

3. Ergebnisse

3.1	Herstellung der transgenen Mauslinien Tg(ARG-zif3UTR) mit genetisch modifiziertem Arc/Arg3.1-PAC	57
3.1.1	Beschreibung des verwendeten <i>shuttle vectors</i> pARG-zif3UTR	58
3.1.2	Austausch der 3'UTR-Sequenz im Arc/Arg3.1-PAC durch die 3'UTR-Sequenz des <i>egr1/zif268</i> -Gens mittels homologer Rekombinationen in <i>E. coli</i>	59
3.1.3	Herstellung von transgenen Mäusen mittels pronukleärer Injektion	62
3.1.4	Genotypische Identifizierung der transgenen Mäuse Tg(ARG-zif3UTR)	62
3.1.5	Verpaarung der transgenen Mäuse Tg(ARG-zif3UTR) in den Arc/Arg3.1-Knockout-Hintergrund	64
3.2	Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen der transgenen Arc/Arg3.1-Expression	65
3.2.1	In Tg(ARG-zif3UTR)-Mäusen ist die dendritische Translokation der transgenen Arc/Arg3.1-mRNA durch die Mutation verhindert	66
3.2.2	In Tg(ARG-zif3UTR)-Mäusen ist trotz abwesender mRNA das Arc/Arg3.1-Protein in den Dendriten anwesend	70
3.2.3	Sowohl in Tg(ARG-zif3UTR)- als auch in Wildtyp-Mäusen ist das Arc/Arg3.1-Protein in der PSD angereichert	73
3.2.4	Ähnlich große Menge Arc/Arg3.1-Protein ist in Tg(ARG-zif3UTR)-Mäusen und in Wildtyp-Mäusen exprimiert	74
3.2.5	In Tg(ARG-zif3UTR)-Mäusen ist das Arc/Arg3.1-Protein wie in Wildtyp-Mäusen physisch mit PSD-95/SAP90 assoziiert	77

3. Ergebnisse

3.3	Verhaltensuntersuchungen der Tg(ARG-zif3UTR)-Mauslinie	81
3.3.1	Verlust des hippocampusabhängigen Langzeit-Gedächtnisses im Test für „ <i>novel object recognition</i> “ (NO) in Tg(ARG-zif3UTR)-Mäusen	82
3.3.2	Reduziertes intermediäres Gedächtnis und unbeeinträchtigt Langzeit-Gedächtnis während der Konsolidierung des kontextabhängigen Angstgedächtnisses in Tg(ARG-zif3UTR)-Mäusen	84
3.3.3	Unverändertes implizites Langzeit-Gedächtnis im Test für „ <i>conditioned taste aversion</i> “ (CTA) in Tg(ARG-zif3UTR)-Mäusen	88
3.3.4	Allgemeine Ängstlichkeit der Tg(ARG-zif3UTR)-Mäuse bleibt unverändert	91

Unter den aktivitätsregulierten Genen zeigt Arc/Arg3.1 die Einzigartigkeit, dass dessen mRNA und Protein dendritisch lokalisiert sind und diese dendritische Lokalisation durch synaptische Aktivität reguliert wird. Die dendritische Lokalisation der Arc/Arg3.1-mRNA nach synaptischer Stimulation lässt vermuten, dass das Protein lokal an aktivierten Synapsen synthetisiert wird und zu synapsenspezifischen Modifikationen beitragen kann (Link et al., 1995; Steward et al., 1998; Kuhl und Skehel, 1998). In den komplett Arc/Arg3.1-defizienten Mäusen, die in unserem Labor hergestellt wurden, ist die Konsolidierung von den langzeitigen Formen der synaptischen Plastizität (LTP und LTD) im Hippokampus und die Konsolidierung von den diversen Formen des Langzeit-Gedächtnisses schwer beeinträchtigt (Plath et al., 2006). Um den Beitrag der dendritischen Translation der Arc/Arg3.1-mRNA zur gesamten neuronalen Arc/Arg3.1- Expression und die Beteiligung von dem dendritisch synthetisierten Arc/Arg3.1-Protein an aktivitätsabhängigen synapsenspezifischen Veränderungen sowie der Gedächtnisbildung untersuchen zu können, wurde eine transgene Mauslinie hergestellt, in der die Translokation von Arc/Arg3.1-mRNA in die Dendriten durch genetische Modifizierung von der 3'UTR-Sequenz des Arc/Arg3.1-Transkripts komplett verhindert wurde. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden diese transgenen Mäuse im Rahmen einer multidisziplinären Studie analysiert. Diese sollte einen umfassenden Einblick geben in die phänotypischen Veränderungen, die aus der Blockierung der dendritischen Translokation von Arc/Arg3.1-mRNA resultieren. Neben der ausführlichen molekularbiologischen und biochemischen Charakterisierung wurden die Tiere auch verhaltensbiologisch untersucht.

3.1 Herstellung der transgenen Mauslinien Tg(ARG-zif3UTR) mit genetisch modifiziertem Arc/Arg3.1-PAC

Als aktivitätsreguliertes Gen zeigt die neuronale Expression von Arc/Arg3.1 ein streng reguliertes räumliches und zeitliches Muster, das von dem Promoter des Arc/Arg3.1-Gens abhängig ist. Um die Aktivität des Arc/Arg3.1-Promoters für die *in vivo* Expression vom Arc/Arg3.1-Transgen zu erhalten, haben wir uns entschlossen, das Arc/Arg3.1-PAC genetisch zu modifizieren und als Transgen zu verwenden (Heintz, 2001). *P1-derived Artificial Chromosomes* (PACs) enthalten genomische DNA-Fragmente bis zu einer Länge von 300 kb. Mit großer Wahrscheinlichkeit sind in so einem Fragment alle zur spezifischen Expression eines Gens notwendigen Elemente vorhanden. Aus einer murinen PAC-Bibliothek (RZPD)

wurde ein PAC-Klon als Arc/Arg3.1-PAC von Dr. Görlich D. (AG Kuhl) identifiziert und charakterisiert, in dem das Arc/Arg3.1-Gen durch 50 kb 5'-regulatorische Sequenzen und 30 kb 3'-regulatorische Sequenzen eingefasst ist. Die Länge dieser Flanken sollte die spezifisch räumliche und zeitliche *in vivo* Expression eines Arc/Arg3.1-Transgens gewährleisten. Die weiteren Arbeiten zur Herstellung von den Tg(ARG-zif3UTR)-Mäusen wurden auf Basis dieses Arc/Arg3.1-PACs durchgeführt.

Die 3' nichttranslatierte Region (3'UTR) enthält in vielen dendritisch lokalisierten mRNAs *cis*-agierende Elemente, die für das dendritische Targeting der entsprechenden mRNA zuständig sind (Blichenberg et al., 1999; Mori et al., 2000; Miller et al., 2002). Studien von Kobayashi et al. (2005) schlagen vor, dass zwei solche Elemente auch in der 3'UTR von Arc/Arg3.1 enthalten sein könnten. Um die dendritische Translokation der Arc/Arg3.1-mRNA zu verhindern, haben wir beschlossen, die 3'UTR-Sequenz des Arc/Arg3.1-Gens durch die des *egr1/zif268*-Gens auszutauschen. *Egr1/zif268* ist ein gut charakterisierter neuronaler Transkriptionsfaktor und gehört wie Arc/Arg3.1 zu den IEGs, deren Expression sehr früh nach synaptischer Aktivität angeschaltet wird. Im Gegensatz zur Arc/Arg3.1-mRNA verbleibt die *egr1/zif268*-mRNA im Soma der aktivierten Neuronen und wird nicht in die Dendriten transportiert. Darüber hinaus zeigt die genomische Organisation des *egr1/zif268*-Gens eine große Ähnlichkeit mit der des Arc/Arg3.1-Gens.

3.1.1 Beschreibung des verwendeten *shuttle vectors* pARG-zif3UTR

Da die PACs große genomische DNA-Fragmente tragen, sind die gängigen Klonierungsstrategien für die Konstruktion von Plasmid-DNA nicht geeignet für die genetische Manipulation von PACs. Hierfür wurde in dieser Arbeit ein Rekombinationssystem verwendet, das im Labor von Prof. Heintz N. entwickelt wurde (Yang et al., 1997) und auf der gesteuerten homologen Rekombination von DNA in *E. coli* basiert (siehe Kapitel 2.6 in „Material und Methoden“).

Der für den Austausch von 3'UTR im Arc/Arg3.1-PAC konstruierte *shuttle vector* ist wie folgt aufgebaut: Ein homologer Arm (Arm-A) hat eine Länge von 723 bp, der von der Position +469 bp bis zu einschließlich dem Stop-Codon (+1191) im offenen Leserahmen des Arc/Arg3.1-Gens reicht. Der andere homologe Arm (Arm-B) besteht aus 900 bp in der 3'-

flankierenden Region des Arc/Arg3.1-Gens und erstreckt sich von der XhoI-Erkennungssequenz bei Position +3301 bp, unmittelbar nach dem Polyadenylierung-Signal, bis zur Position +4201. Die 3'UTR-Sequenz von +1192 bp bis +3300 bp im Arc/Arg3.1-Gen ist im *shuttle vector* ersetzt durch die 3'UTR-Sequenz des *egr1/zif268*-Gens einschließlich des Polyadenylierung-Signals von +1603 bp bis +2817 bp mit einer Länge von 1215 bp. Als Vektorrückgrat wurde der pSV1-Vektor verwendet, der die bakterielle Rekombinase A und die Selektionsmarker enthält. Das Arc/Arg3.1-PAC nach der homologen Rekombination ist in Abbildung 3.1 B dargestellt.

3.1.2 Austausch der 3'UTR-Sequenz im Arc/Arg3.1-PAC durch die 3'UTR-Sequenz des *egr1/zif268*-Gens mittels homologer Rekombinationen in *E. coli*

Die gezielte PAC-Modifizierung wurde nach dem in Abbildung 3.1 A dargestellten Schema durchgeführt. Durch Elektroporation wurde der *shuttle vector* pARG-zif3UTR in die rekombinationsdefizienten *E. coli*-Zellen (DH10beta) transformiert, die das Arc/Arg3.1-PAC enthalten. Die dadurch eingeführte bakterielle Rekombinase A bewirkte dann die Rekombination zwischen homologen DNA-Sequenzen. Nach dem ersten Schritt wurde der gesamte *shuttle vector* durch die homologe Rekombination an einem von den beiden homologen Armen in das Arc/Arg3.1-PAC integriert. Die sogenannten Cointegrenten wurden durch die erworbene Tetracyclin-Resistenz selektiert. Mittels Southern-Hybridisierung mit spezifischen Sonden komplementär zu den beiden homologen Armen konnten von zwanzig PAC-Klonen vier PAC-Klone als positive Cointegrenten identifiziert werden. In allen vier PAC-Klonen erfolgte die Integration des *shuttle vectors* in das Arc/Arg3.1-PAC über den homologen Arm-A (Daten nicht gezeigt). Alle vier Cointegrenten wurden nach dem oben genannten Schema weiter bearbeitet. Durch das zweite Ereignis der homologen Rekombination an dem anderen homologen Arm wurde das Rückgrat des *shuttle vectors* aus dem Cointegrenten ausgeschnitten, dadurch wurde das modifizierte Arc/Arg3.1-PAC von dem Cointegrenten aufgelöst. Da das aufgelöste Arc/Arg3.1-PAC auch die Tetracyclin-Resistenz verlor, konnte es aufgrund seiner Tetracyclin-Sensitivität mit Fusarinsäure selektiert werden. Mehrere PAC-Klone wurden mittels Southern-Analyse mit einer spezifischen Sonde komplementär zur *egr1/zif268*-3'UTR als aufgelöste und modifizierte Arc/Arg3.1-PAC-Klone identifiziert (Daten nicht gezeigt). Der Austausch der 3'UTR-Sequenz des Arc/Arg3.1-

Gens durch die des *egr1/zif268*-Gens in drei ausgesuchten positiven Arc/Arg3.1-PAC-Klonen wurde mit Hilfe einer Reihe von PCR-Ansätzen mit verschiedenen Primerpaaren verifiziert (Daten nicht gezeigt). Die Ähnlichkeit der Restriktionsmuster der modifizierten Arc/Arg3.1-PAC-Klone nach dem Verdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen mit den Restriktionsmustern des Wildtyp-Arc/Arg3.1-PACs hat ein mögliches Rearrangement der genomischen DNA im Arc/Arg3.1-PAC während der PAC-Modifizierung ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt). Die gesamte DNA-Sequenz in dem modifizierten Bereich von einem der positiven Arc/Arg3.1-PAC-Klone wurde durch Sequenzierung von PCR-Produkten durchgehend überprüft. Der Austausch der 3'UTR-Sequenz in diesem PAC-Klon wurde gemäß der Sequenzierungen bestätigt. Die Sequenz des offenen Leserahmens des Arc/Arg3.1-Gens hat sich als korrekt erwiesen. In der 3'UTR-Sequenz des *egr1/zif268*-Gens sind zwei Punktmutationen festzustellen, nämlich von Nukleotid C1712 zu A1712 und von Nukleotid A2797 zu G2797. Die Mutationen könnten auch durch die PCR-Reaktion erzeugt worden sein. Nach der ausführlichen Sequenz-Analyse dieses PAC-Klons entschlossen wir uns, dies modifizierte Arc/Arg3.1-PAC – Arc/Arg3.1-*egr1/zif268*3'UTR-PAC als transgenes Konstrukt in die Zygote der Maus zu injizieren.

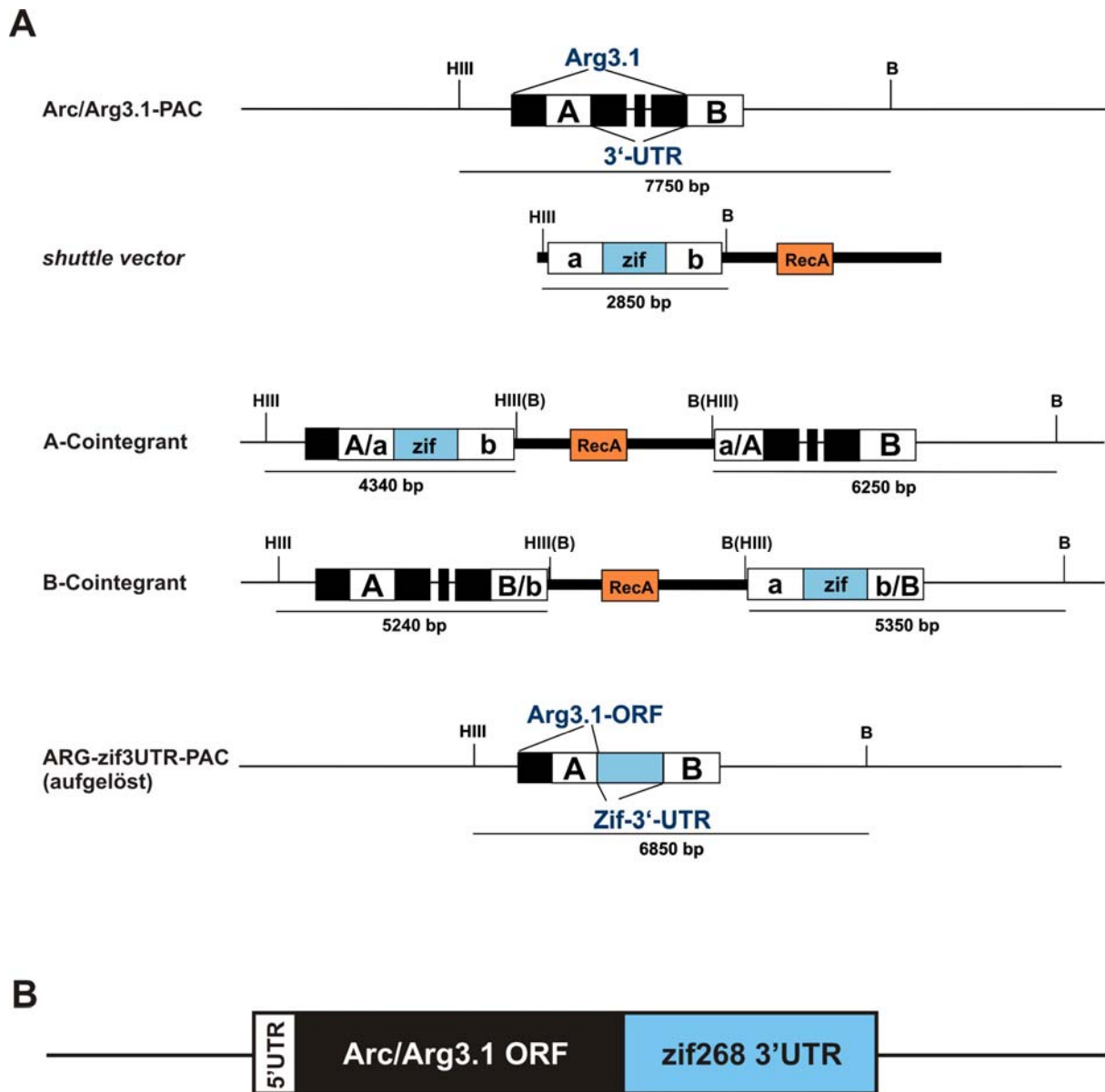


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der genetischen Modifizierung des Arc/Arg3.1-PACs.

