

**Aus dem Institut für Biochemie und Zellbiologie der  
Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-  
Universität Magdeburg**

Zur Bedeutung der neuronalen Stickstoffmonoxidsynthese  
für Veränderungen im Proteinexpressionsmuster des  
*Bulbus olfactorius* und die sozio-olfaktorische  
Langzeitgedächtnisbildung der Maus

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät der

Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Mathias Jüch

aus Westerland

Magdeburg 2009

Jüch, Mathias:

Zur Bedeutung der neuronalen Stickstoffmonoxidsynthase für Veränderungen im Proteinexpressionsmuster des *Bulbus olfactorius* und die sozio-olfaktorische Langzeitgedächtnisbildung der Maus. – 2009. – 128 Bl.: 15 Abb., 4 Tbl., 3 Anl.

**Kurzzusammenfassung:**

Das Wiedererkennen von Artgenossen erfolgt bei Mäusen über das olfaktorische System. Die neuronale Stickstoffmonoxidsynthase (nNOS) spielt über die Bereitstellung des Neurotransmitters Stickstoffmonoxid (NO) eine Schlüsselrolle in der Modulation von Langzeitgedächtniskonsolidierungsprozessen. Diese sind abhängig von zwei aufeinanderfolgenden Phasen der *de novo*-Proteinbiosynthese. An Wildtyp- und nNOS-defizienten Mäusen wurde verhaltensexperimentell die Fähigkeit zur sozio-olfaktorischen Kurz- und Langzeitgedächtnisbildung untersucht. Es folgten Proteomanalysen des *Bulbus olfactorius* beider Genotypen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese und massenspektrometrischer Analysemethoden sowohl unter Kontrollbedingungen als auch sechs Stunden nach Präsentation eines unbekanntes Artgenossen, das heißt während der proteinbiosyntheseabhängigen Konsolidierung eines Langzeitgedächtnisses. Die Langzeitgedächtnisbildung über mehr als 24 Stunden war bei nNOS-defizienten Mäusen beeinträchtigt. In der Proteomanalyse wurden Unterschiede im Proteinexpressionsmuster von glykolytischen Enzymen, spannungsabhängigen anionen-selektiven Kanälen, des Alpha-Synucleins, des neuronalen Proteins 25, von Proteinen des Ubiquitin-Proteasom-Systems sowie von heterogenen nukleären Ribonucleoproteinen ermittelt. Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass NO entscheidend in die Regulation proteinbiosyntheseabhängiger sozio-olfaktorischer Langzeitgedächtniskonsolidierungsprozesse im *Bulbus olfactorius* involviert ist und diese mit spezifischen Veränderungen im Proteinexpressionsmuster einhergehen.

*Wer nichts weiß, muss alles glauben.*

Marie von Ebner-Eschenbach

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>3</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>5</b>
1.1 Soziales Wiedererkennen und soziale Diskrimination .....	5
1.2 Aufbau des olfaktorischen Systems.....	7
1.2.1 Der Hauptanteil des <i>Bulbus olfactorius</i> .....	7
1.2.2 Der akzessorische Anteil des <i>Bulbus olfactorius</i> .....	11
1.3 Mechanismen der olfaktorischen Gedächtnisbildung.....	13
1.4 Proteindynamik bei der Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses.....	14
1.5 Stickstoffmonoxid bei sozialer Interaktion und Lernprozessen .....	16
1.6 Zielsetzung der Arbeit .....	18
<b>2 Materialien und Methoden .....</b>	<b>19</b>
2.1 Versuchstiere .....	19
2.2 Jungtierpräsentation .....	20
2.3 Präparation der <i>Bulbi olfactorii</i> für die Proteomanalyse .....	21
2.4 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE).....	21
2.5 Quantitative Analyse der 2D-Gele.....	26
2.6 Nano-LC-ESI-Iontrap-Analyse.....	28
2.7 MALDI LIFT-TOF-Analyse.....	31
2.8 Datenbankrecherche.....	33
2.9 Statistische Auswertung und Ergebnisdarstellung.....	36
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>37</b>
3.1 Verhaltensanalyse .....	37
3.2 Ergebnisse des Proteomscreenings .....	40
3.3 Ergebnisse der Proteinanalyse in den Vergleichsgruppen.....	42
3.3.1 Vergleich von WT- und nNOS-KO-Tieren in der Kontrollgruppe .....	43

---

3.3.2	Vergleich von exponierten und nicht-exponierten WT-Tieren.....	46
3.3.3	Vergleich von exponierten WT- und nNOS-KO-Tieren .....	49
3.3.4	Vergleich von exponierten und nicht-exponierten nNOS-KO-Tieren....	51
3.3.5	Zusätzliche Betrachtungen.....	53
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>54</b>
4.1	Grenzen des experimentellen Ansatzes .....	54
4.2	Verhaltensexperimente .....	57
4.3	<i>A priori</i> -Unterschiede im Proteinexpressionsmuster des <i>Bulbus olfactorius</i> .	58
4.4	Unterschiede im Proteinexpressionsmuster sechs Stunden nach sozio- olfaktorischem Lernen .....	64
4.5	Der Einfluss des <i>Bulbus olfactorius</i> und anderer Hirnregionen auf die sozio- olfaktorische Gedächtnisbildung .....	71
4.6	Fazit .....	73
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>Danksagungen .....</b>	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>Versicherung an Eides statt .....</b>	<b>88</b>
<b>9</b>	<b>Darstellung des Bildungsweges .....</b>	<b>89</b>
<b>10</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>90</b>
10.1	Tabellen .....	90
10.2	Abbildungen.....	112
10.3	Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Reaktionslösungen .....	122
10.3.1	2D-Gelelektrophorese.....	122
10.3.2	Nano-LC-ESI-Iontrap-Analyse.....	124
10.3.3	MALDI LIFT-TOF-Analyse.....	125

## Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
ACCA	Alpha-Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure
ALDOC	Aldolase C
ANI	Anisomycin
AMPA	Alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl- Isoxazolpropionat
AOB	akzessorischer <i>Bulbus olfactorius</i> ( <i>accessory olfactory bulb</i> )
AOS	akzessorisches olfaktorisches System
AP-1	Aktivatorprotein 1
APS	Ammoniumpersulfat
ASN	Alpha-Synuclein
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	zyklisches Adenosin-3'5'-Monophosphat
cGMP	zyklisches Guanosin-3'5'-Monophosphat
CHAPS	3- (3-Cholamidopropyl)dimethylammonio-1-Propansulfonsäure
CMP	kombinatorisches molekulares Muster ( <i>combinatorial molecular pattern</i> )
CREB	cAMP-responsives Element bindendes Protein
Ctrl	Kontrolle ( <i>control</i> )
DALT	Dalton (bei SDS-DALT Elektrophorese)
DTT	Dithiothreitol
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
ESI	Elektrospray-Ionisation
exp.	Exponiert
G3P	Glyceraldehyd-3-Phosphat
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GFAP	Saures Gliafibrillenprotein ( <i>glial fibrillary acidic protein</i> )
Glu	Glutamat
HnRNP	Heterogenes nukleäres Ribonucleoprotein
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
JT	Jungtier
KO	<i>Knockout</i>
LC	Flüssigkeitschromatographie ( <i>liquid chromatography</i> )
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LTP	Langzeitpotenzierung ( <i>long-term potentiation</i> )
M/B-Zelle	Mitral-/Büschelzelle
MALDI	Matrix-assistierte Laser-Desorption/Ionisation
mGluR1	metabotroper Klasse 1 Glutamat-Rezeptor
MOB	Hauptanteil des <i>Bulbus olfactorius</i> ( <i>main olfactory bulb</i> )
MOS	Hauptanteil des olfaktorischen Systems ( <i>main olfactory system</i> )
MPT	Mitochondriale Permeabilitätspore ( <i>mitochondrial permeability transition pore</i> )

MPW	ultrareines Wasser ( <i>micropure water</i> )
MS	Massenspektrum
MSDB	massenspektrometrische Datenbank
mTOR	Zielstruktur von Rapamycin bei Säugetieren ( <i>mammalian target of rapamycin</i> )
m/z-Quotient	Quotient aus Masse und Ladung eines Peptidions
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxidsynthase
NO	Stickstoffmonoxid
NP25	Neuronales Protein 25
OD	optische Dichte
OGP	Octylglucopyranosid
OMP	olfaktorisches Markerprotein
ORN	olfaktorisches Rezeptorneuron
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
PMF	Peptidmassen-Fingerabdruck
PSD	postsynaptische Dichte
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SP-Fraktion	synaptische (zytoskelettale) Proteinfraktion
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Flugzeit ( <i>time of flight</i> )
TP-Fraktion	Triton X-100-lösliche (zytosolische) Proteinfraktion
UEV1	Variante 1 des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms E2
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
VDAC	spannungsabhängiger anionenselektiver Kanal ( <i>voltage dependent anion selective channel</i> )
VRN	vomeronasales Rezeptorneuron
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

### Schlüsselwörter:

Aldolase C, Alpha-Synuclein, Bulbus olfactorius, Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, MALDI LIFT-TOF, Nano-LC-ESI-Iontrap, nNOS, NP25, olfaktorisches Langzeitgedächtnis, Proteinbiosynthese, soziale Diskrimination, Ubiquitin-Proteasom-System, VDAC

# 1 Einleitung

Die Hausmaus (lateinisch *Mus musculus*) zählt zu den Makrosmatikern; für sie sind die Aufnahme, Verarbeitung, einschließlich Speicherung, und der Abruf olfaktorischer Informationen die entscheidende Voraussetzung für eine erfolgreiche Interaktion mit ihrer unbelebten und belebten Umwelt (Eibl-Eibesfeldt, 1950). Insbesondere das komplexe Sozialverhalten der Hausmaus ist ohne eine auf olfaktorischer Informationsverarbeitung basierende individuelle Wiedererkennung von Artgenossen – mithin eines sozialen Gedächtnisses – nicht erklärbar. Interessanterweise entsprechen wesentliche Charakteristika der olfaktorischen Gedächtnisbildung bei der Maus, wie zum Beispiel *One-Trial*-Lernen, schnelles Enkodieren, eine große Speicherkapazität und die Fähigkeit zur Konsolidierung eines Langzeitgedächtnisses, denen, die für das deklarative Gedächtnis beim Menschen typisch sind.

## 1.1 Soziales Wiedererkennen und soziale Diskrimination

Bei der Erforschung von Gedächtniskonsolidierungsprozessen werden häufig Konditionierungsparadigmen als verhaltensexperimenteller Ansatz gewählt. Dabei lernt ein Versuchstier eine Assoziation zwischen einem primär neutralen Reiz (konditionierter Stimulus) und einem belohnenden oder bestrafenden Stimulus (unkonditionierter Stimulus), wie zum Beispiel einem elektrischen Fußschock, auszubilden. Bei erneuter Präsentation des konditionierten Stimulus erfolgt dann eine Reaktion ähnlich der Antwort auf den unkonditionierten Stimulus, zum Beispiel Furchtverhalten. Allerdings ergibt sich bei der Ergebnisinterpretation die Schwierigkeit der Unterscheidung zwischen Effekten des konditionierten und unkonditionierten Stimulus. Im Labor bieten daher Paradigmen, die für die Bewertung von Lern- und Gedächtnisleistungen nur solche dem angeborenen Trieb der Maus, zum Beispiel zur kontinuierlichen olfaktorischen Durchmusterung ihrer Umwelt, entsprechenden Verhaltensparameter nutzen und auf zusätzliche Konditionierungsmaßnahmen verzichten, einen eleganten Zugang zu gedächtnisrelevanten zellulären und molekularen Prozessen.

Dem Vorgang des Wiedererkennens liegt die Fähigkeit von Tieren und Menschen zugrunde, zwischen bekannten und unbekanntem Stimuli zu unterscheiden. Ein unbe-

kannter Artgenosse, der unter experimentellen Bedingungen in den Käfig eines Versuchstieres gesetzt wird, stellt einen attraktiven sozialen Stimulus für Mäuse dar. Das anfänglich reine Untersuchungsverhalten des Versuchstieres kann im weiteren Verlauf in sexuelle Aktivität, aggressives Verhalten oder passive Akzeptanz gegenüber dem Eindringling münden. Entscheidend dafür ist, dass der individuelle olfaktorische Fingerabdruck des Stimulustieres (wieder-)erkannt wird. In den Paradigmen zum sozialen Wiedererkennen (Dantzer et al., 1987) und zur sozialen Diskrimination (Engelmann et al., 1995) wird die Investigationsdauer des Versuchstieres gegenüber einem Stimulustier als Parameter für den „Neuigkeitsgrad“ des Stimulustieres verwendet. Als Investigationsdauer gilt dabei die Zeit, die das Versuchstier mit Beschnüffeln und Belecken der Anogenitalregion, des Rückens, Kopfes, Schwanzes oder der Füße des Stimulustieres verbringt, ohne aggressives oder sexuell motiviertes Verhalten zu zeigen. Da das Erkennen eines Artgenossen bei Nagetieren zum entscheidenden Teil über das olfaktorische System erfolgt (Matochik, 1988; Bluthé und Dantzer, 1993), kann bei Verringerung der Investigationsdauer während erneuter Präsentation ein und desselben Stimulustieres auf ein Wiedererkennen durch das Versuchstier geschlossen werden. Dieses Wiedererkennen setzt das Vorhandensein eines sozio-olfaktorischen Gedächtnisses voraus.

Das Paradigma zur sozialen Diskrimination hat sich als besonders vorteilhaft erwiesen, da durch die simultane Präsentation des bekannten und unbekanntes Stimulustieres in der Reexpositionphase eine zusätzliche Testsituation vermieden wird. Des weiteren wird bei jungen und sexuell unerfahrenen Versuchstieren aggressives oder sexuell motiviertes Verhalten minimiert (Engelmann et al., 1995).

Obwohl ursprünglich an Ratten etabliert, konnte die Übertragbarkeit dieser verhaltensexperimentellen Ansätze auf das Mausmodell gezeigt werden (Bluthé et al., 1993; Kogan et al., 2000). Dabei ist zu berücksichtigen, dass Mäuse sich ein zuvor präsentiertes Stimulustier in Abhängigkeit von den vorexperimentellen Haltebedingungen wesentlich länger merken können als Ratten. Männliche Mäuse, die zuvor in kleinen Gruppen gehalten wurden, sind in der Lage, den olfaktorischen Fingerabdruck eines Artgenossen bis zu sieben Tage lang zu speichern (Kogan et al., 2000). Dies lässt die Vermutung zu, dass Mäuse befähigt sind, ein proteinbiosyntheseabhängiges sozio-olfaktorisches Langzeitgedächtnis zu bilden.

## 1.2 Aufbau des olfaktorischen Systems

Die Projektionswege sowie die strukturelle Organisation des olfaktorischen Systems sind vergleichsweise gut erforscht. Daher ist sowohl die Betrachtung des Gesamtsystems als auch einzelner Elemente mit den in ihnen ablaufenden Teilprozessen, wie zum Beispiel synaptische Plastizität bei der Konsolidierung olfaktorischer Gedächtnisinhalte, auf unterschiedlichen Verarbeitungsebenen möglich.

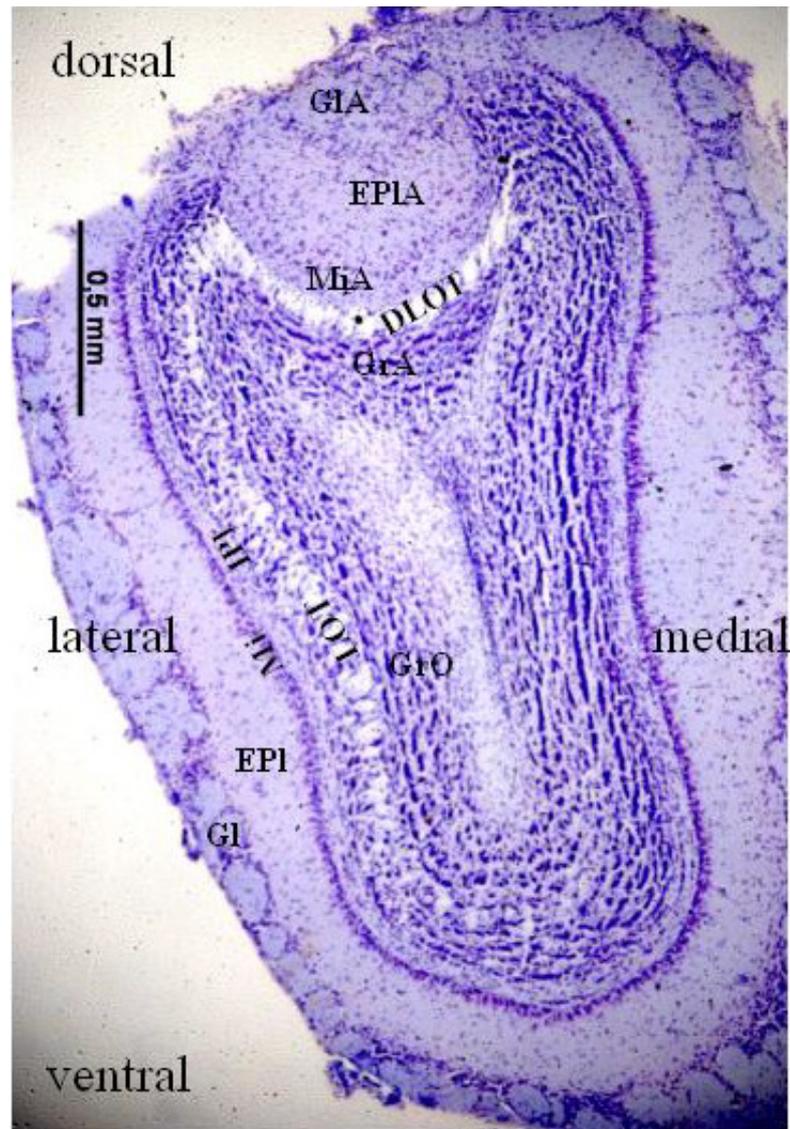
Das olfaktorische System vieler Vertebraten besteht aus einem Hauptanteil (englisch *main olfactory system*, MOS) und einem akzessorischen Anteil (englisch *accessory olfactory system*, AOS). Dabei erfolgt die Verarbeitung volatiler olfaktorischer Stimuli bevorzugt über das MOS, wohingegen nicht-volatile Stimuli hauptsächlich über das AOS verarbeitet werden. Häufig bestimmt das fein abgestimmte Zusammenspiel von MOS und AOS die Verhaltensantwort auf einen olfaktorischen Reiz. Wie bereits eingangs erwähnt, setzt die Konsolidierung sozio-olfaktorischer Gedächtnisinhalte ein funktionierendes olfaktorisches Signalverarbeitungssystem voraus. Für die Prozessierung sozialer olfaktorischer Signale wird eine parallele, teilweise überlappende Verarbeitung im Hauptanteil des *Bulbus olfactorius* (englisch *main olfactory bulb*, MOB) und im *Bulbus olfactorius accessorius* (englisch *accessory olfactory bulb*, AOB) vorgeschlagen (Spehr et al., 2006).

### 1.2.1 Der Hauptanteil des *Bulbus olfactorius*

Mit Hilfe des olfaktorischen Systems werden kleinste Unterschiede in der Zusammensetzung natürlicher Duftstoffe, die aus hunderten verschiedenster Moleküle bestehen, detektiert. Im olfaktorischen Epithel der Nasenhöhle rufen Duftstoffe eine einzigartige Kombination von Rezeptorantworten an bis zu 1000 unterschiedlichen G-Proteingekoppelten Rezeptoren in den Zilien der olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORN) hervor (Broillet und Firestein, 1999). Die Axone tausender ORNs konvergieren im MOB auf wenige Glomerula. Diese Aktivierung distinkter Glomerula ist die Basis olfaktorischer Musterbildung (Schaefer et al., 2002).

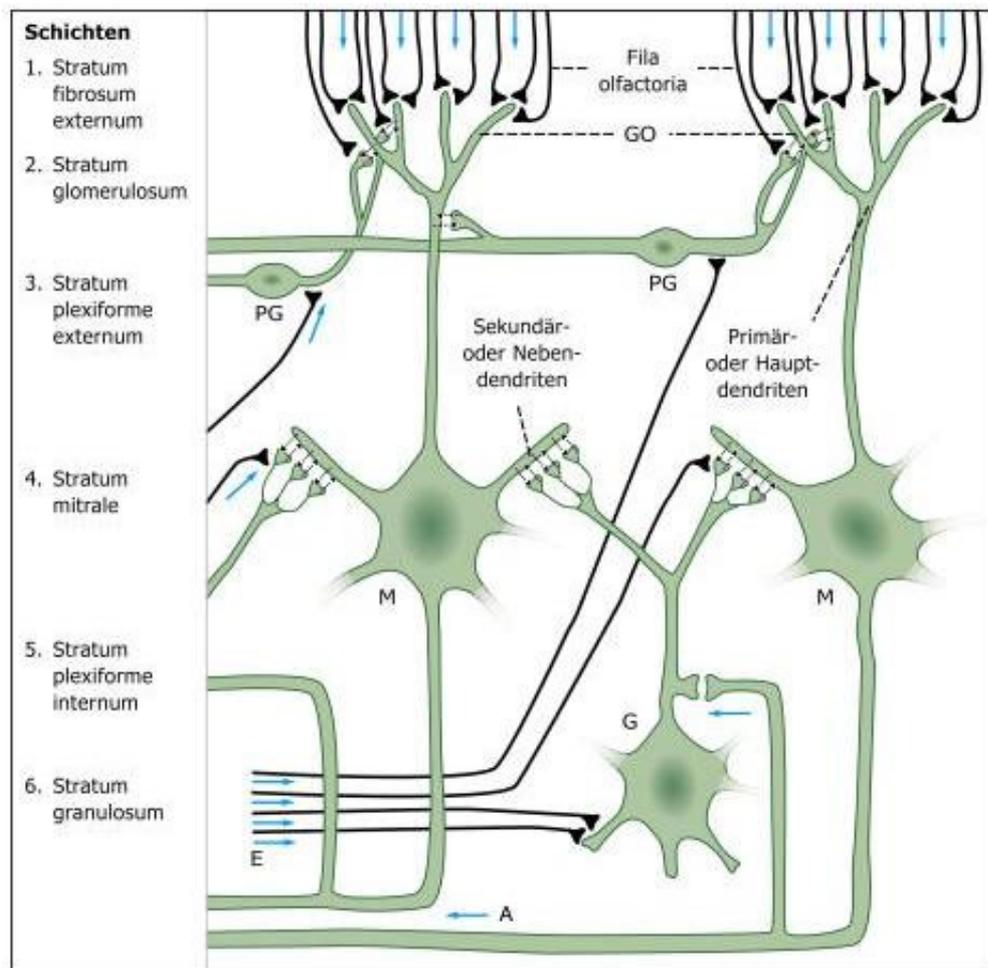
Im MOB lassen sich von außen nach innen folgende Zellschichten unterscheiden (Abbildung 1 und 2): Im *Stratum fibrosum externum* verlaufen die Axone der ORNs. Das *Stratum glomerulosum* beinhaltet die Glomerula, in denen die Axonterminalen der ORNs mit den primären (apikalen) Dendriten der Mitral- und Büschelzellen (M/B-Zel-

len) monosynaptische glutamaterge Kontakte ausbilden. Das *Stratum plexiforme externum* enthält die Gamma-Aminobuttersäure- (GABA-) haltigen periglomerulären Zellen, welche dort die intraglomeruläre Kommunikation über reziproke dendrodendritische Synapsen mit den primären Dendriten der M/B-Zellen gewährleisten. Die Dendriten beider Zelltypen befinden sich jeweils prä- und postsynaptisch zueinander und bilden die Basis für eine Rückwärtshemmung der M/B-Zellen. Im *Stratum mitrale* liegen die Somata der Mitralzellen. Das *Stratum plexiforme internum* enthält die Zellkörper der Horizontal- und Vertikalzellen sowie deren synaptische Verbindungen mit den M/B-Zellen. Im *Stratum granulosum* befinden sich die Somata der GABA-haltigen Körnerzellen. Die distalen Dendriten dieser Interneuronen und die sekundären Dendriten beziehungsweise die Zellkörper der M/B-Zellen bilden reziproke dendrodendritische Synapsen aus. Eine Körnerzelle entsendet Dendriten in mehrere benachbarte Glomerula. Darüber erfolgt die interglomeruläre Kommunikation, die der Kontrastverstärkung von Geruchsinformationen dient. Die Körnerzellen empfangen zusätzlich noradrenerge Projektionen aus dem *Locus coeruleus* (Kendrick et al., 1992).



**Abbildung 1:**

Transversalschnitt durch einen Teil des rechten *Bulbus olfactorius* der Maus in Cresylviolett-Färbung. Gl: *Stratum glomerulosum* des MOB; EPI: *Stratum plexiforme externum* des MOB; Mi: *Stratum mitrale* des MOB; IPI: *Stratum plexiforme internum* des MOB; GrO: *Stratum granulosum* des MOB; GIA: *Stratum glomerulosum* des AOB; EPIA: *Stratum plexiforme externum* des AOB; MiA: *Stratum mitrale* des AOB; GrA: *Stratum granulosum* des AOB; LOT: *Tractus olfactorius lateralis*; DLOT: *Tractus olfactorius dorsolateralis*

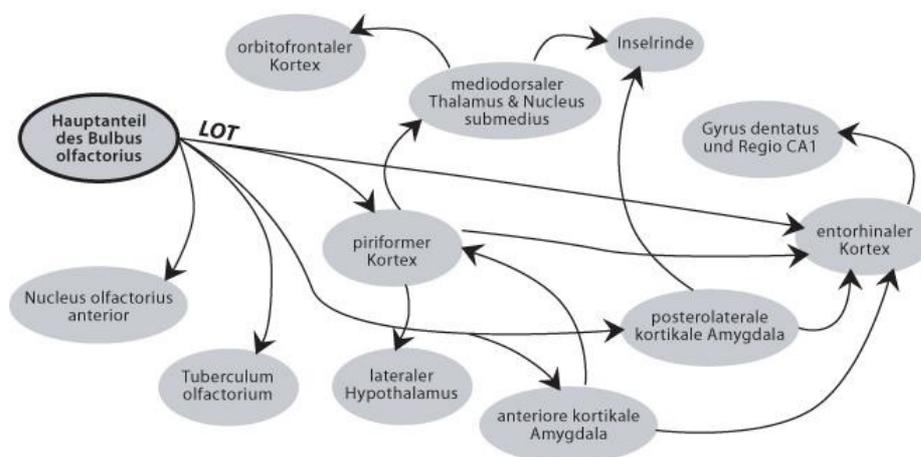


**Abbildung 2:**

Synaptische Organisation des *Bulbus olfactorius* nach Shepherd, 1972. Die Pfeile geben die Richtung des Informationsflusses an. A: Afferenzen im *Tractus olfactorius lateralis*; E: Efferenzen, z.B. aus dem *Locus coeruleus*; G: Körnerzelle; GO: *Glomerula olfactoria*; M: Mitralzelle; PG: periglomeruläre Zelle.

Abbildung 3 gibt einen Überblick über die wichtigsten Projektionen des MOS (Brennan und Keverne, 1997). Projektionen der Mitralzellen verlaufen über den *Tractus olfactorius lateralis* (Abbildung 1 und 2) in den olfaktorischen Kortex, der aus dem piriformen Kortex, dem *Tuberculum olfactorium* sowie Teilen des entorhinalen Kortex und der Amygdala besteht (Scott, 1986, 1987; Shipley und Ennis, 1996). Von dort ziehen Projektionen zum mediodorsalen Thalamus und dem ventralen Anteil des *Nucleus submedius*, der Projektionen in den frontalen Kortex sendet (Price und Slotnick, 1983). Ein kleiner Teil der Fasern im *Tractus olfactorius lateralis* endet im lateralen entorhinalen Kortex (Krettek und Price, 1977). Von dort bestehen Verbindungen zu den Regionen CA1 und CA3 des Hippocampus. Weitere Projektionen des olfaktorischen Kortex enden im Hypothalamus und dem vorderen Anteil der kortikalen Amygdala (Price et al., 1991).

Olfaktorische Signale erreichen damit sowohl kortikale Areale, die für die bewusste Wahrnehmung des Stimulus unabdingbar sind, als auch limbische Areale, die verantwortlich sind für die emotionale, motivationale und neuroendokrine Antwortkomponente.



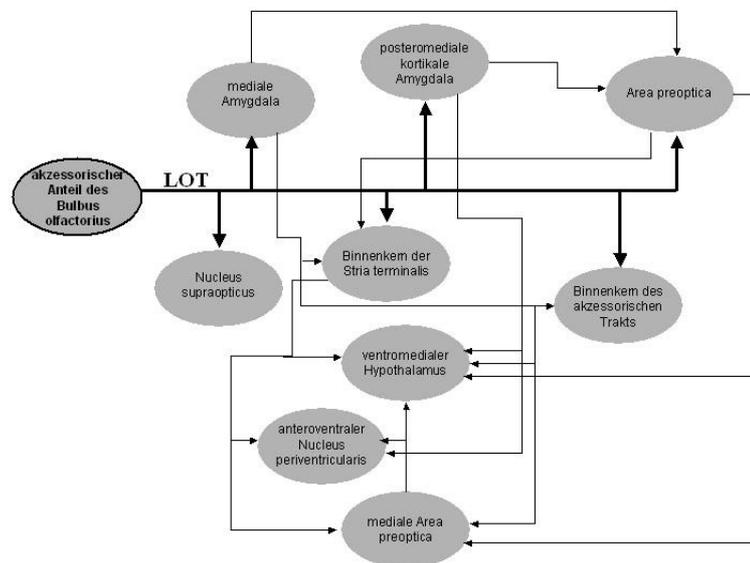
**Abbildung 3:** Projektionen innerhalb des MOS nach Brennan und Kaverne, 1997.

LOT: *Tractus olfactorius lateralis*

### 1.2.2 Der akzessorische Anteil des *Bulbus olfactorius*

Im AOS beginnt die Signaltransduktionskaskade in den Mikrovilli der vomeronasalen Rezeptorneuronen (VRN). Projektionen unterschiedlicher VRN-Subtypen konvergieren

teilweise auf dieselben Glomerula (Belluscio et al., 1999) des AOB. Die Histoarchitektur des AOB ist ebenfalls in Abbildung 1 dargestellt. Abbildung 4 gibt einen Überblick der wichtigsten Projektionen innerhalb des AOS (Cooke et al., 1998). Diese reichen vom AOB in den Binnenkern des akzessorischen olfaktorischen Trakts und der *Stria terminalis* sowie in die mediale und posteromediale kortikale Amygdala (Itaya, 1987). Zusätzlich wurden Projektionen in den *Nucleus supraopticus* und amygdala-unabhängige Projektionen in den Hypothalamus beschrieben (Itaya, 1987; Larriva-Sahd et al., 1993). Im Sinne einer Rückwärts-Schleife projizieren die eben erwähnten Areale der Amygdala zurück in den AOB. Der AOB empfängt weitere wichtige Projektionen aus noradrenergen und serotonergen Strukturen des Hirnstamms sowie dem *Nucleus olfactorius anterior* (Keverne, 1983). Neuronen der medialen Amygdala werden auch durch Projektionen aus dem MOS aktiviert. Sie stellen damit einen Konvergenz- und Integrationspunkt für Informationen beider olfaktorischer Systeme dar (Scalia und Winnans, 1975; Licht und Meredith, 1987; Coolen und Wood, 1998). Tertiäre Projektionen der medialen Amygdala reichen in den Binnenkern der *Stria terminalis*, die *Area preoptica*, den ventromedialen *Nucleus hypothalamicus* und den *Nucleus präammillaris* (Canteras et al., 1995).



**Abbildung 4:** Projektionen des akzessorischen olfaktorischen Systems nach Cooke et al., 1998. LOT: *Tractus olfactorius lateralis*

### 1.3 Mechanismen der olfaktorischen Gedächtnisbildung

Das Aktivierungsmuster innerhalb des *Bulbus olfactorius*, das aus der Präsentation eines olfaktorischen Reizes resultiert, ist hochspezifisch. Da die erneute Präsentation desselben Reizes ein identisches Aktivierungsmuster hervorruft, werden selektiv synaptische Prozesse verstärkt und das Wiedererkennen des präsentierten Musters erleichtert (Brennan et al., 1998; Sanchez-Andrade et al., 2005). Erlernte Geruchsmuster führen zu einer stärkeren Aktivierung der M/B-Zellen und zu einer Schärfung ihrer phasischen Entladungsmuster (Kendrick et al., 1997; Brennan et al., 1998). Diese Prozesse zeigen Ähnlichkeiten mit den hippocampalen Prozessen während der Konsolidierung eines Langzeitgedächtnisses (Izquierdo et al., 2006).

Gerichtete Aufmerksamkeit aktiviert noradrenerge Neuronen des *Locus coeruleus*, die durch ihre Wirkung an beta-noradrenergen Rezeptoren der Körnerzellen des *Bulbus olfactorius* deren GABA-Freisetzung gegenüber den M/B-Zellen vermindern (Kendrick et al., 1992). Die M/B-Zellen befinden sich dann in einem desinhibierten Zustand, so dass ihre durch ORNs vermittelte Exzitation zu einer verstärkten Glutamat-Freisetzung an den reziproken Synapsen zwischen M/B- und Körnerzellen führt (Trombley, 1994). Im Rahmen der interglomerulären Kommunikation werden dabei nicht aktivierte M/B-Zellen in benachbarten Glomerula inhibiert.

Durch die Glutamat-Wirkung an Alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-Isoxazol-propionat- (AMPA-) und N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA-) Rezeptoren wird in den Körnerzellen eine intrazelluläre Kaskade in Gang gesetzt, an deren Ende die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) steht (Ambrosini und Racagni, 1993). Frei diffusibles NO agiert als retrograder Botenstoff und stimuliert die Guanylat-Cyclase (Arancio et al., 1996), was aufgrund der Enzymverteilung vor allem in der M/B-Zelle zur Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) führt. Dies erleichtert die weitere Freisetzung von Glutamat (Arancio et al., 2001). Dadurch wird die exzitatorisch-inhibitorische Kopplung zwischen M/B-Zelle und Körnerzelle verstärkt. Zusätzlich kommt es zu einer vermehrten Präsentation von Glutamat-Autorezeptoren an der Zellmembran der M/B-Zellen, was deren Empfindlichkeit für den Neurotransmitter erhöht. Im Rahmen der Konsolidierung eines olfaktorischen Langzeitgedächtnisses erhöht sich die Sensitivität des metabotropen Klasse 1 Glutamat-Rezeptors (mGluR1) für sein Substrat, so dass ein

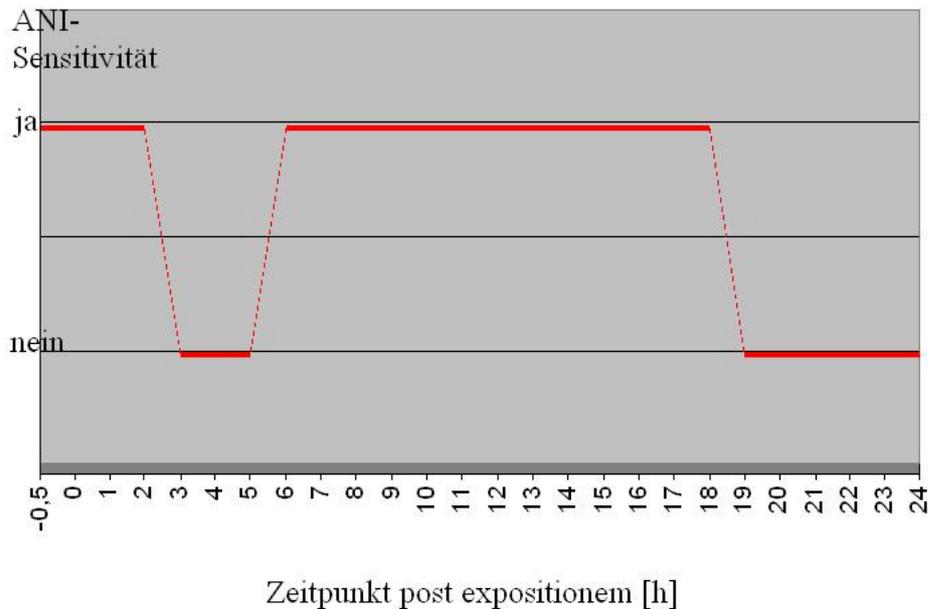
Wechsel vom Glutamat-NMDA/AMPA-NO-Signalweg zum mGluR1-Weg stattfindet (Brennan et al., 1990; Trombley und Shepherd, 1993).

Neben einer regionalen Aktivierung des *Bulbus olfactorius* führt die kurze Präsentation eines Stimulustieres auch zu einer Aktivierung weiterer Elemente des olfaktorischen Systems, wie zum Beispiel des piriformen Kortex, Anteilen der Hippocampusformation, der medialen Amygdala, der medialen *Area preoptica*, des Binnenkerns des *Tractus olfactorius lateralis* und der Septumregion (Kogan et al., 2000; Richter et al., 2005; Bernabeu et al., 2006). Nach einer Konsolidierungsphase von etwa acht Stunden scheinen nur der *Bulbus olfactorius* und der piriforme Kortex für das Abrufen der Erinnerung notwendig zu sein (Bernabeu et al., 2006).

#### 1.4 Proteindynamik bei der Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses

Synaptische Plastizität ist einer der zellulären Mechanismen zur Anpassung der Netzwerk-Aktivität während der Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses (Bliss und Collingridge, 1993). Elemente dieser Umstrukturierung sind unter anderem die Proteinphosphorylierung (Roberson et al., 1999), Monoubiquitinierung (Yi und Ehlers, 2005), Translokation (Krucker et al., 2000) sowie verstärkte translationale Aktivität (Stanton und Sarvey, 1984; Behnisch et al., 2004). Die Konversion eines neuen Gedächtnisinhaltes von einer initial labilen in eine stabile längerwährende Speicherform (Matthies, 1989) ist dabei abhängig von *de novo*-Proteinbiosynthese in den beteiligten Hirnregionen (Davis und Squire, 1984; Stork und Welzl, 1999). Es finden mindestens zwei aufeinanderfolgende Phasen der Proteinbiosynthese statt, die beide erfolgreich durchlaufen werden müssen (Grecksch und Matthies, 1980; Quevedo et al., 1999; Ressler et al., 2002; Richter et al., 2005). Untersuchungen von Richter et al. (2005) und Wanisch et al. (2008) zeigen, dass die subkutane Gabe des Proteinsyntheseblockers Anisomycin (ANI) in Abhängigkeit vom Applikationszeitpunkt das Wiedererkennen eines bekannten Stimulustieres nach einem Retentionsintervall von 24 Stunden im Paradigma zur sozialen Diskrimination beeinträchtigt. Das sozio-olfaktorische Kurzzeitgedächtnis bleibt dabei unbeeinflusst. ANI-sensible Phasen finden sich unmittelbar zum beziehungsweise kurz vor dem Zeitpunkt der Jungtierpräsentation und sechs bis 18 Stunden *post expositionem*. Drei und mehr als 18 Stunden nach der Jungtierpräsentation hat die

Applikation von ANI keinen nachweisbar hemmenden Effekt auf die Konsolidierung sozio-olfaktorischer Gedächtnisinhalte (Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Phasen der Anisomycin-Sensitivität während der Konsolidierung eines sozio-olfaktorischen Langzeitgedächtnisses (nach Wanisch et al., 2008).

Von den beiden ANI-sensiblen Phasen fällt nur die erste – frühe – Phase in den Zeitraum vermehrter c-Fos-Synthese in distinkten, die Verarbeitung olfaktorischer Stimuli betreffenden, Hirnarealen (Richter et al., 2005). C-Fos gehört zu den induzierbaren Transkriptionsfaktoren, die durch sogenannte unmittelbare frühe Gene wie c-fos, c-jun, jun-B und zif/268 enkodiert werden. Diese spielen eine wichtige Rolle im Rahmen synaptischer Plastizität und von Gedächtniskonsolidierungsprozessen (Tischmeyer und Grimm, 1999; Guzowski, 2002). Als Homo- oder Heterodimer ist c-Fos an der Bildung des Aktivatorprotein-1 (AP-1) beteiligt, welches wiederum in dimerisierter Form an eine spezifische DNA-Sequenz, die AP-1-Bindungsstelle, bindet und damit die vermehrte Transkription verschiedener Gene ermöglicht (Glover und Harrison, 1995). Neben der Proteinbiosynthese spielt der aktivitätsinduzierte Abbau von Proteinen über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) eine wichtige Rolle bei Konsolidierungsprozessen (Colledge et al., 2003; Hegde, 2004). Beispielsweise ist im Hippocampus die AMPA-induzierte Internalisierung der Glutamat-Rezeptoren 1 und 2 als wichtiger

postsynaptischer Prozess der Langzeitgedächtniskonsolidierung abhängig vom Proteinabbau über das UPS (Colledge et al., 2003; Patrick et al., 2003). Weitere Untersuchungen unterstreichen das dynamische Zusammenspiel zwischen Proteinbiosynthese und Proteinabbau während der Langzeitgedächtniskonsolidierung (Ehlers, 2003; Karpova et al., 2006).

Der Zeitpunkt sechs Stunden nach Jungtierpräsentation erscheint für weiterführende Untersuchungen besonders interessant, da hier im *Bulbus olfactorius* der Maus eine zweite, c-Fos-unabhängige, Phase der Proteinbiosynthese beginnt, die möglicherweise die Synthese von Signalmolekülen sowie Proteinen des zellulären Energie- und Strukturstoffwechsels beinhaltet.

## 1.5 Stickstoffmonoxid bei sozialer Interaktion und Lernprozessen

Vor mehr als 15 Jahren wurde erstmals eine unterstützende Funktion von NO für Lernprozesse und Gedächtnisbildung beschrieben (Hölscher und Rose, 1992). NO wird im Gehirn insbesondere von der konstitutiv in Neuronen exprimierten neuronalen Stickstoffmonoxidsynthase (nNOS) bei der Umwandlung von Arginin zu Citrullin erzeugt. Für das kurzlebige Gas existieren keine intrazellulären Speicher; seine Freisetzung erfolgt folglich unmittelbar nach der Synthese, und seine Wirkung ist räumlich und zeitlich begrenzt. NO spielt eine Rolle als retrograder neuronaler Botenstoff, der die Langzeitpotenzierung (englisch *long-term potentiation*, LTP) erleichtert, ein electrophysiologisches Phänomen synaptischer Plastizität das als Korrelat von Lern- und Gedächtniskonsolidierungsprozessen angesehen wird (Hawkins et al., 1998; Zhuo et al., 1999). Dabei bewirkt NO als lokaler Modulator eine Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration (Lu et al., 1999). Dadurch wird die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG) aktiviert, die – synergistisch mit der Proteinkinase A (PKA) – durch Phosphorylierung die Aktivität des cAMP-responsives Element bindenden Proteins (CREB) erhöht (Lu et al., 1999). Dieser Transkriptionsfaktor spielt eine wichtige Rolle bei der Konsolidierung eines Langzeitgedächtnisses, insbesondere im Rahmen hippocampusunabhängiger Lernprozesse (Balschun et al., 2003). Phosphoryliertes CREB erhöht die intrazelluläre Konzentration von c-Fos (Kapitel 1.4) und bildet damit eine Verbindung zwischen dem NO-Signalweg und der Induktion unmittelbar früher Gene (Chan et al., 2004).

