

Untersuchungen zur Funktion
des basischen Helix-Loop-Helix (bHLH)-Transkriptionsfaktors ME2
bei Lern- und Gedächtnisprozessen in der Maus

Dissertation
zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades
„Doctor rerum naturalium“
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Diplom-Biologin
Magdalena Marta Brzózka

aus Warschau, Polen

Göttingen 2008

Referent: Prof. Dr. Ralf Heinrich

Koreferent: Prof. Dr. Klaus-Armin Nave

Tag der mündlicher Prüfung: 31.10.2008

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2004 bis September 2008
am Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin (Göttingen)
in der Abteilung Neurogenetik (Leiter: Prof. Dr. Klaus-Armin Nave) durchgeführt.

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich sehr herzlich bedanken bei Herrn Dr. Moritz Rossner, der mir mit dieser Arbeit nicht nur ein abwechslungsreiches und herausforderndes Projekt ermöglichte, sondern mir auch mit großem Engagement und Optimismus immer wieder und zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Herrn Prof. Dr. Klaus-Armin Nave danke ich für die herausragende Gelegenheit, die vorliegende Arbeit in seinem Labor realisieren zu dürfen. Er hat mir auch wertvolle Ratschläge und fruchtbare Diskussionen geliefert. Außerdem danke ich ihm für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Für die Übernahme des Erstgutachtens möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ralf Heinrich bedanken, auch für die hilfreichen Anregungen im Verlauf der Arbeit.

Schließlich danke ich allen weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission für deren Bereitschaft, meine Arbeit wissenschaftlich zu beurteilen: Frau Prof. Dr. Dr. Hannelore Ehrenreich, Herrn Prof. Dr. Nils Brose, Herrn Prof. Dr. Rüdiger Hardeland sowie Herrn Prof. Dr. Rainer Willmann.

Ein besonderer Dank gilt allen, die mit liebevoller Unterstützung, engagiertem Korrekturlesen, aufbauenden Parolen, motivierenden Gesprächen und persönlichem Know-how dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit gelingen konnte. Nennen möchte ich hier vor allem Sven, Micha, Lisa, Wilko und Carolin sowie alle anderen Mitgliedern aus der Rossner-Arbeitsgruppe: Tobi, Anna, Minou, Gudrun und Johannes. Für die schöne Zeit im Labor danke ich auch Viki, Olga, Maike und Chris... sowie vielen anderen.

Ich danke Herrn Dr. Konstantin Radyushkin dafür, dass er mich mit wertvollen Ratschlägen beim Etablieren des Verhaltenslabors unterstützt hat.

Den Tierpflegern Kathrin Dolle, Tanja Leinert und Klaus Hübel danke ich für eine ausgezeichnete Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Walter Paulus sowie Frau Christine Crozier danke ich für die Betreuung im Rahmen des Graduiertenkollegs: „Neuroplasticity: From molecules to Systems“.

Bartosz und Jacek haben mit ihrem Humor und ihrer Beharrlichkeit für Lichtblicke neben der wissenschaftlichen Tätigkeit gesorgt, wofür ihnen ein herzlicher Dank gilt.

Meinen Eltern und meiner Schwester gilt der größte Dank für bedingungslose Unterstützung die ich von ihnen immer bekommen habe.

Schlussendlich danke ich Schteffanek, der nicht nur für semantischen, sondern auch für interkulturellen Ausgleich sorgte. Und vor allem, dass er für mich immer da war.

ALLEN VERSUCHSTIEREN

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	6
2	EINLEITUNG	7
2.1	bHLH-Transkriptionsfaktoren: von <i>Drosophila</i> bis <i>Mammalia</i>	7
2.2	Klassifikation der bHLH-Transkriptionsfaktoren	9
2.3	bHLH-Transkriptionsfaktoren in der Entwicklung des ZNS von Vertebraten...	10
2.4	Rolle der bHLH-Transkriptionsfaktoren in der neuronalen Differenzierung.	13
2.5	Rolle der E-Proteine in der Entwicklung des Nervensystems.....	14
2.6	bHLH-Transkriptionsfaktoren in der adulten Plastizität.....	16
3	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	19
4	ERGEBNISSE	20
4.1	Der Transkriptionsfaktor ME2 und seine potentiellen Interaktionspartner ...	20
4.1.1	ME2 interagiert mit bHLH-Transkriptionsfaktoren der NeuroD-Familie <i>in vitro</i> ...	20
4.1.2	ME2 interagiert mit bHLH-Transkriptionsfaktoren der NeuroD-Familie <i>in vivo</i>	22
4.2	Generation der dnME2-exprimierenden Mäuse	23
4.2.1	Verwendung des TetO-Systems zur Kontrolle der zeitlichen und örtlichen dnME2- Expression	24
4.2.2	Das dnME2-Konstrukt	25
4.2.3	Kontrolle der <i>in vivo</i> -Funktionalität des dnME2-Konstrukts.....	25
4.2.4	Herstellung der dnME2-exprimierenden Mäuse (MHXB-Linie).....	27
4.2.5	Analyse der Expression des dnME2 in transgenen Mäusen.....	27
4.2.6	Diskrepanz zwischen dem Nachweis der dnME2-Expression auf der genomischen und der Proteinebene	29
4.2.7	Verhaltensbiologische Charakterisierung der dnME2-exprimierenden Mäuse	30
4.2.7.1	Angstkonditionierungs-Test	31
4.2.7.2	<i>Hole Board</i> -Test	33
4.2.8	Rückkreuzung der dnME2-Mäuse auf verschiedene Stämme zum Wiedererstarken der Transgenexpression	34
4.3	Generierung und Charakterisierung der Volllänge-ME2-überexprimierenden Mausmutanten	35
4.3.1	Herstellung des Thy-1.2-ME2-Konstruktes	36
4.3.2	Untersuchung des Flag-ME2-TAP-Tag-Konstrukts auf seine Funktionalität.....	38
4.3.3	Generation der Thy-1.2-Promotor-getriebenen ME2-überexprimierenden Mäuse (TMEB-Mauslinie).....	38
4.3.4	Analyse der Überexpression des Thy-1.2-ME2-Konstrukts in transgenen Mäusen	41
4.3.5	Morphologische und anatomische Untersuchungen des ME2-transgenen Gehirns.	42
4.3.6	Verhaltensbiologische Charakterisierung der ME2-überexprimierenden Mäuse	46

4.3.6.1	Standard-Verhaltenstests	46
4.3.6.1.1	<i>Open Field</i> -Test.....	46
4.3.6.1.2	<i>Hole Board</i> -Test	46
4.3.6.1.3	<i>Rotarod</i> -Test.....	47
4.3.6.1.4	<i>Hot Plate</i> -Test.....	48
4.3.6.1.5	<i>Elevated Plus Maze</i> -Test	48
4.3.6.1.6	Motivationstests: der Porsolt- und der <i>Tail Suspension</i> -Test	48
4.3.6.2	Untersuchung der Lernfähigkeit und des Gedächtnisses der ME2-überexprimierenden Mäuse	51
4.3.6.2.1	<i>Water Maze</i> -Test.....	51
4.3.6.2.2	Angstkonditionierungs-Test	55
4.3.7	Charakterisierung der ME2-überexprimierenden Mäuse auf transkriptioneller Ebene.....	58
4.3.7.1	Die Überexpression von ME2 beeinflusst den Transkriptionslevel bestimmter Gene.....	58
4.3.7.2	Analyse des zirkadianen Expressionsprofils verschiedener Gene in der transgenen Maus mittels der qRT-PCR.....	60
4.3.8	Zirkadiane Verhaltensanalyse der ME2-überexprimierenden Mäuse	65
5	DISKUSSION.....	69
5.1	Generierung der dominant negativen ME2-exprimierenden Mäuse	69
5.2	Überexpression des ME2 im Vorderhirn führt zu ausgeprägten Defiziten in kontextuellem und Ton-Gedächtnis.....	71
5.3	Überexpression des ME2 dereguliert Expression anderer bHLH-Transkriptionsfaktoren.....	75
5.4	Schlussbemerkungen.....	78
6	MATERIAL UND METHODEN	79
6.1	Material.....	79
6.1.1	Eukaryontische Zelllinien.....	79
6.1.2	Bakterienstämme	79
6.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	79
6.1.4	Verbrauchsmaterialien.....	80
6.1.5	Laboraausstattung	80
6.1.6	Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	81
6.1.7	Enzyme.....	81
6.1.8	Antikörper	81
6.1.9	Oligonukleotide.....	82
6.1.9.1	Oligonukleotide zum Genotypisieren der Mäuse	82
6.1.9.2	Oligonukleotide für die quantitative Real-Time-PCR.....	82
6.1.9.3	Oligonukleotide zur <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	83

6.1.10	Verwendete Tags.....	83
6.1.10.1	Flag-Tag.....	83
6.1.10.2	TAP-Tag.....	83
6.1.11	Medien für Zellkultur.....	83
6.1.12	Lösungen und Puffer.....	84
6.1.12.1	Allgemeine Lösungen.....	84
6.1.12.2	Puffer für molekularbiologische Arbeitsmethoden.....	84
6.1.12.3	Puffer für Northern-Blotting und in <i>situ</i> -Hybridisierung.....	85
6.1.12.4	Lösungen für die Proteinbiochemie.....	86
6.1.12.5	Lösungen für Luciferase-Messungen.....	88
6.1.12.6	Puffer für die histologische Analyse und Immunhistochemie.....	88
6.1.13	Medien für die Bakterienkultivierung.....	89
6.2	Molekularbiologische Methoden.....	90
6.2.1	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E.coli</i> Zellen (nach Inoue <i>et al.</i> , 1990).....	90
6.2.2	Herstellung elektro-kompetenter <i>E.coli</i> Zellen.....	90
6.2.3	Transformation von chemisch-kompetenten Bakterien.....	90
6.2.4	Transformation von elektro-kompetenten Bakterien.....	91
6.2.5	Herstellung von Glycerinstocks der Bakterienkulturen.....	91
6.2.6	Präparation von Plasmid DNA aus Bakterien.....	91
6.2.7	Präparation genomischer DNA aus Mausegeweben.....	91
6.2.8	Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen.....	91
6.2.9	Präparation von Gesamt-RNA aus Mausegeweben mit TRIzol®.....	92
6.2.10	Northern-Blot.....	92
6.2.11	<i>In situ</i> -Hybridisierung.....	93
6.2.11.1	Radioaktive Markierung spezifischer Oligonukleotide.....	93
6.2.11.2	Aufreinigung der radioaktiven Sonden.....	93
6.2.11.3	Messung der Radioaktivität.....	93
6.2.11.4	Vorbereitung der Kryoschnitte für die <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	94
6.2.11.5	Durchführung der Hybridisierung.....	94
6.2.11.6	Waschen der Schnitte.....	94
6.2.11.7	<i>In situ</i> -Detektion des radioaktiv markierten Transkripts.....	94
6.2.12	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	94
6.2.13	Analyse von DNA.....	95
6.2.13.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	95
6.2.13.2	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	95
6.2.13.3	DNA Extraktion mit Phenol-Chloroform.....	96
6.2.13.4	DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen.....	96
6.2.13.5	Sequenzierung von DNA.....	96
6.2.13.6	Sequenzanalyse von DNA.....	96

6.2.13.7	Modifikation von DNA	96
6.2.13.8	Klonierung von PCR-Produkten.....	97
6.2.13.9	Amplifikation von DNA in der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	97
6.2.13.10	DNA-Amplifikation mit TempliPhi™	98
6.2.14	Reverse Transkription zur Synthese von cDNA	99
6.2.15	Die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	99
6.2.16	Microarray-Analyse.....	100
6.2.17	Rekombination von DNA mit dem GATEWAY und Multisite GATEWAY-System	100
6.3	Zellbiologische Methoden	102
6.3.1	Kultivieren und Passagieren von Zelllinien	102
6.3.1.1	Kryokonservierung und Auftauen von Zelllinien.....	102
6.3.1.2	Beschichtung von Zellkulturschalen mit Poly-L-Lysin.....	103
6.3.2	Transfektion der DNA in eukaryontische Zellen	103
6.3.2.1	DNA-Transfektion in eukaryontische Zellen mit Lipofectamine 2000.....	103
6.3.2.2	DNA-Transfer in eukaryontische Zellen mit Elektroporation.....	103
6.3.3	Luciferase-Reporterassays.....	104
6.3.4	Präparation von primären Neuronen der Maus	104
6.4	Proteinbiochemische Methoden: Isolierung und Nachweis von Proteinen.....	105
6.4.1	Herstellung der Proteinlysate	105
6.4.1.1	Gewinnung von Proteinextrakten aus Säugetierzellen	105
6.4.1.2	Gewinnung von Proteinextrakten aus Geweben.....	105
6.4.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	105
6.4.3	Western-Blot	105
6.4.3.1	Diskontinuierliche und reduzierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .	106
6.4.3.2	Western-Blot-Aufbau und Durchführung.....	106
6.4.3.3	Primär- und Sekundärantikörper für Immunoblotting.....	107
6.4.4	Ko-Immunopräzipitation.....	107
6.4.5	Präparation der Mausgehirne für die RNA-Gewinnung, <i>in situ</i> -Hybridisierung und Proteinanalyse.....	107
6.4.6	Herstellung und Vorbereitung der Kryoschnitte	108
6.4.6.1	Herstellung der Gehirn-Kryoschnitte	108
6.4.6.2	Postfixierung der Gehirn-Kryoschnitte	108
6.4.7	Präparation der Mausgehirne für die immunohistochemische Analyse.....	108
6.4.7.1	Die Ganzkörperfixierung mittels Perfusion.....	108
6.4.7.2	Herstellung der Vibratomschnitte.....	108
6.4.8	Immunohistochemie	108
6.4.9	Antikörper für die immunologische Detektion der Proteine	109
6.4.10	β-Gal-Färbung	109

6.5	Haltung und Verwendung der Mauslinien	109
6.5.1	Verwendete Inzucht-Mausstämme	109
6.5.2	Haltungsbedingungen der Versuchstiere.....	110
6.5.3	Versuchstiere für Verhaltensanalysen.....	110
6.5.4	Versuchstiere für eine molekulare Analyse.....	110
6.6	Verhaltenstests.....	110
6.6.1	<i>Open Field</i> -Test.....	111
6.6.2	<i>Hole Board</i> -Test.....	111
6.6.3	<i>Hot Plate</i> -Test	112
6.6.4	<i>Rotarod</i> -Test.....	112
6.6.5	<i>Elevated Plus Maze</i> -Test.....	112
6.6.6	<i>Light Dark Preference</i> -Test.....	113
6.6.7	Porsolt-Test	113
6.6.8	<i>Tail Suspension</i> -Test	114
6.6.9	Angstkonditionierungs-Test.....	114
6.6.9.1	Das Angstkonditionierungssystem	114
6.6.9.2	Durchführung der Angstkonditionierung	115
6.6.10	<i>Morris Water Maze</i> -Test	116
6.6.10.1	<i>Morris Water Maze</i> -Versuchsaufbau.....	116
6.6.10.2	Durchführung des <i>Water Maze</i> -Tests	116
6.6.11	Analyse der zirkadianen Aktivität.....	117
7	ANHANG 1	119
8	ABKÜRZUNGEN	120
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	122
10	LEBENS LAUF	133

1 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit sollte die Funktion des basischen Helix-Loop-Helix-(bHLH) Transkriptionsfaktors ME2 in Lern- und Gedächtnisprozessen untersucht werden. Die Proteine der NeuroD-Familie NeuroD, NDRF und NEX bestimmen die finale Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen in der Entwicklung und weisen eine hohe funktionelle Redundanz untereinander auf. Die Expression dieser Faktoren sowie des ME2 ist nicht nur während der Entwicklung des ZNS prominent, sondern bleibt auch in postmitotischen Neuronen des adulten Hippokampus und Kortex erhalten und damit in Bereichen des Gehirns, die wichtig sind für Lern- und Gedächtnisprozesse. Daher wurde postuliert, dass diese Transkriptionsfaktoren bei Lernvorgängen und der Gedächtnisbildung beteiligt sein könnten. Die Rolle der Proteine der NeuroD-Familie sollte durch Analysen einer *loss of function*-Mausmutante, die im Vorderhirn dominant negatives ME2 (dnME2) exprimiert, aufgeklärt werden. ME2 konnte als obligater Interaktionspartner für NeuroD und NDRF *in vivo* nachgewiesen werden und Zellkulturexperimente zeigten, dass dnME2 die funktionelle Redundanz der drei NeuroD-Familienmitglieder aufheben kann. Die Anwendung des Tet-Systems zur regulierten Expression von dnME2 *in vivo* erwies sich technisch als sehr problematisch. Eine erfolgreich etablierte Mauslinie verlor über wenige Generation die Expression des Transgenes. Aussagekräftige Lernexperimente waren nicht möglich. Mit einem *gain of function*-Experiment konnten jedoch erste Rückschlüsse auf die Bedeutung von ME2 in Lern- und Gedächtnisprozessen gezogen werden. Dazu wurde eine Mausmutante generiert, die unter Kontrolle des Thy1-Promotors ME2 in Neuronen lernassoziiierter Gehirnstrukturen postnatal überexprimiert. Eine immunohistochemische Analyse des Kortex und Hippokampus wies keine Veränderungen der allgemeinen Morphologie dieser Strukturen in transgenen Tieren auf. Das natürliche Verhalten der Mutanten war von der ME2-Überexpression nicht beeinflusst. In Angstkonditionierungs-Tests ließen sie jedoch stark ausgeprägte Defizite erkennen. Die Lerndefizite der ME2-Mutanten waren unabhängig vom genetischen Hintergrund. Somit wurde zum ersten Mal nachgewiesen, dass die neuronale Überexpression eines bHLH-Transkriptionsfaktors spezifische Lerndefizite verursachen kann. Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass neuronale bHLH-Faktoren nicht nur frühe Entwicklungsprozesse steuern können, sondern ebenfalls eine wichtige Funktion in der neuronalen Plastizität erwachsener Tiere ausüben. Quantitative molekulare Analysen ergaben überraschenderweise erste Hinweise auf eine tageszeitliche Deregulation transkriptionell antagonistischer (b)HLH-Faktoren im Hippokampus ME2-transgener Mäuse. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die beobachteten Lerndefizite möglicherweise in Zusammenhang mit einer Störung der Dynamik des neuronalen bHLH-Netzwerkes gebracht werden können. ME2 könnte somit ein molekulares Bindeglied zwischen kognitiven und zirkadianen Prozessen darstellen.

2 EINLEITUNG

Das menschliche zentrale Nervensystem (ZNS) besteht aus 10^{11} Neuronen, die miteinander über 10^{15} Synapsen verbunden sind. Diese enorme Anzahl an Nervenzellen und deren Verbindungen muss während der Entwicklung in einer bestimmten Menge und in einer korrekten Position entwickelt werden, um ein funktionierendes Netzwerk auszubilden. Während der Entwicklung steht die Plastizität des ZNS, eine Ausbildung der Synapsen und Neuronennetzwerke, unter genetischer Kontrolle. Später weist dieses Netzwerk die außergewöhnliche Fähigkeit auf, gesammelte Erfahrungen in eine unermessliche Anzahl an manchmal lebenslang anhaltenden Erinnerungen umzuwandeln. Die Gedächtnisbildung ist lernassoziiert und erfordert Modifikationen der während der Entwicklung entstandenen Synapsen und Neuronennetzwerke. Der Mechanismus der adulten Plastizität ist bisher weitgehend ungeklärt. Die Frage, ob die zum Teil gleichen Faktoren, die in der embryonalen Entwicklung Plastizität vermitteln, auch in der adulten Plastizität beteiligt sein könnten, bleibt offen.

2.1 bHLH-Transkriptionsfaktoren: von *Drosophila* bis *Mammalia*

Entwicklung der Neurone und Synapsen sowie Differenzierung der Nervenzellen wird zeitlich und räumlich präzise durch externe und intrinsische Regulationsmechanismen gesteuert. An *Drosophila* und Vertebraten durchgeführte genetische Studien zeigten, dass eine kleine Anzahl sog. proneuraler Gene, die auch für Transkriptionsfaktoren der basischen Helix-Loop-Helix-Familie kodieren, erforderlich ist, um im Ektoderm eine Entwicklung neuronaler Zelllinien auszulösen sowie um eine Generierung von Progenitor-Zellen, die zur Differenzierung bestimmt wurden, zu fördern ([Bertrand et al., 2002](#)). Ende der siebziger Jahre wurden Gene identifiziert, die in frühen Stadien der neuronalen Entwicklung von *Drosophila* involviert sind ([Garcia-Bellido, 1979](#)). Eine molekulare Analyse führte zu einer Isolierung von vier Genen, die zu diesem Komplex gehören: *acheate* (*ac*), *scute* (*sc*), *lethal of scute* (*lsc*) und *asense* (*ase*). Weitere Untersuchungen zeigten, dass Gene des *acheate-scute*-Komplexes mit dem Onkogen *Myc*, einem Gen der Geschlechtsdeterminierung *daughterless* (*da*), und mit der Muskel-Determinanten *MyoD* eine Sequenz-Ähnlichkeit aufweisen ([Villares et al., 1987](#); [Murre et al., 1989a](#)). In 1989 wurde zum ersten Mal die Familie der basischen Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren beschrieben und der Begriff bHLH-Proteine definiert ([Murre et al., 1989b](#)). Die namensgebende Helix-Loop-Helix-Domäne ist unter den HLH-Faktoren von *Drosophila* und Vertebraten sehr hoch konserviert. Sie besteht aus zwei amphipatischen α -Helices, die miteinander durch eine Schleife (*loop*) verbunden sind ([Murre et al., 1989b](#)) und

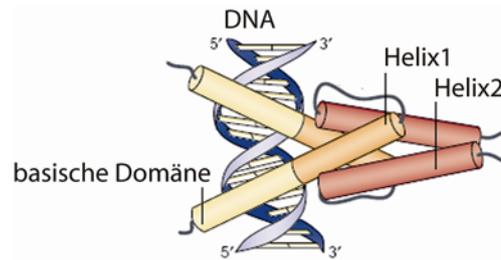


Abb. 1 Schematische Darstellung eines bHLH-Dimers

Die Helix-Loop-Helix (HLH)-Domänen der Transkriptionsfaktoren bilden ein Vier-Helix-Bündel. Somit vermitteln sie die Bildung von Homo- und Heterodimeren. Die basische Domäne umfasst zehn Aminosäurereste, die innerhalb verschiedener Familien der bHLH-Transkriptionsfaktoren sehr stark konserviert sind. Sieben dieser Aminosäuren kommen in spezifischen Erkennungssequenzen von Promotoren der Zielgene in einen direkten Kontakt mit der großen Furche der DNA. Aus: Bertrand et al., 2002, nach: Ferre-D'Amare et al., 1993.

umfasst in der Regel zwischen 40 bis 60 Aminosäuren (Abb.1). Analysen der kristallinen Strukturen der bHLH-Domänen des MyoD und von E47 zeigten, dass eine Dimerisierung der bHLH-Proteine von den HLH-Domänen, die ein Vier-Helix-Bündel bilden, vermittelt wird ([Ellenberger et al., 1994](#); [Ma et al., 1994](#)), wobei sowohl Homo- als auch Heterodimere gebildet werden können ([Murre et al., 1994](#)). Unmittelbar im Bereich der 5'-terminalen HLH-Domäne liegt eine basische Domäne, die an spezifischen Sequenzen der DNA bindet. Die basische Domäne umfasst zehn Aminosäurereste, wovon sieben in einen direkten Kontakt mit DNA kommen. Neun dieser zehn Aminosäuren sind innerhalb verschiedener Familien der bHLH-Transkriptionsfaktoren sehr stark konserviert. Die Basische Region bindet im Bereich der großen Furche der DNA ([Ellenberger et al., 1994](#)), an spezifischen Erkennungssequenzen von Promotoren der Zielgene, sog. E-Boxen mit einer Consensus-Sequenz von CANNTG ([Ephrussi et al., 1985](#); [Voronova und Baltimore, 1990](#)). E-Boxen wurden in regulatorischen Sequenzen, wie Promoter- und Enhancer-Regionen, gefunden, die unter anderem muskel-, neuronen- oder bauchspeicheldrüsenspezifische Gene kontrollieren. Beispiele für muskelspezifische Gene sind etwa Gene der Muskel-Kreatinkinase, der Acetylcholinrezeptoren α und β sowie leichte Ketten des muskelspezifischen Myosins ([Buskin und Hauschka, 1989](#); [Gossett et al., 1989](#); [Lassar et al., 1989](#)), solche für pankreasspezifische Gene Insulin und Somatostatin ([Whelan et al., 1990](#)) und solche für neuronenspezifische Gene Opsin, Hippocalcin, die β 2-Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors sowie muskarinische Acetylcholinrezeptoren ([Ahmad, 1995](#); [Bessis et al., 1995](#); [Grant et al., 1996](#); [Pepitoni et al., 1997](#)). E-Boxen kommen auch in Promotoren von bHLH-Transkriptionsfaktoren vor, z.B. in Id2. Eine sog. nicht-kanonische CACGTT-E-Box wurde im Promotor von Per2 beschrieben und wird von bHLH-Transkriptionsfaktoren der PAS-Familien CLOCK und BMAL1 *in vivo* erkannt ([Yoo et al., 2005](#)).

2.2 Klassifikation der bHLH-Transkriptionsfaktoren

Es gibt zwei Klassifikationssysteme von bHLH-Transkriptionsfaktoren ([Massari und Murre, 2000](#)). Zum einen wurden sie in Untergruppen von A bis D nach ihren Aminosäuresequenzen und ihrer evolutionären Verwandtschaft geordnet ([Atschley and Fitch, 1997](#)), zum anderen teilten [Murre und Mitarbeiter \(1994\)](#) bHLH-Transkriptionsfaktoren in sieben Klassen aufgrund ihrer Gewebespezifität, der Fähigkeit zur Dimerenbildung sowie ihrer DNA-Bindungsspezifität ein.

Zur Klasse I, aufgrund ihrer Bindungsspezifität für E-Boxen als E-Proteine bezeichnet, gehören ME1 (HEB in Menschen), ME2 (Tcf4, E2-2, SEF2), die beiden Spleiß-Varianten des E2A-Gens E12 und E47 sowie Daughterless. Diese ubiquitär exprimierten Proteine können sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden ([Murre et al., 1989b](#)).

Klasse II besteht aus gewebespezifischen MyoD-, Myogenin-, Atonal-, NeuroD- sowie achaeta-scute-Komplexen. Die MyoD-Familie spielt eine entscheidende Rolle in der Determination von Muskelzellen ([Weintraub, 1991](#)). Die NEX/NeuroD-Proteinfamilie ist neuronenspezifisch und wird weiter unten beschrieben. HLH-Faktoren der Klasse II bilden, mit wenigen Ausnahmen (z.B. MyoD), nur Heterodimere und zwar vorzugsweise mit E-Proteinen. Sie weisen auch eine kleinere Spezifität bezüglich der E-Boxen auf und binden an kanonische sowie nicht-kanonische E-Box-Sequenzen ([Murre et al., 1989b](#)).

Zur Klasse III gehören Faktoren der Myc-Familie, etwa TFE3, SREB-1 sowie der mikrophthalmiaassoziierte Transkriptionsfaktor Mi, der außer einer HLH-Domäne auch einen Leucin-Zipper besitzt ([Henthorn et al., 1991](#); [Zhao et al., 1993](#)).

Eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die mit Proteinen der Klasse III und innerhalb der Klasse IV Heterodimere bilden kann, wurde als Klasse IV bezeichnet und besteht aus Mad-, Max- und Mxi-Proteinen ([Ayer et al., 1993](#); [Blackwood und Eisenman, 1991](#); [Zervos et al., 1994](#)).

Faktoren, die zur Klasse V gehören, weisen keine basische Domäne auf und sind daher nicht in der Lage, an DNA zu binden. Mit Transkriptionsfaktoren der Klasse I und II bilden sie Heterodimere, die nicht an DNA binden können und somit funktionsunfähig sind. Daher wirken Proteine der Klasse V als dominant negative Faktoren, die eine transkriptionelle Aktivierung verhindern und gelten als negative Regulatoren der Klasse I und II ([Benezra et al., 1990](#); [Ellis et al., 1990](#); [Garrell et al., 1990](#)). Hierzu gehören Id1-Id4 (*inhibitor of differentiation*) bei Vertebraten und extra macrochaeta (emc) bei Drosophila. Diese Proteine weisen eine hohe Affinität zu E-Proteinen auf, was zu einem „Wettbewerb“ um die Bindung mit der Klasse II führt ([Campuzano, 2001](#); [Yokota, 2001](#)).

Eine andere Gruppe von Inhibitoren der proneuralen Gene bildet die Klasse VI der HLH-Transkriptionsfaktoren. Hierzu gehören hairy and enhancer of split (Espl) bei Drosophila ([Davis und Turner, 2001](#)) und Hes/Her/Esr bei Vertebraten ([Kagejama und Nakanishi, 1997](#)). Eine Besonderheit dieser Familie ist der Besitz der Aminosäure Prolin in der basischen Domäne. Hes1 unterdrückt die Neurogenese in der Maus und erhöht die Anzahl der mitotisch-

aktiven kortikalen Vorläuferzellen ([Ishibashi et al., 1994](#)). Eine Inaktivierung des Hes1 in der transgenen Maus führt zu einer vorzeitigen neuronalen Differenzierung, was sich in einer Verdopplung der Neuronenzahl im Vorderhirn bei E13,5 (embryonalen Tag 13,5) zeigt ([Ishibashi et al., 1995](#); [Nakamura et al., 2000](#)). Hes-Proteine inhibieren die Transkription auf zwei verschiedene Weisen. Zum einen bilden sie Homo- und Heterodimere innerhalb der Familie, binden an sog. N-Boxen (CACNAG) und unterdrücken somit eine Transkription der Zielgene (z.B. Mash1), die zur neuronalen Differenzierung erforderlich sind ([Chen et al., 1997](#); [Davis und Turner, 2001](#)). Zum anderen interagieren sie gleichzeitig mit proneuralen bHLH-Faktoren und dem Transkriptionsrepressor Groucho (bei *Drosophila*), der aufgrund dieser Interaktion an den Promotor des Zielgens rekrutiert wird ([Giagtzoglou et al., 2003](#)). Die Klasse VII der HLH-Transkriptionsfaktoren umfasst Proteine, die eine bHLH-PAS-Domäne aufweisen. Hierzu zählen etwa Single-minded bei *Drosophila*, HIF1 α (*hypoxia inducible factor 1 α*), AHR *nuclear translocator* (Arnt) sowie CLOCK und BMAL1.

2.3 bHLH-Transkriptionsfaktoren in der Entwicklung des ZNS von Vertebraten

Die Entwicklung des Nervensystems wird bei Vertebraten in folgende Entwicklungsstadien unterteilt: Neurale Induktion, Regionalisierung des entstehenden Neuralrohrs, Proliferation der Vorläuferzellen und ihre terminale Differenzierung mit gleichzeitiger Migration zu den Zielregionen. bHLH-Transkriptionsfaktoren werden über sämtliche Phasen der Entwicklung exprimiert (Abb.2). Multipotente kortikale Vorläuferzellen werden durch Hes und Id-Faktoren in ihrem proliferativen Zustand gehalten. Die proneuralen bHLH-Faktoren Ngn1, Ngn2 und Mash1 bestimmen die Transition von der Proliferation zur Neurogenese. Die terminale Reifung der Neuronen wird von bHLH-Differenzierungsfaktoren der NeuroD-Familie reguliert.

Bereits in einer frühen Phase der Entwicklung, nachdem sich im Rahmen der Gastrulation die drei Keimblätter Entoderm, Mesoderm und Ektoderm entwickelt haben, kommt es zu einer Induktion der Entwicklung von Neuroektoderm. Die Neuralrinne schnürt sich als Neuralrohr ab. Sie wird entlang ihrer anterior-posterioren und dorso-ventralen Achse in spezialisierte Regionen unterteilt. Dabei wird die Ventralisierung des Neuralrohrs von Sonic hedgehog (Shh) Signalkaskaden bestimmt ([Briscoe et al., 2000](#)). Der anterior gelegene Bereich des Neuralrohrs wird zum Telencephalon. Aus dorsalen Anteilen dieses Telencephalons wird unter anderem der Neokortex sowie der Hippokampus entwickelt.

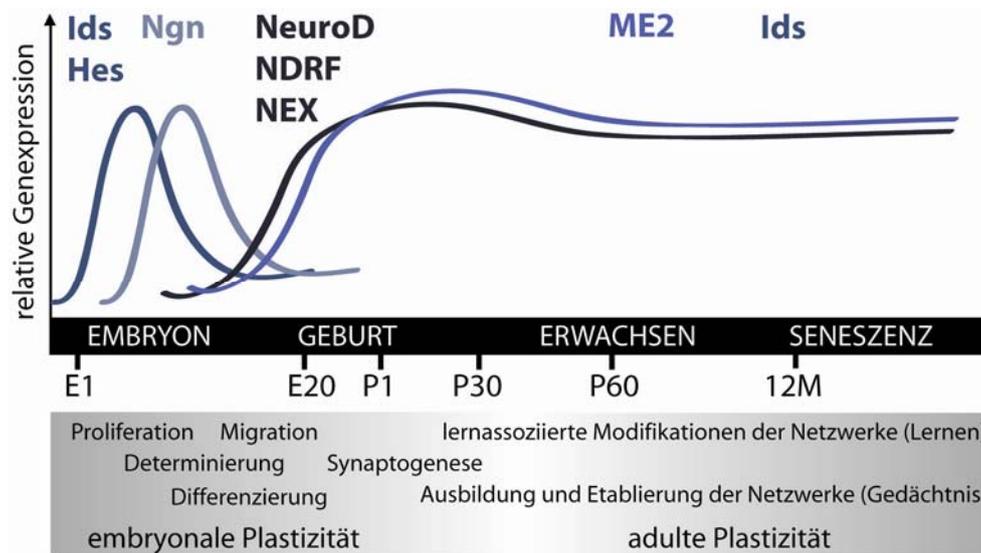


Abb. 2 Schematische Darstellung „relativer“ Expression von bHLH-Transkriptionsfaktoren in Entwicklungsstadien des ZNS von Vertebraten

Im Verlauf der Entwicklung regulieren die bHLH-Transkriptionsfaktoren die Generierung der neuronalen Vorläuferzellen, ihre Transition zur Neurogenese und determinieren eine endgültige Differenzierung der Neuronen. Multipotente kortikale Vorläuferzellen werden durch Hes- und Id-Faktoren in ihrem proliferativen Zustand gehalten. Die proneuralen bHLH-Faktoren Ngn1, Ngn2 und Mash1 bestimmen die Transition von der Proliferation zur Neurogenese. Die terminale Reifung der Neuronen wird von bHLH-Differenzierungsfaktoren der NeuroD-Familie (NeuroD, NDRF und NEX) reguliert. Im adulten ZNS bleibt die Expression von Proteinen der NeuroD- und Id-Familie sowie von ME2 in lernassoziierten Strukturen erhalten. Das ließ eine Rolle dieser Transkriptionsfaktoren in der adulten Plastizität vermuten.

Während das Telencephalon ausgeformt wird, kommt es zu einer raschen Proliferation kortikaler Vorläuferzellen in der Ventrikularzone. In dieser Region werden die bHLH-Transkriptionsfaktoren Hes1 und Hes5 exprimiert. Sie inhibieren eine vorzeitige Ausdifferenzierung der Vorläuferzellen und halten sie in einem proliferativen Stadium ([Ishibashi et al., 1995](#); [Ohtsuka et al., 2001](#)). Die Hes1-defiziente Maus zeigte eine vorzeitige Ausdifferenzierung *in vivo*, was zu einem zweifachen Überschuss an Neuronen im Vorderhirn führte ([Ishibashi et al. 1994](#), [Nakamura et al., 2000](#)). Hes1 und Hes5 sind Zielgene der Notch-Signalkaskade ([Justice und Jan, 2002](#)). Notch/Hes-Signalkaskaden erlauben ein Gleichgewicht zwischen zu differenzierenden Neuronen und mitotisch aktiven neuronalen Vorläuferzellen. Man spricht hier von lateraler Inhibierung. In den neu entstandenen Neuronen wird Delta (Ligand von Notch) hochexprimiert und aktiviert Notch/Hes-Signalkaskaden in benachbarten Vorläuferzellen, was zu deren Arrest in der proliferativen Phase führt und eine Ausdifferenzierung verhindert. Hes2 inhibiert die Aktivität der proneuralen bHLH-Transkriptionsfaktoren ([Giagtzoglou et al., 2003](#)) und reprimiert direkt die Transkription des proneuralen Faktors Mash1 ([Chen et al., 1997](#); [Ishibashi et al., 1995](#)). Andere bHLH-Transkriptionsfaktoren, welche die Neurogenese inhibieren, sind dominant negative Id-Faktoren. Sie werden in der Ventrikularzone des Telencephalon exprimiert ([Jen et al., 1997](#)) und verhindern eine vorzeitige Ausdifferenzierung der Vorläuferzellen, indem sie mit anderen bHLH-Transkriptionsfaktoren interagieren (z.B. mit E-Proteinen) und somit

deren transkriptionelle Aktivität hemmen. In der Zellkultur verhindern die Ausdifferenzierung von Vorläuferzellen in Neurone und Oligodendrozyten, nicht aber in Astrozyten ([Kondo und Raff, 2000](#); [Nakashima et al., 2001](#); [Toma et al., 2000](#)). In $Id1^{-/-}Id3^{-/-}$ -Mausmutanten verlassen kortikale Vorläuferzellen verfrüht den Zellzyklus und differenzieren sich vorzeitig zu Neuronen aus ([Lyden et al., 1999](#)).

In den Vorläuferzellen der Oligodendrozyten werden die bHLH-Faktoren Olig1 und Olig2 hochexprimiert. Ihre Expression bleibt auch während der Zellmigration sowie nach der Ausdifferenzierung erhalten ([Zhou et al., 2000](#)).

Die Neurogenese wird von proneuralen bHLH-Transkriptionsfaktoren initiiert. Im dorsalen Teil des Telencephalons, aus dem sich später Kortex und Hippokampus entwickelt, werden nur wenige proneurale Gene exprimiert: Ngn1, Ngn2 und Mash1. Diese drei Gene könnten zur Bestimmung des Schicksals von kortikalen Vorläuferzellen ausreichend sein ([Fode et al., 2000](#); [Nieto et al., 2001](#)). Eine entscheidende Rolle proneuraler Gene liegt darin, ihre inhibierende Aktivität auf eine einzige Vorläuferzelle zu begrenzen, die zur Differenzierung in ein Neuron bestimmt wurde. Dies geschieht über Notch-Signalkaskaden durch den Prozess der lateralen Inhibierung. $Ngn1^{-/-}$ oder $Ngn2^{-/-}$ -Mausmutanten weisen einen Mangel an kranialen sensorischen Ganglien auf. $Ngn1,2^{-/-}$ -Mutanten fehlen neben kranialen sensorischen Ganglien zusätzlich spinale sensorische Ganglien und eine Fraktion von Neuronen im Bereich des ventralen Rückenmarks. Dies ist auf einen Verlust von Vorläuferzellen zurückzuführen ([Fode et al., 1998](#); [Ma, 1998](#)). Erst kürzlich konnte eine Rolle der proneuralen bHLH-Transkriptionsfaktoren in der Regulierung der Migration reifender Neurone nachgewiesen werden ([Ge et al., 2006](#)). Unter Einfluss proneuraler Gene auf für die Neurogenese bestimmte Vorläuferzellen werden neuronale Differenzierungsfaktoren aktiviert. Mash1 wirkt Ngn1 und NeuroD im olfaktorischen Neuroepithel entgegen ([Cau et al., 2002](#)). Ngn1 oder Ngn2 sind für die Expression von Math3 und NeuroD in sensorischen Neuronen erforderlich ([Fode et al., 1998](#); [Ma, 1998](#)). Dies deutet darauf hin, dass die Transkriptionsfaktoren der NeuroD-Familie von proneuralen Genen reguliert werden. Der Faktor Neuregulin führt vermutlich zu einer direkten Aktivierung des NeuroD ([Huang et al., 2000](#)).

Im Verlauf der Entwicklung verlassen die reifenden Neuronen den Zellzyklus und werden unter Einfluss verschiedener bHLH-Transkriptionsfaktoren zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten differenziert.

2.4 Rolle der bHLH-Transkriptionsfaktoren in der neuronalen Differenzierung

Die NeuroD-Familie der Klasse II der HLH-Transkriptionsfaktoren besteht aus NeuroD/Beta2 (*neurogenic differentiation factor*), NeuroD2/NDRF (*NeuroD related factor*), NEX/MATH-2/NeuroD6 (*neuronal helix-loop-helix protein-1*) und MATH-3/NeuroM (*mammalian atonal homolog-3*). Sie bestimmen eine endgültige Differenzierung der neuronalen Vorläuferzellen, was zu deren Zellzyklus-Arrest und Neuronen-Spezifitätsbestimmung führt ([Lee et al., 1997](#)). Daher werden Mitglieder der NeuroD-Familie Differenzierungsfaktoren genannt. [Lee et al. \(1995\)](#) zeigten, dass es nach Injektion der NeuroD-mRNA in Embryonen von *Xenopus* zur Induktion einer ektopischen neurogenen Umwandlung (*ectopic neurogenic conversion*) der Zellen im Ektoderm kam. Den gleichen Effekt bewirkte eine ektopische Überexpression des NDRF ([McCormick et al., 1996](#)). NDRF sowie NEX aktivieren den GAP43-Promotor ([McCormick et al., 1996](#); [Uittenbogaard et al., 2003](#)). Eine Überexpression des NEX in PC12-Zellen führt zu deren Differenzierung in Neuronen ([Uittenbogaard und Chiaramello, 2002](#)).

Mitglieder der NeuroD-Familie werden in der Maus in unreifen und in differenzierten Neuronen der embryonalen und postnatalen Entwicklungsstadien exprimiert. Die Expression von NeuroD und NDRF beginnt am Tag E11, die des NEX-1 am Tag E14 ([Schwab et al., 1998](#)). NeuroD reguliert neben seiner Rolle in der Differenzierung von Neuronen auch die Entwicklung der Bauchspeicheldrüse. NeuroD-null-Mutantmäuse sterben innerhalb von fünf Tagen nach der Geburt aufgrund einer schweren Hyperglykämie ([Naya et al., 1997](#)).

NDRF spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der Amygdala: Laterale und basolaterale Amygdala wird in NDRF-null-Mäusen nicht gebildet. NDRF-null-Mutant-Mäuse sind nach der Geburt den Wildtyp-Geschwistertieren zwar ähnlich, später kommt es aber zu Entwicklungsstörungen und sie sterben 2 bis 3 Wochen nach der Geburt ([Lin et al., 2005](#)).

Während der Entwicklung des Kortex wird das NEX in einem definierten Zelltyp im Bereich der Ventrikularzone exprimiert. Später differenzieren sich diese Zellen zu glutamatergen pyramidalen Neuronen, die mit den höheren Schichten des Kortex verbunden sind ([Wu et al., 2005](#)). Das höchste NEX-Expressionsniveau wurde in der ersten postnatalen Woche beobachtet, wenn das Wachstum der Neuriten und die Synaptogenese hochaktiv sind ([Bartholomae und Nave, 1994](#); [Shimizu et al., 1995](#); [Schwab et al., 1998](#)). Eine Überexpression des NEX in neuronalen Vorläuferzellen resultiert in einer deutlichen Verkleinerung des Neokortex und führt möglicherweise zu einem vorzeitigen Austritt aus dem Zyklus und einer zu frühen neuronalen Differenzierung ([Ucar et al., in Vorbereitung](#)). [Uittenbogaard et al. \(2007\)](#) zeigten, dass die Expression des NEX von zwei Promotern, NEX P1 und NEX P2, die in separaten, nicht-kodierenden Exonen liegen (entsprechend 1a und 1b), kontrolliert wird. NEX P1 ist hauptsächlich durch CRE-, NEX P2 durch C/EBP-Bindungssequenzen reguliert.

2.5 Rolle der E-Proteine in der Entwicklung des Nervensystems

Während die Funktionen der NeuroD-Familie hinsichtlich ihrer Rolle bei der Zelldifferenzierung umfangreich untersucht wurden, konnten die Aufgaben von bHLH-Transkriptionsfaktoren der Klasse I (E-Proteine) in der neuronalen Entwicklung noch nicht aufgeklärt werden ([Ik Tsen Heng und Tan, 2003](#)). Bei Säugetieren wurden vier E-Proteine beschrieben: ME1 (HEB), ME2 (Tcf4, E2-2) sowie E12 und E47, zwei Splice-Varianten des E2A (E12/E47) Gens. Der Prozess der embryonalen Entwicklung der Maus reagiert sehr sensitiv auf Änderungen des E-Protein-Niveaus ([Zhuang et al., 1996](#)). Die Expressionsdomänen der E-Proteine deuten auf deren Rolle in frühen Entwicklungsstadien des Nervensystems hin.

Eine Expression des ME1 wurde bereits am E7 (embryonaler Tag 7), noch bevor die neurale Induktion stattfindet, im proliferativen Neuroepithel detektiert ([Uittenbogaard und Chiaramello, 2002](#)). Beim E2A fand sich eine Expression im Ventrikel ab E8,5 ([Roberts et al., 1993](#)). Die Expression des ME2 beginnt am E12 ([Soosaar et al., 1994](#)), sie ist besonders stark ausgeprägt in den Regionen von Kortex und Hippokampus. Bei E15,5 wird das ME2 prominent im Region der zukünftigen Hippokampus exprimiert. Im Kortex wiederum findet sich ein rostral-kaudaler Gradient in der Ventrikular- und Subventrikularzone mit höherem Expressionsniveau auf der kaudalen Seite. Am E18,5 ist die Expression des ME2 sehr stark im Bereich der kortikalen Platte, der Subplatte sowie der Ventrikular- und Subventrikularzone des Kortex vorhanden sowie im Hippokampus. In der kortikalen Platte wird ein Gradient mit höherem Niveau im anterioren im Vergleich zum posterioren Teil beobachtet ([Li et al., 2006](#)). [Flora et al. \(2007\)](#) berichteten, dass alle E-Proteine mit dem proneuralen Transkriptionsfaktor Math1 interagieren können. Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte in einer Studie in ME2 null-Mutanten, dass die Interaktion von ME2 mit Math1 spezifisch zur Entwicklung der pontinen Nuklei erforderlich ist.

Die E-Proteine E2A, ME1 und ME2 werden in neuronalen Vorläuferzellen hochexprimiert ([Uittenbogaard und Chiaramello, 2002](#); [Soosaar et al., 1994](#)). Sie bilden Heterodimere mit bHLH-Transkriptionsfaktoren der Klasse II ([Massari und Murre, 2000](#)) und sind somit für die Funktion der bHLH-Differenzierungsfaktoren notwendig. Dies ließ vermuten, dass E-Proteine einen Einfluss auf das Schicksal einer Zelle haben. Erst kürzlich konnte mit Hilfe von Ko-Präzipitationen in P19-Zellen nachgewiesen werden, dass alle obigen E-Proteine mit NDRF interagieren ([Ravanpay und Olson, 2008](#)). [Rothschild et al. \(2006\)](#) zeigten, dass die Balance zwischen E47 und Id2 in Neuroblastoma-Zellen den Ablauf des Zellzyklus reguliert. Eine Überexpression des ME2 aktivierte Id2-Promotor *in vitro* ([Neuman et al., 1995](#)). In einem Zellkulturmodell der Neurogenese führte eine Ko-Expression von E12 und NDRF zu einer signifikant erhöhten Inzidenz der Ausbildung von Neuronen ([Farah et al., 2000](#)). Interessant ist, dass ME1 und E2A als Repressoren des GAD43-Promotors wirken, also ähnlich wie ein dominant negativer Faktor Id2 ([Chiaramello et al., 1996](#)).

E-Proteine bilden auch Homodimere und werden in verschiedenen Organen von Vertebratenembryonen ubiquitär exprimiert. Ihre unabhängige Rolle von anderen HLH-Transkriptionsfaktoren während der Entwicklung kann nicht ausgeschlossen werden ([Ik Tsen Heng und Tan, 2003](#)).

ME1^{-/-}- und ME2^{-/-}-Mausmutanten zeigten eine perinatale und frühe postnatale Mortalität ([Zhuang et al., 1996](#)). Trotzdem wiesen diese Mutanten keine evidente neurologische Entwicklungsstörungen auf, was auf eine partielle Redundanz der genannten Faktoren während der Entwicklung des Nervensystems hindeuten könnte ([Zhuang et al., 1996](#)). [Ravanpay und Olson \(2008\)](#) berichteten, dass ME1- und E2A-null-Mutanten eine Reduktion des Hirnvolumens von 46% im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistertieren aufwiesen, ohne dass die Morphologie beeinträchtigt wurde. Es zeigte sich jedoch eine allgemeine Reduktion der Körpergröße im Vergleich zu den Kontrolltieren ([Ravanpay und Olson, 2008](#)). Eine Wachstumsretardierung wurde auch bei E2A-homozygoten Mutanten, bei denen die bHLH-Domäne deletiert worden war, beobachtet ([Zhuang et al., 1994](#)).

Bei Menschen verursachen Defekte in ME2-Gen eine schwere mentale Retardierung. Eine *de novo* vorkommende Haploinsuffizienz aufgrund einer Deletion im Locus des ME2-Gens auf Chromosom 18 (18q21) genügt, um ein Pitt-Hopkins-Syndrom hervorzurufen ([Brockschmidt et al., 2007](#); [Zweier et al., 2007](#); [Amiel et al., 2007](#); [Andrieux et al., 2008](#)). Beim Pitt-Hopkins-Syndrom (PHS) handelt es sich um eine schwere Entwicklungsverzögerung ([Pitt und Hopkins, 1978](#)). PHS-Patienten weisen charakteristische Gesichtszüge, Atemstörungen mit Hyperventilationsanfällen und eine fehlende Entwicklung der Sprachfähigkeit auf. Die Größe der analysierten Deletionen im ME2-Lokus variierte von 0,5 Mb ([Brockschmidt et al., 2007](#)) über 1,2 Mb ([Zweier et al., 2007](#)) und 1,8 Mb ([Amiel et al., 2007](#)) bis zu 6,2 Mb ([Andrieux et al., 2008](#)). Bei einigen Patienten wurden auch Stop- bzw. *splice site*-Mutationen beschrieben. Es wurde nachgewiesen, dass schon eine Missense-Mutation in einer der Aminosäuren im Exon 18 des ME2-Gens zum Auslösen der PHS ausreicht. In drei Fällen handelte sich um Arginin in der Position 576, die durch eine C→T- oder G→A-Transition zu Tryptophan bzw. Glutamin mutiert wurde. Diese Mutationen lagen in der basischen Domäne des ME2-Gens, die unter E-Proteinen sehr stark konserviert ist und lösten vermutlich einen dominant negativen Effekt aus. Arginin 576 spielt bei den E-Proteinen eine entscheidende Rolle in der Erkennung von DNA, da sie die direkt mit DNA interagierenden Glutamat-Reste stabilisiert ([Ma et al., 1994](#)). Eine gezielte Mutation im homologen Arginin in BMAL1 und in E12/E47 führte zu einem dominant negativen Effekt ([Zhuang et al., 1998](#); [Hosoda et al., 2004](#)).

PHS als Resultat einer Mutation in ME2 liefert einen eindeutigen Hinweis auf eine entscheidende Bedeutung des ME2 für die humane Entwicklung und schließt beim Menschen das Vorhandensein eines möglichen kompensatorischen Mechanismus aus.

2.6 bHLH-Transkriptionsfaktoren in der adulten Plastizität

Das Erlernen von bestimmten Verhaltensweisen und Erinnern an Ereignisse ist für das Überleben eines Tieres von entscheidender Bedeutung. Das Neuronennetzwerk reagiert dynamisch auf neue Reize mit strukturellen Veränderungen. Hierbei kommt es zu Modifikationen von synaptischen Verbindungen zwischen Neuronen: Bildung neuer Synapsen, Verstärkung oder Abschwächung bereits vorhandener Verbindungen sowie Abbau von nicht mehr notwendigen. Diese Plastizität erlaubt dem Nervensystem eine Speicherung und Weiterverarbeitung von Informationen sowie eine dynamische Anpassung an neue Bedingungen. Während die Ausbildung der Synapsen im Verlauf der Entwicklung genetisch gesteuert wird und unabhängig von Lernprozessen ist, steht die Plastizität im adulten ZNS in enger Verbindung mit gesammelten Erfahrungen und Reizen. Eine entscheidende Struktur für Gedächtnisbildung und Mediiierung von Lern- und Gedächtnisprozessen ist der Hippokampus. Läsionen des Hippokampus beeinträchtigen die Lern- und Gedächtnisfähigkeit. Ein Beispiel dafür lieferte der bekannte Fall eines Patienten, bei dem es aufgrund einer Läsion des medialen Temporallappens zu schweren Gedächtnisdefiziten kam. Er war nicht mehr in der Lage, neue Informationen über eine längere Zeit zu behalten. Dabei blieben die Gedächtnisinhalte, die vor der Läsion erworben wurden, weiter erhalten ([Scoville und Milner, 1957](#)). Viele Studien mit lädierten Versuchstieren bewiesen die zentrale Rolle des Hippokampus in Lernprozessen und Bildung von räumlichem Gedächtnis ([Morris et al., 1986](#); [Tsien et al., 1996b](#); [Martin et al. 2005](#), [Pastalkova et al., 2006](#)). Das meistuntersuchte Model für die synaptische Plastizität, die Langzeitpotenzierung (LTP, *long time potentiation*), wurde zum ersten Mal im Hippokampus identifiziert ([Bliss und Lømo, 1973](#)). LTP definiert die Steigerung der Feuerungsrate postsynaptischer Zellen nach tetanischer Stimulation sowie die Potenzierung der Reaktion der Pyramidenzellen auf folgende Stimuli. Diese Potenzierung kann bis zu einigen Wochen nach der Stimulierung erhalten bleiben ([Bliss und Lømo, 1973](#); [Bliss und Gardner-Medwin, 1973](#)). Höchstwahrscheinlich ist der Hippokampus für die initiale Phase von Lern- und Gedächtnisprozessen entscheidend. Das permanente Gedächtnis hingegen wird schrittweise im Kortex konsolidiert ([Squire und Bayley, 2007](#); [Nadel et al., 2007](#)).

Die Expression der bHLH-Transkriptionsfaktoren der NeuroD-Familie wurde in adulten Gehirnen im Hippokampus und im Kortex nachgewiesen. Die NeuroD-, NDRF- und NEX-Expression bleibt in definierten Subpopulationen von ausgereiften Neuronen erhalten ([Schwab et al., 2000](#)). So wiesen pyramidale Neurone der Subregionen CA1-3 im Hippokampus, Körnerzellen des Gyrus Dentatus (mit Ausnahme von NEX) sowie Körnerzellen im Cerebellum überlappende Expressionsmuster dieser Faktoren auf. Dies ließ eine Rolle der bHLH-Faktoren aus der NeuroD-Familie in der adulten Plastizität vermuten. Studien über einige Zielgene dieser Faktoren unterstützten diese Vermutung. Es konnte gezeigt werden, dass NeuroD die Expression des Gad1 (katalysiert Synthese von GABA) sowie des neuronalen Kinesins Kif5c beeinflusst. Kif5c wird postnatal in Motoneuronen

exprimiert und ist wahrscheinlich an der axonalen Elongation beteiligt ([Muñoz et al., 2007](#)). *In vitro* identifizierte Zielgene des NEX deuteten auf eine Rolle von NEX im Aufrechterhalten von adulten pyramidalen Neuronen hin ([Uittenbogaard und Chiaramello, 2005](#)).

