

## 2. Material und Methoden

2.1	Allgemeine Geräte	20
2.2	Häufig verwendete Reagenzien, Chemikalien und Puffer	20
2.3	Antikörper und Antiseren	21
2.4	Oligonukleotide	22
2.5	Manipulation und Propagation von DNA	23
2.6	Zielgerichtete Modifikation von PAC	28
2.7	Genotypische Analyse von Mäusen	32
2.8	Northern Blot-Hybridisierung	34
2.9	<i>In situ</i> Hybridisierung an Gewebeschnitten	36
2.10	Vertikale SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	38
2.11	Western Blot-Analysen	40
2.12	Proteinkonzentrationsbestimmung	42
2.13	Rekombinante Proteinexpression und Affinitätsaufreinigungen	43
2.14	Herstellung von Gewebelysaten	44
2.15	Isolierung von postsynaptischen Dichten (PSD)	44
2.16	<i>In vivo</i> Immunpräzipitation aus Gehirnllysate	47
2.17	Immunhistochemie	48
2.18	Tierversuche	49

## 2.1 Allgemeine Geräte

Alle photometrischen Messungen wurden in einem *Ultrospec3100 pro* Spektrophotometer von Amersham Biosciences durchgeführt. Das Gerät verfügt über einen eingebauten Computer zur Berechnung von Konzentrationen bei allen gängigen Meßmethoden der Molekularbiologie.

Zur Zentrifugation von 1,5 ml- oder 2 ml-Reaktionsgefäßen wurden Eppendorf 5415 D bzw. 5417 R-Kühlzentrifugen eingesetzt. Zentrifugationen im größeren Maßstab wurden in einer Herolab Hicen 21-Kühlzentrifuge durchgeführt, Ultrazentrifugationen in einer Beckman-Coulter Optima LE-80K Ultrazentrifuge. Zentrifugationen von 15 ml- bzw. 50 ml-Falconröhrchen erfolgten in Eppendorf 5810 R Kühlzentrifugen.

Zum Aufschließen der Bakterienmembranen bzw. zum Auflösen der Membranfraktionen des Gehirnllysats wurde ein *Sonoplus* Ultraschallgenerator (Bandelin Electronics) verwendet und stets bei 30% Leistung betrieben.

## 2.2 Häufig verwendete Reagenzien, Chemikalien und Puffer

Alle nicht besonders vermerkten Substanzen und Chemikalien wurden als analysenreine Reagenzien von den Firmen Roche Biochemicals (Mannheim), Applichem (Darmstadt), Fulka (Neu-Ulm), Gibco/BRL (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Difco (Augsburg) oder Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. In dieser Arbeit wurden radioaktive Nukleotide der Firma Hartmann Analytic verwendet.

### 2.2.1 Bakterienmedium und häufig verwendete Puffer

#### LB-Bakterienmedium:

1% [w/v] Pepton

0,5% [w/v] Hefe Extrakt

0,5% [w/v] NaCl

#### PBS-Puffer:

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

7,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

mit HCl auf pH 7,4 einstellen

In dieser Arbeit wurde für alle Bakterienkulturen Luria-Bertani (LB)-Medium verwendet. Medium wurde grundsätzlich autoklaviert. Falls erforderlich, enthielten Bakterienmedien 25 µg/ml Kanamycin, 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Tetracyclin. Die Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren bei höchstens 60°C zugesetzt. Zum Gießen von LB-Agar-Platten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 1,5% [w/v] Agar zugefügt.

### 2.2.2 Protease- und Phosphatase-Inhibitoren

Um ein möglichst großes Spektrum von Proteasen zu inhibieren, wurde eine Mischung verschiedener Protease-Inhibitoren (alle von Applichem) verwendet, deren Wirkspektrum and Endkonzentration im folgenden aufgeführt sind.

**Tabelle 2.1 verwendete Proteaseinhibitoren**

Inhibitor	Spezifität	Endkonzentration
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serin- und einige Cysteinproteasen	1 mM
Aprotinin	Serinproteasen	2 µg/ml
Leupeptin	Thiol-, Serin- und Cysteinproteasen	1 µg/ml
Pepstatin A	saure Proteasen	1 µg/ml

Wenn der Phosphorylierungsstatus von Proteinen untersucht werden sollte, wurden den jeweils verwendeten Lysepuffern die Phosphatase-Inhibitoren Natriumorthovanadat und Natriumfluorid in den Endkonzentrationen 1 mM bzw. 50 mM zugesetzt.

## 2.3 Antikörper und Antiseren

Die in dieser Arbeit verwendeten Antiseren und aufgereinigten Antikörper sind in der Tabelle 2.2 aufgelistet. Zusätzlich sind die verwendeten Verdünnungen für Western Blot-Analysen (W) auf Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen, sowie für die immunhistochemische Färbung (IH) angegeben.

**Tabelle 2.2 In dieser Arbeit verwendete primäre Antiseren und Antikörper**

Name	Organismus und Typ	Hersteller/Quelle	verwendete Verdünnung
α-beta-Actin	IgG, monoklonal, Maus	Sigma	1:5.000.000 (W)
α-Arg3.1	Kaninchen-Serum (8818)	s. diese Arbeit	1:20.000 (W)
α-Arg3.1	Kaninchen-Serum (5904)	Dr. N. Plath	1:1500 (IH)

**Tabelle 2.2 In dieser Arbeit verwendete primäre Antiseren und Antikörper**

Name	Organismus und Typ	Hersteller/Quelle	verwendete Verdünnung
$\alpha$ -GAPDH	IgG, monoklonal, Maus	Chemicon	1:5.000.000 (W)
$\alpha$ -GluR2	IgG, monoklonal, Maus	BD Biosciences	1:10.000 (W)
$\alpha$ -NMDAR2B	IgG, monoklonal, Maus	BD Biosciences	1:5.000 (W)
$\alpha$ -PSD-95	IgG, monoklonal, Maus	Affinity Bioreagents	1:10.000 (W)
$\alpha$ -Stargazin	IgG, polyklonal, Kaninchen	Alomone Labs	1:10.000 (W)
$\alpha$ -Synaptophysin	IgM, monoklonal, Maus	Chemicon	1:100.000 (W)

## 2.4 Oligonukleotide

Die als Primer für PCR-Reaktionen verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Invitrogen bzw. MWG Biotech bezogen. Angefügte Restriktionsschnittstellen sind in den Sequenzen unterstrichen. Die Namen der jeweiligen Restriktionsnukleasen sind immer Bestandteil des Oligonukleotidnamens. Stopcodon eines Leserasters ist fett dargestellt. Alle zur Klonierung des in dieser Arbeit verwendeten *shuttle vectors* eingesetzten Oligonukleotide finden sich in Tabelle 2.3.

**Tabelle 2.3 In dieser Arbeit zur Klonierung des *shuttle vectors* verwendete Oligonukleotide**

Name	Sequenz (Orientierung 5' → 3')	Verwendung
zifUTREcoRI5'	<u>TGAATTC</u> AGGGAATAAAAGAAAGCAA	Klonierung von zif3'UTR in pBKS(+)
zifUTRHindIII3'	AGAAGCTTCTCGAGCTTATTCCCTTTAATT	
argBEcoRI5'	AGAATTCTCGAGGGGTGTGGGATG	Klonierung von Arg3.1-ArmB in pBKS(+)
argBHindIII3'	ACAAGCTTGTCTGACTAGTGAAAGTTCAGACTTGG	
argAEcoRI5'	<u>CGAATTC</u> GCAGCCCTACTGCCAGGAAGCT	Klonierung von Arg3.1-ArmA in pBKS(+)
argA3'	<b>CTATTC</b> AGGCTGGGTCCT	
zifUTRrek5'	TGACAGGACCCAGCCTGAAT <b>AG</b> AGGGAATAAAA GAAAGCAAAGG	Klonierung von 5'-Ende der zif3'UTR in pBKS(+)
zifUTRrekHindIII3'	<u>CCAAGCTT</u> GGGCCCAAACCCATTTTTTTTT	

Für GenotypisierungsPCR eingesetzte Oligonukleotide sind in Tabelle 2.4 zusammengefasst.

**Tabelle 2.4 Oligonukleotide für Genotyp-Analyse**

Name	Sequenz (Orientierung 5' → 3')
Az-for	GCAGGGCTCGGTGAAGAA
Az-rev	GTCTAGCGCTGAAGGGAG
A3UTR-rev	CAGGGCATCCCTTTGGGA
TDA	AAGGGCTACTGGTGGCATGTGTGCA
TDB	CACTGCAGGGAGGGGAAACAAGCAG
TDC	TCACCTTCAGCTCTCCGGCTGAGCT

## 2.5 Manipulation und Propagation von DNA

### 2.5.1 Plasmide

In dieser Arbeit wurden die Plasmide pBluescript II KS(+) (Stratagene), pSV1.*RecA* (Yang & Heintz, 1997), pGEX-4T-1 (GE Healthcare) verwendet. Die in dieser Arbeit verwendete Arc/Arg3.1-cDNA der Maus lag in dem Plasmid pSPORT2 einkloniert vor und wurde freundlicherweise von Ditzen, D. (AG Kuhl) zur Verfügung gestellt. Der Arc/Arg3.1-Gen-Lokus enthaltende PAC-DNA-Klon wurde vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH in Berlin (RZPD) bezogen und von Dr. Görich, D. (AG Kuhl) identifiziert und charakterisiert. Ein genomisches Fragment von dem *egr1/zif268*-Gen-Lokus kloniert in pBluescript II KS erhielt ich von Dr. Baumgärtel, K. (Schweiz). Zur Vermehrung in *E. coli* tragen alle Plasmide ein Gen, das für eine Ampicillin-, Kanamycin- oder Tetracyclin-Resistenz kodiert.

### 2.5.2 Puffer

#### TAE-Puffer:

40 mM Tris-Base

1 mM EDTA

mit Essigsäure auf pH 8,4 einstellen

#### 6 x DNA-Ladepuffer:

20% [w/v] Ficoll

100 mM EDTA

je 0,25% [w/v] Bromphenolblau und  
Xylencyanol

### 2.5.3 Manipulation von DNA mit Restriktionsendonukleasen und alkalischer Phosphatase

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen wird doppelsträngige DNA sequenzspezifisch an definierten Stellen hydrolysiert. Je nach Restriktionsenzym kann das Ende des DNA-Fragments zu überlappender Sequenz (*sticky end*) oder nicht-überlappender Sequenz (*blunt end*) modifiziert werden. Mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut DNA-Fragmente können später ligiert werden. In dieser Arbeit wurden Restriktionsenzyme der Firmen MBI

Fermentas und New England Biolabs verwendet. Die DNA wurde unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen (Enzymmenge, Puffer, Temperatur) für 2 h oder über Nacht verdaut.

