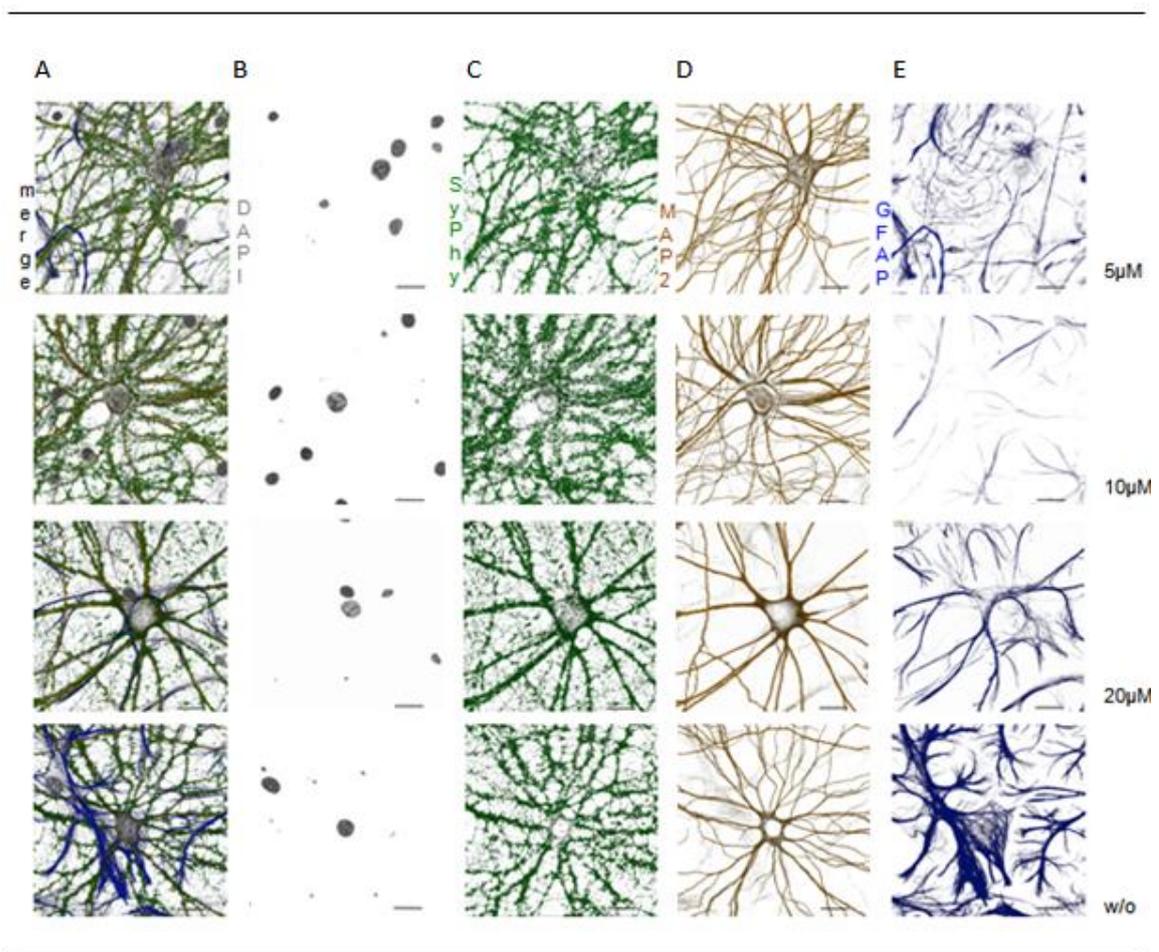


Abbildung 8: Vergleich DIV 60 Neuronen unter basalen Kondition und der Behandlung von A484954; Maßstab: 20 μm (A) Vereinigung der Bilder von Spalte B, C, D und E, (B) Kernfärbung durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI, (C) durch anti-Synaptophysin angefärbte synaptische Vesikel, (D) allgemeine Färbung der Neuronenstruktur mit MAP2, (E) Anfärbung von Astroglia mit Hilfe von GFAP (n = 2)

5.1.2 Pharmakologische Behandlung: Antioxidationsmittel DMF

Sowohl bei den DIV 14 als auch bei den DIV 60 Neuronen kam es zu keinen wesentlichen Veränderungen der Morphologie (siehe Abbildung 9 und 10). Es konnten ebenfalls keine Unterschiede im Vergleich zu den unbehandelten Zellen festgestellt werden.

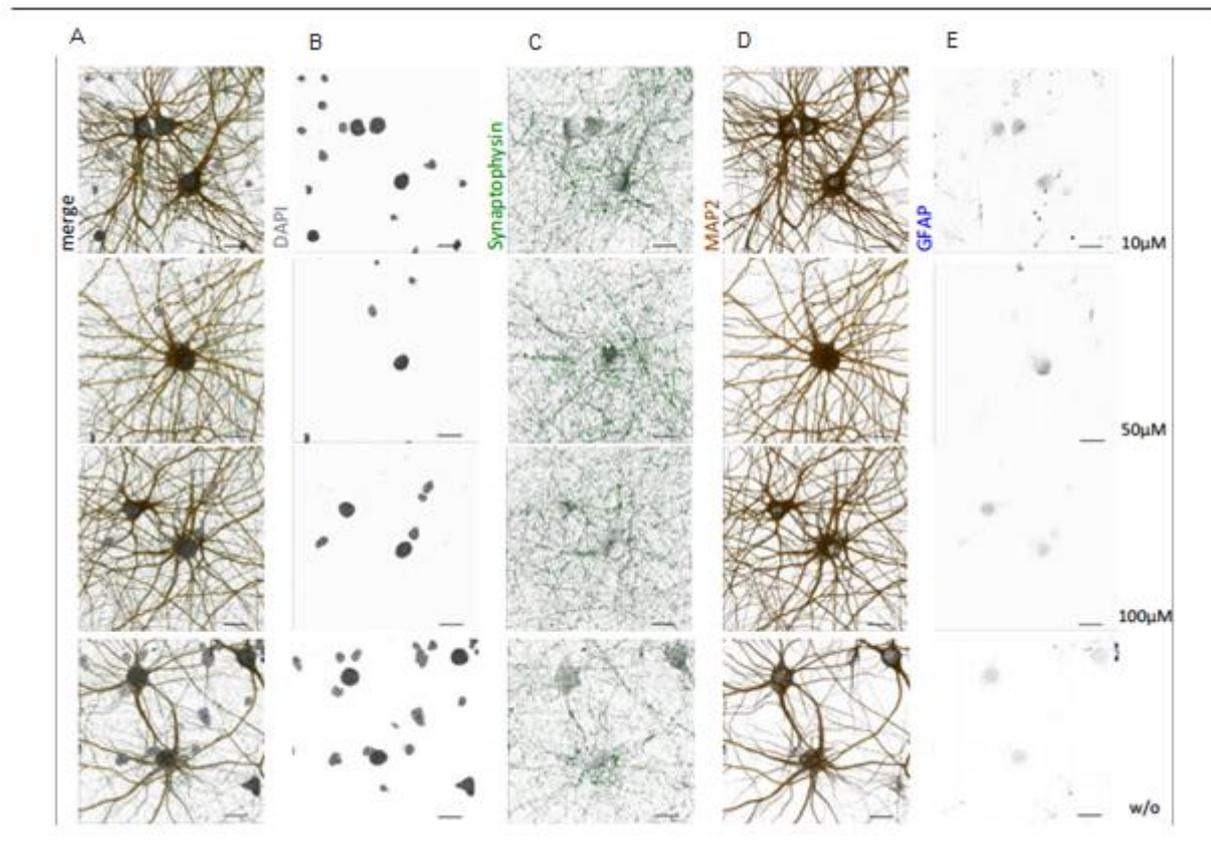


Abbildung 9: Vergleich DIV 14 Neuronen unter basalen Kondition und der Behandlung von DMF; Maßstab: 20 µm (A) Vereinigung der Bilder von Spalte B, C, D und E, (B) Kernfärbung durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI, (C) durch anti-Synaptophysin angefärbte synaptische Vesikel (D) allgemeine Neuronen-Färbung, (E) Glia-Färbung (n = 2)

Bei den Astroglia ist allerdings eine scheinbare Abnahme und eine leichte morphologische Veränderung bei den DIV 60 Neuronen zu verzeichnen (siehe Abbildung 10). In Spalte B ist die Kernfärbung mit DAPI dargestellt, die sowohl in den Neuronen als auch in den Glia-Zellen erfolgte. Bei der Färbung kam es ebenfalls zu keinen signifikanten Änderungen.

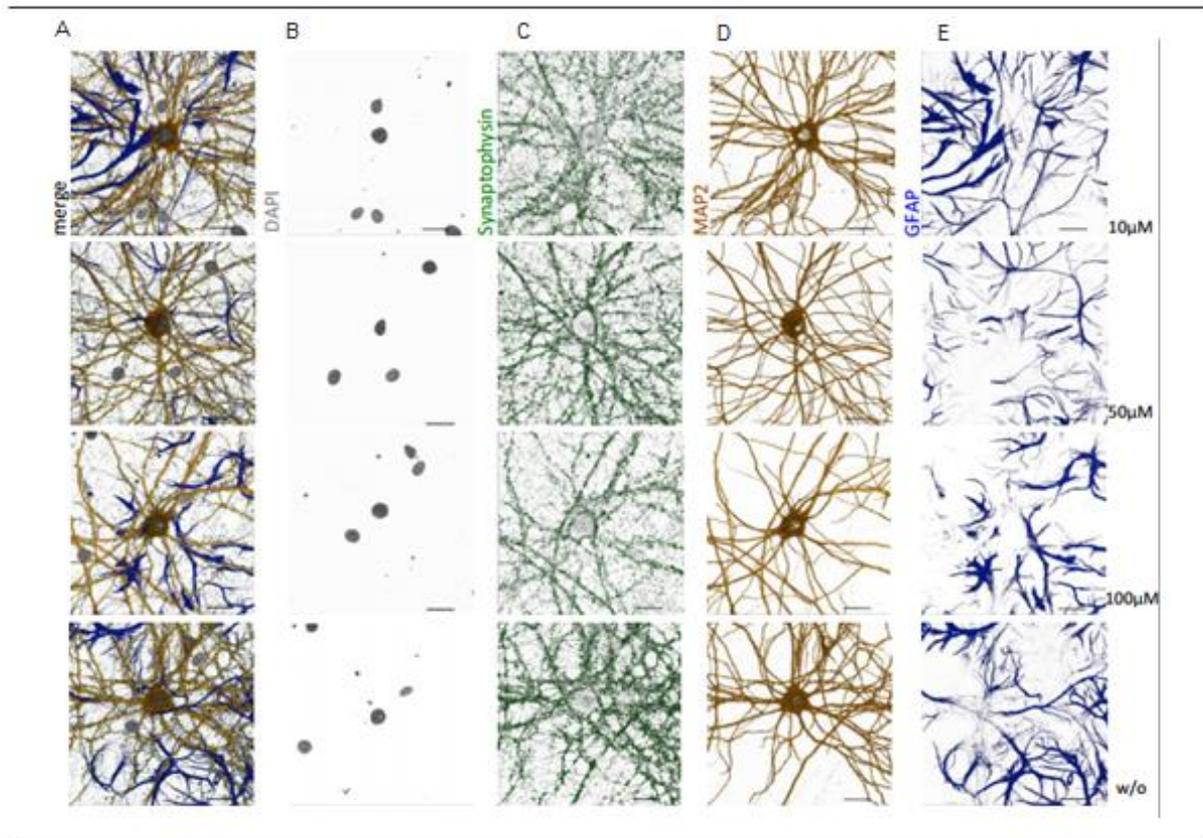


Abbildung 10: Vergleich DIV 60 Neuronen unter basalen Kondition und der Behandlung von DMF; Maßstab: 20 µm (A) Vereinigung der Bilder von Spalte B, C, D und E, (B) Kernfärbung durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI, (C) durch anti-Synaptophysin angefärbte synaptische Vesikel, (D) allgemeine Neuronen-Färbung, (E) Glia-Färbung (n = 2)