Letztere *in vivo*-Untersuchungen lieferten weitere Belege für eine entscheidende Rolle der bHLH-Transkriptionsfaktoren in Lern- und Gedächtnisprozessen. Angstkonditionierungstests mit NDRF^{+/-}-Mäusen ließen ausgeprägte Defizite im kontextuellen sowie im Ton-Gedächtnis der Mutanten erkennen ([Lin et al., 2005](#)). Heterozygote NDRF-Mäuse wiesen in der lateralen und basolateralen Amygdala eine reduzierte Anzahl an Neuronen auf ([Lin et al., 2005](#)) und zeigten verminderte Ängstlichkeit in *Elevated Plus Maze*- und *Light Dark Preference*-Tests.

NEX-null-Mutantmäuse zeigten keinen eindeutigen morphologischen Phänotyp aufgrund der funktionellen Redundanz der Faktoren der NeuroD-Familie ([Schwab et al., 1998](#)). Erst kürzlich wurden eine Hyperaktivität der NEX-null-Mutanten, eine Verlangsamung des räumlichen Lernens und Defekte im kontextuellen Gedächtnis beschrieben ([Ucar, 2007](#)). Ein genauer Mechanismus der Auswirkung des NDRF^{+/-}- und NEX null-Genotyps auf die adulte Plastizität bleibt jedoch noch unklar.

Die Funktion der E-Proteine in adulten Gehirnen wurde noch nicht ausreichend untersucht, ihre Rolle in der adulten Plastizität bleibt unbekannt. Im ZNS von Adulten bleibt die Expression von E2A, ME1 und ME2 weiter erhalten ([Chiaramello et al., 1995b](#); [Uittenbogaard und Chiaramello, 2000](#)). Die ME1- und ME2-Expressionsdomänen sind in adulten Gehirnen aber nur teilweise überlappend. So bleibt die Expression des ME2 in den für das Lernen und die Gedächtnisbildung entscheidenden Strukturen - im Kortex, in Subregionen des Hippokampus (CA1-3), im Gyrus Dentatus sowie im Cerebellum - stark erhalten, während das Expressionsniveau des ME1 in diesen Regionen deutlich reduziert wird und nur im Cerebellum deutlich ausgeprägt bleibt ([Chiaramello et al., 1995b](#)). Homodimere von ME1 sowie ME2 weisen verschiedene Präferenzen bezüglich der Bindung an spezifische E-Boxen auf ([Chiaramello et al., 1995b](#)). Diese Tatsache sowie eine differenzierte Expression von ME1 und ME2 ließ auf unterschiedliche Rollen der E-Proteine im adulten ZNS schließen. ME2 könnte, weil es in den Hirnregionen, die eine hohe Plastizität aufweisen, weiterhin exprimiert wird, unter den E-Proteinen eine entscheidende Rolle in Lern- und Gedächtnisbildungsprozessen spielen.

Eine verhaltensbiologische Analyse von ME2-Mutant-Mäusen könnte Rückschlüsse auf die Rolle der E-Proteine in der adulten Plastizität ermöglichen. Studien zu ME2-defizienten Mäusen sind in der Literatur spärlich vertreten. ME2^{-/-}-Mutanten sind für Untersuchungen der Lernfähigkeiten aufgrund ihrer frühen Mortalität nicht geeignet ([Zhuang et al., 1996](#)). Wie die Autoren ausführten, wurden ME2-null-Mutanten extrem selten geboren und zeigten eine perinatale Mortalität. Eine andere Gruppe ([Flora et al., 2007](#)) berichtete dagegen von einer normalen Mendelschen Rate bei der Geburt von ME2^{-/-}-Mäusen und einer Mortalität um P14.

Die von dieser Gruppe durchgeführte Hirnmorphologie-Analyse der ME2-defizienten Mäusen erbrachte kaum Unterschiede zu den Wildtyp-Geschwistertieren. Eine detaillierte anatomische Untersuchung zeigte Anomalitäten nur in pontinen Nuklei: Eine drastische Reduktion in der Größe dieser Struktur. Ein Grund dafür war, dass neuronale Vorläufer der pontinen Nuklei deren Zielregion nicht erreichten ([Flora et al., 2007](#)). Von [Bergqvist et al. \(2000\)](#) wurde mit Hilfe des Cre-Systems eine konditionelle Mausmutante generiert, die aus einem Mosaik von ME2^{+/-}- und ME2^{-/-}-Zellen bestand. Diese Gruppe zeigte, dass ein ME2-Defizit zu einer partiellen Hemmung der B- und T-Lymphozytenentwicklung führt. In der genannten Arbeit fehlen leider Angaben über Auswirkungen der ME2-Defizienz auf das Nervensystem.

ME1^{+/-}- und ME2^{+/-}-heterozygote Mäuse wurden bereits generiert. Sie zeigten einen normalen Phänotyp und unterschieden sich nicht von ihren Wildtyp-Geschwistertieren ([Zhuang et al., 1996](#); [Flora et al., 2007](#)). Bisher fehlen leider verhaltensbiologische Studien zu diesen Mutanten, die Rückschlüsse auf deren Lernfähigkeiten erlauben würden.

3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion des basischen Helix-Loop-Helix (bHLH)-Transkriptionsfaktors ME2 in Lern- und Gedächtnisprozessen des adulten zentralen Nervensystems (ZNS) zu analysieren. Im Verlauf der Entwicklung des ZNS werden ME2 sowie die bHLH-Transkriptionsfaktoren der NeuroD-Familie prominent exprimiert und sind an der Kontrolle neuronaler Differenzierungsprozesse beteiligt. Die Expression dieser Faktoren bleibt auch in postmitotischen Neuronen des adulten Gehirns, wie Hippokampus und Kortex, erhalten. Diese Bereiche des Gehirns spielen bei Lern- und Gedächtnisfunktionen eine entscheidende Rolle. Daher wurde postuliert, dass diese Transkriptionsfaktoren auch im adulten ZNS eine Funktion in der Regulation neuronaler Plastizität haben könnten. Die zugrunde liegende Arbeitshypothese war, dass einige der strukturellen Veränderungen, die von neuronalen bHLH Faktoren während der Entwicklung gesteuert werden, auch im erwachsenen Tier noch aktiv sind und eine Rolle beim Lernen und der Gedächtnisbildung spielen könnten.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte folgenden Fragestellungen nachgegangen werden:

Zunächst sollten verhaltensbiologische Analysen an einer Mausmutante, die im Vorderhirn ein dominant negatives ME2-Protein (dnME2) exprimiert, durchgeführt werden. Damit sollten erste Hinweise auf die Rolle von Proteinen der NeuroD-Familie in Lern- und Gedächtnisprozessen erhalten werden. Da ME2 vermutlich der obligate Dimerisierungspartner der drei NeuroD-Familienmitglieder im adulten Gehirn ist, sollte die Expression des dnME2 die funktionelle Redundanz zwischen den NeuroD-Verwandten aufheben. Damit sollte deren Funktion im adulten Gehirn parallel nach dem *loss of function*-Prinzip beeinträchtigt werden. Um potentielle Entwicklungsstörungen zu vermeiden sollte die Expression des Transgens durch die Anwendung des TetO-System (Gossen und Bujard, 1992) zeitlich und örtlich kontrolliert werden.

Mit einer zweiten Mauslinie sollte ein *gain of function*-Experiment durchgeführt werden. Hierfür sollte eine Mutante untersucht werden, die im Vorderhirn ME2 postnatal überexprimiert. Die ME2-überexprimierenden Mäuse sollten einer phänotypischen Charakterisierung mit Blick auf hippokampusassoziierte Lern- und Gedächtnisprozesse unterzogen werden. Zur Untersuchung von Navigationsfähigkeit und räumlichem Gedächtnis sollte der *Water Maze*-Test und zur Beurteilung des kontextuellen sowie des Ton-Gedächtnisses bei Mutanten ein Angstkonditionierungs-Test herangezogen werden. Außerdem sollte auf molekularer Ebene der Einfluss der ME2-Überexpression *in vivo* auf die Regulierung potentieller Zielgene überprüft werden.

4 ERGEBNISSE

4.1 Der Transkriptionsfaktor ME2 und seine potentiellen Interaktionspartner

4.1.1 ME2 interagiert mit bHLH-Transkriptionsfaktoren der NeuroD-Familie *in vitro*

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Rolle von ME2-Transkriptionsfaktoren in der adulten Plastizität untersucht werden. Die Identifizierung von Interaktionspartnern des ME2 sollte Hinweise auf seine Funktionen bei Lern- und Gedächtnisbildungsprozessen geben. Als mögliche Kandidaten wurden die neuronspezifischen bHLH-Transkriptionsfaktoren der NeuroD-Familie ausgewählt. Viele durchgeführte Studien am Nervensystem, am Blut und an den Muskeln zeigten, dass zur transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen eine Bildung von Homodimeren aus E-Proteinen oder eine Bildung von Heterodimeren aus einem E-Protein und einem der bHLH-Transkriptionsfaktoren der Klasse II erforderlich ist ([Massari und Murre, 2000](#)). Um der Fragestellung nachzugehen, ob das E-Protein ME2 an der Bildung von Heterodimeren, die Faktoren der NeuroD-Familie beinhalten, beteiligt ist, wurden reporterergenbasierte Luziferase-Assays in PC12-Zellen durchgeführt (Abb. 3).

Als Reporter wurde die Glühwürmchen-Luziferase (*firefly luciferase*) ausgewählt, die von einem E-Box-TK-Promotor getrieben wurde (Abb. 3 A). Bei der Transfektion von ME2 alleine zeigte der E-Box-Reporter eine niedrige Aktivität, die im Hintergrundbereich lag (Abb. 3 B). Im Gegensatz zu ME2 wies NeuroD etwas erhöhte Hintergrundwerte auf, was vermutlich auf spezifische Effekte in PC12-Zellen zurückzuführen ist. Eine Ko-Transfektion von ME2 und NeuroD führte zu einer 3,3-fachen Aktivierung des Reporters. Es ergab sich die Frage, ob diese Transaktivierungsdomänen zur Interaktion der Transkriptionsfaktoren erforderlich sind. Hierfür wurden Konstrukte von ME2 und NeuroD kloniert, die keine Transaktivierungsdomänen besaßen und nur noch aus den jeweiligen bHLH-Domänen bestanden. Es wurden folgende Kombinationen von Ko-Transfektionen durchgeführt:

1. ME2-bHLH-Domäne mit Volllänge-NeuroD
2. Volllänge-ME2 mit NeuroD-bHLH-Domäne
3. ME2-bHLH-Domäne mit NeuroD-bHLH-Domäne

Eine schwache Aktivierung des Reportergens infolge Ko-Transfektion mit ME2-bHLH und NeuroD lag im Hintergrundbereich des Auslesesignals, das NeuroD allein bewirkte. Bei keiner der zwei anderen Kombinationen konnte eine Aktivierung des Reporters gezeigt werden (Abb. 3 B). Dies deutete darauf hin, dass die Transaktivierungsdomänen sowohl von ME2 als auch von NeuroD zur transkriptionellen Aktivierung des Reportergens erforderlich sind.

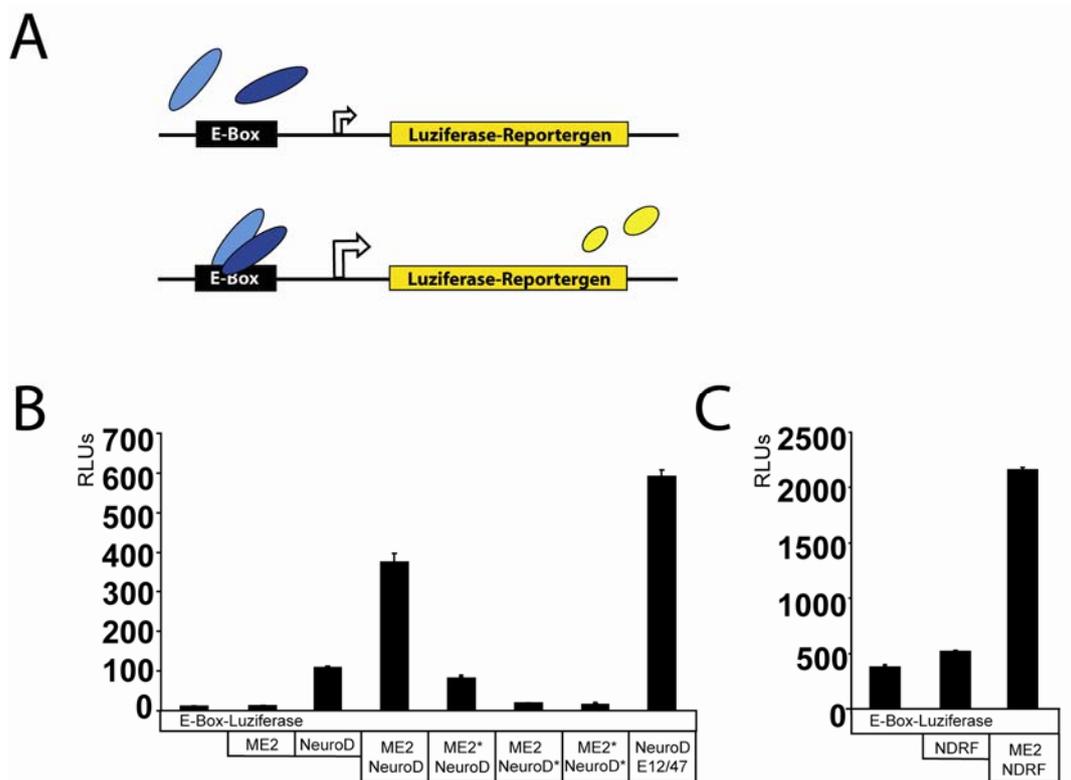


Abb. 3 ME2 interagiert in vitro mit NeuroD und NDRF

A) Funktionsprinzip des Luciferase-Assays. Nach einer Ko-Transfektion kommt es zur Expression der zu untersuchenden Interaktionspartner in einer Zellkultur. Im Fall einer Interaktion binden die Dimere an regulatorische Sequenzen (hier: E-Box), was zu einer transkriptionellen Aktivierung des Reportergens führt.

B) PC12-Zellen wurden mit den angegebenen Expressionsvektoren transient transfiziert und nach 36 h einer Luciferase-Analyse unterzogen. Die Ko-Expression des Volllänge-ME2 mit dem Volllänge-NeuroD führte zu einer Aktivierung des E-Box-TK-getriebenen Luciferasereportergens. Die Ko-Expression der bHLH-Domäne des ME2 (ME2*) mit dem Volllänge-NeuroD zeigte ein leicht erhöhtes Reportersignal, das im Hintergrundbereich des NeuroD lag. Bei der Ko-Expression des Volllänge-ME2 mit der bHLH-Domäne des NeuroD (NeuroD*) wurde keine Aktivierung des Reporters beobachtet. Die Ko-Expression der bHLH-Domäne des ME2 (ME2*) mit der bHLH-Domäne des NeuroD (NeuroD*) zeigte keine Aktivierung des Luciferase-Reportergens.

C) Das Luciferase-Reportergen wird durch die Ko-Expression von ME2 und NDRF aktiviert. PC12-Zellen wurden mit dem Luciferase-Reportergen und den jeweils angegebenen Konstrukten transfiziert, 36 h nach der Transfektion lysiert und mit einem Luciferase-Testsystem analysiert. RLUs, relative Luciferase-Einheiten; n=6.

Als ein weiterer möglicher Kandidat, der mit ME2 interagieren könnte, wurde NDRF untersucht. Eine Ko-Transfektion von ME2 mit NDRF führte zu einem 4,4-fach stärkeren Auslesesignal des Reportergens, so dass eine Interaktion von ME2 mit NDRF vermutet werden konnte (Abb. 3 C). Erst vor kurzem konnte diese Interaktion mittels Ko-Immunopräzipitation in P19-Zellen nachgewiesen werden ([Ravanpay und Olson, 2008](#)).

4.1.2 ME2 interagiert mit bHLH-Transkriptionsfaktoren der NeuroD-Familie *in vivo*

Interaktionen zwischen ME2 und NeuroD sowie zwischen ME2 und NDRF wurden bislang noch nicht *in vivo* beschrieben. Um die *in vitro*-Resultate *in vivo* zu verifizieren, wurden Ko-Immunopräzipitationen mit Hilfe von α -ME2-Antikörpern in Proteinlysaten aus dem Kortex, dem Hippokampus und dem Cerebellum der Wildtyp-Mäuse durchgeführt. Mit Hilfe spezifischer α -NeuroD-Antikörper wurde NeuroD in den Ko-Immunopräzipitat-Fractionen aus allen drei Gewebelysaten nachgewiesen (Abb. 4 A). Dabei war die dem NeuroD entsprechende Bande schwach in Kortex-, dagegen deutlich in Hippokampus- sowie Cerebellumlysaten zu erkennen. Eine Inkubation desselben Blots mit α -NDRF-Antikörpern ergab eine dem NDRF-Protein entsprechende starke Bande in Cerebellum- und eine schwache in Kortex-Proteinextrakten (Abb. 4 B). Somit konnten Interaktionen zwischen ME2 und NeuroD sowie ME2 und NDRF *in vivo* erfolgreich bestätigt werden.

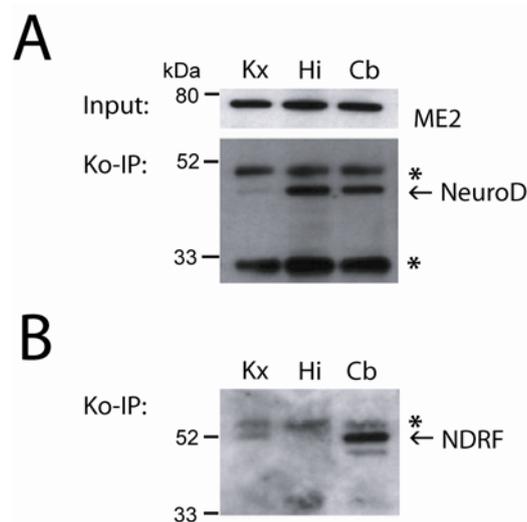


Abb. 4 ME2 interagiert *in vivo* mit NeuroD und mit NDRF

Western-Blot-Analyse von Ko-Immunopräzipitationen mit α -ME2-Antikörpern in Kortex-, Hippokampus- und Cerebellum-Proteinextrakten einer adulten Wildtyp-Maus.

Oberes Panel: Kontrolle der Input-Fractionen mittels α -ME2-Antikörpern.

Mittleres Panel: Detektion des NeuroD mit Hilfe der α -NeuroD-Antikörper.

Unteres Panel: Der Blot wurde gestriipt und mit α -NDRF-Antikörpern inkubiert. Eine NDRF entsprechende Bande war in Cerebellum-Extrakten stark und in Kortex-Lysaten schwach zu erkennen. Es wurden jeweils 40 μ g des Gesamtproteinextraktes pro Spur geladen. Mit einem Sternchen wurden die leichten und die schweren Ketten der α -ME2-Antikörper markiert.

4.2 Generation der dnME2-exprimierenden Mäuse

Basische Domänen sind eine Voraussetzung für die Funktionalität der bHLH-Transkriptionsfaktoren. Sie ermöglichen eine Bindung an die DNA ([Murre et al., 1989a](#)). Die im Rahmen dieser Studie durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass die bHLH-Transkriptionsfaktoren der NeuroD-Familie mit dem E-Protein ME2 *in vitro* und *in vivo* interagieren können. Die Proteine der NeuroD-Familie werden in meist postmitotischen Neuronen exprimiert und sind an deren Differenzierung beteiligt. Die Expression der Faktoren der NeuroD-Familie bleibt auch in adulten Gehirnen, in Regionen wie dem Kortex, den Subregionen des Hippokampus CA1 und CA3 sowie der Amygdala, erhalten ([Bartholomea und Nave, 1994](#); [Schwab et al., 1998](#)). Dies ließ eine Rolle von NeuroD, NDRF und NEX auch in der adulten Plastizität vermuten. Angstkonditionierungs-Tests mit NDRF^{+/-}-Mäusen ließen ausgeprägte Defizite im kontextuellen sowie im Ton-Gedächtnis der Mutanten erkennen ([Lin et al., 2005](#)). NEX-null-Mutanten wiesen eine Verlangsamung des räumlichen Lernens und Defekte im kontextuellen Gedächtnis auf ([Ucar, 2007](#)). Alle drei Transkriptionsfaktoren weisen eine hohe Redundanz untereinander auf ([Schwab et al., 1998](#); [Bormuth et al.](#), in Vorbereitung). Die HLH-Faktoren der Id-Familie, die keine basische DNA-Bindungsdomäne aufweisen, können mit Transkriptionsfaktoren der NeuroD-Familie interagieren. Eine solche Heterodimerisierung des Id2 mit NeuroD verhindert eine Bindung des Dimers an die E-Box und somit eine transkriptionelle Aktivierung des Zielgens ([Ghil et al., 2002](#)). Um die Funktionen von NEX, NeuroD und NDRF in definierten Regionen des Gehirnes gleichzeitig zu inhibieren, wurde eine Mauslinie erzeugt, die im Vorderhirn ein mutiertes ME2-Protein bildet. Dieses veränderte Protein verfügt nur über eine HLH-Domäne, die eine Interaktionsfähigkeit mit Faktoren der NeuroD-Familie ermöglicht. Eine Bindung der entstandenen Heterodimere an regulatorischen DNA-Sequenzen wird jedoch verhindert. Somit sollte das verkürzte ME2 die Funktion eines dominant negativen Faktors übernehmen. Das mutierte Protein wird hier daher als dnME2 bezeichnet.

Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass eine unkontrollierte Expression des dnME2 im Mausehirn während der embryonalen Entwicklung eventuell zu Entwicklungsstörungen des Gehirns oder sogar zu einem letalen Phänotyp führt. Zum Beispiel zeigten ME2-null-Mutantmäuse Defizite speziell in der Entwicklung von pontinen Nuklei ([Flora et al., 2007](#)). Außerdem löst schon eine Mikrodeletion im ORF (*open reading frame*) des ME2-Gens ein schweres Pitt-Hopkins-Syndrom beim Menschen aus ([Brockschmidt et al., 2007](#); [Amiel et al., 2007](#); [Zweier et al., 2007](#); [Andrieux et al., 2008](#)). Daher wurde das Tet-Off-System zur zeitlichen und örtlichen Expressionskontrolle verwendet ([Gossen und Bujard, 1992](#)).

4.2.1 Verwendung des TetO-Systems zur Kontrolle der zeitlichen und örtlichen dnME2-Expression

Hierfür kamen zwei transgene Linien zur Anwendung (Abb. 5). In der ersten Linie, der sog. Aktivator-Maus (Abb. 5 A), wurde unter Kontrolle des CamKII α -Promotors ein Transaktivatorprotein (tTa) im Vorderhirn exprimiert ([Mansuy et al., 1998](#); [Mayford et al., 1996](#)). CamKII α -Promotor wird erst ab der ersten bis zweiten postnatalen Woche aktiv ([Kojima et al., 1997](#)) und ist neuronspezifisch ([Mayford et al., 1996](#)). Das tTa-Protein ist ein Fusionsprodukt aus zwei verschiedenen Proteinen. Es besteht aus dem Repressor des Tetrazyklin-Resistenz-Operons des Tn10-Transposons aus *E.coli* und der Transaktivator-Domäne des VP16-Proteins aus Herpes Simplex-Viren. In Abwesenheit von Tetrazyklin weist das tTa eine hochspezifische Bindung an den Tet-Operator auf, welche zu dessen Aktivierung führt. Der Tet-Operator (TetO) ist eine Sequenz, die eine bidirektionale Regulation der Transkription ermöglicht. Zur Repression des TetO-Promotors wird das Antibiotikum Tetrazyklin oder dessen Derivat Doxyzyklin verwendet. Die Moleküle des Antibiotikums binden an tTa, was zu einer Konformationsänderung des tTa und zur Bildung nicht funktioneller Tetrazyklin-tTa-Komplexe führt.

In der zweiten Linie, den in dieser Arbeit generierten dnME2-exprimierenden Mäusen (als Reporter-transgene Mäuse bezeichnet; RT, Abb. 5 B), kontrollierte die TetO/TATA-Minimalpromotoren-Kassette die gleichzeitige Transkription des dnME2 und des β -Galaktosidase-Reportergens. Bei Verpaarung einer Aktivator- mit einer Reporter-Maus wurden neben Aktivator- und Reporter- auch doppelt-transgene Mäuse geboren (DT; Abb. 5 C). In den Neuronen der DT-Mäuse, die CamKII α -Promotor-Aktivität aufwiesen, kam es zur Expression des tTa, welches wiederum die Expression des dnME2 und des β -Galaktosidase-Reportergens aktivierte. Um die Expression des Transgens erst postnatal zu induzieren, wurde allen für Verpaarungen verwendeten Tieren der MHXB-Linie Doxyzyklin im Trinkwasser (2 mg/ml) appliziert. Durch Beimischung von Saccharose (5%) sollte der bittere Geschmack des Doxyzyklins maskiert werden. Die Haltung der Tiere unter Doxyzyklin erfolgte ab dem Moment der Verpaarung über den Zeitraum der Schwangerschaft hinaus und wurde erst beim Absetzen der Jungtiere von der Mutter (P21) gestoppt.

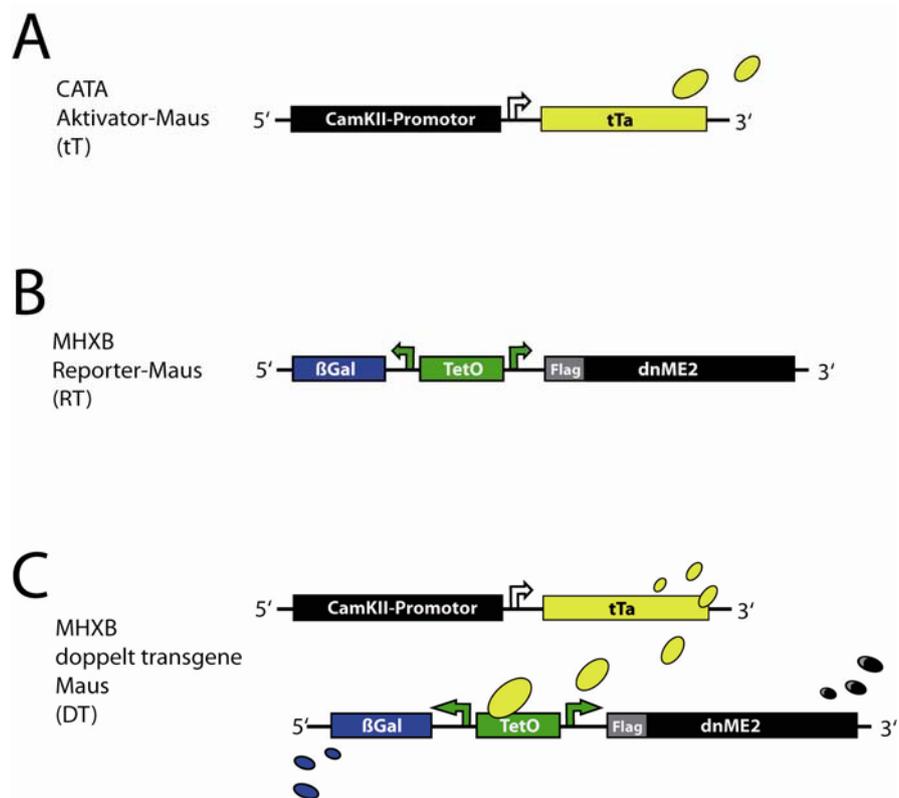


Abb. 5 Schematische Darstellung des Prinzips des verwendeten TetO-Systems

A) und B) Für das TetO-System wurden zwei transgene Mauslinien benötigt:

A) In der Aktivator-Maus (CATA-Linie, tT) wurde ein Transaktivatorprotein (tTa) unter Kontrolle des neuronspezifischen CamKII α -Promotors im Vorderhirn exprimiert.

B) In der Reporter-Mauslinie standen das Reportergen β -Galaktosidase und das 3xFlag-markierte dnME2 unter Kontrolle des bidirektionalen Tetrazyklin-Resistenz-Operons (TetO).

C) Das bidirektionale Tetrazyklin-Resistenz-Operon (TetO) konnte im Vorderhirn der doppelt transgenen Maus (DT) von dem neuronal exprimierten Transaktivatorprotein (tTa) aktiviert werden. Dies führte zu einer gleichzeitigen Transkription des β -Galaktosidase-Reportergens und des 3xFlag-markierten dnME2.

4.2.2 Das dnME2-Konstrukt

Der dnME2-Expressionsvektor wurde im Labor von M. Rossner kloniert. Die das ME2 kodierende Sequenz, verkürzt auf die die HLH-Domäne kodierende Region (Abb. 6 A), wurde unter Kontrolle des CamKII α -Promotors gestellt. Um die spätere Detektion des mutierten Proteins zu erleichtern, wurde die dnME2-Sequenz am 5'-Terminus mit 3xFlag-Tag versehen. Abb. 4 B zeigt das Schema des dnME2-Konstrukts.

4.2.3 Kontrolle der *in vivo*-Funktionalität des dnME2-Konstrukts

Basierend auf den *in vitro*- und *in vivo*-Resultaten, die zeigten, dass ME2 mit NeuroD interagiert (Abb. 3 B und Abb. 4 A), wurde eine funktionelle Analyse des dnME2 mit Hilfe des Luziferase-Assays in PC12-Zellen durchgeführt (Abb. 6 C). Einzel-Transfektionen von ME2, dnME2, NeuroD und Id1 hatten keine Auswirkungen auf die Aktivierung des vom E-Box-TK-Promotor kontrollierten Reportergens. Eine Ko-Transfektion von NeuroD mit ME2

dagegen führte zu einem stark erhöhten Signal. Dieses wurde zudem durch eine weitere Transfektion von Id1 signifikant reduziert. Einen vergleichbaren Effekt auf die Reporter-gen-Aktivität hatte eine Ko-Transfektion von dominant negativen ME2 mit ko-transfizierten ME2 und NeuroD. Die Aktivierung des Reporters durch ME2-NeuroD-Heterodimere wurde von dnME2 signifikant reduziert. Somit wurde eine biologische Funktionalität des dnME2-Konstrukts, die der Rolle von Id1 vergleichbar ist, nachgewiesen.

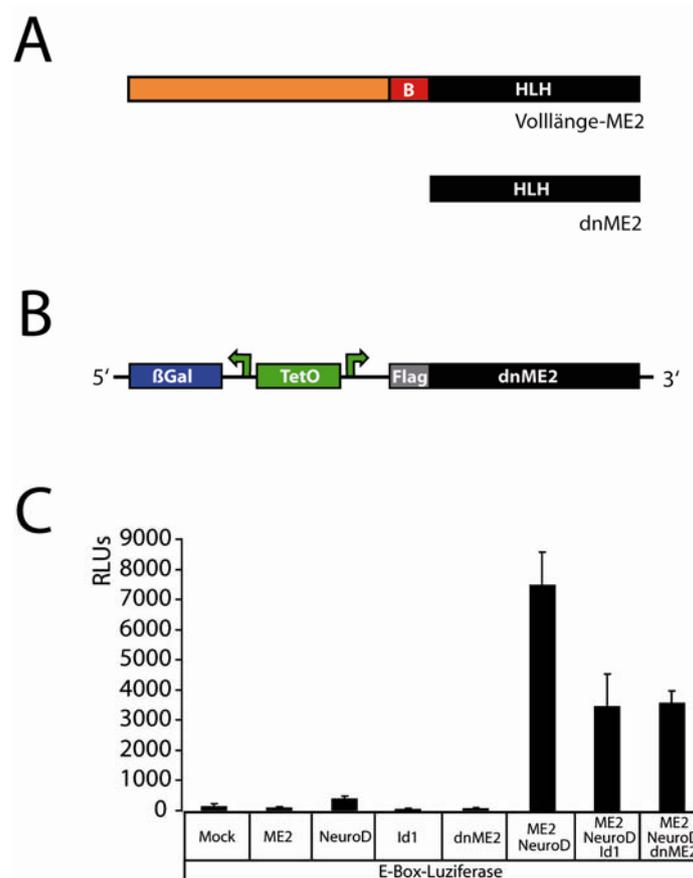


Abb. 6 Das dnME2-Konstrukt ist biologisch funktionell

A) Das Volllänge-ME2 umfasste das vollständige Produkt des ME2-Gens, einschließlich der basischen und der HLH-Domäne. Das dnME2 bestand nur aus der HLH-Domäne. Ausgerechnete Proteingröße: ME2: 73,5 kDa, dnME2: 29,5 kDa.

B) Schematische Darstellung des dnME2-Konstruktes. Das bidirektionale Tetrazyklin-Resistenz-Operon (TetO) kontrollierte gleichzeitig die Transkription des 5'-terminal gelegenen β-Galaktosidase-Reportergens und des 3'-terminal gelegenen dnME2. Zur Detektion des mutierten Proteins wurde es am 5'-Terminus mit einem 3xFlag-Tag versehen.

C) Nachweis der biologischen Funktionalität des dnME2-Konstruktes. Die angegebenen Kombinationen von Expressionsvektoren wurden transient in PC12-Zellen transfiziert und nach 36 h einer Luziferase-Analyse unterzogen. Eine Ko-Expression von ME2 mit NeuroD führte zu einer starken Aktivierung des Luziferase-Reportergens. Diese Aktivierung konnte von dem dominant negativen Faktor Id1 deutlich reduziert werden. Diese starke Verminderung des Reporterauslesesignals, ähnlich dem Effekt des Id1, wurde bei einer Ko-Expression von ME2 mit NeuroD und dnME2 beobachtet. RLUs, relative Luziferase Einheiten; n=6.

4.2.4 Herstellung der dnME2-exprimierenden Mäuse (MHXB-Linie)

Das dnME2-Konstrukt wurde in die Oozyten des Mausstammes FVB/N injiziert. Die transgenen Tiere (*founders*) wurden über mehrere Generationen auf den reinen C57Bl/6N-Hintergrund rückgekreuzt. Die so entstandenen Tiere der MHXB-Linie wurden als Reporter-Mäuse bezeichnet und entsprechend mit der CATA-Linie weiter verpaart. Die Genotypisierung der Mäuse mit dnME2-Konstrukt erfolgte mittels PCR (Abb. 7 A). Es wurden spezifische Primer für das β -Galaktosidase-Gen (lacZ-PCR), für die B1B2-Rekombinations-Sequenz des dnME2 (b-site-PCR) und für die tTa-Sequenz (tTa-PCR) verwendet. Die Nachkommen der MHXB-Linie bestanden aus Tieren folgender drei Genotypen:

BEZEICHNUNG	TRANSGENSTATUS	ABKÜRZUNG	DETEKTIERTER GENOTYP
Doppelt transgene Maus	doppelt transgen	DT	LacZ, b-site, tTa
Reporter-Maus	einzeltransgen	RT	LacZ, b-site
Aktivator-Maus	einzeltransgen	tT	tTa

4.2.5 Analyse der Expression des dnME2 in transgenen Mäusen

Um die Transkription des dnME2-Transgens nachzuweisen, wurden die Hippokampi der adulten doppelt transgenen Mäuse sowie jene der RT- und tT-Kontrolltiere aus der MHXB-Linie analysiert. Die Gesamt-RNA der Hippokampi wurde isoliert und anschließend einer Northern-Blot-Analyse unterzogen. Mit einer radioaktiv markierten Sonde konnte sowohl das endogene ME2, als auch das transgene dnME2 spezifisch detektiert werden (Abb. 7 B). Bei allen untersuchten Tieren wurde eine dem nativen ME2 entsprechende Bande nachgewiesen. Wie erwartet wurde das Transkript des verkürzten dnME2 nur bei den DT-Tieren detektiert. Zur Überprüfung der dnME2-Expression wurde eine Analyse auf Proteinebene durchgeführt. Hierzu erfolgte eine Präparation des Kortex, des Hippokampus und des Cerebellums der adulten DT-Maus sowie ihrer RT- und tT-Geschwistertiere. Die hergestellten Proteinlysate wurden mittels Western-Blot analysiert (Abb. 7 C). Eine Inkubation des Blots mit α -ME2-Antikörpern zeigte deutliche Banden in allen analysierten Extrakten. Das Immuno-Blotting mit dem α -Flag-Antikörper führte zur Detektion der dnME2-entsprechenden Banden im Lysat des Kortex und des Hippokampus der DT-Maus. Im Cerebellum des DT-Tieres wurde keine Bande detektiert. Dies entsprach den Erwartungen an das Expressionsverhalten des vorderhirnspezifischen CamKII α -Promotors. Wie erwartet konnten mit α -Flag-Antikörpern keine Banden in den kortikalen Lysaten der RT- und tT-Mäuse nachgewiesen werden.

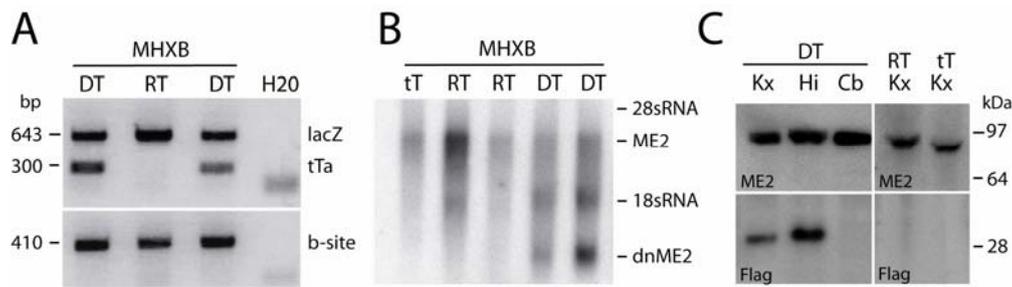


Abb. 7 Analyse der Präsenz des dnME2-Transgens auf genomischer, RNA- und Protein-Ebene

A) PCR-Analyse der MHXB-Mäuse. Die einzeln transgenen Mäuse (Reporter-transgen, RT) wiesen spezifische Banden für das dnME2-Konstrukt und das β -Galaktosidase-Reportergen (entsprechend 410 bp und 643 bp) auf. Bei den doppelt transgenen Mäusen (DT) wurden die für das dnME2, das β -Galaktosidase-Reportergen sowie für das tTa (300 bp) spezifischen Produkte generiert. Als Kontaminationskontrolle wurde der PCR-Ansatz ohne DNA-Matrize auf das Agarosegel aufgetragen (H_2O). Die schwache Bande in der Wasserkontrolle entspricht den Dimeren der eingesetzten Primer. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,5%-igen Agarosegel aufgetragen, aufgetrennt und anschließend fotodokumentiert.

B) Northern-Blot-Analyse der RNA aus den Hippokampi einer Aktivator-Maus (tT), zwei Reporter-transgenen Mäusen (RT) und zwei doppelt transgenen Mäusen (DT). Der Blot wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde für Volllänge-ME2 und für dnME2 hybridisiert. Dem endogenen ME2 entsprechende Banden wurden in allen Spuren detektiert. Die dnME2-Transkripte wurden nur bei den doppelt transgenen Mäusen beobachtet.

C) Western-Blot-Analyse der MHXB-Mäuse. Proteinextrakte aus verschiedenen Gehirnstrukturen (Kortex (Kx), Hippokampus (Hi), Cerebellum (Cb)) der doppelt transgenen Mäuse (DT), der Reporter-transgenen Mäuse (RT) und der Aktivator-Maus (tT) wurden auf einem Western-Blot untersucht. Eine Inkubation des Blots mit α -ME2-Antikörpern ergab dem endogenen ME2 entsprechende Banden in allen analysierten Proteinlysaten. Mit Hilfe der α -Flag-Antikörper konnte eine dem transgenen dnME2 entsprechende Bande ausschließlich in den doppelt transgenen Tieren nachgewiesen werden. Pro Spur wurden jeweils 40 μ g des Gesamtproteinextrakts aufgetragen. Kalkulierte Proteingrößen: 3xFlag-ME2: 95,6 kDa, dnME2: 29,5 kDa. 28S rRNA-Größe: 4718 bp; 18S rRNA-Größe: 1874 bp. kDa, Kilodalton; bp, Basenpaare.

Im Weiteren sollte die exakte Lokalisierung des mutierten Proteins in den Gehirnen der DT-Mäuse visualisiert werden. Hierzu wurden Vibratonschnitte der DT- und RT-Mäuse einer X-Gal-Färbung unterzogen und auf diese Weise das β -Galaktosidase-Reportergen sichtbar gemacht (Abb. 8). Eine spezifische Blau-Färbung war nach einer 15- bis 60-minütigen X-Gal-Färbung zu erkennen (siehe Abb. 8 B-E). Bei den doppelt transgenen Mäusen kam im Vorderhirn eine Farbreaktion in variabler Stärke zustande. Die Gehirnschnitte der RT-Tiere zeigten nach einstündiger Farbreaktion keine blaue Färbung (Abb. 8 A). Eine schwache Anfärbung der Schnitte der doppelt transgenen Tiere zeigten einige Neurone im Bulbus Olfactorius (Abb. 8 B). Eine starke Farbreaktion konnte im Kortex (besonders in Schicht II und III) beobachtet werden (Abb. 8 C). Auch das Striatum war positiv gefärbt (Abb. 8 D). Weiterhin wurde eine deutliche Reportergen-Expression in den hippokampalen Subregionen CA1, CA3 und im Gyrus Dentatus nachgewiesen (Abb. 8 E). Im Cerebellum, wo der CamKII α -Promotor laut Literatur keine Aktivität aufweist, kam es zu einer sehr schwachen Färbung weniger Zellen (Abb. 8 F). Dies ist möglicherweise auf die Aktivität der endogenen β -Galaktosidase zurückzuführen.

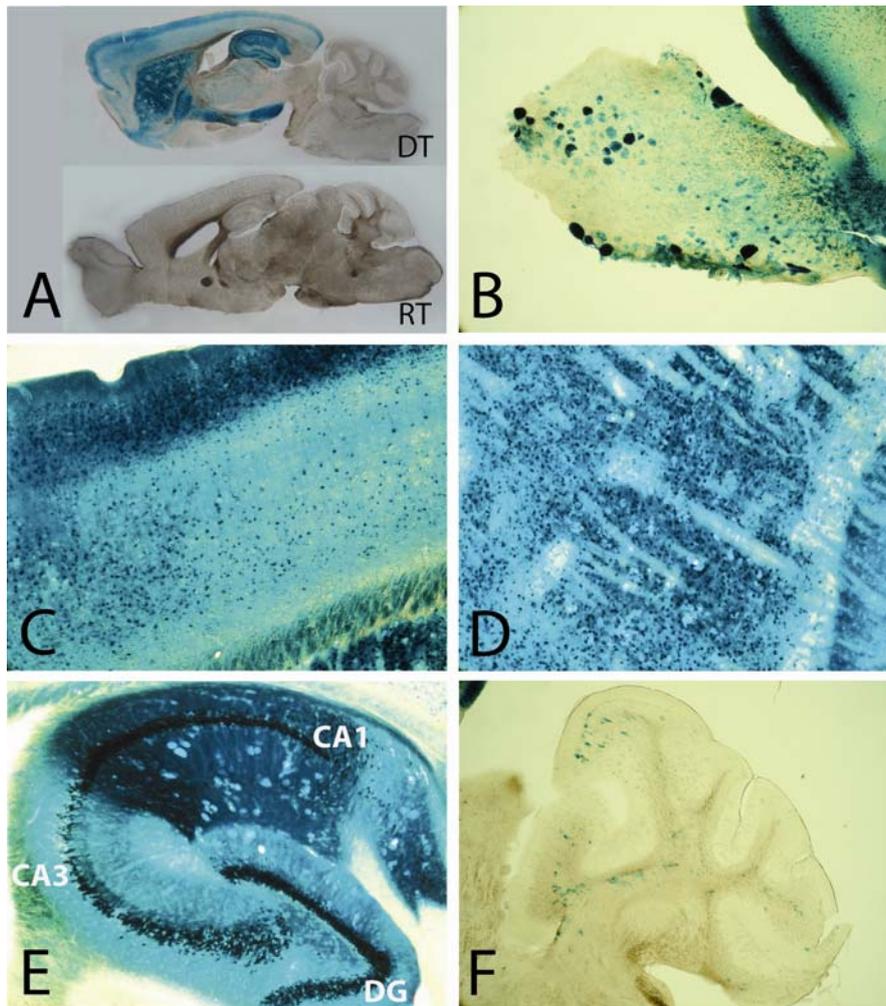


Abb. 8 Nachweis der Transgenexpression mit Hilfe der X-Gal-Farbreaktion

A) Vibratonschnitte der doppelt transgenen (DT) und der Reporter-transgenen (RT) Mäuse wurden einer einstündigen X-Gal-Färbung unterzogen. Im Vorderhirn der DT-Mäuse kam es zu einer spezifischen Farbreaktion. Bei der RT-Maus wurde keine Farbreaktion beobachtet.

B) bis F) Visualisierung der β -Galaktosidase-Aktivität in einer DT-Maus.

C) Im Bulbus Olfactorius zeigten einige Neurone eine Farbreaktion.

D) Im Kortex und im Striatum (C) konnte eine starke Blaufärbung beobachtet werden.

E) Im Hippokampus wurden Neuronen der Subregionen CA1, CA3 und Gyrus Dentatus sehr deutlich gefärbt.

F) Im Cerebellum zeigten einige Zellen eine schwache unspezifische Färbung.

4.2.6 Diskrepanz zwischen dem Nachweis der dnME2-Expression auf der genomischen und der Proteinebene

Die Verwendung des TetO-Systems erwies sich im Verlauf der Zucht der MHXB-Mauslinie als sehr problematisch. Über mehreren Generationen kam es zu einem graduellen Verlust der Transgenexpression. Die Mäuse, die in der PCR eindeutig positiv für alle drei untersuchten Zielsequenzen waren (b-site, lacZ und tTa), wiesen keine dnME2-Proteinexpression auf. Die Detektion des dnME2-Proteins war bei 2/3 der auf der genomischen Ebene doppelt transgenen Tieren nicht möglich. Weder mit Hilfe der X-Gal-Färbung noch mittels Western-Blotting konnte eine Expression des Reportergens oder des Flag-dnME2 nachgewiesen

werden. Von Generation zu Generation wurde die Expression des Transgens in der Population von doppelt transgenen Tieren der MHXB-Linie geringer. Als Beispiel hierfür wurden einige Ergebnisse der X-Gal-Färbungen von Mausgehirnen dargestellt (Abb. 9). Von 17 doppelt transgenen Mäusen zeigten in einer einstündigen Reaktion nur drei eine spezifische Färbung, was einer Quote von lediglich 17,6% entspricht. Die Aufnahme wurde nach 16-stündiger Farbreaktion gemacht. Deshalb kam es zu einer nicht spezifischen bläulichen Färbung auch bei den DT-Mäusen, die kein Transgen exprimierten. Ein Beleg für die Nichtspezifität boten unspezifische Färbungen einiger Schnitte der RT-Tiere (Abb. 9). Eine spezifische Färbung ließ sich hingegen bereits nach einer Stunde beobachten. Die unspezifische Farbreaktion war vermutlich auf eine Aktivität der endogenen β -Galaktosidase zurückzuführen.

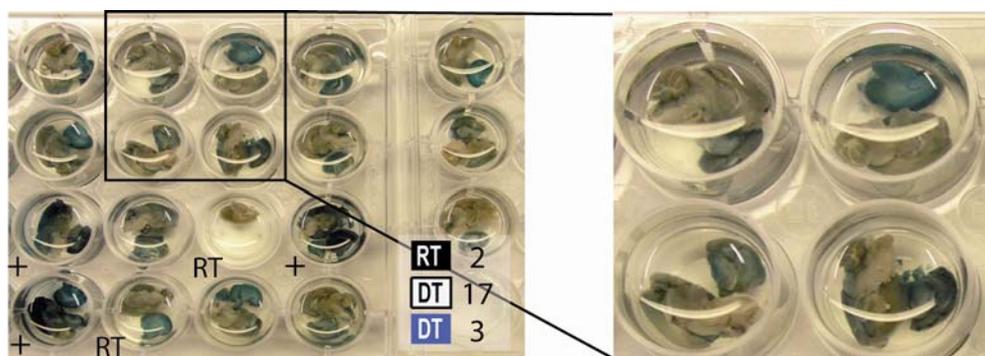


Abb. 9 X-Gal-Färbungen von Gehirnen der transgenen Mäuse der MHXB-Linie

Gehirne von 17 doppelt transgenen und zwei Reporter-transgenen (RT) Mäusen wurden einer X-Gal-Farbreaktion unterzogen. Nur drei (mit „+“ gekennzeichnet) von 17 DT Tieren zeigten eine spezifische Färbung nach einstündiger Reaktion. Das Foto wurde nach 16-stündiger Färbung aufgenommen. Nach dieser langen Inkubationszeit wurde eine unspezifische Farbreaktion einiger DT Schnitte beobachtet (siehe Vergrößerung) und es kam gelegentlich zu einer Blaufärbung bei RT-Mäusen.

4.2.7 Verhaltensbiologische Charakterisierung der dnME2-exprimierenden Mäuse

Zur Untersuchung der Gedächtnisbildung sollten die dnME2-exprimierenden Mäuse einem Angstkonditionierungs-Test ausgesetzt werden. In einem ursprünglich geplanten Experiment sollte eine Kohorte getestet werden, die ausschließlich aus doppelt transgenen Tieren bestand (Abb. 10 A). Einer Gruppe aus dieser Kohorte sollte nach dem Absetzen von der Mutter kein Doxzyklin mehr ins Trinkwasser gegeben werden, womit eine Expression des dnME2 ermöglicht werden sollte. Die zweite Gruppe der Mäuse sollte als Kontrollgruppe dienen: Nach dem Absetzen von der Mutter sollte den Tieren weiterhin Antibiotikum über das Trinkwasser verabreicht werden. Dies würde zu einer Hemmung der Transgenexpression führen. Aufgrund der Probleme mit der Expression des dnME2 in doppelt transgenen Tieren, die kein Doxzyklin bekamen (Abb. 9), wurde jedoch zunächst ein Vorexperiment durchgeführt (Abb. 10 B). Es wurden Mäuse mit zwei verschiedenen Genotypen verwendet. Eine Gruppe bestand aus doppelt transgenen Tieren, die seit dem Absetzen von der Mutter

kein Doxyzyklin mehr bekamen (DT, n=20) womit die Transgenexpression ermöglicht werden sollte. Als Kontrollgruppe dienten Reporter-gen-transgene Mäuse (RT, n=15).

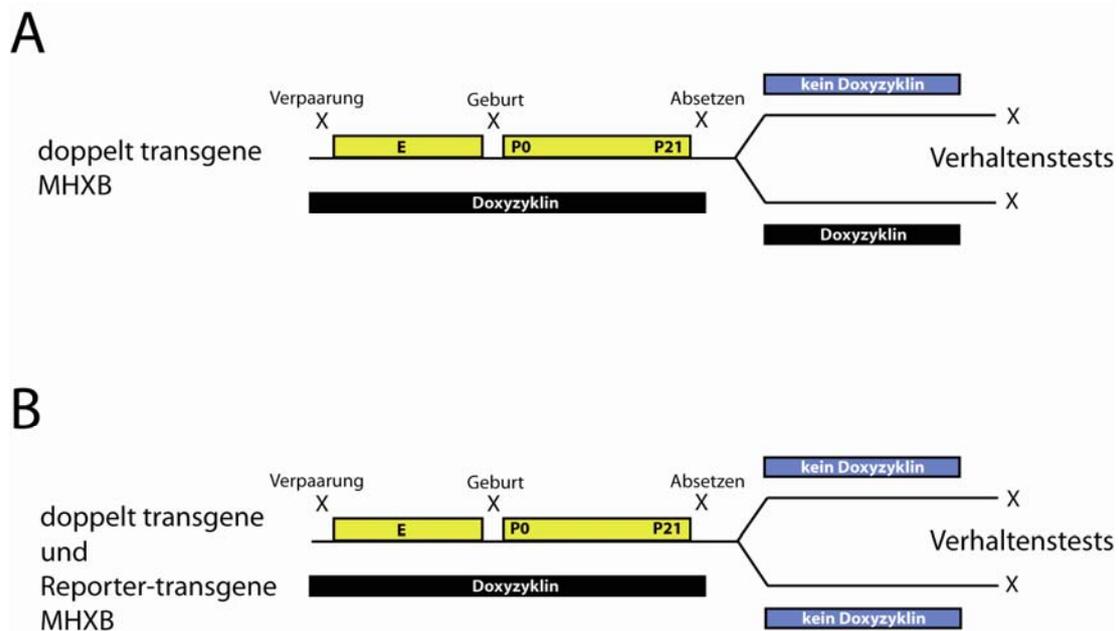


Abb. 10 Experimentelles Vorgehen mit den Mäusen der MHXB-Linie

A) Schematische Darstellung des ursprünglich geplanten Experiments. Ab dem Moment der Verpaarung würden die Muttertiere (und somit die Nachkommen während der embryonalen Entwicklung, (E)) mit Doxyzyklin im Trinkwasser ad libitum versorgt. Die neu geborenen doppelt transgenen Tiere würden Doxyzyklin bis zum Absetzen von den Muttertieren am postnatalen Tag (P21) erhalten. Nach dem Absetzen bekäme eine Gruppe der Tiere kein Doxyzyklin mehr, was zu einem Start der dnME2-Transgenexpression bei den adulten Mäusen führen sollte. Die zweite Gruppe der doppelt transgenen Tiere (Kontrollgruppe) würde nach dem Absetzen weiter unter Doxyzyklin-Zufuhr gehalten. Dies sollte die Expression des dnME2 unterdrücken.

B) Schema des durchgeführten Experiments. Die Tiere der MHXB-Linie wurden seit der Verpaarung des Muttertiers bis zum Absetzen der Nachkommen unter Doxyzyklin-Zufuhr gehalten. In den adulten Tieren sollte es zu einer Expression des transgenen dnME2 in Abwesenheit des Antibiotikums kommen. Die Reporter-transgenen Mäuse (RT) dienten als Kontrollgruppe in Verhaltenstests. Angstkonditionierungs-Test.

Die Expression von dnME2 wurde neuronenspezifisch im Kortex sowie in Subregionen des Hippokampus (CA1, CA3 und Gyrus Dentatus) mit Hilfe der X-Gal-Färbung nachgewiesen (Abb. 8 C und E).

4.2.7.1 Angstkonditionierungs-Test

Um der Fragestellung nachzugehen, ob das dnME2 das hippocampusabhängige kontextuelle Gedächtnis in Mutanten beeinflusst, wurde ein Angstkonditionierungs-Test durchgeführt. Dieser Test erlaubt eine Beurteilung der Lernfähigkeit anhand von Assoziationen, die zwischen einer aversiven Erfahrung und der Umgebung, in der diese Erfahrung gesammelt wurde, erstellt werden (Fanselow, 1980). Die Erinnerung an ein negatives Ereignis löst bei Mäusen eine sog. Angststarre (im Weiteren der Arbeit als *Freezing* bezeichnet) aus. In diesem Zustand bewegt die Maus lediglich den Brustkorb zum Atmen, ansonsten ist sie völlig

regungslos. Über das *Freezing* ließ sich auf das Angstgedächtnis der Mäuse schließen. Über einen Zeitraum von insgesamt 2 min wurde alle 4 s – also insgesamt 30 mal – eine Beobachtung vorgenommen. Die Ergebnisse wurden als relative Häufigkeit positiv beobachteter *Freezings* dargestellt.

Eine Kohorte, bestehend aus 20 DT- und 15 RT-Mäusen aus der MHXB-Linie, wurde einem Angstkonditionierungs-Test unterzogen (Abb. 11 A). Bevor Ton-Schock-Paarungen appliziert wurden, zeigten die Kontrolltiere in 9,1% und die doppelt transgenen Tiere in 10,77% der Gesamtbeobachtungszeit *Freezing* (*baseline* für Kontext). Im kontextuellen Test zeigten dnME2-exprimierende Tiere mit 61,8% weniger *Freezings* als die Reporter-transgenen Kontrollen (70,7%), der Unterschied war aber nicht signifikant ($p=0,399$).

