

### **3. Ergebnisse**

Im Rahmen der Funktionsanalyse von Arg3.1 bei den Prozessen der synaptischen Plastizität im Gehirn von Säugetieren wurden für die vorliegende Arbeit zwei getrennte Projekte bearbeitet:

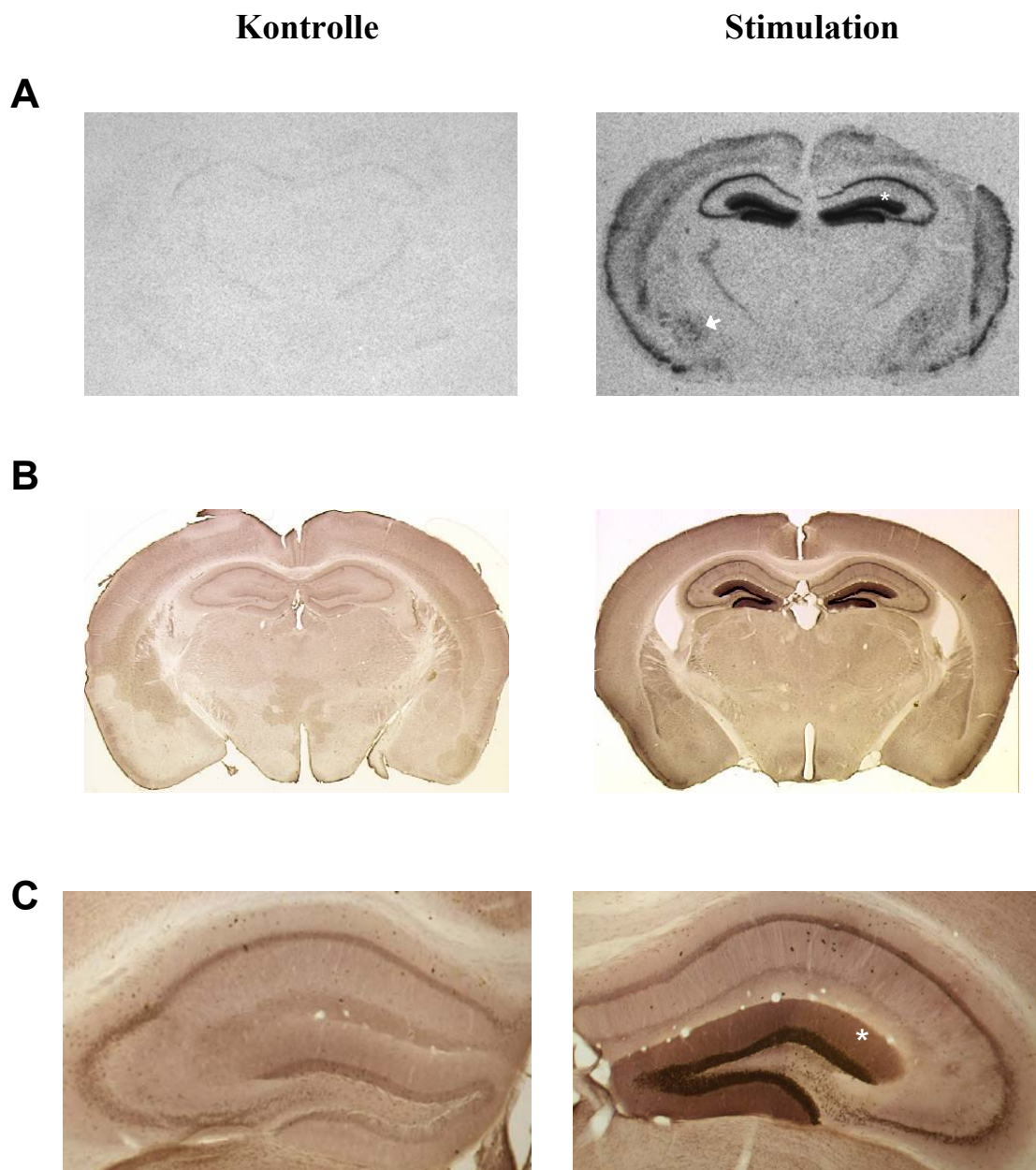
Im ersten Projekt galt es, die exakte Lokalisation von Arg3.1 in Nervenzellen zu untersuchen sowie mögliche Interaktionspartner zu identifizieren. Dafür wurden immunhistochemische und molekularbiologische Studien am Gehirn von Wildtyp-Mäusen durchgeführt.

Parallel dazu wurde im zweiten Projekt eine Arg3.1 *knockout*-Mauslinie im Rahmen einer multidisziplinären Studie analysiert. Diese sollte einen umfassenden Einblick geben in die phänotypischen Veränderungen, die aus der Deletion von Arg3.1 resultieren. Es wurden dafür neben molekularbiologischen und biochemischen auch verhaltensbiologische Experimente durchgeführt, die, im Rahmen einer Kooperation, durch elektrophysiologische Versuchsreihen ergänzt wurden.

#### **3.1 Die zelluläre Lokalisation von Arg3.1**

##### **3.1.1 Arg3.1 ist selektiv an aktivierten Synapsen lokalisiert**

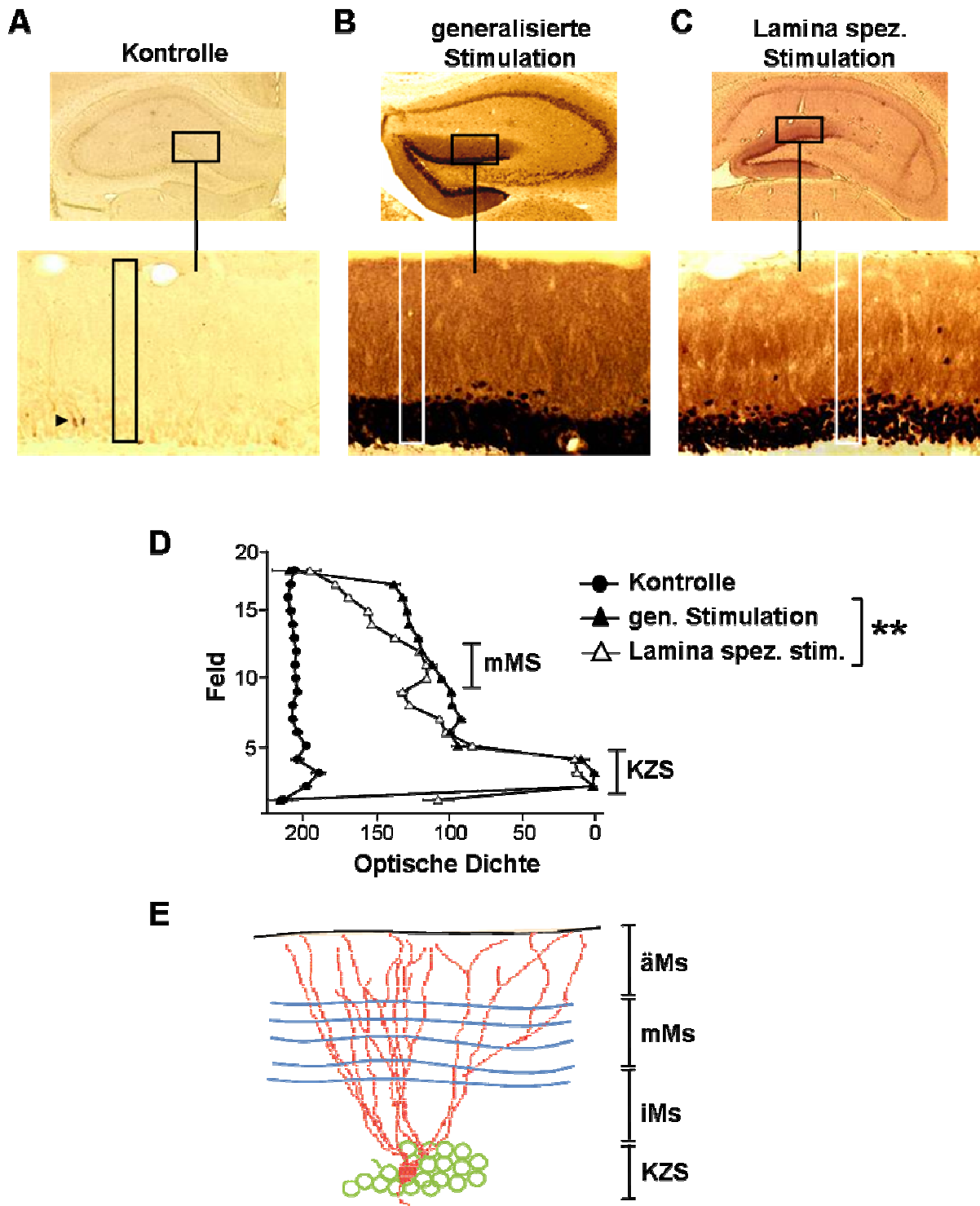
Wie bereits einleitend erwähnt, ist Arg3.1 einzigartig unter den aktivitätsregulierten Genen, da mRNA und Protein dendritisch lokalisiert sind. So lässt sich nach dem Auslösen neuronaler Aktivität im Hippokampus, z. B. durch einen kainatinduzierten epileptischen Anfall, das Transkript im gesamten Bereich der dendritischen Verästelungen bis hin in die distalen Ausläufer nachweisen. Dabei setzt die Transkription bereits wenige Minuten nach der Stimulation ein und die mRNA wird unmittelbar darauf in die Peripherie transportiert. Abbildung 3.1 zeigt die somatodendritische Verteilung sowohl des Arg3.1 Transkriptes als auch des Proteins vier Stunden nach neuronaler Aktivität. Die früheren Beobachtungen von Oswald Steward und Paul Worley, nach denen die Arg3.1 mRNA spezifisch an den aktivierten Synapsen lokalisiert ist, weisen auf eine lokale Translation der mRNA in den Dendriten hin (Steward et al, 1998). Um zu testen, ob auch das Arg3.1 Protein gezielt in den aktivierten dendritischen Regionen akkumuliert, wurden immunhistochemische Färbungen an laminaspezifisch stimulierten Hirnschnitten durchgeführt. Bei dieser Form der Stimulation werden die Axone des mittleren Tractus perforans mit hochfrequenter, LTP-induzierender Reizgabe erregt. Der Tractus perforans projiziert aus dem entorhinalen Kortex u. a. in den



**Abbildung 3.1: Expression der Arg3.1 Transkription und Translation**

(A) *In situ* Hybridisierungen mit einer radioaktiv markierten Arg3.1 Sonde an koronalen Gefrierschnitten des Mausehirns von Wildtyp-Mäusen vor und 4 h nach Einsetzen eines kainatinduzierten Anfalls. Die Autoradiogramme zeigen die stärksten Signale für Arg3.1 nach Stimulation im Hippokampus (v.a. dendritische Lokalisierung, Stern) und im Kortex (inkl. der Amygdala, Pfeil). (B) Immunhistochemische Färbungen mit einem aufgereinigten Arg3.1 Antiserum an koronalen Vibratomschnitten zeigen die der mRNA Verteilung entsprechende somatodendritische Proteinlokalisierung vor und 4 h nach Einsetzen eines kainatinduzierten Anfalls. (C) Vergrößerungen der Hippokampi aus (B).

Gyrus dentatus des Hippokampus und innerviert hier den dendritischen Eingangsbereich der Körnerzellschicht, die sog. Molekularschicht (vgl. Abb. 2.2). Die topographische Verteilung der neuronalen Verknüpfungen ist dabei streng geordnet angelegt. So projizieren die Axone des mittleren Tractus perforans auf die mittlere Molekularschicht (die mittlere „Lamina“ → laminaspezifische Stimulation) des Gyrus dentatus und bilden dort ihre synaptischen Kontakte aus (s. Abb. 3.2 E). Die hochfrequente Stimulation des mittleren Tractus perforans führt daher zur Ausbildung der synaptischen Potenzierung ausschließlich im Bereich der mittleren Molekularschicht des Gyrus dentatus. Eine solche Stimulation wurde, im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tim Bliss am NIMR in London, England, von Mick Errington an Ratten durchgeführt. Die Gehirne wurden dann immunhistochemisch auf die Verteilung von Arg3.1 untersucht. Abbildung 3.2 zeigt das Muster der Arg3.1 Lokalisierung im Hippokampus von Kontroll-, Kainat-, und laminaspezifisch stimulierten Tieren mit Vergrößerungen des Gyrus dentatus. Die Gehirne von nicht stimulierten Kontrolltieren zeigten eine sehr niedrige Basalexpression, wobei vereinzelte Arg3.1 positive Zellen auf das physiologische Aktivitätsmuster im Hippokampus kurz vor der Präparation hindeuten (Abb. 3.2A, vgl. Kap. 2.2 und 2.6). Dagegen war, wie bereits in Abbildung 3.1 gesehen, vier Stunden nach der Induktion eines epileptischen Anfalls eine starke Arg3.1 Protein Expression im Hippokampus nachweisbar, die sich sowohl auf den Zellkörper als auch die Dendriten erstreckte (Abb. 3.2B). Die stärksten Färbungen zeigten sich dabei im Gyrus dentatus, während die Induktion in den Pyramidenzellen der CA1-CA3 Regionen etwas schwächer ausfiel. Dies ist zum einen darauf zurückzuführen, dass nach einem generalisierten Krampf die Arg3.1 Expression in der CA-Region schneller als im Gyrus dentatus wieder abnimmt. Zum anderen verursacht die geringere Zelldichte in den Pyramidalschichten CA1-CA3 generell schwächere Färbungen. Dieses Muster einer ubiquitär verteilten Expression änderte sich grundlegend nach der gezielten Stimulation des mittleren Tractus perforans. Das Arg3.1 Protein akkumulierte hier vier Stunden nach Stimulation selektiv im Bereich der mittleren Molekularschicht, also dort, wo die präsynaptische Reizung übertragen wurde (Abb. 3.2C). Zusätzlich war Arg3.1 sehr stark im Soma und etwas schwächer auch in den proximalen Ansätzen der Dendriten, also in der inneren Molekularschicht, lokalisiert. Die somatische Expression deutet darauf hin, dass auch für den Fall einer Translation von Arg3.1 im dendritischen Bereich zumindest ein Teil des Proteins auch im Zellkörper synthetisiert wird. Das Arg3.1 Signal in den proximalen Dendriten könnte demnach von aus dem Soma heraus transportiertem Protein stammen. Es ist aber nicht auszuschließen, dass die Stimulation auch Teile der inneren Molekularschicht innervierte und dort eine lokale



**Abbildung 3.2: Analyse der selektive Lokalisierung von Arg3.1 an stimulierten Synapsen**

(A) (B) (C) Immunhistochemische Analyse der Arg3.1 Expression im Hippokampus (obere Reihe) mit Vergrößerungen der Molekular- und Körnerzellschicht des Gyrus dentatus (untere Reihe) unter verschiedenen Stimulationsbedingungen. (A) Basalexpression von Arg3.1 unter Kontrollbedingungen. Die einzelnen immunreaktiven Zellen der Körnerzellschicht (Pfeilkopf) geben Aufschluss über kürzlich aktivierte Nervenzellen im Hippokampus. (B) Expressionsmuster 4 h nach dem Einsetzen →



Proteinsynthese auslöste. Eine densitometrische Analyse der drei immunhistochemischen Färbungen konnte zeigen, dass nach der laminaspezifischen Induktion das Arg3.1 Signal im Bereich der mittleren Molekularschicht im Vergleich zu den benachbarten Regionen um das 1,4-fache stärker angereichert war. Diese Verteilung hob sich statistisch signifikant von der ubiquitären Expression nach generalisierter Aktivität ab (Abb. 3.2D).

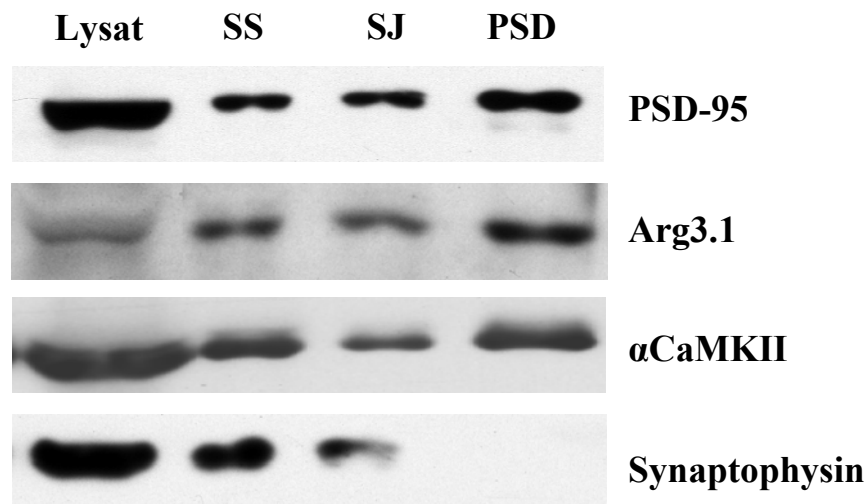
### 3.1.2 Arg3.1 ist in der PSD lokalisiert

Die selektive Anreicherung von Arg3.1 im Bereich der aktivierten Synapsen warf die Frage nach der exakten Lokalisierung an der postsynaptischen Membran auf. Für die Beantwortung dieser Frage wurden verschiedene subzelluläre Fraktionen der Synapse biochemisch aufgereinigt (Methodik s. Abb. 6.2). Im Zuge der Aufreinigung wurden mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation aus dem löslichen Überstand des Gesamtproteinextraktes aus dem Gehirn von Mäusen zuerst die Synaptosomen präpariert. Diese setzen sich aus dem präsynaptischen Endknopf (*bouton*) und dem postsynaptischen Dorn (*spine*) zusammen. Durch erneute Zentrifugationsschritte wurden aus den Synaptosomen die synaptischen Verbindungsstellen (*synaptic junctions*), also die prä- und postsynaptische Membranen inkl. der membranverankerten Proteingerüste, gewonnen. Abschließend konnten die PSDs durch Zugabe von Triton X-100 aus den *synaptic junctions* gelöst und gesammelt werden, da sie für dieses Detergens unlöslich sind. Die einzelnen Fraktionen wurden 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 membranassoziertes Molekül präsynaptischer Vesikel, in allen Fraktionen außer der PSD nachgewiesen werden (Abb. 3.3). PSD-95 hingegen, das seine

---

eines kainatvermittelten generalisierten Anfalls. **(C)** Verteilung von Arg3.1 4 h nach LTP-induzierender Stimulation des mittleren Tractus perforans (siehe **(E)**). Das Arg3.1 Protein ist selektiv an den Synapsen der aktivierten mittleren Molekularschicht angereichert. **(D)** Densitometrische Analyse der Arg3.1 Verteilung im Hippokampus der lichtmikroskopisch erstellten Aufnahmen aus A, B und C. Für die Analyse wurden die gekennzeichneten Regionen (offene Balken) in 36 horizontale Felder aufgeteilt, deren jeweilige Pixelintensität aus dem Mittelwert von 20 Einzelmessungen berechnet wurde. Die im Diagramm dargestellten Werte repräsentieren dabei je zwei benachbarte Felder. Der statistische Vergleich der densitometrischen Verteilung von Arg3.1 in Kainat- und Lamina-spezifisch induzierten Gehirnschnitten ist für die Felder 7-10 und 13-17 signifikant unterschiedlich (Post Hoc LSD-test,  $p < 0.001$ ). **(E)** Skizze der axo-dendritischen Verknüpfung des mittleren entorhinalen Kortex im Gyrus dentatus. Die Axone des aus dem mittleren entorhinalen Kortex stammenden mittleren Tractus perforans projizieren selektiv auf die mittlere Molekularschicht der Körnerzellen. ä-, m-, iMs, äußere, mittlere und innere Molekularschicht. KZS, Körnerzellschicht.

Bezeichnung aus dem Vorkommen in der PSD ableitet, konnte ebenso wie die CaMKII in der aufgereinigten PSD-Fraktion detektiert werden. Wie zu erwarten, war Arg3.1 neben dem Gesamtextrakt auch in der synaptosomalen Fraktion vorhanden. Darüber hinaus konnte es aber auch in den *synaptic junctions* und in der PSD detektiert werden. Durch Auftragen gleicher Mengenverhältnisse wurde sogar eine quantitative Anreicherung in der PSD deutlich. Damit konnte gezeigt werden, dass das Arg3.1 Protein nicht nur selektiv an den stimulierten Synapsen, sondern unmittelbar an der postsynaptischen Membran, in der PSD, lokalisiert ist.



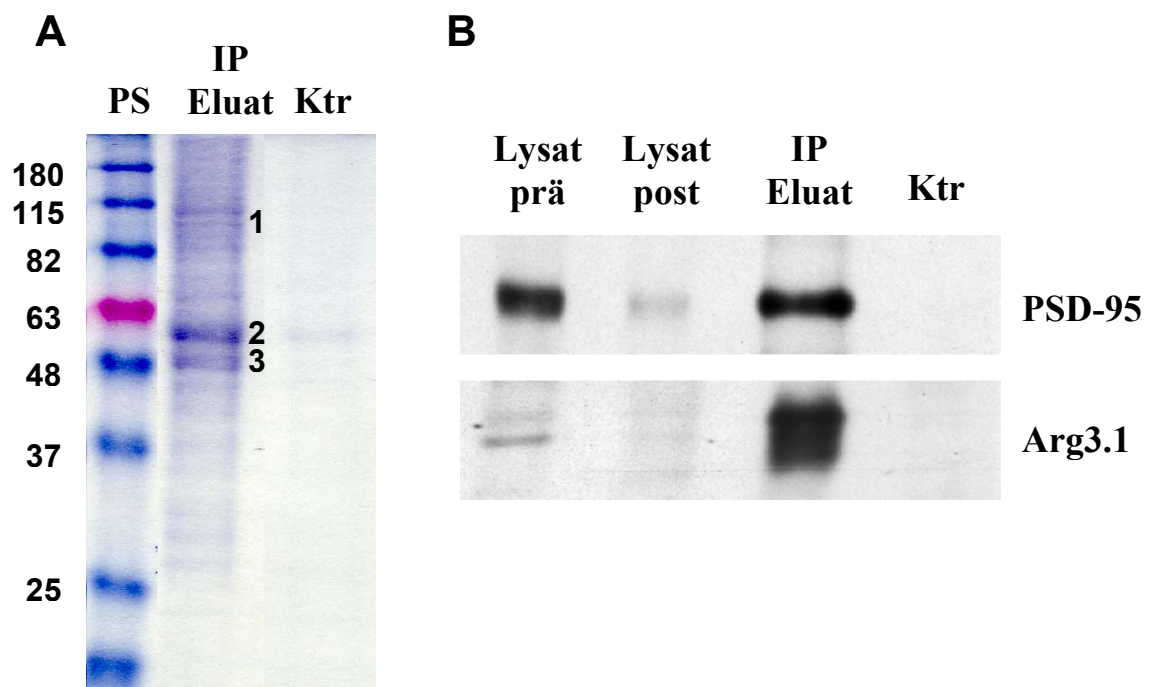
**Abbildung 3.3: Western Blot Analyse aufgereinigter synaptischer Fraktionen**

Western Blot Analyse der durch Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigten subzellulären Kompartimente der synaptischen Region. Pro Fraktion wurden 10 µg Gesamtprotein aufgetragen und sämtliche Detektionen wurden sukzessive auf derselben Blotmembran durchgeführt. Dabei konnte Arg3.1 in allen Fraktionen, inkl. der Triton-X100-unlöslichen PSD, detektiert werden. Die Abwesenheit des ausschließlich präsynaptisch lokalisierten Synaptophysin bestätigt die Reinheit der Fraktionierung. Lysat, lösliches Gehirnextrakt; SS, Synaptosomen; SJ, *synaptic junction*; PSD, postsynaptische Dichte.

