

Aus der Arbeitsgruppe „Synaptische Plastizität“,

Prof. Dr. Dietmar Kuhl

Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg

Direktor: Prof. Dr. Dr. Thomas J. Jentsch

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Martinistrasse 52, 20246 Hamburg

## **Modifikation des genomischen Arg3.1 Lokus**

### **in embryonalen Stammzellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Anika Bick-Sander

aus Hamburg

Hamburg, 2002

Angenommen von dem Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 25. Februar 2003

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. C. Wagener  
Referent: PD Dr. I. Hermans-Borgmeyer  
Koreferent: Prof. Dr. T. Jentsch

Gutachter der Dissertation:  
PD Dr. I. Hermans-Borgmeyer  
Prof. Dr. T. Jentsch  
PD Dr. D. Lorke

Datum der letzten mündlichen Prüfung:  
11. März 2003



## Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>IV</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 Aktivitätsabhängige synaptische Plastizität während der Entwicklung des Nervensystems.....	1
1.2 Aktivitätsabhängige synaptische Plastizität im adulten Gehirn.....	3
1.3 Die Transkription von aktivitätsregulierten, unmittelbar früh exprimierten Genen .....	10
1.4 Unmittelbar früh exprimierte Gene mit Effektorfunktion.....	12
1.5 Arg3.1, ein durch synaptische Aktivität reguliertes Gen.....	14
1.6 Dendritische Lokalisierung von RNAs .....	18
1.7 <i>Gene targeting</i> , Zielgerichtete Genmutation in der Maus .....	20
<b>2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....</b>	<b>29</b>
<b>3 MATERIAL .....</b>	<b>30</b>
3.1 Versuchstiere.....	30
3.2 Geräte .....	30
3.3 Chemikalien und Bestandteile für die Zellkultur .....	32
3.4 Puffer und Lösungen.....	33
3.5 Medien.....	38
3.6 Eukaryontische Zelllinien.....	39
3.7 Bakterienstämme .....	39
3.8 Nukleinsäuren.....	40
3.8.1 Klone.....	40
3.8.2 Plasmide.....	40
3.8.3 Oligonukleotide.....	41
3.8.4 Primer für die Genotypisierung.....	41
3.8.5 Weitere Nukleinsäuren .....	41
3.8.6 Radionukleotide.....	41
3.9 Enzyme.....	42
3.10 Kits.....	42
3.11 Plastikmaterial für Zellkultur.....	43
3.12 Sonstiges Material .....	43
<b>4 METHODEN.....</b>	<b>44</b>
4.1 Mikrobiologische Techniken.....	44
4.1.1 Herstellung kompetenter Zellen .....	44
4.1.2 Transformation.....	44
4.1.3 Herstellung von Glycerolkulturen .....	45
4.1.4 Ermittlung der Transformationseffizienz.....	45
4.2 Zellkulturtechniken.....	46
4.2.1 Präparation der Fibroblastenzellen.....	46

4.2.2	Expandieren der präparierten Fibroblastenzellen.....	47
4.2.3	Einfrieren der präparierten Fibroblastenzellen.....	48
4.2.4	Auftauen der Fibroblastenzellen.....	49
4.2.5	Inaktivieren der Fibroblastenzellen.....	49
4.2.6	Ausplattieren der inaktivierten Fibroblastenzellen.....	50
4.2.7	Auftauen der embryonalen Stammzellen.....	50
4.2.8	<i>Tryplaten</i> der embryonalen Stammzellen.....	51
4.2.9	Splitten der embryonalen Stammzellen.....	52
4.2.10	Stabile Transfektion von ES-Zellen.....	52
4.2.11	Selektion stabil transfizierter ES-Zellen mit Geneticin.....	53
4.2.12	Picken der selektierten ES-Zellklone.....	54
4.2.13	Expansion der gepickten ES-Zellklone.....	54
4.2.14	Einfrieren der gepickten Klone.....	55
4.2.15	Lysieren der ES-Zellklone.....	56
4.2.16	Präparation der genomischen DNA.....	56
4.2.17	Transiente Transfektion von ES-Zellen.....	56
4.2.18	Injektion der ES-Zellen in Blastozysten.....	57
4.3	Molekularbiologische Techniken.....	58
4.3.1	PCR.....	58
4.3.2	Präparation von Plasmid-DNA.....	59
4.3.3	Reinigung und Fällung von Plasmid-DNA.....	60
4.3.4	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA.....	60
4.3.5	Restriktionsverdau von Genomischer-DNA.....	60
4.3.6	Linearisierung des <i>targeting</i> Vektors.....	61
4.3.7	Phenol/Chloroform-Extraktion.....	61
4.3.8	Test der <i>loxP-sites</i> .....	62
4.3.9	DNA-Elektrophorese, bzw. Agarose-Gelelektrophorese.....	63
4.3.10	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	63
4.3.11	Herstellung eines <i>DNA-templates</i> .....	63
4.3.12	Radioaktive Markierung von DNA.....	64
4.3.13	Southern Blot.....	64
4.3.14	Prähybridisierung und Hybridisierung.....	65
4.3.15	DNA-Sequenzierung.....	66
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>67</b>
5.1	Konstruktion des konditionalen <i>pconKO-arg3.1 targeting</i> Vektors.....	67
5.1.1	Entwurf des konditionalen <i>targeting</i> Vektors.....	67
5.1.2	Beschreibung des konditionalen <i>targeting</i> Vektors.....	68
5.1.3	Überprüfung des <i>targeting</i> Vektors durch Sequenzierung.....	70
5.1.4	Beschreibung der <i>Screening</i> -Strategien zur Detektion homologer und Cre-vermittelte Rekombinationen.....	70
5.2	Herstellung von konditionalen Arg3.1-Knockout-Mäusen.....	74
5.2.1	Die homologe Rekombination.....	74
5.2.2	Die Cre-vermittelte Rekombination.....	76
5.2.3	Blastozysteninjektion und Genotypisierung der F1-Generation.....	78
5.2.4	Umklonierung des <i>targeting</i> Vektors.....	83
5.2.5	Funktionalitätstest der <i>loxP</i> -Sequenzen und Überprüfung des strukturellen Aufbaus des <i>targeting</i> Vektors.....	85
5.2.6	Erneute homologe Rekombination.....	86
<b>6</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>88</b>
6.1	Der klassische Arg3.1-Knockout mit einer geringen Penetranz der Nullmutanten.....	88

---

6.2	Herstellung des konditionalen <i>targeting</i> Vektors pconKO-arg3.1 und Etablierung eines konditionalen Mausmodells für Arg3.1 .....	90
6.2.1	Das Cre/loxP-Rekombinase System erlaubt die Generation zelltypspezifischer und zeitlich begrenzter somatischer Mutationen in der Maus..	92
6.3	Die Grenzen der Cre-Expressionskontrolle .....	94
6.4	Die Typl-Deletion als Ausgangspunkt für die Herstellung eines kompletten Knockouts.....	96
6.5	Ausblick .....	97
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>99</b>
<b>8</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>101</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>124</b>

## Abkürzungsverzeichnis

+/+	Wildtyp in Bezug auf das genannte Gen
+/-	heterozygot in Bezug auf das genannte Gen
-/-	<i>Knock-out</i> in Bezug auf das genannte Gen
Amp	Ampizillin; ein Antibiotikum
Arg3.1	<i>activity regulated gene</i> , 3.1 kb
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA, die bei der reversen Transkription von RNA entsteht
cGMP	zyklisches Adenosintriphosphat
CIP	Alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm
CMV	Zytomegalievirus
cpm	Zerfälle pro Minute als Maß für Radioaktivität
Cre	<i>Causes recombination</i> , P1-Bakteriophage
C-Terminus	Carboxyterminus
D	Dalton, ein Zwölftel der Masse eines <sup>12</sup> C-Atom
DEPC	Diethylpyrocarbonat; wird benötigt, um Wasser RNase-frei zu machen
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	beliebiges 2'-Desoxy-Nukleosid-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Chelator von divalenten Kationen
EtOH	Ethanol
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
FCS	fötale Kälberserum
g	Gramm bzw. Normal-Fallbeschleunigung (9,81 m/ s)
GABA	γ-Aminobuttersäure
HsDNA	Heringssperma-DNA
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KO	<i>Knock-out</i> ; das betreffende Gen außer Funktion gesetzt
LB	Luria Broth, ein Bakterienmedium
LTP	Langzeitpotenzierung
LTD	<i>long term depression</i>
M	molar
m	mili
min	Minuten
μ	mikro
mEPSC	exzitatorische postsynaptische Miniatur-Ströme
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
n	nano bzw. Anzahl
neo	Neomycin-Resistenzgen
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
N-Terminus	Aminoterninus
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonukleas
rpm	Rotations per minute
sec	Sekunde
SDS	Natrium-Dodecylsulfat, ein Detergens
Std	Stunde

---

TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer; ein Elektrophoresepuffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> , thermophiler Bakterienstamm
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tet	Tetrazyklin; ein Antibiotikum
TRE	( <i>tet responsive element</i> ) durch tTA induzierbarer Minimal-Promoter
Tris	Trishydroxymethylaminoethan; eine Puffersubstanz
tTA	ein unter Tetrazyklin-Kontrolle stehender Transaktivator ( <i>tetracycline-responsive transcriptional activator</i> ) für das <i>Tet-Off</i> -Expressionssystem
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Unit	„Einheit“; Mengenangabe bei Enzymen
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
ZMNH	Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg
ZNS	Zentrales Nervensystem

## **1 Einleitung**

Die Plastizität des Gehirns ermöglicht es dem Organismus, auf Veränderungen der Umwelt zu reagieren. Neue Eindrücke werden in ein bereits vorhandenes Informationsnetz eingeflochten. Verhaltensweisen werden moduliert, und Erfahrungen über die Abbildung der Welt gespeichert, um bei Bedarf abgerufen zu werden. Die zellulären Voraussetzungen für die Bewältigung dieser Aufgaben finden sich in der morphologischen und funktionellen Plastizität der synaptischen Verbindungen zwischen Nervenzellen. Veränderungen des neuronalen Netzes als Reaktion auf externe Stimuli werden während der Ontogenese und bei Lern- und Gedächtnisprozessen beobachtet, wobei ähnliche molekulare Mechanismen von synaptischer Plastizität bei Insekten, Mollusken und Vertebraten bestehen. Die exzessive Aktivierung solcher Mechanismen, zum Beispiel während epileptischer Anfälle, führt zu pathologischen Veränderungen der neuronalen Strukturen. Erkenntnisse über die zugrundeliegenden Vorgänge werden das Verständnis von Entwicklung, Funktion und Krankheit des Gehirns wesentlich erweitern.

### **1.1 Aktivitätsabhängige synaptische Plastizität während der Entwicklung des Nervensystems**

Während der Ontogenese des menschlichen Gehirns werden  $10^{11}$  Nervenzellen angelegt, die über  $10^{14}$  Synapsen untereinander in Verbindung stehen. Die Information für die präzise Verknüpfung einer so großen Zahl von Synapsen wird jedoch von nur 30.000 proteinkodierenden Genen (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001) im gesamten Genom bereitgestellt. Daraus folgt, daß epigenetische Prozesse eine entscheidende Rolle bei der Vernetzung des zentralen Nervensystems

---

spielen müssen. In der frühen Embryonalentwicklung ist zunächst eine beträchtliche Überproduktion an Nervenfasern und Synapsen zu beobachten, die einen genetisch festgelegten, groben Grundbauplan des Gehirns ausbilden. Die anschließende Etablierung der exakten neuronalen Verknüpfungen erfolgt über den Abbau überschüssiger Axonkollateralen, die Elimination von Synapsen und die Konsolidierung von „korrekten“ Verbindungen (O’Leary, 1992). Das Wechselspiel zwischen Wachstum und Regression von synaptischen Verbindungen wird durch die Aktivität der Nervenzellen gesteuert. Man spricht deshalb von aktivitätsabhängiger neuronaler Plastizität.

Der kanadische Psychologe Donald O. Hebb entwickelte 1949 eine Theorie zur Netzbildung, nach der Zellen, die koinzident aktiv sind, ihre synaptischen Verbindungen verstärken (Hebb, 1949). Das Hebb’sche Postulat ist im modernen angelsächsischen Sprachgebrauch auf den Punkt gebracht: “Fire together, wire together”. Bei der Ausbildung von Okulardominanzkolumnen im visuellen Cortex der Katze wurden diese plastischen Veränderungen der neuronalen Verknüpfung intensiv untersucht (Wiesel, 1982; Goodman und Shatz, 1993).

Die Sehbahn ist so angelegt, daß Sehinformationen aus der Retina des Auges über das Corpus geniculatum laterale in den primären visuellen Cortex (Area 17) gelangen. Durch die Injektion eines transneuronal transportierbaren Farbstoffes in ein Auge läßt sich während der frühen Entwicklung eine Innervierung der gesamten Schicht IV in Area 17 darstellen. Während einer anschließenden kritischen Entwicklungsperiode entstehen Kolumnen von Neuronen in Schicht IV, die primär durch Reizung eines Auges aktiviert werden (Okulardominanzkolumnen). Durch Lidverschluß kann die Aktivität eines Auges während dieser kritischen Periode unterbunden werden. Durch anschließende elektrophysiologische Messungen kann gezeigt werden, daß nach der Deprivation größere Teile des visuellen Cortex auf die Reizung des während der kritischen Periode offenen Auges reagieren. Das Phänomen der unilateralen Dominanz wird damit erklärt, daß die aktiveren Fasern aus dem offenen Auge eine höhere

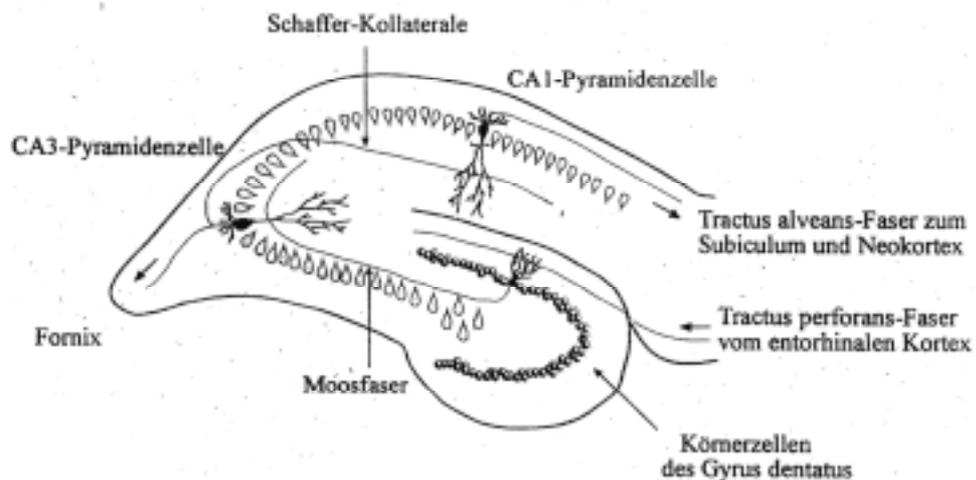
---

Wahrscheinlichkeit hatten, koinzident mit den postsynaptischen Zellen aktiv zu sein und dadurch ihre Synapsen in Schicht IV konsolidieren konnten. Bereits eine Woche nach Verschuß eines Auges kann durch Injektion von anterograden Tracern in Schichten des Corpus geniculatum laterale, die vom deprivierten Auge innerviert werden, eine massive Retraktion der Axonbäume in Schicht IV des visuellen Cortex nachgewiesen werden (Antonini und Stryker, 1993). Somit bewirkt die korrelierte Aktivität von prä- und postsynaptischen Elementen eine Stabilisierung der synaptischen Verbindungen, wohingegen nicht korrelierte Aktivität zur Regression von Synapsen führt. Eine vergleichbare, mit hoher synaptischer Plastizität einhergehende kritische Periode findet sich ebenfalls bei anderen Modalitäten in cortikalen Arealen, wie beispielsweise dem auditorischen, somatosensorischen oder motorischen Cortex (Sanes und Constantine-Patton, 1985; O’Leary *et al.*, 1994; Walton *et al.*, 1992). Am Ende der kritischen Periode, nachdem eine präzise Verknüpfung von Nervenzellen etabliert ist, kommt es zu einer starken Reduktion der synaptischen Plastizität. Man weiß heute, daß plastische Veränderungen der neuronalen Verbindungen nicht auf die Entwicklung beschränkt sind, sondern, daß es auch im adulten Tier physiologische und pathologische Prozesse gibt, die einen Umbau der synaptischen Strukturen bewirken.

## **1.2 Aktivitätsabhängige synaptische Plastizität im adulten Gehirn**

Der zu den archikortikalen Gehirnstrukturen zählende Hippocampus, weist ein hohes Maß an synaptischer Plastizität auf. Neben dessen wichtigen Funktionen bei der Überführung von Informationen in das Langzeitgedächtnis (Milner, 1968) ist der Hippocampus an der Auslösung von Temporallappen-Epilepsien beteiligt (McNamara, 1994). Den hauptsächlichen “Input” erhält der Hippocampus durch die Tractus perforans-Fasern vom entorhinalen Cortex, der wiederum vom gesamten

Assoziationscortex innerviert wird. Die eingehenden Informationen projizieren, nach Durchlaufen des trisynaptischen Schaltkreises des Hippocampus, zurück in den Neocortex sowie über das angrenzende Subiculum in die Amygdala (Kandel *et al.*, 1991). Die Neuronen des Hippocampus bilden ein assoziatives Netzwerk für die temporäre Speicherung einer großen Zahl von Erregungsmustern, die anschließend bei der Konsolidierung von Gedächtnisspuren in den Neocortex übertragen werden (Skaggs und McNaughton, 1992). Die folgende Abbildung (Abb. 1.1) zeigt die schematische Darstellung des trisynaptischen Schaltkreises im Hippocampus.



**Abb1.1 Der trisynaptische Schaltkreis des Hippocampus**

Der Hippocampus als archicortikale Struktur spielt eine wesentliche Rolle bei bestimmten Formen des Lernens. Die afferenten Fasern treten zum größten Teil über den Tractus perforans und zu einem geringeren Anteil über den Alveus in das Ammonshorn ein. Sie enden an den Dendritenverzweigungen der Pyramidenzellen. Ein Teil der Fasern zieht zu den Körnerzellen des Gyrus dentatus, deren Axone als Moosfasern ebenfalls mit den Dendriten der Pyramidenzellen synaptische Kontakte haben. Moosfasern ziehen allerdings nur durch die Felder CA3 und CA4. Sie fehlen in den Feldern CA1 und CA2. Die Pyramidenzellen sind die efferenten Elemente, deren Axone sich im Alveus sammeln und die Hippocampus-Rinde verlassen. Von den Axonen gehen rückläufig Kollaterale ab, die Schaffer-Kollateralen, welche die Dendritenbäume zahlreicher Pyramidenzellen durchlaufen (Abbildung nach Konietzko, 1997).

Die molekularen Vorgänge, die der Induktion von aktivitätsabhängiger Plastizität zugrundeliegen, sind bei der Langzeitpotenzierung (LTP, long-term potentiation) der synaptischen Übertragungseffizienz im Hippokampus am gründlichsten untersucht worden. Dieses von Tim Bliss 1973 zum ersten Mal beschriebene Phänomen (Bliss

und Lomo, 1973) folgt den Regeln, die Donald Hebb für assoziative Lern- und Gedächtnisprozesse postuliert hat und wird als zelluläres Modell für die Ausbildung von Langzeitgedächtnis angesehen (Bliss und Collingridge, 1993).

Nach einer kurzen, hochfrequenten Reizung der präsynaptischen Tractus perforans-Fasern ist die Effizienz der exzitatorischen synaptischen Signalübertragung auf die nachgeschalteten Körnerzellen im Gyrus dentatus über mehrere Tage erhöht (LTP). Wie von Hebb gefordert wurde, wird die Potenzierung der synaptischen Transmission durch koinzidente prä- und postsynaptische Aktivität induziert. Als molekularer Koinzidenzdetektor wurde der NMDA-Subtyp von Glutamat-Rezeptoren identifiziert (Herron *et al.*, 1986). Ein  $Mg^{2+}$ -Ionen-Block des NMDA-Rezeptor-Ionenkanals (Mayer *et al.*, 1984) bewirkt, daß zusätzlich zur Glutamat-Bindung (präsynaptische Aktivität) das Membranpotential stark depolarisiert werden muß (postsynaptische Aktivität), um das  $Mg^{2+}$ -Ion aus dem Kanal zu entfernen und ihn so zu öffnen. Der darauf folgende  $Ca^{2+}$ -Einstrom in die Postsynapse gilt als Voraussetzung für die Induktion der LTP (Malenka *et al.*, 1992), wodurch nach einer komplexen molekularen Kaskade die synaptische Effizienzverstärkung entsteht. Die Potenzierung der synaptischen Transmission, welche sofort nach der hochfrequenten Reizung einsetzt, erfolgt über die kovalente Modifizierung von bereits vorhandenen Proteinen. Ein wichtiger Signaltransduktionsweg geht dabei über die  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) (Malinow *et al.*, 1989). Der Einstrom von  $Ca^{2+}$ -Ionen durch NMDA-Rezeptoren führt zur Aktivierung und Autophosphorylierung der CaMKII, die daraufhin, wie ein molekularer Schalter, konstitutiv aktiv ist. Durch die Aktivität der CaMKII kommt es zur Phosphorylierung von synaptischen AMPA-Rezeptoren, dem Glutamat-Rezeptor-Subtyp, der für den Großteil des exzitatorischen postsynaptischen Stromes (EPSC) verantwortlich ist (Barria *et al.*, 1997). Die nach der Phosphorylierung erhöhte Glutamat-Sensitivität der AMPA-Rezeptoren ist ein wichtiger Mechanismus, um die synaptische Übertragung zu verstärken. Unterstützt

wird dieser Mechanismus durch die erhöhte präsynaptische Freisetzung von Glutamat (Dolphin *et al.*, 1982). Hierfür werden retrograde Botenstoffe postuliert (Stickstoffmonoxid, NO; Platelet-activating factor, PAF) (Arancio *et al.*, 1996; Kato *et al.*, 1994), die nach der Induktion von LTP durch die Aktivierung der postsynaptischen NMDA-Rezeptoren ein Signal zur Präsynapse übermitteln. Es kommt daraufhin zu kovalenten Modifikationen verschiedener Komponenten, die wiederum die Neurotransmitter-Freisetzung in den synaptischen Spalt steuern.

Bei beiden Szenarien, einem post- oder präsynaptischen Expressionsort für LTP, kommt es zur posttranslationalen Modifikation von vorliegenden Proteinen. Aufgrund der begrenzten Lebensdauer von Proteinen müssen für eine über Wochen anhaltende Verstärkung der synaptischen Effizienz zusätzliche Mechanismen gefordert werden. In Experimenten mit hippocampalen Dünnschnitten konnte gezeigt werden, daß bei Blockierung der Transkription durch Actinomycin D (Nguyen *et al.*, 1994; Frey *et al.*, 1996a; Nguyen und Kandel, 1997) oder der Proteinbiosynthese durch Anisomycin (Frey *et al.*, 1988) die Potenzierung der synaptischen Übertragung nach drei Stunden wieder auf Kontrollniveau abgesunken ist. Das bedeutet, daß es für die langfristige Aufrechterhaltung von LTP zu einer *de novo* Synthese von Proteinen kommen muß. Welche Funktion haben diese Proteine ?

Die Induktion von LTP *in vivo* oder im Gehirndünnschnitt resultiert in morphologischen Veränderungen der potenzierten synaptischen Verbindungen. Der überwiegende Teil der exzitatorischen glutamatergen Synapsen im ZNS befindet sich auf Dornfortsätzen der Dendriten (Harris und Kater, 1994). Die Dornen sind röhren- bis pilzförmige Ausstülpungen der dendritischen Membran, die eine elektronenmikroskopisch erkennbare postsynaptische Verdickung aufweisen, in welcher die Glutamatrezeptoren sowie akzessorische Proteine, wie zum Beispiel CaMKII, lokalisiert sind. Die Dornen stellen von den Dendriten abgegrenzte Kompartimente für die Speicherung von  $Ca^{2+}$ -Ionen dar (Koch und Zador, 1993) und erlauben andererseits den ungehinderten Stromfluß von den Synapsen in die

Dendriten. Die Kompartimentierung ermöglicht, daß nach hochfrequenter Reizung einer Synapse der  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg und Teile der resultierenden Signalkaskade auf den aktivierten Dorn beschränkt bleibt.

In elektronenmikroskopischen Analysen konnte nachgewiesen werden, daß es nach Induktion von LTP zu morphologischen Veränderungen in der Anzahl und der Form der synaptischen Dornfortsätze kommt (Lee *et al.*, 1980; Buchs und Muller, 1996; Geinisman *et al.*, 1996; Trommald *et al.*, 1996; Engert und Bonhoeffer, 1999). Die Veränderung in der Morphologie, läßt sich durch Vergrößerungen der postsynaptischen Verdickung und durch die Neubildung von Dornsynapsen erklären. Das würde bedeuten, daß das zelluläre Modell für die Ausbildung von Langzeitgedächtnis auf einer Neuverdrahtung des neuronalen Netzwerkes beruht. Ebenfalls konnte ein Anstieg der Dichte an Dornfortsätzen bei Ratten gemessen werden, die in einem Verhaltensversuch das räumliche Orientierungsvermögen trainiert hatten (Moser *et al.*, 1994). Ähnliche morphologische Veränderungen wurden schon bei der Etablierung der präzisen neuronalen Verknüpfungen während der Entwicklung beobachtet, was auf grundlegende Mechanismen aktivitätsabhängiger Plastizität schließen läßt, die in der Ontogenese wie auch im adulten Tier wirksam sind.

Die Beteiligung LTP-artiger Prozesse bei der Konsolidierung von Gedächtnisinhalten wurde in einer Vielzahl von Lernexperimenten untersucht. Der Hippocampus hat unter anderem eine wichtige Aufgabe bei der Ausbildung des räumlichen Orientierungsvermögens (Morris *et al.*, 1982). Durch eine Blockade der LTP-Induktion, unter Applikation von NMDA-Antagonisten, kann eine Ausbildung des Raumgedächtnisses nicht mehr vollzogen werden (Morris *et al.*, 1986). Eine maximale Induktion von LTP in den Tractus perforans-Körnerzellsynapsen *in vivo* über Reizelektroden zeigte bei den Tieren nach "Sättigung" der synaptischen Potenzierung ein deutliches Defizit in Lernexperimenten, die räumliche Assoziationen erforderten (McNaughton *et al.*, 1986; Barnes *et al.*, 1994). In einem weiteren Ansatz konnte eine

---

konditionale Knockout-Maus für das NMDA-Rezeptor1-Gen hergestellt werden. Durch gezielte Induktion kam es ausschließlich in adulten Tieren, und lokal auf die CA1-Region des Hippocampus begrenzt, zu einer Deletion des entsprechenden Gens (Tsien *et al.*, 1996a). Die Knockout-Tiere weisen einen charakteristischen Phänotyp auf, mit einem nicht induzierbarem LTP in der CA1-Region, und einem bestehenden Defekt des Raumgedächtnisses (Tsien *et al.*, 1996b).

Diese Experimente deuten darauf hin, daß LTP-artige Mechanismen der Gedächtnisbildung zugrunde liegen. Um diese Vermutung beweisen zu können, müßten synaptische Potenzierungen während eines Lernprozesses direkt gemessen werden. Die geringe Spontanaktivität der Neurone des Hippocampus stellt einerseits die Voraussetzung für dessen große Speicheraktivität dar (Skaggs und McNaughton, 1992), verringert andererseits die Wahrscheinlichkeit, die an den Lernprozessen beteiligten synaptischen Verbindungen mit einer Meßelektrode detektieren zu können. Daß Meßexperimente in anderen Gehirnarealen durchführbar sind, zeigte sich bei der Angst-Konditionierung von akustischen Signalen, wobei die Assoziation von Tönen mit einem Angst auslösendem Stimulus in der Amygdala erfolgte. Durch Stimulierung des für die Vermittlung der akustischen Signale verantwortliche Corpus geniculatum mediale kam es zu einem evozierten Potential in der Amygdala. Die Applikation hochfrequenter Stimuli wie auch die Potenzierung von akustisch ausgelösten Potentialen führt zu einer Langzeitpotenzierung der evozierten Potentiale in der Amygdala (Rogan und LeDoux, 1995). Eine Potenzierung der evozierten Potentiale ist ebenfalls nach einer klassischen Konditionierung im Verhaltensexperiment meßbar (Rogan *et al.*, 1997a). Die Beteiligung eines LTP-artigen Prozesses bei unterschiedlichen assoziativen Lernexperimenten, die verschiedene Gehirnareale beanspruchen, deutet auf die grundlegende Rolle der Langzeitpotenzierung bei der Ausbildung von Gedächtnisinhalten hin.

Durch die exzessive Stimulierung neuronaler Schaltkreise während epileptischer Anfälle werden aktivitätsabhängige Prozesse in Gang gesetzt, die auch bei

---

physiologischer Reizung aktiviert werden. Die auch in Deutschland noch häufig eingesetzte elektrokonvulsive Therapie (Naguib und Koorn, 2002) für die Behandlung von schweren Depressionen und katatonen Schizophrenien resultiert in kurzfristigen Gedächtnisstörungen der Patienten. Bei Ratten wird durch eine elektrokonvulsive Stimulierung eine LTP-artige Verstärkung der synaptischen Effizienz induziert (Stewart *et al.*, 1994) und durch hochfrequente Reizung eine weitere Potenzierung blockiert (Barnes *et al.*, 1994). Da die Potenzierung nach elektrokonvulsiver Stimulierung, ebenso wie LTP, durch NMDA-Rezeptor-Antagonisten blockiert werden (Stewart und Reid, 1994), kann auch zur Unterdrückung der progressiven Entwicklung von epileptischer Aktivität in hippocampalen Dünnschnitten auf antagonistisch wirkende Substanzen zurückgegriffen werden (Stasheff *et al.*, 1989). Ähnliche zelluläre Prozesse werden offensichtlich durch physiologische sowie pathologische neuronale Aktivität induziert. In einem Modell der Temporallappen-Epilepsie werden nach starker neuronaler Aktivität im Hippocampus plastische Veränderungen in den Körnerzellen des Gyrus dentatus induziert (Lynch *et al.*, 1996). Es kommt zum Auswachsen von Körnerzell-Axonen, den Moosfasern, die in ihrem physiologischen Projektionsgebiet in der CA3-Region, aber auch in normal nicht innervierten Regionen im Stratum molekulare des Gyrus dentatus, exuberante Synapsen bilden (Parent und Lowenstein, 1997). In einer Studie konnte gezeigt werden, daß sich nach Ablauf eines epileptischen Anfalls die Neurogenese der Körnerzellen erhöht hat (Parent *et al.*, 1997). Dieses erstaunliche Maß an adulter neuronaler Plastizität konnte auch nach physiologischer Reizung detektiert werden. So zeigten beispielsweise adulte Ratten, die für 40 Tage einer komplexen Umgebung ausgesetzt wurden, eine verringerte Apoptose, bzw. ein erhöhtes Überleben von neu gebildeten Zellen (Kempermann *et al.*, 1997). Wiederum wird ersichtlich, daß ähnliche Mechanismen aktivitätsabhängiger Plastizität bei der Entwicklung, Funktion und Erkrankung des Gehirns eine Rolle spielen. Die Aufrechterhaltung, der in hippocampalen Dünnschnitten induzierten epileptischen Zustände, können durch

Proteinsyntheseinhibitoren blockiert werden (Jones *et al.*, 1992). Es liegt also allen aktivitätsabhängigen plastischen Veränderungen eine *de novo* Synthese von Proteinen zugrunde. Die Identifizierung und Charakterisierung dieser neu synthetisierten Proteine ist deshalb für das detaillierte Verständnis der molekularen Mechanismen der Plastizität von großem Interesse.

### **1.3 Die Transkription von aktivitätsregulierten, unmittelbar früh exprimierten Genen**

Nach erfolgter Induktion von LTP, kommt es bereits wenige Stunden später zu strukturellen Veränderungen an den Dornsynapsen (Lee *et al.*, 1980; Hosokawa *et al.*, 1995; Buchs und Muller, 1996). Aufgrund der schnellen morphologischen Veränderungen, gilt den unmittelbar früh induzierten Genen (IEG, *i*mmediate *e*arly *g*ene), deren Transkriptionsrate durch neuronale Aktivität reguliert wird, ein besonders starkes Interesse. Die Regulation der Transkription dieser Gene ist unabhängig von neuer Proteinsynthese, da nach hochfrequenter Aktivierung der Synapsen Signaltransduktionkaskaden in Gang gesetzt werden, die in der Aktivierung von bereits existierenden Transkriptionsfaktoren resultieren.

Ein intensiv untersuchter Transduktionsweg führt über eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-aktivierte Adenylatzyklase zur Bildung von cAMP und so zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Die katalytische Untereinheit der PKA transloziert in den Nukleus, wo sie den Transkriptionsfaktor CREB (*c*AMP *r*esponse *e*lement *b*inding protein) phosphoryliert und damit aktiviert (Deisseroth *et al.*, 1996; Impey *et al.*, 1996; Abel *et al.*, 1997). Durch Bindung an das CRE-Element im Promoter eines Zielgens führt CREB zu dessen transkriptioneller Aktivierung. Die durch koinzidente neuronale Aktivität erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Dornsynapsen führt so zur Regulation der Genexpression im Zellkern. Aus Versuchen mit der Meeresschnecke

---

*Aplysia californica* konnten die ersten Hinweise auf die fundamentale Bedeutung dieses Transkriptionsfaktors für Lern- und Gedächtnisprozesse gewonnen werden. Durch eine kompetitive Hemmung der CRE-Elemente wurde eine Blockade der *long-term-facilitation*, einer nicht assoziativen Form des Lernens, herbeigeführt (Dash *et al.*, 1990).

Durch die Inhibition des CREB-Antagonisten CREB2 wird hingegen die Induktion von *long-term-facilitation* in *Aplysia* erleichtert (Bartsch *et al.*, 1995). In *Drosophila* führt die Expression des CREB-Repressors dCREB2-b zur Blockade des Langzeitgedächtnis (Yin *et al.*, 1994). Knockout-Mäuse, bei denen die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten des CREB-Gens deletiert waren, zeigten ein defizientes Langzeitgedächtnis (Bourtchuladze *et al.*, 1994). Die hochgradige Konservierung dieser Signalkaskaden in verschiedenen Phyla verdeutlicht ihre herausragende Rolle bei der Gedächtnisbildung.