Vor Durchführung des Ton-Gedächtnis-Tests wurde ebenfalls zunächst eine Grundlinie für den Ton bestimmt (*cue baseline, pre-cue*). Sie betrug 18,1% bei den Kontroll- und 21,5% bei den doppelt transgenen Tieren. Während des Tests wiesen die transgenen Mäuse mit einer *Freezing*-Rate von 81,1% gegenüber 76,7% bei den Wildtypen zwar einen erhöhten, aber erneut nicht signifikanten Wert auf ($p=0,232$).

Nach Beendigung des Lerntests wurden die Mäuse getötet und erneut genotypisiert. Zum Nachweis der Transgenexpression durch β -Galaktosidase-Aktivität wurden X-Gal-Färbungen an den Gehirnen durchgeführt. Die Abb. 11 B zeigt das Resultat einer X-Gal-Färbung von 20 doppelt transgenen und fünf ausgewählten Reporter-transgenen Mäusen, die zuvor obigen Verhaltenstests unterzogen wurden. Nur bei sechs von 20 Gehirnen (30%) der doppelt transgenen Mäuse war eine spezifische Blaufärbung zu erkennen.

Aufgrund zu geringer bzw. nicht vorhandener dnME2-Expression bei den doppelt transgenen Tieren mussten diese Mäuse aus der Analyse ausgeschlossen und eine statistische Auswertung des Lerntests wiederholt werden. Die erneute Auswertung des Angstkonditionierungs-Tests ist in Abb. 11 C dargestellt. Transgene Tiere, die eine spezifische positive Reaktion in X-Gal-Färbungen aufwiesen ($n=6$), zeigten mit 53,3% deutlich weniger *Freezings* im Kontext als die Kontrollmäuse (70,7%). Der Unterschied war jedoch erneut nicht signifikant ($p=0,145$), obwohl sich im Vergleich zur ersten Auswertung ($p=0,399$) ein deutlicherer Trend ergab.

Im Ton-Gedächtnis-Test zeigte sich ebenfalls keine Signifikanz: 88,9% *Freezings* bei den DT-Tieren standen 76,6% bei den RT-Tieren gegenüber ($p=0,148$).

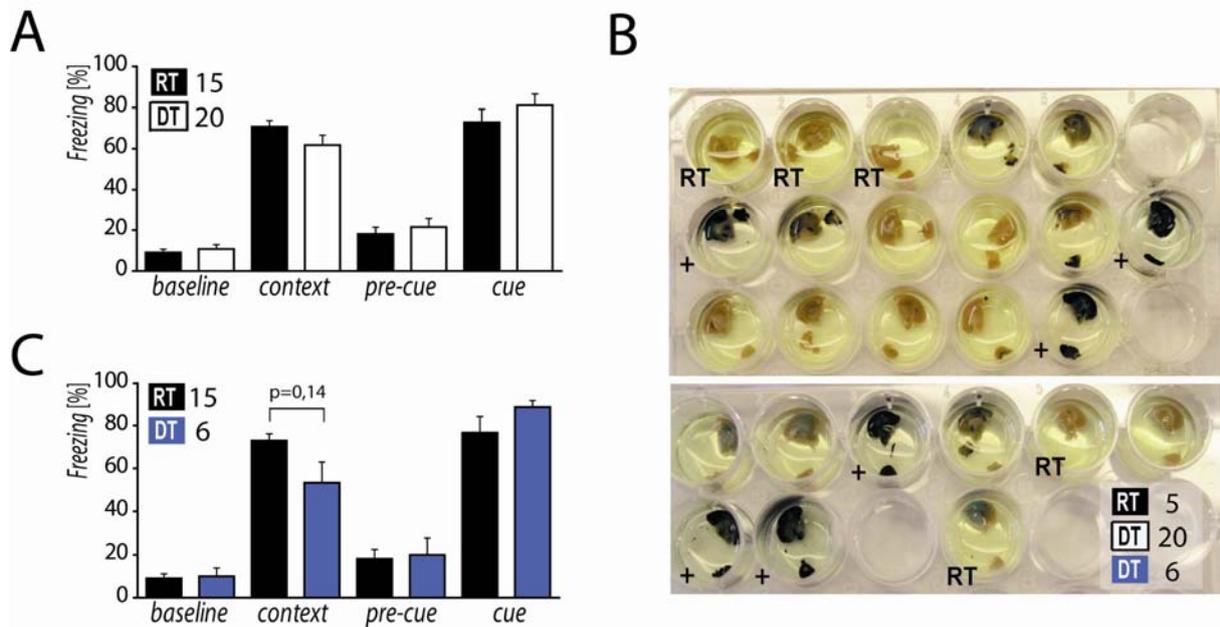


Abb. 11 Angstkonditionierungs-Tests der MEXB-Kohorte sowie anschließende Kontrolle der dnME2-Transgenexpression mit Hilfe der X-Gal-Färbung

A) Angstkonditionierungs-Test der MEXB-Kohorte. Die doppelt transgenen Mäuse (DT, n=20) zeigten eine ähnliche Anzahl an Freezings (Angststarre) wie ihre Reporter-transgenen Geschwistertiere (RT, n=15) im Test für das kontextuelle Gedächtnis ($p=0,399$). Im Ton-Gedächtnis-Test wiesen die Mutanten eine leicht erhöhte Anzahl an Freezings im Vergleich zu den Kontrollen ($p=0,232$) auf.

B) Ergebnisse der X-Gal-Färbung von 20 DT-Mäusen und fünf RT-Kontrolltieren, die dem Angstkonditionierungs-Test unterzogen wurden. In sechs Gehirnen von 20 DT-Mäusen kam es in einer einstündigen Reaktion zu einer spezifischen Blaufärbung (mit „+“ markiert). Das Foto wurde nach 16-stündiger Farbreaktion aufgenommen. Nach dieser Zeit kam es in einigen Gehirnen zu einer unspezifischen Farbreaktion, die auch bei den Gehirnschnitten der RT-Tiere beobachtet werden konnte.

C) Erneute Auswertung der Angstkonditionierungs-Daten. Aus der Analyse wurden DT-Tiere, deren Gehirne keine spezifische β -Galaktosidase-Aktivität aufwiesen, ausgeschlossen. Die DT-Mäuse, bei denen Reporter-gen-Aktivität nachgewiesen wurde (n=6), zeigten deutlich weniger Freezings in der kontextuellen Angstkonditionierung als die RT-Kontrollgruppe (n=15). Der Unterschied zwischen den Genotypen war jedoch nicht signifikant ($p=0,14$). Im Ton-Gedächtnis-Test zeigten die DT-Mäuse eine nicht signifikant erhöhte Anzahl an Freezings im Vergleich zu den RT-Kontrollen.

4.2.7.2 Hole Board-Test

Der *Hole Board*-Test (Bradley *et al.*, 1968) ermöglicht Rückschlüsse auf die Neugier der Nagetiere. Der Test wurde mit einer Kohorte der DT-Mäuse (n=20) und ihren Reporter-gen-transgenen Geschwistertieren (n=15) durchgeführt. In der statistischen Auswertung wurden nur die doppelt transgenen Mäuse berücksichtigt, in deren Kortex und Hippokampus eine spezifische β -Galaktosidase-Aktivität nachgewiesen wurde (Abb. 9). Der *Hole Board*-Test (Abb. 12) zeigte weder mit Blick auf die Explorationshäufigkeit noch auf die Gesamtzeit der Exploration der Löcher signifikante Unterschiede zwischen den beiden Genotypen (Abb. 12 A). Die dnME2-exprimierenden Mäuse legten eine nicht signifikant kürzere Strecke während des 10-minütigen Experiments zurück (Abb. 12 B).

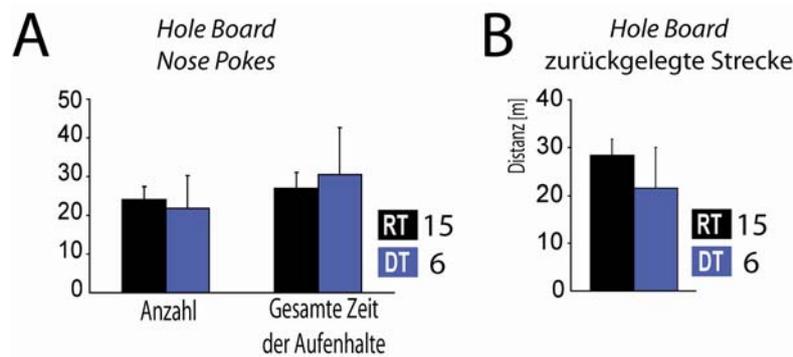


Abb. 12 Hole Board-Test mit Mäusen der MHXB-Linie

In der statistischen Auswertung wurden nur die doppelt transgenen Mäuse berücksichtigt, in deren Kortex und Hippokampus eine spezifische β -Galaktosidase-Aktivität nachgewiesen werden konnte (n=6). Als Kontrolltiere dienten die Reporter-transgene Tiere (n=15).

A) Die Explorationshäufigkeit und die gesamte Explorationszeit der Löcher (Nose Pokes) während des 10-minütigen Versuches waren bei den dnME2-überexprimierenden Mäusen (DT) ähnlich wie bei den Reporter-transgenen Kontrollen (RT).

B) Die dnME2-exprimierenden Tiere legten eine nicht signifikant kürzere Strecke während des Tests zurück.

4.2.8 Rückkreuzung der dnME2-Mäuse auf verschiedene Stämme zum Wiedererstarren der Transgenexpression

Ein weiteres Beispiel für die kontinuierliche Abnahme der spezifischen β -Galaktosidase-Aktivität über die einzelnen DT-Maus-Generationen zeigt die in Abb. 13 A dargestellte X-Gal-Färbung-Analyse: von 10 Gehirnen doppelt transgener Mäuse wies nur eines eine spezifische Farbreaktion auf (10%).

Probleme in Anwendung und Umsetzung des TetO-Systems wurden in der Literatur bereits beschrieben ([Robertson et al., 2002](#); [Chevalier-Mariette et al., 2003](#)). Die Effizienz der Transgenexpression hängt von der Lokalisation der integrierten DNA im Genom und von den verwendeten Mausstämmen ab ([Robertson et al., 2002](#)). Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass eine Rückkreuzung transgener Mäuse mit anderen Mausstämmen zu einem Wiedererstarren der Transgenexpression führt. Um die MHXB-transgene Mauslinie zu erhalten, wurden die Reporter-transgenen C57Bl/6N-Tiere mit Mäusen der Stämme FVB/N und CBA/Ca verpaart. Abb. 13 B zeigt das Ergebnis einer X-Gal-Färbung von Gehirnen der MHXB(C57Bl/6N)-Tiere, die zweimal auf den CBA/Ca-Hintergrund rückgekreuzt wurden.

Alle hier dargestellten Gehirne wurden aus doppelt transgenen Tieren präpariert und über Nacht einer X-Gal-Farbreaktion ausgesetzt. In keinem der Gehirne konnte eine spezifische β -Galaktosidase-Aktivität nachgewiesen werden. Es folgte eine ausführliche Analyse der Stammbäume der MHXB-Linie mit der Suche nach den besten Kandidaten für weitere Verpaarungen. Die Mäuse, die zunächst β -Galaktosidase-positive Nachkommen zeugten, brachten in danach folgenden Würfen häufiger doppelt transgene Nachkommen hervor, deren Gehirne aber keine positive X-Gal-Farbreaktion zeigten. Mit Mäusen der MHXB-Linie wurden daher keine weiteren Experimente durchgeführt.

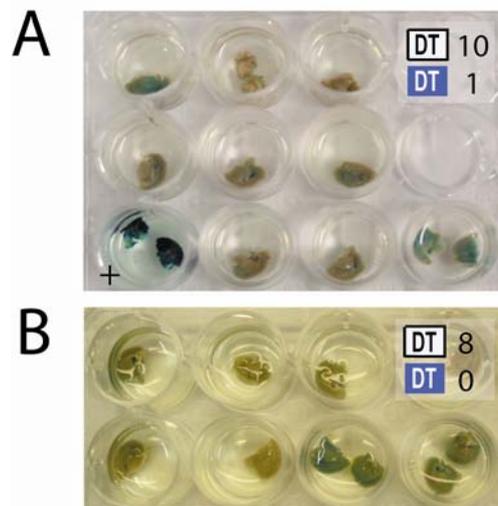


Abb. 13 X-Gal-Färbungen der MHXB-Mäuse des C57Bl6/N-Stammes und der N2-Rückkreuzung des C57Bl6/J-Stammes auf CBA/Ca-Hintergrund

A) X-Gal-Färbung der MHXB-C57Bl6/N Linie. Eine β -Galaktosidase-Reporter-Gen-Aktivität wurde nur in einem (mit „+“ markiert) von zehn Gehirnen der doppelt transgenen Mäusen beobachtet.

B) Acht Gehirne der doppelt transgenen MHXB-Linie, die zweimal auf den CBA/Ca-Stamm rückgekreuzt wurden (N2-Rückkreuzung), wurden einer X-Gal-Färbung unterzogen. Bei keinem der Gehirne kam es zu einer spezifischen Farbreaktion.

4.3 Generierung und Charakterisierung der Volllänge-ME2-überexprimierenden Mausmutanten

Eine Zielsetzung der Arbeit war, die Rolle des ME2-Transkriptionsfaktors in Lernprozessen von adulten Mäusen zu untersuchen. Mit einem *gain of function*-Experiment *in vivo* sollte dies ermöglicht werden. Die Expression des endogenen ME2 bleibt bei adulten Tieren im Kortex und im Hippokampus erhalten ([Chiamello et al., 1995b](#)). Sowohl Kortex als auch Hippokampus sind von zentraler Bedeutung für kognitive Vorgänge, die mit Lernen und Gedächtnisbildung in Zusammenhang stehen. Aus diesem Grund sollte eine Mausmutante hergestellt werden, die das Volllänge-ME2 in den für das Lernen und die Gedächtnisbildung wichtigen Strukturen überexprimiert. Weiterhin sollte die Überexpression des Volllänge-ME2 zeitlich begrenzt werden und erst postnatal zustande kommen. In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass ME2 mit neuronalen Differenzierungsfaktoren der NeuroD-Familie interagieren kann. Eine Überexpression des ME2 in Entwicklungsstadien, in denen es zur Ausdifferenzierung der Neuronen kommt, könnte möglicherweise Fehlfunktionen und/oder Missbildungen im ZNS nach sich ziehen. Durch eine postnatale Überexpression des Transgens sollten potentielle embryonale Entwicklungsstörungen vermieden werden. Als kontrollierendes Element der Transkription wurde daher Thy-1.2 als Promotor verwendet ([Morris, 1985](#)).

4.3.1 Herstellung des Thy-1.2-ME2-Konstruktes

Das Thy-1.2-Flag-ME2-TAP-Tag-Konstrukt (Abb. 14 A) wurde im Labor von M. Rossner hergestellt. Der vollständige ORF (*open reading frame*) des ME2-Gens wurde am 5'-Terminus an eine für einen Flag-Tag kodierende Sequenz fusioniert. Das Flag-Tag-Peptid ist ein Oktamer, das mit Hilfe der spezifischen α -Flag-Antikörper detektiert werden kann. Dies ermöglichte den Nachweis des transgenen Flag-ME2-Fusionsproteins auf dem Western-Blot. Am 3'-Terminus wurde das ME2-Gen mit einer TAP-Tag-kodierenden Sequenz versehen. Das TAP-Tag-Protein besteht aus einer Protein A-Bindedomäne, einer Erkennungssequenz der TEV-Protease und einer Calmodulin-Bindedomäne und wurde ursprünglich für das Verfahren der Tandem-Affinitäts-Tag-Aufreinigung entwickelt ([Rigaut et al., 1999](#)). Der TAP-Tag erlaubt eine Isolierung des Fusionsproteins, bestehend aus dem zu analysierenden Protein und dem TAP-Tag. Die Verwendung des TAP-Tags in der vorliegenden Studie ermöglichte eine Genotypisierung der transgenen Mäuse mit TAP-Tag-spezifischen Primern sowie eine Detektion des transgenen Flag-ME2-TAP-Tag-Transkripts mittels *in situ*-Hybridisierung. Die Expression des transgenen Flag-ME2-TAP-Tags sollte postnatal zustande kommen. Hierfür wurde das Konstrukt unter Kontrolle des Thy-1.2-Promotors gestellt. Thy-1.2 ist ein Zell-Oberfläche-Glykoprotein, dessen Expression in postmitotischen Neuronen perinatal induziert wird ([Morris, 1985](#)). Allerdings wurde eine Variabilität bezüglich einzelner Hirnregionen sowie eine zelluläre Spezifität der Thy-1.2-Promotoraktivität nachgewiesen ([Campsall et al., 2002](#)).

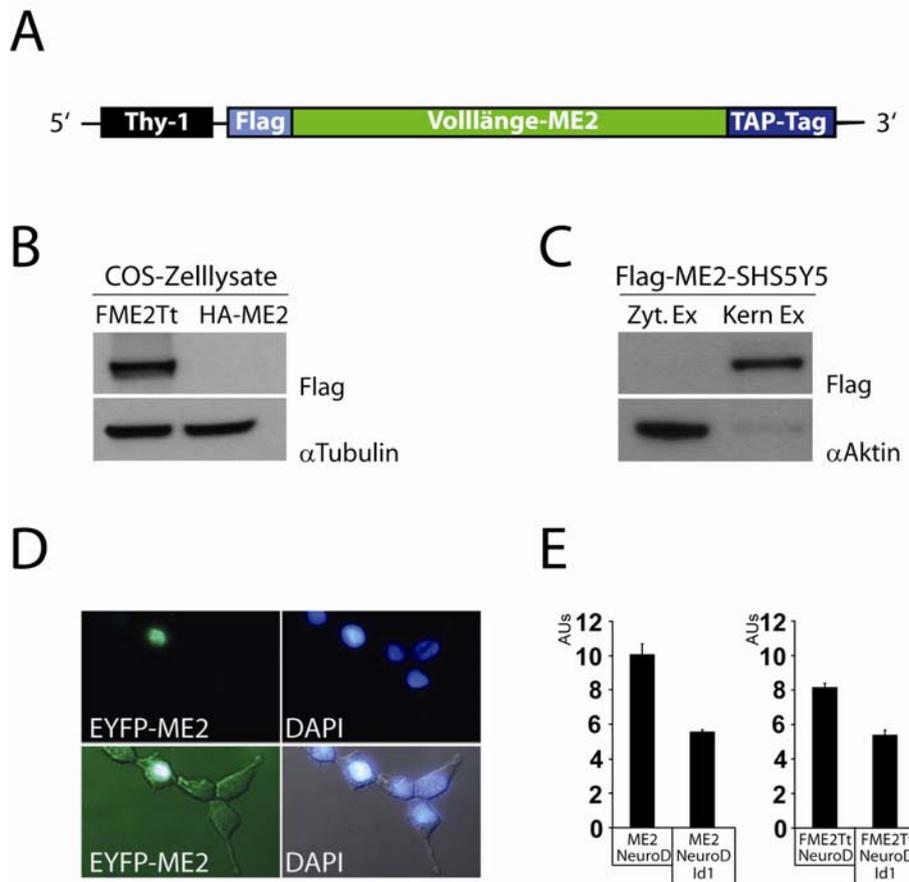


Abb. 14 Charakterisierung des Thy1-Flag-ME2-TAP-Tag-Konstruktes

A) Schematische Darstellung des Thy1-Flag-ME2-TAP-Tag-Konstruktes. Die Volllänge-ME2-Sequenz wurde am 5'-Terminus mit einem Flag- und am 3'-Terminus mit einem TAP-Tag flankiert. Das Konstrukt wurde unter Kontrolle des Thy-1-Promotors gestellt.

B) Expressionskontrolle des Flag-ME2-TAP-Tag-Proteins. COS1-Zellen wurden transient mit dem Flag-ME2-TAP-Tag- (FME2Tt) und dem HA-ME2-Konstrukt transfiziert und nach 24 h lysiert. Es folgte eine Analyse der Zelllysate auf einem Western-Blot. Mit Hilfe der α -Flag-Antikörper konnte spezifisch das Flag-markierte FME2Tt detektiert werden.

C) Mit Hilfe der Western-Blot-Analyse wurde die Kernlokalisierung des Flag-ME2-TAP-Tag-Proteins nachgewiesen. SHS5Y5-Zellen wurden stabil mit dem Flag-ME2-TAP-Tag-Konstrukt transfiziert. Zytoplasmatische und nukleäre Lysate wurden hergestellt. Die Immunoblotting-Analyse mit α -Flag-Antikörpern zeigte eine deutliche Kernlokalisierung des Flag-ME2-TAP-Tag-Proteins. Die Immunoreaktion des Blots mit α -Aktin-Antikörpern diente als Ladekontrolle der Spur mit den zytoplasmatischen Extrakten.

D) EYFP-ME2 ist im Kern lokalisiert. COS1-Zellen wurden transient mit EYFP-ME2-Konstrukten transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert, fluoreszenzmikroskopisch analysiert und fotodokumentiert. Die EYFP-Fluoreszenz wurde ausschließlich im Kernbereich beobachtet. Dies wies auf eine Kernlokalisierung des EYFP-ME2-Fusionsproteins hin. Die Kerne wurden mit DAPI gefärbt.

E) Funktionelle Analyse des Flag-ME2-TAP-Tag-Konstruktes (FME2Tt) mit dem Luciferase-Reportergen-Assay. Bei einer Ko-Transfektion von FME2Tt mit NeuroD (rechtes Panel) wurde wie bei der Ko-Transfektion von ME2 mit NeuroD (linkes Panel) eine starke Reportergen-Aktivierung beobachtet. Diese wurde durch eine zusätzliche Transfektion mit dem dominant negativen Faktor Id1 in beiden Fällen deutlich reduziert. Das FME2Tt-Konstrukt war in Funktion und Verhalten dem Volllänge-ME2 ähnlich. Die angegebene Kombination von Konstrukten wurde transient in PC12-Zellen transfiziert und 36 h nach der Transfektion analysiert. Die ME2- und FME2Tt-Konstrukte erzeugten eine hohe Hintergrundaktivität der Luciferase-Reporter. Daher erfolgte eine Normalisierung der gemessenen Werte auf die Hintergrundwerte der entsprechenden ME2-Konstrukte. AUs, arbiträre Einheiten; n=6.

4.3.2 Untersuchung des Flag-ME2-TAP-Tag-Konstrukts auf seine Funktionalität

Zur Kontrolle der Expression des Konstrukts wurden COS1-Zellen mit dem Expressionsvektor Thy-1.2-Flag-ME2-TAP-Tag transfiziert und lysiert. Die hergestellten Proteinlysate wurden auf einem Western-Blot analysiert. Das Flag-markierte ME2 konnte mit α -Flag-Antikörpern nachgewiesen werden (Abb. 14 B).

Natives ME2 weist eine nukleäre Lokalisierungsdomäne auf ([Chiaramello et al., 1995b](#)). Zur Bestimmung der Lokalisation des Flag-ME2-TAP-Tag-Proteins wurden mit dem Flag-ME2-TAP-Tag-Konstrukt stabil transfizierte SHS5Y5-Zellen verwendet. Es folgte eine Gewinnung der zytoplasmatischen und nukleären Proteinextrakte aus diesen Zellen. Weiterhin wurden die Lysate auf einem Western-Blot mit Hilfe der α -Flag-Antikörper untersucht. Der Blot zeigte eine Lokalisierung des transgenen Proteins ausschließlich im Bereich der nukleären Fraktionen (Abb. 14 C). Zum Vergleich wurde die Lokalisation des EYFP-Volllänge-ME2-Fusionsproteins bestimmt. Hierfür wurden die HEK-Zellen transient mit einem EYFP-ME2-Konstrukt transfiziert. In diesen transfizierten Zellen wurde eine EYFP-Fluoreszenz im Kernbereich eindeutig detektiert (Abb. 14 D).

Die biologische Funktionalität des Konstrukts wurde mittels eines Reporter-gen-Assays in PC12-Zellen nachgewiesen. Eine Ko-Transfektion des Volllänge-ME2 mit NeuroD führte zu einer transkriptionellen Aktivierung des von dem E-Box-TK-Promotor kontrollierten Reportergens (Abb. 3 B; Abb. 14 E, linkes Panel). Es wurde zudem gezeigt, dass diese Aktivierung von dem dominant negativen Faktor Id1 verhindert werden kann (Abb. 14 E, linkes Panel). Der Luziferase-Reporter zeigte nach einer Ko-Transfektion des Flag-ME2-TAP-Tag mit NeuroD eine eindeutige Aktivierung (Abb. 14 E, rechtes Panel). Diese sank in Anwesenheit von Id1 deutlich. Somit verhielt sich das Flag-ME2-TAP-Tag-Konstrukt vergleichbar zu Volllänge-ME2: beide ME2-Konstrukte riefen bei Verwendung des E-Box-TK-Promotors eine erhöhte Hintergrundaktivität des Reportergens hervor. Daher wurden die gemessenen Werte auf die Hintergrundwerte der entsprechenden ME2-Konstrukte normalisiert.

4.3.3 Generation der Thy-1.2-Promotor-getriebenen ME2-überexprimierenden Mäuse (TMEB-Mauslinie)

Das Thy-1.2-Flag-ME2-TAP-Tag-Konstrukt wurde in Oozyten von FVB/N-Mäusen injiziert. Später wurden die resultierenden FVB/N-Tiere (*founder*) der TMEB-Linie (für Thy-1.2-ME2 bHLH) zunächst nur innerhalb des FVB/N-Stammes weiter verpaart. Der ursprüngliche FVB/N-Stamm wurde zur Erhaltung der Linie weitergezüchtet. Für die in der vorliegenden Studie durchgeführten molekularen, histologischen und biochemischen Analysen transgener ME2-überexprimierender Mäuse wurden, wenn nicht anders angegeben, die Nachkommen der ersten Generation (F1) der Stämme C57Bl/6N und FVB/N verwendet (in der Arbeit als F1-Hybride bezeichnet). Einige Verhaltensexperimente erfolgten mit den Nachkommen der fünften Generation der Rückkreuzung des FVB/N-Stammes auf den C57Bl/6N-Hintergrund

(N5). Die TMEB-Mäuse wurden mit TAP-Tag-spezifischen Primern mittels PCR genotypisiert. Die PCR ergab in allen drei verwendeten Mausstämmen eine 140 bp große Bande in den transgenen Mäusen und keine in den als Kontrolle dienenden Wildtyp-Geschwistertieren (*wildtype littermates*; Abb. 15 A).

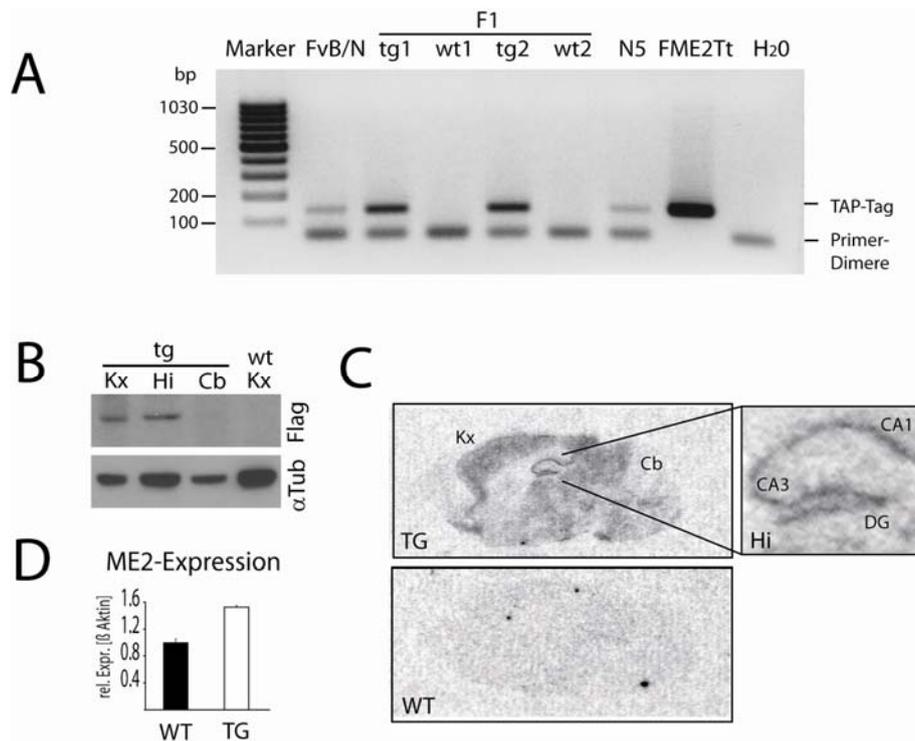


Abb. 15 Analyse der ME2-überexprimierenden Mäuse auf der genomischen, RNA- und Protein-Ebene

A) PCR-Analyse der DNA aus Schwanzbiopsien von Mäusen der TMEB-Linie. Mit Hilfe von TAP-Tag-spezifischen Primern wurde bei den transgenen Tieren (tg) von allen in der Studie verwendeten genetischen Hintergründen (FVB/N, F1-Hybriden und N5-Generation) eine Bande der Größe von 140 bp amplifiziert. Die Stärke der Banden variierte je nach Menge der in der PCR eingesetzten DNA. Bei Wildtyp-Tieren (wt) konnte keine dem TAP-Tag entsprechende Bande amplifiziert werden. Als Positivkontrolle der Reaktion wurde das Expressionsplasmid Flag-ME2-TAP-Tag (FME2Tt) verwendet. In den meisten Spuren sind die Primer-Dimere zu sehen.

F1, (F1-Hybriden) und N5, (N5-Generation) der Rückkreuzung des FVB/N-Stammes auf den C57Bl6/J-Hintergrund. H₂O, PCR-Kontrolle auf Kontaminationen, hier wurde keine DNA als Matrize verwendet.

B) Western-Blot-Analyse der Expression des transgenen ME2.

Vom Kortex (Kx), dem Hippokampus (Hi) und dem Cerebellum (Cb) der ME2-überexprimierenden Mäuse (tg) und vom Kortex ihrer Wildtyp-Geschwistertiere (wt) wurden Proteinlysate hergestellt und auf einem Western-Blot analysiert. Mit Hilfe der α-Flag-Antikörper konnte das Flag-markierte ME2 im Kortex, im Hippokampus und sehr schwach im Cerebellum der transgenen Maus detektiert werden. In Kortex-Proteinextrakten der Wildtyp-Maus konnte keine Bande detektiert werden. Die α-Tubulin-Immunodetektion diente als Kontrolle der pro Spur geladenen Proteinmenge (jeweils 40 µg).

C) Detektion der Flag-ME2-TAP-Tag-Transkripte mit Hilfe der in situ-Hybridisierung.

14 µm dünne Kryo-Schnitte der transgenen Mäuse (TG) und ihrer Wildtyp-Geschwistertiere (WT) wurden mit [³³P-α]dATP-markierten TAP-Tag-spezifischen Oligonukleotiden hybridisiert und mittels Röntgenfilm visualisiert. Die Transkripte des Flag-ME2-TAP-Tags wurden im Vorderhirn der transgenen Maus detektiert. Besonders stark wurden die neuronspezifischen Signale in den Hippokampus-Subregionen CA1, CA3 und Gyrus Dentatus detektiert. In der WT-Maus konnten keine spezifischen Signale beobachtet werden. Kx, Kortex; Hi, Hippokampus; Cb, Cerebellum.

D) Analyse der Überexpression des ME2 in den Hippokampi der transgenen Mäuse. Aus Hippokampi (n=3) von transgenen (TG) und von Wildtyp-Tieren (WT) wurde RNA isoliert und einer RT-PCR-Analyse unterzogen. Mit ME2-spezifischen Primern wurde sowohl das endogene sowie das transgene ME2 amplifiziert. Bei den TG-Tieren wurde im Vergleich zu den Kontrollen eine 1,5-fache Steigerung der ME2-Expression beobachtet. Die relativen Werte wurden auf die Expression des β-Aktin normalisiert; n=4.

4.3.4 Analyse der Überexpression des Thy-1.2-ME2-Konstrukts in transgenen Mäusen

Zur Expressionsanalyse des Transgens in bestimmten Strukturen des Gehirns wurden der Kortex, der Hippokampus und das Cerebellum einer transgenen adulten Maus (P30) und der Kortex eines Wildtyp-Geschwistertieres präpariert und Proteinlysate aus den Geweben hergestellt. Der Nachweis des Transgens erfolgte mit Hilfe eines Western-Blots. Der α -Flag-Antikörper konnte das Flag-markierte Protein in Kortex- und Hippokampusextrakten des transgenen Tieres eindeutig detektieren (Abb. 15 B). Im Cerebellum der transgenen Maus war das transgene Protein kaum detektierbar. Im Kortex der Wildtyp-Kontrolle konnte kein Flag-Tag-markiertes ME2 nachgewiesen werden. Um weiterhin der Frage nach der präzisen Lokalisation des Transgens nachzugehen, wurde eine *in situ*-Hybridisierung mit für die TAP-Tag-Sequenz spezifischen radioaktiv markierten antisense-Oligonukleotiden durchgeführt. Die radioaktiven Signale wiesen auf eine prominente Transgenexpression im Vorderhirn der transgenen Mäuse hin und waren besonders stark im Kortex und in den Hippokampusregionen CA1, CA3 und Gyrus Dentatus zu erkennen (Abb. 15 C). In den Wildtyp-Kontrollen konnte kein für den TAP-Tag spezifisches Signal detektiert werden (Abb. 15 C).

Um den Grad der Überexpression des ME2-Proteins im Hippokampus zu bestimmen, wurde die RNA aus den gepoolten Hippokampi transgener und aus Wildtypmäusen (n=3) isoliert. Es folgte eine quantitative RT-PCR-Analyse. Die in der Reaktion verwendeten Volllänge-ME2-spezifischen Primer detektierten sowohl die endogenen, als auch die transgenen ME2-Transkripte. Die Bestimmung des ME2-Expressionsniveaus zeigte eine 1,5-fache Steigerung in den Hippokampi der transgenen Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen (Abb. 15 D).

Die ersten Untersuchungen des Thy-1.2-Promotors zeigten eine Expression in postmitotischen Neuronen ([Morris, 1985](#)). Später konnte Campsall ([Campsall et al., 2002](#)) eine Thy-1.2-Promotor-induzierte Cre-Expression schon am 11. Tag der embryonalen Entwicklung im ZNS der Maus nachweisen. Aufgrund der widersprüchlichen Literaturangaben sollte der Zeitpunkt des Expressionsbeginns (der Promotoraktivierung und somit der Expression des Transgens) näher untersucht werden.

Die Expression des Flag-ME2-TAP-Tag-Konstrukts unter Kontrolle des Thy-1.2-Promotors wurde in verschiedenen Altersstadien analysiert. Hierzu wurden Proteinlysate aus kortikalen und hippokampalen Geweben der transgenen Mäuse aus verschiedenen Entwicklungsstadien beginnend mit E17 (embryonaler Tag 17) bis 15M (15 Monate) hergestellt. Diese Extrakte wurden anschließend mittels Western-Blotting mit einem α -Flag-Antikörper analysiert (Abb. 16 A für kortikale und Abb. 16 B für hippokampale Lysate) und der Zeitpunkt der beginnenden Proteinexpression determiniert. Das früheste Stadium, in dem das transgene Protein nachgewiesen werden konnte, war in den Kortex- sowie Hippokampusextrakten P2

(postnataler Tag 2). In kortikalen Lysaten war das ME2-Protein bei P2 und P7 zwar detektierbar, wies aber ein sehr niedriges Expressionsniveau auf. Weiterhin war die kortikale Expression des Flag-ME2 von P15 bis 4M prominent ausgeprägt, bei 15M allerdings deutlich reduziert. Die Analyse der hippokampalen Lysate zeigte eine unverändert starke Expression des Transgens von P2 über alle Altersstadien. Die Expression des endogenen ME2, die mit α -ME2-Antikörpern gezeigt wurde, verlief im Kortex durchgehend über alle analysierten Entwicklungsstadien. Im Hippokampus war die endogene ME2-Expression mit Ausnahme einer schwachen Expression bei E17 in allen untersuchten Stadien prominent.

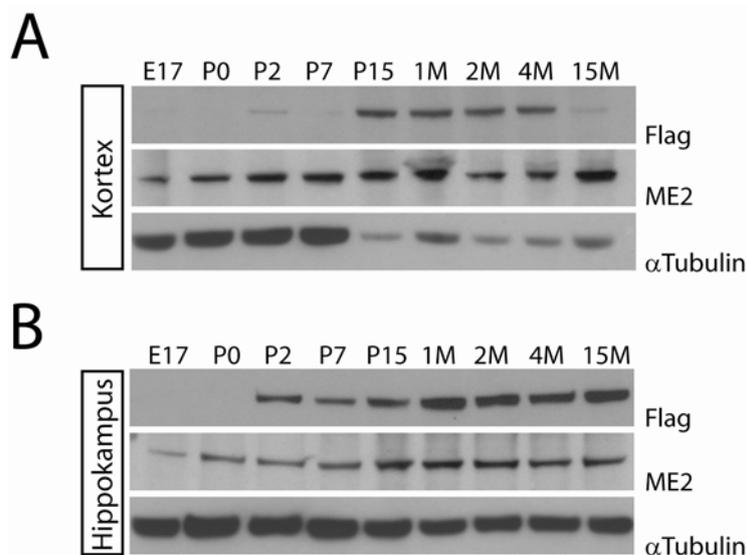


Abb. 16 Western-Blot-Analyse der Flag-ME2-Expression in verschiedenen Entwicklungsstadien der transgenen Mäuse

Die kortikalen und hippokampalen Proteinlysate aus transgenen Mäusen verschiedener Entwicklungsstadien wurden mittels Western-Blot analysiert. Mit Hilfe der α -Flag-Antikörper konnte die Expression des Transgens im Kortex (A) und im Hippokampus (B) ab Tag P2 nachgewiesen werden. Die Expression des endogenen ME2 wurde mit ME2-Antikörpern durchgehend in allen untersuchten Entwicklungsstadien im Kortex (A) sowie im Hippokampus (B) detektiert. Immunoblotting mit α - α -Tubulin-Antikörpern diente als Ladekontrolle. Es wurden jeweils 40 μ g Gesamtprotein pro Spur geladen. E, embryonaler Tag; P, postnataler Tag; M, Monat.

4.3.5 Morphologische und anatomische Untersuchungen des ME2-transgenen Gehirns

Vor Durchführung einer Verhaltensanalyse muss gewährleistet sein, dass keine strukturellen Missbildungen des Gehirns bestehen. Bezüglich der Größe zeigten die Gehirne der transgenen Tiere makroskopisch keine Unterschiede im Vergleich zu den Gehirnen der Wildtyp-Geschwistertiere. Auch das Gesamtbild der Gehirne war bei beiden Genotypen vergleichbar (Abb. 17 A, Durchlicht). Zur Untersuchung möglicher morphologischer Anomalitäten in den Gehirnen transgener Mäuse kamen immunohistochemische Analysen zur Anwendung. Hierfür wurden die Gehirne sowohl aus adulten (P30) transgenen Mäusen als auch aus ihren

Wildtyp-Geschwistertieren nach einer Ganzkörperfixierung mittels Perfusion präpariert. Der Nachweis ausgewählter Marker erfolgte anhand 40 µm dicker sagittaler Gehirnschnitte. Eine α -CNP-Immunoreaktion, in der die Oligodendrozyten markiert wurden, zeigte keine Unterschiede in der Myelinisierung (Abb. 17 A, CNP). Eine korrekte Myelinisierung des ZNS sowie eine normale Ausbildung des Corpus Callosum konnte mit Hilfe einer radioaktiven in situ-Hybridisierung mit PLP-spezifischen Oligonukleotiden bestätigt werden (Abb. 17 A, PLP). In einer NeuN-Färbung, die die Anordnung der Neuronenkerne sichtbar macht, zeigten die transgenen Gehirne keine Abweichungen im Vergleich zu den Wildtypen (Abb. 17 B). Mittels einer α -MAP2 (*microtubuli-associated protein 2*) -Immunofärbung konnte eine normale Ausbildung der neuronalen Fortsätze nachgewiesen werden. Es wurden auch keine Unterschiede in der Verteilung des präsynaptischen Proteins VGLUT1 (*vesicular glutamate transporter 1*) detektiert (Abb. 17 B, VGLUT1). VGLUT1 wird neben den anderen Glutamat-Transportern VGLUT2 und VGLUT3 in adulten Gehirnen exprimiert. Seine Expression übertrifft die von VGLUT2 und VGLUT3 im Kortex, im Hippokampus und im Cerebellum adulter Mäuse ([Miyazaki et al., 2003](#)). Der Hippokampus und der Kortex wurden genauer untersucht (Abb. 18). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Anordnung neuronaler Fortsätze, das Auftreten exzitatorischer Synapsen und die Ausrichtung neuronaler Kerne im Hippokampus (Abb. 18 A) und im Kortex (Abb. 18 B) transgener Mäuse keine Unterschiede im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen aufwiesen. Sowohl der Gyrus Dentatus als auch die Regionen CA1 und CA3 waren normal geformt (Abb. 18 A). Die Anordnung der kortikalen Schichten war in transgenen Tieren und Wildtyp-Kontrollen identisch (Abb. 18 B).

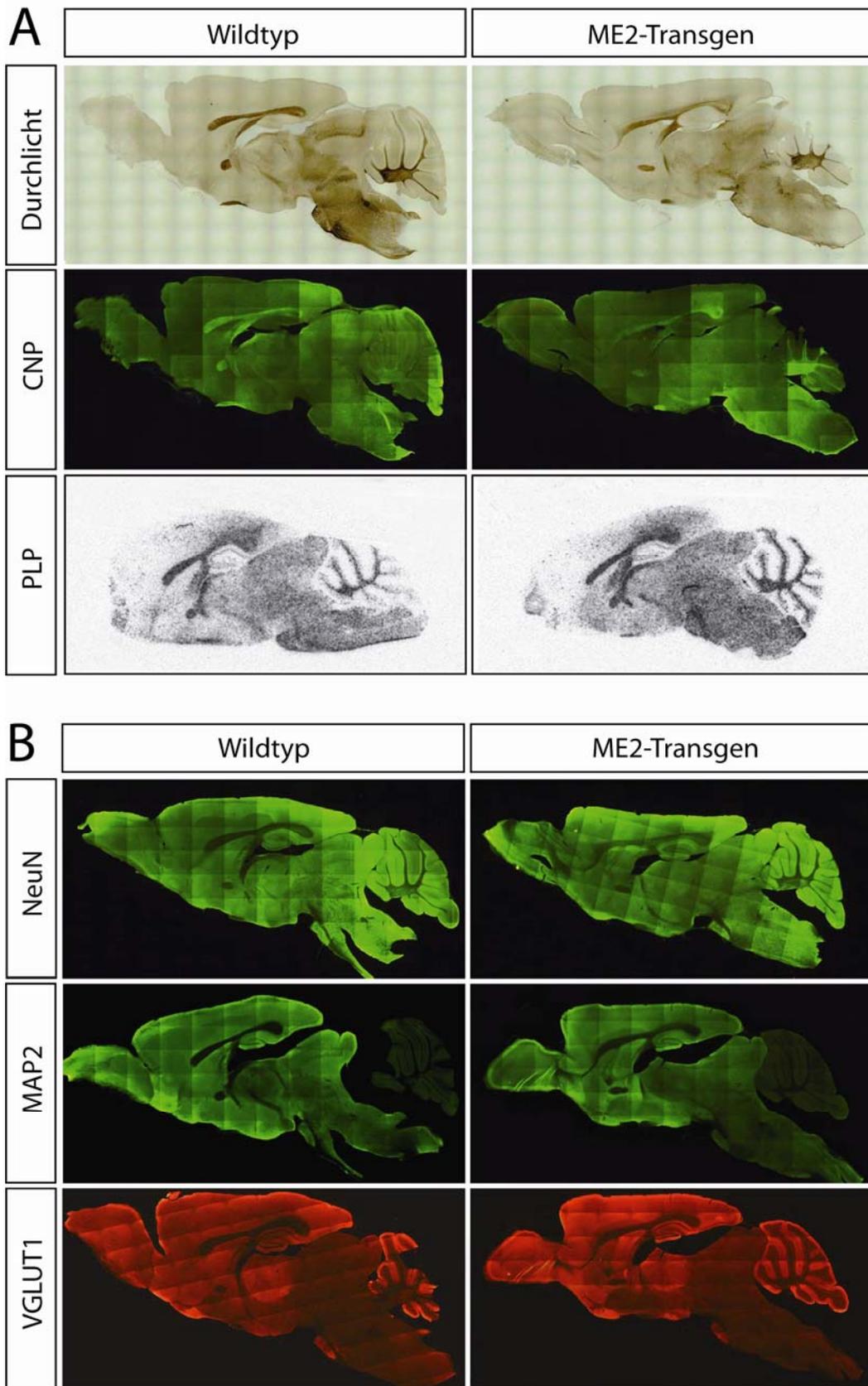


Abb. 17 Allgemeine Morphologie der Gehirne von adulten ME2-überexprimierenden Mäusen

Abb. 17 (siehe vorangegangene Seite)

A) Durchlicht: Die Gehirne von transgenen Mäusen zeigten eine normale allgemeine Morphologie der Gehirnstrukturen. CNP: Mit Hilfe der CNP-Immunofärbung, die Oligodendrozyten markiert, konnte eine korrekte Myelinisierung des ZNS bei den transgenen Tieren gezeigt werden. Die Myelinisierung und die normale Ausbildung des Corpus Callosum wurden mittels einer radioaktiven in situ-Hybridisierung mit PLP-spezifischen Sonden bestätigt (PLP).

B) Immunohistochemische Analyse der Vibratonschnitte von Gehirnen transgener Mäuse und ihrer Wildtyp-Geschwistertiere. NeuN: Die Verteilung der neuronalen Kerne, die spezifisch von α -NeuN-Antikörpern markiert wurden, ist in beiden Genotypen ähnlich. MAP2 (*microtubuli associated protein 2*): Eine α -MAP2-Immunoreaktion zeigte keine Unterschiede zwischen den ME2-überexprimierenden Tieren und Kontrollen. Eine Detektion des VGLUT1 (*vesicular glutamate transporter 1*) zeigte eine ähnliche Verteilung dieses präsynaptischen Proteins zwischen den transgenen Mäusen und den Wildtyp-Tieren. Repräsentative Fluoreszenz-Aufnahmen von Wildtyp- und transgenen Mäusen, n=3.

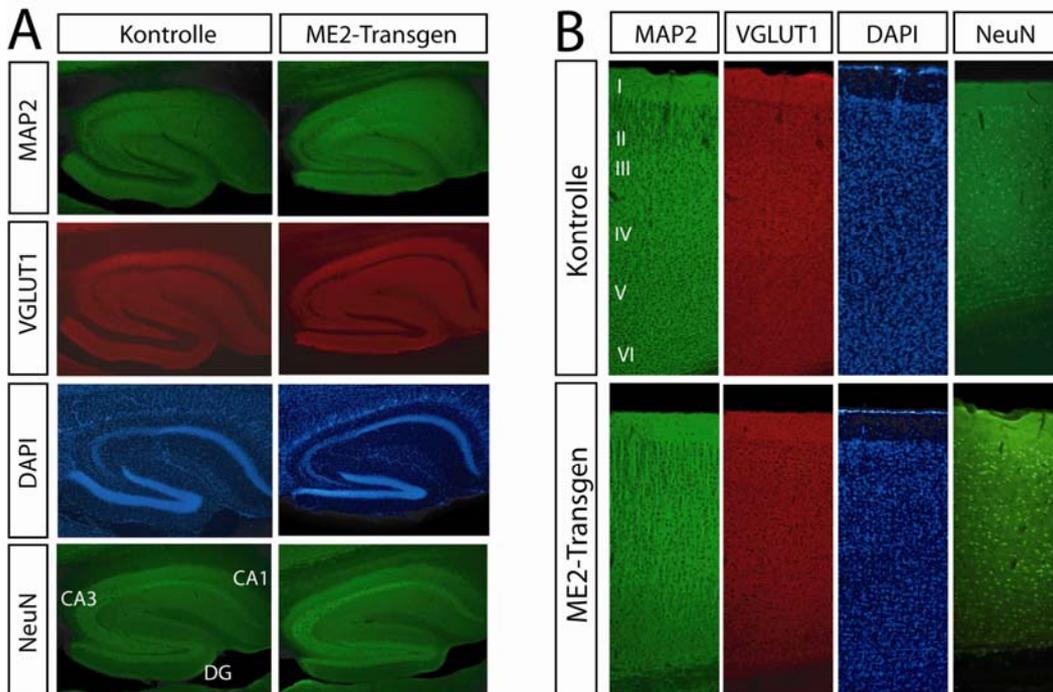


Abb. 18 Immunohistochemische Untersuchung des Hippokampus und des Kortex von ME2-überexprimierenden Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen

A) Immunofärbungen der Hippokampi. MAP2 markierte die neuronalen Fortsätze (MAP2). Die Ausbildung war bei beiden Genotypen ähnlich. Die Detektion des VGLUT1 zeigte eine normale Distribution der glutamatergen Synapsen in transgenen Tieren (VGLUT1). Mittels DAPI-Färbung wurden die Zellkerne unabhängig von den Zelltypen sichtbar gemacht (DAPI). Mit einem für neuronale Kerne spezifischen Marker (NeuN) konnte eine normale Anordnung der neuronalen Nuklei nachgewiesen werden.

B) Immunofärbungen des Kortex von transgenen und Wildtyp-Tieren. Die mit α -MAP2-Antikörpern markierten neuronalen Fortsätze bei den transgenen Tieren demonstrierten eine ähnliche Anordnung wie bei den Wildtyp-Kontrollen. Die Verteilung des VGLUT1 über die kortikalen Schichten war bei beiden Genotypen ähnlich. Mittels der DAPI-Färbung wurden die Zellkerne visualisiert. Mit Hilfe der α -NeuN-Antikörper wurde gezeigt, dass die Anordnung der neuronalen Zellkerne in den kortikalen Schichten in den Mutanten und den Wildtyp-Tieren ähnlich war.

4.3.6 Verhaltensbiologische Charakterisierung der ME2-überexprimierenden Mäuse

Transgene Mäuse und ihre Wildtyp-Geschwistertiere, F1-Hybride des C57Bl/6N- und FVB/N-Stammes, wurden in Verhaltenstests analysiert. Das Alter der Tiere betrug zwei bis fünf Monate. Zur Verhaltensanalyse wurden, wenn nicht anders angegeben, nur männliche Tiere verwendet. Die Verhaltensexperimente begannen 4 h nach Beginn der Lichtphase (ZT4).

Aufgrund der fehlenden deutschen Begriffe im verhaltensbiologischen Feld wurde hier die englische Terminologie verwendet. Eine Übersetzung ist im Anhang 1 zu finden.

4.3.6.1 Standard-Verhaltenstests

Eine Überexpression des Transkriptionsfaktors ME2 in transgenen Mäusen könnte Einfluss auf ein normales Verhalten der Mäuse nehmen. Standard-Verhaltenstests erlauben Rückschlüsse auf mögliche Veränderungen des natürlichen Verhaltens transgener Tiere. Es wurden verschiedene Aspekte des Verhaltens untersucht: Aktivität, Neugier, Angstverhalten, motorische Koordination, Schmerzempfinden sowie Motivationsverhalten.

4.3.6.1.1 *Open Field*-Test

Mit Hilfe des *Open Field*-Tests (Offenfeld-Test; [Hall, 1934](#); [Broadhurst, 1961](#)) wurde die spontane motorische Aktivität der Tiere anhand der zurückgelegten Strecke sowie der Bewegungs- und Erholungszeiten untersucht. Die jeweils verbrachte Zeit, entweder in der Mitte oder in der Peripherie der Versuchsbox, ließ Rückschlüsse auf das Angstverhalten der Tiere zu.

In allen drei der hier analysierten Parameter wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen nachgewiesen (Abb. 19 A-C). Während des 10-minütigen Versuchs waren die Wildtyp-Tiere (n=22) durchschnittlich 351,6 s motorisch aktiv und ruhten 248,4 s; transgene Tiere (n=17) waren 342,1 s aktiv und 257,9 s inaktiv (Abb. 17 A). Die Wildtyp-Kontrollen verbrachten in der Mitte des offenen Feldes, dessen Fläche auf 30% der Gesamtfläche festgelegt wurde, 19,9% der Zeit und in der Peripherie 80,1%. Die entsprechenden Werte für ME2-überexprimierende Mäuse ergaben 20,1% in der Mitte und 79,9% in der Peripherie (Abb. 19 C). Die Wildtyp-Mäuse legten durchschnittlich eine Distanz von 38,7 m, die transgenen Tiere eine von 38,9 m zurück (Abb. 19 C). In Bezug auf Aktivität und Ängstlichkeit waren bei beiden Genotypen keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

4.3.6.1.2 *Hole Board*-Test

Auch der *Hole Board*-Test (Lochbrett-Test; [Bradley et al., 1968](#)), der eine Aussage über die Neugierde der Tiere ermöglicht, hat weder mit Blick auf die Explorationshäufigkeit noch auf die Gesamtzeit der Exploration der Löcher signifikante Unterschiede zwischen den beiden Genotypen gezeigt (Abb. 19 D und E). Die Anzahl des Aufsuchens der Löcher (*nose pokes*) und die gesamte Zeit, die hierfür benötigt wurde, war bei den Wildtypen nur leicht erhöht (Abb. 19 D). Die Wildtyp-Tiere (n=17) suchten im Durchschnitt 26,6 mal die Löcher auf; die

Gesamtzeit der *Nose Pokes* ergab 29,8 s, was eine durchschnittliche Dauer der einzelnen Visiten von 1,12 s ausmachte. Die ME2-überexprimierenden Mäuse (n=22) suchten während des 10-minütigen Tests im Durchschnitt 22,2 Löcher auf, die summierte Zeit der Besuche lag bei 22,8 s, was eine durchschnittliche Explorationszeit von 1,03 s pro Loch ergab. Die Entfernung, die die Versuchstiere im *Hole Board*-Test zurücklegten, lag durchschnittlich bei 33,75 m bei den Wildtypen und bei 34,57 m bei den transgenen Tieren (Abb. 19 E).

4.3.6.1.3 Rotarod-Test

Im *Rotarod*-Test (Jones und Roberts, 1968) wird die motorische Koordination überprüft (Abb. 19 F). Die ME2-überexprimierenden Mäuse und ihre Wildtyp-Kontrollen konnten sich auf dem rotierenden Stab nahezu gleich lange halten. Für die Kontrolltiere (n=16) betrug die Zeit 14,8 s, für die transgenen Mäuse (n=14) 14,1 s.