(A) Das Arc/Arg3.1-PAC wird über zwei Schritte der homologen Rekombination in *E. coli* genetisch modifiziert. Nach der ersten homologen Rekombination an einem homologen Arm entstehen die Cointegranen durch die Integration des gesamten *shuttle vectors* ins Arc/Arg3.1-PAC. Das modifizierte Arc/Arg3.1-PAC wird dann durch eine zweite homologe Rekombination an dem anderen homologen Arm aufgelöst. Homolog rekombinierte Klone können durch PAC-DNA-Verdau mit den Restriktionsenzymen HindIII und BamHI und anschließende Southern Blot-Analyse mit den DIG-markierten Sonden identifiziert werden. Abkürzungen: HIII: HindIII-Erkennungssequenz; B: BamHI-Erkennungssequenz; ORF: offener Leserahmen; UTR: nichttranslatierte Region; RecA: bakterielle Rekombinase A; A/a: homologer Arm-A; B/b: homologer Arm-B.

(B) Bei der Modifizierung wird die 3'UTR-Sequenz von Arc/Arg3.1 deletiert und durch die 3'UTR-Sequenz des *egr1/zif268*-Gens ersetzt.

3.1.3 Herstellung von transgenen Mäusen mittels pronukleärer Injektion

Zur Herstellung von transgenen Mäusen wird das transgene DNA-Konstrukt in den männlichen Vorkern einer befruchteten Eizelle mit Hilfe einer Mikropipette injiziert (Abbildung 3.2 A). Für die pronukleäre Injektion wurde Arc/Arg3.1-egr1/zif2683'UTR-PAC durch alkalische Lyse und anschließende Cäsiumgradientenzentrifugation präpariert und aufgereinigt. Nur die intakte zirkuläre PAC-DNA wurde für die Mikroinjektion verwendet. Die Mikroinjektion wurde im Rahmen einer Kooperation im Labor von Dr. Hermans-Borgmeyer I. am Institut für Entwicklungsneurobiologie in Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH) durchgeführt. Das transgene PAC-Konstrukt wurde in insgesamt 153 Spender-Zellen (Hybrid-Zygoten von C57Bl6/J und CBA Mausstämmen) injiziert. Die Zygoten wurden dann in den Uterus von fünf scheinträchtigen Weibchen (Ammenmütter) transferiert. Es wurden 74 Jungtiere (48% von den injizierten Zygoten) geboren.

Die transgene PAC-DNA wurde nach der Mikroinjektion zufallsbedingt ins Genom der Zygote integriert. Da PACs ein großes transgenes Konstrukt darstellen, ist die Effizienz der genomischen Integration der PACs gering. Unter den 74 *Founder*-Tieren wurden zwei gemäß der etablierten PCR zur Genotypisierung als positiv transgene Mäuse identifiziert. Die Effizienz der genomischen Integration des transgenen PACs betrug ca. 2,7%. Aus dem gleichen Grund kann erfahrungsgemäß nur eine Kopie von PACs genomisch integriert werden. Ebenso sind die Einflüsse des Genoms am Integrationsort auf die transgene Expression ausgeschaltet, da das transgene PAC sämtliche regulatorische Sequenzen und alle Insulator-Sequenzen trägt, die es von diesen Einflüssen abschirmen (Giraldo und Montoliu, 2001).

3.1.4 Genotypische Identifizierung der transgenen Mäuse Tg(ARC-zif3UTR)

Um die Mäuse zu identifizieren, die das transgene Arc/Arg3.1-egr1/zif2683'UTR-PAC im Genom tragen, wurden PCR-Reaktionen zur Genotypisierung genomischer DNA etabliert (Abbildung 3.2 B), wobei ein Vorwärtsprimer P1 aus dem offenen Leserahmen des Arc/Arg3.1-Gens und zwei Rückwärtsprimer, einer (P2) aus 3'UTR des egr1/zif268-Gens, der andere (P3) aus 3'UTR des Arc/Arg3.1-Gens, in einer PCR-Reaktion eingesetzt wurden.

Das Endogen von Arc/Arg3.1 ergibt ein Signal bei 520 bp und das Transgen zeigt ein Signal bei 750 bp. Somit lässt sich das Transgen vom endogenen Arc/Arg3.1 unterscheiden. Wildtyp (Arc/Arg3.1^{+/+})-Hintergrund und heterozygot Arc/Arg3.1-defizienter (Arc/Arg3.1^{+/-}) Hintergrund sind bei dieser PCR-Reaktion jedoch nicht auseinanderzuhalten. Wenn wir aber die GenotypisierungsPCR für die Arc/Arg3.1-defiziente Mauslinie mit den Primern Pa, Pb und Pc zusätzlich zu der oben genannten PCR einsetzen, können alle möglichen genetischen Kombinationen bezüglich der zwei endogenen Arc/Arg3.1-Allele und der einen transgenen Arc/Arg3.1-egr1/zif2683'UTR-Kopie differenziert werden. Die Genotypen wurden teilweise mittels Southern Blot-Analyse genomischer DNA überprüft und bestätigt (Daten nicht gezeigt).

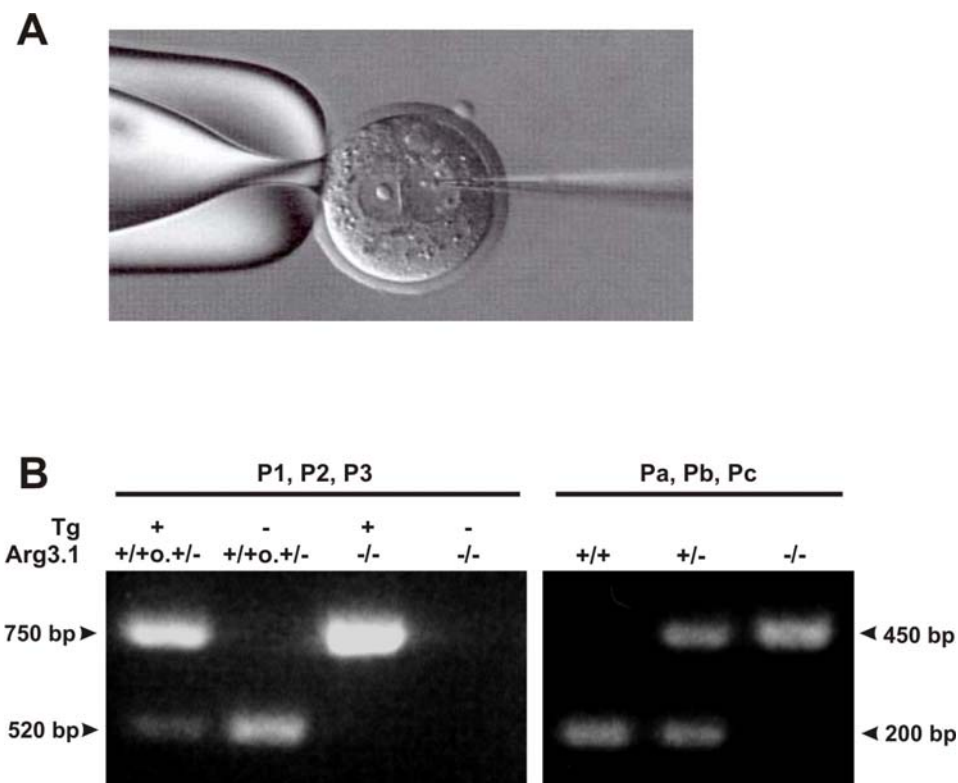


Abbildung 3.2: Herstellung und genotypische Identifizierung der transgenen Mäuse Tg(ARC-zif3UTR).

(A) Illustrative Darstellung einer pronukleären Mikroinjektion des transgenen PACs in den männlichen Vorkern einer Zygote.

(B) PCR-Analyse der genomischen DNA zur genotypischen Identifizierung des ins Genom integrierten Transgens und der zwei endogenen Arc/Arg3.1-Allele. In dem PCR-Ansatz mit den Primern P1, P2, P3 ergibt das Transgen ein 750 bp-Signal. Aus den endogenen Allelen wird hingegen ein 520 bp-Produkt amplifiziert. Der Arc/Arg3.1^{+/+}- und Arc/Arg3.1^{+/-}-Hintergrund lassen sich in dem zweiten PCR-Ansatz mit Pa, Pb, Pc auseinander halten. Arc/Arg3.1^{+/+} ergibt ein Signal bei 200 bp, Arc/Arg3.1^{+/-} hingegen ein zusätzliches Signal bei 450 bp aus dem Arc/Arg3.1-defizienten Allel.

3.1.5 Verpaarung der transgenen Mäuse Tg(ARG-zif3UTR) in den Arc/Arg3.1-Knockout-Hintergrund

Um die Phenotypen des Transgens Arc/Arg3.1-egr1/zif2683'UTR unabhängig von dem endogenen Arc/Arg3.1 untersuchen zu können, wurden die zwei transgenen *Founder*-Mäuse mit den Arc/Arg3.1-Knockout-Mäusen in unserem Labor so lange gekreuzt, bis sich das Transgen in dem Arc/Arg3.1-Knockout-Hintergrund befand. Die Verpaarungsstrategie ist in Abbildung 2.1 dargestellt (siehe Kapitel 2.18.2 in „Material und Methoden“). Da sich unsere Arc/Arg3.1^{-/-}-Mäuse schon stabil im genetischen Hintergrund des Inzuchtstammes C57Bl6/J finden, wurde mit der oben genannten Verpaarungsstrategie die Züchtung der beiden transgenen Mauslinien auch an die Vorschläge der Banbury Konferenz (Banbury Conference, 1997) angepasst, um Schwierigkeiten in der Interpretation späterer Phenotyp-Analysen, die auf genetischen Faktoren außerhalb der gezielten Mutation beruhen könnten, entgegenzutreten. Das heißt, dass durch Rückkreuzung in den Inzuchtstamm C57Bl6/J über mindestens zehn Generationen vor dem Beginn der elektrophysiologischen und Verhaltensanalyse eine kongene Mauslinie generiert wurde, also eine Linie, in der sich die Tiere idealerweise nur an einem Genlocus, nämlich dem mutierten, unterscheiden lassen. Da Inzuchtstämme für > 99% der Genloki homozygot sind, sollte durch diese Zucht eine genetische Variabilität ausgeschlossen werden, die die Analyse der Mutation beeinträchtigen könnte. Die Nachkommen aus solcher Zucht, nämlich Transgen-positive (tg) und Transgen-negative (ko) Tiere im Arc/Arg3.1-Knockout-Hintergrund, wurden zuerst für die molekularbiologischen bzw. biochemischen Analysen der transgenen Expression und später, nach der zehnten Generation, für die phenotypischen Charakterisierungen des Transgens verwendet, wobei die ko-Geschwister (*littermates*) als Kontrolltiere dienten. Die für die Expressionsanalyse der transgenen mRNA verwendeten Transgen-positiven Mäuse im heterozygot Arc/Arg3.1-defizienten (Arc/Arg3.1^{+/-}) Hintergrund wurden durch Rückkreuzung der tg-Mäusen mit C57Bl6/J erzeugt. Die Träger des Transgens verhielten sich in allen bezüglich Linien unauffällig in Bezug auf Körpergröße, Fertilität und Lebensalter. Ebenso blieb die Anfälligkeit für pharmakologisch induzierte epileptische Krämpfe unverändert.

3.2 Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen der transgenen Arc/Arg3.1-Expression

Ursprünglich wurden zwei *Founder*-Mäuse identifiziert, die das transgene PAC im Genom tragen. Mit ihnen wurden zwei transgene Mauslinien etabliert. Mittels *in situ* Hybridisierung, Western Blot-Analyse und immunhistochemischer Färbung zeigen die vorläufigen Analysen der transgenen Expression bei einer Linie (TgAz24) eine starke Reduktion sowohl auf der mRNA- als auch auf der Protein-Ebene im Vergleich zu der Arc/Arg3.1-Expression in der Wildtyp-Maus und auch zu der transgenen Expression in der anderen Linie (TgAz25). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3 zusammengefasst. Die Ursache, die in der TgAz24-Linie zur reduzierten Expression der transgenen mRNA und des Arc/Arg3.1-Proteins führt, ist nicht geklärt. Es wird allgemein angenommen, dass aufgrund der Größe der PACs das Genom am Integrationsort keine Einflüsse auf die Expression des Transgens ausübt (Giraldo und Montoliu, 2001). Es sei denn, dass die, durch das Einfügen des Transgens eingeleiteten, genomischen Änderungen doch Effekte auf die transgene Expression haben. Da der Integrationsort unbekannt bleibt, lassen sich die Effekte schwer untersuchen. Es wäre aber interessant, die transgene Expression der TgAz24-Linie weiter zu analysieren, um dadurch eine Idee zur Erklärung der reduzierten Expression zu bekommen. In Rahmen dieser Arbeit wurde dies nicht weiter untersucht. Alle folgenden Untersuchungen und Charakterisierungen beziehen sich auf die andere transgene Mauslinie (TgAz25), die in dieser Arbeit weiter als Tg(ARG-zif3UTR) bezeichnet wird.

