

# **Funktionelle Charakterisierung des aktivitätsregulierten Gens Arg3.1**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Niels Plath  
aus Oberhausen

Berlin, 2004

1. Gutachter: Prof. Dr. Dietmar Kuhl
2. Gutachter: Prof. Dr. Randolph Menzel

Disputation am 17. August 2004

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	6
	<b>Summary</b>	8
<b>2.</b>	<b>Einleitung</b>	10
2.1	Lernen und Gedächtnis	10
2.2	Der Hippokampus	14
2.3	Die molekularen Grundlagen der synaptischen Plastizität	16
2.4	Die postsynaptische Dichte	18
2.5	Aktivitätsregulierte Gene	19
2.6	Das aktivitätsregulierte Gen Arg3.1	21
2.7	Dendritische Lokalisierung und Translation von mRNAs	22
2.8	Zielgerichtete Genmutationen in der Maus	23
2.9	Zielsetzung der Arbeit	25
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	27
3.1	Die zelluläre Lokalisation von Arg3.1	27
3.1.1	Arg3.1 ist selektiv an aktivierten Synapsen lokalisiert	27
3.1.2	Arg3.1 ist in der PSD lokalisiert	31
3.1.3	Arg3.1 ist mit dem NMDA-Rezeptor-Komplex assoziiert	32
3.2	Funktionelle Charakterisierung einer Arg3.1 <i>knockout</i> -Mauslinie	37
3.2.1	Herstellung einer Arg3.1 <i>knockout</i> -Mauslinie	37
3.2.2	Unveränderte Gehirnmorphologie in Arg3.1 <i>knockout</i> -Mäusen	40
3.2.3	Analyse der synapsenspezifischen Proteine in Arg3.1 <i>knockout</i> -Mäusen	43
3.2.4	Arg3.1 <i>knockout</i> -Mäuse bilden keine lang anhaltende LTP aus	49
3.2.5	Arg3.1 ist essentiell an der Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses beteiligt	51
3.2.5.1	Das <i>Morris water maze</i>	52
3.2.5.2	Furchtkonditionierung	58
3.2.5.3	Allgemeine Ängstlichkeits- und Motivationstests	60
3.2.6	Genomanalyse ( <i>genomics</i> ) der Arg3.1 <i>knockout</i> -Linie	62
3.2.6.1	Unterschiede im DNA <i>microarray</i> von Wildtyp- und Arg3.1 <i>knockout</i> -Mäusen	64
3.2.6.2	Kontrolle des <i>microarrays</i> mittels rtPCR	67
3.2.6.3	SOCS3 Analyse	69
3.2.6.3.1	In situ Analyse der SOCS3 Verteilung in Wildtyp- und Arg3.1 <i>knockout</i> -Tieren	69
3.2.6.3.2	Analyse weiterer Mitglieder der SOCS Familie und anderer assoziierter Kandidaten	71
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	76
4.1	Die Rolle von Arg3.1 an der Synapse	76
4.2	Die funktionelle Charakterisierung einer Arg3.1 <i>knockout</i> -Mauslinie	81
4.2.1	Allgemeine Aspekte	81
4.2.2	Die Ausbildung einer stabilen LTP ist abhängig von Arg3.1	82
4.2.3	Die Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses ist abhängig von Arg3.1	85
4.2.4	Ein Vergleich mit anderen <i>knockout</i> -Linien	91