Um die Religationen von Plasmid-DNA zu verhindern, wurden unmittelbar nach dem Restriktionsverdau die 5'-Ende dephosphoryliert. Dazu wurde dem Ansatz alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (MBI Fermentas) zugegeben, und für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Eine Ligation der Plasmid-DNA kann dann nur noch mit Fragmenten erfolgen, die noch eine 5'-Phosphatgruppe tragen.

Zur Extraktion der Plasmid-DNA aus dem Reaktionsgemisch wurde das Volumen mit H<sub>2</sub>O auf 200 µl erhöht, 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, Roth) hinzugegeben und gut gemischt. Nach fünfminütiger Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei 14.000 rpm wurde die obere Phase abgenommen und mit 600 µl Ethanol und 80 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 gefällt und für 30 min bei 14.000 rpm pelletiert. Nach kurzem Waschen in 70% [v/v] Ethanol wurde das Pellet getrocknet und in H<sub>2</sub>O oder einem geeigneten Puffer für die weitere Behandlung aufgenommen.

### 2.5.4 Agarose-Gelelektrophorese und Elution von DNA aus Agarosegelen

Die Agarose-Gelelektrophorese wird zur analytischen und präparativen Längenauftrennung von Nukleinsäuren im Bereich von ca. 50 bp bis 20 kb eingesetzt. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurde Gel mit 0,8% - 2,0% [w/v] Agarose (Roth) in TAE-Puffer verwendet. Der Ansatz wurde im Mikrowellenherd solange aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Um die Nukleinsäuren später im UV-Licht sichtbar zu machen, wurde das Gel nach kurzem Abkühlen mit Ethidiumbromid versetzt und in noch flüssigem Zustand in Kunststoffgelträger gegossen. Die Taschen zum Beladen mit den mit DNA-Ladepuffer versetzten Proben wurden mit verschiedenen Kämmen geformt. Die Auftrennung in TAE-Puffer erfolgte bei 80 bis 120 V in Elektrophorese-Kammern der Firma Owl. Als Längenstandard wurde eine 1 kb-Leiter oder eine 100 bp-Leiter (beide MBI Fermentas) mitgeführt. Die DNA-Banden wurden mit Hilfe eines UV-Transilluminators in Verbindung mit einer Biorad *GelDoc2000* Geldokumentationsanlage sichtbar gemacht.

Zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurden die entsprechenden Banden unter UV-Licht-Durchleuchtung mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Aufarbeitung erfolgte mit Hilfe des *QIAEX II gel extraction kit* (Qiagen). Die Isolierung beruht auf der

Auflösung der Gelmatrix und anschließender Absorption der DNA an Kunststoffpartikel unter Hochsalzbedingungen. Von diesen wird die DNA dann mit einem geeigneten Volumen sterilen Wassers eluiert. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

### 2.5.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe der T4 DNA-Ligase (MBI Fermentas) wurden in dieser Arbeit dephosphorylierte Plasmide mit DNA-Fragmenten ligiert. Alle Reaktionen wurden in einem 10 µl-Ansatz durchgeführt, in dem das molare Verhältnis von Plasmid zu Insert 1:3 betrug. Die Masse der eingesetzten Plasmide richtet sich dabei nach ihrer Größe: Von einem 3 kb-Plasmid wurden 20 ng eingesetzt. Die Reaktion erfolgte ü/N bei 16 °C in dem von MBI Fermentas mitgelieferten Ligase-Puffer.

### 2.5.6 Präparative Polymerase-Kettenreaktion

Zur präparativen Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die *Pfu* DNA-Polymerase (Stratagene) eingesetzt, die über eine 3'-5' Korrektur-Exonucleaseaktivität verfügt und damit eine im Vergleich zur *Taq* DNA-Polymerase sehr geringe Fehlerrate besitzt. Zur späteren Klonierung der amplifizierten DNA-Fragmente wurden beide Oligonukleotide eines Primerpaares an ihren 5'-Enden um die Sequenzen von Restriktionsschnittstellen verlängert. Auf diese Weise wurden während der PCR auf beiden Seiten des Amplifikats komplette Schnittstellen generiert.

Alle Reaktionen fanden in Gegenwart von Reaktionspuffer mit MgCl<sub>2</sub> (Stratagene), 1 mM dNTPs (Rapidozym), beiden Primern (jeweils 20 µM) und 10 ng Template-DNA in einem Volumen von 50 µl unter den von Stratagene angegebenen Standardbedingungen statt. Es wurden standardmäßig 30 Reaktionszyklen durchgeführt. Die Primerbindungstemperatur wurde abhängig von Länge und GC-Gehalt der Primer gewählt und ggf. variiert. Die für die PCR notwendigen Temperaturprofile wurden mit einem PTC-200 Thermocycler (MJ Research) generiert.

Zur gezielten Manipulation von DNA-Fragmenten, z. B. Fusionieren von zwei DNA-Fragmenten oder Einführen von Mutation einzelner Aminosäure eines Proteins, wurde gegebenenfalls ein aus zwei Schritten bestehendes PCR-Protokoll, die so genannte RekombinationsPCR, verwendet. Dabei wurden zunächst zwei Fragmente generiert, die sich

in dem zu modifizierenden Bereich um 15-18 Basenpaare überlappen. Für diesen Schritt wurden also zwei flankierende Primer benötigt, die in dieser Arbeit zur späteren Klonierung um Sequenzen mit Restriktionsschnittstellen verlängert waren, sowie zwei Primer, die die Sequenz in dem zu modifizierenden Sequenz-Bereich binden und um 15-18 Basenpaare überschneiden. In einer zweiten PCR-Reaktion, die jetzt nur die flankierenden Primer enthielt, wurden jeweils ca. 10 ng der beiden Fragmente als Template eingesetzt. Durch die Überlappung der beiden internen Primer können beide Fragmente nach der ersten Denaturierung in diesem Bereich hybridisieren und den Ausgangspunkt für das Auffüllen der Einzelstränge durch die Polymerase bilden. Während der folgenden Reaktionszyklen wird das neue Fragment mit Hilfe der flankierenden Primer amplifiziert.

### 2.5.7 Chemische Transformation von Plasmiden in *E. coli*

Transformationen wurden mit Hilfe eines Hitzeschocks in chemokompetente *E. coli* XL-1 blue, bzw. *E. coli* BL21 Bakterien (beide von Stratagene) durchgeführt. Der Rekombinase-defiziente Stamm XL-1 blue wurde für die Vermehrung von Plasmiden eingesetzt, der Protease-defiziente Stamm BL21 DE3 für die rekombinante Proteinexpression (siehe Kapitel 2.13). Für die Transformation in *E. coli* BL21 wurde 1 µg DNA, für die Transformation in *E. coli* XL-1 blue wurden 10 ng DNA, bzw. ein kompletter Ligationsansatz eingesetzt. Zu der DNA wurden 100 µl Suspension kompetenter Bakterien unmittelbar nach deren Auftauen zugegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte ein 45 sec dauernder Hitzeschock in einem auf 42 °C erwärmten Wasserbad. Nach 2 min Abkühlen auf Eis wurden 900 µl LB-Medium zu dem Ansatz gegeben und dieser 1 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien pelletiert und in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Die Suspension wurde je nach Resistenz auf einer LB-Agar-Platte mit Ampicillin bzw. Kanamycin ausplattiert. Die Bebrütung erfolgte ü/N bei 37 °C.

### 2.5.8 Plasmidisolierung in kleinem Maßstab (Miniprep)

Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurde die Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979) eingesetzt. Dafür wurden Bakterienkolonien in je 3 ml LB-Medium mit Ampicillin- bzw. Kanamycin überimpft und ü/N bei 37 °C geschüttelt. Je 1 ml der Kulturen wurde dann in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, die Bakterien für 5 min bei 8.000 rpm



pelletiert und in 200 µl 10 mM EDTA resuspendiert. Nacheinander wurden 200 µl 200 mM NaOH, 1% [w/v] SDS und 200 µl 3 M Kaliumacetat pH 5,5 dazugegeben und kräftig geschüttelt, bis sich ein Präzipitat bildete. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm wurden 600 µl des klaren Überstandes zu 420 µl Isopropanol gegeben und gut gemischt. Die dadurch ausgefällte Plasmid-DNA wurde 10 min bei 14.000 rpm sedimentiert und einmal mit 70% [v/v] Ethanol gewaschen. Die ausgefällte Plasmid-DNA wurde an der Luft getrocknet und in 10 - 20 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Minipreps wurden in dieser Arbeit zur Überprüfung von DNA-Klonierungen eingesetzt. In der Regel wurde Plasmid-DNA aus acht verschiedenen Bakterienklonen präpariert und 5 µl der so gewonnenen Plasmid-DNA Restriktionsanalysen unterzogen.

### 2.5.9 Plasmidisolierung in großem Maßstab (Maxiprep), photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung und Sequenzierung

Mit in der Maxiprep durchgeführten Plasmidpräparationen können Ausbeuten von 100-500 µg hochreiner Plasmid-DNA erzielt werden. Hierfür wurden 100 ml Kultur mit einem das Plasmid tragenden Bakterienklon angeimpft und ü/N bei 37 °C geschüttelt. Die Bakterien wurden 15 min bei 5.000 rpm in einem GSA-Rotor (Sorvall) pelletiert und die Plasmide mit Hilfe des *NucleoBond PC 500 Kits* nach Angaben des Herstellers isoliert. Die so präparierte DNA wurde in 100 µl H<sub>2</sub>O gelöst und die Konzentration photometrisch bei 260 nm bestimmt. Zusätzlich wurde als Maß für die DNA-Reinheit die Absorption bei 280 nm gemessen. Der Quotient  $\text{Absorption}_{260 \text{ nm}}/\text{Absorption}_{280 \text{ nm}}$  sollte größer als 1,6 sein.