In nicht-neuronalen Zellen wurde eine NO-induzierte Zunahme der intrazellulären Translationsaktivität beschrieben. Diese wird vermittelt durch Signalwege, deren Bestandteile unter anderem die extrazelluläre regulierte Kinase (ERK) und die Zielstruktur von Rapamycin bei Säugetieren (englisch *mammalian target of rapamycin*, mTOR) sind (Pervin et al., 2007). Diese beiden Kinasen wurden auch im ZNS als Regulatoren der Translation während LTP und Gedächtniskonsolidierungsprozessen beschrieben (Kelleher et al., 2004; Jaworski und Sheng, 2006).

Darüber hinaus beeinflusst NO direkt die Aktivität glykolytischer Proteine wie der Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, Phosphoglyceratmutase, Aldolase und Laktat-Dehydrogenase in der postsynaptischen Dichte (PSD) von Neuronen (Walsh und Kuruc, 1992; Aoki et al., 1993; Rogalski-Wilk und Cohen, 1997; Wu et al., 1997).

Verhaltensexperimentell zeigen Mausmutanten mit einer Gendelektion der nNOS (nNOS-KO) eine Reihe von Auffälligkeiten parallel zu strukturellen neuroanatomischen Veränderungen. Zwar war die Fähigkeit verstecktes Futter aufzuspüren nicht vermindert, und im *Open-Field-Test* ließ sich keine erhöhte Ängstlichkeit der KO-Tiere feststellen. Allerdings wurde bei männlichen Tieren vermehrt aggressives Verhalten und vermindertes submissives Verhalten beobachtet (Nelson et al., 1995). Ferner wurde über exzessives und inadäquates Paarungsverhalten berichtet (Nelson et al., 1995). Im Wasserlabyrinth nach Morris zeigten nNOS-KO-Mäuse bei normaler motorischer Aktivität signifikant schlechtere Leistungen im räumlichen Lernen als Wildtyp- (WT-) Mäuse (Kirchner et al., 2004). Parallel dazu fanden sich Unterschiede im hippocampalen Proteinexpressionsmuster beider Genotypen unter Kontrollbedingungen (Kirchner et al., 2004).

Obwohl bei Mäusen die nNOS in hoher Konzentration in den Körnerzellen des AOB und den Interneuronen des MOB vorhanden ist (Kishimoto et al., 1993) und NO – wie oben beschrieben – in vielfältiger Weise in Gedächtniskonsolidierungsprozesse involviert ist, existieren bislang keine Daten über stimulusabhängig oder -unabhängig veränderte Proteinexpressionsmuster innerhalb des *Bulbus olfactorius* von WT- und nNOS-KO-Mäusen.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die mit der sozio-olfaktorischen Langzeitgedächtnisbildung einhergehenden proteomischen Veränderungen auf der Ebene des *Bulbus olfactorius* von nNOS-KO- und WT-Mäusen zu charakterisieren. Dabei wurde postuliert, dass nNOS-vermittelte NO-Bildung im *Bulbus olfactorius* einen verhaltensexperimentell und molekularbiologisch nachweisbaren Effekt auf die sozio-olfaktorische Gedächtnisbildung, insbesondere die Langzeitgedächtnisbildung, ausübt. Die besondere Herausforderung bestand darin, mögliche quantitative und/oder qualitative Unterschiede im Proteom zwischen den beiden Genotypen im nicht-stimulierten Zustand zu analysieren und in einen möglichen Zusammenhang mit erwarteten Veränderungen im Proteinmuster in der zweiten ANI-sensiblen Phase sechs Stunden nach einmaliger Jungtierpräsentation zu bringen. Dazu sollte zunächst mittels sozialer Diskrimination anhand der Retentionsintervalle 60 und 180 Minuten sowie 24 Stunden das Kurz- beziehungsweise Langzeitwiedererkennungsgedächtnis von nNOS-KO- und WT-Mäusen untersucht werden. Darauf folgte die Erstellung von Proteomkarten des *Bulbus olfactorius* als Ausgangspunkt für weitere quantitative Proteomanalysen. Das extrahierte Proteom musste in zwei Dimensionen (isoelektrischer Punkt und Molekulargewicht) gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend einer massenspektrometrischen Analytik zugeführt werden. Mit Hilfe der computergestützten quantitativen Proteomanalyse sollten etwaige Unterschiede im Proteom des *Bulbus olfactorius* zwischen nNOS-KO- und WT-Mäusen vor sowie sechs Stunden nach Jungtierpräsentation, *id est* zu Beginn der zweiten ANI-sensiblen Phase, identifiziert werden. Um die Proteomausbeute zu maximieren und auch intrazelluläre Verteilungsunterschiede erfassen zu können, wurden die Proteine in eine zytoskelettale und eine zytoplasmatische Fraktion aufgetrennt. Da sich die untersuchten Proteine in Abhängigkeit ihrer physikochemischen Eigenschaften mit unterschiedlichen massenspektrometrischen Analysemethoden optimal identifizieren lassen, wurde je nach Fragestellung entweder die MALDI LIFT-TOF-Analytik oder die Nano-LC-ESI-Iontrap-Analytik eingesetzt.

## 2 Materialien und Methoden

Um den Textfluss nicht zu stören, wurden alle Puffer und Reaktionslösungen in ihrer Zusammensetzung sowie eine Liste aller verwendeten Chemikalien im Anhang dieser Arbeit aufgelistet (Kapitel 10.3).

### 2.1 Versuchstiere

Alle experimentellen Manipulationen an den Versuchstieren wurden vom Regierungspräsidium des Landes Sachsen-Anhalt als zuständiger Aufsichtsbehörde genehmigt. Die EEC-Richtlinien für die Pflege und Nutzung von Labortieren (86/609/CEE) wurden strikt eingehalten.

Alle Tiere entstammten der eigenen Zucht des Instituts für Biochemie und Zellbiologie (ehemals Institut für Medizinische Neurobiologie).

Es wurde ein künstlicher Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden eingehalten, wobei die Tag-Phase von 6:00 Uhr bis 18:00 Uhr dauerte. Die Temperatur betrug im Tierstall  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , die Luftfeuchtigkeit  $60 \pm 5 \%$ .

Bei den verwendeten Wildtyp- (WT-) Mäusen handelte es sich um Tiere des Stammes C57BL/6J. Die nNOS-Knockout-Tiere (nNOS-KO) zeigen durch homologe Rekombination eine selektive Genmutation des nNOS-Gens, was mit einer Verringerung der NO-Produktion im ZNS von mehr als 95 % einhergeht (Huang et al., 1993). Der genetische Hintergrund besteht aus einer Kombination des 129X1/SvJ und des C57BL/6J Stammes. Die Mäuse wurden über drei Generationen mit C57BL/6J Mäusen zurückgekreuzt. Der genetische Hintergrund der verwendeten WT- und KO-Mäuse ist zu mehr als 99,9 % identisch (Gammie und Nelson, 1999).

Bei den verwendeten Stimulustieren handelte es sich um Jungtiere beiderlei Geschlechts im Alter von 28 bis 39 Tagen des Stammes C57BL/6J Ola HSD.

Alle Versuchstiere wurden zu fünf in einem Käfig gehalten und 24 Stunden vor Beginn der Verhaltensexperimente in Einzelkäfigen isoliert. Bei den Einzelkäfigen handelte es sich um den Makrolon 3108 Käfig Typ 2 der Firma Ebeco GmbH, Castrop-Rauxel. Die Bodenfläche betrug  $350 \text{ cm}^2$  bei einer Käfighöhe von 14 cm. Pelletierte Vollkost

(Teklad Global Diet 2014, Firma Harlan Winkelmann GmbH, Borchon) und Wasser waren stets *ad libitum* verfügbar.

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die verwendeten sexuell erfahrenen Versuchstiere im Alter von 25 bis 36 Wochen.

**Tabelle 1:** Übersicht über die Anzahl und Gruppenzuordnung der verwendeten Versuchstiere.

<b>Tiergruppe</b>	<b>Anzahl</b>
WT-Tiere für Verhaltensparadigma	20
nNOS-KO-Tiere für Verhaltensparadigma	19
WT-Kontrolltiere mit Präparation des <i>Bulbus olfactorius</i>	8
WT-Tiere mit Jungtierpräsentation sechs Stunden vor Präparation des <i>Bulbus olfactorius</i>	5
nNOS-KO-Kontrolltiere mit Präparation des <i>Bulbus olfactorius</i>	8
nNOS-KO-Tiere mit Jungtierpräsentation sechs Stunden vor Präparation des <i>Bulbus olfactorius</i>	5

## 2.2 Jungtierpräsentation

Der Versuchsablauf orientierte sich an dem Paradigma der sozialen Diskrimination (Engelmann et al., 1995).

In den Käfig jedes erwachsenen Versuchstieres wurde zwischen 7:30 Uhr und 8:30 Uhr einmalig für exakt vier Minuten ein Jungtier gesetzt. Beschnüffeln und Belecken der Anogenitalregion, des Rückens, Kopfes, Schwanzes oder der Füße des Jungtieres, sowie aggressives (Beißen, Treten oder durch den Käfig Schieben) und sexuell motiviertes Verhalten (offensichtliche Paarungsversuche) durch das Versuchstier wurden von einem erfahrenen Beobachter registriert und als investigatorisches, aggressives oder Paarungsverhalten elektronisch mit dem Computerprogramm *Eventlog* dokumentiert. Hinzufügen und Entfernen des Jungtiers erfolgte mit der behandschuhten Hand (*Rotiprotect – Nitril*, Firma Carl Roth, Emmendingen). Die Stimulustiere wurden mehrmals verwendet.

Den Versuchstieren, die ausschließlich das Verhaltensparadigma durchliefen, wurde an aufeinanderfolgenden Tagen zunächst ein bis dahin unbekanntes Jungtier präsentiert (Erstpräsentation). Diese Mäuse werden im folgenden auch als *exponierte* Tiere bezeichnet. Nach einem Retentionsintervall von 60 Minuten, 180 Minuten und 24 Stunden wurden simultan das bereits bekannte und ein neues, unbekanntes, Jungtier präsentiert. Die Investigationsdauer gegenüber den einzelnen Jungtieren wurde von einem erfahrenen Beobachter wie oben beschrieben dokumentiert.

Die Versuchstiere, deren *Bulbus olfactorius* für die Proteomanalyse weiterverarbeitet wurde, wurden nach der vierminütigen Jungtierpräsentation über ein Retentionsintervall von sechs Stunden isoliert gehalten, dann in tiefe Inhalationsnarkose mit Isofluran (*Forene*, Firma Abbott, Abbott Park, USA) versetzt und dekaptiert. Mit den nicht exponierten Kontrolltieren wurde zeitgleich in derselben Weise verfahren.

### 2.3 Präparation der *Bulbi olfactorii* für die Proteomanalyse

Bei insgesamt 13 WT-Mäusen und 13 nNOS-KO-Mäusen erfolgte auf eisgekühlter Unterlage die Präparation des paarig angelegten *Bulbus olfactorius*. Dazu wurde das im Bereich der Halswirbelsäule abgetrennte *Caput* zunächst von Haaren und Muskulatur befreit. Vom Hinterrand des *Foramen occipitale magnum* ausgehend wurde der knöchernen Schädel entlang der Mittellinie eröffnet. Nach Entfernung der Hirnhäute, Freilegen der *Bulbi* und Lösen des Gehirns von der Schädelbasis wurden das komplette Groß- und Kleinhirn *en bloc* entnommen. Entlang des Interhemisphärenspalts wurde das Gewebe sagittal in zwei Hälften geteilt. Beidseits wurde dann der *Bulbus olfactorius* vom *Cerebrum* abgesetzt. Das präparierte Gewebe wurde nach Entfernung sichtbarer Verunreinigungen auf  $10^{-3}$ g genau gewogen und in beschrifteten Eppendorf-Reaktionsgefäßen bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.4 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE)

Grundprinzip bei der Auftrennung komplexer Proteingemische durch zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist die Separation von Proteinen in einem elektrischen Feld einerseits nach ihrem isoelektrischen Punkt und andererseits nach ihrer Molekülmasse. Die Methode zeichnet sich durch ein extrem hohes Auflösungsvermögen aus und erlaubt es, aus einem Proteingemisch mehrere tausend Proteine in Form von Proteinpunkten auf dem Gel darzustellen und so für weitere Analytik zugänglich zu machen (Raymond und Aurell, 1962; O'Farrell, 1975).

Zunächst wurden die präparierten Gewebeproben des *Bulbus olfactorius* fraktioniert und für die Elektrophorese aufbereitet (Smalla et al., 2000). Aus jeder Gewebeprobe entstanden dabei eine synaptische Proteinfraction (SP-Fraktion), die hauptsächlich zytoskelettale Strukturen, wie zum Beispiel die PSD, enthält und eine Triton X-100-lösliche Proteinfraction (TP-Fraktion), in der zytosolische Proteine, integrale Membran-

proteine und auch tritonlösliche Komponenten der Extrazellulärmatrix vorliegen. Die Präparation erfolgte bei 4°C auf Wassereis für alle Proben am selben Tag. Jeder Gewebeprobe wurden im Eppendorf Reaktionsgefäß 300 µl Extraktionspuffer (siehe Anhang 10.3.1.1) zugesetzt. Es erfolgte die Homogenisierung des Gewebes mit einem Handhomogenisator bei 5000 rpm. Im Anschluss wurden weitere 300 µl Extraktionspuffer zugesetzt, das Gemisch in Zentrifugenröhrchen überführt und für eine Stunde bei 4°C gelagert. Danach wurde für eine Stunde bei 4°C mit 55.000 rpm (100.000 x g) zentrifugiert (Beckman-Tabletop, Rotor TLA 100.1, Firma Beckman Coulter, Fullerton, USA). Die tritonlöslichen Proteine im Überstand wurden als Teil der TP-Fraktion in Eppendorf Reaktionsgefäße pipettiert und auf Eis gelagert. Das Pellet im Zentrifugenröhrchen wurde in 300 µl Extraktionspuffer resuspendiert, mit weiteren 300 µl Puffer aufgefüllt und anschließend erneut für eine Stunde bei 4°C und 55.000 rpm zentrifugiert. Die tritonlöslichen Proteine im Überstand wurden jeweils mit den entsprechenden Überständen aus dem vorangegangenen Arbeitsschritt vereinigt. Die im Pellet verbliebenen Proteine wurden als SP-Fraktion in 200 µl *Aqua destillata* resuspendiert. Die Proben der SP- und TP-Fraktion wurden in Glasröhrchen überführt und mit je 10 ml Aceton bei -20°C über mehr als 12 Stunden gelagert. Danach erfolgte die Zentrifugation bei 4°C für 20 Minuten bei 10.000 rpm (12.000 x g; Sorvall-Zentrifuge RC-5B, Rotor SS-34; Firma Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Der Überstand wurde verworfen und die Proben der SP-Fraktion zwei Mal mit 5 ml Aceton und zwei Mal mit 5 ml *Aqua destillata* gewaschen und wie oben jeweils 20 Minuten bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Proben der TP-Fraktion wurden zwei Mal mit Aceton (gelagert bei -20°C) und drei Mal mit 80 % Ethanol (gelagert bei -20°C) gewaschen. Im Anschluss wurden alle Proben lyophilisiert (SpeedVac, Firma Virtis/Gardiner, New York, USA). Die im folgenden beschriebene Vorbereitung der Proben und Durchführung der zweidimensionalen (2D-) Gelelektrophorese orientierte sich am Vorgehen von Jimenez et al. (2002) und Li et al. (2004).

Die getrockneten Proben wurden über mehrere Stunden in 200 µl Rehydratierungspuffer (siehe Anhang 10.3.1.2) gelöst, in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und mit weiteren 200 µl Rehydratierungspuffer aufgefüllt (Rabilloud et al., 1994).

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976) mit einem Protein-Assay der Firma Bio-Rad, Hercules, USA (siehe

Anhang 10.3.1.3). 300 µl Messansatz wurden entweder 1 µl Probe, 1 µl Proteinstandard (1,5; 3,0; 7,5; 11,25 oder 15,0 µg Protein) oder 1 µl Rehydratierungspuffer (Leeransatz) zugesetzt. Gemessen wurde die Extinktion der Ansätze als Einfachbestimmung bei einer Wellenlänge von 595 nm im Photometer (Ultraspec 2100 pro, Firma Amersham Biosciences, Piscataway, USA). Anhand der Extinktion der Proteinstandards wurde gemäß des Lambert-Beer'schen Gesetzes die Proteinkonzentration der Proben ermittelt. Die Extinktion der Leeransätze wurde dabei von der der Proben- und Standardansätze subtrahiert.

Anhand der Proteinkonzentrationen pro Messansatz wurden für die SP- und TP-Fraktion die extrahierten Gesamtproteinmassen bestimmt und diese als prozentualer Anteil der in Kapitel 2.3 ermittelten Rohmasse des *Bulbus olfactorius* angegeben.

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden den Proben im Rehydratierungspuffer jeweils 2 µl 0,5 %-iger IPG-Puffer pH 3-10 (Firma Amersham Biosciences, Piscataway, USA) zugesetzt. Anschließend wurden die Proben bei Raumtemperatur fünf Minuten bei 20.000 x g zentrifugiert.

Aus den Proteinfractionen der WT- und nNOS-KO-Kontrolltiergruppen gingen neben den Gelen für die quantitative Bildanalyse (siehe unten) Gele mit höherer Proteinbeladung von bis zu 1 mg pro Gel aus gepooltem Material der Einzelproben für das massenspektrometrische Proteinscreening hervor. Für dieses *screening* ist eine hohe Gesamtproteinkonzentration im Hinblick auf gute Identifizierungsraten von Vorteil. Daher wurden für zwei Gele der TP-Fraktion und zwei Gele der SP-Fraktion je drei WT-Kontrolltierproteinextrakte und drei nNOS-KO-Kontrolltierproteinextrakte gepoolt. Die daraus entstandenen Gele wurden auch nach einem anderen Protokoll gefärbt (siehe unten).

400 µl jeder Probe wurden in die entsprechende Keramikwanne des isoelektrischen Fokussierungssystems (Ettan IPGphor, Firma Amersham Biosciences, Piscataway, USA) pipettiert und darin blasenfrei verteilt. Auf eine vollständige Angleichung der Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben wurde bewusst verzichtet, da diese Unterschiede gegebenenfalls später durch geeignete Normierungsverfahren vor der Bildanalyse ausgeglichen werden können. Dann wurde der IPG-Streifen (*Immobiline Dry Strip*, pH 3 bis 11, nicht linear, 18 cm, Firma Amersham Biosciences, Piscataway, USA) blasenfrei mit der Gelseite nach unten aufgelegt und anschließend mit 500 µl

*Cover Fluid* (Firma Amersham Biosciences, Piscataway, USA) überschichtet. In die Fokussierungskammer wurden entsprechend der vorgegebenen Polung maximal 10 nummerierte Fokussierungstreifen gegeben. Bei 20°C und einer Stromstärke von maximal 50  $\mu\text{A}$  pro Fokussierungstreifen erfolgte die isoelektrische Fokussierung gemäß dem folgenden Protokoll in Tabelle 2.

**Tabelle 2:** Protokoll zur isoelektrischen Fokussierung mittels Ettan IPGphor.

Schritt	Spannung [V]	Dauer [h]	Voltstunden [Vh]	Gradiententyp
Rehydratation	30	12:00	360	step-n-hold
1	500	1:00	500	step-n-hold
2	1000	1:00	1000	step-n-hold
3	8000	9:12	73600	step-n-hold
Gesamt		23:12	75460	

Nach Abschluss der isoelektrischen Fokussierung wurden die Fokussierungstreifen in Äquilibrations-Puffer I und II gewaschen.

Um aus dem Basis-Äquilibrations-Puffer (siehe Anhang 10.3.1.4) den Puffer I herzustellen, wurden 250 mg DTT in 25 ml Basis-Puffer gelöst (1 %), um Disulfidbrücken zu öffnen. Zur Herstellung des Puffers II wurden 625 mg Iodacetamid in 25 ml Basis-Äquilibrations-Puffer gegeben (2,5 %). Durch die Zugabe des Iodacetamids wurden die SH-Gruppen von Cysteinseitenketten des untersuchten Proteingemischs alkyliert, was auch bei der Analyse der Massenspektren berücksichtigt werden muss (siehe Kapitel 2.8).

Die Fokussierungstreifen wurden von der Deckflüssigkeit befreit und mit der Gelseite nach oben mit Hilfe einer Pinzette aus den Keramikwannen in die Äquilibrationswannen I transferiert. In jede Wanne wurden 2,4 ml Puffer I pipettiert. Nach 15 Minuten auf dem Rüttler wurden die Fokussierungstreifen in die Äquilibrationswannen II transferiert, und 2,4 ml des Puffers II zugesetzt. Die Äquilibration erfolgte wiederum für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Rüttler.

Je 11 11 %-ige *vertical DALT slab*-Gele (200x250x1,5 mm) für die zweite Dimension der Elektrophorese wurden parallel in einem *Gel-Caster-System* frisch hergestellt. Nach Platzierung und Nummerierung der Gel-Kassetten wurden 200 ml Ersatzlösung (siehe Anhang 10.3.1.5) ins System gegeben. Nach Zugabe von 11 ml APS (siehe Anhang 10.3.1.8) und 0,5 ml TEMED zur Basislösung für Acrylamidgele (siehe Anhang 10.3.1.9) wurde das Gemisch langsam in die Kassetten gegeben. Abschließend wurde

auf jedes Gel 1,0 ml *Overlay*-Puffer (siehe Anhang 10.3.1.10) pipettiert. Die Gele waren nach zwei Stunden vollständig polymerisiert.

Nachdem die Fokussierungsstreifen in SDS-Elektrophorese-Puffer (Anhang 10.3.1.11) befeuchtet wurden, wurden diese vorsichtig mit Hilfe eines Plastikspatels an die Oberfläche der Gele geschoben, ohne Blasen an der Berührungsfläche zu verursachen oder die vordere Glaswand der Gel-Kassette zu berühren. 100 µl Markerprotein (*Precision Protein Molecular Weight Standard* mit Banden bei 10; 15; 20; 25; 37; 50; 75; 100; 150 kDa; Firma Bio-Rad, Hercules, USA) wurden mit 400 µl SDS-Elektrophorese-Puffer (siehe Anhang 10.3.1.11) gemischt. Davon wurden je 20 µl auf die bereitliegenden Marker-Streifen pipettiert.

In die Gel-Kassetten wurden abschließend einige Milliliter 0,5 %-ige Agarose, die mit etwas Bromphenolblau versetzt war, gegeben. Nach fünf Minuten Polymerisationszeit wurden jeweils 10 Gel-Kassetten in den mit SDS-Elektrophorese-Puffer beladenen und auf 16°C vortemperierten Elektrophorese-Tank geladen (DALT vertical System, Firma Hoefer). Bei 85 V liefen die Gele bis zum Austritt der Farbfront aus der Unterseite der Gel-Kassetten etwa 16 Stunden.

Insgesamt entstanden 44 2D-Gele. Die 40 für die Bildanalyse bestimmten Gele wurden zur Proteindetektion einer massenspektrometrie-verträglichen Silber-Färbung nach Shevchenko et al. (1996) unterzogen:

Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Gele für 45 bis 60 Minuten in Fixationslösung (siehe Anhang 10.3.1.12) geschwenkt. Danach wurden sie 15 Minuten in 50 %-igem Methanol und 15 Minuten in *Aqua destillata* gewaschen. Es folgte die Sensitivierung der Gele durch dreiminütiges Schwenken in frisch angesetztem 0,002 %-igen Natriumthiosulfat (siehe Anhang 10.3.1.13) mit anschließendem Waschen in *Aqua destillata* (ein Mal zwei Minuten, dann ein Mal eine Minute). Die Silberfärbung erfolgte für 30 bis 45 Minuten in einer frisch angesetzten 0,15 %-igen Silbernitrat-Lösung (siehe Anhang 10.3.1.14). Danach wurden die Gele wieder ein Mal zwei Minuten und ein Mal eine Minute in *Aqua destillata* gewaschen. Die Entwicklung der Färbung erfolgte in Entwicklungs-Lösung (siehe Anhang 10.3.1.15). Nach Erreichen der gewünschten Färbungsintensität wurde die Entwicklungslösung durch 5 %-ige Eisessig-Lösung ausgetauscht, in der die Gele 20 bis 60 Minuten geschwenkt wurden. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden sie bei 4°C in 0,2 % Eisessig und 10 % Methanol gelagert.

Die vier Gele für das Proteinscreening (Gel Nr. 1043, 1045, 1047 und 1048) wurden nach einem Protokoll für eine Coomassie-Färbung behandelt. Dazu wurden die Gele über Nacht in einem Bad aus 50 % Ethanol und 3 % Phosphorsäure fixiert. Anschließend wurden sie drei Mal 15 Minuten mit Wasser gewaschen. Die Färbung erfolgte über Nacht mit Coomassie-Blau Färbelösung (G-250, siehe Anhang 10.3.1.16).

## 2.5 Quantitative Analyse der 2D-Gele

Die silber-gefärbten Gele wurden mittels eines Scanners (GS 800, Firma Bio-Rad, Hercules, USA) digitalisiert auf einem Personalcomputer gespeichert und dort mit dem Bildanalyse-Programm *PDQuest* (Version 8.0.0.035, Firma Bio-Rad, Hercules, USA) ausgewertet. *PDQuest* ist besonders zur Bildbearbeitung und Analyse von 2D-Gelen geeignet. Die Intensität eines Proteinpunktes auf dem Gel wird dabei als Grauwert dargestellt. Jedes Pixel auf dem digitalen Gel ist somit eindeutig durch seine horizontale und vertikale Position sowie durch seinen Grauwert (optische Dichte, OD) festgelegt. Die Gesamtintensität eines Gels entspricht der Summe der ODs aller Pixel. Ein Proteinpunkt wird auf dem digitalen Gel sichtbar, wenn seine OD größer ist als die des Hintergrundes. Durch Betrachtung des relativen Grauwertanteils eines Proteinpunktes bezogen auf die Summe aller Grauwerte auf dem jeweiligen Gel lassen sich auch unterschiedlich stark gefärbte Gele quantitativ miteinander vergleichen. Eine absolute Aussage über Proteinkonzentrationen ist mit diesem Analyseverfahren allerdings nicht möglich und auch nicht erforderlich.

Zunächst wurden die Bilddaten auf einheitliche, Proteinpunkt-enthaltende Bereiche zugeschnitten. Die Bildgröße wurde aus Kapazitätsgründen des Bildprozessors um einen für alle Gele gleichen Faktor reduziert. Insgesamt wurden acht Vergleichsgruppen (englisch *Matchsets*) mit je 10 Gelen gebildet (Tabelle 3). Aufgrund individueller Einstellungen und Bezüge innerhalb der einzelnen Vergleichsgruppen ist es nicht zulässig, die ermittelten Grauwerte über diese Gruppe hinaus direkt mit anderen zu vergleichen.

**Tabelle 3:** Zusammensetzung der analysierten Vergleichsgruppen (*Matchsets*).

TP-Fraktion		SP-Fraktion	
Versuchstiergruppe	Anzahl Gele	Versuchstiergruppe	Anzahl Gele
<i>Matchset 131:</i> Wildtyp Kontrollen gegen nNOS-KO Kontrollen		<i>Matchset 134:</i> Wildtyp Kontrollen gegen nNOS-KO Kontrollen	
Wildtyp Kontrolle	5	Wildtyp Kontrolle	5
nNOS-KO Kontrolle	5	nNOS-KO Kontrolle	5
<i>Matchset 130:</i> Wildtyp exponiert gegen nNOS-KO exponiert		<i>Matchset 135:</i> Wildtyp exponiert gegen nNOS-KO exponiert	
Wildtyp exponiert	5	Wildtyp exponiert	5
nNOS-KO exponiert	5	nNOS-KO exponiert	5
<i>Matchset 133:</i> Wildtyp Kontrollen gegen Wildtyp exponiert		<i>Matchset 137:</i> Wildtyp Kontrollen gegen Wildtyp exponiert	
Wildtyp Kontrolle	5	Wildtyp Kontrolle	5
Wildtyp exponiert	5	Wildtyp exponiert	5
<i>Matchset 132:</i> nNOS-KO Kontrollen gegen nNOS-KO exponiert		<i>Matchset 136:</i> nNOS-KO Kontrollen gegen nNOS-KO exponiert	
nNOS-KO Kontrolle	5	nNOS-KO Kontrolle	5
nNOS-KO exponiert	5	nNOS-KO exponiert	5

Innerhalb jeder Vergleichsgruppe wurden nach manueller Festlegung des kleinsten und farbschwächsten Proteinpunktes über einen programminternen Algorithmus alle sichtbaren Proteinpunkte detektiert und nummeriert. Entsprechend diesen Vorgaben wurde das digitale Gel gefiltert und geglättet, um den Kontrast zu erhöhen. Zur Identifizierung von Proteinpunkten liegt dem Algorithmus die Annahme zu Grunde, dass die Grauwertverteilung innerhalb eines idealen Proteinpunktes sich durch eine Gauß'sche Verteilungskurve beschreiben lässt. Damit ist auch die Dekonvolution mehrerer konfluierender Proteinpunkte möglich.

Die Proteinpunkte, die sich auf mehreren Gelen einer Vergleichsgruppe innerhalb eines vorher definierten Toleranzbereichs an derselben Position befanden, wurden automatisch als identische Punkte (sogenannte Übereinstimmungen oder *matches*) erkannt und in idealisierter Position auf ein virtuelles Mastergel projiziert. In den Fällen, in denen die automatische Zuordnung identischer Proteinpunkte nicht erfolgreich war, wurde die Zuordnung manuell vorgenommen. Dies war vor allem dann nötig, wenn Proteinpunkte in bestimmten Gelen in ihrer Intensität unterhalb des vorher festgelegten Mindestwerts lagen oder mehrere Punkte im Zielbereich dicht nebeneinander lagen, so dass eine eindeutige automatische Zuordnung trotz Nutzung der Gauß'schen Verteilungskurve nicht möglich war. Zur manuellen Zuordnung wurde der betreffende Bereich eines Gels ver-

größert und anhand prominenter Proteinpunkte in der Umgebung der fehlende Punkt identifiziert.

Aus allen eindeutig zuzuordnenden Proteinpunkten einer Vergleichsgruppe wurden durch programminternen Vergleich der relativen Grauwerte im t-Test nach Student die Proteinpunkte herausgefiltert, die sich innerhalb einer Vergleichsgruppe signifikant, das heißt mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$ , voneinander unterscheiden. Diese wurden nochmals manuell hinsichtlich ihrer korrekten Zuordnung überprüft und der weiteren statistischen Auswertung (siehe Kapitel 2.9) zugeführt.

## 2.6 Nano-LC-ESI-Iontrap-Analyse

Mit Hilfe massenspektrometrischer Analyseverfahren gelingt die Identifizierung von Proteinpunkten aus einem 2D-Gel anhand ihrer physikochemischen Eigenschaften.

Bei der Elektrospray-Ionisation (ESI) liegt die Probe generell in flüssiger Form vor. Durch eine vorgeschaltete Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) erfolgt eine zeitliche Separation der Peptide. Der aus der Trennsäule austretende Eluent speist direkt die Elektrospray-Quelle des Massenspektrometers (Wagner et al., 2003). Die Ionisierung der Peptide erfolgt bei der ESI-Methode bei normalem atmosphärischen Druck, indem die gelöste Probe nach der HPLC eine kleine Kapillare passiert, die eine Potentialdifferenz von + 500 bis + 4500 V relativ zu einer Bezugs Elektrode ausbildet. Es entsteht ein Aerosol aus elektrisch geladenen Tröpfchen. Durch das anliegende elektrische Feld werden Peptidionen in das Massenspektrometer geleitet und dort über mehrstufige Ionenoptiken in einer dreidimensionalen Ionenfalle gesammelt und periodisch ihre Masse/Ladung ( $m/z$ ) Quotienten gescannt. Im Gegensatz zur MALDI-Analyse sind bei der ESI-Methode die Peptide meistens mehrfach geladen. Die Ionisierung bei der ESI-Technik erfolgt sehr schonend. Durch die Akquirierung von MS/MS-Spektren wird bei der ESI-Iontrap-Analyse die Massegenauigkeit des untersuchten Ausgangsproteins wesentlich erhöht. Nachteilig sind der hohe Probenverbrauch und die Anfälligkeit gegenüber kontaminierenden Salzen, welche den Ionisationsvorgang behindern können (Glish und Vachet, 2003).

Um die in 2.5 als signifikant identifizierten Proteinpunkte für die Nano-LC-ESI-Analyse vorzubereiten, wurden diese manuell in staubarmer Umgebung unter Verwendung von Einmalhandschuhen und –armschützern aus den Gelen ausgestanzt. Die weitere

Verarbeitung der Proben für die massenspektrometrische Analyse orientierte sich am Vorgehen von Shevchenko et al. (1996). In jedes Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden nach Zugabe des ausgestanzten Gelstücks 500 µl der Lösung 1 (siehe Anhang 10.3.2.1) pipettiert, gefolgt von 10 Minuten Schütteln auf dem Rüttler. Der Überstand wurde verworfen und es wurden 500 µl der Lösung 2 (siehe Anhang 10.3.2.2) zugegeben, bevor wiederum 10 Minuten geschüttelt wurde. Nach Verwerfen des Überstands wurde Lösung 3 (siehe Anhang 10.3.2.3) zugegeben und nochmals 10 Minuten geschüttelt. In umgekehrter Reihenfolge wurden wie oben beschrieben nochmals die Lösungen 2 und 1 eingesetzt. Das verbleibende Pellet wurde 15 Minuten in der Lyophilisationsanlage getrocknet, bevor pro Reaktionsgefäß 5 µl Trypsinlösung zugeführt wurden. Nach kurzer Zentrifugation wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 25 µl Lösung 4 (siehe Anhang 10.3.2.4) pro Reaktionsgefäß pipettiert und die Proteine bei 37°C über Nacht enzymatisch hydrolysiert. Der tryptische Verdau wurde mit 10 µl 0,1 % Trifluoressigsäure gestoppt. Nach 10-minütigem Schütteln wurde der Überstand in 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Gelstücke am Boden der alten Reaktionsgefäße wurden mit 50 µl Acetonitril versetzt und 30 Minuten auf dem Rüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Überstand aus dem letzten Arbeitsschritt zu dem bereits überführten Überstand im 0,5 ml Reaktionsgefäß hinzugefügt. Es folgte das 90-minütige Trocknen in der Lyophilisationsanlage.

Die tryptisch verdauten Proteinproben wurden in 25 µl 0,1 % TFA gelöst, fünf Minuten geschüttelt und kurz zentrifugiert. Zur Reinigung und Extraktion der Peptide wurden 10 µl ZipTip-Pipettenspitzen der Firma Millipore (Billarica, USA) verwendet. Diese enthalten eine feinporige C18-Matrix, an die sich die Peptide durch hydrophobe Wechselwirkungen in wässrigem Milieu anlagern, während Kontaminanten, wie Salze, ausgewaschen werden. Die Pipette wurde zunächst mit 100 % Methanol gewaschen, gefolgt von zweimaligem Waschen mit 0,1 % TFA. Die Probe wurde 10 Mal durch die ZipTip-Säule aspiriert. Nach einem Waschschrift mit 0,1 % TFA wurden die Proben mit 0,1 % TFA/Acetonitril in Eppendorf-Reaktionsgefäße eluiert. Es folgte das 90-minütige Trocknen in der Lyophilisationsanlage.

Für die massenspektrometrische Analyse wurden die extrahierten Peptide in 10 µl 2 % Acetonitril, 0,05 % TFA gelöst und in den Autosampler der Ultimate/Swichos Nano-HPLC (Firma Dionex, Idstein) überführt. Die Proben wurden jeweils 10 Minuten bei

einer Flussrate von 30  $\mu$ l/min auf einer 1 mm PepMap-trapping Säule (C18-Matrix) gesammelt und dann *online* über eine 5 cm PepMap C18-Nanosäule mit 75  $\mu$ m Innendurchmesser (Firma Dionex, Idstein) getrennt. Die Separation der Peptide erfolgte entlang eines Acetonitrilgradienten bei einer Flussrate von 300 nl/min nach folgendem Schema:

- 0-40 Min 2 %-50 % Acetonitril
- 40-50 Min: 50 %-90 % Acetonitril
- 50-55 Min: 90 % Acetonitril
- 55-70 Min: 2 % Acetonitril

Die Nano-HPLC war über eine Nano-Spray Quelle (Firma Bruker Daltonik, Bremen) an ein Esquire HCT Iontrap Massenspektrometer (Firma Bruker Daltonik, Bremen) gekoppelt. Die zur Ionentrennung eingesetzte dreidimensionale Ionenfalle erzeugt durch drei rotationssymmetrische Elektroden ein spezielles elektrisches Feld, welches Ionen innerhalb eines bestimmten Massebereiches in einer stabilen Zirkulationsbahn fixiert. Zwischen der Ringelektrode und den Endkappenelektroden überlagern sich Gleich- und Wechselspannung. Während einer periodisch durchgeführten Messanalyse der eingefangenen Tochterionen wird die Amplitude des Wechselspannungsanteils erhöht. Je nach Ionenmasse werden die Ionen bei Erreichen unterschiedlicher Amplituden aus der Ionenfalle geschleudert und gelangen zum Detektor.

Die vorliegenden Analysen wurden ausnahmslos im positiven Auto-MS/MS-Modus durchgeführt. In diesem Modus wird nach einem oben beschriebenen MS-Scan der Ionenfalle ein MS/MS-Scan durchgeführt. Hierzu wird selektiv die abundanteste Ionenmasse des vorausgehenden MS-Scans in der Ionenfalle gesammelt, während alle anderen Ionen sofort wieder die Ionenfalle verlassen. Die so gesammelten „Mutterionen“ werden durch eine leichte Erhöhung ihrer kinetischen Energie mit Heliummolekülen zur Kollision gebracht. Diesen Vorgang nennt man *collision induced dissoziation*. Dabei brechen Peptide vorzugsweise an ihren Peptidbindungen und erzeugen somit eine sequenzabhängige Reihe von Tochterionen. Diese werden dann durch den sogenannten MS/MS-Scan bezüglich ihres m/z-Quotienten gescannt. Anschließend erfolgt ein neuer MS-Scan, aus dessen Ergebnis ein neuer Precursor für den nachfolgenden MS/MS-Scan gewählt wird.

Die Prozessierung der akquirierten MS/MS-Spektren erfolgte mit den Computerprogrammen *Data Analysis* und *Biotoools* der Firma Bruker Daltonik, Bremen. Die Zuordnung der Peptidsequenzen zu den vorhandenen Datenbankeinträgen erfolgte unter Verwendung einer *inhouse*-Version des Rechercheprogramms *Mascot* (Matrix Science, London, Großbritannien) und der NCBI-Datenbank (Kapitel 2.8).

## 2.7 MALDI LIFT-TOF-Analyse

Die Erzeugung eines ionisierten Gases aus den zu analysierenden Peptiden erfolgt bei der Matrix-assistierten Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) durch eine gepulste Laserbestrahlung der in eine Kristallmatrix eingebetteten Probe. Dieser Vorgang geschieht in der Regel im Vakuum. Die entstandenen einfach protonierten Ionen stehen für die Flugzeitanalyse (englisch *time of flight*, TOF) zur Verfügung. Grundprinzip ist dabei die Auftrennung verschiedener ionisierter Peptide aufgrund ihrer Geschwindigkeit. Die generierten Ionen entstehen zeitgleich und werden über ein konstantes Feldpotential beschleunigt. Danach besitzen alle Ionen gleicher Masse die gleiche kinetische Energie, so dass Ionen mit kleinen  $m/z$ -Quotienten die Flugstrecke bis zum Detektor schneller zurücklegen als solche mit großen  $m/z$ -Quotienten. Bei Kenntnis der kinetischen Energie, der Flugstrecke und der Molekülladung lässt sich dann aus der Flugzeit der  $m/z$ -Quotient berechnen. Der Einsatz eines Reflektors in der Flugbahn kompensiert kleine Geschwindigkeitsdifferenzen der Ionen mit gleichem  $m/z$ -Quotienten und erhöht damit die Auflösung der TOF-Spektrometrie (Glish et al., 2003). Vorteil der MALDI-Technologie ist der geringe Probenverbrauch, so dass durch wiederholte Messungen selbst Peptidkonzentrationen im Femtomol-Bereich identifiziert werden können. Im Gegensatz zur ESI-Technik eignet sich das MALDI-Verfahren sehr gut, um große Mengen unterschiedlicher Proteine in kurzer Zeit im Sinne eines Screenings zu identifizieren. Ferner ist die Empfindlichkeit gegenüber kontaminierenden Salzen in der Probe verhältnismäßig gering. Die erwähnte Kristallmatrix erleichtert zwar die Ionisation der Probe, führt aber gleichzeitig zu einem chemischen „Hintergrundrauschen“, so dass  $m/z$ -Signale  $< 500$  Da häufig verschleiert werden (Glish et al., 2003). Die in Kapitel 2.4 beschriebenen gepoolten und Coomassie-Blau gefärbten Gele wurden für das Proteomscreening verwendet. Dabei handelte es sich um zwei Gele mit Proteinen des *Bulbus olfactorius* von drei WT-Mäusen, fraktioniert als TP- (Gel Nr. 1043)

und SP-Fraktion (Gel Nr. 1047) und um zwei Gele mit Proteinen des *Bulbus olfactorius* von drei nNOS-KO- Mäusen, ebenfalls fraktioniert als TP- (Gel Nr. 1045) und SP-Fraktion (Gel Nr. 1048).

Die Gele wurden vor dem Ausstechen der Proteinpunkte über Nacht in ultrareinem Wasser (englisch *micropure water*, MPW) gelagert. Das Ausstechen der Proteinpunkte erfolgte computer- und robotergestützt. Die Gele wurden auf einen Scanner transferiert, mit MPW bedeckt und abgescannt. Am Personalcomputer erfolgte die Auswahl der auszustechnen Proteinpunkte mit dem Computerprogramm *spControl*, Version 3.0, der Firma Bruker Daltonik, Bremen. Alle Proteinpunkte wurden als Gelzylinder maschinell (*Proteineer SP*, Firma Bruker Daltonik, Bremen) ausgestanzt und in MPW-gefüllte Reaktionsgefäße pipettiert.

Der enzymatische Verdau (*in-gel digestion*) erfolgte mit Hilfe des *Proteineer DP*-Automaten und des Computerprogramms *dpControl* (beide Firma Bruker Daltonik, Bremen). Dazu wurden zunächst die Puffer 1 bis 4 (siehe Anhang 10.3.3) angesetzt. Im ersten Schritt wurde das den ausgestanzten Gelzylindern zugesetzte MPW durch Abpipettieren entzogen. Dann wurde jede Probe insgesamt neun Mal gewaschen. Der erste, dritte und fünfte Waschschrift erfolgte mit je 15 µl des wasserhaltigen Puffers 1 (siehe Anhang 10.3.3.1). Für den zweiten, vierten und sechsten Waschschrift wurden je 15 µl des acetonitril-haltigen Puffers 2 (siehe Anhang 10.3.3.2) verwendet. Für die Waschschrift 7 bis 9, sowie das sich anschließende Schrumpfen und zweimalige Trocknen der Gelzylinder wurde der rein acetonitril-haltige Puffer 3 (siehe Anhang 10.3.3.3) verwendet. In der Zwischenzeit wurde der trypsinhaltige Puffer 5 (siehe Anhang 10.3.3.5) frisch zubereitet. Von diesem wurden nun 4 µl zu jedem Gelzylinder gegeben. Nach 10-minütigem Schwellenlassen der Gelpartikel wurde der überschüssige Puffer 5 abpipettiert. Bei 30°C Inkubationstemperatur und nach Benetzen der Proben mit Puffer 1 dauerte der enzymatische Verdau mit Trypsin vier Stunden. Mit je 10 µl Extraktionspuffer (siehe Anhang 10.3.3.4) wurden die Peptide dann aus dem Gel entfernt.