5.1.3 Pharmakologische Behandlung: NMDA-Rezeptor Antagonist Memantine hydrochlorid

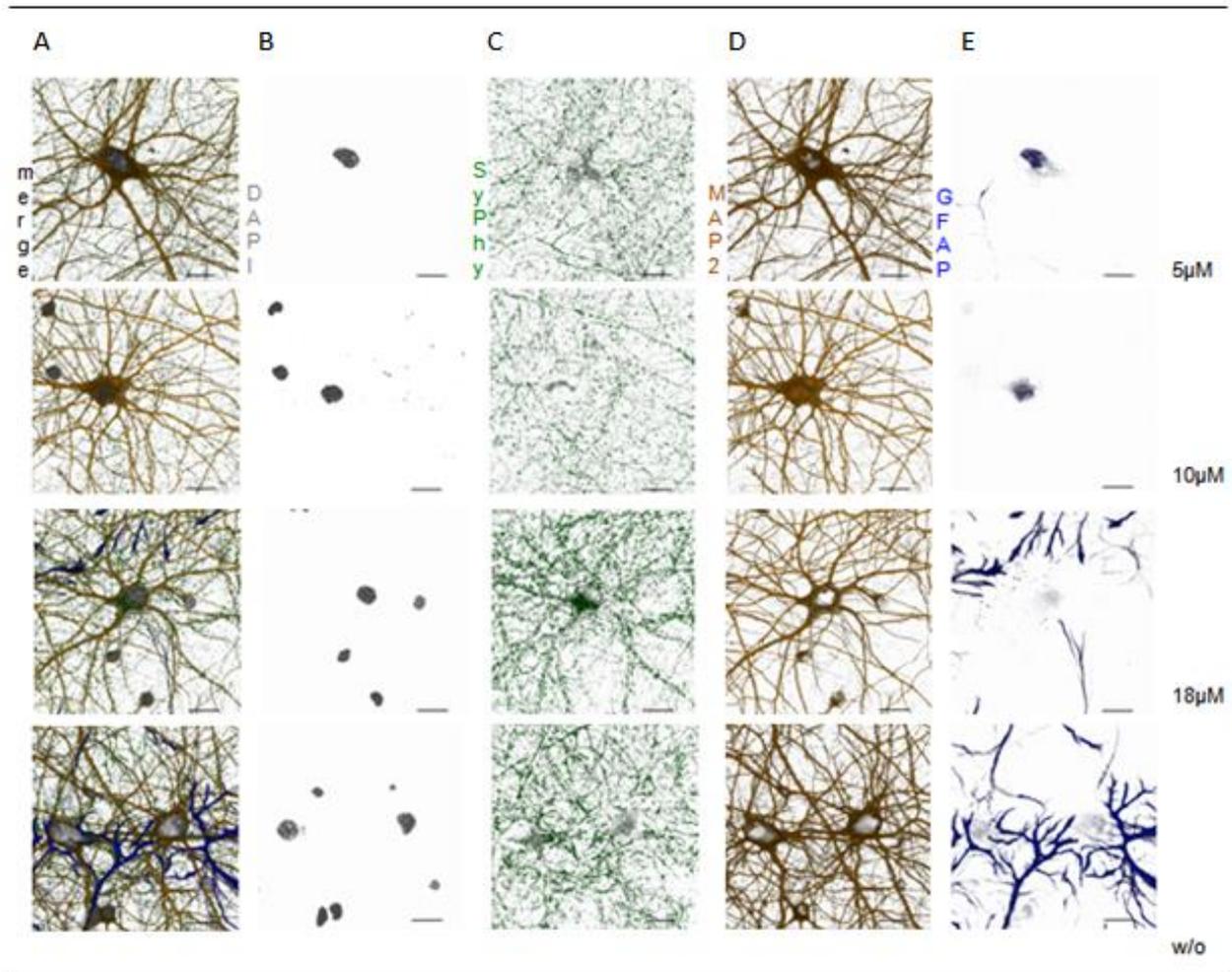


Abbildung 11: Vergleich DIV 14 Neuronen unter basalen Kondition und der Behandlung von Memantine hydrochloride; Maßstab: 20 µm (A) Vereinigung der Bilder von Spalte B, C, D und E, (B) Kernfärbung durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI, (C) durch anti-Synaptophysin angefärbte synaptische Vesikel, (D) allgemeine Neuronfärbung mit MAP2, (E) Anfärbung von Astroglia mit Hilfe von GFAP (n = 2)

Abbildungen 11 und 12 zeigen die Ergebnisse für Memantine hydrochlorid. Dabei wurden basal konditionierte primär Kulturen sowohl bei DIV 14 als auch bei DIV 60 mit Memantine hydrochlorid stimulierten Kulturen miteinander verglichen. Die 14tägige *in vitro* kultivierten Neuronen zeigen, wie auch bei den A484954 behandelten Neuronen, keine Anzeichen einer Wirkung von Memantine hydrochlorid. Wird die Synaptophysin-Färbung betrachtet, ist zwar ein verstärktes Signal vorhanden, vor allem bei der Behandlung mit 18 µM Memantine hydrochlorid, hierbei muss jedoch die allgemeine Zellumgebung berücksichtigt werden.

Die in Abbildung 12 gezeigten DIV 60 Neuronen haben wieder mehr Dendriten und Verknüpfungen, im Vergleich zu den DIV 14 Neuronen, gebildet.

Morphologisch gibt es jedoch keine wesentlichen Veränderungen nach der Behandlung von Memantine hydrochlorid.

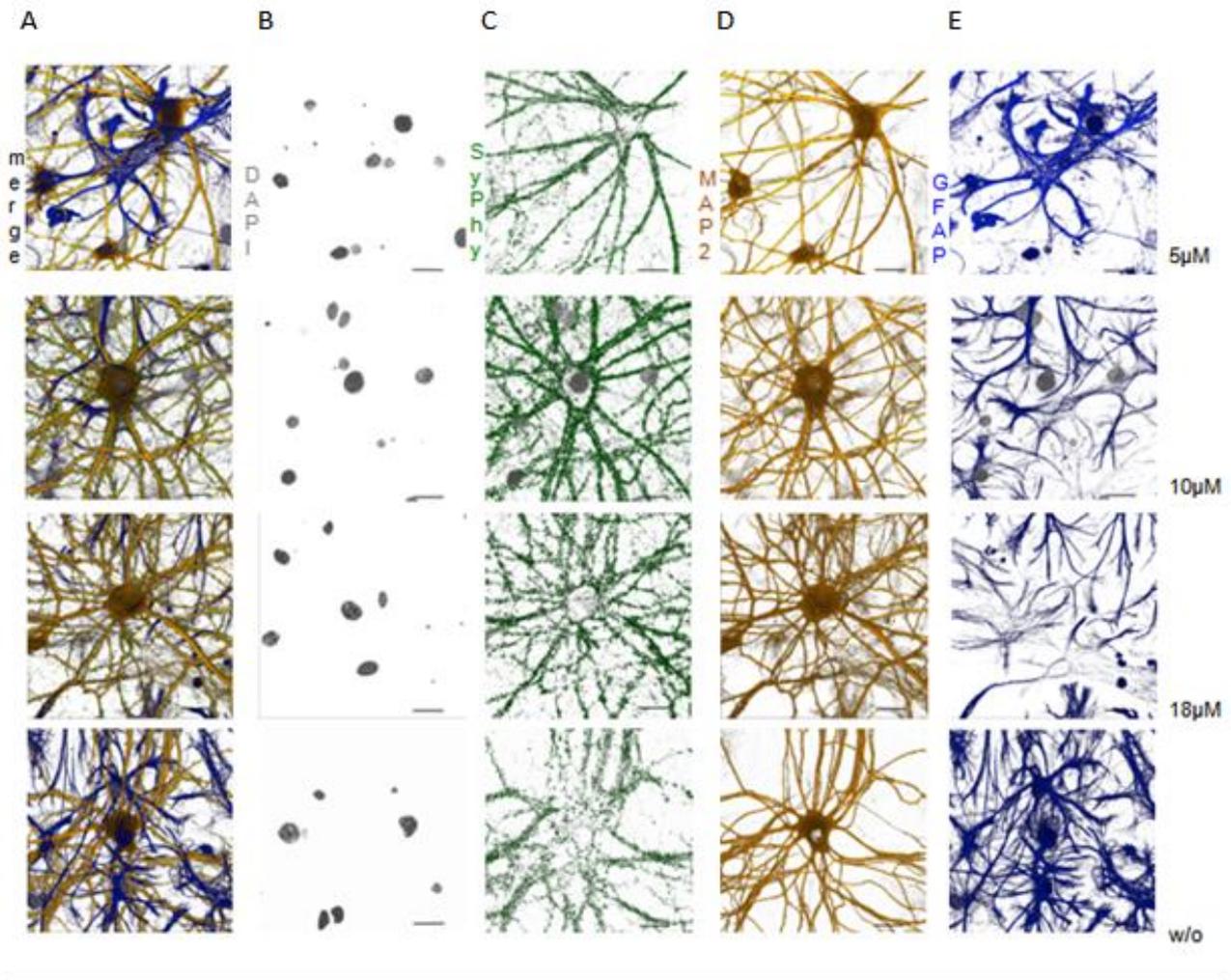


Abbildung 12: Vergleich DIV 60 Neuronen unter basalen Kondition und der Behandlung von Memantin hydrochloride; Maßstab: 20 µm (A) Vereinigung der Bilder von Spalte B, C, D und E, (B) Kernfärbung durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI, (C) durch anti-Synaptophysin angefärbte synaptische Vesikel, (D) allgemeine Neuronfärbung mit MAP2, (E) Anfärbung von Astroglia mit Hilfe von GFAP (n = 2)

Generell ist zu erkennen, dass sich bei DIV 60 bei allen experimentellen Konditionen ein dichteres zelluläres Netzwerk gebildet hat. Hierbei kam es auch zu einer Vermehrung von Gliazellen.

5.1.4 Pharmakologische Behandlung NMDA-Rezeptor Antagonist ZD 9379

Nach der Behandlung mit dem NMDA-Rezeptor Antagonist ZD 9379 kam es sowohl bei den 14 Tage alten als auch bei den 60 Tage alten Neuronen zu keiner Veränderung. Morphologisch gesehen gibt es keine signifikanten Änderungen zwischen den behandelten und unbehandelten Neuronen. Des Weiteren kam es zu keiner Zu- oder Abnahme der synaptischen Vesikel.

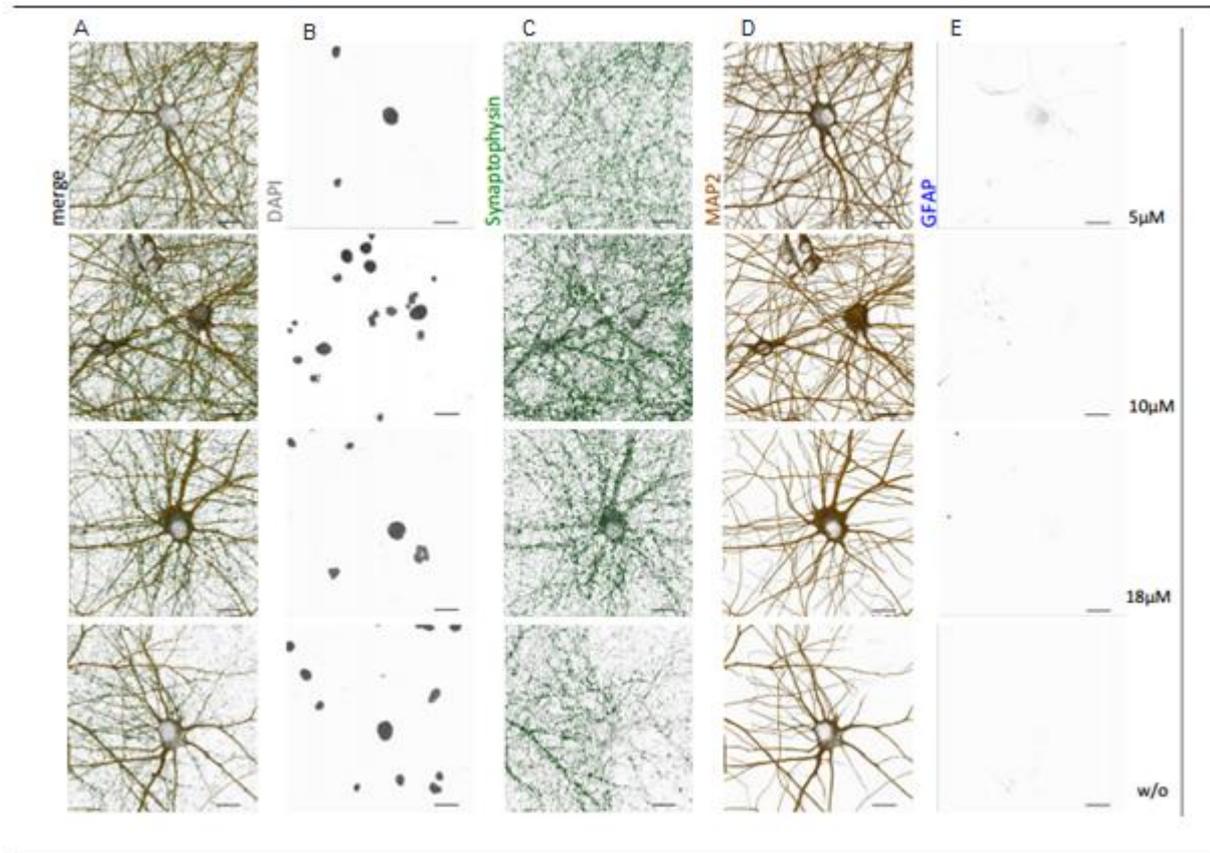


Abbildung 13: Vergleich DIV 14 Neuronen unter basalen Kondition und der Behandlung von ZD 9379; Maßstab: 20 µm (A) Vereinigung der Bilder von Spalte B, C, D und E, (B) Kernfärbung durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI, (C) durch anti-Synaptophysin angefärbte synaptische Vesikel, (D) allgemeine Neuronfärbung mit MAP2, (E) Anfärbung von Astroglia mit Hilfe von GFAP (n = 2)