Alle in dieser Arbeit mit Hilfe einer präparativen PCR erzeugten Konstrukte wurden anschließend sequenziert. Die Sequenzierungen wurden von den Firmen InViTek (Berlin) oder MWG (Ebersberg) durchgeführt.

## 2.6 Zielgerichtete Modifikation von PAC (*P1 derived artificial chromosome*)

### 2.6.1 Medium, Puffer und Lösungen

#### YENB-Bakterienmedium:

0,75% [w/v] Hefe Extrakt

0,8% [w/v] Nutrient Broth

#### TB-Agar-Platte:

1% [w/v] Pepton

0,1% [w/v] Hefe Extrakt

0,1% [w/v] Glucose

0,8% [w/v] NaCl

50  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>

72 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O

1,5% [w/v] Agar

#### Denaturierungslösung:

1,5 M NaCl

0,5 M NaOH

#### Neutralisierungslösung:

1,5 M NaCl

0,5 M Tris

auf pH 7,0 einstellen

#### 20 x SSC:

3 M NaCl

0,3 M Natriumcitrat

#### Hybridisierungslösung:

50% Formamid

5 x SSPE

5 x Denhardt

0,1% [w/v] SDS

#### 20 x SSPE:

3 M NaCl

0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

20 mM EDTA

mit NaOH auf pH 7,4 einstellen

#### 50 x Denhardt:

1% Ficoll 400

1% Polyvinylpyrrolidon K30

1% BSA

Detektionspuffer:

0,1 M Tris

0,1 M NaCl

50 mM MgCl<sub>2</sub>

mit HCl auf pH 9,5 einstellen

### 2.6.2 System zur Manipulation von PAC-DNA

*P1 derived artificial chromosomes* (PACs) sind ringförmige bakterielle Plasmide, die ein genomisches DNA-Fragment von bis zu 300 kb tragen. In dieser Arbeit wurde die PAC-DNA zur Herstellung von transgenen Mäusen genetisch modifiziert und in den Vorkern der befruchteten Zygote injiziert. Zur Manipulation der PAC-DNA wurde eine genetische Methode angewandt, die auf homologe Rekombination in *E. coli* beruht. In diesem System erlaubt die homologe Rekombination zwischen einem Vektor (*shuttle vector*) und der PAC-DNA die Einführung jeder denkbaren Modifikation in das Ziel-Gen. Der *shuttle vector* enthält die Mutation, die eingeführt werden soll, flankiert von zwei Bereichen (Armen), die homolog zu dem Ziel-Lokus in der PAC-DNA sind. Die homologe Rekombination in dem Rekombinase-defizienten *E. coli* Stamm DH10beta wird durch die bakterielle Rekombinase A gewährleistet, deren kodierende Sequenz sich auch im *shuttle vector* befindet. Zur Selektion der homologen Rekombination dienen das Tetracyclin-Resistenz-Gen und ein Temperatursensitiver Repulikationsursprung in diesem System.

Der *shuttle vector* wird in die *E. coli*-Zellen, die die PAC-DNA enthalten, transformiert. Der gesamte Vektor wird durch die erste homologe Rekombination auf einem von den homologen Armen in die PAC-DNA integriert. Nach dem zweiten intramolekularen Rekombinationsschritt an dem anderen homologen Arm wird die Basissequenz des *shuttle vectors* aus der PAC-DNA ausgeschnitten. Das Ereignis der homologen Rekombinationen in *E. coli* wird selektioniert und mittels Southern-Blot-Hybridisierung analysiert.

### 2.6.3 Herstellung elektrokompenter Zellen

Für die Elektroporation wurden kompetente PAC-DNA enthaltende DH10beta Zellen hergestellt. Hierfür wurden 50 ml LB-Medium mit einer Kolonie DH10beta angeimpft und

ü/N bei 37 °C geschüttelt. 500 ml YENB-Medium wurden mit 2,5 ml Vorkultur angeimpft. Die Kulturen ließ ich bis zu einer Dichte von  $OD_{600} = 0,6 - 0,8$  wachsen.

Die folgenden Schritte wurden im Kühlraum und mit vorgekühltem Rotor durchgeführt:

Die Zellen wurden abzentrifugiert (GSA, 4200 rpm, 10 min), zweimal mit 100 ml eiskaltem Wasser gewaschen und erneut abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 25 ml eiskaltem 10% Glycerol resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 2,5 ml 10% Glycerol resuspendiert und zu Ansätzen von je 100 µl aufgeteilt. Die kompetenten DH10beta Zellen wurden unmittelbar nach der Herstellung für Elektroporation eingesetzt oder bei -80 °C gelagert.

### 2.6.4 Transformation durch Elektroporation

Zur Transformation der PAC-DNA enthaltenden DH10beta Zellen mit dem *shuttle vector* wurde die Methode der Elektroporation angewandt. Dazu wurde 1 µg DNA von dem *shuttle vector* mit 40 µl kompetenten Zellen vermischt und in eine eisgekühlte *GenePulser* Elektroporationsküvette mit 0,4 cm Elektrodenabstand (Biorad) gefüllt. Die Elektroporation erfolgte durch einen kurzen Gleichstromimpuls, der durch einen Biorad *GenePulser II* mit den Einstellungen 1,66 kVolt, 25 µFarad und 200 µOhm appliziert wurde. Anschließend wurden die Bakterien in 1 ml S.O.C.-Medium bei 30 °C 1 h geschüttelt. Die bakterielle Suspension wurde auf einer LB-Agar-Platte mit Tetracyclin und Kanamycin ausplattiert. Die Bebrütung erfolgte ü/N bei 30 °C.

### 2.6.5 Selektion auf homologe Rekombination

Zur Selektion der Integration des *shuttle vectors* in die PAC-DNA durch die erste homologe Rekombination wurden die mit dem *shuttle vector* transformierte DH10beta Zellen bei 43 °C auf einer LB-Agar-Platte mit Tetracyclin (50 µg/ml) und Kanamycin (25 µg/ml) inkubiert. Die zweite intramolekulare homologe Rekombination erfolgte dann durch die Inkubation auf einer LB-Agar-Platte ohne Tetracyclin als Selektionsdruck, wobei die gesamte Rückgrat-Sequenz des *shuttle vectors* aus der PAC-DNA ausgeschnitten wurde und die Bakterien die Tetracyclin-Resistenz verloren. Zur Selektion der Tetracyclin-sensitiven Bakterien wurden sie weiter auf einer TB-Agar-Platte, der Fusarinsäure (12 µg/ml) und Kanamycin (25 µg/ml) zugesetzt waren, ausplattiert und für 2-3 Tage bei 37 °C inkubiert.

### 2.6.6 Southern Blot-Hybridisierung

Die zu analysierenden DNA-Fragmente wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, und das Gel wurde durch Schwenken in den nachfolgend genannten Lösungen inkubiert. Die DNA-Fragmente wurden zunächst 30 min in 0,25 M HCl depuriniert, was zu einer Längenreduktion durch Strangbruch führte. Danach wurden die DNA-Fragmente 20 min in einer Denaturierungslösung inkubiert und anschließend 20 min in einer Neutralisierungslösung inkubiert.

Das Gel wurde dann 10 min in 20 x SSC äquilibriert. Eine passend zurechtgeschnittene Nylonmembran (Hybond-N, Amersham) wurde in H<sub>2</sub>O angefeuchtet und 5 min in 20 x SSC gelegt. Das Gel wurde auf 5 mit 20 x SSC getränkte 3MM Papiere gelegt, nacheinander mit der befeuchteten Membran, mit 5 in 20 x SSC getränkten 3MM Papieren und einem Stapel Saugpapier bedeckt und durch ein Gewicht (500 g) beschwert. Der Transfer erfolgte ü/N. Die DNA-Fragmente wurden durch UV-Bestrahlung in einem Peqlab *HL-2000* UV-Crosslinker kovalent an die Membran gebunden.

Der Blot wurde in ein 50 ml fassendes Hybridisierungsröhrchen überführt, 10 ml Hybridisierungslösung dazu gegeben und für mindestens 1 h bei 42 °C unter gleichmäßigem Drehen inkubiert. Nach Zugabe der mit Digoxigenin (DIG) markierten Sonde wurde der Blot bei 42 °C ü/N hybridisiert. Anschließend wurde der Blot nacheinander zweimal 5 min bei RT in 2 x SSC/0,1% SDS, 15 min in 0,2 x SSC/0,1% SDS bei RT und 15 min in 0,2 x SSC/0,1% SDS bei 65 °C gewaschen. Zur Detektion wurde der Blot eine Stunde mit 5% Magermilch in PBS geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Anti-Digoxigenin-Antikörper konjugiert mit der alkalischen Phosphatase (Roche) in PBS für 1 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die spezifischen DIG-Signale kolorimetrisch mit NBT/BCIP im Detektionspuffer detektiert.

Die DIG-Markierung der DNA-Sonden wurde mit Hilfe des *DIG DNA Labeling Kit* (Roche) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die nicht-radioaktive Southern Blot-Hybridisierung wurde in dieser Arbeit zur Analyse und Überprüfung von Modifikation der PAC-DNA eingesetzt.

### 2.6.7 Aufreinigung der PAC-DNA mittels kontinuierlicher Cäsiumgradientenzentrifugation

Die PAC-DNA für die Mikroinjektion in den Vorkern der Zygote wurde mit der Methode der alkalischen Lyse in großem Maßstab aus *E. coli* isoliert, anschließend mit Hilfe der Cäsiumgradientenzentrifugation aufgereinigt. Dafür wurde die PAC-DNA aus 250 ml Kultur mit der standardisierten alkalischen Lyse aus *E. coli* Zellen präpariert und in 20 ml TE-Puffer resuspendiert. Zu der DNA-Lösung wurden 20,2 g Cäsiumchlorid und 400 µl Ethidiumbromid zugegeben und durch Erwärmen gut gelöst. Die Lösung wurde in ein verschließbares Ultrazentrifugenröhrchen eingefüllt und für 24 h bei 54.000 rpm und RT in einem Type 60Ti-Rotor (Beckman-Coulter) zentrifugiert. Während der Zentrifugation wurde die intakte zirkuläre PAC-DNA von den gebrochenen bzw. linearisierten DNA abgetrennt und mit Hilfe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die Fraktion der intakten PAC-DNA wurde sorgfältig mit einer Kanüle durch die Wand vom Zentrifugenröhrchen in ein Reaktionsgefäß überführt. Zur Entfernung von Ethidiumbromid wurde die DNA-Lösung mit Butanol extrahiert. Hierfür wurde die DNA-Lösung mit dem gleichen Volumen an Butanol versetzt und gut gemischt. Nach dreiminütiger Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei 2.500 rpm wurde die obere organische Phase abpipettiert. Der Vorgang wurde vier bis sechsmal wiederholt, bis beide Phasen farblos waren. Um das Cäsiumchlorid aus der DNA-Lösung zu entfernen, wurde diese weiter in einem großen Volumen TE-Puffer ü/N dialysiert. Nach einer Fällung mit Ethanol stand die hochgereinigte zirkuläre PAC-DNA für die Mikroinjektion zur Verfügung.

