

## 4. Diskussion

Die synaptische Plastizität, also die Fähigkeit von Nervenzellen, die Übertragungsstärke ihrer Synapsen zu verändern, liegt der Entwicklung des Nervensystems, dem Lernen und Speichern von Informationen, aber auch neuropathologischen Prozessen zugrunde. Wie das Langzeitgedächtnis, so benötigen auch andere lang anhaltende Formen der synaptischen Plastizität, einschließlich der LTP, komplexe Veränderungen in der molekularen Zusammensetzung und der Struktur von Synapsen und sind von der Synthese neuer mRNAs und Proteine abhängig (Goelet et al., 1986; Morgan et al., 1987; Sheng und Greenberg, 1990). Die plastischen Eigenschaften von Nervensystemen könnten daher auf aktivitätsinduzierten Veränderungen in der Expression spezifischer früh exprimierter Gene (IEGs) beruhen (Kuhl, 2000). Diese genomische Antwort von synaptisch aktivierten Neuronen umfasst zum einen die Expression von Transkriptionsfaktoren, wie c-fos oder zif268 (Greenberg et al., 1986; Morgan et al., 1987; Saffen et al., 1988), und zum anderen von Effektorgenen, deren Proteine direkt an der Synapse lokalisiert sind und somit an den dortigen Veränderungen unmittelbar beteiligt sein könnten (Nedivi et al., 1993; Qian et al., 1993; Yamagata et al., 1993; Frey et al., 1996; Lanahan und Worley, 1998; Kauselmann et al., 1999; Konietzko et al., 1999). Ein solches Effektorgen stellt Arg3.1 dar, das unter den aktivitätsregulierten Genen insofern einzigartig ist, da sowohl mRNA als auch Protein dendritisch lokalisiert sind (Link et al., 1995; Lyford et al., 1995). Bisher sind das Wissen über die funktionelle Rolle von Arg3.1 und sein möglicher Einfluss auf Veränderungen an der Synapse im Anschluss an neuronale Aktivität sehr begrenzt. In der vorliegenden Arbeit wurde mit biochemischen und molekularbiologischen Methoden die Verteilung des Arg3.1 Proteins und seine Einbindung in Proteinnetzwerke charakterisiert. Weiterhin wurden die Auswirkungen einer Arg3.1 Nullmutation auf molekularer, zellbiologischer, elektrophysiologischer und verhaltensbiologischer Ebene untersucht.

### 4.1 Die Rolle von Arg3.1 an der Synapse

Das dendritische Vorkommen der Arg3.1 mRNA und die dortige Assoziation mit Polysomen (Bagni et al., 2000) deuten auf eine lokale Translation von Arg3.1 an der Synapse hin. Die in dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Färbungen zeigen, dass das Arg3.1 Protein, nach spezifischer Stimulation eines räumlich begrenzten synaptischen Bereiches,

selektiv an aktivierten Synapsen akkumuliert. Dieses Muster entspricht der mRNA Verteilung, wie sie von Oswald Steward und Paul Worley bei einer vergleichbaren Stimulation gezeigt wurde (Steward und Worley, 2001). Diese selektive Verteilung des Arg3.1 Proteins deutet entweder auf einen spezifischen Transportmechanismus oder auf eine lokale Proteinsynthese hin. Die lokale Translation von Arg3.1 an Synapsen wurde inzwischen unter *in vitro* Bedingungen nachgewiesen (Yin et al., 2002). So führte eine Stimulation mit dem Wachstumsfaktor BDNF an aufgereinigten Synaptosomen zu einer Zunahme der lokalen Arg3.1 Proteinsynthese. Interessanterweise war auch diese BDNF-vermittelte Induktion abhängig von der Aktivität des NMDA-Rezeptors. Diese Befunde weisen zwar auf eine lokale Translation für Arg3.1 am dendritischen Dorn hin, sie wird aber, wie im Fall der laminaspezifischen Stimulation gezeigt wurde, von einer zytosolischen Proteinsynthese im Zellkörper begleitet. Es bleibt offen, ob das im Soma synthetisierte Arg3.1 Protein eine Funktion ausschließlich im Zellkörper bzw. Zellkern übernimmt, oder ob dieses auch in die Dendriten transportiert wird.

Die dendritische Lokalisation und Translation von mRNAs könnte einen Weg darstellen, wie ein Neuron die räumlich und zeitlich begrenzte Proteinexpression gewährleistet, die der synaptischen Plastizität zugrunde liegt. Dafür spricht auch, dass einige der dendritisch lokalisierten mRNAs für Proteine kodieren, deren zentrale Rolle bei den aktivitätsinduzierten Veränderungen an der Synapse bekannt sind. Dazu gehören die Untereinheit 1 des NMDA-Rezeptors, dessen Aktivität für die Induktion von LTP erforderlich ist, die  $\alpha$ -CaMKII, die sowohl an der Induktion als auch der Aufrechterhaltung von LTP beteiligt ist oder Shank, das als integratives Strukturelement der PSD verschiedene Signalkaskaden in eine räumliche Nähe bringt (s. als Reviews Sheng und Kim, 2002; Steward und Schuman, 2003). Man geht davon aus, dass eine Reihe weiterer mRNAs in sehr niedrigen Konzentrationen in Dendriten vorliegen, die eine Detektion über *in situ* Hybridisierungen nicht zulassen. So wurde durch Amplifikationstechniken und Stimulation der lokalen Translation beispielsweise das dendritische Vorkommen des *fmr1* Transkriptes gezeigt, das für das FMR Protein (*fragile X mental retardation protein*) kodiert (Weiler et al., 1997; Zalfa et al., 2003). Eine Mutationen des *fmr1* Gens, die seine Transkription und damit die Expression des FMRP unterdrückt, führt zur Ausbildung des Fragilen-X-Syndroms (Martin-Bell-Syndrom), das die häufigste Ursache einer genetisch bedingten geistigen Behinderung ist (Warren und Ashley, 1995). Die synaptischen Dysfunktionen, die beim Fragilen-X-Syndrom auftreten, könnten daher auf eine Schädigung der lokalen Proteinsynthese von FMRP an Synapsen zurückzuführen sein (Weiler

et al., 1997). Ein weiteres Beispiel für die Bedeutung dendritischer mRNAs wurde kürzlich anhand des  $\alpha$ -CaMKII Transkriptes gezeigt. Durch eine Mutation in der 3'UTR wurde der dendritische Transport des Transkriptes unterbunden. Die proteinkodierende Region blieb zwar intakt, mRNA- und Proteinlokalisierung blieben aber auf das Soma beschränkt. Das Fehlen der  $\alpha$ -CaMKII an der Synapse führte zu einer reduzierten L-LTP und einem beeinträchtigten Gedächtnisvermögen in hippokampusabhängigen Lernaufgaben (Miller et al., 2002).

Arg3.1 mRNA und Protein lokalisieren also nach ihrer aktivitätsinduzierten Expression selektiv in dem synaptischen Bereich, der die Stimulation erfahren hat. Die Analyse der biochemisch aufreinigten subzellulären Kompartimente zeigt, dass das Protein dort sogar unmittelbar bis an die Synapse transportiert wird und als Teil des mit der postsynaptischen Membran assoziierten Proteinkomplexes, der PSD, vorliegt. Erste Beobachtungen an elektronenmikroskopisch ausgewerteten Immunogoldfärbungen konnten dieses Ergebnis bestätigen. Um allerdings genauere Aussagen über die räumliche Position von Arg3.1 innerhalb der PSD, insbesondere die Entfernung zu der postsynaptischen Membran, mit dieser Methodik treffen zu können, sind in zukünftigen Experimenten noch eine optimierte Fixiertechnik und quantitative Auswertungen nötig. Kenntnisse über Proteininteraktionen innerhalb der PSD geben Aufschluss über das molekulare Zusammenspiel der einzelnen Bausteine, das beispielsweise dem Transport von Rezeptormolekülen, der Rekrutierung von Enzymen oder der Restrukturierung des Zytoskeletts zugrunde liegt. Dieses Zusammenspiel unterliegt dynamischen Veränderungen, von denen man annimmt, dass sie die Potenzierung bzw. Verminderung der synaptischen Übertragungseffizienz bewirken, die bei der synaptischen Plastizität auftreten. Eine zentrale Bedeutung kommt dabei Proteinen wie Arg3.1 zu, die durch neuronale Aktivität induziert oder hochreguliert und erst im Anschluss daran in das Netzwerk eingebunden werden. Zur Identifizierung möglicher Interaktionspartner von Arg3.1 an der postsynaptischen Membran wurden in dieser Arbeit affinitätschromatographische Studien angewendet. Diese wurden dem klassischen Hefe Zwei-Hybrid System aus zweierlei Gründen vorgezogen. Erstens lassen sich kleine Proteinkomplexe präzipitieren. Dadurch können neben direkten auch indirekte Assoziationspartner identifiziert werden. Dies ist mit dem Hefe Zwei-Hybrid System nicht möglich, da hier nur primäre Bindungspartner identifiziert werden können. Zweitens erwies sich der Einsatz von Arg3.1 im klassischen Gal4 Hefe Zwei-Hybrid System als

problematisch, da es, auch in Teilsequenzen, transaktivierende Eigenschaften besitzt und sich der daraus ergebende Hintergrund als zu hoch erwies, um positive Klone isolieren zu können.

In verschiedenen *pull-down* Experimente konnte gezeigt werden, dass Arg3.1 in der PSD mit dem NMDA-Rezeptor, PSD-95, SynGAP und Shank präzipitiert. Diese Proteine stellen Schlüsselmoleküle des NMDA-Rezeptor-Komplexes dar (Husi et al. 2000) und werden im Folgenden daher näher beschrieben. NMDA-Rezeptoren sind Heteromere und setzen sich aus einer obligatorischen NR1 Untereinheit und verschiedenen NR2 Untereinheiten (NR2A-D) zusammen (Hollmann und Heinemann, 1994). Die Öffnung der NMDA-Rezeptor-Kanäle hängt von der Bindung des Agonisten Glutamat und des Co-Agonisten Glycin bei einer zeitgleichen Depolarisierung der postsynaptischen Membran ab. Die Depolarisierung bewirkt das Entfernen einer spannungsabhängigen Blockade von Magnesiumionen aus der Öffnung des Kanals (Nowak et al., 1984). Die NMDA-Rezeptoren wirken also als Detektoren koinzidenter prä- und postsynaptischer Aktivität. Das Öffnen der NMDA-Rezeptor-Kanäle erlaubt den Einstrom von Kalziumionen. Dies bewirkt die Induktion verschiedener Signalkaskaden, die zu kurzfristigen, über die Modifikation prä-existierender Moleküle, und langfristigen, über die Aktivierung neuer Genprodukte, Veränderungen führt. Die räumliche Assoziation des Rezeptors mit Signalmolekülen und anderen Proteinkomplexen wird zu einem großen Teil von PSD-95 vermittelt, das mannigfaltige Proteininteraktionen ausbilden kann. PSD-95 gehört zu der Klasse der membranassoziierten Guanylat-Kinasen (MAGUKs), die als Strukturprotein fungieren und Signalmoleküle zu den Synapsen rekrutieren. Dafür stehen PSD-95 fünf Proteininteraktionsdomänen zur Verfügung, drei PDZ- (PSD-95/*Disc-large*/ZO-1), eine Src-Homologie3- (SH3) und eine Guanylat-Kinasen ähnliche (GK) Domäne (Kornau et al., 1997). PSD-95 bindet über die PDZ-Domänen an die NR2 Untereinheiten (Kornau et al., 1995), die neuronale Stickstoff-Synthase (nNOS) (Brenman, 1996), das Zelladhäsionsmolekül Neuroligin (Irie et al., 1997) und SynGAP (Kim et al., 1998). Ebenfalls über die ersten beiden PDZ-Domänen interagiert PSD-95 mit Stargazin, einem membranassoziierten Strukturprotein, das die synaptische Lokalisierung einzelner AMPA-Rezeptor-Untereinheiten steuert (Chen et al., 2000). AMPA-Rezeptoren werden nach plastizitätsinduzierender Stimulation vermehrt in die Membran eingebaut und tragen so zur Vergrößerung der synaptischen Übertragungsrate bei (Malinow und Malenka, 2002). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass PSD-95 an dieser aktivitätsgesteuerten Insertion direkt beteiligt ist (Schnell et al., 2002; Ehrlich und Malinow, 2004). Über die GK-Domäne bindet PSD-95 darüber hinaus an GKAP (Guanylat-Kinase assoziierte Protein) (Kim et al., 1997), das