Die wesentlichste Veränderung ist jedoch in der Abbildung 14, Spalte E, bei den DIV 60 Neuronenkulturen zu erkennen. Hier ist eine deutliche, morphologische Veränderung der Glia-Zellen zu sehen. Im Vergleich zu den Abbildungen 8, 10 und 12 sind die Glia-Zellen nach der Behandlung stark beschädigt worden. Die stereotypische Gestalt der Glia-Zellen bildete sich nicht aus (siehe Abbildung 14, Spalte E).

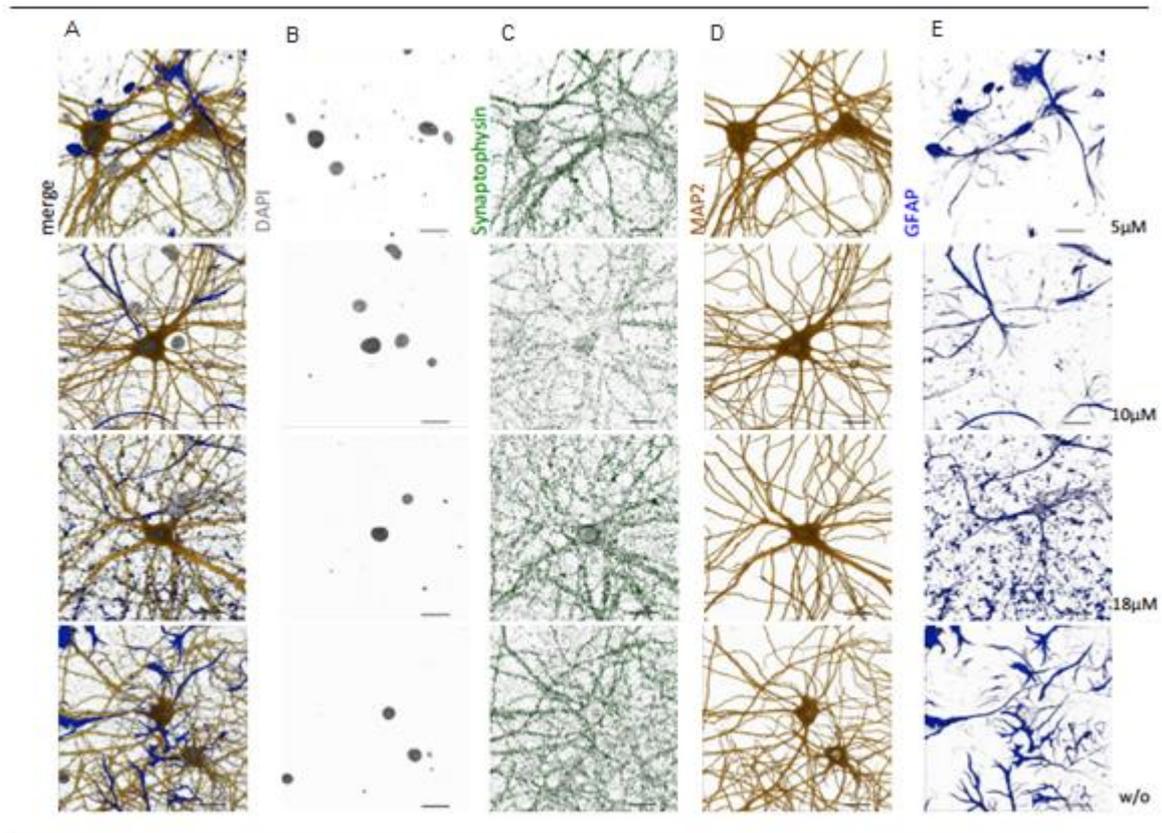


Abbildung 14: Vergleich DIV 60 Neuronen unter basalen Kondition und der Behandlung von ZD 9379; Maßstab: 20 μm (A) Vereinigung der Bilder von Spalte B, C, D und E, (B) Kernfärbung durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI, (C) durch anti-Synaptophysin angefärbte synaptische Vesikel, (D) allgemeine Neuronenfärbung mit MAP2, (E) Anfärbung von Astroglia mit Hilfe von GFAP (n = 2)

5.2 FUNCAT-Signale

5.2.1 *De novo* Proteinsynthese – DIV 21 Neurone

Bei der *de novo* Proteinsynthese der 21 Tage alten Neuronen gab es keine Auffälligkeiten. Die mit Spermidin und A484954 behandelten Neuronen zeigen keine Unterschiede zu den unbehandelten Neuronen auf. Weder im TAMRA-Signal (Rot) noch im SyPhy-Signal (Grün) unterscheiden sich die Aufnahmen (siehe Abbildung 15 und 16).

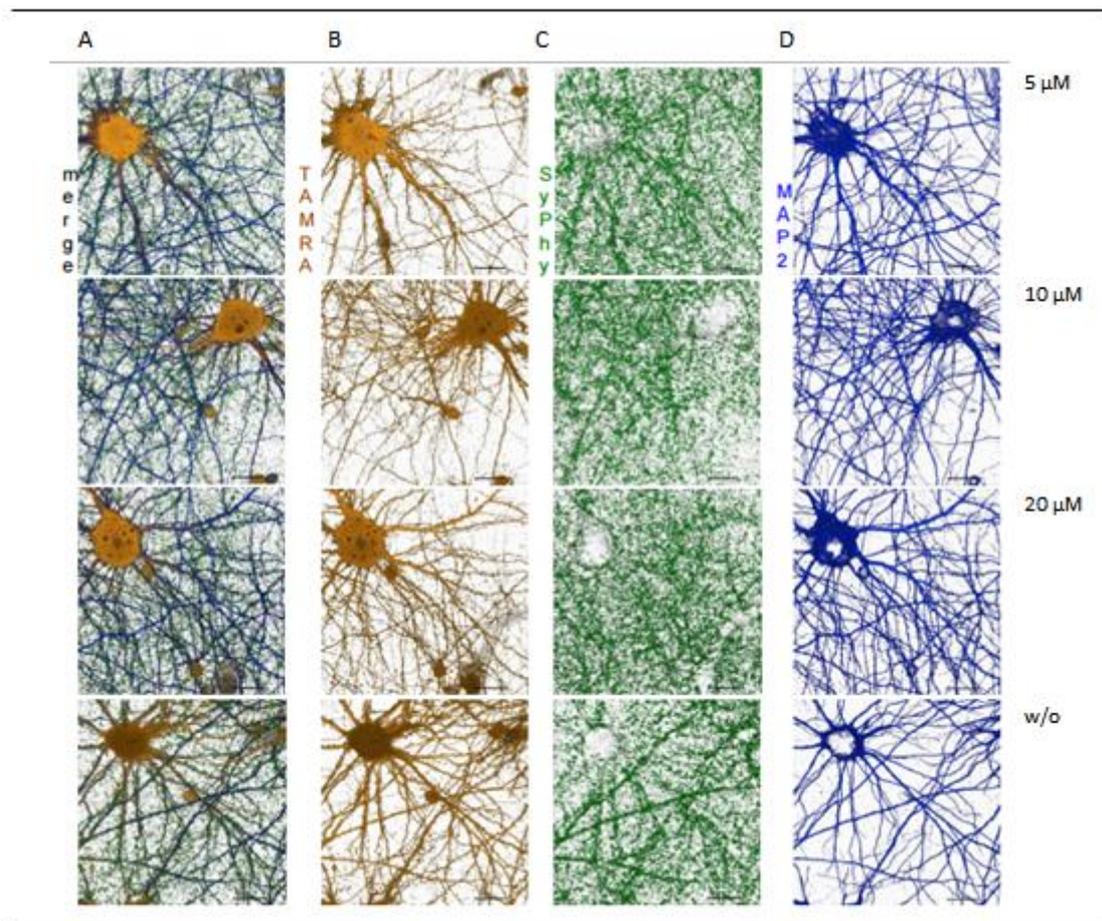


Abbildung 15: Ergebnisse der FUNCAT-Methode für A484954 5µM, 10 µM, 20 µM und ohne Behandlung von A484954 21 Tage alten Neuronen; Maßstab: 20 µm (A) Vereinigung der Ergebnisse von TAMRA, SyPhy und MAP2, (B) Darstellung der *de novo* Proteinsynthese mit dem, am AHA gekoppelten, PEG-TAMRA-Tag, (C) Anzeige der durch anti-Synaptophysin angefärbten synaptischen Vesikel, (D) Färbung der gesamten Neuronen durch MAP2 (n = 2)

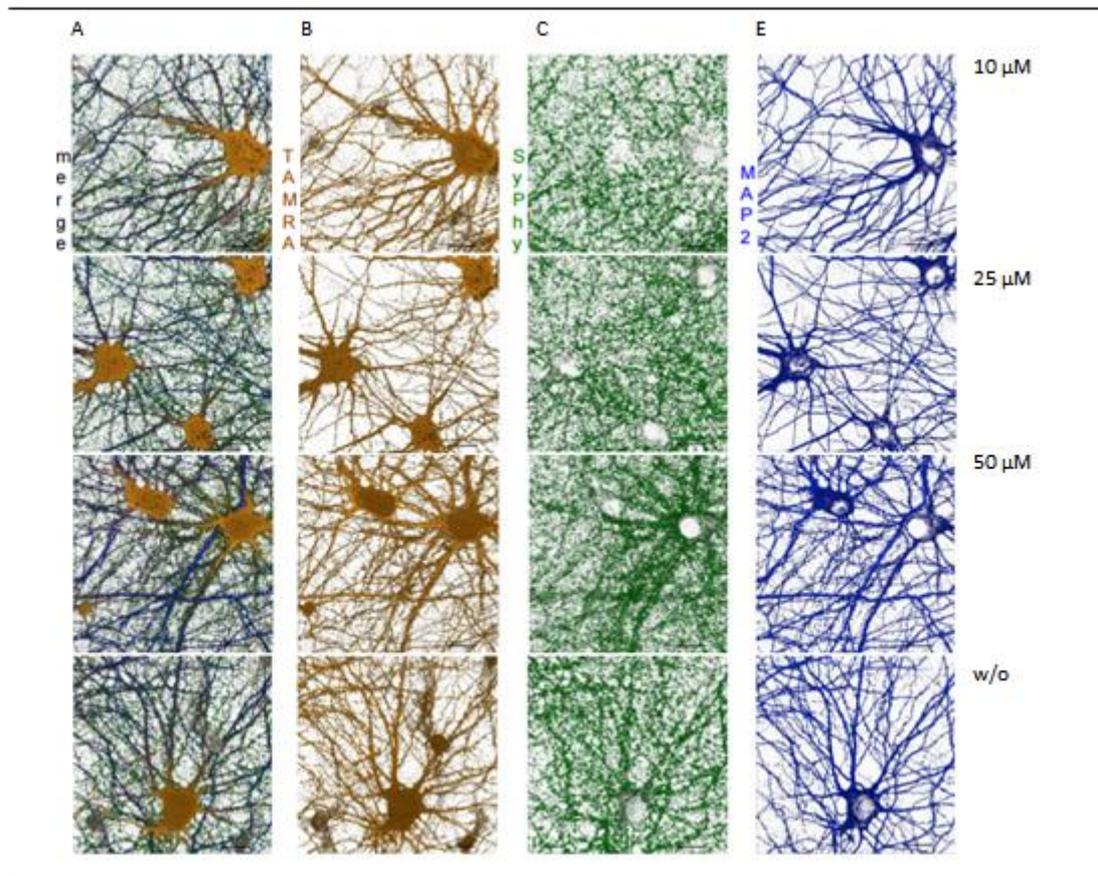


Abbildung 16: Ergebnisse der FUNCAT-Methode für Spermidin 10µM, 20 µM, 50 µM und ohne Behandlung von Spermidin 21 Tage alten Neuronen; Maßstab: 20 µm (A) Vereinigung der Ergebnisse von TAMRA, SyPhy und MAP2, (B) Darstellung der *de novo* Proteinsynthese mit dem, am AHA gekoppelten, PEG-TAMRA-Tag, (C) Anzeige der durch anti-Synaptophysin angefärbten synaptischen Vesikel, (D) Färbung der gesamten Neuronen durch MAP2 (n = 2)