## 2.7 Genotypische Analyse von Mäusen

### 2.7.1 Puffer

#### Ohrloch-Puffer:

0,1 M Tris pH: 8,5

0,2 M NaCl

5 mM EDTA

0,2% [w/v] SDS

#### TE-Puffer:

10 mM Tris pH:7,5

1 mM EDTA

1 mg/ml Proteinase K

### 2.7.2 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwänzen

Zur Genotypisierung von Mäusen wurde diesen ein etwa 0,5 cm langes Stück vom Schwanz abgeschnitten. Die Maus sollte dafür mindestens drei Wochen alt sein. Das Stück Schwanz wurde ü/N bei 37 °C unter Schütteln in 112 µl Ohrloch-Puffer lysiert. Nach 10 min Erhitzen bei 95 °C wurde 800 µl von dem mit RNase A versetzten TE-Puffer zugegeben. Die DNA-Lösung wurde als Template in die PCR eingesetzt.

### 2.7.3 Analytische Polymerase-Kettenreaktion

Zur Genotypisierung wurde *Taq* DNA-Polymerase (Rapidozym) eingesetzt. Um Pipettierfehler zu vermeiden, wurde für alle Reaktionsansätze, die mit einer bestimmten Primerkombination amplifiziert werden, ein Mastermix hergestellt, diesem dann Aliquots für die einzelnen Ansätze entnommen und mit der entsprechenden Template-DNA versetzt. Folgende Endkonzentrationen der einzelnen Komponenten im 50 µl Reaktionsansatz wurden verwendet: 1 x Reaktionspuffer (Rapidozym), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Rapidozym), 1 mM dNTPs (Rapidozym), Primerpaar (jeweils 20 µM) und 30-50 ng Template-DNA. Das PCR-Programm ist abhängig von der Primerbindungstemperatur, von der Länge des erwarteten Produktes und von der Menge der Template-DNA.

### 2.7.4 Genotypisierung der Arc/Arg3.1-defizienten Mauslinie

Die Untersuchung auf die eingeführte Deletion am Arc/Arg3.1-Lokus erfolgt durch PCR. Dafür werden zwei unabhängige Primertrimere (TDA-C (Pa, Pb, Pc) und TDI1-3) so gewählt, dass bei Anwesenheit der Mutation ein 450 Nukleotide langes Fragment amplifiziert wird. Die Anwesenheit des Wildtyp-Lokus ergibt ein Fragment von 200 Nukleotiden, so dass mit einer PCR-Reaktion der Genotyp (Wildtyp, heterozygoter oder homozygoter Knockout) bestimmt werden kann.

Prädenaturierung, 94 °C, 5 min; 35 Zyklen: Denaturierung, 94 °C, 30 s, Primerbindung, 67 °C, 30 s, Elongation, 72 °C, 1 min; abschließende Elongation, 72 °C, 10 min.

### 2.7.5 Genotypisierung der transgenen Mauslinie – Tg(ARG-zif3UTR)

Die Untersuchung des ins Genom eingeführten Transgens - Arc/Arg3.1-egr1/zif2683UTR erfolgt durch PCR. Dafür wird ein Primertrimer (P1 (Az-for), P2 (Az-rev) und P3 (A3UTR-rev)) so gewählt, dass bei Anwesenheit des Transgens ein 752 Nukleotide langes Fragment amplifiziert wird. Die Anwesenheit des Wildtyp-Gens ergibt ein Fragment von 520 Nukleotiden. So kann mit einer PCR-Reaktion das Vorhandensein des Transgens und des Wildtyp-Gens im Genom bestimmt werden.

Prädenaturierung, 94 °C, 5 min; 35 Zyklen: Denaturierung, 94 °C, 30 s, Primerbindung, 54 °C, 30 s, Elongation, 72 °C, 1 min; abschließende Elongation, 72 °C, 10 min.

## 2.8 Northern Blot-Hybridisierung

### 2.8.1 Puffer und Lösungen

#### MOPS-Puffer:

20 mM MOPS

5 mM Natriumacetat

1 mM EDTA

mit HCl auf pH 7,0 einstellen

#### RNA-Denaturierungspuffer:

20 µl 10 x MOPS-Puffer

30 µl Formaldehyd

100 µl Formamid

### 2.8.2 Isolierung und Aufreinigung von totaler RNA

Zur Isolierung von totaler RNA aus dem hippokampalen bzw. kortikalen Gewebe wurde die Methode mit Trizol eingesetzt. Dafür wurde das Tier durch zervikale Dislokation getötet, das Gehirn auf Eis entnommen, das Zerebellum abgetrennt und aus dem Vorderhirn wurden die zwei Hippokampi und der Kortex präpariert. Zwei Hippokampi oder eine Hälfte des Kortex wurden in 1 ml Trizol (Appllichem) aufgenommen und durch sukzessives Passieren durch kleiner werdende Kanülen homogenisiert. Das weitere Verfahren folgte den Angaben des Herstellers. Die isolierte totale RNA wurde anschließend mit Hilfe des *RNA clean-up kit* (NucleoBond) aufgereinigt. Die gewonnene RNA wurde in 30 µl DEPC-H<sub>2</sub>O eluiert und bei -80 °C eingefroren. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bei 280 nm bestimmt.



### 2.8.3 Auftrennung von RNA auf Formaldehyd/Agarosegelen

Die Auftrennung von RNA erfolgte in vertikalen Agarosegelen. Diese enthalten 1,2% Agarose in MOPS-Puffer und 15% Formaldehyd.

Für die Elektrophorese wurde eine RNA-Lösung, die 7,5-12,5 µg RNA enthielt, im dreifachen Volumen RNA-Denaturierungspuffer aufgenommen, 15 min auf 65 °C erhitzt und anschließend auf Eis gestellt. Schließlich wurden 3 µl Probenpuffer zugegeben und die Lösung auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung in MOPS-Puffer erfolgte bei 70 bis 120 V in P10DS-Kammern (Owl). Eine RNA-Leiter (MBI Fermentas) wurde als Längenstandard mitgeführt. Nach der Auftrennung wurde die durch UV-Beleuchtung sichtbaren Banden dokumentiert.

### 2.8.4 Northern Blot

Für den Transfer der RNA auf eine Membran wurde das Gel zweimal 15 min in 20 x SSC inkubiert. Eine passend zurechtgeschnittene Nylonmembran (Hybond-N, Amersham) wurde in H<sub>2</sub>O angefeuchtet und 5 min in 20 x SSC gelegt. Der RNA-Transfer auf die Membran und deren Fixierung erfolgten gemäß der Beschreibung für einen Southern Blot.

### 2.8.5 Hybridisierung

Der Blot wurde in ein Hybridisierungsröhrchen überführt und in 10 ml Hybridisierungslösung für mindestens 1 h bei 42 °C inkubiert. Nach Zugabe der mit alpha-[<sup>32</sup>P]-dCTP markierten DNA-Sonde wurde der Blot bei 42 °C ü/N hybridisiert. Anschließend wurde der Blot nacheinander 5 min bei RT in 2 x SSC/0,1% SDS, 30 min in 2 x SSC/0,1% SDS bei RT, 30 min in 2 x SSC/0,1% SDS bei 65 °C und 30 min in 0,2 x SSC/0,1% SDS bei 65 °C gewaschen. Die radioaktiven Signale wurden durch Autoradiographie mit Verstärkerfolie bei -80 °C detektiert.

### 2.8.6 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die radioaktive Markierung von DNA-Sonden wurde nach der „*random priming*“ Methode mit Hilfe des *Rediprime II kit* (Amersham) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. 25 ng der zu markierenden DNA wurden in 45 µl Volumen verdünnt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Die denaturierte DNA wurde zu einem Konzentrat gegeben, das die zur Reaktion nötigen Komponenten: dATP, dGTP, dTTP, Exonuklease freies Klenow-Fragment und Random Primer (9mere) enthielt. Zu der Lösung gab ich 5 µl alpha-[<sup>32</sup>P]-dCTP und ließ sie mindestens 10 min bei 37 °C inkubieren. Die Zugabe von 5 µl 0,2 M EDTA beendete die Reaktion. Nicht eingebaute Nukleotide wurden nach dem Prinzip der Größenausschlußchromatographie mit *mini Quick Spin DNA Column G50* (Roche) abgetrennt. Aus dem Eluat wurde 1 µl für die Cherenkov-Messung entnommen.

### 2.9 *In situ* Hybridisierung an Gewebeschnitten

Für *in situ* Hybridisierungen wurde das „*Sure-site*“ Protokoll (Novagen) verwendet und wie nachfolgend beschrieben modifiziert.

#### 2.9.1 Puffer und Lösungen

##### Hybridisierungslösung:

50% Formamid

4 x SSC

1 x Denhardt

10% [w/v] Dextransulfat

0,5 mg/ml ssDNA (aus Salmonssperma)

0,25 mg/ml t-RNA (aus der Hefe)

##### RNase-Lösung:

10 mM Tris pH: 8,0

0,5 M NaCl

1 mM EDTA pH: 8,0

0,02 mg/ml RNase

#### 2.9.2 Herstellung der Gehirnschnitte

Die Herstellung der Gehirnschnitte erfolgte am Kryostaten *HM560* (Microm). Bei -80 °C gelagerte adulte Gehirne wurden im Kryostaten mit 2% Gelatinelösung eingebettet. Schnitte

von 16 µm Dicke wurden angefertigt und jeweils ein Gehirnschnitt eines Kontrolltieres und eines zu untersuchenden Tieres auf einen gemeinsamen, bereits beschichteten Objektträger (SuperFrost, Roth) transferiert, um bei der nachfolgenden Hybridisierung identische Bedingungen zu gewährleisten. Die auf die Objektträger aufgezogenen Schnitte wurden luftgetrocknet und bei -80 °C gelagert.