Zudem sind weitere Signalwege von der Synapse zum Zellkern bereits entschlüsselt worden. So führt der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  durch NMDA-Rezeptorkanäle zur Ras-Raf vermittelten Aktivierung von MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Xia *et al.*, 1996). Wie  $\text{Ca}^{2+}$ , so führt auch cAMP über PKA zur Aktivierung des MAPK-Pfades (Vossler *et al.*, 1997; Impey *et al.*, 1998). PKA vermittelt dabei neben der Aktivierung auch die Translokation von MAPK in den Zellkern (Impey *et al.*, 1998). Die MAPK phosphoryliert Transkriptionsfaktoren und weitere zwischengeschaltete Kinasen, welche wiederum Transkriptionsfaktoren regulieren. Die pharmakologische Blockierung der MAPK im hippokampalen Dünnschnitt unterbindet die Aufrechterhaltung von LTP (English und Sweatt, 1997).

Sowohl bei dem PKA/CREB- wie auch bei dem MAPK-Signalweg ist eine Kaskade von Molekülen beteiligt, die in der Phosphorylierung und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren kulminieren. Eine andere Art der Signalübermittlung in den Zellkern ist bei dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor- $\kappa$ B) realisiert. Elektronenmikroskopische Analysen zeigten, daß NF- $\kappa$ B an der postsynaptischen

---

Verdickung lokalisiert ist, gebunden an den Inhibitor I $\kappa$ B (Suzuki, 1996). Durch Stimulierung einer I $\kappa$ B-Kinase kommt es zur Phosphorylierung und Degradation von I $\kappa$ B (DiDonato *et al.*, 1997). Der freigesetzte Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B transloziert daraufhin in den Kern, um die Transkription von Genen zu steuern. Über die NF- $\kappa$ B induzierte Transkription der NF- $\kappa$ B-Untereinheiten p50 und p65 wurde indirekt die Aktivierung dieses Transduktionsweges nach Induktion von LTP nachgewiesen (Meberg *et al.*, 1996). Weiterhin wurde gezeigt, daß die postulierten retrograden Botenstoffe NO und PAF die Genexpression beeinflussen. NO verstärkt die CREB-regulierte Expression von Genen (Peunova und Enikolopov, 1993), und PAF induziert die Expression von unmittelbar frühen Genen über einen noch nicht näher charakterisierten, intrazellulären Rezeptor (Bazan und Allan, 1996). Diese Ergebnisse dokumentieren eine Reihe von Signaltransduktionswegen, deren Zusammenspiel die Expression von Genen nach neuronaler Aktivität reguliert.

#### 1.4 Unmittelbar früh exprimierte Gene mit Effektorfunktion

Zu den bereits identifizierten aktivitätsregulierten, unmittelbar früh exprimierten Genen gehören Transkriptionsfaktoren wie *c-fos*, *c-jun*, *jun-B*, *zif/268*, *Krox-20* und *nur-77* (Morgan *et al.*, 1987; Dragunow *et al.*, 1996). Eine Stunde nach einem experimentell ausgelösten epileptischen Anfall ist die Transkription dieser Gene stark erhöht, um nach wenigen Stunden wieder auf Kontrollniveau abzusinken. Auch nach der Induktion von LTP kommt es zur transient erhöhten Expression dieser Transkriptionsfaktoren, wobei für die verschiedenen Faktoren unterschiedliche Aktivitätsschwellen für die Induktion bestehen (Cole *et al.*, 1989; Worley *et al.*, 1993; Abraham *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1995). Anhand der Langlebigkeit der Potenzierung der synaptischen Übertragung wird die späte Phase von LTP aufgeteilt: LTP2 besitzt eine mittlere Abklingzeit von vier Tagen und LTP3 von 23 Tagen.

Wählt man die Induktionsbedingungen so, daß ausschließlich LTP2 induziert wird, ist nur die Expression von *zif/268* transient erhöht. Die Induktion des Transkriptionsfaktors *zif/268* korreliert stark mit plastischen Veränderungen der synaptischen Strukturen. Er wird induziert, wenn Ratten mit einer komplexen Umgebung konfrontiert werden (Wallace *et al.*, 1995), und die Transkriptmengen im visuellen Cortex während der kritischen Periode maximal erhöht sind (McCormack *et al.*, 1992).

Die unmittelbar frühe Expression von Transkriptionsfaktoren nach der Induktion von synaptischer Plastizität ermöglicht die Transkription einer Vielzahl von späten Genen, die für die strukturellen Veränderungen benötigt werden. Zusätzlich wurden unmittelbar früh exprimierte Gene identifiziert, die nicht für Transkriptionsfaktoren kodieren, sondern für Proteine, die eine Effektorfunktion außerhalb des Zellkerns ausüben. Zu diesen, nach LTP induzierten, unmittelbar frühen Genen zählt der Gewebs-Plasminogen-Aktivator (t-PA) (Qian *et al.*, 1993), eine Mitogen-induzierbare Cyclooxygenase (Cox-2) (Yamagata *et al.*, 1993), ein GTP-bindendes Protein (*rheb*) (Yamagata *et al.*, 1994), ein Wachstumsfaktor (BDNF) (Lauterborn *et al.*, 1996), Homer, ein Ankerprotein für metabotrope Glutamatrezeptoren (Brakeman *et al.*, 1997), und Narp, ein Protein, das AMPA-Rezeptoren aggregiert (O'Brien *et al.*, 1999). In unserem Labor wurden die Proteine Arg3.1 (activity-regulated gene 3.1), ein Protein mit unbekannter Funktion, dessen Transkript eine somato-dentritische Lokalisation aufweist (Link *et al.*, 1995; Lyford *et al.*, 1995), sowie die Kinasen Pim-1, FNK und SNK, die für die Konsolidierung von LTP notwendig zu sein scheinen (Konietzko *et al.*, 1999; Kauselmann *et al.*, 1999) identifiziert. Für einige der identifizierten Gene ist eine direkte Funktion für den Umbau der synaptischen Strukturen ableitbar. Die Aktivierung der extrazellulären Protease Plasminogen durch die sezernierte Serin-Protease t-PA unterstützt den Gewebeumbau bei plastischen Vorgängen (Qian *et al.*, 1993). Bei Mäusen, denen das t-PA-Gen deletiert wurde, führte ein Kainat-induzierter epileptischer Anfall nicht zu dem normalerweise

---

beobachteten Zelltod (Tsirka *et al.*, 1995). Offensichtlich ist eine Überaktivierung von extrazellulären Proteasekaskaden maßgeblich an der neuronalen Degeneration beteiligt. Eine physiologische Aktivierung des Cerebellums durch ein Training von komplexen motorischen Abläufen führte zur Induktion der t-PA-Expression in den Purkinje-Zellen (Seeds *et al.*, 1995). Dagegen war in hippocampalen Gehirnschnitten von Mäusen mit einer t-PA-Gen-Deletion nur eine modifizierte Form der Langzeitpotenzierung meßbar (Frey *et al.*, 1996b). Die wichtige Rolle proteolytischer Prozesse für die aktivitätsabhängigen morphologischen Veränderungen bei neuronaler Plastizität wurde durch die Identifizierung eines unmittelbar früh induzierten Metalloproteaseinhibitors (TIMP-1) weiter untermauert (Rivera *et al.*, 1997).

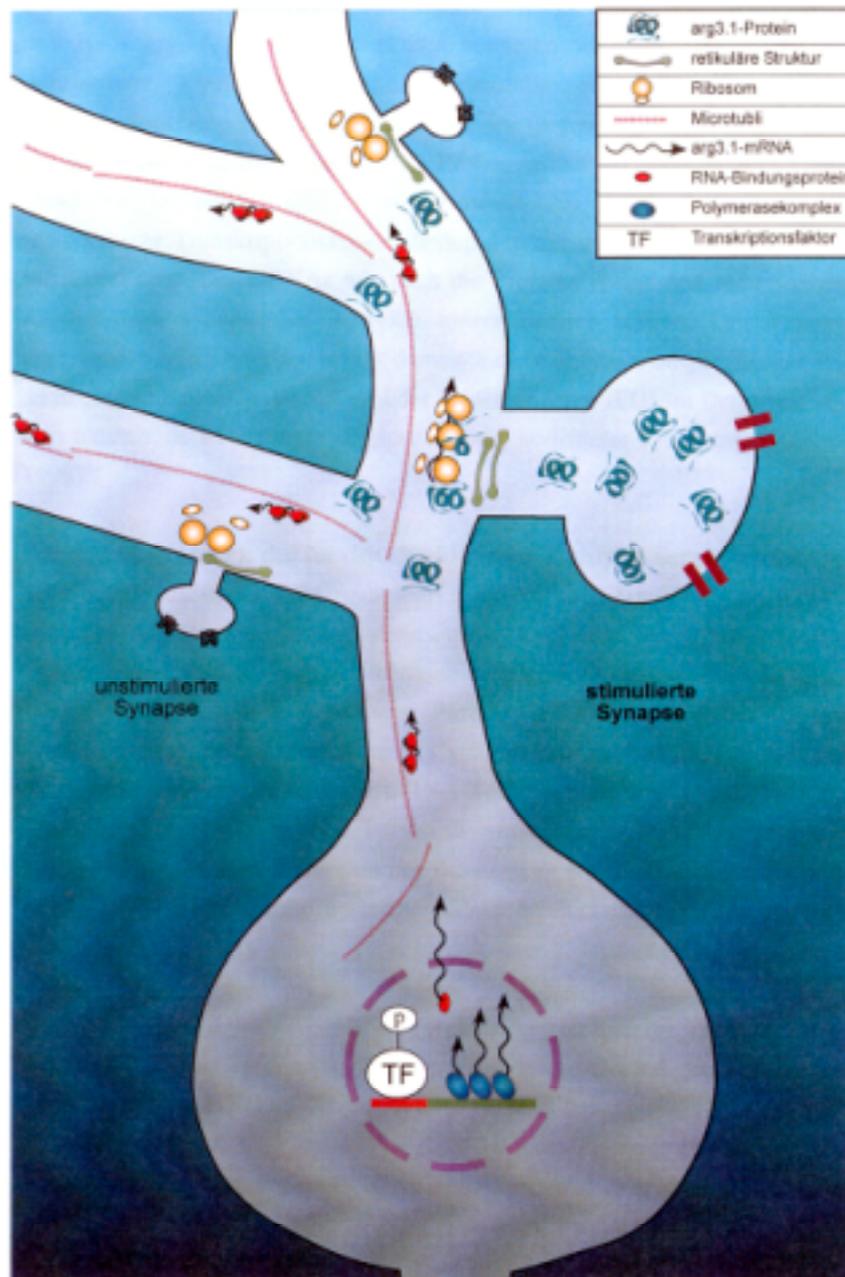
### 1.5 Arg3.1, ein durch synaptische Aktivität reguliertes Gen

In unserem Labor (und unabhängig von uns in dem Labor von Paul Worley an der John Hopkins Universität) wurde ein bislang unbekanntes unmittelbar frühes Gen, Arg3.1 genannt, im Säugetiergehirn entdeckt (Link *et al.*, 1995; Lyford *et al.*, 1995). Dieses aktivitäts-regulierte Gen erbrachte einen weiteren Aspekt aktivitätsabhängiger Plastizität. Ähnlich zu t-PA repräsentiert Arg3.1 ein frühes Effektor-Gen, das sehr schnell Veränderungen in den aktivierten Neuronen herbeiführen könnte. Arg3.1 ist entfernt mit  $\square$ -Spektrin verwandt (Link *et al.*, 1995), welches ein wesentlicher Bestandteil des unterhalb der Basalmembran liegenden Zytoskeletts ist (Bennett, 1985). Die Prozessierung von Gehirnspektrin durch Calcium-abhängige Proteasen an der postsynaptischen Membran wird als ein zentraler Mechanismus für LTP diskutiert (Seubert *et al.*, 1988; Siman und Noszek, 1988). Während die konstitutive Expression von Arg3.1 im Hippocampus relativ niedrig ist, ist sie in cortikalen Bereichen, besonders im visuellen Cortex verstärkt auffindbar. Im Cortex sind NMDA-Rezeptoren wesentlich an der normalen, erregenden synaptischen

---

Übertragung beteiligt. Die Tatsache, daß die Blockade des NMDA-Rezeptors zu einer erheblichen Reduktion der basalen Expression der Arg3.1-mRNA führt, läßt darauf schließen, daß die konstitutive Expression von Arg3.1 im Cortex durch natürliche vorkommende Aktivierung des NMDA-Rezeptors, z.B. durch visuelle Erfahrungen, verursacht wird. Synaptische Aktivität, die durch konvulsive epileptische Anfälle ausgelöst wurde, erhöht die Zahl der mRNA-Transkripte in Neuronen des Cortex und des Hippocampus dramatisch. Die Induktion war unabhängig von neuer Proteinsynthese, wie es für alle IEGs charakteristisch ist. Hochfrequente Reizung des perforanten Weges resultierte in LTP und einem räumlich begrenzten, starken Anstieg der Zahl von Arg3.1-mRNA-Transkripten in den Körnerzellen des Gyrus dentatus. Es war besonders auffallend, daß nach synaptischer Aktivität starke Hybridisierungssignale im Stratum molekulare des Gyrus dentatus beobachtet werden konnten. Diese Hybridisierungssignale zeigten eine Lokalisation der Arg3.1-mRNA in den Dendriten der Körnerzellen (Link *et al.*, 1995; Lyford *et al.*, 1995).

Bisher konnten nur wenige mRNAs identifiziert werden, die ihr Vorkommen in der dendritischen Lamina haben. Arg3.1 repräsentiert das erste Beispiel für ein Gen, dessen mRNA in den Dendriten lokalisiert ist und durch synaptische Aktivität reguliert wird. Die weitere Charakterisierung des dendritischen mRNA-Transports von Arg3.1 könnte die Frage beantworten, wie eine im Nukleus stattfindende transkriptionelle Aktivierung in der Lage ist, selektiv stimulierte Synapsen im entfernten dendritischen Kompartiment eines Neurons zu modifizieren. Vermutlich ist der dendritische Transport der Arg3.1-mRNA für die synapsenspezifische Plastizität nach induzierter Aktivität von großer Bedeutung (Kuhl und Skehel, 1998). In Abbildung 1.2 wurde modellartig dargestellt, wie ein solcher Transport und die synapsenspezifische Modifikation aussehen könnte.



**Abb. 1.2 Modell zur synapsenspezifischen Modifikation nach aktivitätsinduzierter Expression von Arg3.1**

Transsynaptische Aktivierung führt zu einem gerichteten Transport und Lokalisierung der Arg3.1-mRNA in den Dendriten. Die lokale Proteinsynthese an der stimulierten Synapse könnte zur synapsenspezifischen Modifikation beitragen. (Abb. modifiziert nach Kuhl und Skehel, 1998.)

Durch den Vergleich der drei IEGs Arg3.1, COX-2 und *zif/268* konnte bewiesen werden, daß der dendritische Transport nicht zufällig erfolgt. Das IEG COX-2 ist eine induzierbare Cyclo-Oxygenase, und ebenfalls ein Mitglied der nicht für

---

Transkriptionsfaktoren kodierenden IEGs. Im Gegensatz zu Arg3.1 ist die COX-2 mRNA nicht dendritisch, das COX-2 Protein jedoch ist wie das Arg3.1 Protein im Dendriten lokalisiert. *Zif/268* ist ebenfalls ein durch synaptische Aktivität induzierbarer Transkriptionsfaktor, dessen Protein und mRNA nicht im Dendriten lokalisiert sind. Die mRNA wie auch die Proteine dieser drei induzierbaren IEGs werden nach synaptischer Aktivität unterschiedlich sortiert. Der Transport von Arg3.1-mRNA in Dendriten beruht demnach nicht auf einer unspezifischen Diffusion, da in diesem Fall auch die mRNA der beiden anderen IEGs im Dendriten vorhanden sein müßten, es ist vielmehr ein spezifischer, gerichteter Transport (Wallace *et al.*, 1998).

Das für den dendritischen Transport verantwortliche Signal (*zipcode*) ist bis heute völlig unbekannt. Da es jedoch trotz der Inhibition der Proteinsynthese mit Cycloheximid zu einem gerichteten Transport der Arg3.1-mRNA in die Dendriten kommt, muß das verantwortliche Signal in der Arg3.1-mRNA kodiert sein und nicht im neu synthetisierten Protein (Wallace *et al.*, 1998). Auch durch Inkubation mit Puromycin, einem weiteren Inhibitor der Proteinsynthese, der im Gegensatz zu Cycloheximid die Verbindung der mRNA mit den Ribosomen zerstört, wird der mRNA Transport von Arg3.1 nicht beeinflusst. Der Transport von Arg3.1-mRNA ist somit von eigener Proteinsynthese, von neu synthetisierten Proteinen und von der Bindung an Ribosomen unabhängig (Steward *et al.*, 1998), wie es auch für andere dendritische mRNAs gezeigt werden konnte (Kleiman *et al.*, 1993).

Es stellt sich die Frage, ob der Transport der Arg3.1-mRNA mit anderen Transportprozessen in Dendriten vergleichbar ist. Hierzu wurden verschiedene Transportgeschwindigkeiten miteinander verglichen. Die spezifische Transportgeschwindigkeit der Arg3.1-mRNA liegt bei ungefähr 300 µm pro Stunde (Wallace *et al.*, 1998). Vergleichbare Geschwindigkeiten weisen Granulae auf, die unter anderem RNA enthalten, und von BC1-RNA, einer nicht kodierenden RNA, die mit RNAs assoziiert im Dendriten vorliegt. Granulae bewegen sich mit einer

Geschwindigkeit von 360  $\mu\text{m}$  pro Stunde (Knowles *et al.*, 1996), BC1-RNA mit einer Geschwindigkeit von 260  $\mu\text{m}$  pro Stunde nach Mikroinjektion (Muslimov *et al.*, 1998). Aufgrund der Tatsache, daß diese Geschwindigkeiten in der gleichen Größenordnung liegen, könnte man hier verwandte Prozesse für den Transport in die Dendriten vermuten.

Steward und Worley zeigten, daß die mRNA sowie das Protein von Arg3.1 selektiv nur an aktivierten Regionen der Dendriten zu lokalisieren sind (Steward *et al.*, 1998). Nach spezifischer Aktivierung der mittleren molekularen Schicht (MML, middle molecular layer) der Dendriten der Körnerzellen des Gyrus dentatus ist ein Anstieg der Arg3.1-mRNA Konzentration, wie auch des Arg3.1-Proteins nur in dieser Schicht zu beobachten. Diese räumlich begrenzte Expressionserhöhung des Arg3.1-Proteins läßt auf eine lokale Proteinsynthese schließen. Neuronen müssen demnach über einen Mechanismus verfügen, der es ihnen ermöglicht, die neu synthetisierte mRNA selektiv zu den Synapsen zu transportieren, die sich durch vorausgegangene Aktivierung erkenntlich gemacht haben (Steward *et al.*, 1998).

Die Ähnlichkeit mit  $\alpha$ -Spectrin, die differentielle Lokalisierung der Arg3.1-mRNA in den Dendriten, der spezifische Transport zur aktivierten Synapse und die lokale Proteinsynthese von Arg3.1 könnte zu synapsenspezifischen Modifikationen während lang dauernder plastischer Veränderungen des Nervensystems beitragen.

## 1.6 Dendritische Lokalisierung von RNAs

Es gibt nur eine geringe Anzahl von mRNAs, neben Arg3.1, die aus dem Soma der Nervenzelle hinaus in die Dendriten transportiert werden. Die ersten mRNAs, die in Dendriten gefunden wurden, waren die MAP2 (mikrotubuli-associated protein 2) mRNA (Garner *et al.*, 1988) und die mRNA für die  $\alpha$ -Untereinheiten der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen II (CaMKII; Burgin *et al.*, 1990).

---

Weiterhin wurde eine dendritische Lokalisierung für die mRNA des GAP-43 (growth associated protein 43, Landry *et al.*, 1994; Watson *et al.*, 1992) und von dem Inositoltriphosphat Rezeptor Typ 1 (InsP<sub>3</sub>R1; Furuichi *et al.*, 1993) beschrieben. Die mRNA für APP (amyloid precursor protein; Strong *et al.*, 1990) und die für BDNF (brain-derived neurotrophic factor, Dugich-Djordjevic *et al.*, 1992) wurden in den proximalen Bereichen der Dendriten gefunden, wobei eine direkte Lokalisierung dieser mRNAs in Dendriten noch nicht nachgewiesen werden konnte (Steward, 1995; Kuhl und Skehel, 1998). Alle erwähnten RNAs kodieren für scheinbar nicht verwandte Proteine, obwohl viele von ihnen in der intrazellulären Signalkaskade und bei der aktivitätsabhängigen synaptischen Plastizität eine Rolle zu spielen scheinen. Der überwiegende Anteil der dendritischen mRNAs gehört zu den an freien Ribosomen translatierten mRNAs, mit Ausnahme des InsP<sub>3</sub>R1- und der Glycinrezeptor- $\alpha_1$  und - $\alpha_2$  mRNAs. Diese mRNAs kodieren für integrale Membran-proteine und werden am rauhen ER translatiert. Für die Proteinsynthese der in Dendriten lokalisierten mRNAs sind also verschiedene Translationsmaschinerien notwendig (Steward, 1995). Es konnte gezeigt werden, daß in Neuronen Proteinsynthese nicht nur auf den Zellkörper beschränkt bleibt, sondern auch in Dendriten stattfinden kann (Steward und Reeves, 1988; Torre und Steward, 1992; Tiedge und Brosius, 1996; Crino und Eberwine, 1996; Kang und Schumann, 1996). Die Proteinsynthese in den Dendriten kann darüber hinaus durch NMDA-Rezeptor-abhängige, afferente synaptische Aktivität stimuliert werden (Feig und Lipton, 1993). In einem *Aplysia* Zellkultur-System wie auch im Hippocampus der Ratte konnte gezeigt werden, daß eine lokale Synthese für lange anhaltende plastische Veränderungen benötigt wird (Kang und Schumann, 1996; Martin *et al.*, 1997b).

Innerhalb der letzten Jahre konnten RNA-Sequenzen, die für einen mRNA-Transport nötig und ausreichend sind, teilweise identifiziert werden. Es zeigte sich, daß für die dendritische CaMKII-mRNA die 3'-untranslatierte Region (3'UTR) für den gerichteten Transport in die Dendriten verantwortlich ist (Mayford *et al.*, 1996).

Kindler und Mitarbeiter konnten durch Injektionsexperiment in SCG-Neurone und Transfektion von hippocampalen Primärneuronen das dendritische Transportelement der MAP2b-mRNA auf eine Sequenz von 640 Nukleotiden in der 3'UTR einengen (Blichenberg *et al.*, 1999).

### 1.7 *Gene targeting, Zielgerichtete Genmutation in der Maus*

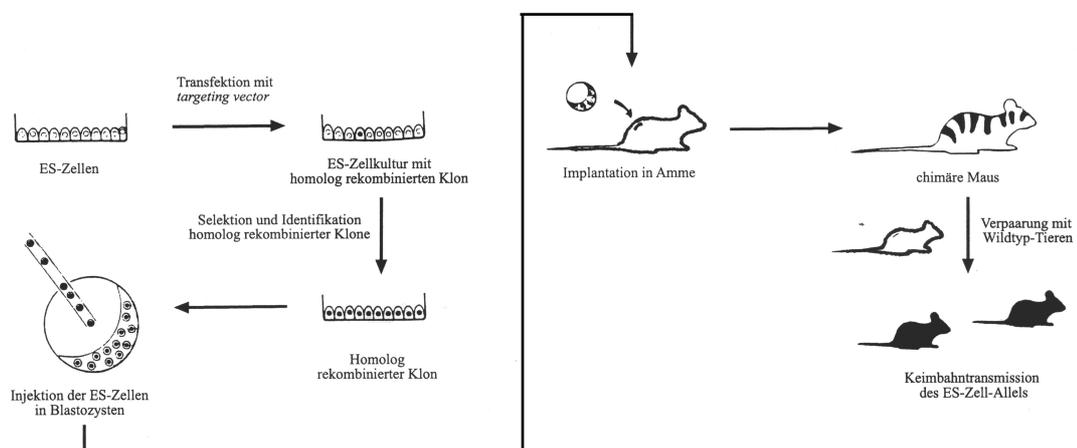
Durch Einführen eines Fragments genomischer DNA in Säugetierzellen, kann es zur Lokalisation und Rekombination dessen mit der endogenen homologen Sequenz kommen. Diese Art der homologen Rekombination (*gene targeting*) hat man sich zu Nutzen gemacht, um zielgerichtete Mutationen ins Genom zu setzen, und anhand von Untersuchungen der resultierenden phänotypischen Konsequenzen, Rückschlüsse auf die Funktion des Gens *in vivo* erstellen zu können. Die Integration der sequenzspezifischen Modifikation wird durch einen Vektor erreicht, der mit dem definierten chromosomalen Locus homolog rekombiniert und somit in einer gerichteten Mutation resultiert.

Die ersten experimentellen Bestätigungen für die Reproduzierbarkeit der homologen Rekombination zwischen einem endogenen Gen und dem artifiziellen DNA-*targeting* Vektor, lieferte Smithies und Mitarbeiter unter Verwendung von erythroleukämischen Zellen (Smithies *et al.*, 1985). Obwohl auf das Rekombinationsereignis hier nur in Zellen selektioniert werden konnte, welche das Zielgen (*target*) exprimierten, und dabei die homologe Integration im Verhältnis zur zufälligen Integration nur sehr selten auftrat (ca.1:1.000), konnte am  $\beta$ -Globin-Lokus die prinzipielle Möglichkeit des *gene targetings* gezeigt werden.

Embryonale Stammzellen (ES) sind totipotente, kontinuierlich wachsende Stammzellen embryonaler Herkunft, welche 1981 erstmals aus der inneren Zellmasse einer sich entwickelnden Mäuseblastozyste isoliert werden konnten (Evans und

Kaufmann, 1981; Martin, 1981). Nach der Reinjektion der ES-Zellen in Blastozysten ist eine Differenzierung in Keimbahnzellen möglich (Bradley *et al.*, 1984), und die *in vitro* vollzogene homologe Rekombination in das Genom der Maus überführbar. Eine Anreicherung der homolog rekombinierten Klone aufgrund des hemizygoten Phänotyps, konnte durch *gene targeting* des X-chromosomal lokalisierten Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase-Gens (*hprt*) erreicht werden. Die Selektion erfolgte durch Hinzugabe von 6-Thioguanin zum Kulturmedium (Thomas und Capecchi, 1987). Eine Lokus-unabhängige Expression des positiven Selektionsmarkers wurde unter dem Einfluß des HSV-Thymidin-Kinase-Promoters erreicht, mit einer deutlichen Anreicherung der homolog rekombinierten Klone. Der Promoter ermöglichte somit nachfolgend auch die Anwendung der *gene targeting*-Strategie für nicht selektierbare Gene (Mansour *et al.*, 1988; Schwartzberg *et al.*, 1989).

Das *gene targeting* in embryonalen Stammzellen erlaubt die Herstellung von Mäusen, die eine definierte Deletion in dem zu analysierendem Gen aufweisen. Diese Technik ist eine sehr geeignete Methode um das jeweilige Genprodukt funktionell zu analysieren, was zu einem wachsenden Anwendungsgebiet in der Biologie und der Medizin und resultierend zu einer Zunahme der Knockout-bezogenen Veröffentlichungen in den letzten Jahren geführt hat (Brandon *et al.*, 1995). In der Abbildung 1.3 wurde die Herstellung einer Knockout-Maus schematisch dargestellt.



**Abb. 1.3 Schematische Darstellung zur Herstellung von Knockout-Mäusen**

Embryonale Stammzellen werden mit dem *targeting* Vektor transfiziert und auf stabile Transfektion selektioniert. Die identifizierten homolog rekombinierten Klone werden in Blastozysten injiziert und jene in scheinträchtige Ammen-Mäuse reimplantiert. Die chimären Nachkommen spiegeln den jeweiligen Anteil aus den mutierten ES-Zellen und den WT-Blastozysten in ihrer Fellfärbung wieder. Die Chimäre können das ES-Zell-Allel an ihre Nachkommen weitergeben, wenn die ES-Zellen zur Keimbahn beigetragen haben (Abbildung nach Capecchi, 1989). Zur Herstellung einer konditionalen Knockout-Maus wird ein homolog rekombinierter Klon mit dem Cre-Protein transient transfiziert. Nach Identifikation des gewünschten Rekombinationstyps wird der entsprechende Klon in Blastozysten injiziert.

Die ersten Knockout-Mäuse, die in der Neurowissenschaft der Untersuchung von LTP und Lernen dienten, waren Nullmutanten der  $\square$ -CaMKII und der *fyn*-Tyrosinkinase (Silva *et al.*, 1992; Grant *et al.*, 1992). Beide Mauslinien waren in ihrem neurologischen Phänotyp unauffällig und zeigten eine normale synaptische Transmission. Die Ausbildung von LTP in den Pyramidenzellen der CA1-Region des Hippocampus war jedoch bei beiden Knockout-Linien signifikant beeinträchtigt. Um bei den Tieren das räumliche Lernen zu untersuchen, wurden jene in ein mit opaker Flüssigkeit gefülltes, rundes Becken plaziert, in dem sie schwimmend eine unterhalb der Flüssigkeitsoberfläche positionierte Plattform aufsuchen sollten (Morris *water maze*). Die Maus kann sich bei dem Aufspüren der Plattform an extern angebrachten Markierungen orientieren. Während der siebentägigen, in mehreren Blocks verlaufenden, Trainingseinheit, werden die jeweiligen Zeiten, die zum Auffinden der Plattform benötigt wurden, gemessen. Am achten Tag wird nach Entfernen der Plattform die Verweildauer der Maus im jeweiligen Quadranten gemessen (Transfertest). Interessanterweise erzielten sowohl die *fyn*- als auch die  $\square$ -CaMKII-Knockout-Mäuse eindeutig schlechtere Ergebnisse als die Kontrolltiere. 1998 konnte anhand einer durch *gene targeting* gesetzten Punktmutation in das  $\square$ -CaMKII-Gen die Autophosphorylierung von Threonin auf Position 286 (Thr<sup>286</sup>) blockiert werden. Auch diese Tiere konnten kein NMDA-Rezeptor abhängiges LTP in der hippocampalen CA1-Region ausbilden und zeigten ein entsprechendes Defizit in dem Morris *water maze*-Test (Giese *et al.*, 1998).

---

Die Pawlow'sche Angstkonditionierung fand als ein weiteres Modell zur Untersuchung der Lernfähigkeit bei Knockout-Mäusen mit einer Deletion des Transkriptionsfaktor CREB, Anwendung. Die Tiere lernen hierbei die Assoziation eines bedingten Reizes, beispielsweise eines Tons, mit einem unbedingten Reiz, z.B. einen Elektroschock. Konditionierte Tiere reagieren bereits auf den bedingten Reiz, indem sie ihre Bewegung einstellen und zittern. Die auf einen Kontext bezogene Konditionierung benötigt den Hippocampus und die Amygdala (Kim und Fanselow, 1992; Phillips und LeDoux, 1992). Bei der Untersuchung der CREB-Nullmutanten fiel auf, daß die Konditionierung nur vorübergehend anhielt (Zeitspanne < 60 min). Ein analoges Bild ergab sich bei der LTP-Induktion in hippocampalen Gehirnschnitten. Die Mäuse mit der deletierten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Isoform von CREB zeigten eine zeitlich reduzierte LTP-Dauer von 90 Minuten (Bourtchuladze *et al.*, 1994). Dies legt eine Rolle für die CREB vermittelte Transkription sowohl bei der Ausbildung von LTP als auch bei der Gedächtnisbildung nahe.

Die ubiquitäre, und bereits früh embryonale Ausschaltung des Zielgens, die durch das konventionell Knockout-Verfahren erreicht wird, kann jedoch einige gravierende Nachteile mit sich bringen.

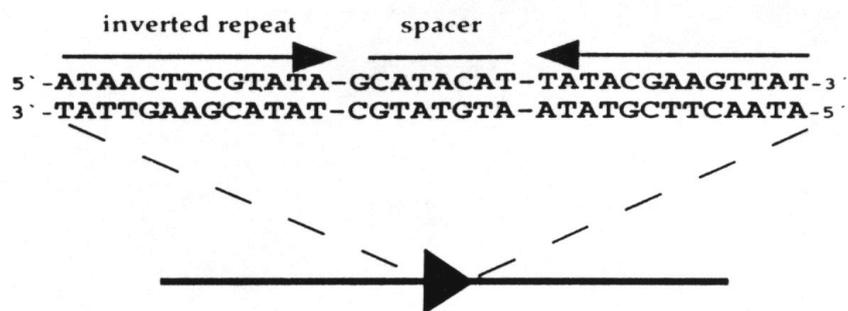
Ist das betreffende Gen bereits während der embryonalen Entwicklung von Bedeutung, so können Entwicklungsdefekte mit der Untersuchung von Lernprozessen interferieren. Die vollständige konstitutive Deletion eines Moleküls kann vor allem während der Ontogenese zu einer Vielzahl adaptativer Reaktionen führen, besonders in solch plastischen zellulären System wie dem ZNS. Durch solche Prozesse werden die Auswirkungen des Gendefekts auf den Phänotyp moduliert. Zusätzlich wird die Interpretation von Ergebnissen bei einer ubiquitär vorliegenden Genmutation dadurch erschwert, daß Verhaltensdefizite keiner bestimmten Hirnregion zugeordnet werden können.

Nullmutanten des *activity-regulated-gene3.1* (Arg3.1) sterben bereits vor der Gastrulation mit einer Resorption *in utero* ab E7,5. Die embryonale Letalität der

homozygoten Knockout-Tiere ist auf deren schweren Wachstums- bzw. Entwicklungsretardierungen zurückzuführen (Dammermann, B., 1999; Liu *et al.*, 2000). Die geringe Penetranz der Nullmutanten und die hohe embryonale Letalität beruht jedoch vermutlich auf dominant negative Effekte des exprimierten Arg3.1/ $\beta$ -Gal-Fusionsproteins (Dammermann, 1999). Da die in dieser Arbeit vorgestellte Arg3.1-Knockout-Linie nach Deletion der kompletten Arg3.1 kodierenden Region *in vitro* weder eine verminderte Penetranz der Nullmutanten noch eine erhöhte embryonale Letalität aufweist, lassen sich die beschriebenen Entwicklungsdefekte der klassischen Arg3.1-Knockout-Maus nicht auf den frühembryonalen Verlust des Arg3.1-Proteins zurückführen.