### 3.1.3 Arg3.1 ist mit dem NMDA-Rezeptor-Komplex assoziiert

Die PSD ist ein hochmolekularer Proteinkomplex in dem membranöse Rezeptormoleküle über Strukturproteine mit dem Zytoskelett sowie diversen Signaltransduktionskaskaden verknüpft werden. Wie bereits einleitend erwähnt, ist das Zusammenspiel der Proteine in der

PSD die Grundlage für die aktivitätsregulierten Veränderungen an der Synapse. Daher geben Kenntnisse über die Proteininteraktionen in der PSD Aufschluss über die Rolle einzelner Moleküle, die diese an der Synapse spielen. Solche Interaktionspartner sollten mit Hilfe biochemischer affinitätschromatographischer Ansätze für Arg3.1 identifiziert werden. In einem ersten Experiment wurde eine Co-Immunpräzipitation (Co-IP) mit einem aufgereinigten Arg3.1 spezifischen Antiserum durchgeführt. Unter einer Immunpräzipitation versteht man die Ausfällung eines löslichen Antigens durch seinen an einer Matrix immobilisierten Antikörper. In diesem Falle wurde das Arg3.1 Protein aus dem Gehirnextrakt des Mausgehirns präzipitiert. Es können dann im Anschluss an die IP weitere Assoziationspartner aus dem Extrakt an das präzipitierte Arg3.1 binden, die ihrerseits wiederum Interaktionen eingehen (co-immunpräzipitieren). So bildet sich ein Proteinkomplex an der antikörpergekoppelten Matrix. Die im Inkubationspuffer vorhandenen Detergenzien sollten dabei niedrig affine sowie unspezifische Bindungen unterbinden. Für die Durchführung wurden die Immunglobuline des affinitätsgereinigten Arg3.1 Antiserums über die Bindung der schweren Fc-Kette an eine Nickel-aktivierte Sepharose Matrix immobilisiert. Die so gekoppelte Matrix inkubierte anschließend mit dem löslichen Teil des Proteinextraktes. Nach Reinigung und Sedimentation des Matrixkomplexes wurde die co-immunpräzipitierte Proteinfraction mittels SDS-Laufpuffer von der Sepharose Matrix eluiert, durch SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung sowie Western Blot Detektion ausgewertet. Die Coomassie-Färbung in Abbildung 3.4A zeigt einige Banden im Eluat, die potentielle Assoziationspartner von Arg3.1 darstellen. Die anschließende Analyse im Western Blot bestätigte zunächst die erfolgreiche Immunpräzipitation von Arg3.1 selbst an die Matrix (Abb. 3.4B). Eine weitere Bande in der Coomassie-Färbung lief bei einer Größe von ca. 95 kDa, ähnlich dem postsynaptisch lokalisierten Strukturprotein PSD-95. Eine Detektion des Western Blots mit spezifischen Antikörpern bewies, dass PSD-95 im Vergleich zum Ausgangsmaterial in der präzipitierten Fraktion deutlich angereichert war, was eine Assoziation mit Arg3.1 nahe legt. Die Methodik der Co-IP kann zwar keinen Aufschluss darüber geben, ob eine Assoziation, wie hier zwischen Arg3.1 und PSD-95, direkt oder indirekt ist. Aufgrund der Anwesenheit starker Detergenzien (0,5% DOC, 0,5% NP-40) und der Relation der Bandenintensitäten im Western Blot ist aber davon auszugehen, dass es sich entweder um einen primären Interaktionspartner handelt oder maximal ein bis zwei Proteine zwischengeschaltet sind.



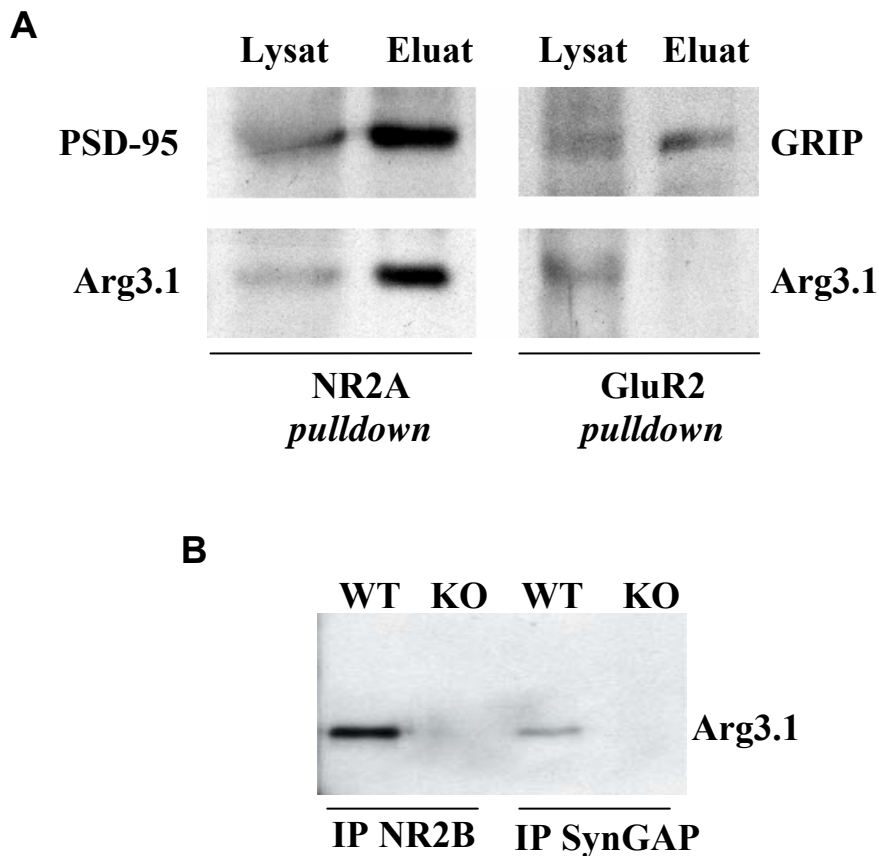
**Abbildung 3.4: Arg3.1 Co-Immunpräzipitationsassay (Co-IP)**

(A) Coomassie-gefärbtes Polyacrylamidgel mit Proteinfractionen aus einer Arg3.1 Co-IP vor und nach der Präzipitierung. Linke Spur: Proteinlängenstandard, Mitte: Eluat der Arg3.1 IP, rechts: Eluat des Kontrollansatzes. Der Kontrollansatz wurde analog der Arg3.1 IP durchgeführt, allerdings ohne Zugabe des Antiserums. Die Arg3.1 IP lieferte mehrere Banden, die durch Western Blot Detektionen teilweise identifiziert wurden (B). Von diesen läuft eine bei ca. 95 kDa (1). Bande Nr. 2 tritt in beiden Eluaten auf und stellt damit zumindest teilweise ein unspezifisch gebundenes Protein dar. Die Laufhöhe lässt dabei auf Tubulin mit einem Molekulargewicht von 55 kDa schließen, ein häufig auftretender unspezifischer Bindungspartner in der IP. Diese könnte aber auch von der schweren Kette der in der IP eingesetzten IgG verursacht worden sein. Bande Nr. 3 läuft bei ca. 50 kDa und könnte das präzipitierte Arg3.1 darstellen. (B) Western Blot Detektion der präzipitierten Fraktionen mit PSD-95 und Arg3.1 Antikörpern. Die per Arg3.1 Co-IP gebundene Fraktion zeigt Immunreaktivität sowohl für Arg3.1 als auch für PSD-95. Lysat prä/post, Gehirnextrakt vor bzw. nach der IP; IP Eluat, Arg3.1 immunpräzipitierte Fraktion; Ktr, Kontrollansatz ohne Antiserum; PS, Proteinlängenstandard (Invitrogen).

Die Assoziation mit PSD-95 deutet auf eine räumliche Nähe und evtl. Interaktion von Arg3.1 mit dem NMDA-Rezeptor hin. Um diese Annahme zu verifizieren, wurden weitere affinitätschromatographische Untersuchungen, sog. *pull-down* Experimente, durchgeführt. Dafür wurde zuerst ein synthetisiertes Oligopeptid des C-Terminus der NMDA-Rezeptor Untereinheit 2A (NR2A) über ein endständiges Lysin an eine NHS-aktivierte Sepharose Matrix gekoppelt. Dieses Oligopeptid ist für die Bindung an PSD-95 ausreichend (Kornau et al., 1995). Wie bereits für die Immunpräzipitation beschrieben, wurde die gekoppelte Matrix

anschließend mit Proteinextrakt inkubiert, sedimentiert und die präzipitierten Proteine eluiert. Die eluierte Fraktion wurde mittels Western Blot Detektionen auf ihre Zusammensetzung ausgewertet, wobei die erfolgreiche Bindung von PSD-95 als Positivkontrolle diente (Abb. 3.5A). Es zeigte sich, dass auch Arg3.1 von der NR2A Untereinheit präzipitiert wurde. Im Gegensatz dazu konnte in einem weiteren *pulldown* keine Assoziation von Arg3.1 mit der zweiten großen Klasse von Glutamat-Rezeptoren, den AMPA-Rezeptoren, gezeigt werden. In einem ähnlichen Ansatz wie für den NR2A *pulldown* beschrieben, wurde dafür das C-terminale Oligopeptid der AMPA-Rezeptor Untereinheit 2 (GluR2) synthetisiert und an einer NHS-aktivierten Sepharose Matrix immobilisiert. Während der anschließenden Inkubation wurde das GluR2 bindende Protein (ABP) GRIP erfolgreich präzipitiert (Abb. 3.5A). Die Analyse der GluR2 bindenden Proteine im Western Blot zeigte aber kein Signal für Arg3.1. Im Rahmen einer Kooperation mit unserem Labor konnte die Arbeitsgruppe von Prof. Seth Grant am *Centre for Neuroscience Research* der Universität Edinburgh, Schottland, die Assoziation von Arg3.1 mit dem NMDA-Rezeptor mittels einer Co-IP bestätigen. Dabei wurden Antiseren gegen die NMDA-Rezeptor Untereinheiten NR1, NR2A und NR2B verwendet. Ferner konnte hier gezeigt werden, dass diese Assoziation exklusiv von PSD-95 vermittelt wird. In PSD-95 *knockout*-Mäusen (Migaud et al., 1998) konnten die Kollegen Arg3.1 nicht mehr mit dem NMDA-Rezeptor präzipitieren. Innerhalb der gleichen Versuchsreihe wurde ebenfalls eine Assoziation von Arg3.1 mit SynGAP gezeigt. Dafür wurde eine weitere Co-IP mit einem polyklonalen SynGAP Antiserum durchgeführt. Wie schon für die NMDA-Rezeptor Assoziation gesehen, konnte aber auch SynGAP Arg3.1 nicht aus dem Gesamtproteinextrakt von PSD-95<sup>-/-</sup> Mäusen präzipitieren (Abb. 3.5B).

Ein weiteres zentrales Strukturprotein der PSD, das direkt mit dem Zytoskelett interagiert, ist Shank (auch bekannt als ProSAP, SSTRIP, CortBP1, s. Böckers et al., 2001). In Zusammenarbeit mit Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp wurde ein *pulldown* Experiment durchgeführt, für das die N-terminale Ankyrin-Domäne von Shank (Aminosäuren 189-399) in den Expressionvektor pQE30, der 6 Histidine an den N-terminus des exprimierten Proteins anfügt, kloniert wurde. Das durch bakterielle Überexpression erzeugte Fusionsprotein wurde an einer mit Nickel aktivierten Sepharosematrix aufgereinigt und mit Gehirnextrakt wie oben beschrieben inkubiert. Die verschiedenen Fraktionen dieses *pulldowns* wurden per Western Blot Analyse ausgewertet und mit den Eluaten der NR2A und GluR2 *pulldowns* verglichen. Abbildung 3.6 zeigt, dass Arg3.1 durch die Shank-Ankyrin-Domäne präzipitiert wurde. Die unterschiedlichen Intensitäten der Arg3.1 Banden im Vergleich des His<sub>6</sub>-Shank<sub>189-399</sub> zum NR2A *pulldown* deuten dabei eine gesteigerte Affinität zu Shank an.



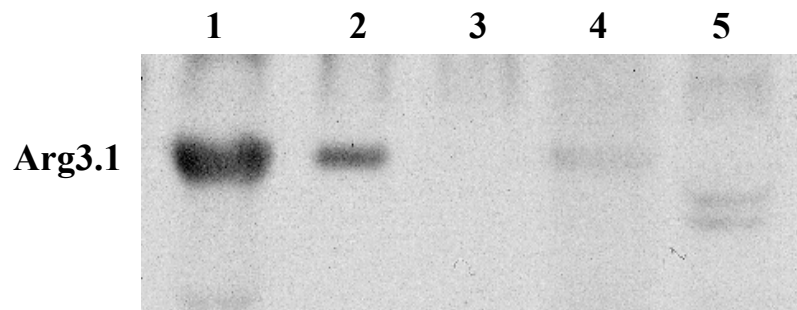
**Abbildung 3.5: NMDA-, AMPA-Rezeptor und SynGAP Affinitätschromatographie (*pulldown*)**

(A) Western Blot Analyse der präzipitierten Eluate. Für den NMDA-Rezeptor *pulldown* wurde die Untereinheit NR2A, für den AMPA-Rezeptor *pulldown* die Untereinheit GluR2 verwendet (s. Text). Die Western Blot Detektionen wurden für den NR2A *pulldown* mit Antiseren gegen PSD-95 und Arg3.1 durchgeführt (links). Beide Proteine zeigen eine starke Immunreaktivität im Eluat. Im Falle des GluR2 *pulldowns* wurde die Blotmembran mit Antiseren gegen GRIP und Arg3.1 detektiert. In diesem Fall konnte im Eluat nur GRIP, aber kein Arg3.1 detektiert werden. Lysat, lösliches Gehirnproteinextrakt vor dem *pulldown*. (B) Arg3.1 Western Blot Analyse der Eluate von NR2B und SynGAP Co-IP. Die Präzipitationen wurden mit Gesamthirnlysate von Wildtyp- (WT)- bzw. PSD-95 *knockout*-Mäusen (KO) durchgeführt. In den Eluates der PSD-95 *knockout* Co-IPs konnte keine Immunreaktivität gegen Arg3.1 detektiert werden. Dieser Blot wurde mit freundlicher Genehmigung von Dr. Holger Husi und Prof. Seth Grant zur Verfügung gestellt.

Zusammenfassend konnte im ersten Projekt die selektive Lokalisierung von Arg3.1 unmittelbar an der postsynaptischen Membran aktivierter Nervenzellen nachgewiesen werden. Arg3.1 ist hier Teil eines Proteinnetzwerkes, der PSD, das das molekulare Fundament aktivitätsregulierter Veränderungen der synaptischen Plastizität darstellt. Innerhalb dieses



Netzwerkes ist Arg3.1 mit dem NMDA-Rezeptor, PSD-95, SynGAP und Shank assoziiert und bildet damit einen zentralen Bestandteil des NMDA-Rezeptor-Komplexes.



**Abbildung 3.6: Shank-Ankyrindomänen *pulldown***

Detektion eines Western Blots mit einem Arg3.1 spezifischen Antiserum. Für den Western Blot wurden in den Spuren 1-3 gleiche Mengen verschiedener Eluate miteinander verglichen. Diese wurden gewonnen aus *pulldown* Experimenten mit der Ankyrindomäne des Strukturproteins Shank als 6x Histidin-Fusionsprotein (Spur 1), der NR2A Untereinheit (Spur 2) und der GluR2 Untereinheit (Spur 3). Alle drei *pulldown* Experimente wurden mit Wildtyp-Gehirnlysaten durchgeführt. Die von der jeweiligen Matrix präzipitierten Fraktionen wurden neben einem Gesamtgehirnextrakt (Lysat, Spur 4) sowie dem Eluat des Kontrollansatzes (analog zum eigentlichen *pulldown* mit ungeladener Matrix, Spur 5) aufgetragen. Die Eluate des Shank-Ankyrin und des NR2A *pulldowns* sowie das Gehirnextrakt zeigen eine Immunreaktivität für Arg3.1. Die Doppelbande in Spur 5 stammt von einer unspezifischen Kreuzreaktion des Antiserums.

## 3.2 Funktionelle Charakterisierung einer Arg3.1 *knockout*-Mauslinie

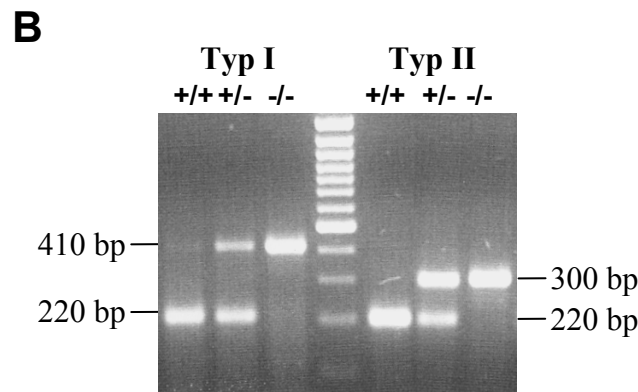
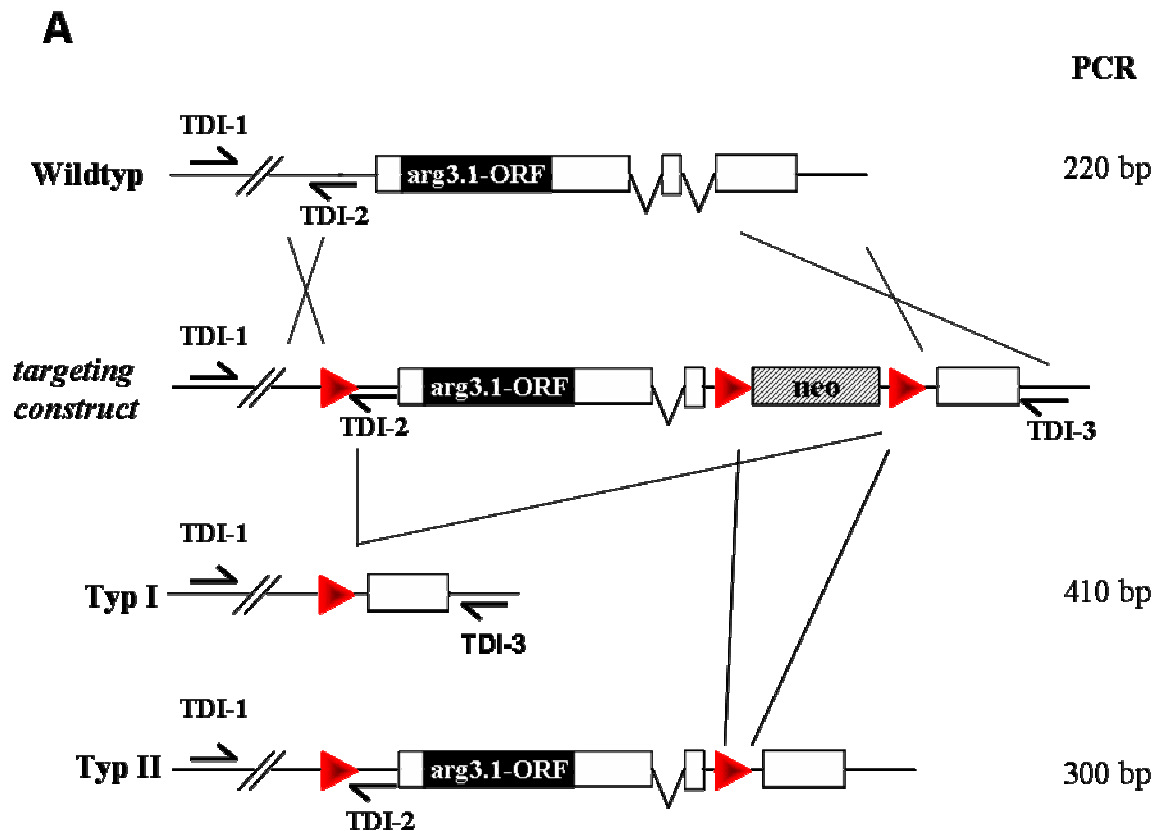
### 3.2.1 Herstellung einer Arg3.1 *knockout*-Mauslinie

Die Herstellung sowohl einer konditionalen als auch einer kompletten Arg3.1 *knockout*-Linie wurde im Labor von Prof. Kuhl bereits bis zur Erzeugung chimärer Mäuse durchgeführt (Bick-Sander, 2002). Dafür wurde ein *targeting construct* durch homologe Rekombination in ES-Zellen des Mausstammes 129SV eingebracht, die anschließend mit einer Cre-Rekombinase transfiziert wurden. Diese führte durch Rekombination an den loxP-Sequenzen zu drei unterschiedlichen Rekombinationstypen I, II und III (Abb. 3.7A). Der komplette *knockout* (Arg3.1<sup>-/-</sup>) resultierte dabei aus einer TypI und der konditionale *knockout* (Arg3.1<sup>flox/flox</sup>) aus einer TypII Rekombination. Durch Injektion der ES-Zellen in Blastozysten des Mausstammes C57Bl/6 und anschließenden Transfer in scheinträchtige C57Bl/6 Ammen wurden die chimären Mäuse gewonnen.