In der Zwischenzeit wurde die Target-Platte (*MTP AnchorChip 200*, Firma Bruker Daltonik, Bremen) zum Auftragen der Proben vorbereitet. Auf eine Platte lassen sich maximal 384 Proben auftragen. Nach Säubern der Platte mit Aceton, n-Heptan, 2-Propanol (15 Minuten im Ultraschallbad) und MPW (15 Min. im Ultraschallbad) wurde die Alpha-Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure-haltige Matrixlösung (siehe Anhang 10.3.3.6)

aufgetragen. Dann wurden pro Position 4 µl Probe beziehungsweise 3,1 µl Kalibrier-Standard, bestehend aus Angiotensin I und II, Substanz P, Bombesin, ACTH und Somatostatin, aufgetragen. Vor Einschleusen der Targetplatte in das *Ultraflex TOF/TOF* Massenspektrometer der Firma Bruker Daltonik, Bremen (Suckau et al., 2003) wurde zum Entfernen von Verunreinigungen über jede Messposition kurzzeitig 0,1 % TFA pipettiert.

Es wurden die MS-Spektren aller Proben auf der Target-Platte detektiert. Die kinetische Energie der generierten Ionen lag bei maximal 25 keV. Pro Probe wurde an unterschiedlichen Positionen insgesamt 210 Mal mit dem gepulsten Laser ein ionisiertes Gas erzeugt und die resultierenden Spektren detektiert. Das so entstandene Summenspektrum wurde automatisch mit den Computerprogrammen *Data Analysis* und *Biotoools* der Firma Bruker Daltonik, Bremen, prozessiert. Die Datenbankrecherche zur Zuordnung des „Peptidmassenfingerabdrucks“ erfolgte unter Verwendung von lizenzierten Computerprogrammen der Firma Matrix Science (*Mascot*, London, Großbritannien) in der MSDB- und NCBI-Datenbank (Kapitel 2.8). In Einzelfällen erfolgte unter Verwendung der MALDI LIFT-TOF/TOF-Analytik die Akquirierung von MS/MS-Spektren (Suckau et al., 2003; Weitzdoerfer et al., 2008).

## 2.8 Datenbankrecherche

Ein Massenspektrum mehrerer Peptide, die durch kontrollierten enzymatischen Verdau eines Proteins entstanden sind, zeichnet sich durch eine hohe Spezifität aus und ist bildlich gesprochen mit einem Fingerabdruck des Proteins vergleichbar. Vergleicht man ein unbekanntes Massenspektrum mit Spektren von Proteinen, die bereits in einer Datenbank enthalten sind, lässt sich damit das gesuchte Protein identifizieren. Man spricht daher auch von Peptidmassen-Fingerabdrücken (PMF). Die Schwachstelle der Proteinidentifikation mittels PMF liegt in der Kombinatorik der Aminosäuren begründet. Eine bestimmte diskrete Masse kann bis auf mehrere Kommastellen genau meistens von vielen unterschiedlichen Aminosäure-Kombinationen realisiert werden. Dadurch steigt mit der Anzahl der identifizierten Peptide die Wahrscheinlichkeit für ein bestimmtes Protein, ohne jedoch jemals 100% Sicherheit zu erreichen. Es ist unwahrscheinlich, dass die Masse des exprimierten und prozessierten Proteins exakt dem Eintrag in der Daten-

bank gleicht. Ein PMF ist daher immer nur die statistisch wahrscheinlichste Zuordnung von Massenspektrum und Protein.

In der vorliegenden Arbeit wurde auf die massenspektrometrische Datenbank (MSDB) der Abteilung für Proteomforschung am Hammersmith Campus des Imperial College in London, Großbritannien und die Datenbank des *National Center for Biotechnology* (NCBI) in Bethesda, USA, zurückgegriffen..

Die Datenbankrecherche erfolgte sowohl über den *Mascot*-Server der Firma Matrix Science (London, Großbritannien; [www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com); Perkins et al., 1999), über den in beiden oben erwähnten Datenbanken gesucht werden kann als auch das *Profound*-Portal des massenspektrometrischen Labors der Rockefeller Universität (New York, USA; [www.prowl.rockefeller.edu](http://www.prowl.rockefeller.edu); Zhang und Chait, 2000), das lediglich auf die NCBI-Datenbank zugreift.

Die Portale unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Suchalgorithmen (Chamrad et al., 2004), so dass ein sequentielles Vorgehen gewählt wurde: Zunächst wurden alle Massenspektren automatisch über das *Mascot*-Portal recherchiert. Wurden dabei keine signifikanten Ergebnisse erzielt, wurden die Massenspektren der MALDI TOF-Analyse, manuell in das *Profound*-System eingespeist.

Bei der Suche über das *Mascot*-System erhält jedes theoretisch zu dem gesuchten Spektrum passende Protein einen Rang, den M-Wert, der auf der wahrscheinlichkeit-basierten Implementierung des Mowse-Algorithmus (Pappin et al., 1993) beruht. Die Angabe erfolgt als  $10 \cdot \text{LOG}_{10}(P)$ , wobei P für die absolute Trefferwahrscheinlichkeit steht. Abhängig von der Art des eingespeisten Spektrums (PMF oder MS/MS-Spektrum), der zulässigen Massentoleranz und dem Zulassen nicht gespaltener Proteinbindungen wird programmintern das Signifikanzniveau mit  $p \leq 0,05$  festgelegt. Proteine, die aufgrund ihres M-Wertes diese Bedingung erfüllen, erscheinen nach ihren Rängen geordnet in der Ausgabe. Die Signifikanzschwelle entspricht nicht konstant demselben M-Wert, jedoch sind in der Regel bei MS-Spektren M-Werte  $> 60$  signifikant. Bei MS/MS-Spektren reicht ein M-Wert  $> 30$ .

Das *Profound*-Portal benutzt statt des M-Wertes einen Z-Wert, um die Signifikanz der Suchergebnisse anzuzeigen. Ein Z-Wert  $\geq 1,645$  bedeutet, dass weniger als 5 % der zufälligen Proteinzusordnungen einen höheren Z-Wert erreichen können als das gesuchte Protein.

*Mascot* und *Profound* bieten neben der Eingabe der m/z-Quotienten der Massenspektren die Möglichkeit, weitere Parameter vorzugeben und so die Datenbankrecherche nach dem entsprechenden Protein einzugrenzen. Dabei sind Spezifika der für die massenspektrometrische Analyse verwendeten Geräte und die Art der erzeugten Spektren zu berücksichtigen. Die MALDI TOF-Spektren wurden als PMF in die Datenbankrecherche eingespeist. Die Spektren der Nano-LC-ESI-Analyse als MS/MS-Ionen Spektren. Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die verwendeten Suchparameter.

**Tabelle 4:** Suchparameter in Abhängigkeit von der verwendeten Analyseverfahren.

Method	MALDI TOF	ESI-Iontrap
Art der Suche	Peptide Mass Fingerprint	MS/MS-Ionen-Suche
Enzym	Trypsin	Trypsin
Feste Modifikationen	Carbamidomethyl-Gruppe an Cystein	Carbamidomethyl-Gruppe an Cystein
Variable Modifikationen	Oxidation an Methionin	Oxidation an Methionin
Massen-Werte	monoisotopisch	monoisotopisch
Proteinmasse	unbegrenzt	unbegrenzt
Massentoleranz	$\pm 25$ ppm	$\pm 2$ Da
Ladungszustand der Peptide	+1	+2
Max. nicht gespaltene Peptidbindungen	0	1
Speziesbeschränkung	<i>Mus musculus</i>	Rodentia

Die Ausgabe der identifizierten Proteine enthielt neben ihrem Namen, ihre Eintragsnummer in der MSDB oder NCBI-Datenbank, das theoretische Molekulargewicht und den isoelektrischen Punkt, den M- beziehungsweise Z-Wert, die Sequenzabdeckung in Prozent, die Anzahl der zugeordneten Peptide innerhalb eines Proteins und bei MS/MS-Spektren zusätzlich deren Sequenz.

In der Proteindatenbank *Swissprot* ([www.expasy.ch](http://www.expasy.ch); Boeckmann et al., 2003) des Schweizerischen Instituts für Bioinformatik (Basel, Schweiz) wurden anhand der Eintragsnummern die dort hinterlegten Proteineigenschaften, wie isoelektrischer Punkt und Molekulargewicht des unprozessierten Vorläufermoleküls, recherchiert und mit den experimentell ermittelten Daten verglichen. Kamen dennoch mehrere Proteine als Korrelate eines Massenspektrums in Frage, erfolgte die Zuordnung nach folgender Rangfolge: Spezies (*Mus musculus*), M- beziehungsweise Z-Wert, Sequenzabdeckung und Anzahl der zugeordneten Peptide.

## 2.9 Statistische Auswertung und Ergebnisdarstellung

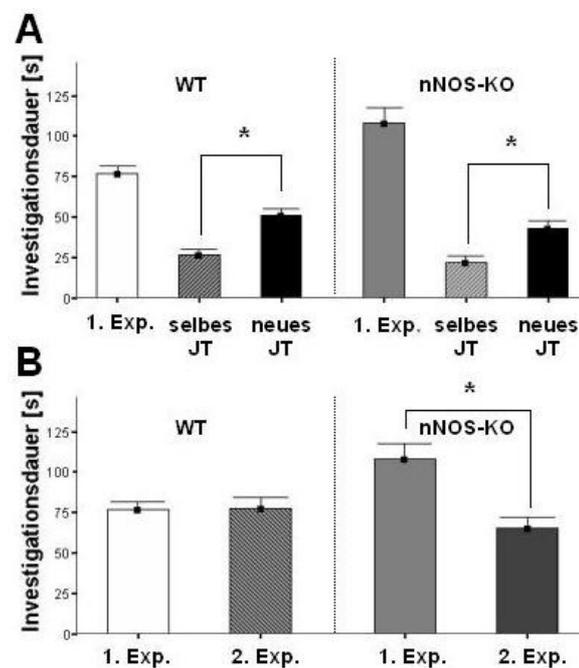
Abgesehen von den oben beschriebenen Algorithmen zur Zuordnung von PMF- und MS/MS-Spektren (siehe Kapitel 2.8) erfolgte die statistische Auswertung der erhobenen Daten unter Verwendung des lizenzierten Computerprogrammes *SPSS für Windows* (Version 11.5.1, Firma SPSS, Chicago, USA). Das zweiseitige Signifikanzniveau wurde für jede Bestimmung mit  $p \leq 0,05$  festgelegt. Nach Überprüfung auf Vorliegen einer Normalverteilung im Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest wurde die Analyse der Daten unter Verwendung metrischer Tests durchgeführt. Beim Vergleich der Investigationsdauern ein- und derselben Maus zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Verhaltensparadigma wurde der t-Test für gepaarte Stichproben angewendet (siehe Kapitel 2.2). Beim Vergleich der Investigationszeiten (siehe Kapitel 2.2) und Gesamtproteinmassen (siehe Kapitel 2.4) zwischen WT- und nNOS-KO-Mäusen sowie dem Vergleich der relativen optischen Dichten innerhalb der Vergleichsgruppen bei der quantitativen Analyse der Proteinpunkte auf den 2D-Gelen (siehe Kapitel 2.5) kam der t-Test für unabhängige Stichproben zum Einsatz.

Die Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwert + Standardfehler des Mittelwertes (SEM) in Balkendiagrammen. In den Abbildungen im Anhang wurden die optischen Dichten als Einzelwerte dargestellt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Verhaltensanalyse

Abbildung 6A zeigt die Investigationsdauer der nNOS-KO- und WT-Mäuse in der sozialen Diskrimination bei einem Retentionsintervall von 60 Minuten. Bei beiden Genotypen wurde während der zweiten Präsentation das neue Jungtier signifikant länger untersucht als das bereits aus der Erstpräsentation bekannte. Offensichtlich waren sowohl WT- als auch nNOS-KO-Mäuse in der Lage, das vorher präsentierte Jungtier wiederzuerkennen. In Abbildung 6B ist die Gesamtinvestigationsdauer während der ersten und der zweiten Jungtierpräsentation dargestellt. Bei WT-Mäusen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Gesamtinvestigationsdauer beobachtet werden. nNOS-KO-Mäuse zeigten kürzere Gesamtinvestigationsdauern während der zweiten Jungtierpräsentation.

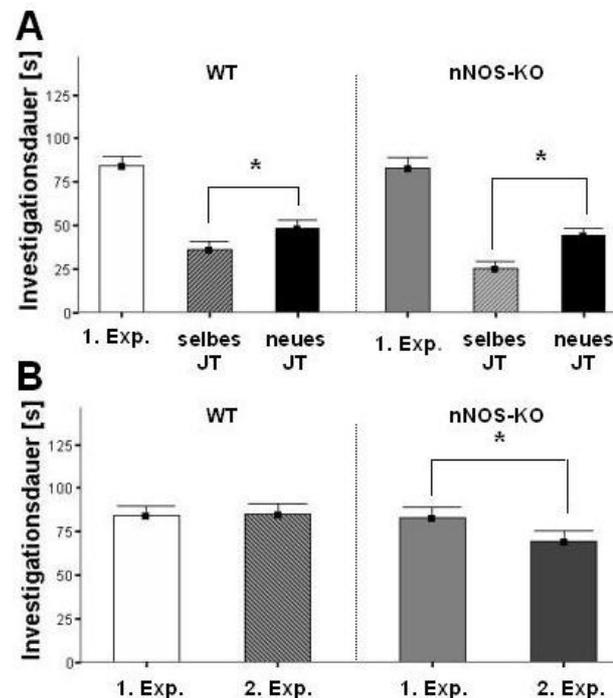


**Abbildung 6: (A)** Investigationsdauer (Mittelwert + SEM) von 20 WT- und 19 nNOS-KO-Mäusen bei einem Retentionsintervall von 60 Minuten gegenüber dem selben und einem neuen Jungtier (JT).

\*  $p = 0,001$  für WT und  $p = 0,001$  für nNOS-KO gegen selbes JT; gepaarter t-Test.

**(B)** Vergleich der Gesamtinvestigationsdauer (Mittelwert + SEM) der zweiten Präsentation (Exp.) mit der ersten. \*  $p = 0,001$  für nNOS-KO gegen zweite Exp.; gepaarter t-Test.

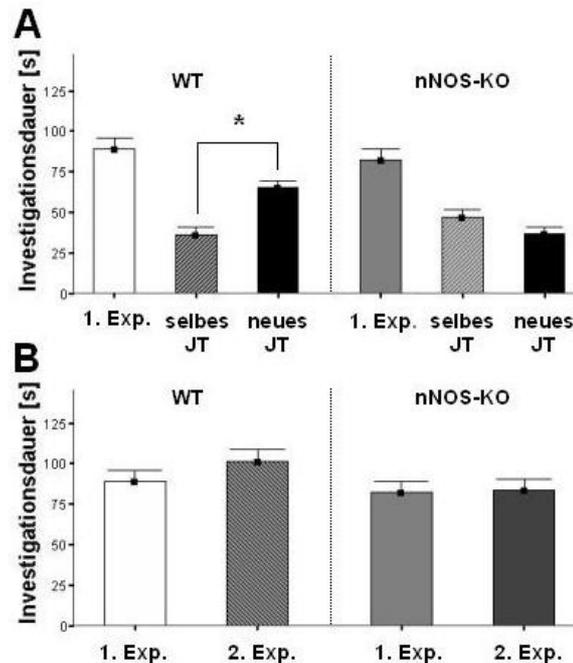
In Abbildung 7A ist die Investigationsdauer der nNOS-KO- und WT-Mäuse bei einem Retentionsintervall von 180 Minuten dargestellt. Bei der Präsentation des bekannten und eines unbekanntes Jungtieres wurde dem unbekanntes Jungtier von beiden Mausstämmen signifikant länger investigatorisches Verhalten entgegengebracht. Beide Genotypen waren auch nach diesem Retentionsintervall in der Lage, zwischen bekanntem und unbekanntem Jungtier zu unterscheiden. Die in Abbildung 7B dargestellte Gesamtinvestigationsdauer unterscheidet sich bei WT-Mäusen zwischen erster und zweiter Jungtierpräsentation nicht signifikant, wohl aber bei nNOS-KO-Mäusen.



**Abbildung 7: (A)** Investigationsdauer (Mittelwert + SEM) von 20 WT- und 19 nNOS-KO-Mäusen bei einem Retentionsintervall von 180 Minuten gegenüber dem selben und einem neuen Jungtier (JT). \*  $p = 0,042$  für WT und  $p = 0,001$  für nNOS-KO gegen selbes JT; gepaarter t-Test. **(B)** Vergleich der Gesamtinvestigationsdauer (Mittelwert + SEM) der zweiten Präsentation (Exp.) mit der ersten. \*  $p = 0,008$  gegen zweite Exp.; gepaarter t-Test.

Die Investigationsdauer der nNOS-KO- und WT-Mäuse bei einem Retentionsintervall von 24 Stunden ist in Abbildung 8A dargestellt. Bei der Präsentation des bekannten und eines unbekanntes Jungtieres brachten WT-Mäuse dem unbekanntes Jungtier signifikant länger investigatorisches Verhalten entgegen. Bei nNOS-KO-Mäusen war kein signifikanter Unterschied in der Investigationsdauer zwischen dem bekannten und

unbekannten Jungtier beobachtbar. Offensichtlich waren nach einem Retentionsintervall von 24 Stunden nur noch die WT-Mäuse in der Lage, das bekannte von dem unbekanntem Jungtier zu unterscheiden. Wie Abbildung 8B zeigt, unterschieden sich sowohl WT- als auch nNOS-KO-Mäuse beim Vergleich der Gesamtinvestigationsdauern zwischen erster und zweiter Jungtierpräsentation nicht signifikant.



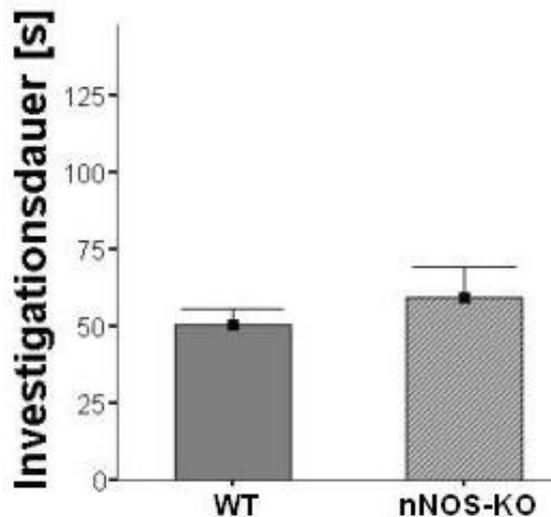
**Abbildung 8: (A)** Investigationsdauer (Mittelwert + SEM) von 20 WT- und 19 nNOS-KO-Mäusen bei einem Retentionsintervall von 24 Stunden gegenüber dem selben und einem neuen Jungtier (JT).

\*  $p = 0,001$  für WT gegen selbes JT; gepaarter t-Test.

**(B)** Vergleich der Gesamtinvestigationsdauer (Mittelwert + SEM) der zweiten Präsentation (Exp.) mit der ersten; gepaarter t-Test.

Aggressives oder sexuell motiviertes Verhalten wurde unabhängig vom Retentionsintervall in keiner Versuchstiergruppe vermehrt festgestellt.

In Abbildung 9 ist die durchschnittliche Investigationsdauer der Versuchstiere dargestellt, denen sechs Stunden nach Erstpräsentation eines Jungtieres der *Bulbus olfactorius* für die Proteomanalyse entnommen wurde. Beim Vergleich der Mittelwerte unter Verwendung des t-Tests nach Student zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Auch während dieses Experimentes wurde bei keinem der Versuchstiere aggressives oder inadäquates Paarungsverhalten gemäß der unter Kapitel 2.2 aufgeführten Kriterien beobachtet.



**Abbildung 9:** Investigationsdauer (Mittelwert + SEM) von 5 WT- und 5 nNOS-KO-Mäusen während vierminütiger Jungtierpräsentation.

### 3.2 Ergebnisse des Proteomscreenings

Das Rohgewicht der *Bulbi olfactorii* betrug  $28,8 \pm 3,6$  mg. Die Proteinkonzentration der SP-Fraktion lag bei durchschnittlich  $5,18 \pm 1,51$   $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Für die TP-Fraktion wurde eine mittlere Proteinkonzentration von  $1,43 \pm 0,14$   $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  ermittelt. Die Proteinmassen der SP-Fraktion hatten bei beiden Genotypen einen Anteil von 7,2 % an der Rohmasse. Durchschnittlich 2 % der Rohmasse entfielen auf die Proteine der TP-Fraktion. Die Präparationen der *Bulbi olfactorii* der untersuchten Untergruppen unterschieden sich in ihrem Gesamtgewicht und dem Anteil der pro Fraktion isolierten Proteine im t-Test nach Student nicht signifikant.

Durch Nutzung der MALDI LIFT-TOF-Technik konnten auf vier 2D-Gelen insgesamt 469 Proteinpunkte bei einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  identifiziert werden. Auf den beiden gepoolten Gelen der TP-Fraktion unstimulierter Kontrolltiere waren dies 156 (Gel 1043) beziehungsweise 85 Punkte (Gel 1045). In der SP-Proteinfraktion konnten die Massenspektren von jeweils 121 (Gel 1047) beziehungsweise 107 (Gel 1048) Proteinpunkten signifikant den in Proteindatenbanken hinterlegten Daten zugeordnet werden. Aufgeschlüsselt nach Fraktionen fanden sich in der SP-Fraktion 84 und in der TP-Fraktion 96 verschiedene Proteine. Die Differenz zu der Gesamtzahl identifizierter Proteine innerhalb einer Fraktion begründet sich mit dem Vorliegen ein- und desselben Proteins in mehreren Proteinpunkten. Insgesamt konnten 164 verschiedene Proteine identifiziert werden. Die Summe der Proteine beider oben genannter Fraktio-

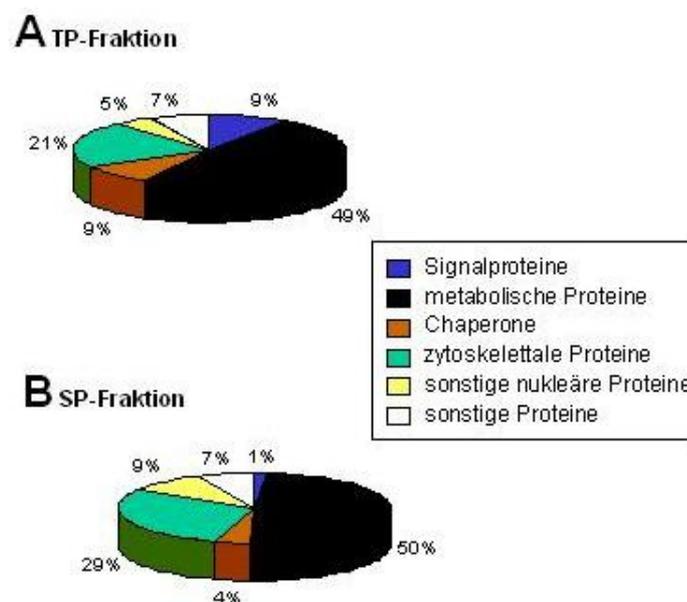
nen ist größer als die Gesamtanzahl, weil mehrfach vorkommende Proteine nur einfach gezählt wurden. Des Weiteren wurden Proteine, die im Datenbankvergleich zunächst als „ähnlich“, Fragmente oder homolog mit dem entsprechenden cDNA-Klon der Datenbank des *RIKEN Genomics Sciences Center* (Yokohama, Japan) angegeben wurden, als Mehrfachnennungen desselben Proteins gezählt. Die Proteinliste wurde weiterhin um 11 Proteine der SP-Fraktion (30 kDa Untereinheit der NADH-Ubichinon Oxidoreductase, BC031593 Protein, heterogenes nukleäres Ribonucleoprotein D, MKIAA 0400 Protein, Neuronales Protein 25, NIPI-ähnliches Protein, proteasomale Untereinheit alpha-3, proteasomale Untereinheit beta-6, Proteindisulfid-isomerase P5, Tropomyosin alpha-3-Kette, Ubiquitin-spezifische Protease 19) und acht Proteine der TP-Fraktion (Alpha-Synuclein, O-Untereinheit des F1 Komplexes der ATP Synthase, Poly(rC)-bindendes Protein 2, Protein 25 der Tumornekrosefaktor Superfamilie, Serin-Transmembranprotease 2, Stathmin 1-ähnliches Protein, Ubiquitin-konjugierendes Enzym E2, Variante 1, Untereinheit alpha des Elektron transferierenden Flavoproteins), die nur mittels Nano-LC-ESI-Analytik bestimmt werden konnten, auf insgesamt 488 identifizierte Proteinpunkte ergänzt. Die Abbildungen I und II im Anhang geben eine Übersicht über die Position der identifizierten Proteine auf dem Coomassie-Blau gefärbten Gel der entsprechenden Proteinfraktion. Angegeben sind dabei die Eintragsnummern in der *Swissprot*-Datenbank ([www.expasy.ch](http://www.expasy.ch)) der identifizierten Proteine. Die Tabellen I bis IV im Anhang enthalten Listen aller auf den Coomassie-Gelen identifizierten Proteinpunkte mit Angaben zum theoretischen Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt, der Sequenzabdeckung, dem Erwartungswert und den Peptidsequenzen. Alle identifizierten Proteine wurden dabei gemäß ihrer überwiegenden zellulären Funktionsweise Lokalisation in die folgenden sechs Gruppen eingeteilt:

- 1.) Signalproteine (zum Beispiel 14-3-3-Proteine)
- 2.) Metabolische Proteine (zum Beispiel Aldolase)
- 3.) Chaperone (zum Beispiel Hitzeschockproteine)
- 4.) Zytoskelettale Proteine (zum Beispiel Tubuline)
- 5.) Nukleäre Proteine (zum Beispiel Enzyme des Transkriptionsvorgangs)
- 6.) Sonstige Proteine (zum Beispiel Albumin)

Die Differenzen zwischen theoretischem Molekulargewicht sowie isoelektrischem Punkt und der tatsächlichen Position eines Proteins auf dem 2D-Gel sind erklärbar

durch posttranslationale Proteinmodifikationen, Modifikationen der Proteine während der Verarbeitung (zum Beispiel Methioninoxidation oder Carbamidomethylgruppenbildung) sowie die Angabe des theoretischen Molekulargewichts und isoelektrischen Punktes des ungespleißten Vorläuferproteins. Besonders erwähnenswert sind Proteine, die in Signaltransduktionskaskaden eingebunden sind: Calbindin-2, Calretinin, die Adenylat-Kinase 1, die 14-3-3-Proteine epsilon, gamma und zeta/delta sowie die UMP-CMP Kinase.

In Abbildung 10 wurden die identifizierten Proteine einer der sechs oben genannten Kategorien zugeordnet und ihre Häufigkeitsverteilung in einem Kreisdiagramm dargestellt. In beiden Proteinfractionen bildeten Proteine mit überwiegenden Aufgaben im Zellmetabolismus die größte Gruppe, gefolgt von zytoskelettalen Proteinen. Chaperone und Signalproteine waren bevorzugt in der TP-Fraktion lokalisiert.



**Abbildung 10:** Prozentuale Verteilung aller identifizierten Proteine nach ihrer überwiegenden zellulären Funktion bzw. Lokalisation. **(A)** Proteinverteilung in der TP-Fraktion. **(B)** Proteinverteilung in der SP-Fraktion.

### 3.3 Ergebnisse der Proteinanalyse in den Vergleichsgruppen

Im Folgenden werden die Ergebnisse der quantitativen Proteinanalyse aller Vergleichsgruppen (vergleiche Tabelle 3) präsentiert. Die Gruppenbezeichnung *exponiert* bedeutet, dass den entsprechenden Versuchstieren sechs Stunden vor der Probenentnahme, (siehe Kapitel 2.2) ein unbekanntes Jungtier präsentiert wurde. Zu jedem Proteinpunkt

sind der Quotient aus den Mittelwerten der optischen Dichte von WT- und nNOS-KO-Tieren (WT/KO-Ratio) beziehungsweise exponierten zu Kontrolltieren (exp/Ctrl-Ratio) und das Signifikanzniveau der verglichenen Gruppen im t-Test für unabhängige Stichproben angegeben. Im Anhang sind auf je einem repräsentativen Gel pro Vergleichsgruppe alle hier besprochenen Proteinpunkte markiert und die ermittelten optischen Dichten in ppm graphisch dargestellt (Kapitel 10.2, Abbildungen III bis X). Die Tabellen V bis VIII, auf die in diesem Abschnitt verwiesen wird, befinden sich ebenfalls im Anhang (Kapitel 10.1) und enthalten aufgeschlüsselt nach Proteinfraction folgende Angaben zu den identifizierten Proteinen: Zugriffsnummer in der *Swissprot*-Datenbank, Proteinname, Proteinpunktnummer auf dem entsprechenden Gel, theoretisches Molekulargewicht sowie isoelektrischer Punkt, Anzahl und prozentuale Sequenzabdeckung der übereinstimmenden und Peptide sowie die Mittelwerte der verglichenen optischen Dichten in ppm  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) und Irrtumswahrscheinlichkeit. Einige Proteinpunkte zeigten sich bei der quantitativen Analyse signifikant verschieden, jedoch konnte in der Nano-LC-ESI-Analytik kein MS/MS-Spektrum detektiert werden, so dass – sofern vorhanden – auf das mit der MALDI LIFT-TOF-Analytik detektierte MS-Spektrum zurückgegriffen wurde. Es sei nochmals darauf hingewiesen, dass ein Vergleich der absoluten optischen Dichte über eine Vergleichsgruppe hinaus aufgrund methodischer Besonderheiten in der Grauwertbestimmung nicht erfolgen darf (vergleiche Kapitel 2.5).

### 3.3.1 Vergleich von WT- und nNOS-KO-Tieren in der Kontrollgruppe

Bei der Analyse der optischen Dichten der Proteinpunkte in der WT- und nNOS-KO-Kontrollgruppe konnte in der SP-Fraktion in sieben Fällen ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung IV): das heterogene nukleäre Ribonucleoprotein K (WT/KO-Ratio 1,7;  $p = 0,042$ ), das Neuronale Protein 25 (Synonyme: NP25, Transgelin-3; WT/KO-Ratio 2,19;  $p = 0,032$ ), die spannungsabhängigen anionenselektiven Kanäle VDAC-1 (WT/KO-Ratio 0,69;  $p = 0,038$ ) und VDAC-2 (WT/KO-Ratio 3,26;  $p = 0,007$ ), die Ubiquitin-spezifische Protease 19 (WT/KO-Ratio 2,05;  $p = 0,04$ ), die proteasomale Untereinheit alpha-3 (WT/KO-Ratio 1,43;  $p = 0,048$ ) und die alpha-6 Kette des Tubulins (WT/KO-Ratio 2,68;  $p = 0,015$ ).

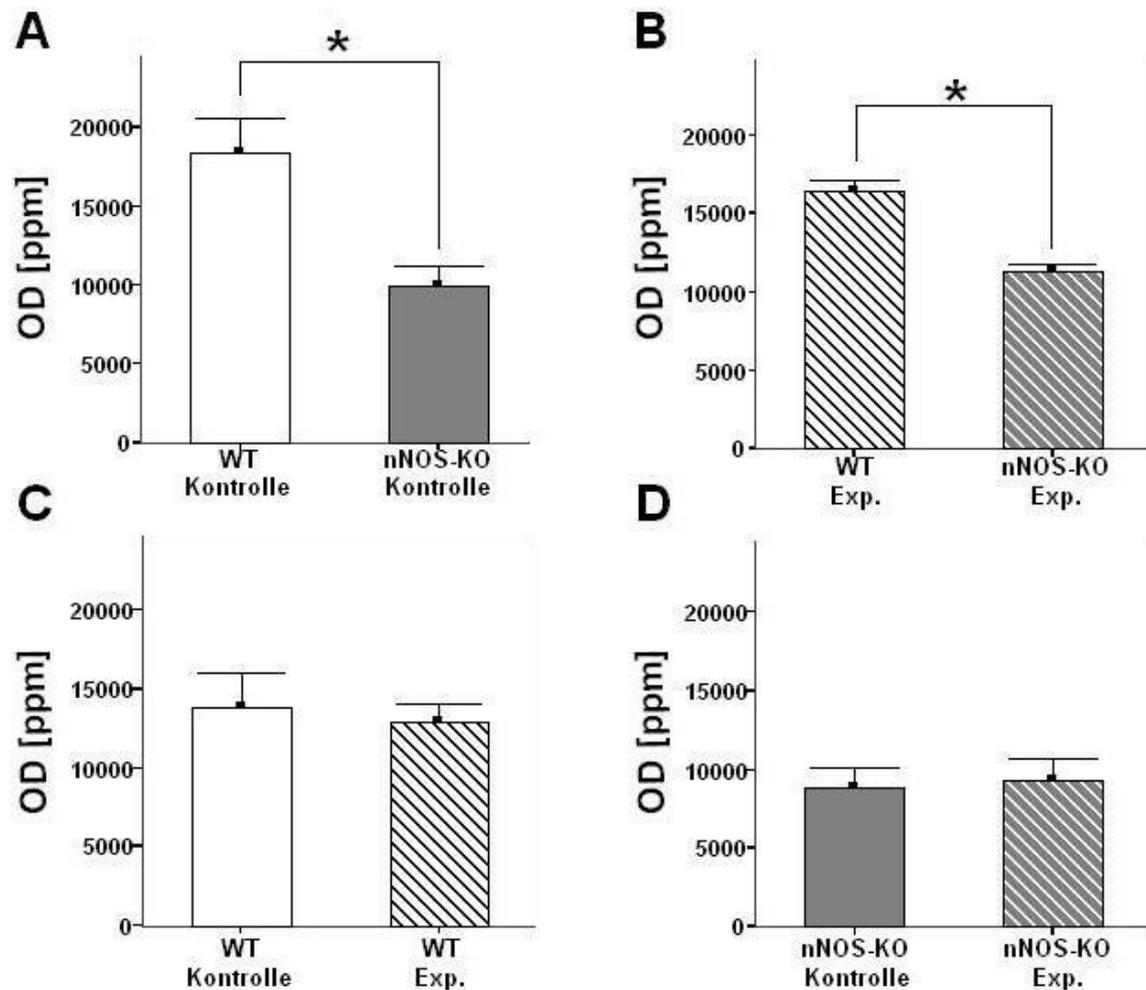
In der TP-Fraktion traf dies für sechs Proteine zu (Abbildung III): das Alpha-Synuclein (WT/KO-Ratio 1,86;  $p = 0,014$ ), die Triosephosphat-Isomerase (WT/KO-Ratio 1,42;  $p = 0,027$ ), die 3-Hydroxyisobutyrat-Dehydrogenase (WT/KO-Ratio 1,37;  $p = 0,031$ ), die alpha-Untereinheit des Elektronen-transferierenden Flavoproteins (WT/KO-Ratio 1,59;  $p = 0,035$ ), das Peroxiredoxin-2 (WT/KO-Ratio 1,92;  $p = 0,028$ ) und das Ubiquitin-konjugierende Enzym E2 O (WT/KO-Ratio 0,31;  $p = 0,04$ ).

Bezogen auf die Gesamtzahl identifizierter Proteinpunkte waren in dieser Vergleichsgruppe ca. 2,7 % der Proteinpunkte in ihrer Konzentration verändert.

Tabelle V zeigt alle oben genannten Proteine dieser Vergleichsgruppe, ihre physikalischen Charakteristika, Informationen zur Identifizierung sowie die Mittelwerte ihrer optischen Dichten .

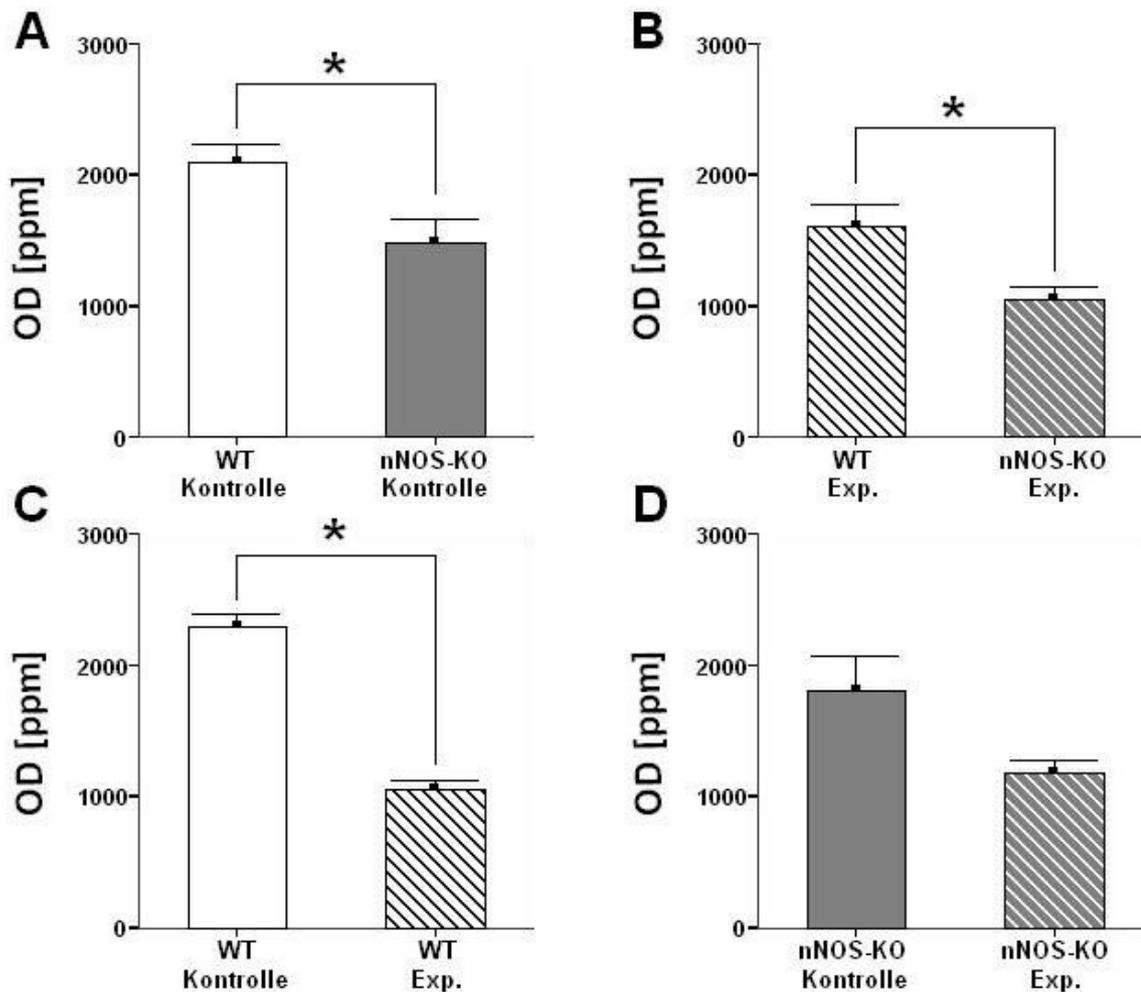
Aus den WT/KO-Quotienten ist zu ersehen, dass bei 11 von 13 Proteinen eine höhere Konzentration bei WT- als bei nNOS-KO-Mäusen nachgewiesen wurde. Die Proteine VDAC-1 und das Ubiquitin-konjugierende Enzym E2 O waren bei nNOS-KO-Mäusen in höherer Konzentration vorhanden.

Bemerkenswert ist, dass Alpha-Synuclein in der TP-Fraktion der nNOS-KO-Mäuse unabhängig von der Jungtierpräsentation in signifikant geringeren Konzentrationen vorhanden war als bei WT-Tieren (Abbildung 11A, B). Bei beiden Genotypen änderte sich dessen Konzentration auch nach Präsentation nicht signifikant (Abbildung 11C, D).



**Abbildung 11:** Darstellung der optischen Dichten (Mittelwert + SEM) des Alpha-Synucleins in den einzelnen Vergleichsgruppen. **(A)** WT- gegen nNOS-KO-Mäuse der Kontrollgruppe. \*  $p = 0,014$ ; t-Test für unabhängige Stichproben. **(B)** WT- gegen nNOS-KO-Mäuse sechs Stunden nach einmaliger Jungtierpräsentation (Exp.). \*  $p = 0,001$ ; t-Test für unabhängige Stichproben. **(C)** WT-Mäuse der Kontrollgruppe gegen exponierte WT-Tiere. **(D)** nNOS-KO-Mäuse der Kontrollgruppe gegen exponierte nNOS-KO-Tiere.

Auch das Neuronale Protein 25 (NP25, Transgelin 3) war in der SP-Fraktion der nNOS-KO-Mäuse im Kontrollzustand vermindert (Abbildung 12A). Allerdings kam es bei beiden Genotypen sechs Stunden nach Jungtierpräsentation zu einer Konzentrationsabnahme (Abbildung 12C, D, vergleiche Kapitel 3.3.2 und 3.3.3). Im Vergleich zwischen exponierten und Kontrolltieren der nNOS-KO-Gruppe wurde mit  $p = 0,082$  das Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  nicht erreicht.

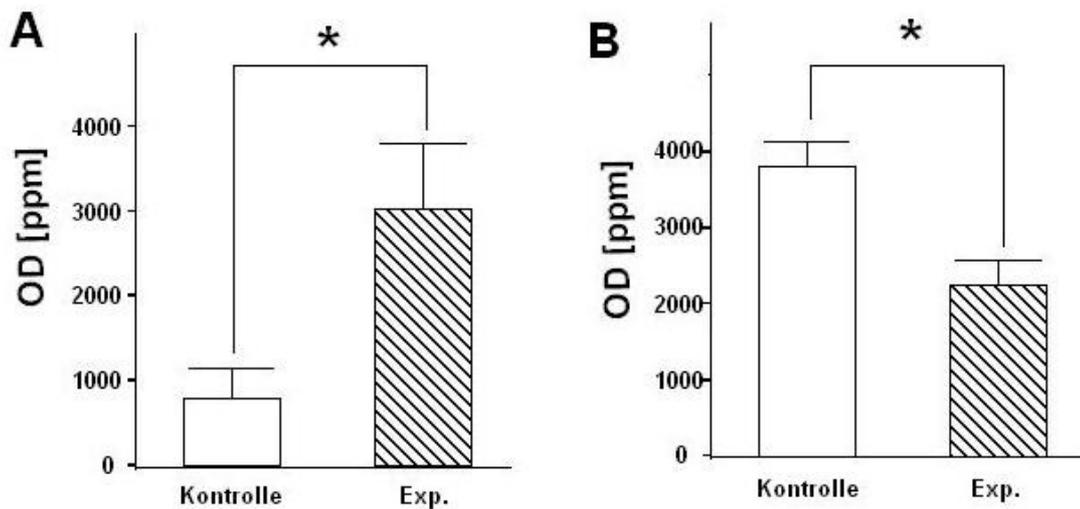


**Abbildung 12:** Darstellung der optischen Dichten (Mittelwert + SEM) des Neuronalen Proteins 25 in den einzelnen Vergleichsgruppen. **(A)** WT- gegen nNOS-KO-Mäuse der Kontrollgruppe. \*  $p = 0,032$ ; t-Test für unabhängige Stichproben. **(B)** WT- gegen nNOS-KO-Mäuse sechs Stunden nach einmaliger Jungtierpräsentation (Exp.). \*  $p = 0,022$ ; t-Test für unabhängige Stichproben. **(C)** WT-Mäuse der Kontrollgruppe gegen exponierte WT-Tiere. \*  $p = 0,008$ ; t-Test für unabhängige Stichproben. **(D)** nNOS-KO-Mäuse der Kontrollgruppe gegen exponierte nNOS-KO-Tiere.