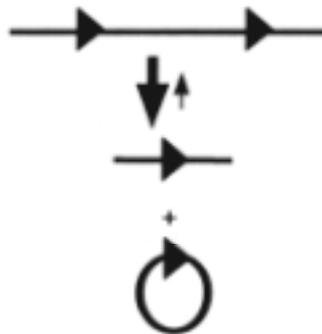
Eine Möglichkeit den geschilderten Problemen des konventionellen Knockouts zu begegnen, bietet daher der sogenannte konditionale Knockout unter Verwendung des Cre/loxP-Systems. Das inter- und intramolekular agierende Enzym Cre-Rekombinase (Causes recombination) stammt aus dem Bakteriophagen P1, einem das Bakterium *Escherichia coli* infizierender Phage. Unter der Cre-Rekombinase kommt es nach Infektion zur Separierung der sich aneinanderlagernden Phagengenome. Der Molekularbiologe Brian Sauer zeigte 1980 erstmals das Wirkungsprinzip des Enzyms. Nach Anlagerung des Cre-Proteins an eine kurze Sequenz der Phagen-DNA, der sogenannten loxP-site, kommt es bei der Integration zweier gleichgerichteter loxP-Sequenzen in einem linearen DNA-Molekül, zur Exzision und Zirkularisierung des durch die loxP-sites flankierten DNA-Abschnittes. In beiden Reaktionsprodukten verbleibt jeweils eine loxP-site (Torres und Kühn, *Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting*). Die loxP-site (locus of crossover ( $\bar{x}$ ) in P1) ist eine 34 bp große Erkennungssequenz. Sie beinhaltet zwei 13 bp große, invertierte Wiederholungen, welche durch eine 8 bp große, nichtpalindromische Sequenz unterbrochen wird. Diese sogenannte *spacer*-Region diktiert die eigentliche Orientierung. Die Cre-Rekombinase ist ein 38 kDa schweres Protein, welches der  $\square$ -Integrase-Superfamilie zugeordnet ist. Neben den aus Hefe stammenden

Rekombinasen FLP und R, ist die Cre-Rekombinase eine der wenigen Enzyme die weder Cofaktoren noch andere Zusatzstoffe für die Rekombination benötigt. In Abbildung 1.4 ist der strukturelle Aufbau einer loxP-Sequenz und die Cre-gesteuerte Rekombination zwischen zwei in gleicher Orientierung integrierten Erkennungssequenzen schematisch dargestellt.



**Abb. 1.4 a Struktureller Aufbau einer loxP-Sequenz**

Die 34 bp große loxP-site beinhaltet zwei 13 bp invertierte Wiederholungen und eine asymmetrische 8 bp große spacer-Region, welche die eigentliche Orientierung der site bestimmt (nach Torres und Kühn 1997).



**Abb. 1.4 b Cre-vermittelte Deletion**

In einem linearen DNA-Molekül kommt es durch die Cre-Rekombinase zur Exzision und Zirkularisierung des durch die loxP-sites flankierten DNA-Abschnittes.

Von zwei unabhängig von einander arbeitenden Gruppen, Marth in Vancouver (Marth *et al.*, 1996) und H. Westphal an dem *National Institut of Child Health und Human Development*, wurde die Effektivität der Cre-Rekombinase in Säugetierzellen

*in vivo* gezeigt, und eine hohe Effizienz in dem Hinaustrennen chromosomaler DNA nachgewiesen.

Das zu untersuchende Zielgen wird wie oben beschrieben in einer embryonalen Stammzelle über homologe Rekombination mit loxP-Sequenzen flankiert. Die genetisch manipulierten Zellen werden in Blastozysten injiziert und in den Uterus von scheinträchtigen Ammen-Mäusen transferiert. Es resultiert eine Generation von Mäusen, die ein funktionstüchtiges, durch loxP-sites flankiertes Gen tragen. Die Deletion des Zielgens wird *in vivo* durch Kreuzung dieser Mäuse mit einem Cre exprimierenden, transgenen Mausstamm erreicht. Die Aktivierung eines Onkogens durch gezielte Rekombination in transgenen Tieren konnten Lakso und Westphal erreichen, indem die Expression eines Tumorantigens nach Cre-gesteuerter Deletion eines Stop-Codons nicht mehr unterdrückt wurde, und es nachfolgend bei allen doppelt transgenen Nachkommen zur Ausbildung eines Linsentumors kam (Lakso und Westphal *et al.*, 1992). In einem weiteren Versuch wurde die Kontrolle der Cre-Rekombinase unter den *lck*-Promoter, einem zelltypspezifischen Promoter, gestellt, wodurch die Rekombination zu einer Deletion des ersten Exons der DNA - Polymerase  $\alpha$  selektiv in T-Zellen führte (Gu *et al.*, 1994). Der erste auf eine definierte Hirnregion beschränkte Knockout war die Deletion der R1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors. Dabei wurde die Deletion auf die Pyramidenzellen der CA1-Region des Hippocampus, durch Expression der Cre-Rekombinase unter Kontrolle des CaMKII-Promoters, begrenzt (Tsien *et al.*, 1996a). Bereits frühere Studien demonstrierten, daß die Aktivierung des CaMKII-Promoters in transgenen Tieren auf die Region des Vorderhirns beschränkt ist (Mayford *et al.*, 1996), und erst postnatal (in der Mitte der dritten postnatalen Woche) einsetzt (Burgin *et al.*, 1990). Hierdurch lassen sich aus der Gendeletion resultierende Entwicklungsdefekte verhindern, und eine Interpretation der Gen-Funktion im adulten Tier wird ermöglicht. Die Mäuse zeigten sich sowohl in der Ausbildung von LTP als auch beim räumlichen Lernen in

Morris *water maze* defizient (Tsien *et al.*, 1996b). Die Korrelation dieser Defekte läßt auf die Bedeutung von LTP für räumliches Lernen in der CA1-Region schließen.

Neben der zelltypspezifischen Gendeletion bietet das Cre/loxP-System auch eine zeitliche Kontrolle der Mutation, durch die Verwendung induzierbarer Promoter zur Expressions- bzw. Aktivitätskontrolle der Cre-Rekombinase. Zur Induktion der Gen-Inaktivierung in Mäusen während eines bestimmten Zeitpunkts der Ontogenese, wurde die Cre-Rekombinase unter die Kontrolle des induzierbaren Promoters Mx1 gestellt. Dieser Promoter kann durch Applikation von Interferon  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) oder IFN- $\gamma$  transient zu einer hohen Transkriptionsrate aktiviert werden (Kühn *et al.*, 1995). Einen alternativen Ansatz bietet die Fusion der Cre-Rekombinase an eine mutierte Liganden-bindene-Domäne des menschlichen Östrogen-Rezeptors, durch die eine Aktivierung der Rekombinase durch Applikation von dem Östrogen-Rezeptor-Agonisten Tamoxifen resultiert (Feil *et al.*, 1996). Nach Fusion der Rekombinase mit der *ligand binding domain* (LBD) des humanen Glukokortikoid-Rezeptors kann die enzymatische Tätigkeit durch Gabe von Dexamethason stimuliert werden (Brocard *et al.*, 1998). Ein weiteres Beispiel bietet die Fusion der Cre-Rekombinase mit der hormonbindenden Domäne eines modifizierten Progesteron-Rezeptors, welche eine Aktivitätsregulierung durch das synthetische Steroid RU 486 gewährleistet (Kellendonk *et al.*, 1996). Hierbei wird die Rekombinase ausschließlich durch das RU 486, und nicht durch endogenes Progesteron aktiviert. Durch Expressionskontrolle eines solchen Fusionsproteins anhand eines zelltypspezifischen Promoters, bleibt die induzierte Gendeletion auf einen definierten Zelltyp begrenzt (Kellendonk *et al.*, 1999).

Ebenfalls ähnliche Ansätze bietet das *tetracycline-controlled trans activator protein* (tTA), bei dem die Abwesenheit, nicht jedoch die Präsenz von oral applizierten Doxycyclin, zur Transkriptionsinduktion führt (Furth *et al.*, 1994; Gossen *et al.*, 1995; Kistner *et al.*, 1996), oder *vice versa* das *reverse tetracycline-controlled transactivator* (rtTA) *system* unter dem es durch Gabe von Doxycyclin zur

Genexpression kommt, die durch Doxycyclin-Karrenz wieder aufgehoben werden kann (Mansuy *et al.*, 1998). Der kombinierte Einsatz eines zelltypspezifischen Promoters, wie dem CaMKII-Promoters mit dem tTA-System erlaubt die gezielte lokale und zeitliche Steuerung der Genexpression *in vivo* (Mayford *et al.*, 1996), woraus sich eine vielfältige Anwendungsvariabilität und vielerlei Vorteile des konditionalen Knockouts im Hinblick auf eine kontextspezifische Funktionsanalyse des betreffenden Gens ergeben.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Die Expression von Arg3.1 (*activity-dependent gene of 3.1kb*) wird dramatisch durch Plastizitäts-produzierende Reizung von Synapsen angeschaltet. Allerdings ist bislang wenig bekannt, welche genaue Aufgaben dieses Gen während plastischer Veränderungen des Gehirns besitzt. Erkenntnisse über seine Funktionen könnten helfen, ein besseres Verständnis jener molekularen Mechanismen zu entwickeln, die Prozessen wie Lernen und Gedächtnis, aber auch pathologischen Veränderungen der Plastizität zugrunde liegen.

Durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) sollte im Arg3.1 Gen eine einzelne loxP-Sequenz 5' des offenen Leserahmens sowie eine durch loxP-sites flankierte Neomycin-Kassette 3' eingeführt werden. Die Transfektion eines Cre-Rekombinase-tragenden Plasmids und die transiente Expression der Rekombinase sollte in ES-Zellen zu zwei verschiedenen Rekombinationstypen führen. Zum einen sollte es zu einer Deletion des positiven Selektionsmarkers kommen, wobei der durch loxP-Erkennungssequenzen flankierte offene Leserahmen von Arg3.1 im Genom der Stammzellen verbleibt, und zum anderen sollte die Arg3.1 kodierende Sequenz vollständig deletiert werden.

Diese manipulierten ES-Zellen könnten dann in anschließenden Arbeiten dazu verwendet werden eine Arg3.1 defiziente Mauslinie zu generieren. Weiterhin könnte eine Mauslinie generiert werden, bei welcher der offene Leserahmen von Arg3.1 flankiert von zwei loxP-Sequenzen vorliegt, und die Deletion des Gens zelltypspezifisch oder zeitlich gesteuert erfolgen könnte. Mit Hilfe dieser Mauslinien ist es möglich, die Rolle des Arg3.1 Gens bei Lernprozessen und bei der Induktion und Aufrechterhaltung von Langzeitpotenzierungen zu untersuchen.

### 3 Material

#### 3.1 Versuchstiere

Es wurden die Nachkommen aus der Kreuzung männlicher transgener Mäuse (FVB (Tg:  $\beta 2$ -m:neo)) mit weiblichen F1-Balb/c-Hybriden für die Fibroblastenkultur genutzt. Die embryonalen Stammzellen wurden durch Präparation embryonalen Gewebes von Tieren der Linie R1 aus dem Stamm 129/Sv x 129/Sv-CP gewonnen. Die ES-Zellen wurden in Blastozysten reinjiziert, welche aus Tuben, bzw. Ovarien von C57Bl/6-Mäusen gewonnen wurden.

#### 3.2 Geräte

Agarosegelkammern (horizontal) 11, 20, 58	GibcoBRL
Brutschrank	Heraeus
Elektroporationsgeräte:	
Capacitance Extender plus	BioRad
GenePulser II	BioRad
Pulse Controller Plus	BioRad
Elektroporationsküvetten	BioRad
Entwickler Modell Curix 60	Agfa
Eppendorf-Schüttler	Heidolph
Gefrierschrank -70 °C	Colora Meßtechnik
Stickstofftank -190 °C	Messer Griesheim
Geiger-Müller-Zählrohr	MiniInstruments

---

Geldokumentationssystem UV-20-LW	Herolab
Glasgeräte	Schott
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Mikrowelle	Bosch
PCR-Thermocycler GeneAmp2400	Perkin-Elmer
pH-Meter	WTW
Phosphoimager Modell BAS 1500	Fuji
Photometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech
Platform Shaker Innova 2100	New-Brunswick Scientific
Scanner Modell ARCUS II	Agfa
Speed-Vac Sc 110	Savant
Sterilwerkbank SG-400E	Baker Company
Stratacooler	Stratagene
Szintillationszähler LS 1701	Beckmann
UV-Crosslinker Modell 2400	Stratagene
UV-Leuchttisch Modell 2035 (356 nm)	Herolab
Vakuumpumpe	ASF
Waagen:	
Modell PM 4000	Mettler
Modell AE 240	Mettler
Wasserbad	MGW Lauda
Whirler REAX 2000	Heidolph
Zentrifugen/Rotoren:	
Modell J2-21 M/E	Beckmann
Festwinkelrotoren JA 10, JS 13.1	Beckmann
Laborzentrifuge Modell Minifuge RF	Heraeus
Biofuge A	Heraeus
Kühlzentrifuge	Savant

---

Kühlzentrifuge 202 MK	Sigma
Tischzentrifuge	Qualitron
Zentrifuge 5417C	Eppendorf

### 3.3 Chemikalien und Bestandteile für die Zellkultur

Falls nicht anders erwähnt, wurden Chemikalien von den Firmen Amersham, Biomol, BioRad, Boehringer Mannheim, Fluka, GibcoBRL, Merck, Research Biochemicals International (RBI), Roth und Sigma bezogen.

Adenosin	GibcoBRL
Ammoniumacetat	Merck
Ampicillin	Merck
Bromphenolblau	Merck
Chloroform	Merck
Cytidin	GibcoBRL
Dimethylformamid (DMF)	Fluka
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dulbecco's Glutamax Medium	GibcoBRL
Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	GibcoBRL
EDTA	Sigma
ESGRO LIF (Leukeamia Inhibitory Factor)	GibcoBRL
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	GibcoBRL
Ficoll	Merck
Fötale Kälberserum (FCS)	GibcoBRL
Fötale Kälberserum ES-Qualität (FCS-ES)	GibcoBRL

---

Geneticin (G418)	GibcoBRL
Glycerol (87 %)	Merck
Glykogen	Boehringer
Guanosin	GibcoBRL
L-Glutamin	GibcoBRL
L-Arginin HCL	GibcoBRL
L-Asparagin	GibcoBRL
MEM (nicht essentielle Aminosäuren)	GibcoBRL
β-Mercaptoethanol	GibcoBRL
Mitomycin C	GibcoBRL
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth
Natriumpyruvat	GibcoBRL
PBS	GibcoBRL
Penicillin	GibcoBRL
Penicillin/Streptomycin	GibcoBRL
Phenol	GibcoBRL
Salzsäure	Merck
Thymidin	GibcoBRL
Trypsin-EDTA-Lsg.	GibcoBRL
Uridin	GibcoBRL
Xylen Cyanol	Pharmacia

### 3.4 Puffer und Lösungen

Für sämtliche Ansätze wurde Wasser, welches aus einer Membran-Filtrationsanlage stammte, verwendet. Dieses Wasser entspricht in seiner Qualität dem des zweifach destilliertem H<sub>2</sub>O. Es wurde vor Gebrauch autoklaviert oder sterilfiltriert.

**Denaturierungslösung für****den Southern Blot**

88,08 g NaCl (1,5 M)

20 g Natriumhydroxid-Plätzchen (0,5 M)

ad 1000 ml Aqua bidest.

**Denhardt (50 x)**

5 g Ficoll

5 g Polyvinylpyrrolidon

5 g BSA

ad 500 ml Aqua dest.

**DNA/RNA-Probenpuffer**

0,1 M EDTA

1 % (w/v) SDS

20 % (w/v) Ficoll

0,25 % (w/v) Bromphenolblau

0,25 % (w/v) Xylen-Cyanol

**L-Glutamin-Lösung (100 x)**

200 mM L-Glutamin

**HCl (0,25 M)****Lösung für den Southern Blot**

20,7 ml 37 % HCl (rauchend)

ad 1000 ml Aqua bidest.

**Hybridisierungslösung für****Southern-Hybridisierungen**

50 % Formamid

---

	5 x SSPE
	5 x Denhardt
	0,1 % (w/v) SDS
	100 µg/ml Heringsperma-DNA (hitzenedenaturiert)
<b>Luria-Broth-Medium (LB)</b>	10 g Bacto-Trypton
	5 g Hefe-Extrakt
	5 g NaCl
	ad 1000 ml Aqua dest.
<b>LB-Amp.-Medium</b>	LB-Medium
	100 µg/ml Ampicillin
<b>LB-Platten</b>	1000 ml LB-Medium
	15 g Agar
<b>LB-Amp.-Platten</b>	1000 ml LB-Medium
	15 g Agar
	100 µg/ml Ampicillin
<b>Lysis-Puffer für ES-Zellen</b>	10 mM Tris HCl
	10 mM EDTA
	10 mM NaCl
	0,5 % Sarcosyl
	1 mg/ml Proteinase K

**Neutralisierungs-Lsg.****für den Southern Blot**

88,08 g NaCl (1,5 M)

60,76 g Tris-Puffer (0,5 M)

pH 7,0

ad 1000 ml Aqua bidest.

**Nukleosid-Lösung (100 x)**

80 mg Adenosin

85 mg Guanosin

73 mg Uridin

73 mg Cytidin

24 mg Thymidin

ad 100 ml Aqua dest.

**PBS**

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

7,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

auf pH 7,4 mit HCl einstellen

**10 % SDS**

100 g SDS

in 900 ml H<sub>2</sub>O

auf 68 °C erhitzen

auf pH 7,2 mit HCl einstellen

ad 1 l H<sub>2</sub>O**20 x SSC**

3 M NaCl

---

	0,3 M Natriumcitrat auf pH 7,0 mit NaOH einstellen
<b>20 x SSPE</b>	3 M NaCl 20 mM EDTA 0,2 M $\text{NH}_2\text{PO}_4$
<b>TAE-Puffer (50 x)</b>	0,2 M Tris-Acetat 10 mM EDTA pH 7,4
<b>TELT-Puffer</b>	50 mM Tris HCl pH 7,5 62,5 mM EDTA 0,4 % Triton X 100 2,5 mM LiCl
<b>10 x TE-Puffer</b>	0,1 M Tris/HCl 10 mM EDTA pH 7,4
<b>1 M Tris-HCl</b>	121,1 g Tris gewünschten pH mit HCl einstellen
<b>Top-Agarose</b>	10 g/l Trypton 8 g/l NaCl 6 g/l Agarose

**Waschlösung 1**

**für den Southern Blot**            2 x SSC  
0,1 % SDS

**Waschlösung 2**

**für den Southern Blot**            0,2 x SSC  
0,1 % SDS

**3.5 Medien**

**DMEM**                                    0,232 g L-Arginin-HCl  
0,072 g L-Asparagin  
0,432 g L-Glutamin  
4 g NaHCO<sub>3</sub>  
0,2 mM Natriumpyruvat  
2 x DMEM-Pulver  
ad 2000 ml Aqua dest.  
pH 7,0 mit HCl einstellen

**Kulturmedium für**

**embryonale Stammzellen (R1)**    150 ml FCS (ES)  
10 ml L-Glutamin  
10 ml MEM nicht essentielle Aminosäuren  
10 ml Nukleosid-Lösung (100 x)  
100µl LIF  
1 ml β-Mercaptoethanol

**Kulturmedium für**

**embryonale Fibroblastenzellen** 100 ml FCS (EF)  
10 ml MEM nicht essentielle Aminosäuren  
890 ml Dulbecco Glutamax Medium

**Einfriermedium für**

**embryonale Stammzellen (R1)** 50 % ES-FCS  
20 % DMSO  
30 % ES-Medium

**3.6 Eukaryontische Zelllinien**

Murine neomycinresistente Fibroblastenzellen Dr. Michael Bösl, ZMNH  
Embryonale Stammzellen R1 (129/Sv x 129/Sv-CP) Prof. Olaf Pongs, ZMNH

**3.7 Bakterienstämme**

Folgender *Escherichia coli* Stamm der Firma Life Technologies wurde verwendet:

<b>Stamm</b>	<b>Genotyp</b>
Elektro MAX DH 10B	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> , $\square$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ), $\square$ 80 <i>lac Z</i> $\square$ M15, $\square$ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> ,

*recA1, endA1, araD139, [(araleu)  
7697, galU, galK, [ rpsL, nupG*

Elektro MAX DH 12S

*[80dlacZ[M15, mcrA, [(mr-hsdRMS-  
mcrBC), araD139, [(ara, leu)7697,  
[lacX74, galU, galK, rspL, deoR,  
nupG, recA1F', proAB+, lacIq, Z[M15*

### 3.8 Nukleinsäuren

#### 3.8.1 Klone

ARG 3.1-cDNA-Klon

Robert Waltereit, AG Kuhl

#### 3.8.2 Plasmide

pBluescript KS+

Stratagene

pBS-EAG

Robert Waltereit, AG Kuhl

pCre-Pac

Masahiko Taniguchi, Kasugai

plox Pneo-1

Olaf Pongs, Hamburg

pPNT

Rudolf Jaenisch, Boston

pZero-arg Gen

Robert Waltereit, AG Kuhl

pZero 22 A1-2

Robert Waltereit, AG Kuhl

pconKO-arg3.1

Björn Dammermann, AG Kuhl

### 3.8.3 Oligonukleotide

Primer für Sequenzierungen und PCR-Amplifikationen wurden von den Firmen Gibco BRL und MWG bezogen.

### 3.8.4 Primer für die Genotypisierung

Die Angaben der Primersequenz erfolgt in 5' → 3'-Richtung

ABSI: TCC TAT GGA GGA ATC CTG GGA GC

ABSII: CAT CGG GAA GTC ACA GGT CTC AG

loxPI: CTT CGT ATA ATG TAT GCT ATA CG

loxPII: CTT CGT ATA GCA TAC ATT ATA CG

### 3.8.5 Weitere Nukleinsäuren

DNA-Größenmarker GibcoBRL

Heringsperma-DNA Boehringer

### 3.8.6 Radionukleotide

[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP NEN

### 3.9 Enzyme

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP)	Boehringer
Lysozym	Sigma
Proteinase K	Sigma
RNase A	Roth
RNase H	GibcoBRL
Restriktionsendonukleasen	NEB, MBI
T4 Ligase	Boehringer, GibcoBRL, MBI
Taq-Polymerase	MBI

### 3.10 Kits

Plasmid Mini Kit	Qiagen
Plasmid Midi Kit	Qiagen
Plasmid Maxi Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAex Gel Extraction Kit	Qiagen
rediprimeII DNA labelling system	Amersham
T/A Cloning Kit	Invitrogen

### 3.11 Plastikmaterial für Zellkultur

Zellkulturschalen	Nunc, Costar
Kryoröhrchen	Nunc
Stericup PVDF Filtereinheiten	Millipore/Amicon

### 3.12 Sonstiges Material

Duralose Membran	Stratagene
QIAshredder-Säulen	Qiagen
Röntgenfilm: Hyperfilm MP	Amersham
Sephadex-G25/G50-Säulen	Boehringer Mannheim S
Software:	
Freehand	Macromedia Inc.
GCG 9.0	Genetic Computer Group
Word 7.0	Microsoft
Vector NTI 4.0	InforMax, Inc.
Image Analyze	Fuji

## **4 Methoden**

### **4.1 Mikrobiologische Techniken**

#### **4.1.1 Herstellung kompetenter Zellen**

Ausgehend von einer einzelnen Kolonie DH12S *E.coli* Zellen (Life Technologies) wurden zunächst 50 ml LB-Medium einer Übernachtskultur inokuliert. Mit 2,5 ml dieser Vorkultur wurden wiederum 4 Erlenmeyer Kolben mit je 500 ml YT-Medium angeimpft und bis zu einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0,6 bis 0,8 bei 37° C geschüttelt. Nach dem Abzentrifugieren der Bakterien in vorgekühlten Rotoren mit Zentrifugenbechern (Rotor JA10, 20 min, 4.200 rpm) wurde das Pellet zunächst in 5 ml Wasser (4° C) resuspendiert, danach auf 500 ml mit eiskaltem Wasser verdünnt und erneut abzentrifugiert. Nach Resuspendieren in 500 ml Glycerollösung (10 % Glycerol in H<sub>2</sub>O) wurde nach erneuter Zentrifugation das Pellet in 40 ml Glycerollösung aufgenommen, in ein gekühltes Kunststoffröhrchen (Falcon) überführt, erneut zentrifugiert (Heraeus Kühlzentrifuge, 20 min, 4.200 rpm) und abschließend in 1-2 ml GYT-Medium resuspendiert. Alle Ansätze wurden vereinigt, jeweils 100 µl Aliquots in auf Trockeneis vorgekühlte Reaktionsgefäße pipettiert und bei -70 °C gelagert. Ein Aliquot der Zellen wurde zur Bestimmung der Transformationseffizienz mit pUC19 Plasmid transformiert.

#### **4.1.2 Transformation**

Elektrokompetente DH12S-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, 1-2  $\mu\text{l}$  eines Ligationsansatzes zu 20  $\mu\text{l}$  Bakterien pipettiert und der gesamte Ansatz in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette transferiert. Die Zellen wurden elektroporiert (1,66 kV, 25 $\mu\text{F}$ , 200 m $\Omega$ ) und nach Zugabe von 1 ml S.O.C Medium 1 h bei 37 °C geschüttelt. Durch Plattierung von 10  $\mu\text{l}$  bzw. 990  $\mu\text{l}$  des Transformationsansatzes auf beispielsweise LB-Amp-Platten, konnten plasmidtragende Klone selektioniert werden.

#### **4.1.3 Herstellung von Glycerolkulturen**

Glycerolkulturen wurden hergestellt, indem aus einer Bakterienkultur für Plasmid-DNA Präparation 1,0 ml Zellsuspension entnommen, und mit 200  $\mu\text{l}$  87 %iger steriler Glycerollösung (Merck) versetzt wurden. Die Zellen wurden in Ethanol-Trockeneisbad gefroren und bei -80 °C gelagert.

#### **4.1.4 Ermittlung der Transformationseffizienz**

Die transformierten Bakterien wurden in verschiedenen Verdünnungen auf LB-Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die gewachsenen Kolonien pro Platte gezählt und die Anzahl der pro Menge eingesetzter DNA entstandenen Kolonien ermittelt.

## 4.2 Zellkulturtechniken

Alle Arbeiten der Zellkultur wurden unter der Sicherheitswerkbank, unter keimarmen Bedingungen ausgeführt. Alle Gegenstände wurden vor Gebrauch zur Keimreduktion mit 70 %igem Ethanol abgesprüht. Die Werkbank selbst wurde ebenfalls vor Beginn, mehrmals während wie auch nach Beendigung der Arbeit mit 70 %igem Ethanol ausgewischt. Über Nacht sorgte eine UV-Lampe für eine Keimreduktion in der Sicherheitswerkbank. Alle Behältnisse wurden unter der Werkbank an der Bunsenbrennerflamme geöffnet, beziehungsweise verschlossen. Es wurden, abgesehen von sterilen Einweg-Pipetten, ausschließlich autoklavierte Pipettenspitzen und Pasteur-Pipetten benutzt. Alle verwendeten Nährmedien, Puffer und andere Lösungen wurden steril filtriert. Die Medien und Pufferlösungen wurden bei 4 °C oder -20 °C gelagert und vor Gebrauch für einige Minuten bei 37 °C erwärmt.

### 4.2.1 Präparation der Fibroblastenzellen

Männliche, für die Neomycin-Resistenz transgene Mäuse (FVB(Tg:  $\beta$ 2-m:neo)) und F1-Balb/c-Hybride Weibchen wurden miteinander verpaart und die Embryonen am Tag 15 pc für die Fibroblastenpräparation genutzt. Schwangere Weibchen wurden am Tag 15 post conceptionem nach CO<sub>2</sub>-Narkose durch Genickbruch getötet. Nach einem Bad in 70%igem Ethanol wurde den Mäusen in der Sterilwerkbank der Bauchraum durch Schnitte entlang der Longitudinalachse und der Transversalachse eröffnet. Der Uterus wurde herausgenommen und in eine Petrischale überführt. Die einzelnen Embryonen wurden aus der Fruchtblase befreit. Der Schwanz, die Extremitäten, der Kopf und die inneren Organe wurden entfernt, und die Rumpfe mit der Schere zerkleinert. Die resultierenden Gewebestücke wurden in 5 ml PBS in ein 50 ml Kunststoffgefäß (Falcon) mit 5 ml Trypsin-Lösung überführt. Es wurde mehrere

---

Male mit einer 10 ml Einweg-Pipette titriert und das Tube unter wiederholtem Schwenken (alle 2 min) bei 37 °C für 10 min inkubiert. Die Zellen setzten sich innerhalb von einer Minute ab und der Überstand wurde in ein neues Falcon Tube überführt. Der Überstand wurde mit 5 ml Feedermedium versetzt. Dem Sediment wurde wiederum 5 ml Trypsin-EDTA und eine geringe Menge DNase zugegeben und wie zuvor für 10 min bei 37° C inkubiert. Der beschriebene Vorgang wurde insgesamt 5 Mal wiederholt, so daß ein Gesamtvolumen von 50 ml Suspension mit Einzelzellen, Trypsin und Medium erhalten wurde. Die Zellen wurden sedimentiert bei 1500 rpm, 5 min, und das Zellpellet in 20 ml Feeder-Medium resuspendiert. Der Waschschrift wurde wiederholt. Die Zellen wurden erneut sedimentiert und das Pellet diesmal, für die folgende Zellzählung in 10 ml Medium resuspendiert. Für die Zählung wurden 100 µl der Zellen mit 150 µl PBS und 250 µl Trypan-Blue-Lösung versetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit wurde die Zellsuspension 1:10 in PBS verdünnt und in der Neubauer-Zählkammer ausschließlich die nicht angefärbten Zellen (Fibroblasten) gezählt. Es wurden  $5 \times 10^6$  Fibroblastenzellen auf eine 14 cm-Platte ausplattiert, indem ca. 24 ml Feedermedium auf die Platte vorgelegt wurden und die entsprechende Zellzahl tröpfchenweise auf die Platte gegeben wurde. Durch Auf- und Abpipettieren mit einer 10 ml Pipette wurde die Zellsuspension homogen verteilt. Die Gewebekulturplatten wurden stets bei 37 °C inkubiert.

#### **4.2.2 Expandieren der präparierten Fibroblastenzellen**

Zwei bis drei Tage nach dem Ausplattieren erreichten die Fibroblastenzellen die Konfluenz und wurden gesplittet. Das Medium und eventuelle Zellaggregate wurden abgesaugt. Die Platte wurde mit PBS gewaschen, indem der Plattenboden mit PBS benetzt wurde und nach wiederholtem Schwenken jenes wieder abgesaugt wurde. Um die Zellen von dem Plattenboden zu lösen und untereinander zu vereinzeln, wurden

---

sie mit 7,5 ml Trypsin für 3 min bei 37 °C inkubiert. Durch leichtes Klopfen der Schale gegen die Arbeitsplatte wurden die Zellen vollständig von dem Plattenboden gelöst und das Trypsin durch Hinzugabe von Feeder-Medium inaktiviert. Die Zellsuspension wurde 2 x auf- und abpipettiert und in ein Falcon Tube überführt. Die Zellen wurden bei 850 rpm für 5 min zentrifugiert und nach der Abnahme des Überstandes das Zellpellet in 10 ml Feeder-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden 1:5 gesplittet.

### **4.2.3 Einfrieren der präparierten Fibroblastenzellen**

Sobald die Fibroblastenzellen nach einmaliger Passage (P1) zu 90-95 % konfluent waren, wurden sie eingefroren. Die Fibroblastenzellen können nach dem Auftauen noch ein weiteres Mal vor der Inaktivierung, passagiert werden (P2) (siehe 4.2.4). Zum Wegfrieren wurden die Zellen zuvor durch das Trypsinieren (siehe 4.2.2.) von dem Plattenboden getrennt. Die Zellen wurden in ein Falcon-Tube überführt und bei 850 rpm, 5 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml Feeder-Medium resuspendiert und die Zellzahl durch Zählen in der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Zellen wurden erneut sedimentiert und diesmal auf Eis im kalten Feeder-Freezingmedium resuspendiert. Es wurde soviel Freezing-Medium eingesetzt, daß die Zellen in einer Konzentration von  $3,5-4 \times 10^6$ /ml vorlagen. Nach dem Resuspendieren wurden die Zellen schnell mit jeweils 1 ml in ein Kryotube aliquotiert. Die Kryotubes wurden in eine bei 4 °C vorgekühlte Kryobox gestellt, und in jener wurden die Zellen langsam über Nacht bei -70 °C eingefroren. Am darauffolgenden Tag (nach 24-36 h) wurden die Kryotubes aus der -70 °C-Truhe in den flüssigen Stickstoff-Tank überführt.

#### 4.2.4 Auftauen der Fibroblastenzellen

Ein Aliquot mit ca.  $3,7 \times 10^6$  Fibroblastenzellen wurde aus dem flüssigen Stickstofftank genommen und die Zellen in einem 37 °C-Wasserbad aufgetaut. Unmittelbar nach dem Auftauen wurden die Zellen in ein kleines Falcon Tube mit ca. 10 ml vorgelegtem Feedermedium gegeben. Das Tube wurde nach kurzem Invertieren in der Zentrifuge bei 850 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das im Tube verbleibende Zellpellet in 2 ml Feedermedium, durch wiederholtes Pipettieren, vorsichtig resuspendiert. Es wurden zwei Gewebekulturplatten (Ø 14 cm) genommen und auf jene jeweils 23 ml Feedermedium vorgelegt. Durch Schwenken der Platte wurde eine Benetzung des gesamten Bodens erzielt. Die resuspendierten Zellen wurden anschließend mit einer 5 ml Einweg-Pipette aufgesaugt und jeweils 2 ml langsam, tröpfchenweise auf eine Platte (Ø 14 cm) gegeben. Durch Auf- und Abpipettieren, sowie durch Schwenken der Kulturschale wurden die Zellen vollständig vereinzelt und homogen auf der Platte verteilt.

Die Platten wurden für die folgenden zwei oder drei Tage, bis zum Erreichen der Konfluenz, in dem Inkubatorschrank bei 37 °C aufbewahrt.