wiederum direkt mit Shank interagiert (Naisbitt et al., 1999). Shank wiederum ist über das Strukturprotein Homer1 mit den metabotropen Glutamat-Rezeptoren verbunden. Da Shank auch mit sich selbst interagiert und so Homomultimere ausbildet, bildet es eine Art Rückgrad der PSD, das Rezeptorkomplexe miteinander verbinden kann (Sheng und Kim, 2000). SynGAP ist ein synaptisches, RasGTPase aktivierendes Protein, das direkten Einfluss auf die Aktivierung der MAPK-Signalkaskade nehmen kann. RasGAPs greifen in die Kaskade ein, indem sie den Übergang der aktiven Form von Ras (RasGTP) in die inaktive (RasGDP) fördern. Aktives RasGTP stimuliert die Kinase Raf, die am Anfang des MAPK/ERK Signalweges steht. Diese Signalkaskade ist an der Differenzierung und Proliferation von Zellen und wie bereits einleitend erwähnt auch an der synaptischen Plastizität und der Gedächtnisbildung beteiligt (s. als Review: Thomas und Huganir, 2004). RasGAPs wie SynGAP wirken inhibierend auf die Aktivierung der MAPK Signalkaskade und aufgrund seiner Einbindung in den NMDA-Rezeptor-Komplex könnte SynGAP ein Mediator der NMDA-Rezeptor vermittelten Aktivierung der MAPK-Signalkaskade sein (Gille und Downward, 1999). Die Assoziation von Arg3.1 mit dem NMDA-Rezeptor wird von PSD-95 vermittelt, da sie in dessen Abwesenheit nicht ausgebildet werden kann. Die biochemischen Ergebnisse aus den Arg3.1 *knockout*-Mäusen zeigen aber, dass die synaptische Lokalisation der NMDA-Rezeptoren und PSD-95 sowie deren direkte Interaktion unabhängig von Arg3.1 ausgebildet werden. Auch die Assoziation mit SynGAP ist in PSD-95 *knockouts* unterbrochen und wird demnach von PSD-95 geknüpft. Arg3.1 ist also ein Teil des Proteinnetzwerkes NMDA-Rezeptor-PSD-95-GKAP-Shank, dessen tragende Rolle an der Ausbildung von synaptischer Plastizität gezeigt wurde (s. als Review Sheng, 2001). Ein entscheidender Nachteil der *pulldown*-Experimente ist, dass keine Aussagen darüber getroffen werden können, ob die Interaktionen direkt oder indirekt sind. Hierfür müssen andere Methoden angewendet werden. In diesem Falle bietet sich ein *pulldown* ausschließlich mit rekombinierten Proteinen an und nicht mit Gesamtgehirnfraktionen.

Welche Rolle spielt Arg3.1 in diesem Proteinkomplex? Bei der Beantwortung dieser Frage muss man beachten, dass Arg3.1 erst nach synaptischer Aktivität in die PSD eingebaut wird. Es könnte somit eine Transportfunktion für andere Moleküle übernehmen. Ferner könnte es strukturelle Veränderungen vermitteln, da Arg3.1 mit dem Protein F-actin interagiert (Lyford et al., 1995) und so eine aktivitätsgesteuerte Assoziation des NMDA-Rezeptor-Komplexes mit dem Zytoskelett bildet. Diese Verknüpfung könnte eine wichtige Restrukturierung innerhalb der PSD bewirken. So führt das Lösen bestehender und Ausbilden neuer

Proteininteraktionen zu den morphologischen Veränderungen, die im Anschluss an neuronale Aktivität an der Synapse beobachtet werden können. Neueste, auf einer Tagung (33. Meeting of the Society for Neuroscience) vorgestellte Studien deuten auf eine Beteiligung von Arg3.1 am Transport einzelner AMPA-Rezeptor Untereinheiten hin (Rial-Verde et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte zwar keine unmittelbare Assoziation von Arg3.1 mit der AMPA-Rezeptor-Untereinheit 2 (GluR2) gezeigt werden. Die enge Verknüpfung der einzelnen rezeptorassoziierten Netzwerke schließt aber eine indirekte funktionelle Assoziation nicht aus. So besteht die Möglichkeit einer Verknüpfung von Arg3.1 über PSD-95 und Stargazin mit der AMPA-Rezeptor Untereinheit 1 (GluR1).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser biochemischen und molekularbiologischen Studien, dass Arg3.1 im Anschluss an seine aktivitätsabhängige Induktion und synaptische Lokalisierung in eben den Proteinkomplex eingebunden wird, durch dessen Aktivität seine Expression ursprünglich induziert wurde (Abbildung 4.1). Der NMDA-Rezeptor steuert damit die Zusammensetzung seines eigenen Proteinkomplexes.

## **4.2 Die funktionelle Charakterisierung einer Arg3.1 *knockout*-Mauslinie**

### **4.2.1 Allgemeine Aspekte**

Die hier analysierte Nullmutations-*knockout*-Mauslinie entstand parallel zu einer konditionalen Arg3.1 *knockout*-Linie, indem die dafür homolog rekombinierten ES-Zellen mit einer Cre-Rekombinase transient transfiziert wurden. Homozygot mutierte Tiere treten in einer Frequenz nach Mendel auf und zeigen keine Abnormalitäten in Hinblick auf ihre allgemeine Physiologie und Anatomie. Ferner wurden sowohl auf licht- als auch auf elektronenmikroskopischer Ebene keine morphologischen Veränderungen im Gehirn erkannt, was die Anzahl und Verteilung von Neuronen und Gliazellen, immunhistochemische Verteilung verschiedener synaptischer Proteine, sowie Vorkommen und Größe postsynaptischer Strukturen betraf. Zudem verhielten sich die Tiere völlig unauffällig in Verhaltenstests, die einerseits auf die Motorik und andererseits auf allgemeine Verhaltensweisen von Mäusen wie Ängstlichkeit und Explorationsdrang abzielen. Aufgrund dieser Befunde wurde es als sinnvoll betrachtet, die Auswirkungen der Arg3.1 Deletion in der kompletten *knockout*-Mauslinie zu untersuchen. Es sollte in diesem Zusammenhang erwähnt werden, dass in einer früheren Studie die embryonale Letalität eines Arg3.1 *knockouts* publiziert wurde (Liu et al. 2000). Dieser Ansatz unterschied sich aber in einigen zentralen

Punkten von dem hier verwendeten. Erstens handelte es sich bei der letalen Linie um einen konventionellen *knockout*, bei dem 600 Nukleotide im 5'-Bereich des offenen Leserahmens (ORF) von Arg3.1 durch einen Selektionsmarker substituiert wurden. Die im Genom verbliebene Sequenz, weitere 600 Nukleotide, könnte demnach dominant negative Auswirkungen auf die embryonale Entwicklung gehabt haben. Auch in unserem Labor wurde bereits eine Arg3.1 *knockout*-Mauslinie der ersten Generation generiert, in der ca. 700 Nukleotide im 3' Bereich des Arg3.1 ORFs durch das Reporter-gen lacZ sowie eine Selektionskassette ersetzt wurden (Dammermann, 1999). Während heterozygote Nachkommen dieser Linie vital sind, treten homozygote Nachkommen nicht in den nach den Mendelschen Regeln zu erwartenden Verhältnissen auf, sondern sind stark unterrepräsentiert (ca. 2%). Auch hier ist ein dominant negativer Effekt des hybriden Genproduktes aus dem N-terminalen Arg3.1 und der  $\beta$ -Galaktosidase während der Entwicklung nicht auszuschließen. Im Gegensatz dazu trägt die in dieser Arbeit analysierte *knockout*-Linie eine komplette Deletion des Gens. Des Weiteren wurden für die Generierung der diversen Linien unterschiedliche genetische Hintergründe, die Herkunft der embryonalen Stammzellen sowie der injizierten Blastozyste betreffend, verwendet. So wurde schon an anderer Stelle beobachtet, dass die Wahl des genetischen Hintergrundes große Auswirkungen auf die Entwicklung und das spätere Verhalten von Mäusen haben kann (Tonegawa et al., 1995; Crusio, 1996; Lipp und Wolfer, 1998). Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurde bei der kompletten Arg3.1 *knockout*-Linie großer Wert darauf gelegt, einen stabilen genetischen Hintergrund durch Rückkreuzung in den Inzuchtstamm C57Bl/6J zu schaffen, bevor die Tiere einzelnen Versuchen unterzogen wurden. Dieser Stamm eignet sich am besten für Untersuchungen an LTP und Lernfähigkeiten (Nguyen et al., 2000). Die Zucht wurde in Einklang mit den Empfehlungen der Banbury Konferenz (*Banbury Conference*, 1997) und deren Erweiterungen (Wolfer et al., 2002) durchgeführt. In diesen Publikationen sind allgemeine Richtlinien zur Generierung eines einheitlichen genetischen Hintergrundes für *knockout*-Mauslinien beschrieben.