Diese Chimären wurden in den Inzuchtstamm C57Bl/6 gekreuzt, wobei solche Tiere, die die mutierten Zellen in der Keimbahn trugen, die Mutation an die Nachkommen weitergaben und heterozygote F1-Tiere erzeugten. Um Schwierigkeiten in der Interpretation von *knockout*-Analysen, die auf genetischen Faktoren außerhalb der gezielten Mutation beruhen könnten, entgegen zu treten, wurden beide Linien, also Arg3.1<sup>-/-</sup> und Arg3.1<sup>flox/flox</sup>, gemäß den Vorschlägen der Banbury-Konferenz gezüchtet. Das heißt, dass durch Rückkreuzung in den Inzuchtstamm C57Bl/6 über mind. 10 Generationen vor dem Beginn der Versuchsreihen eine kongene Mauslinie generiert wurde, also eine Linie, in der sich die Wildtyp- und *knockout*-Tiere idealerweise nur an einem Genlocus, nämlich dem mutierten, unterscheiden. Da Inzuchtstämme für >99 % der Genloki homozygot sind, sollte durch diese Zucht eine genetische Variabilität ausgeschlossen werden, die die Analyse der Mutation beeinträchtigen könnte. Heterozygote Tiere, die aus dieser kongenen Linie hervorgingen, wurden dann untereinander zur Erzeugung von *knockout*- und Wildtyp-Nachkommen verpaart, wobei die Wildtyp-Geschwister (*littermates*) als Kontrolltiere dienten (das Verpaarungsschema ist in Abb. 6.3 skizziert). Nachkommen wurden anhand genomischer, aus Schwanzbiopsien gewonnener DNA über PCR mit den Primern TDI 1, 2 und 3 genotypisiert (Abb. 3.7B). Homozygote Träger des mutierten Gens verhielten sich in beiden Linien unauffällig bezüglich Körpergröße, Fertilität und Lebensalter. Ebenso blieb die Anfälligkeit für pharmakologisch induzierte epileptische Krämpfe unverändert.

Neben der Genotypisierung sollten die Auswirkungen der genmanipulatorischen Eingriffe auch auf Ebene der Arg3.1 Expression gezeigt werden. Eine Western Blot Analyse von homogenisiertem Hirngewebe vier Stunden nach Einsetzen generalisierter neuronaler Aktivität bewies die Deletion von Arg3.1 in den *knockout*-Tieren (Abb. 3.8A). Andererseits konnte per Northern bzw. Western Blot die unbeeinträchtigte Expression des Arg3.1 Transkriptes sowie des Proteins im Gehirn von Arg3.1<sup>flox/flox</sup> Mäusen gezeigt werden (Abb. 3.8B). Die Gewebeproben stammten von Tieren der jeweiligen F1-Generation.

Alle im Folgenden beschriebenen Experimente wurden, soweit nicht anders vermerkt, mit männlichen Tieren der kompletten Arg3.1 *knockout*-Linie (Arg3.1<sup>-/-</sup>) im Alter von zwei bis fünf Monaten durchgeführt. Als Kontrollen dienten Wildtyp-Geschwistertiere gleichen Alters (*littermates*).



**Abbildung 3.7: Generierung verschiedener Arg3.1 knockout-Mauslinien**

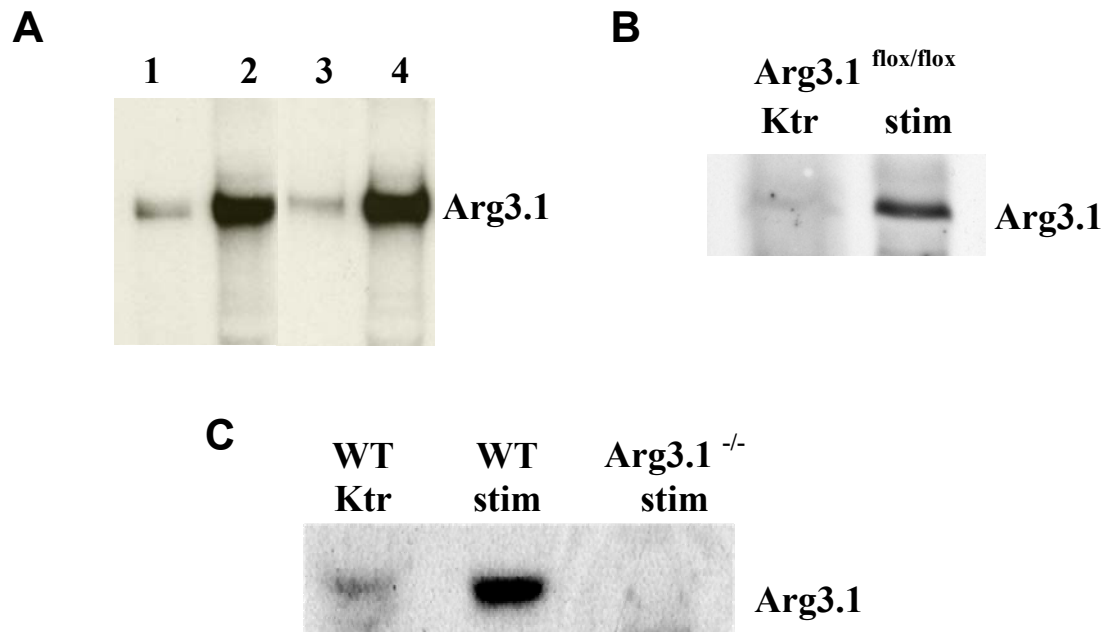
(A) Schematische Darstellung der in der Arbeitsgruppe Kuhl durchgeführten, Cre-vermittelten Rekombination des konditionalen Arg3.1 *targeting construct*. Die Rekombination erfolgte durch transiente Transfektion mit der Cre-Rekombinase in ES-Zellen, in denen zuvor das *targeting construct* über homologe Rekombination in den genomischen Locus von Arg3.1 (Wildtyp) eingefügt wurde. Die kodierende Region von Arg3.1 wurde so von zwei loxP-sites flankiert („gefloxt“) und trug eine ebenfalls gefloxt Neomycin-Selektionskassette (neo) in der 3' UTR. Durch die Cre-vermittelte Rekombination kam es an den loxP-sites (Dreiecke) zu insgesamt drei verschiedenen Rekombinationstypen. Typ I repräsentiert den kompletten Arg3.1<sup>-/-</sup> und Typ II den konditionalen Arg3.1<sup>fllox/fllox</sup> Knockout. Der dritte Typ, der zur Rekombination zwischen der ersten und zweiten loxP-site führte und die neo-Kassette im Genom hinterließ, wurde nicht berücksichtigt. Boxen stellen →

### 3.2.2 Unveränderte Gehirnmorphologie in Arg3.1 *knockout*-Mäusen

Um pathologische Auswirkungen der Arg3.1 Deletion auf die Ontogenese des Gehirns auszuschließen, wurde zunächst die Zellmorphologie der *knockout*-Mäuse analysiert. Eine gute Übersicht über die zellulären Gehirnstrukturen liefert die Hämatoxylin-Eosin-Färbung, bei der das Oxidationsprodukt des Hämatoxylin den Zellkern blau und Eosin durch Anlagerung an eosinophile Gewebebestandteile das Zytoplasma rötlich färbt. Die Färbung ergab auch bei 200-facher Vergrößerung keine lichtmikroskopisch auffälligen Veränderungen zwischen Wildtyp- und *knockout*-Tieren bezüglich der Anzahl und Anordnung pyramidaler Zellen der CA1-Region oder Körnerzellen des Gyrus dentatus (Abb. 3.9). Neben den neuronalen Zellpopulationen wurde auch die Verteilung von Gliazellen, die bis zu 90 % aller Zellen im Zentralnervensystem von Säugetieren bilden, in den Arg3.1 *knockout*-Mäusen überprüft. Den häufigsten Gliotyp im Hippokampus stellen die Astrozyten dar, die leicht anhand ihrer sternförmigen Zellform zu erkennen sind und sich über die Expression des intermediären Filamentproteins GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) definieren. Es wurde kürzlich gezeigt, dass Astrozyten an der Ausbildung von chemischen Synapsen im Gehirn beteiligt sind (Mauch et al., 2001). Zur Färbung von Astrozyten wurden immunhistochemische Präparate von Wildtyp- und *knockout*-Mäusen mit einem monoklonalen Antikörper gegen GFAP angefertigt. Diese ergaben eine vergleichbare Menge und Verteilung GFAP-exprimierender Zellen im Hippokampus von Wildtyp- und Arg3.1 *knockout*-Mäusen (Abb. 3.10).

---

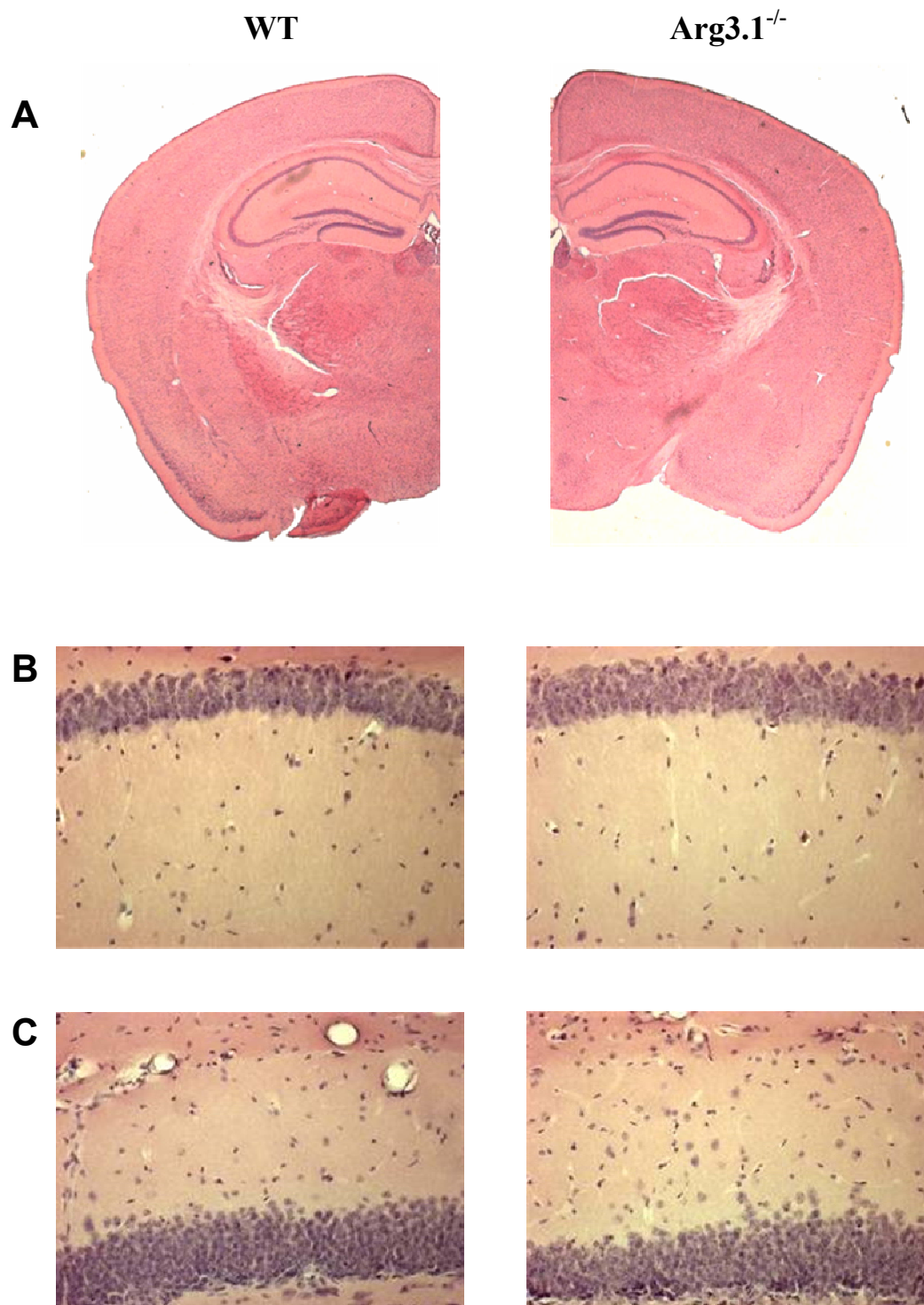
Exons, Linien Introns dar, die ausgefüllte Box repräsentiert die Arg3.1 kodierende Region. Die Pfeile zeigen die Homologiebereiche der drei Genotypisierungsprimer TDI-1, 2 und 3 an, die zu erwartenden Bandengrößen der PCR-Genotypisierung sind rechts daneben angegeben. Im *targeting construct* sind die theoretischen Loci aller drei Primer gekennzeichnet, in den übrigen Allelen nur die zur PCR-Amplifikation beitragenden. **(B)** DNA-Gelelektrophorese der PCR-Genotypisierung der verschiedenen Rekombinationstypen. Die in **(A)** schematisch dargestellten Primer ergeben folgende Amplifikationstypen: in Wildtyp- und Rekombinationstyp II Allelen werden nur die Sequenzen zwischen TDI-1 und -2, im Typ I zwischen TDI-1 und -3 amplifiziert. ORF, *open reading frame*; neo, Neomycin Selektionskassette.



**Abbildung 3.8: Analyse der Arg3.1 Expression im Gehirn von kompletten und konditionalen *knockout*-Tieren**

(A) Northern Blot Analyse der Arg3.1 mRNA Expression mit einer radioaktiv markierten Sonde in Wildtyp- (Spur 1, 2) und Arg3.1<sup>flox/flox</sup> (Spur 3, 4) Tieren. Die flankierenden loxP-*sites* behindern die aktivitätsinduzierte Geninduktion von Arg3.1 nicht. Einer schwachen Basalexpression (Spur 1, 3) steht eine stark hochregulierte Transkription 4 h nach dem Einsetzen eines kainatinduzierten Anfalls (Spur 2, 4) in beiden Genotypen gegenüber. (B) Die Western Blot Analyse zeigt Immunreaktivität für Arg3.1 in Arg3.1<sup>flox/flox</sup> Mäusen. Auch hier ist die aktivitätsabhängige Induktion der Proteinsynthese unbeeinträchtigt. (C) Western Blot Analyse der Protein Expression von Arg3.1<sup>-/-</sup> Mäusen 4 h nach Einsetzen eines kainatinduzierten Anfalls. Im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen zeigen homozygote *knockout*-Tiere keine Immunreaktivität für Arg3.1. Ktr, Kontrollbedingungen; stim, 4 h nach Einsetzen generalisierter neuronaler Aktivität.

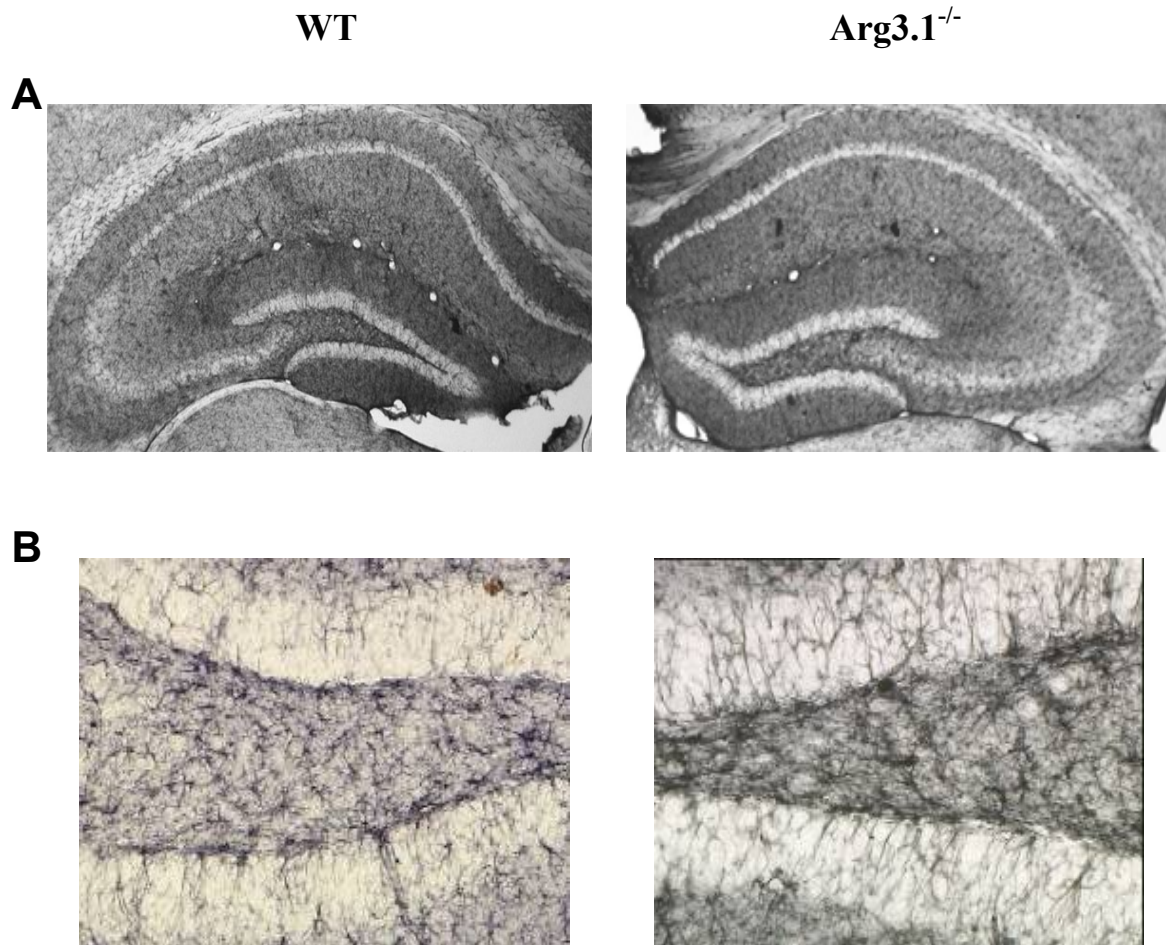
Letztlich wurden aufgrund der Lokalisation von Arg3.1 an der postsynaptischen Membran elektronenmikroskopische Aufnahmen der Synapsen von Arg3.1 *knockout*-Mäusen analysiert. Elektronenmikroskopisch erstellte Gewebebilder erlauben einen Einblick in die ultrastrukturelle Morphologie der Zelle, da sie synaptische Strukturen wie beispielsweise die PSD, präsynaptische Vesikel und andere Zellorganellen ohne zusätzliche Färbetechniken sichtbar machen. In der Analyse der Arg3.1 defizienten Synapsen sollten dabei v. a. Vorkommen und Form der PSDs überprüft werden. Abbildung 3.11 zeigt Synapsen aus der Molekularschicht des Gyrus dentatus, die aktive Zonen ausbilden. Aus den Aufnahmen geht hervor, dass auch Synapsen Arg3.1 defizienter Mäuse PSDs beinhalten und dass diese sich in Form oder Größe nicht grundsätzlich von den entsprechenden Wildtyp-Strukturen unterscheiden.



**Abbildung 3.9: Morphologische Analyse des Gehirns von Arg3.1 defizienten Mäusen**

Hämatoxylin-Eosin Färbung an koronalen Gehirnschnitten von Wildtyp- und Arg3.1 *knockout*-Mäusen unter Kontrollbedingungen. (A) Vergleich je einer Gehirnhälfte von beiden Genotypen. (B, C) Vergrößerungen der CA1-Region (B) sowie des Gyrus dentatus (C).



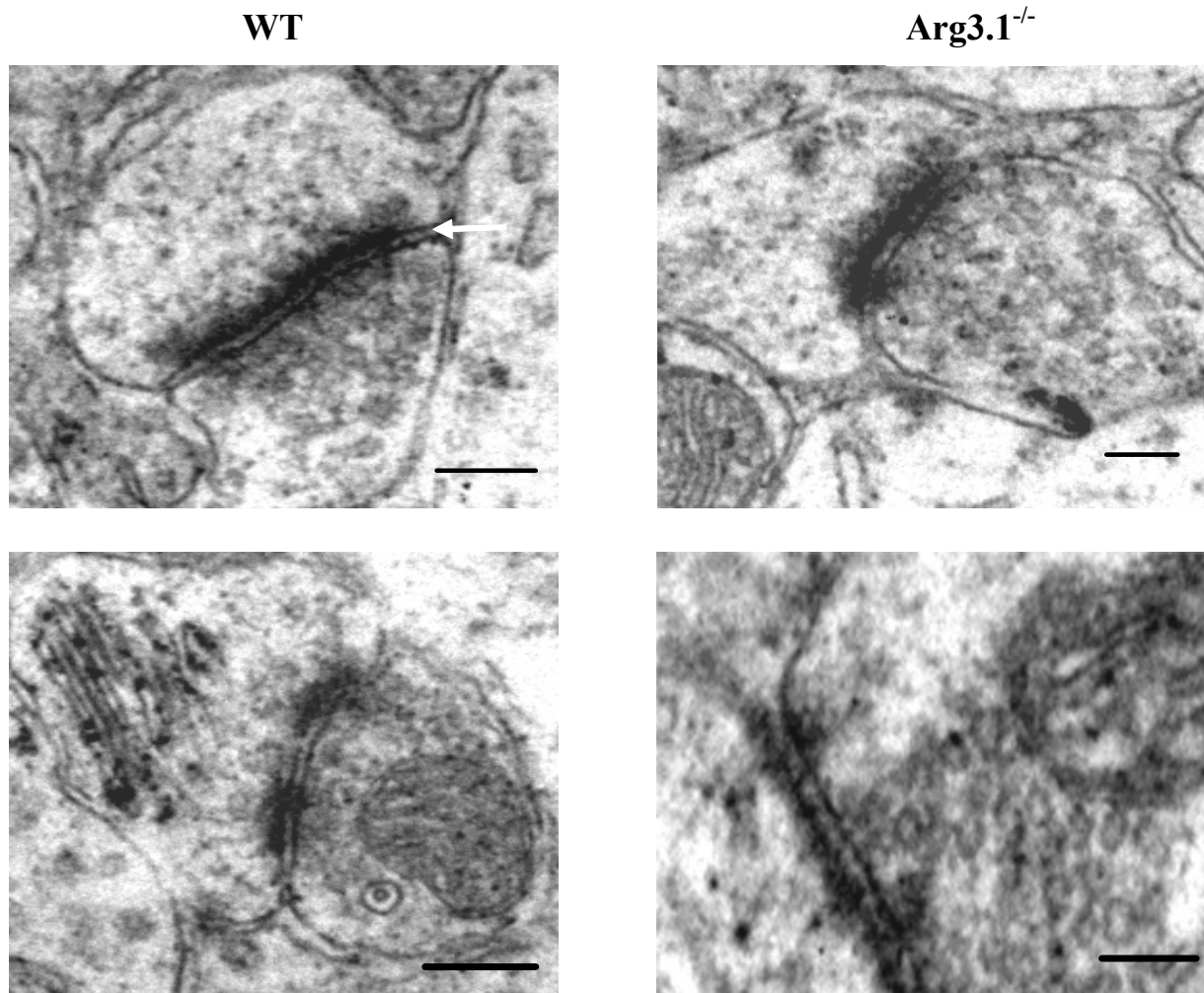


**Abbildung 3.10: Analyse der Astrozytenmorphologie in Arg3.1 defizienten Mäusen**

Immunhistochemische Färbungen von Astrozyten mit einem monoklonalen Antikörper gegen GFAP. Vergrößerungen des Hippokampus (A) sowie des Gyrus dentatus mit Granulärzell-, plexiformer und Molekularschicht (B).