#### 4.2.5 Inaktivieren der Fibroblastenzellen

Beim Erreichen der Konfluenz wurden die Fibroblastenzellen mit dem Zytostatikum Mitomycin C inaktiviert um einen konstanten, sich nicht mehr durch Teilungsprozesse verändernden, Halt- und Nährboden für die embryonalen Stammzellen zu schaffen. Auf den Gebrauch des künstlichen Lichtes unter der Werkbank wurde während der Inaktivierung, aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Mitomycins C, verzichtet. Von der Platte (Ø 14 cm), auf welche die Fibroblastenzellen nach dem Auftauen ausplattiert wurden waren, wurde das

Feedermedium mit einer Pasteur-Pipette über die Vakuumpumpe abgesaugt, und durch 15 ml Feedermedium mit 150 µl Mitomycin C (MMC Endkonzentration: 10 µg/ml) ersetzt. Die Platte wurde für die folgenden 2-3 h im Inkubatorschrank gelagert.

#### **4.2.6 Ausplattieren der inaktivierten Fibroblastenzellen**

Nach Ablauf der Inaktivierungszeit wurde die Platte aus dem Inkubator genommen und das Feedermedium mit Mitomycin C abgesaugt. Um die Fibroblasten vollständig von dem Zytostatikum zu befreien, wurden sie 2 x mit PBS gewaschen. Die Fibroblasten wurden 3 min bei 37 °C trypsiniert und unter dem Mikroskop inspiziert, um ein ausreichendes Lösen der Zellen vom Plattenboden sicherzustellen, bevor das Trypsin durch Hinzugabe des Mediums inaktiviert wurde. Die Zellen wurden vereinzelt und anschließend in ein großes Falcon-Tube (25ml) überführt. Um das Trypsin von den Zellen zu trennen wurden diese für 5 min bei 850 rpm zentrifugiert und der resultierende Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in Feedermedium resuspendiert und anschließend in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Fibroblastenzellen wurden stets in einer Konzentration von  $3,4 \times 10^4$ /qcm ausplattiert. 12 h nach dem Ausplattieren waren die Zellen vollständig entfaltet und bildeten einen homogenen Zellboden.

Die inaktivierten Fibroblastenzellen konnten nach dem Ausplattieren ohne Medium-Wechsel für ca. 7-10 Tage in Kultur gehalten werden.

#### **4.2.7 Auftauen der embryonalen Stammzellen**

Die für diese Arbeit verwendeten embryonalen Stammzellen der Mauslinie R1 wurden von Herrn Xin Ran aus dem Institut von Herrn Prof. Pongs (ZMNH) bezogen.

Es wurde auf ein schnelles Auftauen geachtet, da das DMSO, als Bestandteil des Freezingmediums, im aufgetauten Zustand eine toxische Wirkung auf die Zellen hat.

Das Aliquot mit den ES-Zellen wurde aus dem flüssigen Stickstofftank genommen und schnell in einem 37 °C-Wasserbad aufgetaut. Die Zellen wurden mit einer 5 ml Einweg-Pipette in ein kleines Falcon-Tube überführt, in welches zuvor ca. 10 ml ES-Medium vorgelegt worden waren. Nach kurzem Invertieren des Falcon-Tubes wurden die ES-Zellen für 5 min bei 850 rpm zentrifugiert und durch Absaugen des Überstandes von dem Freezingmedium getrennt. Das Zellpellet wurde in 2 ml ES-Medium resuspendiert. Die ES-Zellen wurden in einer Dichte von ca.  $8 \times 10^4/\text{qcm}$  auf inaktivierten Fibroblastenzell-Platten, auf welchen zuvor das Feedermedium gegen frisches ES-Medium ausgewechselt worden war, ausplattiert.

#### **4.2.8 Tryplaten der embryonalen Stammzellen**

Es wurde 2 h vor dem *Tryplaten* das ES-Medium auf den Platten erneuert.

Das *Tryplaten* wurde bei den embryonalen Stammzellen durchgeführt, wenn die Zellen zwei Tage auf ein und derselben Platte in Kultur gewesen sind und am zweiten, oder spätestens am dritten Tag die für das Splitten erforderliche Dichte nicht erreichen konnten. Das ES-Medium wurde abgesaugt und die Zellen 1 x mit PBS gewaschen. Die embryonalen Stammzellen wurden stets 7 min bei 37 °C trypsiniert. Bei vollständigem Ablösen der Zellen vom Plattenboden wurde das Trypsin durch Hinzugabe von ES-Medium inaktiviert und die restlichen Zellaggregate gegebenenfalls durch wiederholtes Pipettieren gegen den Plattenboden aufgehoben. Um die Zellen von dem Trypsin zu trennen, wurden sie für 5 min bei 850 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in ES-Medium resuspendiert und gleichmäßig auf einer inaktivierten Feederzellplatte ausplattiert. Beim *Tryplaten*

entsprachen sich die Ausgangs-Platte und die Platte, auf die die ES-Zellen nach dem Trypsinieren ausplattiert wurden, in ihrer Größe.

#### **4.2.9 Splitten der embryonalen Stammzellen**

Bei normalen Wachstum erreichten die ES-Zellen am zweiten Tag in Kultur die Subkonfluenz. Der Vorgang des Splitten verläuft ähnlich dem des *Tryplaten*, jedoch werden die Zellen beim Splitten nach dem Resuspendieren, anstatt auf die gleiche Quadratmeterfläche auf die dreifache der Ausgangsfläche ausplattiert.

Um den undifferenzierten, pluripotenten Status der embryonalen Stammzellen beizubehalten, wurde auf ein Mediumwechsel im 24-Rhythmus geachtet. Bei gutem, regelrechtem Wachstum wurden die Zellen alle zwei Tage im Verhältnis 1:3 gesplittet. War die Zelldichte für das Splitten am zweiten Tag nicht ausreichend, so wurden die Zellen im Verhältnis 1:1 getryplatet, um das Wachstum durch die Trypsinierung anzuregen.

#### **4.2.10 Stabile Transfektion von ES-Zellen**

Das Medium wurde zwei Stunden vor der Transfektion auf den ES-Platten gewechselt. 10 ml PBS wurden sterilfiltriert und in einem Falcon-Tube auf Eis gestellt. Eine steril verpackte Elektroporationsküvette (biorad) wurde ebenfalls auf Eis gelegt und der Gene-Pulser eingestellt (Feldstärke: 3  $\mu$ F, Spannung: 0,8 kV). Es wurden drei Platten ( $\varnothing$  9 cm) mit subkonfluierenden R1p17-WT-ES-Zellen aus dem Inkubatorschrank genommen und unter dem Mikroskop auf ihren Zustand inspiziert. Die Zellen wurden trypsiniert (4.2.8) und nach dem Resuspendieren in einem Falcon-Tube gepoolt. Die Zellen wurden bei 850 rpm für 5 min sedimentiert und das Zellpellet in 10 ml ES-Medium resuspendiert. Es wurden  $5 \times 10^7$  ES-Zellen aus dem

---

Pool entnommen und erneut bei 850 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 600  $\mu$ l eiskaltem, sterilen PBS auf Eis resuspendiert. Den resuspendierten Zellen wurde 50  $\mu$ l (33 $\mu$ g) der linearisierten DNA (pconKO-arg3.1 *targeting* Vektor) beigegeben und durch Auf- und Abpipettieren auf eine homogene, luftblasenfreie Verteilung der DNA geachtet. Mit einer 1 ml-Pipette wurde die Suspension luftblasenfrei in die gekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Die Zellen wurden in dem Gene Pulser bei 3  $\mu$ F und 0,8 kV transfiziert. Die Elektroporationsküvette wurde unmittelbar nach der Transfektion für 20 min auf Eis gestellt. Während dieser Zeit wurde auf zehn inaktivierten Fibroblastenzell-Platten ( $\varnothing$  9 cm) das Feeder-Medium abgenommen, die Platten 1 x mit PBS gewaschen und je 9 ml ES-Medium vorgelegt. Nach Ablauf der 20-minütigen Inkubationszeit wurden die transfizierten Zellen in 9,35 ml ES-Medium aufgenommen und nach Inversion mit je 1 ml auf eine der Fibroblastenzell-Platten homogen ausplattiert.

#### **4.2.11 Selektion stabil transfizierter ES-Zellen mit Geneticin**

Um die Klone, die das Gen für Neomycin-Resistenz durch Integration des *targeting* Vektors aufgenommen haben zu selektionieren, wurde ab dem ersten Tag nach der Transfektion G418 dem ES-Medium beigegeben. Die ins Genom integrierte Neomycin-Kassette fungiert als positiver Selektionmarker, welcher durch Geneticin (G418) detektiert werden kann. Die Selektion lief insgesamt über sieben Tage, angefangen am Tag1 nach der Transfektion und weitergeführt bis einschließlich Tag sieben. Während der Selektion wurden die ES-Zellen durch tägliches Mediumwechsel dem G418 in einer Konzentration von 175  $\mu$ g/ml ausgesetzt.

#### **4.2.12 Picken der selektierten ES-Zellklone**

Am siebten Tag waren die Klone vollständig selektiert und ausreichend gewachsen, so daß die einzelnen Kolonien unter dem Mikroskop gepickt werden konnten. Auf den Platten ( $\varnothing$  9 cm) wurde 2 h vor Beginn des Pickens das Medium gewechselt, wobei während des Pickens und in den darauffolgenden Tagen ebenfalls mit G418 (Geneticin) zugeführten Medium gearbeitet wurde. Auf einer 96er Well-Platte mit rundem Boden wurde pro Well 15  $\mu$ l PBS mit einer Multichannel-Pipette vorgelegt. Ein Klon wurde unter dem Kreuz des Mikroskops fokussiert und mit einer in der Bunsenbrennerflamme in die Länge gezogenen Pasteur-Pipette von den Feederzellen gelöst. Der freischwimmende Klon wurde mit einer 20  $\mu$ l Eppendorf-Pipette, in 2,5 ml Volumen von der Platte genommen und in ein 96er Well mit vorgelegtem PBS überführt. Es wurde ein neuer Klon auf der Platte fokussiert und der beschriebene Vorgang wiederholt bis eine Reihe auf der 96er Well-Platte (insge. 12 Wells) mit Klonen gefüllt war. Es wurde mit der Multichannel-Pipette in jedes der 12 Wells 35  $\mu$ l Trypsinlösung gegeben und die Platte für 10 min bei 37 °C inkubiert. Um die Zellen vollständig zu vereinzeln, wurde die Trypsinierungszeit von den normalerweise für ES-Zellen üblichen 7 min auf 10 min erhöht. Nach abgelaufener Zeit wurden jedem Well 75  $\mu$ l ES-Medium zugeführt, und das Trypsinieren somit unterbrochen. Durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren mit der Multichannel, wurden eventuelle Zellaggregate gelöst und die Zellen Well für Well auf eine 96er Well-Platte mit geradem, fibroblastenbenetzten Boden überführt. Die Platte mit den gepickten Klonen wurde bei 37 °C inkubiert.

#### **4.2.13 Expansion der gepickten ES-Zellklone**

Nach dem Picken wurde jeder Klon individuell kultiviert und expandiert. Gemessen an dem jeweiligen Wachstum wurden die Klone am zweiten Tag nach dem Picken entweder auf ein neues 96er Well getryplatet, oder auf ein 24er Well gesplittet. Die Zellen konnten bei Erreichen der Subkonfluenz in dem 24er Well eingefroren werden. Es wurde während der Expansion darauf geachtet, daß die Kultivierungszeit der einzelnen Klone vom Picken bis zum Einfrieren 10 Tage nicht überschritt.

#### **4.2.14 Einfrieren der gepickten Klone**

Die Klone, welche auf dem 24er Well subkonfluierend gewachsen waren, wurden eingefroren. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen 1 x mit PBS gewaschen.

Die Zellen wurden mit 150 µl Trypsinlösung bei 37 °C in 7 min von dem Plattenboden gelöst und vereinzelt. Durch die Hinzugabe von 525 µl ES-Medium pro Well wurde das Trypsin inaktiviert und durch Auf- und Abpipettieren die eventuell vorhandenen Zellaggregate beseitigt (Kontrolle unter dem Mikroskop!). Mit einer 1000 µl Pipette wurden 525 µl der Zellsuspension in ein Kryotube überführt, so daß 150 µl Volumen in dem 24er Well verblieben. Dem Kryotube wurden 525 µl Freezingmedium zugegeben und nach kurzem Invertieren wurde das Kryotube in die bei 4 °C vorgekühlte Kryobox gestellt. Die Zellen wurden langsam über Nacht bei -70 °C eingefroren. Dem 24er Well mit den verbleibenden 150 µl Zellsuspension wurde 1 ml ES-Medium zugegeben und die Platten bei 37 °C inkubiert. Aus diesen Zellen wurde beim Erreichen der Konfluenz die DNA für spätere Analysen präpariert.

Am darauffolgenden Tag wurden die Kryotubes aus der -70 °C-Truhe in den flüssigen Stickstofftank überführt.

#### **4.2.15 Lysieren der ES-Zellklone**

Um die DNA der Klone für spätere Analysen zu gewinnen, wurden die Zellen, sobald sie konfluent waren, in dem 24er Well lysiert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Auf die zu lysierenden Zellen wurden pro Well 400 µl Lysispuffer gegeben. Die Platte wurde mit Parafilm umwickelt und in einer feuchten Atmosphäre für 12 h bei 50 °C inkubiert.

#### **4.2.16 Präparation der genomischen DNA**

Nach 12-stündiger Inkubation der Platten bei 50 °C, wurden die Platten bei 1000 rpm für 2 min zentrifugiert und die lysierten Zellen mit einer 1000 µl Eppendorf Pipette mit 400 µl in ein Eppi-Tube überführt. Dem Tube wurde die gleiche Menge (400 µl) Isopropanol zugesetzt. In den folgenden 30 min wurden die Tubes auf einem Rad gedreht bis die DNA vollständig ausgefallen war. Die Tubes wurden bei 14.000 rpm für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 500 µl 70 %igem Ethanol durch kurzes Invertieren der Tubes gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 14.000 rpm, 7 min, und Verwerfung des Überstandes, wurde die DNA an der Bunsenbrennerflamme getrocknet. Die DNA wurde in 50 µl TE-Puffer (pH = 8,0) aufgenommen. Zum Lösen der DNA wurden die Tubes über Nacht auf dem Bellydancer bei 37 °C inkubiert.

#### **4.2.17 Transiente Transfektion von ES-Zellen**

Es wurde auf zwei Platten (Ø 9 cm) mit subkonfluierenden ES-Zellen (positiv für die TV-Integration) zwei Stunden vor der Elektroporation das Medium gewechselt. Eine

---

Elektroporationsküvette und 10 ml PBS (sterilfiltriert) wurden auf Eis gelagert. Bei den Platten ( $\varnothing$  9 cm) wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 2 x mit PBS gewaschen. Nach dem Trypsinieren wurden die Zellen in einem großen Falcon Tube gepoolt und bei 850 rpm für 5 min zentrifugiert und das Pellet in 10 ml normal temperiertem PBS resuspendiert. Die Zellen wurden in einer 1:10 Verdünnung in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Das Zellvolumen wurde halbiert, indem 5 ml ( $1,2 \times 10^7$  Zellen) in ein neues Falcon-Tube überführt, und erneut bei 850 rpm, 5 min sedimentiert wurde. Das Zellpellet wurde diesmal in 500  $\mu$ l eiskaltem PBS resuspendiert. Es wurden den Zellen 40  $\mu$ l des nicht linearisierten Plasmids pCrePac ( $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren eine homogene Verteilung erreicht. Mit einer 1000  $\mu$ l Pipette wurde die Suspension luftblasenfrei in die Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 240 V und 500  $\mu$ F mit einer Zeitkonstante von 8,6 msec. Nach der Transfektion wurden die Zellen in der Küvette für 20 min auf Eis inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde auf zwanzig Fibroblasten-Platten ( $\varnothing$  9 cm) das Feedermedium gegen ES-Medium substituiert. Die Zellsuspension wurde in 10 ml ES-Medium aufgenommen und das Tube invertiert. Auf der Hälfte der Platten wurden 100  $\mu$ l ausplattiert und auf die anderen zehn Platten jeweils 20  $\mu$ l. Da nach der transienten Transfektion keine Selektion stattfindet, mußte auf eine ausreichende Verdünnung geachtet werden.

#### **4.2.18 Injektion der ES-Zellen in Blastozysten**

Der Klon der anhand der Southern Blot Analyse als positiv für die TypII -Deletion detektiert worden war, wurde für die Blastozysteninjektion aufgetaut. Das Zellpellet wurde nach der Zentrifugation in 500  $\mu$ l ES-Medium resuspendiert und die Zellen in einer Verdünnungsreihe auf einer 24-Well-Platte ausplattiert. Die Verdünnungsreihe sah aus wie folgt: 1/2, 1/4, 1/8, ..., 1/512.

Die Zellen wurden in drei aufeinanderfolgenden Tagen injiziert. Aufgrund der Verdünnungsreihe konnte an den verschiedenen Tagen jeweils ein Well mit optimaler Zelldichte verwendet werden. Die Zellen wurden trypsiniert (4.2.8) und in 2 ml ES-Medium aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bis zur Injektion bei 4 °C. Die Injektion wurde von Herrn Dr. Ralf Waldschütz aus dem ZMNH durchgeführt.

### 4.3 Molekularbiologische Techniken

#### 4.3.1 PCR

Für die Genotypisierung der Mäuse-DNA wurden zwei verschiedene PCR-Reaktionen standardisiert. Die Oligo-Primer-Paare (sense, antisense) wurden von der Firma MWG bezogen.

PCR-Reaktion I: Primerpaare *ABSI* und *ABSII*

PCR-Reaktion II: Primerpaare *ABSI* und *loxPI*; bzw. *ABSII* und *loxPII*

Für jeden Ansatz wurden 20 pmol des Primers und 50 ng des DNA-*templates* eingesetzt. Die Reaktionen liefen in einem 50 µl Volumen unter Verwendung der *Red-Taq*-Polymerase (Sigma). Als *template* wurde DNA von ES-Zellklonen eingesetzt (WT, positiver Klon vor der Cre-vermittelten Rekombination, positiver Klon nach der Cre-vermittelten Rekombination). Die Elongation während der ersten PCR - Reaktion lief über 1 min bei 64,2 °C, und bei der zweiten Reaktion wurde eine Elongationstemperatur von 55,3 °C über 1 min gewählt. Es liefen zwischen 30 und 40 Zyclen.

## 4.3.2 Präparation von Plasmid-DNA

### 4.3.2.1 TELT-Präparation

Zu 4 ml LB-Medium wurde Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml zugegeben und die Kultur mit einer Bakterienkolonie bzw. mit einem Stück gefrorener Glycerolkultur angeimpft. Die Kultur wurde für 10-15 Stunden bei 37 °C geschüttelt. 3 ml wurden von der Kultur abgenommen und bei 14.000 rpm, 1 min in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 100 µl TELT-Puffer resuspendiert. Der Ansatz wurde für 5 min auf Eis inkubiert und mit 5 µl Lysozym (5 mg/ml) ergänzt. Der Ansatz wurde für 3 sec gevortext und anschließend 1 min im Wasserbad gekocht. Der Präparations-Ansatz wurde wiederum bei 4 °C inkubiert und in einer Tischzentrifuge sedimentiert (10 min, 14.000 rpm). Der Niederschlag wurde mit Hilfe eines Zahnstochers entfernt und durch Zugabe von 200 µl Ethanol die Plasmide präzipitiert. Die Resuspendierung der DNA erfolgte in 20 µl H<sub>2</sub>O.

### 4.3.2.2 Weitere Minipräparationsverfahren

Die Isolierung von amplifizierter Plasmid-DNA aus 4 ml Übernachtskulturen erfolgte ebenfalls mit dem *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Boehringer-Mannheim) und dem Kit der Firma Macherey-Nagel. Es wurden jeweils die in den Protokollen empfohlenen Bedingungen eingehalten.

### 4.3.2.3 Midi-Präparation

Die Plasmid-DNA wurde aus einem Übernachtkulturvolumen von 100 ml mit Hilfe des Qiagen-Kits für Midipräparation isoliert.

#### **4.3.2.4 Maxi-Präparation**

Die Plasmid-DNA wurde aus einem Übernachtkulturvolumen von 400 ml mit Hilfe des Qiagen-Kits für Maxipräparation isoliert.

#### **4.3.3 Reinigung und Fällung von Plasmid-DNA**

Die Phenol/Chloroform-Extraktion und die Fällung von Plasmid-DNA wurden gemäß den Protokollen (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt.

#### **4.3.4 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA**

Es wurden 1 µg Plasmid-DNA in einem Reaktionsansatz von 10 µl oder 20 µl mit 10 Units Restriktionsenzym verdaut. Die Reaktionstemperatur, die Reaktionsdauer und die Reaktionspuffer wurden entsprechend den Angaben des Herstellers gewählt.

#### **4.3.5 Restriktionsverdau von Genomischer-DNA**

Es wurden 15 µg der genomischen DNA eingesetzt und mit 30 Units des Restriktionsenzym verdaut. Es wurde ein Reaktionsvolumen gewählt und dem Ansatz Spermidine (0,1 M), RNase und Reaktionspuffer zugegeben. Alle weiteren

Reaktionsbedingungen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers gewählt. Der Restriktionsansatz wurde über Nacht inkubiert.

#### **4.3.6 Linearisierung des *targeting* Vektors**

Zur Linearisierung des Konstrukts wurden 80 µg DNA eingesetzt und in einem 400 µl Reaktionsvolumen mit 250 Units des Restriktionsenzym verdaut. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle der Vollständigkeit der Linearisierung wurden je 1 µg des verdauten und des unverdauten DNA-Ansatzes elektrophoretisch aufgetrennt und auf einer 356 nm UV-Leuchtplatte visualisiert. Der linearisierte DNA-Ansatz wurde bei -20 °C gelagert.

#### **4.3.7 Phenol/Chloroform-Extraktion**

siehe 4.3.3

Zur Extraktion wurde dem linearisierten DNA-Ansatz die gleiche Menge an Phenol/Chloroform zugegeben und 15 sec gevortext. Anschließend wurde der Ansatz für 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt und die untere Phase entsprechend den allgemeinen Bestimmungen entsorgt. Die erläuterten Schritte wurden mit Chloroform wiederholt. Zur Fällung wurde der DNA die Hälfte des Ausgangsvolumen an Ammoniumacetat (7,5 M) und das dreifache Volumen an 100 %igem, eiskaltem Ethanol zugegeben. Der Ansatz wurde über Nacht bei -70 °C gelagert. Der Ansatz wurde 30 min, bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA mit 200 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach kurzem Invertieren des Tubes wurde jenes

---

wiederum zentrifugiert (15 min, 14.000 rpm, 4 °C) Der Überstand wurde abgenommen und die DNA an der Bunsenbrennerflamme oder in der SpeedVac getrocknet und anschließend in 50 µl MPW aufgenommen. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20 °C.

#### 4.3.8 Test der loxP-sites

Um die Funktion der loxP-sites zu überprüfen, wurde der *targeting* Vektor in Cre-exprimierende Bakterien transfiziert. Es wurden 5 µg DNA durch das *Heat-Shock*-Verfahren in 100 µl Cre-exprimierende Bakterien (294-Cre) transfiziert. Die Bakterien 294-Cre wurden von Frank Buchholz (Buchholz *et al.*, 1996) bezogen. Nach dem Auftauen der Bakterien, wurden diese mit der DNA in einem Reaktionsgefäß für 30 min auf Eis inkubiert. Es wurden zwei Reaktionsansätze unter unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt. Bei dem ersten Ansatz wurde der *Heat-Shock* durch 40 sec lange Inkubation bei 42 °C und folgender Abkühlung auf Eis für 2 min durchgeführt. Der zweite Ansatz wurde 2 min bei 42 °C inkubiert und dann ebenfalls für 2 min auf Eis gestellt. Die Ansätze wurden mit je 1 ml LB-Medium in ein Falcon-Tube überführt und 1 h bei 37 °C auf einem Rad gedreht. Die Ansätze wurden in verschiedenen Verdünnungen auf LB-Amp.-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien von den Platten gepickt und die Vorkulturen für eine Mini-Präparation angeimpft.

Die aus dem Cre-Bakterien isolierte DNA wurde mit dem Restriktionsenzym NheI verdaut und elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Kontrolle wurde unverdaute DNA (pconKO-arg3.1) und DNA des *targeting* Vektors ohne Cre-vermittelte Rekombination aufgetragen.

#### **4.3.9 DNA-Elektrophorese, bzw. Agarose-Gelelektrophorese**

Die DNA wurde in 1 x DNA Probenpuffer aufgenommen und in 0,8-2,0 %igen Agarosegelen (Seakem LE-Agarose, FMC) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte in Horizon-Gelapparaturen (Gibco BRL) bei 5 V/cm. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE verwendet und dem flüssigen Gel wurde Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml hinzu gegeben. Die Visualisierung und die Dokumentation der DNA erfolgte auf einer 356 nm UV-Leuchtplatte und anhand des E.A.S.Y-Systems (Herolab).

#### **4.3.10 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen**

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung (4.3.9) wurden die gewünschten DNA-Fragmente mit einem Skalpell über einer UV-Leuchtplatte aus dem Gel geschnitten. Die DNA-Isolierung aus dem Gel und die Aufreinigung der DNA wurde mittels des *Gel-Extraction-Kit* (Quiagen) erreicht. Die DNA wurde in H<sub>2</sub>O aufgenommen und falls erforderlich in der *Speed-Vac* auf das gewünschte Volumen konzentriert.

#### **4.3.11 Herstellung eines DNA-templates**

Für die Southern Blot Analysen der ES-Zellklone wurden zwei verschiedene Sonden-*templates* benötigt. Für deren Herstellung wurde die entsprechende Plasmid-DNA mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdaut (700er Sonde: pzero22 A1-1 wurde mit NheI und KpnI verdaut; 500er Sonde: pzero22 A-2 wurde mit NheI und XhoI verdaut). Es wurden 10 µg DNA mit 20 Units des jeweiligen Restriktionsenzym

---

verdaut. Die Reaktionsbedingungen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers gewählt. Die verdaute Probe wurde elektrophoretisch auf einem 1,5 %-igen Agarose-Gel aufgetrennt und die entsprechende Bande mit einem Skalpell von dem übrigen Gel getrennt. Die DNA wurde mittels des *Gel-Extraction-Kit* aus dem Gel isoliert. Nach Aufreinigung des DNA-Fragments wurden 1 µg zur Kontrolle erneut in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und bildlich dokumentiert.

#### 4.3.12 Radioaktive Markierung von DNA

Für die radioaktive Markierung wurden 25 ng des DNA Fragments (4.3.11) eingesetzt. Die Markierung erfolgte mit Hilfe des *Rediprime Labelling Systems* (Amersham) unter Verwendung von [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP (6000 Ci/mmol, Amersham). Mittels Zentrifugation über Sephadex G-50 Säulen (Boehringer) wurde die Abtrennung freier Nukleotide durchgeführt. Die resultierenden Sonden hatten eine spezifische Aktivität zwischen 1 und 4 x 10<sup>9</sup> cpm/µg DNA und wurden in einem Hybridisierungsvolumen von 5 ml und 50 ml eingesetzt.

#### 4.3.13 Southern Blot

Die zu analysierenden DNA-Fragmente wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und das Gel in den folgenden Lösungen inkubiert. Durch Schwenken des Geles wurden die DNA-Fragmente zunächst für 30 min in 0,25 M HCl-Lösung denaturiert. Es folgte eine Inkubation in der Denaturierungs-Lösung von 2 x 20 min. Nach erfolgter Denaturierung der DNA wurde das Gel 2 x 20 min in der Neutralisierungs-Lösung geschwenkt. Zwischen den jeweiligen Waschschr

wurde das Gel mit MPW gespült. Der Transfer der DNA aus dem Gel auf die Duralose-Membran (Stratagene) erfolgte über Nacht durch Kapillarkraft. Für den Transfer wurde das Gel auf 15 mit 20 x SSC äquilibrierten Whatman 3 MM Papiere gelegt, und nacheinander mit der in Aqua dest. und 20 x SSC getränkten Duralose-Membran, mit 2 in 2 x SSC getränkten Whatman-Papieren und einem Stapel trockener Haushaltspapiere bedeckt. Der Transfer-Blot wurde durch ein Gewicht von ca. 500 g beschwert. Am nächsten Tag wurde der Blot abgebaut, die Membran beschriftet und die Slots mit Bleistift markiert. Die DNA wurde durch beidseitiges Crosslinken an der Membran fixiert. Die Lagerung der Membran erfolgte bei -20 °C.

#### 4.3.14 Prähybridisierung und Hybridisierung

Die Prä-, bzw. die Hybridisierung der Membranen erfolgte entweder einzeln in einem 50 ml Kunststoffröhrchen (Falcon) in 5 ml Hybridisierungslösung oder zu mehreren Membranen in einer Tupperdose als 50 ml Hybridisierungsansatz. Die Membranen wurden aus der -20 °C-Truhe genommen, kurz aufgetaut und mit Prähybridisierungs-Lösung befeuchtet. Die Membranen wurden dann in das Reaktionsgefäß überführt und in der Prähybridisierungs-Lösung für mindestens 1 h bei 42 °C inkubiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42 °C durch Hinzugabe der [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP markierten DNA-Sonde. Unspezifisch gebundene Sonde wurde am nächsten Tag durch folgende Waschschrirte entfernt:

Die Membranen wurden aus der Hybridisierungs-Lösung in 2 x SSC, 0,1 % SDS haltige Waschlösung überführt und 5 min bei Raumtemperatur auf einem Rotor in dieser geschwenkt. Die Waschschrirte wiederholten sich wie folgt: 2 x SSC, 0,1 % SDS (30 min bei Raumtemperatur); 2 x SSC, 0,1 % SDS (30 min bei 60 °C). Die verbleibenden Counts wurden nach Beendigung der Waschschrirte gemessen und die Membranen im noch feuchten Zustand in Plastik-Folie (Saran) gewickelt. Die

Membranen wurden für 4 Stunden einem *Phosphor-Imaging-Plate* exponiert und nach dessen Auswertung bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 7 Tage unter Verwendung eines Hyperfilm MP Röntgenfilm (Amersham) und eines signalverstärkenden *Screens* gelagert.

#### **4.3.15 DNA-Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung wurde nach der Didesoxyterminationmethode (Sanger *et al.* 1977) mit einem *ABI Prism 377 DNA Sequencer* (Perkin Elmer) unter Verwendung des *ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits* (Perkin Elmer) nach Angaben des Herstellers im Servicelabor durchgeführt. Es wurden jeweils  $1\text{ }\mu\text{g}$  DNA und  $10\text{ pmol}$  vom T7- bzw. M13-Standardprimern oder DNA-Sequenz-spezifischen Primern in einem  $8\text{ }\mu\text{l}$  Volumen eingesetzt.

## 5 Ergebnisse

Arg3.1 (Aktivitäts-reguliertes Gen) gehört zu den unmittelbar frühen Genen, welche durch synaptische Aktivität reguliert werden. Nach synaptischer Stimulation kommt es zur dendritischen Lokalisation der Arg3.1-mRNA. Vermutlich kann die lokale Synthese des Proteins an aktivierten Synapsen zu synapsenspezifischen Modifikationen beitragen (Link *et al.*, 1995; Steward *et al.*, 1998; Kuhl und Skehel, 1998).

Um die Rolle von Arg3.1 in der Regulation von plastischen Prozessen im ZNS und die Beteiligung von Arg3.1 an aktivitätsabhängigen Veränderungen wie der Gedächtnisbildung zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Mausmodell für einen konditionalen Arg3.1-Knockout hergestellt. Die für diesen Zweck verwendete *targeting* Strategie basiert auf dem Cre/loxP-Rekombinase System. Das Projekt beinhaltet die Zellkultur-Arbeit mit den embryonalen Stammzellen, welche sich aus der homologen und der Cre-vermittelten Rekombination zusammensetzt, sowie der Genotypisierung der jeweiligen ES-Zellen und der resultierenden Nachkommenschaft.

### 5.1 Konstruktion des konditionalen pconKO-arg3.1 *targeting* Vektors

#### 5.1.1 Entwurf des konditionalen *targeting* Vektors

Bei der klassischen Arg3.1-Knockout-Maus sind nur 3 % der Nachkommen aus den Verpaarungen heterozygot Arg3.1-defizienter Mäuse homozygot defizient (Dammermann, 1999). Um den zu einem hohen Prozentsatz embryonal letal

wirkenden Ausfall von Arg3.1 zu umgehen, sollte hier auf die Methode des *conditional gene targeting* (Gu *et al.*, 1994; Tsien, *et al.*, 1996) zurückgegriffen werden. Die Strategie des *conditional gene targeting* bietet eine elegante Methode, das Gen *in vivo*, limitiert auf einen speziellen Zelltyp (*tissue specific*) oder zeitlich begrenzt (*temporally specific*) abzuschalten. Durch die Cre-vermittelte Rekombination wird der genomische DNA-Abschnitt, der zwischen zwei durch homologe Rekombination eingeführten Erkennungssequenzen (*loxP site*) liegt, deletiert. zelltypspezifische, bzw. induzierbare Promotoren kontrollieren das Expressionsprofil der Cre-Rekombinase, und damit die Deletion des Gens. Um einen derartigen Ansatz, der gezielten Deletion verfolgen zu können, wurde ein entsprechender *targeting* Vektor pconKO-arg3.1 hergestellt.