### 3.3.2 Vergleich von exponierten und nicht-exponierten WT-Tieren

Beim Vergleich von WT-Tieren der Kontrollgruppe mit exponierten WT-Tieren unterschieden sich insgesamt 29 Proteinpunkte signifikant in ihrer optischen Dichte. 12 davon gehörten zur TP-Fraktion (Abbildung V): das Protein 25 der Tumornekrosefaktor Superfamilie (exp/Ctrl-Ratio 2,91;  $p = 0,033$ ), die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (exp/Ctrl-Ratio 3,77;  $p = 0,045$ , Abbildung 13A), die Aldolase C (exp/Ctrl-Ratio 3,06;  $p = 0,001$ ), die Glutathion-S-Transferase P1 (exp/Ctrl-Ratio 3,21;  $p = 0,005$ ), die Phosphoglyceratmutase 1 (exp/Ctrl-Ratio 2,25;  $p = 0,049$ ), die alpha-Untereinheit der Isocitratdehydrogenase (exp/Ctrl-Ratio 2,18;  $p = 0,044$ ), die Variante 1 des Ubiquitin-

konjugierenden Enzyms E2 (exp/Ctrl-Ratio 2,56;  $p = 0,003$ ), das Peroxiredoxin-1 (exp/Ctrl-Ratio 3,07;  $p = 0,002$ ), das ADP-Ribosylierungsfaktor-ähnliche Protein 3 (exp/Ctrl-Ratio 0,58;  $p = 0,01$ ), das Poly(rC)-bindende Protein 2 (exp/Ctrl-Ratio 0,24;  $p = 0,019$ ), das Stathmin-1-ähnliche Protein (exp/Ctrl-Ratio 0,63;  $p = 0,03$ ) und die Beta-2C-Kette des Tubulins (exp/Ctrl-Ratio 3,21;  $p = 0,046$ ).



**Abbildung 13:** Veränderung der Proteinkonzentration 6 Stunden nach Jungtierpräsentation (Exp.). Dargestellt sind die Mittelwerte der optischen Dichte (OD) + SEM. **(A)** Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Proteinpunkt Nr. 7301). \*  $p = 0,045$ ; t-Test für unabhängige Stichproben. **(B)** heterogenes nukleäres Ribonucleoprotein A2/B1 (Proteinpunkt Nr. 8204). \*  $p = 0,011$ ; t-Test für unabhängige Stichproben.

Bei 17 Proteinpunkten der SP-Fraktion wurden im Gruppenvergleich Unterschiede in der optischen Dichte festgestellt (vergleiche Abbildung VI): das heterogene nukleäre Ribonucleoprotein A2/B1 in zwei Proteinpunkten: Punkt Nr. 7211 (exp/Ctrl-Ratio 0,49;  $p = 0,032$ ) und 8204 (exp/Ctrl-Ratio 0,59;  $p = 0,011$ , Abbildung 13B), das Neuronale Protein 25 (exp/Ctrl-Ratio 0,44;  $p = 0,008$ ), die Aldolase C in zwei benachbarten Proteinpunkten: 7302 (exp/Ctrl-Ratio 0,21;  $p = 0,002$ ) und 7306 (exp/Ctrl-Ratio 0,18;  $p = 0,01$ ), das Fe-S Protein 1 der NADH-Dehydrogenase (exp/Ctrl-Ratio 0,7;  $p = 0,043$ ), das Flavoprotein 2 der NADH-Dehydrogenase (exp/Ctrl-Ratio 0,54;  $p = 0,008$ ), das Pyruvatdehydrogenase-bindende Protein (exp/Ctrl-Ratio 0,27;  $p = 0,032$ ), VDAC-1 in 3 benachbarten Proteinpunkten: Punkt Nr. 5102 (exp/Ctrl-Ratio 0,26;  $p = 0,008$ ), 6204 (exp/Ctrl-Ratio 0,45;  $p = 0,016$ ) und 7107 (exp/Ctrl-Ratio 0,16;  $p = 0,012$ ), die proteasomale Untereinheit beta-6 (exp/Ctrl-Ratio 0,31;  $p = 0,017$ ), die Ubiquitin-spezifische

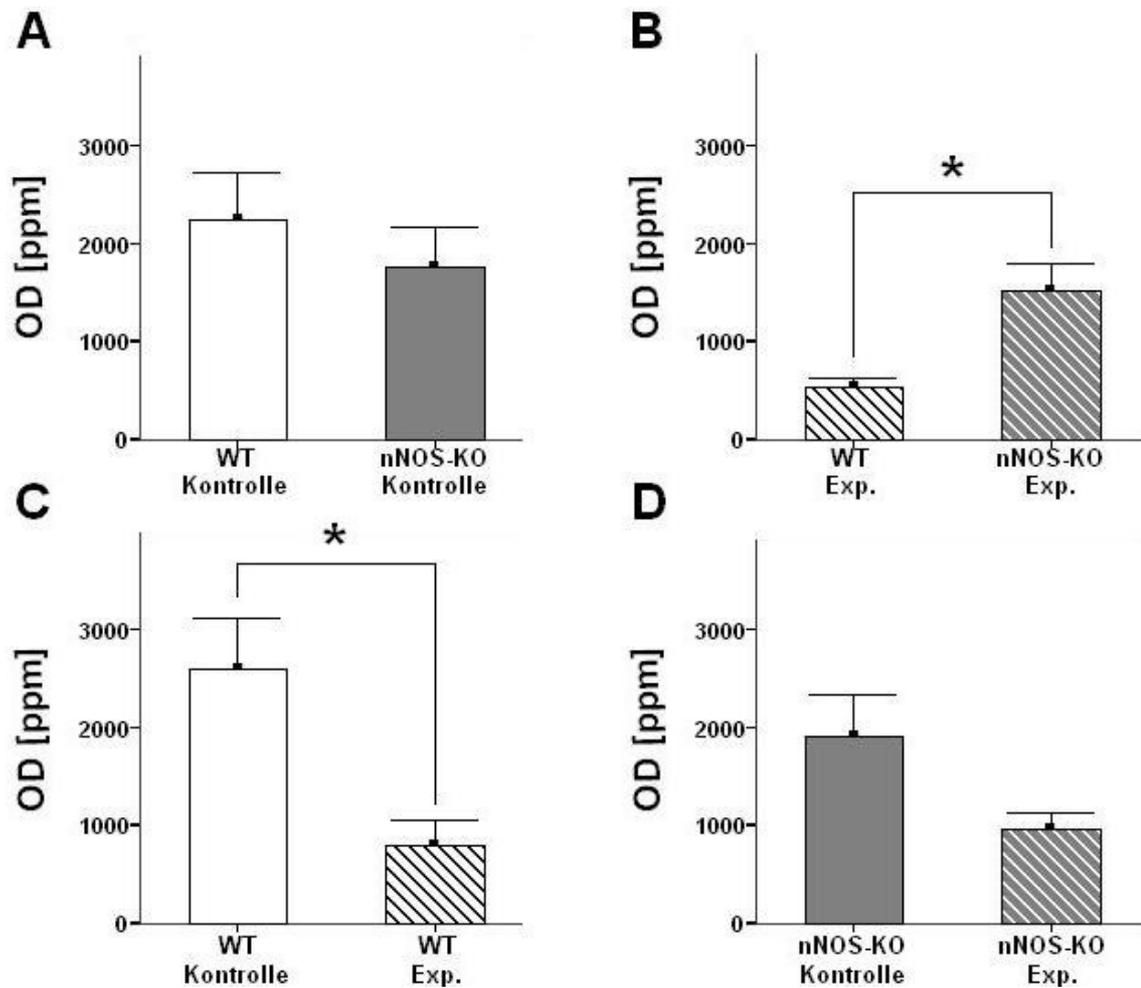
Protease-19 (exp/Ctrl-Ratio 0,32;  $p = 0,001$ ), das NIPI-ähnliche Protein (exp/Ctrl-Ratio 0,62;  $p = 0,022$ ), die Proteindisulfitisomerase P5 (exp/Ctrl-Ratio 0,06;  $p = 0,008$ ), das Protein MKIAA0400 (Regulator der GTPase Aktivität; exp/Ctrl-Ratio 0,4;  $p = 0,008$ ) und das Protein BC031593 (exp/Ctrl-Ratio 0,13;  $p = 0,001$ ).

Tabelle VI zeigt alle identifizierten Proteine dieser Vergleichsgruppe, ihre physikalischen Charakteristika, Informationen zur Identifizierung sowie die Mittelwerte ihrer optischen Dichten .

In der SP-Fraktion waren in der Kontrollgruppe alle identifizierten Proteine in höherer Konzentration vorhanden als bei exponierten Tieren. Erwähnenswert ist hierbei, dass die proteasomale Untereinheit beta-6 in allen *Matchsets* der SP-Fraktionen identifiziert werden konnte (siehe Kapitel 3.3.1, 3.3.3 und 3.3.4), aber nur bei exponierten WT-Mäusen in signifikant verringerter Konzentration vorlag (Abbildung 14).

In der TP-Fraktion kehrte sich der Befund um. Lediglich das ADP-Ribosylierungsfaktor-ähnliche Protein 3, das Poly(rC)-bindende Protein 2 und das Stathmin-1-ähnliche Protein zeigten in der Kontrollgruppe höhere Konzentrationen als nach Präsentation.

Bezogen auf die Gesamtzahl identifizierter Proteinpunkte waren in dieser Vergleichsgruppe ca. 6 % der Proteinpunkte in ihrer Konzentration verändert.



**Abbildung 14:** Darstellung der optischen Dichten (Mittelwert + SEM) der proteasomalen Untereinheit beta-6 in den einzelnen Vergleichsgruppen. **(A)** WT- gegen nNOS-KO-Mäuse der Kontrollgruppe. **(B)** WT- gegen nNOS-KO-Mäuse sechs Stunden nach einmaliger Jungtierpräsentation (Exp.). \*  $p = 0,025$ ; t-Test für unabhängige Stichproben. **(C)** WT-Mäuse der Kontrollgruppe gegen exponierte WT-Tiere. \*  $p = 0,017$ ; t-Test für unabhängige Stichproben. **(D)** nNOS-KO-Mäuse der Kontrollgruppe gegen exponierte nNOS-KO-Tiere.

### 3.3.3 Vergleich von exponierten WT- und nNOS-KO-Tieren

Beim Vergleich exponierter WT- und nNOS-KO-Tiere unterschieden sich insgesamt 18 Proteinpunkte in ihrer optischen Dichte. Tabelle VII zeigt alle identifizierten Proteine dieser Vergleichsgruppe, ihre physikalischen Charakteristika, Informationen zur Identifizierung sowie die Mittelwerte ihrer optischen Dichten. Bezogen auf die Gesamtzahl identifizierter Proteinpunkte waren in dieser Vergleichsgruppe ca. 3,9 % der Proteinpunkte in ihrer Konzentration verändert.

Von den acht Proteinen der SP-Fraktion (Abbildung VIII) lagen die folgenden bei nNOS-KO-Tieren in höherer Konzentration vor als bei WT-Mäusen: das heterogene

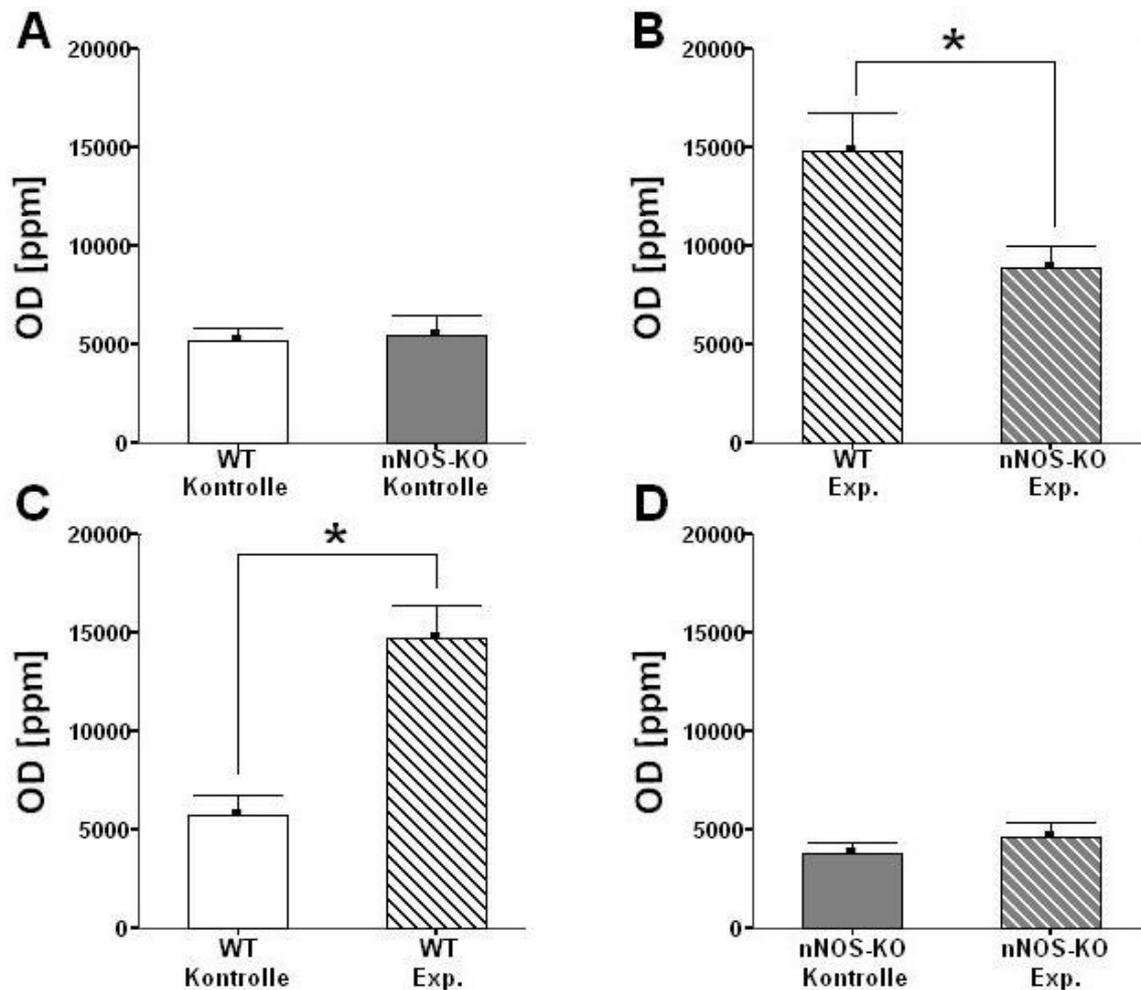
nukleäre Ribonucleoprotein D in Punkt Nr. 4413 (WT/KO-Ratio 0,78;  $p = 0,036$ ), die proteasomale Untereinheit beta-6 (WT/KO-Ratio 0,36;  $p = 0,025$ ), VDAC-1 (WT/KO-Ratio 0,7;  $p = 0,03$ ) und die 30 kDa-Untereinheit der NADH-Ubichinon-Oxidoreductase (WT/KO-Ratio 0,62;  $p = 0,036$ ).

WT-Mäuse wiesen höhere Proteinkonzentrationen des heterogenen nukleären Ribonucleoproteins D in Punkt Nr. 5411 (WT/KO-Ratio 1,43;  $p = 0,036$ ), des Neuronalen Proteins 25 (WT/KO-Ratio 1,53;  $p = 0,022$ ), des VDAC-2 (WT/KO-Ratio 2,04;  $p = 0,014$ ) und der alpha-3 Kette des Tropomyosins (WT/KO-Ratio 1,73;  $p = 0,038$ ) auf.

Interessant ist hierbei das Auftreten des heterogenen nukleären Ribonucleoproteins D bei WT-Mäusen sowohl in höherer als auch in niedrigerer Konzentration, abhängig von der Position auf dem 2D-Gel.

Von den 10 Proteinen der TP-Fraktion (Abbildung VII) zeigten vier höhere Konzentrationen in nNOS-KO-Mäusen: die Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase A (WT/KO-Ratio 0,76;  $p = 0,014$ ), die O-Untereinheit des F1-Komplexes der ATP-Synthase (WT/KO-Ratio 0,4;  $p = 0,033$ ), die Serin-Transmembranprotease 2 (WT/KO-Ratio 0,47;  $p = 0,005$ ) und das ADP-Ribosylierungsfaktor Protein 3 (WT/KO-Ratio 0,52;  $p = 0,02$ ). Die übrigen Proteine lagen in exponierten WT-Mäusen in höherer Konzentration vor: das Alpha-Synuclein (WT/KO-Ratio 1,45;  $p = 0,001$ ), die Aldolase C (WT/KO-Ratio 1,76;  $p = 0,016$ ), die Fumarathydratase (WT/KO-Ratio 2,34;  $p = 0,033$ ), die 3-Hydroxyisobutyrat-Dehydrogenase (WT/KO-Ratio 1,38;  $p = 0,008$ ), die Untereinheit alpha des Elektron transferierenden Flavoproteins (WT/KO-Ratio 1,55;  $p = 0,008$ ) und die Variante 1 des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms E2 (WT/KO-Ratio 1,66;  $p = 0,037$ ).

Es fiel auf, dass das letztgenannte Protein nur in der TP-Fraktion exponierter WT-Tiere (vergleiche Punkt Nr. 6106 im *Matchset* 133 in Tabelle VI und 7016 im *Matchset* 130 in Tabelle VII) in erhöhter Konzentration vorlag, wohingegen bei nNOS-KO-Mäusen keine signifikante Konzentrationsänderung der Variante 1 des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms E2 im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden wurde (Abbildung 15).



**Abbildung 15:** Darstellung der optischen Dichten (Mittelwert + SEM) der Variante 1 des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms E2 in den einzelnen Vergleichsgruppen. **(A)** WT- gegen nNOS-KO-Mäuse der Kontrollgruppe. **(B)** WT- gegen nNOS-KO-Mäuse sechs Stunden nach einmaliger Jungtierpräsentation (Exp.). \*  $p = 0,037$ ; t-Test für unabhängige Stichproben. **(C)** WT-Mäuse der Kontrollgruppe gegen exponierte WT-Tiere. \*  $p = 0,003$ , t-Test für unabhängige Stichproben. **(D)** nNOS-KO-Mäuse der Kontrollgruppe gegen exponierte nNOS-KO-Tiere.

### 3.3.4 Vergleich von exponierten und nicht-exponierten nNOS-KO-Tieren

Beim Vergleich von nNOS-KO-Tieren der Kontrollgruppe mit exponierten nNOS-KO-Tieren zeigten sich deutlich weniger Proteinpunkte, die sich in ihren optischen Dichten signifikant unterschieden, als in den beiden vorangegangenen Vergleichsgruppen. Bezogen auf die Gesamtzahl identifizierter Proteinpunkte waren in dieser Vergleichsgruppe ca. 2,5 % der Proteinpunkte in ihrer Konzentration verändert. Insgesamt waren es 12 Proteinpunkte. Fünf davon gehörten der TP-Fraktion an (Abbildung IX), die restlichen sieben der SP-Fraktion (Abbildung X). Tabelle VIII zeigt alle identifizierten

Proteine dieser Vergleichsgruppe, ihre physikalischen Charakteristika, Informationen zur Identifizierung sowie die Mittelwerte ihrer optischen Dichten .

Bei den Proteinen der TP-Fraktion handelte es sich um das Hitzeschockprotein 8 (exp/Ctrl-Ratio 4,13;  $p = 0,046$ ), VDAC-1 (exp/Ctrl-Ratio 4,93;  $p = 0,004$ ), die Beta-Kette des Alpha-Kristallins (exp/Ctrl-Ratio 2,83;  $p = 0,023$ ), ein Homologon des ES1-Proteins (exp/Ctrl-Ratio 3,74;  $p = 0,001$ ) und die Beta-Kette des Hämoglobins (exp/Ctrl-Ratio 3,07;  $p = 0,019$ ). Die Hämoglobinbestandteile sind dabei als Verunreinigung aufzufassen. Alle genannten Proteine waren im stimulierten Zustand in höherer Konzentration vorhanden.

Folgende Proteine der SP-Fraktion waren in ihrer Konzentration nach Jungtierpräsentation erhöht: die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase in zwei benachbarten Proteinpunkten: Punkt Nr. 6303 (exp/Ctrl-Ratio 5,33;  $p = 0,033$ ) und 6307 (exp/Ctrl-Ratio 4,45;  $p = 0,007$ ), die Aldolase C in zwei benachbarten Proteinpunkten: Punkt Nr. 6410 (exp/Ctrl-Ratio 4,33;  $p = 0,001$ ) und 7402 (exp/Ctrl-Ratio 3,25;  $p = 0,037$ ) und das Transkriptionsaktivatorprotein PUR-beta (exp/Ctrl-Ratio 4,17;  $p = 0,006$ ). Die Unter-einheit beta der ATP-Synthase (exp/Ctrl-Ratio 0,23;  $p = 0,003$ ) und die Ubiquitin-spezifische Protease 19 (exp/Ctrl-Ratio 0,21;  $p = 0,019$ ) zeigten im Kontrollzustand höhere Konzentrationen. Interessant ist hierbei der Konzentrationsanstieg der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase in der SP-Fraktion, da bei WT-Mäusen sechs Stunden nach Jungtierpräsentation ein Anstieg in der TP-Fraktion gemessen wurde (Abbildung 13A). Ähnliche Verteilungsunterschiede ließen sich auch für die Aldolase C feststellen, die hier nach Jungtierpräsentation in der SP-Fraktion eine Konzentrationszunahme zeigte (vergleiche die Punkte Nr. 6410 und 7402 im *Matchset* 136 in Tabelle VIII), während es bei WT-Mäusen zu einer Zunahme in der TP-Fraktion (vergleiche Punkt Nr. 6302 im *Matchset* 133 in Tabelle VI) und einer Abnahme in der SP-Fraktion (vergleiche die Punkte Nr. 7302 und 7306 im *Matchset* 137 in Tabelle VI) sechs Stunden nach Jungtierpräsentation kam. Auf den Coomassie-Blau gefärbten Gelen für das Proteomscreening wurden in der TP-Fraktion der WT-Tiere sieben von insgesamt 157 Proteinpunkten (ca. 4,5 %) als Aldolase C identifiziert. Bei den nNOS-KO-Tieren waren es vier von 82 Proteinpunkten (ca. 4,8 %). In der SP-Fraktion der WT-Tiere war es einer von 126 Proteinpunkten (ca. 0,8 %), bei den nNOS-KO-Tieren wurde kein Proteinpunkt der Aldolase C zugeordnet.

### 3.3.5 Zusätzliche Betrachtungen

Für den spannungsabhängigen Kationenkanal VDAC-1 wurden beim Vergleich zwischen WT- und nNOS-KO-Mäusen unabhängig von der Jungtierpräsentation höhere Proteinkonzentrationen in der SP-Fraktion der nNOS-KO-Tiere festgestellt (vergleiche Punkt Nr. 6101 in Abbildung IV und 4107 in Abbildung VIII). Beim Vergleich zwischen nNOS-KO-Kontroll- und exponierten Tieren fand sich nach Jungtierpräsentation eine Konzentrationszunahme in der TP-Fraktion. In der SP-Fraktion der WT-Tiere lag VDAC-1 in der Kontrollgruppe in mehreren Proteinpunkten (vergleiche die Punkte Nr. 5102, 6204 und 7107 in Abbildung VI) in höheren Proteinkonzentrationen vor als nach Jungtierpräsentation. Beim Vergleich der im Proteinscreening als VDAC-1 identifizierten Proteinpunkte zeigte sich, dass bei WT-Mäusen in der TP-Fraktion 3,2 % und in der SP-Fraktion 8,7 % aller Proteine als VDAC-1 identifiziert wurden. Bei den nNOS-KO-Mäusen waren es in der TP-Fraktion 1,2 % und 9,3 % in der SP-Fraktion.

VDAC-2 lag sowohl beim Vergleich der Kontrollgruppen als auch in der Gruppe der exponierten Tiere jeweils in der SP-Fraktion der WT-Tiere in höherer Proteinkonzentration vor. VDAC-2 war damit entgegengesetzt zu VDAC-1 verändert. Allerdings korrespondieren die VDAC-2-Proteinpunkte auf den Gelen der beiden Vergleichsgruppen nicht miteinander (vergleiche Punkt Nr. 3306 in Abbildung IV und 0210 in Abbildung VIII).

Auffällig waren genotyp-spezifische Expressionsmuster einiger heterogener nukleärer Ribonucleoproteine (HnRNP). Bei nNOS-KO-Mäusen wurde in der SP-Fraktion der Kontrollgruppe eine geringere Konzentration des HnRNP K als bei WT-Mäusen ermittelt (siehe Kapitel 3.3.1). Sechs Stunden nach Jungtierpräsentation kam es bei WT-Mäusen zu einer Konzentrationsverminderung des HnRNP A2/B1 (siehe Kapitel 3.3.2). Im Gegensatz dazu zeigten nNOS-KO-Mäuse eine gegenläufige Konzentrationsdynamik in zwei Proteinpunkten des HnRNP D-ähnlichen Proteins (vergleiche Kapitel 3.3.3).

## 4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob nNOS-KO-Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen Defizite bei der Konsolidierung eines sozio-olfaktorischen Kurz- und Langzeitgedächtnisses aufweisen. Im *Bulbus olfactorius* sollte das der Konsolidierung dieses Langzeitgedächtnisses zugrunde liegende proteomische Korrelat identifiziert werden. Dabei war sowohl auf die Frage nach quantitativen und qualitativen Unterschieden im Proteinexpressionsmuster der beiden Genotypen im nicht stimulierten Zustand einzugehen als auch auf Veränderungen im Proteinexpressionsmuster in der zweiten ANI-sensiblen Phase sechs Stunden nach einmaliger Jungtierpräsentation.

### 4.1 Grenzen des experimentellen Ansatzes

Die Verknüpfung verhaltensexperimenteller Daten aus dem Paradigma zur sozialen Diskrimination der Maus mit proteomanalytischen Daten aus 2D-Gelelektrophorese und anschließender massenspektrometrischer Analytik weist neben vielen Vorteilen, wie zum Beispiel der Möglichkeit der schnellen Identifizierung einer Vielzahl von Proteinen und dem Knüpfen einer Verbindung zwischen verhaltensexperimentell objektivierbaren Parametern und molekularen Veränderungen während eines Gedächtniskonsolidierungsprozesses, einige methodische Einschränkungen auf, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen.

Die Identifizierung einzelner Proteine lässt abgesehen von ihrer Zuordnung zur TP-Fraktion (zytosolische Proteine, integrale Membranproteine, tritonlösliche Komponenten der Extrazellulärmatrix) oder SP-Fraktion (zytoskelettale Strukturen, PSD) zunächst keine Aussage über deren subzelluläre Lokalisation zu. Selbst eine Zuordnung der identifizierten Proteine zum AOB oder MOB und innerhalb dieser beiden Entitäten zu einem bestimmten Zelltyp, sei es Mitralzelle, Körnerzelle, periglomeruläre oder Gliazelle, gelingt nur selten. Die identifizierten Proteine GFAP und das olfaktorische Markerprotein (OMP) lassen sich jedoch aufgrund ihrer zelltyp-spezifischen Synthese eindeutig zuordnen: GFAP ist das Indikatorprotein für Astrozyten und das Vorkommen von OMP ist auf ORNs beschränkt, die mit ihren Axonterminalen Teil der Glomerula des *Bulbus olfactorius* sind (Farbman und Margolis, 1980). Dabei ist es für die Funktion

bestimmter Proteine von größter Bedeutung, ob sie mitochondrial, nukleär, im Axon, Dendriten oder Soma eines Neurons lokalisiert sind. Schubert (2003) führte in Anlehnung an die Proteomanalyse (*Proteomics*) den Begriff der Toponomanalyse (*Toponomics*) ein, um die funktionelle Bedeutung von Kompartimentverschiebungen und molekularen Netzwerken in die Betrachtung biologischer Prozesse einzubeziehen. Als Toponom gilt dabei die gesamte molekulare topologische Organisation innerhalb einer Zelle, bestehend aus Netzwerken von Proteinen, Kohlenhydraten, Fetten und Nukleinsäuren. In der Literatur finden sich Hinweise, dass im Rahmen synaptischer Plastizität innerhalb eines Neurons an bestimmten Dendriten regional vermehrte Proteinbiosynthese stattfindet und gleichzeitig an anderen Dendriten Proteinabbau vonstatten geht (Karpova et al., 2006; Ding et al., 2007). Dies ist nicht nur für verschiedene Dendriten eines Neurons sondern auch für unterschiedliche Neuronenpopulationen innerhalb eines definierten Hirnareals wahrscheinlich. Wird nun ein Protein in bestimmten Regionen vermehrt synthetisiert, aber gleichzeitig in anderen Regionen vermehrt abgebaut, ergibt sich *in summa* für den Proteinpunkt auf dem 2D-Gel keine Konzentrationsveränderung, obwohl es subzellulär sehr wohl zu entscheidenden Konzentrationsverschiebungen gekommen ist. Erschwerend kommt hinzu, dass der Geruch eines Artgenossen nur an einer kleinen Subpopulation der Zellen im *Bulbus olfactorius* zu einer nachweisbaren Aktivitätsänderung führt und somit bevorzugt an diesen aktivitätsabhängige Veränderungen im Proteinexpressionsmuster zu erwarten sind. Richter et al. (2005) fanden 70 Minuten nach Jungtierpräsentation im AOB und MOB der Maus pro Gewebeschnitt durchschnittlich 91 beziehungsweise 75 c-Fos-positive Zellen. Weitere immunhistochemische Untersuchungen zu zellulären Verteilungsmustern und Konzentrationsveränderungen der identifizierten Proteine sind somit zur Bestätigung der hier vorliegenden Ergebnisse erforderlich.

Auch über die direkte Interaktion innerhalb einer Signalkaskade und funktionell entscheidende posttranslationale Modifikationen wie Phosphoryl-, Glykosyl-, Fucosyl-, Acetyl-, Palmityl- oder Ubiquitinierungen lässt sich auf Basis der vorliegenden Daten keine Aussage treffen. Routtenberg und Rekart (2005) schlagen für langandauernde Konsolidierungsprozesse ein Modell vor, in dessen Zentrum nicht die *de novo*-Proteinbiosynthese steht, sondern ein Netzwerk posttranslatinaler Modifikationsmechanismen an bereits vorhandenen Proteinen, das durch positive Rückwärtsschleifen unterhalten

wird. *De novo*-Synthese findet in diesem Modell nicht phasenweise gesteigert, sondern kontinuierlich und nur zum Auffüllen des vorhandenen Proteinvorrats statt.

Zu berücksichtigen sind ferner interindividuelle Unterschiede in der Proteinsyntheserate der Versuchstiere, so dass bei der eher geringen Anzahl von fünf Mäusen pro Gruppe relevante Änderungen der Proteinkonzentration im „interindividuellen Rauschen“ verschwinden können.

Zytoskelettale Proteine waren bei WT- und nNOS-KO-Tieren bis auf wenige Ausnahmen in gleichen Konzentrationen vorhanden. Somit ergab sich kein Anhalt für konstitutiv unterschiedliche Neuronendichten. Die Carboanhydrase 2 und GFAP wiesen in beiden Genotypen keine signifikanten Konzentrationsunterschiede auf, so dass eine vermehrte Gliaproliferation in nNOS-KO-Tieren unwahrscheinlich ist.

Es ist offensichtlich, dass die erstellte Proteomkarte des *Bulbus olfactorius* keineswegs vollständig ist. Trotz fraktionierter Extraktion der Proteine in einer zytoskelettalen (SP) und einer zytosolischen (TP) Fraktion, ist davon auszugehen, dass nicht alle Proteine am Ende der Aufbereitungsschritte für die 2D-Gelelektrophorese zur Verfügung stehen. Beispielsweise wäre im Proteom der WT-Mäuse die nNOS zu erwarten. Aufgrund ihres hohen Molekulargewichts von 160.472 Da ([www.expasy.ch](http://www.expasy.ch)) und ihrer Bindung an die Zellmembran wurde sie mit den verwendeten analytischen Methoden dennoch nicht detektiert. Die 2D-Gelelektrophorese und die anschließende Anfärbung der Proteine lassen sich bildlich gesprochen als ein Sieb verstehen, dessen Porengröße durch pH-Bereich, Molekülmassenbereich und Sensitivität der Färbung definiert ist. Proteine mit hohem Molekulargewicht, wie zum Beispiel Rezeptoruntereinheiten, entgehen somit der Fixierung auf dem Gel. Proteine, die nur in äußerst geringen Mengen vorhanden sind, aber im pH- und Molekulargewichtsbereich des Gels liegen, entgehen weiterer Analytik aufgrund ihrer geringen Anfärbbarkeit, die sich unter Umständen nicht von artifiziellen Färbeschlieren auf dem Gel unterscheiden lässt. Die Silberfärbung gilt als sensitiver als die Coomassie-Blau-Färbung, allerdings ist auch nach Entfärben durch Ausfällen des Silbers nicht sicher auszuschließen, dass die Trypsin-Spaltstellen durch Silberaddukte blockiert sind. Aus diesem Grunde wurden für das Proteomscreening mittels MALDI LIFT-TOF-Analytik Coomassie-Blau-gefärbte Gele verwendet. Generell hat sich die Kombination zweier komplementärer massenspektrometrischer Analy-

severfahren als vorteilhaft in Bezug auf die Identifizierungsrate der Proteinpunkte aus einem 2D-Gel erwiesen (Chen et al., 2006; Weitzdoerfer et al., 2008).

Der Vergleich der Proteomkarte des Hippocampus (Kirchner et al., 2004) mit einer *Microarray*-basierten mRNA-Charakterisierung (Rampon et al., 2000) zeigt, dass nur ein geringer Teil der mRNA tatsächlich auch als Protein in diesem Hirnareal identifiziert werden konnte. Insbesondere große membrangebundene Moleküle entgehen aus oben genannten Gründen der Proteomanalytik. In der vorliegenden Arbeit war der Anteil quantitativ veränderter Proteine gemessen am gesamten identifizierten Proteom des *Bulbus olfactorius* mit ca. 1 % erwartungsgemäß gering.

## 4.2 Verhaltensexperimente

WT- und nNOS-KO-Mäuse waren in der Lage, nach einem Retentionsintervall von 60 und 180 Minuten das vorher präsentierte Jungtier wiederzuerkennen. Nach einem Retentionsintervall von 24 Stunden konnten jedoch nur die WT-Mäuse zwischen bekanntem und unbekanntem Jungtier unterscheiden (siehe Kapitel 3.1). Damit bestätigte sich für die WT-Tiere die bereits bei anderen Mausstämmen beobachtete Fähigkeit, Jungtiere anhand ihres olfaktorischen Fingerabdrucks mindestens 24 Stunden nach der Erstpräsentation sicher wiederzuerkennen (Kogan et al., 2000; Richter et al., 2005). In dem angewendeten Verhaltensparadigma zeigten nNOS-KO-Mäuse entgegen den Beobachtungen von Nelson et al. (1995) keine vermehrte Aggression. Die Präsentation sexuell unreifer Jungtiere gegenüber den sexuell erfahrenen Versuchstieren und die kurze Zeitspanne der isolierten Versuchstierhaltung könnten Erklärungen für das diesbezüglich unauffällige Verhalten sowohl der WT- als auch der nNOS-KO-Mäuse sein.

Die Investigationsdauer der WT- und nNOS-KO-Mäuse im Paradigma zur sozialen Diskrimination war im Durchschnitt länger ( $p = 0,001$ ; gepaarter t-Test) als die Investigationsdauer der Tiere, denen der *Bulbus olfactorius* zur Proteomanalyse entnommen wurde. Als Erklärung kann eine interindividuelle, vom Wurf oder von der „Tagesform“ abhängige Investigationsfreudigkeit der Mäuse herangezogen werden. Von einer Beeinträchtigung der sozio-olfaktorischen Gedächtnisbildung aufgrund kürzerer Investigationsdauer ist allerdings nicht auszugehen.

Da die Investigationsdauer der nNOS-KO-Mäuse während der ersten Jungtierpräsentation nicht geringer war als die der WT-Mäuse (siehe Kapitel 3.1), kann die Beobachtung

bestätigt werden, dass beide Genotypen sich nicht bezüglich Ängstlichkeit oder ihrem motorischen Aktivitätsniveau voneinander unterscheiden (Kirchner et al., 2004). Die Defizite beim Wiedererkennen eines bekannten Jungtieres im Paradigma zur sozialen Diskrimination sind somit nicht durch Verhaltensauffälligkeiten der nNOS-KO-Tiere während der Erstpräsentation des Jungtieres zu erklären, sondern lassen auf die Schlüsselrolle von nNOS/ NO während der Konsolidierung eines sozio-olfaktorischen Langzeitgedächtnisses schließen (Kendrick et al., 1997). Ein Vergleich mit dem olfaktorischen System wirbelloser Tiere zeigt, dass NO bei der Ausbildung eines olfaktorischen Langzeitgedächtnisses bei der Mittelmeergrille (lateinisch *Gryllus bimaculatus*) eine vergleichbare Rolle spielt und auch dort auf die Kurzzeitgedächtnisbildung keinen messbaren Einfluss hatte (Matsumoto et al., 2006). Aus den hier vorgelegten Daten lässt sich schließen, dass sowohl WT- als auch nNOS-KO-Mäuse befähigt sind, ein sozio-olfaktorisches Kurzzeitgedächtnis auszubilden. Dies ist eine Form der Gedächtnisbildung, die keine Proteinbiosynthese erfordert (Barondes und Cohen, 1968; Cohen und Barondes, 1968). Die Ergebnisse im Paradigma zur sozialen Diskrimination deuten aber darauf hin, dass nNOS-KO-Mäuse sich einen neu erworbenen sozio-olfaktorischen Gedächtnisinhalt nicht länger als einen Tag merken beziehungsweise nach diesem Retentionsintervall wieder abrufen können. Da diese mittel- und langfristige Form der Gedächtnisbildung abhängig von mindestens zwei aufeinanderfolgenden Phasen der *de novo* Proteinbiosynthese ist (Grecksch et al., 1980; Richter et al., 2005; Wanisch et al., 2008), liefern die verhaltensexperimentellen Daten eine zusätzliche Begründung für den zweiten Teil der Experimente, nämlich der Suche nach einem proteomischen Korrelat der *in vivo* beobachteten Effekte im *Bulbus olfactorius* von WT- und nNOS-KO-Mäusen. Dabei muss unterschieden werden zwischen Genotyp-spezifischen Unterschieden im Proteinexpressionsmuster *a priori* und/oder nach sozio-olfaktorischem Lernen.

### **4.3 A priori-Unterschiede im Proteinexpressionsmuster des *Bulbus olfactorius***

Im Proteinscreening mittels MALDI LIFT-TOF-Analyse wurden im *Bulbus olfactorius* von WT- und nNOS-KO-Mäusen unter anderem die Proteine 14-3-3 zeta und delta sowie Calretinin und Calbindin-2 identifiziert (siehe Kapitel 3.2). Signifikante

Konzentrationsunterschiede dieser Proteine zwischen beiden Genotypen wurden allerdings nicht nachgewiesen.

Das 14-3-3-Protein ist ein aus mehreren Untereinheiten bestehendes ZNS-spezifisches Protein, das von Moore und Perez (1967) entdeckt wurde. Das Gen für die Untereinheit eta enthält eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor CREB, dessen Aktivität unter anderem durch NO-vermittelte Phosphorylierung erhöht wird (Chan et al., 2004). Die höchsten Konzentrationen wurden unter anderem im *Bulbus olfactorius* gefunden (Toyooka et al., 2002). Immunhistochemisch konnte eine Kolo-kalisation mit der Proteinkinase C (PKC) ermittelt werden, was eine regulatorische Wirkung des 14-3-3-Proteinkomplexes bei Prozessen wie Langzeitpotenzierung nahe legt (Toyooka et al., 2002). Tatsächlich inhibiert das 14-3-3-Protein die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase-Kinase (Davare et al., 2004). Die Untereinheiten zeta und delta des 14-3-3-Proteins hemmen die PKC (MattoYelin et al., 1997). In der Kontrollgruppe und nach Jungtierpräsentation zeigten sich weder bei WT- noch bei nNOS-KO-Mäusen signifikante Konzentrationsunterschiede, so dass hier eher eine Änderung der Bindungsaffinität zwischen Protein 14-3-3 und PKC als eine absolute Änderung der Konzentration während der Konsolidierung eines sozio-olfaktorischen Langzeitgedächtnisses zu vermuten ist.

Die Calcium-bindenden Proteine Calbindin und Calretinin spielen als intrazelluläre Calciumpuffer eine wichtige Rolle bei der räumlichen und zeitlichen Regulation intrazellulärer Calciumspiegel (Kawasaki et al., 1998), synaptischer Plastizität und Langzeitpotenzierung (Caillard et al., 2000). Die beiden Proteine unterscheiden sich in ihrer Pufferkapazität und somit ihrer zellulären Wirkung (Schmidt et al., 2003). Calbindin könnte nach Bindung von Calcium die Myoinositol-Monophosphatase aktivieren, ein wichtiges Enzym des Inositol-Phospholipid-Signalsystems (Berggard et al., 2002). Die Verteilung von Calbindin und Calretinin ist spezies- und neuronenspezifisch. Im MOB der Ratte enthalten periglomeruläre Interneuronen Calbindin und Calretinin, während in Körnerzellen nur Calretinin nachweisbar ist (Brinon et al., 1999). Kürzlich konnte immunhistochemisch eine Koexpression von Calretinin und nNOS in periglomerulären Zellen des MOB nachgewiesen werden, deren funktionelle Relevanz noch ungeklärt ist (Kosaka und Kosaka, 2007). Neben bestimmten Axonen der VRNs zeigen sich periglomeruläre und Körnerzellen mit Bevorzugung des anterioren AOB der Ratte

immunhistochemisch positiv für Calbindin, während das Protein in Mitralzellen nicht nachweisbar ist (Jia und Halpern, 2003). Bekannt ist, dass das Vorhandensein eines bestimmten Calcium-bindenden Proteins in einem Neuron abhängig ist von dessen Rezeptorausstattung, Ionenkanälen, seiner Einbindung in synaptische Netzwerke und seiner Aktivitätsmuster. In den Interneuronen des MOB der Ratte wird die Expression Calcium-bindender Proteine unter anderem durch ORN-vermittelte Reizung reguliert (Philpot et al., 1997). Die Verteilungsmuster Calcium-bindender Proteine sind damit eng an die Funktion der sie exprimierenden Neurone gekoppelt.

Im Zusammenhang mit der Regulation des intrazellulären Calciumstoffwechsels gewinnt die Tatsache an Bedeutung, dass in der vorliegenden Arbeit unterschiedliche Expressionsmuster der spannungsabhängigen anionenselektiven Kanäle (englisch *voltage dependent anion selective channel*, VDAC) VDAC-1 und -2 bei WT- und nNOS-KO-Mäusen beobachtet wurden (siehe Kapitel 3.3.5). VDAC-1 lag in der SP-Fraktion der nNOS-KO-Kontrollgruppe in höherer Konzentration vor als bei WT-Mäusen. Dagegen wurden bei WT-Mäusen höhere Konzentrationen von VDAC-2 beobachtet.