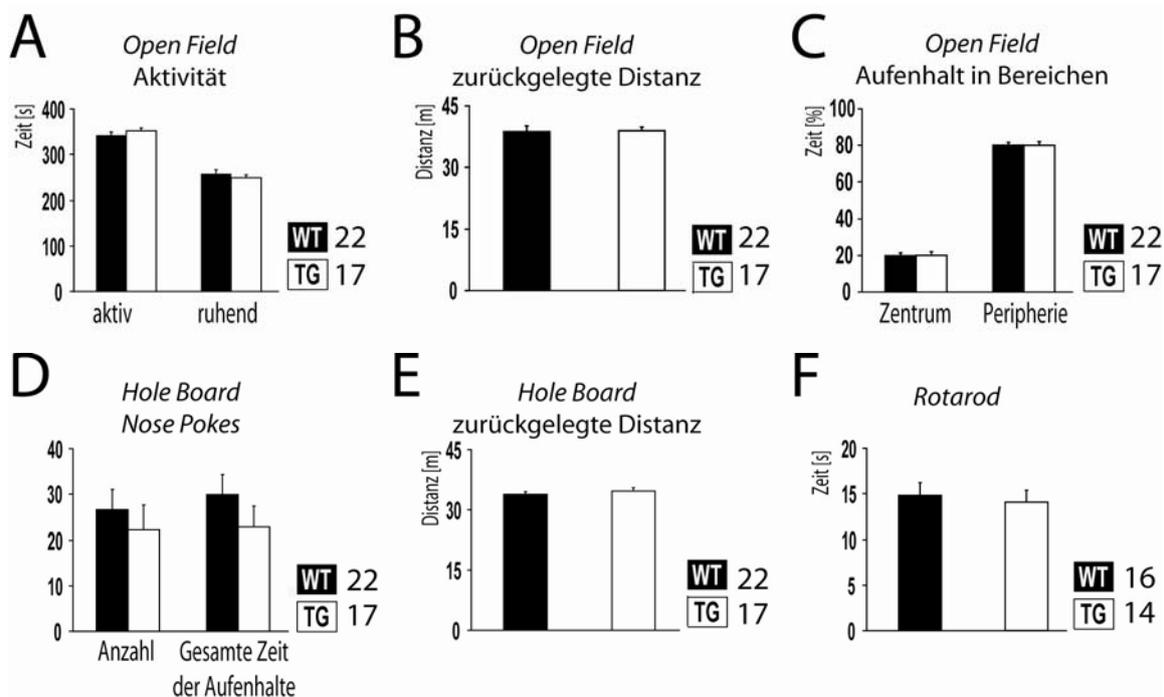


Abb. 19 Standard-Verhaltenstests Teil I: Untersuchung der Aktivität, des Angstverhaltens, der Neugierde und der motorischen Koordination der ME2-überexprimierenden Mäuse

A) bis C) *Open Field*-Test. Die transgenen Mäuse (n=17) wiesen eine ähnliche Aktivität bezüglich der Bewegungs- und Erholungszeiten (A) sowie der zurückgelegten Distanz während des 10-minütigen Versuches wie ihre Wildtyp-Geschwistertiere (n=22) auf. Die Ängstlichkeit der Tiere, gemessen als Aufenthaltsdauer in der Mitte oder in der Peripherie der Versuchsbox, war in beiden Genotypen nahezu gleich (C).

D) und E) *Hole Board*-Test. Das Neugierde-Verhalten der Mutanten gegenüber dem der Wildtyp-Tiere war annähernd gleich. Die Anzahl der *Nose Pokes* (Einsetzen der Nase in die Löcher) war vergleichbar ebenso wie die für die Exploration verbrachte Zeit (D). Die ME2-überexprimierenden Mäuse (n=22) legten eine ähnliche Distanz während des 10-minütigen Experiments wie die Wildtyp-Kontrollen (n=17) zurück (E).

F) *Rotarod*-Test zur Beurteilung der motorischen Koordination der Versuchstiere. Die ME2-überexprimierenden Mäuse (n=14) blieben im Durchschnitt eine ähnliche Zeitspanne auf der Walze der *Rotarod*-Apparatur wie ihre Wildtyp-Geschwistertiere (n=16). WT, Wildtyp-Kontrollen; TG, transgene Mäuse.

4.3.6.1.4 *Hot Plate*-Test

Im *Hot Plate*-Test ([O'Callaghan und Holtzman, 1985](#)) wird die Schmerzwahrnehmung der Tiere untersucht.

Im weiter unten beschriebenen Angstkonditionierungs-Test werden die Tiere elektrischen Fußschocks ausgesetzt. Die Aussagefähigkeit dieses Tests ist von der jeweiligen Schmerzempfindlichkeit abhängig. In transgenen Mäusen wird die ME2-Überexpression vom Thy-1.2-Promoter kontrolliert. Das Thy-1-Protein wird im motosensorischen Kortex der Maus gebildet ([Barlow und Huntley, 2000](#)). Aus diesem Grund musste ausgeschlossen werden, dass das gezeigte Lernverhalten von einem möglicherweise verminderten Schmerzempfinden der Mutanten beeinflusst wurde.

Hierzu wurde mit den gleichen Versuchstieren, die zuvor dem Angstkonditionierungs-Test ausgesetzt waren, der *Hot Plate*-Test durchgeführt. Es wurden sowohl F1-Hybride als auch die N5-Rückkreuzungsgeneration getestet. Aus der F1-Generation wurden 16 Wildtypen und 12 transgene Mäuse auf eine 52°C heiße Platte gesetzt. Die typische Reaktion der Mäuse auf Hitze, das Lecken der Hinterpfote, trat im Durchschnitt nach 13,6 s bei den Wildtyp-Tieren und nach 13,9 s bei den transgenen Tieren auf (Abb. 20 A). Die Latenzzeit der Reaktion war somit vergleichbar für beide Versuchsgruppen. Dies deutete darauf hin, dass die Schmerzwahrnehmung der transgenen Tiere der der Wildtyp-Kontrollen entsprach. Im Experiment mit N5 bestätigte sich das Ergebnis (Abb. 20 B). Nach 19,9 s zeigten die Wildtyp-Tiere (n=19) und nach 21,3 s die transgenen Mäuse (n=15) eine spezifische Reaktion auf Hitze. Die im Durchschnitt längeren Reaktionszeiten der N5-Tiere sind im Vergleich zu den F1-Hybriden wahrscheinlich auf den Stamm-Hintergrund zurückzuführen.

4.3.6.1.5 *Elevated Plus Maze*-Test

Der *Elevated Plus Maze*-Test ([Handley und Mithani, 1984](#); [Pellow et al., 1985](#)) erlaubt eine Beurteilung des Ängstlichkeitsgrades bei Testtieren. Die ME2-überexprimierenden Mäuse (n=16) und deren Wildtyp-Geschwistertiere (n=15) wurden einem fünfminütigen Test ausgesetzt (Abb. 20 C-E). Im Vergleich zu den transgenen Mäusen wiesen die Wildtypen in den offenen Armen eine nicht signifikant erhöhte Anzahl an Visiten und in den geschlossenen Armen des Apparates die gleiche Zahl an Visiten auf (durchschnittlich 13 und 11,5 Visiten). Die durchschnittliche Visitenanzahl der offenen Arme betrug 9,7 und die der geschlossenen 13 (Abb. 20 C und D). Beide Genotypen zeigten ähnliche Aktivität und legten im Test fast die gleiche Strecke zurück (14 m Wildtypen; 13,4 m Mutanten; Abb. 20 E).

4.3.6.1.6 Motivationstests: der Porsolt- und der *Tail Suspension*-Test

Der Porsolt- und der *Tail Suspension*-Test wurden entwickelt, um ein depressionsähnliches Verhalten bei Nagetieren zu erforschen. Die Tests lassen Rückschlüsse auf das Motivationsverhalten der zu untersuchenden Tiere zu.

Porsolt-Test

Im Porsolt-Test (auch *forced swim test* genannt; [Porsolt et al., 1977](#)) wurden die Versuchstiere in einen mit Wasser gefüllten Zylinder überführt und für 6 min beobachtet.

Die transgenen Mäuse schwammen durchschnittlich 181 s (54% der Gesamtzeit) aktiv, etwa 179 s lang (46% der Gesamtzeit) zeigten sie ein nahezu immobiles Verhalten. Bei den Wildtypen boten sich annähernd die gleichen Zeitintervalle: 196 s aktives Schwimmen (54%) und 164 s Passivität (46%). Es konnten somit keine signifikanten Differenzen im Motivationsverhalten zwischen den beiden Genotypen nachgewiesen werden (Abb. 20 F).

Tail Suspension-Test

Während des 5-minütigen *Tail Suspension*-Tests ([Sterú et al., 1985](#)), in dem die Mäuse mit ihrem Schwanz frei aufgehängt wurden, zeigten die Wildtypen (n=24) durchschnittlich 184 s (62% der Gesamtzeit) ein aktives und 116 s (38%) ein passives Verhalten. Die transgenen Mäuse (n=19) boten entsprechend 170 s (39% der Gesamtzeit) und 130 s (61%). Somit erbrachte auch hier der Vergleich der beiden Versuchsgruppen keine Unterschiede (Abb. 20 G).

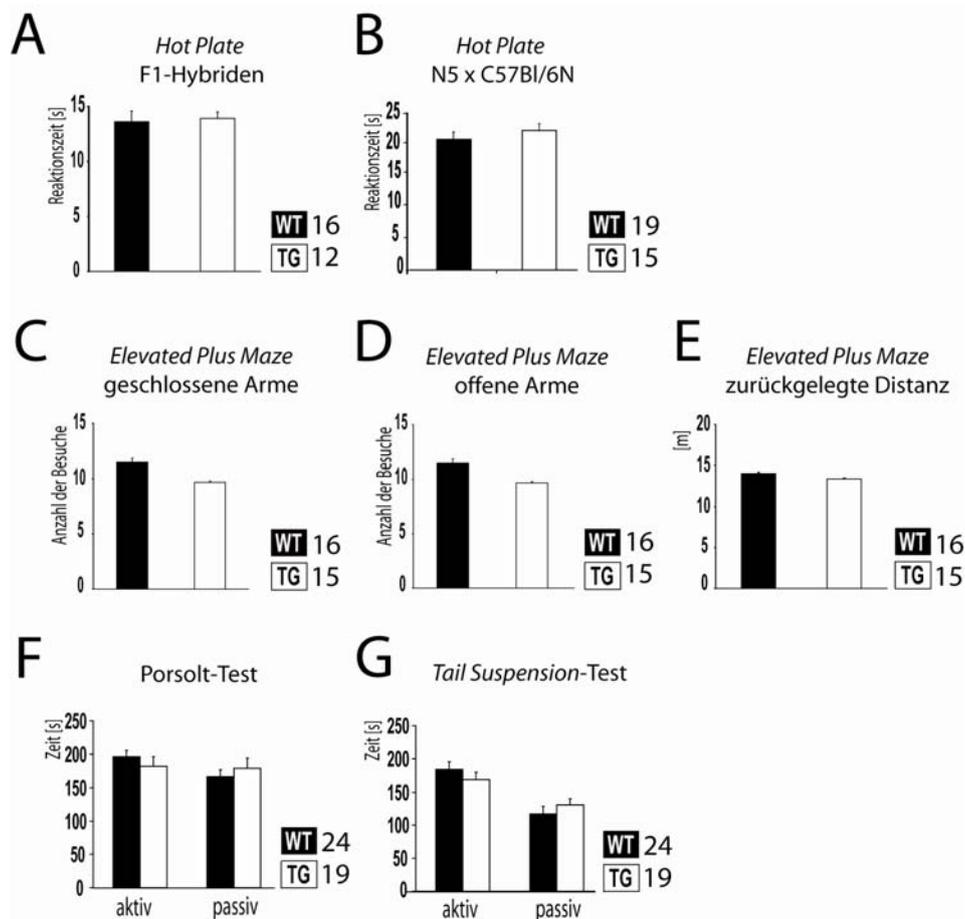


Abb. 20 Standard-Verhaltenstests Teil II: Untersuchung des Schmerzempfindens und des Angst- und Motivationsverhaltens der ME2-überexprimierenden Tiere

A) und B) *Hot Plate*-Test zur Schmerzwahrnehmung. A) Die transgenen Mäuse (n=12) zeigten nach nahezu gleicher Zeit eine spezifische Reaktion auf die Hitze (das Lecken der Hinterpfoten) wie die Wildtypen (n=16).

B) Test mit der fünften Generation der Rückkreuzung auf den C57Bl6/J-Hintergrund (N5). Die Reaktion auf die Hitze trat bei beiden Genotypen nach ähnlicher Zeit auf (WT, n=19; TG, n=15).

C) bis E) Beurteilung der Ängstlichkeit im *Elevated Plus Maze*-Test. Die Häufigkeit des Aufsuchens der geschlossenen (C) und der offenen (D) Arme des Apparats zeigte zwischen den Versuchsgruppen keinen Unterschied (TG, n=15; WT, n=16). Die zurückgelegte Strecke während des 10-minütigen Tests war bei beiden Genotypen nahezu gleich (E).

F) und G) Motivationstests. F) Im Porsolt-Test (*forced swim test*) zeigten die ME2-überexprimierenden Mäuse (n=19) die gleiche Verteilung an aktivem und immobilem Verhalten wie die Wildtyp-Kontrollen (n=24). Im *Tail Suspension*-Test (G) war die Motivation zwischen beiden Versuchsgruppen ähnlich (TG, n=19; WT, n=24). Beide Versuchsgruppen verhielten sich ähnlich lange aktiv und wiesen nahezu die gleiche Gesamtzeit des passiven Verhaltens auf.

Alle Tests, mit Ausnahme von (B), wurden mit Nachkommen der F1-Generation der Rückkreuzung von FVB/N-Mäusen mit C57Bl6/J-Stamm (F1-Hybriden) durchgeführt.

WT, Wildtyp-Kontrollen; TG, transgene Mäuse.

4.3.6.2 Untersuchung der Lernfähigkeit und des Gedächtnisses der ME2-überexprimierenden Mäuse

4.3.6.2.1 Water Maze-Test

Mit dem *Water Maze*-Test (Wasserlabyrinth nach Morris; [Morris, 1981](#); [Morris et al., 1984](#)) werden die hippocampusabhängige Navigationsfähigkeit und das räumliche Gedächtnis untersucht. Das Experiment wurde zweimal mit jeweils unabhängigen Mäuskohorten der TMEB-Linie durchgeführt. Die Auswertung der gemessenen Werte erfolgte mit 2-seitiger ANOVA und dem Bonferroni-Posttest.

Das erste Experiment wurde nach einem Standardprotokoll durchgeführt (Abb. 21 A-I). Zunächst wurden die Versuchstiere (12 Wildtypen und 14 transgene Mäuse) zwei Tage lang mit sichtbarer Plattform getestet. Sowohl am ersten als auch am zweiten Tag benötigten beide Gruppen nahezu die gleiche Zeit, um die Plattform zu erreichen (Interaktion zwischen Genotypen: $p=0,8808$; Abb. 21 I). Am dritten Tag wurde unmittelbar mit dem initialen Lernen (*initial learning*) begonnen. Beide Versuchsgruppen zeigten eine signifikante Reduktion der Suchzeiten (*escape latency*) innerhalb der sechs Testtage ($p<0,0001$; Abb. 21 A). Die Lernkurve der transgenen Tiere verlief annähernd parallel zu der der Kontrolltiere. Die ME2-überexprimierenden Mäuse wiesen im Durchschnitt eine größere Suchlatenz im Vergleich zu den Wildtypen auf. Die Interaktion zwischen beiden Genotypen war jedoch nicht signifikant ($p=0,8927$). Mit Blick auf *Trial 1* bis *4* bezüglich des Erreichens der Plattform am ersten Tag ergab sich eine ähnliche Tendenz: Die transgenen Tiere benötigten im *Trial 2* und *3* im Durchschnitt zwar mehr Zeit, um die Plattform zu finden, der Unterschied zwischen Mutanten und Wildtypen war aber nicht signifikant (Abb. 21 B).

Unmittelbar nach Beendigung des *Initial Learning*-Prozesses wurden die Versuchstiere einem *Probe Trial* (Probelauf) unterzogen, in dem sie 90 s lang im Becken ohne Plattform schwammen. Die beiden Genotypen verbrachten nahezu die gleiche Zeit im Zielquadranten (*target quadrant*; Abb. 21 C) bei vergleichbarer Schwimmgeschwindigkeit (Abb. 21 G) und zeigten eine ähnliche Präferenz bezüglich der anderen Quadranten, die jeweils unter dem Zufallsbereich von 25% lag. Die Anzahl der Überquerungen des Zielpunktes war in beiden Versuchsgruppen ähnlich (Abb. 21 H).

Ein Tag nach dem ersten *Probe Trial* wurde die Plattform in den gegenüberliegenden Quadranten überführt und es folgte ein *Reversal Learning* (Abb. 21 D). Beide Genotypen wiesen im Verlauf des sechstägigen Tests eine signifikante Reduktion der Suchzeit zum Erreichen der Plattform auf ($p<0,0001$). Die Lernkurve der transgenen Mäuse verlief nahezu parallel zu der der Kontrolltiere. Die Mutanten benötigten an jedem Testtag eine längere Suchzeit im Vergleich zu den Wildtypen, die Differenz zwischen beiden Genotypen war aber wiederum, auch wenn *Trial 2* des ersten Tages besonders hervorstach, nicht signifikant ($p=0,5362$). Direkt nach Abschluss des *Reversal Learning* wurden die Versuchstiere einem zweiten *Probe Trial* unterzogen (*Probe Trial 2*). Beide Gruppen hielten sich annähernd die

gleiche Zeit im Zielquadranten auf (Abb. 21 F), jedoch kürzer als während des ersten *Probe Trials*. Der Vergleich der Schwimgeschwindigkeit beider Genotypen im zweiten *Probe Trial* wies keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 21 G). Allerdings erbrachte der Vergleich zwischen den Schwimgeschwindigkeiten im ersten und zweiten *Probe Trial* innerhalb der Genotypen eine deutliche Reduktion der Fortbewegung während des zweiten *Probe Trials*. Beide Versuchsgruppen zeigten eine ähnliche Präferenz bezüglich der anderen Quadranten. Die Anzahl der Überquerungen des Zielpunktes im zweiten *Probe Trial* war in beiden Versuchsgruppen ähnlich, jedoch reduziert innerhalb der Genotypen im Vergleich zu *Probe Trial* 1 (Abb. 21 H).

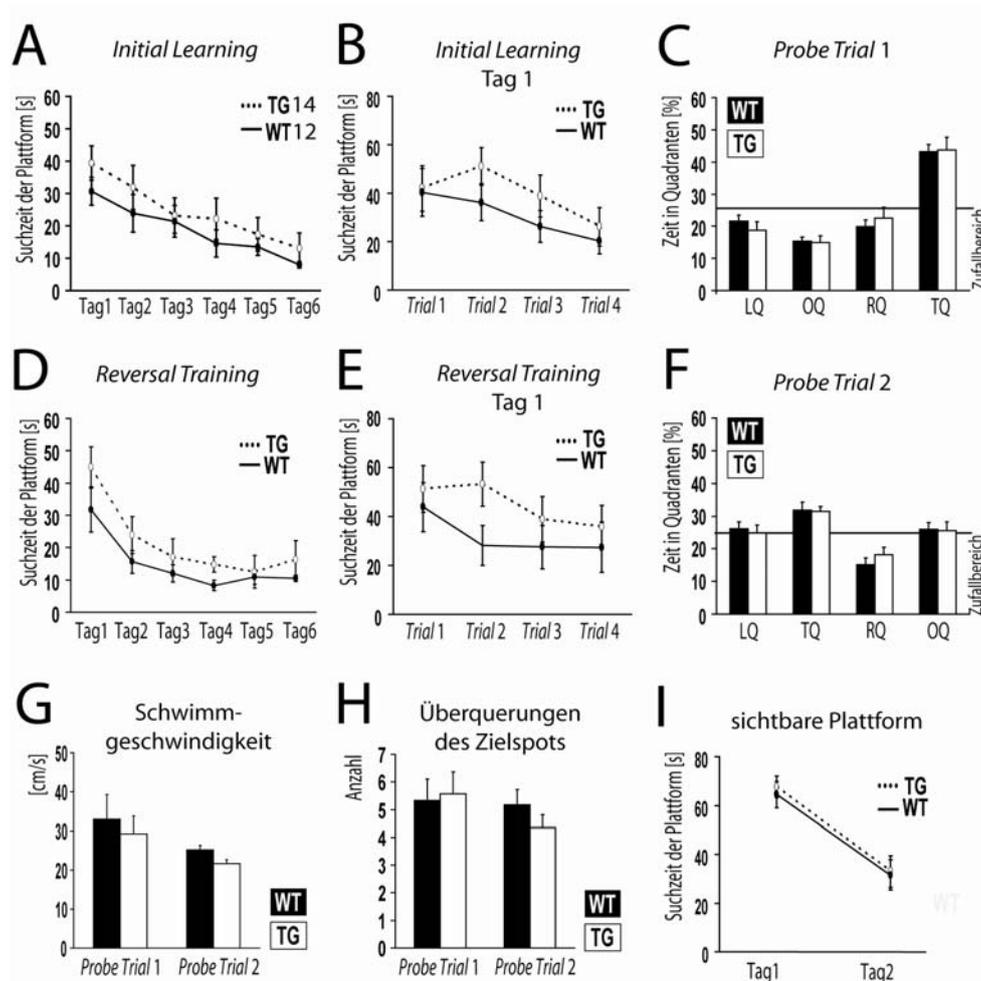


Abb. 21 Water Maze-Test nach Standardprotokoll

A) und B) *Initial Training*. A) Die Zeitdauer zum Finden der Plattform während des *Initial Learnings* war bei den transgenen Mäusen (TG, n=14) nicht signifikant länger als bei den Wildtyp-Tieren (WT, n=12). B) Die Suchlatenzen der Plattform am ersten Tag des *Initial Learnings* ergaben eine ähnliche Tendenz. Die Durchschnittzeiten jedes *Trials* wurden separat dargestellt. Im *Probe Trial 1* (C) hielten sich die Mutanten nahezu die gleiche Zeit im Zielquadranten auf wie die Kontrolltiere.

D) und E) *Reversal Training*. D) Während des *Reversal Trainings* brauchten die transgenen Tiere im Durchschnitt mehr Zeit zum Erreichen der Plattform. E) Die Suchzeiten der Plattform bei den Mutanten waren am ersten Tag nicht signifikant größer als bei den Wildtyp-Tieren. Im *Probe Trial 2* verbrachten beide Genotypen nahezu die gleiche Zeit im Zielquadranten (F).

Die ME2-überexprimierenden Mäuse wiesen in beiden *Probe Trials* ähnliche Schwimmgeschwindigkeiten wie ihre Wildtyp-Geschwistertiere auf (G). Die Anzahl der Überquerungen des Zielspots war bei beiden Genotypen vergleichbar (H). Während des Sichtbare Plattform-Tests (I) brauchten die transgenen sowie die Wildtyp-Tiere eine ähnliche Zeitspanne bis zum Erreichen der Plattform.

TG, Zielquadrant (*target quadrant*); RQ, rechter Quadrant; LQ, linker Quadrant; OQ, gegenüber dem TQ liegender Quadrant.

Im zweiten Experiment wurde das *Water Maze*-Protokoll modifiziert, um bei höherem Anspruchsprofil eine höhere Signifikanz herausarbeiten zu können.

Es wurden zwei Parameter geändert: Es wurde auf den Test mit sichtbarer Plattform verzichtet und den Tieren wurde nach Erreichen der Plattform statt 30 s nur 10 s erlaubt, die Umgebung zu erkunden.

Das Experiment wurde mit einer neuen Mauskohorte durchgeführt (Abb. 22 A-I). Die Anzahl der Tiere betrug für die transgenen Mäuse $n=17$ und für die Wildtyp-Tiere $n=23$. Beide Versuchsgruppen zeigten eine signifikante Reduktion der Suchzeiten während des initialen Lernens ($p<0,0001$). Anders als erwartet verhielten sich in diesem Experiment beide Genotypen ähnlich. Die Lernkurve der transgenen Tiere verlief zum größten Teil deckungsgleich zu der der Kontrollmäuse (Abb. 22 A). Die Analyse der separaten Trials des ersten Versuchstages bezüglich des Erreichens der Plattform ergab keine Unterschiede zwischen den Genotypen. Während des *Probe Trials* 1 hielten sich die beiden Genotypen bei vergleichbarer Schwimmgeschwindigkeit annähernd die gleiche Zeit im Zielquadranten auf (Abb. 22 C und H). Die Anzahl der Überquerungen des Zielpunktes war in beiden Versuchsgruppen vergleichbar (Abb. 22 I).

Einen Tag nach dem ersten *Probe Trial* folgte das *Reversal Learning* (Abb. 22 D). Beide Genotypen wiesen während des fünftägigen Experiments eine signifikante Reduktion der Suchzeit zum Erreichen der Plattform auf ($p<0,0001$). Die Lernkurve der transgenen Tiere verlief flacher als die der Wildtypmäuse. Die Mutanten brauchten an jedem Testtag eine längere Suchzeit im Vergleich zu den Wildtypen, die Differenz zwischen beiden Genotypen erwies sich als signifikant ($p=0,0346$), die Interaktion hingegen nicht ($p=0,4432$). Es folgte eine genauere Analyse der separaten Trials am ersten (Abb. 22 E) und am zweiten Tag (Abb. 22 F). Am zweiten Tag verhielten sich die Genotypen zwar unterschiedlich ($p=0,0247$), die Interaktion zwischen transgenen Mäusen und Wildtyptieren war aber erneut nicht signifikant ($p=0,7473$).

Anschließend wurden die Versuchstiere einem zweiten *Probe Trial* unterzogen (Abb. 22 G). Die beiden Gruppen hielten sich annähernd die gleiche Zeit im Zielquadranten auf. Der Vergleich der Schwimmgeschwindigkeit beider Genotypen wies keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 22 H). Die Anzahl der Überquerungen des Zielpunktes war in beiden Versuchsgruppen ähnlich, jedoch reduziert innerhalb der Gruppen im Vergleich zum ersten *Probe Trial* (Abb. 22 I).

Nach Durchführung des *Water Maze*-Tests mit zwei unabhängigen Mauskohorten nach einem Standard- und einem modifizierten Protokoll konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den ME2-überexprimierenden Mäusen und ihren Wildtyp-Geschwistertieren aufgezeigt werden. Allerdings benötigten die transgenen Tiere beider untersuchten Kohorten während des *Initial Learnings* nach dem Standardprotokoll und während des *Reversal Training* nach dem Standard- sowie nach dem modifizierten Protokoll im Durchschnitt eine längere Suchzeit, um die versteckte Plattform zu erreichen.

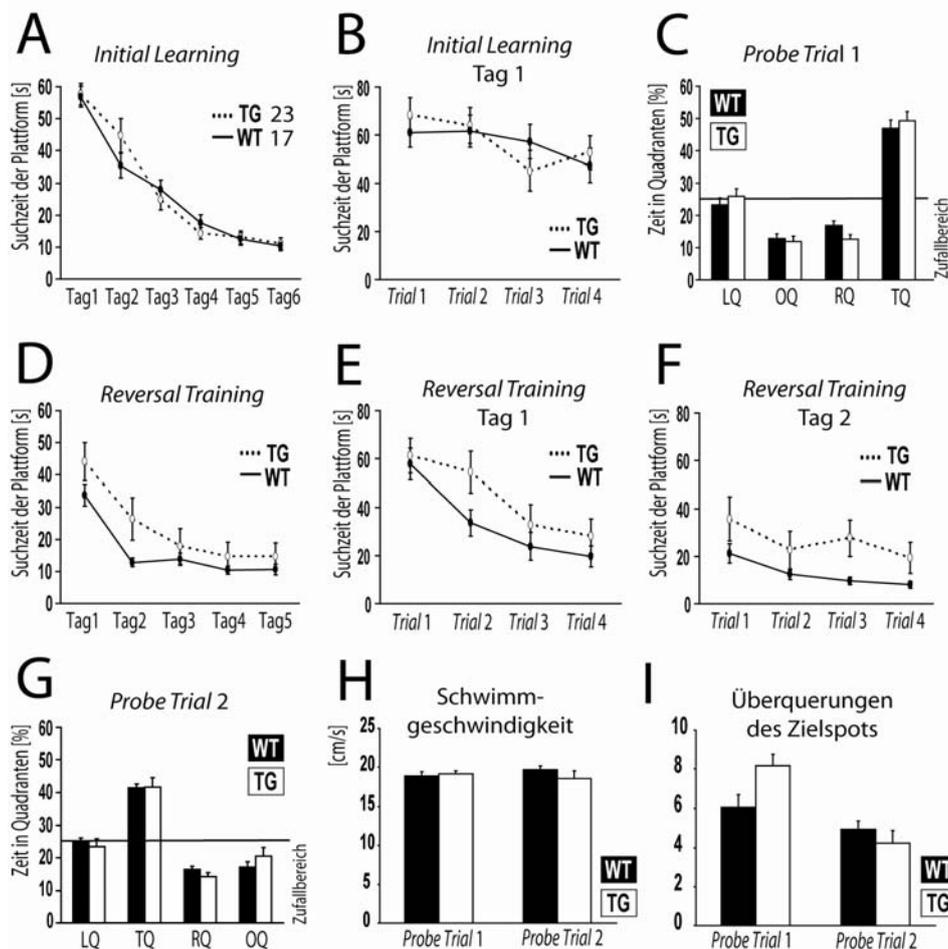


Abb. 22 Water Maze-Test nach einem modifizierten Protokoll

A) und B) *Initial Training*. A) Während des gesamten *Initial Learnings* sowie am ersten Tag dessen (B) brauchten die transgenen Mäuse (TG, n=17) nahezu die gleichen Zeiten bis zum Erreichen der Plattform wie ihre Wildtyp-Geschwistertiere (WT, n=23). Im *Probe Trial 1* zeigten beide Genotypen eine ähnliche Präferenz bezüglich des Zielquadranten (C).

D) bis F) *Reversal Training*. D) Im *Reversal Training* benötigten die Mutanten eine nicht signifikant längere Zeit ($p=0,443$) als die Kontrolltiere, um die Plattform zu erreichen. Die gleiche Tendenz konnte am ersten (E) und am zweiten (F) Tag beobachtet werden. Die Unterschiede zwischen beiden Genotypen waren aber nicht signifikant. Im *Probe Trial 2* verbrachten beide Versuchsgruppen eine nahezu gleiche Zeit im Zielquadranten (G). Die Schwimmgeschwindigkeit während des *Probe Trial 1* und 2 war bei beiden Genotypen fast gleich (H). Die Anzahl der Überquerungen des Zielspots im *Probe Trial 1* (I) war bei den Mutanten nicht signifikant größer als bei den Wildtyp-Tieren ($p=0,109$; Student's T-Test). Im *Probe Trial 2* zeigten beide Gruppen eine ähnliche Anzahl an Überquerungen des Zielspots (I).

TG, Zielquadrant (*target quadrant*) ; RQ, rechter Quadrant; LQ, linker Quadrant; OQ, gegenüber dem TQ liegender Quadrant.

4.3.6.2.2 Angstkonditionierungs-Test

Die Frage, ob das hippocampusabhängige kontextuelle Gedächtnis in Mutanten von der ME2-Überexpression beeinträchtigt wird, konnte mit ausführlichen Angstkonditionierungs-Tests (Fanselow, 1980) beantwortet werden. Dieser Test erlaubt eine Beurteilung der Lernfähigkeit anhand von Assoziationen, die zwischen einer aversiven Erfahrung und der Umgebung, in der diese Erfahrung gesammelt wurde, hergestellt wurden. Die Erinnerung an ein negatives Ereignis löst bei Mäusen eine sog. Angststarre (*Freezing*) aus. In diesem Zustand bewegt die Maus lediglich den Brustkorb zum Atmen, ansonsten ist sie völlig regungslos. Über das

Freezing ließ sich auf das Angstgedächtnis der Mäuse schließen. Über einen Zeitraum von insgesamt 2 min wurde alle 4 s – also insgesamt 30 mal – eine Beobachtung vorgenommen. Die Ergebnisse wurden als relative Häufigkeit positiv beobachteter *Freezings* dargestellt.

Angstkonditionierung mit F1-Hybriden

Drei unabhängige Mauskohorten von F1-Hybriden der TMEB-Mauslinie wurden dem Angstkonditionierungs-Test unterzogen. Neben einem Standardprotokoll mit zwei Ton-Fußchock-Paarungen wurde ein modifiziertes Protokoll mit fünf Ton-Fußchock-Paarungen verwendet.

Die Schemata dieser Protokolle wurden in Abb. 23 A dargestellt. Die Signifikanz der Messungen wurde mit dem Mann-Whitney-Test überprüft.

Standardprotokoll mit zwei Ton-Fußchock-Paarungen

Bevor Ton-Fußchock-Paarungen appliziert wurden (Abb. 23 B), zeigten die dem Versuch unterzogenen Mutanten (n=19) und ihre Wildtyp-Geschwistertiere (n=18) in der Konditionierungs-Box einen *Freezing*-Grad, der im Bereich von 4,3 - 6,2% lag (Grundlinie für entsprechenden Kontext, *baseline*). Am ersten Tag nach der aversiven Erfahrung boten die Tiere beider Genotypen nach Einsetzen in die Konditionierungs-Box eine deutliche Antwort (*context*). Die transgenen Mäuse zeigten dabei signifikant weniger *Freezings* als die Wildtyp-Kontrollen (36% gegenüber 56,7%; $p=0,0053$).

Einen Tag später wurden die Versuchstiere in eine neue Box eingesetzt und es erfolgte die Bestimmung der Grundlinie für Ton (*pre-cue, cue baseline*). Die Werte lagen bei 6,4% bei den Mutanten und 11,5% bei den Kontroll-Tieren. Während des Applizierens des Tons (*cue*) wiesen beide Versuchsgruppen eine starke Antwort auf den konditionierten Stimulus auf. Mit Werten von 44,2% für die transgenen und 65% für die Kontroll-Mäuse war der Unterschied zwischen beiden Genotypen signifikant ($p=0,0089$).

Protokoll mit fünf Ton-Fußchock-Paarungen

Weiterhin stellte sich die Frage, ob bei Applizieren mehrerer Ton-Fußchock-Paarungen der konditionierte Stimulus so stark werden würde, dass sowohl das kontextuelle als auch das Ton-Gedächtnis der transgenen Mäuse sich dem der Wildtyp-Kontrollen angleichen und somit durch Überreizen der sog. Deckel-Effekt (*ceiling effect*) beobachtet werden könnte.

Dafür sollte ein Angstkonditionierungs-Test mit fünf Ton-Fußchock-Paarungen verwendet werden. Eine neue Mauskohorte wurde diesem Experiment unterzogen (Abb. 23 C). Die Grundlinien-Werte für den Kontext waren sehr gering (0,6 - 0,8%). Die Angstreaktion der transgenen Tiere (n=23) war ausgeprägt und war nahezu gleich wie die Antwort der Wildtyp-Mäuse (n=21; entsprechend 64,5% und 70,3%; $p=0,3529$).

Die Grundlinie für das Ton-Gedächtnis lag im Bereich von 6,4 - 9%. Im Gegensatz zum kontextuellen Gedächtnis war der Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen während dieses Tests mit $p=0,0472$ signifikant.

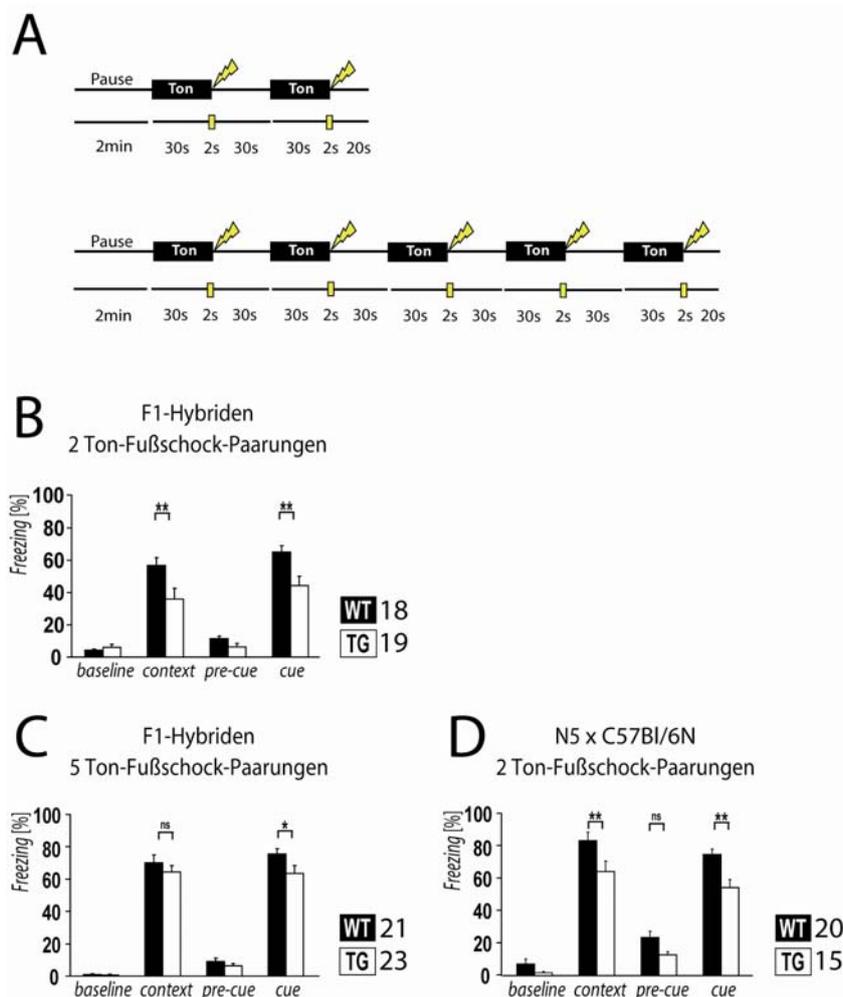


Abb. 23 Untersuchung des kontextuellen und des Ton-Gedächtnisses der ME2-überexprimierenden Mäuse im Angstkonditionierungs-Test

A) Schematische Darstellung der verwendeten Protokolle zur Durchführung des Angstkonditionierungs-Tests.

B) und C) Angstkonditionierungs-Tests mit den Nachkommen der F1-Generation der Rückkreuzung von FVB/N-Mäusen mit C57Bl6/N-Stamm (F1-Hybriden).

B) Im Test mit zwei Ton-Fußschock-Paarungen zeigten die transgenen Mäuse (TG; n=19) sowohl im Kontext ($p=0,0053$) als auch im Ton-Gedächtnis-Test ($p=0,0089$) signifikant weniger *Freezings* als die Wildtyp-Kontrollen (WT; n=18).

C) Im Test für das kontextuelle Gedächtnis mit fünf Ton-Fußschock-Paarungen zeigten die transgenen Mäuse (n=23) eine ähnliche *Freezing*-Häufigkeit wie die Kontrolltiere (n=21; $p=0,3529$). Im Ton-Gedächtnis-Test wiesen die Mutanten signifikant weniger *Freezings* als ihre Wildtyp-Geschwistertiere auf ($p=0,0472$).

D) Angstkonditionierungs-Tests mit den Nachkommen der fünften Generation der Rückkreuzung von FVB/N-Mäusen mit dem C57Bl6/N-Stamm (N5). Im Test für das kontextuelle Gedächtnis wiesen die ME2-überexprimierenden Mäuse (n=15) signifikant weniger *Freezings* als die Wildtyp-Kontrollen auf (n=20; $p=0,0025$). Während der Ton-Exposition zeigten die Mutanten eine signifikant reduzierte Anzahl an *Freezings* im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistertieren ($p=0,0029$).

baseline, Grundlinie für Kontext; *context*, Kontext-Gedächtnis; *pre-cue*, Grundlinie für Ton-Gedächtnis; *cue*, Ton-Gedächtnis. Signifikanz: **, $p<0,01$; *, $p<0,05$. ns, nicht signifikant.

Angstkonditionierung mit N5 x C57Bl/6N-Mäusen

Die Wahl des Mausstammes ist ein wichtiger Faktor für Verhaltensanalysen. Manche Verhaltensphänotypen sind stark vom verwendeten Mausstamm abhängig (Crawley, 2000). Um zu überprüfen, ob der Lernphänotyp der ME2-überexprimierenden Mäuse stammspezifisch ist, wurden die Nachkommen der F5-Generation aus der Rückkreuzung von FVB/N-Mäusen mit dem C57Bl6/N-Stamm (N5) dem Standard-Angstkonditionierungs-Test mit zwei Fußschock-Ton-Paarungen unterzogen (Abb. 23 D). Die Grundlinie bezüglich des Kontextes lag im Bereich von 1,7 bis 7%. Im Kontext zeigten transgene N5 Mäuse (n=15) einen *Freezing*-Grad von 64,5%, ihre Wildtyp-Geschwistertiere (n=20) einen solchen von 82,7%. Die Interaktion zwischen beiden Genotypen konnte somit als signifikant nachgewiesen werden ($p=0,0025$).

Während der Untersuchung für die Ton-Gedächtnis-Grundlinie zeigten die Wildtypen eine nicht signifikant erhöhte Anzahl von *Freezings* (23,3% im Vergleich zu 12,6%). Im Rahmen der Ton-Exposition wiesen die ME2-überexprimierenden Tiere signifikant weniger *Freezings* als die Wildtyp-Kontrollen auf (54% und 74,3%; $p=0,0029$). Damit wurde nachgewiesen, dass der Lernphänotyp transgener ME2-überexprimierender Mäuse stamunabhängig und somit universell ist.

4.3.7 Charakterisierung der ME2-überexprimierenden Mäuse auf transkriptioneller Ebene

4.3.7.1 Die Überexpression von ME2 beeinflusst den Transkriptionslevel bestimmter Gene

In dieser Studie wurde nachgewiesen, dass eine Überexpression des ME2 im Vorderhirn der transgenen Mäuse zu stark ausgeprägten Lerndefiziten sowohl im kontextuellen als auch im Ton-Gedächtnis führt. Als Transkriptionsfaktor besitzt ME2 das Potenzial, Zielgene differentiell zu regulieren. Zur Überprüfung einer möglichen Deregulierung einzelner Gene in ME2-überexprimierenden Mäusen wurde eine Microarray-Analyse durchgeführt. Dazu wurden Gesamt-RNA-Proben aus den Hippokampi transgener Tiere und ihrer Wildtyp-Geschwistertiere (n=3 pro Genotyp) isoliert, innerhalb der Versuchsgruppen gepoolt und in cDNA umgeschrieben. Pro Genotyp wurden zwei Microarrays verwendet und unabhängig ausgewertet. Die Analyse offenbarte einige Gen-Kandidaten, die vom Wildtyp auffällig abweichende Werte zeigten. In Abb. 24 sind die absoluten Werte der einzelnen Kandidaten mit ihren biologischen Funktionen dargestellt. Auffallend war die Deregulierung einer der für den zirkadianen Rhythmus verantwortlichen Hauptkomponenten: *Per2*.

Gen	Microarray-Daten	Funktion
Cbx6 <i>chromobox homolog 6</i>		Transkriptionsfaktor Bindung von Chromatin Modifizierung von Chromatin
Zipro1 <i>zinc finger protein 1</i>		Transkriptionsfaktor Bindung der DNA Zelldifferenzierung
Arnt2 <i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2</i>		Transkriptionsfaktor Bindung der DNA
Bsn <i>basoon</i>		Synapsen Zytoskelett
Per2 <i>period homolog 2</i>		Transkriptionsfaktor Zirkadianer Rhythmus
Timp2s <i>tissue inhibitor of metalloproteinase 2</i>		Enzymatische Aktivität

Abb. 24 Microarray-Analyse der Genexpression in ME2-überexprimierenden Mäusen

Die Gesamt-RNA aus gepoolten Hippokampi von ME2-überexprimierenden Mäusen und ihren Wildtyp-Geschwistertieren (n=3) wurde mit Hilfe von Microarrays analysiert. Pro Genotyp wurden zwei unabhängige Microarrays (als M1 und M2 bezeichnet) verwendet und separat ausgewertet.

Linkes Panel: Ausgewählte Gen-Kandidaten, deren absolute Expressionswerte bei den transgenen Tieren deutlich von denen der Kontrolltiere abweichen.

Mittleres Panel: Darstellung der absoluten Werte entsprechender Gene.

Rechtes Panel: Funktionen, die mit den entsprechenden Gen-Kandidaten in Verbindung gebracht werden.

Die gewonnenen Microarray-Daten sollten nun mit Hilfe einer anderen Methode validiert werden, die eine Bestimmung der Genregulierung auf mRNA-Ebene erlaubt. Hierfür wurde eine neue Kohorte von Tieren präpariert. Aus den Hippokampi transgener Mäuse und ihrer Wildtyp-Geschwistertiere (n=3 pro Genotyp) wurde die RNA gewonnen, in cDNA umgeschrieben und einer qRT-PCR-Analyse unterzogen. Per2 war das einzige Gen, dessen Änderung der Regulierung in transgenen Tieren bestätigt werden konnte. Es wurde eine 1,6-

fache Hochregulierung des Per2-Expressionsniveaus im Hippokampus der transgenen Mäuse beobachtet (Abb. 25).

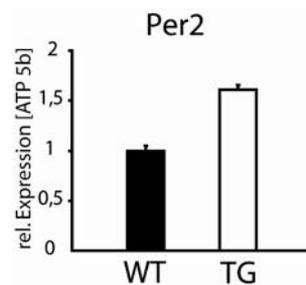


Abb. 25 Untersuchung des Per2-Expressionsniveaus in Hippokampi der ME2-überexprimierenden Tiere mit Hilfe der quantitativen RT-PCR-Analyse

Zur Validierung der Microarray-Daten wurde eine unabhängige Kohorte der ME2-überexprimierenden Mäuse und ihrer Wildtyp-Geschwistertiere verwendet. Aus den Hippokampi der beiden Genotypen (n=3) wurde RNA isoliert und entsprechend vereinigt. Mit einer qRT-PCR-Analyse konnte eine 1,6-fache Hochregulierung der Per2-Expression bei den Mutanten nachgewiesen werden. Die Werte wurden auf die Expressionswerte des ATP 5b normalisiert. Werte +S.E.M.

4.3.7.2 Analyse des zirkadianen Expressionsprofils verschiedener Gene in der transgenen Maus mittels der qRT-PCR

Mit Hilfe der Microarray-Analyse konnte nachgewiesen werden, dass in den Hippokampi der transgenen Tiere das relative Per2-Expressionsniveau erhöht war. Dies konnte mit einer qRT-PCR-Analyse der hippokampalen RNA unabhängiger Mauskohorten bestätigt werden (Abb. 25). Per2 ist einer der wichtigsten für die zirkadiane Rhythmik verantwortlichen Faktoren. Nun galt es herauszufinden, ob ein erhöhtes ME2-Expressionsniveau in transgenen Mäusen eine Änderung der zirkadianen Regulierung potentieller Zielgene verursachen kann. Hierzu sollte ein zirkadianes Profil der hippokampalen Genexpression einiger ausgesuchter Gene in Mutanten erstellt werden. Es wurden die Hippokampi der transgenen Mäuse und der Wildtyp-Tiere beider Geschlechter (n=3-5 pro Genotyp) zu sechs verschiedenen Zeitpunkten (ZT0, ZT4, ZT8, ZT12, ZT16 und ZT20) präpariert. Im Anschluss wurde die Gesamt-RNA aus den gepoolten Hippocampi isoliert, in cDNA umgeschrieben und schließlich eine quantitative RT-PCR-Analyse der Genexpression durchgeführt (Abb. 26).

Zur Qualitätskontrolle folgte die Bestimmung der c-fos- und β -Aktin-Expression (Abb. 26 A). C-fos ist ein unmittelbar früh exprimiertes Gen (IEG, *immediate early gene*) und wird als Antwort auf einen Stimulus (neue Umgebung, Stress, Licht usw.) induziert. Wie erwartet, war das c-fos-Niveau am stärksten ausgeprägt in der aktiven Phase und am schwächsten in der Schlafphase. Da Mäuse keinen kontinuierlichen Schlaf aufweisen und auch während der Ruhephase hin und wieder aktiv werden, stieg das c-fos-Expressionsniveau bereits in der Schlafphase an. Am Ende der Aktivitätsphase zeigten die transgene Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren eine leicht erhöhte c-fos-Expression.

β -Aktin ist ein zytoskelettales Haushaltsgen (*housekeeping gene*), das keine tageszeitabhängige Amplitude in der Regulierung aufweist. Das β -Aktin-Expressionsniveau war bei beiden Genotypen annähernd gleich ausgeprägt und erwartungsgemäß über den gesamten Tagesverlauf hinweg konstant.

Per2 stellt eine der Komponenten für die negative Rückkopplung in der molekularen Uhr dar. Die Per2-Expression wird von bHLH-Transkriptionsfaktoren der bHLH-PAS-Familie über nicht-kanonische E-Boxen reguliert. Hierfür werden spezifische Heterodimere von BMAL1 mit CLOCK oder mit NPAS2 benötigt. Die Per2-Expression nahm bei den Kontrolltieren von ZT4 bis ZT16 zu und war während der Transition von der hellen Phase in die dunkle Phase am stärksten ausgeprägt (Abb. 26 B). Diese Ergebnisse stimmten mit denen in der Literatur überein ([Sakamoto et al., 1998](#)). Bis auf ZT8 lag die Per2-Expression in den transgenen Tieren durchschnittlich höher als bei den Wildtyp-Kontrollen. Damit wurden die Microarray-Daten verifiziert. Die zirkadiane Amplitude des Per2-Niveaus schien bei den Mutanten robuster reguliert zu werden.

Weiterhin wurde die Expression von Id2, einem dominant negativen Faktor der bHLH-Familie, untersucht (Abb. 26 C). Id2 wird im Kortex und Hippokampus von adulten Mäusen exprimiert ([Neuman et al., 1993](#)). Eine Überexpression von ME2 aktiviert den Id2-Promotor in der Zellkultur ([Neuman et al., 1995](#)). Das durchschnittliche Expressionsniveau von Id2 war in den ME2-überexprimierenden Mutanten erhöht, was konsistent mit den *in vitro*-Daten von [Neuman et al. \(1995\)](#) war. Id2 weist eine zirkadiane Regulierung in den *Nuclei suprachiasmatici* der Maus auf ([Ueda et al., 2002](#)). Die höchste Expression des Id2 wurde bei den ME2-überexprimierenden Mäusen und ihren Wildtyp-Kontrollen am Anfang der Lichtphase nachgewiesen. Die Tiefstwerte des Id2-Transkript-Niveaus lagen bei ZT12 (Wildtyp-Kontrollen) bzw. bei ZT20 (transgene Mäuse).

BDNF (*brain derived neurotropic factor*) spielt eine wichtige Rolle bei der synaptischen Plastizität. Der Verlust einer Kopie des BDNF-Gens führt zu Defiziten im kontextuellen Gedächtnis ([Liu et al., 2004](#)), also zu einem ähnlichen Phänotyp wie bei den ME2-überexprimierenden Mäusen. Das Expressionsprofil von BDNF wurde bei den ME2-überexprimierenden Mäusen und ihren Wildtyp-Geschwistertieren untersucht (Abb. 26 D). Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen beiden Genotypen. Die Expression des BDNF ist zudem tageszeitabhängig. So erreicht sie bei Ratten das höchste Niveau im Hippokampus und in den *Nuclei suprachiasmatici* (SCN) während der dunklen Phase ([Berchtold et al., 1999](#); [Liang et al., 1998](#)). Es wurde eine deutliche zirkadiane Regulierung mit den durchschnittlich höchsten Werten in der Schlafphase der Mäuse (ZT4 bis ZT8) beobachtet.

Die Analyse der zirkadianen Expression der bHLH-Transkriptionsfaktoren der NeuroD-Familie ergab folgendes: Das Expressionsniveau von NeuroD und NEX war über fast alle analysierten Zeitpunkte in beiden Versuchsgruppen ähnlich (Abb. 26 E und F). Zwischen ZT16 und ZT20, also am Ende der Schlafphase, war die Expression von NeuroD in den Mutanten niedriger. Beide Transkriptionsfaktoren zeigten tageszeitabhängig eine leichte

Modulation, die tiefsten Werte wurden bei ZT0 gemessen. Hierbei sollte bemerkt werden, dass das Expressionsniveau des dominant negativen Faktors Id2 bei beiden Genotypen am Punkt ZT0 ihr Maximum erreichte. Im Gegensatz zu NeuroD und NEX war die NDRF-Expression dagegen stark zirkadian reguliert (Abb. 26 G). Das Expressionsprofil des NDRF war bei den ME2-überexprimierenden Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen zeitlich verschoben. Während der Aktivitätsphase war die durchschnittliche relative NDRF-Expression im Vergleich zu den Kontrollen erhöht.

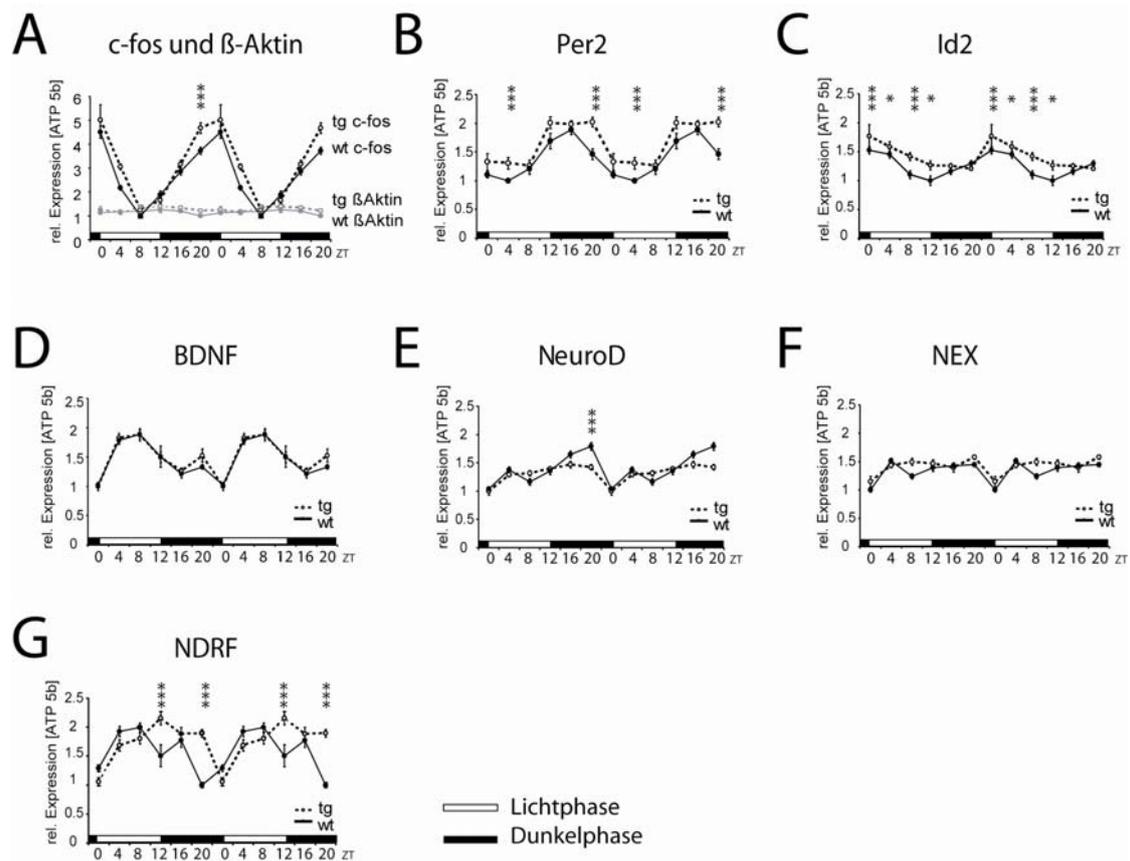


Abb. 26 Quantitative RT-PCR-Analyse der zirkadianen Genexpression in ME2-überexprimierenden Mäusen

Mutanten (tg) und ihre Wildtyp-Geschwistertiere (wt; n=3-4) wurden zu sechs verschiedenen Zeitpunkten (ZT0, ZT4, ZT8, ZT12, ZT16 und ZT20) präpariert. Die Gesamt-RNA aus den Hippokampi wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und einer qRT PCR-Analyse unterzogen. Die gemessenen Werte wurden auf die Expressionswerte des ATP 5b normalisiert und in den Diagrammen doppelt geplottet. Werte \pm S.E.M.