Die durch den TAMRA-Tag markierten *de novo* synthetisierten Proteine, sind bei den unbehandelten und behandelten Neuronen, in den dendritischen Spines vorhanden. Hierbei ist die Dosis der Behandlung nicht ausschlaggebend (siehe Abbildung 17 und 18).

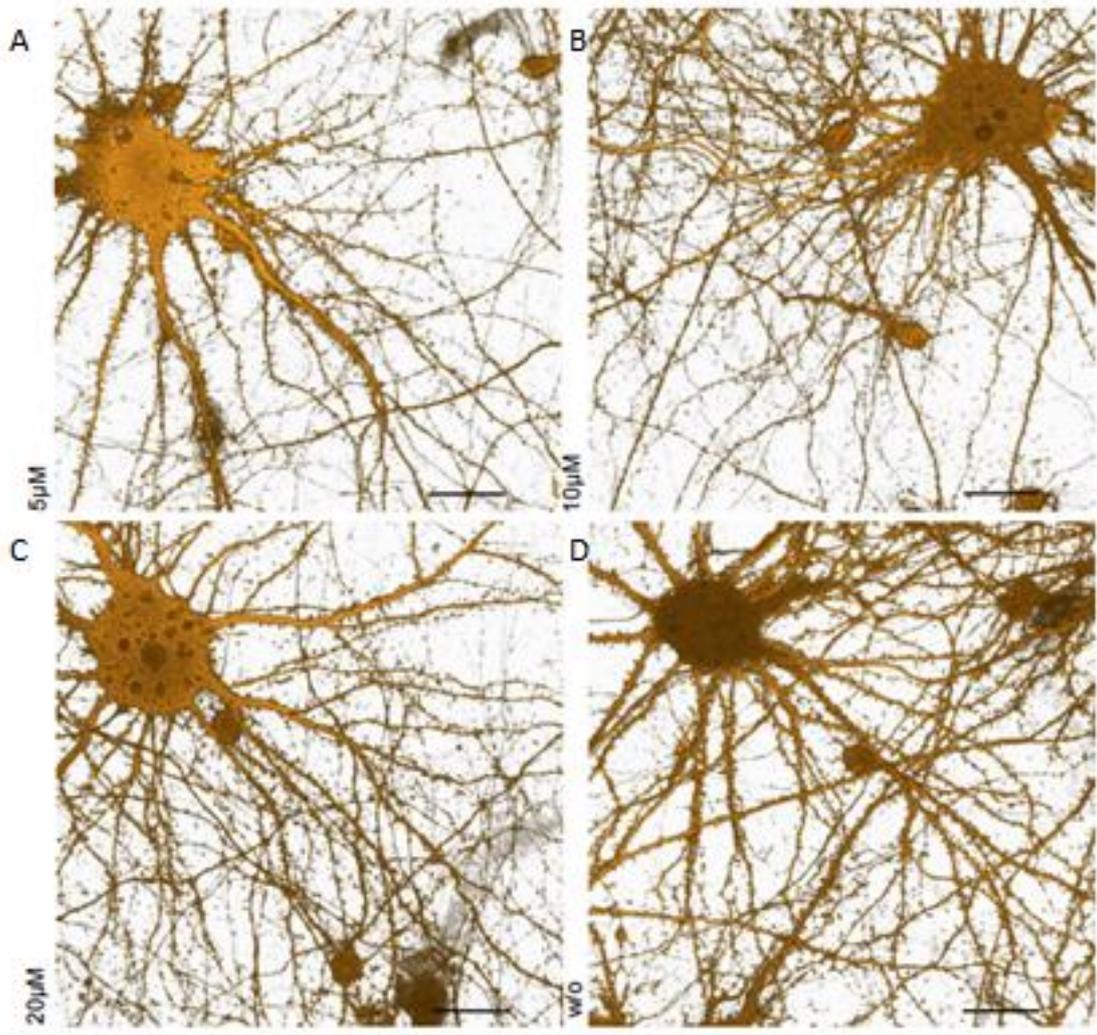


Abbildung 17: Vergrößerung der *de novo* Proteinsynthese der DIV 21 Neuronen, die mit A484954 behandelt wurden; Maßstab: 20 μm (A) A484954 - Konzentration von 5 μM, (B) Spermidin- Konzentration von 10 μM, (C) A484954 - Konzentration von 25 μM, (D) *de novo* Proteinsynthese bei unbehandelten Neuronen (n = 2)

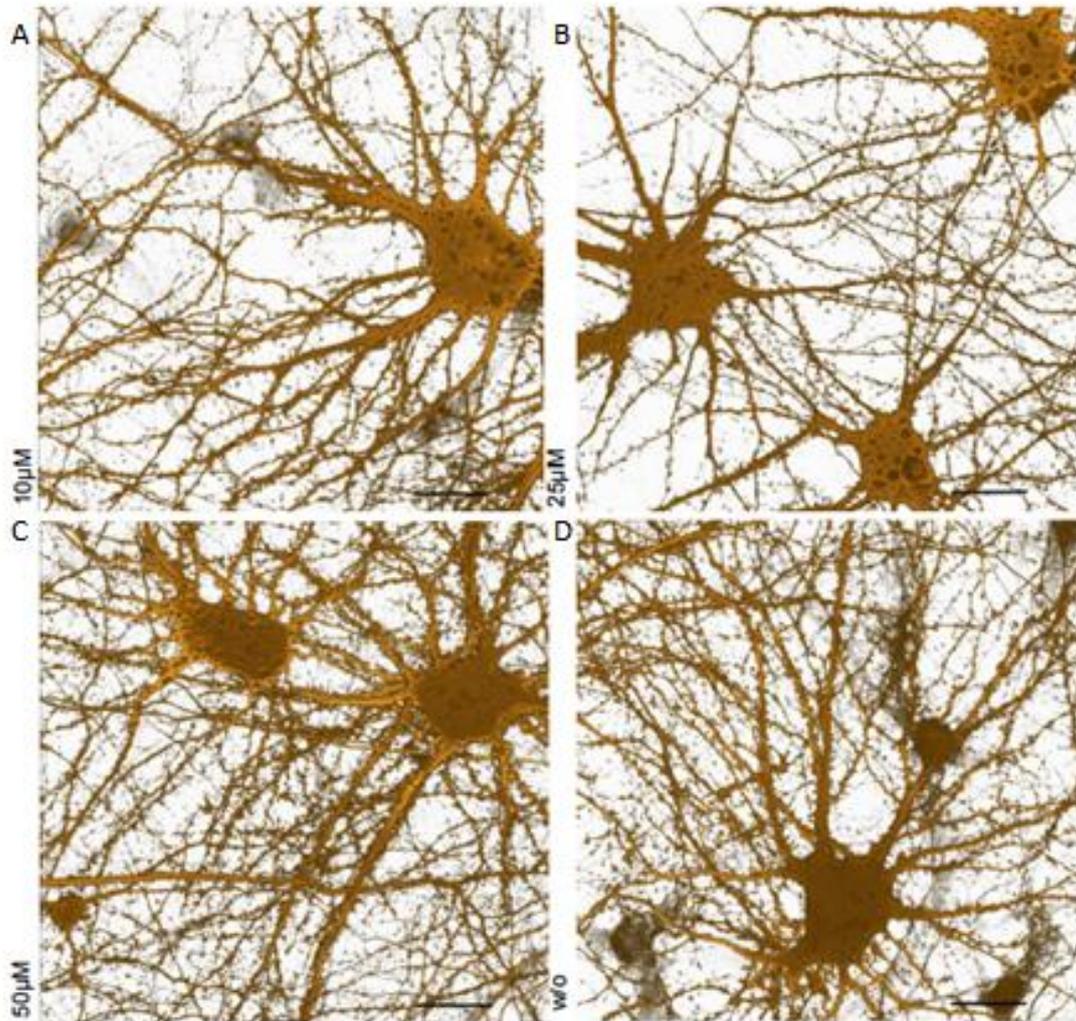


Abbildung 18: Vergrößerung der *de novo* Proteinsynthese der DIV 21 Neuronen, die mit Spermidin behandelt wurden; Maßstab: 20 µm (A) Spermidin - Konzentration von 10 µM, (B) Spermidin- Konzentration von 20 µM, (C) Spermidin - Konzentration von 50 µM, (D) *de novo* Proteinsynthese bei un- behandelten Neuronen (n = 2)

In der Abbildung 19 ist eine vergrößerte Darstellung der fortlaufenden Dendriten aufgezeigt. In dieser Abbildung ist deutlich zu sehen, dass sich das TAMRA-Signal in den fortlaufenden Dendriten und der dazugehörigen Anzahl der dendritischen Spines nur gering unterscheidet. Diese Aussage wird durch das SyPhy-Signal bekräftigt. Weiterhin ist zu erkennen, dass die funktionellen dendritischen Spines nach der Stimulation mit A484954 und Spermidin bis zu 10 % zugenommen haben.

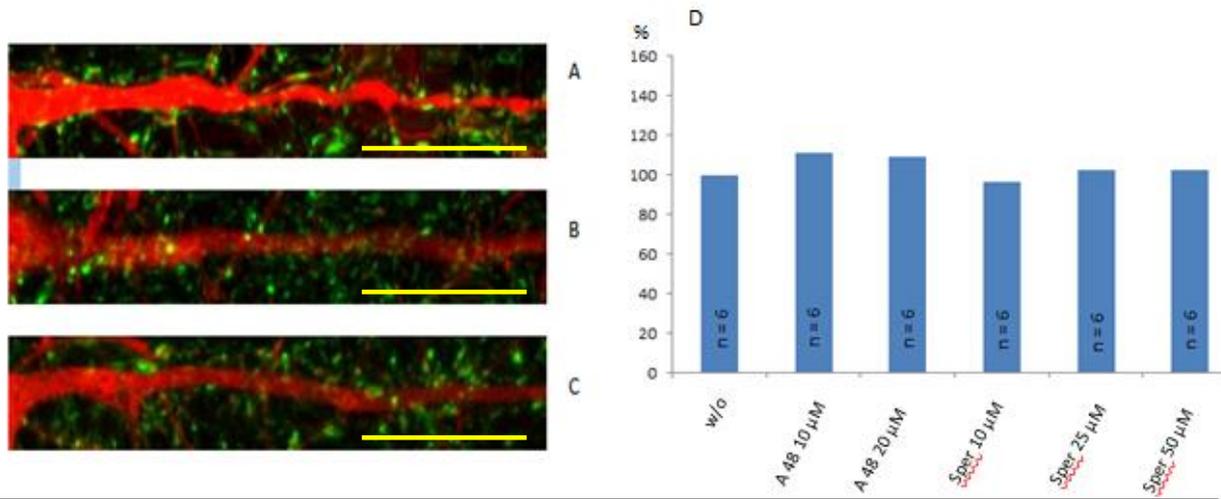


Abbildung 19: *De novo* Proteinsynthese in den Dendriten und Spines der DIV 21 Neuronen und Anfärbung der synaptischen Vesikel durch anti-Synaptophysin, Maßstab: 20 μm (A) unbehandelte Neuronen (B) 20 μM A484954-Behandlung, (C) Dendrite der, mit 25 μM Spermidin behandelten, Neuronen (n = 2), (D) prozentuale Entwicklung der funktionellen dendritischen Spines

5.2.2 *De novo* Proteinsynthese – DIV 60 Neurone

In Abbildung 20 und 21 sind die Ergebnisse für die Auswirkungen von A484954 und Spermidin auf die *de novo* Proteinsynthese in zwei Übersichten dargestellt.