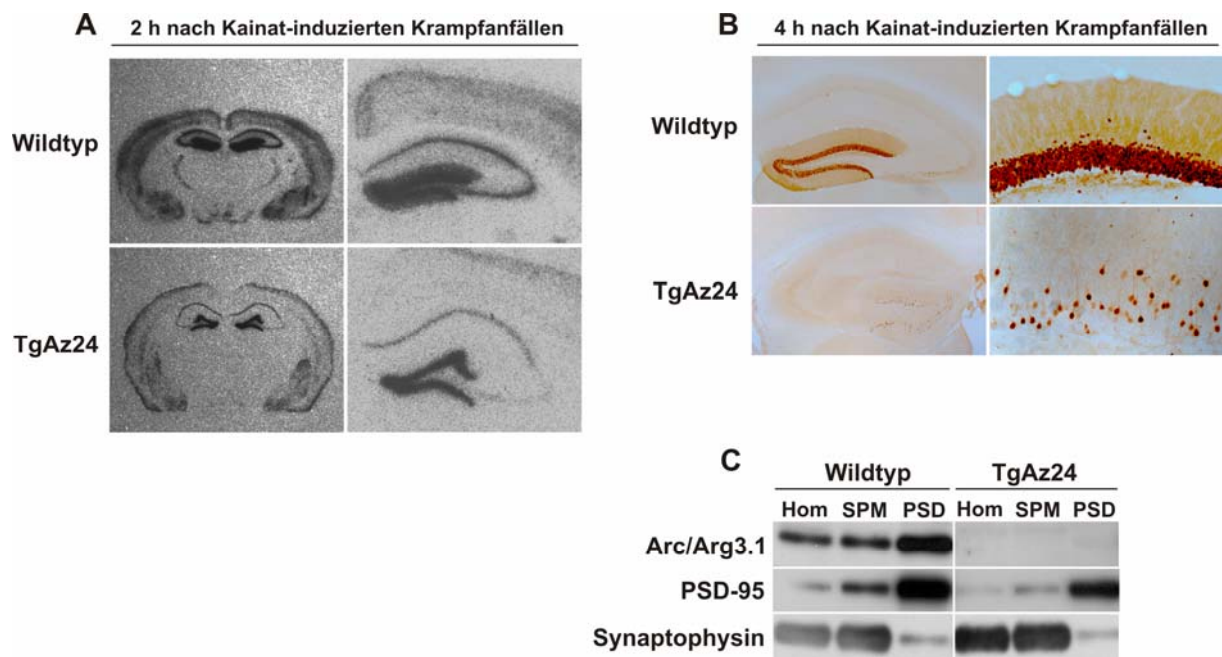


Abbildung 3.3: Geringere Expression der transgenen mRNA bzw. des Arc/Arg3.1-Proteins in TgAz24-Mäusen im Vergleich zur Arc/Arg3.1-Expression in Wildtyp-Mäusen.

(A) Durch *in situ* Hybridisierungen mit einer [³⁵S]-markierten Sonde des offenen Leserahmens von Arc/Arg3.1 wurde die Lokalisation der Arc/Arg3.1-Transkripte in Wildtyp- und der transgenen Transkripte in TgAz24-Mäusen untersucht. Die koronalen Hirnschnitte stammen von den Tieren jeweils 2 h nach Kainat-induzierten Krampfanfällen. Die transgene mRNA scheint weniger exprimiert zu sein und bleibt auf die Somata beschränkt. Vergrößerungen der Hippokampi sind auf der rechten Seite abgebildet.

(B) Durch immunohistochemische Färbungen mit einem aufgereinigten Arc/Arg3.1-Antiserum wurde die Lokalisation des Arc/Arg3.1-Proteins in Wildtyp- und in TgAz24-Tieren untersucht. Die koronalen Vibratomschnitte stammen von den Mäusen jeweils 4 h nach Kainat-induzierten Krampfanfällen. In den TgAz24-Mäusen ist die induzierte Expression des Arc/Arg3.1-Proteins in den hippocampalen Regionen, insbesondere in dem Gyrus dentatus stark reduziert. Vergrößerungen des Gyrus dentatus sind auf der rechten Seite abgebildet.

(C) Western Blot-Analyse der PSD-Aufreinigungen aus Hippokampi/Kortex der Wildtyp- und TgAz24-Mäusen. Je 5 µg Protein der Fraktionen wurden aufgetragen. Mit einem spezifischen Arc/Arg3.1-Antiserum ist die niedrige Expression des Arc/Arg3.1-Proteins in den TgAz24-Tieren festzustellen. Eine geringe Menge des Arc/Arg3.1-Proteins ist nur in der aufgereinigten PSD-Fraktion aus dem TgAz24-Gehirn detektierbar. Abkürzungen: Hom: Homogenat; SPM: Fraktion der synaptosomalen Plasmamembranen; PSD: Fraktion der postsynaptischen Dichte nach dem zweiten Extraktion mit Triton X-100.

3.2.1 In Tg(ARG-zif3UTR)-Mäusen ist die dendritische Translokation der transgenen Arc/Arg3.1-mRNA durch die Mutation verhindert

Die Analyse der transgenen Expression wurde auf dem mRNA-Level begonnen. Um die Menge der exprimierten mRNA unter gleichen experimentellen Bedingungen direkt vergleichen zu können, wurde das Transgen in den heterozygot Arc/Arg3.1-defizienten Hintergrund hineingekreuzt. Das Genom solcher Mäuse trägt dadurch eine Kopie von dem

Transgen Arc/Arg3.1-egr1/zif2683'UTR-PAC (tg) und ein Allel von dem endogenen Arc/Arg3.1 (wt), deren Transkripte sich in der Größe von ca. 400 bp unterscheiden und dadurch anhand einer Northern Blot-Hybridisierung aufgetrennt und analysiert werden konnten. Für die spezifische Detektion wurden die mRNA mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde komplementär zum offenen Leserahmen des Arc/Arg3.1-Gens, der den gemeinsamen Bereich von den beiden Transkripten darstellt, hybridisiert. Darüber hinaus wurden in diesen Mäusen durch Injektion von Kainat epileptische Krämpfe ausgelöst und das zeitliche Expressionsmuster von tg- und wt-Transkripten (30 Minuten, zwei Stunden, vier Stunden, acht Stunden und 24 Stunden nach den Kainat-induzierten Krampfanfällen) direkt untereinander verglichen und analysiert. Die Ergebnisse demonstrierten ein paralleles zeitliches Expressionsprofil der tg- und wt-Transkripte (Abbildung 3.4 A). Das heißt, die Expression der transgenen mRNA wird durch neuronale Aktivität genauso reguliert wie die Expression der endogenen Arc/Arg3.1-mRNA, nämlich, werden sie 30 Minuten nach dem Krampfanfall sowohl im Hippokampus als auch im Kortex induziert und erreichen zwei Stunden danach den Höchstpunkt. Auch nach vier bzw. acht Stunden nach dem Krampfanfall ist eine im Vergleich zu der Expression auf dem Basis-Level erhöhte Expression im Hippokampus zu beobachten, während die Expression im Kortex schon vier Stunden nach dem Krampfanfall auf den Basis-Level absinkt. Interessanterweise zeigten die quantitativen Analysen mittels densitometrischer Messung der RNA-Signale, dass sowohl im Hippokampus als auch im Kortex dieser Mäuse die Menge der transgenen mRNA 1,5 bis 2,0-fach höher ist als die der exprimierten endogenen mRNA unter gleichen experimentellen Bedingungen (Abbildung 3.4 A). Der Unterschied zwischen tg- und wt-Expression ist anscheinend unabhängig von der Regulation durch neuronale Aktivität. Die erhöhte mRNA-Expression des Transgens gegenüber dem Wildtyp kann wahrscheinlich durch die Blockierung des Prozesses – *nonsense* vermitteltem Abbau der *pre*-mRNA – erklärt werden. Im letzten Jahr wurde Arc/Arg3.1-*pre*-mRNA als ein natürliches Ziel-Molekül des Prozesses – *nonsense* vermitteltem Abbau identifiziert, da der 3'UTR-Bereich des Gens üblicherweise zwei *Introns* enthält (Giorgi et al., 2007). In unserem transgenen PAC sind die beiden *Introns* des Arc/Arg3.1-Gens durch den Austausch von 3'UTR gegen 3'UTR des egr1/zif268-Gens deletiert. Da in der 3'UTR-Sequenz des egr1/zif268-Gens keine *Introns* vorhanden sind, wird dadurch auch der *intron*-vermittelte Abbau der Arc/Arg3.1-*pre*-mRNA gestört, was dann zu einer erhöhten Menge der transgenen mRNA führt. Kurz zusammengefasst: Die Northern Blot-Analyse weist darauf hin, dass das zeitliche Expressionsprofil der transgenen mRNA

dem der Wildtyp-mRNA ähnelt. Damit ist unser von Anfang an verfolgtes Ziel durch den Einsatz des PACs als Transgen erreicht worden. Ausgehend von dem Expression-Verhältnis der tg- und wt-Transkripte in diesen Mäusen (1,5-2,0 : 1) lässt sich vermuten, dass in den in den weiteren Untersuchungen verwendeten Mäusen, nämlich den tg-Mäusen im Arc/Arg3.1-Knockout-Hintergrund, die eine transgene Kopie besitzen, und den Wildtyp-Mäusen, die zwei Arc/Arg3.1-Allele enthalten, eine ähnlich große Menge Arc/Arg3.1-Protein produziert wird. Dies wurde auch zu einem späteren Zeitpunkt bestätigt.

In einem weiteren Schritt wurde die neuronale Lokalisation des transgenen Transkripts in tg-Mäusen im Arc/Arg3.1-Knockout-Hintergrund im Vergleich zu dem räumlichen Expressionsmuster des endogenen Arc/Arg3.1-Transkripts in Wildtyp-Mäusen (wt) mittels *in situ* Analyse untersucht. Dazu wurden in den tg- und wt-Mäusen mit einer intraperitonealen Injektion von Kainat epileptische Krämpfe ausgelöst. Die Präparation der Gehirne erfolgte zwei Stunden nach dem Krampfanfall. Zur Kontrolle der Basis-Expression wurden die Gehirne von unbehandelten tg- und wt-Tieren im Experiment ebenfalls untersucht. Die angefertigten Gehirnschnitte wurden dann mit einer [³⁵S]-markierten RNA-Sonde komplementär zu der mRNA-Sequenz des offenen Leserahmens des Arc/Arg3.1-Gens hybridisiert. Übereinstimmend mit der Northern Blot-Analyse ist die Expression der transgenen Transkripte sowie der Wildtyp-Transkripte zwei Stunden nach synaptischer Aktivität stark induziert (Abbildung 3.4 B und C). Während die Wildtyp-Transkripte nach synaptischer Aktivität in der dendritischen Schicht der Körnerzellen des Gyrus dentatus und der Pyramidenzellen der CA1-Region nachgewiesen werden konnten, blieb die Expression der transgenen Transkripte auf die Somata beschränkt (Abbildung 3.4 B-E). Dies deutet darauf hin, dass durch den Austausch der 3'UTR-Sequenz des Arc/Arg3.1-Gens im Transgen die dendritische Translokation der mRNA verhindert wird, so wie es von dieser genetischen Modifizierung zu erwarten war. Auf den Gehirnschnitten der tg-Mäuse gab es, im Widerspruch zur Northern Blot-Analyse, weniger mRNA-Signale in der kortikalen Region. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass der dendritische Anteil in der kortikalen Region auf einer Schnittebene groß ist, weil anders als im Hippokampus die Neuronen im Kortex nicht laminiert angeordnet sind. Die reduzierten *in situ* mRNA-Signale in der kortikalen Region der tg-Mäuse widerspiegeln daher die Abwesenheit der mRNA-Moleküle in den Dendriten. Kurz zusammengefasst: Die *in situ* mRNA-Analyse zeigt uns, dass die 3'UTR-Sequenz für die *in vivo* Translokation der Arc/Arg3.1-mRNA in die Dendriten essentiell ist.

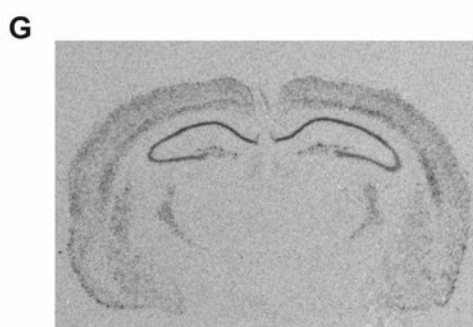
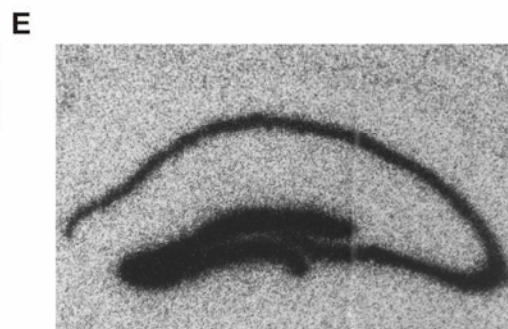
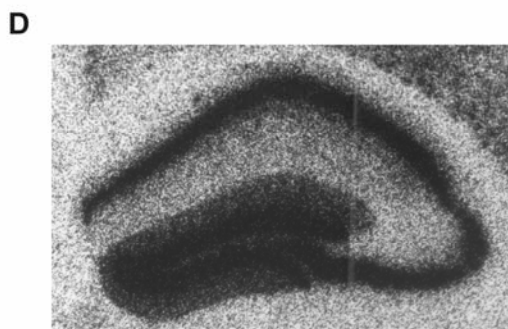
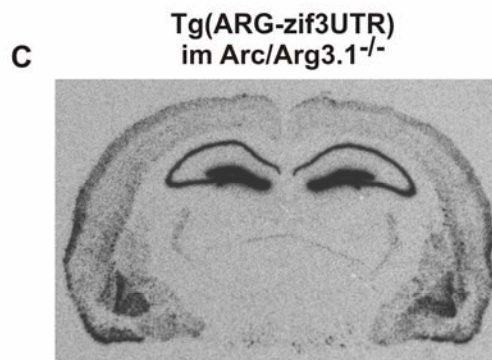
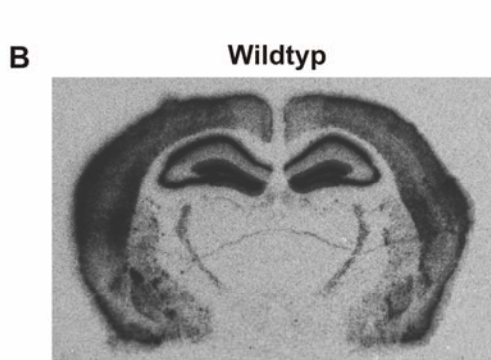
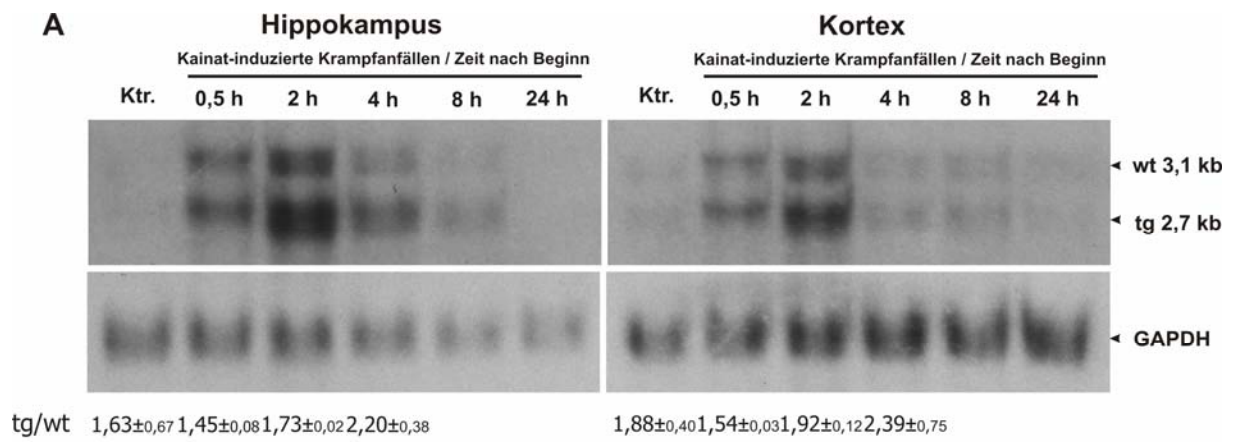


Abbildung 3.4: In den Tg(ARG-zif3UTR)-Mäusen ist die dendritische Translokation der Arc/Arg3.1-mRNA verhindert.