#### **4.2.2 Die Ausbildung einer stabilen LTP ist abhängig von Arg3.1**

Die strikte Kopplung der Arg3.1 Expression an eine NMDA-Rezeptor abhängige Stimulation zusammen mit dem zeitlichen Verlauf der dendritischen mRNA- bzw. Proteinverteilung impliziert eine Rolle für Arg3.1 bei der Konsolidierungsphase von synaptischer Plastizität. Diese Annahme wurde in Untersuchungen zur Ausbildung und Aufrechterhaltung der LTP in

Abwesenheit der Arg3.1 Genexpression getestet. Hier konnte gezeigt werden, dass *knockout*-Tiere einen einzigartigen bi-phasischen LTP Verlauf aufweisen. Dabei steht einer massiv vergrößerten frühen Phase (E-LTP) eine komplett fehlende späte Phase (L-LTP) gegenüber, wobei die Abnahme der Potenzierung ca. eine Stunde nach der Stimulation einsetzt. Es ist bemerkenswert, dass diese erhöhte Potenzierung in einem Zeitfenster auftritt, in dem das neu synthetisierte Arg3.1 Protein unter Wildtyp-Bedingungen an der Synapse noch nicht nachweisbar und die LTP noch translationsunabhängig ist.

Eine Funktion für residual an der Synapse lokalisiertes Arg3.1 in der frühen LTP Phase kann zwar nicht ausgeschlossen werden, die niedrige Basalexpression und relativ kurze Halbwertszeit (die Proteinexpression kehrt ca. 10 Stunden nach Induktion auf ihre Grundwerte zurück) widersprechen allerdings dieser Annahme. Auch präsynaptische Aspekte in der Transmitterausschüttung, die eine wichtige Rolle in den ersten Sekunden bis Minuten der synaptischen Potenzierung spielen, können als Ursache der erhöhten E-LTP ausgeschlossen werden. So zeigte Dr. Ora Ohana, dass beispielsweise die *paired-pulse facilitation*, ein rein präsynaptisches Phänomen synaptischer Übertragungssteigerung, bei den *knockout*-Tieren unbeeinträchtigt ist. Ferner konnte die potenzierte E-LTP unabhängig voneinander durch zwei verschiedene Induktionsprotokolle reproduziert werden. Während die LTP nach zeitlicher Paarung präsynaptischer Stimulation und postsynaptischer Depolarisation ausschließlich auf postsynaptischen Mechanismen beruht, ruft die hochfrequente Reizgabe eine Potenzierung hervor, die von prä- und postsynaptischen Faktoren abhängt (Lisman, 2003). Diese Beobachtungen stärken die Annahme einer postsynaptischen Ursache der erhöhten E-LTP. Eine mögliche Erklärung basiert auf dem Prinzip der synaptischen Metaplastizität und ihrer Beeinträchtigung in Arg3.1 *knockout*-Mäusen. Die Größenordnung einer möglichen Übertragungssteigerung hängt von dem Grundzustand jeder individuellen Synapse ab. So kann eine vorherige, unterschwellige Stimulation die Induktion der LTP durch hochfrequente Reizgabe inhibieren (Abraham und Bear, 1996). Ebenso führen sequenzielle überschwellige Stimulationen zu einer Sättigung, die eine weitere Effizienzsteigerung verhindert. Diese Argumentation folgt der Bienenstock-Cooper-Munro (BCM) Regel (Bienenstock et al., 1982). Sie besagt, dass jedes Neuron eine unterschiedliche Reizschwelle  $\theta_m$  für Modifikationen besitzt (*modification threshold*), die darüber entscheidet, ob seine Aktivierung zu einer synaptischen Verstärkung oder Abschwächung führt.  $\theta_m$  ändert sich jedoch stetig in Abhängigkeit der vorherigen synaptischen Aktivität. Man spricht daher von Metaplastizität (Abraham und Bear, 1996). Die Metaplastizität könnte in Arg3.1 *knockout*-Mäusen gestört



sein. Spuren ehemaliger Stimulationen sind bei ihnen aufgrund der nicht existenten Langzeitphase von LTP ausgelöscht oder hinterlassen zumindest eine abweichende Signatur. Ihre Synapsen befinden sich daher stets in einem anderen Zustand als Wildtyp-Synapsen unter den gleichen Bedingungen. Dies könnte nach der BCM-Regel zu einer abweichenden Reizschwelle  $\theta_m$  und somit zu einer, wie in diesem Fall, erhöhten Potenzierung führen. Ein experimenteller Beweis für die Hypothese muss aber noch erbracht werden. Dafür könnten die synaptischen Antworten Arg3.1 defizienter Neurone auf niedrigere Frequenzintensitäten getestet werden, die in Wildtyp-Tieren eine transiente Potenzierung oder eine Depression der Synapse induzieren.

Unabhängig von diesen Spekulationen kann aber festgehalten werden, dass eine kurzzeitige LTP in den Mutanten ausgelöst werden kann und dass Arg3.1 daher nachweislich nicht an der Induktion der Langzeitpotenzierung beteiligt ist. Dagegen fällt die Verstärkung der synaptischen Übertragung während einer Phase ab, in der ihre Aufrechterhaltung von der Transkription abhängig ist. Dies zeigt die essentielle Rolle, die dabei der Synthese von Arg3.1 zukommt. Interessanterweise beeinträchtigt die Abwesenheit von Arg3.1 im NMDA-Rezeptor-Komplex nicht die synaptische Lokalisierung und Aktivierung des NMDA-Rezeptors. Dies belegen die Messungen der E-LTP und die immunhistochemischen bzw. biochemischen Resultate. Das bedeutet, dass kurz nach seiner Induktion ein Arg3.1 abhängiger Prozess in Gang gesetzt wird, der für die Ausbildung der lang anhaltenden LTP unbedingt erforderlich ist. Dessen Zeitpunkt fällt mit zwei zentralen Beobachtungen bei der Etablierung der L-LTP zusammen: der Abhängigkeit von der Proteinsynthese und dem Auftreten erster morphologischer Veränderungen an der Synapse. Eine Reihe von Studien zeigt, dass Inhibitoren der Proteinsynthese, wie Anisomycin, Emitin, Cycloheximid oder Puromycin die LTP ungefähr 30 bis 100 Minuten nach Stimulation negativ beeinflussen (Stanton und Sarvey, 1984; Deadwyler et al., 1987; Nguyen und Kandel, 1996; Osten et al., 1996). Einige Arbeiten, in denen ebenfalls der Inhibitor Anisomycin verwendet wurde, berichten einen Abfall der LTP zwar erst nach drei bis sechs Stunden (Krug et al., 1984; Frey et al., 1988; Otani und Abraham, 1989). Dabei könnte es sich aber um ein Artefakt handeln, da Anisomycin mehrere MAP Kinasen stimuliert (Hazzalin et al., 1998), die wiederum eine wichtige Rolle bei der Induktion der LTP spielen (English und Sweatt, 1997). So ist es denkbar, dass in diesen Studien die Abhängigkeit früherer LTP-Phasen von der Synthese neuer Proteine durch die von Anisomycin bewirkte Aktivierung der MAPK unterdrückt wird (Konietzko et al., 1999).

Die abfallende LTP in den Arg3.1 *knockouts* tritt zu einem Zeitpunkt auf, an dem in Wildtyp-Tieren morphologische Veränderungen (perforierte PSDs und *multiple spine boutons*) beobachtet werden können (Toni et al., 1999, 2001). Dies ist von besonderem Interesse in Hinblick auf eine mögliche Funktion von Arg3.1 an der Synapse. Die hier gezeigten Assoziationen mit PSD-95 und Shank, die entfernte Homologie von Arg3.1 zu  $\alpha$ -Spectrin sowie die Interaktion mit F-actin unterstützen die These, dass Arg3.1 eine Rolle bei dieser synaptischen Umstrukturierung spielen könnte. Dies ist zum jetzigen Zeitpunkt allerdings experimentell nicht bestätigt und bedarf zukünftiger Untersuchungen.

#### **4.2.3 Die Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses ist abhängig von Arg3.1**

Seit der Entdeckung der LTP als ein zelluläres Korrelat der synaptischen Plastizität wird deren kausaler Zusammenhang mit der Ausbildung von Gedächtnisinhalten diskutiert. Die „*Synaptic Plasticity and Memory*“ (SPM) Hypothese argumentiert für eine solche Beziehung (Martin et al., 2000) und basiert vor allem auf Erkenntnissen von genetisch manipulierten Mäusen (Wolfert et al., 1998; Dudai, 2002; Silva, 2003). Arg3.1 *knockout*-Mäuse stellen in zweierlei Hinsicht ein geeignetes Modell dar, um den Zusammenhang zwischen den aktivitätsbedingten Veränderungen auf molekularer bzw. zellulärer Ebene und dem Lernverhalten eines Tieres zu analysieren. Erstens fehlt Arg3.1 *knockout*-Mäusen die Langzeitkomponente von LTP. Daraus leitet sich die Frage ab, wie sich dies auf die Fähigkeiten der *knockout*-Tiere auswirkt, neue Informationen zu lernen und das Erlernte stabil abzuspeichern. Zweitens wird die Induktion von Arg3.1 in der Maus nicht nur durch LTP-spezifische Stimulation ausgelöst, sondern auch durch eine Reihe physiologischer Reize wie die Exploration neuer Umweltreize (neue Umgebung, neuer Geschmack, etc.) (Montag-Sallaz et al., 1999; Kelly und Deadwyler, 2002; Pinaud et al., 2001, 2002). In Bezug auf die physikalische Umgebung konnte sogar ein direkter Zusammenhang zwischen der Umwelt, in der sich das Tier bewegt, und der Arg3.1 Expression im Hippokampus gezeigt werden (Guzowski et al., 1999).

Um ein differenziertes Bild über die verhaltensbiologischen Auswirkungen der Arg3.1 Deletion in den *knockout*-Mäusen zu erhalten, wurden in der vorliegenden Arbeit das *Morris water maze* und die Furchtkonditionierung durchgeführt. Die Ergebnisse wurden durch eine von Dr. Hans Welzl durchgeführte CTA-Analyse ergänzt. Diese Lernexperimente zielen auf unterschiedliche Formen der Gedächtnisbildung ab. Das *Morris water maze* wurde für Ratten

und Mäuse entwickelt, um ihr räumliches „Referenzgedächtnis“ zu testen, von dem man annimmt, dass es mit dem deklarativen Gedächtnis von Menschen vergleichbar ist. Hippokampusläsionierte Mäuse bewältigen das *Morris water maze* ebenso wenig, wie konditionale NMDA-Rezeptor *knockout*-Mäuse, bei denen der Rezeptor ausschließlich in der CA1-Region deletiert wurde (Tsien et al., 1996b; Logue et al., 1997). Dies bestätigt zum einen die Funktion des Hippokampus bei der Prozessierung räumlicher Informationen, wahrscheinlich mit Hilfe der „*place cells*“, und zum anderen die zentrale Rolle, die dabei der NMDA-Rezeptor vermittelten neuronalen Aktivität zukommt.