### 2.9.3 *In vitro* Transkription, Entfernung der Template-DNA und Fällung

Die Herstellung strangspezifischer *sense*- oder *antisense* Sonde erfolgte mit Hilfe des *Riboprobe Kit* (Invitrogen) gemäß „*Sure-site*“ Protokoll (Novagen). Dabei wurde linearisierte Plasmid-DNA mit T7- oder SP6-Polymerase in Anwesenheit von alpha-[<sup>35</sup>S]-UTP *in vitro* transkribiert. Die im Ansatz vorhandene Template-DNA wurde anschließend durch DNase I Verdau entfernt. Hierfür wurde 1 µl DNase I zu 20 µl *in vitro* Transkriptionsansatz hinzugefügt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden mit *mini Quick Spin RNA Column G50* (Roche) abgetrennt. Dafür wurde der Transkriptionsansatz mit 100 mM DTT auf 100 µl aufgefüllt, auf die Säule aufgetragen und zentrifugiert. Das Eluat wurde in 10 µl 1 M DTT, 10 µl t-RNA (10 mg/ml aus der Hefe) und 20 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 versetzt und durch Zugabe von zweifach Volumen Ethanol bei -20 °C ü/N gefällt und zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Trocknung bei 37 °C für 20 min in 40 µl 1 M DTT resuspendiert.

### 2.9.4 Größenreduktion der RNA-Sonde

Um ein besseres Eindringen der Sonde in das Gewebe zu gewährleisten, wurde die radioaktiv markierte RNA-Sonde durch alkalische Hydrolyse in kleinere Fragmente aufgespalten. Die Größenreduktion erfolgte nach dem „*Sure-site*“ Protokoll (Novagen). Die reduzierte RNA wurde in 40 µl 1 M DTT resuspendiert und 1 µl zur Messung der Markierungseffizienz im Szintillationsmessgerät *LS6000SC* (Beckman-Coulter) entnommen.

### 2.9.5 Vorbehandlung der Gehirnschnitte

Die bei -80 °C gelagerten Schnitte wurden aufgetaut, bei RT getrocknet, 15 min fixiert (4% Paraformaldehyd in PBS) und dreimal je 5 min in PBS gewaschen. Um den unspezifischen

Hintergrund zu reduzieren, wurden freie Aminogruppen anschließend acetyliert, indem die Gehirnschnitte zunächst 3 min in 0,1 M Triethanolamin pH 8,0 inkubiert, dann 10 min unter Rühren mit 0,25% Acetanhydrid in 0,1 M Triethanolamin pH 8,0 behandelt wurden. Abschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 80%, 95%, 100% Ethanol) für je 3 min entwässert und getrocknet.

### 2.9.6 Hybridisierung

Die alpha-[<sup>35</sup>S]-UTP markierte RNA-Sonde wurde mit Hybridisierungslösung im Verhältnis 1:50 verdünnt. Je 100 µl Sondelösung wurde auf einen Objektträger pipettiert, dieser mit einem Deckglas versehen, mit DPX versiegelt und für mindestens 18 h bei 55 °C hybridisiert. Nach erfolgter Hybridisierung wurden die Deckgläser entfernt. Zur Entfernung der unspezifisch gebundenen Sonde wurden die Gehirnschnitte in dieser Reihenfolge gewaschen: 20 min in 4 x SSC bei RT, zweimal 10 min in 4 x SSC bei RT, 30 min in RNase-Lösung bei 37 °C, 15 min in 2 x SSC bei RT, 15 min in 1 x SSC bei RT, 15 min in 0,5 x SSC bei RT, 30 min in 0,1 x SSC bei 55 °C und 10 min in 0,1 x SSC bei RT.

### 2.9.7 Detektion

Die Gehirnschnitte wurden für je 5 min in 70% und 95% Ethanol entwässert. Nach dem Trocknen der Objektträger wurden Hybridisierungssignale auf den Gehirnschnitten durch Exposition mit Biomax-MR-Filmen (Kodak) detektiert.

## 2.10 Vertikale SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Zur Proteinauftrennung unter denaturierenden Bedingungen wurde in dieser Arbeit die vertikale SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) eingesetzt. Bei diesem Gelsystem werden Proteine in Gegenwart des anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) nach Anlegen einer Spannung zunächst in einem Sammelgel konzentriert, um dann in einem darunterliegenden Trenngel nach ihrer molekularen Masse in Richtung der Anode aufgetrennt zu werden. Der Acrylamid/Bisacrylamidgehalt des Trenngels bestimmt dabei die

Trenneigenschaften des Gels. In dieser Arbeit wurden 6, 8, 10 und 15%ige Proteingele zur Auftrennung von großen bis kleinen Proteinen eingesetzt.

Die Proteine wurden nach der Elektrophorese mit Hilfe einer Coomassie-Färbung nachgewiesen.

### 2.10.1 Puffer und Lösungen

#### SDS-Laufpuffer:

25 mM Tris-Base

192 mM Glycin

0,1% [w/v] SDS

#### 2x reduzierender Protein-Probenpuffer (rSB):

100 mM Tris pH: 6,8

4% [w/v] SDS

20% Glycerin

200 mM DTT

#### Sammelgellösung:

125 mM Tris pH: 6,8

5% [v/v] Acrylamid/Bisacrylamidmix

0,1% [w/v] SDS

#### Trenngellösungen:

375 mM Tris pH: 8,8

10–15% [v/v] Acrylamid/ Bisacrylamidmix

0,1% [w/v] SDS

Es wurde ein 29:1 Acrylamid/Bisacrylamidmix von Applichem verwendet.

Die Polymerisierung der Sammel- und Trenngele wurde durch Zugabe von 0,1% [w/v] Ammoniumpersulfat (APS) und 0,1% [v/v] N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) gestartet, sie nahm 30-60 min in Anspruch.

#### Coomassiefärbelösung:

50% [v/v] Ethanol

10% [v/v] Essigsäure

0,125% [w/v] Coomassie Blue R250

#### Entfärbelösung:

10% [v/v] Essigsäure

50% [v/v] Ethanol

### 2.10.2 Elektrophorese

Die Elektrophoresen wurden in Twin-Minigelkammern (Biometra) bei 20 mA pro Gel für etwa 90 min, bzw. in P10DS-Kammern (Owl) ü/N bei 65 Volt mit SDS-Laufpuffer durchgeführt. Der Aufbau der Apparaturen erfolgte nach den Angaben der Hersteller. Als

Längenstandard wurde bei allen Elektrophoresen die eingefärbte *PageRuler Prestained Ladder* von MBI Fermentas mitgeführt.

### 2.10.3 Coomassiefärbung von Proteingelen

Zur Anfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen wurden die Gele mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Dazu wurden die Gele für 30 min in Coomassie-Färbelösung unter Agitation inkubiert und anschließend solange in Entfärbelösung unter mehrfachem Austauschen der Lösung entfärbt, bis die Proteinbanden eindeutig zu identifizieren waren und der Hintergrund vollständig entfärbt war.

### 2.10.4 Trocknen von Proteingelen

Für die Lagerung der Proteingele wurden diese getrocknet und damit gleichzeitig dauerhaft auf Filterpapier fixiert. Dafür wurden die Gele auf Whatman 3MM-Filterpapier gelegt und mit Saran-Folie (Dow Chemicals) bedeckt. Das Trocknen der Gele erfolgte unter Vakuum für 1 h bei 75°C auf dem Gelrockner *DryGelSr Model SE1160* (Hoefer).

## 2.11 Western Blot-Analysen

Western Blot-Analysen erlauben den spezifischen Nachweis eines bestimmten Proteins in Proben, die zuvor über eine Gelelektrophorese aufgetrennt wurden. Dazu werden die Proteine in einem elektrischen Feld aus dem Gel auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran übertragen (Western Blot), welche dann mit spezifischen Antikörpern inkubiert werden kann. In dieser Arbeit wurden mit Hilfe Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper die gebundenen Erstantikörper mittels einer Chemilumineszenzreaktion nachgewiesen.

### 2.11.1 Puffer und Lösungen

#### Transfer-Puffer:

25 mM Tris-Base

192 mM Glycin

#### Ponceau S-Färbelösung

0,2% [w/v] Ponceau S

3% [v/v] Essigsäure

20% [v/v] Methanol

PBS-T

0,1% Tween 20 (Roth) in PBS

Block-Puffer:

5% [w/v] Magermilchpulver (Roth) in PBS

### 2.11.2 Western Blot

Der Proteintransfer von Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulose- oder PVDF-Membran erfolgte in einer vollständig mit Transferpuffer gefüllten *Trans-Blot-Cell*-Kammer (Biorad) für 1,5 h bei 100 Volt oder  $\ddot{u}$ /N bei 80 mA. Dazu wurde zunächst das Trenngel auf zwei mit Transferpuffer angefeuchtete Whatman 3MM-Papiere gelegt und mit einer auf Größe des Gels zurechtgeschnittenen Nitrocellulose-Membran luftblasenfrei bedeckt. Auf die Membran wurden weitere zwei Lagen Whatman-Papier gelegt, das Haltesystem der Transferkammer geschlossen und in die mit Transferpuffer gefüllte Kammer eingehängt.

Zur Kontrolle des Transfers wurden die Proteine auf den Nitrocellulosemembranen nach dem Western Blot für 5 min mit Ponceau S-Färbelösung angefärbt. Der Farbstoff lässt sich mit Wasser abwaschen.

### 2.11.3 Antikörperbindung und Detektion

Sämtliche im Folgenden beschriebenen Inkubationsschritte fanden unter leichter Agitation statt. Um die Proteinbindungskapazität der Membranen vollständig abzusättigen und damit eine unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden, wurde die Membran zunächst mit Block-Puffer für 1 h bei RT geblockt. Für Antikörper aus der Ziege wurde statt mit Block-Puffer mit Roti-Block (Roth) geblockt. Die anschließende Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte  $\ddot{u}$ /N bei 4°C. Die jeweilige Verdünnung des Erstantikörpers in PBS-T ist Tabelle 2.2 zu entnehmen. Nach viermaligem Waschen der Membran mit PBS-T für je 10 min erfolgte die einstündige Inkubation mit dem 1:10.000 in PBS-T verdünnten Peroxidase-gekoppelten Anti-Kaninchen-, Anti-Maus-, bzw. Anti-Ziege-Sekundärantikörper (alle von Vector Laboratories). Anschließend wurde wieder wie oben gewaschen und die Bindung der Antikörper mit einer Chemiluminiszenz-Reaktion nachgewiesen. Dazu wurden die Lösungen des *SuperSignal Pico-Kits* (Pierce) oder des *ECL-Kits* (Amersham) verwendet. Die

Lichtsignale wurden durch Exposition gegenüber einem Röntgenfilm für eine Sekunde bis zu 30 min detektiert.