A) Zur Qualitätskontrolle der Messung wurde die zirkadiane Expression des Aktivitätsmarkers c-fos gemessen. Das c-fos-Niveau war bei den transgenen Tieren am Ende der Schlafphase im Vergleich zu den Wildtypen leicht erhöht. Als eine weitere Kontrolle diente das Haushaltsgen β -Aktin, dessen Expression konstant verlief und keine Abweichungen zwischen den beiden Genotypen erkennen ließ.

B) Die Expression des Per2 zeigte bei beiden Genotypen einen ähnlichen zirkadianen Verlauf. Dabei war die Per2-Expression bei den ME2-überexprimierenden Mäusen während fast aller untersuchten Zeitpunkte erhöht.

C) Die Id2-Expression war in den ME2-überexprimierenden Mäusen höher als bei Kontroll-Tieren und zeigte bei beiden Genotypen eine zirkadiane Regulierung mit Höchstwerten um ZT0.

D) Die Expressionsverläufe des BDNF waren bei beiden Genotypen nahezu deckungsgleich und wiesen eine deutliche zirkadiane Regulierung auf.

E) In den Mutanten war das NeuroD-Niveau zwischen ZT16 und ZT20 reduziert. Die NeuroD-Expressionskurve der transgenen Tiere verlief etwas flacher als die der Kontrollen. Bei beiden Genotypen wurde eine leichte zirkadiane Veränderung der NeuroD-Expression mit Tiefstwerten um ZT0 beobachtet.

F) Das NEX wies in beiden Genotypen ein ähnliches Expressionsniveau mit Tiefstwerten um ZT0 auf.

G) Die Expressionsverläufe des NDRF in beiden Versuchsgruppen ließen eine starke zirkadiane Regulierung erkennen. Das NDRF-Expressionsniveau bei den ME2-überexprimierenden Mäusen schien in der Phase verschoben zu sein.

In Abb. 27 ist ein Vergleich der zirkadianen NeuroD- und Id2-Expressionsverläufe dargestellt. Die Expression beider Gene verhielt sich in beiden Genotypen nahezu antizyklisch zueinander. Bei den Wildtyp-Kontrollen übertraf das NeuroD-Expressionsniveau während der dunklen Phase deutlich die Id2-Expression (Abb. 27 A). In den transgenen Tieren (Abb. 27 B) dominierte das NeuroD-Expressionsniveau nicht mehr so stark über das Id2-Niveau. Zur genaueren Darstellung dieser veränderten Regulation des NeuroD und des Id2 wurden deren relative Expressionsniveaus ins Verhältnis gesetzt (Expressionsindex NeuroD:Id2; Abb. 28). Das Expressionsverhältnis war bei den ME2-überexprimierenden Mäusen während der ganzen Messung niedriger als bei den Wildtyp-Kontrollen. Der Unterschied war zwischen ZT12 und ZT20 besonders stark ausgeprägt.

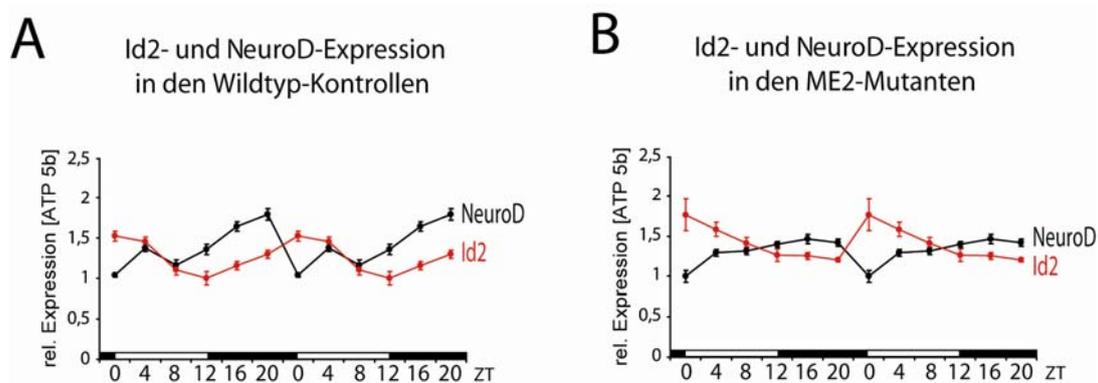


Abb. 27 Vergleich des zirkadianen NeuroD- und Id2-Expressionsniveaus in den ME2-überexprimierenden Mäusen und ihrer Wildtyp-Geschwistertiere

Die Hippokampi der ME2-überexprimierenden Mäusen sowie der Kontrolltiere (n=3-4) wurden zu sechs verschiedenen Zeitpunkten (ZT0, ZT4, ZT8, ZT12, ZT16 und ZT20) präpariert. Es folgte eine Isolierung der Gesamt-RNA und eine qRT-PCR-Analyse. Die gemessenen Werte wurden auf die Expressionswerte des ATP 5b normalisiert und in den Diagrammen doppelt geplottet. Werte \pm S.E.M.

A) Vergleich des relativen NeuroD- und Id2-Expressionsniveaus der Wildtyp-Tiere. Die NeuroD-Expression verhielt sich annähernd antizyklisch zu der Id2-Expression. Die Expression des NeuroD zeigte die tiefsten Werte um ZT0, wenn das Id2-Niveau das Maximum erreichte. Die relativen Werte der NeuroD-Expression lagen in der Aktivitätsphase der Mäuse deutlich höher als die Id2-Werte.

B) Vergleich der relativen Expression von NeuroD und Id2 bei den transgenen Tieren. Es wurde ein reverser Zyklus der Expression der beiden Gene beobachtet. Die tiefsten Werte der NeuroD-Expression wurden bei ZT0 gemessen, parallel zu der maximalen Expression des Id2.

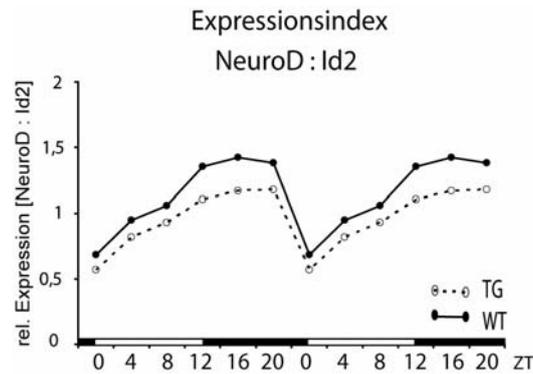


Abb. 28 Expressionsindex NeuroD:Id2 in ME2-überexprimierenden Mäusen

Die relativen Expressionswerte des NeuroD wurden entsprechend durch die relativen Id2-Expressionswerte dividiert. Das Expressionsverhältnis NeuroD:Id2 lag bei den transgenen Tieren (TG) über alle untersuchten Zeitpunkte niedriger als bei den Wildtyp-Kontrollen (WT). Dies ließ sich besonders stark zwischen ZT12 und ZT20 erkennen.

4.3.8 Zirkadiane Verhaltensanalyse der ME2-überexprimierenden Mäuse

In dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass das Expressionsniveau des Per2 bei den ME2-überexprimierenden Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen erhöht ist (Abb. 26 B). Aufgrund der veränderten Per2-Gen-Regulation ergab sich die Frage, ob diese das zirkadiane Verhalten der transgenen Tiere beeinflussen könnte. Die Durchführung folgenden Experiments sollte diese Fragestellung aufklären. ME2-überexprimierende Mäuse (n=9) und ihre Wildtyp-Geschwistertiere (n=11) wurden einzeln in Käfigen mit freiem Zugang zu einem Laufrad gehalten. Nach einer Gewöhnungsphase an den Versuchsraum und den Tag-Nacht-Rhythmus wurde mit der Aufnahmen der Daten begonnen. Die Anzahl der Laufradumdrehungen und damit die Aktivität der Mäuse wurden automatisch gemessen.

Das Ergebnis der Untersuchungen im Licht-Dunkel-Rhythmus (LD; *light dark*) wurde als die sogenannten Aktogramme für einzelne ausgewählte Mäuse dargestellt (Abb. 29). Dabei zeigten die transgenen Tiere und deren Wildtyp-Geschwistertiere im Durchschnitt eine ähnliche Aktivität während der Dunkelphase. Eine Beurteilung der zirkadianen Aktivität im LD ist aufgrund von sogenannten Maskierungseffekten nicht möglich. Die motorische Aktivität der beiden Versuchsgruppen (summierte Laufradumdrehungen innerhalb von 14 Tagen in LD) war ähnlich ($p=0,548$; Abb. 30).

Zur Untersuchung der Schnelligkeit, mit der die transgenen Tiere ihre Aktivität an einen neuen Licht-Dunkel-Rhythmus anpassen können, wurde ein sog. *jet lag*-Experiment durchgeführt. Die Versuchstiere wurden zunächst in einem konstanten Licht-Dunkel-Rhythmus gehalten (Abb. 31). Am 18. Tag wurde die Licht-Phase um 8 Stunden verkürzt, so dass das Licht 8 Stunden früher als gewohnt ausging. Danach folgten weitere Zyklen von 12 Stunden Dunkelheit und 12 Stunden Licht. ME2-überexprimierende Mäuse und ihre Wildtyp-Geschwistertiere zeigten eine ähnliche Reaktion auf die Phasenverschiebung mit einer Anpassung der Aktivität an den neuen Rhythmus innerhalb von maximal 6 Tagen.

Um eine zirkadiane Aktivität zu beurteilen, wurden die Mutanten und Kontrolltiere einer konstanten Dunkelheit (DD; *dark dark*) ausgesetzt (Abb. 31). Dadurch, dass das Licht keinen Maskierungseffekt auf die Tiere ausübte, war es möglich, die Länge der zirkadianen Phase (τ) auszurechnen. Die transgene Tiere wiesen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen keine Unterschiede in τ auf.

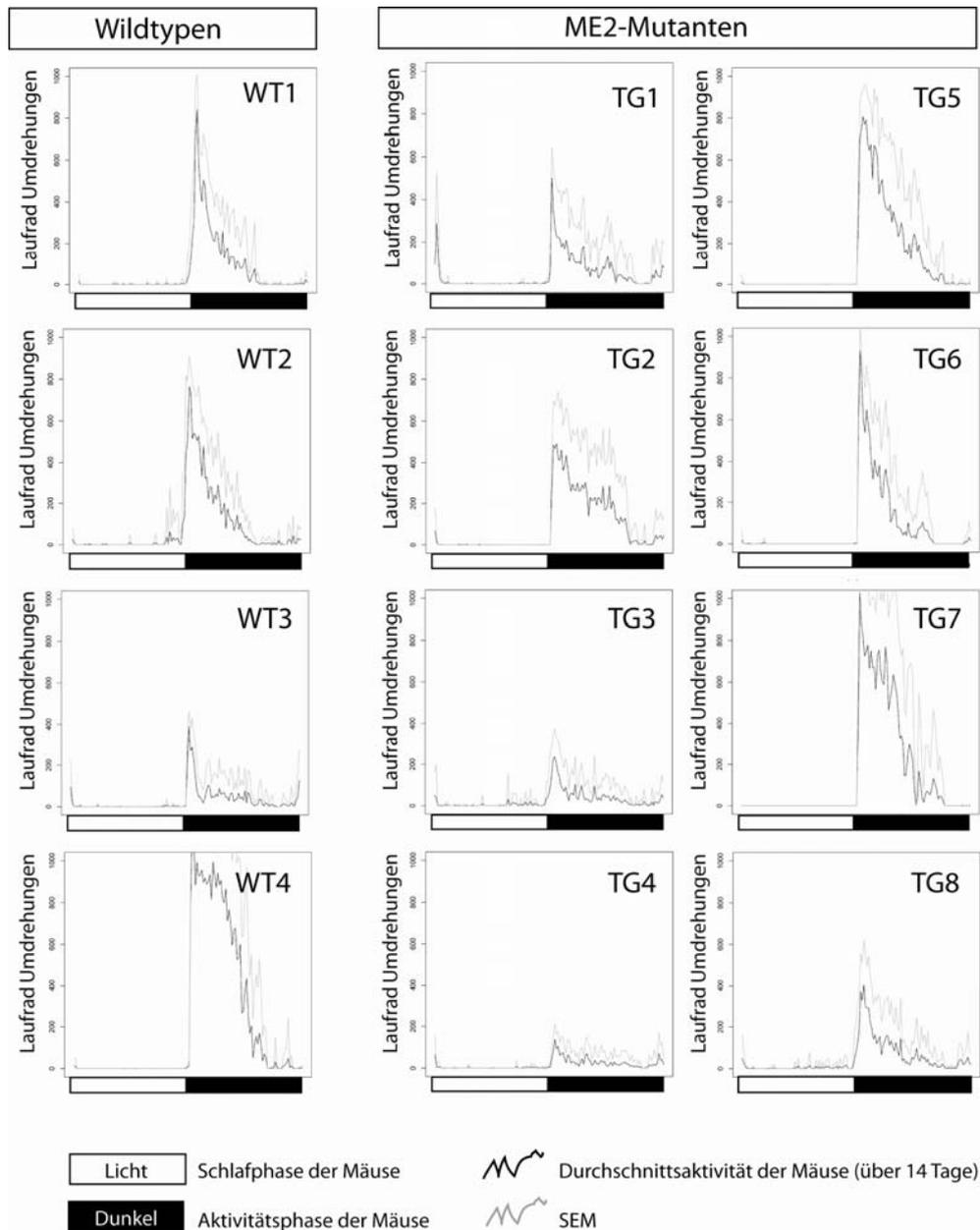


Abb. 29 Analyse der zirkadianen Aktivität der ME2-überexprimierenden Mäuse im Licht-Dunkel-Rhythmus

Die Aktivität der Versuchstiere wurde anhand von Laufradumdrehungen über 14 Tage gemessen. In den Aktogrammen wurde die durchschnittliche individuelle Aktivität für die Wildtyp-Kontrollen (n=4; WT1-WT4) und für die transgenen Mäuse (n=8; TG1-TG8) dargestellt. Die Durchschnittsaktivität in der dunklen Phase variierte zwischen einzelnen Mäusen. Es ließen sich keine ausgeprägten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen erkennen. Werte + S.E.M.

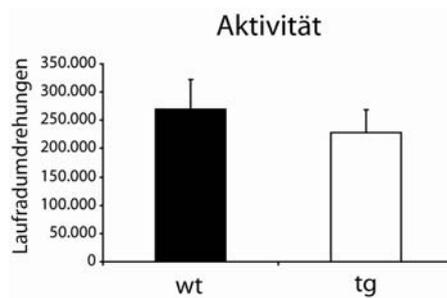


Abb. 30 Analyse der zirkadianen Aktivität der ME2-überexprimierenden Mäuse im Licht-Dunkel-Rhythmus

Die summierten Laufradumdrehungen spiegeln die gesamte Aktivität der Versuchstiere während 14 Tage wieder.

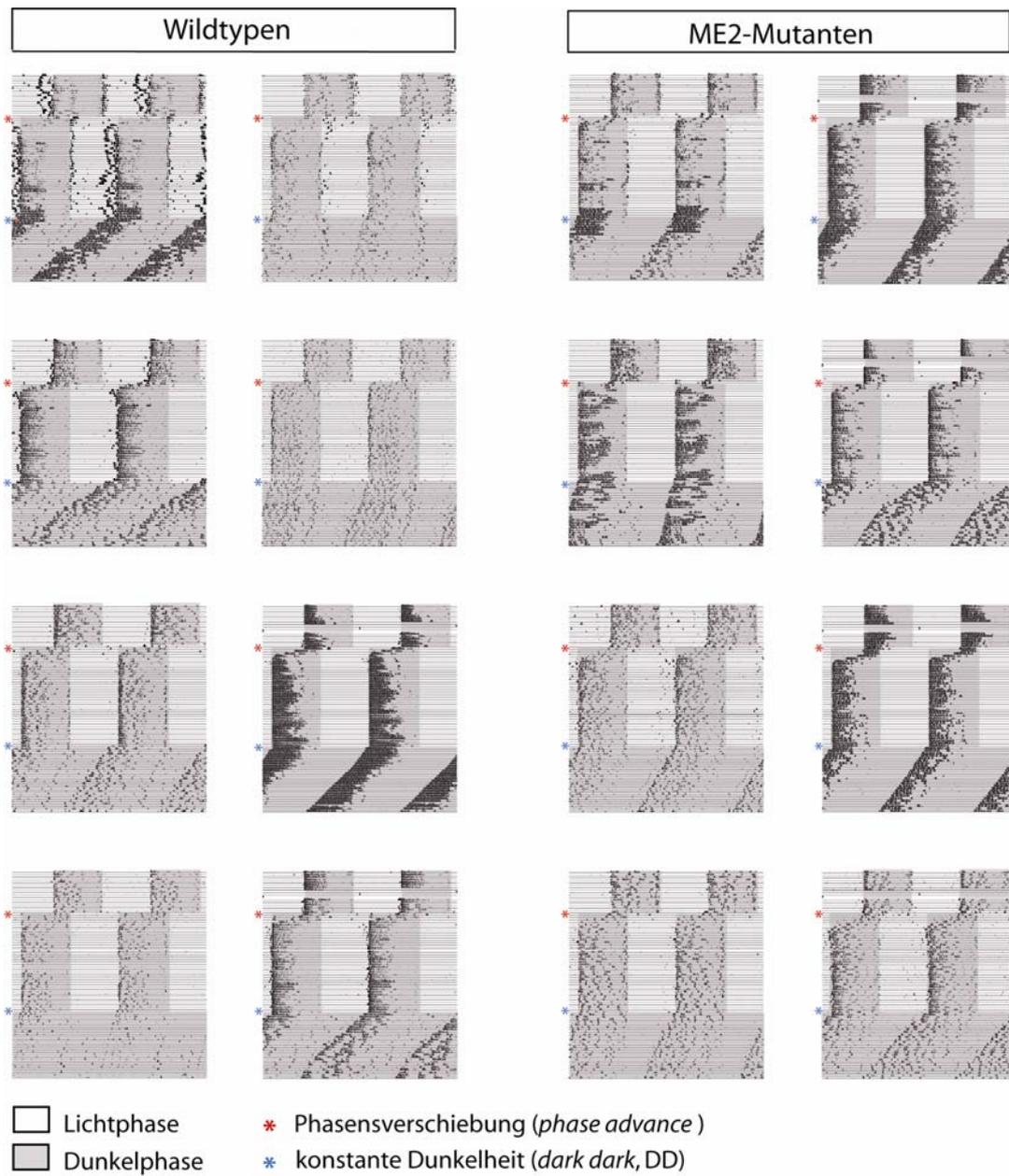


Abb. 31 Analyse der zirkadianen Aktivität der ME2-überexprimierenden Mäusen in konstanter Dunkelheit

A) Die ME2-überexprimierenden Mäuse und ihre Wildtyp-Geschwistertiere wurden zunächst in einem stabilen Licht-Dunkel-Rhythmus gehalten (LD; 12 h Licht, 12 h Dunkelheit). Der Tag der Phaseverschiebung von 8 h (*phase advance*) wurde mit einem roten Sternchen markiert. Nach 40 Tagen wurden die Tiere einer konstanten Dunkelheit ausgesetzt (DD, *dark dark*; mit einem blauen Sternchen markiert).

5 DISKUSSION

5.1 Generierung der dominant negativen ME2-exprimierenden Mäuse

In dieser Studie wurde die Funktion des basischen Helix-Loop-Helix- (bHLH) Transkriptionsfaktors ME2 in Lern- und Gedächtnisprozessen des adulten zentralen Nervensystems (ZNS) analysiert. In der Literatur gab es Hinweise, dass ME2 mit den Proteinen der NeuroD-Familie interagieren kann. So wurde bereits *in vitro* eine Interaktion von ME2 mit NDRF in P19-Zellen nachgewiesen ([Ravanpay und Olson, 2008](#)). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine Interaktion *in vivo* demonstriert werden, und zwar zwischen ME2 und NeuroD (Abb. 2 A) sowie zwischen ME2 und NDRF (Abb. 2 B). Die Expression dieser Faktoren bleibt auch in postmitotischen Neuronen lernrelevanter Strukturen, dem Hippokampus und dem Kortex, erhalten ([Bartholomea und Nave, 1994](#); [Schwab et al., 1998](#)). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass ME2 und Proteine der NeuroD-Familie an der Plastizität des adulten Gehirns beteiligt sind. Basierend auf Resultaten von *in vivo*-Interaktionen wurde ein dominant negatives ME2 (dnME2)-Konstrukt kloniert, um Interaktionen zwischen ME2 und NeuroD, NDRF sowie NEX im ZNS eines Mausmodells *in vivo* simultan zu inhibieren. Eine Expression des dnME2 in den lernrelevanten Strukturen transgener Mäuse sollte die funktionelle Redundanz der drei NeuroD-Familienmitglieder ([Schwab et al., 1998](#)) aufheben und so deren Funktion im adulten Gehirn parallel nach dem loss of function-Prinzip beeinträchtigen. Schon eine Missens-Punktmutation in der basischen Domäne des ME2 löst eine schwere mentale Retardierung beim Menschen, das Pitt-Hopkins-Syndrom, aus ([Zweier et al., 2007](#); [Amiel et al., 2007](#)). Um potentielle Entwicklungsstörungen zu vermeiden und die Transgenexpression zeitlich (bei den adulten Tieren) und örtlich (neuronspezifisch entsprechend der CamKII α -Expressionsdomäne) zu kontrollieren, wurde das TetO-System verwendet ([Gossen und Bujard, 1992](#); [Mayford et al., 1996](#); [Mansuy et al., 1998](#)). Zunächst entsprach das Expressionsmuster des Transgens genau den Erwartungen (Abb. 6 B bis F). Es kam aber zu einem graduellen Verlust der Transgenexpression (Abb. 7 und 9 B). Über die bestehende Problematik bei der Anwendung des TetO-Systems wurde in der Literatur bereits mehrfach berichtet ([Furth et al., 1994](#); [Robertson et al., 2002](#); [Chevalier-Mariette et al., 2003](#)). Die mosaikartige Transgenexpressionsdomäne und deren Effizienz sind von der Lokalisation der integrierten DNA im Genom abhängig und möglicherweise auf die Methylierung des Transgens in sogenannten CpG-Inseln zurückzuführen ([Dobie et al., 1997](#)). Solche Effekte sind ausgeprägter bei der Anwendung von kleineren Konstrukten ohne weitreichende Kontrollelemente und betreffen häufig bakterielle ORFs (*open reading frame*; [Okabe et al., 1997](#)). Dies könnte eine Ursache für das *Silencing* der dnME2-Expression sein. Das dnME2 umfasste nur die HLH-kodierende Sequenz und war zwar mausspezifisch, wurde aber von einem Tet-Operator aus *E.coli* kontrolliert. [Robertson et al. \(2002\)](#) beobachteten eine Korrelation zwischen der Transgenexpression und den verwendeten Mausstämmen. Diese

Gruppe zeigte, dass eine Rückkreuzung des Mausstammes, in dem es zum Verlust der Transgenexpression gekommen war, auf die verschiedenen genetische Hintergründe zu einem Wiedererstarben der Expression des Transgens führte. Anhand dieser Beobachtung wurden in dieser Studie die Reporter-transgenen C57Bl/6N-Tiere mit Mäusen der Stämme FVB/N und CBA/Ca verpaart. Anhand von Western-Blot- und β -Galaktosidase-Reporter-Gen-Aktivitäts-Analyse konnte allerdings in den auf genomischer Ebene doppelt transgenen Tieren der N2-Generation der Rückkreuzung von C57Bl/6N auf CBA/Ca nur selten eine Expression des dnME2 nachgewiesen werden (Abb. 11 B), im Fall der C57Bl/6N x FVB/N-Hybriden sogar gar nicht.

Die dnME2-exprimierenden Mäuse des C57Bl/6N-Stammes wurden einem Angstkonditionierungs-Test zur Untersuchung des kontextuellen und des Ton-Gedächtnisses unterzogen. Trotz der niedrigen Zahl an Mutanten ($n=6$), bei denen post mortem eine Expression des dnME2 nachgewiesen werden konnte (Abb. 9 B), ergab sich im Test für das kontextuelle Gedächtnis ein deutlicher Trend. dnME2-Mäuse wiesen im Kontext einen stark reduzierten *Freezing*-Grad im Vergleich zu den Kontrolltieren auf, was auf eine Verminderung des kontextuellen Gedächtnisses bei Mutanten hindeutete (Abb. 9 C). Auf Grund der vorhandenen Literatur, entsprach das Ergebnis den Erwartungen. Die Angstkonditionierungs-Tests mit NDRF^{+/-}-Mäusen ließen ausgeprägte Defizite im kontextuellen sowie im Ton-Gedächtnis der Mutanten erkennen ([Lin et al., 2005](#)). Die NEX-null-Mutanten zeigten eine Verlangsamung des räumlichen Lernens im Water Maze-Test und Defekte im kontextuellen Gedächtnis ([Ucar, 2007](#)). [Ravanpay und Olson \(2008\)](#) schlugen eine Redundanz der E-Proteine während der Entwicklung des ZNS vor. Der Lernphänotyp der dnME2-exprimierenden Mäuse schließt das Vorhandensein eines möglichen kompensatorischen Mechanismus in adulten Gehirnen aus.

Die Tatsache, dass die dnME2-exprimierenden Mäuse Lerndefizite aufwiesen, sollte jedoch mit Vorsicht betrachtet werden. Die Anzahl transgenexprimierender Mutanten war für eine verlässliche statistische Analyse zu niedrig, so dass alle Interpretationen mit äußerster Vorsicht zu behandeln sind. Die deutliche Tendenz der wenigen dnME2-exprimierenden Tiere, weniger Freezings als die Kontroll-Tiere aufzuweisen, wurde dennoch als Hinweis interpretiert, dass das *loss of function*-Prinzip grundsätzlich funktioniert haben könnte. Diese Beobachtungen führten letztendlich auch zu dem Versuch die Transgenexpression durch sehr zeitaufwendige Rückkreuzung auf einen anderen genetischen Hintergrund wieder zu erhöhen. Zukünftig wäre es daher sinnvoll, zu einer regulierbaren dnME2-Expression in adulten Gehirnen ein anderes vermutlich stabileres System konditioneller Transgenexpression anzuwenden. Hier scheint das Cre-loxP-System geeignet zu sein ([Gu et al., 1994](#)). Cre ist eine Rekombinase aus Bakteriophagen, die die Zielsequenzen von loxP in der DNA erkennt. Cre besitzt die Fähigkeit, je nach Lokalisierung und Orientierung der loxP-Sequenzen im endogenen Locus oder im Transgen, die Genexpression zu aktivieren oder zu unterdrücken

([Kilby et al., 1993](#)). Eine weitverbreitete Methode zur regulierbaren Transgenexpression beruht auf der Verwendung des CreER und einen loxP-Reporter. CreER ist ein Fusionsprodukt aus Cre und einer modifizierten Östrogen-bindenden Domäne des Östrogen-Rezeptors (ER). Dieses Fusionsprotein ist normalerweise in dem Zytoplasma lokalisiert. Unter Applizieren des Tamoxifens, einen Östrogen-Analogon, kommt zu einer Translokalisierung des CreER in den Nukleus, was folglich zur Aktivierung der Rekombination führt ([Feil et al., 1996](#)). Als ein Cre-expressionskontrollierenden Element könnte, ähnlich wie in vorliegender Studie, der neuronspezifische CamKII α -Promotor verwendet werden ([Tsien et al., 1996a](#); [Mayford et al., 1996](#)), der ab der ersten bis zweiten postnatalen Woche besonders stark im Hippokampus aktiv wird ([Kojima et al., 1997](#)). Eine entsprechende Dosierung von Tamoxifen würde erlauben, die dnME2-Expression zeitlich (adult) zu steuern. Eine CamKII α -CreER-dnME2-Mausmutante könnte ein wertvolles Werkzeug zur Klärung der Rolle von ME2 und dessen Interaktionspartnern aus der NeuroD-Familie in Lern- und Gedächtnisprozessen darstellen.

5.2 Überexpression des ME2 im Vorderhirn führt zu ausgeprägten Defiziten in kontextuellem und Ton-Gedächtnis

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Mausmutante generiert, die unter der Kontrolle des Thy1.2-Promoters ([Morris, 1985](#)) den bHLH-Transkriptionsfaktor ME2 überexprimiert. Die Thy1.2-Promotoraktivität weist eine Variabilität bezüglich der zellulären Spezifität auf ([Campsall et al., 2002](#)). Es konnte demonstriert werden, dass die transgene Überexpression des ME2 in Mutantmäusen prominent und neuronenspezifisch im lernassozierten Hippokampus zustande kommt (Abb. 13 C).

Die Wahl des Mausstammes ist ein wichtiger Faktor für Verhaltensanalysen ([Crawley, 2000](#)). Die für das Transgen positiven *founder*-Tiere gehörten zum FVB/N-Mausstamm. Dieser Stamm ist für Verhaltensanalysen, die auf Kontext-abhängigen Lernprozessen basieren (wie die hier verwendeten *Water Maze*- oder Angstkonditionierungs-Tests), aufgrund von visuellen Beeinträchtigungen und Missbildungen im Hippokampus ungeeignet ([Upchurch und Wehner, 1989](#); [Owen et al., 1997](#); [Crawley et al., 1997](#)). Deshalb wurden alle Verhaltenstests mit Nachkommen der F1-Generation aus der Kreuzung des C57Bl/6N- mit dem FVB/N-Stamm durchgeführt (F1-Hybriden). Alle resultierenden F1-Hybride weisen den gleichen genetischen Hintergrund auf und sind heterozygotisch für die meisten Loci. Sie sind auch wenig anfällig bezüglich des Umgebungseinflusses und deshalb für Verhaltensanalysen ideal geeignet ([Wolfer und Lipp, 2000](#)).

In Standard-Verhaltenstests zeigten die ME2-überexprimierenden Tiere keine Beeinträchtigung bezüglich der Aktivität, des Angstverhaltens, der Neugierde oder der Motorik im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen (Abb. 17 und 18). Dies lieferte einen Beleg dafür, dass eine Überexpression des ME2 das normale Verhalten der Tiere nicht beeinflusste

und war eine Voraussetzung für die folgenden Untersuchungen der Lernfähigkeiten transgener Tiere. Die ME2-überexprimierenden Mäuse wurden einer verhaltensbiologischen Charakterisierung mit Blick auf hippocampusassoziierte Lern- und Gedächtnisprozesse unterzogen. Zur Untersuchung von Navigationsfähigkeit und räumlichem Gedächtnis wurde der *Water Maze*-Test verwendet ([Morris, 1981](#); [Morris et al., 1984](#)). Die Vorbedingung für diesen Test, nämlich das Sehvermögen, war bei den Mutanten unverändert (Abb. 19 I). Die ME2-überexprimierenden Mäuse waren in der Lage, die gestellte Aufgabe zu erlernen und wiesen eine signifikante Reduktion der Suchzeiten der Plattform im Verlauf des Tests auf (Abb. 19 A und D). Unter Voraussetzung eines einfachen Funktionsprinzips konnte anhand dieses *gain of function*-Experiments erwartet werden, dass eine Überexpression des ME2 zu einer Verbesserung der Lern- und Gedächtnisprozesse führt. Die Mutanten benötigten aber an jedem Testtag eine durchschnittlich längere Zeit, die versteckte Plattform zu finden, als die Wildtypen. Dies konnte nicht auf die Schwimmgeschwindigkeit der Tiere zurückgeführt werden, da sie in beiden Versuchsgruppen nahezu gleich war (Abb. 20 H). Der Unterschied in den Suchlatenzen war zwar nicht signifikant, deutete aber auf ein verlangsamtes Lernen bei transgenen Tieren hin. Es wurde erneut der *Water Maze*-Test mit einer neuen Kohorte transgener Tiere und entsprechender Wildtyp-Geschwister durchgeföhrt. Die Anwendung eines modifizierten Protokolls mit erhöhtem Schwierigkeitsgrad (Abschaffung des zweitägigen Sichtbare-Plattform-Tests sowie Verkürzung der Zeit, in der die Tiere nach Erreichen der Plattform die Umgebung erkundeten) sollte ermöglichen, eine höhere Signifikanz herauszuarbeiten (K-P. Giese, persönliche Mitteilung). Anders als erwartet, war die Lernkurve der Mutanten während des *Initial Learning* sogar fast deckungsgleich mit der der Kontrolltiere (Abb. 20 A). Zu mehr ausgeprägten Unterschieden kam es im *Reversal Training* (Abb. 20 D), während dessen den Versuchstieren die Flexibilität abverlangt wurde, eine neue Lokalisierung der versteckten Plattform zu erlernen. Die Differenz zwischen beiden Genotypen war aber wiederum, auch wenn der zweite Tag besonders hervorstach, nicht signifikant. Die ME2-überexprimierenden Tiere konnten korrekt eine neue Position der Plattform identifizieren, allerdings brauchten sie an jedem Tag etwas mehr Zeit als die Wildtyp-Kontrollen. Das könnte auf ein leicht beeinträchtigt bzw. verlangsamtes räumliches Lernen hindeuten. Die Hauptaussagekraft des *Water Maze*-Tests nach Morris liegt in der Ausführungsleistung der Versuchstiere im *Probe Trial* ([Crawley, 2000](#)). Die beiden Genotypen zeigten während der *Probe Trials* nahezu die gleiche Präferenz bezüglich des Zielquadranten (Abb. 19 C, F und 20 C, F). Diese Tatsache lieferte einen Beleg dafür, dass die Navigationsfähigkeit der transgenen Tiere unverändert war.

Zur Beurteilung des kontextuellen sowie des Ton-Gedächtnisses wurden ME2-überexprimierende Mäuse einem Angstkonditionierungs-Test ([Fanselow, 1980](#)) nach einem Standard-Protokoll mit zwei Ton-Fußschock-Paarungen ausgesetzt. Die transgenen Tiere zeigten signifikant weniger *Freezings* (Angststarre) im kontextuellen sowie im tonvermittelten Test (Abb. 21 B). Da die ME2-überexprimierenden Mäuse eine den

Wildtypen ähnliche Schmerzempfindlichkeit aufwiesen (Abb. 18 A), empfanden sie höchstwahrscheinlich den elektrischen Fußschock während der Konditionierung in analoger Stärke. Daher deutet ein im Vergleich zu den Kontrolltieren vermindertes *Freezing*-Niveau auf Defizite im kontextuellen sowie im Ton-Gedächtnis bei Mutanten hin (Abb. 21 B). Dies ließ den Rückschluss zu, dass eine Überexpression des ME2 im Hippokampus zu einer Beeinträchtigung des kontextuellen Lernens und/oder des Gedächtnisses führt.

Weiterhin stellte sich die Frage, ob beim Applizieren mehrerer konditionierter Stimuli eine Angleichung der *Freezing*-Antwort der ME2-überexprimierenden Mäuse an die der Wildtyp-Kontrollen erfolgen würde. Im Angstkonditionierungs-Test mit fünf Ton-Fußschock-Paarungen wiesen die transgene Mäuse im Kontext eine annähernd gleiche Zahl an Freezings auf wie die Kontrollen (Abb. 21 D). Durch das Überreizen wurde der sog. Deckel-Effekt (*ceiling effect*) beobachtet, der zum Maskieren des Phänotyps der Mutanten führte. Der Ton-Gedächtnis-Test demonstrierte einen anderen Befund. Das Ton-Gedächtnis wird vom Kortex und der Amygdala vermittelt und ist vom Hippokampus unabhängig ([Sanders et al., 2003](#)). Aufgrund der mosaikartigen Aktivität des Thy1.2-Promotors ([Morris, 1985](#); [Campsall et al., 2002](#)) konnte die Präsenz des ME2-Transgens in der Amygdala nicht ausgeschlossen werden. Trotz eines sehr intensiven Lernverfahrens wiesen die transgene Tiere im Ton-Test signifikant weniger Freezings auf als die Wildtyp-Kontrollen. Dies ließ vermuten, dass eine Überexpression von ME2 auch in der Amygdala zustande kam und die starken Lerndefizite auslöste.

Einige Verhaltensphänotypen der Mutanten kommen abhängig vom verwendeten Mausstamm zum Ausdruck ([Crawley, 2000](#) und [2008](#); [Wolfer und Lipp, 2000](#)). Dies ließ sich durch verhaltensbiologische, aber auch biochemische ([Matsuyama et al., 1997](#)), pharmakologische ([Royle et al., 1999](#)), physiologische ([Matsuyama et al., 1997](#); [Bampton et al., 1999](#)) oder anatomische, zwischen den einzelnen Inzucht-Stämmen vorkommende Unterschiede erklären. Zur Überprüfung, ob der Lernphänotyp der ME2-überexprimierenden Mäuse stammspezifisch ist, wurden die F1-Hybriden des C57Bl/6N- und FVB/N-Stammes viermal auf C57Bl/6N-Mäuse zurückgekreuzt und die resultierenden Nachkommen (als N5 bezeichnet, [Markel et al., 1997](#)) dem Angstkonditionierungs-Test mit zwei Fußschock-Ton-Paarungen unterzogen. Tiere der N5-Generation weisen untereinander eine Übereinstimmung des Genoms auf, die bei 96,9% liegt ([Markel et al., 1997](#)). Die ME2-überexprimierenden Tiere der N5-Generation zeigten im Kontext sowie im Ton-Gedächtnis signifikant weniger *Freezings* als ihre Wildtyp-Geschwistertiere (Abb. 21 E). Die Beeinträchtigung der N5-Generation der ME2-überexprimierenden Mäuse im kontextuellen und in Ton-Gedächtnis lieferte einen Anhalt dafür, dass der Lernphänotyp der Mutanten stamunabhängig ist.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass das transgene ME2 im Genom in einen Locus integriert wurde, der ein lernassoziiertes Gen umfasst. Die Wahrscheinlichkeit, dass dem tatsächlich so ist, ist jedoch äußerst gering.

Die ME2-überexprimierenden Tiere werden weiter auf den C57Bl/6N-Stamm rückgekreuzt mit der Absicht, die Auswirkung der ME2-Überexpression auch auf dem nahezu reinen C57Bl/6N-Hintergrund zu untersuchen. Weitere Analysen sollten mit Mäusen der N10-Generation, die untereinander eine Genomähnlichkeit von 99,9% aufweisen ([Green, 1995](#); [Silver, 1995](#)), durchgeführt werden.

Es stellte sich die Frage, ob eine schlechtere Leistung der transgenen Tiere im Angstkonditionierungs-Test auf eine verminderte Lernfähigkeit (Akquisition) oder auf Gedächtnis-Defizite zurückzuführen ist. Im *Water Maze*-Test verlief die Lernkurve der Mutanten während des *Reversal Trainings*, als die Tiere die ursprüngliche Lokalisierung der Plattform „vergessen“ und schnell eine neue erlernen sollten, nahezu parallel zu der der Kontrolltiere (Abb. 19 D und 20 D). Dies könnte bedeuten, dass möglicherweise nicht das Gedächtnis der transgenen Tiere beeinträchtigt ist, sondern das Lernen *per se*. Es wäre denkbar, dass Mutanten in Angstkonditionierungs-Tests eher Lern- als Gedächtnisdefizite aufweisen. Um diese Hypothese aufzuklären, wären weitere Verhaltenstests erforderlich. Beispielsweise wäre hier eine Untersuchung der Angst-Extinktion angebracht. Die Extinktion geschieht, wenn ein angstkonditioniertes Tier ohne einen aversiven Stimulus erneut dem Kontext exponiert wird, in dem vorher die Konditionierung stattfand. Sie beruht auf einem erneuten Lernen (*inhibitory learning*), welches das Angstgedächtnis nicht auslöscht aber inhibiert ([Pavlov, 1927](#); [Barad, 2005](#); [Barad et al., 2006](#)). Die Amygdala spielt für die Extinktion eine entscheidende Rolle ([Falls et al., 1992](#)). Die ME2-überexprimierenden Tiere wiesen starke Defizite im Ton-Gedächtnis auf (Abb. 23 B), selbst nach fünf Ton-Fußschock-Paarungen (Abb. 23 C), was auf eine Präsenz des Transgens in der Amygdala hindeutet. Eine Voraussetzung für die Durchführung dieses Tests wäre eine annähernde Antwort der zu untersuchenden Tiere auf den Kontext, in dem zuvor die Konditionierung stattfand. Im Angstkonditionierungs-Test nach einem Standardprotokoll (Abb. 23 B) wiesen die ME2-überexprimierenden Tiere eine stark verminderte *Freezing*-Antwort auf, was die Verwendung dieses Protokolls ausschließt. Das Applizieren von fünf konditionierten Stimuli verursachte im Kontext eine Angleichung der *Freezing*-Antwort der transgenen Mäuse an die der Wildtypen (Abb. 23 C). Daher sollte zur Untersuchung der Extinktion ein Angstkonditionierungs-Test mit fünf Ton-Fußschock-Paarungen in Betracht gezogen werden. Der Vergleich des Extinktions-Grades zwischen den ME2-überexprimierenden Mäusen und ihren Wildtyp-Geschwistertieren könnte die Fragestellung klären, ob die stark verminderte *Freezing*-Antwort der Mutanten auf eine verminderten Lernfähigkeit oder auf ein defizientes Gedächtnis zurückzuführen ist.

Eine Überexpression des ME2 in lernrelevanten Strukturen führte zu stark ausgeprägten und mausstammunabhängigen Defiziten im kontextuellen und im Ton-Gedächtnis. Diese Beeinträchtigung ist höchstwahrscheinlich auf die Funktionen des ME2 zurückzuführen. Die Verwendung des Thy1.2-Promotors als ein die Expression kontrollierendes Element

gewährleistete eine postnatale Expression des Transgens im Kortex und im Hippokampus (ab P2; Abb. 16 A und B), was das Entstehen von embryonalen Entwicklungsstörungen im ZNS verhinderte. Die Morphologie der Gehirne von Mutanten und Kontrolltieren wies unter besonderer Berücksichtigung von Kortex und Hippokampus keine Unterschiede auf (Abb. 17 und 18). Die Entwicklung des Kortex und des Hippokampus ist am P2 zwar sehr fortgeschritten, aber noch nicht vollständig. Beispielsweise findet am P2 im Hippokampus die Etablierung der Vorläuferzellen im Hilus und die Differenzierung der Körnerzellen in Gyrus Dentatus sowie die Entwicklung und Arborization von kommissuralen Fasern statt ([Súper und Soriano, 1994](#); [Li und Pleasure, 2005](#)). Aus diesem Grund könnten spätere Entwicklungsstörungen nicht ausgeschlossen werden. Wenn sie vorhanden wären, dann nur subtil, da sie keinen Einfluss auf das normale Verhalten der transgenen Tiere ausübten (Abb. 19 und 20).

5.3 Überexpression des ME2 dereguliert Expression anderer bHLH-Transkriptionsfaktoren

In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression des ME2 im Vorderhirn der transgenen Mäuse zu stark ausgeprägten Lerndefiziten sowohl im kontextuellen als auch im Ton-Gedächtnis führt. Informationen über mögliche Zielgene von ME2 sind in der Literatur nicht vorhanden. Die Fragestellung, ob eine Überexpression des ME2 *in vivo* die Expression anderer Gene beeinflusst, konnte mit einer Microarray- und qRT-PCR-Analyse beantwortet werden.

In den Hippokampi der transgenen Mäuse wurde eine 1,6-fache Hochregulierung des Per2-Expressionsniveaus beobachtet (Abb. 25). Eine Deregulierung des Per2, eines der für den zirkadianen Rhythmus verantwortlichen Hauptkomponenten ([Shearman et al., 1997](#); [Tei et al., 1997](#); [Vitaterna et al., 1999](#)), gab einen Hinweis auf die Vermutung, dass es möglicherweise ein Zusammenhang zwischen ME2 und bHLH-Transkriptionsfaktoren der NeuroD-Familie sowie einer zirkadianen Regulierung besteht. Aus diesem Grund wurde ein zirkadianes Profil der hippokampalen Genexpression einiger ausgesuchter Gene in Mutanten erstellt (Abb. 26). Die Per2-Expression lag in den transgenen Tieren durchschnittlich höher als in den Wildtyp-Kontrollen (Abb. 26 B). Per2 ist eine der Komponenten für die negative Rückkopplung in der molekularen Uhr. Seine Expression wird über nicht-kanonische E-Boxen (CACGTT) in der Promotorregion gesteuert. Dabei sind spezifische Heterodimere von BMAL1 mit CLOCK oder BMAL1 mit NPAS2, Mitglieder der bHLH-PAS-Transkriptionsfaktorenfamilie, notwendig ([Yoo et al., 2005](#)). Die zirkadiane Regulierung der Clock-verwandten Gene ist äußerst komplex und noch weitgehend ungeklärt ([Ueda et al., 2005](#)). Eine Hochregulierung der Per2-Expression in ME2-überexprimierenden Mäusen könnte auf eine Beteiligung des ME2 an der Expressionskontrolle des Per2 hindeuten. ME2 bindet an kanonische CANNTG-E-Boxen ([Chiamello et al., 1995b](#)). In den 5'-terminalen

regulatorischen Sequenzen des Per2-Gens sind aber keine dieser E-Boxen vorhanden ([Swanson et al., 1995](#)). Eine direkte Regulierung der Per2-Expression durch ME2 ist damit zwar nicht ausgeschlossen aber eher unwahrscheinlich. Vermutlich ist ME2 an der Hochregulierung der Per2-Expression, möglicherweise unter Beteiligung anderer bHLH-Transkriptionsfaktoren, über eine Dynamik mehrerer biologischer Prozesse beteiligt.

Es ist bekannt, dass manche bHLH-Transkriptionsfaktoren eine zirkadiane Expression aufweisen. Ein Beispiel dafür ist Hes1, ein transkriptioneller Repressor aus der HLH-Familie, der eine vorzeitige Ausdifferenzierung der neuronalen Vorläuferzellen inhibiert ([Ishibashi et al., 1995](#); [Ohtsuka et al., 2001](#)). Hes1 weist eine zirkadiane Expression in synchronisierten Zellen auf ([Hirata et al., 2002](#)). [Ueda und Mitarbeiter \(2002\)](#) zeigten, dass die Expression des dominant negativen Faktors Id2 in suprachiasmatischen Nuklei der Maus eine zirkadiane Regulierung aufweist. In dieser Arbeit durchgeführte quantitative Analysen der zirkadianen Genexpression zeigten ebenfalls eine zirkadiane Regulierung der Id2-Expression im Hippokampus (Abb. 26 C). [Neuman et al. \(1995\)](#) konnten nachweisen, dass eine Überexpression von ME2 den Id2-Promotor *in vitro* aktiviert. Id2 ist ein dominant negativer HLH-Transkriptionsfaktor und wird im Kortex und Hippokampus von adulten Mäusen, also ähnlich wie ME2, exprimiert ([Neuman et al., 1993](#)). Das durchschnittliche Expressionsniveau von Id2 war in den Mutanten erhöht (Abb. 26 C). Dies war konsistent mit den *in vitro*-Daten von [Neuman et al. \(1995\)](#). Id2 interagiert mit bHLH-Proteinen und beeinträchtigt ihre Funktionen ([Benezra et al., 1990](#)). [Ghil et al. \(2002\)](#) zeigten, dass das Id2 spezifisch eine Bindung von NeuroD an E-Boxen verhindert. Dies gab einen Hinweis dafür, dass ein erhöhtes Expressionsniveau des Id2 in den ME2-überexprimierenden Mäusen die Funktionen der NeuroD-Familie beeinträchtigen und somit eine Ursache für die Lerndefizite der Mausmutanten darstellen könnte. Eine veränderte Regulierung der NeuroD-Expression in transgenen Mäusen lieferte einen Beleg für diese Hypothese (Abb. 26 E). Bei den Wildtyp-Kontrollen übertraf das NeuroD-Expressionsniveau während der dunklen Phase deutlich die Id2-Expression (Abb. 27 A). In den transgenen Tieren dominierte das NeuroD-Expressionsniveau nicht mehr so stark über das Id2-Niveau (Abb. 27 B). Das Expressionsverhältnis von NeuroD zu Id2 war bei den ME2-überexprimierenden Mäusen während aller untersuchten Zeitpunkte kleiner als bei den Wildtyp-Kontrollen (Abb. 28). Dies liess vermuten, dass eine transgene ME2-Überexpression in lernrelevanten Gehirnstrukturen zu einer Störung des sensiblen Gleichgewichts der HLH-Transkriptionsfaktoren führt und folglich Lern- und Gedächtnisprozesse beeinträchtigt.

Die Expression von Proteinen der NeuroD-Familie wurde im Kontext der zirkadianen Regulierung noch nie ausführlich beschrieben. [Muñoz und Mitarbeiter \(2007\)](#) konnten nachweisen, dass die NeuroD-Expression auf der mRNA-Ebene über Tag und Nacht in der Epiphyse, dem Cerebellum und der Retina von Ratten konstant verläuft. Die vorliegende

Arbeit liefert ein entgegengesetztes Ergebnis. Die NeuroD-Expression zeigte eine leichte zirkadiane Modulation, wobei die tiefsten Werte am Beginn der Lichtphase (ZT0) gemessen wurden. Genau zu diesem Zeitpunkt erreichte das Expressionsniveau des dominant negativen Faktors Id2 in beiden Genotypen ihr Maximum (Abb. 26 C). Die Expression von NeuroD und Id2 verhielt sich in beiden Versuchsgruppen somit nahezu antizyklisch zueinander. Dies betont einen möglichen Zusammenhang zwischen den Expressionsniveaus dieser Faktoren.

In der vorliegenden Studie konnte zum ersten Mal eine zirkadiane Regulierung der bHLH-Transkriptionsfaktoren der NeuroD-Familie demonstriert werden. NeuroD und NEX wiesen einen nur leicht modulierten Expressionsverlauf auf (Abb. 26 E und F). Die Expression des NDRF dagegen zeigte sich als zirkadian sehr stark reguliert (Abb. 26 G). Diese Erkenntnis liefert einen Hinweis für einen Zusammenhang zwischen zirkadianen und kognitiven Vorgängen. NDRF spielt eine wichtige Rolle bei Lern- und Gedächtnisprozessen. Heterozygote NDRF-Mäuse ließen ausgeprägte Defizite im kontextuellen sowie im Ton-Gedächtnis erkennen ([Lin et al., 2005](#)). Ein anderes lernrelevantes Gen, das eine zirkadiane Regulierung aufweist, ist BDNF (*brain derived neurotropic factor*; [Berchtold et al., 1999](#); [Liang et al., 1998](#)). Der Verlust einer Kopie des BDNF-Gens führt zu Defiziten im kontextuellen Gedächtnis ([Liu et al., 2004](#)). BDNF fördert ein Axonwachstum und induziert eine Synapsenbildung im Hippokampus ([Lowenstein und Arsenault, 1996](#)) sowie eine Langzeitpotentierung (*long time potentiation*; [Poo, 2001](#)). Folglich spielt das BDNF eine wichtige Rolle bei der synaptischen Plastizität. Eine Analyse des BDNF-Expressionsniveaus in lerndefizienten ME2-Mutanten ließ aber kaum Änderungen im Vergleich zu Kontrolltieren erkennen (Abb. 26 D).

Die Existenz einer Korrelation zwischen einem zirkadianen Rhythmus und der Konsolidierung des Gedächtnisses wurde mehrmals mit verhaltensbiologischen Studien belegt. Ein sehr aussagekräftiger Beweis für einen Zusammenhang zwischen kognitiven Prozessen und einer zirkadianen Oszillation wurde erst kürzlich von [Eckel-Mahan und Mitarbeitern \(2008\)](#) geliefert. Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass ERK (eine Isoform von MAPK, *mitogen-activated protein kinase*) eine zirkadiane Oszillation der Expression in definierten Subregionen des Hippokampus aufweist. ERK ist eine Komponente der cAMP/ERK/CREB-Signalkaskade, die für die Bildung des Langzeitgedächtnisses von entscheidender Bedeutung ist.

Eine Verbindung zwischen cAMP-Signalkaskaden und neuronspezifischen bHLH-Transkriptionsfaktoren wurde bereits beschrieben. [Uittenbogaard et al. \(2007\)](#) zeigten, dass die Expression von NEX von zwei Promotoren, NEX P1 und NEX P2, die in separaten, nicht kodierenden Exonen liegen, kontrolliert wird. NEX P1 ist überwiegend durch CRE-, NEX P2 durch C/EBP-Bindungssequenzen reguliert. Es ist daher möglich, dass die zirkadiane Modulation der NEX-Expression von ERK-Signalkaskaden vermittelt wird. Dies wird von der folgenden Beobachtung untermauert: Die Expression von einigen Komponenten der

cAMP/ERK/CREB-Signalkaskade, von c-fos, jun und prkar2b, ist in der Subregion CA3 in Hippokampi von NEX-null-Mutantmäusen beeinträchtigt (Ucar *et al.*, in Vorbereitung). Es wäre vorstellbar, dass ein cAMP/ERK/CREB-Signalkaskaden-abhängiger Mechanismus die zirkadiane Expression von Proteinen der NeuroD-Familie sowie des ME2 kontrolliert.

5.4 Schlussbemerkungen

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Rückschlüsse auf die Funktion des bHLH-Transkriptionsfaktors ME2 im adulten ZNS gezogen werden. Erstmals konnte gezeigt werden, dass ME2 mit Proteinen der NeuroD-Familie, NeuroD und NDRF, *in vivo* interagiert. Aufgrund dieser Resultate wurde eine Mausmutante generiert, die neuronspezifisch im Vorderhirn ein dominant negativ wirkendes ME2 (dnME2) exprimiert und somit Funktionen von Proteinen der NeuroD-Familie in adulten Gehirnen verhindert. Die Lerntests ergaben, trotz der niedrigen Gesamtzahl an transgenen Tieren, einen Anhaltspunkt dafür, dass eine Beeinträchtigung der Funktionen von Proteinen der NeuroD-Familie in den adulten Tieren zu Defiziten in kognitiven Prozessen führt. Der Lernphänotyp der dnME2-exprimierenden Mäuse könnte das Vorhandensein eines möglichen kompensatorischen Mechanismus in adulten Gehirnen ausschließen.

Eine postnatale Überexpression des ME2 in Neuronen von lernrelevanten Gehirnstrukturen löste starke Defizite in Lern- und Gedächtnisprozessen der transgenen Mäuse aus. Die allgemeine Morphologie des ZNS wurde dabei nicht beeinträchtigt. Die transgenen Tiere wiesen eine erhöhte Expression des dominant negativen Faktors Id2 auf, worin vermutlich die Ursache für ein vermindertes Niveau der NeuroD-Expression zu erkennen ist. Eine Störung des sensiblen Gleichgewichts unter den HLH-Transkriptionsfaktoren in lernrelevanten Gehirnstrukturen, das sich erstaunlicherweise als tageszeitabhängig reguliert zeigte, könnte eine Erklärung für Defizite in Lern- und Gedächtnisprozessen transgener Tiere darstellen. Mit dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass die gleichen Faktoren, die während der embryonalen Entwicklung eine Ausbildung und Etablierung der Neuronennetze kontrollieren, auch an der adulten Plastizität beteiligt sind.

Eine Deregulierung der Schlüsselkomponenten der molekularen Uhr in transgenen Tieren ließ eine Rolle des ME2 in verschiedenen zellulären Prozessen vermuten. Es ist nicht auszuschließen, dass ME2 ein zentrales Bindeglied zwischen kognitiven und zirkadianen Prozessen darstellt.