(A) Northern Blot-Analyse der mRNA-Expression in Tg(ARG-zif3UTR)-Mäusen im heterozygot Arc/Arg3.1-defizienten Hintergrund. Autoradiographie einer Northern Blot-Analyse mit jeweils 7,5 µg hippocampaler bzw. 12,5 µg kortikaler totaler RNA. Der Blot wurde mit einer [³²P]-markierten DNA-Sonde gegen den offenen Leserahmen von Arc/Arg3.1 sowie GAPDH als Ladekontrolle hybridisiert. Wie erwartet sind sowohl transgene Arc/Arg3.1-Transkripte (2,7 kb) als auch Wildtyp-Arc/Arg3.1-Transkripte (3,1 kb) in den Tieren zu detektieren. Das densitometrische Verhältnis des tg-RNA-Signals zu dem wt-RNA-Signal ist unter den jeweiligen RNA-Spuren angegeben. Dies lässt eine 1,5 bis 2,0-fach höhere Menge transgener mRNA als der Wildtyp-mRNA erkennen. n = 3 Tiere zu jedem Zeitpunkt. Die Werte sind der Mittelwert ± Standard-Fehler (*SEM*). Abkürzungen: wt: Wildtyp; tg: Tg(ARG-zif3UTR).

(B-G) Durch *in situ* Hybridisierungen mit einer [³⁵S]-markierten RNA-Sonde komplementär zur mRNA-Sequenz des offenen Leserahmens von Arc/Arg3.1 wurde die Lokalisation der Arc/Arg3.1-Transkripte untersucht.

(B und C) Film-Autoradiogramme der koronalen Hirnschnitte von Wildtyp-Tieren (B) und von tg-Mäusen (C) jeweils 2 h nach Kainat-induzierten Krampfanfällen.

(D und E) Hippokampale Vergrößerungen jeweils aus (B) und (C).

Während in den wt-Tieren die Arc/Arg3.1-mRNA in den Dendriten des Gyrus dentatus bzw. der CA1-Region (B, D) lokalisiert ist, bleibt die Expression der Arc/Arg3.1-mRNA in den tg-Tieren auf die Somata (C, E) beschränkt. Abkürzung: CA1: Cornu ammonis Region 1.

(F und G) Film-Autoradiogramme der koronalen Hirnschnitte von Wildtyp-Tieren (F) und von tg-Mäusen (G) ohne induzierte synaptische Aktivität.

In dieser Arbeit wurde eine transgene Mauslinie - Tg(ARG-zif3UTR) hergestellt, in der die dendritische Translokation der transgenen mRNA und dadurch auch die lokale Synthese des Arc/Arg3.1-Proteins in den Dendriten verhindert ist. Diese Mauslinie bietet uns die Möglichkeit, den Beitrag der dendritischen Lokalisation der Arc/Arg3.1-mRNA zur gesamten neuronalen Arc/Arg3.1-Expression und die Beteiligung des dendritisch synthetisierten Arc/Arg3.1-Proteins an aktivitätsabhängigen synapsenspezifischen Veränderungen sowie der Gedächtnisbildung zu untersuchen.

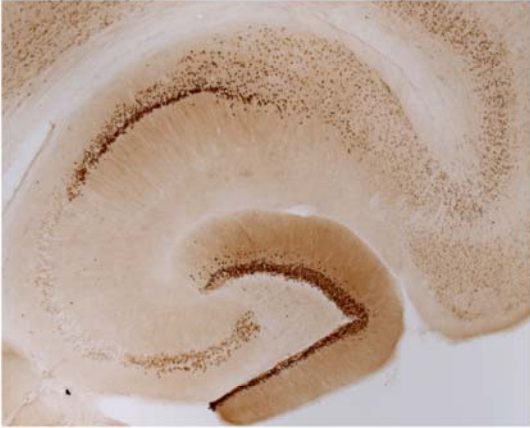
3.2.2 In Tg(ARG-zif3UTR)-Mäusen ist trotz abwesender mRNA das Arc/Arg3.1-Protein in den Dendriten anwesend

Es wird angenommen, dass die dendritisch lokalisierte mRNA für die Expression der entsprechenden Protein-Produkte in Dendriten bzw. Synapsen essentiell sind. Die Knockin-Mäuse, in denen die dendritische Translation der alpha-Untereinheit von CaMKII durch genetische Modifizierung der 3'UTR-Sequenz verhindert ist, haben eine reduzierte Expression des Proteinproduktes in der postsynaptischen Gehirn-Fraktion, aber auch eine allgemeine Reduktion der Protein-Expression in dem Homogenat aus Hippokampus und Kortex aufgewiesen (Miller et al., 2002). Das räumliche Expressionsmuster des Arc/Arg3.1-Proteins in den Tg(ARG-zif3UTR)-Mäusen erwies sich als viel versprechend, um den Effekt

der dendritischen Arc/Arg3.1-mRNA auf die synaptische Expression des Arc/Arg3.1-Proteins zu studieren. Dies wurde immunhistochemisch untersucht. Dazu wurde bei tg- und wt-Tieren durch Injektion von Kainat eine Erhöhung der synaptischen Aktivität ausgelöst. Vier Stunden später wurden die Gehirne präpariert. Mit einem spezifischen Antikörper gegen Arc/Arg3.1-Protein wurden dann immunhistochemische Färbungen an den angefertigten Gehirndünnschnitten durchgeführt. Überraschenderweise ist eine starke Arc/Arg3.1-Protein-Expression auch in den Dendriten der tg-Mäuse nachweisbar (Abbildung 3.5 B, D und F). Wie bei den wt-Mäusen ist das Arc/Arg3.1-Protein im Hippokampus der tg-Mäuse vier Stunden nach der Induktion eines Krampfanfalls stark exprimiert. Und wie in den wt-Tieren sind in den tg-Tieren die Protein-Signale sowohl im stratum moleculare (dem dendritischen Eingangsbereich der Körnerzellen des Gyrus dentatus) als auch im stratum radiatum (der dendritischen Schicht der Pyramidenzellen der CA1-Region) zu beobachten (Abbildung 3.5 D und F). Aufgrund der Abwesenheit der dendritischen mRNA kann die dendritische Expression des Arc/Arg3.1-Proteins in tg-Mäusen nur noch auf einen aktiven Transport-Prozess des Proteins selbst zurückgeführt werden. Der grundlegende Mechanismus für den aktiven Transport des Arc/Arg3.1-Proteins in den tg-Mäusen wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Kurz zusammengefasst, demonstriert uns die immunhistochemische Färbung, dass nach generalisierter synaptischer Aktivität das Arc/Arg3.1-Protein trotz abwesender mRNA in den Dendriten exprimiert ist. Dies deutet darauf hin, dass zwei unterschiedliche Mechanismen für die dendritische Expression des Arc/Arg3.1-Proteins zu Grunde liegen. Ein Mechanismus ist die lokale Translation dendritischer mRNA, der andere ist der aktive dendritische Transport des somatisch synthetisierten Arc/Arg3.1-Proteins. Es wäre interessant zu wissen, wie die zelluläre Regulation zwischen den zwei Mechanismen erfolgt und ob sie von der synaptischen Aktivität abhängig ist. Für eine genauere Analyse muss noch das räumliche Expressionsmuster des Arc/Arg3.1-Proteins nach der laminaspezifischen Stimulation des mittleren Tractus perforans aufgezeigt werden, um einen möglichen Effekt der dendritischen mRNA auf die Akkumulierung des Arc/Arg3.1-Proteins an aktivierten Synapsen zu bestätigen oder auszuschließen.

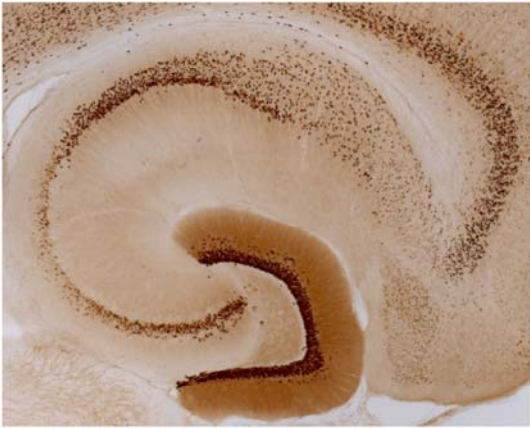
A

Wildtyp

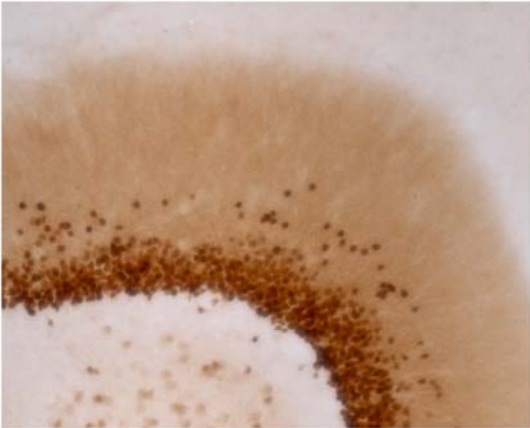


B

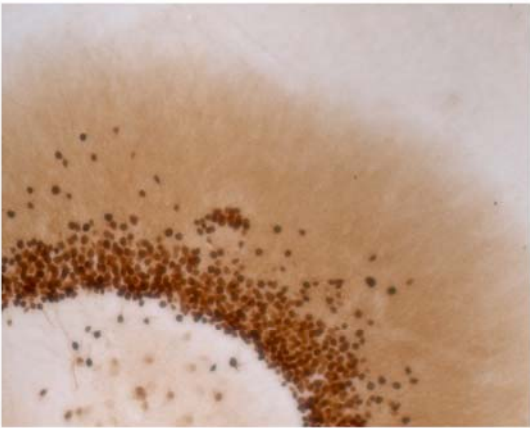
**Tg(ARC-zif3UTR)
im Arc/Arg3.1^{-/-}**



C



D



E



F

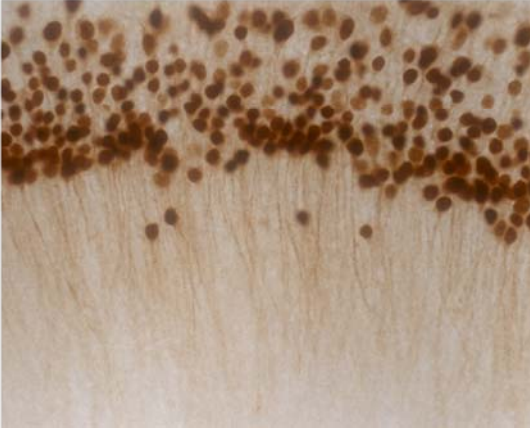


Abbildung 3.5: In den Tg(ARC-zif3UTR)-Mäusen ist das Arc/Arg3.1-Protein in den Dendriten anwesend.

(A-F) Durch immunhistochemische DAB-Färbungen mit einem aufgereinigten Antiserum gerichtet gegen Arc/Arg3.1-Protein wurde die zelluläre Verteilung des Proteins untersucht. (A und B) Mikroskopische Aufnahme der horizontalen hippocampalen Vibratonschnitte von Wildtyp-Mäusen (A) und von tg-Mäusen (B) jeweils 4 h nach Kainat-induzierten Krampfanfällen. (C und D) Vergrößerungen des Gyrus dentatus jeweils aus (A) und (B). (E und F) Vergrößerungen der CA1-Region jeweils aus (A) und (B). Abkürzung: CA1: Cornu ammonis Region 1. In den tg-Tieren ist das Arc/Arg3.1-Protein sowohl in stratum moleculare (B, D) als auch in stratum radiatum (B, F) vorhanden.

3.2.3 Sowohl in Tg(ARC-zif3UTR)- als auch in Wildtyp-Mäusen ist das Arc/Arg3.1-Protein in der PSD angereichert

Die selektive Akkumulierung von Arc/Arg3.1-mRNA und -Protein im Bereich der aktivierten Synapsen lässt eine Integration des Proteins in dem postsynaptischen Proteinnetzwerk vermuten. Über die Lokalisation des Arc/Arg3.1-Proteins in der postsynaptischen Dichte (PSD) wurde bereits berichtet (Donai et al., 2003). In dieser Arbeit habe ich ein Verfahren zur Aufreinigung der PSD etabliert und standardisiert. Dafür wird die Fraktion der synaptosomalen Plasmamembranen zuerst durch differentielle Zentrifugation und Saccharose-Gradienten-Sedimentation aus dem Homogenat des Mausgehirns gewonnen. Diese Fraktion besteht aus den prä- und postsynaptischen Seiten der synaptosomalen Plasmamembranen, inklusive synaptischer und extrasynaptischer Bestandteile. Daraus wird anschließend die PSD-Fraktion durch Extraktion mit nicht-ionischen Detergenzien (Triton X-100) aufgereinigt, weil die PSD durch solche Detergenzien nicht aufgeschlossen werden können. Jeweils 5 µg von den drei Protein-Fractionen – Gehirnhomogenat, synaptosomale Plasmamembranen und PSD – wurden dann im Western Blot auf ihre Zusammensetzung analysiert, wobei Proteine, die ausschließlich prä- oder postsynaptisch exprimiert werden, als Indikatoren für die Reinheit der Präparation dienten. So konnte Synaptophysin, ein membranassoziiertes Molekül präsynaptischer Vesikel, in der PSD-Fraktion kaum noch nachgewiesen werden (Abbildung 3.6 A). Das Arc/Arg3.1-Protein sowie das PSD-95/SAP90 zeigten hingegen eine Anreicherung in der PSD-Fraktion. Der Anreicherungsprozess wurde durch densitometrische Messung der Protein-Signale quantifiziert. Der Wert des Verhältnisses zwischen der Signal-Intensität eines Proteins in der PSD-Fraktion und der im Homogenat wurde als Anreicherungsfaktor angegeben. Gemäß der Quantifizierung war das PSD-95/SAP90 mit

einem Faktor von ca. 10 in der PSD-Fraktion angereichert, während die Anreicherung des Arc/Arg3.1-Proteins in der PSD um einen Faktor von ca. 5 bestand (Abbildung 3.6 B). Wenn wir annehmen, dass das PSD-95/SAP90 als ein Hauptbestandteil der Postsynapsen ausschließlich in der PSD lokalisiert ist, stellt das Arc/Arg3.1-Protein eine geringere Anreicherung in der PSD dar. Dies stimmt mit der experimentellen Beobachtung überein, dass das Arc/Arg3.1-Protein auch in den Somata und sogar in den Zellkernen zu finden ist. In der Abbildung 3.6 A wird beta-Actin hier als ein Protein-Beispiel mit einer homogenen zellulären Verteilung demonstriert. In einem experimentellen Aufbau wurde die postsynaptische Verteilung der Proteine in den tg- und wt-Mäusen mittels PSD-Aufreinigung untersucht. Das Arc/Arg3.1-Protein und das PSD-95/SAP90 waren in den tg-Mäusen sowie in den wt-Mäusen in der PSD-Fraktion angereichert (Abbildung 3.6 A). Der postsynaptische Anreicherungsfaktor beider Proteine in den tg-Tieren zeigte keinen Unterschied zu dem in den wt-Tieren (Abbildung 3.6 B). Die postsynaptischen Verteilungen einer Reihe anderer Proteine, inklusive Glutamatrezeptoren, postsynaptischer Gerüstproteine und Signalmoleküle, blieben in den tg-Mäusen im Unterschied zu den wt-Mäusen ebenfalls unverändert (Daten nicht gezeigt). Kurz zusammengefasst, demonstrieren uns die PSD-Analysen, dass das Arc/Arg3.1-Protein und andere postsynaptische Proteine in den tg-Mäusen genauso in den Postsynapsen verteilt sind wie in den wt-Mäusen.