### 5.1.2 Beschreibung des konditionalen *targeting* Vektors

Der *targeting* Vektor enthält zwei Homologiearme und die Sequenz eines positiven Selektionsmarkers. Zusätzlich wurden zwei 34 bp lange Erkennungssequenzen, die sogenannten *loxP-sites*, integriert, zwischen denen die Cre-vermittelte Rekombination stattfindet. Als positiver Selektionsmarker wurde das Gen der Neomycinphosphotransferase (*neo*) unter Kontrolle des ubiquitär exprimierenden Phosphoglycerolkinase-1-Promoters (PGK-1) verwendet. Wie sich bereits bei der homologen Rekombination des klassischen *targeting* Vektors gezeigt hat, wird am Arg3.1-Lokus durch den PGK-1-Promoter eine genügend effiziente Expression des *neo*-Gens erreicht, um die homolog rekombinierten Klone mit Geneticin selektionieren zu können. Um eventuelle Interferenzen des *neo*-Gens oder dessen regulatorischer Elemente mit der Expression des Zielgens oder benachbarter Gene zu verhindern, sollte die Sequenz des Neomycin-Resistenzgens durch zwei *loxP-sites* flankiert werden, und nach der Selektion der homolog rekombinierten Klone *in vitro* durch die

Cre-vermittelte Rekombinase deletiert werden (Pham *et al.*, 1996; Fiering *et al.*, 1995; Olson *et al.*, 1996). Die gefloخته neo-Kassette wurde an Position 2690 bp, in das zweite Intron integriert, um den Spleißprozeß der Arg3.1-mRNA nicht zu beeinträchtigen. Eine zu große Entfernung der einzelnen loxP-Sequenzen zur neo-Kassette, bzw. zum positiven Selektionsmarker bewirkt eine Verschlechterung der Kointegrationsrate (Torres und Kühn, 1997). Die Integration einer dritten loxP-Sequenz in den *targeting* Vektor sollte eine Inaktivierung des gesamten Gens ermöglichen, um dominant negative Effekte ausgehend von partiell translatierten Proteinen zu vermeiden. Andererseits sollten keine regulatorischen Elemente im Arg3.1-Promoter zerstört werden, weshalb die dritte loxP-site an Position -1720 bp integriert wurde. Es ist mit keiner Beeinflussung dieser loxP-Sequenz auf die Transkriptionsmaschinerie zu rechnen, da die am weitesten 5' gelegenen Promoterelemente auf Position -1589 bp im Arg3.1-Promoter liegen (R. Waltereit, persönliche Mitteilung) und damit die loxP-Sequenz deutlich stromaufwärts integriert wurde. Bei der Klonierung wurde auf eine ausreichende Länge der homologen Sequenz geachtet, um die Rekombinationsfrequenz zu erhöhen (Hasty *et al.*, 1991; Thomas & Capecchi, 1987). Der Homologiearm 5' von der einzelnen loxP-site liegend, hat eine Länge von ca. 2,1 kb und die sich stromabwärts des gefloختen positiven Selektionsmarkergens befindende homologe Sequenz hat eine Länge von ca. 8,0 kb. Der Vektor enthält stromabwärts der langen homologen Sequenz unter Kontrolle des Herpes-Simplex-Virus-Promoters (HSV) das Thymidin-Kinase-Gen, welches eine Negativ-Selektion gegen eventuelle Integrationen ermöglicht, und damit zu einer bis zu zehnfachen Anreicherung führen kann (Torres und Kühn, 1997). Die Abbildung 5.1 zeigt eine schematische Darstellung des konditionalen *targeting* Vektors.

Zur Herstellung des pconKO-arg3.1 Vektors,-siehe: (Dammermann, B., 1999)

### targeting Konstrukt



**Abb. 5.1 Schematische Darstellung des konditionalen targeting Konstrukts**

Die homologe Rekombination führt zu einer Integration einer loxP-Sequenz stromaufwärts der kodierenden Arg3.1 Region und der „geflochten“ Neomycin-Kassette, als positiver Selektionsmarker, in das 2. Intron.

### 5.1.3 Überprüfung des targeting Vektors durch Sequenzierung

Der pconKO-arg3.1 targeting Vektor wurde mit sequenzspezifischen Oligonukleotid-Primern sequenziert. Die Analysen zeigten 5' des offenen Leserahmens drei aufeinander folgende loxP-Sequenzen anstelle einer einzigen. Da diese die gleiche Orientierung aufwiesen, wurde davon ausgegangen, daß die Cre-vermittelte Rekombination zu den gewünschten Rekombinationstypen führt. In der Folge werden die drei aufeinanderfolgenden loxP-Sequenzen wie eine funktionelle behandelt.

### 5.1.4 Beschreibung der Screening-Strategien zur Detektion homologer und Cre-vermittelte Rekombinationen

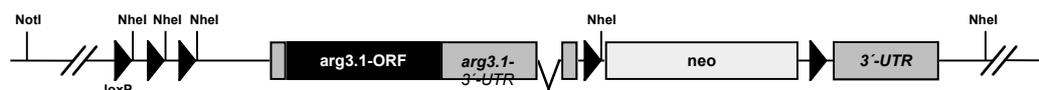
Bei der Mehrzahl der ES-Zellklone, die nach der Elektroporation mit dem targeting Vektor eine Selektion mit Geneticin überlebt haben, ist mit dem stabilen Einbau des Neomycin-Resistenzgens im Genom zu rechnen. Zu unterscheiden ist hier die zufällige Integration von Teilen des targeting Vektors von der gewünschten homologen Rekombination, bei der eines der beiden Allele spezifisch durch das Knockout-Konstrukt ersetzt wird.

Um eine homologe Rekombination zuverlässig detektieren zu können, wurde für den Vektor eine auf der Technik des Southern Blots basierende Screening-Methode

entwickelt. Durch den Einbau des verschiedene Extra-Sequenzen tragenden Knockout-Konstrukts anstelle des Wildtyp-Gens entsteht bei Verdau der aus den Zellen präparierten genomischen DNA Restriktionsfragmente unterschiedlicher, aber definierter Längen. Diese können durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden detektiert werden. Um die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer für die homologe Rekombination erwarteten Restriktionsfragmente bei zufälliger Integration zu verringern, sollte jeweils eine der Schnittstellen und zumindest eine Sonde außerhalb der Konstrukt-Sequenz liegen.

Die DNA der ES-Zellen wurde mit der Restriktionsendonuklease *NheI* geschnitten. Nach Hybridisierung mit der externen 700er Sonde ergibt sich für die homologe Rekombination am *Arg3.1*-Lokus ein Signal von 2,8 kb und nach Hybridisierung mit der internen 500er Sonde eine Bande bei 3,2 kb. Für den Wildtyp ergaben sich sowohl durch die 700er als auch durch die 500er Sonde ein Signal auf Höhe von 8,5 kb. Der genomische Locus vor und nach der homologen Rekombination, das zur Detektion verwendete Restriktionsenzym und die jeweiligen Sonden sind in der Abbildung 5.2 dargestellt.

### targeting Konstrukt



### Wildtyp Allel



### Allel nach homologer Rekombination



Sonde	Wildtyp-Allel	Allel nach Rekombination
-------	---------------	--------------------------

500	8,5 kb	3,2 kb
700	8,5 kb	2,8 kb

**Abb. 5.2 Schematische Darstellung des konditionalen targeting Vektors am genomischen Arg3.1-Lokus nach erfolgter homologer Rekombination**

Die homologe Rekombination führte zu einer Integration dreier aufeinander folgender, in gleicher Richtung orientierter loxP-Sequenzen stromaufwärts der kodierenden Arg3.1 Region und der neo-Kassette, als positiver Selektionsmarker, in das 2. Intron. Die homolog rekombinierten Klone können durch Southern Blot Analyse mit den <sup>32</sup>P-markierten 500er und 700er Sonden identifiziert werden.

Um die neo-Kassette zu entfernen, werden homolog rekombinierte Klone transient mit der Cre-Rekombinase transfiziert. Durch die Anwesenheit von drei loxP-Sequenzen ergeben sich mehrere Rekombinationsmöglichkeiten.

Die TypI-Rekombination entspricht hierbei der kompletten Deletion der Arg3.1-kodierenden Sequenz, mit Verlust der neo-Kassette und des durch zwei loxP-sites flankierten offenen Leserahmens von Arg3.1. Bei der TypII-Rekombination wird die neo-Kassette ebenfalls entfernt, doch bleibt der ORF (offener Leserahmen), flankiert von zwei loxP-Erkennungssequenzen, im Genom erhalten. Bei Kreuzung der heterozygot mutierten Tiere mit einem Cre-exprimierenden transgenen Mausstamm erhält man eine *in vivo* Deletion des ORF, weshalb dieser Deletionstyp für die Generierung konditionaler Arg3.1-Knockout-Mäuse genutzt wurde. Die nach der Cre-vermittelten Rekombination verbleibende neo-Kassette ist charakteristisch für die TypIII-Rekombination, welche für den weiteren Gebrauch bedeutungslos ist.

Die Identifizierung dieser verschiedenen Typen Cre-vermittelter Rekombination sollten ebenfalls mittels Southern Blot Analyse erfolgen.

Die ES-Zell-DNA wurde wiederum mit NheI geschnitten. Die drei Rekombinationstypen nach erfolgter Cre-vermittelter Rekombination zeigen ausnahmslos nach Hybridisierung mit der 5' liegenden 700er Sonde ein Signal von 2,8 kb. Das Signal der 500er Sonde ermöglichte die Unterscheidung der Rekombinationstypen. So zeigt der Wildtyp-Lokus unverändert ein Signal auf Höhe von 8,5 kb, die TypI-Deletion eine Bande für das rekombinierte Allel von 4,1 kb, die TypII-Deletion ein Signal von 6,0 kb und die TypIII-Deletion zeigt das Signal auf

Höhe von 3,5 kb. Es wird ersichtlich, daß die gewollten Rekombinationstypen, Deletion I und II durch die 500er Sonde eindeutig identifizierbar sind.

Abbildung 5.3 gibt eine Übersicht über die drei zu erwartenden Rekombinationstypen nach der Cre-vermittelten Rekombination und die entsprechenden Fragmentlängen.

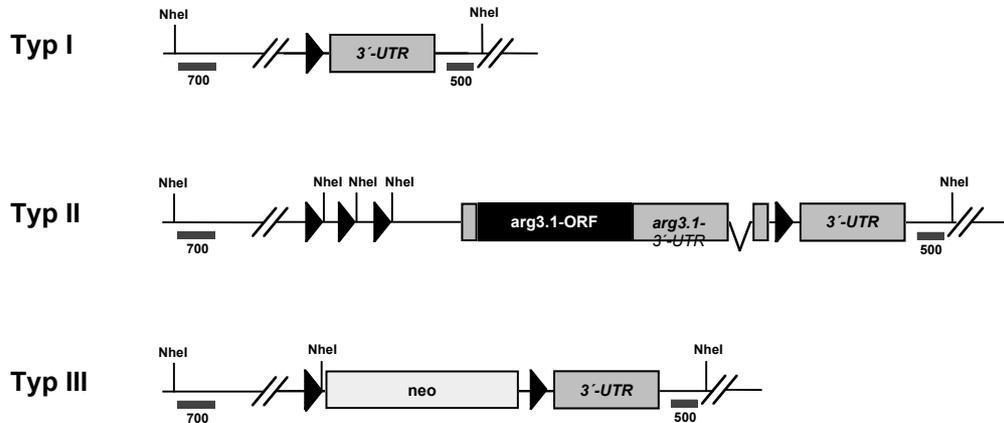
**Wildtyp-Allel**



**Allel nach homologer Rekombination**



**Allel nach Cre-vermittelter Rekombination**



Sonde	WT-Allel	Allel nach Rekombination	Allel nach Cre Vermittelter Rekombination		
			Typ I	Typ II	Typ III
500	8,5 kb	3,2 kb	4,1 kb	6,0 kb	3,5 kb
700	8,5 kb	2,8 kb	4,1 kb	2,8 kb	2,8 kb

**Abb. 5.3 Schematische Darstellung des Arg3.1 Locus nach erfolgter Cre-Rekombination**

Durch transiente Transfektion von Cre in ES-Zellen kommt es zu einer Cre-vermittelten Rekombination zwischen den loxP-Sequenzen des manipulierten Arg3.1-Lokus. Dabei kann es zu drei verschiedenen Rekombinationen kommen. Typ I entspricht der Rekombination zwischen den äußeren

---

LoxP-Sequenzen, während TypII und TypIII einer Rekombination zwischen einer der äußeren und der mittleren entsprechen. Für die Herstellung des konditionalen Knockouts werden Zellen benötigt, bei denen eine Rekombination des TypsII erfolgt ist. In der Tabelle sind die Fragmentlängen der verschiedenen Rekombinationstypen nach Hybridisierung mit der 500er und 700er Sonde angegeben.

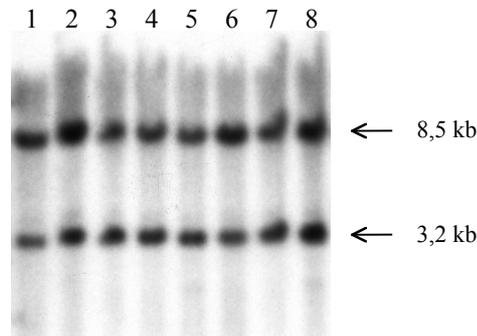
## 5.2 Herstellung von konditionalen Arg3.1-Knockout-Mäusen

### 5.2.1 Die homologe Rekombination

Aus der inneren Zellmasse von Blastozysten isolierte embryonale Stammzellen können auch nach genetischer Manipulation in der Zellkultur durch Reinjektion in Blastozysten in Keimzellen differenzieren.

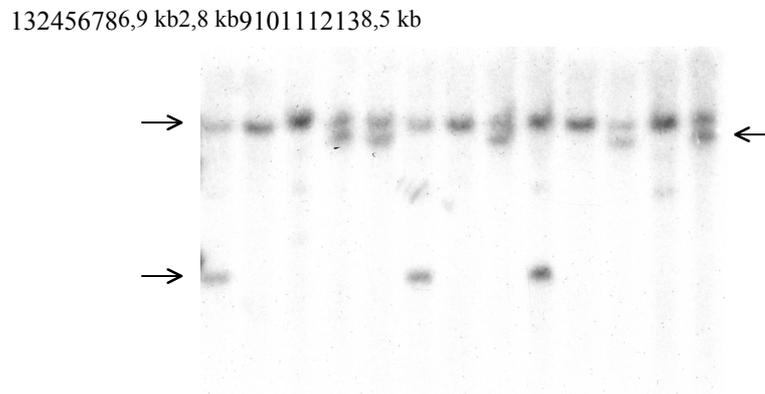
Für die stabile Transfektion wurden 30 µg des durch NotI-Verdau linearisierten pconKO-arg3.1 *targeting* Vektors eingesetzt, und in ca.  $5 \times 10^7$  ES-Zellen vom Typ R1 (Nagy *et al.*, 1993) transfiziert. Nach Geneticin-Selektion (175 µg/ml) wurde nach den Klonen gescreent, die durch die Elektroporation und homologe Rekombination eine stabile Integration des neo-Resistenzgens ins Genom erfahren haben. Nach individueller Kultivierung und Expansion von insgesamt 190 isolierten ES-Zellklonen, wurden 2/3 der jeweiligen Zellen eingefroren und das verbleibende 1/3 für die DNA-Präparation in Kultur weitere drei Tage expandiert. Die DNA der 190 ES-Zellklone1 wurde nach NheI-Verdau auf homologe Rekombination durch Southern Blot-Analyse untersucht. Mit Hilfe der 5' liegenden, externen 700er Sonde und der 3' liegenden, internen 500er Sonde konnten insgesamt 13 ES-Zellklone detektiert werden, bei denen anhand des spezifischen Bandenmusters von einer kompletten homologen Integration des *targeting* Vektors ausgegangen werden konnte. Dies entspricht einer Effizienzrate für die homologe Rekombination von 6,8 %. Wie in Abbildung 5.4a und 5.4b anhand eines Southern Blots dargestellt wurde, zeigten die für die homologe Rekombination

positiven Klone neben der bei 8,5 kb für das WT-Allel liegenden Bande, ein Signal von 3,2 kb, bzw. 2,8 kb.



**Abb. 5.4 a Southern Blot Analyse der ES-Zell-DNA nach erfolgter homologer Rekombination; Screen mit der 500er Sonde**

Die genomische DNA der ES-Zellklone wurde nach erfolgter stabiler Transfektion mit dem *targeting* Vektor mit der Restriktionsendonuklease *NheI* geschnitten. Die Hybridisierung mit der  $^{32}\text{P}$ -markierten 500er Sonde führte zu einem Signal auf Höhe von 8,5 kb für das WT-Allel und auf Höhe von 3,2 kb für das rekombinierte Allel (Spur 1-8).



**Abb. 5.4 b Southern Blot Analyse der ES-Zell-DNA nach erfolgter homologer Rekombination; Screen mit der 700er Sonde**

Nach Verdau der stabil transfizierten ES-Zell-DNA mit der Restriktionsendonuklease *NheI* zeigte sich nach Hybridisierung mit der  $^{32}\text{P}$ -markierten 700er Sonde ein Signal bei 8,5 kb für das WT-Allel und bei 2,8 kb für das homolog rekombinierte Allel (Spur 1, 6 und 9).

Wie erwartet, führt die homologe Rekombination des 3' gelegenen Vektoranteils am genomischen *Arg3.1*-Lokus zu einer Integration des Neomycin-Resistenzgens. Die

genomische DNA aller ES-Zellklone, welche nach Selektion präpariert werden konnte und mit *NheI* geschnitten wurde, zeigt demnach nach Hybridisierung mit der 3' gelegenen 500er Sonde ein Signal auf Höhe von 3,2 kb für das rekombinierte Allel (Abb. 5.4a).

Nach *NheI*-Verdau und Hybridisierung der ES-Zell-DNA mit der 5' gelegenen 700er Sonde, zeigen einige Klone eine Bande auf Höhe von 8,5 kb für das WT-Allel und eine zweite Bande auf Höhe von 6,9 kb (Abb. 5.4b, Spur: 4, 5, 8, 11,13).

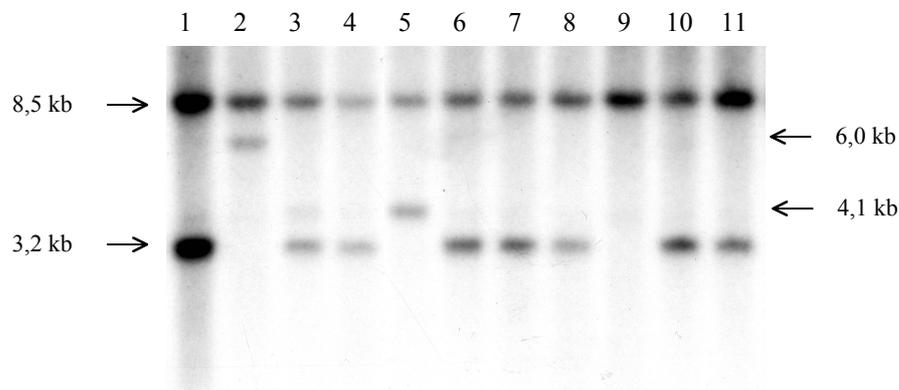
Bei einer homologen Rekombination 3' von der am weitesten 5' gelegenen loxP-Sequenz, kommt es zum Verlust dieser loxP-site und der dazugehörigen *NheI*-Schnittstelle. Die 700er Sonde detektiert dann ein Fragment, welches von der 5', extern gelegenen *NheI*-Schnittstelle bis zur nächsten *NheI*-site, welche an der geflochten neo-Kassette liegt, reicht. Dieses rekombinierte Fragment hat eine Größe von 6,9 kb.

### 5.2.2 Die Cre-vermittelte Rekombination

Um Effekte des Neomycin-Resistenzgens und seiner regulatorischen Elemente auf die Expression des Zielgens oder benachbarter Gene zu verhindern, muß die neo-Kassette nach Selektion entfernt werden. Dies gelingt durch transiente Transfektion des homolog rekombinierten Klons mit der Cre-Rekombinase.

Einer der für die homologe Rekombination positiven Klone (HB6) wurde aufgetaut und expandiert. Ca.  $1,2 \times 10^7$  Zellen wurden mit ca. 40 µg des nicht linearisierten Plasmids pCre-Pac (von M. Taniguchi, Kasugai; Taniguchi *et al.*, 1998) transfiziert. Da nach der transienten Transfektion keine Selektion stattfindet, wurden die Zellen stark verdünnt ausplattiert und für 6 Tage expandiert. Es wurden insgesamt 168 ES-Zellklone von der Platte genommen und für weitere 7 Tage individuell kultiviert und expandiert. Die Zellen von 126 der gepickten Klone wurden zu 2/3 eingefroren und

das verbleibende 1/3 für die DNA-Präparation genutzt. Nach NheI-Verdau wurde jeder der 126 ES-Zellklone durch Southern Blot Analyse genotypisiert. Die Proben wurden mit der 500er Sonde hybridisiert, um die unterschiedlichen Rekombinationstypen zu identifizieren. Bei den insgesamt 126 analysierten Klonen zeigte sich bei 3 Klonen (2,4 %) ein für die TypI-Deletion charakteristisches Bandenmuster, mit einem 8,5 kb großen Signal für das Wildtyp-Allel und einem zweiten Signal auf Höhe von 4,1 kb für das rekombinierte Allel. Ein die TypII-Deletion repräsentierendes Bandenmuster, 8,5 kb für das WT- und 6,0 kb für das rekombinierte Allel, zeigte sich bei einem Klon, 0,8 % entsprechend. Die TypIII-Deletion (8,5 kb und 3,5 kb) resultierte bei insgesamt 6 ES-Zellklonen, und somit bei 4,7 % der analysierten Klone. In Abbildung 5.5 sind die spezifischen Bandenmuster der einzelnen Rekombinationstypen anhand eines Southern Blots dargestellt.



**Abb. 5.5 Southern Blot Analyse der homolog rekombinierten ES-Zellklone nach Cre-vermittelter Rekombination, Screen mit der 500er Sonde**

Die ES-Zell-DNA wurde präpariert, mit der Restriktionsendonuklease NheI verdaut und mit Southern Blot analysiert. Nach Hybridisierung mit der <sup>32</sup>P-markierten 500er Sonde ergab sich für das WT-Allel ein Signal auf Höhe von 8,5 kb. Für das rekombinierte Allel ohne Cre-Rekombination ergab sich eine Bande auf Höhe von 3,2 kb (Spur 1, 3, 4, 6, 7, 8, 10 und 11). Nach Cre-Rekombination zeigte sich entsprechend der TypI-Rekombination ein Signal bei 4,1 kb (Spur 5) und für den TypII bei 6,0 kb (Spur 2).

Neben der erwarteten Rekombinationstypen zeigte sich bei 90 Klonen (71 %) durch die Signale von 8,5, bzw. 3,2 kb, daß keine Cre-vermittelte Rekombination stattgefunden hat, und das Allel somit noch im homolog rekombinierten Zustand

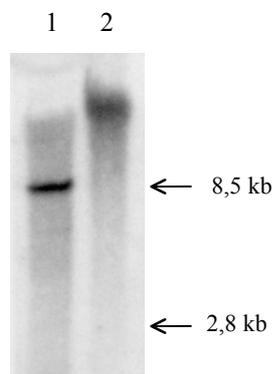
vorliegt. Festzuhalten ist, daß eine genaue Differenzierung zwischen homolog rekombinierten Klonen und Klonen, die für die TpyIII-Deletion positiv sind, auf Grund der ähnlichen Fragmentlänge nach NheI-Verdau, schwer möglich ist. 12,6 % der analysierten Klone sind Mischklone mit unreinem Bandenmuster. Insgesamt 10 der Klone (7,9 %) liegen genetisch als Wildtyp-Zellen vor, da sie lediglich ein Signal von 8,5 kb zeigen. Der für die TypII-Deletion positive ES-Zell-Klon (GC3) wurde aufgetaut, expandiert und in drei aufeinanderfolgenden Passagen eingefroren.

### **5.2.3 Blastozysteninjektion und Genotypisierung der F1-Generation**

Manipulierte ES-Zellen können in Blastozysten reinjiziert werden und nach deren Transfer in den Uterus von scheinträchtigen Ammen-Mäusen in alle Zelltypen einschließlich Keimzellen differenzieren. Die entstehenden Mäuse sind Chimäre aus den manipulierten ES-Zellen und den Wildtypzellen der Blastozysten. Haben die manipulierten ES-Zellen zur Keimbahn beigetragen, kann das mutierte Gen nach Kreuzung der Chimären mit Wildtyp Mäusen an die Nachkommen (F1) vererbt werden.

Der Klon, der das für die TypII-Deletion spezifische Bandenmuster nach Hybridisierung mit der 500er Sonde gezeigt hatte (GC3), wurde aufgetaut und in einer Verdünnungsreihe expandiert. Die aufgetauten Zellen wurden zur Kontrolle ihres Genotyps durch das Southern Blot Verfahren und Hybridisierung mit der 500er Sonde erneut analysiert. In Kooperation mit Herrn Dr. Ralf Waldschütz aus dem Institut von Herrn Prof. Olaf Pongs, wurden die Zellen in drei aufeinanderfolgenden Tagen in Embryonen des Blastozystenstadiums injiziert. Die Empfängerblastozysten entstammen der Mauslinie C57Bl/6. Den Blastozysten wurden jeweils 10 bis 14 ES-Zellen mikroinjiziert, und den Ammen pro Eileiter 5 Blastozysten, bzw. 10 Blastozysten pro Uterus implantiert. Von den insgesamt 3 präparierten Ammen, resultierte eine Nachkommenschaft von 5 männlichen und 2 weiblichen Jungtieren. Die implantierten Blastozysten des Stammes C57Bl/6 unterscheiden sich von den

manipulierten ES-Zellen vom Typ R1 des Stammes 129Sv x 129Sv-CP bezüglich den für die Fellfarbe kodierenden Agouti-Genlokus. Der Grad des Chimärismus läßt sich anhand des Anteils von agouti an der Fellfarbe abschätzen und ist somit ein Indiz für den von den ES-Zellen geleisteten Beitrag zur Keimzelle. Die Inspektion ergab einen hohen Chimärismus (> 90 %) in der gesamten Nachkommenschaft. Trotz wiederholtem Verpaarens der männlichen Chimären mit weiblichen Wildtyp-Mäusen resultierte in der F1-Nachkommenschaft nur ein Junges mit agoutifarbenem Fell. Die Schwanzbiopsie des F1-Nachkommen wurde mittels Southern Blot genotypisiert. Die DNA der Schwanzbiopsie zeigte nach NheI-Verdau und Hybridisierung mit der 5' extern liegenden 700er Sonde ausschließlich ein Signal auf Höhe der Wildtyp-Bande von 8,5 kb. Das für die TypII Deletion spezifische Signal auf Höhe von 2,8 kb, nach Hybridisierung mit der 700er Sonde, fehlte (Abb. 5.6).



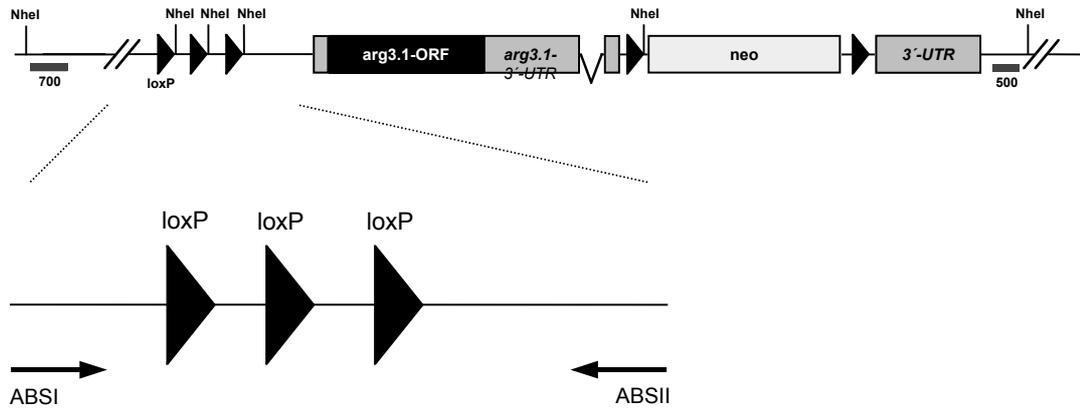
**Abb. 5.6 SouthernBlot Analyse von genomischer DNA aus einer Schwanzbiopsie**

Die Schwanzbiopsie-DNA wurde präpariert, mit der Restriktionsendonuklease NheI verdaut und mit Southern Blot analysiert (Spur 1). Nach Hybridisierung mit der <sup>32</sup>P-markierten 700er Sonde ergab sich für die Probe der vermeintlich heterozygoten Maus nur eine Bande auf Höhe der WT-Bande. Eine Bande, die dem rekombinierten Allel entspräche (2,8 kb), konnte nicht detektiert werden. Als Kontrolle wurde unverdaute DNA aufgetragen (Spur 2).

Zur Klärung des unvollständigen Bandenmusters wurden ES-Zellen des injizierten Klones (GC3, als positiv für die TypII-Deletion detektiert) aufgetaut, und die NheI verdaute DNA erneut durch einen Southern Blot und Hybridisierung mit der 500er und der 700er Sonde analysiert. Die 500er Sonde zeigte die erwarteten Signale von 8,5

kb für das WT-Allel und für das rekombinierte Allel entsprechend der TypII-Deletion von 6,0 kb. Durch die externe 700er Sonde wurde allerdings, wie bereits bei der Schwanzbiopsie, nur das WT-Allel mit einer Bande auf Höhe von 8,5 kb detektiert. Da der ES-Zellklon vor der Cre-vermittelten Rekombination durch beide Sonden abgesichert worden war, und durch das spezifische Bandenmuster von einer homologen Integration des *targeting* Vektors ausgegangen werden konnte, muß eine inkomplette Rekombination, bzw. eine Mutation während oder nach der Cre-Rekombination zu der Abweichung im Arg3.1-Genlocus geführt haben.

Eine stattgefundenen Mutation, bzw. Deletion in der 5', extern liegenden NheI-Sequenz des rekombinierten Allels, kann am ehesten erklären, daß trotz korrekter Detektion des für die TypII-Deletion spezifischen 6 kb großen Fragmentes mit der 500er Sonde, die 700er Sonde das zu erwartende 2,8 kb große Fragment nicht erfassen konnte. Zur detaillierten Analyse der ES-Zellklone HB6 und GC3 wurden zwei verschiedene PCR-Analysen durchgeführt. In der ersten Reaktion sollte anhand der PCR, bei Verwendung des Primerpaars ABSI und ABSII (siehe 4.3.1 und 3.8.4), der Sequenzabschnitt im Bereich der am weitesten stromaufwärts liegenden loxP-Sequenz amplifiziert werden. Das erwartete, amplifizierte Fragment hat bei der WT-Sequenz eine Größe von 157 bp, und bei der homolog rekombinierten DNA ein um drei loxP-Sequenzen (3 x 90 bp = 270 bp) entsprechend größeres Fragment von insgesamt 427 bp. Als *template* wurde WT-DNA, HB6-DNA, GC3-DNA und DNA der Schwanzbiopsie (F1 Nachkomme) eingesetzt. In der Abbildung 5.7 ist der *targeting* Vektor nach homologer Rekombination am genomischen Arg3.1-Lokus mit den Angriffspunkten der *sense* und *antisense* Primer, ABSI und ABSII, schematisch dargestellt. Die Abbildung 5.8 zeigt das entsprechende PCR-Bild.



**Abb. 5.7: Schematische Darstellung der Lage der Primer ABSI und ABSII**

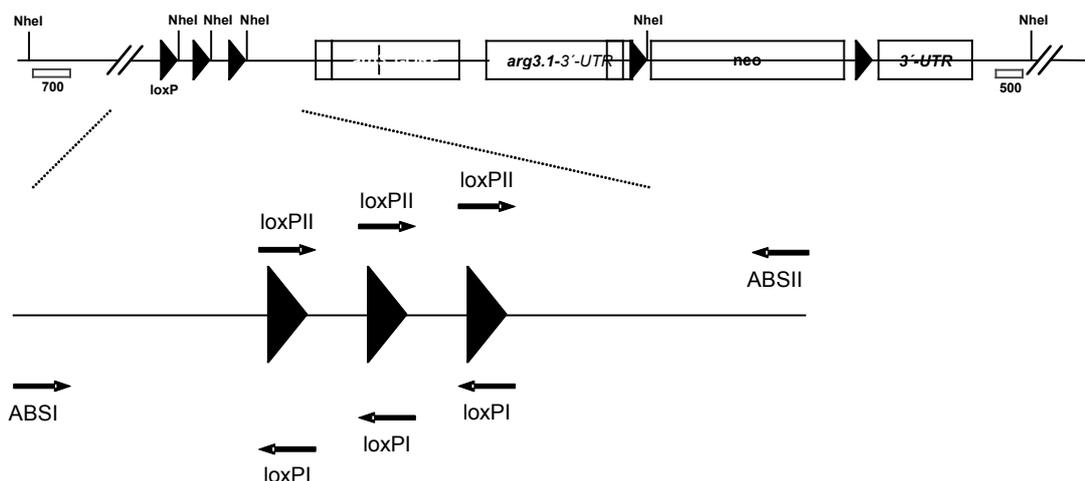
Wie erwartet, zeigt sich nach Amplifikation der Wildtyp-DNA ein 157 bp großes PCR-Produkt. Die Amplifikation der HB6-DNA und der Plasmid DNA, welche den pconKO-arg3.1 Vektor beinhaltet, führt jeweils zu einem 427 bp großem Fragment. Dieses beweist die Integration von drei loxP-Sequenzen im Bereich des amplifizierten Sequenzabschnitts. Die amplifizierte DNA des injizierten Klonen GC3 zeigt ausschließlich ein Signal auf Höhe von 157 bp für das WT-Allel. Eine vor oder während der Cre-vermittelten Rekombination stattgefundene Deletion, bzw. fehlerhafte Rekombination 5' des offenen Leserahmens, könnte das Fehlen des erwarteten 427 bp großen PCR-Produkts in dem amplifizierten DNA-Abschnitt erklären (s. S. 77).



**Abb. 5.8 PCR-Analyse der homolog rekombinierten ES-Zellklone nach Cre-vermittelter Rekombination**

Unter Anwendung der Primerpaare ABSI und ABSII wurde der Sequenzabschnitt im Bereich der am weitesten stromaufwärts liegenden loxP-Sequenzen amplifiziert. Als *template* wurde WT-DNA (Spur 1 und 2), DNA des ES-Zellklons vor der Cre-vermittelten Rekombination (HB6, Spur 3) und DNA des Klons nach Cre-vermittelter Rekombination (GC3, Spur 4 und 5) eingesetzt. Die DNA des Klons GC3 zeigt nach Amplifikation lediglich ein Signal auf Höhe von 157 bp, welches der WT-Sequenz entspricht, und somit die fehlerhaft verlaufende Cre-vermittelte Rekombination beweist. Die DNA des Klones HB6 zeigt neben dem Signal bei 157 bp für das WT-Allel, ein Signal bei 427 bp für das rekombinierte Allel. Da für jede integrierte loxP-Sequenz sich das WT-DNA entsprechende amplifizierte Fragment um 90 bp vergrößert, spricht das Signal auf Höhe von 427 bp für eine dreifache Integration der LoxP-Sequenz. In Spur 6 wurde Plasmid-DNA des pconKO-arg3.1 *targeting* Vektors als *template* eingesetzt. Man sieht ein 427 bp großes Amplifikat, welches dem des HB6-Klons entspricht. Abkürzungen: M: Marker.