### 3.2.3 Analyse synapsenspezifischer Proteine in Arg3.1 knockout-Mäusen

Arg3.1 ist, wie in Kap. 3.1.3 gezeigt, über PSD-95 mit dem NMDA-Rezeptor assoziiert. In der Literatur wurde ferner eine direkte Interaktion von Arg3.1 mit der  $\alpha$ -CaMKII beschrieben (Donai et al., 2003). Aufgrund des einzigartigen Expressionsprofils von Arg3.1 im Gehirn von Säugetieren ist es denkbar, dass es an der dendritischen bzw. synaptischen Lokalisierung seiner Interaktionspartner im Anschluss an eine plastizitätsinduzierende Stimulation beteiligt ist. Die zellulären Verteilungen des NMDA-Rezeptors (anhand der essentiellen Untereinheit 1 (NR1)), von PSD-95 und der  $\alpha$ -CaMKII wurden daher immunhistochemisch und



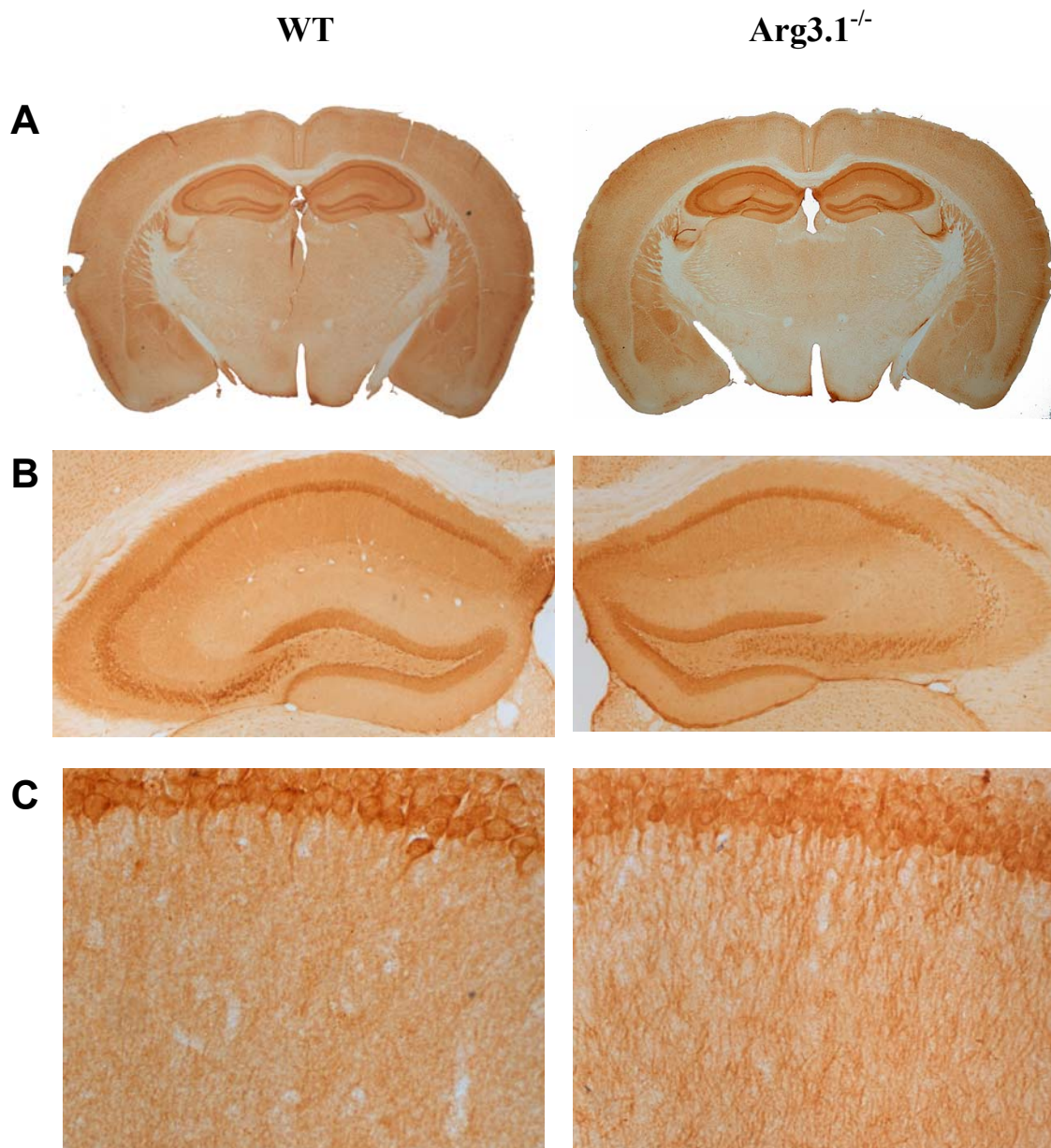
**Abbildung 3.11: Ultrastruktureller Vergleich von Wildtyp- und Arg3.1<sup>-/-</sup> Synapsen**

Ausgewählte elektronenmikroskopische Aufnahmen exzitatorischer synaptischer Kontakte in der Molekularschicht des Gyrus dentatus. Der postsynaptische Dorn mit der Membranverankerten PSD befindet sich jeweils auf der linken Seite des synaptischen Spaltes (links oben exemplarisch mit einem Pfeil gekennzeichnet). Die PSD erscheint im elektronenmikroskopischen Bild als schwarzer Balken; abnorme Veränderung in ihrer Größe oder Gestalt konnten nicht festgestellt werden. Skalierung: 100 nm.

biochemisch untersucht. Antikörperfärbungen in Gehirnschnitten von Wildtyp- und Arg3.1 defizienten Mäusen ergaben keine sichtbaren Veränderungen in der Verteilung von NR1 und  $\alpha$ -CaMKII, insbesondere auch die deutliche dendritische Lokalisation betreffend (Abb. 3.12, 3.13; obwohl für Western Blot Detektionen geeignet, zeigten diverse kommerziell erhältliche Antikörper gegen PSD-95 in immunhistochemischen Färbungen keine spezifischen Signale für das Antigen und können daher nicht gezeigt werden). Die lichtmikroskopische

Auswertung der Proteinverteilung konnte aber keinen Aufschluss über die Lokalisierung der NR1 oder  $\alpha$ -CaMKII direkt an der postsynaptischen Membran geben. Daher wurden, analog zu Kap. 3.1.2, die postsynaptischen Dichten von Arg3.1<sup>-/-</sup> Mäusen biochemisch aufgereinigt und auf das Vorkommen von NR1, PSD-95 und  $\alpha$ -CaMKII überprüft. Die Western Blot Analyse zeigt, dass alle drei Proteine identisch zum Wildtyp auch in der PSD Arg3.1 defizienter Synapsen vorhanden sind (Abb. 3.14A). Aufgrund ihres unveränderten Vorkommens in der PSD sollte auch die Interaktionsfähigkeit von PSD-95 mit dem NMDA-Rezeptor in der Abwesenheit von Arg3.1 überprüft werden. Dafür wurde ein weiteres *pull-down*-Experiment durchgeführt, für das ein N-terminales GST-Fusionsprotein von PSD-95<sub>(PDZ1-3,SH3)</sub> hergestellt wurde (Klonierungsstrategie s. Kap. 6.2.1.13). Die bakterielle Expression des Fusionsproteins PSD-95<sub>(PDZ1-3,SH3)</sub>-GST wurde mittels einer Coomassie-Färbung überprüft (Abb. 3.14B). Diese zeigt nach IPTG-vermittelter Expression des Fusionsproteins eine induzierte Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 90 kDa. Das entspricht der Summe der Einzelmassen von PSD-95<sub>(PDZ1-3,SH3)</sub> (ca. 60 kDa) und GST (ca. 27 kDa). PSD-95<sub>(PDZ1-3,SH3)</sub>-GST wurde anschließend an einer Glutathion-Sepharose-4B-Matrix aufgereinigt und der *pull-down* wie unter 3.1.3 beschrieben durchgeführt. Es wurden zwei parallele Experimente angesetzt, in denen die Matrix einerseits mit Gehirnlysaten von Wildtyp- und andererseits von Arg3.1 *knockout*-Mäusen inkubiert wurde. Dabei stellte sich heraus, dass PSD-95<sub>(PDZ1-3,SH3)</sub> sowohl in Wildtyp- als auch in *knockout*-Tieren die NR1 Untereinheit präzipitieren konnte (Abb. 3.14C). Da sich die verschiedenen Untereinheiten des NMDA-Rezeptors im *pull-down* anlagern und gemeinsam an die Matrix binden, erlaubt die Detektion der NR1 Untereinheit im Western Blot die Überprüfung der Interaktion von PSD-95 mit den NR2 Untereinheiten. In einem Kontrollexperiment, in dem nur das GST-Protein an die Matrix gekoppelt wurde, konnte kein NR1 in der präzipitierten Fraktion detektiert werden (Abb. 3.14C).

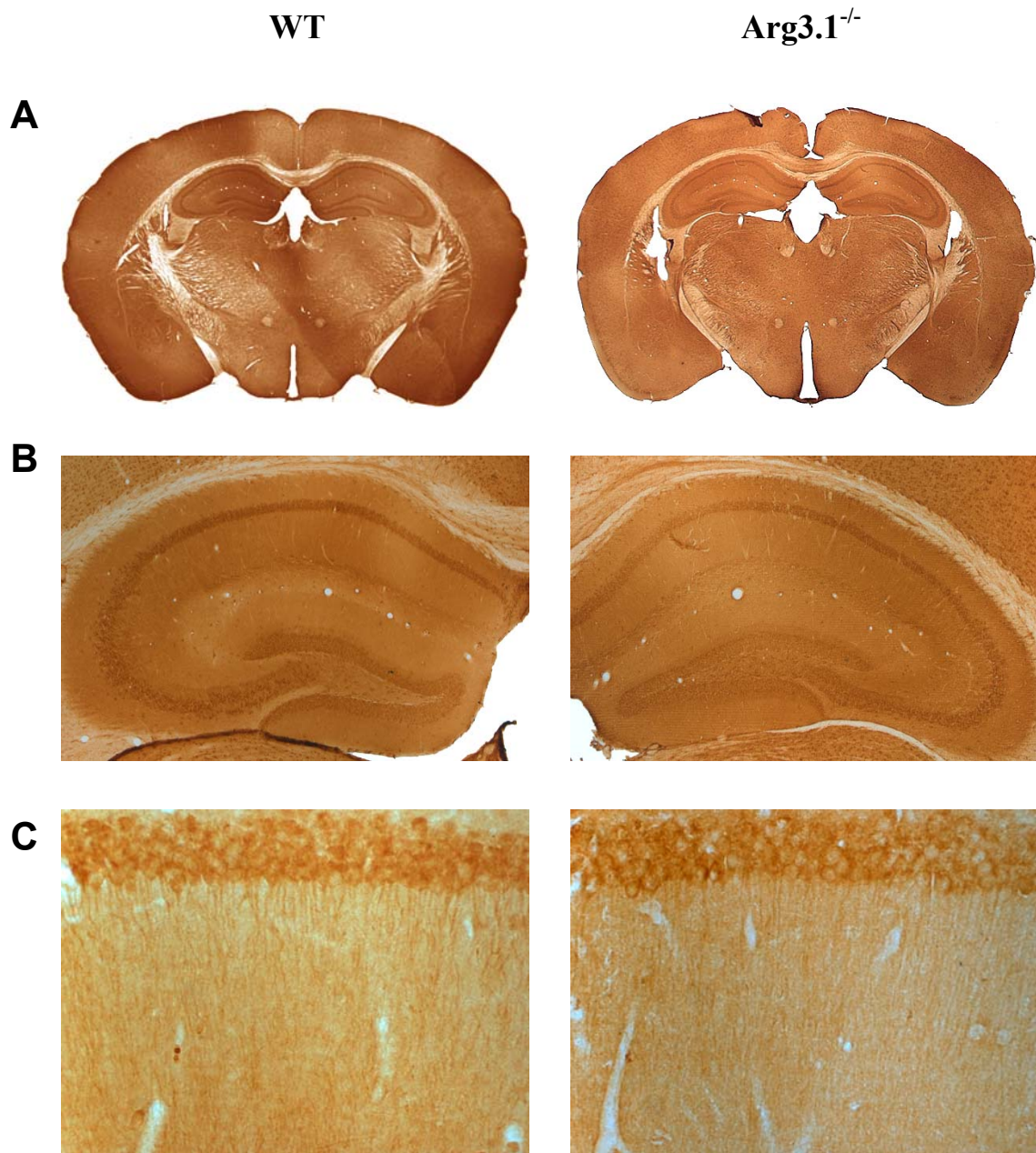
Diese Befunde weisen auf eine unbeeinträchtigte Expression und Lokalisierung von NR1, PSD-95 und  $\alpha$ -CaMKII sowie eine intakte Interaktion von PSD-95 mit dem NMDA-Rezeptor in der Abwesenheit von Arg3.1 hin.



**Abbildung 3.12: Die Verteilung von  $\alpha$ -CaMKII im Gehirn von *Arg3.1* *knockout*-Mäusen**

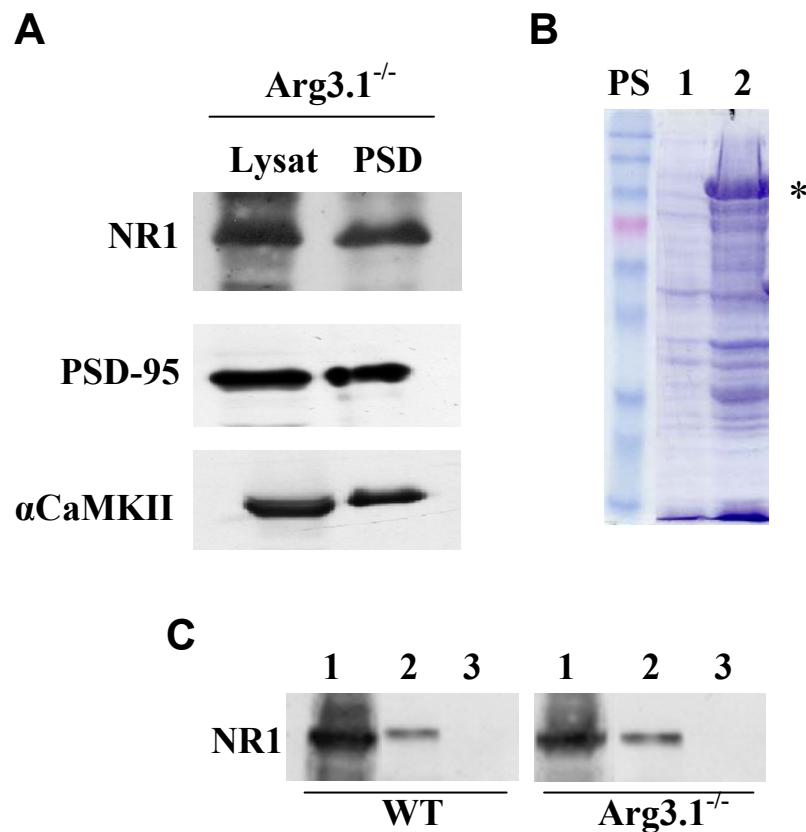
Lichtmikroskopische Analyse immunhistochemischer Färbungen mit einem monoklonalen  $\alpha$ -CaMKII-Antikörper an koronalen Gehirnschnitten von Wildtyp- (links) und *Arg3.1* defizienten Mäusen (rechts) (A). Vergrößerungen des Hippokampus (B) und der Pyramidal- und Radialschichten der CA1-Region (C). Die Vergrößerungen verdeutlichen die somatodendritische Lokalisierung von  $\alpha$ -CaMKII.





**Abbildung 3.13: Die Verteilung der NMDA-Rezeptor Untereinheit 1 (NR1) im Gehirn von Arg3.1 *knockout*-Mäusen**

Lichtmikroskopische Analyse immunhistochemischer Färbungen mit einem polyklonalen NR1-Antikörper an koronalen Gehirnschnitten von Wildtyp- (links) und Arg3.1 defizienten Mäusen (rechts) (A). Vergrößerungen des Hippokampus (B) und der Pyramidal- und Radialschichten der CA1-Region (C). Die Vergrößerungen zeigen die somatodendritische Lokalisierung von NR1.



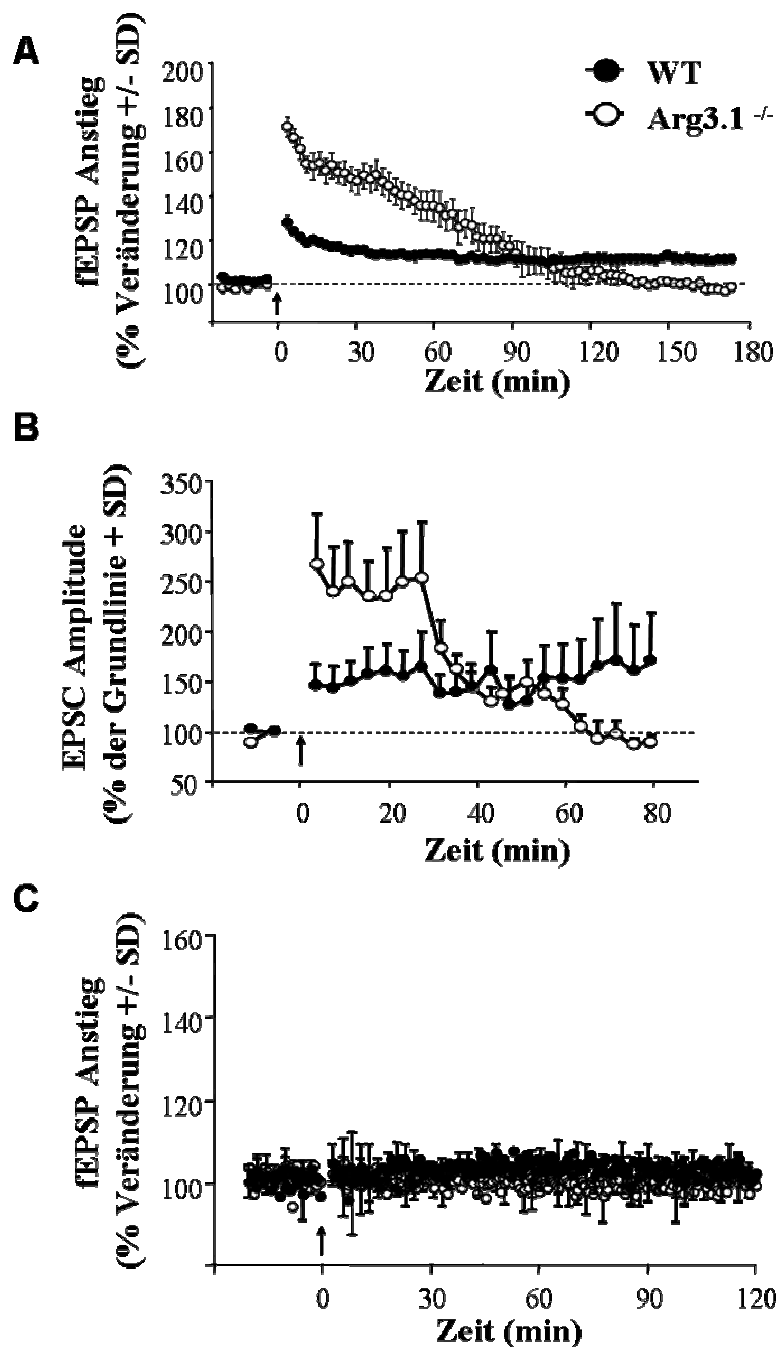
**Abbildung 3.14: Analyse der Verteilung und NMDA-Rezeptor Interaktion von PSD-95 in Arg3.1<sup>-/-</sup> Mäusen**

(A) Western Blot Vergleich des Gesamtgehirnextrakts (Lysat) und der PSD Arg3.1 defizienter Mäuse. Sowohl NR1, PSD-95 als auch  $\alpha$ -CaMKII konnten in der Abwesenheit von Arg3.1 in der PSD nachgewiesen werden. (B) Coomassie-Färbung der bakteriellen GST-PSD-95<sub>(PDZ1-3,SH3)</sub> Expression (Stern). SDS-PAGE der Gesamtproteinfraktionen von E.coli vor (Spur 1) und 3 h nach IPTG-vermittelter Induktion von GST-PSD-95<sub>(PDZ1-3,SH3)</sub>. (C) Western Blot Analyse des GST-PSD-95<sub>(PDZ1-3,SH3)</sub> pull-downs in Wildtyp- und Arg3.1 knockout-Mäusen. Der pull-down wurde mit einem GST-Fusionsprotein aus den 3 PDZ- sowie der SH3-Domäne von PSD-95 durchgeführt, bzw. dem GST-Protein allein durchgeführt. Immunreaktivität für NR1 konnte in Gehirnextrakten (Spuren 1) und im Eluat des GST-PSD-95<sub>(PDZ1-3,SH3)</sub> pull-downs (Spuren 2) beider Ansätze festgestellt werden, nicht aber im Eluat des GST-Kontrollansatzes (Spuren 3). PS, Proteinlängenstandard.