Die *Arg3.1 knockout*-Mäuse verhielten sich im *Morris water maze* während der Akquisitionsphase unauffällig, scheiterten aber an der Ausbildung eines präzisen räumlichen Gedächtnisses. Dies äußerte sich in der Unfähigkeit der *knockout*-Mäuse, die exakte Plattformlokalisierung im Transfertest zu erinnern, obwohl sie sich vermehrt in dem trainierten Quadranten aufgehalten haben. Die detaillierte Analyse der einzelnen Schwimmstrategien deutet darauf hin, dass das schlechte Abschneiden auf einem selektiven Defizit in der Integration räumlicher Informationen beruht. Es wird angenommen, dass diese Integration hippokampusabhängig ist. Sie wird, in Bezug auf das räumliche Lernvermögen und in Anlehnung an den von O’Keefe und Nadel geprägten Begriff der „kognitiven Karte“ im Hippokampus (O’Keefe und Nadel, 1978), als die kognitive Komponente der Gedächtnisbildung im *Morris water maze* bezeichnet (Wolfer et al., 1998). Hinsichtlich der im Gegensatz dazu „nicht-räumlichen“ Verhaltensweisen Thigmotaxis, Kreisen oder *scannen*, die von Mäusen generell als anfängliche Reaktion auf das *Morris water maze* gezeigt werden, waren die *knockouts* den Wildtypen gleichwertig. Das sequentielle Abrufen dieser verschiedenen Strategien erfordert aber noch keine die räumliche Orientierung betreffenden Leistungen, sondern beruht auf der motorischen Flexibilität der Mäuse. Die Verbesserung während der Akquisition könnte also darauf zurück zu führen sein, dass auch *Arg3.1 knockout*-Tiere Strategien wie das Schwimmen in konzentrischen Kreisen anwenden, das relativ effizient ins Ziel führt. Für die Anwendung dieser Strategien ist es aber noch nicht erforderlich, dass das Tier die eigene Position innerhalb des Pools anhand entfernter Landmarken berechnet. Nach erfolgreichen Durchgängen bildeten die Wildtyp-Tiere ein orientierungsgestütztes Gedächtnis für den Zielort aus und steuerten ihn schließlich gezielt an. Dies ist ausschließlich über die Navigation anhand der Landmarken möglich. Wenn sie dieses Stadium erreichten, fielen sie nicht mehr auf die Anwendung „nicht-räumlicher“ Strategien zurück. Dies verhielt sich bei den *Arg3.1* defizienten Mäusen anders. Selbst im Anschluss an

eine „räumliche“ Strategie konnte man thigmotaktisches Verhalten beobachten. Das könnte darauf zurück zu führen sein, dass sie in der Abwesenheit von Arg3.1 im Hippokampus keine präzise kognitive Landkarte der physikalischen Umgebung bilden können. Der Befund, dass Defizite der Arg3.1 *knockout*-Tiere im *Morris water maze* durch eine Störung der höheren kognitiven Funktionen verursacht wurden und nicht durch allgemeine Störungen in der motorischen Flexibilität, verleiht ihnen eine besondere Stellung unter den bisher analysierten genetisch manipulierten Mäusen. Genauer gesagt repräsentieren sie eine Minderheit, die aus einem Vergleich von über 5000 Mäusen aus 69 genetisch unterschiedlichen Mauslinien hervorging, die trotz normaler Frequenzen bei den „nicht-räumlichen“ Strategien weniger „räumliche“ anwendete (Wolfer und Lipp, 2003). Exemplarisch für die nicht-räumlichen Defizite anderer Linien können die *knockout*-Tiere des BDNF Rezeptors *trkB* angeführt werden. Diese zeigten schwere Defizite während der Akquisition und des Transfertestes (Minichiello et al., 1999). Das lag aber daran, dass sie nicht über die Anwendung einer thigmotaktischen Verhaltensweise hinaus kamen. Sie bleiben also auf einer Strategie stehen, die noch nichts mit räumlicher Navigation und damit höherer kognitiver Leistung zu tun hatte. Grundsätzlich anders dagegen verhielten sich die Arg3.1 *knockout*-Mäuse im *Morris water maze*. Deren Defizite zeigten sich erst bei den „räumlichen“ Strategien und könnten auf die verminderte Präzision eines räumlichen Abbildes im Gehirn der Tiere zurückzuführen sein, die auf der fehlerhaften Ausbildung eines korrekten „*place cell*“ Musters beruhen könnte. Zukünftige Experimente sollen daher die Verteilung der „*place cells*“ im Hippokampus der *knockout*-Tiere untersuchen. Die genaue Rolle des Hippokampus bei den verschiedenen Stufen des räumlichen Lernens ist aber nicht geklärt (McNamara und Shelton, 2003) und so ist auch die Abhängigkeit der einzelnen im *Morris water maze* angewendeten Strategien von dieser Struktur unbekannt. Die Defizite der Arg3.1-*knockout*-Mäuse könnten also auch von anderen Hirnstrukturen, wie z. B. dem an der motorischen Steuerung beteiligten Nucleus caudatus, abhängen (Setlow und McGaugh, 1999).

Im *Morris water maze* wurden die Tiere über drei Tage hinweg in 18 Versuchsdurchgängen trainiert, wobei sie für jeden Durchgang erneut in das Bassin gesetzt wurden. Dadurch interferieren bereits gebildete Gedächtnisinhalte aus vorherigen Durchgängen mit dem aktiven Lernprozess, was eine strikte Trennung verschiedener Gedächtnisformen bei der Auswertung erschwert. Hier leistet die Furchtkonditionierung Abhilfe, da die Akquisition während eines in sich geschlossenen Trainings erfolgt, in dem das Tier in der Versuchsumgebung verweilt und das Gedächtnis zu einem späteren Zeitpunkt getestet wird. Dabei stellt die

Furchtkonditionierung eine einzigartige Versuchsanordnung dar, in der sowohl implizite als auch explizite Gedächtnisformen, deren anatomischen Korrelate klar definiert sind, gebildet werden. Das explizite Lernparadigma beruht, vergleichbar dem *Morris water maze*, auf dem räumlichen Gedächtnis. Dabei wird die physikalische Umgebung (Kontext) mit dem schmerzhaften Schock assoziiert. Man spricht von dem Kontext als einem „multimodalen“ Stimulus, da er verschiedene Faktoren beinhaltet (visuell, olfaktorisch, taktil, etc.). Während das Kurzzeitgedächtnis dieser kontextabhängigen Furchtkonditionierung ausschließlich in der Amygdala gebildet wird, ist das Langzeitgedächtnis von der Amygdala **und** dem Hippokampus abhängig (Kim et al., 1993). Wie beim *Morris water maze* ist also auch hier der Hippokampus an einer räumlichen Lernaufgabe beteiligt. Das komplett fehlende Langzeitgedächtnis der *knockout*-Mäuse für die Assoziation der Versuchskammer mit dem Schock verifiziert die zentrale Rolle, die Arg3.1 bei der Ausbildung von hippokampusabhängigen, expliziten Gedächtnisinhalten spielt.

Die implizite Gedächtniskomponente der Furchtkonditionierung liegt in der Assoziation zwischen dem ursprünglich neutralen Ton mit dem Fußschock, was zu einer konditionierten Furchtreaktion auf den Ton führt. Man spricht in diesem Zusammenhang von dem Ton als einem „unimodalen“ Stimulus. Die Assoziation stellt eine klassische Pavlovsche Konditionierung dar, die ausschließlich amygdalaabhängig und damit hippokampusunabhängig ist (Fanselow und LeDoux, 1999). So konnte gezeigt werden, dass die Stimulusweiterleitungen von dem auditorischen Reiz und dem schmerzinduzierenden Elektroschock in der dorsalen Amygdala konvergieren (Romanski et al., 1993). Wie die immunhistochemischen Färbungen an Mäusegehirnen nach generalisierter neuronaler Aktivität zeigen, wird Arg3.1 in der dorsalen Amygdala exprimiert. Dass es dort und bei der tonabhängigen Furchtkonditionierung tatsächlich eine Rolle spielt, wurde durch das völlige Fehlen des Langzeitgedächtnisses der *knockout*-Mäuse in dieser Aufgabe belegt. Dem gegenüber stand eine normale Lernkurve in der Akquisition, die andeutet, dass eine Assoziation für die Zeit des Intervalls von rund zwei Minuten zwischen den CS/US Paarungen unabhängig von Arg3.1 gebildet werden kann. Die Konsolidierung dieser Assoziation in ein stabiles Langzeitgedächtnis findet aber in den *knockout*-Mäusen nicht statt. Arg3.1 ist demnach auch an der Ausbildung stabiler impliziter, hippokampusunabhängiger Gedächtnisformen beteiligt.

Eine solche Beteiligung von Arg3.1 an impliziten Gedächtnisinhalten wurde in der CTA (*conditioned taste aversion*) bestätigt, einem Lerntest, bei der die Aufnahme eines

ursprünglich neutralen Nahrungsmittels mit einer Übelkeit auslösenden Injektion gepaart wird. Dieses Experiment wurde von Dr. Hans Welzl an der Universität Zürich, Schweiz, mit den Arg3.1 *knockout*-Mäusen durchgeführt. Er injizierte den Tieren eine Stunde nach Aufnahme einer Saccharinlösung Lithiumchlorid, das eine allgemeine Malaise bewirkte. Normalerweise assoziieren Mäuse die giftige Wirkung unmittelbar mit dem Geschmack und meiden bereits nach einmaliger Erfahrung das Saccharin komplett. Diese Fähigkeit, einen Geruch bzw. Geschmack als sicher oder gefährlich einzustufen, ist von lebenswichtiger Bedeutung für Tier und Mensch. Daher formt sich das Gedächtnis für den Geschmack besonders schnell (nach einem Durchgang) und ist darüber hinaus äußerst stabil (mehrere Jahre) (Welzl et al., 2001). Dies schlägt sich auch in einer sehr langsamen Extinktion des Geschmacksgedächtnisses nieder, es wird also kaum wieder ausgelöscht. Die Arg3.1 *knockout*-Tiere bildeten dagegen nur ein sehr schwaches Langzeitgedächtnis aus, das sich als äußerst instabil erwies. Bereits 24 Stunden nach der Lithiumchloridinjektion konsumierten sie bei der Wahl zwischen Wasser und Saccharin zu 50 % Saccharin. Weitere 48 bzw. 72 Stunden später war bei erneuten Tests annähernd 90% der gesamten Flüssigkeitsaufnahme Saccharin. Das entspricht den Werten von Kontrolltieren, die nie mit Lithiumchlorid injiziert wurden. Dieser Verlauf zeigt, dass bei den *knockouts* nach 24 Stunden eine sehr schwache Gedächtnisspur vorhanden ist, die innerhalb von vier Tagen durch erneute Konfrontation mit Saccharin komplett ausgelöscht wurde. Die CTA stellt damit zusammen mit der kontextabhängigen Furchtkonditionierung die drastischsten Beispiele für das fehlende Langzeitgedächtnis von Arg3.1 *knockout*-Mäusen dar.