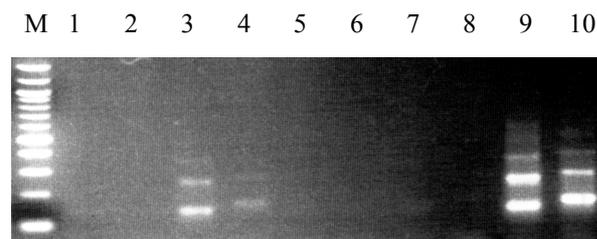
Für die zweite PCR-Reaktion wurden entweder der *sense* oder der *antisense* Primer, welche der Sequenz der loxP-site entsprachen (loxPI, loxPII), mit dem gegenläufigen Primer aus der ersten PCR-Reaktion (ABSI, ABSII) eingesetzt. Ziel war es, die DNA der Klone auf die Anzahl der integrierten loxP-Sequenzen im amplifizierten Abschnitt zu überprüfen. Als *template* wurde wiederum DNA von WT-Klonen, DNA vom Klon HB6 und DNA vom Klon GC3 eingesetzt. Die Abbildung 5.9 zeigt eine schematische Darstellung des Vektors und die Angriffspunkte der eingesetzten Primer. Die Abbildung 5.10 zeigt das dazugehörige PCR-Bild.



**Abb. 5.9: Schematische Darstellung der Primer ABSI, ABSII, loxPI und loxPII**

Wie erwartet resultierten nach Amplifikation der HB6-DNA drei Banden pro Ansatz. Diese entsprachen in ihrer Größe den loxP-Sequenz-Abständen (90 bp), und

bewiesen somit die dreifache, gleichgerichtete Integration der *loxP-sites* im amplifizierten Abschnitt des Vektors. Aus den Ansätzen, in denen die DNA des Klones GC3, bzw. WT-DNA als *template* eingesetzt worden war, konnten keine Fragmente amplifiziert werden.



**Abb. 5.10 PCR-Analyse der homolog rekombinierten ES-Zellklone nach Cre-vermittelter Rekombination als Nachweis der multiplen Integration der *loxP*-Sequenz**

Zur Amplifikation wurden die Primerpaare ABSI/*loxPI* (Spur 1, 3, 5, 7 und 9) bzw. ABSII/*loxPII* (Spur 2, 4, 6, 8, 10) eingesetzt. Als *template* diente die genomische DNA von Wildtyp-Klonen (Spur 1 und 2), von dem Klon HB6 (homolog rekombinierter Klon vor der Cre-vermittelten Rekombination, Spur 3 und 4), DNA von dem Klon GC3 (Klon nach der Cre-vermittelten Rekombination, Spur 5-8), und Plasmid-DNA des pconKO-arg3.1 *targeting* Vektors. Die Amplifikation der DNA des Klons HB6 und des *targeting* Vektors führte pro Ansatz zu drei Signalen, die in ihrer Größe den *loxP*-Sequenz-Abständen entsprachen. Diese Signale untermauerten die dreifache Integration der *loxP-site*. Unter Anwendung des Primerpaars ABSI/*loxPI* resultierten drei Signale auf der Höhe von 62 bp, 152 bp und 240 bp. Das Primerpaar ABSII/*loxPII* amplifizierte drei Fragmente, die eine Größe von 95 bp, 185 bp und 275 bp zeigten. Abkürzungen: M: Marker.

#### 5.2.4 Umklonierung des *targeting* Vektors

Da die PCR- und die Southern Blot-Analysen zeigten, daß es zu keiner TypII-Rekombination in den injizierten ES-Zellen gekommen war, wurde eine erneute stabile Transfektion angestrebt. Hierfür sollte ein *targeting* Vektor verwendet werden, welcher nur eine *loxP-site* 5' vom offenen Leserahmen enthält. Der Vektor wurde demnach wie folgt umkloniert:

Das Plasmid pBS-EagI (von R. Waltereit, AG Kuhl), welches den Arg3.1-Genabschnitt mit den drei aufeinanderfolgenden *loxP*-Sequenzen enthält, wurde mit NheI verdaut und nach gelelektrophoretischer Auftrennung isoliert. Dadurch wurden zwei *loxP*-Sequenzen entfernt. Das Plasmid mit einer verbleibenden *loxP-site* wurde aus dem Gel extrahiert und religiert. Nach Amplifikation in Bakterien wurde die

Plasmid-DNA mit NotI und FseI geschnitten. Durch gelelektrophoretische Auftrennung wurde der Plasmidanteil, welcher die *loxP-site* integriert, isoliert und aus dem Gel extrahiert.

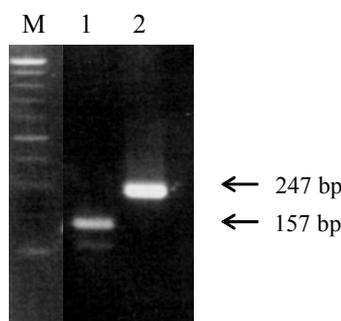
Das Plasmid, welches das ursprüngliche *pconKO-arg3.1 targeting* Konstrukt mit drei aufeinanderfolgenden *loxP-sites* 5' des ORF integriert, wurde nach Amplifikation in Bakterien ebenfalls mit FseI und NotI geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt, und der von den *loxP-sites* getrennte Plasmidanteil aus dem Gel extrahiert.

Durch Ligation der beiden extrahierten Plasmidanteile wurde Plasmid-DNA gewonnen, welche den neuen *pconKO-arg3.1 targeting* Vektor mit nunmehr einer einzelnen *loxP-site* 5' des offenen Leserahmens integriert. Vor der erneuten Transfektion wurde die Plasmid-DNA in Bakterien amplifiziert.

### 5.2.5 Funktionalitätstest der loxP-Sequenzen und Überprüfung des strukturellen Aufbaus des *targeting* Vektors

Der strukturelle Aufbau des *targeting*-Vektors wurde durch den XhoI, NheI, NotI, und einen XhoI/NotI-Doppelverdau überprüft. Darüber hinaus wurden die loxP-Erkennungssequenzen, der offene Leserahmen, wie die neo-Kassette durch Sequenzierung überprüft. Um die Funktionalität der loxP-Sequenzen vor der stabilen Transfektion in ES-Zellen zu testen, wurde der *targeting* Vektor in transgene Cre-Rekombinase-exprimierende *E.coli* Bakterien (294-Cre) (Buchholz *et al.*, 1996) transfiziert. Anschließend wurde die Plasmid DNA präpariert und mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Nach der Gelelektrophorese zeigte sich jeweils ein für die TypI Rekombination charakteristisches Bandenmuster, wie es bei der konstitutiven Expression der Cre-Rekombinase zu erwarten war.

Die stromaufwärts liegende loxP-Sequenz wurde mit dem Primerpaar ABSI und ABSII in einer PCR amplifiziert. Das Ergebnis zeigte ein eindeutiges Signal auf Höhe von 247 bp, welches für die Integration einer 90 bp großen loxP-Sequenz im amplifizierten DNA-Abschnitt spricht. Somit konnte dieses Signal sicher von dem Wildtyp-spezifischen Amplifikationsprodukt von 157 bp, abgegrenzt werden. Die Abbildung 5.12 zeigt das dazu gehörige PCR-Bild.

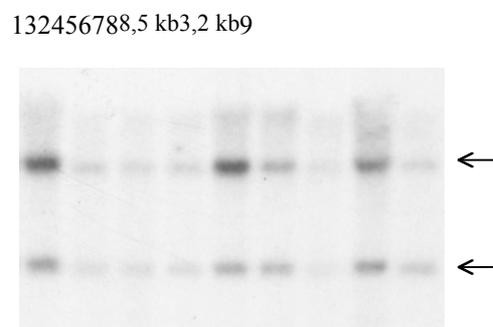


**Abb. 5.12: PCR-Analyse des unklonierten Konstrukts mit dem Sondenpaar ABSI/ABSII.**

Nach der PCR sieht man bei der WT-DNA ein Signal auf Höhe von 157 bp (Spur 1). In Spur 2 wurde das neue Konstrukt als *template* eingesetzt, was zu einem 247 bp großen Amplifikat führt, und somit die Integration einer einzelnen, 90 bp großen loxP-Sequenz beweist.

### 5.2.6 Erneute homologe Rekombination

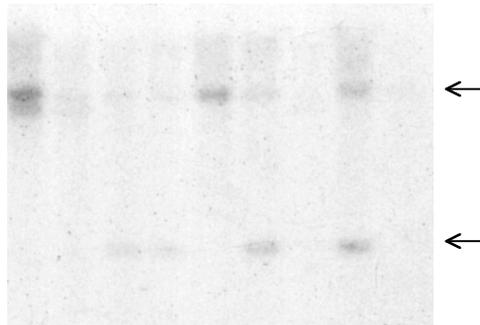
Das Plasmid, welches den umklonierten Vektor enthält, wurde mit dem Restriktionsenzym NotI linearisiert. Für die stabile Transfektion wurden ca.  $5 \times 10^7$  embryonale Stammzellen der Linie R1 aus der 17. Passage und  $33 \mu\text{g}$  der linearisierten Plasmid-DNA eingesetzt. Die resultierende Zeitkonstante betrug 0,06 msec. Nach der Selektion mit Geneticin ( $175 \mu\text{g/ml}$ ) wurden insgesamt 168 ES-Zellklone von der Platte genommen (gepickt) und individuell expandiert. Von 108 Klonen wurde die genomische DNA präpariert, und nach NheI-Verdau durch das Southern Blot-Verfahren analysiert. 16 ES-Zellklone zeigten nach Hybridisierung mit der 700er Sonde ein Bandenmuster von 8,5 kb für das WT-Allel und 2,8 kb für das homolog rekombinierte Allel. Nach Hybridisierung mit der internen Sonde resultierten bei diesen Klonen Banden bei 8,5 kb für das WT-Allel und auf der Höhe von 3,2 kb für das rekombinierte Allel. Die Rate für die homologe Rekombination des *targeting* Vektors am genomischen Arg3.1-Lokus beträgt 14,8 %, und liegt somit deutlich höher als nach der stabilen Transfektion mit dem ersten Konstrukt. Die Abbildungen 5.13 zeigen die Southern Blot Analysen der ES-Zell-DNA nach Transfektion mit dem umklonierten Vektor.



**Abb. 5.13 a** Southern Blot Analyse der ES-Zell-DNA nach erfolgter homologer Rekombination; Screen mit der 500er Sonde

Die genomische DNA der ES-Zellklone wurde, nach erfolgter stabiler Transfektion mit dem *targeting* Vektor, mit der Restriktionsendonuklease *NheI* geschnitten. Die Hybridisierung mit der  $^{32}\text{P}$ -markierten 500er Sonde führte zu einem Signal auf Höhe von 8,5 kb für das WT-Allel und auf Höhe von 3,2 kb für das rekombinierte Allel (Spur 1-9).

132456786,9 kb2,8 kb9



**Abb. 5.13 b Southern Blot Analyse der ES-Zell-DNA nach erfolgter homologer Rekombination; Screen mit der 700er Sonde**

Nach Verdau der stabil transfizierten ES-Zell-DNA mit der Restriktionsendonuklease *NheI* zeigte sich nach Hybridisierung mit der  $^{32}\text{P}$ -markierten 700er Sonde ein Signal bei 8,5 kb für das WT-Allel und bei 2,8 kb für das homolog rekombinierte Allel (Spur 3,4, 6 und 8).

## 6 Diskussion

Aktivitätsabhängige morphologische Veränderungen spielen in der Ontogenese, bei Lernvorgängen und bei neuropathologischen Erkrankungen eine wichtige Rolle. Für ein besseres Verständnis der Prozesse, welche aktivitätsabhängiger synaptischer Plastizität zugrunde liegen, ist die Aufklärung der Funktion der beteiligten Proteine von großem Interesse. Eine wichtige Rolle könnte dabei dem aktivitätsabhängigen Gen Arg3.1 zukommen. Die Lokalisation der Arg3.1-Transkripte an aktivierten Dendriten (Steward *et al.*, 1998) ermöglicht die lokale Synthese des Proteins, das dann zu synapsenspezifischen Modifikationen beitragen könnte. Neben der entfernten Verwandtschaft zu der gehirnspezifischen Isoform von  $\alpha$ -Spektrin gibt es jedoch keine weiteren Hinweise auf die Funktion des Arg3.1-Proteins. Die Beteiligung von Arg3.1 an plastischen Prozessen wie der Ausbildung von LTP oder Gedächtnis kann durch Analyse dieser Phänomene in Knockout-Mäusen, bei denen das Arg3.1-Gen inaktiviert wurde, untersucht werden. Basierend auf dem klassischen Knockout-Prinzip generierte Arg3.1-defiziente Mäuse sind zu einem hohen Prozentsatz im homozygoten Zustand embryonal letal. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung des Cre/loxP-Systems ein Arg3.1-Mausmodell etabliert, welches in Zukunft eine konditionale, bzw. zeitlich oder räumlich begrenzte Ausschaltung der genetischen Arg3.1-Information *in vivo* ermöglichen wird.

### 6.1 Der klassische Arg3.1-Knockout mit einer geringen Penetranz der Nullmutanten

Nur insgesamt 3 % der Nachkommen aus der Verpaarung heterozygot Arg3.1 defizienter Mäuse konnten mittels PCR und Southern Blot Verfahren als homozygote

Mutationsträger detektiert werden (Dammermann, 1999). Die Analyse der Embryonen, die aus einer gezielten Verpaarung heterozygot Arg3.1-defizienter Mäuse resultierten, zeigte, daß homozygot Arg3.1-defiziente Tiere zwar noch im Uterus implantiert werden, es jedoch kurze Zeit später in fast allen Fällen zum Abort kommt (Dammermann, 1999). Morphologische Defekte wie desorganisiertes Gewebe, Störungen der viszeralen, entodermalen Formationen und eine komplette Separation des extraembryonalen von dem embryonalen Gewebe, führt bei Arg3.1-Nullmutanten zu einem Absterben bereits vor der Gastrulation und einer Resorption *in utero* ab E7,5.

Der *targeting* Vektor des klassischen Arg3.1-Knockouts wurde so kloniert, daß nicht die komplette kodierende Region von Arg3.1 deletiert wurde, sondern lediglich die letzten zwei Drittel. Diese sind im *targeting* Vektor ersetzt durch das LacZ-Reportergen und eine gefloxtete neo-Kassette als Selektionsmarker. Daran schließt sich die 3'-untranslatierte Region von Arg3.1 an.

Die Northern-Blot-Analyse mit einer Sonde komplementär zum deletierten Arg3.1-Fragment zeigte die Abwesenheit dieses Fragments auch unter Bedingungen, die zu einer Induktion der Arg3.1-mRNA Expression führen. Das Translationsprodukt der entstehenden Arg3.1/LacZ Hybrid-mRNA wurde durch Western-Blot-Analyse näher charakterisiert. Es entsteht ein ca. 150 kDa großes Fusionsprotein aus den ersten 133 AS von Arg3.1 und den etwa 1000 AS aus der  $\beta$ -Galaktosidase (Dammermann, 1999). Die klassischen Arg3.1-Knockout-Mäuse exprimieren also kein Arg3.1-Protein, sondern ein Arg3.1/ $\beta$ -Gal-Fusionsprotein. Das räumlich-zeitliche Expressionsmuster dieses Fusionsproteins nach synaptischer Aktivität wurde in Gehirnschnitten näher untersucht. Wie bei dem endogenen Arg3.1 kam es in den Körnerzellen des Gyrus dentatus zu einer starken Induktion der Proteinexpression nach synaptischer Aktivität. Im Gegensatz zur dendritischen Lokalisation des endogenen Arg3.1 blieb die Expression des Arg3.1/ $\beta$ -Gal-Fusionsproteins auf die Zellsomata beschränkt. Da die Hybrid-mRNA aus Arg3.1/LacZ nicht in die

Dendriten transportiert wurde (Dammermann, 1999), scheint es keine Mechanismen zu geben, die eine dentritische Lokalisation des Arg3.1/ $\beta$ -Gal-Fusionsproteins bewirken können. Weiterhin auffällig ist die induzierte ektopische Arg3.1/ $\beta$ -Gal-Expression in der CA1-Region, die der Induktion der LacZ-mRNA folgt. Neben den vermutlich dominant negativen Effekten des Arg3.1/ $\beta$ -Gal-Fusionsproteins kann der beobachtete Phänotyp der klassischen Knockout-Maus ebenfalls durch die Anwesenheit des positiven Selektionsmarkers (neo-Kassette) im Genom der Maus erheblich beeinflusst werden. Untersuchungen des  $\beta$ -Globin-Lokus veranschaulichen inwieweit die neo-Sequenz regulatorische Einflüsse auf die Expression benachbarter Gene nehmen kann. Die Substitution mittels homologer Rekombination des regulatorischen Elements 5'-HS2 in der Locus-Kontroll-Region des  $\beta$ -Globin-Gens durch eine PGK-neo-Kassette führte bei den homozygot defizienten Tieren embryonal zu einer Reduktion der Expression aller Gene des  $\beta$ -Globin-Lokus um das 2-5 fache des Ausgangswerts. Die verminderte Expression führte zur Letalität der Embryonen *in utero*, wohingegen eine Elimination der neo-Kassette *in vitro* mit einer normalen Gen-Expression in den homozygoten Mutationsträgern einherging, welche in dem nach Mendel erwarteten Verhältnis geboren werden konnten (Fiering *et al.*, 1995). Diese Ergebnisse zeigen, daß nicht die Deletion des 5'-HS2 zur Letalität der Embryonen führte, sondern die Anwesenheit der neo-Kassette, und geben nur ein Beispiel für die zahlreichen regulatorischen Effekte, die von dem im Genom integrierten Selektionsmarker ausgehen können.

## **6.2 Herstellung des konditionalen *targeting* Vektors pconKO-arg3.1 und Etablierung eines konditionalen Mausmodells für Arg3.1**

Die homologe Rekombination in ES-Zellen (*embryonic stem cells*) der Maus und die Generation von Mauslinien als Träger einer spezifischen Mutation wurde zu einer

---

häufig angewandten Methode zur Untersuchung der Genfunktion *in vivo*. Sowohl elektrophysiologische, anatomische wie auch Verhaltensanalysen dieser Mauslinien führten zu einem besseren Verständnis von komplexen physiologischen Mechanismen wie Lernen und Gedächtnis (Mayford *et al.*, 1997).

Um etwaige dominant negative Effekte des Arg3.1/ $\beta$ -Gal-Fusionsproteins und regulatorische Einflüsse der neo-Kassette auf die phänotypischen Ausprägung der Arg3.1-Knockout-Maus ausschließen zu können, wurde in dieser Arbeit ein konditionaler Arg3.1-*targeting* Vektor kloniert und mittels homologer Rekombination am genomischen Arg3.1-Lokus integriert. Durch die Integration einer durch Erkennungssequenzen flankierten neo-Kassette 3' des offenen Leserahmens von Arg3.1 und einer einzelnen Erkennungssequenz 5' des Leserahmens, führt die *in vitro* durchgeführte Cre-vermittelte Rekombination zu drei verschiedenen Deletionstypen, bzw. Rekombinationsmustern. Das für die Generierung der konditionalen Knockout-Maus entscheidende Muster entspricht der TypII-Rekombination, mit dem charakteristischen Verbleib des offenen Leserahmens, welcher von zwei loxP-Erkennungssequenzen flankiert ist. Einen eindeutigen Vorteil bietet die TypII-Deletion gegenüber dem klassischen Knockout durch den frühen, bereits *in vitro* stattfindenden Verlust der neo-Kassette. Dadurch kann das Auftreten eventueller regulatorischer Effekte auf das Arg3.1-Gen oder benachbarter Gene vermieden werden. Die TypI-Rekombination entspricht der kompletten Deletion des Arg3.1-Gens, mit Verlust sowohl der neo-Kassette als auch des offenen Leserahmens. Embryonale Stammzellen, bei denen eine TypI-Rekombination nachgewiesen werden konnte, wurden für die Generation einer Arg3.1-Knockout-Maus genutzt, um anhand derer den beobachteten embryonalen Phänotyp der klassischen Knockout-Maus zu überprüfen.

---

## **6.2.1 Das Cre/loxP-Rekombinase System erlaubt die Generation zelltypspezifischer und zeitlich begrenzter somatischer Mutationen in der Maus**

### **6.2.1.1 Die Cre-gesteuerte Rekombination unter Kontrolle eines zelltypspezifischen Promoters**

Bei Tieren, bei denen das Zielgen homozygot durch loxP-Erkennungssequenzen flankiert vorliegt (TypII-Deletion), kommt es durch Kreuzung mit transgenen Tieren, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle von zelltypspezifischen Promotern exprimieren, zu einer gezielten Deletion in dem Gewebe, indem der Promoter aktiv ist. Eine Reihe von transgenen Mauslinien, bei denen es zu einer Cre-Expression in einem zelltypspezifischen Gewebe kommt, wurden bereits beschrieben. Neueste Beispiele für eine zelltypspezifische Deletion in spezifischen Zelluntergruppen ist der Knockout des Insulinrezeptorgens im Skelettmuskel (Brüning *et al.*, 1998) und in den Insulin sezernierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas (Kulkarni *et al.*, 1999). Durch den Gebrauch verschiedener Transgener, dem Mausstamm MCK-Cre, bei dem die Cre-Expression unter der Kontrolle des *muscle creatine kinase*-Promoters steht, und dem RIP-Cre-Stamm mit integriertem Insulin-Promoter, kann ein und dasselbe Gen in unterschiedlichem Gewebe ausgeschaltet werden, so dass im Rahmen der Zelltypspezifität kontextspezifischere Untersuchungen durchgeführt werden können. Für die Funktionsanalyse des Arg3.1-Gens ist es interessant, die genetische Information spezifisch im Gewebe des zentralen Nervensystems auszuschalten. Ein Kennzeichen der Arg3.1-Expression ist die starke Induktion nach synaptischer Aktivität. In Kontrolltieren sehen wir eine schwache konstitutive Expression von Arg3.1 im Cortex und in der CA1 Region des Hippocampus. Synaptische Aktivität, die beispielsweise durch einen epileptischen Anfall ausgelöst werden kann, führt zu einer dramatischen Erhöhung der Expression der Arg3.1-mRNA im Cortex und

---

stärker noch im Gyrus dentatus (Link *et al.*, 1995). Um das regionale Expressionsmuster im ZNS von Arg3.1 anhand des konditionalen, zelltypspezifischen Knockouts möglichst genau zu erfassen, ist die Kreuzung zwischen den für die TypII Rekombination homozygot detektierten Knockout-Mäusen und dem transgenen Mausstamm CaMKIIa-Cre interessant. Die Cre-gesteuerte Rekombination findet bei diesen Transgenen unter Verwendung des *Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II*-Promoters statt. So kommt es zu einer Rekombination mit resultierender Deletion des flankierten Genabschnittes in Bereichen des Vorderhirns, speziell in den Pyramidenzellen der CA1-Region (Tsien *et al.*, 1996; Kellendonk *et al.*, 1999). Ebenfalls wäre eine Kreuzung mit der Nestin-Cre-transgenen Maus zu erwägen, da durch deren embryonale Cre-Expression ab Tag E9,5 in Vorläuferzellen des ZNS (Orban, persönliche Mitteilung) Rückschlüsse auf eventuelle Einflüsse von Arg3.1 auf die frühe neuronale Entwicklung gemacht werden könnten.

#### **6.2.1.2 Aktivierung der Cre-vermittelte Rekombination durch Anwesenheit von synthetischen Liganden**

Die Cre-vermittelte Rekombination kann selektiv durch Applikation synthetischer Drogen aktiviert werden, wodurch eine zeitliche Kontrolle der genspezifischen Deletion gewährleistet werden kann. Durch Fusion des Cre-Proteins an genetisch veränderte LBDs (ligand-binding domain) des Progesteron-Rezeptors (Kellendonk *et al.*, 1996), des Estrogen-Rezeptors (Feil *et al.*, 1996) oder des Glukokortikoid-Rezeptors (Brocard *et al.*, 1998), kommt es durch Applikation des synthetischen Liganden der spezifischen LBD zur Aktivierung des Cre-Proteins und folgend zur Rekombination, bzw. zur Deletion der geflochten Sequenz in kultivierten Säugetierzellen. Die alleinige Aktivierung anhand des synthetischen, nicht jedoch des

---

physiologisch vorliegenden Liganden, ist die Voraussetzung für die Steuerung des Knockouts. Neben den *in vitro* Experimenten wurden bereits einige transgene Mauslinien etabliert, die entweder eine durch Tamoxifen (CreER<sup>T</sup>) oder durch RU486 (CrePR1) induzierbare Cre-vermittelte Rekombination aufweisen. Durch Kombination des CrePR1-Fusions-Proteins mit den regulierenden Sequenzen der Calcium/Calmodulin-abhängigen KinaseII $\square$  oder des Thy-1-Gens, konnten transgene Mausstämme (CaMKIIa-CrePR1; Thy1-CrePR1) etabliert werden, bei denen die Applikation von RU486 zu einer Cre-vermittelten Rekombination im Hippocampus und im Cortex führt (Kellendonk *et al.*, 1999). Die Vereinigung des *celltype-* und *temporally-specific-gene targeting* im Gehirn, eröffnet auch für die kontextspezifische Funktionsanalyse des Arg3.1-Gens neue Perspektiven.

### 6.3 Die Grenzen der Cre-Expressionskontrolle

Es eröffnet sich eine Vielzahl von forschungsrelevanten Perspektiven durch die Cre-exprimierenden transgenen Mausstämme. Deren Anwendbarkeit wird jedoch durch zwei molekularbiologische Probleme limitiert. Zum einen kann es durch die sogenannte "leckende" Cre-Expression (*'leaky' expression*), zu einer inkompletten, bzw. fehlerhaften Cre-vermittelten Rekombination kommen, aus der Rekombinationsereignisse im falschen Gewebe (Betz *et al.*, 1996), und/oder zum unkorrekten Zeitpunkt (Kühn *et al.*, 1995; St-Onge *et al.*, 1996; Schmedt 1998) resultieren. Als Folge würde beispielsweise die fehlerhafte Aktivität eines Promoters bereits während der frühen Embryogenese, zu einer fast ubiquitären Präsenz der rekombinierten DNA im adulten Tier führen.

Die sogenannte Mosaik-Expression (*mosaic expression*) des Cre-Proteins verhindert das Auftreten einer gleichmäßigen und vollständigen Rekombination in allen Zellen

---

einer Gewebeart. Das verdeutlicht, daß durch diese und ähnliche Ereignisse der Anwendung der Cre-Expression *in vivo* Grenzen gesetzt sind.

Das von Hermann Bujard entwickelte Tetracyclin-regulierte-System erlaubt eine sowohl zeitlich als auch räumlich gesteuerte Induktion der Genexpression. Durch die systemische Anwesenheit von dem hirschrängängigen Doxycyclin kommt es zur Bindung des Transaktivators tTA an den *tetO*-Promoter und somit zur Unterdrückung der Cre-Proteinexpression (Furth *et al.*, 1994; Gossen *et al.*, 1995). Andererseits wird die Genexpression in dem rtTA (*reverse system*) durch Applikation des Doxycyclins induziert (Mansuy *et al.*, 1998). Trotz erfolgreicher Etablierung beider Systeme trat wiederholt die Schwierigkeit auf, die durch ein Pharmakon induzierte, bzw. unterdrückte Genexpression über einen längeren Zeitraum konstant zu halten. In einem lebenden Organismus kommen viele Faktoren, wie physiologische Toleranzen oder auch Stoffwechsel spezifische Variabilitäten, zusammen. Diese beeinflussen die Pharmakokinetik und verändern somit den Wirkungsgrad eines Pharmakons. Es ist daher leicht vorstellbar, daß der Pharmakonspiegel physiologischen Schwankungen unterliegt. Um einen permanent vorhandenen effektiven Doxycyclin-Spiegel zu gewährleisten, der das Auftreten von *leaky*- oder *mosaic*-Expressionen des Cre-Proteins minimieren würde, wäre eine engmaschige Titer-Kontrolle oder aber eine unüblich hohe Dosierung indiziert. Wie eng die therapeutische Breite (Verhältnis des toxischen Bereichs zum therapeutischen, bzw. tolerierten effektiven Bereich) für manche Pharmakons sein kann, zeigte sich bei der induzierbaren Cre-Expression des Cre-ERt-Fusionsproteins unter Kontrolle des *Wnt1*-Promoters. Aufgrund einer geringen Affinität des applizierten Tamoxifens zu den mutierten LBD mußte der synthetische Stoff, um eine effiziente Induktion erreichen zu können, in einer fast teratogenen Dosis gegeben werden (Rossant und McMahon, 1999).

Für eine frühe Detektion fehlerhafter Cre-gesteuerter Rekombinationen und für die korrekte phänotypische Analyse der Knockout-Maus ist es notwendig, die zeitlichen

---

und räumlichen Rekombinationsmuster der Cre-exprimierenden Maus auf zellulärer Ebene zu kennen. Obwohl es bis heute noch keinen spezifischen Antikörper gibt, welcher eine Cre-Detektion in allen Geweben ermöglichen würde, besteht die Alternative das Cre-Protein mit dem grün-fluorezierendem-Protein (GFP) zu fusionieren, und somit einen optischen Marker für Cre-Expression zu erhalten (Gagneten *et al.*, 1997). Eine Abwesenheit von Cre in einer bestimmten Zelle und zu einem bestimmten Zeitpunkt, wäre jedoch nicht unmittelbar gleichbedeutend mit einer nicht abgelaufenen Rekombination, da es bei der transienten Cre-Expression auch bereits zu einem früheren Zeitpunkt zu einer stattgefundenen Rekombination gekommen sein kann. Eine weitere Möglichkeit zur Funktionskontrolle einer Cre-gesteuerten Rekombination, bieten die sogenannten Reporter-Mauslinien (z.B. pcActXstopXlacZ (Tsien *et al.*, 1996)). Diese Tiere integrieren in ihrer genetischen Sequenz eine gefloxt (durch Erkennungssequenzen flankiert) Kasette, dessen Deletion zu einer Expression eines zellulären Marker-Proteins, beispielsweise dem  $\beta$ -Galaktosidase-Marker, führt (Kellendonk *et al.*, 1999). In jüngsten Veröffentlichungen wurden bereits einige Reporter-Stämme beschrieben (Lobe *et al.*, 1999; Mao *et al.*, 1999; Soriano *et al.*, 1999), die in Zukunft ihre Anwendung bei der Cre-Expressions-Kontrolle in verschiedenen konditionalen Knockout-Mäusen finden werden.

#### **6.4 Die TypI-Deletion als Ausgangspunkt für die Herstellung eines kompletten Knockouts**

Die Injektion von TypI-Deletion spezifischen Zellen führte zur Generierung einer Mauslinie, bei der sowohl der komplette offene Leserahmen von Arg3.1 als auch die Neomycin-Kasette deletiert sind.

Die im Rahmen des *conditional gene targeting* gewonnene Knockout-Linie wurde genutzt, um den bei der klassischen Arg3.1-Konckout-Linie beobachteten Phänotyp

---

zu überprüfen. Diese Linie zeigt im Gegensatz zu der klassischen Knockout-Linie eine Nachkommenschaft, welche in dem nach Mendel erwarteten Verhältnis geboren wurden (N. Plath, persönliche Mitteilung). Vermutlich hat deshalb nicht der frühembryonale Verlust des Arg3.1-Proteins zu den beschriebenen Entwicklungsdefekten mit resultierender erhöhten embryonalen Letalität und einer verminderten Penetranz bei der klassischen Arg3.1-Knockout-Linie geführt, sondern die eventuell dominant negativen Effekte des exprimierten Arg3.1/ $\beta$ -Gal-Fusionsproteins. Desweiteren können etwaige regulatorische Einflüsse der neo-Kassette als Ursache des bei der klassischen Knockout-Linie beschriebenen Phänotyps diskutiert werden.

## 6.5 Ausblick

Nach erneuter transienten Transfektion der homolog rekombinierten ES-Zellen mit dem Cre-Rekombinase-exprimierenden Plasmid und Identifizierung der Rekombinationstypen mittels Southern Blot- und PCR-Analysen, konnten im Anschluß an diese Arbeit aus den manipulierten ES-Zellen zwei Mauslinien generiert werden.

Durch die Etablierung von Arg3.1 defizienten Mäusen, basierend auf dem Cre/loxP-System, konnte die hohe embryonale Letalität des klassischen Arg3.1-Knockouts umgangen werden. Damit konnten elektrophysiologische Untersuchungen zur Langzeitpotenzierung (LTP) und Verhaltenstests wie der Morris *water maze* mit diesen Mäusen durchgeführt werden.

Die Verpaarung von Mäusen, die homozygot für den von loxP-*sites* flankierten offenen Leserahmen von Arg3.1 sind, mit CaMKII-Cre Transgenen soll zur Etablierung einer konditionalen Arg3.1-Mauslinie führen. Die zelltypspezifische Cre-Expression unter dem CaMKII-Promoter soll eine Deletion des mit loxP-Sequenzen

flankierten Arg3.1-Gens in den Pyramidenzellen der CA1-Region ermöglichen. Etwaige Veränderungen in der konditionalen Knockout-Maus könnten somit einer bestimmten Hirnregion zugeordnet werden.

Sowohl die Arg3.1 defiziente Mauslinie, als auch die Mauslinie, bei welcher der offene Leserahmen des Arg3.1 Gens durch loxP-Sequenzen flankiert ist, werden in Zukunft hilfreich sein, um weitere Erkenntnisse über die Funktion von Arg3.1 zugewinnen.

## 7 Zusammenfassung

Aktivitätsabhängige Veränderungen von neuronalen Verbindungen sind von grundlegender Bedeutung für die Entwicklung des Zentralen Nervensystems und für die Fähigkeit des adulten Gehirns, Informationen über lange Zeit zu speichern. Solche langanhaltenden Veränderungen in der synaptischen Stärke sind abhängig von Gentranskription und Translation. Ein spezifisches Beispiel kann in der Expression des Arg3.1 Gens gesehen werden. Synaptische Stimulierung führt zur dramatischen Induktion der Arg3.1 mRNA Synthese und Protein-Expression; die Arg3.1 mRNA wird rasch in die dendritischen Prozesse der aktivierten Neurone transportiert. Infolgedessen könnte die Arg3.1 mRNA lokal translatiert werden und eine Schlüsselrolle bei synapsenspezifischen Modifikationen während plastischer Ereignisse im Gehirn spielen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein auf dem Cre/loxP-System basierender *targeting* Vektor für den genomischen Arg3.1 Locus hergestellt. Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) wurden mit der DNA des linearisierten Vektors elektroporiert, und dadurch stabil transfiziert. Homolog rekombinierte ES-Zell-Klone, die eine loxP-Sequenz 5' des offenen Leserahmens von Arg3.1 sowie eine mit loxP-Sequenzen flankierte Neomycin-Kassette im 3'-Bereich des Arg3.1 Locus trugen, konnten mittels Southern Blot-Analyse identifiziert werden. Die Zellen einer der homolog rekombinierten Klone wurden expandiert und mit einem Cre-exprimierenden Plasmid transfiziert. Die transiente Expression der Cre-Rekombinase in diesen ES-Zellen führte zu drei Rekombinationstypen, die mittels Southern Blot-Analysen unterschieden werden konnten. ES-Zellen, bei denen sowohl die Neomycin-Kassette als auch das gesamte Arg3.1 Gen deletiert waren, und ES-Zellen, in denen die Neomycin-Kassette deletiert und das Arg3.1 Gen von loxP-Sequenzen flankiert war, wurden aufbewahrt. Die von der Neomycin-Resistenzkassette eventuell ausgehenden regulatorischen Effekte konnten in beiden ES-Zelllinien somit umgangen werden.