### 3.2.4 Arg3.1 *knockout*-Mäuse bilden keine lang anhaltende LTP aus

Die Expression von Arg3.1 wird durch LTP generierende Stimulation im Hippokampus induziert. Sowohl mRNA als auch Protein akkumulieren daraufhin selektiv an den stimulierten Synapsen. Um die Fähigkeit zur Ausbildung von LTP in Arg3.1 *knockout*-Mäusen zu überprüfen, wurden in zwei verschiedenen Laboren elektrophysiologische Messungen am Hippokampus der Tiere vorgenommen. Frau Dr. Ora Ohana induzierte am Institut für Neuroinformatik der Universität Zürich, Schweiz, LTP *in vitro* durch eine zeitliche Paarung präsynaptischer Reizung mit postsynaptischer Depolarisation in der CA1-Region. Dafür stimulierte sie die auf die CA1-Pyramidalschicht projizierenden Schaffer-Kollateralen mit einer niederfrequenten Reizung (200 Stimuli, 1,5 Hz). Mittels der Ganzzell-Konfiguration der *patch clamp* Technik depolarisierte sie gleichzeitig eine der stimulierten CA1-Pyramidalzellen auf eine Membranspannung von 0 mV. Die durch diese Stimulation induzierte synaptische Potenzierung konnte anschließend bis zu 120 Minuten lang anhand intrazellulärer Ableitungen der exzitatorischen postsynaptischen Ströme (EPSCs) durch die *patch clamp* Elektrode gemessen werden (die EPSCs wurden durch einzelne Stimuli von 20-100  $\mu$ A hervorgerufen). Eine andere Möglichkeit der LTP Induktion wendeten Prof. Tim Bliss und Mick Errington am NIMR in London, England, an. Sie stimulierten den Tractus perforans durch hochfrequente Reizgabe *in vivo* (sechsmalige Wiederholung von sechs Zügen á sechs Stimuli mit 400 Hz und 200 ms Abstand zwischen den Zügen) und erzeugten so LTP an den Synapsen der Molekularschicht im Gyrus dentatus. Die synaptische Potenzierung konnte anschließend durch Messung postsynaptischer Feldpotenziale über extrazelluläre Ableitelektroden im Gyrus dentatus bis zu drei Stunden lang aufgezeichnet werden. Diese sich grundlegend unterscheidenden Methoden führten beide zur Ausbildung einer stark erhöhten Potenzierung an den jeweils stimulierten Synapsen von Arg3.1 *knockout*-Mäusen, die aber bereits nach kurzer Zeit auf die Grundlinienwerte zurückfiel (Abb. 3.15A, B). Diese kurz anhaltende Form der LTP (E-LTP) blieb für ca. 30 (*in vitro*) bzw. 60 Minuten (*in vivo*) stabil, fiel dann ab und erreichte nach 90 (*in vitro*) bzw. 120 Minuten (*in vivo*) wieder Grundlinienwerte. Wildtyp-Mäuse bildeten dagegen eine kleinere, aber robuste und über den gesamten Messungszeitraum anhaltende L-LTP aus. Die Applikation der NMDA-Rezeptor Antagonisten CPP (*in vivo*) bzw. AP-5 (*in vitro*) zeigte, dass die kurze Form der erhöhten LTP in Arg3.1 *knockout*-Mäusen von der Aktivierung des NMDA-Rezeptors abhängig war (Abb. 3.15C, exemplarisch für CPP). Ein weiteres Kontrollexperiment zeigte, dass zumindest während der ersten 30 Minuten auch die für die hippokampale LTP typische



**Abbildung 3.15: Elektrophysiologische Induktion und Aufzeichnung von LTP in Arg3.1 knockout-Mäusen**

(A) Extrazelluläre Ableitung postsynaptischer Feldpotentiale (fEPSP) im Gyrus dentatus von anästhesierten Mäusen *in vivo*. Die Messwerte sind als prozentuale Änderung des EPSP-Anstiegs (*slope*) über der Zeit angegeben. LTP wurde durch eine unilaterale Tetanus-Stimulation (6 x 6 Reizgaben á 6 Einzelstimuli mit einer Frequenz von 400Hz) des Tractus perforans zum Zeitpunkt 0 (Pfeil) an den Synapsen der Granulärzellen ausgelöst. Die posttetanischen Potentiale wurden durch Einzelimpuls-gabe evoziert und gegen die prätetanischen Messungen normalisiert (Messwerte: 0-5 min post Tetanus: WT, 26.2% ± 2.6,  $p < 0.0001$ ; KO, 69.8% ± 4.2; 55-60 min post Tetanus: WT, 12.9% ± 2.6,  $p < 0.0001$ ; KO, 10.5% ± 2.1,  $p < 0.0001$ ).

Eingangsspezifität in der Abwesenheit von Arg3.1 gewährleistet blieb. Dabei wurde die postsynaptische Antwort eines zweiten, nicht potenzierten synaptischen Einganges der gleichen Zelle gemessen. Ferner blieb die rein präsynaptisch vermittelte Doppelpulsbahnung (*paired pulse facilitation*) von der Mutation unbeeinflusst. Das heißt, dass in Wildtyp- und Arg3.1 *knockout* Mäusen von zwei kurz aufeinander folgenden Impulsen der letztere einen erhöhten synaptischen Strom (EPSC) bewirkte (Dr. Ora Ohana, persönliche Mitteilung). Dies lässt auf eine unbeeinträchtigte Funktion der basalen synaptischen Übertragungseigenschaften schließen.

### **3.2.5 Arg3.1 ist essentiell an der Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses beteiligt**

Die Expression von Arg3.1 kann durch Lernaufgaben induziert werden (Guzowski et al., 2001; Kelly und Deadwyler, 2002). Das in solchen Aufgaben neu erlernte Verhalten basiert auf zellulären und molekularen Veränderungen im Gehirn, wobei man annimmt, dass die LTP einen zellulären Mechanismus für solche Veränderungen darstellt. Da die Ausbildung von LTP in Arg3.1 *knockout*-Mäusen defekt ist, sollte in Verhaltenexperimenten eine eventuelle Auswirkung der Arg3.1 Mutation auf die Fähigkeit dieser Tiere, neue Gedächtnisspuren auszubilden und diese im Langzeitgedächtnis zu speichern, getestet werden.

---

1.5; KO, 44.1% ± 6.6; ns; 175-180 min post Tetanus: WT, 11.2% ± 2.0; KO, -2.5% ± 1.6; p<0,0004; WT n=5; KO n=6, *Student's t-test*). **(B)** Intrazelluläre Ableitung postsynaptischer Ströme (EPSC) von Pyramidalzellen der CA1-Region an Hirnschnitten *in vitro*. Zur Generierung von LTP wurden Fasern der Schaffer-Kollaterale niederfrequent stimuliert (200 Stimuli, 1,5 Hz) und die abgeleiteten Pyramidalzellen zeitgleich auf 0 mV depolarisiert (Pfeil). Die Messwerte sind als prozentuale Veränderung der EPSC-Amplitude gegenüber den prästimulatorischen Strömen angegeben. Während der ersten 30 min waren die Knockout-Ströme signifikant größer (p<0.01); die beiden Messkurven der Genotypen über die gesamte Zeit der Ableitung betrachtet unterschieden sich ebenfalls statistisch (2-Weg ANOVA p<0.008, WT n=13 von 9 verschiedenen Tieren; KO n=13/7). **(C)** Analoge Stimulation, Messung und Datenverarbeitung zu (A) unter Einwirkung des NMDA-Rezeptor Antagonisten CPP (Messwerte: 115-120 min post Tetanus: WT, -0.35% ± 5.1%; KO, 1.94% ± 4.1%; ns; WT n=3; KO n=3). fEPSP, Feld-exzitatorische postsynaptische Potenziale; EPSC, exzitatorische postsynaptische Ströme; SD, Standardabweichung. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Ora Ohana (B) und Mick Errington (A, C).

### 3.2.5.1 Das *Morris water maze*

Das Expressionsmuster von Arg3.1 im Hippokampus markiert sog. „*place cells*“, also Zellen, die die jeweilige Lage des Individuums in seiner Umgebung kodieren (s. Kap. 2.2 und 2.6). Diese Beobachtung weist auf eine mögliche Rolle für Arg3.1 bei der Verarbeitung räumlicher Informationen hin. Durch die Abwesenheit einer robusten Langzeitpotenzierung im Hippokampus von Arg3.1 *knockout*-Mäusen könnte diese Kodierung gestört sein und somit negative Auswirkungen auf das Bewältigen von räumlichen Lernaufgaben in diesen Tieren haben. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden Arg3.1 defiziente Mäuse einer räumlichen Lernaufgabe, dem *Morris water maze*, unterzogen. In dieser Aufgabe werden Mäuse in einem Wasserbassin ausgesetzt und müssen dort die Position einer unterhalb der Oberfläche versteckten und daher nicht sichtbaren Plattform lernen. Das Bassin selber, dessen Wasser milchig trüb eingefärbt und damit undurchsichtig ist, bietet keine Anhaltspunkte zur Navigation, so dass die Tiere sich an räumlichen Markierungen außerhalb des Beckens orientieren müssen (der Versuchsaufbau ist in Abb. 3.16A skizziert). Der Antrieb zur Bewältigung dieser Aufgabe ergibt sich aus der aversiven Haltung von Mäusen gegenüber dem Schwimmen, die sie veranlasst, die Plattform auf dem kürzest möglichen Weg erreichen zu wollen. So kann die dafür benötigte Schwimmstrecke als Parameter für das Lernvermögen der Tiere dienen. Je kürzer die Schwimmstrecke, desto direkter der gewählte Weg, desto besser die erlernte räumliche Orientierung.

#### Akquisitionsphase und Transfertest

Für das *Morris water maze* wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere eingesetzt. Eine getrennte Analyse ergab keine geschlechtsspezifischen Unterschiede innerhalb der beiden Gruppen, so dass die Ergebnisse gemittelt wurden. Arg3.1<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäuse wurden zunächst für 18 Durchgänge auf eine unveränderte Plattformposition trainiert (Akquisition, Abb. 3.16B). Beide Gruppen konnten ihre Leistungen im Verlauf der Akquisition verbessern und zeigten zunächst eine Abnahme der Suchstrecke bis zum Auffinden der Plattform (Abb. 3.17A). Im Vergleich zu ihren *littermates* konnten die Arg3.1 Mutanten ihr Ergebnis allerdings im letzten Drittel der Trainingsphase (Durchgang 11-18) nicht mehr steigern. Das neu erlernte Verhalten wurde anschließend in einem Transfertest (Durchgang 19) getestet, für den die Plattform von ihrer ursprünglichen Position entfernt und an die gegenüberliegende plaziert wurde. Während dieses Transfertests wurde die Zeit gemessen, während der die Tiere die Plattform an ihrem ursprünglichen Ort suchten. Je länger sich ein Tier am trainierten Ort der Plattform aufhielt, desto robuster war das dafür gebildete

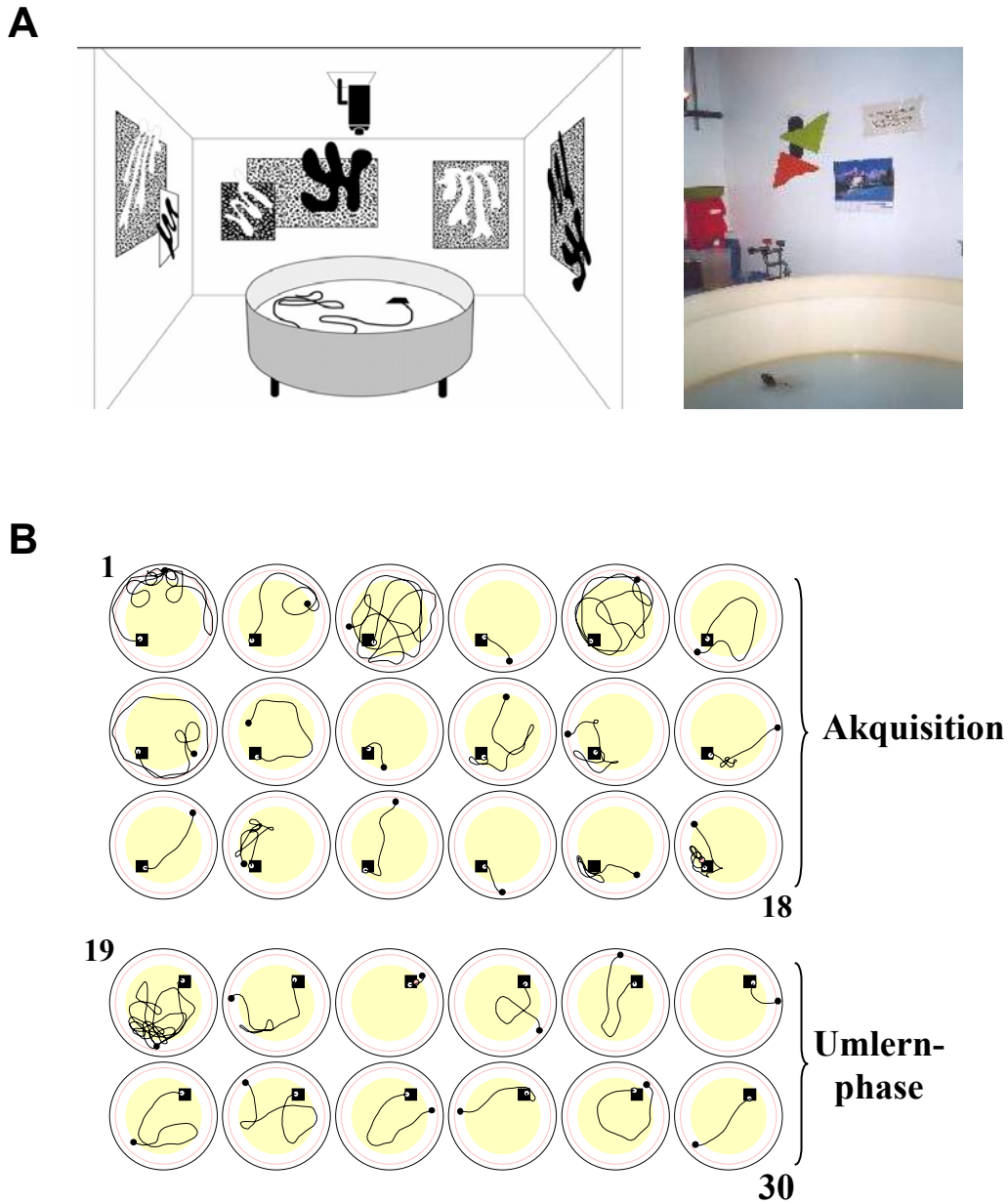
räumliche Gedächtnis. Hier zeigten die *knockout*-Mäuse zwar eine Präferenz für den trainierten Quadranten (25 % der gesamten Wasseroberfläche), in dem sich die Plattform während der Akquisition befand, sie hielten sich darin aber signifikant kürzer auf als die Wildtyp-Kontrollen (Abb. 3.17B). Dieser Unterschied wird mit zunehmender Stringenz des Lernkriteriums immer deutlicher, d.h. wenn man die Fläche um die ehemalige Plattformlokalisierung weiter einengt. Betrachtet man z. B. die Zeit, während der die Tiere einen kleinen Umkreis um den alten Ort absuchten (12,5 % der Oberfläche), so fällt die Leistung der *knockout*-Mäuse stärker ab. Während die Wildtyp-Tiere sich annähernd 35 % der Testdauer in diesem Areal aufhielten, war das bei den Arg3.1 *knockout*-Mäusen nur zu gut 20 % der Zeit der Fall (Abb. 3.17B). Der größte Unterschied ergab sich im Vergleich der Überquerungshäufigkeit über die exakte Stelle, an der sich die Plattform während der Akquisition befand. Während des 90 Sekunden dauernden Durchgangs überquerten die Kontrolltiere diese mehr als doppelt so häufig wie die Arg3.1 *knockouts*, die keine erkennbare Präferenz mehr für diesen Ort erkennen ließen (Abb. 3.17B).

### Umlernphase

Um die Tiere auf eine neue Aufgabe innerhalb des gleichen Setups zu trainieren und so die Flexibilität des räumlichen Lernens zu analysieren, verblieb die Plattform für weitere 11 Durchgänge (20-30) an der neuen Position (Umlernphase). Für das erfolgreiche Umlernen muss die alte Gedächtnisspur gelöscht und eine neue gebildet werden. Während die Wildtyp-Kontrollen den Ort der neuen Plattform bereits nach zwei bis drei Durchgängen erlernt und eine asymptotische Lernkurve erreicht hatten, benötigten die Arg3.1<sup>-/-</sup> Tiere durchschnittlich acht Durchgänge, um eine Abnahme der Schwimmstrecke erkennen zu lassen und damit die neue Aufgabe zu bewältigen (Abb. 3.17A).

### Sichtbare Plattform

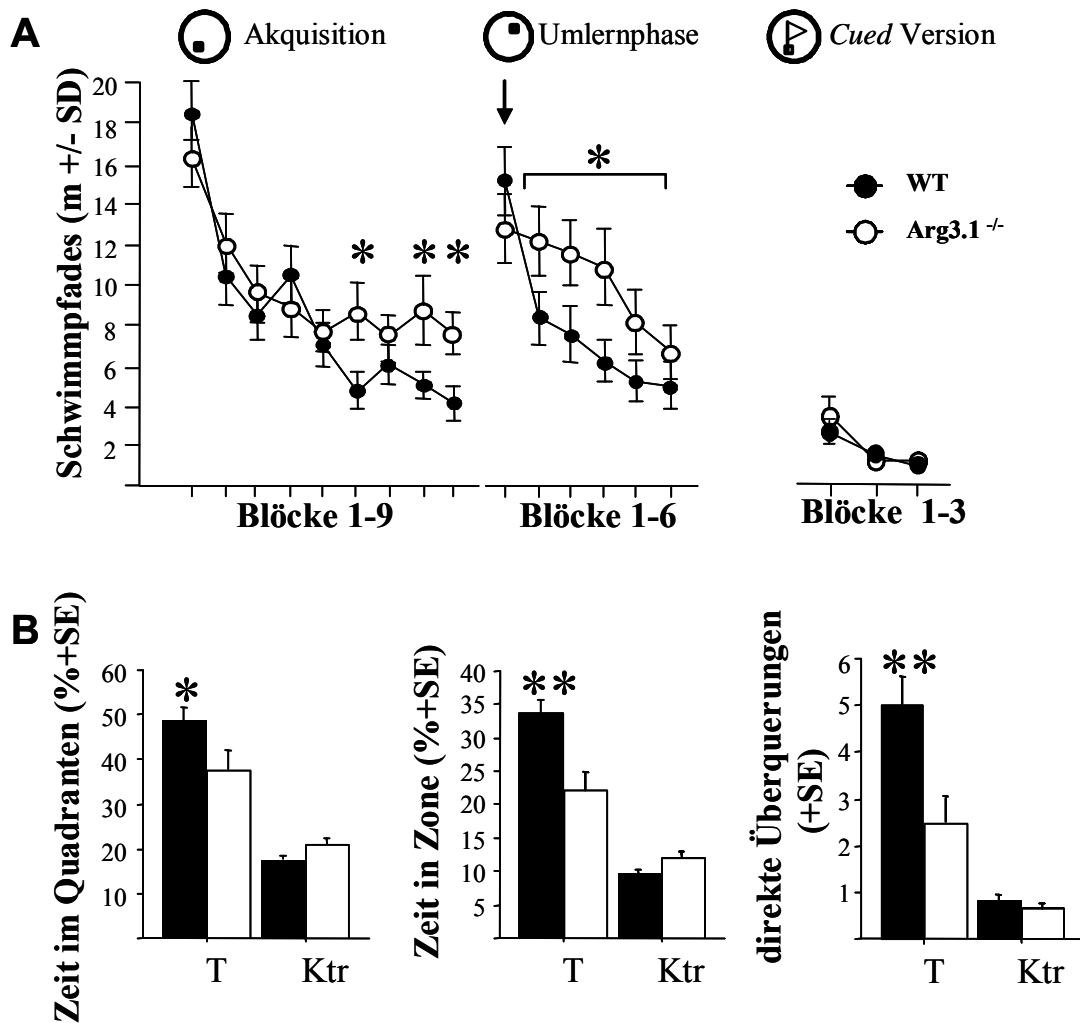
In dieser abgewandelten Version des *Morris water maze*, bei der die Plattform durch ein deutliches Hinweiszeichen markiert wurde, verhielten sich beide Versuchsgruppen gleich und erreichten das Ziel unmittelbar (Abb. 3.17A). Ebenso war die Schwimmgeschwindigkeit der beiden Gruppen statistisch nicht zu unterscheiden (ANOVA,  $p > 0.5$ ). Dadurch konnten visuelle, motorische oder die Motivation betreffende Störungen als Grund für das schlechte Abschneiden der Arg3.1 *knockout*-Mäuse im *Morris water maze* ausgeschlossen werden.



**Abbildung 3.16: Aufbau und Versuchsablauf des *Morris water maze***

(A) Skizze und Photodokumentation des verwendeten Wasserbassins und seiner räumlichen Umgebung. Im Gegensatz zur Umgebung besaß das Bassin selber keine Markierungen. (B) Skizzierter Versuchsablauf des *Morris water maze* mit 18 Akquisitions- und 12 Umlerndurchgängen. Der erste Durchgang der Umlernphase stellte den Transfertest dar (Nr. 19). Schwarze Quadrate zeigen die Plattformposition an, gefüllte Kreise die Auslassposition. Die Linien zeigen den exemplarischen Schwimmpfad einer Kontrollmaus.