VDACs oder Porine sind die häufigsten Proteine der äußeren Mitochondrienmembran (Linden et al., 1984). Bei Säugetieren unterscheidet man die Isoformen VDAC-1 bis 3 (Sampson et al., 1998). Ihr Genlocus befindet sich auf der nukleären DNA; sie sind somit kein Bestandteil des mitochondrialen Genoms. Im geöffneten Zustand sind diese Kanalproteine selektiv permeabel für eine Vielzahl von Anionen (Hodge und Colombini, 1997). Man geht davon aus, dass VDACs den äußeren Anteil des *mitochondrial permeability transition pore* (MPT) Komplexes bilden, der vor allem bei Apoptoseprozessen eine Rolle spielt (Vyssokikh et al., 2001). VDAC-2 wurde bereits in hohen Konzentrationen in neuronalem Gewebe beschrieben (Sampson et al., 1996), unter anderem im Hippocampus (Lubec, persönliche Mitteilung). Da Mitochondrien auch bei synaptischen Prozessen der LTP-Konsolidierung eine wichtige Rolle spielen (Mulkey et al., 1994), wurde die Rolle von VDAC-1 und -3 bei synaptischer Plastizität näher untersucht. VDAC-1-KO-Mäuse zeigten keine Defizite bei der kontextbezogenen Furchtkonditionierung, einer hippocampusabhängigen assoziativen Lernform. Bei kontextunabhängiger Furchtkonditionierung und räumlichen Lernaufgaben im Wasserlabyrinth nach Morris wiesen sie im Vergleich zu WT-Mäusen jedoch Defizite auf (Weeber et al.,

2002). Die Konsolidierung eines hippocampalen Kurzzeitgedächtnisses war nicht beeinträchtigt, wohl aber die LTP-Konsolidierung (Weeber et al., 2002). Da VDAC-3 stark im Hippocampus vertreten ist, wurde bei VDAC-3-KO-Mäusen eine Beeinträchtigung kontextabhängiger Furchtkonditionierung beobachtet (Weeber et al., 2002). Dies zeigt, dass bei der Beurteilung der gewebespezifischen Proteinwirkung das Verteilungsmuster der VDAC-Isoenzyme berücksichtigt werden muss. Die beschriebenen Effekte lassen sich bei WT-Mäusen durch die Blockade des MPT-Komplexes mit Cyclosporin A imitieren. Ein funktionierender MPT-Komplex scheint somit über die Regulation der präsynaptischen Calciumkonzentration Voraussetzung für langandauernde Lern- und Gedächtnisprozesse zu sein (Weeber et al., 2002; Levy et al., 2003).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die Vermutung, dass VDACs in die Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses involviert sein könnten, ohne dabei das sozio-olfaktorische Kurzzeitgedächtnis zu beeinflussen. Insbesondere subzelluläre Verteilungsunterschiede tragen unter der Annahme gewebespezifischer Wirkungen der VDAC-Isoformen, beispielsweise im Bereich der Prä- und Postsynapse, zu den Defiziten der nNOS-KO-Mäuse im Rahmen der Konsolidierung eines sozio-olfaktorischen Langzeitgedächtnisses bei. Denkbar ist auch eine Synthesestörung für VDAC-2 bei nNOS-KO-Mäusen, die durch die vermehrte Synthese von VDAC-1 möglicherweise nur partiell kompensiert wird. Die Folge wäre eine Fehlfunktion des calciumregulierenden Systems mit einer negativen Beeinflussung der Langzeitgedächtniskonsolidierungsprozesse.

Die Beobachtung, dass Alpha-Synuclein (ASN) in der vorliegenden Arbeit bei nNOS-KO-Mäusen sowohl in der Kontrollgruppe als auch sechs Stunden nach Jungtierpräsentation in geringeren Konzentrationen vorlag und bei exponierten WT-Tieren keine signifikante Konzentrationsveränderung feststellbar war (siehe Kapitel 3.3.1), legt nahe, dass nNOS-KO-Mäuse konstitutiv geringere ASN-Konzentrationen aufweisen. Dabei stellt sich vor allem die Frage nach der funktionellen Beziehung zwischen nNOS und ASN.

Das ubiquitär extra- und intrazellulär vorkommende Protein ASN findet sich in besonders hohen Konzentrationen im *Bulbus olfactorius*, dem Hippocampus und der Amygdala (Maroteaux und Scheller, 1991). Es gilt als Schlüsselmolekül für die Pathogenese sogenannter Synucleinopathien, wie zum Beispiel Morbus Alzheimer oder Morbus Par-

kinson (Galvin et al., 2001). In löslicher Form spielt ASN bei der Modulation der Dopamin-Biosynthese, dessen vesikulärer Speicherung und Freisetzung, sowie der Wiederaufnahme des Neurotransmitters eine Rolle (Perez und Hastings, 2004; Yu et al., 2005). Da im *Bulbus olfactorius* D2-Rezeptoren beschrieben wurden, die präsynaptisch am *Nervus olfactorius* die Signalübertragung in den Glomerula hemmen und Mäuse mit einem *Gen-knockout* des synaptosomalen Dopamintransporters Defizite in der Geruchsdiskriminierung zeigten (Tillerson et al., 2006), könnten niedrige intrazelluläre ASN-Konzentrationen diesen Prozess über die oben genannten Mechanismen beeinflussen. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass ASN an Prozessen synaptischer Plastizität und Lernvorgängen beteiligt ist. Glutamat-induzierte Plastizität führte in den präsynaptischen Terminalen hippocampaler Neurone zu einem kombinierten Anstieg kolokalisierter ASN- und Synapsin-I-Ansammlungen (Liu et al., 2004). Eine direkte Verbindung zwischen NO und ASN wurde in folgendem Modell beschrieben: NO führt zur Produktion von cGMP und zur Aktivierung der PKG. VASP, ein Substrat der PKG, das an der Kontrolle der Aktin-Organisation während synaptischer Plastizität beteiligt ist, verankert synaptische Vesikel über Synapsin I am Zytoskelett. Durch NO aktiviertes ASN reguliert synergistisch mit  $Ca^{2+}$  diese Interaktion durch Bindung an vesikuläre Phospholipide und verändert die vesikuläre Freisetzungverfügbarkeit von Neurotransmittern (Giasson et al., 2000; Liu et al., 2004).

Da ASN sowohl in die spontane als auch in die aktivitätsabhängige Neurotransmitterfreisetzung eingebunden ist, lassen sich die expositionsunabhängig verringerten ASN-Konzentrationen im *Bulbus olfactorius* der nNOS-KO-Tiere mit dem Fehlen der nNOS erklären. In diesen Kontext passen auch die verhaltensexperimentellen Daten, wonach nNOS-KO-Mäuse längerfristig nicht in der Lage sind, sich den olfaktorischen Fingerabdruck eines Artgenossen zu merken. Zwar wäre demzufolge bei WT-Tieren ein Anstieg der ASN-Konzentration nach Jungtierpräsentation zu erwarten, jedoch lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit keinen Hinweis darauf erkennen. Liu et al. (2004) beschrieben eine Zunahme der Synapsin I – Konzentration in den präsynaptischen Terminalen, die sich, obwohl das Protein in der vorliegenden Arbeit identifiziert wurde, sechs Stunden nach Jungtierpräsentation nicht signifikant verändert zeigte. Die globale Proteinbestimmung im gesamten *Bulbus olfactorius* könnte lokale Konzentrationsveränderungen in den wenigen aktivierten Neuronen verschleiern. Wie in Kapitel

4.1 beschrieben, könnte vermehrte Proteinsynthese in den aktivierten Neuronen mit einer Verminderung der Proteinsynthese andernorts einhergehen, was im gewählten experimentellen Ansatz *in summa* keine Änderung der Proteinkonzentration anzeigen würde. Möglich ist, dass das gewählte Sechs-Stunden-Intervall zwischen Jungtierpräsentation und Hirnpräparation zeitlich vor dem Maximum der *de novo*-ASN-Biosynthese liegt. Dafür spricht, dass Liu et al. (2004) in Schnittkulturen hippocampaler Neurone erst 14 Tage nach Stimulation eine Veränderung der ASN-Verteilung fanden. Allerdings sind die Ergebnisse dieser *In-vitro*-Experimente nur begrenzt mit den hier vorgelegten Daten vergleichbar.

Da gezeigt wurde, dass C57BL/6J Ola Hsd-Mäusen durch chromosomale Deletion konstitutiv der Genlocus für ASN fehlt (Specht und Schoepfer, 2001), muss die Möglichkeit eines genetischen Hintergrundeffekts an dieser Stelle ebenfalls diskutiert werden. Allerdings wurde zum Rückkreuzen der verwendeten nNOS-KO-Mäuse der Stamm C57BL/6J verwendet, für den ein Fehlen des ASN-Genlocus ausgeschlossen werden konnte (Langnäse, unveröffentlicht). Eine unbeabsichtigte Durchmischung der beiden Stämme ist aufgrund der Halte- und Zuchtbedingungen der Tiere hochgradig unwahrscheinlich.

Trotz vieler Hinweise auf die Einbindung des ASN in Langzeitgedächtnis-Konsolidierungsprozesse finden sich zwei starke Argumente gegen die propagierten Mechanismen: 1.) ASN-KO-Mäuse zeigten im Wasserlabyrinth nach Morris im Vergleich zu WT-Mäusen keine Beeinträchtigung des räumlichen Lernens (Chen et al., 2002). Damit konnte gezeigt werden, dass ASN auf molekularer Ebene nicht zwingend in jede Form des Lernens involviert ist. 2.) Es wurden Experimente zur sozialen Diskrimination von Artgenossen mit ASN-defizienten C57BL/6J Ola Hsd-Mäusen durchgeführt, in denen sich keine Beeinträchtigung des sozio-olfaktorischen Langzeitgedächtnisses zeigte (Richter et al., 2005). Ob die Unterschiede in den ASN-Konzentrationen zwischen WT- und nNOS-KO-Mäusen tatsächlich eine funktionelle Relevanz besitzen, kann daher anhand der vorliegenden Daten nicht eindeutig beantwortet werden. Inwieweit konstitutiv verminderte ASN-Konzentrationen im Gegensatz zu einer akuten pharmakologischen ASN-Blockade längerfristig zur Ausbildung alternativer Signalwege führen, muss in weiterführenden Experimenten erforscht werden.

#### 4.4 Unterschiede im Proteinexpressionsmuster sechs Stunden nach sozio-olfaktorischem Lernen

Es wurden Unterschiede im Proteinexpressionsmuster des *Bulbus olfactorius* von WT- und nNOS-KO-Mäusen sechs Stunden nach Präsentation eines unbekanntes Jungtiers analysiert. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da er sich im Paradigma zur sozialen Diskrimination als Beginn der zweiten Phase der ANI-sensitiven Proteinbiosynthese im Rahmen der Langzeitgedächtniskonsolidierung herausgestellt hat (Richter et al., 2005; Wanisch et al., 2008). Dabei sind unspezifische Effekte des ANI zu berücksichtigen, welche den Konsolidierungsprozess über die Hemmung der Katecholaminsynthese (Flexner und Goodman, 1975) oder die Veränderung posttranslatiionaler Modifikationen, zum Beispiel an CREB (Bebien et al., 2003), beeinflussen. Die Gabe von ANI senkt die Proteinbiosyntheserate in den ersten zwei Stunden nach Applikation auf unter 10 % und innerhalb der folgenden zwei Stunden auf unter 40 % des Ausgangsniveaus (Flood et al., 1973). Wanisch et al. (2008) beschrieben nach subkutaner Gabe von ANI eine Hemmung der Translation für drei bis vier Stunden. Die Dauer der zweiten Phase der ANI-sensitiven Proteinbiosynthese wird in der Literatur mit etwa 18 Stunden angegeben (Richter et al., 2005; Wanisch et al., 2008). Der hier gewählte Präparationszeitpunkt liegt daher möglicherweise vor dem Maximum der *de novo*-Synthese einiger relevanter Proteine, wie zum Beispiel Bestandteilen intrazellulärer Signalkaskaden. Interessanterweise liegt der in der vorliegenden Arbeit gewählte Präparationszeitpunkt innerhalb des Intervalls, das bei Mäusen nach Präsentation eines weiteren unbekanntes Jungtiers zur Kollision und gegenseitigen Löschung der konkurrierenden Gedächtnisspuren führt (Engelmann, 2008). Dies zeigt, wie empfindlich der Konsolidierungsprozess in dieser Phase ist. Da bei beiden Genotypen nach Jungtierpräsentation ein Nebeneinander von Konzentrationszunahme und –abnahme definierter Proteine beobachtet wurde, lassen sich die hier gewonnenen Ergebnisse gut mit denen von Ehlers et al. (2003) vereinbaren. Nach Stimulation kortikaler postsynaptischer Fraktionen mit Bicucullin wurden dort quantitative Veränderungen von Proteinen der PSD über einen Zeitraum von 72 Stunden beobachtet. Dabei konnte zwischen vermehrt, vermindert und unverändert vorhandenen Proteinen unterschieden werden. Nach spätestens 120 Stunden war das Ausgangsniveau wieder erreicht.

Nach Jungtierpräsentation kam es bei WT- und nNOS-KO-Mäusen zu einer Konzentrationszunahme glykolytischer Enzyme, wie der Aldolase C (ALDOC) und der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Da synaptische Plastizität einen energieverbrauchenden Prozess darstellt, verwundern diese Ergebnisse nicht. Es wurde beobachtet, dass die Konzentrationszunahme der ALDOC bei exponierten WT-Tieren vor allem in der TP-Fraktion zu verzeichnen war, während es in der SP-Fraktion zu einer Konzentrationsabnahme kam (Kapitel 3.3.2). Bei den entsprechenden Tieren der nNOS-KO-Gruppe kam es dagegen in der SP-Fraktion zu einem Konzentrationsanstieg des Enzyms (Kapitel 3.3.3). Dieselbe subzelluläre Proteindynamik war auch für die GAPDH nachweisbar. Interessant ist hierbei, dass für die GAPDH eine NO-medierte ADP-Ribosylierung und damit einhergehende Verminderung der enzymatischen Aktivität beschrieben wurde (Zhang und Snyder, 1992). Des Weiteren konnten glykolytische Enzyme, darunter die ALDOC und GAPDH, in der PSD nachgewiesen werden (Li et al., 2004). Ihre Aktivität wird dort NO-abhängig reguliert (Wu et al., 1997; 2004). Daraus leitet sich eine These zur regionalen ATP-Produktion im Rahmen synaptischer Plastizität ab. Fructose-1,6-bisphosphat wird enzymatisch durch die ALDOC zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat (G3P) und Dihydroxyacetonphosphat gespalten. G3P ist das Substrat der GAPDH und wird  $\text{NAD}^+$ -abhängig zu 3-Phosphoglyceroylphosphat oxidiert. Dabei entsteht NADH, welches bei der durch die LDH katalysierten Reduktion von Pyruvat zu Laktat als Reduktionsmittel genutzt wird und so erneut als  $\text{NAD}^+$  zur Verfügung steht. Unter katalytischer Wirkung der Phosphoglycerat-Kinase wird ein energiereicher Phosphatrest des 3-Phosphoglyceroyl-phosphats auf ADP übertragen, so dass ATP entsteht. ATP steht nun den Proteinkinasen PKA, PKC und der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-aktivierten Proteinkinase sowie ATP-abhängigen Ionenkanälen in der PSD zur Verfügung. Im Zusammenhang mit der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinphosphorylierung sei auf die vermutete Beeinflussung des intrazellulären Calciumstoffwechsels durch unterschiedliche VDAC-Verteilungsmuster hingewiesen (siehe Kapitel 4.3), was die Relevanz dieser Beobachtung in Bezug auf Langzeitgedächtniskonsolidierungsprozesse unterstreicht.

Die Rolle des durch die nNOS generierten NOs besteht in einer Regulation der GAPDH- und der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinphosphorylierung (Wu et al., 1996; Wu et al., 1997). NO erhöht die Aufnahme des Kofaktors  $\text{NAD}^+$  durch die

GAPDH und den Anteil an Aktin-gebundener GAPDH. Im Sinne einer Rückwärts-Schleife vermindert die NO-vermittelte Aufnahme des Kofaktors die Enzymaktivität. ATP-abhängige Autophosphorylierung der GAPDH erhöht den Anteil des Aktin-gebundenen Enzyms zusätzlich.  $\text{NAD}^+$ -Aufnahme und Autophosphorylierung führen beide durch Verminderung der Enzymaktivität zu einer lokalen Minderproduktion von ATP. Die vorliegenden Ergebnisse scheinen denen von Wu et al. (1997) zu widersprechen, da ausgerechnet in der die PSD enthaltenden SP-Fraktion nNOS-defizienter Mäuse nach Jungtierpräsentation höhere Konzentrationen der GAPDH und ALDOC festgestellt wurden und WT-Mäuse nach Jungtierpräsentation eine Konzentrationszunahme glykolytischer Enzyme in der TP-Fraktion aufwiesen. Wu et al. (1997) wiesen zwar immunhistochemisch nach, dass ein großer Teil GAPDH in der PSD lokalisiert ist, allerdings verwendeten sie für ihre weiterführenden Bindungsstudien einen *In-vitro*-Ansatz mit gereinigter GAPDH, Aktin und NAD sowie Nitroprussidnatrium als NO-Donor (Wu et al., 1997). Daher ist aufgrund ihrer Ergebnisse keine Beurteilung der subzellulären Proteinverteilungsdynamik möglich. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass die GAPDH in Neuronen neben ihrer Rolle als Dehydrogenase der Glykolysekaskade auch als Kinase zur Phosphorylierung der Alpha-1-Untereinheit des GABA-A-Rezeptors fungiert (Laschet et al., 2004). Über diese glykolyseabhängige Phosphorylierung wird die GABA-A-Rezeptoraktivität erhöht. Wie in der Einleitung beschrieben (siehe Kapitel 1.2 und 1.3), spielen GABA-erge Interneuronen im *Bulbus olfactorius* und ihr hemmender Einfluss auf die Mitralzellen eine Schlüsselrolle im Rahmen olfaktorischer Konsolidierungsprozesse. So wird über die Körnerzellen in aktivierten Glomerula selektiv die GABA-Freisetzung vermindert und in nicht-aktivierten Glomerula im Sinne einer Kontrastverstärkung erhöht. GABA-erge Interneuronen im *Bulbus olfactorius* unterliegen einem kontinuierlichen Neurogenesezyklus, der unter anderem eine Optimierung olfaktorischer Informationsprozesse gewährleistet und mit einer Verbesserung olfaktorischer Gedächtnisbildung assoziiert ist (Rocheffort et al., 2002; Lledo und Gheusi, 2003). Aufgrund der beschriebenen Zusammenhänge kann vermutet werden, dass auch die in der vorliegenden Arbeit beobachteten subzellulären Verteilungsunterschiede der GAPDH zwischen WT- und nNOS-KO-Mäusen sechs Stunden nach Jungtierpräsentation neben der lokalen Beeinflussung des Energiestoffwechsels über die phosphorylierungsabhängige Beeinflussung des Gleichgewichts zwischen exzitato-

rischer und inhibitorischer Neurotransmission im *Bulbus olfactorius* zu einer Einschränkung der Generierung und mindestens vorübergehenden Speicherung von Geruchsmustern beitragen.

Wie unter Kapitel 3.3.1 beschrieben, lag das Neuronale Protein 25 (NP25) bei WT-Mäusen in der SP-Fraktion in höheren Konzentrationen vor als bei nNOS-KO-Mäusen. Nach Jungtierpräsentation wurde sowohl bei WT- als auch bei nNOS-KO-Tieren eine Konzentrationsabnahme beobachtet. NP25, benannt nach seinem ungefähren Molekulargewicht in kDa, zeigt starke Homologien zu Aktin-interagierenden Proteinen der Calponin-Subfamilie, wie SM22 $\alpha$ , mp20 und Calponin (Ren et al., 1994). Der C-Terminus des Proteins enthält eine ATP-Bindungssequenz, die hochkonserviert in der katalytischen Domäne von Proteinen der PKC-Familie vorkommt (Nishizuka, 1988). NP25 lässt sich als Monomer in mindestens zwei Isoformen bei Ratten ausschließlich in Neuronen des Gehirns und Rückenmarks nachweisen, was auf seine Funktion in besonders hochdifferenzierten Zellen hinweist. Eine untranslatierte Konsensussequenz am 3'-mRNA-Ende, die ebenfalls bei Zellzyklusregulatoren und Transkriptionsfaktoren vorkommt, lässt einen hohen Umsatz und eine regulatorische Funktion des Proteins vermuten. Immunhistochemisch finden sich besonders hohe Proteinkonzentrationen im Hippocampus, dem frontalen Kortex sowie Mittel- und Kleinhirn. Im Thalamus und Hypothalamus konnte keine entsprechende Immunreaktivität nachgewiesen werden (Ren et al., 1994). Die *In-situ*-Hybridisierung für NP25-mRNA zeigte unter anderem im *Tuberculum olfactorium* der Ratte nur ein schwaches Signal (Ren et al., 1994). Des Weiteren konnte durch *In-vitro*- und *In-situ*-Versuche gezeigt werden, dass NP25 in Neuronen nicht nur mit F-Aktin kolokalisiert ist, sondern auch an der Assoziation polymerisierten F-Aktins beteiligt ist (Mori et al., 2004). Das zytoskelettale Protein F-Aktin spielt wiederum eine wichtige Rolle bei intrazellulären Transportvorgängen und Zelldifferenzierungsprozessen als Reaktion auf extrazelluläre Signale (Rao, 2002). So wurde die Aktin-Polymerisation in den Dornen von Dendriten im Zusammenhang mit synaptischer Plastizität und Lernvorgängen beschrieben (Fukazawa' et al., 2003; Fischer et al., 2004; Dillon und Goda, 2005). An der Kontrolle der Aktinfilament-Organisation sind mehr als 100 Regulatorproteine beteiligt (Button et al., 1995). Änderungen der Konzentrationen von NP25 und Aktin-Komponenten wurden auch im Hippocampus

von Ratten gefunden, die sechs Wochen lang einer mit künstlichen Objekten angereicherten Umgebung ausgesetzt waren (McNair et al., 2007).

Die hier vorliegenden Ergebnisse legen die Involvierung des intrabulbären NP25 in zytoskelettale Umbauprozesse bei der sozio-olfaktorischen Langzeitgedächtniskonsolidierung nahe. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von McNair et al. (2007) war bei der Maus sechs Stunden nach Jungtierpräsentation im Vergleich zu den Kontrolltieren die Konzentration von NP25 erniedrigt. Eine mögliche Erklärung ist, dass zur Verwirklichung zytoskelettaler Veränderungen im Rahmen synaptischer Plastizität im Bereich der PSD eine F-Aktin-Reorganisation stattfindet, die mit einer vorübergehenden Konzentrationsabnahme von NP25 einhergeht.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Konzentrationsveränderungen von Proteinen des UPS sechs Stunden nach Jungtierpräsentation deuten auf eine Beteiligung desselben an Prozessen sozio-olfaktorischer Gedächtnisbildung im *Bulbus olfactorius* hin und stützen die Hypothese, dass synaptische Plastizität sowohl Proteinbiosynthese als auch Proteindegradation erfordert (Ehlers, 2003; Karpova et al., 2006; Ding et al., 2007).

Die Untersuchungen ergaben, dass die Variante 1 des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms E2 (UEV1) bei WT-Mäusen nach Jungtierpräsentation in höherer Konzentration vorlag als in der Kontrollgruppe (siehe Kapitel 3.3.2). UEV1 ist charakterisiert durch das Fehlen eines Cystein-Restes, in dessen Konsequenz die Konjugation und der Transfer von Ubiquitin an Proteinsubstrate im Rahmen des Ubiquitin-Proteasom-Systems nicht mehr möglich ist. Es handelt sich bei dieser inaktiven Variante der E2-Enzyme um ein Protein, das früher als CROC-1 bezeichnet wurde. Isoformen des Proteins finden sich konstitutiv in jedem Gewebe. Es wird vermutet, dass UEV1-Proteine die Ubiquitinierung von Proteinen modulieren könnten, indem sie Heterodimere mit den „echten“ E2-Enzymen bilden und damit deren Aktivität oder Substratspezifität verändern (Sancho et al., 1998). Als Heterodimer mit dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym E2 N katalysiert es die Synthese nicht-kanonischer Poly-Ubiquitinketten. Diese Art von Polyubiquitinierung aktiviert zum Beispiel die NF-kappa B-Inhibitor Kinase (Tanaka et al., 2001). Abhängig vom kanonischen Ubiquitinierungsgrad eines Proteins kommt es entweder zur Regulation seines intrazellulären Transports (Monoubiquitinierung) oder zum proteasomalen Abbau (Multiubiquitinierung) (Glickman und Ciechanover, 2002). Darüber hinaus ist UEV1 in

der Lage, den Promotor des *c-fos*-Gens und damit dessen Transkription zu aktivieren (Rothofsky und Lin, 1997). Die beschriebenen Unterschiede im Expressionsmuster zwischen WT- und nNOS-KO-Mäusen sechs Stunden nach Jungtierpräsentation könnten daher einen Einfluss auf die lerninduzierte Transkriptionsrate bestimmter in Konsolidierungsprozesse eingebundene Gene nehmen.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine stark verminderte Konzentration der Untereinheit beta-6 des multikatalytischen proteasomalen 20S-Komplexes nur in der SP-Fraktion von WT-Mäusen nach Jungtierpräsentation nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.3.2). In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass es während synaptischer Plastizität am Proteasom selbst zu einer Änderung der Proteinabbaurate kommt, was auf eine wichtige Rolle bei der Veränderung des Proteinaufbau/-abbaugleichgewichts im Allgemeinen und der Regulation von Transkriptionsfaktoren im Speziellen hindeutet (Reid et al., 2003). Im Hefe-Zweihibrid-System wurde eine direkte Interaktion zwischen der Rezeptor-Tyrosinkinase *trkA* und der proteasomalen Untereinheit beta-6 nachgewiesen (MacDonald et al., 1999). Somit konnte eine direkte Verbindung zwischen Rezeptoraktivierung und Regulation des Proteinabbaus über das UPS aufgezeigt werden. Die fehlende Konzentrationsverminderung der proteasomalen Untereinheit beta-6 in der SP-Fraktion von nNOS-KO-Mäusen sechs Stunden nach Jungtierpräsentation könnte ein Hinweis auf eine Überexpression proteolytischer Signalwege in der PSD während Konsolidierungsprozessen sein, der zu einer Einschränkung der sozio-olfaktorischen Langzeitgedächtnisbildung führt.

Darüber hinaus wurden nicht-proteolytische Funktionen von proteasomalen 19S-Untereinheiten als Elongationsfaktor der RNA-Polymerase II und damit eine direkte Regulation der Proteinbiosynthese auf Transkriptionsniveau beschrieben (Ferdous et al., 2002; Gillette et al., 2004; Ding et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnten Unterschiede im Proteinexpressionsmuster einiger HnRNPs in der SP-Fraktion von WT- und nNOS-KO-Mäusen unter Kontrollbedingungen (HnRNP K) und sechs Stunden nach Jungtierpräsentation (HnRNPs A2/B1 und D) festgestellt werden (siehe Kapitel 3.3.5). HnRNPs regulieren den intrazellulären Transport und die Stabilität von mRNA-Molekülen. Dies ist wichtig, um die Expression bestimmter Proteine in spezifischen subzellulären Kompartimenten zu maximieren und die ektope Translation zu minimieren. Die Translation wird daher lokalisationsabhängig

während des mRNA-Transports inhibiert und aktiviert, sobald die mRNA ihr intrazelluläres Zielkompartiment erreicht hat.

Die HnRNPs D und K regulieren die Stabilität und Translation unterschiedlicher mRNAs mit spezifischen Bindungssequenzen, beispielsweise des AU-reichen Elements (Audic und Hartley, 2004). Das HnRNP K inhibiert die Translation der erythrozytären Lipoxygenase durch Blockade der 60S ribosomalen Untereinheit (Ostareck et al., 2001). Der über die c-src-Kinase vermittelte Phosphorylierungsgrad entscheidet über Lokalisation und Aktivität des HnRNP K (Habelhah et al., 2001; Ostareck-Lederer et al., 2002). Eine Beteiligung von HnRNP D an der Initiierung der Translation der c-fos-mRNA wurde beschrieben (Audic et al., 2004). Die Bedeutung von c-Fos für Langzeitgedächtniskonsolidierungsprozesse ist bereits in Kapitel 1.3 erläutert worden. Die hier gefundenen Konzentrationsunterschiede, insbesondere in der die PSD enthaltenden SP-Fraktion, könnten somit die fehlende sozio-olfaktorische Langzeitgedächtnisbildung bei nNOS-KO-Mäusen durch eine lokale Störung der c-fos-mRNA-Translation erklären. Die Bedeutung der in zwei Proteinpunkten gegensätzlich veränderten Proteinkonzentration von HnRNP D ist möglicherweise durch Unterschiede im Phosphorylierungsgrad und damit der Aktivität des Proteins zu erklären.

Der zytoplasmatische Anteil des HnRNP A2 bindet als Heterodimer mit HnRNP E1 an bestimmte mRNA-Nucleotidsequenzen, darunter das *A2-response element*, und verhindert die Translation (Kosturko et al., 2006). Es kommt zur Ausbildung eines Ribonucleotidkomplexes, der in neuronalen Zellen über Mikrotubuli in die distalen Dendriten transportiert wird, wo dann die lokalisationsabhängige Translation stattfindet (Carson et al., 2006). Auffällig ist, dass in der vorliegenden Arbeit nur WT-Mäuse sechs Stunden nach Jungtierpräsentation eine Konzentrationsabnahme des HnRNP A2/B1 aufwiesen, was auf eine Beeinträchtigung der lern-induzierten lokalisationsabhängigen Translation bei nNOS-KO-Mäusen schließen lässt.

Eine weitere Beeinflussung der lokalen mRNA-Translationaktivität während Gedächtniskonsolidierungsprozessen erfolgt, wie in Kapitel 1.5 beschrieben, über Signalwege, in die die Proteinkinasen ERK und mTOR eingebunden sind (Tischmeyer et al., 2003; Kelleher et al., 2004). Es wurde kürzlich beschrieben, dass NO in nicht-neuronalen Zellen die Translation über Signalwege, in welche die oben genannten Proteinkinasen involviert sind, beeinflusst (Pervin et al., 2007).

Somit lässt sich vermuten, dass durch die nNOS bereitgestelltes NO im Rahmen der sozio-olfaktorischen Langzeitgedächtniskonsolidierung über unterschiedliche Mechanismen eine Schlüsselrolle in der Regulation von Faktoren spielt, welche die basale und/oder induzierbare lokalisationsabhängige mRNA-Translation kontrollieren.

#### **4.5 Der Einfluss des *Bulbus olfactorius* und anderer Hirnregionen auf die sozio-olfaktorische Gedächtnisbildung**

Wie in Kapitel 1.2 beschrieben, sind in die Verarbeitung und Konsolidierung sozio-olfaktorischer Gedächtnisinhalte einige weitere Hirnregionen involviert. Eine wichtige Funktion scheint hierbei der Hippocampusformation zuzukommen. Es wurde gezeigt, dass Läsionen dieser Hirnregion das sozio-olfaktorische Langzeitgedächtnis von Mäusen beeinflussen (Kogan et al., 2000). Daher ist es möglich, dass ein verändertes hippocampales Proteinexpressionsmuster bei nNOS-KO-Mäusen ebenfalls an der Beeinträchtigung der sozio-olfaktorischen Langzeitgedächtnisleistung beteiligt ist.

Kirchner et al. (2004) fanden bei der Proteomanalyse des Hippocampus von WT- und nNOS-KO-Mäusen unter Kontrollbedingungen bei den letztgenannten verminderte Konzentrationen des vesikulären Fusionsproteins (Synonym: NSF) und erhöhte Konzentrationen der Untereinheit 1 des Guaninnucleotid-bindenden Proteins beta, metabolischer Proteine (der Aspartataminotransferase, der ALDOC, der Gamma-Enolase, der Phosphoglyceratkinase 1 und der Pyruvatkinase), des 78kDa Glucose-regulierten Proteins und der Beta-Untereinheit des F-Aktin *capping* Proteins.

In der vorliegenden Arbeit konnten weder die Untereinheit 1 des Guaninnucleotid-bindenden Proteins beta noch das vesikuläre Fusionsprotein identifiziert werden. Kirchner et al. (2004) verwendeten bei der Datenbankrecherche allerdings andere Speziesbeschränkungen, indem sie die Massenspektren mit den Datenbankeinträgen aller Säugetiere verglichen. So wurde die Untereinheit 1 des Guaninnucleotid-bindenden Proteins beta anhand eines Eintrags für die Spezies *Homo sapiens* identifiziert. Zum vesikulären Fusionsprotein fehlen in dem Artikel leider sämtliche zur Identifizierung und Quantifizierung des Proteins notwendigen Angaben. Obwohl die von Kirchner et al. (2004) in ihrer Konzentration als signifikant verändert beschriebenen Proteine bis auf die beiden oben besprochenen und die Beta-Untereinheit

des F-Aktin *capping*-Proteins auch in der vorliegenden Arbeit identifiziert werden konnten, ergab sich dabei kein Hinweis auf erhöhte Konzentrationen metabolischer Enzyme oder des 78kDa Glucose-regulierten Proteins bei nNOS-KO-Mäusen in der Kontrollgruppe. Auf die Verteilungsunterschiede metabolischer Enzyme nach Jungtierpräsentation wurde bereits in Kapitel 4.4 eingegangen. Unter Berücksichtigung methodischer Unterschiede (Kirchner et al., 2004, bestimmten absolute Proteinkonzentrationen und verwendeten ausschließlich Coomassie-Blau-gefärbte 2D-Gele) ist aufgrund der vorliegenden Ergebnisse zu vermuten, dass das Fehlen von nNOS in Abhängigkeit von der Stärke seiner Expression und der es synthetisierenden Neuronen Areal-spezifische Effekte hervorruft. Beispielsweise sind im Hippocampus GABA-erge Interneuronen des *Stratum pyramidale* der Regionen CA1 und CA3 stark nNOS-haltig (Jinno et al., 2001), während es im *Bulbus olfactorius* vor allem die Körnerzellen und periglomerulären Zellen mit ihren in Kapitel 1.2 und 1.3 beschriebenen Interaktionen sind. Die Areal-spezifischen Effekte könnten Ausdruck von Unterschieden in der Verarbeitungsebene und der intrinsischen Informationsprozessierung im Rahmen sozio-olfaktorischer Langzeitgedächtniskonsolidierung sein. Interessant wäre die Analyse stimulus- (un-)abhängiger Veränderungen im Proteinexpressionsmuster der medialen Amygdala von WT- und nNOS-KO-Mäusen, da diese ein wichtiger Konvergenzpunkt für Informationen aus dem MOS und AOS ist (siehe Kapitel 1.2).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass der *Bulbus olfactorius* eine der Schlüsselregionen im Rahmen der proteinbiosyntheseabhängigen sozio-olfaktorischen Gedächtniskonsolidierung darstellt. Diese Schlussfolgerung wird durch die Tatsache unterstützt, dass nach olfaktorischem Lernen unter anderem im *Bulbus olfactorius* eine Induktion der c-Fos-Synthese nachgewiesen werden konnte, nicht aber in der Hippocampusformation (Richter et al., 2005).

McNair et al. (2007) untersuchten mit zu der vorliegenden Arbeit vergleichbaren Methoden Unterschiede im Proteom des Hippocampus der Ratte nach sechswöchiger Haltung in einer mit verschiedenen künstlichen Objekten angereicherten Umgebung. Bekannt ist, dass durch diesen experimentellen Ansatz die Anzahl der Synapsen in der Hippocampusformation gesteigert werden kann (Duffy et al., 2001; Li et al., 2007).

McNair et al. (2007) untersuchten neuronales Gewebe der Region CA1 in einer dendritischen und einer somatischen Proteinfraction. Die Ergebnisse belegen, dass es dabei

im Hippocampus zu einer Veränderung der Proteinbiosynthese bei einer Vielzahl von Proteinfamilien kommt. Es wurden Proteine in 42 somatischen und 32 dendritischen Proteinpunkten identifiziert, die sich in ihrer Proteinkonzentration unterschieden. Dabei zeigten sich Proteine mit Aufgaben in zellulären Signalkaskaden vor allem in der dendritischen Fraktion vermehrt. Dies unterstreicht die Bedeutung der exakten subzellulären Lokalisation von Proteinkonzentrationsänderungen, die bei der unfraktionierten Betrachtung unter Umständen nicht nachweisbar sind. Unter Berücksichtigung des Speziesunterschiedes sowie der Unterschiede in Art und Dauer der Lernparadigmen ergeben sich einige Gemeinsamkeiten mit den hier vorliegenden Ergebnissen. Dies gilt beispielsweise für NP25, GAPDH, HnRNP D und K sowie der im Hippocampus vorherrschenden VDAC-Isoform 3. Diese Gemeinsamkeiten stützen die Hypothese, dass die oben genannten Proteine in die Generierung olfaktorischer Muster involviert sind, die an der Konsolidierung und/oder dem Abruf eines sozio-olfaktorischen Gedächtnisinhaltes beteiligt sind (Schaefer et al., 2002).

## 4.6 Fazit

Zusammenfassend ist festzustellen, dass nNOS-KO-Mäuse bei unbeeinträchtigter sozio-olfaktorischer Kurzzeitgedächtnisleistung im Gegensatz zu WT-Mäusen nicht in der Lage sind, sich den olfaktorischen Fingerabdruck eines Artgenossen länger als 24 Stunden zu merken, mithin ein sozio-olfaktorisches Langzeitgedächtnis auszubilden. Dieses verhaltensexperimentell nachweisbare Defizit geht einher mit Veränderungen im Proteinexpressionsmuster des *Bulbus olfactorius*. Den dramatischen Einfluss veränderter Proteinexpressionsmuster auf spezifische zelluläre Funktionen erklärt Schubert (2003) mit der These, dass molekulare Netzwerke einem einzigartigen Proteinlokalisations- und Antilokalisationscode gehorchen. Kombinatorische molekulare Muster (englisch *combinatorial molecular pattern*, CMP) sind in jedem Gewebe die Grundeinheit und in höheren Organisationseinheiten, den CMP-Motiven, organisiert. Mit diesem Modell lassen sich die beobachteten expositions- und genotypabhängigen Proteinverschiebungen erklären. Darüber hinaus liefert es Erklärungen für das Fehlen weiterer Proteinkonzentrationsveränderungen, da es während der Konsolidierung eines sozio-olfaktorischen Langzeitgedächtnisses zu Proteintranslokationen und einer Veränderung der CMP-Motive ohne ausgedehnte *de novo*-Proteinbiosynthese kommt. Die Untersuchung des

*Bulbus olfactorius* vor und nach Jungtierpräsentation bei WT- und nNOS-KO-Mäusen mittels Multiepitop-Liganden Kartographie könnte daher einen Anknüpfungspunkt an diese Arbeit darstellen. Die Nutzung der Methode könnte zur Identifizierung höherer Proteinorganisationsmotive während Konsolidierungsprozessen beitragen sowie die Kenntnisse über den Einfluss von NO auf die Organisation zellulärer Netzwerke ergänzen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass olfaktorische Langzeitgedächtnisbildung bei Mäusen im *Bulbus olfactorius* als zentralem Element des olfaktorischen Systems abhängig ist von nNOS-medierter lokaler und zeitlich begrenzter NO-Produktion. Diese greift auf vielfältige Weise direkt oder indirekt in das fein abgestimmte, konzertierte und dynamische Zusammenspiel des Proteomnetzwerks ein. *A priori* hat die Verminderung der ASN-Konzentration bei nNOS-KO-Mäusen möglicherweise einen Einfluss auf die Freisetzungverfügbarkeit von Neurotransmittern. Über Verteilungsunterschiede der VDACs kommt es zu einer lokalen Störung des Calciumstoffwechsels. Sechs Stunden nach Jungtierpräsentation scheinen Störungen des lokalen Energiestoffwechsels sowie eine Beeinflussung der GABA-A-Rezeptoraktivität über die GAPDH zur Beeinträchtigung der sozio-olfaktorischen Langzeitgedächtniskonsolidierung zu führen. Eine Überexpression proteolytischer Enzyme in der PSD von nNOS-KO-Mäusen lässt eine Störung des fragilen Gleichgewichts zwischen Proteinauf- und -abbau mit den entsprechenden Konsequenzen vermuten. Unterschiede in der Verteilungsdynamik des F-Aktin-verbindenden Proteins NP25 deuten auf eine Beeinträchtigung der lern-induzierten Zytoskelett-Reorganisation hin. Schließlich tragen vor allem innerhalb der PSD unterschiedliche Verteilungsmuster der HnRNPs über eine Beeinflussung der lokalisationsabhängigen Translation entscheidend zur eingeschränkten sozio-olfaktorischen Langzeitgedächtnisleistung der nNOS-KO-Mäuse bei. Möglicherweise wird dies unterstützt durch weitere NO-abhängige Signalwege, die die Rezeptorvermittelte Translationsaktivität beeinflussen. Weitere *In-vivo*- und *In-vitro*- Untersuchungen sind zur Überprüfung und Ergänzung dieser Hypothesen erforderlich.

## 5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die mit der proteinbiosyntheseabhängigen sozio-olfaktorischen Langzeitgedächtnisbildung einhergehenden proteomischen Veränderungen auf der Ebene des *Bulbus olfactorius* von nNOS-KO- und WT-Mäusen zu charakterisieren. Dabei wurde postuliert, dass nNOS-vermittelte NO-Bildung im *Bulbus olfactorius* einen verhaltensexperimentell und molekularbiologisch nachweisbaren Effekt auf die sozio-olfaktorische Langzeitgedächtnisbildung ausübt. Zunächst wurde in einem Paradigma zur sozialen Diskrimination das Kurz- beziehungsweise Langzeitwiedererkennungsgedächtnis von nNOS-KO- und WT-Mäusen untersucht. Es folgte die Erstellung von Proteomkarten des *Bulbus olfactorius* beider Genotypen. Das extrahierte Proteom wurde in einer synaptischen (SP) und einer Triton-X-100-löslichen (TP) Fraktion aufgetrennt, in der zweidimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht separiert sowie anschließend der massenspektrometrischen MALDI LIFT-TOF-Analytik zugeführt. Aus den 2D-Gelen von insgesamt vier Vergleichsgruppen wurden mit Hilfe der computergestützten quantitativen Proteomanalyse Unterschiede im Proteinexpressionsmuster des *Bulbus olfactorius* zwischen nNOS-KO- und WT-Mäusen vor sowie sechs Stunden nach Jungtierpräsentation identifiziert. Die Identifizierung der entsprechenden Proteine erfolgte durch Nutzung Nano-LC-ESI-Iontrap-Analytik.