3.2.4 Ähnlich große Menge Arc/Arg3.1-Protein ist in Tg(ARG-zif3UTR)-Mäusen und in Wildtyp-Mäusen exprimiert

Wie in der Kapitel 3.2.1 bereits erwähnt, aufgrund der in der Northern Blot-Analyse aufgewiesenen 1,5 bis 2,0-fach höheren Menge transgener mRNA als der Wildtyp-mRNA in den tg-Mäusen mit dem Arc/Arg3.1^{+/-}-Hintergrund, deren Genom eine transgene Kopie und ein Wildtyp-Allel enthält, ist eine ähnlich große Menge der Arc/Arg3.1-Protein-Produktion in den tg-Mäusen mit dem Arc/Arg3.1^{-/-}-Hintergrund, die nur eine transgene Kopie tragen, und in den Wildtyp-Mäusen, die zwei Wildtyp-Allele enthalten, zu erwarten. Dies wurde hier mittels quantitativer Western Blot-Analyse überprüft.

Die Expression vom Arc/Arg3.1-Protein und PSD-95/SAP90 in tg- und wt-Mäusen wurde durch densitometrische Auswertung der Protein-Signale quantifiziert. Im hippokampal-kortikalen Homogenat von tg-Mäusen war eine ähnlich große Menge Arc/Arg3.1-Protein und

PSD-95/SAP90 vorhanden wie im Homogenat von wt-Mäusen (je 10 µg Protein aufgetragen) (Abbildung 3.6 C und D). Darüber hinaus zeigte die Protein-Menge von Arc/Arg3.1 und von PSD-95/SAP90 in der aufgereinigten PSD-Fraktion aus den tg-Mäusen ebenfalls keinen Unterschied zu der Fraktion aus den wt-Mäusen (je 1 µg Protein aufgetragen) (Abbildung 3.6 E und F). Dies weist darauf hin, dass in tg-Mäusen sowohl die gesamte als auch die synapsenspezifische Expression des Arc/Arg3.1-Proteins keinen Unterschied zur Expression in wt-Mäusen darstellen. Der ähnliche konstitutive Expression-Level des Arc/Arg3.1-Proteins in tg-Mäusen sowie in wt-Mäusen bietet uns eine optimale Voraussetzung für spätere funktionelle und Verhaltenscharakterisierung der Mäuse, um den spezifischen Effekt der lokalen Translation der Arc/Arg3.1-mRNA in den Dendriten auf die synaptische Plastizität und auf die Gedächtnisbildung aufzuschlüsseln.

Die Analysen der Arc/Arg3.1-Expression in tg-Mäusen demonstrierten uns bisher das überraschende Ergebnis, dass die dendritische Lokalisation der Arc/Arg3.1-mRNA und demzufolge die lokale Synthese des Arc/Arg3.1-Proteins weder auf die dendritische Verteilung des Proteins noch auf die quantitative postsynaptische Protein-Expression einen Einfluss ausüben. In den bisherigen Untersuchungen wurde allerdings nur die Arc/Arg3.1-Basis-Expression unter nicht-stimulierender Bedingung quantitativ betrachtet. Es wäre sehr interessant, die Arc/Arg3.1-Expression in tg- und wt-Tieren unter der Bedingung spezifischer synaptischer Stimulationen, zum Beispiel der LTP-Stimulation, zu untersuchen, um den spezifischen Beitrag der dendritischen Arc/Arg3.1-mRNA zu den aktivitätsabhängigen synaptischen Modifizierungen festzustellen.

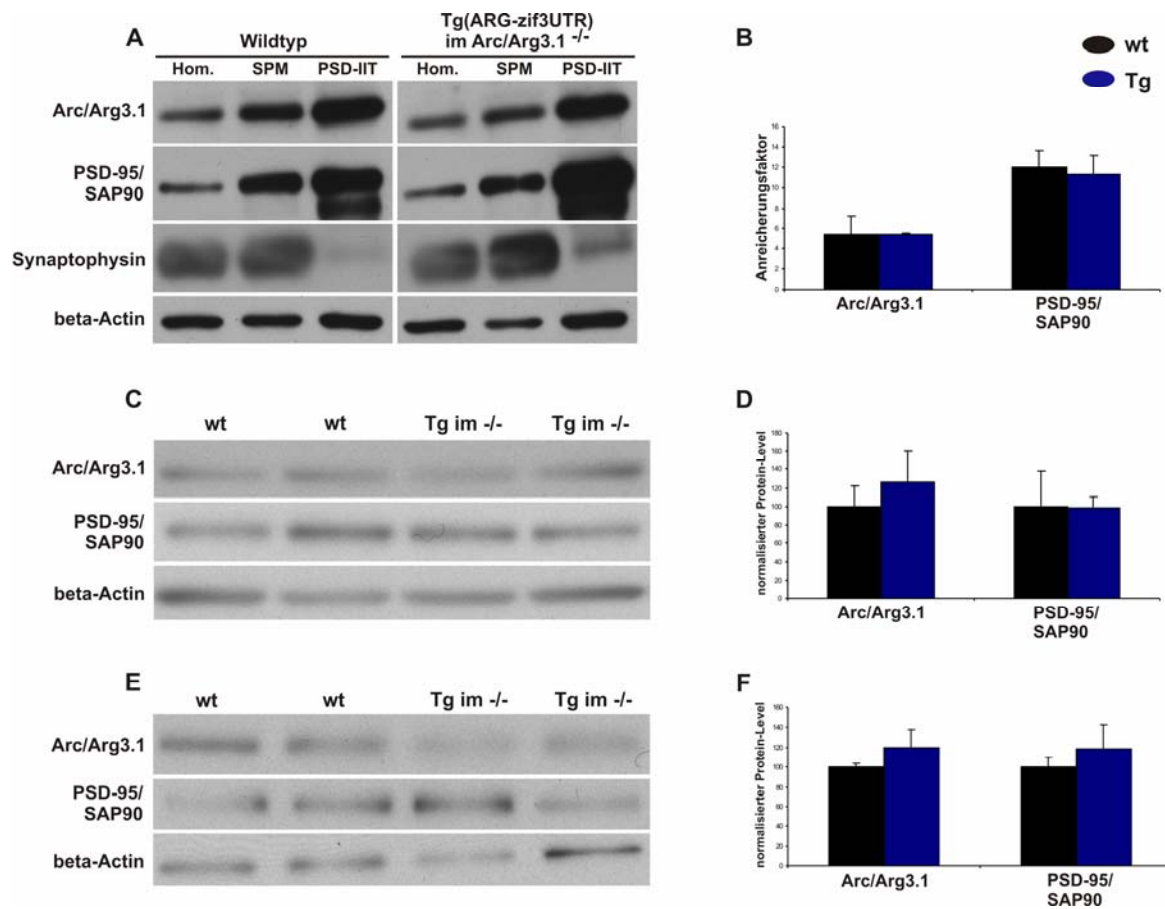


Abbildung 3.6: In den Tg(ARC-zif3UTR)-Mäusen sind die quantitative Basis-Expression und die synaptische Verteilung des Arc/Arg3.1-Proteins unverändert.

(A) Western Blot-Analyse der PSD-Aufreinigungen aus Hippokampi/Kortex der Wildtyp- und Tg(ARC-zif3UTR)-Mäusen. Je 5 µg Protein pro Fraktion wurden aufgetragen. Mit einem spezifischen Arc/Arg3.1-Antiserum ist sowohl in den wt- als auch in den tg-Tieren eine Anreicherung des Arc/Arg3.1-Proteins in der PSD-Fraktion festzustellen. Abkürzungen: Hom: Homogenat; SPM: Fraktion der synaptosomalen Plasmamembranen; PSD: Fraktion der postsynaptischen Dichte nach dem zweiten Extraktion mit Triton X-100.

(B) Quantitative Analyse der Western Blots aus (A). n = 4 für jeden Genotyp.

(C) Western Blot-Analyse der nicht-fraktionierten hippocampal-kortikalen Homogenaten (10 µg Protein) von wt- und tg-Mäusen. Eine ähnlich große Menge Arc/Arg3.1-Protein in den tg- und wt-Tieren ist mit einem spezifischen Arc/Arg3.1-Antiserum detektierbar. Auf dem SDS-PAGE sind Homogenate von jeweils zwei Tieren pro Genotyp aufgetragen. Beta-Actin wurde zur Lade-Kontrolle detektiert und ist in der anschließenden Quantifizierung einbezogen.

(D) Quantitative Analyse der Western Blots aus (C). n = 4 Mäuse für jeden Genotyp.

(E) Western Blot-Analyse der aufgereinigten PSD-Fractionen (1 µg Protein) von wt- und tg-Mäusen. Eine ähnlich große Menge Arc/Arg3.1-Protein in den tg- und wt-Tieren ist auch hier erkennbar. Auf dem SDS-PAGE sind PSD-Fractionen von jeweils zwei Tieren pro Genotyp aufgetragen. Beta-Actin dient hier ebenfalls als Lade-Kontrolle.

(F) Quantitative Analyse der Western Blots aus (E). n = 4 Tiere für jeden Genotyp.

In (B), (D) und (F) stellen die Werte den Mittelwert ± Standard-Fehler (SEM) dar.

3.2.5 In Tg(ARG-zif3UTR)-Mäusen ist das Arc/Arg3.1-Protein wie in Wildtyp-Mäusen physisch mit PSD-95/SAP90 assoziiert

In den Jahren 2000 bzw. 2006 wurde MASC (MAGUK-assoziierter Signal-Komplex) in zwei proteomischen Studien mittels verschiedener Affinitätschromatographischer Methoden isoliert und im großen Maßstab charakterisiert (Husi et al., 2000; Collins et al., 2006). Das Arc/Arg3.1-Protein wurde als eine Komponente dieses Proteinkomplexes identifiziert. Dies liefert uns einen wichtigen Hinweis, dass trotz unbekannter molekularer Funktionen das Arc/Arg3.1-Protein physisch mit dem Multiproteinkomplex in der PSD verknüpft ist. Dieser Komplex ist für die Koordination und Weiterleitung der synaptischen Signale und dadurch auch für die Erhaltung der physiologischen Funktionen der Synapse einschließlich der aktivitätsregulierten plastischen Veränderungen an der Synapse entscheidend. Um die physische Assoziation des Arc/Arg3.1-Proteins mit dem MASC zu demonstrieren, habe ich in dieser Arbeit *in vivo* Co-Immunpräzipitationen (Co-IPs) etabliert.

Bei einer *in vivo* Immunpräzipitation (IP) wird ein Antigen aus dem Proteinlysate eines Gewebes durch die hochaffine Bindung an seinem an einer Matrix immobilisierten Antikörper präzipitiert. Die mit dem Antigen assoziierten Protein-Partner befinden sich ebenfalls in der präzipitierten Fraktion und können durch Western Blot nachgewiesen werden (Co-IP). In einem Co-IP-Ansatz wurde ein spezifischer monoklonaler Antikörper gegen das PSD-95/SAP90-Protein (IgG aus Maus; Affinity Bio-Reagents) verwendet. Die Anwesenheit diverser Proteine in der durch diesen Antikörper präzipitierten Fraktion eines gesamten Proteinextraktes aus dem Vorderhirn der wt-Mäuse wurde mittels Western Blot-Analyse mit spezifischen Antikörpern überprüft. Die Spezifität der Bindung des PSD-95/SAP90-Proteins an seinen Antikörper in der IP wurde durch Einsetzen eines anderen IgG-Antikörpers aus Maus kontrolliert. Es ist aus der Abbildung 3.7 A zu entnehmen, dass das PSD-95/SAP90 durch seinen Antikörper spezifisch präzipitiert wurde, weil in der IP-Fraktion mit dem unspezifischen IgG keine Proteinbande vom PSD-95/SAP90 vorhanden war. Interessanterweise waren das Arc/Arg3.1-Protein und NR2B (eine Untereinheit des NMDA-Rezeptors) auch spezifisch in der IP-Fraktion mit dem PSD-95/SAP90-Antikörper nachzuweisen, während sich GluR2 (eine Untereinheit des AMPA-Rezeptors) und andere Proteine, z.B. Stargazin und GAPDH als abwesend erwiesen (Abbildung 3.7 A). Dies

Ergebnis deutet darauf hin, dass unter diesen experimentellen Bedingungen das Arc/Arg3.1-Protein mit dem PSD-95/SAP90 und dem NMDA-Rezeptor in einem Protein-Komplex assoziiert ist, in dem der AMPA-Rezeptor nicht anwesend ist. Diese Aussage stimmt mit den Berichten in den oben genannten Literaturen überein. Die tg-Mäuse wurden anschließend auf diese physische Verknüpfung zwischen Arc/Arg3.1 und PSD-95/SAP90 hin überprüft. Das Experiment zeigte uns, dass das Arc/Arg3.1-Protein in den tg-Mäusen genauso wie in den wt-Mäusen durch den spezifischen PSD-95/SAP90-Antikörper co-präzipitiert wurde (Abbildung 3.7 A). Das heißt, eine physische Assoziation des Arc/Arg3.1-Proteins mit dem postsynaptischen Gerüstprotein – dem PSD-95/SAP90 – ist auch in den tg-Tieren vorhanden.

Das Arc/Arg3.1-Protein ist mit einem spezifischen postsynaptischen Proteinkomplex physisch assoziiert. Es wird durch neuronale Aktivität induziert und an den aktivierten Synapsen akkumuliert. Diese Eigenschaften lassen uns vermuten, dass das Arc/Arg3.1-Protein zu den aktivitätsabhängigen synapsenspezifischen Modifizierungen beiträgt. Um mehr über die funktionelle Rolle des Arc/Arg3.1-Proteins in der Postsynapse zu erfahren, wurden in dieser Arbeit die Interaktionspartner des Arc/Arg3.1-Proteins mittels Immunpräzipitation untersucht. Dafür wurde ein polyklonales Kaninchen-Antiserum spezifisch gegen das Arc/Arg3.1-Protein hergestellt und dies in einer *in vivo* Co-IP verwendet.

Zur Gewinnung des Arc/Arg3.1-Antiserums wurde ein rekombinantes Fusionsprotein aus dem C-terminalen Bereich des Arc/Arg3.1-Proteins (G134 – E396) mit einem N-terminal fusionierten GST-tag in *E. coli* überexprimiert und anschließend mit Hilfe einer durch das GST-tag vermittelten Affinitätschromatographie aufgereinigt. Bei der Firma BioGenes in Berlin wurde ein Kaninchen mit dem aufgereinigten Fusionsprotein als Antigen immunisiert. Nach viermaliger Injektion innerhalb von zwei Monaten und dreimaliger Überprüfung der Qualität des Test-Antiserums zum Nachweis des Arc/Arg3.1-Proteins entnahmen wir dem Kaninchen 55 ml Antiserum.