## 2.12 Proteinkonzentrationsbestimmung

### 2.12.1 Methode nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in einer Lösung folgte der kolorimetrischen Methode nach Bradford (Bradford, 1976). Hierzu wurde 1  $\mu\text{l}$  der zu untersuchenden Lösung zu 799  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  gegeben, mit 200  $\mu\text{l}$  Bradford Reagenz (Biorad) gut gemischt und nach fünfminütiger Inkubation bei RT die Absorption bei 595 nm gemessen. Die Variabilität der Farbreaktion macht bei jeder Proteinmengenbestimmung das Erstellen einer Eichgerade mit definierten Proteinmengen notwendig. Dazu wurden 2, 4, 6, 8, 10, 14 und 20  $\mu\text{g}$  BSA Fraktion V (Sigma) unter den gleichen Bedingungen photometrisch vermessen. Die eingesetzte Proteinmenge wurde gegen die Absorption bei 595 nm aufgetragen und die zu bestimmende Proteinmenge mit Hilfe einer Regressionsgrade bestimmt. Befand sich die Proteinmenge außerhalb der Standards, wurde die Ausgangsmenge entsprechend angepasst.

### 2.12.2 Methode nach BCA

Da die Farbreaktion nach Bradford durch verschiedene Faktoren in der Proteinlösung, vor allem durch eine Reihe von Detergenzien, gestört wird, wurde eine alternative Methode nach BCA zur Bestimmung der Proteinmenge in einer Lösung mit Triton X-100 bzw. Natriumdeoxycholat eingesetzt. Dafür wurde 1  $\mu\text{l}$  der Proteinlösung zu 49  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  gegeben und mit 1 ml BCA Reagenz (Pierce) gut gemischt. Danach erfolgte eine dreißigminütige Inkubation bei 60 °C. Nach Abkühlen der Lösung wurde die Absorption bei 562 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde wie bei der Bradford-Methode mit Hilfe einer Eichgerade von BSA bestimmt.



## 2.13 Rekombinante Proteinexpression und Affinitätsaufreinigungen

Für die rekombinante bakterielle Expression von Fusionsproteinen mit einem Glutathion-S-Transferase-*tag* (GST-*tag*) wurde das Plasmid pGEX-4T-1 verwendet, welches eine N-terminale Fusion des zu exprimierenden Proteins mit GST erlaubt. Die Transkription steht bei pGEX-4T-1 unter dem Einfluß des starken *tac*-Promotors und des *lac*-Operators, an den das *lac*-Repressorprotein anbindet. Durch die Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid (IPTG) wird das Repressorprotein inaktiviert und die Transkription gestartet. GST-*tag* Proteine können durch Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose (Amersham Pharmacia) aufgereinigt werden.

### 2.13.1 Proteinexpression in *E. coli*

Für die rekombinante Expression von GST-Arc/Arg3.1-134-396 wurde das entsprechende Expressionsplasmid pGEX-4T-1-Arg3.1-134-396 in den *E. coli*-Stamm BL21 transformiert. Zwei Liter Bakterienkultur wurden 1:100 aus einer ü/N gewachsenen Vorkultur angeimpft und so lange kultiviert, bis die optische Dichte bei 600 nm 0,4 - 0,6 betrug. Danach wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Da die maximale Proteinausbeute bereits nach etwa 2,5 h erreicht war, konnten die Bakterien nach 2,5 h für 15 min bei 6000 rpm in einem GSA-Rotor (Sorvall) pelletiert werden.

### 2.13.2 Affinitätsaufreinigung von GST-*tag*-Proteinen

Die Bakterienpellets aus 2 l Kultur wurden in insgesamt 100 ml PBS resuspendiert. Durch Zugabe von 140 mg Lysozym (Roche) wurden die Bakterien für 30 min auf Eis lysiert. Zum vollständigen Aufschluß der Bakterien wurde die Suspension weiter an *Sonoplus* (Bandelin Electronics) 6 x 15 s bei einem Wirkungsgrad von 30 % mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C in einem SS34-Rotor abgetrennt. Zur Affinitätsaufreinigung der rekombinanten GST-Arc/Arg3.1-134-396 Proteine wurden sie an die Glutathion-Sepharose 4B immobilisiert. Hierfür wurde die Glutathion-Sepharose mit PBS äquilibriert, mit dem

löslichen Überstand des Bakterienlysats ü/N unter Invertieren bei 4 °C inkubiert, fünfmal mit 20 ml PBS gewaschen und viermal mit je 1 ml 10 mM reduziertem L-Glutathion in 50 mM Tris (pH 8,0) eluiert. Sämtliche Eluate wurden über SDS-PAGE zur Kontrolle der Aufreinigung überprüft und die Ausbeute mit Hilfe der Bradford-Methode bestimmt. Die Proteinlösung wurde bei 4 °C gelagert.

Zur Herstellung eines spezifischen polyklonalen Antiserums gegen Arc/Arg3.1 wurden von der Firma Biogens als Antigen den Kaninchen mit den aufgereinigten GST-Arc/Arg3.1-134-396 Proteinen immunisiert.

### 2.14 Herstellung von Gewebelysaten

#### HP-Puffer:

50 mM Tris pH:7,5

120 mM NaCl

0,5% [v/v] NP-40

Für Western Blot-Analysen wurden in dieser Arbeit Lysate aus Mausgehirnen hergestellt.

Mausgehirne wurden entweder direkt nach der Entnahme homogenisiert oder sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bis zur Verarbeitung bei -80°C gelagert. Die Gehirngewebe wurden mit einem Pestel in einem Dounce-Homogenisator (B. Braun) in HP-Puffer mit Protease-Inhibitoren und ggf. Phosphatase-Inhibitoren sorgfältig homogenisiert. Nach einer 6 x 15 s Ultraschallbehandlung wurde das Homogenat für 30 min bei 4°C inkubiert.

Die Proteinkonzentration in dem Homogenat wurde mit Hilfe der Bradford-Methode bestimmt.

### 2.15 Isolierung von postsynaptischen Dichten (PSD)

In dieser Arbeit wurden die synaptischen bzw. subsynaptischen Kompartimente mit Hilfe eines differentiellen Zentrifugationsprotokolls aus dem Vorderhirn von Mäusen fraktioniert.

### 2.15.1 Puffer und Lösungen

#### Homogenisierungspuffer:

4 mM HEPES pH: 7,4  
0,32 M Sucrose

#### Aufreinigungspuffer:

4 mM Tris pH: 8,1  
0,32 M Sucrose

#### Extraktionspuffer:

7 mM Tris pH: 8,1  
0,32 M Sucrose  
0,5% [v/v] Triton X-100

### 2.15.2 Homogenisierung und differentielle Zentrifugation

Die folgende Arbeit wurde auf Eis durchgeführt. Alle Lösungen waren auf 4 °C vorgekühlt. Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet, das Gehirn entnommen und das Zerebellum abgetrennt. Das Vorderhirn wurde sofort mit je 12 Pestel-Stößen in einem Dounce-Homogenisator in 5-6 ml Homogenisierungspuffer mit Protease-Inhibitoren und Phosphatase-Inhibitoren homogenisiert (H-Fraktion). Zellkerne und Zelltrümmer wurden für 10 min bei 1.000 g pelletiert. Das Pellet wurde im Homogenisierungspuffer aufgenommen und wie oben erneut homogenisiert und abzentrifugiert. Die zwei postnuklearen Überstände wurden vereint und bei 12.000 g für 15 min in einem SS-34-Rotor (Sorvall) zentrifugiert. Die grobe Fraktion von Synaptosomen als Pellet wurde mit Hilfe des Dounce-Homogenisators in 5-6 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert (P2-Fraktion) und erneut bei 12.000 g für 20 min zentrifugiert. Um die synaptosomalen Plasmamembranen zu isolieren werden die Synaptosomen durch einen hypoosmotischen Schock lysiert. Hierfür wurde das gewaschene grobe synaptosomale Pellet in 2 ml eiskaltem Wasser mit Protease-Inhibitoren und Phosphatase-Inhibitoren mit 3 Pestel-Stößen in einem Dounce-Homogenisator resuspendiert, in der Suspension durch Zugabe von 100 mM HEPES pH 7,4 eine Endkonzentration von 4 mM eingestellt und anschließend bei 4 °C für 30 min inkubiert. Die grobe Fraktion von synaptosomalen Plasmamembranen wurde durch eine zwanzigminütige Zentrifugation bei 25.000 g in einem SS-34-Rotor (Sorvall) pelletiert. Da diese Fraktion noch mit anderen zellulären Elementen kontaminiert war, wurde das Pellet im Aufreinigungspuffer mit

Protease-Inhibitoren und Phosphatase-Inhibitoren resuspendiert und über einen diskontinuierlichen Dichtegradienten weiter aufgereinigt.

### 2.15.3 Diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation zur Gewinnung einer reinen Fraktion von synaptosomalen Plasmamembranen (SPM-Fraktion)

In ein Ultrazentrifugenröhrchen wurden 10 ml 1,2 M-Sucrose-Lösung vorgelegt und diese nacheinander vorsichtig mit 10 ml 1,0 M-Sucrose-Lösung und 10 ml 0,85 M-Sucrose-Lösung überschichtet. Zur Aufreinigung reiner synaptosomalen Plasmamembranen aus dem in Aufreinigungspuffer resuspendierten 25.000 g-Pellet wurde die Fraktion vorsichtig über die 0,85 M-Sucrose-Lösung geschichtet und der Gradient bei 85.000 g in einem SW32Ti-Rotor (Beckman-Coulter) für 2 h ultrazentrifugiert. Die synaptosomalen Membranen reichern sich dabei als Interphase zwischen der 1,0 M- und der 1,2 M-Sucrose-Lösung an. Die synaptosomalen Plasmamembranen wurden mit einer Glaspipette vorsichtig in ein mit 10 ml Aufreinigungspuffer gefülltes Zentrifugenröhrchen überführt und für 30 min bei 32.000 g erneuert pelletiert. Um die postsynaptischen Dichten aus der SPM-Fraktion weiter zu isolieren wurde das Pellet im Extraktionspuffer mit 0,5% [v/v] Triton X-100 resuspendiert.