4.3	Auswirkungen der Arg3.1 Deletion auf die Genexpression	92
4.3.1	SOCS3 wird im Gehirn von Arg3.1 <i>knockout</i> -Mäusen nicht induziert	95
4.3.2	C-fos wird im Arg3.1 <i>knockout</i> differentiell reguliert	99
4.4	Ausblick	101
<b>5.</b>	<b>Material</b>	<b>104</b>
5.1	Chemikalien	104
5.2	Geräte	104
5.3	Computersoftware	105
5.4	Puffer und Lösungen	105
5.5	Nukleinsäuren	110
5.5.1	Vektoren	110
5.5.2	Oligonukleotide	110
5.6	Enzyme	111
5.7	Kits	111
5.8	Antikörper	111
5.9	Bakterienstämme	112
5.10	Sonstiges	112
<b>6.</b>	<b>Methoden</b>	<b>113</b>
6.1	Mikrobiologische Techniken	113
6.1.1	Herstellung elektrokompeter Zellen	113
6.1.2	Herstellung chemokompeter Bakterien nach Inoue	113
6.1.3	Transformation von Bakterien durch Elektroporation	113
6.1.4	Chemische Transformation von Bakterien	114
6.2	Molekularbiologische Techniken	114
6.2.1	DNA	114
6.2.1.1	Isolierung plasmidischer DNA aus Bakterien	114
6.2.1.2	Isolierung genomischer DNA aus Mausschwänzen	114
6.2.1.3	PCR	115
6.2.1.4	Genotypisierung des kompletten und konditionalen Arg3.1 <i>knockouts</i>	115
6.2.1.5	Restriktionsverdau plasmidischer DNA	115
6.2.1.6	DNA-Gelelektrophorese	116
6.2.1.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegele	116
6.2.1.8	Phosphatasebehandlung von 5'-überhängenden Enden	116
6.2.1.9	Ligation	116
6.2.1.10	Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA	116
6.2.1.11	DNA-Sequenzierung	117
6.2.1.12	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	117
6.2.1.13	Klonierung des Vektors pGEX-PSD-95 <sub>(PDZ1-3,SH3)</sub>	117
6.2.1.14	Densitometrische Auswertung von DNA-Signalen in Agarosegelen	117
6.2.2	RNA	117
6.2.2.1	Isolierung und Reinigung totaler RNA-Fractionen	117
6.2.2.2	Auftrennung von RNA in Formaldehyd/Agarosegelen	118
6.2.2.3	Northern Blot	118
6.2.2.4	Hybridisierung der Northern Blot Membran	118
6.2.2.5	<i>In situ</i> Hybridisierung an Gewebeschnitten	119
6.2.2.5.1	Herstellung der Gehirnschnitte	119
6.2.2.5.2	<i>In vitro</i> Transkription	119
6.2.2.5.3	Größenreduktion der RNA-Sonde	119

6.2.2.5.4	Vorbereitung der Gehirnschnitte	119
6.2.2.5.5	Hybridisierung	120
6.2.2.5.6	Waschen und Entwickeln	120
6.2.2.6	<i>microarray</i>	120
6.2.2.7	rtPCR	121
6.2.3	Proteine	123
6.2.3.1	Immunhistochemische Färbungen mit DAB	123
6.2.3.2	Immunogoldfärbungen	123
6.2.3.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	124
6.2.3.4	Präparation von Gesamtgehirnextrakten	124
6.2.3.5	PSD-Aufreinigung	124
6.2.3.6	Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	124
6.2.3.6.1	Expression rekombinanter Proteine in <i>E.coli</i>	124
6.2.3.6.2	Aufreinigung rekombinanter GST-Fusions-Proteine aus <i>E.coli</i>	125
6.2.3.6.3	Aufreinigung von His <sub>6</sub> -rekombinanten Proteinen aus <i>E.coli</i>	125
6.2.3.7	Kopplung synthetischer Peptide an eine NHS-Matrix	127
6.2.3.8	Affinitätschromatographische Experimente	127
6.2.3.9	Co-Immunpräzipitierung	127
6.2.3.10	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	127
6.2.3.11	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	128
6.2.3.12	Coomassie-Färbung eines Protein-Gels	128
6.2.3.13	Western Blot	128
6.2.3.14	Detektion eines Western Blots	128
6.2.3.15	Western Blot <i>stripping</i>	129
6.3	Tierversuche	129
6.3.1	Induktion von epileptischen Anfällen	129
6.3.2	Perfusion von Mäusen	129
6.3.3	Mauszucht	130
6.3.4	Verhaltensbiologische Experimente	130
6.3.4.1	<i>Morris water maze</i>	130
6.3.4.2	Furchtkonditionierung	132
6.3.4.3	Offene Arena	132
6.3.4.4	<i>Elevated O-Maze</i>	133
6.3.4.5	Hell/Dunkel-Kammer	133
6.3.4.6	Statistik	133
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>135</b>
	Abkürzungsverzeichnis	151
	Danksagung	153
	Lebenslauf	154