Dieses Antiserum wurde in dem zweiten *in vivo* Co-IP-Ansatz verwendet. Zur Kontrolle der Bindungsspezifität des Arc/Arg3.1-Proteins an das Antiserum wurde das Kaninchen-Serum vor der Immunisierung (Preimmun-Serum) in die IP eingesetzt. Der gesamte Proteinextrakt aus dem Vorderhirn der Arc/Arg3.1-Knockout-Maus wurde als weitere negative Kontrolle in das Experiment übernommen. Unter denselben experimentellen Bedingungen wie bei der

PSD-95/SAP90-Co-IP wurde das Arc/Arg3.1-Protein spezifisch durch sein Antiserum präzipitiert, weil es in der IP-Fraktion mit dem unspezifischen Preimmun-Serum nicht zu finden war (Abbildung 3.7 B). Übereinstimmend mit dem Ergebnis der PSD-95/SAP90-Co-IP war das PSD-95/SAP90 spezifisch in der durch das Arc/Arg3.1-Antiserum präzipitierten Fraktion des Proteinextraktes aus dem Gehirn der wt- und der tg-Mäuse nachweisbar, aber nicht in der IP-Fraktion des Proteinextraktes aus dem ko-Gehirn, womit die Spezifität der Co-Präzipitation vom PSD-95/SAP90 durch das Arc/Arg3.1-Protein weiter bestätigt wurde (Abbildung 3.7 B). Eine physische Assoziation zwischen dem Arc/Arg3.1-Protein und dem PSD-95/SAP90 wurde durch diesen experimentellen Ansatz verifiziert. Überraschenderweise war NR2B in der IP-Fraktion des Proteinextraktes aus dem wt- und dem tg-Gehirn auch nach einer langen Expositionszeit des Western Blots nicht detektierbar. Es scheint, dass sich der NMDA-Rezeptor nicht in dem durch das Arc/Arg3.1-Antiserum präzipitierten Protein-Komplex befindet. Dies Ergebnis demonstriert uns, dass das Arc/Arg3.1-Protein durch das PSD-95/SAP90 mit dem postsynaptischen Proteingerüst verknüpft ist, aber nicht mit dem NMDA-Rezeptor. Die Anwesenheit des NMDA-Rezeptors in dem PSD-95/SAP90-Protein-Komplex und seine Abwesenheit in dem Arc/Arg3.1-Protein-Komplex lassen uns vermuten, dass ein Protein (z.B. PSD-95/SAP90 als postsynaptisches Gerüstprotein) in verschiedenen Protein-Komplexen involviert sein könnte und es sich hier um zwei verschiedene Protein-Komplexe handelt.

Die Zusammensetzungen des Arc/Arg3.1-Protein-Komplexes und des PSD-95/SAP90-Protein-Komplexes in den tg-Mäusen zeigten bisher keinen Unterschied zu denen in den wt-Mäusen. Das Arc/Arg3.1-Protein in den tg-Mäusen ist wie in den wt-Mäusen über das PSD-95/SAP90 an die Postsynapse assoziiert. Allerdings wurden alle bisherigen Untersuchungen auf die Interaktionen des Arc/Arg3.1-Proteins auf einem Basis-Level der Arc/Arg3.1-Expression unter nicht-stimulierender Bedingung durchgeführt. Das heißt, bislang wurde weder die aktivitätsabhängige Arc/Arg3.1-Expression durch experimentelle Stimulation induziert noch eine mögliche durch die synaptische Aktivität regulierte dynamische Änderung der Interaktionen des Arc/Arg3.1-Proteins in Betracht gezogen. Es wäre interessant zu wissen, ob die Assoziation des Arc/Arg3.1-Proteins im postsynaptischen Proteinnetzwerk durch synaptische Aktivität verändert wird und ob die tg-Mäuse eine von den wt-Mäusen abweichende aktivitätsabhängige Modifizierung der Postsynapse auf der molekularen Ebene aufweisen.

3. Ergebnisse

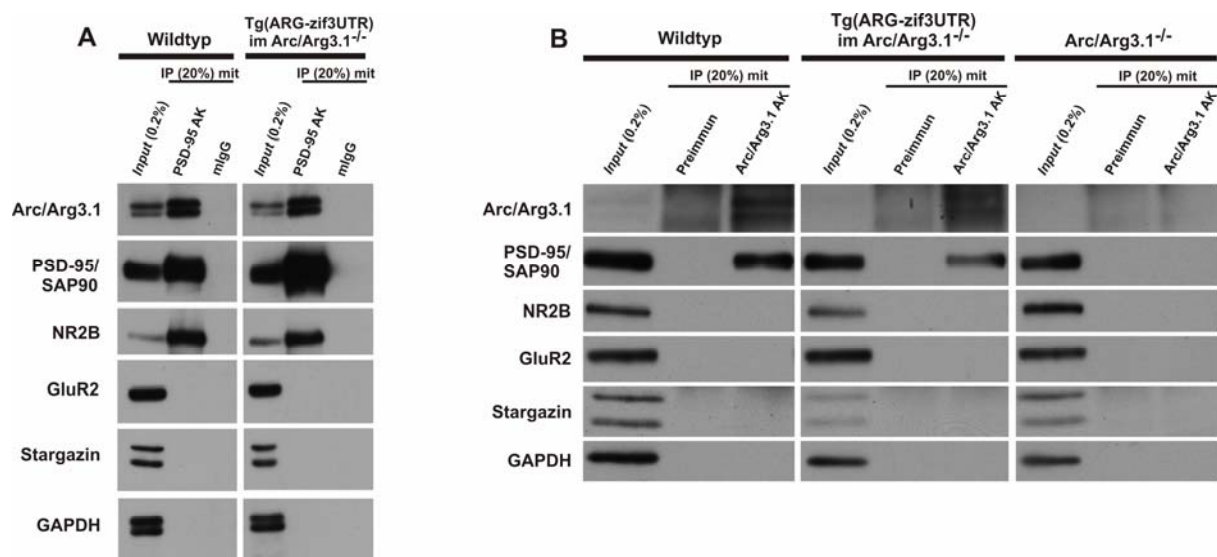


Abbildung 3.7: Sowohl in den Tg(ARG-zif3UTR)-Mäusen als auch in den Wildtyp-Mäusen ist das Arc/Arg3.1-Protein mit dem PSD-95/SAP90 assoziiert.

(A) Co-Immunpräzipitation aus dem Gehirnextrakt der wt- und tg-Mäuse mit einem aufgereinigten monoklonalen PSD-95/SAP90-Antikörper des Maus-IgGs zeigt die physische Assoziation des Arc/Arg3.1-Proteins mit dem PSD-95/SAP90. Western Blots sind mit den links angegebenen Antikörpern analysiert. Zur Detektion des Arc/Arg3.1-Proteins (ca. 55 kDa) wurden die IP-Fraktionen unter nicht-reduzierender Bedingung von der Agarose eluiert und auf einer 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt, um die Interferenz des in der IP eingesetzten IgG-Antikörpers, u.a. der schweren Kette vom IgG (ca. 50 kDa) zu vermindern. Unter dieser Bedingung ist das Arc/Arg3.1-Protein als eine Doppel-Bande mit einem spezifischen Antiserum aus Kaninchen detektierbar. NR2B ist ebenfalls in dem PSD-95/SAP90-assozierten Protein-Komplex zu finden. Mit einem anderen Maus-IgG wird die Spezifität der IPs überprüft. Abkürzungen: *Input*: Gehirnextrakt; IP: Immunpräzipitation; PSD-95 AK: PSD-95/SAP90-IP-Fraktion; mIgG: IP-Fraktion mit Maus-IgG.

(B) Co-Immunpräzipitation aus dem Gehirnextrakt mit einem spezifischen polyklonalen Arc/Arg3.1-Antiserum aus Kaninchen bestätigt die physische Assoziation des PSD-95/SAP90s mit dem Arc/Arg3.1-Protein in den wt- und tg-Tieren. Die Co-IPs wurden mit dem Gehirnextrakt aus den wt-, tg- und Arc/Arg3.1^{-/-}-Mäusen (ko) durchgeführt. Western Blots sind mit den links angegebenen Antikörpern analysiert. Die Detektion von Arc/Arg3.1 erfolgte ebenfalls unter nicht-reduzierender Bedingung und mit einem anderen polyklonalen Kaninchen-Antiserum gegen das Arc/Arg3.1-Protein. In der Arc/Arg3.1-IP-Fraktion des wt- und tg-Gehirnextraktes ist die Doppel-Bande des Arc/Arg3.1-Proteins auf dem IgG-Hintergrund zu erkennen. NR2B lässt sich in dem Arc/Arg3.1-assozierten Protein-Komplex nicht nachweisen. Mit dem Preimmun-Serum und dem Gehirnextrakt der ko-Mäuse wird die Spezifität der co-IPs überprüft. Abkürzungen: *Input*: Gehirnextrakt; IP: Immunpräzipitation; Arc/Arg3.1 AK: Arc/Arg3.1-IP-Fraktion; Preimmun: IP-Fraktion mit Preimmun-Serum.

Die molekularbiologischen und proteinbiochemischen Untersuchungen der transgenen Expression in den Tg(ARG-zif3UTR)-Mäusen zeigen uns:

1. Die dendritische Translokation der transgenen Arc/Arg3.1-mRNA ist durch die gezielte Modifizierung der 3'UTR-Sequenz des Arc/Arg3.1-Gens verhindert.

2. Das Arc/Arg3.1-Protein ist trotz fehlender dendritischer mRNA in den Dendriten lokalisiert, in den Postsynapsen akkumuliert und über das PSD-95/SAP90 mit dem postsynaptischen Proteingerüst assoziiert.

3. Eine ähnlich große Menge Arc/Arg3.1-Protein ist in den Tg(ARC-zif3UTR)-Mäusen (im Arc/Arg3.1-Knockout-Hintergrund) wie in den Wildtyp-Mäusen exprimiert. Mit anderen Worten bleibt die konstitutive Arc/Arg3.1-Expression auf dem Basis-Level in den tg-Mäusen im Vergleich zur Expression in den wt-Tieren unverändert.

Auf der Grundlage der ausführlich charakterisierten Arc/Arg3.1-Expression in den tg- und wt-Mäusen wurden die Tiere weiter auf funktioneller und Verhaltensebene charakterisiert, um den spezifischen Beitrag des dendritisch synthetisierten Arc/Arg3.1-Proteins zur plastischen Änderung der Synapsen und zur Gedächtnisbildung aufzuschlüsseln.

3.3 Verhaltensuntersuchungen der Tg(ARC-zif3UTR)-Mauslinie

2006 konnten wir nachweisen, dass das Arc/Arg3.1-Protein bei der Konsolidierung der langzeitigen synaptischen Plastizität und bei der Konsolidierung der durch den Lernprozess neu gebildeten Gedächtnisspuren in ihre langzeitigen Formen eine essentielle Rolle spielt. Die Arc/Arg3.1-defizienten Mäuse weisen ein starkes Defizit bei der Bildung des Langzeit-Gedächtnisses sowohl für hippokampusabhängige, explizite als auch für hippokampusunabhängige, implizite Lernaufgaben auf, während das Kurzzeit-Gedächtnis in den Mäusen intakt bleibt (Plath et al., 2006).

In den Tg(ARC-zif3UTR)-Mäusen ist die lokale Synthese des Arc/Arg3.1-Proteins in den Dendriten durch die Verhinderung der dendritischen Translokation der transgenen mRNA blockiert. Obwohl die synaptische Expression des Arc/Arg3.1-Proteins durch diese Änderung anscheinend nicht beeinträchtigt ist, bieten uns diese Mäuse gute Möglichkeiten, den Beitrag des dendritisch synthetisierten Arc/Arg3.1-Proteins zur Gedächtnisbildung zu studieren. Dazu wurden die Bildung der Gedächtnisspuren und die Konsolidierung des Langzeit-Gedächtnisses in den tg-Tieren mittels verschiedener Verhaltensparadigmen untersucht. Die Knockout-Geschwister (*littermates*) aus demselben Wurf dienten in den verhaltensbiologischen Experimenten als Kontrolltiere. Die Wildtyp-Mäuse aus der

Arc/Arg3.1-defizienten Mauslinie wurden als weitere Kontrolle in dem experimentellen Aufbau einbezogen. Gemäß den Vorschlägen der Banbury-Konferenz (Banbury Conference, 1997) besaßen alle in den Verhaltensanalysen verwendeten Mäuse aufgrund mindestens zehnmaliger Rückkreuzung in den Inzuchtstamm C57Bl6/J einen kongenen genetischen Hintergrund.

3.3.1 Verlust des hippocampusabhängigen Langzeit-Gedächtnisses im Test für „*novel object recognition*“ (NO) in Tg(ARC-zif3UTR)-Mäusen

Nagetiere zeigen in ihrem Explorationsverhalten eine ausgeprägte Bevorzugung neuartiger Objekte. Wird einer Maus gleichzeitig mit ihr schon bekannten Objekten ein neues, eingetaushtes Objekt präsentiert, so verbringt sie mehr Zeit mit der Erkundung des neuen Objektes. In diesem Verhalten reflektiert sich ein sogenanntes Erkennungsgedächtnis der Tiere, das heißt, die Eigenschaften und die räumliche Position eines bekannten Objektes können durch dieses Gedächtnis wieder abgerufen werden. Daher nimmt man an, dass das Wiedererkennen eines bekannten Objektes eine Form des Episoden-ähnlichen Gedächtnisses der Tiere ist. 1996 wurde davon berichtet, dass der Hippokampus für die langzeitige Retention des Erkennungsgedächtnisses essentiell ist (Vnek et al., 1996). In den letzten Jahren hat man die Aufgabe der Objekt-Erkennung und -Erkundung (NO) als ein standardisiertes Paradigma zur Untersuchung der hippocampusabhängigen Bildung des Langzeit-Gedächtnisses oft eingesetzt. Ein Vorteil der NO-Aufgabe besteht darin, dass die Retention eines Gedächtnisses nach dem Trainieren zu verschiedenen Zeitpunkten in einem experimentellen Aufbau untersucht werden kann und dadurch die Länge der Retention eines Gedächtnisses beurteilt werden kann.