6 MATERIAL UND METHODEN

6.1 Material

6.1.1 Eukaryontische Zelllinien

COS1 Tumorzellen aus der Niere der afrikanischen grünen Meerkatze, transformiert mit einem replikations-defizienten SV40 Virus, (*CV-1 in Origin*, mit SV40 transformiert)
 HEK-293 menschliche embryonale Nierenzellen, Human Embryonic Kidney
 PC12 Phäochromozytomzellen, Tumorzellen aus dem Nebennierenmark der Ratte
 SH-S5Y5 humane Neuroblastom-Zellen

6.1.2 Bakterienstämme

Für die Experimente wurden die folgenden Bakterienstämme verwendet:

E. coli DH5 α Invitrogen, Karlsruhe
 E. coli DH10B Invitrogen, Karlsruhe
 E. coli DB3.1 Invitrogen, Karlsruhe
 E. coli XL1-blue Stratagene, La Jolla, USA

6.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien, die zu einer üblichen Standardlaboraustattung gehören, wurden hier nicht aufgelistet und wurden bei den folgenden Firmen bestellt: Amersham Biosciences (Freiburg), Becton Dickinson Falcon (Heidelberg), BioRad (München), Carl Roth (Karlsruhe), Eppendorf (Hamburg), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Hannover), Roche (Indianapolis, USA), Serva (Heidelberg), Sigma (Taufkirchen), VWR (Darmstadt).

Biozym, Seakem LE Agarose
 Ampicillin, Roche
 ATP, PJK
 BSA, Sigma-Aldrich
 Coelenteracin, PJK
 Co-Enzym A, PJK
 Chloramphenikol, Sigma-Aldrich
 Chloroform, Sigma-Aldrich
 DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindol), Roche
 DNA-Größenmarker (100 bp, 1 kb), Fermentas, St. Leon-Rot
 Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (DMEM), Gibco
 DTT, PJK
 EDTA, Sigma-Aldrich
 Einbettmedium (Aqua Poly Mount), Polyscience Ltd.
 Ethidiumbromid, Sigma-Aldrich; Fluka
 FCS (fötales Kälberserum, ES-Qualität), Gibco
 Ficoll (Typ 400), Sigma-Aldrich
 FK506, Calbiochem
 Gentamycin, Sigma-Aldrich
 Glycerin, Sigma-Aldrich
 Hoechst 33342 Molecular Probes, Leiden, NL
 HS (*Horse Serum*, Pferdeblutserum), Gibco
 4-Hydroxytamoxifen, Sigma-Aldrich
 Hygromycin B, Sigma-Aldrich
 Kanamycin, Sigma-Aldrich
 Kobaltchlorid, Sigma-Aldrich
 β -Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich
 D-Luciferin, PJK
 OPTI-MEM, Gibco
 Paraformaldehyd, Serva
 Penizillin/Streptavidin, Sigma-Aldrich

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1), Roth
 Poly-L-Lysin, Sigma-Aldrich
 Poly-D-Lysin, Sigma-Aldrich
 2-Propanol, VWR
 Trypsin, Gibco

6.1.4 Verbrauchsmaterialien

Die nicht gesondert aufgeführte Gebrauchswaren wurden von den folgenden Firmen bezogen: BD Falcon, Heidelberg; Eppendorf, Hamburg; Gilson, Middleton, WI (USA); Greiner-Nunc, Nürtingen; Menzel-Gläser, Braunschweig.

Cryo-Einfrierröhrchen Nunc, Wiesbaden
 ECL-Hyperfilme, Amersham Biosciences
 Elektroporationsküvetten (0,1 und 0,4 mm) Biorad, München
 Filter-Einheiten, 150 und 500 ml Nalgene, Rochester, NY, USA
 PVDF-Membran Hybond P (Western), Amersham Biosciences
 Objektträger, Deckgläschen, Menzel
 Zellkulturschalen, -platten, BD Falcon
 96-Loch-Platten für Real-Time-PCR, Applied Biosystems, Warrington, UK

6.1.5 Laborausstattung

Nur die von der Standardlaboraustattung abweichenden Geräte wurden im Folgenden aufgeführt:

Computer-Hardware:

DELL LATITUDE Dell, Frankfurt
 HP Color Laser Jet 4550 Hewlett Packard, Böblingen
 OKI C9200 OKI Systems, Düsseldorf

Computer-Software:

7500 Fast System SDS Software Applied Biosystems, Warrington, UK
 Acrobat Reader 7.0 Adobe, San Jose, CA
 Adobe Photoshop 7.0 Adobe, San Jose, CA
 Illustrator 10.0 Adobe, San Jose, CA
 InDesign 2.0 Adobe, San Jose, CA
 DNASTar 6.0 DNASTar, Inc., Madison, WI, USA
 Endnote 9.0 Thomson ResearchSoft, Carlsbad, CA, USA
 Firefox web browser 1.5.0.7 Mozilla Foundation, Mountain View, CA, USA
 GraphPad Prism 4 www.graphpad.com
 Microsoft Office X Microsoft, Redmond, WA, USA
 Openlab 3.1.7 Improvion, Lexington, MA, USA
 pDRAW32 1.1.91 www.acaclone.com
 RasMol v2.7 www.openrasmol.org
 Roche: Universal ProbeLibrary Assay Design Center
<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/adc.jsp>

Digitalkamera ProgRes C14 Jenoptik, Jena
 Durchflusszytometer (FACS-ARIA) Becton Dickinson, Heidelberg
 GenePulser Xcell Biorad, München
 Luminometer MicroLumatPlus LB 96 V Berthold Technologies, Bad Wildbad
 Mikroskope Leica, Solms
 Leica DM IRBE
 Leica DM RXA
 Sterilbank Heraeus, Hanau
 SDS-PAGE Gelelektrophorese und Western-Blot-Apparatur XCell-SureLock™ Invitrogen, Karlsruhe
 Röntgen Film Entwickler KODAK XOMAT Kodak, Stuttgart

7500 Fast Real-Time PCR System Applied Biosystems, Warrington, UK
 Ultraschallgerät Bandelin Sonoplus Bandelin, Berlin
 UV-Illuminator Intas UV-Systeme, Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen

6.1.6 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

ECL Plus Western-Blot Detection Reagents Amersham Biosciences, Freiburg
 Perkin Elmer, Rodgau
 GATEWAY® Recombination System Invitrogen, Karlsruhe
 pGEMT® Vector System I Promega, Mannheim
 pGEMT® Vector *easy* System I Promega, Mannheim
 QIAfilter® Maxi Kit Qiagen, Düsseldorf
 QIAfilter® Midi Kit Qiagen, Düsseldorf
 QIAprep® Miniprep Kit Qiagen, Düsseldorf
 QIAprep® 8 Miniprep Kit Qiagen, Düsseldorf
 QIAquick® Gel Extraction Kit Qiagen, Düsseldorf
 RNeasy® Mini Kit Qiagen, Düsseldorf
 QIAShredder® Mini Kit Qiagen, Düsseldorf
 Power SYBR® Green Master Mix (2x) Applied Biosystems, Warrington, UK
 TempliPhi™ DNA Amplification Kit Amersham Biosciences, Freiburg

6.1.7 Enzyme

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen vom Typ II (5-20 U/μl) und entsprechende Reaktionspuffer wurden von New England Biolabs (Ipswich, MA, USA), Promega (Mannheim) und Roche (Penzberg) bestellt.

BP-Clonase Invitrogen, Karlsruhe
 Calf intestine phosphatase (CIP) Roche, Penzberg
 Cloned *Pfu* DNA Polymerase (2,5 U/μl) Stratagene, La Jolla, CA (USA)
 DNaseI Roche, Penzberg
 Hi Fi-Taq-Polymerase Invitrogen, Karlsruhe
 Klenow-Fragment der DNA Polymerase Promega, Mannheim
 GoTaq DNA-Polymerase
 LR-Clonase Invitrogen, Karlsruhe
 Phusion DNA Polymerase New England Biolabs, Mannheim
 Proteinase K Roth
 REDTaq™ DNA Polymerase Sigma-Aldrich Co, Taufkirchen
 RNaseH Qiagen, Düsseldorf
 SuperscriptIII Invitrogen, Karlsruhe
 T4 DNA-Ligase (3 U/μl) Promega, Mannheim
 T4 DNA-Polymerase Roche, Penzberg

6.1.8 Antikörper

α-Flag-M2-HRP-direktgekoppelt, Maus monoklonal, IgG Sigma-Aldrich, Taufkirchen
 α-HA (3F10), Ratte monoklonal, IgG Roche, Penzberg
 α-ME2, Ziege Monoklonal, IgG Sigma-Aldrich, Taufkirchen
 α-Aktin, Maus monoklonal, IgG Chemicon, UK
 α-MAP2, Maus monoklonal, IgG Chemicon, UK
 α-alpha-Tubulin
 α-VGLUT1 polyklonal (Kaninchen), Abcam
 α-NeuN, Chemicon
 α-Maus monoklonal-HRP-gekoppelt (Ziege), IgG Dianova, Hamburg
 α-Ratte-HRP-gekoppelt monoklonal (Ziege), IgG Dianova, Hamburg
 α-Kaninchen-HRP-gekoppelt polyklonal (Ziege), IgG Dianova, Hamburg
 α-Maus-Cy2™-gekoppelt (Ziege), IgG Dianova, Hamburg
 α-Kaninchen-Cy3™-gekoppelt (Ziege), IgG Dianova, Hamburg

6.1.9 Oligonukleotide

Alle im Folgenden aufgelistete Oligonukleotide wurden von Fritz Benseler (Abteilung Molekulare Neurobiologie, Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen) synthetisiert.

6.1.9.1 Oligonukleotide zum Genotypisieren der Mäuse

Primer	Richtung	Nr.	Sequenz 5'→3'
TAP-Tag	Fwd	4872	CATCGTGTTCGCAAGAGCCGCGG
	Rev	4873	TCATAGCCGTCTCAGCCAACCGC
b-site	Fwd	3213	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCT
	Rev	3214	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC
lacZ	Fwd	2660	TCGCTTCACTTACGCCAATGTCG
	Rev	2662	TGGTCGGCTTACGGCGGTGATTT
tTa	Fwd	2776	CGCTGTGGGGCATTCTTACTTTAG
	Rev	2777	GCGGACCCACTTTCACATTTAAG

6.1.9.2 Oligonukleotide für die quantitative Real-Time-PCR

Transkript	Nummer	Richtung	Sequenz 5'→3'
Id2	8714	Fwd	GACAGAACCAGGCGTCCA
	8715	Rev	AGCTCAGAAGGGAATTCAGATG
Per2	8738	Fwd	CAACACAGACGACAGCATCA
	8739	Rev	TCCTGGTCCTCCTTCAACAC
ME2	8756	Fwd	CTGGAGCAGCAAGTTCGAG
	8757	Rev	TTCTCTTCCCTCCCTTCTTTTCA
NDRF	8724	Fwd	TCAAGGAGGAAGGAGAGCTG
	8725	Rev	GGTCATCTTGCCTTCTTCG
NeuroD	8726	Fwd	GCAGAAGGCAAGGTGTCC
	8727	Rev	TTTGGTCATGTTTCCACTTCC
β-Aktin	9146	Fwd	CTTCCTCCCTGGAGAAGAGC
	9147	Rev	ATGCCACAGGATTCCATACC
c-fos	8879	Fwd	GAATGGTGAAGACCGTGTCA
	8892	Rev	TCTTCCTCTTCAGGAGATAGCTG
BDNF	11594	Fwd	GCATCTGTTGGGGAGACAAG
	11595	Rev	TGGTCATCACTTCTCACCTG
Per2	11242	Fwd	AGCTTCCCTTGTGGAGCAT
	11243	Rev	TCTCCTCCATGCATTCTTGA
ATP 5b	11282	Fwd	GGATCTGCTGGCCCCATAC
	11283	Rev	CTTCCAACGCCAGCACCT
NEX	Primer Nr. 01326464_A1; Applied Biosystems		

6.1.9.3 Oligonukleotide zur *in situ*-Hybridisierung

Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'
Per2 (Abe <i>et al.</i> , 2004)	GCTCCTTCAGGGTCCTTATCAGTTCCTTGTGTGCGTCAGCTTTGG
Plp #1 as	GGGAGTGAGATGATCCTGACAACACTGTTTCTCTCCTAATGAGC
Plp #2 as	TGATGGCAAGAAGACCAGGGACATTTCTGCTCTCTACCTGAGAAC
Id2 #1 as	TGAGCTTGAGTAGCAGTCGTTTCATGTTGTAGAGCAGACTCATCG
Id2 #2 as	GCTATCATTTCGACATAAGCTCAGAAGGGAATTCAGATGCCTGCAAGG
Id2 #3 as	GGCCATTTCTGACCGAAGACTTCATTTAAGTAACCGAATACTGGGTC
Flag-Tag #1 as	TTGTTTGATCCGCCCGGGCCTTATCGTCGTCATCCTTGTAATC
Flag-Tag #2 as	AGAGCCTGCTTTTTTGTACAAACTTGTTTGATCCGCCCGGGCCTT
TAP-Tag #1 as	CATAATCAAGTGCCCCGAGGATGAGATTTTCTTAAAGCGGTTGGC
TAP-Tag #2 as	GGTTAGCGCTTTGGCTTGGGTCATCTTTTAAACTTTGGATGAAGGCG
TAP-Tag #3 as	GTCTACTTTCGGCGCCTGAGCATCGTTTGTAGCTTTTGTAGCTTCTGCTA
TAP-Tag #4 as	CCGCGGTTTTGAGCTCACCTGAAAATACAAATTCTCGCTAGCAG

6.1.10 Verwendete Tags

6.1.10.1 Flag-Tag

Das Flag-Tag-Peptid ist ein Oktamer, das die Sequenz N-Terminus-DYKDDDDK-C-Terminus aufweist.

6.1.10.2 TAP-Tag

Das TAP-Tag-Protein besteht aus der Protein A-Bindedomäne, einer Erkennungssequenz der TEV-Protease und einer Calmodulin-Bindedomäne. Es wurde ursprünglich für das Verfahren der Tandem-Affinitäts-Tag-Aufreinigung entwickelt ([Rigaut *et al.*, 1999](#)). Der TAP-Tag erlaubt eine Isolierung des Fusionsproteins, bestehend aus dem zu analysierten Protein und dem TAP-Tag. Das TAP-Tag weist die folgende Sequenz auf:

N-Terminus-MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKLAAANSSIDLISTSLYKKAGS-C-Terminus

6.1.11 Medien für Zellkultur

Als Basismedium für die Zellkultur wurde kommerzielles F12 oder DMEM mit 1g Glucose/Liter (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Alle Medien enthielten 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung, 200 mM GlutaMaxx™ (stabiles Glutamat-Dipeptid-Derivat, Invitrogen) und hitzeinaktiviertes (für 25 min bei 56°C) fötales Kälberserum (FCS) und/oder hitzeinaktiviertes (für 45 min bei 56°C) Pferdeserum (HS). Die genaue Zusammensetzung der Medien variierte je nach verwendeter Zellart:

Zelllinie	Medium	Prozent FCS	Prozent HS
COS-1	DMEM	10	-
NIH-3T3	DMEM	10	-
PC12	DMEM	10	10
SHS5Y5	DMEM	10	5

6.1.12 Lösungen und Puffer

Die Sterilisation der Lösungen erfolgte im Dampfdruckautoklaven für 30 min bei 120°C und 105 Pascal. Hitzeempfindliche Lösungen wurden sterilfiltriert (Porengröße: 0,22 µm), Gebrauchswaren wurden autoklaviert.

6.1.12.1 Allgemeine Lösungen

PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung):
10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4
150 mM NaCl

TBS (1000 ml):
50 ml Tris-Base (1 M; pH 8) (f.c. 50 mM)
30 ml NaCl (5 M) (f.c. 150 mM)
auf 1000 ml mit H₂O aufgefüllt, pH 7,4 mit 1 M HCl eingestellt

6.1.12.2 Puffer für molekularbiologische Arbeitsmethoden

DNA-Probenpuffer:
Bromphenolblau 0,25 %
Xylencyanol 0,25 %
Ficoll (Typ 400) 15 %
in H₂O

Tris/Acetat/EDTA-Puffer (TAE, 50x, 1000 ml):
Tris-HCl-Base 242 g (2 M)
mit Eisessig auf pH 8 eingestellt
EDTA (0,5 M; pH 8) 100 ml (1 mM)
auf 1000 ml mit H₂O aufgefüllt

TE-Puffer:
TrisCl (pH 7,4) 10 mM
EDTA (0,5 M) 1 mM

Puffer P1:
50 mM Tris/HCl; pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A

Puffer P2:
200 mM NaOH; 1% SDS (w/v)

Puffer P3:
3 M Kaliumacetat; pH 5,5

Puffer FWB2:
1 M Kaliumacetat; pH 5,0

Puffer QBT:
750 mM NaCl; 50 mM MOPS; pH 7,0; 15% (v/v) Isopropanol, 0,15% Triton® X-100 (v/v)

Puffer QC:
1 M NaCl; 50 mM MOPS; pH 7,0; 15% Isopropanol (v/v)

Puffer QF:

1,25 mM NaCl; 50 mM MOPS; pH 7,0; 15% Isopropanol (v/v)

Puffer QN:

1,6 M NaCl; 50 mM MOPS; pH 7,0; 15% Isopropanol (v/v)

Puffer EB:

10 mM Tris/HCl; pH 8,0; 1 mM EDTA

10x MGB-Puffer (Modified Gitschier Buffer):

Tris pH 8, 8 (1M) 6,7 ml

(NH₄)₂SO₄ (1M) 1,66 ml

MgCl₂ (1M) 650 µl

auf 10 ml mit ddH₂O aufgefüllt

1x MGB-Puffer:

1 ml 10x MGB

0,5 ml Triton-X-100 (10%) (f.c. 0,5%)

8 ml H₂O

6.1.12.3 Puffer für Northern-Blotting und in *situ*-Hybridisierung**2x Northern-Hybridisierungs-Puffer (100ml):**

20 ml 50x Denhardts Puffer

30 ml 20x SSC (Millipore)

20 ml 1M TrisCl pH 7,0

2 ml 0.5M EDTA

10 ml 20% SDS

5 ml Heringssperma ssDNA (2mg/ml), sheared 100µg/ml

13 ml DEPC H₂O

Vor der Zugabe wurde die Heringssperma-DNA für 5 min bei 95°C denaturiert.

50x Denhardts Puffer:

5 g Ficoll (Type 400)

5 g PVP (Polyvinylpyrolidone)

5 g BSA (Fraktion V)

in d H₂O gelöst, auf 500 ml mit dH₂O aufgefüllt.

***in situ*-Hybridisierungs-Puffer (10ml):**

5 ml 100% Formamid

5 ml 2x Northern-Hybridisierungspuffer

Soerensen-Puffer:**Lösung A:**

27.6 g NaH₂PO₄*H₂O

in d H₂O gelöst, auf 1l mit dH₂O aufgefüllt

Lösung B:

57.2 g Na₂HPO₄

in dH₂O gelöst, auf 1l mit dH₂O aufgefüllt

115 ml Lösung A wurden mit 385 ml Lösung B zu 500 ml 0.2 M Soerensen-Puffer zusammengemischt.

4% PFA in Soerensen-Puffer, pH 7,4:

20 g PFA wurden in 230 ml dH₂O gelöst und 1 g NaOH Plätzchen hinzugegeben auf 65°C in einer Mikrowelle erhitzt und auf 250 ml mit dH₂O aufgefüllt.

Dazu wurden 250 ml Soerensen-Puffer gegeben.

20x SSC:
0.3M Natriumcitrat
3M NaCl
in 800ml d H₂O gelöst, pH auf 7,0 eingestellt, auf 1 l mit dH₂O aufgefüllt und autoklaviert.

10x RNA-Laufpuffer (500ml):
20,93 g MOPS (f.c. 0,2 M)
8,5 ml Natrium Acetat pH 5,2 (f.c. 50 mM)
Mit 2 N NaOH auf pH 7,0 eingestellt
10 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 (f.c. 10 mM)
Mit dH₂O auf 500 ml aufgefüllt, unter Lichtschutz bei 4°C gelagert.

1%-Agarosegel zur RNA-Auftrennung:
1 g Agarose wurde in 82,5 ml 1x RNA-Laufpuffer aufgekocht und gelöst,
nach dem Abkühlen auf 65°C wurden 17,7 ml 37%-iges Formaldehyd zugegeben.

2x RNA-Ladepuffer:
200 µl 10x RNA-Laufpuffer
100 µl FMII (DNA-Loading Dye II)
700 µl Formamid
Der RNA-Puffer wurde bei -20°C aufbewahrt.

Frisch vorm Gebrauch wurden 5 µl Ethidiumbromid pro 1,5 ml 2x RNA-Ladepuffer hinzugegeben.

DEPC- H₂O:
1 ml DEPC wurde in 1000 ml Wasser bei 37°C gelöst (über Nacht) und anschließend autoklaviert.

2%-ige Methylenblau-Färbelösung:
2 mg Methylenblau wurden in H₂O gelöst und auf 100 ml mit H₂O aufgefüllt.

6.1.12.4 Lösungen für die Proteinbiochemie

Lysepuffer (LyB)/nukleärer Lysepuffer (NuLyB):
20 mM Hepes pH 7,5
20% Glycerol
10 mM NaCl (500 mM für NLYB)
1,5 mM MgCl₂
0,2 mM EDTA
0,1% Triton-X-100
Gelöst in H₂O.

Vor dem Gebrauch wurde 1 mM DTT und pro 10 ml NuLyB eine Tablette „Mini-Complete“-Proteaseinhibitoren (Roche) frisch hinzugegeben.

RIPA-Puffer:
50 mM Tris-HCl pH 7,4
150 mM NaCl
1 mM EDTA
1% Triton-X-100
1% Natrium-Deoxycholat
0,1% SDS
Gelöst in H₂O; zu je 10 ml RIPA-Puffer wurde eine Tablette „Mini-Complete“-Proteaseinhibitoren (Roche) hinzugegeben

Coomassie-Färbelösung:
2 g Coomassieblue-R250 (0,2%)
400 ml Methanol (40%)
100 ml Essigsäure (10%)

auf 1000 ml mit H₂O aufgefüllt und durch einen Faltenfilter filtriert.

Coomassie-Entfärbelösung:

300 ml Methanol (30%)

100 ml Essigsäure (10%)

auf 1000 ml mit H₂O aufgefüllt.

Laufpuffer (NuPAGE[®]) MES (20x):

1 M MES (2-(N-morpholino)-Ethansulfonsäure)

1 M Tris-Base

2% SDS

20 mM EDTA

bei 4°C aufbewahrt

1x Puffer: pH 7,3

Protein-Probenpuffer (NuPAGE[®]) (4x):

564 mM Tris-Base

424 mM Tris-HCl

8% (w/v) Lithiumdodecylsulfat

2,04 mM EDTA

40% (w/v) Glycerol

7,5% (v/v) Serva Blue G250 (1% Lösung)

2,5% (v/v) Phenolrot-Lösung (1% Lösung)

bei -20°C aufbewahrt

1x Puffer: pH 8,5

PonceauS-Färbelösung:

0,2 g (0,2% w/v) PonceauS

3 ml (3% v/v) Trichloressigsäure

auf 100 ml mit H₂O aufgefüllt

Transfer-Puffer (NuPAGE[®]) (20x):

500 mM Bicine

500 mM Bis-Tris

20 mM EDTA

1 mM Chlorobutanol

bei 4°C aufbewahrt

Transfer-Puffer (NuPAGE[®]) (1x) pH 7,2:

10% Methanol

100 ml 20x Transfer-Puffer

auf 1000 ml mit H₂O aufgefüllt

Western-Blot-Stripping-Puffer:

62,5 mM Tris-HCl pH 6,7

2% (w/v) SDS

100 mM β-Mercaptoethanol

Western-Blot-Blockierungslösung:

5% (w/v) Magermilchpulver

0,05% Tween-20

in 1x TBS

Western-Blot-Waschlösung (TBS-T):

1x TBS

0,05% Tween-20

Primärantikörperlösung:

Entsprechender Antikörper in Western-Blot-Blockierungslösung

Sekundärantikörperlösung:

Entsprechender Antikörper in Western-Blot-Blockierungslösung

6.1.12.5 Lösungen für Luciferase-Messungen

Lyse-Puffer:

Passive Lysis Buffer (5x) Promega

Puffer wurde entsprechend in H₂O verdünnt.

Firefly Luciferase-Assay Puffer (nach Gaunitz):

für 500 ml

1792 mg Tricine (20 mM)

260 mg (MgCO₃)₄*Mg(OH)₂*5 H₂O (1,07 mM) (Magnesiumcarbonat)

161 mg MgSO₄ (2,67 mM)

100 µl EDTA (0,5 M) (0,1 mM)

2570 mg DTT (33,3 mM)

105 mg Coenzym A (270 µM)

66 mg D-Luziferin, freie Säure (470 µM)

146 mg ATP (530 µM)

Zum Lösen von Magnesiumcarbonat wurde der pH-Wert mit HCl titriert, bis die Lösung klar wurde. Danach wurde der pH-Wert mit 5 M NaOH auf pH 7,8 eingestellt.

Luziferin und Coenzym A wurden zum Schluss zugegeben und der pH-Wert kontrolliert.

Lagerung des Puffers unter Lichtabschluss bei – 20°C.

Renilla Luciferase-Assay Puffer (500 ml):

32,15 g NaCl (1,1 M)

2,2 ml (0,5 M) Na₂-EDTA (2,2 mM)

110 ml 1 M KH₂PO₄ K_xPO₄ (pH 5,1) (0,22 M)

220 mg BSA (0,44 mg/ml)

42,25 mg NaN₃ (1,3 mM)

300 µl Coelenterazin (Stock)(in EtOH gelöst) (1,43 mM)

K_xPO₄ (pH 5,1):

1M KH₂PO₄, der pH-Wert wurde mit KOH auf 5,1 eingestellt.

Coelenterazin wurde am Schluss zugegeben.

Coelenterazin Stock: 1mg/ml EtOH; Lagerung bei – 20°C.

Anschließend wurde der pH-Wert des Puffers auf 5,0 eingestellt.

Lagerung unter Lichtabschluss bei – 20°C.

6.1.12.6 Puffer für die histologische Analyse und Immunhistochemie

K₃[Fe(CN)₆]-Stammlösung:

0,5 M Kaliumhexacyanoferrat (III), wurde lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

K₄[Fe(CN)₆]-Stammlösung:

0,5 M Kaliumhexacyanoferrat (II), wurde lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

X-Gal-Stammlösung:

4 % (w/v) X-Gal (Roth) in N,N'-Dimethylformamid, wurde lichtgeschützt bei -20°C gelagert.

Narkosemittel Avertin:

1 g Tribromethanol wurde abgewogen und mit

0,81 ml Amylalkohol vermischt.

Das obige wurde in 71,49 ml auf 40°C aufgewärmtem Wasser gelöst, sterilfiltriert (Porengröße 0,22 µm) und unter Lichtschutz bei 4°C bis 4 Wochen gelagert.

Dosierung für Mäuse: intraperitoneal 0,2 ml pro 10 g Körpergewicht

Perfusion-Lösung (pH 9,5):

20 g PFA
 38,14 g NaBH₄
 2 g NaOH
 wurden in dH₂O gelöst und mit d H₂O auf 500 ml aufgefüllt.

Permeabilisierung-Puffer
 0,4% Triton in PBS

Blockierungs-Puffer:
 4% HS in 0,2% Triton/PBS

Puffer zur Antikörperinkubation:
 1% HS in 0,05% Triton/PBS

6.1.13 Medien für die Bakterienkultivierung

LB-Medium (Luria's Bretani-Medium):
 0,5% (w/v) Hefeextrakt
 1% (w/v) Bacto-Pepton pH 7,5
 1% (w/v) NaCl
 LB/Amp: 0,1 mg/ml Ampicillin in LB-Medium
 LB/Kan: 0,05 mg/ml Kanamycin in LB-Medium
 LB/Genta: 0,05 mg/ml Gentamycin in LB-Medium
 LB/Cm: 0,05 mg/ml Chloramphenicol in LB-Medium
 LB/Tet: 0,03 mg/ml Tetracyclin in LB-Medium

Herstellung der LB-Platten:
 0,5% (w/v) Hefeextrakt
 1% (w/v) Bacto-Pepton pH 7,5
 1% (w/v) NaCl
 1,5% (w/v) Agar
 Oben angegebene Substanzen wurden autoklaviert und nach dem Abkühlen folgte eine Zugabe der entsprechenden Antibiotika (Endkonzentration wie bei LB-Medium).

LB/Amp/IPTG:
 35 µg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid (X-Gal)
 15 µg/ml Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)
 0,1 mg/ml Ampicillin in LB-Medium.

Niedrigsalz-LB-Medium für Hygromycin-Medium:
 0,5% (w/v) Hefeextrakt
 1% (w/v) Bacto-Pepton pH 7,5
 0,5% (w/v) NaCl
 LB/Hyg: 0,2 mg/ml Hygromycin in LB-Medium

SOC-Medium:
 10 mM NaCl
 2,5 mM KCl
 10 mM MgSO₄
 2% (w/v) Bacto-Pepton
 0,5% (w/v) Hefeextrakt
 20 mM Glucose

TB-Medium:
 1,2 % (w/v) Bacto Trypton
 2,4 % (w/v) Bacto Hefeextrakt
 0,4 % (w/v) Glycerol
 17 mM KH₂PO₄
 70 mM K₂HPO₄

TB-tet-Medium:
TB-Medium mit 30 µg/ml Tetracyclin

TB Jap-Puffer:
10 mM PIPES
15 mM CaCl₂
250 mM KCl mit KOH auf pH 6,7 eingestellt
55 mM MnCl₂, sterilfiltriert (0,45 µm Porenweite)

10%ige Glycerinlösung:
10% Glycerin in H₂O

Glycerinstocklösung zur Bakterienlagerung:
52 ml (65% (v/v)) Glycerin
8 ml 1M MgSO₄ (0,1 M)
2 ml 1M Tris-Cl, pH 8 (0,025 M)
Anschließend wurde der pH-Wert mit NaOH auf pH 8 angestellt und mit sterilem H₂O auf 80 ml aufgefüllt.

6.2 Molekularbiologische Methoden

6.2.1 Herstellung chemisch-kompetenter *E.coli* Zellen

Zunächst wurde von einer Einzelkolonie oder aus einem Glycerinstock eine Übernachtskultur des gewünschten Bakterienstammes (*E.coli* XL1-Blue, Stratagene, La Jolla, USA; DH5α oder DB3.1, Invitrogen, Karlsruhe) in 5 ml TB- oder TB-tet-Medium (bei XL1-Blue-Zellen) angeimpft. Aus dieser Vorkultur wurden 500 µl in 250 ml TB-Medium oder TB-tet-Medium bei 18°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert (24-40 h). Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Bakteriensuspension bei 4°C für 10 min mit 3000 rpm (GS3-Rotor, Sorvall, Langensfeld) abzentrifugiert. Das in 80 ml kaltem TB Jap-Puffer (+2% DMSO f.c.) resuspendierte Pellet wurde nach Inkubation für 10 min auf Eis bei 4°C für 10 min mit 3000 rpm (Sorvall GS3-Rotor) erneut zentrifugiert und in 18,6 ml kaltem TB Jap-Puffer (+7% DMSO f.c.) aufgenommen. Nach anschließender 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden je 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

6.2.2 Herstellung elektro-kompetenter *E.coli* Zellen

Eine Übernachtskultur von DH10B Zellen wurde von einer Einzelkolonie oder aus einem Glycerinstock in LB-Medium angeimpft. 500 µl dieser Vorkultur wurden als Inokulum für 1000 ml LB-Medium verwendet. Die Bakterien wurden bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 geschüttelt. Danach folgte das Abzentrifugieren der Zellen bei 4000 rpm für 10 min bei 4°C. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und die Zellen in 500 ml eiskaltem 10%-igen Glycerin in H₂O resuspendiert. Nach dreimaligem Wiederholen des Waschvorgangs (250 ml 10%-ige Glycerinlösung, dann 100 ml 10%-ige Glycerinlösung, zuletzt 50 ml 10%-ige Glycerinlösung, Abzentrifugieren (4000 rpm)) wurde der Überstand bis auf 2-3 ml abgenommen (abhängig von der Größe des Pellets). Anschließend wurden Aliquots von 25-50 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt. Zur Bestimmung der Kompetenz wurden die *E.coli* Zellen mit pUC18 Plasmid DNA transformiert. Durchschnittlich lag die Effizienz bei 5x10⁷ bis 8x10⁸ Transformanten per 1 µg des pUC18 Plasmids.

6.2.3 Transformation von chemisch-kompetenten Bakterien

Zu 50µl bei 4°C aufgetauten transformationskompetenten *E.coli* XL1-Blue- oder DH5α-Bakterien wurden 5 bis 10 µl des Ligationsansatzes gegeben und der Transformationsansatz für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien einem Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C für 40 s ausgesetzt. Nach der Abkühlung auf Eis für 2 min wurde zum Transformationsgemisch 800 µl vorgewärmtes LB-Medium (ohne Antibiotikum) zugegeben. Danach folgte eine Inkubation von 45 min bei 37°C und 500 rpm, die den transformierten

Bakterien eine Expression des Antibiotikum-Resistenzgens ermöglichte. Anschließend wurden 100 µl bis 1000 µl auf LB-Selektionsplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Bei Vektoren mit der Möglichkeit zur Blau-Weiß-Selektion wurden LB-Platten mit 5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl-β-D-Galactosid (X-Gal) und Isopropyl-Thiogalactosid (IPTG) verwendet.

6.2.4 Transformation von elektro-kompetenten Bakterien

Für Gateway-Klonierungen wurden kommerzielle DH10B *E.coli* Bakterien (1:5 bis 1:10 in 10%-iger Glycerinlösung in H₂O verdünnt), für klassisch klonierte Vektoren dagegen selbst hergestellte DH10B *E.coli* Zellen verwendet. Zu einem 20 µl Aliquot Bakterien wurden 2 µl eines Rekombinations- bzw. Ligationsansatzes gegeben, der Transformationsansatz wurde in eine Elektroporationsküvette (1 mm) überführt und für 5 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Elektroporation (1700 kV, 25 µF, 200 Ω). Die Bakterienzellen wurden dann in 500 µl bis 800 µl eisgekühltem LB- oder SOC-Medium resuspendiert und für 45 min bei 37°C und 500 rpm inkubiert, um die Antibiotikum-Resistenzgenexpression zu ermöglichen. Anschließend wurden 10 µl bis 100 µl des Transformationsansatzes auf LB-Selektionsplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

6.2.5 Herstellung von Glycerinstocks der Bakterienkulturen

Zur langfristigen Aufbewahrung wurden 750 µl Bakterienkultur in entsprechendem LB-Selektionsmedium mit 500 µl steriler Glycerinlösung sorgfältig gemischt und in Kryoeinfrieröhrchen bei -80°C aufbewahrt.

6.2.6 Präparation von Plasmid DNA aus Bakterien

Die Präparation von Plasmiden wurde nach einem modifizierten Protokoll von [Birnboim und Doly \(1979\)](#) durchgeführt. Die Aufreinigung kleiner Mengen Plasmid-DNA (5-10 µg) beruhte auf der Bindung von DNA an ein Silikamembran unter Hochsalzbedingungen. Zur Aufreinigung mittlerer (Midi-Präp, bis 100 µg) und großer Plasmid-Mengen (Maxi-Präp, bis 500 µg) wurden Resin-Säulen verwendet (Qiagen, Düsseldorf). Für Plasmidpräparationen in kleinem Maßstab (Mini-Präp) wurden Bakterienkolonien von LB-Platten mit sterilen Zahnstochern in 4 ml LB-Selektionsmedium überführt und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Präparationen mittlerer (Midi-Präp) bzw. großer (Maxi-Präp) Plasmid-Mengen erfolgten nach Animpfen von 75 ml bzw. 200 ml Übernachtskulturen in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum. Die Aufreinigung wurde mit gebrauchsfertigen QIAprep[®]-Kits (Qiagen, Düsseldorf) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt (Qiagen Plasmid Handbuch). Mini-DNA wurde in 30 µl bzw 100 µl EB-Puffer oder sterilem Wasser eluiert.

6.2.7 Präparation genomischer DNA aus Mausgeweben

Genomische DNA zur Genotypisierung der Versuchstiere bzw. zum Verwenden als *Template* für spätere Klonierungen wurde aus Schwanzbiopsiematerial (ca. 0,5 cm) oder aus anderen Geweben gewonnen.

Das entsprechende Biopsiematerial wurde in 180 µl 1x MGB-Puffer mit 20 µl Proteinase K (10 mg/ml Stocklösung) über Nacht bei 55°C und 180 rpm inkubiert. Nach einer Hitzeinaktivierung der Proteinase K bei 95°C für 10 min wurden die Haare und unlösliche Zellrückstände durch eine Zentrifugation bei 5000 rpm für 10 min abgetrennt und der DNA enthaltende Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die genomische DNA wurde bei 4°C gelagert. Für die PCRs zur Genotypisierung wurde die DNA 1:5 mit sterilem Wasser verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden standardmäßig 2 µl für die PCR eingesetzt.

6.2.8 Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen

Bei kultivierten Zelllinien wurden konfluente Zellkulturplatten direkt mit Lysepuffer versehen. Die Präparation von Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Düsseldorf), wobei für die RNA-Präparation aus Zelllinien zusätzlich das QiaShredder-Kit (Qiagen, Düsseldorf) zur effizienten Eliminierung der genomischen DNA nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurde. Nach der RNA-Präparation wurden die

Eluate bei -70°C eingefroren. Die Konzentration der RNA wurde spektrometrisch bei OD_{260} bestimmt.

6.2.9 Präparation von Gesamt-RNA aus Mausgeweben mit TRIzol®

Zur Gesamt-RNA-Isolierung aus Geweben, geschützt von RNasen, wurde TRIzol® (Invitrogen) eine homogene Lösung aus Phenol und Guanidiniumthiocyanat ([Chomczynski und Sacchi, 1987](#)) verwendet.

Hierzu wurde das präparierte, tiefgefrorene Mausgewebe mit Hilfe eines Ultraturrax (IKA Labortechnik, Staufen) in TRIzol (1 ml TRIzol pro 100 mg Gewebe) 5 bis 10 s homogenisiert. Der Ansatz wurde für 5 min bei RT inkubiert. Zum Homogenat wurden pro 1 ml TRIzol 0,2 ml Chloroform gegeben, danach folgte das Vortexen des Ansatzes und eine Zentrifugation für 15 min bei RT und 13000 rpm. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml 70%-igem Ethanol pro 1 ml TRIzol versehen, durch pipettieren der Lösung durchmischt und auf die RNA-Säulen (RNaeasy Columns, Qiagen) gegeben. Die Säulen wurden für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. An die Säulenmatrix gebundene RNA wurde in folgender Reihenfolge gewaschen: Zunächst mit 750 μl RW1-Puffer, zweimal mit 750 μl RPE Puffer und anschließend mit 80%-igem Ethanol, bevor die Säule für 2 min trocken zentrifugiert wurde. Die RNA wurde (je nach Gewebe) in 30 bzw. 50 μl RNase-freiem Wasser eluiert. Um die Effizienz der Elution zu erhöhen, wurde das Eluat erneut auf die Säule pipettiert und die Säule für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die RNA-Proben-Lagerung erfolgte bei -70°C .

6.2.10 Northern-Blot

Die Northern-Blot Analyse basiert auf einer für die DNA entwickelte Methode ([Southern, 1975](#)). Ziel des Northern-*blotting* ist, die RNA-Fragmente, die durch eine denaturierende Elektrophorese der Größe nach aufgetrennt wurden, auf einer Membran zu binden und mittels Hybridisierung mit spezifischen radioaktiv markierten Sonden die einzelnen RNA-Fragmente nachzuweisen.

RNA-Trennung und Membrantransfer

Die Gesamt-RNA (10-12 μg RNA in 2x RNA-Probe-Puffer) wurde durch eine denaturierende Gelelektrophorese in einem 1%-igem Agarose-Gel mit Formaldehyd in 1x RNA-Laufpuffer (RB) aufgetrennt. Das Gel wurde mit angelegtem Fluoreszenzlineal vermessen und fotografiert. Der Transfer der RNA auf die Nylon N Membran (Amersham) erfolgte mit Hilfe eines Kapilarblots. Er erfolgte über Nacht bei RT. Nach dem Blotabbau und Markierung der Lage der Geltaschen auf der Membranrückseite wurde sie einmal in 10x SSC gewaschen, luftgetrocknet und zur Immobilisierung der RNA in einem Stratalinker-Gerät (Stratagene, Amsterdam) UV-kreuzvernetzt (*crosslinking*). Zur Visualisierung der RNA auf der Membran wurde sie 2 min in 0,02% Methylenblaulösung zunächst gefärbt und später mit Wasser wieder entfärbt (Herrin und Schmidt, 1988). Die Lagerung der Membran erfolgte in einer Plastikfolie bei 4°C oder -20°C .

Sondenmarkierung

Für eine sequenzspezifische Hybridisierung mit der immobilisierten RNA wurden unter Verwendung des "Prime-It™-II-Primer Kit (Stratagene) entsprechend der Herstellerangaben sequenzspezifische Sonden radioaktiv markiert. Die Markierungsreaktion setzte sich wie folgt zusammen:

1 μl zu markierende Sonden DNA (25 ng)

23 μl H₂O

10 μl *random* Primer (Nonamer)

Der Ansatz wurde 5 min bei 98°C inkubiert, kurz abzentrifugiert und sofort auf Eis für 10 min abgekühlt. Im Folgenden wurde das Gemisch kurz gevortext, abzentrifugiert und nach Zugabe von 10 μl 5x dCTP-Puffer erneut gevortext und abzentrifugiert. Anschließend wurden 5 μl α -³²P-dCTP (mit einer Konzentration von 3000 Ci/mM) und 1 μl Exo(-)Klenow Enzym zugegeben und gemischt. Danach folgte eine Inkubation des Ansatzes für 10 min bei 37°C . Die radioaktiv markierten Sonden wurden schließlich über die BioRad C30-Säulen aufgereinigt.

Hybridisierung

Vor der Verwendung in der Hybridisierungsreaktion wurden die Sonden für 10 min bei 95°C denaturiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Northern-Blot-Membran für 30 min bei 42°C rotierend im Inkubator mit 1x NB-Hybridisierungspuffer inkubiert. Anschließend wurde die radioaktiv markierte, denaturierte Sonde zugegeben und über Nacht bei 42°C inkubiert. Zur Entfernung überschüssiger oder unspezifisch gebundener Sonde wurde die Membran bei abnehmender Salzkonzentration zunächst zweimal mit 2x SSC/ 0,5% SDS Waschpuffer, anschließend zweimal mit 0,25x SSC/0,1% SDS für 10 min bei 50°C gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die feuchte Membran in Plastikfolie eingeschweißt, in eine Röntgenkassette gelegt und mit einem Röntgenfilm (Kodak XR) abgedeckt. Die Exposition der Filme erfolgte bei -80°C für 3 bis 21 Tage. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte in einer Entwicklermaschine (KODAK-O-MAT).

6.2.11 *In situ*-Hybridisierung

Die Methode der *in situ*-Hybridisierung (ISH) erlaubt den Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen (DNA, RNA, miRNA) in einem Gewebe und ermöglicht somit eine präzise Lokalisation spezifischer Sequenzen in bestimmten Zellen oder Geweben. Im Rahmen dieser Arbeit wurden *in situ*-Hybridisierungen mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden auf 14 µm dünnen Kryoschnitten von Mausgehirnen durchgeführt.

6.2.11.1 Radioaktive Markierung spezifischer Oligonukleotide

Zur Detektion bestimmter Transkripte wurden zu diesen komplementäre, spezifische 45 – 48 bp lange *antisense* Oligonukleotide ausgesucht (siehe: 6.1.9.3 Oligonukleotide für *in situ*-Hybridisierung). Im Fall der Verwendung mehrerer Oligonukleotide zur Detektion eines Transkriptes, wurde ein Oligo-Mix mit einer finalen Konzentration von 5 pmol hergestellt. Die freien 3'-Hydroxyl-Enden der Oligonukleotide wurden enzymatisch mit der Terminalen Desoxynukleotidyl Transferase (TdT, New England Biolabs) radioaktiv markiert ([α -³³P]dATP).

Die TdT besitzt die Fähigkeit, die Nukleotide an die 3'OH-Enden doppel- oder einzelsträngiger DNA-Moleküle matrizenunabhängig anzuhängen.

Für einen 20 µl Reaktionsansatz wurden die folgenden Komponenten wie folgt eingesetzt:

9,8 µl H₂O

1 µl spezifisches Oligonukleotid oder spezifischer Oligo-Mix (f.c. 5 pmol)

2 µl NEB4-Puffer

2 µl CoCl₂

0,2 µl terminale Transferase

5 µl [α -³³P]dATP

Der Ansatz wurde bei 37°C für 30 min inkubiert. Das Enzym wurde anschließend bei 70°C für 10 min hitzeinaktiviert. Zu dem obigen Gemisch wurden 20 µl 2x TENS-Puffer gegeben und das Ganze über eine mit 1x TENS-Puffer äquilibrierten C30 -Säule (BioRad) aufgereinigt.

6.2.11.2 Aufreinigung der radioaktiven Sonden

Die Deckel und die unteren Verschlüsse der BioRad-Säulen wurden zunächst entfernt. Anschließend wurde die Säule in zwei aufeinander folgenden Zentrifugationsschritten für 2 min bei 2000 rpm trocken zentrifugiert. Danach wurden 400 µl des 1xTENS-Puffers auf die Matrix pipettiert. Es folgten zwei zusätzliche Zentrifugationsschritte jeweils für 2 min bei 2000 rpm. Nach jeder Zentrifugation wurde der Durchfluss verworfen. Jede vorbereitete Säule wurde in ein neues Reaktionsgefäß eingesetzt und die radioaktive Sonde auf die Mitte der Matrix pipettiert. Es folgte eine Zentrifugation für 2 min bei 2000 rpm. Als Durchfluss ergab sich die gebrauchsfertige Sonde.

6.2.11.3 Messung der Radioaktivität

Zur Bestimmung der Radioaktivität der aufgereinigten Sonde wurde jeweils 1 µl der Sonde mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit in ein Szintillationsröhrchen pipettiert und in einem

Szintillationszähler, der die Energie der ionisierten Strahlung quantifiziert, gemessen. Die resultierenden Werte variierten je nach verwendeten Oligonukleotiden zwischen 200.000 und 800.000 cpm/ μ l (*counts per minute/ μ l*). Für die *in situ*-Hybridisierung wurden 1.000.000 cpm pro 100 μ l des Hybridisierungspuffers (Menge für einen Objektträger) eingesetzt.

6.2.11.4 Vorbereitung der Kryoschnitte für die *in situ*-Hybridisierung

Die Gehirn-Kryoschnitte (siehe: Herstellung der Kryoschnitte) wurden zunächst in dicht geschlossenen Boxen bei RT für 1 Stunde aufgetaut. Es folgte eine Inkubation für 3 min in DEPC H₂O und anschließend eine Behandlung für 3 min mit 0,1 M TEA (Triethanolamin) pH 8,0 und für 10 min mit 0,1 M TEA pH 8,0/0,25% Essigsäureanhydrid. Durch eine steigende Ethanolreihe (mit 50%, 70%, 90% und 100%-igem Ethanol für jeweils 3 min) wurden die Präparate dehydriert, anschließend luftgetrocknet und somit für die Hybridisierung vorbereitet.

6.2.11.5 Durchführung der Hybridisierung

Die Objektträger wurden horizontal in eine Kammer gelegt, die mit in 5x SSC/50% Formamid getränkten Tücher angefeuchtet war. Auf jeden Objektträger wurden 100 μ l des Hybridisierungspuffers mit radioaktiver Sonde pipettiert (1.000.000 cpm). Als Spezifitätskontrolle für jede der verwendeten Sonden wurde eine negativ Kontrolle unter Zugabe von einem 100-fach-molaren Überschuss an unmarkierten (sog. kalten) Oligonukleotiden zur radioaktiv markierten Probe durchgeführt. Schnitte und entsprechende Kontrollen wurden parallel durchgeführt. Auf die Objektträger wurden Streifen des zurechtgeschnittenen Parafilms (Parafilm „M“®) gelegt, so dass keine Luftblasen entstanden. Die Schnitte wurden bei 42°C über Nacht, jedoch nicht kürzer als 20 Stunden, in der angefeuchteten und dicht verschlossenen Kammer in einem Hybridisierungssofen inkubiert.

6.2.11.6 Waschen der Schnitte

Der Parafilm wurde vorsichtig mit einer Pinzette entfernt und die Objektträger vertikal in einem Objektträgerständer angeordnet. Zum Waschen der Schnitte wurde folgendermaßen vorgegangen:

30 s in 1x SSC bei RT

30 min in auf 55°C vorgewärmten 1x SSC bei 55°C

3 min in 1x SSC bei RT

3 min in 0,1x SSC bei RT

Anschließend wurden die Schnitte in einer steigenden Ethanolreihe (mit 50%, 70%, 90% und 100%-igem Ethanol für jeweils 3 min) dehydriert und luftgetrocknet.

6.2.11.7 *In situ*-Detektion des radioaktiv markierten Transkripts

Zur Lokalisierung der radioaktiv markierten Transkripten wurden zwei Methoden verwendet: Die Schnitte wurden auf einem Hyperfilm MR1- β Max Röntgenfilm für 2 bis 4 Wochen in einer Kassette bei RT exponiert (Autoradiographie). Die Filme wurden maschinell entwickelt und eingescannt. Mit dieser Methode wurde die allgemeine Lokalisation des Transkripts detektiert.

Zur genaueren Analyse und um eine präzise, zelluläre Lokalisierung der Transkripte zu bestimmen, wurden die Schnitte mit einer lichtempfindlichen (Kodak NTB-2 Foto-) Emulsion überschichtet („gedippt“) und für 4 Wochen bei 4°C exponiert. Nach der Entwicklung (Kodak D19) wurden die Schnitte mit einem fluoreszenten, mit der DNA interkalierendem Farbstoff DAPI (1 μ l/ml) gefärbt. Nach anschließender Dehydrierung in einer steigenden Ethanolreihe (mit 50%, 70%, 90% und 100%-igem Ethanol für jeweils 3 min) wurden die Objektträger mit den Schnitten luftgetrocknet und schließlich in Eukitt-Abdeckmedium eingebettet.

6.2.12 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration einer Lösung lässt sich gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmen: Die Konzentration einer Lösung ist direkt proportional zu ihrer Extinktion bzw. Absorption, $A = \epsilon c \lambda$, wobei ϵ der molare Extinktionskoeffizient (Einheit: $M^{-1}cm^{-1}$), c die Konzentration

(Einheit: M) und λ die Weglänge (Schichtdicke der Küvette) ist, die das Licht durch die Probe zurücklegt [cm].

Die Extinktionskoeffizienten für Nukleinsäuren sind bei $\lambda = 260$ nm:

Adenin: $\epsilon = 15200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Cytosin: $\epsilon = 7050 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Guanin: $\epsilon = 12010 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Thymin: $\epsilon = 8400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Uracil: $\epsilon = 8111 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Von einer Verdünnung der Nukleinsäurelösung wurde im Spektralphotometer die Absorption bei 260 nm (Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren) und bei 280 nm (Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäuren von Proteinen) bestimmt. Die Messungen erfolgten in einer 500 μl Quarzküvette bzw. in 100 μl Kunststoffküvetten (Schichtdicke je 1 cm). Für eine dsDNA Konzentrationsbestimmung wurde folgende Formel angewendet:

Konzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$] = $\text{OD}_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}/1000$

Die Reinheit der DNA und der RNA wird durch das Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Bei sauberen Präparationen von Nukleinsäurelösung ergab sich ein Verhältnis von 1,8 bis 2,0. Signifikant kleinere Werte deuteten auf Kontaminationen durch Proteine hin. Die Molarität einer Oligonukleotidlösung wurde über die Extinktionskoeffizienten E [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$] der Nukleotide nach der Formel $M = \text{OD}_{260} / \text{E}_{\text{gesamt}}$ ermittelt, wobei E_{gesamt} die Summe der Extinktionskoeffizienten darstellt.

6.2.13 Analyse von DNA

6.2.13.1 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose ist ein lineares Polysaccharid, das aus den Rotalgengattungen *Gelidium* und *Gracillaria* gewonnen wird. Durch Erhitzen der Agarose in Pufferlösung bildet sich eine homogene Gelmatrix (Agarosegel). Die Auftrennung der Nukleinsäuren nach Molekulargewicht erfolgt in einem elektrischen Feld, wobei die durch ihre Phosphatgruppen negativ geladenen Nukleinsäuren zur Anode wandern. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 1,5%- bzw. 2%-ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer in einer Mikrowelle erhitzt, um sie zu lösen. Zur späteren Visualisierung der DNA-Banden unter UV-Licht wurde das Ethidiumbromid nach Abkühlung der Agaroselösung auf ca. 50°C zu einer Endkonzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gegeben und das Gel in einen Gelschlitten gegossen. Die Probentaschen sind durch den Einsatz verschiedener Gelkämme in den Gelschlitten entstanden. Gelkammer, Kämme und Schlitten wurden von der institutseigenen Werkstatt hergestellt. Der Schlitten wurde horizontal in eine Flachgelkammer gelegt und mit Laufpuffer (TAE) bedeckt. Vor dem Auftrag wurden die DNA-Proben mit DNA-Probenpuffer versetzt. Die angelegte Spannung betrug abhängig von der Größe der Gelkammer und der Agarosekonzentration 30-160 V (5-10 V/cm) (Spannungsgerät: Pharmacia GmbH, Heidelberg). Durch die Interkalation von Ethidiumbromid in die DNA konnte diese nach der Elektrophorese auf einem UV-Illuminator bei 250 bis 360 nm sichtbar gemacht und fotografiert werden. Die Größenabschätzung der DNA-Fragmente erfolgte im Vergleich mit einem 100 bp- oder einem 1 kb- DNA-Ladder Fragmentlängenstandard (Fermentas, St. Leon-Rot).

6.2.13.2 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung der DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurde unter langwelligem UV-Licht (356 nm, Intas UV-Systeme, Heidelberg) mit einem Skalpell aus dem Gel die gewünschte DNA-Bande herausgeschnitten. Zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde das QiaQuick Gel Extraction Kit (Qiagen, Düsseldorf) verwendet. Das in ein Reaktionsgefäß überführte Gelfragment wurde gewogen und mit dem 3-fachem Volumen des Puffers QG versetzt. Danach folgte eine 10-minütige Inkubation in einem Thermomixer bei 1400 rpm und 50°C. Nach vollständigem Lösen der Agarose wurde der Ansatz auf die Silikamembran der QiaQuick-Säulen appliziert. Die Membran wurde zuerst mit QG-Puffer und anschließend mit PE-Puffer gewaschen, um Gelreste und Verunreinigungen zu entfernen. Standardmäßig wurde zur Elution 30 μl steriles Wasser auf die trockene Membran pipettiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte eine einminütige Zentrifugation der Säule.

6.2.13.3 DNA Extraktion mit Phenol-Chloroform

Zur Aufreinigung der DNA wurde eine Extraktion mit Phenol-Chloroform durchgeführt. Hierzu wurde zu der DNA je 1 Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Phl/Chl/IAA 25:24:1) und 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (Chl/IAA 24:1) verwendet. Auf die Fällung der DNA mit 0.1 Vol 5 M LiCl und 2,5 Vol Ethanol (10min, -20°C) folgte eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 min in der Tischzentrifuge. Das Pellet wurde in 80%-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in Wasser, EB oder TE-Puffer aufgenommen.

6.2.13.4 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden unter den vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen eingesetzt. Die DNA wurde mit Typ II-Restriktionsendonukleasen geschnitten, die überwiegend innerhalb ihrer 4 bis 8 Nukleotide zählenden Erkennungssequenz schneiden, wobei je nach Enzym, 5'- oder 3'-Überhänge (sog. *sticky ends*) bzw. gerade Enden ohne Überhänge (sog. *blunt ends*) entstehen. Der Verdau erfolgte in Volumina von 20 bis 100 µl mit einem Zusatz von dem entsprechendem 10x Puffer (je nach Enzym, NEB1 bis NEB4 Puffer, New England BioLabs). Die Restriktionsenzymeinheit U (*unit*) definiert, welche Menge des Enzyms benötigt wird, um 1 µg DNA in einer Stunde bei 37°C zu schneiden. Für analytische DNA-Verdaus wurden 0,5 bis 1 µg DNA eingesetzt, für präparative Verdaus 4 bis 5 µg DNA verwendet sowie entsprechend 2 oder 10 U des Enzymes.