Es konnte gezeigt werden, dass nNOS-KO-Mäuse bei unbeeinträchtigter sozio-olfaktorischer Kurzzeitgedächtnisleistung nicht in der Lage sind, sich den olfaktorischen Fingerabdruck eines Artgenossen bis zu 24 Stunden zu merken; mithin ein proteinbiosyntheseabhängiges Langzeitgedächtnis auszubilden. Insgesamt wurden 469 Proteinpunkte im *Bulbus olfactorius* identifiziert. Im Kontrollzustand war das Alpha-Synuclein in der TP-Fraktion von nNOS-KO-Mäusen in geringerer Konzentration vorhanden als bei WT-Mäusen ( $p = 0,014$ ), was möglicherweise die Freisetzungsvorfügbarkeit von Neurotransmittern beeinflusst. Der spannungsabhängige anionenselektive Kanal VDAC-1 lag in der SP-Fraktion von nNOS-KO-Mäusen in höherer Konzentration vor als bei WT-Mäusen ( $p = 0,038$ ). Diese wiesen höhere Konzentrationen von VDAC-2 auf ( $p = 0,007$ ). Die Verteilungsunterschiede könnten

den lokalen Calciumstoffwechsel beeinflussen. Das heterogene nukleäre Ribonucleoprotein HnRNP K lag in der SP-Fraktion der nNOS-KO-Mäuse in geringer Konzentration vor als bei WT-Mäusen ( $p = 0,042$ ). Sechs Stunden nach Jungtierpräsentation kam es bei WT-Mäusen in der TP-Fraktion und bei nNOS-KO-Mäusen in der SP-Fraktion zu einer Konzentrationszunahme der Aldolase C ( $p_{WT} = 0,001$ , beziehungsweise  $p_{KO} = 0,001$ ) und der Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase ( $p_{WT} = 0,045$ , beziehungsweise  $p_{KO} = 0,007$ ), was auf Unterschiede im subzellulären Energiemetabolismus hindeutet. Das Neuronale Protein 25 lag bei WT-Mäusen in der SP-Fraktion in höheren Konzentrationen vor als bei nNOS-KO-Mäusen ( $p = 0,022$ ). Sechs Stunden nach Jungtierpräsentation wurde bei WT-Mäusen eine Konzentrationsabnahme beobachtet ( $p = 0,008$ ), die im Zusammenhang mit zytoskelettalen Reorganisationsvorgängen stehen könnte. Die Variante 1 des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms E2 lag in der TP-Fraktion der WT-Mäuse nach Jungtierpräsentation in höherer Konzentration vor als in der Kontrollgruppe ( $p = 0,003$ ). Eine stark verminderte Konzentration der proteasomalen Untereinheit beta-6 wurde nur in der SP-Fraktion von WT-Mäusen nach Jungtierpräsentation nachgewiesen ( $p = 0,017$ ). Störungen im Gleichgewicht zwischen Proteinauf- und -abbau sind Folge. Sechs Stunden nach Jungtierpräsentation kam es nur bei WT-Mäusen zu einer Konzentrationsverminderung des HnRNP A2/B1 ( $p = 0,032$ ), was auf eine Beeinflussung der lokalisationsabhängigen Proteintranslation hindeutet.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ambrosini, A., G. Racagni. Glutamate receptor-induced cyclic GMP formation in primary cultures of mesencephalic neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **193** (3): 1098-1103.
- Aoki, E., I.K. Takeuchi, R. Shoji, R. Semba. Localization of nitric oxide-related substances in the peripheral nervous tissues. *Brain Res* 1993; **620** (1): 142-145.
- Arancio, O., I. Antonova, S. Gambaryan, S.M. Lohmann, J.S. Wood, D.S. Lawrence, R.D. Hawkins. Presynaptic role of cGMP-dependent protein kinase during long-lasting potentiation. *J Neurosci* 2001; **21** (1): 143-149.
- Arancio, O., V. Lev-Ram, R.Y. Tsien, E.R. Kandel, R.D. Hawkins. Nitric oxide acts as a retrograde messenger during long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *J Physiol Paris* 1996; **90** (5-6): 321-322.
- Audic, Y., R.S. Hartley. Post-transcriptional regulation in cancer. *Biol Cell* 2004; **96** (7): 479-498.
- Balschun, D., D.P. Wolfer, P. Gass, T. Mantamadiotis, H. Welzl, G. Schutz, J.U. Frey, H.P. Lipp. Does cAMP response element-binding protein have a pivotal role in hippocampal synaptic plasticity and hippocampus-dependent memory? *J Neurosci* 2003; **23** (15): 6304-6314.
- Barondes, S.H., H.D. Cohen. Memory impairment after subcutaneous injection of acetoxycycloheximide. *Science* 1968; **160** (827): 556-557.
- Bebien, M., S. Salinas, C. Becamel, W. Richard, L. Linares, R.A. Hipskind. Immediate-early gene induction by the stresses anisomycin and arsenite in human osteosarcoma cells involves MAPK cascade signaling to Elk-1, CREB and SRF. *Oncogene* 2003; **22** (12): 1836-1847.
- Behnisch, T., S. Matsushita, T. Knöpfel. Imaging of gene expression during long-term potentiation. *Neuroreport* 2004; **15** (13): 2039-2043.
- Belluscio, L., G. Koentges, R. Axel, C. Dulac. A map of pheromone receptor activation in the mammalian brain. *Cell* 1999; **97**: 209-220.
- Berggard, T., O. Szczepankiewicz, E. Thulin, S. Linse. Myo-inositol monophosphatase is an activated target of calbindin D28k. *J Biol Chem* 2002; **277** (44): 41954-41959.
- Bernabeu, R., N. Thiriet, J. Zwiller, G. Di Scala. Lesion of the lateral entorhinal cortex amplifies odor-induced expression of c-fos, junB, and zif 268 mRNA in rat brain. *Synapse* 2006; **59** (3): 135-143.
- Bliss, T.V., G.L. Collingridge. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993; **361** (6407): 31-39.
- Bluthé, R.M., R. Dantzer. Role of the vomeronasal system in vasopressinergic modulation of social recognition in rats. *Brain Res* 1993a; **604**: 205-210.
- Bluthé, R.M., G. Gheusi, R. Dantzer. Gonadal steroids influence the involvement of arginine vasopressin in social recognition in mice. *Psychoendocrinology* 1993b; **18** (4): 323-335.
- Boeckmann, B., A. Bairoch, R. Apweiler, M.C. Blatter, A. Estreicher, E. Gasteiger, M.J. Martin, K. Michoud, C. O'Donovan, I. Phan, S. Pilbout, M. Schneider. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res* 2003; **31** (1): 365-370.

- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248-254.
- Brennan, P.A., H. Kaba, E.B. Keverne. Olfactory recognition: a simple memory system. *Science* 1990; **250** (4985): 1223-1226.
- Brennan, P.A., E.B. Keverne. Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. *Prog Neurobiol* 1997; **51**: 457-481.
- Brennan, P.A., H.M. Schellinck, C. de la Riva, K.M. Kendrick, E.B. Keverne. Changes in neurotransmitter release in the main olfactory bulb following an olfactory conditioning procedure in mice. *Neuroscience* 1998; **87** (3): 583-590.
- Brinon, J.G., F.J. Martinez-Guijarro, I.G. Bravo, R. Arevalo, C. Crespo, K. Okazaki, H. Hidaka, J. Aijon, J.R. Alonso. Coexpression of neurocalcin with other calcium-binding proteins in the rat main olfactory bulb. *J Comp Neurol* 1999; **407** (3): 404-414.
- Broillet, M.C., S. Firestein. Cyclic nucleotide-gated channels. Molecular mechanisms of activation. *Ann N Y Acad Sci* 1999; **868**: 730-740.
- Button, E., C. Shapland, D. Lawson. Actin, its associated proteins and metastasis. *Cell Motil Cytoskeleton* 1995; **30** (4): 247-251.
- Caillard, O., H. Moreno, B. Schwaller, I. Llano, M.R. Celio, A. Marty. Role of the calcium-binding protein parvalbumin in short-term synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97** (24): 13372-13377.
- Canteras, N.S., R.B. Simerly, L.W. Swanson. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J Comp Neurol* 1995; **360**: 213-245.
- Carson, J.H., N. Blondin, G. Korza. Rules of engagement promote polarity in RNA trafficking. *BMC Neurosci* 2006; **7 Suppl 1**: S3.
- Chamrad, D.C., G. Korting, K. Stuhler, H.E. Meyer, J. Klose, M. Bluggel. Evaluation of algorithms for protein identification from sequence databases using mass spectrometry data. *Proteomics* 2004; **4** (3): 619-628.
- Chan, S.H.H., K.F. Chang, C.C. Ou, J.Y.H. Chan. Nitric oxide regulates c-fos expression in nucleus tractus solitarius induced by baroreceptor activation via cGMP-dependent protein kinase and cAMP response element-binding protein phosphorylation. *Molecular Pharmacology* 2004; **65** (2): 319-325.
- Chen, P.E., C.G. Specht, R.G. Morris, R. Schoepfer. Spatial learning is unimpaired in mice containing a deletion of the alpha-synuclein locus. *Eur J Neurosci* 2002; **16** (1): 154-158.
- Chen, W.Q., S.U. Kang, G. Lubec. Protein profiling by the combination of two independent mass spectrometry techniques. *Nat Protoc* 2006; **1** (3): 1446-1452.
- Cohen, H.D., S.H. Barondes. Effect of acetoxycycloheximide on learning and memory of a light-dark discrimination. *Nature* 1968; **218** (5138): 271-273.
- Colledge, M., E.M. Snyder, R.A. Crozier, J.A. Soderling, Y. Jin, L.K. Langeberg, H. Lu, M.F. Bear, J.D. Scott. Ubiquitination regulates PSD-95 degradation and AMPA receptor surface expression. *Neuron* 2003; **40** (3): 595-607.
- Cooke, B., C.D. Hegstrom, L.S. Villeneuve, S.M. Breedlove. Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms. *Front Neuroendocrinol* 1998; **19** (4): 323-362.
- Coolen, L.M., R.I. Wood. Bidirectional connections of the medial amygdaloid nucleus in the Syrian hamster brain: simultaneous anterograde and retrograde tract tracing. *J Comp Neurol* 1998; **399**: 189-209.

- Dantzer, R., R.M. Bluthé, G.F. Koob, M. Le Moal. Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. *Psychopharmacology* 1987; **91**: 363-368.
- Davare, M.A., T. Saneyoshi, E.S. Guire, S.C. Nygaard, T.R. Soderling. Inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase by protein 14-3-3. *J Biol Chem* 2004; **279** (50): 52191-52199.
- Davis, H.P., L.R. Squire. Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull* 1984; **96** (3): 518-559.
- Dillon, C., Y. Goda. The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse. *Annu Rev Neurosci* 2005; **28**: 25-55.
- Ding, Q., V. Cecarini, J.N. Keller. Interplay between protein synthesis and degradation in the CNS: physiological and pathological implications. *Trends Neurosci* 2007; **30** (1): 31-37.
- Duffy, S.N., K.J. Craddock, T. Abel, P.V. Nguyen. Environmental enrichment modifies the PKA-dependence of hippocampal LTP and improves hippocampus-dependent memory. *Learn Mem* 2001; **8** (1): 26-34.
- Ehlers, M.D. Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nat Neurosci* 2003; **6** (3): 231-242.
- Eibl-Eibesfeldt, I. Beiträge zur Biologie der Haus- und Ährenmaus nebst einigen Beobachtungen an anderen Nagern. *Z. Tierpsychol.* 1950; **7**: 79-91.
- Engelmann, M. Competition between two memory traces for long-term recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 2008;
- Engelmann, M., C.T. Wotjak, R. Landgraf. Social discrimination procedure: an alternative method to investigate juvenile recognition abilities in rats. *Physiol Behav* 1995; **58** (2): 315-321.
- Farbman, A.I., F.L. Margolis. Olfactory marker protein during ontogeny: immunohistochemical localization. *Dev Biol* 1980; **74** (1): 205-215.
- Ferdous, A., T. Kodadek, S.A. Johnston. A nonproteolytic function of the 19S regulatory subunit of the 26S proteasome is required for efficient activated transcription by human RNA polymerase II. *Biochemistry* 2002; **41** (42): 12798-12805.
- Fischer, A., F. Sananbenesi, C. Schrick, J. Spiess, J. Radulovic. Distinct roles of hippocampal de novo protein synthesis and actin rearrangement in extinction of contextual fear. *J Neurosci* 2004; **24** (8): 1962-1966.
- Flexner, L.B., R.H. Goodman. Studies on memory: inhibitors of protein synthesis also inhibit catecholamine synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; **72** (11): 4660-4663.
- Flood, J.F., M.R. Rosenzweig, E.L. Bennett, A.E. Orme. The influence of duration of protein synthesis inhibition on memory. *Physiol Behav* 1973; **10** (3): 555-562.
- Fukazawa, Y., Y. Saitoh, F. Ozawa, Y. Ohta, K. Mizuno, K. Inokuchi. Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. *Neuron* 2003; **38** (3): 447-460.
- Galvin, J.E., V.M. Lee, J.Q. Trojanowski. Synucleinopathies: clinical and pathological implications. *Arch Neurol* 2001; **58** (2): 186-190.
- Gammie, S.C., R.J. Nelson. Maternal aggression is reduced in neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *J Neurosci* 1999; **19** (18): 8027-8035.

- Giasson, B.I., J.E. Duda, I.V. Murray, Q. Chen, J.M. Souza, H.I. Hurtig, H. Ischiropoulos, J.Q. Trojanowski, V.M. Lee. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science* 2000; **290** (5493): 985-989.
- Gillette, T.G., F. Gonzalez, A. Delahodde, S.A. Johnston, T. Kodadek. Physical and functional association of RNA polymerase II and the proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101** (16): 5904-5909.
- Glickman, M.H., A. Ciechanover. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 2002; **82** (2): 373-428.
- Glish, G.L., R.W. Vachet. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nature* 2003; **2**: 140-150.
- Glover, J.N., S.C. Harrison. Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature* 1995; **373**: 257-261.
- Grecksch, G., H. Matthies. Two sensitive periods for the amnesic effect of anisomycin. *Pharmacol Biochem Behav* 1980; **12**: 663-665.
- Guzowski, J.F. Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus* 2002; **12** (1): 86-104.
- Habelhah, H., K. Shah, L. Huang, A. Ostareck-Lederer, A.L. Burlingame, K.M. Shokat, M.W. Hentze, Z. Ronai. ERK phosphorylation drives cytoplasmic accumulation of hnRNP-K and inhibition of mRNA translation. *Nat Cell Biol* 2001; **3** (3): 325-330.
- Hawkins, R.D., H. Son, O. Arancio. Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus. *Nitric Oxide in Brain Development, Plasticity and Disease* 1998; **118**: 155-172.
- Hegde, A.N. Ubiquitin-proteasome-mediated local protein degradation and synaptic plasticity. *Prog Neurobiol* 2004; **73** (5): 311-357.
- Hodge, T., M. Colombini. Regulation of metabolite flux through voltage-gating of VDAC channels. *Journal of Membrane Biology* 1997; **157** (3): 271-279.
- Hölscher, C., S.P. Rose. An inhibitor of nitric oxide synthesis prevents memory formation in the chick. *Neurosci Lett* 1992; **145** (2): 165-167.
- Huang, P.L., T.M. Dawson, D.S. Bredt, S.H. Snyder, M.C. Fishman. Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* 1993; **75** (7): 1273-1286.
- Itaya, S.K. Anterograde transsynaptic transport of WGA-HRP in rat olfactory pathways. *Brain Res* 1987; **409**: 205-214.
- Izquierdo, I., L.R. Bevilacqua, J.I. Rossato, J.S. Bonini, J.H. Medina, M. Cammarota. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci* 2006; **29** (9): 496-505.
- Jaworski, J., M. Sheng. The growing role of mTOR in neuronal development and plasticity. *Mol Neurobiol* 2006; **34** (3): 205-219.
- Jia, C., M. Halpern. Calbindin D28K immunoreactive neurons in vomeronasal organ and their projections to the accessory olfactory bulb in the rat. *Brain Res* 2003; **977** (2): 261-269.
- Jimenez, C.R., M. Eyman, Z.S. Lavina, A. Gioio, K.W. Li, R.C. van der Schors, W.P. Geraerts, A. Giuditta, B.B. Kaplan, J. van Minnen. Protein synthesis in synaptosomes: a proteomics analysis. *J Neurochem* 2002; **81** (4): 735-744.

- Jinno, S., N. Kinukawa, T. Kosaka. Morphometric multivariate analysis of GABAergic neurons containing calretinin and neuronal nitric oxide synthase in the mouse hippocampus. *Brain Res* 2001; **900** (2): 195-204.
- Karpova, A., M. Mikhaylova, U. Thomas, T. Knöpfel, T. Behnisch. Involvement of Protein Synthesis and Degradation in Long-Term Potentiation of Schaffer Collateral CA1 Synapses. *J Neurosci* 2006; **26** (18): 4949-4955.
- Kawasaki, H., S. Nakayama, R.H. Kretsinger. Classification and evolution of EF-hand proteins. *Biometals* 1998; **11** (4): 277-295.
- Kelleher, R.J., 3rd, A. Govindarajan, S. Tonegawa. Translational regulatory mechanisms in persistent forms of synaptic plasticity. *Neuron* 2004; **44** (1): 59-73.
- Kendrick, K.M., R. Guevara-Guzman, J. Zorrilla, M.R. Hinton, K.D. Broad, M. Mimmack, S. Ohkura. Formation of olfactory memories mediated by nitric oxide. *Nature* 1997; **388** (6643): 670-674.
- Kendrick, K.M., F. Levy, E.B. Keverne. Changes in the sensory processing of olfactory signals induced by birth in sleep. *Science* 1992; **256** (5058): 833-836.
- Keverne, E.B. Pheromonal influences on the endocrine regulation of reproduction. *Trends Neurosci* 1983; **6**: 381-384.
- Kirchner, L., R. Weitzdoerfer, H. Hoeger, A. Url, P. Schmidt, M. Engelmann, S.R. Villar, M. Fountoulakis, G. Lubec, B. Lubec. Impaired cognitive performance in neuronal nitric oxide synthase knockout mice is associated with hippocampal protein derangements. *Nitric Oxide* 2004; **11**: 316-330.
- Kishimoto, J., E.B. Keverne, J. Hardwick, P.C. Emson. Localization of nitric oxide synthase in the mouse olfactory and vomeronasal system: a histochemical, immunological and in situ hybridization study. *Eur J Neurosci* 1993; **5** (12): 1684-1694.
- Kogan, J.H., P.W. Frankland, A.J. Silva. Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. *Hippocampus* 2000; **10**: 47-56.
- Kosaka, T., K. Kosaka. Heterogeneity of nitric oxide synthase-containing neurons in the mouse main olfactory bulb. *Neurosci Res* 2007; **57** (2): 165-178.
- Kosturko, L.D., M.J. Maggipinto, G. Korza, J.W. Lee, J.H. Carson, E. Barbarese. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) E1 binds to hnRNP A2 and inhibits translation of A2 response element mRNAs. *Molecular Biology of the Cell* 2006; **17**: 3521-3533.
- Krettek, J.E., J.L. Price. Projections from the amygdaloid complex and adjacent olfactory structures to the entorhinal cortex and to the subiculum in the rat and cat. *J Comp Neurol* 1977; **172** (4): 723-752.
- Krucker, T., G.R. Siggins, S. Halpain. Dynamic actin filaments are required for stable long-term potentiation (LTP) in area CA1 of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97** (12): 6856-6861.
- Larriva-Sahd, J., A. Rondan, E. Orozco-Estevez, M.R. Sanchez-Robles. Evidence of a direct projection of the vomeronasal organ to the medial preoptic nucleus and hypothalamus. *Neurosci Lett* 1993; **163**: 45-49.
- Laschet, J.J., F. Minier, I. Kurcewicz, M.H. Bureau, S. Trottier, F. Jeanneteau, N. Griffon, B. Samyn, J. Van Beeumen, J. Louvel, P. Sokoloff, R. Pumain. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a GABAA receptor kinase linking glycolysis to neuronal inhibition. *J Neurosci* 2004; **24** (35): 7614-7622.
- Levy, M., G.C. Faas, P. Saggau, W.J. Craigen, J.D. Sweatt. Mitochondrial regulation of synaptic plasticity in the hippocampus. *J Biol Chem* 2003; **278** (20): 17727-17734.

- Li, C., W. Niu, C.H. Jiang, Y. Hu. Effects of enriched environment on gene expression and signal pathways in cortex of hippocampal CA1 specific NMDAR1 knockout mice. *Brain Res Bull* 2007; **71** (6): 568-577.
- Li, K.W., M.P. Hornshaw, R.C. Van Der Schors, R. Watson, S. Tate, B. Casetta, C.R. Jimenez, Y. Gouwenberg, E.D. Gundelfinger, K.H. Smalla, A.B. Smit. Proteomics analysis of rat brain postsynaptic density. Implications of the diverse protein functional groups for the integration of synaptic physiology. *J Biol Chem* 2004; **279** (2): 987-1002.
- Licht, G., M. Meredith. Convergence of main and accessory olfactory pathways onto single neurons in the hamster amygdala. *Exp Brain Res* 1987; **69**: 7-18.
- Linden, M., G. Andersson, P. Gellerfors, B.D. Nelson. Subcellular distribution of rat liver porin. *Biochim Biophys Acta* 1984; **770** (1): 93-96.
- Liu, S., I. Ninan, I. Antonova, F. Battaglia, F. Trinchese, A. Narasanna, N. Kolodilov, W. Dauer, R.D. Hawkins, O. Arancio. alpha-Synuclein produces a long-lasting increase in neurotransmitter release. *Embo J* 2004; **23** (22): 4506-4516.
- Lledo, P.M., G. Gheusi. Olfactory processing in a changing brain. *Neuroreport* 2003; **14** (13): 1655-1663.
- Lu, Y.F., E.R. Kandel, R.D. Hawkins. Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. *J Neurosci* 1999; **19** (23): 10250-10261.
- MacDonald, J.I., J.M. Verdi, S.O. Meakin. Activity-dependent interaction of the intracellular domain of rat trkA with intermediate filament proteins, the beta-6 proteasomal subunit, Ras-GRF1, and the p162 subunit of eIF3. *J Mol Neurosci* 1999; **13** (1-2): 141-158.
- Maroteaux, L., R.H. Scheller. The rat brain synucleins; family of proteins transiently associated with neuronal membrane. *Brain Res Mol Brain Res* 1991; **11** (3-4): 335-343.
- Matochik, J.A. Role of the main olfactory system in recognition between individual spiny mice. *Physiol Behav* 1988; **42** (3): 217-222.
- Matsumoto, Y., S. Unoki, H. Aonuma, M. Mizunami. Critical role of nitric oxide-cGMP cascade in the formation of cAMP-dependent long-term memory. *Learning & Memory* 2006; **13** (1): 35-44.
- Matthies, H. In search of cellular mechanisms of memory. *Prog Neurobiol* 1989; **32** (4): 277-349.
- MattoYelin, M., A. Aitken, S. Ravid. 14-3-3 inhibits the Dictyostelium myosin II heavy-chain-specific protein kinase C activity by a direct interaction: Identification of the 14-3-3 binding domain. *Molecular Biology of the Cell* 1997; **8** (10): 1889-1899.
- McNair, K., J. Broad, G. Riedel, C.H. Davies, S.R. Cobb. Global changes in the hippocampal proteome following exposure to an enriched environment. *Neuroscience* 2007; **145**: 413-422.
- Moore, B.W., V.J. Perez. Specific proteins of the nervous system. In. *Physiological Biochemical Aspects of Nervous Integration*. Englewood Cliffs: F.O. Carlson; 1967. 343-359.
- Mori, K., Y. Muto, J. Kokuzawa, T. Yoshioka, S. Yoshimura, T. Iwama, Y. Okano, N. Sakai. Neuronal protein NP25 interacts with F-actin. *Neurosci Res* 2004; **48** (4): 439-446.
- Mulkey, R.M., S. Endo, S. Shenolikar, R.C. Malenka. Involvement of a Calcineurin/Inhibitor-1 Phosphatase Cascade in Hippocampal Long-Term Depression. *Nature* 1994; **369** (6480): 486-488.
- Nelson, R.J., G.E. Demas, P.L. Huang, M.C. Fishman, V.L. Dawson, T.M. Dawson, S.H. Snyder. Behavioral abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Nature* 1995; **378**: 383-386.

- Nishizuka, Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 1988; **334** (6184): 661-665.
- O'Farrell, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975; **250** (10): 4007-4021.
- Ostareck, D.H., A. Ostareck-Lederer, I.N. Shatsky, M.W. Hentze. Lipoygenase mRNA silencing in erythroid differentiation: The 3'UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining. *Cell* 2001; **104** (2): 281-290.
- Ostareck-Lederer, A., D.H. Ostareck, C. Cans, G. Neubauer, K. Bomsztyk, G. Superti-Furga, M.W. Hentze. c-Src-mediated phosphorylation of hnRNP K drives translational activation of specifically silenced mRNAs. *Mol Cell Biol* 2002; **22** (13): 4535-4543.
- Pappin, D.J., P. Hojrup, A.J. Bleasby. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol* 1993; **3** (6): 327-332?
- Patrick, G.N., B. Bingol, H.A. Weld, E.M. Schuman. Ubiquitin-mediated proteasome activity is required for agonist-induced endocytosis of GluRs. *Curr Biol* 2003; **13** (23): 2073-2081.
- Perez, R.G., T.G. Hastings. Could a loss of alpha-synuclein function put dopaminergic neurons at risk? *J Neurochem* 2004; **89** (6): 1318-1324.
- Perkins, D.N., D.J. Pappin, D.M. Creasy, J.S. Cottrell. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 1999; **20** (18): 3551-3567.
- Pervin, S., R. Singh, E. Hernandez, G. Wu, G. Chaudhuri. Nitric oxide in physiologic concentrations targets the translational machinery to increase the proliferation of human breast cancer cells: involvement of mammalian target of rapamycin/eIF4E pathway. *Cancer Res* 2007; **67** (1): 289-299.
- Philpot, B.D., J.H. Lim, P.C. Brunjes. Activity-dependent regulation of calcium-binding proteins in the developing rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 1997; **387** (1): 12-26.
- Price, J.L., B.M. Slotnick. Dual olfactory representation in the rat thalamus: an anatomical and electrophysiological study. *J Comp Neurol* 1983; **215** (1): 63-77.
- Price, J.L., B.M. Slotnick, M.F. Reval. Olfactory projections to the hypothalamus. *J Comp Neurol* 1991; **306** (3): 447-461.
- Quevedo, J., M.R. Vianna, R. Roesler, F. de Paris, I. Izquierdo, S.P. Rose. Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: Protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learn Mem* 1999; **6**: 600-607.
- Rabilloud, T., C. Valette, J.J. Lawrence. Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension. *Electrophoresis* 1994; **15** (12): 1552-1558.
- Rampon, C., Y.P. Tang, J. Goodhouse, E. Shimizu, M. Kiyin, J.Z. Tsien. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci* 2000; **3** (3): 238-244.
- Rao, J. Targeting actin remodeling profiles for the detection and management of urothelial cancers--a perspective for bladder cancer research. *Front Biosci* 2002; **7**: 1-8.
- Raymond, S., B. Aurell. Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Science* 1962; **138** (3537): 152-153.
- Reid, G., M.R. Hubner, R. Metivier, H. Brand, S. Denger, D. Manu, J. Beaudouin, J. Ellenberg, F. Gannon. Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell* 2003; **11** (3): 695-707.

- Ren, W.Z., G.Y. Ng, R.X. Wang, P.H. Wu, B.F. O'Dowd, D.H. Osmond, S.R. George, C.C. Liew. The identification of NP25: a novel protein that is differentially expressed by neuronal subpopulations. *Brain Res Mol Brain Res* 1994; **22** (1-4): 173-185.
- Ressler, K.J., G. Paschall, X.L. Zhou, M. Davis. Regulation of synaptic plasticity genes during consolidation of fear conditioning. *J Neurosci* 2002; **22**: 7892-7902.
- Richter, K., G. Wolf, M. Engelmann. Social recognition memory requires two stages of protein synthesis in mice. *Learn Mem* 2005; **12** (4): 407-413.
- Roberson, E.D., J.D. English, J.P. Adams, J.C. Selcher, C. Kondratieck, J.D. Sweatt. The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus. *J Neurosci* 1999; **19** (11): 4337-4348.
- Rocheffort, C., G. Gheusi, J.D. Vincent, P.M. Lledo. Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *J Neurosci* 2002; **22** (7): 2679-2689.
- Rogalski-Wilk, A.A., R.S. Cohen. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity and F-actin associations in synaptosomes and postsynaptic densities of porcine cerebral cortex. *Cell Mol Neurobiol* 1997; **17** (1): 51-70.
- Rothofsky, M.L., S.L. Lin. CROC-1 encodes a protein which mediates transcriptional activation of the human FOS promoter. *Gene* 1997; **195** (2): 141-149.
- Routtenberg, A., J.L. Rekart. Post-translational protein modification as the substrate for long-lasting memory. *Trends Neurosci* 2005; **28** (1): 12-19.
- Sampson, M.J., R.S. Lovell, W.J. Craigen. Isolation, characterization, and mapping of two mouse mitochondrial voltage-dependent anion channel isoforms. *Genomics* 1996; **33** (2): 283-288.
- Sampson, M.J., L. Ross, W.K. Decker, W.J. Craigen. A novel isoform of the mitochondrial outer membrane protein VDAC3 via alternative splicing of a 3-base exon - Functional characteristics and subcellular localization. *J Biol Chem* 1998; **273** (46): 30482-30486.
- Sanchez-Andrade, G., B.M. James, K.M. Kendrick. Neural encoding of olfactory recognition memory. *J Reprod Dev* 2005; **51** (5): 547-558.
- Sancho, E., M.R. Vila, L. Sanchez-Pulido, J.J. Lozano, R. Paciucci, M. Nadal, M. Fox, C. Harvey, B. Bercovich, N. Loukili, A. Ciechanover, S.L. Lin, F. Sanz, X. Estivill, A. Valencia, T.M. Thomson. Role of UEV-1, an inactive variant of the E2 ubiquitin-conjugating enzymes, in in vitro differentiation and cell cycle behavior of HT-29-M6 intestinal mucosecretory cells. *Mol Cell Biol* 1998; **18** (1): 576-589.
- Scalia, F., S. Winnans. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J Comp Neurol* 1975; **161**: 31-56.
- Schaefer, M.L., K. Yamazaki, K. Osada, D. Restrepo, G.K. Beauchamp. Olfactory fingerprints for major histocompatibility complex-determined body odors II: relationship among odor maps, genetics, odor composition, and behavior. *J Neurosci* 2002; **22** (21): 9513-9521.
- Schmidt, H., K.M. Stiefel, P. Racay, B. Schwaller, J. Eilers. Mutational analysis of dendritic Ca<sup>2+</sup> kinetics in rodent Purkinje cells: role of parvalbumin and calbindin D28k. *J Physiol* 2003; **551** (Pt 1): 13-32.
- Schubert, W. Topological proteomics, toponomics, MELK-technology. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2003; **83**: 189-209.
- Scott, J.W. The olfactory bulb and central pathways. *Experientia* 1986; **42** (3): 223-232.

- Scott, J.W. Organization of olfactory bulb output cells and their local circuits. *Ann N Y Acad Sci* 1987; **510**: 44-48.
- Shepherd, G.M. Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb. *Physiol Rev* 1972; **52** (4): 864-917.
- Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm, M. Mann. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996; **68** (5): 850-858.
- Shipley, M.T., M. Ennis. Functional organization of the olfactory system. *J Neurobiol* 1996; **30**: 123-176.
- Smalla, K.H., H. Matthies, K. Langnase, S. Shabir, T.M. Bockers, U. Wyneken, S. Staak, M. Krug, P.W. Beesley, E.D. Gundelfinger. The synaptic glycoprotein neuropilin is involved in long-term potentiation at hippocampal CA1 synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97** (8): 4327-4332.
- Specht, C.G., R. Schoepfer. Deletion of the alpha-synuclein locus in a subpopulation of C57BL/6J inbred mice. *BMC Neurosci* 2001; **2**: 11.
- Spehr, M., J. Spehr, K. Ukhanov, K.R. Kelliher, T. Leinders-Zufall, F. Zufall. Parallel processing of social signals by the mammalian main and accessory olfactory systems. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2006; **63** (13): 1476-1484.
- Stanton, P.K., J.M. Sarvey. Blockade of long-term potentiation in rat hippocampal CA1 region by inhibitors of protein synthesis. *J Neurosci* 1984; **4** (12): 3080-3088.
- Stork, O., H. Welzl. Memory formation and the regulation of gene expression. *Cellular and Molecular Life Sciences* 1999; **55** (4): 575-592.
- Suckau, D., A. Resemann, M. Schuerenberg, P. Hufnagel, J. Franzen, A. Holle. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal Bioanal Chem* 2003; **376**: 952-965.
- Tanaka, K., T. Kawakami, K. Tateishi, H. Yashiroda, T. Chiba. Control of I kappa B alpha proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochimie* 2001; **83** (3-4): 351-356.
- Tillerson, J.L., W.M. Caudle, J.M. Parent, C. Gong, T. Schallert, G.W. Miller. Olfactory discrimination deficits in mice lacking the dopamine transporter or the D2 dopamine receptor. *Behav Brain Res* 2006; **172** (1): 97-105.
- Tischmeyer, W., R. Grimm. Activation of immediate early genes and memory formation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 1999; **55** (4): 564-574.
- Tischmeyer, W., H. Schicknick, M. Kraus, C.I. Seidenbecher, S. Staak, H. Scheich, E.D. Gundelfinger. Rapamycin-sensitive signalling in long-term consolidation of auditory cortex-dependent memory. *Eur J Neurosci* 2003; **18** (4): 942-950.
- Toyooka, K., T. Muratake, H. Watanabe, S. Hayashi, T. Ichikawa, H. Usui, K. Washiyama, T. Kumanishi, Y. Takahashi. Isolation and structure of the mouse 14-3-3 eta chain gene and the distribution of 14-3-3 eta mRNA in the mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 2002; **100** (1-2): 13-20.
- Trombley, P.Q. Noradrenergic modulation of synaptic transmission between olfactory bulb neurons in culture: implications to olfactory learning. *Brain Res Bull* 1994; **35** (5-6): 473-484.
- Trombley, P.Q., G.M. Shepherd. Synaptic transmission and modulation in the olfactory bulb. *Curr Opin Neurobiol* 1993; **3** (4): 540-547.
- Vyssokikh, M.Y., A. Katz, A. Rueck, C. Wuensch, A. Dorner, D.B. Zorov, D. Brdiczka. Adenine nucleotide translocator isoforms 1 and 2 are differently distributed in the mitochondrial inner membrane and have distinct affinities to cyclophilin D. *Biochemical Journal* 2001; **358**: 349-358.

- Wagner, Y., A. Sickmann, H.E. Meyer, G. Daum. Multidimensional nano-HPLC for analysis of protein complexes. *J Am Soc Mass Spectrom* 2003; **14** (9): 1003-1011.
- Walsh, M.J., N. Kuruc. The postsynaptic density: constituent and associated proteins characterized by electrophoresis, immunoblotting, and peptide sequencing. *J Neurochem* 1992; **59** (2): 667-678.
- Wanisch, K., C.T. Wotjak, M. Engelmann. Long-lasting second stage of recognition memory consolidation in mice. *Behav Brain Res* 2008; **186** (2): 191-196.
- Weeber, E.J., M. Levy, M.J. Sampson, K. Anflous, D.L. Armstrong, S.E. Brown, J.D. Sweatt, W.J. Craigen. The role of mitochondrial porins and the permeability transition pore in learning and synaptic plasticity. *J Biol Chem* 2002; **277** (21): 18891-18897.
- Weitzdoerfer, R., H. Hoeger, G. Burda, A. Pollak, G. Lubec. Differences in Hippocampal Protein Expression at 3 Days, 3 Weeks, and 3 Months Following Induction of Perinatal Asphyxia in the Rat. *J Proteome Res.* 2008; (Epub ahead of print)
- Wu, K., C. Aoki, A. Elste, A.A. Rogalski-Wilk, P. Siekevitz. The synthesis of ATP by glycolytic enzymes in the postsynaptic density and the effect of endogenously generated nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94** (24): 13273-13278.
- Wu, K., J.L. Xu, P.C. Suen, Y.Y. Huang, H.T. Mount. Nitric oxide increases calcium/calmodulin-dependent phosphorylation of proteins in the postsynaptic density of adult rat cerebral cortex. *Brain Res Mol Brain Res* 1996; **40** (1): 22-26.
- Yi, J.J., M.D. Ehlers. Ubiquitin and protein turnover in synapse function. *Neuron* 2005; **47** (5): 629-632.
- Yu, F., H. Xu, M. Zhuo, L. Sun, A. Dong, X. Liu. Impairment of redox state and dopamine level induced by alpha-synuclein aggregation and the prevention effect of hsp70. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **331** (1): 278-284.
- Zhang, J., S.H. Snyder. Nitric oxide stimulates auto-ADP-ribosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89** (20): 9382-9385.
- Zhang, W., B.T. Chait. ProFound: An expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information. *Anal Chem* 2000; **72** (11): 2482-2489.
- Zhuo, M., J.T. Laitinen, X.C. Li, R.D. Hawkins. On the respective roles of nitric oxide and carbon monoxide in long-term potentiation in the hippocampus. *Learn Mem* 1999; **6** (1): 63-76.

## 7 Danksagungen

Mein Dank gilt allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des ehemaligen Instituts für Medizinische Neurobiologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Gerald Wolf und Herrn Professor Dr. Mario Engelmann für die exzellente Betreuung, Geduld, Verständnis und fruchtbare Diskussionen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Gert Lubec, Leiter der Abteilung für Grundlagenforschung an der Klinik für Kinder- und Jugendheilkunde des Allgemeinen Krankenhauses Wien danke ich für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit bei der MALDI LIFT-TOF-Analyse.

Herr Professor Dr. Michael Naumann und Herr Privatdozent Dr. Thilo Kähne vom Institut für Experimentelle Innere Medizin wiesen mich in die Arbeit mit dem Nano-LC-ESI-Iontrap-Analysator ein und erlaubten mir die Durchführung der entsprechenden Experimente an ihrem Institut.

Herr Dr. Karl-Heinz Smalla aus der Abteilung für Neurobiochemie des Leibniz-Instituts für Neurobiologie ermöglichte mir die Nutzung der 2D-Gelelektrophoresekammern sowie der entsprechenden Auswertungsprogramme und lieferte mir in zahlreichen Diskussionen wertvolle Impulse.

Den BTAs Yvonne Ducho, Maureen Felizardo, Rita Murau, Kathrin Pohlmann und Andrea Rudloff möchte ich für ihre bereitwillige und aufopferungsvolle Hilfe bei der Erlernung von Arbeitsmethoden und -techniken danken.

Meinem Freund Tim Petersen danke ich für die Hilfe bei der Erstellung einiger Abbildungen. Frau Anne Albrecht las das Manuskript und half mir den Text klarer zu strukturieren. Herr Dr. phil. Lutz Sellmer korrigierte diese Arbeit bezüglich Orthographie und Interpunktion.

Ohne die Unterstützung durch meine Familie wäre diese Arbeit undenkbar. Die Liebe, Geduld und Zuversicht meiner Frau Corinna-Johanna halfen mir vom ersten Tag im Labor bis zum Tippen der letzten Zeile.

## 8 Versicherung an Eides statt

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

*Zur Bedeutung der neuronalen Stickstoffmonoxidsynthase für Veränderungen im Proteinexpressionsmuster des Bulbus olfactorius und die sozio-olfaktorische Langzeitgedächtnisbildung der Maus*

am Institut für Biochemie und Zellbiologie in Kooperation mit dem Institut für Experimentelle Innere Medizin, dem Leibniz Institut für Neurobiologie und der Abteilung für Grundlagenforschung der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde in Wien ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

## 9 Darstellung des Bildungsweges

Name	Mathias Jüch
Geburtsdatum	1.März 1982
Geburtsort	Westerland
wohnhaft	Raiffeisenstr. 28, 39112 Magdeburg

### Ausbildung

seit Januar 2009	Assistenzarzt an der Klinik für Innere Medizin am Klinikum Schönebeck (Elbe)
November 2008	Staatsexamen und Approbation als Arzt
September 2006	Forschungsaufenthalt an der Abteilung für Grund- lagenforschung der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde in Wien
April 2006 bis November 2008	Stipendiat der Friedrich-Ebert-Stiftung
Oktober 2002	Beginn des Humanmedizinstudiums an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke- Universität in Magdeburg
August 2001 bis Mai 2002	Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz in Westerland
Juni 2001	Abitur an der Friedrich-Paulsen-Schule in Niebüll

### Veröffentlichungen

Jüch et al. (2009): Congenital lack of nNOS impairs long-term social recognition memory and alters the olfactory bulb proteome. *Neurobiol Learn Mem* 92 (4): 469-484.

# 10 Anhang

## 10.1 Tabellen

**Tabelle I:** Identifizierte Proteine der TP-Fraktion von WT-Kontrolltieren. Angegeben sind die Eintragsnr. in der *Swissprot*-Datenbank, der Proteinname, die Nummer des Proteinpunktes auf dem Gel, theoretisches Molekulargewicht sowie isoelektrischer Punkt, M- bzw. Z-Wert, sowie Anzahl und Sequenzabdeckung [%] der zugeordneten Peptide.