Die langzeitige Retention (24 h) des Erkennungsgedächtnisses in einer NO-Aufgabe ist durch das Ausschalten des Arc/Arg3.1-Gens beeinträchtigt, während das Kurzzeit-Gedächtnis (10 min) intakt bleibt (Plath et al., 2006). Dasselbe Protokoll wurde in dieser Arbeit zur Beurteilung der Gedächtnis-Retention in den tg-Mäusen verwendet. Die Mäuse wurden in vier Trainingsperioden mit freier Exploration in einer Arena mit drei Objekten bekannt gemacht. Zehn Minuten bzw. 24 Stunden nach dem letzten Training wurden die Tiere in einer neuen Testperiode in die Arena zurückgesetzt, wo jetzt eines der drei Objekte durch ein neues Objekt ausgetauscht war. Ihr Explorationsverhalten gegenüber den Objekten während der

zehnminütigen Testperiode wurde auf Video aufgenommen und ausgewertet. Zwischen den Tieren aller drei Genotypen besteht kein Unterschied bei dem allgemeinen Interesse an der Objekterkundung, denn alle Tiere verbrachten während der Testperiode einen ähnlichen Anteil an Zeit für die Erkundung der Objekte (Daten nicht gezeigt). Um die Bevorzugung neuer Objekte bei ihrem Explorationsverhalten zu bewerten, wurde das Verhältnis zwischen der Zeit, die die Mäuse mit dem neuen Objekt verbrachten, und einem Mittelwert von den Zeiten, die sie jeweils mit den beiden bekannten Objekten verbrachten, als ein prozentualer Wert der Erkundung des neuen Objektes angegeben. Zehn Minuten nach dem letzten Training verbrachten die wt-, tg- und ko-Mäuse signifikant mehr Zeit mit dem neuen Objekt als mit den bekannten Objekten. Die prozentuale Erkundung des neuen Objektes zeigte keinen Unterschied zwischen den Genotypen (wt, 224,3% \pm 28,0%; tg, 265,6% \pm 42,6%; ko, 270,3% \pm 70,4%; $p = 0,845$ (*One Way ANOVA*); wt, $n = 8$; tg, $n = 10$; ko, $n = 10$) (Abbildung 3.8). Dies weist darauf hin, dass bei allen Genotypen das Erkennungsgedächtnis in Bezug auf neue und bekannte Objekte nach einem zehnminütigen Zeitintervall unverändert funktioniert.

Bei der 24-stündigen Retention des Erkennungsgedächtnisses bestand hingegen ein Unterschied zwischen den wt-Mäusen und den tg- bzw. ko-Mäusen. Während die wt-Tiere 24 Stunden nach dem letzten Training bei der Objekterkundung noch länger am neuen Objekt als am bekannten Objekt verweilten, hielten sich die tg- und ko-Tiere fast gleich lange an dem neuen und an dem bekannten Objekt auf (wt, 156,7% \pm 19,0%; tg, 104,5% \pm 13,7%; ko, 104,4% \pm 10,1%; $p = 0,026$ (*One Way ANOVA*); $p_{(wt/tg)} = 0,036$ (*t-test*); $p_{(wt/ko)} = 0,02$ (*t-test*); $p_{(tg/ko)} = 0,997$ (*t-test*); wt, $n = 8$; tg, $n = 10$; ko, $n = 10$) (Abbildung 3.8). Dies deutet darauf hin, dass bei den tg- und den ko-Mäusen die Länge der Gedächtnis-Retention für eine NO-Aufgabe im Vergleich zu der bei den wt-Tieren reduziert ist.

Kurz zusammengefasst: Das Explorationsverhalten der Tiere in der NO-Aufgabe demonstriert uns, dass das Arc/Arg3.1 bei der Retention des Erkennungsgedächtnisses eine essentielle Rolle spielt. Die tg- und ko-Mäuse können nach dem Lernen eine kurz andauernde Gedächtnisspur bilden. Die hippokampusabhängige langzeitige Retention des Gedächtnisses aber ist gestört. Darüber hinaus lässt der komplette Verlust der 24-stündigen Retention des Erkennungsgedächtnisses in den tg-Tieren interessanterweise einen Rückschluss auf eine spezifische Funktion des dendritisch synthetisierten Arc/Arg3.1-Proteins bei der hippokampusabhängigen Retention des Langzeit-Gedächtnisses zu. Die reduzierte Retention

des Erkennungsgedächtnisses bei den tg- und ko-Mäusen kann wahrscheinlich auf eine mangelhafte Konsolidierung eines neu gelernten Verhaltens ins Langzeit-Gedächtnis zurückgeführt werden.

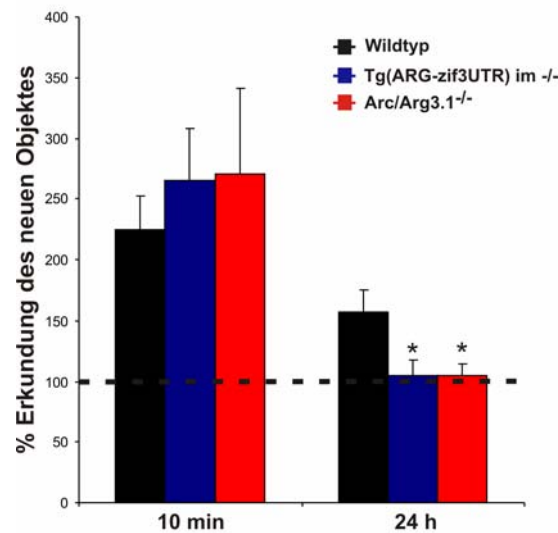


Abbildung 3.8: Reduzierte Retention des Erkennungsgedächtnis in den Tg(ARG-zif3UTR)-Mäusen sowie in den Arc/Arg3.1^{-/-}-Mäusen.

Angegeben ist das prozentuale Verhältnis der verbrachten Zeit zur Erkundung des neuen Objektes im Vergleich zur Erkundung der bekannten Objekte. Alle Genotypen verbrachten 10 min nach der Trainingsphase signifikant mehr Zeit mit dem neuen Objekt als mit den bekannten Objekten. 24 h nach dem letzten Training zeigten nur noch die wt-Tiere während einer zehnmütigen Exploration eine Bevorzugung neuer Objekte (wt, n = 8; tg, n = 10; ko, n = 10). Der Standard-Fehler des Mittelwertes (*SEM*) ist mit einem Fehler-Balken gezeigt.

3.3.2 Reduziertes intermediäres Gedächtnis und unbeeinträchtigt Langzeit-Gedächtnis während der Konsolidierung des kontextabhängigen Angstgedächtnisses in Tg(ARG-zif3UTR)-Mäusen

Die Angstkonditionierung (*fear conditioning*) von Nagetieren ist ein gutes Beispiel für die klassische Pawlowsche Konditionierung, mit der eine Form des Assoziationslernens bei Säugetieren entdeckt wurde. Bei der kontextabhängigen Angstkonditionierung wird ein neutraler Stimulus (*conditioned stimulus* (CS), in diesem Fall eine neue Umgebung, in der die Konditionierung stattfindet) mit einem schmerzhaften, aversiven Reiz (*unconditioned stimulus* (US), ein kurzer elektrischer Stromstoß am Fuß) assoziiert. Aufgrund der

erworbenen Assoziation zwischen US und CS reagieren die Mäuse auf die erneute Präsentation des CS mit einer angstbedingten aversiven Reaktion (*conditioned reaction* (CR), *freezing* = absolute Bewegungslosigkeit). Die Angstkonditionierung wird häufig bei der Untersuchung des emotionalen Lernens und der Gedächtnisbildung verwendet. Für die implizite Assoziation zwischen US und CS bei der Akquisition und Retention der Angstkonditionierung spielt der Amygdala eine zentrale Rolle (Repa et al., 2001). An der expliziten Wahrnehmung der Umgebung bei der kontextabhängigen Angstkonditionierung ist der Hippokampus beteiligt (Anagnostaras et al., 2001). Daher wird die kontextabhängige Angstkonditionierung als ein Lernparadigma zur Untersuchung des hippokampusabhängigen räumlichen Gedächtnisses verwendet.

Die Arc/Arg3.1-defizienten Mäuse zeigen ein Defizit bei der Bildung eines kontextabhängigen angstbedingten Langzeit-Gedächtnisses (Plath et al., 2006). In dieser Arbeit wurden die wt-, tg- und ko-Mäuse einem sogenannten „*single trial conditioning*“-Protokoll zur Überprüfung der Bildung und Retention des hippokampusabhängigen Angstgedächtnisses unterzogen. Mit diesem Protokoll wurden die Tiere durch eine einmalige Paarung des US mit dem CS konditioniert: Die Mäuse erhielten während ihrer Exploration einer neuen Umgebung einen elektrischen Stromstoß am Fuß. 24 Stunden bzw. zwei Wochen später wurde ihnen der CS (die Umgebung) erneut präsentiert und ihr angstbedingtes *freezing*-Verhalten in der Umgebung als konditionierte Reaktion (CR) bewertet. Keines der Tiere zeigte vor der Konditionierung eine *freezing*-Reaktion auf die Umgebung. Alle Genotypen reagierten auf die Paarung des US mit dem CS mit einem *freezing*-Verhalten (Abbildung 3.9 A). Eine Mausgruppe (acht Tiere je Genotyp) wurde 24 Stunden nach der Konditionierung in den Konditionierungskontext zurückgesetzt, und die Retention ihres Angstgedächtnisses entsprechend ihres *freezing*-Verhaltens ausgewertet. Während die wt-Mäuse ca. 50 % der Beobachtungszeit mit *freezing* auf den Kontext reagierten, zeigten die tg- und ko-Tiere eine deutlich reduzierte *freezing*-Rate (wt, 52,3% ± 7,0%; tg, 26,4% ± 3,5%; ko, 25,6% ± 4,9%; $p = 0,002$ (*One Way ANOVA*); $p_{(wt/tg)} = 0,005$ (*t-test*); $p_{(wt/ko)} = 0,007$ (*t-test*); $p_{(tg/ko)} = 0,895$ (*t-test*); wt, n = 8; tg, n = 8; ko, n = 8) (Abbildung 3.9 B). Dies Ergebnis bestätigt den in der oben genannten Literatur beschriebenen Verlust des kontextabhängigen Angstgedächtnisses der Arc/Arg3.1-defizienten Mäusen. Das ähnliche Gedächtnis-Defizit der tg-Mäuse und der ko-Mäusen lieferte uns jedoch einen weiteren Hinweis, dass das dendritisch synthetisierte

Arc/Arg3.1-Protein für die 24-stündige Retention des hippocampusabhängigen Angstgedächtnisses eine spezielle Rolle spielt.

Mit einer anderen Mausgruppe (sechs Tiere je Genotyp) wurde die zweiwöchige Retention des Angstgedächtnisses überprüft. Dies brachte ein erstaunliches Ergebnis. Während bei den wt-Mäusen kein signifikanter Unterschied zwischen der 24-stündigen und der zweiwöchigen Retention des kontextabhängigen Angstgedächtnisses bestand, wiesen die ko-Mäuse einen weiteren Verlust dieses Gedächtnisses auf (wt-24h, $52,3\% \pm 7,0\%$; wt-2w, $44,2\% \pm 9,6\%$; $p_{wt} = 0,497$ (*t-test*); wt-24h, n = 8; wt-2w, n = 6; ko-24h, $25,6\% \pm 4,9\%$; ko-2w, $3,4\% \pm 0,7\%$; $p_{ko} < 0,001$ (*t-test*); ko-24h, n = 8; ko-2w, n = 6) (Abbildung 3.9 B). Die ko-Tiere verloren nach dem zweiwöchigen Zeitintervall die angstbedingte Assoziation des US mit dem CS fast vollständig. Der partielle Verlust der 24-stündigen Gedächtnis-Retention der tg-Mäuse hingegen wurde überraschenderweise kompensiert: Die bei der Konditionierung erlernte Assoziation des US mit dem CS ist zwei Wochen später im Gedächtnis der tg-Tiere wieder vollständig abrufbar (tg-24h, $26,4\% \pm 3,5\%$; tg-2w, $70,3\% \pm 3,3\%$; $p_{tg} < 0,001$ (*t-test*); tg-24h, n = 8; tg-2w, n = 6) (Abbildung 3.9 B).

Kurz zusammengefasst: Die *freezing*-Reaktion der Tiere in der kontextabhängigen Angstkonditionierung demonstriert uns, dass das Arc/Arg3.1-Protein eine essentielle Bedeutung für die Konsolidierung des hippocampusabhängigen angstbedingten Langzeit-Gedächtnisses hat. Der Zeitverlauf der Gedächtniskonsolidierung in den tg- und den ko-Mäusen während der kontextabhängigen Angstkonditionierung lässt uns vermuten, dass sich die Wirkungsweise des Arc/Arg3.1-Proteins bei der Gedächtniskonsolidierung stufenweise abspielt. Die lokale Synthese des Arc/Arg3.1-Proteins in Dendriten erscheint von großer Bedeutung für die Konsolidierung des 24-stündigen Gedächtnisses, das ich hier mit dem Begriff „intermediäres Gedächtnis“ bezeichne. Die spezifische Blockierung der dendritischen Synthese des Arc/Arg3.1-Proteins führt zu einer selektiven Reduktion des intermediären Gedächtnisses (24 h) der tg-Mäuse. Das unveränderte Langzeit-Gedächtnis (2 Wochen) in den tg-Tieren und der vollständige Verlust des Langzeit-Gedächtnisses in den ko-Mäusen weisen jedoch auf eine wesentliche Rolle des somatisch synthetisierten Arc/Arg3.1-Proteins für die langfristige Gedächtniskonsolidierung hin.

Das unterschiedliche *freezing*-Verhalten der Genotypen bei der Angstkonditionierung könnte auf unterschiedliche Schmerzsensitivität zurückzuführen sein. Kein *freezing*-Verhalten vor der Konditionierung und die ähnliche *freezing*-Reaktion während der Akquisition schließen diese Möglichkeit jedoch aus. Darüber hinaus wurde eine mögliche Veränderung der allgemeinen Ängstlichkeit der Versuchstiere durch ihr normales Verhalten im *O-maze*-Experiment und im Hell/Dunkel-Kammer-Experiment (siehe Kapitel 3.3.4) ausgeschlossen. Daher kann das unterschiedliche Verhalten in der kontextabhängigen Angstkonditionierung auf eine spezifische Veränderung der kognitiven Gehirnfunktion zurückgeführt werden.

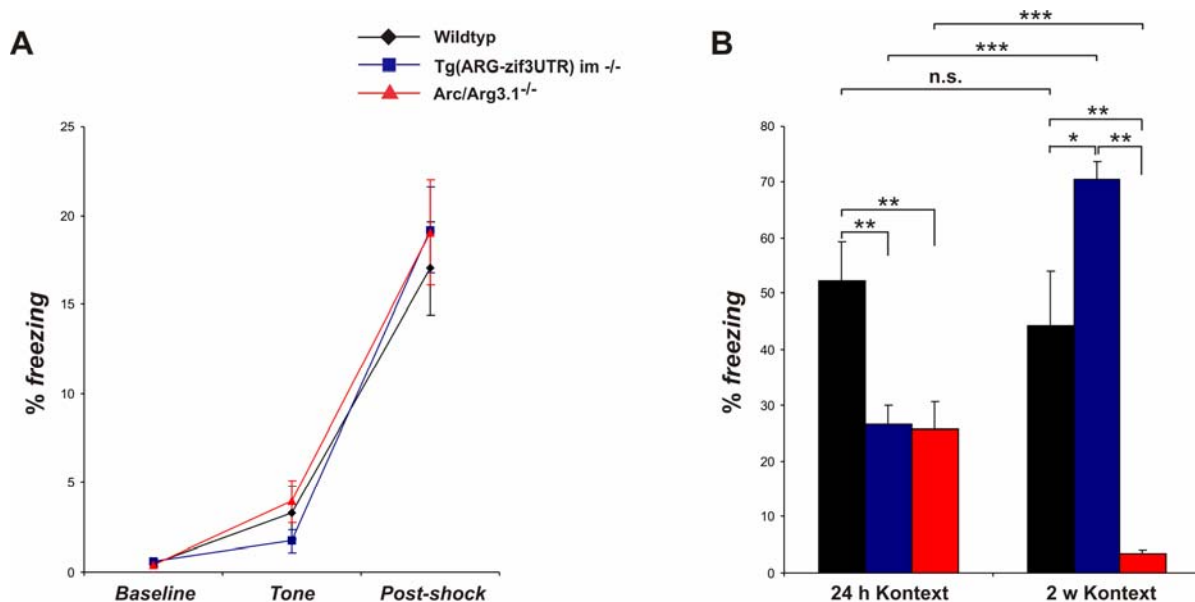


Abbildung 3.9: Ungewöhnliche Konsolidierung des kontextabhängigen Langzeit-Angstgedächtnisses in den Tg(ARG-zif3UTR)-Mäusen.