Im Anschluß an meine Arbeit konnten durch Injektion der hergestellten ES-Zelllinien in Blastozysten zwei Mauslinien generiert werden. Eine der Mauslinien ist für Arg3.1 defizient, die andere trägt einen von loxP-Sequenzen flankierten offenen Arg3.1-Leserahmen. Dies erlaubt eine zelltypspezifische oder zeitlich steuerbare Deletion des Arg3.1 Gens. Weiterführende Experimente mit diesen Tieren sollen zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen beitragen, die Lernen und Gedächtnis, aber auch pathologischen Veränderungen der neuronalen Plastizität zugrunde liegen.

## 8 Literatur

ABEL, T., NGUYEN, P.V., BARAD, M., DEUEL, T.A., KANDEL, E.R. und BOURTCHOULADZE, R. (1997) Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell* 88, 615-626.

ABRAHAM, W. C., MASON, S. E., DEMMER, J., WILLIAMS, J. M., RICHARDSON, C. L., TATE, W. P., LAWLOR, P.A. und DRAGUNOW, M. (1993) Correlations between immediate early gene induction and the persistence of long-term potentiation. *Neuroscience* 56, 717-727.

ALMENDRAL, J.M., SOMMER, D., MACDONALD-BRAVO, H., BURCKHARDT, J., PERERA, J. und BRAVO-R. (1988) Complexity of the early genetic response to growth factors in mouse fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 8, 2140-8.

ANNIS, C.M., O'DOWD, D.K. und ROBERTSON, R.T. (1994) Activity-dependent regulation of dendritic spine density on cortical pyramidal neurons in organotypic slice cultures. *J. Neurobiol.* 25, 1483-93.

ANTONINI, A. und STRYKER (1993) Rapid remodeling of axonal arbors in the visual cortex. *Science* 260 (5115), 1819-21.

ARANCIO, O., KIEBLER, M., LEE, C.J., LEV-RAM, V., TSIEN, R.Y., KANDEL, E.R. und HAWKINS, R.D. (1996) Nitric oxide acts directly in the presynaptic Neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Cell* 87, 1025-1035.

ARMAN, E., HAFFNER-KRAUSZ, R., CHEN, Y., HEATH, J.K. und LONAI, P. (1998) Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5082-87.

ASHLEY, C.T., WILKINSON, K.D., REINES, D. und WARREN, S.T. (1993) FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science* 262, 563-566.

AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A. und STRUHL, K. (1991) Current Protocols in Molecular Biology. Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School.

BAILEY, C.H., BARTSCH, D. und KANDEL, E.R. (1996) Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13445-13452.

BAIMBRIDGE, K.G., CELIO, M.R. und ROGERS, J.H. (1992) Calcium-binding proteins in the nervous system. *TINS* 15,8, 303-8.

BALDARELLI, R.M., MAHONEY, P.A., SALAS, F., GUSTAVSON, E., BOYER, P.D., CHANG, M.F., ROARK, M. und LENGYEL, J.A. (1988) Transcripts of the *Drosophila* blastoderm-specific locus, terminus, are concentrated posteriorly and encode a potential DNA-binding finger. *Dev Biol* 125, 85-95.

- BANBURY CONFERENCE ON GENETIC BACKGROUND IN MICE (1997) Mutant mice and neuroscience: recommendations concerning genetic background. *Neuron* 19, 755-9.
- BARNES, C.A., JUNG, M.W., MCNAUGHTON, B.L., KOROL, D.L., ANDREASSON, K. und WORLEY, P.F. (1994) LTP saturation and spatial learning disruption: effects of task variables and saturation levels. *J. Neurosci.* 14, 5793-5806.
- BARRIA, A., MULLER, D., DERKACH, V., GRIFFITH, L.C. und SODERLING, T.R. (1997) Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaMKII during long-term potentiation. *Science* 276, 2042-2045.
- BARTSCH, D., CASADIO, A., KARL, K.A., SERODIO, P. und KANDEL, E.R. (1998) CREB1 encodes a nuclear activator, a repressor, and a cytoplasmic modulator that form a regulatory unit critical for long-term facilitation. *Cell* 95, 211-223.
- BARTSCH, D., GHIRARDI, M., SKEHEL, P. A., KARL, K. A., HERDER, S. P., CHEN, M., BAILEY, C. H. und KANDEL, E. R. (1995) Aplysia CREB2 represses long-term facilitation: relief of repression converts transient facilitation into long-term functional and structural change. *Cell* 83, 979-992.
- BATES, C.A. und KILLACKY, H.P. (1985) The organization of the neonatal rat's brainstem trigeminal complex and its role in the formation of central trigeminal patterns. *J. Comp. Neurol.* 240, 265-87.
- BAUDRY, M., BUNDMAN, M.C., SMITH, E.K., und LYNCH, G. (1981) Micromolar calcium stimulates proteolysis and glutamate binding in rat brain synaptic membranes. *Science* 212, 937-938.
- BAZAN, N.G. und ALLAN, G. (1996) Platelet-activating factor in the modulation of excitatory amino acid neurotransmitter release and of gene expression. *J. Lipid Mediators and cell signalling* 14, 321-330.
- BENNET, V. (1985) The membrane skeleton of human erythrocytes and its implications for more complex cells. *Ann. Rev. Biochem.* 54, 273-304.
- BERRY, F.B. und BROWN, I.R. (1996) CaMKII mRNA is localized to apical dendrites during postnatal development of neurons in the rat brain. *J. Neurosci. Res.* 43, 565-575.
- BERTRAM S. und GASSEN H.G. (1991) Gentechnische Methoden. G. Fischer, Stuttgart.
- BETZ, U. A. K., VOSSHENRICH, A. J., RAJEWSKY, K. und MÜLLER, W. (1996) Bypass of lethality with mosaic mice generated by Cre-loxP-mediated recombination. *Curr. Biol.* 6, 1307-1316.
- BHAT, R.V., WORLEY, P.F., COLE, A.J. und BARABAN, J.M. (1992) Activation of the zinc finger encoding gene krox-20 in adult rat brain: comparison with zif268. *Mol. Brain Res.* 13, 263-266.
- BIAN, F., CHU, T., SCHILLING, K. und OBERDICK, J. (1996) Differential mRNA transport and regulation of protein synthesis: selective sensitivity of Purkinje cell dendritic mRNAs to translation inhibition. *Mol. Cell. Neurosci.* 7, 116-133.

- BINDER, R., HOROWITZ, J.A., BASILION, J.P., KOELLER, D.M., KLAUSNER, R.D. und HARFORD, J.B. (1994) Evidence that the pathway of transferrin receptor mRNA degradation involves an endonucleolytic cleavage within the 3'UTR and does not involve poly(A) tail shortening. *EMBO J.* 13, 1969-80.
- BLICHENBERG, A., SCHWANKE, B., REHBEIN, M., GARNER, C.C., RICHTER, D. und KINDLER S. (1999) Identification of a cis-acting dendritic targeting element in MAP2 mRNAs. *J. Neuroscience*, submitted.
- BLISS, T.V.P. und LOMO, T. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232, 331-356.
- BLISS, T.V.P. und COLLINRIDGE, G.L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39.
- BLUM, S., MOORE, A. N., ADAMS, F. und DASH, P. K. (1999) A Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade in the CA1/CA2 Subfield of the Dorsal Hippocampus Is Essential for Long-Term Spatial Memory. *J. of Neuroscience* May, 1999, 19(9), 3535-3544.
- BONYADI, M., RUSHOLME, S.A.B., COUSINS, F.M., SU, H.C., BIRON, C.A., FARRALL, M. und AKHURST, R.J. (1997) Mapping of a major genetic modifier of embryonic lethality in TGF $\beta$ 1 knockout mice. *Nature genetics* 15, 207-211.
- BOURTOULADZE, R., FRENGUELLI, B., BLENDY, J., CIOFFI, G., SCHUTZ, G. und SILVA, A. (1994) Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element binding protein. *Cell* 79, 59-68.
- BRAKEMAN, P.R., LANAHAN, A.A., O'BRIEN, R., ROCHE, K., BARNES, C.A., HUGANIR, R.L. und WORLEY, P.F. (1997) Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386, 284-288.
- BRANDON, E.P., IDZERDA, R.L. und MCKNIGHT, G.S. (1995) Targeting the mouse genome: a compendium of knockouts. *Curr. Biol.* 5, 625-34 (part I), 758-65 (part II), 873-81 (part III).
- BRANDON, E.P., ZHUO, M., HUANG, Y.Y., QI, M. und GERHOLD, K.A. (1995) Hippocampal long-term depression and depotentiation are defective in mice carrying a targeted disruption of the gene encoding the RI beta subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8851-55.
- BRAUN, I.C., ROHRBACH, E., SCHMITT, C. und IZAURRALDE, E. (1999) TAP binds to the constitutive transport element (CTE) through a novel RNA-binding motif that is sufficient to promote CTE-dependent RNA export from the nucleus. *EMBO J.* 18, 1953-1965.
- BROCARD, J., FEIL, R., CHAMBON, P. und METZGER, D. (1998) A chimeric Cre recombinase inducible by synthetic, but not by natural ligands of the glucocorticoid receptor. *Nucleic Acids Research* 26, 17, 4086-4090.
- BUCHS, P.-A. und MULLER, D. (1996) Induction of long-term potentiation is associated with major ultrastructural changes of activated synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 8040-8045.

- BUCHHOLZ, F., ANGRAND, P.O. und STEWART, F. (1996) A simple assay to determine the functionality of Cre or FLP targete in genomic manipulation constructs. *Nucleic Acids Research* 24, 15, 3118-9.
- BURGIN, K.E., WAXHAM, M.N., RICKLING, S., WESTGATE, S.A., MOBLEY, W.C. und KELLY, P.T. (1990) In situ Hybridization Histochemistry of Ca<sup>2+</sup>/ Calmodulin-Dependent Protein Kinase in Developing Rat Brain. *J. Neurosci.* 10, 1788-1798.
- BURNETTE, W.N. (1981) "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112, 195-201.
- BURNS, R.G. und ISLAM, K. (1984) Stoichiometry of microtubule-associated protein (MAP2):tubulin and the localisation of the phosphorylation and cysteine residues along the MAP2 primary sequence. *Eur. J. Biochem.* 141, 599-608.
- CHANG, F.L.F. und GREENUOGH, W.T. (1984) Transient and enduring morphological correlates of synaptic activity and efficacy change in the rat hippocampal slice. *Brain Res.* 309, 35-46.
- CHENG, J.G., TIEDGE, H. und BROSIUS, J. (1996) Identification of BC1 RNP particels. *DNA Cell. Biol.* 15, 549-559.
- CHEN, C., KANO, M., ABELIOVICH, A., CHEN, L., BAO, S., KIM, J.J., HASHIMOTO, K., TOMPSON, R.F. und TONEGAWA, S. (1995) Impaired motor coordination correlates with persistent multiple climbing fiber innervation in PKC $\epsilon$  mutant mice. *Cell* 83, 1233-42.
- CHEN, C. und TONEGAWA, S. (1997) Molecular genetic analysis of synaptic plasticity, activity-dependent neural development, learning, and memory in the mammalian brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 20, 157-84.
- CHEN, C., RAINNIE, D.G., GREENE, R.W. und TONEGAWA, S. (1994) Abnormal fear response and aggressive behavior in mutant mice deficient for  $\epsilon$ -Calcium-Calmodulin Kinase II. *Science* 266, 291-294.
- CHIAIA, N.L., BENNET-CLARKE, C.A. und RHOADES, R.W. (1992) Differential effects of peripheral damage on vibrissa-related patterns in trigeminal nucleus principalis, subnucleus interpolaris, and subnucleus caudalis. *Neuroscience* 49, 141-156.
- CHICUREL, M.E., TERRIAN, D.M. und POTTER, H. (1993) mRNA at the synapse: analysis of a synaptosomal preparation enriched in hippocampal dendritic spines. *J. Neurosci.* 13, 4054-4063.
- CHURCHILL, M.E.A., TULLIUS, T.D. und KLUGE, A. (1990) Mode of interaction of the zinc finger protein TFIIIA with a 5S RNA gene of *Xenopus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 5528-5532.
- COLE, A. J., SAFFEN, D. W., BARABAN, J. M. und WORLEY, P. F. (1989) Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation. *Nature* 340, 474-476.
- CRAIR, M. C. und MALENKA, R. C. (1995) A critical period for long-term potentiation at thalamocortical synapses. *Nature* 375(6529), 325-8.

- CRINO, P.B. und EBERWINE, J. (1996) Molecular characterization of the dendritic growth cone: Regulated mRNA transport and local protein synthesis. *Neuron* 17, 1173-1187.
- CRINO, P.B., KHODAKHAH, K., BECKER, K., GINSBERG, S., HEMBY, S. und EBERWINE, J. (1998) Presence and phosphorylation of transcription factors in developing dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 2313-2318.
- DALY, T.J., COOK, K.S., GRAY, G.S., MAIONE, T.E. und RUSCHE, J.R. (1989) Specific binding of HIV-1 recombinant Rev protein to the rev-responsive element in vitro. *Nature* 342, 816-819.
- DAMMERMANN, B. (1999) Dissertation: Herstellung und Charakterisierung einer Arg3.1-Knockout-Maus
- DANDEKAR, T. und HENTZE, M.W. (1995) Finding the hairpin in the haystack: searching for RNA motifs. *Trends Genet* 11, 45-50.
- DASH, P. K., HOCHNER, B. und KANDEL, E. R. (1990) Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of Aplysia sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature* 345, 718-721.
- DAVIS, R.L. und SQUIRE, L.R. (1984) Protein synthesis and memory: a review. *Psychol. Bull.* 96, 518-559.
- DAVIS, L., BANKER, G.A., und STEWARD O. (1987) Selective dendritic transport of RNA in hippocampal neurons in culture. *Nature* 330, 477-479.
- DEFELIPE, J. HENDRY, S.H. und JONES, E.G. (1989) Visualization of chandelier cell axons by parvalbumin immunoreactivity in monkey cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2093-97.
- DEISSEROTH, K., BITO, H. und TSIEN, R.W. (1996) Signaling from synapse to nucleus: postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity. *Neuron* 16, 89-101.
- DIDONATO, J.A., HAYAKAWA, M., ROTHWARF, D.M., ZANDI, E. und KARIN, M. (1997) A cytokine-responsive I $\kappa$ B kinase that activates the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Nature* 388, 548-553.
- DOETSCHMAN, T., GREGG, R.G., MAEDA, N., HOOPER, M.L., MELTON, D.W., THOMPSON, S. und SMITHIES, O. (1987) Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 330, 5765-68.
- DOETSCHMAN, T.C., EISTETTER, H., KATZ, M. SCHMIDT, W. und KEMLER, R. (1985) The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands, and myocardium. *J Embryol Exp Morph* 87, 27-45.
- DOLPHIN, A.C., ERRINGTON, M.L. und BLISS, T.V.P. (1982) Long-term potentiation of the perforant path in vivo is associated with increased glutamate release. *Nature* 297, 496-498.

- DRAGUNOW, M. und ROBERTSON, H.A. (1987) Kindling stimulation induces c-fos protein(s) in granule cells of the rat dentate gyrus. *Nature* 329, 441-442.
- DRAGUNOW, M., ABRAHAM, W. und HUGHES, P. (1996) Activation of NMDA and muscarinic receptors induces nur-77 mRNA in hippocampal neurons. *Mol. Brain Res.* 36, 349-356.
- DRAPER, D.E. (1995) Protein-RNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 593-620.
- DUGICH-DJORDJEVIC, M.M., TOCCO, G., WILLOUGHBY, D.A., NAJM, I., PASINETTI, G., THOMPSON, R.F., BAUDRY, M., LAPCHAK, P.A. und HEFTI, F. (1992). BDNF mRNA expression in the developing rat brain following kainic acid-induced seizure activity. *Neuron* 8, 1127-1138.
- DUMAS, S., JAVOY-AGUÍD, F., HIRSCH, E., AGID, Y. und MALLET, J. (1990) Tyrosine hydroxylase gene expression in human ventral mesencephalon: detection of tyrosine hydroxylase messenger RNA in neurites. *J. Neurosci. Res.* 25, 569-575.
- ENGERT, F. und BONHOEFFER, T. (1997) Synapse specificity of long-term potentiation breaks down at short distances. *Nature* 388, 279-84.
- ENGERT, F. und BONHOEFFER, T. (1999) Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399, 66-70
- ENGLISH, J.D. und SWEATT, J.D. (1997) A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long-term potentiation. *J. Biol. Chem.* 272, 19103-19106.
- EVANS, M.J. und KAUFMAN, M.H. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-6.
- FEIG, S. und LIPTON, P. (1993) Pairing the Cholinergic Agonist Carbachol with Patterned Schaffer Collateral Stimulation Initiates Protein Synthesis in Hippocampal CA1 Pyramidal Cell Dendrites via a Muscarinic, NMDA-Dependent Mechanism. *J. Neurosci.* 13, 1010-1021.
- FEIL, R., BROCARD, J., MASCREZ, B., LEMEURE, M., METZGER, D. und CHAMBON, P. (1996) Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 10887-10890.
- FIERING, S., EPNER, E., ROBINSON, K., ZHUANG, Y., TELLING, A., HU, M., MARTIN, D.I.K., ENVER, T., LEY, T.J. und GROUNDINE, M. (1995) Targeted deletion of 5'-HS2 of the murine beta-globin LCR reveals that it is not essential for proper regulation of the beta-globin locus. *Genes Dev.* 9, 18, 2203-13.
- FLINT, J., CORLEY, R., DEFRIES, J.C., FUKLER, D.W., GRAY, J.A., MILLER, S. und COLLINS, A.C. (1995) A simple genetic basis for a complex psychological trait in laboratory mice. *Science* 269, 1432-5.
- FORT, P., MARTY, L., PIECHACZYK, M., EL SABROUTY, S., DANI, C., JANTEUR, P. und BLANCHARD, J.M. (1985) Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Res.* 13, 1431-1442.

- FRANK, D.A. und GREENBERG, M.E. (1994) CREB: A mediator of long-term memory from mollusks to mammals. *Cell* 79, 5-8.
- FREY, U., KRUG, M., REYMANN, K.G. und MATTHIES, H. (1988) Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro. *Brain Res.* 452, 57-65.
- FREY, U., FREY, S., SCHOLLMEIER, F. und KRUG, M. (1996a) Influence of actinomycin D, a RNA synthesis inhibitor, on long-term potentiation in rat hippocampal neurons in vivo and in vitro. *J. Physiol.* (London) 490, 703-711.
- FREY, U., MÜLLER, M. und KUHL, D. (1996b) A different form of long-lasting potentiation revealed in tissue plasminogen activator mutant mice. *J. Neurosci.* 16, 2057-2063.
- FURTH, P. A., ST.ONGE, L., BÖGER, H., GRUSS, P., GOSSEN, M., KISTNER, A., BUJARD, H. und HENNIGHAUSEN, L. (1994) Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 9302-9306.
- FURUICHI, T., SIMON-CHAZOTTES, D., FUJINO, I., YAMADA, N., HASEGAWA, M., MIYAWAKI, A., YOSHIKAWA, S., GUENET J.L. und MIKOSHIBA, K. (1993) Widespread Expression of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 1 Gene (Insp3r1) in the Mouse Central Nervous System. *Recept Channels* 1, 11-24.
- GAGNETEN, S., LE, Y., MILLER, J., SAUER, B. (1997). Brief expression of a GFPcre fusion gene in embryonic stem cells allows rapid retrieval of site-specific genomic deletions. *Nucleic Acids Res.* 25, 3326-3331.
- GARNER, C.G., TUCKER, R.P. und MATUS, A. (1988) Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. *Nature* 336, 674-677.
- GEINISMAN, Y., MORRELL, F. und DETOLEDO-MORRELL, L. (1992). Increase in the number of axospinous synapses with segmented postsynaptic densities following hippocampal kindling. *Brain Research* 569, 341-347.
- GEINISMAN, Y., DETOLEDO-MORRELL, L., MORRELL, F., PERSINA, I.S. und BEATTY, M.A. (1996) Synapse restructuring associated with the maintenance phase of hippocampal long-term potentiation. *J. Comp. Neurol.* 368, 413-423.
- GERLAI, R. (1996) Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype ? *TINS* 19, 177-181.
- GIESE, K.P., FEDOROV, N.B., FILIPKOWSKI, R.K. und SILVA, A.J. (1998). Autophosphorylation at Thr286 of the  $\square$  calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science* 279, 870-873.
- GOODMAN, C. S. und SHATZ, C. J. (1993) Development mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Neuron* 10, 77-98.
- GOSSEN, M., FREUNDLIEB, S., BENDER, G., MÜLLER, G., HILLEN, W. und BUJARD, H. (1995) Transcriptional Activation by Tetracyclines in Mammalian Cells. *Science* 268, 1766-1769.

- GOSSLER, A., DOETSCHMAN, T., KORN, R., SERFLING, E. und KEMLER, R. (1986) Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 23, 9065-9.
- GORDON, J.A., CIOFFI, D., SILVA, A.J. und STRYKER, M.P. (1996) Deficient plasticity in the primary visual cortex of  $\square$ -Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II mutant mice. *Neuron* 17, 491-99.
- GRANT, S. G. N., O'DELL, T. J., KARL, K. A., STEIN, P. L., SORIANO, P. und KANDEL, E. R. (1992). Impaired Long-Term Potentiation, Spatial Learning, and Hippocampal Development in fyn Mutant mice *Science* 258, 1903-1910.
- GREENBERG, M.E., HERMANOWSKI, A.L. und ZIFF, E.B. (1986). Effect of protein synthesis inhibitors on growth factor activation of c-fos, c-myc, and actin gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* 6, 1050-7.
- GU, H., MARTH, J. D., ORBAN, P. C., MOSSMANN, H. und RAJEWSKY, K. (1994) Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265, 103-6.
- GU, H., ZOU, Y. R. und RAJEWSKY, K. (1993). Independent Control of Immunoglobulin Switch Recombination at Individual Switch Regions Evidenced through Cre-loxP-Mediated Gene Targeting. *Cell* 73, 1155-1164.
- HANDYSIDE, A.H., O'NEILL, G.T., JONES, M. und HOOPER, M. (1989). Use of BRL-conditioned medium in combination with feeder layers to isolate a diploid embryonal stem cell line. *Roux Arch Dev Biol* 198, 48-56.
- HANAS, J.S., BOGENHAGEN, D.F. und WU, C.W. (1983). Cooperative model for the binding of Xenopus transcription factor A to the 5S RNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2142-2145.
- HARRIS, K.M. und KATER, S.B. (1994) Dendritic spines: Cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 341-371.
- HASTY, P.; RIVERA-PÉREZ, J. und BRADLEY, A. (1991) The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol. Cell Biol.* 11, 5586.
- HEBB, D.O. (1949) The organisation of behavior: a neurophysiological theory. Wiley, New York.
- HERRON, C.E., LESTER, R.A.J., COAN, E.J. und COLLINGRIDGE, G.L. (1986) Frequency-dependent involvement of NMDA receptors in the hippocampus: a novel synaptic mechanism. *Nature* 322, 265-268.
- HEVNER, R.F. und WONG-RILEY, M.T. (1991) Neuronal expression of nuclear and mitochondria genes for cytochrome oxidase (CO) subunits analyzed by in situ hybridization: comparison with CO activity and protein. *J. Neurosci.* 11, 1942-1958.
- HOOPER, M., HARDY, K., HANDYSIDE, A., HUNTER, S. und MONK, M. (1987) HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* 326, 292-4.

HOSOKAWA, T., RUSAKOV, D.A., BLISS, T.V. und FINE, A. (1995) Repeated confocal imaging of individual dendritic spines in the living hippocampal slice: evidence for changes in length and orientation associated with chemically induced LTP. *J. Neurosci.* 15, 5560-5573.

HUANG, E.P. (1999) Regulated translation in dendrites. *Curr Biol* 9, R168-70.

HUANG, Y.Y., KANDEL, E.R., VARSHAVSKY, L., BRANDON, E.P., QI, M., IDZERDA, L., MCKNIGHT, G.S. und BOURTCHOULADZE, R. (1995) A genetic test of the effects of mutations in PKA on mossy fiber LTP and its relation to spatial and contextual learning. *Cell* 83, 1211-22.

IMPEY, S., MARK, M., VILLACRES, E.C., POSER, S., CHAVKIN, C. und STORM, D.R. (1996) Induction of CRE-mediated gene expression by stimuli that generate long-lasting LTP in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 16, 973-982.

INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. (2001) Initial Sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.

ISACKSON, P.J., HUNTSMAN, M.M., MURRAY, K.D. und GALL, C.M. (1991) BDNF mRNA expression is increased in adult rat forebrain after limbic seizures: temporal patterns of induction distinct from NGF. *Neuron* 6, 937-948.

JACKSON, R.J. (1995) Cytoplasmic regulation of mRNA function: the importance of the 3'-untranslated region. *Cell* 74, 9-14.

JIA, Z., AGOPYAN, N., MIU, P., XIONG, Z., HENDERSON, J., GERLAI, R., TAVERNA, F.A., VELUMIAN, A., MACDONALD, J., CARLEN, P., ABRAMOW-NEWERLY, W. und RODER, J. (1996) Enhanced LTP in mice deficient in the AMPA receptor GluR2. *Neuron* 17, 945-956.

JONES, L.S., GROOMS, S.Y., LAPADULA, D.M. und LEWIS, D.V. (1992) Protein synthesis inhibition blocks maintenance but not induction of epileptogenesis in hippocampal slice. *Brain Res.* 599, 338-344.

KANDEL, E.R., SCHWARTZ, J.H. und JESSELL, T.M. (1991) Principles of Neural Science. 3rd edn. New York: Elsevier Publishing Co., Inc.

KANG, H. und SCHUMAN, E.M. (1995) Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science* 267, 1658-1662.

KANG, H. und SCHUMAN, E.M. (1996) A requirement for local protein synthesis in Neurotrophin-induced hippocampal plasticity. *Science* 273, 1402-1406.

KATO, K., CLARK, G.D., BAZAN, N.G. und ZORUMSKI, C.F. (1994) Platelet-activating factor as a potential retrograde messenger in CA1 hippocampal long-term potentiation. *Nature* 367, 175-179.

KAUFMANN, M.H. und BARD, J.B.L. (1999) The anatomical basis of mouse development., Academic Press.

- KAUSELMANN, G., WEILER, M., WULFF, P., JESSBERGER, S., KONIETZKO, U., SCAFALDI, J., STAUBLI, U., BEREITER-HAHN, J., STREBHARDT, K. und KUHL, D. (1999) The polo-like kinases Fnk and Snk associate with a Ca<sup>2+</sup> and integrin binding protein and are dynamically regulated with synaptic plasticity. *EMBO J.*, Vol. 18, 20, 5528-5539.
- KAWAGUCHI, Y., KATSUMARA, H., KOSAKA, T., HEIZMANN, C.W. und HAMA, K. (1987) Fast spiking cells in rat hippocampus (CA1 region) contain the calcium-binding protein parvalbumin. *Brain Res* 416, 369-374.
- KELLENDONK, C., TRONCHE, F., CASANOVA, E., ANLAG, K., OPHERK, C. und SCHÜTZ, G. (1999) Inducible Site-specific recombination in the brain. *J. Mol. Biol.* 285, 175-82.
- KELLENDONK, C., TRONCHE, F., MONAGHAN A.P., ANGRAND, P.O., STEWART, F. und SCHÜTZ, G. (1996) Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU 486. *Nucl. Acids Research* 24, 1404-11.
- KELLY, M.A., RUBINSTEIN, M., PHILLIPS, T.J., LESSOV, C.N., BURKHART-KASCH, S., ZHANG, G., BUNZOW, J.R., FANG, Y. GERHARDT, G.A., GRANDY, D.K. und LOW, M.J. (1998) Locomotor activity in D2 dopamine receptor-deficient mice is determined by gene dosage, genetic background, and developmental adaptations. *Journal of Neuroscience* 18, 3470-9.
- KEMPERMANN, G., KUHN, H.G. und GAGE, F.H. (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386, 493-495.
- KENNEDY, T.E., KUHL, D., BARZILEI, A., SWEATT, J.D. und KANDEL, E.R. (1992) Long-term sensitization training in aplysia leads to an increase in calreticulin, a major presynaptic calcium-binding protein. *Neuron* 9, 1013-1024.
- KIM, J.J. und FANSELOW, M.S. (1992) Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 256, 675-77.
- KINDLER, S., MÜLLER, R., CHUNG, W.J. und GARNER, C.C. (1996) Molecular characterization of dendritically localized transcripts encoding MAP2. *Mol. Brain Res.* 36, 63-69.
- KIRKWOOD, A. und BEAR, M. F. (1995a) Element forms of synaptic plasticity in the visual cortex. *Biol. Res.* 28(1), 73-80.
- KIRKWOOD, A., LEE, H.K. und BEAR, M. F. (1995b) Co-regulation of long-term potentiation and experience-dependent synaptic plasticity in the visual cortex by age and experience. *Nature* 375(6529), 328-331.
- KISLAUKIS, E.H., ZHU, X. und SINGER, R.H. (1994) Sequence responsible for intracellular localization of actin messenger RNA also affect cell phenotype. *J. Cell Biol.* 127, 441-451.
- KISTNER, A., GOSEN, M., ZIMMERMANN, F., JERECIC, J., ULLMER, C., LÜBBERT, H. und BUJARD, H. (1996). Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 10933-10938.

- KLEIMAN, R., BANKER, G. und STEWARD, O. (1993) Inhibition of protein synthesis alters the subcellular distribution of mRNA in neurons but does not prevent dendritic transport of RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11192-11196.
- KNOWLES, R. B., SABRY, J. H., MARTONE, M.E., DEERINCK, T.J., ELLISMAN, M. H., BASSELL, G. J. und KOSIK, K. S. (1996) Translocation of RNA granules in living neurons. *J. Neurosci.* 16, 7812-7820.
- KOBAYASHI, S., TAKASHIMA, A. und ANZAI, K. (1998) The dendritic translocation of translin protein in the form of BC1 RNA protein particles in developing rat hippocampal neurons in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 18, 448-453.
- KOCH, C. und ZADOR, A. (1993) The function of dendritic spines: devices subserving biochemical rather than electrical compartmentalization. *J. Neurosci.* 13, 413-422.
- KOGAN, J., FRANKLAND, P.W., BLENDY, J.B., COBLENTZ, J., MAROWITZ, Z. und SCHUTZ, G. (1997) Spaced training induces normal long-term memory in CREB mutant mice. *Curr. Biol.* 7, 1-11.
- KONIETZKO, U. (1997) Aktivitätsregulierte Genexpression bei synaptischer Plastizität: Identifizierung von *pim*-Proteinkinasen durch subtraktive Hybridisierung. Hamburg, Doktorarbeit.
- KOSAKA, T., KATSUMARA, H., HAMA, K. WU, J.Y. und HEIZMANN, C.W. (1987) GABAergic neurons containing the Ca<sup>2+</sup>-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus and dentate gyrus. *Brain Res* 419, 119-130.
- KRUYSS, V., WATHERLET, M., POUPART, P., CONTRERAS, R., FIERIS, W., CONTENT, J. und HUEZ, G. (1987) The 3'-untranslated region of the human interferon- $\beta$  mRNA has an inhibitory effect on translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 6030-34.
- KÜHN, R., RAJEWSKY, K. und MÜLLER, W. (1991) Generation and analysis of Interleukin-4 deficient mice. *Science* 254, 707-10.
- KÜHN, R., SCHWENK, F., AGUET, M. und RAJEWSKY, K. (1995) Inducible gene targeting in mice. *Science* 269, 1427-1428.
- KUHL, D., KENNEDY, T.E., BARZILAI, A. und KANDEL, E.R. (1992) Long-term sensitization training in aplysia leads to an increase in the expression of BiP, the major protein chaperon of the ER. *J. Cell. Biol.* 119, 1069-1076.
- KUHL, D. und SKEHEL, P. (1998) Dendritic localization of mRNAs. *Curr. Op. Neurobiol.* 8, 600-606.
- KULKARNI, R. N., BRUNING, J. C., WINNAY, J. N., POSTIC, C., MAGNUSON, M. A. und KAHN, C. R. (1999) Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell* 96(3), 329-39.
- LAKSO, M., PICHEL, J.G., GORMAN, J.R., SAUER, B., OKAMOTO, Y., LEE, E., ALT, F.W. und WESTPHAL, H. (1996) Efficient in vivo manipulation of mouse genomic sequences at the zygote state. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5860-5.