### 2.15.4 Triton X-100 Extraktion zur Isolierung von postsynaptischen Dichten (PSD)

Die postsynaptische Dichte ist ein struktureller Bereich der postsynaptischen Membran, der durch eine erhöhte Dichte unter dem Elektronenmikroskop charakterisiert ist. Biochemisch betrachtet, ist die PSD als ein subsynaptisches Kompartiment gegen Extraktion mit nicht-ionischen Detergenzien z. B. Triton X-100 resistent. Zur Isolierung von PSD wurde daher das SPM-Pellet in 6 ml Extraktionspuffer mit 0,5% [v/v] Triton X-100 sorgfältig resuspendiert und für 15 min unter invertieren inkubiert. Nach einer dreißigminütigen Zentrifugation bei 32.000 g wurde das Pellet (PSD-IT-Fraktion) erneut im Extraktionspuffer resuspendiert, für 15 min inkubiert und abzentrifugiert. Die PSD-IIT-Fraktion wurde dadurch pelletiert.

Alle Pellets wurden in kleinem Volumen von 50 mM HEPES pH 7,4, 2 mM EDTA mit Protease-Inhibitoren und Phosphatase-Inhibitoren mit Hilfe der Ultraschallbehandlung gut gelöst. Zur vollständigen Auflösung des PSD-IIT-Pellets wurde 0,2% [w/v] SDS zugesetzt.

Die Proteinkonzentration in allen Fraktionen wurde mit Hilfe der BCA-Methode bestimmt und über Western Blot-Analyse auf spezifische Proteine untersucht.

## 2.16 *In vivo* Immunpräzipitation aus Gehirnlisat

Die Immunpräzipitation eines bestimmten Proteins aus dem Gehirnlisat (*in vivo*) wurde in dieser Arbeit in der Kombination mit Western Blot-Analyse zur Identifizierung der Assoziation von Proteinen in einem bestimmten Proteinkomplex angewendet.

### 2.16.1 Puffer

#### 1% DOC Extraktionspuffer:

50 mM Tris pH: 9,0

1 % Natriumdeoxycholat

20  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>

#### 2x nicht reduzierender Probenpuffer (nrSB):

100 mM Tris pH: 6,8

4 % [w/v] SDS

20 % Glycerin

### 2.16.2 Immunpräzipitation

Die folgende Arbeit wurde auf Eis durchgeführt. Alle Lösungen wurden auf 4 °C vorgekühlt. Für die Immunpräzipitation wurde das Vorderhirn mit 12 Pestel-Stößen in einem Dounce-Homogenisator in 10 ml 1% DOC Extraktionspuffer mit Protease-Inhibitoren und Phosphatase-Inhibitoren homogenisiert und für 1 h auf Eis lysiert. Gewebetrümmer wurden bei 30.000 rpm für 30 min abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu 10 mg Gehirnlisat wurden 5  $\mu$ g eines Antikörpers bzw. 5  $\mu$ l eines Antiserums zur spezifischen Immunpräzipitation zugegeben. Die Antikörperbindung erfolgte 1 h unter ständiger Agitation. Zum Präzipitieren der Antikörper und der von ihnen gebundenen Proteine wurde Protein G-Agarose (Upstate) verwendet. Die Agarose wurde 1 h unter Agitation mit dem Lysat gekoppelt, für 1 min bei 13.000 rpm pelletiert und viermal mit 1 ml Extraktionspuffer gewaschen. Die Elution der Immunkomplexe von der Agarose erfolgte 5 min bei 95 °C mit 2 x rSB bzw. 2 x nrSB. Die so präzipitierten Proteine wurden dann über Western Blot analysiert.

## 2.17 Immunhistochemie

### 2.17.1 Lösungen

Blockierlösung:

10% Pferdeserum

0,2% BSA

in PBS

Carrier:

1% Pferdeserum

0,2% BSA

in PBS

### 2.17.2 Perfusion von Mäusen

Die Mäuse wurden mit CO<sub>2</sub> betäubt und auf der Bauchseite aufgeschnitten. Das Herz wurde freigelegt. Eine Kanüle wurde von unten durch die linke Herzkammer in die Kopfaorta geschoben und mit einer Klemme festgesteckt. Durch die Kanüle wurde 0,01% Heparin in PBS in den Blutkreislauf der Maus gepumpt. Ein Schnitt in den rechten Vorhof verhinderte das Aufstauen der Heparinlösung im Herzen. Nachdem etwa 80 ml Heparinlösung durchgespült wurde, wurde eine 4%ige Paraformaldehydlösung pH 7,4 an die Pumpe angeschlossen, hiervon wurden 150 ml für die Perfusion eingesetzt. Das so fixierte Gehirn wurde präpariert und ü/N in 4% Paraformaldehyd nachfixiert.

### 2.17.3 Präparation von Gehirndünnschnitten

Die Herstellung von Gehirnschnitten für die Immunhistochemie erfolgte mit dem Vibratom *VT1000S* (Leica). Die in 4% PFA gelagerten Gehirne wurden in 2% Agarose eingebettet, mit Sekundenkleber auf dem Vibratomteller fixiert und so in 30-40 µm dicke Schnitte geschnitten. Die Gehirnschnitte wurden in PBS bei 4 °C bis zu einer Woche gelagert.

### 2.17.4 Immunhistochemische Färbungen mit DAB

Alle Schritte für immunhistochemische Färbungen erfolgten bei RT unter ständiger Agitation, wobei die Gehirnschnitte frei in der jeweiligen Lösung schwimmen konnten (*free floating*).

Die fixierten Gehirnschnitte wurden viermal je 5 min mit PBS gewaschen, durch eine Alkoholinkubation von jeweils 5 min in 10%, 20%, 40%, 20% und 10% Ethanol permeabilisiert und wieder mit PBS gewaschen. Die endogenen Peroxidasen wurden durch dreißigminütige Inkubation in einer 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung inaktiviert. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS wurden die Schnitte für 60 min mit Blockierlösung inkubiert, danach erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper in der jeweiligen in Tabelle 2.2 angegebenen Verdünnung im Carrier ü/N. Die Schnitte wurden viermal mit PBS gewaschen und 1 h mit dem 1:1.000 im Carrier verdünnten Biotin-gekoppelten Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (Vector Laboratories) inkubiert. Die Schnitte wurden viermal mit PBS gewaschen und 90 min mit den vorinkubierten Komponenten A und B aus dem *ABC-Elite Kit* (Vector) inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS und dreimaligem Waschen mit 50 mM Tris pH 7,6 wurden die Schnitte mit der DAB-Färbelösung (Sigma) inkubiert. Die Färbereaktion wurde unter der Stereolupe (Zeiss) beobachtet und durch Waschen mit 50 mM Tris pH 7,6 gestoppt. Die Schnitte wurden dann auf Objektträger aufgezogen, luftgetrocknet und mit DPX eingedeckelt.

## 2.18 Tierversuche

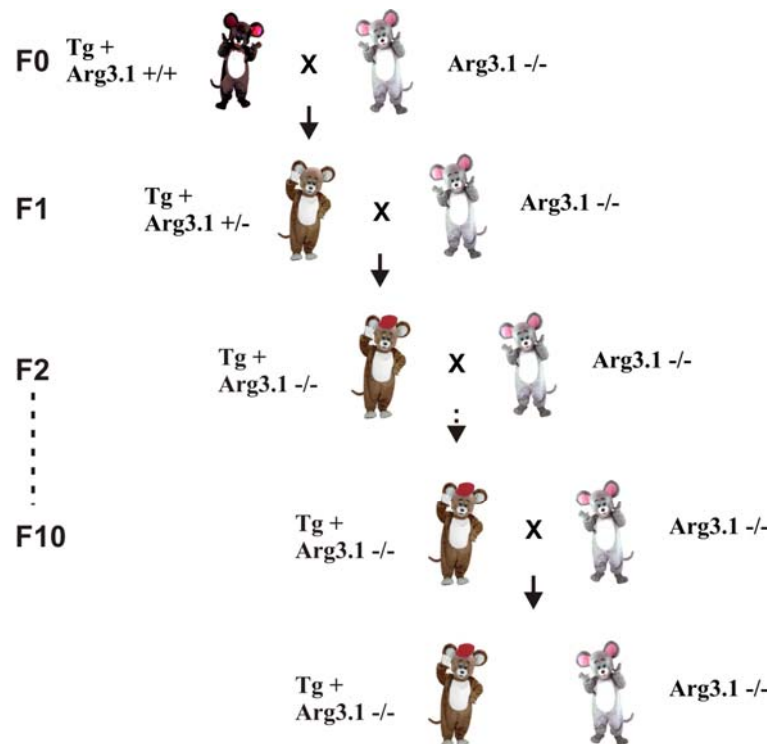
Die Tierversuche wurden von dem Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit der Stadt Berlin (G0241/02) genehmigt.

### 2.18.1 Induktion von epileptischen Anfällen

Zur Induktion von generalisierten epileptischen Krämpfen wurden den Mäusen Kainat (25 mg/kg) intraperitoneal injiziert. Kontrolltieren wurde das gleiche Volumen an isotonischer Salzlösung injiziert. Zu bestimmten Zeitpunkten nach Auslösung des epileptischen Anfalls wurden die Versuchstiere je nach anschließender Methodik A) dekapitiert, das gesamte Gehirn bzw. beide Hippokampi und Kortex-Hemisphären präpariert, sofort weiterbehandelt oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert, oder B) intrakardial perfundiert und anschließend die Gehirne präpariert und bei 4 °C in 4% PFA fixiert.

### 2.18.2 Mauszucht

Die Züchtung der Mauslinien folgte den Richtlinien der Banbury Konferenz (Banbury Conference, 1997). Die transgenen Mäuse Tg(ARG-zif3UTR) wurden mit den homozygot Arc/Arg3.1-defizienten Mäusen so oft verpaart, bis sich das Transgen in dem genetischen Hintergrund von Arc/Arg3.1<sup>-/-</sup> befand. Die Verpaarungsstrategie ist in Abbildung 2.1 skizziert. Die Mauszucht wurde am FEM in Berlin durchgeführt.