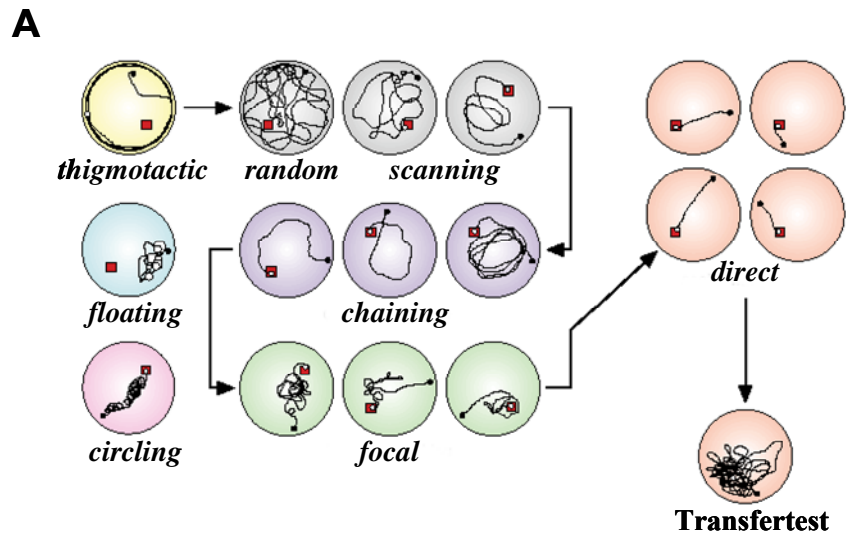


**Abbildung 3.17: Arg3.1<sup>-/-</sup> Mäuse im räumlichen Lerntest**

(A) Länge des Schwimmpfades bis zum Erreichen der Plattform während der Akquisition, Umlernphase und *cued* Version des *Morris water maze*. Die Plattform blieb während der Akquisition an einer fixen Position, wurde für die Umlernphase an die gegenüberliegende Position bewegt und während der *cued* Version mit einer Markierung gekennzeichnet (s. schwarzes Quadrat in den Bassinskizzen über den Graphen). Die Graphen zeigen die Mittelwerte je zwei aufeinander folgender Durchgänge. Die Schwimmpfade der *knockout*-Mäuse waren während der letzten Akquisitionsdurchgänge sowie der Umlernphase signifikant länger (2-Weg ANOVA,  $p < 0.0001$ ; WT,  $n = 25$ ; KO,  $n = 25$ ). (B) Aufenthalt der Mäuse in verschiedenen Arealen während des 90-sekündigen Transfertestes (s. Pfeil in (A)). Der Transfertest bildete gleichzeitig den ersten Durchgang der Umlernphase, d.h. die Plattform befand sich an gegenüber liegender Position. Die Blockdiagramme stellen die Zeit dar, die die Tiere im Quadranten bzw. einer kreisförmigen Zone (12.5% der Oberfläche) um die alte Plattformposition verbrachten, sowie die Anzahl der unmittelbaren Überquerungen dieser Position. Als Kontrolle sind die Mittelwerte der beiden benachbarten Quadranten angezeigt. Arg3.1 *knockout*-Mäuse verbrachten signifikant weniger Zeit im trainierten Quadranten (links, WT,  $49.2\% \pm 1.9\%$ ; KO,  $37.7\% \pm 2.4\%$ ; 2-Weg ANOVA Interaktion Genotyp-Ort  $F(48,1) = 5.6$ ,  $p < 0.0224$ ), in der trainierten Zone (Mitte, WT,  $34.2\% \pm 1.6\%$ ; KO,  $22.6\% \pm 2.2$ ; 2-Weg ANOVA Interaktion Genotyp-Ort  $F(48,1) = 8.5$ ,  $p < 0.0054$ ) und überquerten die exakte Plattformposition deutlich seltener (rechts, WT,  $5 \pm 0.7$ ; KO,  $2.4 \pm 0.4$ ; 2-way ANOVA Interaktion Genotyp-Ort  $F(48,1) = 8.5$ ,  $p < 0.0053$ ). T, trainierte Position; Ktr., Kontrollareal (= Mittelwert der korrespondierenden Areale in den benachbarten Quadranten).

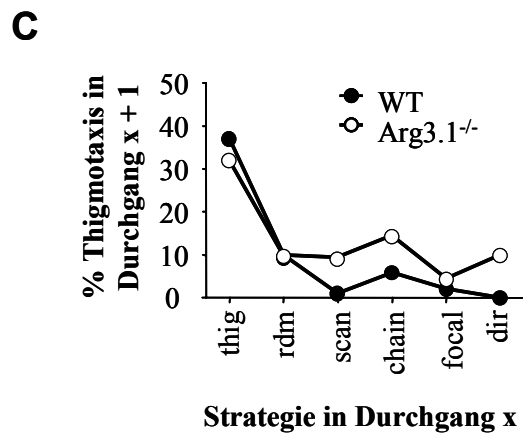
## Strategieanalyse

Das erfolgreiche Abschneiden im *Morris water maze* erfordert eine komplexe Motorik sowie die Integration verschiedener Verhaltensformen, inkl. des Erlernens der räumlichen Umgebung. Dr. David Wolfer vom Anatomischen Institut der Universität Zürich, Schweiz, konnte zeigen, dass Mäuse während der Akquisition ein hierarchisch geordnetes Strategieprogramm durchlaufen, das sie schließlich zum Erfolg führt (Lipp und Wolfer, 1998; Wolfer et al., 1998). Die einzelnen Strategien werden in „nicht räumlich“ und „räumlich“ kategorisiert, wobei die Tiere mit den „nicht räumlichen“ beginnen. So schwimmen sie zu Beginn der Trainingsphase noch unmittelbar an der Wand des Bassins entlang (Thigmotaxis), beginnen aber bald, die gesamte Wasseroberfläche abzusuchen: zuerst zufallsorientiert (*random*), dann auf einzelne Areale fokussiert (*scanning*) und schließlich in konzentrischen Kreisen schwimmend (*chaining, circling*), stoßen sie irgendwann auf die Plattform. Diese Strategien werden als „nicht räumlich“ bezeichnet, da die Mäuse nicht anhand von im Raum verteilten Orientierungsmarken navigieren. Ist die Plattform allerdings lokalisiert, wird die Strategie allmählich von dem ziellosen Abtasten („nicht räumlich“) zum gezielten Schwimmpfad („räumlich“) geändert. Ein gezielter Schwimmpfad ist zuerst auf die unmittelbare Region um die Plattform fokussiert (*focal*) und wird schließlich direkt auf diese gerichtet (*direct*). Hierbei orientieren sich die Tiere an den distalen Landmarken, die im Raum verteilt sind (vgl. Abb. 3.16A). Der Strategienwandel ist anhand exemplarischer Schwimmspuren in Abbildung 3.18A skizziert. Dabei ändern sich die Anforderungen an das Tier: während die frühen, „nicht räumlichen“ Strategien, wie z.B. das Kreisen, hauptsächlich motorische Flexibilität und Stressbewältigung erfordern, ist das spätere, gezielte Ansteuern des Ziels von der Fähigkeit, räumliche Informationen zu verarbeiten und diese zu erinnern, abhängig. Um die Defizite der Arg3.1 *knockout*-Mäuse genauer zu beleuchten, wurden die Schwimmpfade aller Tiere mit Hilfe einer Computersoftware (Wintrack 2.4) abermals analysiert. Dafür ordnete der Computer jeden Durchgang einer Strategie zu. Es zeigte sich, dass während die „nicht räumlichen“ Strategien (z.B. *random, scanning, chaining*) von beiden Gruppen gleich häufig genutzt wurden, die Arg3.1 *knockout*-Mäuse deutlich seltener „räumliche“ Strategien (*focal, direct*) anwendeten. Dafür wurde eine erhöhte Thigmotaxisrate gemessen (Abb. 3.18B). Dabei blieben die *knockout*-Tiere aber nicht auf der Stufe der anfänglichen Thigmotaxis stehen, sondern durchschritten ebenfalls die weiteren Strategien der



**B**

| Strategie    | +/+    | -/-    | Diff.  | X <sup>2</sup> |
|--------------|--------|--------|--------|----------------|
| direct       | 17,0 % | 12,9 % | -4,0 % | 4,0            |
| focal        | 37,4 % | 32,8 % | -4,6 % | 2,2            |
| chaining     | 9,9 %  | 11,0 % | +1,1 % | 0,4            |
| scanning     | 17,9 % | 17,8 % | -0,1 % | 0,0            |
| random       | 8,8 %  | 7,9 %  | -0,9 % | 0,3            |
| thigmotactic | 9,1 %  | 17,5 % | +8,4 % | 19,8           |
| Total        | 100%   | 100 %  | 0 %    | 26,7           |



**Abbildung 3.18: Strategienwechsel im *Morris water maze***

(A) Entwicklung der Schwimmstrategien von Mäusen im *Morris water maze*. Rote Quadrate symbolisieren die Plattformposition, ausgefüllte Kreise die Auslassposition zu Beginn eines Versuchsdurchgangs und die schwarzen Linien repräsentative Schwimmpfade. (B) Strategienanalyse der *Arg3.1 knockout*-Mäuse und ihrer *littermates* im Chi<sup>2</sup>-Test. Die Strategien *floating* und *circling* wurden von beiden Gruppen nicht angewandt. *Arg3.1<sup>-/-</sup>* Mäuse zeigten während der Akquisition eine erhöhte Thigmotaxis auf Kosten verminderter „räumlicher“ Strategien. (C) Analyse der erhöhten Thigmotaxiswerte in *Arg3.1<sup>-/-</sup>* Mäusen. Es wurde die Häufigkeit eines thigmotaktischen Durchgangs,

„nicht räumlichen“ Verhaltensweisen. Sie zeigten aber selbst im Anschluss an weiter fortgeschrittene Strategien einen immer wiederkehrenden Rückfall in thigmotaktisches Verhalten. Analysiert man nämlich das Verhalten in Abhängigkeit des vorausgegangenen Durchgangs, so zeigt sich, dass die Arg3.1<sup>-/-</sup> Tiere zu jedem Zeitpunkt, sogar im Anschluss an eine „räumliche“ Strategie, in die Thigmotaxis zurückfallen konnten. Ein solches Verhalten wird generell bei Kontrolltieren nicht beobachtet. Je fortgeschrittener ihre Strategie, desto geringer bzw. ausgeschlossen die Rückkehr zu thigmotaktischem Verhalten (Abb. 3.18C). Diese Analyse deuten darauf hin, dass die Defizite der Arg3.1<sup>-/-</sup> Mäuse im *Morris water maze* auf einer selektiven Störung des räumlichen Lernvermögens beruhen könnten.

### 3.2.5.2 Furchtkonditionierung

Im *Morris water maze* wird ein intensives Trainingsprotokoll angewendet, das sich über drei Tage und 18 Durchgänge erstreckt und so die Analyse einzelner, zeitlich abgestufter Gedächtnisformen erschwert. Zusätzlich erfordert das Schwimmen bei Mäusen eine sehr komplexe Motorik, die sie in einen Stresszustand versetzt und damit eine aversive Motivation in der Bewältigung des Lernparadigmas bewirken kann. Diese beeinflusst die Lernfähigkeit der Versuchstiere negativ. Um die Rolle von Arg3.1 beim Lernen und Gedächtnis ohne diese Nebeneffekte zu analysieren, wurden die *knockout*-Mäuse einem einfacheren Lernparadigma unterzogen, der Furchtkonditionierung (*fear conditioning*). Bei der Furchtkonditionierung wird ein neutraler Stimulus (CS<sub>1</sub>, in diesem Fall ein Ton) mit einem schmerzhaften, aversiven Reiz (US, ein elektrischer Stromstoß) gepaart (tonabhängige Komponente der Furchtkonditionierung). Zusätzlich wird auch die Umgebung, in der die Konditionierung stattfindet (CS<sub>2</sub>, Kontext), mit dem Schock assoziiert (kontextabhängige Komponente der Furchtkonditionierung). Aufgrund der gebildeten Assoziation von CS und US reagieren Mäuse auf die erneute Präsentation des CS mit einer aversiven Reaktion (UR, *freezing* = absolute Bewegungslosigkeit). Die Fähigkeit zur Ausbildung dieser Assoziationen wurde bei Arg3.1 *knockout*-Mäusen im Rahmen zweier Paradigmen getestet, der *trace* und der *delay*

---

in Abhängigkeit der Strategie des vorherigen Durchgangs gemessen. Je weiter Kontrolltiere in der Hierarchie der Strategien aufstiegen, desto seltener bis gar nicht fielen sie auf die Thigmotaxis zurück. *Knockout*-Mäuse dagegen zeigten selbst im Anschluss an „räumliche“ Strategien erneute Thigmotaxis. thig, Thigmotaxis; rdm, *random*; scan, *scanning*; chain, *chaining*; focal, *focal*; dir, *direct*.

Furchtkonditionierung. Um das Langzeitgedächtnis zu testen wurden 24 Stunden nach der CS-US Präsentation zuerst der CS<sub>1</sub> und dann der CS<sub>2</sub> alleine präsentiert.

### *Delay* Protokoll

Bei dieser Form der Angstkonditionierung beginnt die Präsentation des CS<sub>1</sub> kurz vor der des US (*delay*), beide terminierten aber gleichzeitig. Es kommt also zu einer zeitlichen Überlappung der beiden Stimuli. Vor der ersten Paarung zeigten die Tiere weder auf den Kontext noch auf den Ton das *freezing*-Verhalten. Während der Akquisition wurde die CS<sub>1</sub>/US-Paarung fünf mal in Folge präsentiert und sowohl Wildtyp- als auch Arg3.1<sup>-/-</sup> Mäuse wurden sofort konditioniert, wie aus den bereits ab der zweiten CS<sub>1</sub> Gabe stark erhöhten *freezing*-Antwortraten ersichtlich wurde (Abb. 3.19A). Im Anschluss an die Akquisition verbrachten die Mäuse 24 Stunden in ihrem Heimkäfig und wurden dann zuerst für zwei Minuten in die Konditionierungskammer gesetzt, um die Assoziation zwischen Kontext und Schock zu analysieren. Kontrolltiere verbrachten dabei annähernd 50 % der Zeit mit dem *freezing*-Verhalten. Arg3.1 *knockout*-Tiere dagegen reagierten mit einer deutlich reduzierten *freezing*-Rate auf den trainierten Kontext (Abb. 3.19B). Um die Assoziation zwischen Ton und Schock zu testen, wurden die Tiere anschließend in eine neue, völlig neutrale Umgebung gesetzt und mit dem CS<sub>1</sub> konfrontiert. Auch hier reagierten die Arg3.1 Mäuse im Vergleich mit den Wildtyp-Tieren mit einer drastisch erniedrigten *freezing*-Rate (Abb. 3.19C).

### *Trace* Protokoll

Bei diesem Protokoll liegt eine Pause, ein sog. *trace* Intervall, zwischen dem Ende des CS<sub>1</sub> und dem Beginn des US, so dass diese zeitlich getrennt sind. Der restliche Versuchsablauf ist identisch zur *delay* Furchtkonditionierung. Beide Gruppen bildeten eine rasche, aber schwächere Assoziation von Ton und Schock während der Akquisition aus (Abb. 3.19D). Im Langzeitgedächtnistest 24 Stunden nach der Akquisition war die Assoziation sowohl für den räumlichen Kontext (CS<sub>2</sub>) als auch für den Ton (CS<sub>1</sub>) mit dem US bei beiden Gruppen im Vergleich zum *delay* Paradigma schwächer ausgebildet (Abb. 3.19E, F). Dies ist eine generelle Beobachtung, die darauf beruht, dass beim *trace* Protokoll in der Pause zwischen Ton und Schock andere Reize auftreten können, die mit der Gedächtnisbildung interferieren. Während allerdings die Kontrolltiere bei der Präsentation beider Stimuli erhöhte *freezing*-Raten zeigten, reagierten die Arg3.1 Mäuse auf den konditionierten Kontext kaum und auf den Ton nur sporadisch. Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich der Genotypen

ergaben sich dabei für die Kontextassoziation. Die reduzierten *freezing*-Raten in der Angstkonditionierung könnten auf eine verminderte Schmerzsensitivität zurückzuführen sein. Die erfolgreiche Konditionierung während der Akquisitionsphase schließt diese Möglichkeit aber aus.

### 3.2.5.3 Allgemeine Ängstlichkeits- und Motivationstests

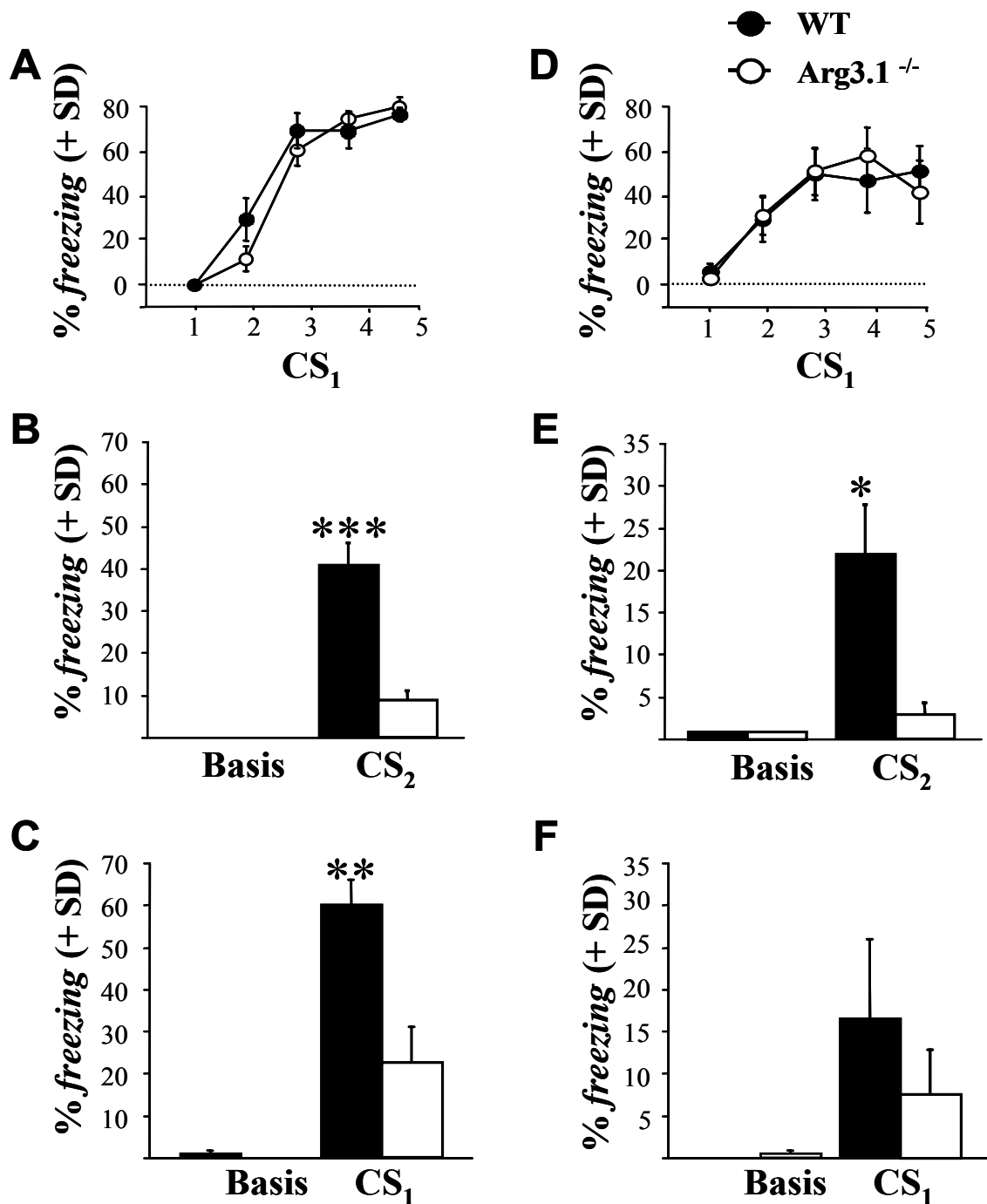
Um eine evtl. generell reduzierte Ängstlichkeit, Motivationsschwächen oder motorische Störungen, die sich negativ auf die oben durchgeführten Lernexperimente auswirken könnten, in den Arg3.1 Mäusen auszuschließen, wurden drei weitere Verhaltenstests durchgeführt: das *O-Maze*, die Hell/Dunkel-Kammer und die offene Arena. Alle drei Tests schaffen eine Konfliktsituation für die Mäuse zwischen dem angeborenem Explorationsverhalten neuer Umgebungen und ihrer natürlichen Aversion gegenüber potentiell gefährlichen Situationen, die freie Flächen oder große Höhen bieten. Die Versuchsaufbauten sind in Abbildung 6.5 dargestellt.

#### Offene Arena

Mäuse tendieren dazu, offene Flächen zu meiden und sich Schutz an Wänden oder in Höhlen zu suchen. Da die offene Arena keine Zufluchtsmöglichkeiten bietet, zeigen die Tiere, nach einer kurzen Verweildauer am Rand, exploratives Verhalten. Wildtyp- und Arg3.1 *knockout*-Mäuse, die für jeweils zwei mal zehn Minuten in die Arena gesetzt wurden, unterschieden sich in keinem der gemessenen Parameter (Aufenthaltssorte, Laufrichtung, Laufgeschwindigkeit, Richtungswechsel, Inaktivität) voneinander. So zeigten sie etwa gleiche Thigmotaxiswerte und Aufenthaltszeiten im Zentrum der Arena (Abb. 3.20A).

#### *Elevated O-Maze*

Das *elevated O-maze* ist ein schmaler kreisförmiger Laufsteg, der Mäuse aufgrund seiner Höhe (50 cm über dem Boden) abschreckt. Obwohl keine Fluchtmöglichkeiten vorhanden sind, können die Versuchstiere zwischen zwei 180° voneinander entfernt liegenden offenen und zwei von Wänden geschützten Sektoren wählen. Auch hier ergaben die



**Abbildung 3.19: Furchtkonditionierung mit Arg3.1<sup>-/-</sup> Mäusen**

(A–C) Delay, (D–F) Trace Protokoll der Furchtkonditionierung. (A), (D) Durchschnittliche *freezing*-Raten der Wildtyp- bzw. Arg3.1 *knockout*-Mäuse während der CS-Präsentationen in der Akquisitionsphase. Die Tiere wurden 5-mal mit einer CS<sub>1</sub>/US Paarung (Ton/Elektroschock) in dem Kontext CS<sub>2</sub> konfrontiert. (B), (E) *Freezing*-Raten während der 2-minütigen Präsentation des Kontextes (CS<sub>2</sub>) ohne Präsentation des CS<sub>1</sub> 24 Stunden nach der Akquisition. Zum Vergleich ist die Basisrate vor der ersten CS/US Paarung angegeben (Basis, s. Ruhephase in Abb. 6.4). Wildtyp-Mäuse zeigten in beiden Experimenten signifikant längere *freezing*-Zeiten (B: WT, 40.5 ± 5.5%; KO, 9.2 ± 1%; p<0.0007; E: WT, 22.6 ± 8.7; KO, 3.9 ± 0.9%; ANOVA p<0.02). (C), (F) *Freezing*-Raten während einer 1-minütigen Präsentation des CS<sub>1</sub> in einem neutralen Kontext 24 h nach der →

Lokomotionsmessungen keine Unterschiede zwischen den Gruppen. So hielten sich die *knockout*-Tiere beispielsweise genau so häufig in den ungeschützten Sektoren auf und waren vergleichbar lange in Bewegung wie ihre *littermates* (Abb. 3.20B).

#### Hell/Dunkel-Kammer

In der Hell/Dunkel-Kammer haben die Versuchstiere die Auswahl zwischen einem kleinen, dunklen und einem größeren, hell erleuchteten Abteil, die miteinander verbunden sind. Die gemessenen Parameter, u. a. Anzahl und Dauer der Besuche des offenen Abteils, zeigten keine Unterschiede im Vergleich der beiden Testgruppen (Abb. 3.20C).