Eintragsnr. Swissprot	Proteinname	Spot Nr.	MW [Da]	pI	M-/Z- Wert	Peptidsequenzen Anz.	%
<b>1.) Signalproteine</b>							
P62259	14-3-3 Protein epsilon	144	29174	4,93	64	6	34
P61982	14-3-3 Protein gamma	349	28171	4,80	1,92	7	34
P63101	14-3-3 Protein zeta/delta	146	27771	4,73	72	8	40
Q542C5	Adenylatkinase 1	33	21540	5,67	55	2	58
		154			69	7	46
		352			80	8	45
Q8CCS7	Calbindin 2	357	28123	4,92	2,06	6	28
Q08331	Calretinin	142	31373	9,94	30	1	48
Q9DBP5	UMP-CMP Kinase	34	22165	5,68	99	2	35
<b>2.) metabolische Proteine</b>							
Q99L13	3-Hydroxyisobutyrat-Dehydrogenase, mitochondrial [Precursor]	124	35440	8,37	2,11	7	29
Q9CRF4	3-oxoacid CoA Transferase [Fragment]	178	29185	8,97	75	6	47
		179			81	6	47
		180			105	8	58
Q99KI0	Aconitat Hydratase, mitochondrial [Precursor]	168	85464	8,08	125	14	29
		169			136	17	29
		170			197	21	39
		171			174	20	36
		248			73	9	20
Q9JII6	Alcohol Dehydrogenase [NADP+]	191	36456	6,87	79	8	35
P17182	Alpha-Enolase	57	47010	6,36	81	10	30
		90			81	9	32
		91			100	9	36
		115			91	7	38
		116			212	3	60

		266			93	8	35
		267			133	12	42
Q03265	ATP Synthase Untereinheit alpha, mitochondrial [Precursor]	255	59753	9,22	2,25	6	21
		202			104	11	32
P56480	ATP Synthase Untereinheit beta, mitochondrial [Precursor]	290	56300	5,19	63	7	24
		337			88	10	31
		338			84	9	29
P00920	Carboanhydrase 2	165	28960	6,52	78	7	43
Q4V9X5	Elektron transferierendes Flavoprotein, alpha-Polypeptid	167	35009	8,62	75	7	37
P05064	Fructose-bisphosphat Aldolase A	206	39225	8,40	117	10	54
		207			61	1	48
		340			79	7	38
P05063	Fructose-bisphosphat Aldolase C	114	39264	6,79	85	6	39
		132			67	6	31
		185			101	7	46
		186			115	10	50
		189			119	10	51
		249			68	6	33
		339			82	7	40
P97807	Fumarathydratase, mitochondrial [Precursor]	182	54371	9,12	82	9	31
		183			92	10	33
P17183	Gamma-Enolase	47	47165	4,99	62	6	27
		48			118	12	39
		60			37	1	30
		69			134	17	48
		157			81	8	31
Q5HZH5	Glutamat-oxaloacetat Transaminase 2, mitochondrial	232	47411	9,13	122	12	42
P19157	Glutathion S-Transferase P 1	227	23478	8,13	64	2	37
Q3THK7	Guaninmonophosphat Synthetase (ähn- lich)	330	76733	6,32	2,25	9	23
Q66JZ6	Guaninmonophosphat Synthetase [Fragment]	252	53383	6,67	2,35	7	22
		253			2,35	7	22
Q6PEB2	Halosäure Dehalogenase (ähnlich)	42	28744	5,70	83	9	50
Q04447	Kreatinkinase B-Typ	9	42713	5,40	2,16	6	28
		16			40	1	17
		66			58	2	40
		67			119	2	60
		38			153	1	58
Q9CPU0	Lactoylglutathion Lyase	24	20678	5,25	1,66	6	29
P16125	L-Laktat Dehydrogenase Beta-Kette	58	36441	5,70	81	9	33

		342			63	8	28
P08249	Malat Dehydrogenase, mitochondrial	210	35596	8,82	113	10	39
	[Precursor]	279			2,19	6	28
Q61171	Peroxiredoxin-2	23	21647	5,20	55	2	33
		353			78	6	55
O08709	Peroxiredoxin-6	38	24739	5,72	70	6	39
Q5XJE7	Phosphoglyceratkinase 1	205	44550	8,02	115	11	40
Q9DBJ1	Phosphoglyceratmutase 1	164	28701	6,75	107	9	59
		166			112	10	59
P09671	Superoxiddismutase [Mn], mitochondrial	161	24603	8,80	74	7	44
	[Precursor]						
P17751	Triosephosphatisomerase	100	26581	7,09	76	7	45
		162			40	1	45
Q64513	Triosephosphatisomerase [Fragment]	163	22506	5,62	69	6	49
Q8R317	Ubiquilin-1	156	61976	4,86	2,33	7	21
Q9QZM0	Ubiquilin-2	139	67379	5,25	2,30	6	17
		140			1,68	5	14
		141			2,24	6	17
Q9CZ13	Ubiquinol-cytochrom-c reductase Kom- plex Kernprotein I, mitochondrial [Precur- sor]	92	52769	5,75	63	7	26
Q9R0P9	Ubiquitin Carboxyl-terminal Hydrolase	21	24838	5,14	83	6	59
	Isozym L1 (Neuronen zytoplasmatisches Protein 9.5)	359			92	6	59
Q8K5D6	V-ATPase E2 Untereinheit	219	26187	8,44	69	6	42
<b>3.) Chaperone</b>							
Q8C2F4	58 kDa Glucose reguliertes Protein	83	56625	5,78	1,99	7	21
P20029	78 kDa Glucose-reguliertes Protein [Pre- cursor]	135	72422	5,07	81	10	23
Q8C2C7	Hsp 60 kDa Protein	73	60956	5,67	83	7	24
		155			71	8	24
Q3TI47	Hsp 70kD Protein 5	136	72346	5,07	2,26	7	18
P63017	Hsp 71 kDa Protein	75	70871	5,37	72	8	17
		213			99	11	26
Q6NZD0	Hsp 8 Protein	108	70872	5,28	1,65	7	16
		222			2,22	8	18
Q504P4	Hspa 8 Protein	61	68779	5,37	62	6	19
Q60864	Stress-induziertes Phosphoprotein 1	173	62582	6,40	72	9	23

**4.) zytoskelettale Proteine**

P60710	Aktin, zytoplasmatisch 1	64	41737	5,29	94	12	46
P63260	Aktin, zytoplasmatisch 2	65	41793	5,31	60	1	46
P23927	Alpha-Kristallin Beta-Kette	220	20069	6,76	54	1	20
O08553	Dihydropyrimidinase- assoziiertes Protein 2	78	62278	5,95	70	8	21
		79	76	9	22	79	76
		101			97	12	27
		102			83	9	27
		103			186	18	49
		106			81	9	26
Q3TT92	Dihydropyrimidinase-ähnlich 3	107	61780	6,04	2,36	7	21
Q62188	Dihydropyrimidinase-assoziertes Protein 3	104	61936	6,04	68	7	24
		105			75	8	25
Q9EQF6	Dihydropyrimidinase-assoziertes Protein 5	175	61516	6,62	62	7	22
		176			68	8	24
		177			70	7	26
Q80V75	Fscn1 Protein [Fragment]	181	51405	6,57	119	12	40
Q64288	Olfaktorisches Marker- protein (OMP)	27	18735	5,00	74	9	56
Q62433	Protein NDRG1	111	43009	5,69	1,72	6	22
Q925K2	saures Gliafibrillen Protein (GFAP)	62	46492	5,05	2,04	6	21
		63			67	8	27
Q60932	spannungsabhängiger anionenselektiver Kanal 1	215	32351	8,55	74	6	39
		216			65	5	35
		217			76	6	41
		218			90	7	45
		272			1,83	5	36
Q5XJF8	Tubulin alpha-1 Kette	341	50152	4,94	36	2	26
P05213	Tubulin alpha-2 Kette	51	50152	4,94	106	9	37
		52			42	2	25
		53			220	9	30
		70			175	19	56
		89			72	7	28
P68373	Tubulin alpha-6 Kette	50	49909	4,96	62	7	25
		85			152	13	52
		109			155	14	51
		125			74	8	27
		204			90	9	32
		286			98	10	34
		333			92	9	32
P68372	Tubulin Beta-2C-Kette	46	49831	4,79	2,18	8	26
		55			1,73	7	21

Q9D6F9	Tubulin Beta-4-Kette	5	49552	4,78	100	11	36
		56			72	1	25
		71			135	17	45
		149			66	9	28
		242			64	9	22
		299			93	11	36
P99024	Tubulin Beta-5Kette	59	49671	4,78	87	10	34
		68			93	12	32
		72			94	10	34
		151			1,95	7	18
		287			67	8	25

#### 5.) sonstige nukleäre Proteine

Q9D172	ES1 Protein homolog, mitochondrial [Precursor]	226	28090	9,00	74	6	47
O35737	Heterogenes nukleäres Ribonucleoprotein H	88	49068	5,89	64	7	26
Q8K2T1	NmrA-ähnlich 1	271	34376	6,37	74	7	27
Q80UU3	SET Domäne enthaltendens Protein 7	285	40476	5,54	68	7	32

#### 6.) sonstige Proteine

Q8C7C7	Albumin 1 [Fragment]	77	65003	5,49	107	10	28
Q00623	Apolipoprotein A-I [Precursor]	32	30588	5,64	1,71	6	24
Q99LX0	Protein DJ-1	94	20021	6,32	68	8	56
Q921I1	Serumtransferrin [Precursor]	245	76724	6,94	79	10	22
P07724	Serumalbumin [Precursor]	289	68693	5,75	2,37	7	21
Q497E7	Tu Translations-Elongationsfaktor, mitochondrial	192	49508	7,23	76	8	30

**Tabelle II:** Identifizierte Proteine der TP-Fraktion von nNOS-KO-Kontrolltieren. Angegeben sind die Eintragsnr. in der *Swissprot*-Datenbank, der Proteinname, die Nummer des Proteinpunktes auf dem Gel, theoretisches Molekulargewicht sowie isoelektrischer Punkt, M- bzw. Z-Wert, sowie Anzahl und Sequenzabdeckung [%] der zugeordneten Peptide.

Eintragsnr. Swissprot	Proteinname	Spot Nr.	MW [Da]	pI	M-/Z- Wert	Peptidsequenzen Anz.	%
<b>1.) Signalproteine</b>							
Q542C5	Adenylatkinase 1	36	21540	5,67	73	5	39
Q9R0Y5	Adenylatkinase Isoenzym 1	195	21540	5,67	2,04	5	40
Q543P7	ADP-Ribosylierungsfaktor-ähnliches Protein 3	187	20487	6,74	97	8	62
<b>2.) metabolische Proteine</b>							
Q99KI0	Aconitat Hydratase, mitochondrial [Precursor]	143	85464	8,08	128	14	30
		144			113	14	28
		269			88	11	22
P17182	Alpha-Enolase	110	47010	6,36	69	6	27
		111			131	12	41
		112			117	13	41
		114			125	13	44
		138			97	11	38
		140			2,22	8	31
		141			110	11	38
		215			108	10	36
		285			128	13	44
		286			101	11	38
		287			87	10	32
		288			96	9	35
		371			2,34	7	22
381	100	10	36				
Q03265	ATP-Synthase Untereinheit alpha, mitochondrial [Precursor]	149	59753	9,2	86	9	26
		150			73	8	25
		151			98	11	29
		224			89	9	30
		280			76	8	25
Q4V9X5	Elektron transferierendes Flavoprotein, alpha- Polypeptid	157	35009	8,62	81	7	37
P05064	Fructose-bisphosphat Aldolase A	209	39225	8,40	146	12	61

		115			105	9	42
		118			72	6	39
		121			1,84	5	31
		153			129	8	55
P19157	Glutathion-S-Transferase P 1	163	23478	8,13	64	5	37
		164			69	5	52
Q3TFR6	Guaninmonophosphat Synthetase	214	76723	6,29	2,37	8	19
Q9D6R2	Isocitrat Dehydrogenase [NAD]	77	39639	6,27	2,25	7	33
	Untereinheit alpha, mitochondrial [Precursor]	130			1,72	5	27
Q04447	Kreatinkinase B-Typ	101	42713	5,40	172	14	57
		228			138	13	52
		291			89	8	37
P08249	Malat Dehydrogenase, mitochondrial [Precursor]	175	35596	8,82	101	10	43
		368			66	6	27
P17742	Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase A	353	17840	7,88	72	5	42
		377			69	6	47
		382			1,85	5	36
Q5XJE7	Phosphoglyceratkinase 1	152	44550	8,02	113	10	40
		154			92	8	34
		191			111	10	40
Q9D0K2	Succinyl-CoA:3-Ketosäure-Coenzym A Transferase 1, mitochondrial [Precursor]	146	55989	8,73	88	9	31
		277			64	6	26
P09671	Superoxid Dismutase [Mn], mitochondrial [Precursor]	384	24603	8,80	80	7	38
Q64513	Triosephosphat-Isomerase [Fragment]	53	22506	5,62	90	7	55
		155			77	6	50
Q9QZM0	Ubiquilin-2	321	67379	5,25	1,95	6	14
<b>3.) Chaperone</b>							
P63038	60 kDa Hitzeschockprotein, mitochondrial [Precursor]	306	60955	5,91	2,36	7	22
Q8C2F4	Glucose reguliertes Protein, 58 kDa	133	56625	5,78	1,76	6	18
P38647	Stress-70 Protein, mitochondrial [Precursor]	255	73528	5,91	131	11	27
<b>4.) zytoskelettale Proteine</b>							
P60710	1-Aktin, zytoplasmatisch	100	41737	5,29	96	9	40
Q3TI89	Beta-Aktin, zytoplasmatisch	240	41886	5,38	1,90	6	31
Q80V75	Fscn1 Protein [Fragment]	189	51405	6,57	119	1	40
Q64288	Olfaktorisches Marker-protein (OMP)	30	18735	5,00	83	7	56
		339			75	9	56

		360			67	5	45
Q60932	spannungsabhängiger anionenselektiver Kanal 1	369	32351	8,55	63	5	35
P05213	Tubulin alpha-2 Kette	198	50152	4,94	87	8	30
		239			104	9	34
P68373	Tubulin alpha-6 Kette	62	49909	4,96	68	8	27
		99			112	10	32
		238			105	10	36
		245			152	11	40
		333			1,73	6	23
		334			78	8	30
Q9CVR0	Tubulin Beta-2-Kette homolog [Fragment]	60	32259	5,56	66	9	35
		317			75	10	39
P68372	Tubulin Beta-2C-Kette	188	49831	4,79	2,37	8	22
Q9D6F9	Tubulin Beta-4-Kette	63	49552	4,78	2,16	8	25
<b>5.) sonstige Proteine</b>							
Q91VB8	Hämoglobin, Beta-Kette	231	15112	7,97	99	7	77
		232			72	5	70
		359			77	6	71
		372			81	5	70
		373			81	4	61
		380			78	6	71
		383			97	7	77

**Tabelle III:** Identifizierte Proteine der SP-Fraktion von WT-Kontrolltieren. Angegeben sind die Eintragsnr. in der *Swissprot*-Datenbank, der Proteinname, die Nummer des Proteinpunktes auf dem Gel, theoretisches Molekulargewicht sowie isoelektrischer Punkt, M- bzw. Z-Wert, sowie Anzahl und Sequenzabdeckung [%] der zugeordneten Peptide.

Eintragsnr. Swissprot	Proteinname	Spot Nr.	MW [Da]	pI	M-/Z- Wert	Peptidsequenzen Anz.	%
<b>1.) metabolische Proteine</b>							
P62196	26S Protease regulatoische Untereinheit 8	131	45626	7,11	2,00	8	25
Q99KI0	Aconitat Hydratase, mitochondrial [Precursor]	49	85464	8,08	94	10	23
		50			78	10	21
		51			138	15	31
		52			70	8	18
		265			95	10	22
P17182	Alpha-Enolase	120	47010	6,36	87	9	33
		122			110	11	41
Q9DCX2	ATP Synthase D Kette, mitochondrial	210	18618	5,53	51	1	61
		212			1,68	5	47
		358			88	8	63
Q9DB20	ATP Synthase O-Untereinheit, mitochondrial [Precursor]	237	23364	10,0	1,89	5	33
		238			104	10	54
P56480	ATP Synthase Untereinheit beta, mitochondrial [Precursor]	11	56300	5,19	88	9	32
		24			103	10	35
		30			206	18	55
		31			239	21	58
		364			118	2	56
Q8CHX2	Atp6v1a Protein	271	68326	5,42	66	8	20
		310			74	8	21
Q03265	ATP-Synthase Untereinheit alpha, mitochondrial [Precursor]	84	59753	9,22	83	13	31
		85			85	10	26
		86			104	16	35
		87			117	13	33
		88			124	15	39
		89			134	15	39
		91			109	13	31
		92			103	10	27
		97			71	8	21
		98			81	9	27
		99			62	7	22
138	2,00	6	20				
139	87	8	33				

		145		2,31	7	22	
		174		82	10	48	
		290		62	9	19	
		348		77	9	25	
		362		163	16	39	
Q8BMF4	Dihydrolipoamid Acetyltransferase	6	67946	8,81	145	17	35
		7		72	8	22	
Q99LD3	Dihydrolipoamid Dehydrogenase	73	54272	7,99	75	8	26
Q91ZB1	Dihydrolipoamid S-Acetyltransferase [Fragment]	361	59085	5,71	104	13	39
P05064	Fructose-bisphosphat Aldolase A	146	39225	8,40	140	12	61
		148		140	12	61	
		149		139	12	61	
		153		103	10	45	
		365		45	2	65	
P05063	Fructose-bisphosphat Aldolase C	133	39264	6,79	108	8	48
P26443	Glutamat Dehydrogenase 1, mitochondrial Precursor]	78	61337	8,05	83	11	26
		79		108	13	33	
		80		64	8	22	
		81		68	8	24	
		370		135	14	35	
		371		67	8	24	
Q5HZH5	Glutamat-oxaloacetat Transaminase 2, mitochondrial	150	47411	9,13	105	10	37
		151		100	10	37	
P15105	Glutaminsynthetase	126	42014	6,49	1,93	6	24
		127		86	10	28	
		130		82	11	28	
P16858	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	165	35679	8,45	68	9	34
Q569X2	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	166	35838	8,44	2,05	9	37
		167		1,66	7	37	
P08249	Malat Dehydrogenase, mitochondrial [Precursor]	168	35596	8,82	67	7	31
		354		110	10	43	
Q5SUH2	NADH Dehydrogenase (Ubichinon) Fe-S Protein 1	2	79777	5,51	81	8	20
		3		91	11	25	
Q8BU07	NADH Dehydrogenase (Ubichinon) Flavoprotein 2	209	21192	6,91	84	8	50
Q9DCS9	NADH Dehydrogenase [Ubichinon] 1 beta Subcomplex Untereinheit 10	234	20893	8,36	38	1	49
Q91VD9	NADH-Ubichinon- oxidoreductase 75 kDa Untereinheit, mitochondrial [Precursor]	342	79749	5,51	2,39	7	16

Q91ZA3	Propionyl-CoA Carboxylase alpha-Kette, mitochondrial [Precursor]	46 307	79922	6,83	2,34	9 11	16 22
Q505N8	Pyruvat Dehydrogenase beta	111	38937	6,41	98	11	45
Q9CZ13	Ubichinol-Cytochrom-c- reductase- Komplex Kernprotein I, mitochondrial [Precursor]	34 363	52769	5,75	86	10 16	32 44
P62814	vacuoläre ATP-Synthase Untereinheit beta	21	56551	5,57	160	17	48

## 2.) Chaperone

Q9JJD8	Chaperonin Untereinheit 2-beta (Cct2) ähnlich	306	52469	5,88	82	8	29
Q6NZD0	Hsp 8	344	70872	5,28	2,41	7	16
P80316	T-complex Protein 1 Untereinheit epsilon	16	59624	5,72	105	11	34

## 3.) zytoskelettale Proteine

P60710	1-Aktin, zytoplasmatisch	45	41737	5,29	75	12	38
P63260	2-Aktin, zytoplasmatisch	41	41793	5,31	94	9	41
		43			93	9	41
		44			97	10	41
P46660	Alpha-Internexin	323	55742	5,23	74	7	27
Q61276	A-X Aktin	43	41694	5,21	65	11	42
O08553	Dihydropyriminidase-assoziiertes Protein 2	72	62278	5,95	2,08	7	18
Q99KJ8	Dynactin Untereinheit 2	32	43986	5,14	87	8	32
P47754	F-Aktin capping Protein alpha-2 Unter- einheit	113	32836	5,58	75	7	41
Q8CAQ8	Mitofilin	8	83900	6,18	130	13	33
Q5SQG5	Prohibitin [Fragment]	194	22999	5,97	99	7	56
Q8BTU5	Proteasom Untereinheit alpha, Typ 1	186	29466	5,78	70	6	37
P49722	Proteasom Untereinheit alpha, Typ 2	222	25794	8,42	69	7	48
Q99LW9	Pyruvat Dehydrogenase-bindendes Protein	110	34836	5,63	82	9	45
Q60932	spannungsabhängiger anionenselektiver Kanal 1	142 173	32351	8,55	82	7 12	42 65
		175			137	11	66
		176			125	10	59
		177			126	10	59
		191			63	5	35
		221			78	6	37
		351			76	6	40
		352			113	9	55
		368			135	11	62
Q78MH6	spannungsabhängiger anionenselektiver	178	31733	7,44	94	8	44

	Kanal 2	183			62	5	32
Q64332	Synapsin-2	66	63373	8,59	68	7	22
P68373	Tubulin alpha-6 Kette	10	49909	4,96	98	10	35
		12			67	7	25
<b>4.) sonstige nukleäre Proteine</b>							
Q6ZQK0	Condensin II Komplex Untereinheit D3	329	169434	6,67	1,79	7	11
Q8C2A0	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein	160	32460	8,74	50	2	31
	A2/B2	161			55	2	37
		162			73	6	32
		168			67	7	33
Q91ZR9	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein A2/B2	170	35979	8,67	95	9	40
P61979	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein K	14	50976	5,39	78	9	30
Q8R081	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein L	345	60123	6,65	63	8	22
Q3U0V1	KH-Typ Spleißvorgang regulierendes Protein	48	76810	6,90	2,22	8	21
O35295	Transkriptionsaktivatorprotein Pur-β	103	33770	5,35	2,18	5	31
<b>5.) sonstige Proteine</b>							
Q91V31	Laminin Rezeptor 1	37	32838	4,80	70	8	37
n.v.	TCRBV4S1	198			63	5	72
		201			63	5	72

**Tabelle IV:** Identifizierte Proteine der SP-Fraktion von nNOS-KO-Kontrolltieren. Angegeben sind die Eintragsnr. in der *Swissprot*-Datenbank, der Proteinname, die Nummer des Proteinpunktes auf dem Gel, theoretisches Molekulargewicht sowie isoelektrischer Punkt, M- bzw. Z-Wert, sowie Anzahl und Sequenzabdeckung [%] der zugeordneten Peptide.

Eintragsnr. Swissprot	Proteinname	Spot Nr.	MW [Da]	pI	M-/Z- Wert	Peptidsequenzen Anz.	%
<b>1.) metabolische Proteine</b>							
Q99KI0	Aconitat Hydratase, mitochondrial	19	85464	8,08	111	12	25
	[Precursor]	20			67	7	16
Q8CI65	Atp5b Protein [Fragment]	56	56667	5,24	2,10	6	20
Q8CHX2	ATPase, H <sup>+</sup> transportierend,	11	68326	5,42	69	8	21
	V1 Untereinheit alpha, Isoform 1	12			153	18	43
Q03265	ATP-Synthase Untereinheit alpha,	80	59753	9,22	98	10	32
	mitochondrial [Precursor]	83			134	13	39
		84			81	8	27
		100			69	7	22
		101			87	9	27
		102			110	11	33
		103			83	9	25
		104			113	11	33
		105			65	8	17
		106			90	9	25
		107			135	13	35
		108			89	10	27
		124			2,03	6	17
		302			112	13	31
		352			116	12	29
P56480	ATP-Synthase Untereinheit beta,	41	56300	5,19	122	12	32
	mitochondrial [Precursor]	57			247	23	63
		58			117	10	34
Q8R339	Dihydrolipoamide S-acetyltransferase	35	67942	8,81	84	9	23
O08749	Dihydrolipoyl Dehydrogenase,	77	54212	7,97	2,07	7	21
	mitochondrial [Precursor]						
Q8BH95	Enoyl-CoA Hydratase, mitochondrial	236	31474	8,76	2,26	6	42
	[Precursor]						
P05064	Fructose-bisphosphat Aldolase A	163	39225	8,4	73	6	30
		164			129	11	57
		165			129	11	57
		166			149	13	61
		167			134	12	57

		168			176	19	68
P05063	Fructose-bisphosphat Aldolase C	156	39264	6,79	1,68	5	27
Q3UIA9	Fumarathydratase 1	151	54357	9,12	1,72	6	20
P26443	Glutamat Dehydrogenase 1, mitochondrial [Precursor]	22	61337	8,05	122	17	34
		75			67	8	23
		76			130	17	35
		328			2,15	6	17
		353			1,74	5	15
Q5HZH5	Glutamat-oxaloacetat Transaminase 2 mitochondrial	181	47411	9,13	129	13	43
		182			119	11	40
		248			64	10	32
Q91VC6	Glutaminsynthetase	137	42120	6,64	2,21	10	25
		138			107	12	32
P16858	Glycerinaldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase	162	35679	8,45	84	7	34
		169			74	7	34
		186			68	8	32
		191			64	8	32
		381			62	8	28
P30275	Kreatinkinase, sarkomerische Form, mitochondrial [Precursor]	150	47004	8,39	118	13	38
		148			82	8	31
P08249	Malat Dehydrogenase, mitochondrial [Precursor]	188	35596	8,82	71	7	35
Q5SUH2	NADH Dehydrogenase (Ubichinon) Fe-S Protein 1	3	79777	5,51	94	10	25
Q9D6J6	NADH-Ubichinon Oxidoreductase 24 kDa Untereinheit, mitochondrial [Precursor]	257	27315	7,00	2,16	6	31
Q91VD9	NADH-Ubichinon Oxidoreductase 75 kDa Untereinheit, mitochondrial [Precursor]	46	79749	5,51	2,25	7	16
Q505N8	Pyruvat Dehydrogenase beta	201	38937	6,41	111	12	49
P35486	Pyruvat Dehydrogenase E1 Komponente, alpha Untereinheit, somatische Form, mitochondrial [Precursor]	145	43232	8,49	1,95	6	17
Q9D0K2	Succinyl-CoA:3-Ketosäure-Coenzym A Transferase 1, mitochondrial [Precursor]	79	55989	8,73	88	7	31
		320			82	7	31
Q9CZ13	Ubichinol-Cytochrom-c Reductase Komplex Kernprotein I, mitochondrial [Precursor]	61	52769	5,75	73	8	27
		63			77	7	24
		64			112	11	36
Q8BK11	Ubichinol-Cytochrom-c Reductase Kom- plex Kernprotein II, mitochondrial, ho- molog	172	48263	9,33	74	8	29
P62814	vakuoläre ATP-Synthase, Untereinheit beta	48	56551	5,57	154	15	48
		49			88	8	30
		66			67	7	19
Q99LD0	VATPase, H <sup>+</sup> transportierend, lysosomal	229	26157	8,44	83	11	51

## V1 Untereinheit E1

**2.) Chaperone**

P80314	T-Komplex Protein 1 Untereinheit beta	69	57346	5,98	142	15	44
		85			138	12	41
P80316	T-Komplex Protein 1 Untereinheit epsilon	36	59624	5,72	1,74	6	18

**3.) zytoskelettale Proteine**

P60710	1-Aktin, zytoplasmatisch	119	41737	5,29	86	8	44
P63260	2-Aktin, zytoplasmatisch	118	41793	5,31	63	7	26
Q91XP9	Axonemales Dynein schwere Kette 8	92	480208	5,82	1,74	7	3
Q8R5C5	Beta-Centractin	129	42281	5,98	70	6	30
Q99KJ8	Dynactin Untereinheit 2	59	56300	5,19	81	8	27
Q8CAQ8	Mitofilin	14	83900	6,18	111	11	28
Q5SQG5	Prohibitin [Fragment]	212	22999	5,97	84	8	32
		289			132	8	60
P49722	Proteasom Untereinheit alpha Typ 2	251	25794	8,42	62	8	51
Q99LW9	Pyruvat Dehydrogenase bindendes Protein	200	34836	5,63	101	9	47
Q8C1B7	Septin-11	73	49563	6,26	1,79	6	22
Q9Z2Q6	Septin-5	362	42748	6,21	1,76	6	28
Q60932	spannungsabhängiger anionenselektiver Kanal 1	179	32351	8,55	78	7	42
		180			69	6	40
		189			83	7	43
		227			129	14	70
		228			122	13	66
		230			92	11	56
		231			149	12	65
		232			122	13	63
		250			2,25	6	36
		380			114	10	56
Q78MH6	spannungsabhängiger anionenselektiver Kanal 2	199	31733	7,44	81	10	50
		218			79	9	46
Q9CVR0	Tubulin Beta-2-Kette homolog [Fragment]	52	32259	5,56	75	10	38
Q7TMM9	Tubulin, beta-2a	53	49907	4,78	1,72	5	11

**4.) sonstige nukleäre Proteine**

Q91ZR9	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein A2/B1	193	35979	8,67	63	6	32
		225			71	6	32
		384			136	15	50
Q8C2A0	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein	217	32460	8,74	2,38	7	34

---

	A2/B1	222			77	10	37
		223			94	12	42
		224			96	11	40
		375			92	10	39
Q8R081	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein L	37	60123	6,65	2,12	7	17
Q8VIJ6	Spleiß-Faktor, Prolin- und Glutamin-reich	95	75442	9,45	73	8	22
<b>5.) sonstige Proteine</b>							
Q8BFR5	Elongationsfaktor Tu, mitochondrial [Precursor]	335	49508	7,23	1,93	6	23

**Tabelle V:** Proteine, die sich beim Vergleich zwischen WT-Tieren und nNOS-KO-Kontrolltieren signifikant unterscheiden. Angegeben sind die Eintragsnr. in der *Swissprot*-Datenbank, der Proteinname, die Nummer des Proteinpunktes auf dem Gel, theoretisches Molekulargewicht sowie isoelektrischer Punkt, M- bzw. Z-Wert, die Anzahl der zugeordneten MS/MS-Sequenzen, der Mittelwert der Grauwertintensitäten und das Signifikanzniveau.

Eintragsnr. Swissprot	Proteinname	Spot Nr.	MW [Da]	pI	M-/Z- Wert	Anzahl <i>matches</i>	mittlere OD $\pm$ SEM		P
							WT Kontrolle	KO Kontrolle	
<b>(A) TP-Fraktion (Matchset 131)</b>									
Q99L13	3-Hydroxyisobutyrat-Dehydrogenase, mitochondrial [Precursor]	4208	35440	8,37	68	1	2512 $\pm$ 206	1831 $\pm$ 152	0,031
O55042	Alpha-Synuclein	1009	14485	4,74	190	4	18378 $\pm$ 2193	9882 $\pm$ 1288	0,014
Q99LC5	Elektron transferierendes Flavoprotein Untereinheit alpha, mitochondrial [Precursor]	6212	35040	8,62	83	2	4266 $\pm$ 146	2682 $\pm$ 516	0,035
Q61171	Peroxiredoxin-2	2001	21648	5,20	125	3	17072 $\pm$ 2311	8885 $\pm$ 1961	0,028
Q64513	Triosephosphat-Isomerase [Fragment]	5115	22506	5,62	138	4	1822 $\pm$ 110	1287 $\pm$ 158	0,027
Q6ZPJ3	Ubiquitin-konjugierendes Enzym E2 O [Fragment]	0018	141943	4,97	51	1	1218 $\pm$ 298	3884 $\pm$ 911	0,040
<b>(B) SP-Fraktion (Matchset 134)</b>									
P61979	Heterogenes nukleäres Ribonucleoprotein K	2607	50976	5,39	78	9	4237 $\pm$ 427	2498 $\pm$ 564	0,042
Q9R1Q8	Neuronales Protein 25	5115	22471	6,84	245	7	2110 $\pm$ 128	1478 $\pm$ 197	0,032
O70435	proteasomale Untereinheit alpha-3	2208	28274	5,29	147	3	896 $\pm$ 125	409 $\pm$ 164	0,048
Q60932	spannungsabhängiger anionenselektiver Kanal 1	6101	32352	8,55	125	10	1599 $\pm$ 147	2314 $\pm$ 235	0,038
Q78MH6	spannungsabhängiger anionenselektiver Kanal 2	3306	31733	7,44	96	2	802 $\pm$ 118	246 $\pm$ 42	0,007
P68373	Tubulin alpha-6 Kette	1614	49909	4,96	98	10	1116 $\pm$ 280	417 $\pm$ 109	0,015
Q6P9T0	Ubiquitin spezifische Protease 19	2118	150539	5,99	48	2	1442 $\pm$ 131	702 $\pm$ 123	0,040

**Tabelle VI:** Proteine, die sich beim Vergleich zwischen WT-Kontrolltieren und exponierten WT-Tieren signifikant unterscheiden. Angegeben sind die Eintragsnr. in der *Swissprot*-Datenbank, der Proteinname, die Nummer des Proteinpunktes auf dem Gel, theoretisches Molekulargewicht sowie isoelektrischer Punkt, M- bzw. Z-Wert, die Anzahl der zugeordneten MS/MS-Sequenzen, der Mittelwert der Grauwertintensitäten und das Signifikanzniveau.

Eintragsnr. Swissprot	Proteinname	Spot Nr.	MW [Da]	pI	M-/Z- Wert	Anzahl <i>matches</i>	mittlere OD $\pm$ SEM		P
							WT Kontrolle	WT exponiert	
<b>(A) TP-Fraktion (Matchset 133)</b>									
Q543P7	ADP-Ribosylierungs- faktor-ähnliches Protein 3	6007	20487	6,74	93	7	2389 $\pm$ 123	1396 $\pm$ 238	0,010
P05063	Fructose-bisphosphat Aldolase C	6302	39264	6,79	119	10	982 $\pm$ 146	3003 $\pm$ 85	0,001
P19157	Glutathion-S-Transferase P 1	7009	23478	8,13	141	7	746 $\pm$ 346	2398 $\pm$ 217	0,005
Q569X5	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydro- genase	7301	35681	8,44	154	7	802 $\pm$ 356	3024 $\pm$ 785	0,045
Q9D6R2	Isocitrat Dehydrogenase [NAD] Unter- einheit alpha, mitochondrial [Precursor]	4304	39639	6,27	279	5	175 $\pm$ 76	382 $\pm$ 74	0,044
P35700	Peroxiredoxin-1	7013	22177	8,26	368	10	1141 $\pm$ 336	3504 $\pm$ 383	0,002
Q61990	Poly(rC)-bindendes Protein 2	5418	38222	6,33	54	1	845 $\pm$ 174	202 $\pm$ 40	0,019
Q5NBV3	Stathmin 1-ähnliches Protein	3014	17275	5,60	225	6	4594 $\pm$ 516	2902 $\pm$ 358	0,030
Q8VD70	TNF-Rezeptor Superfamilie 25 Protein	4314	41641	6,11	63	1	315 $\pm$ 48	917 $\pm$ 192	0,033
Q99JZ6	Tubulin Beta-2c-Kette	1214	49815	4,79	76	4	547 $\pm$ 275	1757 $\pm$ 415	0,046
Q9CZY3	Ubiquitin-konjugierendes Enzym E2 Variante 1	6015	16355	7,75	275	7	5738 $\pm$ 980	14696 $\pm$ 1676	0,003
Q9DBJ1	Phosphoglyceratmutase 1	6106	28701	6,75	112	10	485 $\pm$ 147	1090 $\pm$ 210	0,049
<b>(B) SP-Fraktion (Matchset 137)</b>									
Q8VED5	BC031593 Protein [Fragment]	4105	59180	7,09	86	2	2581 $\pm$ 147	327 $\pm$ 139	0,001
P05063	Fructose-bisphosphat Aldolase C	7302	39225	8,40	140	12	3025 $\pm$ 339	623 $\pm$ 46	0,002

		7306			140	12	11357 ± 1482	2043 ± 924	0,002
Q8C2A0	Heterogenes nukleäres Ribonucleo- protein A2/B1	7211	32460	8,74	50	2	4700 ± 617	2311 ± 407	0,032
		8204			55	2	3806 ± 330	2242 ± 344	0,011
Q6A074	MKIAA 0400 Protein [Fragment]	5206	107769	6,28	53	3	1147 ± 185	463 ± 65	0,008
Q8BU07	NADH Dehydrogenase Flavoprotein 2	2102	21192	6,91	84	8	6130 ± 397	3293 ± 372	0,008
Q5SUH2	NADH Dehydrogenase Fe-S Protein 1	2904	79777	5,51	91	11	7851 ± 738	5508 ± 633	0,043
Q9R1Q8	Neuronales Protein 25	5007	22471	6,84	245	7	2292 ± 102	1015 ± 75	0,008
P97398	NIPI-ähnliches Protein	3107	37708	8,09	45	2	2176 ± 242	1340 ± 118	0,022
Q60692	proteasomale Untereinheit beta-6 [Pre- cursor]	1102	25379	4,97	144	2	2595 ± 518	799 ± 255	0,017
Q9DAB4	Proteindisulfid-isomerase P5	4004	42890	6,28	39	1	1087 ± 253	67 ± 51	0,008
Q99LW9	Pyruvat Dehydrogenase bindendes Protein [Fragment]	2203	34836	5,63	82	9	6803 ± 1683	1854 ± 751	0,032
Q60932	spannungsabhängiger anionenselektiver Kanal 1	5102	32351	8,55	51	1	2692 ± 287	697 ± 496	0,012
		6204			137	11	10483 ± 1470	4667 ± 1041	0,008
		7107			135	11	10683 ± 1704	1670 ± 541	0,016
Q6P9T0	Ubiquitin-spezifische Protease 19	2101	150539	5,99	48	2	1348 ± 147	435 ± 80	0,001

**Tabelle VII:** Proteine, die sich beim Vergleich zwischen exponierten WT-Tieren und exponierten nNOS-KO-Tieren signifikant unterscheiden. Angegeben sind die Eintragsnr. in der *Swissprot*-Datenbank, der Proteinname, die Nummer des Proteinpunktes auf dem Gel, theoretisches Molekulargewicht sowie isoelektrischer Punkt, M- bzw. Z-Wert, die Anzahl der zugeordneten MS/MS-Sequenzen, der Mittelwert der Grauwertintensitäten und das Signifikanzniveau.

Eintragsnr. Swissprot	Proteinname	Spot Nr.	MW [Da]	pI	M-/Z- Wert	Anzahl <i>matches</i>	mittlere OD ± SEM		P
							WT exponiert	KO exponiert	
<b>(A) TP-Fraktion (Matchset 130)</b>									
Q99L13	3-Hydroxyisobutyrat-Dehydrogenase, mitochondrial [Precursor]	5207	35440	8,37	68	1	2547 ± 158	1839 ± 72	0,008
Q543P7	ADP-Ribosylierungsfaktor-ähnliches Protein 3	7001	20487	6,74	97	8	517 ± 117	1001 ± 119	0,020
O55042	Alpha-Synuclein	1010	14485	4,74	190	4	16456 ± 663	11311 ± 433	0,001
Q3TF25	ATP Synthase, H+ transportierend, mitochondrial F1 Komplex, O-Untereinheit	0102	23365	9,90	79	2	1346 ± 384	3343 ± 426	0,033
Q99LC5	Elektron transferierendes Flavoprotein Untereinheit alpha, mitochondrial [Precursor]	6225	35040	8,62	83	2	3801 ± 224	2457 ± 160	0,008
P05063	Fructose-bisphosphat Aldolase C	6416	39264	6,79	223	5	2951 ± 283	1673 ± 335	0,016
P97807	Fumarathydratase, mitochondrial [Precursor]	6414	54371	9,12	92	10	2423 ± 444	1035 ± 245	0,033
P17742	Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase A	6009	17840	7,88	88	7	5655 ± 385	7424 ± 409	0,014
Q3TTU9	Serin-Transmembranprotease 2	7304	32900	7,83	55	2	496 ± 85	1056 ± 112	0,005
Q9CZY3	Ubiquitin-konjugierendes Enzym E2, Variante 1	7016	16355	7,75	275	7	14766 ± 1954	8875 ± 1077	0,037
<b>(B) SP-Fraktion (Matchset 135)</b>									
Q9Z130	Heterogenes nukleäres Ribonucleoprotein D-ähnlich	4306	33559	6,85	61	3	2340 ± 170	2986 ± 191	0,036
		5411			43	2	836 ± 59	585 ± 73	0,030

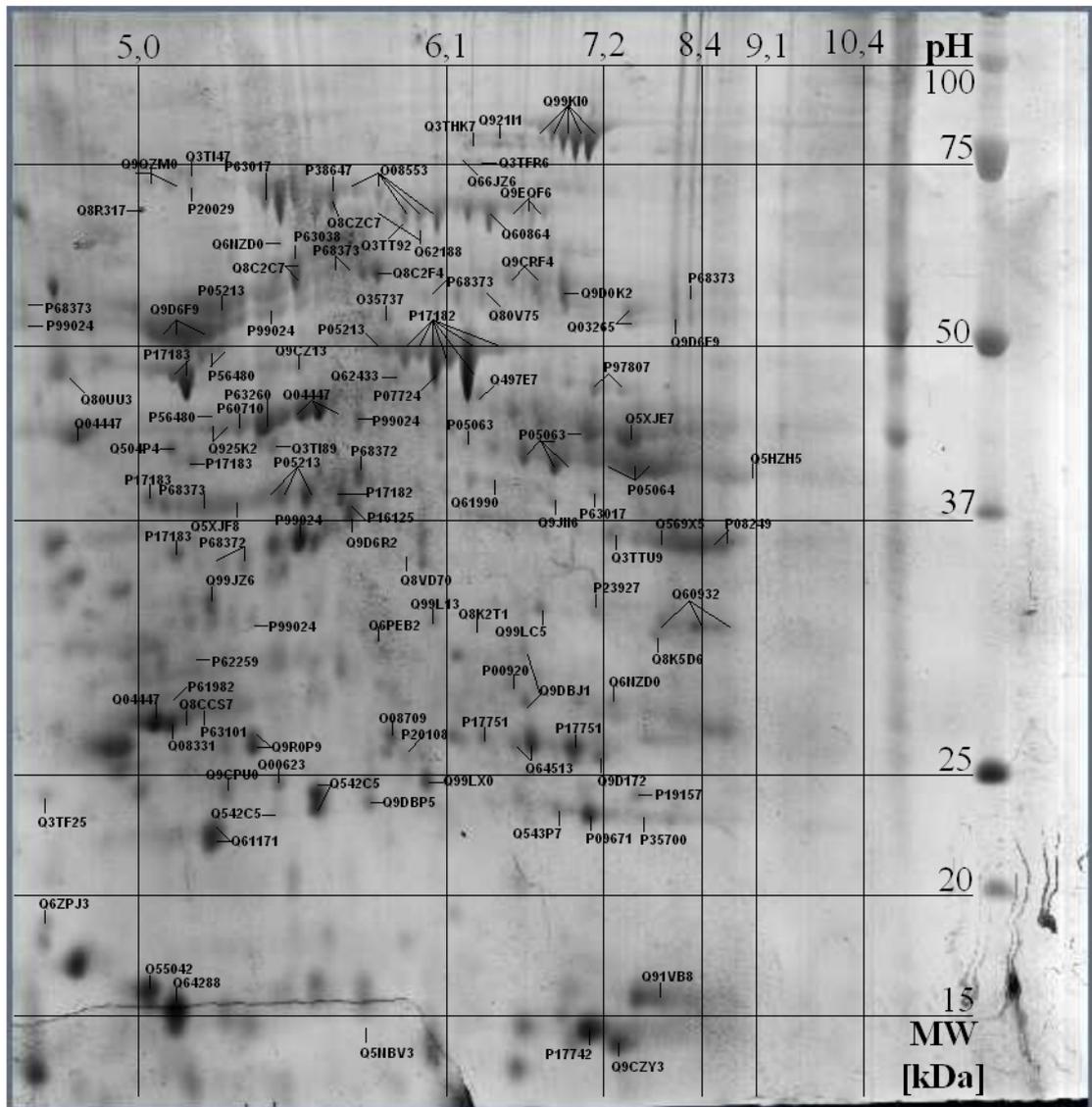
---

Q9DCT2	NADH-Ubichinon Oxidoreductase 30 kDa Untereinheit, mitochondrial [Precursor]	2215	30207	6,40	45	1	328 ± 30	533 ± 68	0,036
Q9R1Q8	Neuronales Protein 25	5102	22471	6,84	245	7	1616 ± 161	1053 ± 99	0,022
Q60692	Proteasomale Untereinheit beta-6 [Precursor]	1102	25379	4,97	144	2	544 ± 100	1520 ± 291	0,025
Q60932	spannungsabhängiger anionenselektiver Kanal 1	4107	32352	8,55	54	1	2117 ± 288	3043 ± 71	0,030
Q78MH6	spannungsabhängiger anionenselektiver Kanal 2	0210	31733	7,44	96	2	773 ± 101	379 ± 41	0,014
P21107	Tropomyosin alpha-3 Kette	0203	32863	4,68	97	8	4396 ± 296	2546 ± 621	0,038

**Tabelle VIII:** Proteine, die sich beim Vergleich zwischen nNOS-KO-Kontrolltieren und exponierten nNOS-KO-Tieren signifikant unterscheiden. Angegeben sind die Eintragsnr. in der *Swissprot*-Datenbank, der Proteinname, die Nummer des Proteinpunktes auf dem Gel, theoretisches Molekulargewicht sowie isoelektrischer Punkt, M- bzw. Z-Wert, die Anzahl der zugeordneten MS/MS-Sequenzen, der Mittelwert der Grauwertintensitäten und das Signifikanzniveau.