- LAKSO, M., SAUER, B., MOSINGER, Jr., LEE, E. J., MANNING, R.W., YU, S. H., MULDER, K. L. und WESTPHAL, H. (1992) Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6232-6236.
- LANDRY, C.F., WATSON, J.B., KASHIMA, T. und CAMPAGNONI, A.T. (1994) Cellular influences on RNA sorting in neurons and glia: an in situ hybridization histochemical study. *Mol Brain Res* 27, 1-11.
- LANGMAN, J. (1989) Medizinische Embryologie, 8. überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag
- LATHE, R. (1996) Mice, gene targeting and behaviour: more than just genetic background *Trends Neurosci.* 19, 183-6.
- LAUTERBORN, J.C., RIVERA, S., STINIS, C.T., HAYES, V.Y., ISACKSON, P.J. und GALL, C.M. (1996) Differential effects of protein synthesis inhibition on the activity-dependent expression of BDNF transcripts: evidence for immediate-early gene responses from specific promoters. *J. Neurosci.* 16, 7428-7436.
- LEE, K.S., SCHOTTLER, F., OLIVER, M. und LYNCH, G. (1980) Brief bursts of high-frequency stimulation produce two types of structural change in rat hippocampus. *J. Neurophys.* 44, 247-258.
- LI, Y., ERZURUMLU, R.S., CHEN, C., JHAVERI, S. und TONEGAWA, S. (1994) Whisker-related neuronal patterns fail to develop in the trigeminal brainstem nuclei of NMDAR1 knockout mice. *Cell* 76, 427-37.
- LIEBHABER, S.A. (1997) mRNA stability and the control of gene expression. *Nucleic Acids Symposium Series* 36, 29-32.
- LINK, W., KONIETZKO, U., KAUSELMANN, G., KRUG, M., SCHWANKE, B., FREY, U. und KUHL, D. (1995) Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 5734-5738.
- LIU, C.Y., FLESKEN-NIKITIN, A., LI, S., ZENG, Y. und LEE, W.H. (1996) Inactivation of the mouse *Brcal* gene leads to failure in the morphogenesis of the egg cylinder in early postimplantation development. *Gen. Dev.* 10, 1835-43.
- LIU, D., BEI, D., PARMAR, H., MATUS, A. (2000) Activity-regulated, cytoskeleton-associated protein (ARC) is essential for visceral endoderm organization during early embryogenesis. *Mechanisms of Development* 92, 207-215.
- LOBE, C. G., KOOP, K. E., KREPPNER, W., LOMELI, H., GERTSENSTEIN, M. und NAGY, A. (1999) Z/AP, a double reporter for Cre-mediated recombination. *Dev. Biol.* 208, 281-292.
- LU, Y. M., JIA, Z., JANUS, C. HENDERSON, J.T. und GERLAI, R. (1997) Mice lacking metabotropic glutamate receptor 5 show impaired learning and reduced CA1 longterm potentiation but normal CA3 LTP. *J Neurosci* 17, 5196-206.
- LYFORD, G.L., YAMAGATA, K., KAUFMANN, W.E., BARNES, C.A., SANDERS, L.K., COPELAND N.G., GILBERT, D.J., JENKINS, N.A., LANAHAN, A.A. und WORLEY, P.F. (1995) Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel

- cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* 14, 433-445.
- LYNCH, G., DUNWIDDIE, T. und GIBKOFF, V. (1977) Heterosynaptic depression: a postsynaptic correlate of long-term potentiation. *Nature* 266, 737-739.
- LYNCH, G. und BAUDRY, M. (1987) Brain spectrin, calpain and long-term changes in synaptic efficacy. *Brain Res. Bull.* 18, 809-815.
- LYNCH, M.W., RUTECKI, P.A. und SUTULA, P.S. (1996) The effects of seizures on the brain. *Curr. Op. Neurol.* 9, 97-102.
- MACDONALD, P.M und KERR, K. (1988) Mutational analysis of an RNA recognition element that mediates localization of bicoid mRNA. *Mol. Cell Biol.* 18, 3788-95.
- MACDONALD, P.M. und KERR, K. (1997) Redundant RNA recognition events in *bicoid* mRNA localization. *RNA* 12, 1413-20.
- MALENKA, R.C., LANCASTER, B. und ZUCKER, R.S. (1992) Temporal limits on the rise in postsynaptic Calcium required for the induction of long-term potentiation. *Neuron* 9, 121-128.
- MALINOW, R., SCHULMAN, H. und TSIEN, R.W. (1989) Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* 245, 862-866.
- MANSOUR, S.L., THOMAS, K.R. und CAPECCHI, M.R. (1988) Disruption of the proto-oncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 336, 348-352.
- MANSUY, I. M., WINDER, D. G., MOALLEM, T. M., OSMAN, M., MAYFORD, M., HAWKINS, R. D. und KANDEL, E. R. (1998) Inducible and Reversible Gene Expression with the rtTA System for the Study of Memory. *Neuron* 21, 257-265.
- MAO, X., FUJIWARA, Y. und ORKIN, S.H. (1999) Improved reporter strain for monitoring Cre recombinase-mediated DNA excisions in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 5037-5042.
- MARTH, J.D. (1996) Recent advances in gene mutagenesis by site-directed recombination. *J. Clin. Invest* 97, 1999-2002.
- MARTIN, F., SCHALLER, A., EGLITE, S., SCHÜMPERLI, D. und MÜLLER, B. (1997) The gene for histone RNA hairpin binding protein is located on human chromosome 4 and encodes a novel type of RNA binding protein. *EMBO J.* 16, 769-778.
- MARTIN, K.C., MICHAEL, D., ROSE, J.C., BARAD, M., CASADIO, A., ZHU, H. und KANDEL, E.R. (1997a) MAP kinase translocates into the nucleus of the presynaptic cell and is required for long-term facilitation in *Aplysia*. *Neuron* 18, 899-912.
- MARTIN, K.C., CASADIO, A., ZHU, H., YAPING, E., ROSE, J.C., CHEN, M., BAILEY, C.H. und KANDEL, E.R. (1997b) Synapse-specific, long-term facilitation of *aplysia* sensory to motor synapses: a function for local protein synthesis in memory storage. *Cell* 91, 927-938.

- MARTIN, G.R. (1981) Isolation of pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78,12, 7634-8.
- MAYER, M.L., WESTBROOK, G.L. und GUTHRIE, P.B. (1984) Voltage-dependent block by  $Mg^{2+}$  of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309, 261-263.
- MAYFORD, M., BACH, M.E., HUANG, Y.Y., WANG, L., HAWKINS, R.D. und KANDEL, E.R. (1996) Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science* 274, 1678-1683.
- MAYFORD, M., BARANES, D., PODSYPANINA, K. und KANDEL, E.R. (1996) The 3'-untranslated region of CaMKII is a cis-acting signal for the localization and translation of mRNA in dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13250-13255.
- MAZARAKIS, N., MICHALOVICH, A., KARIS, A., GROSVELD, F. und GALJART, N. (1996) Zfp-37 is a member of the KRAB zinc finger gene family and is expressed in neurons of the developing and adult CNS. *Genomics* 33, 247-257.
- MCCORMACK, M.A., ROSEN, K.M., VILLA-KOMAROFF, L. und MOWER, G.D. (1992) Changes in immediate early gene expression during postnatal development of cat cortex and cerebellum. *Mol. Brain Res.* 12, 215-223.
- MCDONALD, P.M. und STRUHL, G. (1988) Cis-acting sequences responsible for anterior localization of bicoid mRNA in *Drosophila* embryos. *Nature* 336, 595-598.
- MCNAMARA, J.O. (1994) Cellular and molecular basis of epilepsy. *J. Neurosci.* 14, 3413-3425.
- MCNAUGHTON, B.L., BARNES, C.A., RAO, G., BALDWIN, J. und RASMUSSEN, M. (1986) Long-term enhancement of hippocampal synaptic transmission and the acquisition of spatial information. *J. Neurosci.* 6, 563-571.
- MEBERG, P.J., KINNEY, W.R., VALCOURT, E.G. und ROUTTENBERG, A. (1996) Gene expression of the transcription factor NF- $\kappa$ B in hippocampus: regulation by synaptic activity. *Mol. Brain Res.* 38, 179-190.
- MICHELMORE, R.W., PARAN, I. und KESSELI, R.V. (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9828-32.
- MIGAUD, M., CHARLESWORTH, P., DEMPSTER, M., WEBSTER, L.C., WATABE, A.M., MAKHINSON, M., HE, Y., RAMSAY, M. F., MORRIS, R. G. M., MORRISON, J.H. O'DELL, T.J. und GRANT, S.G.N. (1998) Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* 396, 433-439.
- MILNER, B. (1968) Visual recognition and recall after right temporal lesions in man. *Neuropsychologia* 6, 191-209.
- MONTKOWSKI, A., POETTIG, M., MEDERER, A. und HOLBOER, F. (1997) Behavioural performance in three substrains of mouse strain 129. *Brain Research* 762, 12-18.

- MORALES, M. und FIFKOVA, E. (1989) Distribution of MAP2 in dendritic spines and its colocalization with actin. An immunogold electron-microscope study. *Cell Tissue Res.* 256, 447-456.
- MORGAN, J.I., COHEN, D.R., HEMPSTEAD, J.L. und CURRAN, T. (1987) Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science* 237, 192-197.
- MORIYA, M. und TANAKA, S. (1994) Prominent expression of protein kinase C (gamma) mRNA in the dendrite-rich neuropil of mice cerebellum at the critical period for synaptogenesis. *Neuroreport* 5, 929-932.
- MORRIS, R.G., ANDERSON, E., LYNCH, G.S. und BAUDRY, M. (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319, 774-776.
- MORRIS, R.G.M., GARRUD, P., RAWLINS, J.N.P. und O'KEEFE, J. (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681-683.
- MOSER, M.-B., TROMMALD, M. und ANDERSEN, P. (1994) An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12673-12675.
- MUHLRAD, D., DECKER, C.J. und PARKER, R. (1994) Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast MFA2 gene leads to decapping followed by 5'- to 3'-digestion of the transcript. *Genes Dev.* 8, 855-66.
- MULLER, U., CRISTINA, N., LI, Z.W., WOLFER, D.P., LIPP, H.P., RULICKE, T., BRANDNER, S., AGUZZI, A. und WEISSMANN, C. (1994) Behavioral and anatomical deficits in mice homozygous for a modified beta-amyloid precursor protein gene. *Cell* 79, 5, 755-65.
- MULLNER, E.W. und KUHN, L.C. (1988) A stem-loop in the 3'-untranslated region mediates iron-dependent regulation of transferrin receptor mRNA stability in the cytoplasm. *Cell* 53, 815-25.
- MURAMATSU, T., OHMAE, A. und ANZAI, K. (1998) BC1 RNA protein particles in mouse brain contain twoY-, H-element-binding-proteins, translin and a 37 kDa protein. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 247, 7-11.
- MUSLIMOV, I.A., BANKER, G., BROSIUS, J. und TIEDGE, H. (1998) Activity-dependent regulation of dendritic BC1 RNA in hippocampal neurons in culture. *J. Cell Biol.* 141, 1601-1611.
- NAGUIB, M. und Koorn, R.. (2002) Interactions between psychotropics, anaesthetics and electroconvulsive therapy: Implications for drug choice and patient management. *CNS Drugs* 16 (4), 229-247.
- NAGY, A., ROSSANT, J., NAGY, R., ABRAMOW-NEWERLY, W. und RODER, J.C. (1993) Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 18, 8424-8.

- NEDIVI, E., HEVRONI, D., NAOR, D., ISRAELI, D. und CITRI, Y. (1993) Numerous candidate plasticity-related genes revealed by differential cDNA cloning. *Nature* 363, 718-722.
- NGUYEN, P.V., ABEL, T. und KANDEL, E.R. (1994) Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science* 265, 1104-1107.
- NGUYEN, P.V. und KANDEL, E.R. (1997) Brief Theta-burst stimulation induces a transcription-dependent late phase of LTP requiring cAMP in Area CA1 of the mouse hippocampus. *Learning & Memory* 4, 230-243.
- NILSON, L.A. und SCHÜPBACH, T. (1999) EGF receptor signaling in Drosophila oogenesis. *Curr. Top. Dev. Biol.* 44, 203-243.
- O'BRIEN, R. J. O., XU, D., PETRALIA, R. S., STEWARD, O., HUGANIR, R.L. und WORLEY, P. (1999) Synaptic Clustering of AMPA Receptors by the Extracellular Immediate-Early Gene Product *Narp*. *Neuron* 23, 309-323.
- O'LEARY, D.D.M. (1992) Development of connectional diversity and specificity in the mammalian brain by the pruning of collateral projections. *Curr. Op. Neurobiol.* 2, 70-77.
- O'LEARY, D. D., RUFF, N. L. und DYCK, R. H. (1994) Development critical period plasticity and adult reorganization of mammalian somatosensory systems. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4, 535-544.
- OLSON, E.N., ARNOLD, H.H., RIGBY, P.W.J. und WOLD, B.J. (1996) Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4. *Cell* 84, 1-4.
- OSTARECK-LEDERER, A., OSTERECK, D.H., STANDART, N. und THIELE, B.J. (1994) Translation of 15-lipoxygenase mRNA is inhibited by a protein that binds to a repeated sequence in the 3'-untranslated region. *EMBO J* 13, 1476-81.
- PARASKEVA, E., ATZBERGER, A. und HENTZE, M.W. (1998) A translational repression assay procedure (TRAP) for RNA-protein interactions in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 951-956.
- PARENT, J.M. und LOWENSTEIN, D.H. (1997) Mossy fiber reorganization in the epileptic hippocampus. *Curr. Op. Neurol.* 10, 103-109.
- PARENT, J.M., YU, T.W., LEIBOWITZ, R.T., GESCHWIND, D.H., SLOVITER, R.S. und LOWENSTEIN, D.H. (1997) Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* 17, 3727-3738.
- PEASE, S. und WILLIAMS, R.L. (1990) Formation of germ-line chimeras from embryonic stem cells maintained with recombinant leukemia inhibitory factor. *Exp. Cell. Res.* 190, 209-11.
- PEUNOVA, N. und ENIKOLOPOV, G. (1993) Amplification of calcium-induced gene transcription by nitric oxide in neuronal cells (published erratum appears in Nature 1993 Sep 30;365 (6445):468). *Nature* 364, 450-453.

- PHAM, C.T.N., MACIVOR, D.M., HUG, B.A., HEUSEL, J.W. und LEY, T.J. (1996) Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13090-95.
- PHILLIPS, R.G. und LEDOUX, J.E. (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav. Neurosci.* 106, 27-85.
- PUTZ, U., SKEHEL, P. und KUHL, D. (1996) A tri-hybrid system for the analysis and detection of RNA-protein interactions. *Nucleic Acids Res.* 24, 4838-4840.
- PUTZ, U., KREMERSKOTHEN, J., SKEHEL, P. und KUHL, D. (1999). A tri-hybrid system for the analysis and detection of RNA-protein interactions. In: Zhu, L. (Ed.) *Yeast Hybrid Methods: in vivo detection of interaction between protein, DNA, RNA and other molecules.* BioTechniques Book. Eaton Publishing (in press).
- QI, M., ZHUO, M., SKALHEGG, B.S., BRANDON, E.P., KANDEL, E.R. und MCKNIGHT, G.S. (1996) Impaired hippocampal plasticity in mice lacking the Cbeta1 catalytic subunit of cAMP dependent protein kinase *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1571-76.
- QIAN, Z., GILBERT, M.E., COLICOS, M.A., KANDEL, E.R. und KUHL, D. (1993) Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature* 361, 453-457.
- RIVERA, S., TREMBLAY, E., TIMSIT, S., CANALS, O., BEN-ARI, Y. und KHRESTCHATISKY, M. (1997) Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) is differentially induced in neurons and astrocytes after seizures: Evidence for developmental, immediate early gene, and lesion response. *J. Neurosci.* 17, 4223-4235.
- ROBERSON, E.D., ENGLISH, J.D., ADAMS, J.P., SELCHER, J.C., KONDRATICK, C. und SWEATT, J.D. (1999) The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus. *J. Neurosci.* 19, 4337-4348.
- ROGAN, M. T. und LEDOUX, J.E. (1995) LTP is accompanied by commensurate enhancement of auditory-evoked responses in a fear conditioning circuit. *Neuron* 15(1), 127-36.
- ROGAN, M. T., STAUBLI, U. V. und LEDOUX, J.E. (1997a) Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature* 390(6660), 604-607.
- ROGAN, M. T., STAUBLI, U. V. und LEDOUX, J. F. (1997b) AMPA receptor facilitation accelerates fear learning without altering the level of conditioned fear acquired. *J. Neuroscience* 17(15), 5928-35.
- ROSSANT, J. und MCMAHON, A. (1999) "CRE"-ating mouse mutants-a meeting review on conditional mouse genetics. *Genes. Dev.* 13(2), 142-145.
- ROZMAHEL, R., WILSCHANSKI, M., MATIN, A., PLYTE, S., OLIVER, M., AUERBACH, W., MOORE, A., FORSTNER, J., DURIE, P., NADEAU, J., BEAR, C. und TSUI, L.C. (1996) Modulation of disease severity in cystic fibrosis transmembrane

conductance regulator deficient mice by a secondary genetic factor. *Nature Genetics* 12, 280-287.

SAFFEN, D.W., COLE, A.J., WORLEY, P.F., CHRISTY, B.A., RYDER, K. und BARABAN, J.M. (1988) Convulsant-induced increase in transcription factor messenger RNAs in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7795-7799.

SAKIMURA, K., KUTSUWADA, T. ITO, I. MANABE, T., TAKAYAMA, C. und KUSHIYA, E. (1995) Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Nature* 373, 151-5.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. und MANIATIS, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*, second edition edn. Cold Spring Harbor Laboratory. Laboratory Press.  
SANES, D. H. und CONSTANTINE-PATON, M. (1985) The development of stimulus following in the cochlear nerve and inferior colliculus of the mouse. *Brain Res.* 354(2), 255-67.

SATTILARO, R.F. (1986) Interaction of microtubule-associated protein 2 with actin filaments. *Biochemistry* 25, 2003-9.

SCHAUWECKER, P.E. und STEWARD, O. (1997) Genetic determinants of susceptibility to excitotoxic cell death: implications for gene targeting approaches. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4103-8.

SCHMEDT, C., SAIJO, K., NIIDOME, T., KÜHN, R., AIZAWA, S. und TARAKHOVSKY, A. (1998) Csk controls antigen receptor-mediated development and selection of T-lineage cells. *Nature* 394, 901-904.

SCHWARTZBERG, P.L., GOFF, S.P. und ROBERTSON, E.J. (1989) Germ-line transmission of a c-abl mutation produced by targeted gene disruption in ES-cells. *Science* 246, 799-803.

SEEDS, N.W., WILLIAMS, B.L. und BICKFORD, P.C. (1995) Tissue plasminogen activator induction in Purkinje neurons after cerebellar motor learning. *Science* 270, 1992-1994.

SELCHER, J. C., ATKINS, C. M., TRZASKOS, J. M., PAYLOR, R. und SWEATT, J. D. (1999) A Necessity for MAP Kinase Activation in Mammalian Spatial Learning. *Learning and Memory* 6, 478-490.

SENGUPTA, D.I., ZHANG, B., KRAEMER, B., POCHART, P., FIELDS, S. und WICKENS, M. (1996) A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 8496-8501.

SEUBERT, P., LARSON, J., OLIVER, N., JUNG, M.W., BAUDRY, M. und LYNCH, G. (1988) Stimulation of NMDA receptors produces proteolysis of brain spectrin in hippocampal slices. *Brain Res.* 460, 189-195.

SHAW, G. und KAMEN, R. (1986) A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46, 659-667.

SHYU, A.B., BELASCO, J.G. und GREENBERG, M.E. (1991) Two distinct destabilizing elements in the c-fos message trigger deadenylation as a first step in rapid mRNA decay. *Genes Dev* 7, 1632-43.

- SIBILIA, M. und WAGNER, E.F. (1995) Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* 269, 234-238.
- SILVA, A. J., STEVENS, C.F., TONEGAWA, S. und WANG, Y. (1992) Deficient hippocampal long-term potentiation in  $\square$ -calcium-calmodulin kinase II mutant mice *Science* 257, 201-206.
- SILVA, A.J., PAYLOR, R., WEHNER, J.M. und TONGAWA, S. (1992) Impaired spatial learning in  $\square$ -calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 257, 206-10.
- SILVA, A.J., SMITH, A.M. und GIESE, K.P. (1997) Gene targeting and the biology of learning and memory. *Annu. Rev. Genet.* 31, 527-46.
- SIMAN, R. und NOSZEK, J.C. (1988) Excitatory amino acids activate calpain I and induce structural protein breakdown *in vivo*. *Neuron* 1, 279-287.
- SIMPSON, E.M., LINDER, C.C., SARGENT, E.E., DAVISSON, M.T., MOBRAATEN, L.E. und SHARP, J.J. (1997) Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice. *Nature genetic* 16, 19-27.
- SKAGGS, W.E. und MCNAUGHTON, B.L. (1992) Computational approaches to hippocampal function. *Curr. Op. Neurobiol.* 2, 209-211.
- SMITHIES, O., GREGG, R.G., BOGGS, S.S., KORALEWSKI, M.A. und KUCHERLAPATI, R.S. (1985) Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature* 317, 230-4.
- SORIANO, P. (1999) Generalized *lacZ* expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat. Genet.* 21, 70-71.
- STASHEFF, S.F., ANDERSON, W.W., CLARK, S. und WILSON, W.A. (1989) NMDA antagonists differentiate epileptogenesis from seizure expression in an *in vitro* model. *Science* 245, 648-651.
- STEWARD, O. und REEVES, T.M. (1988) Protein-synthetic machinery beneath postsynaptic sites on CNS neurons: Association between polyribosomes and other organelles at the synaptic site. *J. Neurosci.* 8, 176-184.
- STEWARD, O. (1995) Targeting of mRNAs to subsynaptic microdomains in dendrites. *Curr. Opin. Neurobiology* 5, 55-61.
- STEWARD, O., WALLACE, C.S., LYFORD, G.L. und WORLEY, P.F. (1998a) Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron* 21, 1-20
- STEWART, C., JEFFERY, K. und REID, I. (1994) LTP-like synaptic efficacy changes following electroconvulsive stimulation. *Neuroreport.* 5, 1041-1044.
- STEWART, C.A. und REID, I.C. (1994) Ketamine prevents ECS-induced synaptic enhancement in rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 178, 11-14.
- ST-ONGE, L., FURTH, P. A. und GRUSS, P. (1996) Temporal control of the Cre recombinase in transgenic mice by a tetracycline responsive promoter. *Nucleic Acids Res.* 24, 3875-3877.

- Strong, M.J., Svedmyr, A., Gajdusek, D.C. und Garruto, R.M. (1990) The temporal expression of amyloid precursor protein mRNA in vitro in dissociated hippocampal neuron culture. *Exp. Neurol.* 109, 171-179.
- SUZUKI, T. (1996) Messengers from the synapses to the nucleus (MSNs) that establish late phase of long-term potentiation (LTP) and long-term memory. *Neuroscience Res.* 25, 1-6.
- TANIGUCHI, M., SANBO, M., WATANABE, S., NARUSE, I., MISHINA, M. und YAGI, T. (1998) Efficient production of Cre-mediated site-directed recombinants through the utilization of the puromycin resistance gene, *pac*: a transient gene-integration marker for ES cells. *Nucleic Acids Research* 26, 2, 679-680.
- THOMAS, K.R. und CAPECCI, M.R. (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51 3, 503-12
- THREADGILL, D.W., DLUGOSZ, A.A., HANSEN, L.A., TENNENBAUM, T., LICHTI, U., YEE, D., LAMANTIA, C., MOURTON, T., HERRUP, K., HARRIS, R.C., BARNARD, J.A., YUSPA, S.H., COFFEY, R.J. und MAGNUSON, T. (1995) Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 269, 230-233.
- TIEDGE, H., FREMEAU, R.T.JR., WEINSTOCK, P.H., ARANCHIO, O. und BROSIUS, J. (1991) Dendritic location of neural BC1 RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2093-2097.
- TIEDGE, H., CHEN, W., und BROSIUS, J. (1993) Primary Structure, Neural-Specific Expression, and Dendritic Location of Human BC200 RNA. *J. Neurosci.* 13, 2382-2390.
- TIEDGE, H. und BROSIUS, J. (1996) Translational machinery in hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* 16, 1717-1781.
- TORRE, E. und STEWARD, O. (1992) Demonstration of Local Protein Synthesis within Dendrites Using a New Cell Culture System That Permits the Isolation of Living Axons and Dendrites from Their Cell Bodies. *J. Neurosci.* 12, 762-772.
- TORRES, R. M. und KÜHN, R. (1997) Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting. Oxford University Press
- TROMMALD, M., HULLEBERG, G. und ANDERSEN, P. (1996) Long-term potentiation is associated with new excitatory spine synapses on rat dentate granule cells. *Learning & Memory* 3, 218-228.
- TSIEN, J.Z., CHEN, D.F., GERBER, D., TOM, C., MERCER, E.H., ANDERSON, D.J., MAYFORD, M., KANDEL, E.R. und TONEGAWA, S. (1996a) Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell* 87, 1317-26.
- TSIEN, J.Z., HUERTA, P.T. und TONEGAWA, S. (1996b) The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87, 1327-38.
- TSIRKA, S.E., GUALANDRIS, A., AMARAL, D.G. und STRICKLAND S. (1995) Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* 377, 340-344.

- TYBULEWICZ, V.L.J., CRAWFORD, C.E., JACKSON, P.K., BRONSON, R.T. und MULLIGAN, R.C. (1991) Neonatal Lethality and Lymphopenia in Mice with a Homozygous Disruption of the c-abl Proto-Oncogene. *Cell* 65, 1153-63
- VANDERKLISH, P., SAIDO, T.C., GALL, C., ARAI, A. und LYNCH, G. (1995) Proteolysis of spectrin by calpain accompanies theta burst stimulation in cultured hippocampal slices. *Mol. Brain Res.* 32, 25-35.
- VESELOVSKY, N.S., ENGERT, F. und LUX, H.D. (1995) Fast local superfusion technique. *Pflügers Arch.* 432, 351-4.
- WALLACE, C.S., WITHERS, G.S., WEILER, I.J., GEORGE, J.M., CLAYTON, D.F. und GREENOUGH, W.T. (1995) Correspondence between sites of NGFI-A induction and sites of morphological plasticity following exposure to environmental complexity. *Mol. Brain Res.* 32, 211-220.
- WALLACE, C.S. LYFORD, G.L. WORLEY, P.F. und STEWARD, O. (1998) Differential intracellular sorting of immediate early gene mRNAs depends on signals in the mRNA sequence. *J. Neurosci.* 18, 26-35.
- WALTON, K. D., LIEBERMAN, D., LLINAS, A., BEGIN, M. und LLINAS, R. R. (1992) Identification of a critical period for motor development in neonatal rats. *Neuroscience* 51(4), 763-7.
- WANG, J.H. und KELLY, P.T. (1995) Postsynaptic injection of CA2+/CaM induces synaptic potentiation requiring CaMKII and PKC activity. *Neuron* 15, 443-452.
- WATSON, J.B., SUTCLIFFE, J.G. und FISHER, R.S. (1992) Localization of the protein kinase C phosphorylation/ calmodulin-binding substrate RC3 in dendritic spines of neostriatal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8581-8585.
- WIESEL, T. N. und HUBEL, D. H., (1963) Shape and arrangement of columns in the cat's striate cortex. *J. Physiol.* 165, 559-568.
- WIESEL, T. N. (1982) Postnatal development of the visual cortex and the influence of environment. *Nature* 299(5884), 583-591.
- WILLIAMS, A. J., KHACHIGIAN, L. M., SHOWS, T. und COLLINS, T. (1995) Isolation and Characterization of a Novel Zinc-finger Protein with Transcriptional Repressor Activity. *J. Biol. Chem.* 270, 22143-22152.
- WILLIAMS, J., DRAGUNOW, M., LAWLOR, P., MASON, S., ABRAHAM, W.C., LEAH, J., BRAVO, R., DEMMER, J. und TATE, W. (1995) Krox20 may play a key role in the stabilization of long-term potentiation. *Mol. Brain Res.* 28, 87-93.
- WILSON, T. und TREISMAN, R. (1988) Removal of poly(A) and consequent degradation of c-fos mRNA facilitated by 3'-AU-rich sequences. *Nature* 336, 396-399.
- WONG-RILEY, M. (1979) Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. *Brain Res.* 171, 11-28.

- WORLEY, P. F., BHAT, R. V., BARABAN, J. M., ERICKSON, C. A., MCNAUGHTON, B. L. und BARNES, C. A. (1993) Thresholds for synaptic activation of transcription factors in hippocampus: correlation with long-term enhancement. *J. Neuroscience* 13, 4776-4786.
- WORLEY, P.F., CHRISTY, B. A., NAKABEPPU, Y., BHAT, R. V., COLE, A. J. und BARABAN, J. M. (1991) Constitutive expression of zif268 in neocortex is regulated by synaptic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5106-5110.
- WORLEY, P.F. (1998) Making proteins at the synapse: Activity-regulated translation and CPEB. *Neuron* 21, 936-938.
- WU, L., WELLS, D., TAY, J., MENDIS, D., ABBOTT, M.A., BARNITT, A., QUINLAN, E., HEYNEN, A., FALLON, J.R. und RICHTER, J.D. (1998) CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation and the regulation of experience-dependent translation of  $\square$ -CaMKII mRNA at synapses. *Neuron* 21, 1129-1139.
- WU, Z.L., THOMAS, S.A., VILLACRES, E.C., XIA, Z., SIMMONS, M.L. und CHAVKIN, C. (1995) Altered behavior and long-term potentiation in type I adenylyl cyclase mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 220-4.
- WU, X.Q., GU, W., MENG, X. und HECHT, N.B. (1997) The RNA-binding protein, TB-RBP, is the mouse homologue of translin, a recombination protein associated with chromosomal translocations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5640-5645.
- XIA, Z., DUDEK, H., MIRANTI, C.K. und GREENBERG, M.E. (1996) Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism. *J. Neurosci.* 16, 5425-5436.
- XU, Y., DAVIDSON, L., ALT, F.W. und BALTIMORE, D. (1996) Deletion of the Ig kappa light chain intronic enhancer/matrix attachment region impairs but does not abolish V kappa rearrangement. *Immunity* 4, 4, 377-85
- YAMAGATA, K., ANDREASSON, K.I., KAUFMANN, W.E., BARNES, C.A. und WORLEY, P.F. (1993) Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 11, 371-386.
- YAMAGATA, K., SANDERS, L.K., KAUFMANN, W.E., YEE, W., BARNES, C.A., NATHANS, D. und WORLEY, P.F. (1994) rheb, a growth factor- and synaptic activity-regulated gene, encodes a novel Ras-related protein. *J. Biol. Chem.* 269, 16333-16339.
- YIN, J. C., WALLACH, J. S., DEL VECCHIO, M., WILDER, E.L., ZHOU, H., QUINN, W.G. und TULLY, T. (1994) Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in Drosophila. *Cell* 79(1), 49-58.
- YIN, J.C.P. und TULLY, T. (1996) CREB and the formation of long-term memory. *Curr. Op. Neurobiol.* 6, 264-268.
- ZAMANILLO, D., SPRENGEL, R., HVALBY, O., JENSEN, V., BURNASHEV, N., ROZOV, A. KAISER, K.M.M., KÖSTER, H.J., BORCHARDT, T., WORLEY, LÜBKE, J., FROTSCHER, M., KELLY, P.H., SOMMER, B., ANDERSEN, P., SEEBURG, P.H. und SAKMANN, B. (1999) Importance of AMPA receptor for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning. *Science* 284, 1805-1811.

ZIV, N.E. und SMITH, S.J. (1996) Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* 17, 91-102.

## 9 Anhang

### Lebenslauf

Geboren am 31.08.1973 in Hamburg

#### Ausbildung

1980-1984	Grundschule am Ahrensburger Weg, Hamburg
1984-1994	Walddörfer-Gymnasium, Hamburg
1990-1991	Auslandsaufenthalt in Minnesota, USA
1991	Graduation, Highschool-Abschluß in USA
1994	Abitur am Walddörfer-Gymnasium, Hamburg
1994	Freiwilliges Soziales Jahr, Kurt-Juster-Heim Gesellschaft für Behinderte
1994	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Hamburg
1997	Ärztliche Vorprüfung
1998	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
ab 1998	Teilnahme am Aufbaustudiengang Molekularbiologie an der Universität Hamburg
2000	Abschluß des Aufbaustudiengangs Molekularbiologie (Gesamtnote: sehr gut)
1998-2000	Molekularbiologische- und Zellkultur-Arbeiten im Rahmen der Doktorarbeit in der AG „Synaptische Plastizität“ (Leiter: Prof. Dr. D. Kuhl) im Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg



## WS 2000-WS2001 Praktisches Jahr

1. Tertial                    Neurologie in der Neurologischen Klinik des UKEs
  2. Tertial                    Innere Medizin im Sanitätsspital Bozen und im Kent and  
Sussex Hospital, England
  3. Tertial                    Neurochirurgie und Allgemein Chirurgie im UKE
- 2001                            Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote: 1,6)  
Teilapprobation als Ärztin
- Seit Januar 2002            Ärztin im Praktikum in der Neurologischen Klinik der Charité  
(Direktor: Professor Dr. med. K.M. Einhäupl)  
und im Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in der  
AG „Neuronale Stammzellen“ (Leiter: PD Dr. med. Gerd  
Kempermann
1. Juli 2003                Vollapprobation als Ärztin
- Seit Juli 2003              Assistenzärztin in der Neurologischen Klinik der Charité
- Famulaturen:
- 1997                        Famulatur in der Chirurgischen Abteilung, Amalie-Sieveking-  
Krankenhaus, Hamburg
- 1999                        Famulatur in der Abteilung für Anästhesie, UKE
- 1999                        Famulatur in den Abteilungen für Neurochirurgie, Neurologie  
und Anästhesie im New England Baptist Hospital in Boston,  
Massachusetts, USA
- 2000                        Famulatur in der Neurologischen Klinik, UKE

## Danksagung

Dietmar Kuhl danke ich für die Überlassung des faszinierenden Themas, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und die großzügig gewährte wissenschaftliche Freiheit.

Frau PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer danke ich für die Übernahme der Doktormutterschaft.

Für die freundliche Kooperation und die Geduld während der Injektionen bedanke ich mich bei Herrn Dr. Ralph Waldschütz.

Bei Björn Dammermann bedanke ich mich insbesondere für die grosse Geduld in den ersten Stunden hinter der *bench*, neben der *bench* und unter der *hood*, die rechnerische Lehrfähigkeit bezüglich der Molaritäten und die ständige Abrufbereitschaft und Weiterleitung seines chemischen Wissens.

Bedanken möchte ich mich bei der alten Kuhl-Crew: Gunther, Putz, Peer, Sebastian, Markus, Marsha, Stefan, Jochen, Robert, Uwe, Eric und Jessica für die guten und anregenden Gespräche, die permanente Hilfsbereitschaft, die phantastische Arbeitsatmosphäre und alles drumherum!

Ein großer Dank geht selbstverständlich auch an Niels Plath der sich erfolgreich DER Maus angenommen hat und sie zum Schwimmen gebracht hat.

Tilman, vielen Dank für die Korrekturen und alles andere.

Danke an meine Eltern, an Julia und an meine Freunde für die großzügige Unterstützung in allen Bereichen.

## **Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, daß ich diese Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, 2002

Anika Bick-Sander