Diese Kontrollexperimente zeigten, dass die Defizite, die bei *Arg3.1<sup>-/-</sup>* Mäuse im *Morris water maze* und in der Furchtkonditionierung festgestellt wurden, nicht auf motorische, sensorische oder die Motivation betreffende Fehlfunktionen zurückzuführen sind, sondern auf einer mangelhaften kognitiven Integrationsfähigkeit beruhen.

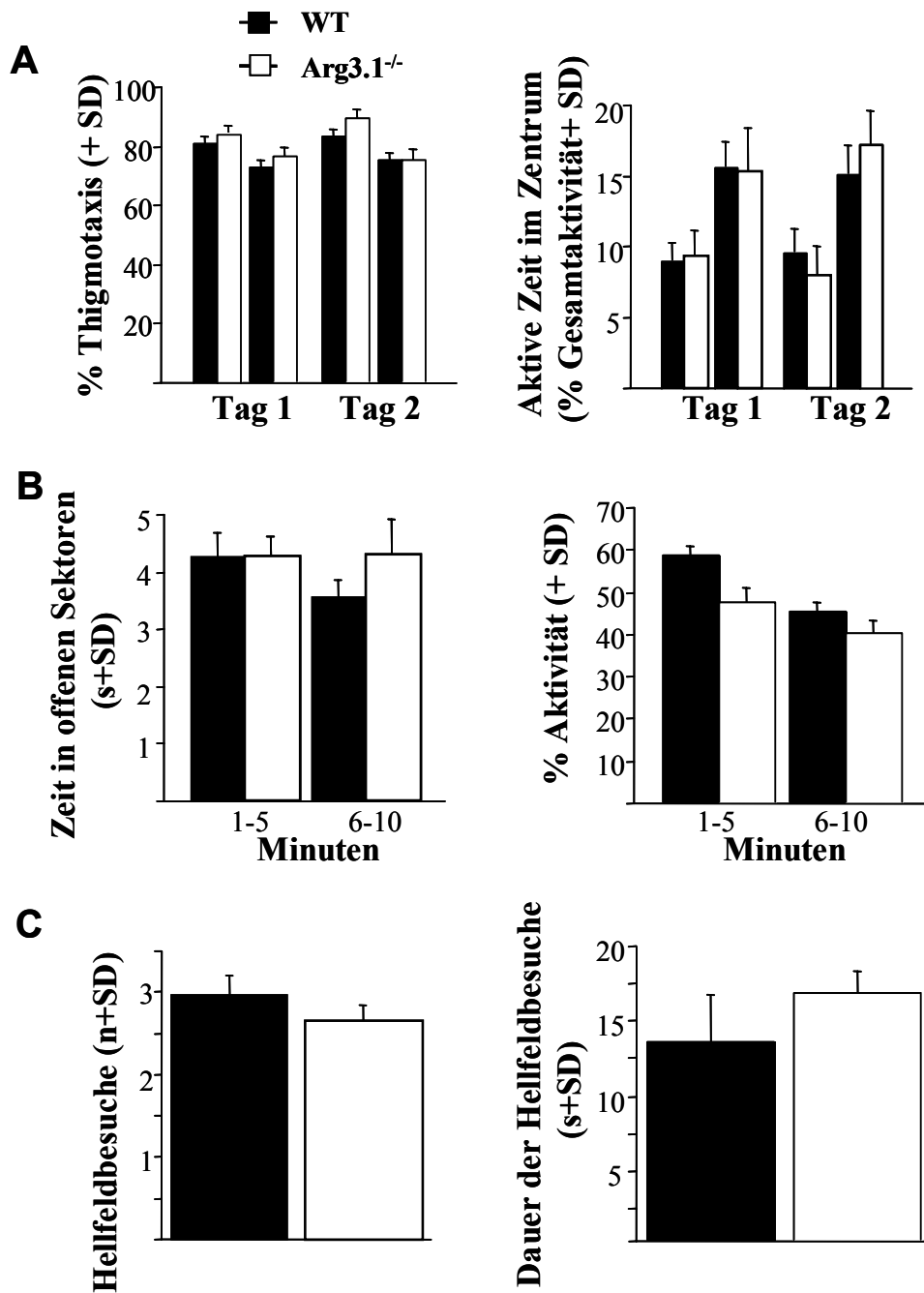
### 3.2.6 Genomanalyse (*genomics*) der *Arg3.1 knockout*-Linie

Neben den proteinbiochemischen, elektrophysiologischen und verhaltensbiologischen Analysen wurden ferner die Auswirkungen der *Arg3.1* Nullmutation auf die Transkription anderer Gene untersucht. Ein Einblick in solche eventuell auftretende Veränderungen auf transkriptioneller Ebene sollten durch eine DNA *microarray*-Studie gewonnen werden. Die Annahme, dass solche Veränderungen stattfinden, stützt sich auf folgende Beobachtung: *Arg3.1* ist in Wildtyp-Tieren, neben der bemerkenswerten Verteilung in den Dendriten bzw. an der Synapse, auch im Zellkörper und darüber hinaus im Nukleus lokalisiert (vgl. immunhistologische Färbungen in Abb. 3.1 und 3.2). In elektronenmikroskopisch analysierten Immunogoldfärbungen konnte dieser Befund verifiziert werden. Hier zeigen sich Signale für

---

Akquisition. Zum Vergleich sind die Werte einer 1-minütigen Vorlaufzeit in dem neutralen Kontext angegeben (Basis). Nach dem *trace* Protokoll konditionierte Wildtyp-Tiere zeigten signifikant höhere *freezing*-Raten als die *Knockouts* (C: WT, 60.2 ± 6.1%; KO, 22.4 ± 8.5%; ANOVA  $p < 0.003$ ; F: WT, 17.2 ± 10.2%; KO, 8.1 ± 4.8%; ns). WT, n=10; KO, n=10 pro Experiment.





**Abbildung 3.20: Allgemeine Verhaltenstests zur Motivation und Ängstlichkeit von Arg3.1<sup>-/-</sup> Mäusen**

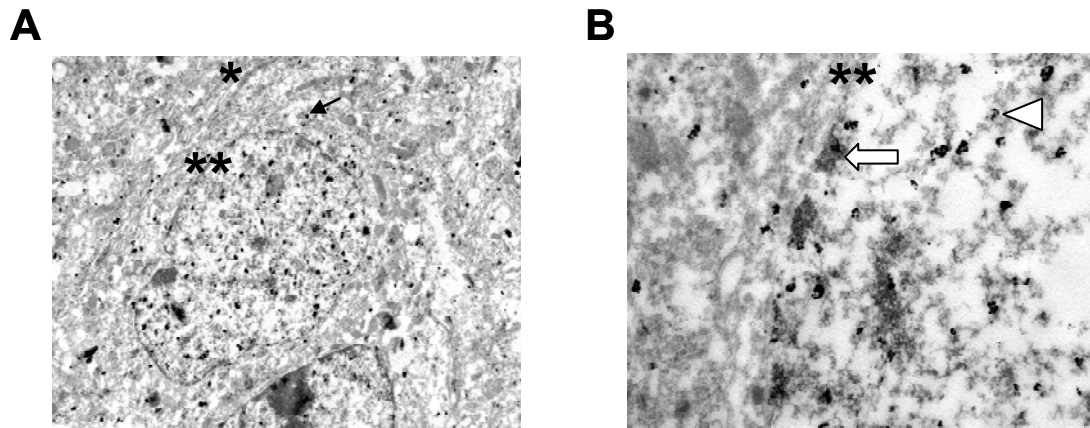
(A) Offene Arena. Die Tiere verbrachten je 10 min pro Tag, die für die Analyse in 2 x 5 min aufgeteilt wurden, in der Arena. Links: prozentualer Anteil der Versuchsdauer, die die Tiere an der Arenawand (Thigmotaxis) verbrachten. Rechts: prozentualer Anteil der aktiven Zeit, die die Tiere im Zentrum der Arena verbrachten. (B) *Elevated O-maze*. Die Mäuse verbrachten 10 min am Stück im Experiment. Links: Durchschnittliche Zeit eines Besuchs der offenen Sektoren. Rechts: Prozentualer Anteil der aktiven Zeit an der Gesamtversuchsdauer. (C) Hell/Dunkel-Kammer. Die Tiere verbrachten einmalig 5 min in der Versuchskammer. Gezeigt sind die Anzahl der Besuche (links) und deren durchschnittliche Dauer (rechts) des beleuchteten Kompartments. Keiner der Vergleiche zwischen Wildtyp- und *knockout*-Mäusen war im 2-Weg ANOVA statistisch signifikant unterschiedlich.

Arg3.1 im gesamten Zellkörper, aber insbesondere auch im Nukleus von Körnerzellen des Gyrus dentatus (Abb. 3.21). Diese Lokalisierung deutet auf eine Funktion von Arg3.1 im Zellkern, möglicherweise bei transkriptionellen Prozessen, hin.

### **3.2.6.1 Unterschiede im DNA *microarray* von Wildtyp- und Arg3.1 *knockout*-Mäusen**

Für die Erstellung der Genexpressionprofile sollten die hippokampalen RNA-Fractionen von Wildtyp- und Arg3.1 *knockout*-Mäusen unter Stimulationsbedingungen mittels der DNA-Genchiptechnologie (*microarray*) miteinander verglichen werden. Der experimentelle Ablauf der hier verwendeten DNA-Chipanalyse ist im Methodenkapitel (Abb. 6.1A) skizziert. Der DNA *microarray* Technologie liegt, vergleichbar zum Northern und Western Blot Verfahren, die Hybridisierung von markierter DNA bzw. RNA mit einer komplementären, an einer definierten Stelle auf einer Trägermatrix immobilisierten DNA, zugrunde. Die Detektion der hybridisierten Sonden erfolgt allerdings nicht über Radioaktivität, sondern über Fluoreszenzfarbstoffe, die die Automatisierung der Auswertung erlauben.

Für die *microarray*-Studie wurden die Gesamt-RNAs aus den Hippokampi je einer stimulierten (Präparation vier Stunden nach Einsetzen eines Kainat-induzierten Krampfes) und einer nicht stimulierten Wildtyp- und *knockout*-Maus nach dem Trizol-Verfahren gewonnen und durch Ionenaustauschersäulen (Qiagen) nochmals aufgereinigt. Die Reinheit wurde photometrisch bestimmt, wobei das Verhältnis der optischen Dichten  $OD_{260}/OD_{280}$  bei allen Proben  $2.0 \pm 0.05$  betrug. In einem denaturierenden Formaldehydgel wurde die Reinheit zusätzlich überprüft (Abb. 3.22A). Zur Verifizierung der Genotypen wurde die Gesamt-RNA per rtPCR in cDNA revers transkribiert und diese als *template* für eine Genotypisierungs-PCR mit den Primern TDI1-3 eingesetzt (vgl. Abb. 3.7). Abbildung 3.22B zeigt die Bestätigung der Genotypen, so dass die präparierten Fraktionen im *microarray* eingesetzt werden konnten. Dafür wurde die Gesamt-RNA in cDNA revers transkribiert, welche unter Zusatz der biotinkoppelten Nukleotide Biotin-UTP und Biotin-CTP in cRNA transkribiert wurde. Die biotinmarkierte cRNA wurde dann auf einen mausgenomspezifischen DNA-Genchip des Typs MG-U74A der Firma Affymetrix hybridisiert und im Anschluss an die Hybridisierung durch einen streptavidinkoppelten, fluoreszierenden Farbstoff markiert und detektiert. Die Hybridisierung sowie die Detektion der Chips wurde von Dr. Fang Yu durchgeführt.



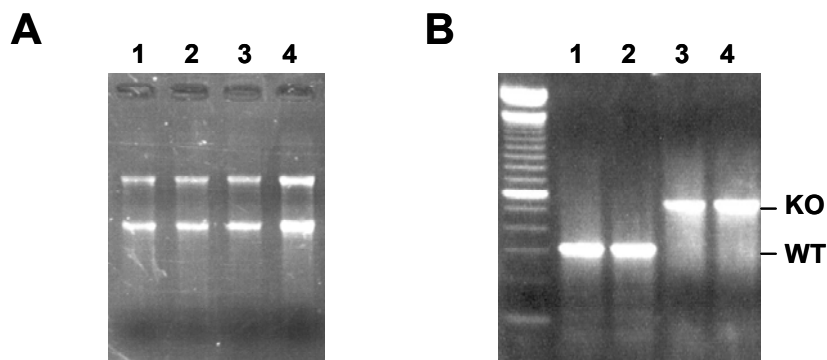
**Abbildung 3.21: Arg3.1 Immunogoldfärbung im Zellkern**

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellkörpern in der Granulärzellschicht des Gyrus dentatus einer Wildtyp-Maus 4 h nach Einsetzen neuronaler Aktivität (kainatinduzierter Anfall). Die Arg3.1 Expression wurde immunhistochemisch durch Inkubation mit einem aufgereinigten Arg3.1 Antiserum und anschließender Kopplung eines Goldpartikel-markierten sekundären Antikörpers sichtbar gemacht. Die Goldpartikel erscheinen im elektronenmikroskopischen Bild als schwarze Punkte (Pfeil). **(A)** Zellkörper einer Körnerzelle mit Zellmembran (\*) und Kernmembran (\*\*). **(B)** Vergrößerung der das Zellplasma (links) und das Kernplasma (rechts) trennenden Kernmembran (\*\*). Die Goldpartikelverteilung im Kernplasma deutet eine Assoziation von Arg3.1 sowohl mit dem Hetero- (offener Pfeil) als auch dem Euchromatin (Pfeilkopf) an.

Der Genchip MG-U74A umfasst ca. 6000 Sequenzen charakterisierter Mausgene der *UniGene* Mausdatenbank und 6000 EST-Sequenzen (*expressed sequence tag*), die noch keinem bekannten Gen zugeordnet werden konnten. Jedes Transkript ist durch 11-16 Paare verschiedener Oligonukleotide, mit einer Länge von 25 Basen, die im 3'OH Bereich des Transkripts liegen, auf dem Chip repräsentiert. Ein Paar besteht aus einer sog. *perfect match* (PM) und einem *mismatch* (MM) Probe. Eine PM Probe ist 100% komplementär zur Zielsequenz, eine MM Probe trägt einen singulären Nukleotidaustausch in deren Zentrum. Dieser führt zu einer verminderten Bindungsaffinität der cRNA. Aus der Signaldifferenz zwischen PM und MM Probe berechnet sich die absolute Signalstärke, anhand derer eine Sequenz als vorhanden (*present*), schwach vorhanden (*mediate*) oder nicht vorhanden (*absent*) eingestuft wird. Falsch-positive Kreuzhybridisierungen treten bei beiden Proben gleich häufig auf und sorgen so für vergleichbare Hintergrundintensitäten (ein Beispiel für die Signalintensitäten von PM und MM Probenpaaren eines Gens ist im Methodenkapitel in Abbildung 6.1B gezeigt). Die anhand dieses PM/MM Abgleichs entstandenen Datensätze mit den Signalintensitäten der vier verschiedenen Fraktionen wurden dann untereinander

verglichen. Alle Expressionsanalysen wurden am Computer durchgeführt (*software*: Microarray Suite 5.0, MicroDB 3.0, Data Mining Tool 3.0.).

Ein Gen galt als differentiell exprimiert, wenn die Signalstärken zwischen Wildtyp und *knockout* sich mindestens verdoppelten oder halbierten („Signal Log Ratio“ = +/-1 oder größer). Im Folgenden wird zunächst nur der Vergleich der beiden stimulierten Fraktionen aus der *microarray*-Studie ausgewertet. Es handelt sich hierbei um die Ergebnisse eines einzelnen, ersten Versuchsdurchlaufs. Aus diesem Grund konnte zu diesem Zeitpunkt noch keine Statistik für die Auswertung angewendet werden. Der Vergleich Arg3.1 *knockout*- vs. Wildtyp-Maus unter Stimulationsbedingungen brachte 15 unterschiedlich transkribierte Gene hervor, wovon vier im *knockout* eine Signalverstärkung und elf eine Signalreduktion zeigten (Tab. 3.1). Von diesen 15 Sequenzen gehörten drei zu unbekanntesten ESTs (Nr. 4, 14, 15), wobei zwei davon im Arg3.1 *knockout* eine schwächere Signalintensität zeigten. Die verbleibenden zwölf Sequenzen stammten von bereits charakterisierten Genen. Davon ergaben drei im Vergleich Arg3.1<sup>-/-</sup> vs. Arg3.1<sup>+/+</sup> verstärkte und zehn reduzierte Signalintensitäten.



**Abbildung 3.22: Überprüfung der im *microarray* eingesetzten Gesamt-RNA-Fractionen**

(A) RNA-Agarosegel mit den im *microarray* eingesetzten hippocampalen Gesamt-RNA Fraktionen von: 1, Wildtyp Kontrolle; 2, Wildtyp stimuliert (4 h nach Einsetzen eines kainatinduzierten Anfalls); 3, *knockout* Kontrolle; 4, *knockout* stimuliert. Die Banden repräsentieren die 28S und die 18S rRNA Untereinheiten. Ihre Schärfe dient als interner Marker für die Integrität der isolierten RNA. (B) DNA-Agarosegel der Genotypisierung-PCR. Für die Überprüfung der Genotypen wurden die in (A) gezeigten RNA-Proben per rtPCR in cDNA umgeschrieben und dann für die PCR eingesetzt. Spurenverteilung analog zu (A), links: DNA-Größenmarker.

|            | <b>Ratio</b> | <b>Signal -/-</b> | <b>Signal +/-</b> |
|------------|--------------|-------------------|-------------------|
| Sequenz 1  | 2,7          | 239,3             | 38,2              |
| Sequenz 2  | 1,8          | 659,1             | 152,1             |
| Sequenz 3  | 1,2          | 264,3             | 88,6              |
| Sequenz 4  | 1,4          | 278               | 94,8              |
| -----      |              |                   |                   |
| Sequenz 5  | -2,6         | 204,4             | 1484,3            |
| Sequenz 6  | -1,1         | 218,2             | 523,9             |
| Sequenz 7  | -1,0         | 5346,8            | 11071,3           |
| Sequenz 8  | -1,1         | 320,8             | 714,7             |
| Sequenz 9  | -4,2         | 6,5               | 140,9             |
| Sequenz 10 | -1,9         | 157,2             | 584,2             |
| Sequenz 11 | -1,9         | 44,3              | 256,7             |
| Sequenz 12 | -1,2         | 831,6             | 1922,8            |
| Sequenz 13 | -1,0         | 609,6             | 1069,1            |
| Sequenz 14 | -1,0         | 1741,5            | 3644,4            |
| Sequenz 15 | -1,0         | 158,9             | 340,7             |

**Tabelle 3.1: Aufstellung der unterschiedlich repräsentierten Sequenzen im *microarray* Arg3.1 *knockout* vs. Wildtyp**

Vergleich der Signalintensitäten im *microarray*-Screen von Arg3.1 *knockout* vs. Wildtyp-Mäusen 4 h nach Einsetzen neuronaler Aktivität. Bei insgesamt 15 Sequenzen war die Signaldifferenz mind. um die Ratio +/- 1,0 verändert (s. Text). Die Signalintensitäten errechnen sich aus dem Verhältnis der *perfect match* und *mismatch* Proben für eine Sequenz (s. Text).

### 3.2.6.2 Kontrolle des *microarrays* mittels rtPCR

In einem ersten Schritt der Datenvalidierung sollte die Expression der bereits bekannten Gene durch rtPCR und anschließende PCR überprüft werden. Dafür wurden die Hippokampi von weiteren Wildtyp- und *knockout*-Mäusen unter Kontroll- und Stimulationsbedingungen präpariert und die Gesamt-RNA wie oben beschrieben isoliert. Um einen besseren Überblick über den zeitlichen Verlauf aktivitätsabhängiger Genexpressionen zu erhalten, wurden für die RNA-Gewinnung neben den nicht induzierten Kontrollen drei verschiedene Stimulationszeitpunkte gewählt: 30 Minuten, eine und vier Stunden nach Einsetzen eines kainatinduzierten Krampfes. Die präparierten hippokampalen Gesamt-RNAs wurden zunächst in cDNA revers transkribiert. Diese cDNA wurde dann als *template* für die anschließenden PCR-Läufe eingesetzt. Die Banden der PCR-Produkte wurden dokumentiert und mittels

densitometrischer Analyse (Methodik s. Kap. 6.2.1.14) ausgewertet. Analog zum *microarray* wurde als Kriterium für eine unterschiedliche Genexpression eine Signaldifferenz mindestens um den Faktor 1 gewählt. In einem Vorexperiment musste aber zunächst die vergleichbare Induktion neuronaler Aktivität in den Wildtyp- und *knockout*-Mäusen überprüft werden. Dafür wurde das aktivitätsregulierte Gen Homer 1a ausgewählt, da dieses im *microarray* gleiche Signalintensitäten zwischen den verschiedenen Gruppen aufwies. Die PCR für Homer1a (*Primer* Homer1a *for*; Homer1a *rev*) zeigte keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen (Abb. 3.23, 3.24). Eine Induktion der Transkription wurde ebenfalls für Arg3.1 (*Primer* Arg3.1 *genom for*; Arg3.1 *genom rev*) zu allen drei Stimulationszeitpunkten beobachtet, allerdings nur in den Wildtyp-Fraktionen. Die Proben der *knockout*-Tiere waren Arg3.1 negativ. Eine in der gleichen PCR durchgeführte Amplifikation des konstitutiv exprimierten Gens GAPDH (*Primer* GAPDH *for*; GAPDH *rev*) bestätigte dabei die gleichen Konzentrationsverhältnisse. Auch die Verteilungen der nicht aktivitätsregulierten Gene  $\alpha$ -actin und  $\alpha$ -CaMKII bestätigten gleiche Konzentrationsverhältnisse bei den in der PCR eingesetzten cDNAs.

Zur PCR-Analyse der Kandidatengene aus dem *microarray* wurden die jeweiligen Primerpaare so gewählt, dass sie die auf dem Genchip repräsentierten Sequenzen flankierten. Es wurden zunächst die Sequenzen Nr. 1-3 und 5-11 analysiert, da es sich bei diesen um bereits bekannte Gene mit den höchsten Signaldifferenzen aus dem *microarray* handelte. Zur besseren Veranschaulichung der PCR-Resultate wurden die in Abb. 3.23 gezeigten DNA-Banden der Kandidatengene densitometrisch gemessen und miteinander verglichen (Abb. 3.24). Dabei konnte eine differentielle Regulation der Nr. 1-3, 5, 6, 8, 9 und 11 nicht bestätigt werden. Die Sequenzen 7 und 10 waren jedoch vier Stunden nach neuronaler Aktivität im Arg3.1 *knockout* schwächer repräsentiert als in den Wildtyp-Proben und verhielten sich damit analog zum *microarray* Ergebnis. Die diesen Sequenzen zugehörigen Gene wurden durch den *software*-Algorithmus BLAST (*basic local alignment search tool*, Altschul et al., 1990) der Datenbank *GenBank* identifiziert. Bei der Sequenz 7 handelt es sich um das für einen Transkriptionsfaktor kodierende aktivitätsregulierte Gen *c-fos* (*cellular-FBJ osteosarcoma oncogene*) und bei Sequenz 10 um SOCS3 (*suppressor of cytokine signalling 3*).