6.2.13.5 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung der DNA beruht auf einer modifizierten Didesoxy-Kettenterminationmethode nach Sanger ([Sanger et al., 1977](#)). Sie basiert auf einer *in vitro*-Replikation der DNA mittels einer modifizierten Taq-Polymerase (DNA-Sequense), wobei fluorochrome Substrate zum Einsatz kommen. Das Verfahren wurde von der Arbeitsgruppe Fritz Benseler (Abteilung Molekulare Neurobiologie, MPI für experimentelle Medizin, Göttingen) durchgeführt.

6.2.13.6 Sequenzanalyse von DNA

Die Sequenzierungsdaten wurden mit Hilfe der Software DNASTar von Lasergene, Version 6.0, ausgewertet. Zudem wurden die Sequenzen von DNA und Proteinen mit Hilfe der Internetpräsenzen vom "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), von ENSEMBL (<http://www.ensembl.org>) und von ExpASY (<http://www.expasy.org/>) analysiert.

6.2.13.7 Modifikation von DNA

Glättung überhängender einzelsträngiger DNA-Enden

Viele Restriktionsendonukleasen können bei dem Verdau von DNA-Molekülen 3'- oder 5'-überhängende Enden erzeugen. Häufig sind die neu gebildeten Enden von DNA-Fragmenten, die später verbunden werden sollen, nicht kompatibel. In diesen Fällen können die Enden durch Auffüllen (5'-überhängende Enden) mit Hilfe des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I aus *E. coli* oder durch Abbau (3'-überhängende Enden) mittels der T4 DNA-Polymerase des Bakteriophagen T4 geglättet werden. Beispielsweise um die 5'-überhängenden Enden zu glätten, wurden zu 10 µl Reaktion jeweils 1 µl hochsalz 10x Restriktionpuffer, 0,5 µl dNTPs (2 mM), 4,5 µl Wasser und 1,0 µl Klenow-Enzym (2 U/µl) zugegeben. Der Ansatz wurde für 15 min bei 37°C inkubiert. Das Klenow-Enzym wurde durch eine fünfzehnminütige Inkubation bei 75°C inaktiviert. Die wie oben behandelte DNA konnte anschließend für eine Ligation eingesetzt werden.

Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten

Die Entfernung von freien 5'-Phosphatgruppen von der Vektor-DNA (Dephosphorylierung) vermindert die Wahrscheinlichkeit einer intramolekularen Verknüpfung (Religierung). Die terminalen 5'-Phosphorylgruppen von dsDNA können durch eine Behandlung mit dem Enzym alkalische Phosphatase (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*) CIAP oder *Calf*

Intestinal Phosphatase, CIP) entfernt werden. Eine Unit (U) der CIP ist definiert als die Menge an Enzym, die erforderlich ist, um 1 μM p-Nitrophenolphosphat in 1 Minute bei 37°C zu Nitrophenol zu hydrolysieren. Um die 5'-Phosphorylgruppen von DNA-Fragmenten zu entfernen, wurden 1-2 U der CIP zu einem komplettierten DNA-Verdau hinzugefügt und für max. 20 min inkubiert. Die CIP wurde mit NEB-, Roche- und Promega-kompatiblen Puffern verwendet. Das geschnittene DNA-Fragment wurde über ein Gel oder eine QiaQuick-Säule aufgereinigt, da eine hitzeinaktivierung der CIP nicht möglich ist.

Phosphorylierung von 5'-hydroxylierten Enden durch Polynukleotidkinase

Das Enzym Polynukleotidkinase (PNK) überträgt die terminale Phosphatgruppe γPi von ATP auf das 5'-OH Ende von DNAs, RNAs und einzelsträngigen Oligonukleotiden. Für die Transferreaktion von γPi auf das 5'-OH Ende wurde ATP in eine Endkonzentration von 1 mM eingesetzt.

Eine typische Reaktionszusammensetzung für Oligonukleotide enthält:

1 μl dsOligonukleotid (~ 50 pmol)

5 μl 10x Puffer

1 μl ATP 50 mM (f.c. 1 mM)

1 μl PNK (10 U)

42 μl H₂O

Der Ansatz wurde für 30 min inkubiert und die PNK anschließend bei 70°C für 10 min hitzeinaktiviert.

Ligation von DNA

Die Ligation führt zu einer intra- oder intermolekularen Verknüpfung freier DNA-Enden und kann zwischen überhängenden oder glatten Enden stattfinden.

Das Enzym DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphoryltermini doppelsträngiger DNA in Anwesenheit der Mg^{2+} -Ionen und ATP. In einem 10 – 20 μl Ligationsansatz wurden Vektor-DNA (50-100 ng) und Insert-DNA (150-300 ng) in einem molaren Verhältnis von 1:3 zusammen mit 1,5 U T4-DNA-Ligase und 1-2 μl des vom Hersteller mitgelieferten 10x ATP-haltigen Puffers eingesetzt. Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte bei 4°C für 12-16 h, bei 16°C für 12 h oder bei Raumtemperatur für 4 h. Die Reaktion wurde durch 10-minütiges Erhitzen auf 65°C gestoppt.

6.2.13.8 Klonierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden über Agarosegele und mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen, Düsseldorf) aufgereinigt oder direkt für MultiGateway-Cloning angesetzt. Die PCR-Produkte wurden entweder mit Restriktionsenzymen geschnitten und in den entsprechenden Ligationsansatz oder direkt nach dem Aufreinigen für eine Ligation in pGemT oder pGemT Easy (Promega, Mannheim) eingesetzt. Die Reaktion findet hierbei zwischen Adenosinüberhängen, die die Taq-Polymerase während der PCR-Reaktion an 3'-Enden anfügt, und Thymidinüberhängen am 5'-Ende von einem pGemT oder pGemT easy Vektor statt. Im Fall der Verwendung einer *Proofreading*-Polymerase (Pfu-Polymerase, Stratagene), die eine 3'-Exonucleaseaktivität aufweist, mussten die Adenosinüberhänge in einer zweiten Reaktion mit einer Taq-Polymerase angefügt werden. Dazu wurden 25 μl des aufgereinigten PCR-Produktes mit 5 μl 10x Puffer, dATP (f.c. 0,2 mM) und 5 U Red-Taq-Polymerase in einem Endvolumen von 50 μl für 10 min bei 37°C inkubiert und über eine QiaQuick-Säule aufgereinigt. Für eine Ligationsreaktion wurden 5-7 μl des aufgereinigten Produktes eingesetzt.

6.2.13.9 Amplifikation von DNA in der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ermöglicht die Vervielfältigung (Amplifikation) von spezifischen DNA-Fragmenten *in vitro* (Mullis *et al.*, 1986). Als Ausgangsmaterial (Matrize) reichen schon geringe Mengen an DNA, weshalb sich diese Methode zum Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen in einem heterogenen Nukleinsäuregemisch eignet. Die DNA-Synthese wurde durch die Anlagerung von zwei DNA-Oligonukleotiden (*Primer*), die die zu amplifizierende Sequenz flankieren, gestartet. Einer der sequenzspezifischen Primer lagerte

sich als *sense* Primer auf dem Plus-Strang der DNA an, der andere als *anti-sense* Primer auf dem Minus-Strang. Die Synthese wurde katalysiert von Taq-Polymerasen (aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*) oder *Proofreading*-Polymerasen (z.B. Pfu, Stratagene; Phusion, NEB). Die *Proofreading*-Polymerasen besitzen eine Korrekturlesefunktion mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität und sind somit in der Lage, die Fehlerrate um eine Potenz auf ca. eine Mutation pro 106 Nukleotide zu senken. Die Matrizen-DNA wurde bei 95°C denaturiert (*denaturation*), bei typischerweise 55 – 60°C wurde die Anlagerung der Oligonukleotide an die DNA-Vorlage (*annealing*) durchgeführt und bei 72°C synthetisierte die DNA-Polymerase die neue DNA mit einer Synthesegeschwindigkeit von 500 bis 1000 bp/s. In jedem Zyklus wird die Menge der Matrizen-DNA verdoppelt, was zu einem exponentiellen Wachstum der Zahl der DNA-Moleküle führt. Je nach DNA-Matrize (z.B. Plasmid, cDNA, genomische DNA) wurden 15 bis 36 Zyklen durchgeführt. Zum Schluss der Reaktion erfolgte die finale Verlängerung (*final extension*) bei 72°C, um unvollständige DNA-Stränge zu vervollständigen.

Ein typischer 20 µl PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

x µl DNA-Matrize (10 – 100 ng)
 1 µl *sense* Primer (10 pmol/µl)
 1 µl *anti-sense* Primer (10 pmol/µl)
 2 µl 10x Puffer (mit MgCl₂)
 2 µl dNTPs (f.c. 0,2 mM)
 0,8 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)
 ad 20 µl dd H₂O

Das Volumen eines PCR-Ansatzes lag bei 20 µl (Genotypisierung) oder 50 µl (präparative PCR).

Im Folgenden ein Standard-Amplifikationsprotokoll für eine PCR-Reaktion mit frei wählbarer Zykluszahl:

3 min	95°C initiale Denaturierung	} Zyklus (15 bis 36 mal wiederholt)
30 s	56°C <i>annealing</i>	
60 s	72°C Extension	
30 s	95°C Denaturierung	
60 s	55°C Schluss- <i>annealing</i>	
10 min	72°C Schlussexension	

Nach Beenden der Reaktion wurde der PCR-Ansatz auf 4°C abgekühlt. Die PCR-Protokolle variierten durch Änderungen der *annealing*-Temperatur, Dauer der einzelnen Zyklen und Anzahl der Zyklen. Sie wurden daher an die entsprechenden Primer angepasst.

6.2.13.10 DNA-Amplifikation mit TempliPhi™

Die DNA-Amplifikation mit TempliPhi™ ermöglicht, ausgehend von einem in Pikogramm-Mengen eingesetzten, zirkulären dsDNA Molekül, ein lineares DNA-Molekül herzustellen. Grundlage für die DNA-Amplifikation mit TempliPhi™ sind die Phi29-DNA-Polymerase des Bakteriophagen Phi, die eine 3'-5'-Korrekturlesefunktion besitzt, und *random hexamer primer* (Dean *et al.*, 2001). Es wird über eine *rolling circle* Amplifikation, die exponentiell und isothermal bei 30°C verläuft, ein lineares DNA-Molekül produziert, so dass bereits nach 6 h Mikrogramm-Mengen an DNA zur Verfügung stehen. Dieses Produkt kann in DNA-Restriktionsverdau, Sequenzierungen und Transfektionen mittels Lipofectamine 2000 weiter eingesetzt werden. Da die TempliPhi-Reaktion auch direkt mit dsDNA von einer Bakterienkolonie aus gestartet werden kann, vereinfacht sich die Suche nach einem korrekten Klon bei schwierigen Klonierungen enorm.

TempliPhi-Amplifikationsprotokoll:

Eine Kolonie wurde gepickt und in 5 µl Denaturierungs-Puffer aufgenommen, 3 min bei 95°C denaturiert und für 4 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden 5 µl TempliPhi-Premix hinzugegeben und es folgte eine Amplifikation bei 30°C für 6 bis 18 h (nach 8 h wird ein Plateau erreicht). Zum Schluss wurde der Ansatz für 4 min bei 90°C denaturiert. Das Gemisch wurde auf 30 µl mit sterilem Wasser aufgefüllt und die lineare DNA mittels Restriktion, Sequenzierung und Transfektion analysiert.

6.2.14 Reverse Transkription zur Synthese von cDNA

Nach Isolierung der Gesamt-RNA aus Gewebe wurde die cDNA mit Hilfe von Oligo-dT Startmolekülen (*primer*) revers mittels der reversen Transkriptase (aus dem *Moloney murine leukemia virus*) transkribiert. Zuerst wurde einzelsträngige cDNA (*single-stranded cDNA*, ss cDNA) synthetisiert; es wurde ein Kit von Invitrogen verwendet. Die ss cDNA wurde in eine PCR-Reaktion eingesetzt, um die gewünschte doppelsträngige cDNA (*double-stranded cDNA*, ds cDNA) zu erhalten. Pro Reaktion wurde eine Gesamtmenge von 5 bis 10 µg RNA eingesetzt. Für eine effizientere reverse Transkription in 5'-mRNA-Bereichen wurde zusätzlich, außer Oligo-dT-Primern, die am Beginn des poly-A-Schwanzes der RNA ankern, ein *random primer* eingesetzt – eine Mischung aus 9 oder 15 Nukleotiden langen Primern. Das Verhältnis von Oligo-dT- zum *random*-Primer lag bei 1:200.

cDNA-Synthese-Protokoll:

x µl RNA
2 µl T7 dT Primer/random Primer Mix (0.6pmol/120mol)

Zunächst wurde die Gesamt-RNA mit Primern versetzt und der Ansatz bei 70°C für 2 min inkubiert.

Auf Eis wurden folgende Komponenten hinzugegeben:

4 µl 5x 1st Strand Puffer
2 µl DTT 0,1 M
1 µl dNTPs (10 mM)
1 µl Superscript III
ad 20 µl H₂O

Die Reaktion wurde für 10 min bei RT inkubiert, danach 30 min bei 50°C und anschließend für 30 min bei 55°C. Die cDNA wurde, bevor sie für RT-PCR eingesetzt wurde, zu einer gewünschten Konzentration mit sterilem Wasser verdünnt (standardmäßig 1:200).

6.2.15 Die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Real-Time PCR beruht auf dem Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion und ermöglicht eine Quantifizierung des entstehenden Produktes. Der fluoreszierende Farbstoff SYBRGreen (Applied Biosystems), der zu der Reaktion zugegeben wird, besitzt die Fähigkeit, in die ds cDNA zu interkalieren. Die Fluoreszenz nimmt proportional zu der Menge des gebildeten Produkts zu. Wird seine Fluoreszenz gemessen, bekommt man eine präzise Information über die Quantität des RT-PCR-Produktes.

Zur quantitativen Analyse von endogener RNA wurde diese zunächst in einzelsträngige cDNA (ssDNA) umgeschrieben (siehe Synthese von cDNA). 5 ng ssDNA wurden pro Real-Time-PCR-Ansatz eingesetzt. Der Farbstoff SYBRGreen® (Applied Biosystems), der in das synthetisierte DNA-Produkt interkalierte, wurde zur Quantifizierung des PCR-Produktes verwendet. Die Real-Time-PCR selbst wurde in speziellen lichtdurchlässigen Real-Time-PCR-96-Loch-Platten im Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) durchgeführt. Der Website von Roche Universal Probe Library (www.roche-applied-science.com) wurden entsprechende spezifische Sequenzen von RT-PCR Primern entnommen. Die mRNA-Menge jeder Probe wurde mit der Menge der mRNA des Standardgenes (*housekeeping genes*) wie β-Aktin, ATP5b, Dnmt1 oder Cyc1 verglichen, um die relative Genexpressionsbestimmung zu ermöglichen.

Ein typischer 10 µl RT-PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

4 µl ssDNA
5 µl 2x Master-Mix (enthält SYBRGreen® und Taq-Polymerase)
0,1 µl Vorwärts-Primer
0,1 µl Rückwärts-Primer
0,6 µl H₂O

Zur statistischen Auswertung wurden mit Hilfe des Programms *7500 Fast System SDS Software* die Ct-Werte des verwendeten Standardgens von denen der untersuchten Gene subtrahiert, so dass dCt-Werte entstanden. Diese wiederum wurden de-logarithmiert ($1/(dCt^2)$), um die exponentielle Natur der PCR wiederzuspiegeln.

Die PCR wurde mit folgendem Standardprogramm durchgeführt:

10 min	95°C, Aktivierung der Polymerase, initiale Denaturierung
15 s	95°C, Denaturierung
1 min	60°C, <i>annealing</i> und Extension

Statistische Auswertung

Das Excel-Makro qBase (<http://medgen.ugent.be/qbase/>) wurde zur Auswertung der Daten verwendet. Die Ct-Werte wurden abstrahiert und der höchste Wert gleich 1 gesetzt. Durch Teilung der Roh-Werte jeder Probe durch den Normalisierungsfaktor (geometrischer Mittelwert der Referenzgene) erhielt man die normalisierten Expressionslevel.

Die Standardabweichung wurde folgendermaßen berechnet:

$$Q = E^{\Delta Ct}$$

Q = Quantität (Wert) der Probe relativ zur Probe mit der höchsten Expression

E = Amplifikationseffizienz (2 = 100%)

$$\Delta Ct = \min Ct - \text{sample Ct}$$

Standardabweichung für die relative Quantität Q:

$$SD Q = E^{\Delta Ct} \times \ln E \times SD \text{ sample Ct}$$

$\ln E$ = Logarithmus naturalis

SD sample Ct = Standardabweichung der Ct-Werte innerhalb der Replikate

Berechnung des Standardfehlers:

$$SEM = SD / \sqrt{n}$$

n = Anzahl der Messungen/Replikate

Für komplexere Auswertungen, bei denen mehrere Gruppen von Einzelwerten miteinander verglichen wurden, wurde die Signifikanz mit Hilfe der zweifaktoriellen ANOVA (*analysis of variance*)-Methode berechnet. Dabei wurden die Interaktionen zwischen Zeit und Standardgen sowie zwischen Zeit und Genotyp (*in vivo*-Kinetiken) erfasst. Die Varianzanalyse erlaubt es, die Gesamtvarianz auf Behandlung und Fehler aufzuteilen. Der Quotient der beiden Varianzen wird F-Faktor genannt. Je höher er ist, desto größeren Einfluss hatte die Behandlung auf die Messdaten. Die erste Zahl in der Klammer bezeichnet den F-Faktor, zusätzlich sind die Freiheitsgrade (definiert als n-1 mit n = Anzahl der Messungen) angegeben, z. B. (ANOVA (49,26;3)). Der *p*-Wert (auch Überschreitungswahrscheinlichkeit oder Irrtumswahrscheinlichkeit genannt) gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass (unter Annahme der Gültigkeit der Nullhypothese H₀) die gewonnenen Daten rein zufällig entstanden sind. Darüber hinaus wurde der konservative Posteriortest von Bonferroni angewendet, um die Signifikanz der einzelnen Gruppen untereinander zu bestimmen mit $p < 0,001$ ***, $p < 0,01$ **, $p < 0,05$ * und $p > 0,05$ n.s (nicht signifikant).

6.2.16 Microarray-Analyse

Die Microarray-Analyse wurde von Carolin Stünkel nach den Angaben des Herstellers (Affymetrix) durchgeführt. Die gewonnenen Daten wurden von Sven Wichert ausgewertet.

6.2.17 Rekombination von DNA mit dem GATEWAY und Multisite GATEWAY-System

Rekombination von DNA mit dem GATEWAY-System

Das GATEWAY-Rekombinationssystem ermöglicht einen einfachen und schnellen Transfer von DNA-Fragmenten zwischen Vektoren ([Hartley et al., 2000](#)).

Der strategische Vorteil dieses Systems einem klassischen System gegenüber liegt in der effizienten Fusion mittels Rekombination von einem gewünschtem ORF mit einem ORF-Anhang (*tag*), z.B. EYFP, 3xFlag usw., wobei dieser *tag* N- und C-terminal an den gewünschten ORF fusioniert werden kann. Das GATEWAY-System beruht auf einem modifizierten λ -Rekombinationssystem und enthält acht verschiedene Rekombinationssequenzen, die in Paaren angeordnet sind (attB1/attB2, attP1/attP2,

attL1/attL2, attR1/attR2), was eine Orientierungs- und Ortsspezifität der Rekombination ermöglicht. Es können jeweils zwei Paare miteinander rekombinieren (B1/B2 mit P1/P2, wobei B1 mit P1 rekombiniert, sowie L1/L2 mit R1/R2 usw.). Bei der Rekombination entstehen die jeweils komplementären zwei Paare. Die Verwendung von verschiedenen Resistenzgenen (positive Selektion) und dem Todesgen *ccdB* (negative Selektion) ermöglicht die gleichzeitige Handhabung mit verschiedenen Vektoren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das GATEWAY-System für die Konstruktion von Säugerzell-kompatiblen Expressionsvektoren verwendet.

Zunächst wurde ein PCR-Produkt, das den gewünschten ORF enthielt und von den Sequenzen B1 und B2 flankiert war, mit einem Donor-Vektor (pDONR), der die Sequenzen P1 und P2 enthielt, in einer BP-Reaktion zu einem Entry-Klon (pENTR) und einem nichtreplizierbarem Nebenprodukt rekombiniert. Der entstehende Entry-Klon diente dann als zentraler Ausgangsklon, um den ORF in Expressionsvektoren zu klonieren und enthielt L1- und L2-Sequenzen, das Nebenprodukt wies R1- und R2-Sequenzen auf. Weiterhin wurde der rekombinierte Entry-Klon in DH10B *E.coli*-Zellen transformiert, amplifiziert und isoliert. Die Richtigkeit des PCR-amplifizierten ORFs wurde in diesem Vektor durch Sequenzierung überprüft. Weiterhin wurden ein Destinationsvektor und ein Entry-Klon in einer zweiten Rekombination (LR-Reaktion) zu einem Expressionsvektor wie folgt umgewandelt:

Der den gewünschten ORF tragende Entry-Klon wurde mit einem Destinations-Vektor (pDEST, enthält R1- und R2-Sequenzen, das Todesgen *ccdB* und eine andere Resistenz als pENTR) in eine zweite Art von Rekombination eingesetzt, die LR-Reaktion. Es ergaben sich zwei verschiedene Produkte: der gewünschte Expressionsklon (mit B1 und B2 Sequenzen) und ein Nebenprodukt (mit P1- und P2-Sequenzen). Der Letzte ließ sich aufgrund des *ccdB*-Gens nicht in DH10B *E.coli*-Zellen amplifizieren. Die hier verwendeten Vektoren enthielten folgende Resistenzgene:

pDONR und pENTR: Gentamycin-Resistenz

pDEST und pEXPR: Ampicillin- oder Kanamycin-Resistenz

Für die Rekombinationsreaktionen wurden folgende Schemata verwendet:

BP-Reaktion:

- 3 µl B1/B2 PCR
- 1 µl pDONR (100 ng/µl)
- 1 µl BPII-Clonase/5x BPII-Puffer Mix

LR-Reaktion:

- 1 µl pENTR (Mini-DNA)
- 2 µl pDEST (100 ng/µl) – linearisiert oder nicht-linearisiert
- 1 µl H₂O
- 1 µl LR II-Clonase/5x LR II-Puffer Mix

Beide Reaktionen wurden für 2 h bzw. über Nacht bei RT inkubiert. Für die Transformation in DH10B *E.coli*-Zellen wurden 2 µl, in XL1Blue *E.coli* Zellen 5µl der jeweiligen Reaktion eingesetzt. Beim Auswählen der Primer für die Amplifikation des gewünschten ORFs wurden folgende Aspekte beachtet: jeder Primer bestand aus einer Rekombinationssequenz (B1 oder B2), einer Matrizen-spezifischen Sequenz (M-sS) und ggf. einer Kozak-Sequenz oder einem Stopcodon.

Ein ORF konnte entweder N-terminal oder C-terminal an einen Expressions-tag fusioniert werden, so dass entweder *N-open* oder *C-open* ORFs konstruiert wurden.

Dementsprechend benötigten *N-open* ORFs einen offenen N-Terminus und ein Stopcodon, *C-open* ORFs dagegen brauchten eine Kozak-Sequenz für den Translationsstart (ACCATG) und einen offenen C-Terminus.

Primer-Design für *N-open*-ORFs; die unterstrichenen Nukleotide repräsentieren die Rekombinationssequenzen:

B1-Primer: 5'-GAGA ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TCT ... (M-sS)-3'

B2-Primer (*sense*-Strang): 5'- (M-sS) ... TGA GAC CCA GCT TTC TTG TAC AAA GTG GT GAGA-3'

Primer-Design für C-open-ORFs:

B1-Primer: 5'-GAGA ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TCT ACC ATG... (M-sS)-3'

B2-Primer (*sense*-Strang): 5' - (M-sS) ... GAC CCA GCT TTC TTG TAC AAA GTG GT GAGA-3'

M-sS: Martizen spezifische Sequenz

MultiSite Gateway: 3 –Fragment Rekombination

Das MultiSite Gateway System wurde auf Grundlage des oben vorgestellten Gateway Systems weiterentwickelt. Die spezifischen Rekombinationssequenzen wurden erweitert, sodass eine gleichzeitige Rekombination von drei Entry Klonen in einen Dest-Vektor möglich ist (Multisite-LR-Reaktion).

MultiSite B-site Primer:

B1-Primer_for 5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCT 3'

B4-Primer_rev 5' GGGGCAACTTTTGTATAGAAAAGTTG 3'

B4r-Primer_for 5' GGGGCAACTTTTCTATACAAAAGTTG 3'

B3r-Primer_rev 5' GGGGCAACTTTTATTATACAAAAGTTG 3'

B3-Primer_for 5' GGGGCAACTTTGTATAATAAAGTTG 3'

B2-Primer_rev 5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC 3'

Für einen typischen Ansatz für die MultiSite-LR-Reaktion wurden die folgenden Komponenten zusammenpipettiert:

1 µl pENTR attL1-attL4 5 fmol/10 ng

1 µl pENTR attR4-attR3 5 fmol/10 ng

1 µl pENTR attL3-attL2 5 fmol/10 ng

1 µl pDEST attR1-attR2 10 fmol/45 ng

1 µl LR-Clonase II Plus/Puffer Mix

Die genauen Funktionsweisen, Strategien und Protokolle können im Handbuch des Herstellers (GATEWAY-Manual, Invitrogen) eingesehen werden.

6.3 Zellbiologische Methoden

6.3.1 Kultivieren und Passagieren von Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete eukaryontische Zelllinien wurden zur Bildung eines konfluenten Zellrasens in sterilen Plastikschalen (150 mm Durchmesser, Falcon) kultiviert. Zum Passagieren wurde das Medium vollständig abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2,5 ml Trypsin/EDTA bei 37°C im Zellkulturinkubator inkubiert. Nach 1 bis 3 min wurde die Reaktion mit 5 ml des jeweiligen Zellkulturmediums abgestoppt, die Zellen durch sorgfältiges Pipettieren mit einer Glaspipette vereinzelt und in einer gewünschten Verdünnung auf einer neuen Zellkulturschale mit 25 ml Medium ausgesät. Zum Passagieren von empfindlichen Zelllinien (z.B. PC12) wurden sie nur in PBS aufgenommen und mechanisch vereinzelt.

6.3.1.1 Kryokonservierung und Auftauen von Zelllinien

Kryokonservierung der Zellen

Die zu konservierenden Zellen wurden auf einer 150 mm Zellkulturschale bis zur Konfluenz kultiviert. Nach Vereinzeln der Zellen (s.o.) wurden sie in ein mit 30 ml Zellkulturmedium gefülltes Falcon-Röhrchen transferiert und für 5 min bei 800 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in der gewünschten Menge Medium (üblicherweise 2 ml) aufgenommen, resuspendiert und jeweils 0,5 ml der Zellsuspension auf das in Kryoröhrchen vorgekühlte 0,5 ml 2x Einfriermedium (1:1) gegeben. Die Kryoröhrchen wurden dreimal invertiert und zunächst für

1 h bei -20°C und weiterhin über Nacht bei -80°C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die Zellen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Von einer konfluenten 150 mm Schale (ca. 5×10^6 Zellen) ergaben sich 4 Kryoröhrchen.

Auftauen der kryokonservierten Zellen

Ein Aliquot der in flüssigem Stickstoff (-196°C) kryokonservierten Zellen wurde schnell im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Weiterhin wurden die Zellen in 30 ml Zellkulturmedium aufgenommen und bei 800 rpm für 5 min bei 4°C zentrifugiert, um sie zu waschen und das DMSO zu entfernen. Im Anschluss folgte das Resuspendieren des Zellsediments in 1 ml des jeweiligen Zellkulturmediums und die Aussäung der Zellen auf eine 60 mm Zellkulturplatte.

6.3.1.2 Beschichtung von Zellkulturschalen mit Poly-L-Lysin

Häufig wird die Kultivierung der Zellen dadurch erschwert, dass manche Zelllinien (z.B. PC12) geringe Adhäsionsfähigkeit aufweisen. Aus diesem Grund wurden die Zellkulturschalen mit positiv geladenen Poly-L-Lysin (PLL) beschichtet, was den negativ geladenen Zuckerstrukturen der Zelloberfläche eine Bindung an die Schale ermöglichte. Zur Beschichtung wurden die Zellkulturschalen bei RT für 15 bis 20 min mit 0,02 mg/ml (f.c.) PLL in H_2O inkubiert, dreimal mit sterilem Wasser gewaschen und unter dem Abzug getrocknet. Zur Sterilisierung der Schalen folgte eine einstündige Bestrahlung mit UV-Licht.

6.3.2 Transfektion der DNA in eukaryontische Zellen

Transfektion ist ein Prozess, in dem exogene Nukleinsäuren in eine eukaryontische Zelle durch biochemische oder physikalische Methoden eingebracht werden.

6.3.2.1 DNA-Transfektion in eukaryontische Zellen mit Lipofectamine 2000

Das Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000 bildet mit der zugegebenen DNA Komplexe (Liposomen), in denen die zu transferierende DNA eingeschlossen wird. Die Liposomen fusionieren mit der Zellmembran und gelangen durch Endozytose in die Zellen ([Felgner et al. 1987](#)). Die ionische Wechselwirkung zwischen der positiv-geladenen Kopfgruppe der Lipide und der negativ-geladenen Phosphatgruppe der Nukleinsäuren vermittelt die Bildung der Nukleinsäure/Lipid-Komplexe. Für die Transfektion ist das Verhältnis zwischen Lipiden und DNA entscheidend, wobei die Lipide im Überschuss zur DNA eingesetzt werden sollten. Die Transfektion der Zellen wurde nach Angaben des Herstellers Invitrogen durchgeführt. Bei PC12-Zellen wurde die Transfektion in DMEM mit 5% Pferdeserum durchgeführt, bei allen anderen Zelllinien in regulärem Wachstumsmedium. Bei 24-Loch-Platten wurden pro Loch 0,5 – 1 μg DNA mit 1,5 μl Lipofectamine 2000 gemischt, bei 96-Loch-Platten pro Loch 200 – 400 ng DNA mit 0,2 μl Lipofectamine 2000. Die DNA und Lipofectamine 2000 wurden in jeweils 1 ml OptiMEM (Invitrogen) vermischt und für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Liposom/DNA-Gemisch auf die Zellen gegeben. 24 bis 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert.

6.3.2.2 DNA-Transfer in eukaryontische Zellen mit Elektroporation

Bei der Elektroporation wird durch ein äußeres elektrisches Feld ein transmembranes elektrisches Feld bei den Zellen induziert. Dies ruft lokale Instabilitäten in der Zellmembran hervor, sog. „Elektroporen“. Während dieser Instabilitätsperiode es besteht für die zugegebene DNA eine Möglichkeit, in die Zelle zu gelangen. Bei der Verwendung optimaler Elektroporationsparameter, erholen sich die Zellen nach dem elektrischen Puls wieder und können weiter in Kultur gehalten werden. Zur Elektroporation von COS-Zellen wurden pro Ansatz $2\text{-}3 \times 10^6$ Zellen in 300 μl Elektroporationspuffer aufgenommen und in die Elektroporationsküvetten (4 mm, BioRad) überführt. Es folgte eine Elektroporation (mit den Parametern 1,7 kV, 200 Ohm und 25 μF) in einem GenePulser (BioRad). Anschließend wurden die Zellen unter Standardbedingungen für 24 bis 48 h kultiviert.

6.3.3 Luciferase-Reporterassays

Reporter gene sind DNA-Sequenzen, die aus einem induzierbaren oder konstitutiven Promotorelement bestehen, das die leicht messbare Expression eines Proteins kontrolliert, und einer dieses Protein kodierenden Sequenz. Durch Messung der Aktivität des Reporterproteins kann eine indirekte Transkriptionsaktivität der Promotorsequenz unter bestimmten Bedingungen (wie z.B. Ko-Transfektion von miteinander interagierenden Transkriptionsfaktoren) festgestellt werden. Die Luciferase-Reporterassays beruhen auf der aktivierten Genexpression oder direkten Aktivierung einer Luciferase (Reporterprotein), die als Enzym eine Reaktion von einem Substrat (Luciferin) unter ATP-Verbrauch in ein messbares Lichtsignal und ADP katalysiert. Die Menge an Lichtsignal ist dabei proportional zur Bildung von Luciferase-Protein. In diesem *assay* wird die Aktivität von zwei Luciferasen gemessen. Der zu analysierende Promotorbereich kontrolliert die Expression der *Firefly*-Luciferase, eines Enzyms des nordamerikanischen Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*). Zur internen Kontrolle der Transfektionseffizienz wird die Aktivität der *Renilla*-Luciferase, eines Enzyms der Seeanemone (*Renilla reniformis*), gemessen. Die Expression der *Renilla*-Luciferase erfolgt aufgrund des SV40-Promotors konstitutiv und wird daher nur durch die Effizienz der Transfektion beeinflusst.

In dieser Arbeit wurden die Luciferase-Reporterassays in PC12-Zellen sowie in primären, kortikalen und hippocampalen Neuronen der Maus im 96-Loch-Platten-Format durchgeführt. Je nach Zellart wurde eine unterschiedliche Anzahl von Zellen pro Loch angesät: zwischen 40.000 und 50.000 der PC12-Zellen und zwischen 60.000 und 80.000 der primären Neuronen. Nach Transfektion sämtlicher DNAs mit Lipofectamine 2000 wurden die Zellen zwischen 24 bis 48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zur Messung der Luciferaseaktivität wurden pro Loch auf die Zellen 40 µl 1x passive-Lyse-Puffers (*Passive Lysis Puffer*, Promega) gegeben und unter 20-minütigem Schütteln bei RT und 250 rpm lysiert und das gesamte Lysat mit Hilfe einer 8-Kanal-Pipette in eine weiße blickdichte 96-Loch-Platte überführt.

Technische Einstellungen der Messung:

75 µl Substrat für *Firefly Luciferase*, Reaktionszeit 1,6 s; Integration der Licht-Werte über 6,0 s (Neurone: 8,0 s); Wartezeit von 6,0 s.

75 µl Substrat für *Renilla Luciferase* (gleichzeitig Stop-Lösung für *Firefly Luciferase*), Reaktionszeit 2,0 s; Integration der Lichtwerte über 6,0 s (Neurone: 8,0 s).

Pro Loch wurden zwischen 75 und 300 ng DNA eingesetzt. Zusätzlich wurde jedem Loch zur internen Transfektionskontrolle 10 ng einer *Renilla Luciferase*-Mischung zugegeben, der als optische Transfektionskontrolle CMV-getriebenes EYFPnuc Konstrukt und auch die Plasmide der humanen *Renilla Luciferase* unter den drei Promotoren SV40, TK und CMV im Verhältnis 10:2:1 (SV40:TK:CMV) enthielt. Diese Kombination von Promotoren wurde verwendet, um eine Interferenz bei der Transkription zu den anderen transfizierten Plasmiden, die alle einen CMV Promotor aufwiesen, zu vermeiden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Microlumatplus 96V (Berthold) und des Programms WinGlow (Berthold).

Statistische Auswertung:

Bei der Auswertung der Daten mit Hilfe der Programme WinGlow und Excel wurde zur Normalisierung der *Firefly*-Wert durch den *Renilla*-Wert geteilt und mit 100 multipliziert, so dass ein relativer Luciferase-Wert entstand (*relative luciferase unit, RLU*). Alle Ansätze wurden in technischen Replikaten von n=6 durchgeführt. Als Resultate wurden die folgenden Parameter berechnet und graphisch dargestellt: der Mittelwert und der Fehler des Mittelwertes (*standard error of the mean, SEM*; Kalkulation über Standardabweichung/ \sqrt{n}) sowie ggf. die Signifikanz ($p \leq 0,05$) mit Hilfe des T-Tests (doppelseitig, 2 Proben mit gleicher Varianz).

6.3.4 Präparation von primären Neuronen der Maus

Gehirne von Mausembryonen (E14-E18) wurden in kaltem HBSS+ auf Eis präpariert und zwischengelagert. Nach Isolierung der Hippokampi und Kortices folgte die Entfernung der Meningen bei Ansicht unter einem Binokular und Transfer in ein mit kaltem HBSS+ gefülltes 15 ml Falcon-Röhrchen (auf Eis, zur Zwischenlagerung). Im Weiteren wurde das HBSS+ entfernt, 2,5 ml Trypsin-EDTA (in BME) zugegeben und zweimal rauf und runter pipettiert. Nach Zugabe von 1 ml DNaseI (0,05% in HBSS) und einmaligem Triturieren mit der

Pasteurpipette folgte eine 10-minütige Inkubation der Gehirnstückchen bei RT. Danach wurde erneut zweimal mit der Pasteurpipette trituriert. Optional wurde das Trypsin mit 10% HS oder FCS inaktiviert. Zum Waschen der Neuronen wurden 12 ml HBSS+ hinzugefügt und die Zellen für 10 min bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, das Neuronenpellet in 1 ml DNaseI aufgenommen und einmal mit einer unbehandelten, viermal mit einer grob ausgezogenen und schließlich zweimal mit einer fein ausgezogenen Pasteurpipette trituriert. Anschließend wurden die Neurone erneut mit 10 ml HBSS+ gewaschen, bei 800 rpm abzentrifugiert und in 2 bis 3 ml Neurobasalmedium (Gibco) mit Zusätzen (B27-Supplement, Gibco; MK801, Tocris; NGF, Promega; FGF, PeproTech) aufgenommen. Nach Bestimmung der Zahl der Neuronen in einer Neubauer-Kammer (Marienfeld) wurden sie in gewünschter Dichte in mit Poly-D-Lysin (Sigma) beschichteten entsprechenden Zellkulturplatten ausgesät (500.000 Neuronen pro Loch einer 24-Loch-Platte; 60.000 bis 80.000 Neuronen pro Loch einer 96-Loch-Platte) und bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

6.4 Proteinbiochemische Methoden: Isolierung und Nachweis von Proteinen

6.4.1 Herstellung der Proteinlysate

6.4.1.1 Gewinnung von Proteinextrakten aus Säugetierzellen

Zur Gewinnung von Proteinextrakten aus COS-Zellen wurden die konfluent mit Zellen bewachsenen 100 mm Zellkulturschalen mit PBS gewaschen und mit 500 µl Lysepuffer (RIPA-Puffer mit 0,1% SDS) oder mit 500 µl NuLyB zur Gewinnung der nukleären Proteinlysate für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend mit einem Zellschaber von den Schalen mechanisch entfernt. Nach mehrmaligem Hoch- und Runter-Pipettieren des Lysates folgte eine Ultraschallbehandlung zum Zerkleinern der genomischen DNA. Dazu wurde jede Probe dreimal für 10 s in einem Bandelin Sonoplus Ultraschallgerät sonifiziert. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 min bei 4°C zur Sedimentierung der Zellreste. Der proteinhaltende Überstand wurde bei -80°C eingefroren und bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

6.4.1.2 Gewinnung von Proteinextrakten aus Geweben

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Proteinexpression des gesamten Kortex, des Hippokampus und selten des Cerebellums der Maus untersucht. Zur Gewinnung der Proteinlysate wurde das auf Trockeneis tiefgefrorene Gewebe mit Hilfe eines Ultrathurrax (IKA Labortechnik, Staufen) je nach Gewebemenge in 500 bis 750 µl NuLyB homogenisiert. Die Ultraschallbehandlung der Homogenate und weitere Schritte wurden in oben beschriebener Weise (siehe: Gewinnung von Proteinextrakten aus Säugetierzellen) durchgeführt.

Anschließend, nach einer Proteinkonzentrationsbestimmung, wurden die Proteinextrakte mit einem 4x Proteinladepuffer versehen und eine 10-minütige Denaturierung der Proteine bei 95°C folgte. Zur Lagerung wurden die Proteinextrakte bei -80°C eingefroren. Wie oben vorbereitete Proben konnten in die SDS-PAGE eingesetzt werden.

6.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen erfolgte nach der von [Bradford \(1976\)](#) beschriebenen Methode. Hierfür wurde der BioRad Protein Assay entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

6.4.3 Western-Blot

Der Western-Blot ermöglicht den immunologischen Nachweis von Proteinen in biologischen Proben ([Towbin et al., 1979](#)). Innerhalb dieser Arbeit wurde der Western-Blot zur Expressionskontrolle des Flag-markierten und des endogenen ME2-Proteins in Kortex, Hippocampus und Cerebellum während der verschiedenen Entwicklungsstadien der

transgenen Mäusen, zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* (mittels Ko-Immunoprecipitationen) und zur Kontrolle der Antikörperspezifität verwendet.

6.4.3.1 Diskontinuierliche und reduzierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Proteine wurden mit Hilfe einer diskontinuierlichen und reduzierenden SDS Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach [Laemmli \(1970\)](#) aufgetrennt.

Aufgrund der unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzung weisen Proteine, im Gegensatz zur DNA, kein lineares Masse-Ladungsverhältnis auf. Durch Erhitzen (Denaturieren) und Zugabe des negativ geladenen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) wird die Polypeptidkette entfaltet und in eine Art „Mizelle“ eingebunden, wobei ein annähernd lineares Masse-Ladungsverhältnis (Stöchiometrie ca. ein SDS-Molekül pro zwei Aminosäureresten) erreicht wird. Die Bildung von intra- und intermolekularen Disulfidbindungen wird durch eine zusätzliche Behandlung mit dem reduzierenden Reagenz β -Mercaptoethanol oder DTT verhindert. Die Gelelektrophorese wurde in einem zweistufigen Gelsystem, bestehend aus einem 3%-igen Sammel- (pH 6,8) und einem 8-12%-igem Trenngel (pH 8,8), durchgeführt. Innerhalb des Sammelgels wurden die Proteine auf eine Ebene gebracht, um später im Trenngel eine exakte Auftrennung zu erreichen.

Für die SDS-PAGE wurde das NuPAGE[®]-Gelelektrophoresesystem (Invitrogen) mit dem Kammersystem XCell-SureLock[™] derselben Firma verwendet. Der genaue Aufbau der Laufkammer und die exakte Durchführung sind eingehend im Begleitheft des Herstellers beschrieben. Die XCell-SureLock[™] Kammer wurde an ein Spannungsgerät angeschlossen. Zunächst wurde der Gellauf bei 80 bis 100 V durchgeführt, bis die Ladepuffer-Bande die Grenze zwischen dem Sammel- und dem Trenngel erreichte. Der weitere Gellauf erfolgte bei 180 bis 200 V.

6.4.3.2 Western-Blot-Aufbau und Durchführung

Der Transfer der im SDS-PAGE Gel aufgetrennten Proteine erfolgte auf eine PVDF-Membran im XCell-SureLock[™]-Western-Blot-System.

Zunächst wurde die PDVF-Membran für 30 s in 100%-igem Methanol aktiviert und danach kurz in Transfer-Puffer gewaschen. Der Blot wurde nach folgendem Schema aufgebaut: in eine Western-Blot-Kammer, die gleichzeitig als Kathode diente, wurden zwei *blotting pads* (Schaumstoffkissen) gelegt, denen ein Filterpapier (z.B. Whatman-Papier), das Gel mit den nach Größe aufgetrennten Proteinen und anschließend die aktivierte PVDF-Transfermembran folgten. Oben schlossen erneut ein Filterpapier und zwei weitere *blotting pads* den Blot-Aufbau ab. Ein Deckel, die Anode, verschloss die Blot-Kammer. Um eine Überhitzung des Systems zu vermeiden, wurde die gesamte Western-Blot-Apparatur in ein Eisbad gestellt. Nach dem Anlegen der Spannung erfolgte der Elektrotransfer der Proteine (für 1,5 h bei 30 V und 400 mA), die während ihres Laufs von der Kathode zur Anode auf der PVDF-Membran durch hydrophobe und elektrostatische Bindungen fixiert wurden. Die Membran wurde dem Blot entnommen und zunächst für 1 h bei RT schwenkend in WB-Blockierungspuffer (5%-igen Magermilch in TBS-T) zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen, anschließend mit primärem Antikörper in entsprechender Verdünnung in WB-Blockierungspuffer für 1 bis 2 h bei RT (optional bei 4°C über Nacht) unter leichtem Schütteln inkubiert. Es folgten sieben Waschschrte bei RT von je 7 min mit TBS-T-Puffer. Bei Verwendung der mit HRP-direktgekoppelten Antikörpern, wie z.B. α -Flag-M2-HRP (Sigma), folgte unmittelbar nach dem Waschen eine Chemilumineszenz-Reaktion. Kamen die klassische Primärantikörper zum Ansatz, folgte eine Inkubation der Membran mit den sekundären HRP-konjugierten Antikörpern (üblicherweise 1:5000 verdünnt in WB-Blockierungspuffer) für 1 bis 2 h bei RT. Nach erneuten sieben Waschschrten von je 7 min mit TBS-T folgte anschließend der Nachweis einer spezifischen Immunreaktivität mittels Chemilumineszenz-Reaktion.

Chemilumineszenz-Reaktion und Immunodetektion

Die PVDF-Membran wurde unter leichtem Schwenken mit einer ECL-Lösung (Perkin-Elmer) für 1 min bei RT nach Angaben des Herstellers inkubiert und in eine Plastiksutzfolie verpackt. Unter Lichtabschluss wurde die Membran abhängig von der Signalstärke zwischen 5 s bis 45 min mit einem ECL-Hyperfilm exponiert, der anschließend maschinell in einem

KODAK-O-MAT entwickelt wurde. Die PVDF-Membranen wurden nach einer Immunodetektion getrocknet und zwischen zwei Whatman-Papierblättern in einer Plastikfolie bei 4°C zur weiteren Behandlung aufbewahrt.

Strippen und Re-Probing

Zur erneuten Proteindetektion mit einem weiteren primären Antikörper (*Re-Probing*, z.B. zum Nachweis der Ladekontrolle mit α -Tubulin) wurde die PVDF-Membran in einem *Stripping*-Puffer für 2 h bei 65°C behandelt und danach zweimal für 20 min mit TBS-T bei RT gewaschen. Die „gestrippte“ Membran wurde im Anschluss bei RT für 1 h im Western-Blot-Blockierungspuffer schwenkend inkubiert. Es folgte eine Behandlung mit Antikörpern wie oben beschrieben.

6.4.3.3 Primär- und Sekundärantikörper für Immunoblotting

Antikörper	Verdünnung
α -Flag-M2-HRP Maus, IgG	1:2000
α -Tcf4 Ziege, IgG	1:500
α -NeuroD N19 Ziege	1:500
α -NDRF Kaninchen, IgG	1:500
α -HA Ratte, IgG	1:1000
α -Aktin Maus, IgG	1:1000
α - α -Tubulin, IgG Maus	1:2500
α -Maus-HRP, IgG	1:5000
α -Ziege-HRP, IgG	1:2000
α -Ratte-HRP, IgG	1:5000

6.4.4 Ko-Immunopräzipitation

Die Immunpräzipitation (IP) erlaubt es, ein bestimmtes Antigen aus einer Vielzahl von Antigenen einer Lösung zu gewinnen. Mittels Ko-IP kann gezielt ein zu untersuchendes Protein mit seinen Interaktionspartnern isoliert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels Ko-IP potentielle Interaktionspartner von ME2 *in vivo* aus kortikalen, hippokampalen und cerebellären Lysaten von Wildtyp-Mäusen gewonnen und mit Hilfe des Western Blots analysiert.

Zunächst wurden Protein-A-Sepharose und Protein-G-Sepharose im Verhältnis 1:1 vermischt und zweimal mit NuLyB-Puffer gewaschen. Es folgte eine über Nacht Inkubation (4°C/langsame Rotation) der Proteinextrakte (350 μ l) mit 160 μ l des Sepharose-A- und G-Gemisches und einem Zusatz von 15 μ l α -ME2-Antikörpern. Die Proben wurden im Weiteren für 1 min bei 3000 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und als Input-Fraktion für eine spätere Analyse bei -20°C aufgehoben. Die sedimentierte Sepharose wurde zweimal mit 500 μ l NuLyB gewaschen, anschließend in 30 μ l NuLyB aufgenommen und mit 13 μ l des 4x Proteinladepuffers vermischt (Ko-IP-Fraktion). Nach einer fünfminütigen Denaturierung der Proben bei 95°C erfolgte eine Analyse der Input- und Ko-IP-Fraktionen auf einem Western-Blot.

6.4.5 Präparation der Mausgehirne für die RNA-Gewinnung, *in situ*-Hybridisierung und Proteinanalyse

Die Gehirnpräparationen fanden, je nach Fragestellung, zur bestimmten Zeiten des Lichtzyklus statt. Für eine übliche molekulare und histologische Analyse wurden die Gehirne zwischen ZT4 und ZT8, für eine zirkadiane Analyse exakt bei ZT0, ZT4, ZT8, ZT12, ZT16 und ZT 20 präpariert. Unter einer Halothan-Narkose wurde eine zervikale Dislokation durchgeführt und das Gehirn entnommen. Das Hirn wurde sagittal halbiert und eine Hälfte, die zum Kryoschneiden bestimmt wurde, rasch auf einem Blättchen Aluminiumfolie auf

Trockeneis eingefroren, in Aluminiumfolie und in Parafilm „M“[®] (Pachiney) gewickelt und anschließend in einem Reaktionsgefäß aufbewahrt. Von der zweiten Hälfte wurden üblicherweise der Kortex, der Hippokampus und das Cerebellum getrennt präpariert, separat auf einem Aluminiumfolie-Blättchen auf Trockeneis eingefroren und in entsprechend beschriftete Reaktionsgefäße zur Aufbewahrung überführt. Die Lagerung der Gewebe zur weiteren Behandlung erfolgte bei -80°C.

6.4.6 Herstellung und Vorbereitung der Kryoschnitte

6.4.6.1 Herstellung der Gehirn-Kryoschnitte

Zur Herstellung von Kryoschnitten wurden die eingefrorenen Mausgehirne mindestens 1 h vor Beginn des Schneidens in die Schneidekammer des Gerätes Cryocut, Jung CM3000 (Leica) überführt. Mit Hilfe von Shandon Cryomatrix (Thermo Electron Corporation) wurde das Gewebe auf einem Metallstempel fixiert, dieser eingespannt und die Gehirne mit Einweg-Messern (Microtome Blades A35, Feather) bei Temperaturen von -18°C bis -22°C geschnitten. Es wurden 14 µm dicke Schnitte jeweils von drei verschiedenen transgenen und von drei unterschiedlichen Wildtyp-Mäusen auf einen SuperFrost[®]-Objektträger aufgenommen und bei RT getrocknet.

6.4.6.2 Postfixierung der Gehirn-Kryoschnitte

Die auf Objektträger gezogenen Schnitte wurden für 10 min bei RT in einer 4%-igen PFA-Lösung in Soerensen-Puffer fixiert, dreimal mit PBS in DEPC-Wasser gewaschen und über Nacht in einem Exikator getrocknet. Die fertigen Schnitte wurden in Boxen mit Kieselgel bei -80°C aufbewahrt oder direkt für die *in situ*-Hybridisierung verwendet.

6.4.7 Präparation der Mausgehirne für die immunohistochemische Analyse

6.4.7.1 Die Ganzkörperfixierung mittels Perfusion

Für eine immunohistochemische Analyse wurden die Mäuse mit dem Narkosemittel Avertin (0,2 ml/kg Gewicht) betäubt und, nachdem sie keine Reflexe mehr zeigten, transkardial perfundiert. Hierzu wurde der Thorax geöffnet, das Herz freigelegt, der rechte Vorhof durch einen Schnitt geöffnet und in die linke Herzkammer eine Kanüle eingeführt, die mit einer Peristaltikpumpe (Heraeus SR70) verbunden war. Das Gefäßsystem wurde zunächst mit HBSS und weiter mit 4%-igem PFA in PBS mit einer Flussrate von 0.2 bis 0.5 ml/s (insgesamt 20 min) gespült. Das Gehirn wurde aus dem Schädel entnommen und bei 4°C für 20 h in 4%-igen PFA in PBS nachfixiert. Danach wurde das Gewebe entweder direkt am Vibratom geschnitten oder zur Aufbewahrung wie folgt vorbereitet: das Hirn wurde zunächst in 15%-iger, danach in 30%-iger Saccharose in DEPC-Wasser bei 4°C eingelegt. Im Anschluss wurde das Gewebe aus der Saccharose-Lösung genommen, kurz abgetrocknet, auf einem Aluminiumfolie-Blättchen auf Trockeneis gefroren, in Aluminiumfolie und Parafilm „M“[®] (Pachiney) eingewickelt und bei -80°C in Reaktionsgefäßen bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

6.4.7.2 Herstellung der Vibratomschnitte

Für die Vibratomschnitte wurden frisch perfundierte oder eingefrorene perfundierte Gehirne verwendet. Letztere wurden vor dem Schneiden in PBS aufgetaut. Es wurden mit Hilfe des Vibratoms in eiskaltem PBS 40 bis 60 µm dicke Schnitte angefertigt, die in eine mit PBS gefüllte 24-Loch-Platte überführt wurden. Diese freischwimmenden (*free floating*) Schnitte wurden für die folgende immunohistochemische Analyse verwendet.

6.4.8 Immunohistochemie

Zur Lokalisation von Proteinen innerhalb von Geweben wurde die immunohistochemische Analyse angewandt.

Die Behandlung der *free floating*-Schnitte erfolgte in einer 24-Loch-Platte: Zunächst wurde eine 30-minütige Permeabilisierung in 0,4%-iger Triton/PBS-Lösung durchgeführt. Danach wurden die Schnitte zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen für 30 min in 4%-igem HS in 0,2% Triton/PBS-Blockierungspuffer und anschließend über Nacht mit entsprechend verdünnten primären Antikörper in 1%-igem HS in 0,05% Triton/PBS-Lösung bei 4°C inkubiert. Es folgte ein zweimaliges Waschen der Schnitte für 5 min mit PBS und eine Inkubation mit Fluorochrom-gekoppelten sekundären Antikörpern. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit PBS wurden die Schnitte für 5 min in DAPI/PBS-Lösung (1:2000, DAPI f.c. 0,5 µg/ml) zur Kernfärbung inkubiert. Schließlich wurden die *free floating*-Schnitte kurz in Wasser getaucht auf einen Objektträger gezogen, anschließend mit Aqua-Poly-Mount-Einbettmedium fixiert und mit Deckgläschen abgedeckt. Um die fluoreszenten Signale vor dem Ausbleichen zu schützen, folgte die Lagerung der Präparate nach einer Immuno-Färbung in Dunkelheit bei 4°C.

6.4.9 Antikörper für die immunologische Detektion der Proteine

Primärantikörper	Verdünnung
α-MAP2, Maus monoklonal, Chemicon	1:800
α-VGLUT1 Kaninchen monoklonal	1:4000
α-NeuN, Maus monoklonal, Chemicon	1:100
α-CNP, Maus monoklonal, Sigma	1:150
Sekundärantikörper	Verdünnung
Cy2 α Maus, IgG	1:100
Cy3 α Rabbit, IgG	1:1000

6.4.10 β-Gal-Färbung

Zum *in situ*-Nachweis der von CamKIIα-Promotoraktivität-kontrollierten Expression des β-Galaktosidase Reportergens wurden X-Gal-Färbungen auf Vibratom-Gehirnschnitten der MHXB-Mauslinie durchgeführt. Das Reporterprotein β-Galaktosidase katalysierte hierbei die Hydrolyse des Substrates X-Gal zum sichtbaren blauen Farbstoff 5-Brom-4-Chlor-Indigo. Dies führte zu einer Visualisierung der Bereiche der CamKIIα-Promotoraktivität, was wiederum eine Aussage über die Lokalisierung der dnME2-Protein-Expression erlaubte. Für die Farbreaktion wurden folgende Reagenzien zusammengesetzt:

250 µl X-Gal (40 mg/ml in DMSO) [1 mg/ml f.c.]