Dabei ist aufgelistet, unter welchen Konditionen die Neuronen behandelt wurden.

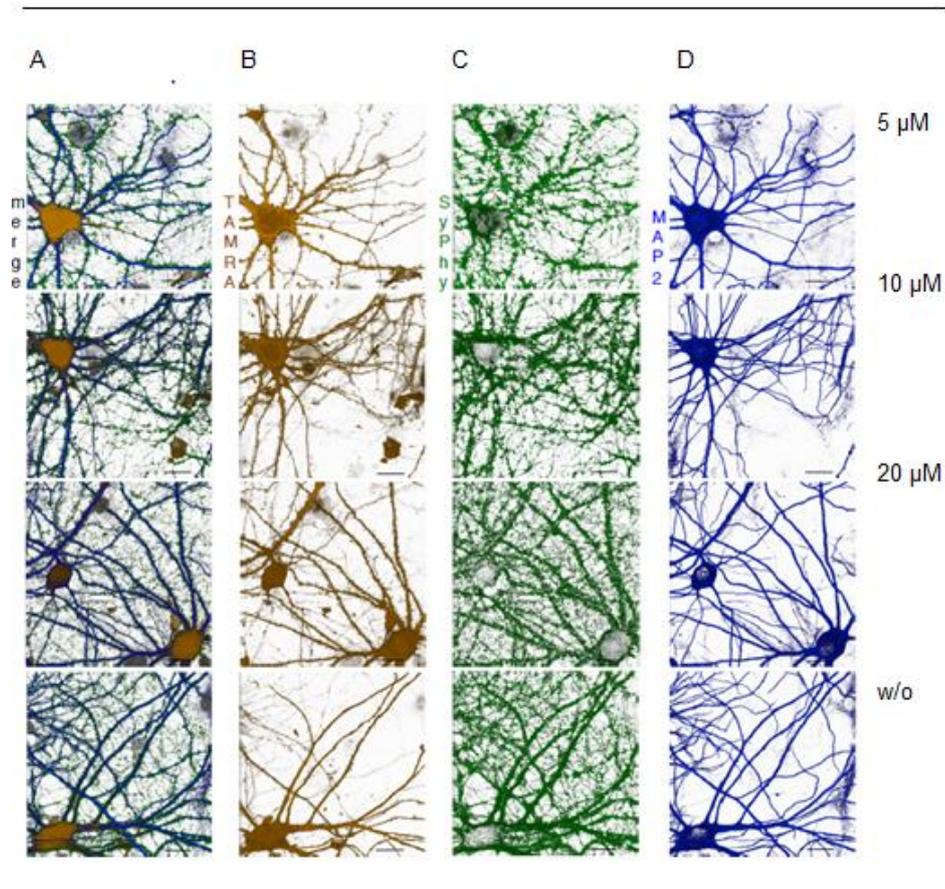


Abbildung 20: Ergebnisse der FUNCAT-Methode für A484954 5µM, 10 µM, 20 µM und ohne Behandlung von A484954 60 Tage alten Neuronen; Maßstab: 20 µm (A) Vereinigung der Ergebnisse von TAMRA, SyPhy und MAP2, (B) Darstellung der *de novo* Proteinsynthese mit dem, am AHA gekoppelten, PEG-TAMRA-Tag, (C) Anzeige der durch anti-Synaptophysin angefärbten synaptischen Vesikel, (D) Färbung der gesamten Neuronen durch MAP2 (n = 2)

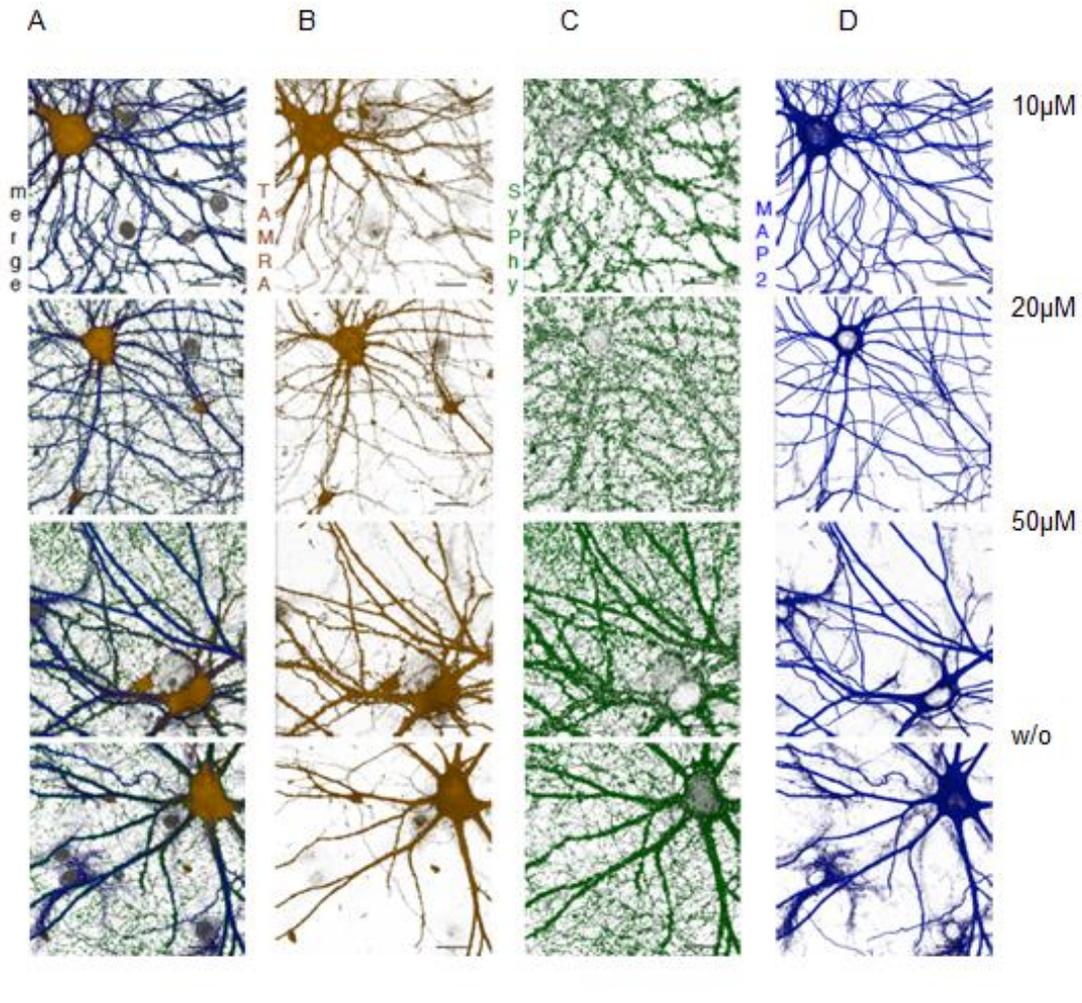


Abbildung 21: Ergebnisse der FUNCAT-Methode für Spermidin 10µM, 20 µM, 50 µM und ohne Behandlung von Spermidin 60 Tage alten Neuronen; Maßstab: 20 µm (A) Vereinigung der Ergebnisse von TAMRA, SyPhy und MAP2, (B) Darstellung der *de novo* Proteinsynthese mit dem, am AHA gekoppelten, PEG-TAMRA-Tag, (C) Anzeige der durch anti-Synaptophysin angefärbten synaptischen Vesikel, (D) Färbung der gesamten Neurone durch MAP2 (n = 2)

In Spalte A sind die die einzelnen Bilder von Spalte B, C und D vereinigt. Spalte B stellt die *de novo* Proteinsynthese durch PEG-TAMRA-Tag dar, dabei wird die Proteinsynthese nicht nur nahe des Nucleus im Perikaryon dargestellt, sondern auch in den Axonen, Dendriten und in den Spines. Die Bilder in Spalte C zeigen die mit anti-Synaptophysin angefärbten synaptischen Vesikel und in Spalte D wurde die Neuronenstruktur mit MAP2 angefärbt. Unterschied sind bei der *de novo* Proteinsynthese im Bereich der Dendrite zu vermerken

Ergebnisse

In Abbildung 22 und 23 ist die *de novo* Proteinsynthese, die durch den PEG-TAMRA-Tag aufgezeigt wird, noch einmal deutlicher dargestellt.

Hier ist zu erkennen, dass das TAMRA- Signal in den dendritischen Spines mit Zunahme der Konzentration beider Wirkstoffe, also sowohl von A 484954 als auch von Spermidin, deutlich zunimmt. So ist bei unbehandelten Zellen keine Protein-Neusynthese in den Spines zu sehen, da in diesen Spines das entsprechende TAMRA-Signal fehlt. Allerdings sind; selbst bei der geringsten Konzentration beider Wirkstoffe *de novo* Proteine in diesen Spines mit Hilfe des TAMRA-Signals erkennbar.

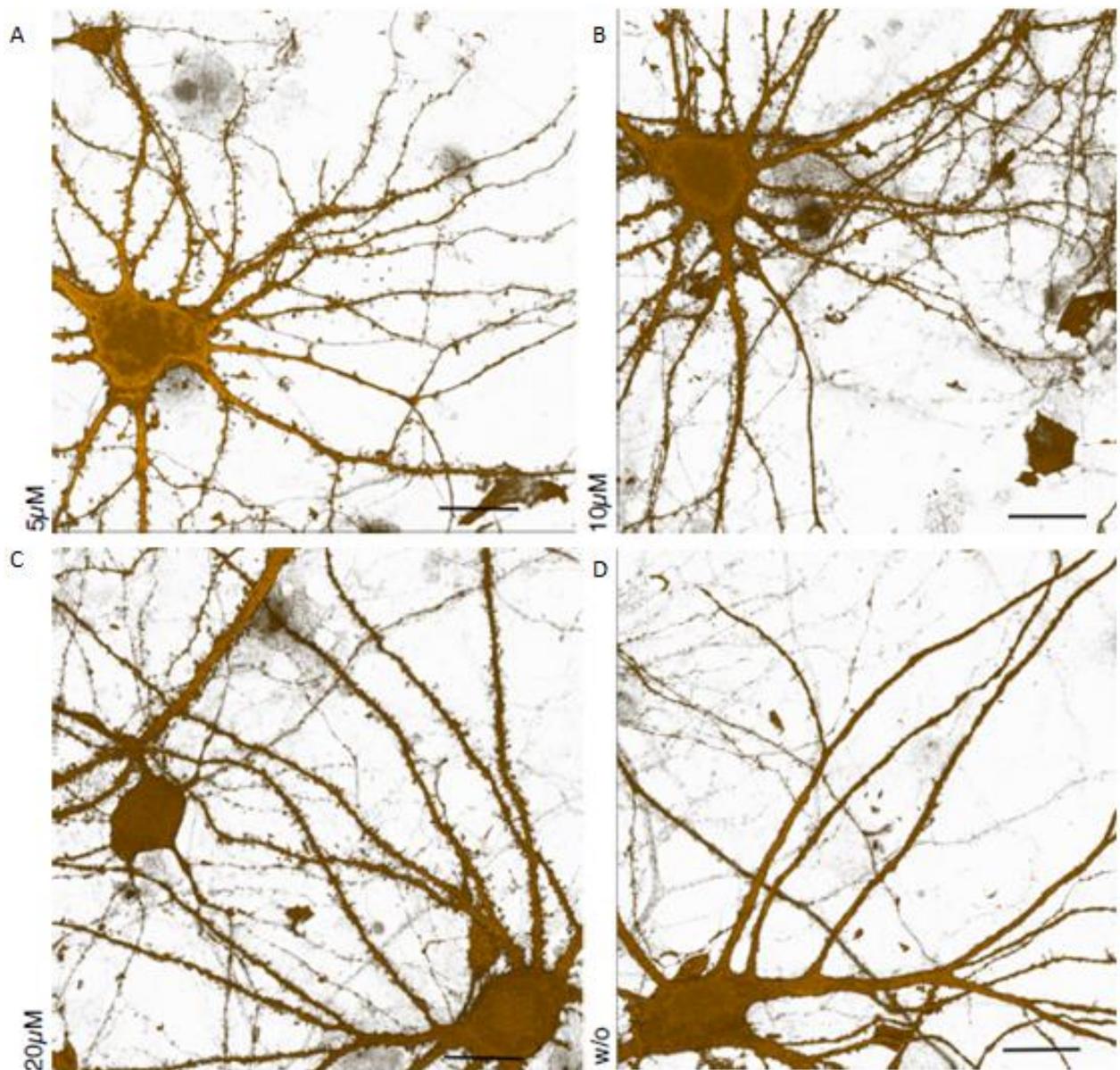


Abbildung 22: Vergrößerung der *de novo* Proteinsynthese der DIV 60 Neuronen, die mit A484954 behandelt wurden; Maßstab: 20 µm (A) A484954 - Konzentration von 5 µM (B) Spermidin- Konzentration von 10 µM (C) A484954 - Konzentration von 25 µM (D) *de novo* Proteinsynthese bei unbehandelten Neuronen (n = 2)