Die zeitliche Analyse der Datenverifizierung per rtPCR und anschließender PCR verdeutlichte, dass der differentiellen Expressionen von *c-fos* und SOCS3, wie sie vier Stunden nach neuronaler Aktivität beobachtet wurden, zwei verschiedene Induktionsverläufe zugrunde lagen. Die Expression von *c-fos* war sowohl in Wildtyp- als auch Arg3.1 *knockout*-Mäusen nach 30 Minuten und einer Stunde deutlich induziert, fiel aber in den Mutanten zum

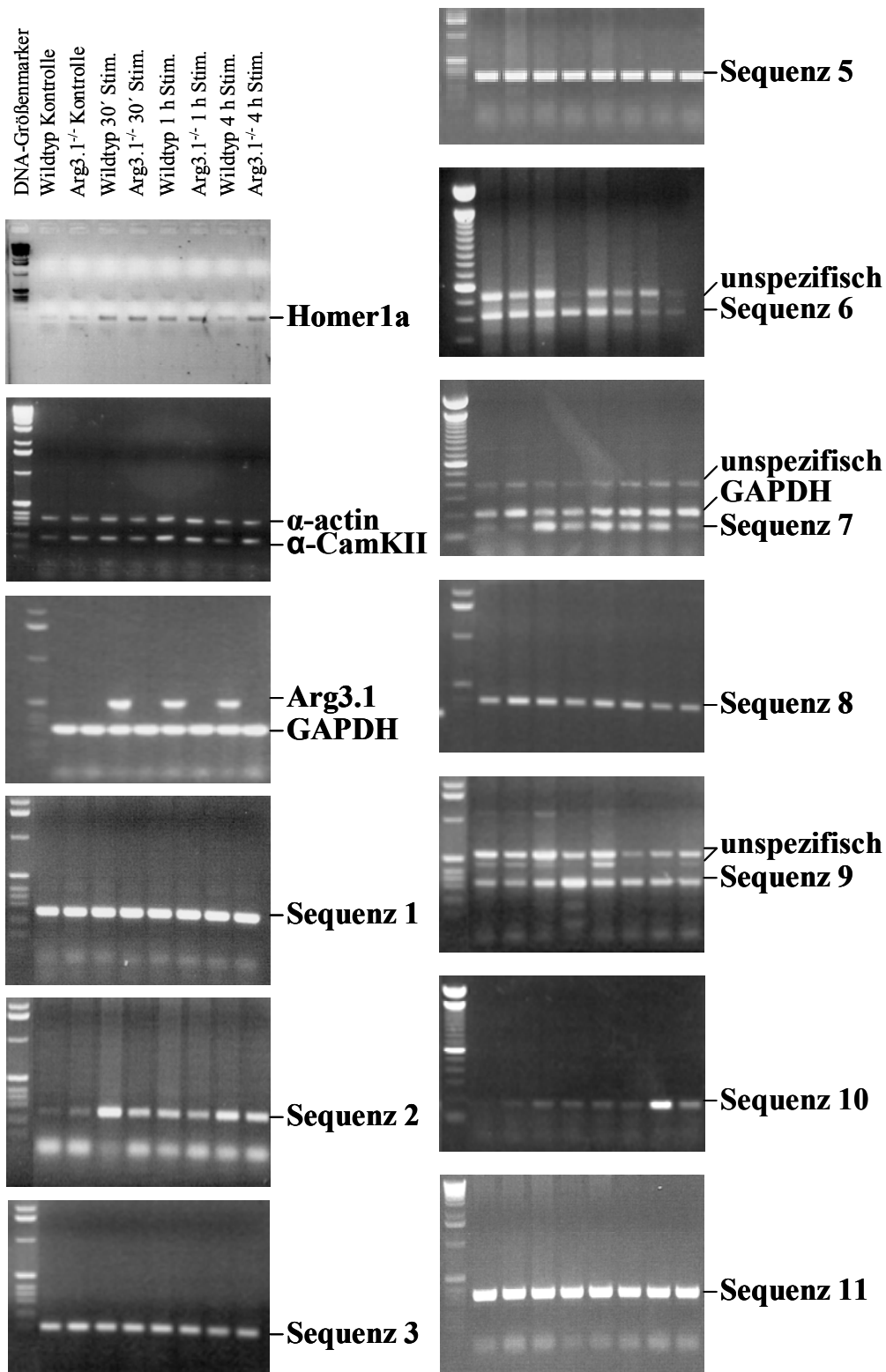
Zeitpunkt von vier Stunden auf den Basiswert unter Kontrollbedingungen zurück. Im Gegensatz dazu war in Wildtyp-Tieren auch vier Stunden nach der Induktion die c-fos Expression stark erhöht. SOCS3 hingegen zeigte 30 Minuten und eine Stunde nach Stimulation in keiner der beiden Gruppen eine Veränderung der Genexpression. Im Gegensatz dazu führte die neuronale Aktivität vier Stunden nach ihrem Einsetzen zur Induktion der SOCS3 Expression in Wildtyp-Tieren (12-fache Intensitätsverstärkung in der DNA-Gelelektrophorese). Dieser deutlichen Induktion stand in den Arg3.1 Mutanten nur eine schwache Hochregulierung gegenüber (Verdopplung der Basalexpression).

### **3.2.6.3 SOCS3 Analyse**

Die Befunde der differentiellen Regulierung von SOCS3 nach neuronaler Aktivität zum einen in Wildtyp-Tieren und zum anderen zwischen Wildtyp- und Arg3.1 *knockout*-Tieren wurden näher analysiert.

#### **3.2.6.3.1 *In situ* Analyse der SOCS3 Verteilung in Wildtyp- und Arg3.1 *knockout*-Tieren**

Um neben der zeitlichen auch die räumliche Auflösung der veränderten Genexpression zu visualisieren, wurden radioaktive *in situ* Hybridisierungen für SOCS3 an Gehirnschnitten von Wildtyp- und Arg3.1 *knockout*-Mäusen unter Kontrollbedingungen bzw. eine und vier Stunden nach Einsetzen eines epileptischen Anfalls angefertigt. Da die ursprüngliche *microarray*-Studie und die rtPCR-Validierung mit hippocampalem Gewebe durchgeführt wurden, lag der Fokus der *in situ* Hybridisierung auf koronalen Schnitten in der Ebene des Hippokampus. Unter Kontrollbedingungen zeigten sich niedrige und ubiquitär verteilte Signalintensitäten für die SOCS3 mRNA, die bei Wildtyp- und *knockout*-Tieren vergleichbar ausfielen (Abb. 3.25A). Die stärksten Signale wurden hier im Bereich der Körnerzellschicht (Gyrus dentatus) und der Pyramidalschichten (CA1-3) des Hippokampus sowie in der kortikalen Schicht II/III des piriformen Kortex detektiert. In diesen Regionen findet man aber auch die höchste Zellpopulationsdichte. Eine Stunde nach Stimulation zeigte sich im Wildtyp ein nahezu unverändertes Bild, abgesehen von einer punktierten Signalverstärkung im Bereich der äußeren Molekularschicht des Gyrus dentatus bzw. im Stratum lacunosum moleculare der CA1-Region (Abb. 3.25B). Letztere setzt sich aus den Somata inhibitorischer Interneurone zusammen, die in alle Hippokampus Regionen projizieren. Diese spezifische



**Abbildung 3.23: Verifizierung der *microarray* Daten per rtPCR**

DNA-Gelelektrophorese der PCR Produkte für die Gensequenzen, die im *microarray* Vergleich Wildtyp - *knockout* unterschiedlich starke Signale zeigten (vgl. Tab. 3.1). Zusätzlich wurden Teilsequenzen →



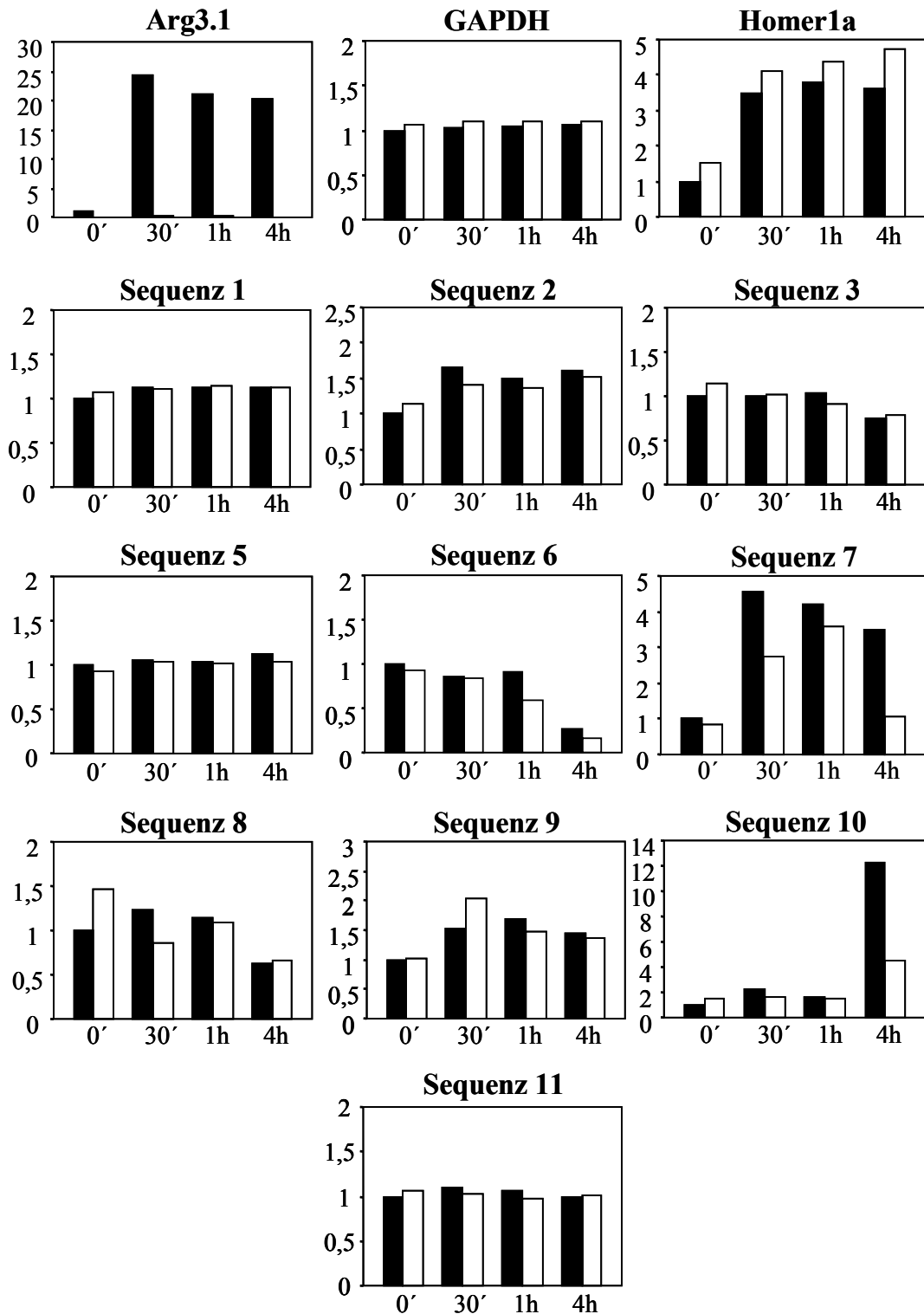
Geninduktion war im *Arg3.1-knockout* nicht zu erkennen. Vier Stunden nach Stimulation zeigte sich eine deutliche Induktion der SOCS3 Expression im Hippokampus der Wildtyp-Tiere. Neben dem Bereich des Stratum lacunosum moleculare ist im Autoradiogramm hier auch der Gyrus dentatus sowie die Pyramidenzellen der CA1-3 Region stark gefärbt (Abb. 3.25C, D). Auffälligerweise beschränkt sich das Signal im Gyrus dentatus nicht nur auf die Körnerzellschicht, sondern füllt auch die polymorphe Zellschicht des Hilus dazwischen aus. Polymorph beschreibt in diesem Zusammenhang das Vorkommen verschiedener Zelltypen im Hilus, u. a. inhibitorischer und exzitatorischer Interneurone. In der Abwesenheit von *Arg3.1* dagegen war auch vier Stunden nach der Stimulation keine Induktion der SOCS3 Expression zu erkennen. Die SOCS3 Signale blieben auf dem Level der Basalexpression unter Kontrollbedingungen. Dieser Befund bestätigte die Ergebnisse der *microarray*-Studie und der rtPCR.

### **3.2.6.3.2 Analyse weiterer Mitglieder der SOCS Familie und anderer assoziierter Kandidaten**

Die Transkription der SOCS Genfamilienmitglieder (SOCS1-7, Cish) wird durch eine zytokinvermittelte Stimulation induziert. Die SOCS Proteine wiederum hemmen, in einer klassischen negativen Rückkopplung, die zytokininduzierten Signaltransduktionsmoleküle JAK und STAT. Um einen möglichen Effekt der *Arg3.1* Deletion auf andere Gene ähnlicher Funktionsweise zu untersuchen, wurden auch die übrigen, auf dem *microarray*-Chip vertretenen Mitglieder der SOCS, JAK und STAT, sowie der funktionell assoziierten PIAS Genfamilie analysiert. PIAS Proteine (*protein inhibitors of activated STATs*) wirken inhibitorisch auf die transkriptionsaktivierende Funktion der STATs. Auf den beiden Genchips für den Wildtyp- und *knockout*-Ansatz unter Stimulationsbedingungen wurden in dem oben beschriebenen *microarray*-Screen neben SOCS3 noch Signale für Cish, SOCS 1, 2,

---

der folgenden Gene zur Überprüfung der verschiedenen experimentellen Bedingungen amplifiziert: Homer 1a (vergleichbare Induktion neuronaler Aktivität),  $\alpha$ -actin,  $\alpha$ -CaMKII, GAPDH (gleiche *template* Konzentrationen in der PCR) und *Arg3.1* (korrekte Genotypen). Aufgrund der schwachen Signalintensitäten der Homer1a PCR-Amplifikate wurden die Banden in diesem Agarosegel mit invertierter Kameraeinstellung fotografiert. GAPDH wurde zur zusätzlichen Kontrolle in der PCR der Sequenz 7 eingesetzt. Als PCR-*template* wurde cDNA von stimulierten und nicht-stimulierten hippokampalen Gesamt-RNAs eingesetzt. Das Diagramm links oben zeigt die Reihenfolge der aufgetragenen Proben, die Zeitangaben beziehen sich auf den Zeitpunkt der RNA-Präparation nach Einsetzen eines Kainat-induzierten Anfalls. Die in den PCR Ansätzen der Sequenzen 6, 7 und 9 zusätzlich auftretenden Banden sind auf das unspezifische Binden der Primerpaare an weitere *template* cDNAs zurückzuführen.



**Abbildung 3.24: Densitometrische Analyse der DNA-Gelelektrophorese aus Abb. 3.23**

Die Intensität der Wildtyp-Kontrollbande wurde jeweils als 1 definiert und alle weiteren DNA-Banden daran normalisiert (für die Erläuterung der densitometrischen Analyse s. Kap. 6.2.1.14). Auf der x-Achse ist die seit Einsetzen der neuronalen Aktivität vergangene Zeit angegeben. Ausgefüllte Balken stellen die Signale der Wildtyp-Fractionen, leere Balken der Arg3.1 *knockout*-Fractionen dar. Aufgrund der Tatsache, dass es sich hier um die Ergebnisse des jeweils ersten Versuchsansatzes handelt, konnte noch keine statistische Auswertung durchgeführt werden.

5 und 7, für STAT 1, 3, 4, 5b, 6, PIAS 1 und 3 und für JAK2 detektiert. Im Vergleich der Signalstärken dieser Sequenzen zwischen den Arg3.1 *knockout*- und den Wildtyp-Daten jeweils vier Stunden nach Stimulation waren neben SOCS3 noch die Werte für Cish (-1,1) STAT1 (-1,0) und STAT6 (-2,6) reduziert (Tabelle 3.2). Diese Unterschiede tauchten im ursprünglichen Computerabgleich der *microarray* Daten nicht auf, da mind. einer der Werte für diese Gene durch den Abgleich *perfect match/mismatch* als nicht vorhanden eingestuft wurde. Die Relation der Signalwerte zu denen der oben abgehandelten und auch bestätigten Sequenzen zeigt aber, dass es sich dabei nicht unbedingt um ein Ausschlusskriterium handeln muss. Diese Gene sollen daher in einer zukünftigen Analyse neben den aus dem *microarray* stammenden und hier noch nicht berücksichtigten Sequenzen 4 und 12-15 weiter analysiert werden.

| <b>Gen</b> | <b>Ratio</b> | <b>Signal -/-</b> | <b>Signal +/-</b> |
|------------|--------------|-------------------|-------------------|
| Cish       | -1,1         | 265,1             | 521,1             |
| SOCS1      | k.V.         | 659,1             | 152,1             |
| SOCS2      | k.V.         | 1620,9            | 1881,7            |
| SOCS5      | k.V.         | 1288,3            | 1677,2            |
| SOCS7      | k.V.         | 204,4             | 1484,3            |
| STAT1      | -1,0         | 96,3              | 184,1             |
| STAT3      | k.V.         | 2305              | 3078,8            |
| STAT5b     | k.V.         | 1107,6            | 1197,1            |
| STAT6      | -2,6         | 41,9              | 216,2             |
| PIAS1      | k.V.         | 850,2             | 744               |
| PIAS3      | k.V.         | 268               | 325,8             |
| JAK1       | k.V.         | 3076              | 2837,8            |
| JAK2       | k.V.         | 403,7             | 470,2             |
| JAK3       | k.V.         | 1011              | 985,4             |

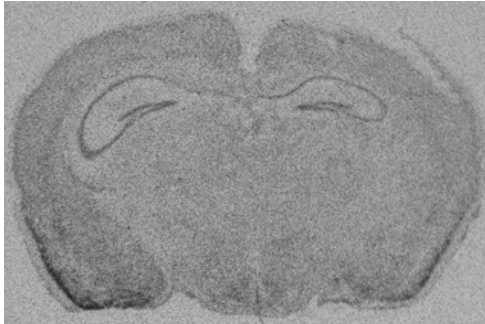
**Tabelle 3.2: Expression funktionell verwandter Gene von SOCS3 in der *microarray* Analyse**

Vergleich der Signalintensitäten weiterer Kandidatengene zwischen Wildtyp- und Arg3.1 *knockout*-Mäusen aus demselben *microarray* Screen, der schon in Tab. 3.1 behandelt wurde. Der Fokus lag auf Genen der SOCS Familie sowie Mitgliedern der STAT, PIAS und JAK Genfamilien. Die drei Gene Cish, STAT1, und STAT3 zeigten in den Arg3.1 *knockouts* eine geringere Signalintensität. Wie schon in Tab. 3.1 wurden Signaldifferenzen ab einer Ratio von +/-1 gewertet. k.V., keine Veränderung.

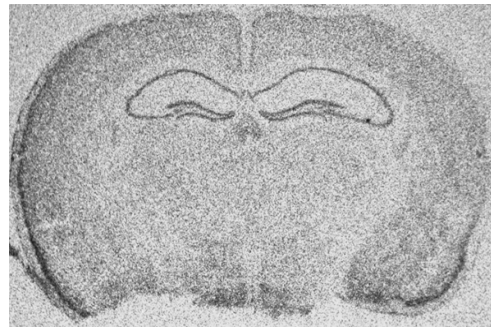
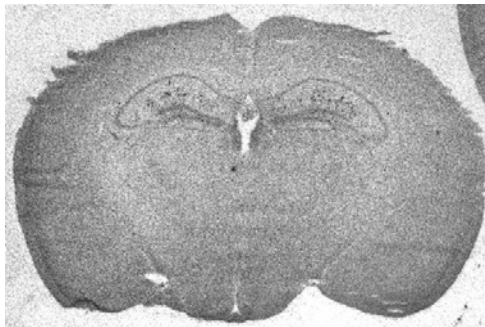
**Wildtyp**

**Arg3.1<sup>-/-</sup>**

**A**



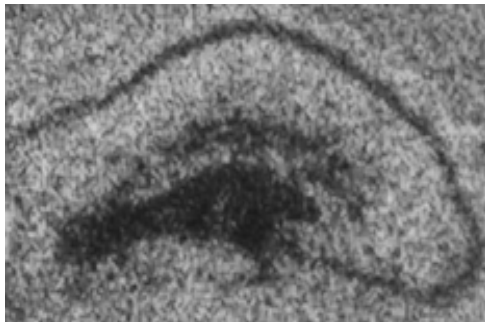
**B**



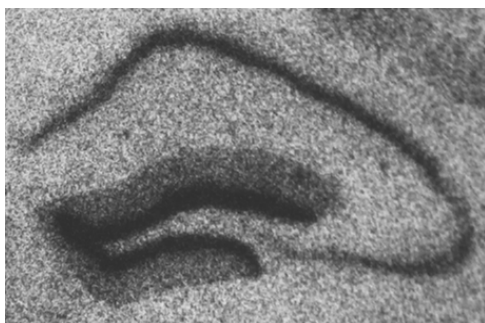
**C**



**D**



**E**



→

---

### **Abbildung 3.25 (s. S. 74): *In situ* Hybridisierungen von SOCS3**

Koronale Gehirnschnitte von Wildtyp- (linke Reihe) und Arg3.1 *knockout*-Mäusen (rechte Reihe) wurden zu verschiedenen Stimulationszeitpunkten mit einer radioaktiv-markierten SOCS3 (A-D) bzw. Arg3.1 (E) Sonde hybridisiert. Die Autoradiogramme der *in situ* Hybridisierung zeigen die SOCS3 Expression unter Kontrollbedingungen (A), 1 h (B) und 4 h (C-E) nach Einsetzen neuronaler Aktivität (Kainat-induzierter Anfall). (D) Vergrößerungen des Hippokampus aus (C); (E) Vergrößerung des Hippokampus aus Abb. 3.1A. Die *in situ* Hybridisierung mit der Arg3.1 spezifischen Sonde auf *knockout*-Gewebe zeigt keine Signale.