Zusammenfassend konnte in den verhaltensbiologischen Experimenten gezeigt werden, dass Arg3.1 *knockout*-Mäuse sowohl in hippokampusabhängigen, expliziten als auch in hippokampusunabhängigen, impliziten Lerntests signifikant schlechtere Ergebnisse erzielen. In zahlreichen Kontrollversuchen konnte gezeigt werden, dass die beobachteten Effekte auf Defizite in höheren kognitiven Prozessen und nicht auf mutationsabhängige Beeinträchtigungen, z. B. der Motorik, Emotion oder Sinnesphysiologie, zurückzuführen sind. Interessanterweise bedienen sich alle Gedächtnisleistungen, in denen die *knockout*-Tiere Defizite aufzeigten, den gleichen molekularen Signalketten. In den jeweiligen Hirnregionen, also dem Hippokampus (*Morris water maze*, kontextabhängige Furchtkonditionierung), der Amygdala (tonabhängige Furchtkonditionierung) oder dem Inselkortex (CTA), setzt das erfolgreiche Bestehen der angewandten Tests die Funktionalität des NMDA-Rezeptors voraus, der die Aktivierung der MAPK Signalkaskade bewirkt (Rosenblum et al., 1997;

Atkins et al., 1998; Berman et al., 1998; Blum et al., 1999). Dieser molekulare Fingerabdruck ist nicht nur identisch mit der Induktion von LTP, er liegt auch der Arg3.1 Expression zugrunde (Waltereit et al., 2001). Arg3.1 könnte demnach eine zentrale Rolle in diesen Signalkaskaden spielen.

Hier schließt sich der Kreis zu den Ergebnissen der molekularbiologischen Analyse über die Arg3.1 Verteilung. Diese zeigten, dass Arg3.1 von einer NMDA-Rezeptor aktivierten, molekularen Signalkaskade induziert und anschließend in diese integriert wird. Diese Kaskade liegt sowohl der Ausbildung lang anhaltender LTP als auch der Konsolidierung verschiedener Gedächtnisspuren zugrunde. Das Entfernen von Arg3.1 aus diesem Netzwerk hat schwerwiegende Folgen auf zellulärer und verhaltensbiologischer Ebene. Diese Befunde sind ein weiterer Beleg für die wichtige Rolle des NMDA-Rezeptor-Komplexes bei den Prozessen der synaptischen Plastizität und Gedächtnisbildung und weisen darauf hin, dass Arg3.1 dabei eine zentrale Position in dem Komplex einnimmt. Die Ergebnisse der Arg3.1 *knockout*-Mäuse unterstützen die SPM Hypothese, nach der die synaptische Plastizität die Grundlage für Lernen und Gedächtnis bildet. Neben einer fehlenden stabilen LTP steht die Unfähigkeit zur Bildung eines Langzeitgedächtnisses in den hier angewendeten Tests. Diese basieren zwar auf der Integrität unterschiedlicher Hirnregionen, es ist aber denkbar, dass sich die Defizite in der NMDA-Rezeptor abhängigen LTP auch auf andere, z. B. kortikale Areale übertragen lassen. Ein linearer Zusammenhang zwischen LTP auf der einen Seite und Lernen und Gedächtnis auf der anderen, wie er hier abgeleitet werden könnte, muss trotzdem ausgeschlossen werden. So zeigen beispielsweise PSD-95 *knockout*-Mäuse eine dauerhaft erhöhte LTP, können aber keine stabilen Gedächtnisformen im *Morris water maze* bilden (Migaud et al., 1998). Dies bestätigt die Annahme, dass die Gedächtnisbildung in einem neuronalen Netzwerk und nicht in einzelnen Zellen stattfindet (Martin et al., 2000). LTP könnte zwar der Speicherung einzelner Informationsspuren zugrunde liegen, aber die Gewichtung der Informationen und ihre Assoziationen werden im Netzwerk und nicht von isolierten Synapsen geregelt. Die synaptische Plastizität ist demnach ein Teil dieses Netzwerkes. Ferner muss beachtet werden, dass falls synaptische Plastizität an der Gedächtnisprozessierung beteiligt ist, sie diese über distinkte Aktivitätsmuster kodiert (Buzsáki, 1989). Ein Abweichen der synaptischen Übertragungsstärke würde diese Musterbildung beeinflussen, unabhängig davon ob eine Potenzierung oder Depression an der Synapse stattfindet.

#### 4.2.4 Ein Vergleich mit anderen *knockout*-Linien

Arg3.1 interagiert an der postsynaptischen Membran mit dem NMDA-Rezeptor, PSD-95, SynGAP und Shank. Bis auf Shank wurden bereits *knockout*-Mäuse für diese Gene publiziert. Besonders für die Untereinheiten der NMDA-Rezeptoren wurden diverse genetisch manipulierte Linien hergestellt, die alle die Voraussetzung des NMDA-Rezeptors für die Induktion von LTP und die Etablierung sowohl des Kurzzeit- als auch des Langzeitgedächtnisses verdeutlichen (Sakimura et al., 1995; Tsien et al., 1996b; Sprengel et al., 1998; Tang et al., 1999; Shimizu et al., 2000). Von besonderem Interesse im Vergleich zu den Arg3.1 *knockouts* sind die LTP-Studien im Hippokampus und das räumliche Lernverhalten. Ein CA1-spezifischer *knockout* für NR1, der zum kompletten Funktionsverlust des Rezeptors in dieser Region führt, bildet weder E-LTP noch L-LTP in der CA1-Region aus und hat Defizite bei der Akquisition und dem Transfertest im *Morris water maze* (Tsien et al., 1996b; McHugh et al., 1996). Der Phänotyp von funktionellen PSD-95 *knockout*-Mäusen zeigt in Ansätzen Ähnlichkeiten zu den Arg3.1 Mutanten. In diesen Mäusen ist die LTP ebenfalls signifikant erhöht, allerdings fällt sie nicht nach kurzer Zeit wieder ab, sondern bleibt für mehrere Tage stabil über den Werten der Kontrolltiere (Migaud et al., 1998; Mick Errington, persönliche Mitteilung). Im *Morris water maze* schneiden diese Tiere schon bei der Akquisition schlechter ab als ihre *littermates* und zeigen während des Transfertests überhaupt keine Präferenz für die trainierte Plattformlokalisierung. Diese Defizite könnten aber unter Umständen auf eine erhöhte *circling*-Rate bei der Strategiewahl zurückzuführen sein (Migaud et al., 1998). Zur Erinnerung, in den PSD-95 *knockouts* ist Arg3.1 nicht mehr mit dem NMDA-Rezeptor assoziiert. Trotzdem zeigen sie im Vergleich zu den Arg3.1 *knockouts* einen substantiell unterschiedlichen LTP-Verlauf, der nur während der E-LTP Phase ähnlich ist. Ausgehend von der Annahme, dass PSD-95 stromaufwärts von Arg3.1 liegt, könnte der PSD-95<sup>-/-</sup> Phänotyp die Auswirkungen der unterbrochenen Arg3.1 – NMDA-Rezeptor Assoziation überdecken. Andererseits ist die fehlende L-LTP in den Arg3.1 Mutanten unabhängig von PSD-95. Demnach ist die Funktion von Arg3.1 bei der Ausbildung stabiler Veränderungen der synaptischen Übertragungsstärke nicht ausschließlich über seine Assoziation mit dem NMDA-Rezeptor definiert, sondern auch über weitere Interaktionen an der Synapse, möglicherweise mit Shank. Wie in Kapitel 4.3 ausgeführt wird, könnte sich eine solche Funktion aber auch im Zellkern manifestieren, wo Arg3.1 im Anschluss an neuronale Aktivität ebenfalls lokalisiert ist. Homozygote SynGAP *knockout*-Mäuse sind nicht lebensfähig. Heterozygote Tiere sind dagegen vital und zeigen eine gesteigerte Grundaktivität



der MAP Kinase ERK2, die nach NMDA-Rezeptor abhängiger Stimulation noch weiter erhöht wird. Die LTP ist in diesen Mäusen allerdings reduziert (Komiyama et al., 2002), was der Hypothese widerspricht, nach der die Aktivierung der MAPK die synaptische Potenzierung unterstützt (English und Sweatt, 1997; Impey et al., 1996; Winder et al., 1999; Watabe et al., 2000). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass SynGAP noch weitere Signaltransduktionswege außer der MAPK beeinflusst, die bei der Ausbildung synaptischer Plastizität eine Rolle spielen (Komiyama et al., 2002). SynGAP heterozygote *knockout*-Tiere sind weiterhin unauffällig in der *Morris water maze* Akquisition und zeigen milde Defizite im Transfertest. SynGAP<sup>+/-</sup>/PSD-95<sup>-/-</sup> Doppelmutanten zeigen den gleichen elektrophysiologischen Phänotyp wie PSD-95<sup>-/-</sup> Mäuse, was die Annahme bestätigt, dass SynGAP in demselben funktionellen Signaltransduktionsweg stromabwärts von PSD-95 liegt (Komiyama et al., 2002). Die Vergleiche der verschiedenen Mausmodelle mit den biochemischen Daten dieser Arbeit führen zu einem Interaktionsschema an der postsynaptischen Membran, wie es in Abbildung 4.1 vereinfacht dargestellt ist.

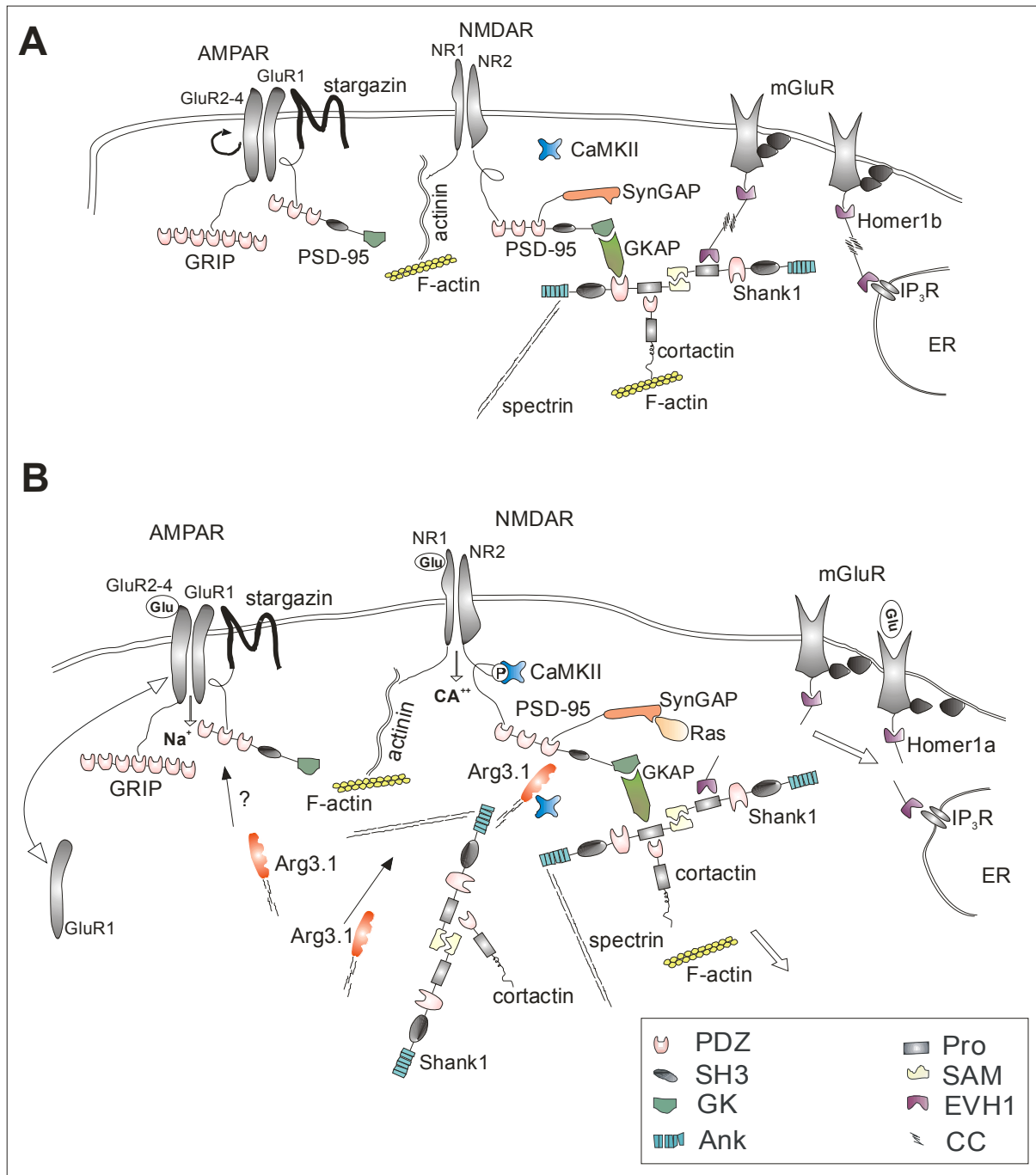
### 4.3            **Auswirkungen der Arg3.1 Deletion auf die Genexpression**