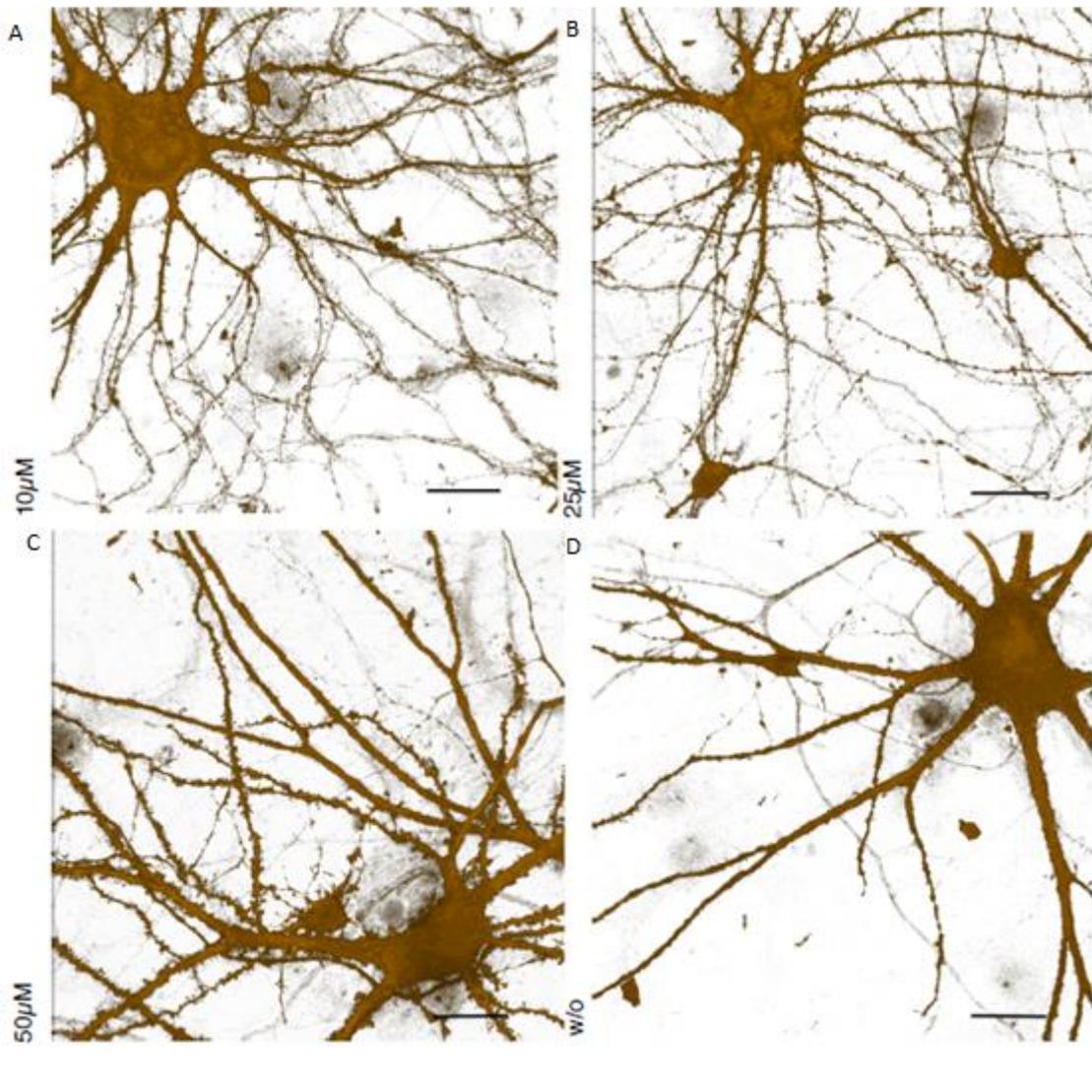


Abbildung 23: Vergrößerung der *de novo* Proteinsynthese der DIV 60 Neuronen, die mit Spermidin behandelt wurden; Maßstab: 20 μm (A) Spermidin - Konzentration von 10 μM , (B) Spermidin- Konzentration von 20 μM , (C) Spermidin - Konzentration von 50 μM , (D) *de novo* Proteinsynthese bei unbehandelten Neuronen (n = 2)

Abbildung 24 zeigt die Vereinigung des TAMRA-Tag-Signals und des Synaptophysin-Signals. Hier wird die prozentuale Steigerung der funktionellen dendritischen Spines deutlich. Weiterhin ist zu erkennen, dass die funktionellen dendritischen Spines nach der Stimulation mit A484954 und Spermidin bis zu 20 % zugenommen haben.

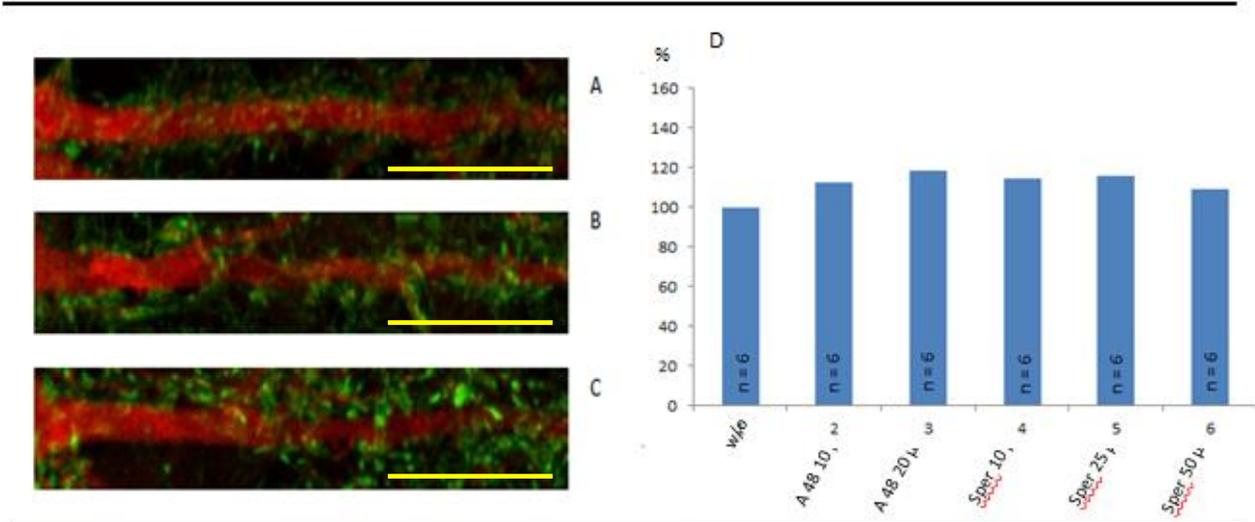


Abbildung 24: *De novo* Proteinsynthese in den Dendriten und Spines der DIV 60 Neurone und Anfärbung der synaptischen Vesikel durch anti-Synaptophysin, Maßstab: 20 µm (A) unbehandelte Neuronen, (B) 20 µM A484954-Behandlung, (C) Dendrite der, mit 25 µM Spermidin behandelten, Neuronen (n = 2), (D) prozentuale Entwicklung der funktionellen dendritischen Spines

5.3 Western- & Immunoblot

Die Abbildung 25 zeigt die Detektion derjenigen Proteine, die dem eEF2-Signalweg zugehörig sind. Dabei sind die jungen (DIV 21) und alten (DIV 60) Proben der primären kortikalen Neuronen, für jede einzelne Behandlung nebeneinander aufgelistet. Der Elongationsfaktor eEF2 und die eEF2-Kinase mit dem korrelierenden Phospho-Partner besitzen eine Größe von 100 kDa. Die Proteine S6K1 und pS6K1 sind 70 kDa groß.

Hierbei ist zu erkennen, dass es keine Abweichungen zwischen behandelten und unbehandelten Neuronen gibt. Liegen bei den unbehandelten Neuronen die entsprechenden Proteine im Alter vermindernd vor, so ist dies auch bei den alten, behandelten Neuronen der Fall. Das Gleiche gilt auch für die Proteine die im Alter bei den unbehandelten Neuronen vermehrt vorliegen. Nach der Behandlung, mit den entsprechenden Wirkstoffen, kam es zu keiner Verminderung der Proteine im Alter. Die einzige Auffälligkeit war bei der Behandlung mit 20 μM A484954 im Bereich des Proteins S6K1 zu erkennen. Dieses Signal scheint darauf hin zu deuten, dass S6K1 durch den eEF2-Kinase Inhibitor im Alter reguliert werden könnte.

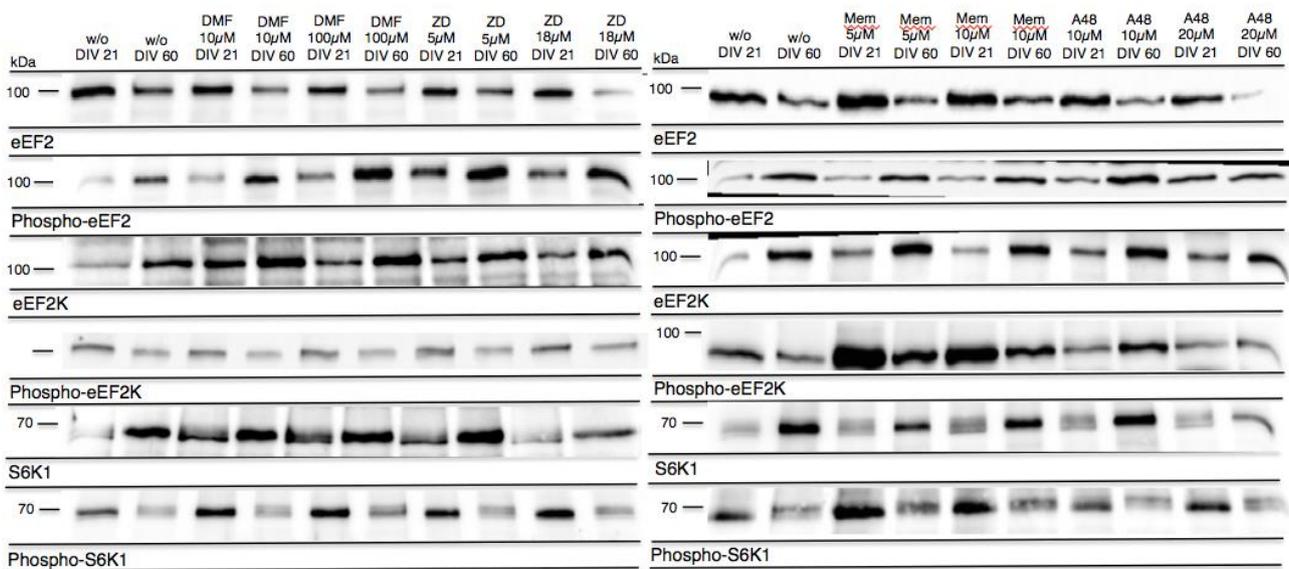


Abbildung 25: Detektion der Proteine im eEF2-Pathway, Vergleich sowohl zwischen unbehandelten jungen (DIV 21) und alten (DIV 60) Proben der primären kortikalen Neuronen als auch pharmakologisch behandelten jungen (DIV 21) und alten (DIV 60) Proben der primären kortikalen Neuronen

5.4 BONCAT-Signale

In Abbildung 26 sind die, mit dem Biotin-Tag gelabelten, *de novo* synthetisierten Proteine dargestellt. Dabei ist zu sehen, dass in den jungen DIV 30 Neuronenkulturen die Proteinsynthese im Vergleich zu den älteren DIV 60 Neuronenkulturen wesentlich höher ist. Dieser Effekt ist vor allem bei den unbehandelten Neuronen deutlich. Nach der pharmakologischen Behandlung wurde die Proteinsynthese im Alter kaum beeinflusst. Die 5 μ M Memantine hydrochlorid Behandlung zeigt jedoch eine leicht höhere *de novo* Proteinsynthese im Alter auf. Werden die anderen Behandlungen betrachtet, so ist zu erkennen, dass die älteren Proben der primären Neuronenkulturen eine geringere Proteinsynthese aufweisen.