**Abbildung 2.1: Verpaarungsstrategie zur Generierung einer kongenen Tg(ARG-zif3UTR)-Linie im Arc/Arg3.1<sup>-/-</sup>-Hintergrund.**

Die Founder-Mäuse wurden direkt mit den homozygot Arc/Arg3.1-defizienten Tieren verpaart, die den genetischen Hintergrund der Inzuchtlinie C57Bl6/J besaßen. In der F2-Generation bekam ich tg-Mäusen im Arc/Arg3.1<sup>-/-</sup>-Hintergrund. Um eine kongene Tg(ARG-zif3UTR)-Linie mit einem einheitlichen genetischen Hintergrund für die funktionellen Analysen vorzubereiten, wurde die F2-Generation weiter über zehn Generationen in die Arc/Arg3.1<sup>-/-</sup>-Tiere rückgekreuzt.



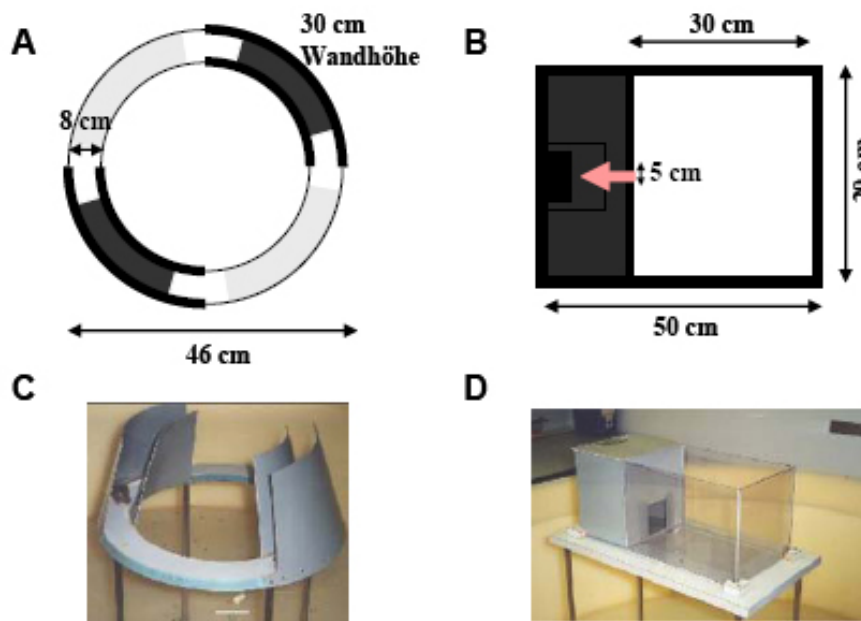
### 2.18.3 Verhaltensbiologische Experimente

#### 2.18.3.1 Hell/ Dunkel-Kammer

Der Aufbau der Kammer ist in Abbildung 2.2 B und D gezeigt. Das helle Kompartiment wurde mit 500 Lux beleuchtet. Die Wände waren 20 cm hoch, der Durchgang zum dunklen Kompartiment 5 cm breit und 7,5 cm hoch. Die Tiere wurden in die Mitte des hellen Kompartiments gesetzt und für 10 min per Video beobachtet.

#### 2.18.3.2 *Elevated O-Maze*

Der Aufbau der Apparatur ist in Abbildung 2.2 A und C gezeigt. Die Tiere wurden einmalig in einen der geschlossenen Sektoren gesetzt und per Video für 10 min beobachtet.



**Abbildung 2.2:** Aufbau der Hell/Dunkel-Kammer und des *Elevated O-maze*.

Skizzierter Aufbau (B, A) und Photodokumentation (D, C) der Hell/Dunkel-Kammer und des *Elevated O-maze*.

### 2.18.3.3 *Novel Object Recognition (NO)*

In der zweitägigen Habituationsphase ließ ich die Versuchstiere jeweils für 20 min pro Tag eine oben offene Arena ohne Objekte explorieren. Für die folgenden Experimente wurden vier aus Legosteinen konstruierte, in Form und Farbe unterschiedliche Objekte verwendet. Zunächst wurden drei Objekte in der Arena auf eine feste Position installiert. In der anschließenden zweitägigen Trainingsphase wurden die Mäuse jeweils zweimal am Tag für je 10 min in die Arena eingesperrt, damit sie die Objekte erkunden konnten. In der Pause zwischen den zwei Explorationstrainings pro Tag wurden die Tiere für 10 min im Heimkäfig gehalten. Nach dem letzten Training wurden die Tiere aus der Arena in den Heimkäfig zurückgesetzt. Ein Objekt wurde durch das vierte Objekt ausgetauscht, wobei die Positionen der Objekte unverändert blieben. 10 min bzw. 24 h nach dem letzten Training wurden die Mäuse erneut in die nun veränderte Arena eingesperrt und ihr Explorationsverhalten gegenüber den bekannten Objekten und dem neuen Objekt während einer zehnminütigen Testphase mit der Videokamera *WV-BP 330/G* (Panasonic) aufgenommen und später mit Hilfe der Software *EthoVision 2.14* ausgewertet. Der experimentelle Verlauf ist in Abbildung 2.3 A skizziert.

### 2.18.3.4 Kontextabhängige Angstkonditionierung

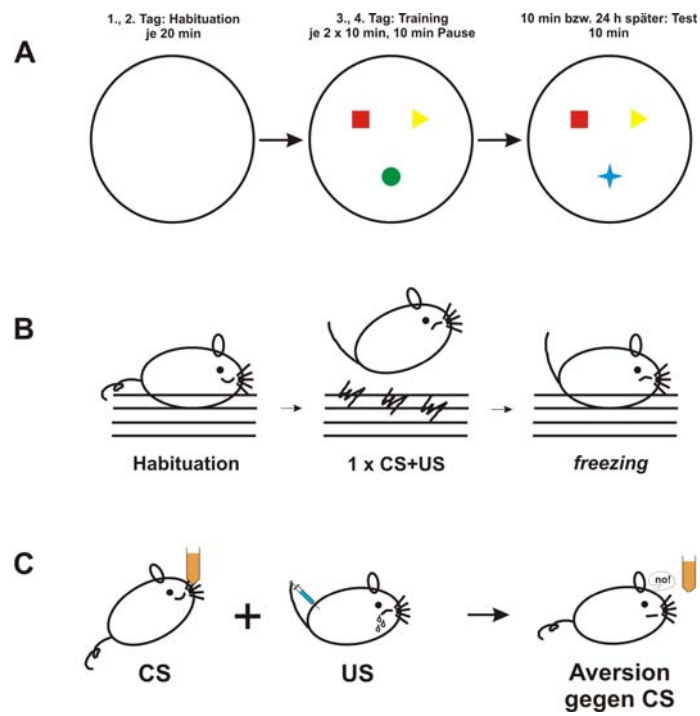
Zur Akquisition wurde ein Tier in die Konditionierungskammer (Box A, 25 x 17 x 23 cm, Gitter-Boden, schwache Beleuchtung; MadeAssociates) gesetzt und nach einer 2-minütigen Explorationsphase mit einer einmaligen überlappenden Ton/Elektroschock-Paarung konfrontiert. Diese Paarung bestand aus einem 20-sekundigen Ton (10 kHz, 70 dB) und einem 2-sekundigen Elektroschock (0,5 mA) am Fuß durch den Gitter-Boden. Nach dieser Konditionierung wurde die Maus für weitere 30 sec in der Konditionierungskammer gehalten, bevor sie in den Heimkäfig zurückgesetzt wurde. Das Tier wurde 24 h bzw. 2 w nach der Akquisition erneut in die Konditionierungskammer gesetzt. Als Indikator für das kontextabhängige Angstgedächtnis wurde das *freezing*-Verhalten (absolute Bewegungslosigkeit) der Maus während einer 2-minütigen Phase mit einer Videokamera aufgenommen und später mit Hilfe der Software *EthoVision 2.14* ausgewertet. Das gesamte Protokoll ist in Abbildung 2.3 B skizziert.

#### 2.18.3.5 *Conditioned Taste Aversion (CTA)*

Während des gesamten Experiments erhielten die Versuchstiere täglich nur zweimal, am Vormittag (9 Uhr) und am Nachmittag (16 Uhr), Flüssigkeit zum Trinken. In der 1-wöchigen Habituationsphase gewöhnten sich die Mäuse an den experimentellen Trink-Rhythmus, wobei sie zweimal am Tag für jeweils 20 min aus zwei am Ende abgeschnittenen, mit Wasser gefüllten 15 ml-Falconröhrchen trinken konnten. Zur Kontrolle wurde die täglich von den Tieren konsumierte Menge Wasser registriert. Am Tag der Konditionierung wurden die Mäuse am Vormittag mit einer 0,5%igen Saccharinlösung in einem Falconröhrchen versorgt und 1 h später erhielten sie eine intraperitoneale Injektion von 2% des Körpergewichts entsprechendem 0,14 M Lithiumchlorid bzw. 0,9% Natriumchlorid. Am Nachmittag wurden sie wieder mit Wasser versorgt. 24 h, 48 h bzw. 2 w nach der Konditionierung wurden den Tieren zur Trink-Wahl ein Röhrchen mit Saccharinlösung und ein Röhrchen mit Wasser zur Verfügung gestellt. Die von den Tieren konsumierten Mengen Saccharinlösung und Wasser wurden gemessen. Als Indikator für die Aversion gegen den konditionierten Geschmack wurde der Anteil der Saccharinlösung an der gesamten Flüssigkeit-Konsumption ausgewertet. Die Konditionierung ist in Abbildung 2.3 C skizziert.

#### 2.18.3.6 Statistik

Für die Vergleiche der drei Genotypen wurde der ANOVA-Test angewendet, während die Vergleiche von zwei Gruppen mittels des t-tests erfolgten. Zur Berechnung wurde die statistische Software Sigmastat verwendet.



**Abbildung 2.3:** In dieser Arbeit verwendete Lernparadigmen.

(A) Protokoll der *Novel Object Recognition*.

(B) Verlauf der kontextabhängigen Angstkonditionierung.

(C) Konditionierungsparadigma in *Conditioned Taste Aversion*.

CS, konditionierter Stimulus; US, nicht-konditionierter Stimulus.