Ein zentraler Aspekt bei der funktionellen Charakterisierung der Arg3.1 *knockout*-Mäuse war das Vorhaben, die Auswirkungen der Gendeletion aus verschiedenen Blickrichtungen zu analysieren. Dazu gehörte auch die Analyse der Veränderungen, die sich auf Ebene der Genexpression ergeben. Dabei fand die DNA-*microarray*-Technik Verwendung, die die Expressionsanalyse des Transkriptoms, also aller Transkripte eines einzelnen Organismus, erlaubt und die mittlerweile häufig als Analyseverfahren angewendet wird. Diese Technik eignet sich in besonderem Maße für den Übergang von den „*structural*“ zu den „*functional genomics*“, d. h. von der Sequenzierung ganzer Genome zu ihrer funktionellen Analyse. Der große Vorteil liegt hier auf der genomweiten Analyse, die eine völlig unvoreingenommene Herangehensweise an die mutationsbedingten Veränderungen auf Genexpressionsebene erlaubt. Die Sequenzierung des Mausgenoms wurde im Jahr 2002 von einem internationalen Konsortium abgeschlossen, das von einer Gesamtzahl von rund 40 000 Transkripten ausgeht (Okazaki et al., 2002). Der in dieser Studie verwendete *microarray*-Genchip der Firma Affymetrix umfasst Sequenzabschnitte von 6000 bekannten Genen der Maus-*UniGene* Datenbank sowie weiterer 6000 ESTs unbekannter Herkunft. Der Fokus der Genchip-Analyse lag vornehmlich auf Transkripten, die im Anschluss an neuronale Aktivität im Vergleich zwischen Wildtyp- und *knockout*-Mäusen unterschiedlich reguliert werden. Daher wurden die

mRNA Pools der beiden Genotypen unter stimulierten Bedingungen auf dem *microarray*-Genchip hybridisiert und ausgewertet. Die Annahme, dass die Deletion von Arg3.1 zu einer differentiellen Regulation der Expression anderer Gene führen könnte, basiert auf zwei Beobachtungen:

- 1) Arg3.1 ist im Zellkern lokalisiert und elektronenmikroskopisch aufgenommene Bilder von Immunogold gefärbten Zellen zeigen eine Assoziation mit dem Chromatin. Diese Verteilung deutet auf eine Rolle von Arg3.1 im Zellkern, möglicherweise bei der Transkription, hin.
- 2) Arg3.1 ist mit dem NMDA-Rezeptor assoziiert, dessen Aktivität die Grundvoraussetzung der Transkriptionsinduktion nach plastizitätsproduzierender Stimulation ist. Arg3.1 *knockout*-Mäusen wiederum fehlt die späte Phase der LTP, was Auswirkungen auf die aktivitätsabhängige Expression anderer Gene haben könnte.

Der Vergleich der *microarray*-Daten zwischen Wildtyp- und Arg3.1 *knockout*-Mäusen vier Stunden nach generalisierter neuronaler Aktivität ergab 15 differentiell transkribierte Gene. Ein rtPCR Kontrollexperiment konnte zwei davon verifizieren, nämlich c-fos und SOCS3. Die hohe Anzahl falsch positiver Ergebnisse ist einer der größten Nachteile der Genchiptechnologie, der es erfordert, dass *microarray*-Experimente wiederholt durchgeführt, Ergebnisse reproduziert und mit konventionellen Methoden überprüft werden müssen. Es handelt sich hier also nur um einen ersten, vorläufigen Versuchsdurchlauf, der keinen Anspruch auf Vollständigkeit erheben kann. Trotzdem produzierte er Ergebnisse, die darauf hinweisen, dass sich die Deletion des Arg3.1 Gens auf die Transkription nachgeschalteter Gene auswirkt. So stellen die als differentiell reguliert identifizierten Gene c-fos und SOCS3 überaus interessante Kandidaten im Zusammenhang mit der Funktionsanalyse von Arg3.1 dar. Dies soll im Folgenden näher diskutiert werden.



**Abbildung 4.1: Model einer möglichen Beteiligung von Arg3.1 an der molekularen Umstrukturierung der PSD nach synaptischer Aktivität**

(A) Vereinfachte Darstellung der Interaktionen ausgewählter Proteine in der PSD unter Kontrollbedingungen. Soweit bekannt wurden die Proteininteraktionsdomänen berücksichtigt (s. Symbolerklärung im Kasten unten rechts). Die verschiedenen Typen von Glutamaterezeptoren sind über Strukturmoleküle mit dem Zytoskelett aber auch untereinander verknüpft. Der membranassoziierte Anteil der GluR2 und 3 Untereinheiten unterliegt einem ständigen Austausch (runder Pfeil). Die einzelnen Interaktionen sind im Text näher beschrieben. (B) Umstrukturierung des Proteinnetzwerkes im Anschluss an synaptische Aktivität. Arg3.1 wird in die PSD transportiert →

#### 4.3.1 SOCS3 wird im Gehirn von Arg3.1 *knockout*-Mäusen nicht induziert

SOCS3 gehört zur Familie der SOCS Gene, deren Proteine als Inhibitoren von Signaltransduktionswegen wirken, die von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Hormonen (im Folgenden als Zytokine zusammengefasst) aktiviert werden (Krebs und Hilton, 2001). Zytokine werden sezerniert und wirken als Effektoren der endokrinen, autokrinen und parakrinen Kommunikation von Zellen. Sie steuern dabei eine Vielzahl an zellulären Prozessen, u. a. auch im Gehirn, wo sie an Neurogenese, Zelldifferenzierung, dendritischem Wachstum, Inflammation oder Neuroimmunantworten beteiligt sind, um nur einige Beispiele zu nennen (Wang und Campbell, 2002). Ein gut untersuchter Signaltransduktionsweg, den Zytokine über die Bindung an ihre membranständigen Rezeptoren beeinflussen, führt zur Aktivierung der rezeptorassoziierten Kinasen JAK, die ihrerseits den Rezeptor phosphorylieren und so Bindungsstellen für Mitglieder der STAT Familie schaffen. STATs sind Transkriptionsfaktoren, die nach ihrer Bindung an den Zytokin-Rezeptor durch JAKs phosphoryliert werden, was ihre Dimerisierung und anschließenden Nukleustransport bewirkt. Im Nukleus aktivieren sie dann die Transkription ihrer Zielgene, u. a. auch Gene der SOCS Familie. Dies stellt einen klassischen negativen Feedbackmechanismus dar, denn die SOCS Proteine greifen inhibitorisch in die JAK/STAT Signalkaskade ein. So bindet SOCS3, dessen Expression hauptsächlich von STAT3 vermittelt wird, an die phosphorylierte STAT-Bindungsstelle am Zytokinrezeptor und verhindert so die Aktivierung u. a. von STAT3 und 5 (Abb. 4.2; Krebs und Hilton, 2001). Die Ergebnisse der Transkriptionsanalyse von SOCS3 in Arg3.1 *knockout*-Mäusen ist in zweierlei Hinsicht bemerkenswert:

- 1) Die Anzahl der SOCS3 mRNA Transkripte ist im Gehirn nach neuronaler Stimulation erhöht.

---

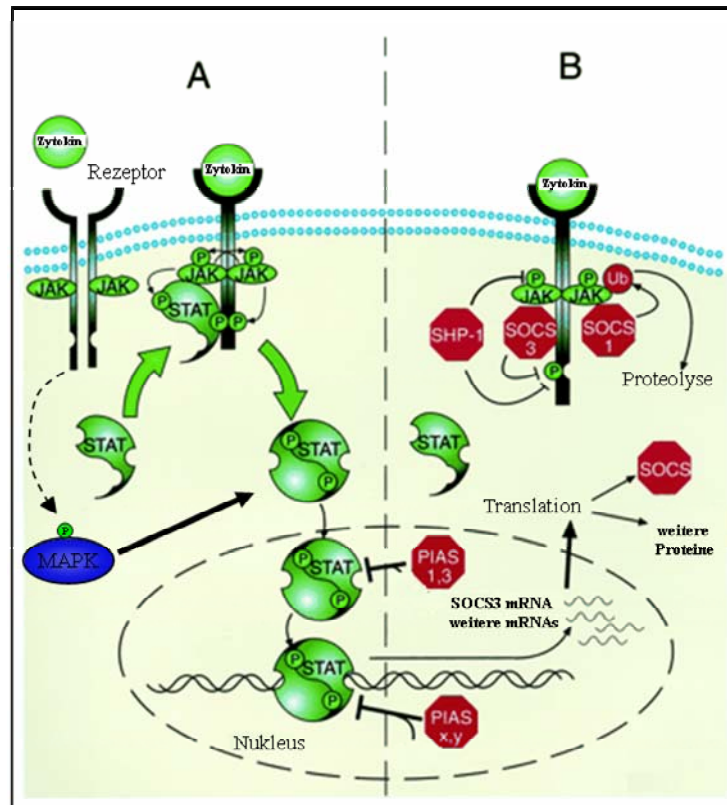
(dünne Pfeile), wo es über PSD-95 mit dem NMDA-Rezeptor interagiert, an F-actin bindet und mit Shank assoziiert ist. Dies eröffnet neue Verknüpfungsmöglichkeiten für den Rezeptor mit zytoskelettalen Proteinen. Die Bindung an CaMKII könnte ferner eine Verankerung der Kinase im Rezeptorkomplex bewirken. Gleichzeitig wird die Assoziation von Shank mit den mGluR durch Homer1a unterbrochen und die Interaktion mit F-actin gelöst. So könnte es zu einer Verschiebung des PSD-Gerüsts kommen (offene Pfeile). Des Weiteren besteht über PSD-95 und Stargazin eine mögliche Assoziation von Arg3.1 mit AMPA-Rezeptoren, deren Untereinheiten 1 und 4 nach synaptischer Aktivität vermehrt in die Membran endo- bzw. exozytiert werden (geschwungener Pfeil). Glu, Glutamat; PDZ, PSD-95/disc-large/ZO-1; SH<sub>3</sub>, Src *homology* 3; GK, Guanylatkinase; Ank, Ankyrindomäne; Pro, Proline-reiche Domäne; SAM, *sterile alpha motif* Domäne; EVH1, Ena/VASP Homologiedomäne; CC, *coiled-coiled* Domäne; ER, endoplasmatisches Retikulum.