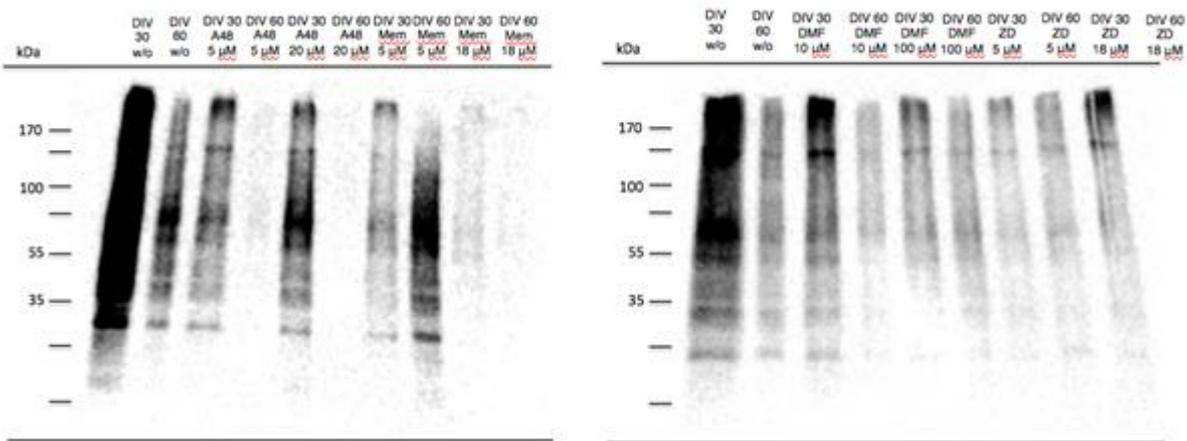


Abbildung 26: Biotin-Signal der *de novo* synthetisierten Proteine von den primären kortikalen Neuronenkulturen aus Kulturflaschen (n=2), Vergleich zwischen unbehandelten und pharmakologisch behandelten Proben der primären kortikalen Neuronen (DIV 30 und DIV 60)

6 Diskussion

6.1 Morphologische Veränderungen nach pharmakologischen Behandlung

Jede pharmakologische Behandlung, die bei den jungen Neuronenkulturen für diese Arbeit durchgeführt wurde, brachte keine Veränderung der untersuchten Parameter hervor. Weder ergaben sich morphologische Veränderungen bei den Neuronen oder Astrogliazellen noch in der Anzahl der ausgebildeten synaptischen Vesikel. Dies ist passend zum theoretischen Hintergrund des Projektes und somit ein positives Ergebnis.

Die eingesetzten Wirkstoffe hatten jedoch spezifische Effekte auf die gealterten DIV 60 Neuronenkulturen. Die Ergebnisse der eEF2-Kinase Inhibitor: A484954-Behandlung zeigte eine morphologische Veränderung auf. Nachdem die Neuronenkulturen mit 20 μM A484954 stimuliert wurden, bildeten sich die Dendriten linear und starr aus. Diese Ausbildung ist untypisch, liegt allerdings noch nicht im neurotoxischen Bereich, weshalb die Arbeit mit 20 μM A484954 weitergeführt werden konnte.

Nach der Behandlung mit Memantine hydrochlorid kam es zu keinen morphologischen Veränderung der Neuronen. Auch bei der Behandlung mit dem Antioxidationsmittel DMF und dem zweiten NMDA-Rezeptor-Antagonist ZD 9379 kam es zu keinen Veränderungen.

Diese Pharmaka hatten zwar keinen Einfluss auf die Morphologie der Neuronen, jedoch gab es nach der Behandlung, mit beiden Wirkstoffen, eine morphologische Veränderung der entstehenden Astrogliazellen. Die Glia-Zellen besitzen eine unterstützende Funktion für die Neuronen [Souza et al., 2015].

Des Weiteren besitzen die Glia-Zellen eine antioxidative Wirkung [Dringen 2005]. Aufgrund der ebenfalls antioxidantischen Wirkung von DMF fällt diese Wirkung der Glia-Zellen weg. Somit liegen die Glia-Zellen nach der DMF-Behandlung in den DIV 60 Neuronenkulturen scheinbar vermindert vor. Des Weiteren könnte DMF toxisch auf Glia-Zellen wirken. Damit wäre die leichte morphologische Veränderung selbiger begründet. Eine genaue Aussage kann diesbezüglich nicht getroffen werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

Der zweite NMDA-Rezeptor Antagonist ZD 9379 bewirkt ebenfalls eine morphologische Veränderung der Glia-Zellen. Bei den unbehandelten DIV 60 Neuronenkulturen besitzen die Glia-Zellen eine komplexe Morphologie. Nach weiterer Behandlung mit diesem NMDA-Rezeptor-Antagonist sind die Glia-Zellen stark angegriffen, was auf eine toxische Wirkung schließen lässt.

Allerdings wurden durch die Ergebnisse aus Kapitel 5.1 Immunofluoreszenz deutlich, dass mit den angewendeten Konzentrationen und den spezifischen Inkubationszeiten der Wirkstoffe, in einem nicht neurotoxischen Bereich gearbeitet werden kann.

6.2 *In situ* Proteinsynthese

Die Proteinsynthese Rate ist vor und nach der Behandlung mit Spermidin und dem eEF2-Kinase Inhibitor in den jungen DIV 21 Neuronen gleich bleibend. Somit erzeugten diese verwendeten Wirkstoffe keinen Effekt. Die Anzahl der funktionsfähigen dendritischen Spines unterscheidet sich prozentual bis zu 10 % und liegt somit im Rahmen.

Allerdings hatten die eingesetzten Wirkstoffe in der FUNCAT-Methode signifikante Effekte bei DIV 60 Neuronenkulturen. Im Bereich der Dendriten und der dendritischen Spines kam es sowohl zu einer erhöhten Anzahl von *de novo* synthetisierten Proteinen als auch zu einem erhöhten Synaptophysin-Signal (siehe Kapitel 5.2.2 *De novo* Proteinsynthese – DIV 60 Neuronenkulturen, Abbildung 20–24). Dabei erfolgte eine Zunahme von funktionstüchtigen dendritischen Spines um 10 – 18 %.

Die Zunahme der *de novo* Proteine in den Spines kann einen Einfluss auf das Wachstum und die Differenzierung der Dendriten haben. Dadurch sind die Neuronen in der Lage, das schon bestehende Netzwerk zu vergrößern. Auch die Signalübertragung durch die synaptischen Vesikel kann angeregt werden.

Spermidin weist eine Anti-Aging-Wirkung auf [Gupta et al, 2013], welche sich auch bei der Proteinsynthese der Neuronen widerspiegelt, es findet eine erhöhte Proteinsynthese statt.

Allerdings müssen die Signale in den Spines kein Anzeichen dafür sein, dass die *de novo* Proteinsynthese in den Dendriten einen Anstieg erfahren hat. Die globale Proteinsynthese kann durch Spermidin und A484954 zugenommen haben. Durch Transportprozesse können die frisch synthetisierten Proteine in die Spines gelangt sein.

Auch die vermehrte Ausbildung der synaptischen Vesikel muss nicht durch A484954 und Spermidin bedingt sein. Diese aufgenommenen Bilder sind Momentaufnahmen, weshalb die Signale von Zelle zu Zelle innerhalb derselben Kondition unterschiedlich sein können. Je nachdem wie viele Verbindungspartner eine Neurone besitzt, desto mehr Signale können von diesen Zellen übertragen und aufgenommen werden. Des Weiteren wurden für die Berechnung der prozentualen Steigerung jeweils 6 Dendriten pro Kondition benutzt. Deshalb sind die Ergebnisse noch nicht signifikant genug um eine klare Aussage treffen zu können. Aus diesem Grund sind die Ergebnisse aus Kapitel 5.2 FUNCAT-Signale nur Tendenzen, die durch weitere Experimente und statistische Auswertungen validiert werden müssten.

6.3 Einfluss der Wirkstoffe auf den eEF2-Signalweg und der globalen Proteinsynthese

Durch die Analyse mit dem Immunoblot wurde deutlich gezeigt, in wie weit der eEF2-Signalweg reguliert wird. Die eingesetzten Wirkstoffe zeigen keinerlei Wirkung auf die zu untersuchenden Proteine. Der eEF2 wird im Alter runter reguliert [Kimball et al., 1992], dies wird mit den Ergebnissen aus Kapitel 5.3 Western- & Immunoblot belegt. Der Vergleich zwischen jungen und alten unbehandelten Neuronenkulturen zeigt ein vermindertes eEF2 Signal. Dem entgegen, liegt der dazugehörige Phospho-Partner peEF2 im Alter vermehrt vor. Nach der jeweiligen Behandlung mit den bestimmten Wirkstoffen kam es zu keiner Veränderung dieses Statements. Der Elongationsfaktor eEF2 wird im Alter nach jeder pharmakologischen Behandlung runter reguliert bzw. liegt vermindert in seiner aktiven, nicht phosphorylierten Form vor.

Dieser Effekt ist ebenfalls bei den anderen Proteinen im eEF2-Signalweg sichtbar. Liegen die Proteine bei den unbehandelten Neuronenkulturen im Alter vermindert vor, so ist dies auch nach der Stimulation durch die Wirkstoffe der Fall. Liegen bei den alten, unbehandelten Neuronen die Proteine vermehrt vor, so bleiben diese, auch nach der Behandlung mit den Wirkstoffen vermehrt. Die einzige Ausnahme jedoch ist das Proteine S6K1, ersichtlich in den Ergebnissen aus Kapitel 5.3 Western- & Immunoblot. Nach der eEF2-Kinase-Inhibitor Behandlung von 20 μM ist zu erkennen, dass dieses Protein im Alter vermindert vorliegt. Der Grund hierfür könnte sein, dass bei der Signalaufnahme mit dem Licor-System, das verwendete ECL nicht gleichmäßig aufgetragen wurde. Deshalb könnte es sein, dass das ECL bei diesem linearisierten Protein nicht vollständig wirken konnte. Alternativ könnte eine funktionelle Regulation vorliegen, die durch Wiederholung der Experimente bestätigt werden könnte.

Der eEF2-Signalweg ist ein wichtiger Teil in der Proteinbiosynthese. Da der eukaryotische Elongationsfaktor 2, in seiner aktiven Form vermehrt in den jungen Zellen vorliegt, werden in diesem Altersstadium Proteine vermehrt neu synthetisiert [Heise et al., 2014]. Belegt werden kann dies durch die BONCAT-Ergebnisse in Kapitel 5.4 BONCAT-Signale. Im Alter wiederum liegt eEF2 vermindert in der aktiven Form vor, weshalb die Proteinsynthese abnimmt. Nach der pharmakologischen Behandlung mit den aufgelisteten Wirkstoffen, konnten keine wesentlichen Veränderungen in der globalen Proteinsynthese festgestellt werden. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Proteinbiosynthese im Alter, also bei den DIV 60 Neuronenkulturen, weiterhin abgenommen hat. Bei der Memantine hydrochlorid-Behandlung scheint jedoch eine leichte Zunahme der Proteinsynthese vorhanden zu sein. Das an AHA gebundene Biotin-Tag-Signal an den *de novo* synthetisierten Proteinen ist bei der 5 μM Behandlung der alten DIV 60 Neuronenkulturen höher als bei den jungen Neuronenkulturen.