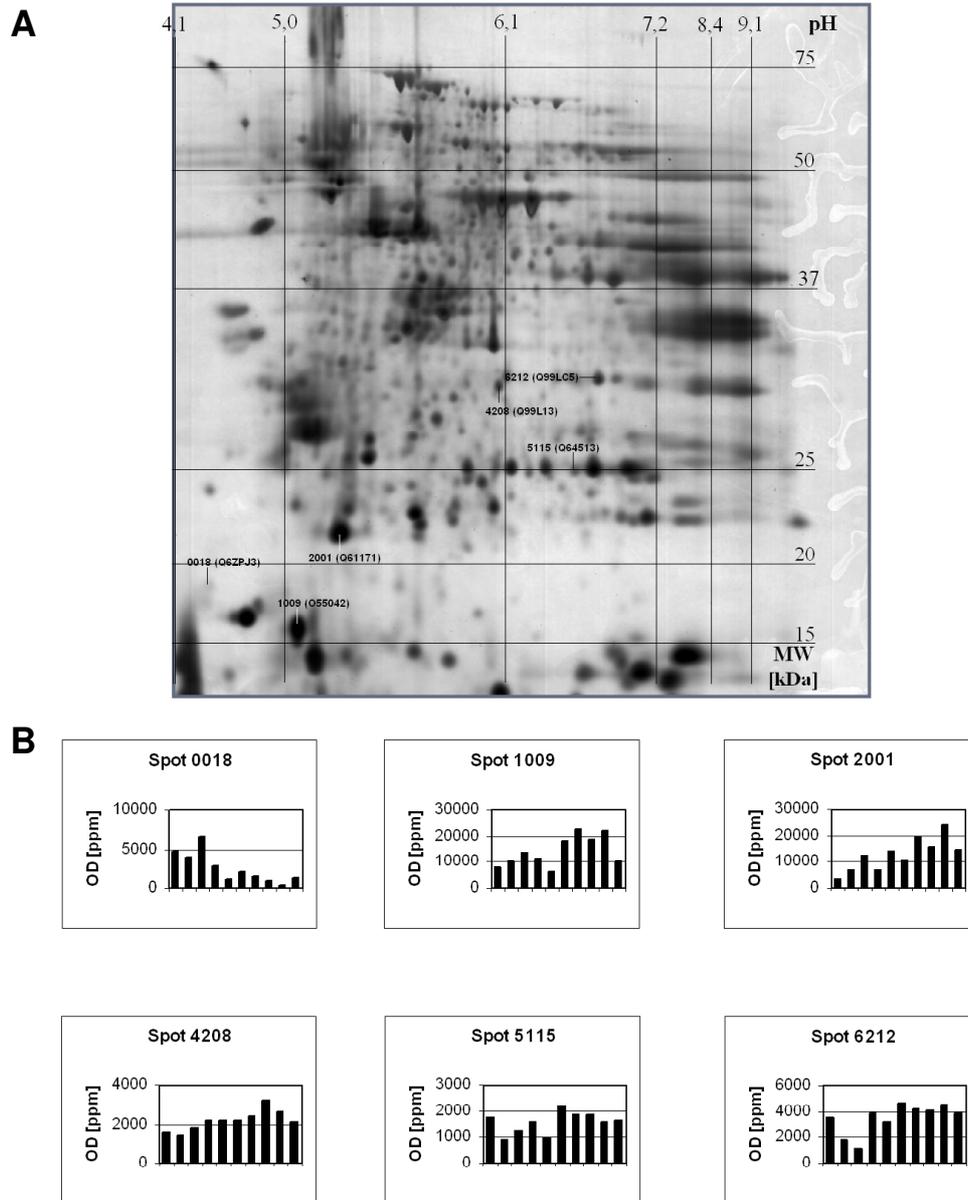
Eintragsnr. Swissprot	Proteinname	Spot Nr.	MW [Da]	pI	M-/Z- Wert	Anzahl <i>matches</i>	mittlere OD $\pm$ SEM		P
							KO Kontrolle	KO exponiert	
<b>(A) TP-Fraktion (Matchset 132)</b>									
P23927	Alpha Kristallin Beta-Kette	6318	20069	6,76	54	1	859 $\pm$ 451	2429 $\pm$ 291	0,023
Q9D172	ES1 Protein, mitochondrial [Precursor]	6119	28091	9,00	74	6	526 $\pm$ 187	1965 $\pm$ 169	0,001
Q91VB8	Hämoglobin Beta-Kette	7001	15112	7,97	77	6	3211 $\pm$ 178 1	9870 $\pm$ 1405	0,019
Q6NZD0	Hsp 8	6220	70872	5,28	2,22	8	206 $\pm$ 84	850 $\pm$ 260	0,046
Q60932	spannungsabhängiger anionenselektiver Kanal 1	7208	32352	8,55	74	6	561 $\pm$ 181	2767 $\pm$ 512	0,004
<b>(B) SP-Fraktion (Matchset 136)</b>									
P56480	ATP Synthase Untereinheit beta, mitochondrial [Precursor]	1707	56301	5,19	206	18	7801 $\pm$ 103 4	1758 $\pm$ 273	0,003
P05063	Fructose-bisphosphat Aldolase C	6410	39264	6,79	1,68	5	121 $\pm$ 42	524 $\pm$ 14	0,001
		7402			108	8	917 $\pm$ 233	2977 $\pm$ 687	0,037
Q569X2	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	6303	35838	8,44	2,05	9	418 $\pm$ 169	2226 $\pm$ 582	0,033
		6307			1,66	7	1930 $\pm$ 456	8597 $\pm$ 1416	0,007
O35295	Transcriptionsaktivatorprotein Pur- $\beta$	2420	33770	5,35	2,18	5	114 $\pm$ 58	475 $\pm$ 76	0,006
Q6P9T0	Ubiquitin-spezifische Protease 19	2113	150539	5,99	48	2	1019 $\pm$ 217	216 $\pm$ 47	0,019

## 10.2 Abbildungen

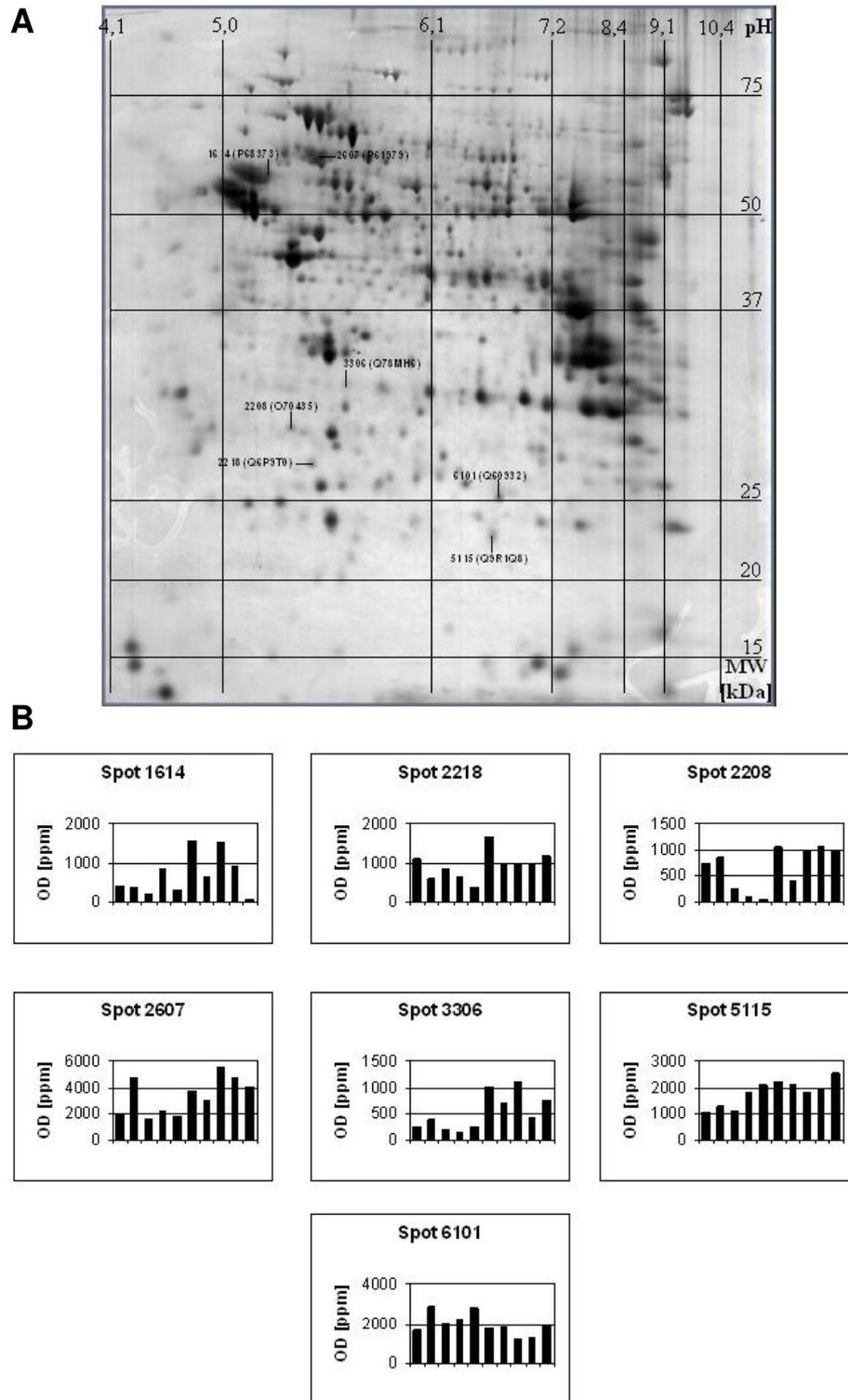


**Abbildung I:** Die Position der identifizierten Proteine der TP-Fraktion auf dem Coomassie-Blau gefärbten 2D-Polyacrylamid-Gel. Die Beschriftungen sind die Eintragsnummern in der *Swissprot*-Datenbank. Zur Orientierung sind pH-Wert und Molekulargewicht als Achsen eingezeichnet.

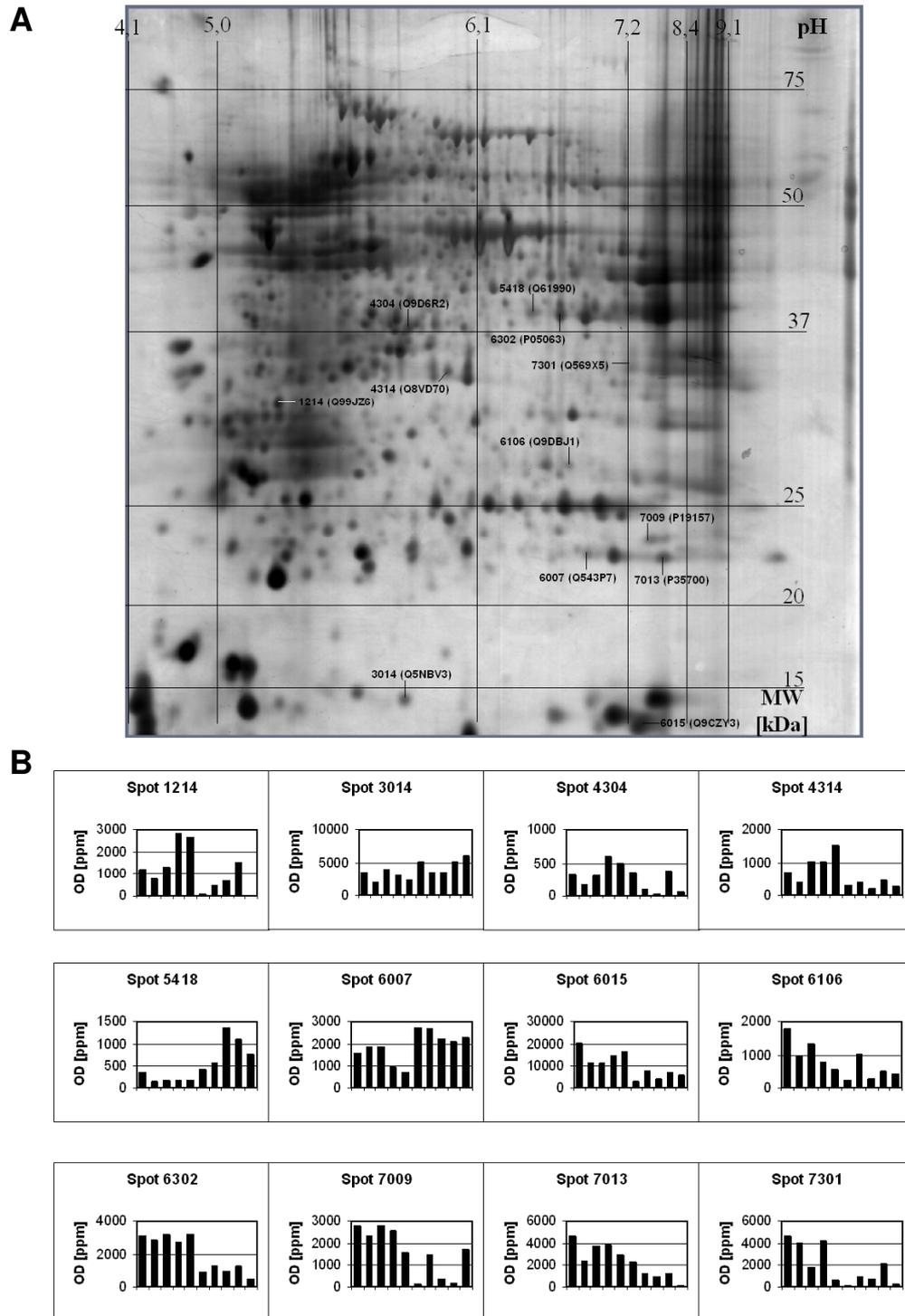




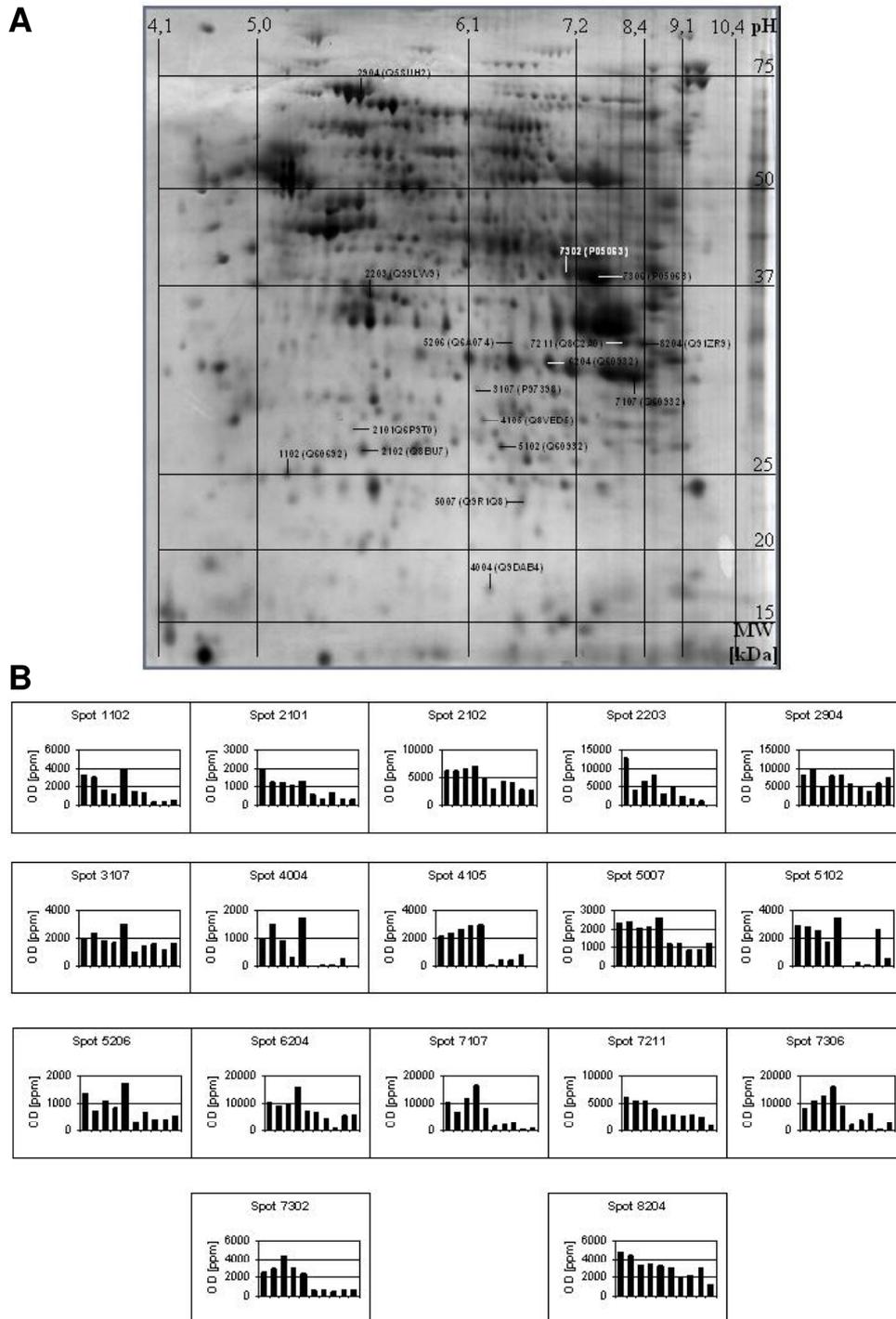
**Abbildung III:** (A) Darstellung signifikanter Proteinpunkte der Vergleichsgruppe Wildtyp-Kontrolle gegen nNOS-KO-Kontrolle auf einem repräsentativen Gel der TP-Fraktion. Eingetragen sind die Proteinpunkt Nr., auf dem Gel und die Eintragsnr. in *Swissprot*. Zur Orientierung sind pH und Molekulargewicht als Skala angegeben. (B) Die Diagramme zeigen die optischen Dichten in ppm der signifikanten Proteinpunkte. Säule 1 bis 5: nNOS-KO Kontrolle; Säule 6 bis 10: Wildtyp Kontrolle.



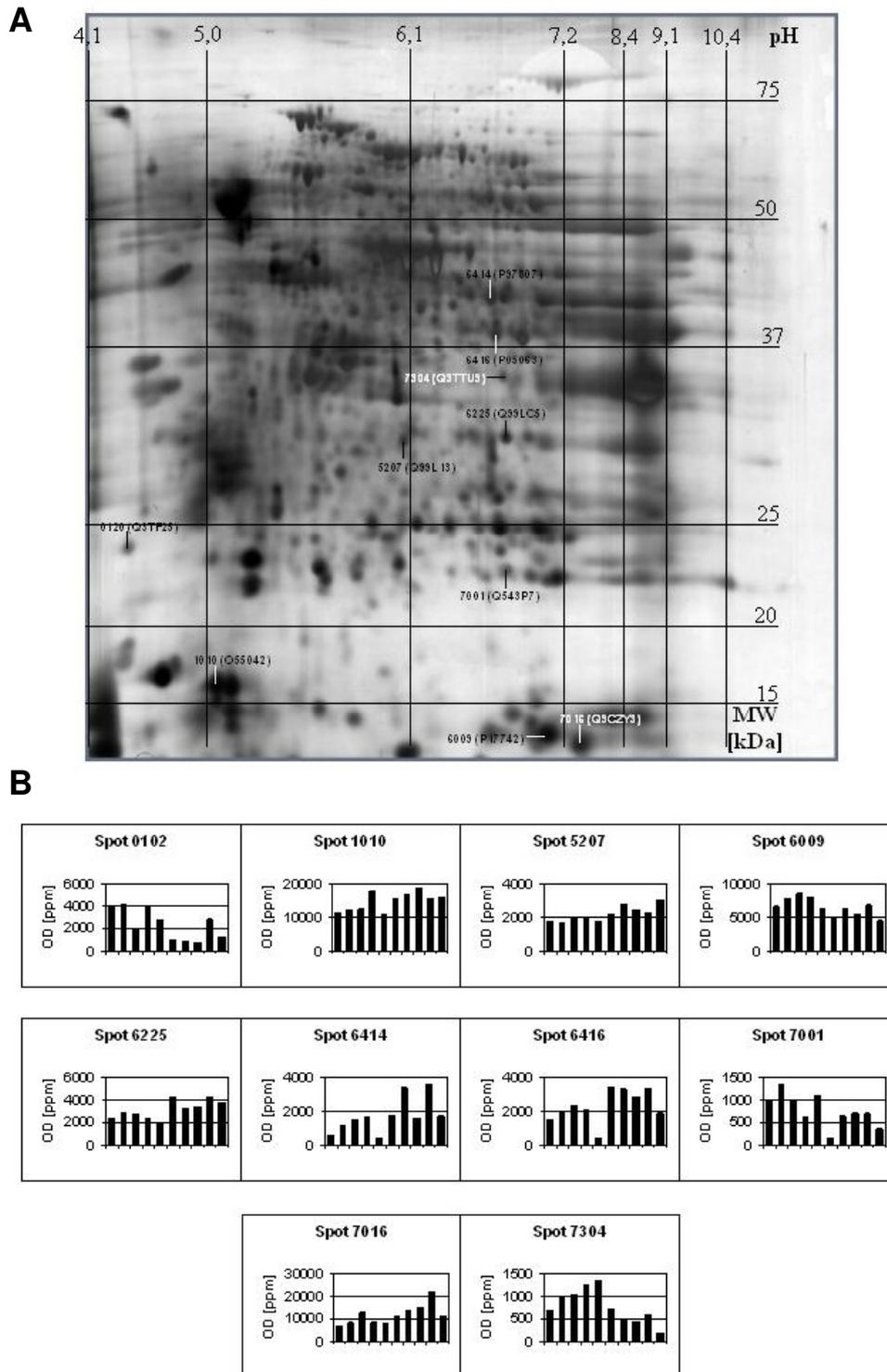
**Abbildung IV:** (A) Darstellung signifikanter Proteinpunkte der Vergleichsgruppe Wildtyp Kontrolle gegen nNOS-KO Kontrolle auf einem repräsentativen Gel der SP-Fraktion. Eingetragen sind die Proteinpunkt Nr. auf dem Gel und die Eintragsnr. in *Swissprot*. Zur Orientierung sind pH und Molekulargewicht als Skala angegeben. (B) Die Diagramme zeigen die optischen Dichten in ppm der signifikanten Proteinpunkte. Säule 1 bis 5: nNOS-KO Kontrollen; Säule 6 bis 10: Wildtyp Kontrollen.



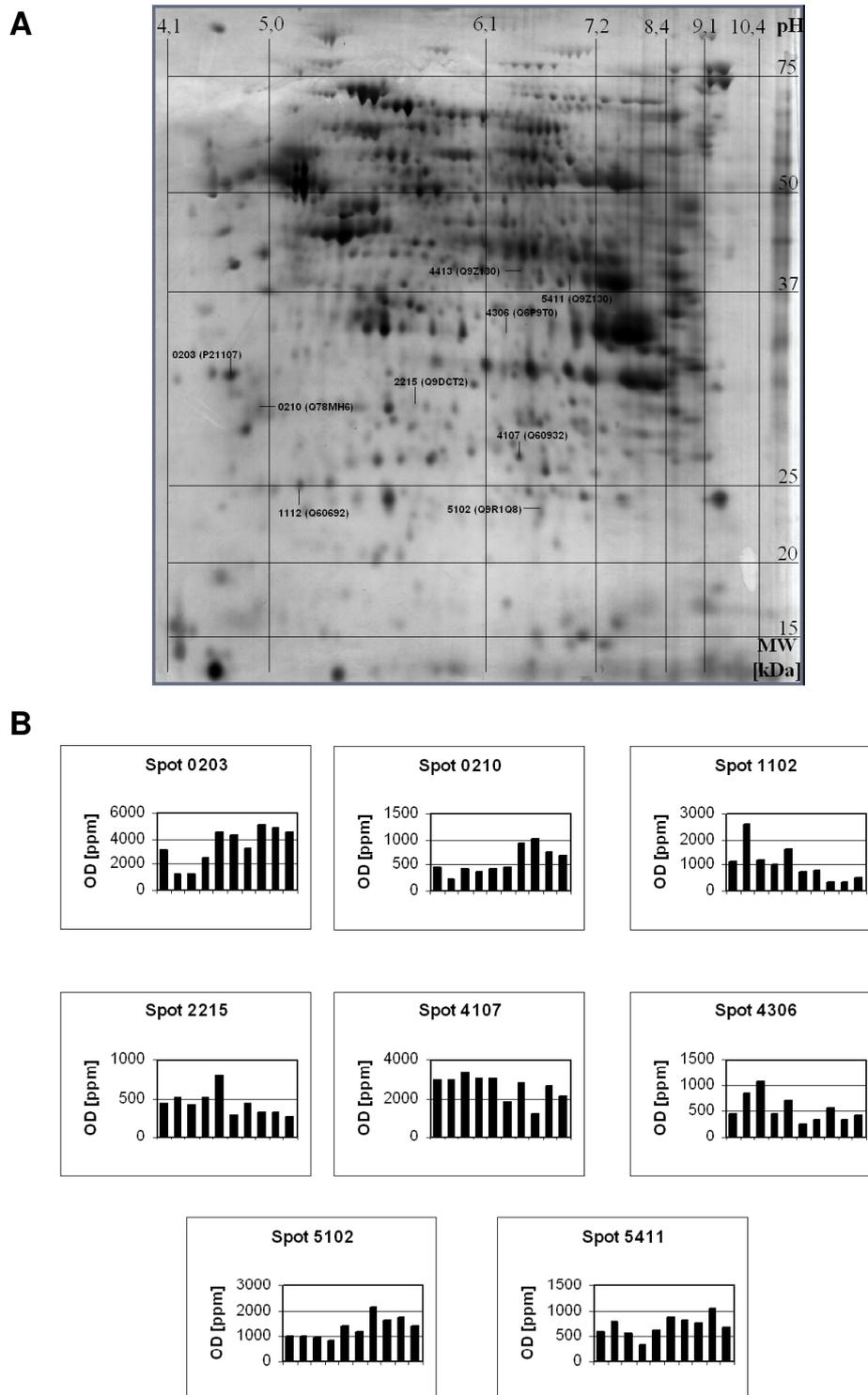
**Abbildung V:** (A) Darstellung signifikanter Proteinpunkte der Vergleichsgruppe Wildtyp Kontrolle gegen Wildtyp exponiert auf einem repräsentativen Gel der TP-Fraktion. Eingezeichnet sind die Proteinpunkt Nr. auf dem Gel und die Eintragsnr. in *Swissprot*. Zur Orientierung sind pH und Molekulargewicht als Skala angegeben. (B) Die Diagramme zeigen die optischen Dichten in ppm der signifikanten Proteinpunkte. Säule 1 bis 5: Wildtyp exponiert; Säule 6 bis 10: Wildtyp Kontrollen.



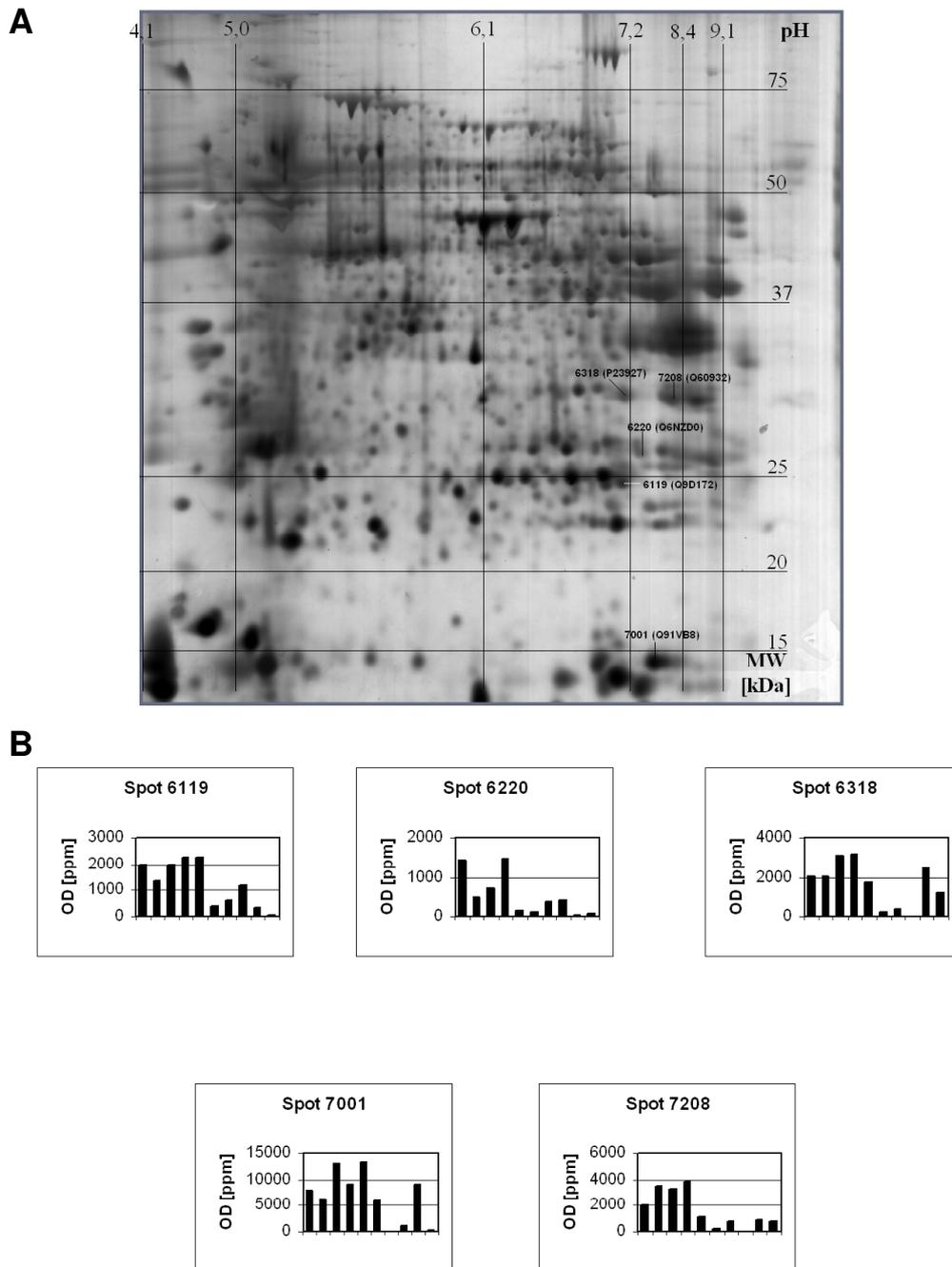
**Abbildung VI: (A)** Darstellung signifikanter Proteinpunkte der Vergleichsgruppe Wildtyp Kontrollen gegen exponierte Wildtyp-Tiere auf einem repräsentativen Gel der SP-Fraktion. Eingetragen sind die Proteinpunkt Nr. auf dem Gel und die Eintragsnr. in *Swissprot*. Zur Orientierung sind pH und Molekulargewicht als Skala angegeben. **(B)** Die Diagramme zeigen die optischen Dichten in ppm der signifikanten Proteinpunkte. Säule 1 bis 5: Wildtyp Kontrollen; Säule 6 bis 10: Wildtyp exponiert.



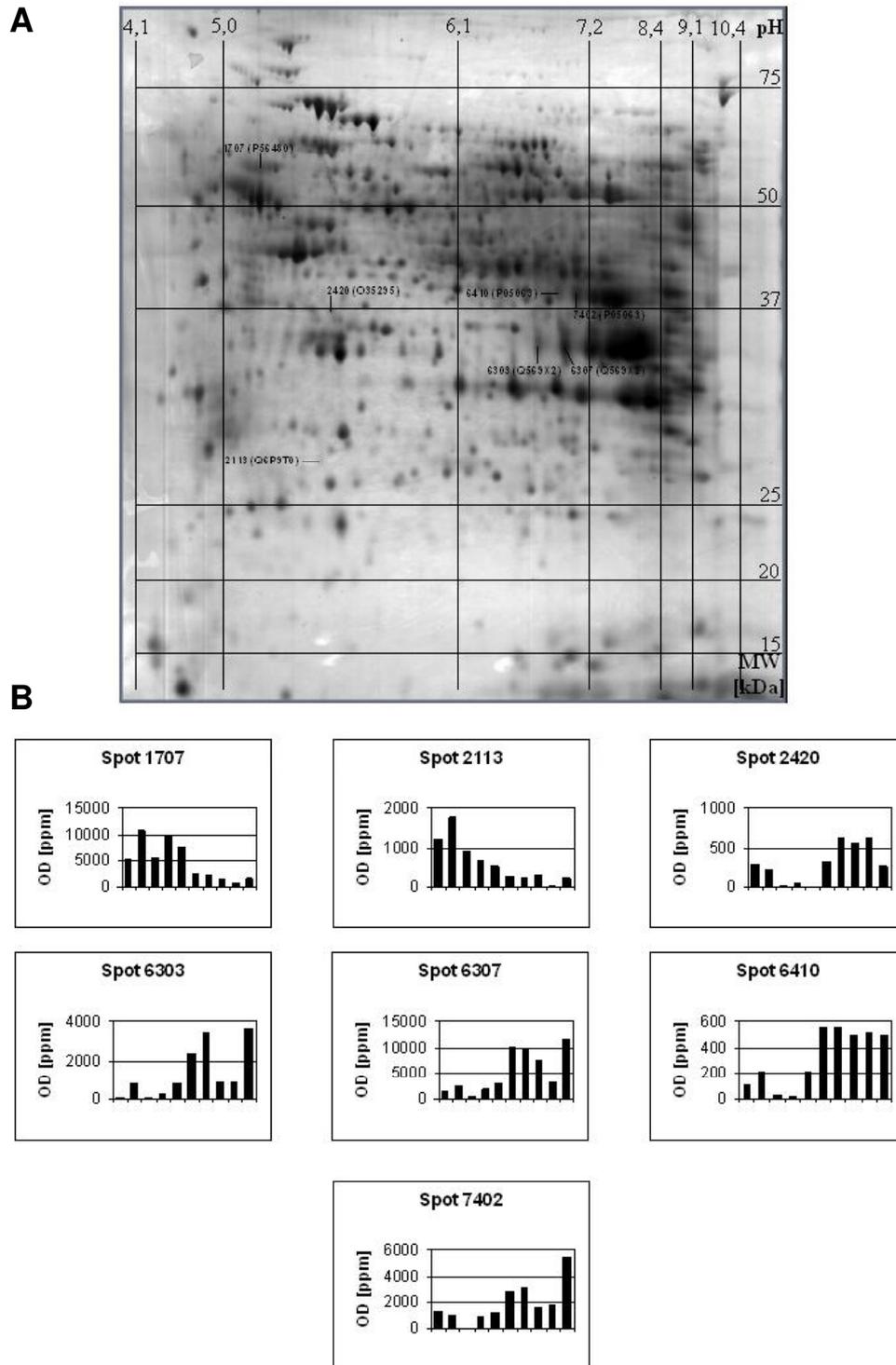
**Abbildung VII: (A)** Darstellung signifikanter Proteinpunkte der Vergleichsgruppe exponierte Wildtyp- gegen exponierte nNOS-KO-Tiere auf einem repräsentativen Gel der TP-Fraktion. Eingetragen sind die Proteinpunkt Nr. auf dem Gel und die Eintragsnr. in *Swissprot*. Zur Orientierung sind pH und Molekulargewicht als Skala angegeben. **(B)** Die Diagramme zeigen die optischen Dichten in ppm der signifikanten Proteinpunkte. Säule 1 bis 5: nNOS-KO exponiert; Säule 6 bis 10: Wildtyp exponiert.



**Abbildung VIII: (A)** Darstellung signifikanter Proteinpunkte der Vergleichsgruppe exponierte Wildtyp- gegen exponierte nNOS-KO-Tiere auf einem repräsentativen Gel der SP-Fraktion. Eingetragen sind die Proteinpunkt Nr. auf dem Gel und die Eintragsnr. in *Swissprot*. Zur Orientierung sind pH und Molekulargewicht als Skala angegeben. **(B)** Die Diagramme zeigen die optischen Dichten in ppm der signifikanten Proteinpunkte. Säule 1 bis 5: exponierte nNOS-KO; Säule 6 bis 10: Wildtyp exponiert.



**Abbildung IX:** (A) Darstellung signifikanter Proteinpunkte der Vergleichsgruppe nNOS-KO Kontrolle gegen nNOS-KO exponiert auf einem repräsentativen Gel der TP-Fraktion. Eingetragen sind die Proteinpunkt Nr. auf dem Gel und die Eintragsnr. in *Swissprot*. Zur Orientierung sind pH und Molekulargewicht als Skala angegeben. (B) Die Diagramme zeigen die optischen Dichten in ppm der signifikanten Proteinpunkte. Säule 1 bis 5: nNOS-KO exponiert; Säule 6 bis 10: nNOS-KO Kontrollen.



**Abbildung X:** (A) Darstellung signifikanter Proteinpunkte der Vergleichsgruppe nNOS-KO Kontrollen gegen exponierte nNOS-KO-Tiere auf einem repräsentativen Gel der SP-Fraktion. Eingetragen sind die Proteinpunkt Nr. auf dem Gel und die Eintragsnr. in *Swissprot*. Zur Orientierung sind pH und Molekulargewicht als Skala angegeben. (B) Die Diagramme zeigen die optischen Dichten in ppm der signifikanten Proteinpunkte. Säule 1 bis 5: nNOS-KO; Säule 6 bis 10: exponierte nNOS-KO.

## 10.3 Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Reaktionslösungen

### 10.3.1 2D-Gelelektrophorese

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle in diesem Kapitel aufgeführten Chemikalien und Reagenzlösungen über die Firma Amersham Biosciences, Piscataway, USA, bezogen.

#### 10.3.1.1 Extraktionspuffer (50 ml)

1 Tablette Protease-Inhibitor (*Complete*, Firma Roche, Mannheim)

10 mM Tris-HCl

0,5 % Triton X-100, pH 8.1

*Aqua destillata* ad 50 ml

#### 10.3.1.2 Rehydratierungspuffer (10 ml)

5,4 g ( 9 M) Harnstoff

0,3 g ( 2 %) CHAPS

0,012 g ( 10 mM) Tris

50 mg ( 32 mM) DTT

einige Krümel Bromophenol Blau

entionisiertes Wasser ad 10 ml

#### 10.3.1.3 Protein-Assay

jeder Messansatz enthielt:

10 µl H<sub>2</sub>O

9 µl Rehydratierungspuffer

1 µl Probe, Proteinstandard oder Rehydratierungspuffer

10 µl 0,1 n HCl

1000 µl Reaktionslösung (1:5 verdünnt) der Firma Bio-Rad, Hercules, USA

#### 10.3.1.4 Basis-Äquilibrierungs-Puffer (200 ml)

72,07 g ( 6 M) Harnstoff

60,6 ml (30 %) Glycerol 99 %

40 ml (2 %) SDS 10 %

10 ml (50 mM) 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

einige Krümel Bromophenolblau

entionisiertes Wasser ad 200 ml

#### **10.3.1.5 Ersatz-Lösung (200 ml)**

50 ml 1,5 M Tris-HCl Puffer, pH 8.8

100 ml Glycerol

2 mg Bromophenol Blau

50 ml *Aqua destillata*

#### **10.3.1.6 1,5 M Tris-HCl Puffer (pH 8,8)**

182 g Tris wurden in 200 ml entionisiertem Wasser gelöst, mit 6 N HCl auf pH 8,8 eingestellt und mit entionisiertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

#### **10.3.1.7 10 % SDS**

10 g Natriumdodecylsulfat wurden mit entionisiertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

#### **10.3.1.8 10 % Ammonium Persulfat (APS)**

1,1 g Ammonium Persulfat wurden in 11 ml entionisiertem Wasser gelöst.

#### **10.3.1.9 Basislösung für Acrylamid-Gele**

Lösung für 11 11 % *vertical DALT slab* Gele:

403 ml Duracryl 30 % (Firma Bio-Rad, Hercules, USA)

275 ml 1,5 M Tris-HCl Puffer, pH 8,8 (10.3.1.5)

400 ml *Aqua destillata*

11 ml SDS 10 % (10.3.1.7)

#### **10.3.1.10 Overlay-Puffer**

n-Butanol 50 ml

entionisiertes Wasser 5 ml

#### **10.3.1.11 SDS-Elektrophorese Puffer**

2 Liter 10xTris/Glycerin/SDS-Puffer der Firma Bio-Rad, Hercules, USA, wurden 1:10 mit 18 Litern *demi water* verdünnt, so dass ein Endvolumen von 20 Litern entstand. Der Puffer wurde auf 16°C vortemperiert.

#### **10.3.1.12 Fixations-Lösung (3,0 l)**

1,5 l Methanol

150 ml Eisessig

*Aqua destillata* ad 3,0 l

#### **10.3.1.13 Natriumthiosulfat-Lösung**

600 mg Natriumthiosulfat wurden in 3 l *Aqua destillata* gelöst (0,002 %).

#### **10.3.1.14 Silber-Färbung**

4,5 g Silbernitrat wurden in 3 l *Aqua destillata* gelöst (0,15 %).

#### **10.3.1.15 Entwicklungslösung**

60 g Natriumcarbonat (2 %) wurden in 1,11 l Formaldehyd (37 %) und 2,89 l *Aqua destillata* gelöst.

#### **10.3.1.16 Coomassie-Blau Färbelösung (G-250)**

340 ml Methanol

35,3 ml Phosphorsäure

150 g Ammoniumsulfat

1 g Coomassie brillant blau G-250

*Aqua destillata* ad 1000 ml

### **10.3.2 Nano-LC-ESI-Iontrap-Analyse**

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien und Reagenzlösungen in diesem Kapitel über die Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

#### **10.3.2.1 Lösung 1**

25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  in 50 % Acetonitril

#### **10.3.2.2 Lösung 2**

Acetonitril 100 %

#### **10.3.2.3 Lösung 3**

25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  in  $\text{H}_2\text{O}$

#### **10.3.2.4 Lösung 4**

25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  in  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,05 mg Trypsin/ml (Firma Roche Diagnostics, Mannheim)

### 10.3.3 MALDI LIFT-TOF-Analyse

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien und Reagenzlösungen in diesem Kapitel über die Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

#### 10.3.3.1 Puffer 1

20 ml 10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$

#### 10.3.3.2 Puffer 2

10 ml Acetonitril

10 ml 20 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$

#### 10.3.3.3 Puffer 3

20 ml Acetonitril (100 %)

#### 10.3.3.4 Extraktionspuffer

10 ml 2 % TFA (Pierce Biotechnology, Rockford, USA)

10 ml 10 mM Octylglucopyranosid (OGP)

#### 10.3.3.5 Puffer 5 (für 384 Proben)

1960  $\mu\text{l}$  20 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  + 10 mM OGP (1:1)

80  $\mu\text{g}$  Trypsin (Promega, Mannheim) in 40  $\mu\text{l}$  1 mM HCl

Endkonzentration des Trypsins: 40 ng/ $\mu\text{l}$

#### 10.3.3.6 Matrix-Lösung

20  $\mu\text{l}$  0,1 % TFA (Pierce Biotechnology, Rockford, USA)

1980  $\mu\text{l}$  Aceton

50 mg Alpha-Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure (ACCA)