2) Diese Anhäufung der SOCS3 mRNA kann in Arg3.1 *knockout*-Tieren nicht beobachtet werden.

zu 1) Zahlreiche Arbeiten, die sich vor allem auf hämatopoetische oder immunologische Zellsysteme konzentrieren, zeigen, dass die Expression von SOCS3 durch Zytokine induziert werden kann, es sich also um ein stark reguliertes Gen handelt (s. Krebs und Hilton, 2001 als Review). Es lässt sich dabei keine genaue Zuordnung von einzelnen Zytokinen auf die SOCS3 Transkription herstellen, da der jeweilige Effekt zelltypabhängig ist. So wird SOCS3 im Gehirn von Säugetieren im Hypothalamus, der Hypophyse sowie in periventriculären Bereichen durch Leptin, IL-1, IL-6, LIF oder den Wachstumsfaktor CNTF induziert (Wang und Campbell, 2002). Zeitgleich mit den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit wurde eine Studie über die Induktion von SOCS3 im Hippokampus nach generalisierter neuronaler Aktivität veröffentlicht (Rosell et al., 2003). Darin wurden Lithium-Pilocarpin-induzierte epileptische Anfälle bei Ratten angewendet. Die Ergebnisse decken sich weitgehend mit den hier gezeigten, allerdings wurde die Induktion in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung von Kainat wesentlich früher beobachtet. Im Stratum lacunosum moleculare zeigte sich bereits nach einer Stunde eine Hochregulierung von SOCS3 und weitere drei Stunden später konnte eine starke Induktion auch in den Körnerzellen und im Hilus des Gyrus dentatus, sowie etwas schwächer in den Pyramidalzellen der CA1-3 Region, detektiert werden. Das Stratum lacunosum moleculare gehört zur CA1-Region und beinhaltet hauptsächlich die Zellkörper inhibitorischer Interneurone (Amaral and Witter, 1989). Im Hilus befinden sich inhibitorische und exzitatorische Interneurone. Rosell und Mitarbeiter beschreiben ein wesentlich späteres Einsetzen der Induktion. Sie beobachteten eine Signalverstärkung der SOCS3 mRNA im Stratum lacunosum moleculare und im Hilus erst zehn bis zwölf Stunden nach Einsetzen des Anfalls und weitere zwölf Stunden später in den Körnerzellen des Hippokampus. Dieser Effekt der zeitlichen Verschiebung in den beiden Arbeiten könnte auf die unterschiedlichen Stimulationsprotokolle zurückzuführen sein. SOCS3 wurde aber in beiden Studien zuerst in den Nicht-Prinzipalzellen des Hippokampus, also den Interneuronen der CA1-Region und des Gyrus dentatus, und eventuell auch Gliazellen, und anschließend in den Prinzipalzellen, also den Körnerzellen und Pyramidenzellen, exprimiert. Eine Sequenzanalyse der ca. 1500 Nukleotide umfassenden Promotorregion von SOCS3 stromaufwärts des Transkriptionsstarts (*GenBank* Nr. AF314501) zeigt, dass neben den bereits identifizierten Konsensus-Sequenzen für STAT3

und AP-1 (Auernhammer et al., 1999) noch weitere Bindungsstellen für CREB, SP-1 und zif268 vorliegen. Somit könnte die SOCS3 Expression von verschiedenen Transkriptionsfaktoren gesteuert werden, die entweder zeitlich oder zelltypspezifisch reguliert werden. Das bedeutet, dass Nicht-Prinzipalzellen und Prinzipalzellen entweder auf den gleichen Stimulus mit einer unterschiedlichen intrinsischen Expressionskinetik antworten oder mit unterschiedlichen extrinsischen Stimuli, wie etwa verschiedenen Zytokinen, konfrontiert werden. So könnte SOCS3 in den Prinzipalzellen ein *late-response gene* darstellen, das erst durch die IEGs c-fos oder zif268 oder eine verzögerte Aktivierung von STAT3 induziert wird. Andererseits ist es in den Nicht-Prinzipalzellen oder Gliazellen nicht auszuschließen, dass die SOCS3 Induktion eine zytokinvermittelte, inflammatorische Antwort auf den Anfall darstellt. Für genaue Aussagen über den temporalen Verlauf der SOCS3 Expression müssen aber die zelltypspezifischen Auswirkungen verschiedener Zytokine in Folge neuronaler Aktivität erst noch eingehender charakterisiert werden.

zu 2) In den Arg3.1 *knockout*-Tieren konnte weder eine noch vier Stunden nach dem Einsetzen generalisierter neuronaler Aktivität eine Induktion der SOCS3 Expression festgestellt werden. Die Basalexpression von SOCS3 ist aber nicht gestört, was auf eine Rolle von Arg3.1 speziell bei der aktivitätsvermittelten Induktion hindeutet. Diese beruht wiederum auf der Aktivierung von JAK/STAT. Eine Funktion für Arg3.1 in diesem Signalpfad wurde bisher noch nicht gezeigt. In dieser Arbeit wurde aber bereits die Einbindung von Arg3.1 in den NMDA-Rezeptor-Komplex nachgewiesen, der an der Aktivierung des MAPK-Signaltransduktionsweges beteiligt ist und Einfluss auf zytokinvermittelte Antworten nehmen kann. Ferner könnte die veränderte SOCS3 Expression aber auch auf eine transkriptionsaktivierende Funktion des nukleär lokalisierten Arg3.1 Proteins zurückzuführen sein. Gegen einen solchen direkten Einfluss spricht aber, dass unser Labor noch keine Arg3.1 Expression in den Nicht-Prinzipalzellen oder Gliazellen des Hippokampus beobachtet hat, in denen ebenfalls eine Beeinträchtigung der SOCS3 Induktion stattfindet. Dies lässt eher auf einen interzellulären Effekt schließen, der sich möglicherweise aus den gestörten synaptischen Übertragungseigenschaften nach plastizitätsinduzierender Stimulation ergibt. Die Ergebnisse beruhen aber bisher auf einer generalisierten neuronalen Stimulation. Die Expression von SOCS3 nach gezielter synaptischer Stimulation muss noch analysiert werden. In jedem Fall stellt der Arg3.1 *knockout* aber einen aktivitätsabhängigen SOCS3 *knockout* dar. Zukünftige Experimente müssen nun einerseits zeigen, welche Auswirkungen dieser Effekt auf die Aktivität der Proteine hat, die von SOCS3 inhibiert werden. Dies sind neben STAT3 und



**Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des JAK/STAT Signaltransduktionsweges und seines negativen Rückkopplungsmechanismus**

(A) Die Bindung eines Zytokins an den spezifischen Rezeptor in der Zellmembran führt zur Dimerisierung des Rezeptors und Aktivierung der damit assoziierten JAKs, die sich gegenseitig autophosphorylieren. Die dadurch aktivierten JAKs phosphorylieren den Rezeptor und schaffen so Bindungsstellen u. a. für die STATs, die nach ihrer Kopplung an den Rezeptor ebenfalls von JAK phosphoryliert werden. Die STAT Moleküle dimerisieren daraufhin und werden in den Nukleus transportiert, wo sie die Transkription von nachgeschalteten Genen, z. B. von SOCS3, induzieren. Diese Induktion von SOCS3 findet auch nach neuronaler Aktivität statt, allerdings nur in der Anwesenheit von Arg3.1. STAT Proteine werden zusätzlich von der MAP Kinase phosphoryliert, die wiederum durch eine Vielzahl an Stimuli, darunter auch durch die Aktivierung von Zytokinrezeptoren aktiviert wird. (B) Die JAK/STAT Signalkaskade wird durch diverse Inhibitoren gehemmt, darunter die Proteine der PIAS-, SHP- und SOCS-Genfamilien. SOCS3 blockiert die STAT-Bindungsstelle am Zytokinrezeptor und unterbindet dadurch die Aktivierung des eigenen Transkriptionsfaktors. Die SOCS Proteine vermitteln ebenfalls die Bindung ihrer Interaktionspartner an Polyubiquitinligasen und damit deren Proteolyse durch das Proteasom. (Verändert nach Turnley und Bartlett, 2000; Wormald und Hilton, 2004.)

STAT5 auch andere Zielmoleküle (z. B. die *focal adhesion kinase* FAK), die in jüngeren Studien identifiziert wurden (Soriano et al., 2002; Haan et al., 2003; Liu et al., 2003). Dass die fehlende Inhibition von SOCS3 allerdings eine erhöhte Aktivität der JAK/STAT

Signalkaskade bewirkt, ist nicht zwangsläufig, da noch weitere inhibitorische Mechanismen, beispielsweise über PIAS oder SHP, existieren (Wormald und Hilton, 2004). Des Weiteren stellt sich die Frage, inwieweit die fehlende SOCS3 Expression den Phänotyp der Arg3.1 *knockout*-Mäuse beeinflusst. Eine mögliche Antwort könnten Experimente geben, in denen SOCS3 als Transgen in das Genom Arg3.1 defizienter Mäuse eingebracht wird. Dieses Transgen würde sich unter dem Promotor von Arg3.1 befinden, so dass eine aktivitätsabhängige Expression gewährleistet bleibt. Elektrophysiologische und verhaltensbiologische Studien an solchen Tieren könnten dann zeigen, ob die Auswirkungen der Arg3.1 Deletion teilweise oder vollständig komplementiert werden können.