Diskussion

Darüber, in wie weit die Proteinsynthese abgenommen hat können jedoch keine quantitativen Aussagen getroffen werden. Die Ergebnisse aus Kapitel 5.4 BONCAT-Signale zeigen nur eine Tendenz.

Die fehlenden Banden in Abbildung 24 sind aufgrund des schwachen Signals zu erklären.

7 Fazit

Mittels der Immunocytochemie konnte dargestellt werden, dass mit den angegebenen Konzentrationen und den Inkubationszeiten der Wirkstoffe im nicht neurotoxischen Bereich gearbeitet werden kann. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die eingesetzten Wirkstoffe einen gewissen Effekt auf die Neuronenkulturen ausüben. So werden beispielsweise, durch das körpereigene Polyamin, Spermidin und dem eEF2-Kinase-Inhibitor A484954 in DIV 60 Neuronenkulturen vermehrt funktionsfähige dendritische Spines erzeugt. Dies war bei zwei unabhängigen Experimenten der Fall, die Ergebnisse sind jedoch vorerst nur Tendenzen.

Außerdem konnte mittels Westernblot gezeigt werden, in wie weit die Proteine des eEF2-Signalweges im Alter reguliert werden. Ebenfalls konnte die Aussage, dass die generelle Proteinbiosynthese im Alter abnimmt, mittels der BONCAT-Methode bekräftigt werden. Der Zusammenhang zwischen dem eEF2-Signalweg und der Proteinbiosynthese wurde ebenfalls deutlich. Die eingesetzten Wirkstoffe hatten allerdings nicht den gewünschten Effekt. Ein Eingriff auf den eEF2-Signalweg erfolgte nicht. Die angegebenen Wirkungen dieser Pharmaka, können jedoch nicht entkräftet werden, da in dieser Arbeit eigens definierte und festgesetzte Konzentrationen und Inkubationszeiten angewendet wurden.

8 Ausblick

Um eine bessere, quantitative Aussage für die Zunahme der funktionsfähigen dendritischen Spines treffen zu können, müssen die Experimente noch mindestens einmal wiederholt werden. Dabei sollten bei der Aufnahme mit dem Mikroskop für jede Kondition mehrere Bilder aufgenommen werden. Somit könnten die aufgezeigten Tendenzen bestätigt und die Verfälschung der Ergebnisse ausgeschlossen werden. Des Weiteren muss eine Quantifizierung der „geklickten“ Proteinproben erfolgen. Dies geschieht mittels der „Dot-Plot“- Methode und ermöglicht eine bessere Aussage über die Ab- und Zunahme der neu synthetisierten Proteine in den primären kortikalen Neuronenkulturen.

Weiterhin muss die Frage geklärt werden ob die *de novo* synthetisierten *in situ* oder global entstanden sind. Durch ein Puromycin-Assay kann diese Frage beantwortet werden. Puromycin ist ein Antibiotikum, welches einerseits eine verfrühte Termination einleitet kann, sich andererseits aber auch in die entstehende Peptidkette einlagert. Aufgrund dessen, dass bei dem Puromycin-Assay das Antibiotikum eine Minute inkubiert und eine anschließende Fixierung erfolgt, könnten die *de novo* synthetisierten Proteine an ihrem Entstehungsort sichtbar gemacht werden. Dies wird durch den Antikörper anti-Puromycin ermöglicht.

Weiterhin könnten die Wirkstoffe Memantine hydrochlorid, DMF, ZD 9379 für die FUNCAT-Methode benutzt werden, Spermidin hingegen kann für biochemische Methoden verwendet werden. Vor allem für die BONCAT-Methode wäre dies interessant, um den Einfluss von Spermidin auf die Proteinbiosynthese genauer untersuchen zu können.

Außerdem konnte keine Aussage über den Einfluss der Wirkstoffe auf die kognitiven Prozesse getroffen werden. Hierbei wären Experimente an Modelorganismen wie zum Beispiel *Drosophila melanogaster* denkbar. Die eingesetzten Wirkstoffe könnten den Tieren dazu gefüttert und im Anschluss daran, könnten Effekte im Kurz- und Langzeit Gedächtnis getestet werden.

9 Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Frau Prof. Dr. Daniela. C. Dieterich, Leiterin des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie. Ich danke ihr dafür, dass ich mein Praxismodul in diesem Institut absolvieren durfte und sie mir die Mittel für die Arbeiten zur Verfügung gestellt hat. Sie hat mir während meines Praktikums einen Hilfswissenschaftler-Vertrag ermöglicht.

Ein großer Dank geht an Prof. Dr. Röbbke Wünschiers, er hat mir den Kontakt zu Prof. Dr. Daniela Dieterich vermittelt und konnte meine Fragen immer beantworten.

Des Weiteren möchte ich Julia Abele für ihre super freundliche, ruhige und sehr kompetente Betreuung danken. Sie hat mich durch ihre kompetente, menschliche Art und ihr Fachwissen sehr bereichert.

Frau Dr. Anke Müller danke ich für die Tipps und Anregungen, die sie mir während der Arbeit geben konnte.

Herrn Dr. Peter Landgraf danke ich für die interessanten und inspirierenden Gespräche die ich mit ihm führen durfte.

Evelyn Dankert und Grit Borkhardt möchte ich dafür danken, dass sie sich um die Kultivierung der Primärkulturen gekümmert haben.

Auf diesem Weg danke ich besonders Evelyn Danke für die amüsanten Gespräche die wir hatten.

Allgemein danke ich der ganzen Arbeitsgruppe für die, um es einmal in der Jugendsprache einmal auszudrücken „coole Zeit“, die ich mit Euch im Institut hatte.

Zu guter Letzt, danke ich meiner Familie und an meinen Freunden die mich immer Unterstützt haben, egal welchen Weg ich eingeschlagen habe.

Literaturverzeichnis

Argüelles, S., Cano, M., Machado, A., and Ayala, A. (2011).

Effect of aging and oxidative stress on elongation factor-2 in hypothalamus and hypophysis.

Mech Ageing Dev, 132(1-2):55–64.

Banker & Goslin (1988) Developments in neuronal cell culture. Nature 336(6195):185-6

Chen, Gopalakrishnan, Bui, Soni, Warrior, Johnson, Donnelly, Glaser (2011) 1-Benzyl-3-cetyl-2-methylimidazolium iodide (NH125) induces phosphorylation of eukaryotic elongation factor-2 (eEF2): a cautionary note on the anticancer mechanism of an eEF2 kinase inhibitor. J.Biol.Chem. 2011; 286(51):43951-8

De Matos, Trufelli, de Matos & da Silva Pinhal (2010) Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice. Biomarker Insights 5:9-20

Deng, Aimone & Gage (2010) New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? Net Rev Neurosci 2010, 11(5):339-50

Dieterich, Link, Graumann, Tirrel & Schuman (2006) Selective identification of newly synthesized proteins in mammalian cells using bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT). Proc Natl Acad Sci U S A, 103(25):9482-7

Dringen (2005) Oxidative and Antioxidative Potential of Brain Microglial Cells. Antioxidants & Redox Siganling 2005(7): 1223-1233

Dieterich, Hodas, Gouzer, Shadrin, Ngo, Triller, Triller & Schuman (2010) *In situ* visualization and dynamics of newly synthesized proteins in rat hippocampal neurons. Nat Neurosci 13(7):897-905

Gal-Ben-Ari, Kenney, Ounalla-Saad, Taha, David, Levitan, Gildish, Panaj, Pai, Wibrand, Simpsons, Proud, Bramham, Armstrong & Rosenblum (2012) Consolidation and translation regulation. Learning and Memory 19:410-422

Gupta, Scheunemann, Eisenberg, Mertel, Bhukel, Koemans, Kramer, Liu, Schroeder, Stunnenberg, Sinner, Magnes, Pieber, Dipt, Fiala, Schenck, Schwaerzel, Madeo & Sigrist (2013)

Restoring polyamines protects from age-induced memory impairment in an autophagy dependent manner. *Nature Neuroscience* 10.1038/nn.3512

Henley & Wilkinso (2013) AMPA receptor trafficking and the mechanisms underlying synaptic plasticity and cognitive aging. *Dialogues Clin Neurosci.* 2013, 15(1): 11-27

Heise, Gardoni, Culotta, di Luca, Verpelli & Sala (2014) Elongation factor-2 phosphorylation in dendrites and the regulation of dendritic mRNA translation in neurons. *Front Cell Neurosci* 2014(8):35

Hinz, Dieterich & Schuman (2013) Teaching old NCATs new tricks: using non-canonical amino acids tagging to study neuronal plasticity. *Current Opinion in Chemical Biology* 17:738-746

Kimelberg (2007) Supportive or information-processing function of mature protoplasmic astrocyte in the mammalian CNS? A critical appraisal. *Neuro Glia Biol.* 2007, 3:181-189

Kimball, Vary & Jefferson (1992) Age-dependent decrease in the amount of eukaryotic initiation factor 2 in various rat tissues. *Biochem J.* 286 (Pt 1), 263 - 268

Kolb, Finn, Sharpless (2001) Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew Chem Int Ed* 2001, 40:2004-2021.

Laemmli (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685

Lee, Gold & Linker (2012) Mechanisms of Oxidative Damage in Multiple Sclerosis and Neurodegenerative Diseases: Therapeutic Modulation via Fumaric Acid Esters. *Int. J. Mol Sci.* 13:11783-11803

Lerner & Johnson (1970) Regulation of Protein Synthesis in Developing Mouse Brain Tissue. *The Journal of Biological Chemistry* 245(6): 1388-93

Linker, Lee, Ryan, van Dam, Conrad, Bista, Zeng, Hronowsky, Buko, Chollate, Ellrichmann, Brücke, Dawson, Goelz, Wiese, Scannevin, Lukashev & Gold (2011) Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain* 2011 134(Pt 3): 678-92

Ricci, Volpi, Pasquali & Siciliano (2009) Astrocyte-neuron interaction in neurological disorders. *J Biol Phys.* 2009, 35(4):317-336

Sanders, Maassen, Amons & Möller (1991) Nucleotide sequence of human elongation factor-1 β cDNA. *Nucleic Acid Research* 19(16): 4551

Slomka, Kuszczuk, Lazarewicz & Makarewicz (2014) NMDA receptor antagonists MK-801 and memantine induce tolerance to oxygen and glucose deprivation in primary cultures of rat cerebellar granule cells. *Acta Neurobiol Exp* 2014, 74:396-404

Shadlen & Newsome (1998) The Variable Discharge of Cortical Neurons Implication for Connectivity, Computation, and Information Coding, *The Journal of Neuroscience* 18(10): 3870-3896

Souza, Bellaver, Raupp, Souza & Quincozoos-Santos (2015) Astrocytes from adult Wistar rats aged *in vitro* show changes in glial function. *Neurochemistry International* 2015, doi: 10.1016/j.neuint.2015.07.016

Syntichaki, Troulinaki & Tavernarakis (2007) eif4 function in somatic cells modulates aging in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 445(7130):922-6

Taha, Gildish, Gal-Ben-Ari & Rosenblum (2013) The role of eEF2 pathway in learning and synaptic plasticity. *Neurobiology of Learning and Memory* 105:100-106

Tatlisumak, Takano, Meiler & Fisher (2000) A glycine site antagonist ZD9379 reduces number of spreading depressions in infarct size in rats with permanent middle cerebral artery occlusion. *Acta Neurochir Suppl* 2000; 76:331-3

Walsh & Mohr (2011) Viral subversion of the host protein synthesis machinery. *Nature Reviews Microbiology* 9: 860-875

Weng & Proud (2006) The mTOR Pathway in the Control of Protein Synthesis. *Physiology* 21(5): 362 - 369

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Magdeburg, den 18. August.2015

Höhne, Eric