(A) *Freezing*-Reaktion während der Akquisition bleibt bei den tg- und ko-Tieren unverändert im Vergleich zu den wt-Tieren ($p > 0,1$ (*One Way ANOVA*); $n = 14$ für alle Genotypen).

(B) Tg- und ko-Mäuse zeigen reduziertes *freezing* in dem Kontext 24 h nach der Konditionierung (wt, $52,3\% \pm 7,0\%$; tg, $26,4\% \pm 3,5\%$; ko, $25,6\% \pm 4,9\%$; $p = 0,002$ (*One Way ANOVA*); $p_{(wt/tg)} = 0,005$ (*t-test*); $p_{(wt/ko)} = 0,007$ (*t-test*); $p_{(tg/ko)} = 0,895$ (*t-test*); wt, $n = 8$; tg, $n = 8$; ko, $n = 8$). Zwei Wochen nach der Konditionierung zeigt die *freezing*-Rate der ko-Tiere eine weitere Reduktion (ko-24h, $25,6\% \pm 4,9\%$; ko-2w, $3,4\% \pm 0,7\%$; $p_{ko} < 0,001$ (*t-test*); ko-24h, $n = 8$; ko-2w, $n = 6$). Das reduzierte 24-stündige *freezing* der tg-Tiere wird hingegen vollständig kompensiert (tg-24h, $26,4\% \pm 3,5\%$; tg-2w, $70,3\% \pm 3,3\%$; $p_{tg} < 0,001$ (*t-test*); tg-24h, $n = 8$; tg-2w, $n = 6$). Der Standard-Fehler des Mittelwertes (*SEM*) ist mit einem Fehler-Balken gezeigt.

3.3.3 Unverändertes implizites Langzeit-Gedächtnis im Test für „*conditioned taste aversion*“ (CTA) in Tg(ARC-zif3UTR)-Mäusen

Neben seiner Rolle für die hippokampusabhängigen Lernparadigmen ist das Arc/Arg3.1-Protein für die Bildung des hippokampusunabhängigen Langzeit-Gedächtnisses für implizite Lernaufgaben unentbehrlich (Plath et al., 2006). Als eine spezielle Form der klassischen aversiven Konditionierung ist CTA ein gut etabliertes Lernparadigma für Nagetiere. Dabei wird ein neuartiger Geschmack (CS) mit einem durch Lithiumchlorid ausgelösten Brechreiz (US) assoziiert. Als Konsequenz meiden die Mäuse bereits nach einmaliger Erfahrung den speziellen Geschmack (CR). Darüber hinaus besitzt das erworbene aversive Gedächtnis für diesen Geschmack eine lange Retention. An der Konsolidierung dieses impliziten Gedächtnisses ist der Hippokampus nicht beteiligt (Welzl et al., 2001).

Der Erwerb des Langzeit-Gedächtnisses für den konditionierten aversiven Geschmack ist bei den Arc/Arg3.1-defizienten Mäusen beeinträchtigt (Plath et al., 2006). CTA wurde in dieser Arbeit zur Untersuchung der Retention des impliziten Gedächtnisses der tg-Mäuse eingesetzt. Normalerweise zeigen Mäuse Gefallen an süßem Geschmack. In dem CTA-Versuch tranken die Tiere eine Saccharinlösung. Eine Stunde danach erhielten sie eine Lithiumchlorid-Injektion, die eine allgemeine Malaise bewirkte. Die daraufhin zu erwartende Aversion gegen den süßen Geschmack der Saccharinlösung wurde in verschiedenen Zeitintervallen durch eine Trink-Wahl zwischen Saccharinlösung und Wasser getestet. Die Gedächtnis-Retention der Tiere für den konditionierten Geschmack wurde danach bewertet, wie viel Prozent Saccharinlösung von der Gesamttrinkmenge die Tiere tranken. Um die Spezifität der Assoziation des süßen Geschmacks mit der Lithiumchlorid-induzierten Malaise zu überprüfen, wurde nach dem Trinken der Saccharinlösung eine kleine Gruppe von den Tieren (wt, n = 5; tg, n = 3; ko, n = 3) mit Natriumchlorid injiziert. In den vorläufigen Untersuchungen wurde die Retention des CTA-Gedächtnisses zu verschiedenen Zeitpunkten (24 h, 48 h und 2 w) nach der Konditionierung der wt-, tg- und ko-Mäuse geprüft. Anders als in der kontextabhängigen Angstkonditionierung sind bei allen Genotypen keine zeitabhängigen Veränderungen der Retention des CTA-Gedächtnisses zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Das heißt, das erworbene implizite Gedächtnis für den aversiven Geschmack bleibt bei allen Genotypen über die Zeit (bis zu mindestens zwei Wochen) stabil. Die Stärke des

konsolidierten CTA-Gedächtnisses hingegen war bei den Genotypen verschieden. Während die wt- und tg-Mäuse bei der ersten Trink-Wahl zwischen Saccharinlösung und Wasser 28,5% bzw. 21,3% Saccharinlösung konsumierten, zeigten die ko-Tiere eine schwächere Aversion gegen den konditionierten Geschmack (Konsumtion: 57,5% Saccharinlösung) (wt, 28,5% \pm 5,0%; tg, 21,3% \pm 4,2%; ko, 57,5% \pm 6,5%; $p < 0,001$ (*One Way ANOVA*); $p_{(wt/tg)} = 0,284$ (*t-test*); $p_{(wt/ko)} = 0,002$ (*t-test*); $p_{(tg/ko)} < 0,001$ (*t-test*); $n = 12$ für alle Genotypen) (Abbildung 3.10). Alle mit Natriumchlorid injizierten Kontrolltiere tranken einen ähnlich großen Anteil der Saccharinlösung an der gesamten Flüssigkeit-Konsumtion (88,9% \pm 3,0% Saccharinlösung). Um die Schwächung des erworbenen Gedächtnisses der Mäuse zu analysieren, wurde den Tieren die Saccharinlösung in einer zweiten Trink-Wahl erneut präsentiert. Im Vergleich zu der ersten Trink-Wahl war die Konsumtion der Saccharinlösung in dem zweiten Test bei allen Tieren erhöht (wt, 46,8% \pm 7,1%; tg, 36,3% \pm 6,6%; ko, 79,9% \pm 7,7%; $p < 0,001$ (*One Way ANOVA*); $p_{(wt/tg)} = 0,293$ (*t-test*); $p_{(wt/ko)} = 0,005$ (*t-test*); $p_{(tg/ko)} < 0,001$ (*t-test*); $n = 10$ für alle Genotypen) (Abbildung 3.10). Dabei tranken die ko-Mäuse den fast gleichen Anteil Saccharinlösung wie die Kontrolltiere. Die Beeinträchtigung der impliziten Gedächtniskonsolidierung der ko-Mäuse wurde durch dieses Ergebnis bestätigt. Die tg-Tiere waren aber in der Lage, ein stabiles implizites Gedächtnis für den konditionierten Geschmack zu erwerben und beizubehalten. Dies liefert uns den Hinweis, dass für die Konsolidierung des hippocampusunabhängigen CTA-Gedächtnisses die dendritische Synthese des Arc/Arg3.1-Proteins nicht unbedingt notwendig ist. Kurz zusammengefasst, demonstriert uns das Verhalten der wt-, tg- bzw. ko-Mäuse in der CTA-Aufgabe, dass für die Stärke eines erworbenen impliziten Gedächtnisses die allgemeine neuronale Expression, aber nicht die dendritische Synthese des Arc/Arg3.1-Proteins eine wesentliche Bedeutung hat.

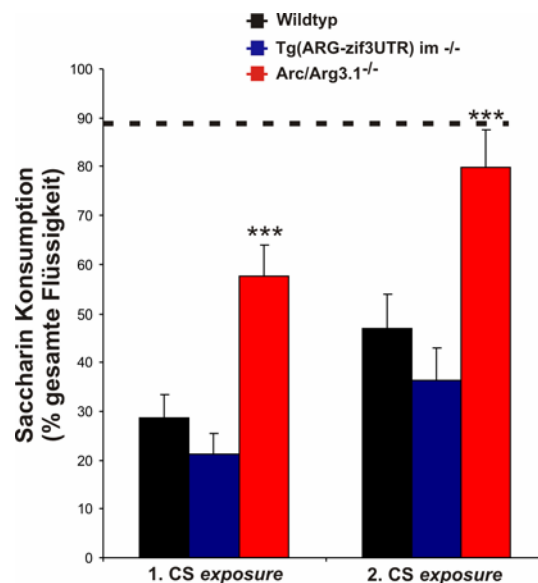


Abbildung 3.10: Intakte Gedächtniskonsolidierung der Tg(ARG-zif3UTR)-Mäuse in dem impliziten CTA-Lernparadigma.

Prozentualer Anteil der Saccharinlösung an der gesamten Flüssigkeit-Konsumption bei einer Trink-Wahl zwischen Saccharinlösung und Wasser. Die ko-Mäuse zeigen signifikant weniger Aversion gegen den Geschmack der Saccharinlösung während der beiden Wahl-Tests, während die Geschmack-Aversion der tg-Mäuse im Vergleich zu den wt-Mäusen unverändert bleibt. Der Standard-Fehler des Mittelwertes (*SEM*) ist mit einem Fehler-Balken gezeigt.

In einer Serie der Lernparadigmen weisen die Tg(ARG-zif3UTR)-Mäuse ein einzigartiges Spektrum ihres kognitiven Verhaltens auf. Während die Retention des hippocampusabhängigen Langzeit-Gedächtnisses in der NO-Aufgabe (siehe Kapitel 3.3.1) stark beeinträchtigt war, blieb das hippocampusunabhängige Langzeit-Gedächtnis in der CTA-Aufgabe (siehe Kapitel 3.3.3) intakt. In der kontextabhängigen Angstkonditionierung (siehe Kapitel 3.3.2) war das intermediäre Gedächtnis (24 h) in den tg-Tieren selektiv reduziert, während ihr Langzeit-Gedächtnis (2 Wochen) unbeeinträchtigt geblieben war. Das Lernverhalten der tg-Mäuse zeigt an, dass für die verschiedenen Lernparadigmen außer unterschiedlichen Gehirnregionen auch unterschiedliche Mechanismen auf der molekularen Ebene zuständig sind. Mit dieser Entdeckung eröffnen uns die tg-Mäuse gute Aussichten, eine mögliche Korrelation zwischen der anatomischen Grundlage und den molekularen Mechanismen der Gedächtniskonsolidierung zu untersuchen.

3.3.4 Allgemeine Ängstlichkeit der Tg(ARG-zif3UTR)-Mäuse bleibt unverändert

Um bei den tg- und ko-Mäusen eine generelle Veränderung der Ängstlichkeit oder der Motivation, die die oben durchgeführten Lernexperimente hätten beeinträchtigen können, auszuschließen, wurden zwei weitere Verhaltenstests durchgeführt: das *Elevated O-maze*-Experiment und das Hell/Dunkel-Kammer-Experiment. In beiden Tests werden die Mäuse mit dem Konflikt zwischen ihrem angeborenen Explorationsverhalten in neuen Umgebungen einerseits und ihrer natürlichen Aversion gegenüber potentiell gefährlichen Situationen andererseits konfrontiert. An ihren Reaktionen auf diese Konfrontationen kann man ablesen, ob ihre Ängstlichkeit bzw. Motivation im normalen Bereich liegt oder nicht.

Elevated O-maze

Das *Elevated O-maze* ist ein hochgelegener, schmaler, kreisförmiger Laufsteg, der in vier Sektoren aufgeteilt ist: zwei dunkle, von Wänden geschützte Teile und zwei helle, ungeschützte Teile. Die dunklen und hellen Sektoren liegen sich jeweils gegenüber. Die Lokomotionsmessungen ergaben keine Unterschiede zwischen den wt-, tg- und ko-Mäusen. Die tg- und ko-Tiere hielten sich genau so lange in den ungeschützten Sektoren auf wie die wt-Mäuse (Abbildung 3.11 A).

Hell/Dunkel-Kammer

In der Hell/Dunkel-Kammer können die Versuchstiere zwischen einem kleinen, dunklen Abteil und einem größeren, offenen und hell erleuchteten Abteil, die beide miteinander verbunden sind, wählen. Auch hier zeigten die gemessenen Parameter, u.a. die Dauer und Anzahl des Aufenthalts in dem offenen Abteil, keine Unterschiede zwischen den Genotypen (Abbildung 3.11 B).

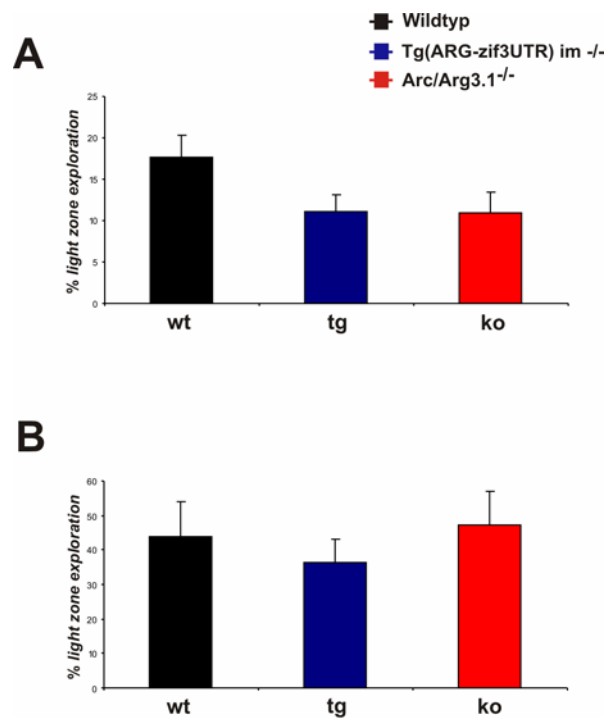


Abbildung 3.11: Unveränderte Ängstlichkeit und Motivation der Tg(ARG-zif3UTR)-Mäuse.

(A) *Elevated O-maze*. Prozentualer Anteil der Zeitdauer für die Exploration der ungeschützten Sektoren während eines 10-minütigen Experiments. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen ($p > 0,1$ (*One Way ANOVA*); wt, n = 6; tg, n = 10; ko, n = 8).

(B) Hell/Dunkel Kammer. Prozentualer Anteil der Zeitdauer für die Exploration des erleuchteten Abteils während eines 5-minütigen Experiments. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen ($p > 0,4$ (*One Way ANOVA*); wt, n = 6; tg, n = 10; ko, n = 8).

Der Standard-Fehler des Mittelwertes (*SEM*) ist mit einem Fehler-Balken gezeigt.

Diese Kontrollexperimente beweisen, dass die Defizite, die bei den tg- und den ko-Mäusen in verschiedenen Lernparadigmen festgestellt wurden, weder auf eine Veränderung ihrer allgemeinen Ängstlichkeit oder Motivation noch auf eine Dysfunktion ihres generellen Explorationsverhaltens zurückzuführen sind, sondern spezifisch auf einer Störung der kognitiven Gehirnfunktionen beruhen.