#### **4.3.2 C-fos wird im Arg3.1 *knockout* differentiell reguliert**

C-fos gehört wie Arg3.1 zu den IEGs, d. h. es wird unmittelbar nach neuronaler Aktivität induziert. Im Gegensatz zu Arg3.1 handelt es sich aber nicht um ein Effektorgen, das direkt an der Synapse lokalisiert ist, sondern um einen Transkriptionsfaktor. Zusammen mit FosB und den *Fos-related antigens* 1 und 2 (Fra-1 und Fra-2) gehört c-fos zur Familie der Fos-Proteine, die in heterodimeren Komplexen mit Jun-Proteinen den Transkriptionsfaktor aktivierenden Proteinkomplex AP-1 bilden, der über die Bindung an die AP-1 Erkennungssequenz die Expression zahlreicher Gene steuert (Muller et al., 1983; Chiu et al., 1988; Halazonetis et al., 1988; Karin et al., 1997). C-fos bewirkt im Anschluss an seine eigene Induktion die Aktivierung nachgeschalteter Gene, der *late-response genes*, deren Transkription im Gegensatz zu den IEGs translationsabhängig ist. Es vermittelt also die transkriptionelle Antwort, die nach neuronaler Aktivität in den Nervenzellen aktiviert wird (Lanahan und Worley, 1998). Die Induzierbarkeit der c-fos Expression nach neuronaler Aktivität wurde erstmals im Anschluss an einen generalisierten Krampf gezeigt (Morgan et al., 1987). Dass c-fos eine Rolle bei der syntaptischen Plastizität spielen könnte, zeigte sich in Untersuchungen zur Induktion des Gens nach LTP-produzierender Stimulation. Darin konnte c-fos zwar durch starke LTP-Stimulation induziert werden, weniger intensive Induktionsprotokolle, die immer noch eine stabile LTP hervorrufen, führten aber nicht zu einem Anstieg der c-fos Transkripte. Zumindest die Induktion der LTP ist also unabhängig von c-fos (Dragunow et al., 1989). Arg3.1 unterscheidet sich damit in einem weiteren Punkt von c-fos, da seine Expression strikt an die Induktion von LTP gekoppelt ist (Waltereit et al., 2001). Ähnlich wie Arg3.1 wird aber auch c-fos durch eine Reihe physiologischer Stimuli angeschaltet, beispielsweise im Zusammenhang mit Verhaltensexperimenten, wie dem *Morris*



*water maze*, der Furchtkonditionierung oder der CTA (Tischmeyer und Grimm, 1999). Bei der differentiellen Regulation von *c-fos* in *Arg3.1* defizienten Mäusen unter Stimulationsbedingungen sind drei Punkte auffällig:

- 1) Eine erhöhte Anzahl an *c-fos* mRNA Transkripten kann in Wildtyp-Tieren auch vier Stunden nach neuronaler Aktivität detektiert werden.
- 2) In den *Arg3.1 knockout*-Mäusen findet eine *c-fos* Induktion 30 Minuten bzw. eine Stunde nach dem Einsetzen generalisierter neuronaler Aktivität statt.
- 3) Diese Induktion kann in *Arg3.1 knockout*-Mäusen vier Stunden nach dem Einsetzen der neuronalen Induktion nicht mehr detektiert werden.

zu 1) In der ersten Arbeit über das aktivitätsabhängige neuronale Expressionsmuster von *c-fos* von Tom Curran und seinen Mitarbeitern wurde eine unmittelbare Induktion nach einem pharmakologisch induzierten Anfall beschrieben, die bereits nach drei Stunden zur Basalexpression zurückkehrt (Morgan et al., 1987). Dabei handelte es sich aber um einen metrazolinduzierten Krampf, im hier durchgeführten Experiment wurde Kainat verwendet. Kainat und Metrazol wirken grundsätzlich verschieden: Kainat ist ein Agonist für die exzitatorischen glutamatergen Kainat-Rezeptoren, die hauptsächlich in den exzitatorischen Pyramidenzellen der hippocampalen CA3-Region exprimiert werden, und bewirkt epileptiforme Aktivitäten durch die exzessive Stimulation der CA3-Region, die aufgrund der schleifenförmigen Projektionen in dieser Region noch verstärkt wird (Ben-Ari und Cossart, 2000). Die resultierenden Anfälle sind im Gegensatz zu einer Metrazolbehandlung stärker und kehren wieder. Metrazol wirkt als Antagonist der GABA-Rezeptoren an den inhibitorischen Interneuronen im Hippokampus und blockiert so die natürliche Hemmung, was wiederum zu einer exzessiven Erregung im Hippokampus und schließlich zur Ausbildung epileptischer Krämpfe führt (de Deyn et al., 1990). Eine stabilere Induktion der *c-fos* Expression durch Kainat wurde auch schon an anderer Stelle beschrieben (Beer et al., 1998). Die Anreicherung der *c-fos* Transkripte vier Stunden nach dem Einsetzen des kainatinduzierten Krampfes könnte auch durch einer Reinduktion der *c-fos* Transkription zu diesem Zeitpunkt verursacht werden. Ein solches, temporäres Muster für die Expression von IEGs wurde beispielsweise für *Arg3.1* nach Geschmackslernen beschrieben (Montag-Sallaz et al., 1999).

zu 2) Das Expressionsmuster in den *knockout*-Mäusen zeigt, dass die aktivitätsinduzierte Transkription von *c-fos* unabhängig von *Arg3.1* ist. Dies liegt insofern auf

der Hand, als dass beide zu den IEGs gehören und ungefähr zum gleichen Zeitpunkt nach neuronaler Aktivität induziert werden.

zu 3) Ob die fehlende c-fos Expression nach vier Stunden ein direkter Effekt des fehlenden Arg3.1 Proteins im Zellkern oder eine indirekte Auswirkung der ausbleibenden synaptischen Verstärkung in Arg3.1 defizienten Mäusen und damit fehlender Signalweiterleitung von der Synapse zum Zellkern ist, kann hier nicht abschließend beantwortet werden. Zwei Ursachen kommen aber in Betracht. Erstens, die erhöhte Anzahl von c-fos Transkripten im Wildtyp-Gehirn bleibt über die vollen vier Stunden stabil. In diesem Fall würde die c-fos Transkription im Arg3.1 *knockout* entweder kürzer andauern oder die mRNA abgebaut werden. Eine unmittelbare RNA stabilisierende Funktion von Arg3.1 ist bisher allerdings nicht bekannt. Zweitens, in Wildtyp-Tieren findet eine Reinduktion nach vier Stunden statt. Diese ist dann in Arg3.1 Mäusen nicht vorhanden. Die fehlende c-fos Expression nach vier Stunden könnte Auswirkungen auf den Phänotyp der Arg3.1<sup>-/-</sup> Mäuse haben. Wie bereits erwähnt, ist c-fos nicht an der Induktion von LTP beteiligt, ZNS-spezifische c-fos *knockout*-Mäuse können demnach auch eine LTP ausbilden, diese ist aber in ihrer späten Phase reduziert (Fleischmann et al., 2003). Die Tatsache, dass die Arg3.1 *knockout*-Tiere aber überhaupt keine L-LTP ausbilden spricht dafür, dass ihre Defizite in der synaptischen Plastizität spezifisch auf die Arg3.1 Deletion zurückzuführen sind. Eine Auswirkung der fehlenden c-fos Expression auf das Langzeitgedächtnis von Arg3.1 *knockout*-Mäusen würde dies demnach nur teilweise erklären. C-fos Mutanten zeigen leichte Defizite in der Ausbildung eines räumlichen Langzeitgedächtnisses, (*Morris water maze*, kontextabhängigen Furchtkonditionierung), verhalten sich aber normal in impliziten Lerntests (tonabhängigen Furchtkonditionierung).

#### **4.4           Ausblick**

Die hier gezeigten Ergebnisse geben zum ersten Mal Aufschluss über eine mögliche Funktion von Arg3.1 bei den Prozessen der synaptischen Plastizität und eröffnen eine Reihe von Fragestellungen für darauf aufbauende Fortsetzungsstudien. Diese erstrecken sich über alle hier behandelten Themengebiete, von der biochemischen und molekularbiologischen Funktionsanalyse des Proteins an der Synapse über die Charakterisierung des Arg3.1 *knockout* Phänotyps bis hin zur Identifizierung transkriptionsmodulierender Eigenschaften von Arg3.1.

- 1) Es ist von besonderem Interesse, die Auswirkungen der Einbindung des Arg3.1 Proteins nach neuronaler Aktivität in den NMDA-Rezeptor-Komplex und die PSD auf die Morphologie der aktivierten Synapsen zu analysieren. Ferner müssen nun die hier aufgezeigten Assoziationen von Arg3.1 mit Proteinen der PSD in Hinblick auf die verantwortlichen Proteindomänen charakterisiert werden. Solche Kenntnisse werden einen gezielten Eingriff in die einzelnen Interaktionen und damit detaillierte Funktionsanalysen des Proteinnetzwerkes an der Synapse erlauben. Weitere Einblicke in die Hierarchie innerhalb des NMDA-Rezeptor-Komplexes wird die Generierung von Doppel-*knockout*-Tieren, beispielsweise Arg3.1<sup>-/-</sup>/PSD-95<sup>-/-</sup>, geben.
- 2) Zur weiteren Charakterisierung der Defekte in der Ausbildung lang anhaltender Veränderungen synaptischer Effektivität werden elektrophysiologische LTD (Langzeitdepression) Studien beitragen. Bei der LTD wird die synaptische Übertragungsrate, wie bereits am Beispiel der Metaplastizität diskutiert wurde, langfristig abgeschwächt. In diesem Zusammenhang wird es von besonderem Interesse sein, die Antwortraten in Abhängigkeit der Stimulationsfrequenzen zu verfolgen und so eine eventuelle Verschiebung der Modifikationsreizschwelle  $\theta_m$  aufzudecken.
- 3) Die verhaltensbiologischen Studien haben u. a. einen Defekt in der korrekten Identifizierung des räumlichen Kontextes in Arg3.1 *knockout*-Mäusen gezeigt. Man geht davon aus, dass diese Orientierungsfähigkeit auf der Aktivität der „*place cells*“ im Hippokampus beruht. Eine „*place cell*“ Analyse im Hippokampus von Arg3.1 *knockout*-Mäusen könnte demnach Aufschluss geben über die Rolle von Arg3.1 an der Ausbildung von „*place cells*“ und deren Bedeutung für das präzise Navigieren im Raum. Ebenso müssen neben dieser detaillierten Studie über die Rolle von Arg3.1 auf das Langzeitgedächtnis auch kürzere Gedächtnisformen analysiert werden. Besonders in Hinblick auf die kurzzeitig erhöhte E-LTP erscheint dies von besonderem Interesse.
- 4) Eine erste, auf der *microarray*-Technik basierende Analyse hat einen Einblick in die Auswirkungen der Arg3.1 Deletion auf die Expression anderer Gene gegeben. Die Eigenschaften und Auswirkungen der differentiellen Regulation von *c-fos* und *SOCS3* müssen nun näher charakterisiert werden. Dabei steht die Charakterisierung der Rolle von Arg3.1 in dem Zytokin/JAK/STAT Signaltransduktionspfad im Vordergrund. Ferner müssen zusätzliche *microarray*-Experimente durchgeführt werden, um weitere Kandidatengene zu identifizieren und zu bestätigen.

5) Letztlich soll eine bereits eingeleitete *proteomics*-Studie Einblicke in die posttranslationalen Veränderungen bei den Arg3.1 *knockout*-Mäusen geben. So können modulatorische Veränderungen anderer Moleküle, die von Arg3.1 ausgeführt oder vermittelt werden, umfassend analysiert werden.