250 µl 0,2 M K-Ferricyanid in PBS [5 mM f.c.]

250 µl 0,2 M K-Ferrocyanid in PBS [5 mM f.c.]

10 µl 1M MgCl₂

mit 1x PBS auf 10 ml aufgefüllt.

Die Farbreaktion erfolgte über 1 h bei 37°C an *free floating* Vibratomschnitten bzw. an mit Hilfe des *slicers* angefertigten 1 mm dicken Schnitten in einer 24-Loch-Platte. Anschließend wurden die Schnitte mit PBS gewaschen und das Ergebnis der Färbung fotodokumentiert.

6.5 Haltung und Verwendung der Mauslinien

6.5.1 Verwendete Inzucht-Mausstämme

Als Inzuchtstamm wird ein Mausstamm bezeichnet, bei dem seit mindestens zwanzig Generationen Geschwisterverpaarungen beibehalten worden sind ([Silver, 1995](#)). Außer dem Geschlechtsunterschied sind Mäuse eines Inzuchtstammes genetisch identisch und praktisch für alle genetischen Loci homozygot. Die genetische Varianz zwischen den einzelnen Generationen ist minimal oder kaum vorhanden ([Beck et al., 2000](#)).

Inzuchtstamm C57Bl/6

C57Bl/6 wurde von C.C. Little im Jahr 1921 aus einer Zucht von Abby Lathrop's Bestand weiterentwickelt, der auch zu den Stämmen C57BR und C57L führte. Stämme 6 und 10 wurden 1937 separiert.

Inzuchtstamm FVB/N

Dieser Inzuchtstamm ist im Jahr 1935 von einem *Outbred*-Stamm aus der Schweiz [N:GP(S)] durch das *National Institute of Health* (NIH) abgeleitet worden. In den frühen 70er Jahren wurde der Stamm als Inzuchtstamm etabliert. Dabei wurde eine Sensitivität gegen das Friend'sche Leukämie Virus B entdeckt. Zu dieser Zeit wurde eine Inzucht dieser Linie für das Fv1b-Allel durchgeführt und der Stamm wurde FVB genannt.

6.5.2 Haltungsbedingungen der Versuchstiere

Alle Tiere wurden in Gruppen von 3 bis 6 in Standardkäfigen (Makrolon[®] Typ2) unter 12/12 Stunden Licht-Dunkel-Rhythmus bei konstanter Temperatur von 22°C und einer Luftfeuchtigkeit von ca 55% gehalten. Für die zirkadiane Verhaltensanalyse wurden Mäuse vereinzelt in Ratten-Käfigen freiem Zugang zum Laufrad gehalten. Wasser und Futter standen den Tieren immer *ad libitum* zur Verfügung.

6.5.3 Versuchstiere für Verhaltensanalysen

Die Wahl des Mausstammes ist einer der wichtigsten Faktoren in Verhaltensanalyse ([Crawley, 2000](#)). Beispielweise ist der Inzuchtstamm FVB/N für *Water Maze*-Tests aufgrund visueller Behinderung und geringer Lernfähigkeiten ungeeignet.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Verhaltensexperimente mit transgenen ME2-überexprimierenden Mäusen (in der Arbeit TMEB-Linie genannt) wurden die Männchen der ersten Generation (F1) nach Kreuzen des C57Bl/6N- und des FvB/N-Stammes verwendet (in der Arbeit als F1-Hybriden bezeichnet). Eine Ausnahme ist das Angst-Konditionierungs-Experiment, welches mit Hybriden des FVB/N-Stammes, der fünfmal auf C57Bl/6N-Hintergrund zurückgekreuzt wurde (fünfte Generation, hier als N5 bezeichnet), durchgeführt wurde.

Zur Verhaltensanalyse der transgenen, dnME2-exprimierenden Tiere (MHXB-Linie) wurden die Männchen des reinen C57Bl/6N-Stammes verwendet.

Das Alter der in den Verhaltenstests eingesetzten Tiere variierte von 2 bis 5 Monaten. Transgene Mäuse wurden parallel mit deren gleichaltrigen Wildtyp-Kontroll-Geschwistertieren (*wildtype littermates*) in den Tests eingesetzt.

6.5.4 Versuchstiere für eine molekulare Analyse

Die quantitative RT-PCR, histologische, Protein- und biochemische Analysen der ME2-überexprimierenden transgenen Mäuse, wurden, wenn nicht anders angegeben, auf Grundlage von F1-Hybriden durchgeführt. Analysen der dnME2-exprimierenden MHXB-Linie erfolgten mit Mäusen des C57Bl/6N-Stammes.

6.6 Verhaltenstests

Vor Beginn jedes Versuches wurden die Mäuse mindestens 2 Wochen an die Versuchsräume und den entsprechenden Licht-Dunkel-Rhythmus adaptiert. Die Verhaltensexperimente wurden 4 Stunden nach Beginn der Lichtphase (ab ZT4) begonnen.

Alle Verhaltenstests und die Aufnahme der Daten wurden ohne Kenntnis der Genotypen der Versuchstiere (*blind to genotype*) durchgeführt. Erst nach der Beendigung der Versuchsreihe wurde die Zuordnung der Tiere zur entsprechenden Gruppe für eine statistische Auswertung mit der Software GraphPadPrism[™] vorgenommen.

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Verhaltensanalysen wurden überwiegend nach Standardprotokollen durchgeführt ([Crawley, 2000](#)).

Zur Anwendung kamen, wenn nicht anders angegeben, verschiedene Apparaturen und Messsysteme der Firma TSE Systems (Bad Homburg).

Zwischen den einzelnen Versuchsdurchläufen mit verschiedenen Tieren wurde die Apparatur (mit Ausnahme des Angstkonditionierungs-Tests) grundsätzlich zunächst mit 70%-igem Ethanol p.A und anschließend mit Wasser gereinigt, um olfaktorische Hinweise (*cues*) zu minimieren und gleiche Versuchsbedingungen für alle Mäuse zu schaffen.

6.6.1 Open Field-Test

Der am häufigsten angewendete Test zur Analyse der spontanen motorischen Aktivität ist der *Open Field* (Offenfeld-Test; [Hall, 1934](#); [Broadhurst, 1961](#)). Die Tiere wurden in einer Offenfeld-Box mit den Maßen von 45 x 45 x 55 cm (Abb. 32 A), deren Wände aus durchsichtigem und deren Boden aus hellgrauem PVC-Kunststoff gebaut waren, eingesetzt. Die Aktivität der Mäuse wurde während der Versuchszeit von 10 min automatisch durch ein Infrarot-Überwachungssystem und ein entsprechendes Computerprogramm (VideoMot2, TSE Systems) analysiert. Folgende Parameter wurden aufgenommen: Die Distanz in cm, die das Tier insgesamt in der Mitte des Feldes (70% der Fläche) und in der Peripherie (restliche 30% der Fläche) zurücklegte, die Zeit, während der sich das Tier in den verschiedenen Bereichen des Offenfeldes (Mitte und Peripherie) aufhielt und die Laufgeschwindigkeit in cm/s.

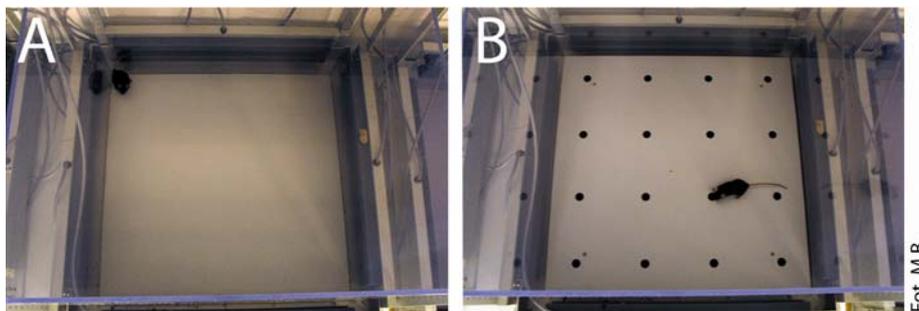


Abb. 32 Darstellung der Versuchsboxen für den *Open Field-Test* und für den *Hole Board-Test*

A) Open Field-Box

B) Hole Board-Box

Hersteller: TSE Systems®

6.6.2 Hole Board-Test

Hole Board-Test ([Bradley et al., 1968](#)) beruht auf der natürlichen Neigung von Nagetieren, die Nase in Löcher im Boden (*nose pokes*) zur Erkundung der Umgebung einzusetzen. *Hole Board* wurde hier zur Analyse des Neugier-Verhaltens verwendet. Der Test wurde in den gleichen Boxen und mit dem gleichen Überwachungssystem wie der *Open Field-Test* durchgeführt mit dem Unterschied, dass auf den Boden ein zusätzliches Brett mit 16 Löchern (Diameter 2 cm) eingesetzt wurde (Abb. 32 B). Das Tier wurde in der Mitte der Box abgesetzt und durfte sie 10 min lang explorieren. Die folgenden Parameter wurden zur Analyse aufgenommen: Die Distanz in cm, die das Tier insgesamt zurücklegte, die Anzahl der Besuche der Löcher und die Gesamtdauer von *Nose Pokes*.

6.6.3 Hot Plate-Test

Der *Hot Plate*-Test ([O'Callaghan und Holtzman, 1985](#)) wurde zur Überprüfung der Schmerzrezeption entwickelt. Das ähnliche Schmerzempfinden der transgenen und der Kontrollmäuse ist die Voraussetzung für einige Lerntests, wie z.B. Angstkonditionierung. Zur Analyse der Schmerzempfindlichkeit wurde das Versuchstier auf eine auf 55°C aufgeheizte Platte, die von einem Plexiglaszylinder umgeben war, abgesetzt. Es wurde die Zeit mit einer Stopp-Uhr gemessen, bis die Maus eine deutliche Reaktion auf die Hitze zeigte, indem sie an den hinteren Füßen leckte. Nach dem Stoppen der Uhr wurde die Maus sofort von der Heizplatte entfernt, zur Abkühlung ihrer Pfoten für 10 s auf eine Metallplatte und anschließend zurück in den Käfig gesetzt. Die Latenz des Leckens der Hinterfüße (in s) wurde zur Analyse verwendet. Die Tiere, die es geschafft haben, aus dem Zylinder während des Versuches rauszuspringen, wurden nicht erneut getestet und von der Analyse ausgeschlossen.

6.6.4 Rotarod-Test

Mit einem *Rotarod*-Apparat (Abb. 33) von TSE Systems wurde die Motokoordination der Mäuse untersucht. Die Apparatur bestand aus einem rotierenden Stab (3,5 cm Durchmesser) mit einer schwarzen, rutschsicheren Oberfläche, der 15 cm über dem Boden des Apparats angebracht war. Das Versuchstier wurde auf dem mit einer Startgeschwindigkeit von 5 rpm rotierenden Stab aufgesetzt. Nach 10 s wurde die Rotation des Stabes linear beschleunigt, um 35 rpm in einem Zeitraum von 3 min zu erreichen. 4 min nach Versuchsbeginn wurde der *Rotarod*-Test gestoppt. Die Zeit, die die Tiere auf dem Stab verblieben, wurde automatisch von der Apparatur gemessen.



Abb. 33 Aufnahme des *Rotarod*-Apparates
 Hersteller: TSE-Systems®

6.6.5 *Elevated Plus Maze*-Test

Der *Elevated Plus Maze*-Test macht sich den Konflikt zwischen natürlicher Tendenz der Mäuse zur Erkundung der neuen Umgebung und aversiven Eigenschaften des offenen und hellen Raumes zu Nutze ([Handley und Mithani, 1984](#); [Pellow et al., 1985](#)) und gibt eine Aussage über die Ängstlichkeit der getesteten Tiere. Die Versuchsanlage wurde von der hauseigenen Werkstatt nach den in *Current Protocols in Neuroscience: Behavioral Neuroscience unit 8.3.7* (2004) publizierten Vorgaben hergestellt und bestand aus zwei



Abb. 34 Darstellung des *Elevated Plus Maze*-Apparates

offenen und zwei mit durchsichtigen, 15 cm hohen Plexiglas-Wänden begrenzten Armen (30 x 5 cm). Der Boden der Apparatur war hellgrau und befand sich 50 cm oberhalb des Bodens (Abb. 34). Zu Versuchsbeginn wurde die Maus auf die zentrale Plattform aufgesetzt und 5 min beobachtet. Als *readout* wurde mit einer Stopp-Uhr die Zeit gemessen, die das Versuchstier in offenen und in geschlossenen Armen verbrachte.

6.6.6 *Light Dark Preference-Test*

Der Konflikt von Erkundung der neuen Umgebung der Mäuse und aversiven Stimulus des hellen Raumes wird in einem weiteren Ängstlichkeits-Test genutzt, in Hell-Dunkel-Präferenz-Tests ([Crawley und Goodwin, 1980](#)). Die Versuchsbox bestand aus einer dunklen und einer hellen Kammer, die beide miteinander verbunden waren (Abb. 35). Das Tier wurde in das



Abb. 35 Fotoaufnahme der *Light Dark Preference*-Versuchsbox

helle Kompartiment des Apparats eingesetzt. Der Versuch wurde in dem Moment gestartet, in dem das Tier in das dunkle Kompartiment hineinging. Über 10 min wurden jeweils die Zeiten, die die Maus im hellen und im dunklen Kompartiment verbracht hat, gemessen und die Anzahl der Übergänge zwischen den beiden Kammer notiert.

6.6.7 *Porsolt-Test*

Der *Porsolt-Test* (auch *forced swim test* genannt) wurde entwickelt, um ein depressionsähnliches Verhalten in Tieren zu untersuchen ([Porsolt et al., 1977](#)). Zur Analyse des Verhaltens wurde das Versuchstier in einen 40 cm hohen Glaszylinder mit 20 cm Durchmesser (Abb. 36 A), der bis zu einer Höhe von 30 cm mit Wasser (Temperatur 23°C) gefüllt war, eingesetzt und für 6 min beobachtet. Als passives Verhalten wurde fast bewegungsloses „Schweben“ an der Wasseroberfläche mit wenigen Bewegungen, die nur zur Haltung der Naseöffnung über den Wasserspiegel dienen, betrachtet. Die Zeit, in der die Maus aktiv schwamm und in der sie sich passiv verhielt, wurde jeweils gemessen.

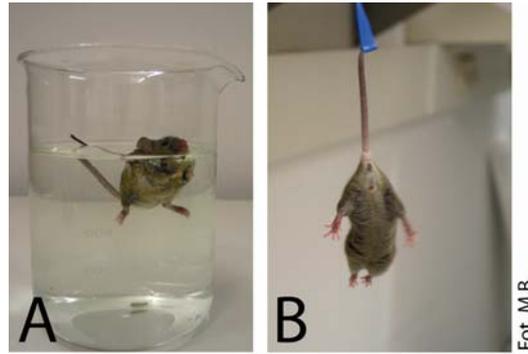


Abb. 36 Durchführung der Motivationstests

A) Porsolt-Tests (*forced swim test*)

B) Tail Suspension-Test

6.6.8 Tail Suspension-Test

Der *tail suspension test* (Sterú *et al.*, 1985) beruht auf ähnlichen Prinzipien wie der Porsolt-Test; hierbei wird ebenfalls das passive und aktive Verhalten der Maus beobachtet und analysiert. Der Unterschied liegt darin, dass das Versuchstier nicht in Wasser eingesetzt, sondern mit dessen Schwanz frei aufgehängt wurde (Abb. 36 B). Mäuse mit einer hohen Motivation versuchten mehrmals, sich zu befreien. Eine Bewegungslosigkeit der Maus wurde als passives Verhalten gesehen und mit einer Stopp-Uhr während des 6-minütigen Tests gemessen.

6.6.9 Angstkonditionierungs-Test

Das Angstkonditionierungs-Test (*fear conditioning*) beruht auf einer klassischen Konditionierung und ermöglicht eine Untersuchung der Fähigkeit der Versuchstiere zum Lernen und Erstellen einer Assoziation zwischen einer aversiven Erfahrung und dem Kontext, in dem diese Erfahrung gesammelt wurde (Fanselow, 1980). Dieser Test, neben dem *Morris Water Maze-Test*, fand die am weitesten verbreitete Anwendung zur Untersuchung von Lernprozessen und die des Gedächtnisses bei Versuchstieren.

Das Angstgedächtnis der Mäuse wurde am *Freezing* (Angststarre) des Tieres visuell gemessen. Als *Freezing* bezeichnet man das Verhalten der Maus, indem sie, mit der Ausnahme der Atembewegungen des Brustkorbs, völlig bewegungslos ist.

6.6.9.1 Das Angstkonditionierungssystem

Die Angstkonditionierung erfolgte mit der Apparatur der Firma TSE Systems, die über die mitgelieferte Software über einen Computer gesteuert wurde. Für die Experimente wurden zwei verschiedenen Boxen verwendet: eine Konditionierungs-Kammer und die Tongedächtnis-Box. Die viereckige Angstkonditionierungs-Kammer (36 x 20 x 20 cm) war mit einer Lichtquelle (12 V), einer Videokamera und einem Lautsprecher ausgestattet (Abb. 37 A). An das Bodengitter, der aus Metallstäben von 4 mm Durchmesser bestand (wobei der Abstand zwischen den einzelnen Stäben 6 mm betrug) wurde eine Stromquelle angeschlossen. Die Konditionierungs-Kammer wurde zwischen den Einzeltests immer wieder mit 70%-igem Ethanol p.A. gereinigt. Die Box, in der das Tongedächtnis getestet wurde, hatte einen glatten, hellgrauen Boden, drei weiße und eine durchsichtige Wand (Abb. 37 B) und war mit einem Lautsprecher und einer Videokamera versehen. Die Tongedächtnis-Box wurde zwischen den Durchläufen ausschließlich mit Wasser gereinigt, da die Versuchstiere den Ethanolgeruch mit der Konditionierungs-Kammer in Verbindung bringen konnten.

Die Auswertung der Experimente erfolgte auf zweierlei Weise: zum einen während des Tests durch den Experimentator und zum anderen mit Hilfe der von einer in der Box montierten Videokamera aufgezeichneten Filme.

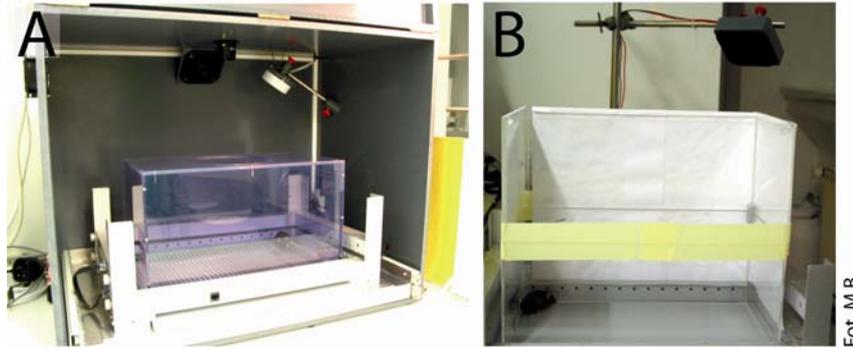


Abb. 37 Darstellung der Apparatur für den Angstkonditionierungs-Test.

A) Die Versuchsbox mit einem Metallgitter-Boden für die Konditionierung und zum Testen des kontextuellen Gedächtnisses.

B) Die Versuchsbox zur Untersuchung des Ton-Gedächtnisses während der Ton-Exposition.

Hersteller: TSE-Systems®

6.6.9.2 Durchführung der Angstkonditionierung

Für die Angstkonditionierungs-Experimente wurden zwei Protokolle verwendet (Abb. 23 A).

Standardprotokoll mit zwei Ton-Fußschock-Paarungen

Am ersten Tag des Experiments wurde das Versuchstier in die Angstkonditionierungs-Box eingesetzt und seine *Freezing*-Antwort in dieser neuen Umgebung wurde gemessen. Dabei wurde über einen Zeitraum von 2 min alle 4 s eine Beobachtung gemacht, was insgesamt 30 Beobachtungen ergab (Grundlinie für Kontext, *context baseline*). Danach wurde ein Ton (*conditioned stimulus*, 10kHz, 75dB) appliziert, der 30 s dauerte und der mit einem einmaligen elektrischen Fußschock (0,4 mA und 2 s) gepaart wurde. Nach 30 s Pause folgte erneut der gleiche Ton mit einem Fußschock gleicher Länge und Stärke. Anschließend durfte sich die Maus 20 s in der Konditionierungs-Box ausruhen und wurde zurück in den Heimkäfig gebracht.

Nach 24 h folgte der Test zum kontextuellen Gedächtnis: Die Maus wurde wieder in die Konditionierungs-Box eingesetzt und, diesmal ohne den Ton und Schock, unter den gleichen Bedingungen wie während des Lernprozesses (Box, Uhrzeit, Beleuchtung, Versuchsperson) ihre *Freezing*-Antwort in demselben Kontext (*contextual memory*) wurde über 2 min alle 4 s beobachtet.

Am dritten Tag (48 h nach der Konditionierung und 24 h nach dem Kontextgedächtnis-Test) folgte der Test des Ton-Gedächtnisses in einem neutralen Kontext. Hierzu wurde die Maus in eine neue Box mit glattem, hellgrauem Boden gesetzt und über 2 min alle 4 s zur Bestimmung der *Freezing*-Antwort als *baseline* für das Ton-Gedächtnis beobachtet (*cue baseline* oder *pre-cue*). Nach 2 min wurde der gleiche Ton, der während der Angstkonditionierung am ersten Tag des Versuches appliziert worden war, für 2 min präsentiert und die *Freezing*-Antwort zum Testen des Ton-Gedächtnisses (*cued memory*) visuell gemessen.

Protokoll mit fünf Ton-Fußschock-Paarungen

Um die Frage zu beantworten, ob bei sehr intensiven Lernverfahren transgene Mäuse einen Phänotyp im Kontext- und Ton-Gedächtnis zeigen, wurde mit einer unabhängigen Mauskoorte ein Angstkonditionierungs-Test mit fünf Ton-Fußschock-Paarungen durchgeführt. Die Untersuchung der Mäuse bezüglich des Kontext- und Ton-Gedächtnisses erfolgte wie im Standardprotokoll angegeben.

Auswertung des Angstkonditionierungs-Experiments

Zur visuellen Messung des *Freezing*-Verhaltens wurde die Maus im Zeitraum von 2 min alle 4 s beobachtet, was insgesamt 30 Beobachtungen ergab. Die folgenden *Freezing*-Parameter wurden visuell gemessen:

Grundlinie im Kontext (*context baseline*):

Reaktion auf die Konditionierungsbox, noch ohne negative Assoziationen

Freezing in Kontext (*context*): kontextuelle Gedächtnis

Grundlinie für Tongedächtnis (*context baseline*): Reaktion auf eine neue Box
Freezing während des Tons (*cue*): Tongedächtnis

Die Anzahl beobachteten *Freezings* wurde ausgerechnet (x von 30 Beobachtungen) und die *Freezings* in Prozenten dargestellt, wobei die maximale Zahl von 30 Beobachtungen auf 100% gestellt wurde. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPadPrism.

6.6.10 Morris Water Maze-Test

Der *Morris Water Maze*-Test (Morrissches Wasserlabyrinth; [Morris, 1981](#)) ist einer der am häufigsten verwendeten Verhaltenstests zur Untersuchung räumlicher Lern- und Navigationsleistungen in der tierexperimentellen Forschung. Die Anwendung dieser Methode an hippokampal- und kortikallädierten Ratten hat einen Beleg dafür erbracht, dass der Hippocampus eine essentielle Rolle für das räumliche Lernen spielt ([Morris et al., 1982](#)).

6.6.10.1 Morris Water Maze-Versuchsaufbau

Alle Versuche wurden mit Hilfe des TSE VideoMot-Systems durchgeführt. Dieses kameraüberwachte, computergesteuerte System ermöglichte eine automatisierte Beobachtung und Analyse des Mausverhaltens im Wasserlabyrinth.

Im Versuchsraum wurde mit indirektem Licht gearbeitet, so dass Reflektionen an der Wasseroberfläche, die die automatisierte Verfolgung der Maus im *Water Maze* stören konnten, weitgehend ausgeschlossen wurden. Die Wände des Raumes wurden mit jeweils einem deutlich sichtbaren Hinweisreiz pro Wand (*external cues*) ausgestattet. Die Experimente wurden in einem großen, runden Becken (120 cm Durchmesser, 60 cm Höhe), welches 50 cm hoch mit weiß gefärbtem Wasser gefüllt wurde, durchgeführt. In einem von vier gleichgroßen „virtuellen“ Quadranten, genau 1 cm unter dem Wasserspiegel, befand sich eine runde (10 cm Durchmesser) Plattform (*hidden platform*).

6.6.10.2 Durchführung des *Water Maze*-Tests

Initial Learning

Im Verlauf des Anfangslernens (*Initial Learning*) lernten die Versuchstiere, die versteckte Plattform als einzige Fluchtmöglichkeit aus dem aversiven Wasser zu betrachten und die Plattform auf einem möglichst schnellen und direkten Weg zu erreichen. Das Versuchstier wurde viermal pro Tag, mit einem Intervall von mindestens 5 min, von einem der vier Startpunkten (als S, N, E und W bezeichnet) mit dem Kopf zur Beckenwand eingesetzt. Die Strecke, die die Maus auf der Suche nach der unsichtbaren Plattform zurücklegte, wurde aufgenommen. Das Experiment wurde automatisch beendet, wenn das Versuchstier die versteckte Plattform gefunden hatte, spätestens jedoch nach 90 s. Sollte die Maus innerhalb von 90 s die Plattform nicht gefunden haben, wurde sie zu dieser hingeführt. Nach Erreichen der Plattform wurde dem Tier erlaubt, sich 30 s lang im Standard- oder 10 s lang in einem modifizierten Protokoll auf der Plattform zu erholen. In dieser Zeit konnte die Maus die Umgebung visuell erkunden (*acquisition*). Nach Beendigung des Versuches wurde das Tier auf eine 37°C warme Platte zum Trocknen und Erholen gesetzt. Nach 5 min wurde das Tier erneut in das Becken eingesetzt, diesmal von einer anderen Startposition. Die Reihenfolge der Startpositionen variierte in zufälliger Anordnung von Tag zu Tag. Das *Initial Learning* wurde täglich durchgeführt, solange, bis alle Tiere in der Lage waren, in minimaler Zeit (einige Sekunden) die Plattform zu finden.

Probe Trial 1

Nach dem *Initial Learning* folgte eine Überprüfung der Lernleistung der Versuchstiere in Form eines Probelaufs (*Probe Trial 1*). Hierzu wurde das Tier an einer bestimmten Startposition in das Becken eingesetzt, ohne dass sich eine Plattform darin befand. Der *Probe Trial* dauerte 90 s und wurde von einer Videokamera aufgenommen. Mit Hilfe des entsprechenden Computerprogramms wurde die Zeit berechnet, die die Maus in bestimmten Quadranten verbrachte, die wie folgt bezeichnet wurden: Zielquadrant (*target quadrant*),

gegenüberliegender Quadrant (*opposite quadrant*), linker Quadrant (*left quadrant*) und rechter Quadrant (*right quadrant*).

Reversal Training und Probe Trial 2

Die Plattform wurde in eine neue Position, nämlich in den ehemaligen „gegenüberliegenden Quadrant“ (jetzt als Zielquadrant bezeichnet) gebracht. Es folgte dieselbe Prozedur wie während des *Initial Learnings*. Anschließend wurde erneut ein Probelauf durchgeführt (in der Arbeit als *Probe Trial 2* bezeichnet).

Sichtbare-Plattform-Test (*visible platform*)

Mit Hilfe des Sichtbare-Plattform-Tests (*visible platform*) konnte überprüft werden, ob die transgenen Mäuse keine Beeinträchtigung der visuellen Wahrnehmung aufweisen. Der Test wurde ohne die Anwendung von *external cues* durchgeführt. Vor der Durchführung der Experimente mit der sichtbaren Plattform wurde auf ihr eine schwarze Fahne befestigt. Der Test wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt, wobei die Position der Plattform am zweiten Tag in den gegenüberliegenden Quadranten verlegt wurde.

6.6.11 Analyse der zirkadianen Aktivität

Für die zirkadiane Verhaltensanalyse wurden die Mäuse einzeln in Ratten-Käfigen mit freiem Zugang zu einem Laufrad gehalten (Abb. 38). Wasser und Futter standen den Tieren immer ad libitum zur Verfügung. Nach einer Gewöhnungsphase der Versuchstiere (20 Tage) an den Versuchsraum und nachdem die Mäuse ein Laufverhalten entwickelten, wurde mit der



Abb. 38 Haltung der Tiere zur zirkadianen Analyse

Zur Analyse der zirkadianen Aktivität wurden die Versuchstiere einzeln in Käfigen mit freiem Zugang zu einem Laufrad gehalten.

Aufnahme der Daten angefangen. Die Umdrehungen des Laufrads wurden durch ein an einen Computer angeschlossenes Messsystem gezählt. Die statistische Auswertung der aufgenommenen Daten wurde von Sven Wichert durchgeführt mit Hilfe eines von ihm geschriebenes Programms.

Der Licht-Dunkel-Rhythmus variierte wie im Folgenden:

- Tag 1 bis Tag 17: gewöhnlicher Licht-Dunkel-Rhythmus (LD, *light dark*)
Licht an um 10:00 und Licht aus um 22:00
- Tag 18: Die Licht-Phase wurde um 8 h verkürzt indem das Licht um 14:00 ausgeschaltet wurde Eine 8-stündige Verschiebung der Licht-Dunkel-Phase nach Vorne (*phase advance*) war die Folge.
- Tag 19 bis Tag 59: Licht-Dunkel-Rhythmus
Licht aus um 14:00 und um 02:00 an.
- Tag 60: das Licht wurde ausgeschaltet und die Tiere wurden bis Tag 80 in einer konstanten Dunkelheit (DD, *dark dark*); gehalten.

Es wurden folgende Parameter analysiert:

- zirkadiane Aktivität der Tiere in gewöhnlichen Licht-Dunkel-Rhythmus (*LD, light dark*)
- zirkadianes Verhalten der Mäuse nach 8-stündiger Verschiebung der Licht-Dunkel-Phase nach Vorne (*phase advance*)
- zirkadiane Aktivität der Versuchstiere in der Dunkelheit.

7 ANHANG 1: VERHALTENS BIOLOGISCHER WORTSCHATZ

Angstkonditionierungs-Test

Freezing (Angststarre) wird bei Mäusen durch eine Erinnerung an eine negative Erfahrung ausgelöst. In diesem Zustand bewegt die Maus lediglich den Brustkorb zum Atmen, ansonsten ist sie völlig regungslos.

Zur visuellen Messung des *Freezing*-Verhaltens wurde die Maus über einen Zeitraum von 2 min alle 4 s beobachtet, was insgesamt 30 Beobachtungen ergab. Die Anzahl der beobachteten *Freezings* wurde registriert (x von 30 Beobachtungen) und als relative Zahl angegeben.

Die folgenden *Freezing*-Parameter wurden visuell gemessen:

Grundlinie für Kontext (*context baseline*):

Reaktion auf die Konditionierungsbox, noch ohne negative Assoziationen.

Freezing im Kontext:

Freezing-Antwort in demselben Kontext (*context*), in dem die Konditionierung stattfand; ließ Rückschlüsse auf das kontextuelle Gedächtnis (*contextual memory*) ziehen.

Grundlinie für Tongedächtnis:

In einem neuen neutralen Kontext (24 h nach der Angstkonditionierung) folgt eine Bestimmung der *Freezing*-Antwort als *baseline* für das Ton-Gedächtnis (*cue baseline* oder *pre-cue*).

Freezing während des Tons (*cue*):

Während der Exposition des Tons (*conditioned stimulus*), der während der Angstkonditionierung am ersten Tag des Versuches appliziert worden war, wird die *Freezing*-Antwort zum Testen des Ton-Gedächtnisses (*cued memory*) beobachtet.

Water Maze-Test (Morrische Wasserlabyrinth)

Initial Learning und Probe Trial 1

Im Verlauf des Anfangslernens (*Initial Learning*) lernten die Versuchstiere, die versteckte Plattform (*hidden platform*) als einzige Fluchtmöglichkeit aus dem aversiven Wasser zu betrachten und die Plattform auf einem möglichst schnellen und direkten Weg zu erreichen. Nach dem *Initial Learning* folgte eine Überprüfung der Lernleistung in Form eines *Probe Trial 1* (Probelaufs). Hierzu wurde die Maus an einer bestimmten Startposition für 90 s in das Becken eingesetzt, ohne dass sich eine Plattform darin befand. Mit Hilfe eines entsprechenden Computerprogramms wurde die Zeit berechnet, die die Maus in bestimmten Quadranten verbrachte, die wie folgt bezeichnet wurden:

Zielquadrant, *target quadrant*

gegenüberliegender Quadrant, *opposite quadrant*

linker Quadrant, *left quadrant*

rechter Quadrant, *right quadrant*

Reversal Training und Probe Trial 2

Die Plattform wurde in eine neue Position, nämlich in den ehemaligen „gegenüberliegenden Quadranten“ (jetzt als Zielquadrant bezeichnet) gebracht. Es folgte dieselbe Prozedur wie während des *Initial Learnings*. Anschließend wurde erneut ein *Probe Trial* durchgeführt (*Probe Trial 2*).

Sichtbare-Plattform-Test, *visible platform*

Mit Hilfe des Sichtbare-Plattform-Tests (*visible platform*) konnte überprüft werden, ob die transgenen Mäuse keine Beeinträchtigung der visuellen Wahrnehmung aufweisen. Der Test wurde ohne die Anwendung von sichtbaren Hinweisreizen (*external cues*) durchgeführt.

8 ABKÜRZUNGEN

Abb., Abbildung
 Amp, Ampicillin
 cAMP, zyklisches Adenosinmonophosphat
 ATP, Adenosintriphosphat
 BME, Basalmedium (Eagle)
 bp, Basenpaare
 BSA, Rinder (Bovine)-Serum-Albumin
 bzw., beziehungsweise
 °C, Grad Celsius
 cDNA, komplementäre DNA
 Cml, Chloramphenicol
 CMV, Cytomegalie
 DAPI, 4'-6-Diamidino-2-phenylindol
 DMEM, Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
 DMSO, Dimethylsulfoxid
 DNA, Desoxyribonukleinsäure
 DNase, Desoxyribonuklease
 dNTP, Desoxynukleosidtriphosphat
 DTT, 1,4-Dithiothreitol
 ECL, verbesserte Chemilumineszenz (*enhanced chemiluminescence*)
 E.coli, Escherichia coli
 EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure
 EGFP, verbessertes grünes fluoreszentes Protein (*enhanced green fluorescent protein*)
et al., und andere
 EtOH, Ethanol
 EYFP, verbessertes gelbes fluoreszentes Protein (*enhanced yellow fluorescent protein*)
 f.c., Endkonzentration (*final concentration*)
 FCS, fötales Kälberserum
 FGF, Fibroblasten-Wachstumsfaktor (*fibroblast growth factor*)
 g, Gramm und Schleuderziffer zur Messung der Zentripetalbeschleunigung (Vielfaches der Erdbeschleunigung)
 Genta, Gentamycin
 h, Stunde(n) (*hour*)
 HBSS, Hanks' gepufferte Salzlösung
 HEPES, (4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethan-sulfonsäure)
 HRP, Merettichperoxidase (*horse radish peroxidase*)
 HS, Pferdeserum (*horse serum*)
 IPTG, Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
 IgG, Immunglobulin
 Kan, Kanamycin
 kb, Kilobasen
 kDa, Kilo-Dalton
 l, Liter
 LB, Luria Bertani
 LDS, Lithiumdodecylsulfat
 μ , mikro
 m, milli
 M, molar
 MAP2, Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
 min, Minute
 mRNA, Boten-(*messenger*)-RNA
 n, Anzahl (*number*) oder nano
 NaOH, Natriumhydroxid
 OD, optische Dichte
 ORF, Protein-kodierende Sequenz (*open reading frame*)

p.A., per analysi
PAGE, Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS, Phosphat-gepufferte (*buffered*) Salzlösung
PCR, Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*)
PFA, Paraformaldehyd
pH, negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration
PNS, Peripheres Nervensystem
PVDF, Polyvinylidenfluorid
PVP, Polyvinylpyrrolidone
RLUs, relative Luciferase-Einheiten (*relative luciferase units*)
RNA, Ribonukleinsäure
RNase, Ribonuklease
rpm, Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute*)
RT, Raumtemperatur
SDS, Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecylsulfate*)
s.o., siehe oben
s.u., siehe unten
SV40, Affenvirus Simian Virus 40
TAE, Tris/Acetat/EDTA
Taq, *Thermus aquaticus*
TB, Terrific Broth
TBS, Tris-Base gepufferte (*buffered*) Lösung
TE, Tris/EDTA
Tet, Tetracyclin
TK, Thymidin-Kinase
TRIS, Tris(hydroxymethyl)aminomethan oder 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U, Einheit der Enzymaktivität (*unit*)
u.a., unter anderem
üN, über Nacht
UV, ultraviolett
vgl., vergleiche
Vol, Volumen
v/v, Volumen/Volumen
X-Gal, 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
ZNS, Zentrales Nervensystems
ZT, Zeitgeber time

9 LITERATURVERZEICHNIS

- AHMAD, I. (1995). Mash-1 is expressed during ROD photoreceptor differentiation and binds an E-box, E(opsin)-1 in the rat opsin gene. *Brain Res Dev Brain Res* 90, 184-9.
- AKAGI, K., SANDIG, V., VOOIJS, M., VAN DER VALK, M., GIOVANNINI, M., STRAUSS, M. & BERNS, A. (1997). Cre-mediated somatic site-specific recombination in mice. *Nucleic Acids Res* 25, 1766-73.
- AMIEL, J., RIO, M., DE PONTUAL, L., REDON, R., MALAN, V., BODDAERT, N., PLOUIN, P., CARTER, N. P., LYONNET, S., MUNNICH, A. & COLLEAUX, L. (2007). Mutations in TCF4, encoding a class I basic helix-loop-helix transcription factor, are responsible for Pitt-Hopkins syndrome, a severe epileptic encephalopathy associated with autonomic dysfunction. *Am J Hum Genet* 80, 988-93.
- ANDRIEUX, J., LEPRETRE, F., CUISSET, J. M., GOLDENBERG, A., DELOBEL, B., MANOUVRIER-HANU, S. & HOLDER-ESPINASSE, M. (2008). Deletion 18q21.2q21.32 involving TCF4 in a boy diagnosed by CGH-array. *Eur J Med Genet* 51, 172-7.
- ATCHLEY, W. R. & FITCH, W. M. (1997). A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5172-6.
- AYER, D. E., KRETZNER, L. & EISENMAN, R. N. (1993). Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell* 72, 211-22.
- BAMPTON, E. T., GRAY, R. A. & LARGE, C. H. (1999). Electrophysiological characterisation of the dentate gyrus in five inbred strains of mouse. *Brain Research* 841, 123-134.
- BARAD, M. (2005). Fear extinction in rodents: basic insight to clinical promise. *Curr Opin Neurobiol* 15, 710-5.
- BARAD, M., GEAN, P. W. & LUTZ, B. (2006). The role of the amygdala in the extinction of conditioned fear. *Biol Psychiatry* 60, 322-8.
- BARLOW, J. Z. & HUNTLEY, G. W. (2000). Developmentally regulated expression of Thy-1 in structures of the mouse sensory-motor system. *J Comp Neurol* 421, 215-33.
- BARTHOLOMEA, A., NAVE, K.-A. (1994). NEX1: a novel brain-specific helixloop-helix protein with autoregulation and sustained expression in mature cortical neurons. *Mech Dev* 48:217-228.
- BECK, J. A., LLOYD, S., HAFEZPARAST, M., LENNON-PIERCE, M., EPPIG, J. T., FESTING, M. F., FISHER, E. M. (2000). Genealogies of mouse inbred strains. *Nat Genet.* Jan;24(1):23-5.
- BENEZRA, R., DAVIS, R. L., LOCKSHON, D., TURNER, D. L. & WEINTRAUB, H. (1990). The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 61, 49-59.
- BERCHTOLD, N. C., OLIFF, H. S., ISACKSON, P., COTMAN C. W. (1999). Hippocampal BDNF mRNA shows a diurnal regulation, primarily in the exon III transcript. *Brain Res Mol Brain Res.* Jul 23;71(1):11-22.
- BERGQVIST, I., ERIKSSON, M., SAARIKETTU, J., ERIKSSON, B., CORNELIUSSEN, B., GRUNDSTROM, T. & HOLMBERG, D. (2000). The basic helix-loop-helix transcription factor E2-2 is involved in T lymphocyte development. *Eur J Immunol* 30, 2857-63.
- BERTRAND, N., CASTRO, D. S. & GUILLEMOT, F. (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* 3, 517-30.
- BESSIS, A., SALMON, A. M., ZOLI, M., LE NOVERE, N., PICCIOTTO, M. & CHANGEUX, J. P. (1995). Promoter elements conferring neuron-specific expression of the beta 2-subunit of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor studied in vitro and in transgenic mice. *Neuroscience* 69, 807-19.
- BIRNBOIM, H. C. & DOLY, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-23.

- BLACKWOOD, E. M. & EISENMAN, R. N. (1991). Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 251, 1211-7.
- BLISS, T. V. & GARDNER-MEDWIN, A. R. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232, 357-74.
- BLISS, T. V. and LØMO, 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
- BOTMUTH, I., YONEMASU, T., ZHANG, M., GUMMERT, M., GOEBBELS, S., ZHANG, W., TARABYKIN, V., NAVE, K.-A., SCHWAB, M.H. Neuronal bHLH transcription factors NEX and NDRF are essential regulators of pyramidal neuron axogenesis. In Vorbereitung.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.
- BRADLEY, D. W., JOYCE, D., MURPHY, E. H., NASH, B. M., PORSOLT, R. D., SUMMERFIELD, A. & TWYMAN, W. A. (1968). Amphetamine-barbiturate mixture: effects on the behaviour of mice. *Nature* 220, 187-8.
- BRISCOE, J., PIERANI, A., JESSELL, T. M. & ERICSON, J. (2000). A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 101, 435-45.
- BROADHURST, P. L. (1961). Analysis of maternal effects in the inheritance of behaviour. *Animal Behaviour* 9: 129-141.
- BROCKSCHMIDT, A., TODT, U., RYU, S., HOISCHEN, A., LANDWEHR, C., BIRNBAUM, S., FRENCK, W., RADLWIMMER, B., LICHTER, P., ENGELS, H., DRIEVER, W., KUBISCH, C. & WEBER, R. G. (2007). Severe mental retardation with breathing abnormalities (Pitt-Hopkins syndrome) is caused by haploinsufficiency of the neuronal bHLH transcription factor TCF4. *Hum Mol Genet* 16, 1488-94.
- BUSKIN, J. N. & HAUSCHKA, S. D. (1989). Identification of a myocyte nuclear factor that binds to the muscle-specific enhancer of the mouse muscle creatine kinase gene. *Mol Cell Biol* 9, 2627-40.
- CAMPSALL, K. D., MAZEROLLE, C. J., DE REPENTINGY, Y., KOTHARY, R. & WALLACE, V. A. (2002). Characterization of transgene expression and Cre recombinase activity in a panel of Thy-1 promoter-Cre transgenic mice. *Dev Dyn* 224, 135-43.
- CAMPUZANO, S. (2001). Emc, a negative HLH regulator with multiple functions in *Drosophila* development. *Oncogene* 20, 8299-307.
- CAU, E., CASAROSA, S. & GUILLEMOT, F. (2002). Mash1 and Ngn1 control distinct steps of determination and differentiation in the olfactory sensory neuron lineage. *Development* 129, 1871-80.
- CHEN, H., THIAGALINGAM, A., CHOPRA, H., BORGES, M. W., FEDER, J. N., NELKIN, B. D., BAYLIN, S. B. & BALL, D. W. (1997). Conservation of the *Drosophila* lateral inhibition pathway in human lung cancer: a hairy-related protein (HES-1) directly represses achaete-scute homolog-1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5355-60.
- CHEVALIER-MARIETTE, C., HENRY, I., MONTFORT, L., CAPGRAS, S., FORLANI, S., MUSCHLER, J. & NICOLAS, J. F. (2003). CpG content affects gene silencing in mice: evidence from novel transgenes. *Genome Biol* 4, R53.
- CHIARAMELLO, A., NEUMAN, K., PALM, K., METSIS, M. & NEUMAN, T. (1995a). Helix-loop-helix transcription factors mediate activation and repression of the p75LNGFR gene. *Mol Cell Biol* 15, 6036-44.
- CHIARAMELLO, A., SOOSAAR, A., NEUMAN, T. & ZUBER, M. X. (1995b). Differential expression and distinct DNA-binding specificity of ME1a and ME2 suggest a unique

- role during differentiation and neuronal plasticity. *Brain Res Mol Brain Res* 29, 107-18.
- CHIARAMELLO, A., NEUMAN, T., PEAVY, D. R. & ZUBER, M. X. (1996). The GAP-43 gene is a direct downstream target of the basic helix-loop-helix transcription factors. *J Biol Chem* 271, 22035-43.
- CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9.
- CRAWLEY, J. & GOODWIN, F. K. (1980). Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 13, 167-70.
- CRAWLEY, J.N. et al., (1997). Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology*,132: 107-124.
- CRAWLEY, J.N. (2000). *Whats wrong with my mouse? Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice.* Wiley-Liss, New York.
- CRAWLEY, J. N. (2008). Behavioral phenotyping strategies for mutant mice. *Neuron* 57, 809-18.
- DEAN, F. B., NELSON, J. R., GIESLER, T.L., LASKEN, R. S. (2001). Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res.* Jun;11(6):1095-9.
- DOBIE, K., MEHTALI, M., MCCLENAGHAN, M., LATHE, R. (1997). Variegated gene expression in mice. *Trends Genet.* Apr;13(4):127-30
- ECKEL-MAHAN, K. L., PHAN, T., HAN, S., WANG, H., CHAN, G. C., SCHEINER, Z. S. & STORM, D. R. (2008). Circadian oscillation of hippocampal MAPK activity and cAMP: implications for memory persistence. *Nat Neurosci.*
- DAVIS, R. L. and TURNER, D. L. (2001). Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene* 20, 8342–8357
- ELLENBERGER, T., FASS, D., ARNAUD, M. & HARRISON, S. C. (1994). Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. *Genes Dev* 8, 970-80.
- ELLIS, H. M., SPANN, D. R. & POSAKONY, J. W. (1990). extramacrochaetae, a negative regulator of sensory organ development in *Drosophila*, defines a new class of helix-loop-helix proteins. *Cell* 61, 27-38.
- EPHRUSSI, A., CHURCH, G. M., TONEGAWA, S. & GILBERT, W. (1985). B lineage-specific interactions of an immunoglobulin enhancer with cellular factors in vivo. *Science* 227, 134-40.
- FALLS, W. A., MISERENDINO, M. J., DAVIS, M. (1992). Extinction of fear-potentiated startle: blockade by infusion of an NMDA antagonist into the amygdala. *J Neurosci.* Mar;12(3):854-63.
- FANSELOW, M. S. (1980). Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlov J Biol Sci* 15, 177-82.
- FARAH, M.H., OLSON, J.M., SUCIC, H.B., HUME, R.I., TAPSCOTT, S.J., TURNER, D.L. (2000). Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells. *Development* 127:693–702.
- FEIL, R., BROCARD, J., MASCREZ, B., LEMEURE, M., METZGER, D. & CHAMBON, P. (1996). Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10887-90.
- FELGNER, P. L., GADEK, T. R., HOLM, M., ROMAN, R., CHAN, H. W., WENZ, M., NORTHROP, J. P., RINGOLD, G. M., DANIELSEN, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* Nov;84(21):7413-7.

- FLORA, A., GARCIA, J. J., THALLER, C. & ZOGHBI, H. Y. (2007). The E-protein Tcf4 interacts with Math1 to regulate differentiation of a specific subset of neuronal progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15382-7.
- FODE, C., GRADWOHL, G., MORIN, X., DIERICH, A., LEMEUR, M., GORIDIS, C. & GUILLEMOT, F. (1998). The bHLH protein NEUROGENIN 2 is a determination factor for epibranchial placode-derived sensory neurons. *Neuron* 20, 483-94.
- FODE, C., MA, Q., CASAROSA, S., ANG, S. L., ANDERSON, D. J. & GUILLEMOT, F. (2000). A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes Dev* 14, 67-80.
- FURTH, P. A., ST ONGE, L., BÖGER, H., GRUSS, P., GOSSEN, M., KISTNER, A., BUJARD, H., HENNIGHAUSEN, L. (1994). Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* Sep 27;91(20):9302-6.
- GARCIA-BELLIDO, A. (1979). Genetic Analysis of the Achaete-Scute System of *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *Genetics* 91, 491-520.
- GARRELL, J. & MODOLELL, J. (1990). The *Drosophila* extramacrochaetae locus, an antagonist of proneural genes that, like these genes, encodes a helix-loop-helix protein. *Cell* 61, 39-48.
- GE, W., HE F., KIM, K. J., BLANCHI, B., COSKUN, V., NGUYEN, L., WU, X., ZHAO, J., HENG, J. I., MARTINOWICH, K., TAO, J., WU, H., CASTRO, D., SOBEIH, M. M., CORFAS, G., GLEESON, J. G., GREENBERG, M. E., GUILLEMOT, F., SUN, Y. E. (2006). Coupling of cell migration with neurogenesis by proneural bHLH factors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* Jan 31;103(5):1319-24
- GHIL, S. H., JEON, Y. J. & SUH-KIM, H. (2002). Inhibition of BETA2/NeuroD by Id2. — *Exp Mol Med* 34, 367-73.
- GIAGTZOGLU, N., ALIFRAGIS, P., KOUMBANAKIS, K. A. & DELIDAKIS, C. (2003). Two modes of recruitment of E(spl) repressors onto target genes. *Development* 130, 259-70.
- GOSSEN, M., BUJARD, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* Jun 15;89(12):5547-51.
- GOSSETT, L. A., KELVIN, D. J., STERNBERG, E. A. & OLSON, E. N. (1989). A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes. *Mol Cell Biol* 9, 5022-33.
- GRANT, A. L., JONES, A., THOMAS, K. L. & WISDEN, W. (1996). Characterization of the rat hippocalcin gene: the 5' flanking region directs expression to the hippocampus. *Neuroscience* 75, 1099-115.
- GREEN, E.L. *Biology of the Laboratory Mouse* (McGraw-Hill, New York, 1966)
- GU, H., MARTH, J. D., ORBAN, P. C., MOSSMANN, H. & RAJEWSKY, K. (1994). Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265, 103-6.
- HALL, C. S. (1934). Emotional behaviour in the rat. *J Comparative and Physiological Psychology* 18: 385-403.
- HANDLEY, S. L. & MITHANI, S. (1984). Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 327, 1-5.
- HARTLEY, J.L., TEMPLE, G.F., BRASCH, M.A. (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res.* Nov;10(11):1788-95.
- HENTHORN, P. S., STEWART, C. C., KADESCH, T. & PUCK, J. M. (1991). The gene encoding human TFE3, a transcription factor that binds the immunoglobulin heavy-chain enhancer, maps to Xp11.22. *Genomics* 11, 374-8.
- HERRIN, D. L. & SCHMIDT, G. W. (1988). Rapid, reversible staining of northern blots prior to hybridization. *Biotechniques* 6, 196-7, 199-200.

- HIRATA, H., YOSHIURA, S., OHTSUKA, T., BESSHO, Y., HARADA, T., YOSHIKAWA, K. & KAGEYAMA, R. (2002). Oscillatory expression of the bHLH factor Hes1 regulated by a negative feedback loop. *Science* 298, 840-3.
- HOSODA, H., MOTOHASHI, J., KATO, H., MASUSHIGE, S. & KIDA, S. (2004). A BMAL1 mutant with arginine 91 substituted with alanine acts as a dominant negative inhibitor. *Gene* 338, 235-41.
- HUANG, H. P., LIU, M., EL-HODIRI, H. M., CHU, K., JAMRICH, M. & TSAI, M. J. (2000). Regulation of the pancreatic islet-specific gene BETA2 (neuroD) by neurogenin 3. *Mol Cell Biol* 20, 3292-307.
- IK TSEN HENG, J. & TAN, S. S. (2003). The role of class I HLH genes in neural development--have they been overlooked? *Bioessays* 25, 709-16.
- ISHIBASHI, M., MORIYOSHI, K., SASAI, Y., SHIOTA, K., NAKANISHI, S. & KAGEYAMA, R. (1994). Persistent expression of helix-loop-helix factor HES-1 prevents mammalian neural differentiation in the central nervous system. *EMBO J* 13, 1799-805.
- ISHIBASHI, M., ANG, S. L., SHIOTA, K., NAKANISHI, S., KAGEYAMA, R. & GUILLEMOT, F. (1995). Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes Dev* 9, 3136-48.
- JEN Y., MANOVA K., BENEZRA R. (1997): Each member of the Id gene family exhibits a unique expression pattern in mouse gastrulation and neurogenesis. *Dev Dynamics* 208:92-106.
- JONES, B. J. & ROBERTS, D. J. (1968). A rotarod suitable for quantitative measurements of motor incoordination in naive mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 259, 211.
- JUSTICE, N. J., JAN, Y. N. (2002). Variations on the Notch pathway in neural development. *Curr Opin Neurobiol*. Feb;12(1):64-70. Review.
- KAGEYAMA, R. & NAKANISHI, S. (1997). Helix-loop-helix factors in growth and differentiation of the vertebrate nervous system. *Curr Opin Genet Dev* 7, 659-65.
- KILBY, N. J., SNAITH, M. R., MURRAY JA. (1993). Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet*. Dec;9(12):413-21.
- KOJIMA, N., WANG, J., MANSUY, I. M., GRANT, S. G., MAYFORD, M. & KANDEL, E. R. (1997). Rescuing impairment of long-term potentiation in fyn-deficient mice by introducing Fyn transgene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4761-5.
- KOLLIGS, F. T., NIEMAN, M. T., WINER, I., HU, G., VAN MATER, D., FENG, Y., SMITH, I. M., WU, R., ZHAI, Y., CHO, K. R. & FEARON, E. R. (2002). ITF-2, a downstream target of the Wnt/TCF pathway, is activated in human cancers with beta-catenin defects and promotes neoplastic transformation. *Cancer Cell* 1, 145-55.
- KONDO, T., RAFF, M. (2000). Basic helix-loop-helix proteins and the timing of oligodendrocyte differentiation. *Development*. Jul;127(14):2989-98.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- LASSAR, A. B., BUSKIN, J. N., LOCKSHON, D., DAVIS, R. L., APONE, S., HAUSCHKA, S. D. & WEINTRAUB, H. (1989). MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell* 58, 823-31.
- LEE, J. E. (1997). Basic helix-loop-helix genes in neural development. *Curr Opin Neurobiol* 7:13-20.
- LI, H., BISHOP, K. M. & O'LEARY, D. D. (2006). Potential target genes of EMX2 include Odz/Ten-M and other gene families with implications for cortical patterning. *Mol Cell Neurosci* 33, 136-49.

- LI, G., PLEASURE, S. J. (2005). Morphogenesis of the dentate gyrus: what we are learning from mouse mutants. *Dev Neurosci*. Mar-Aug; 27(2-4):93-9.
- LIANG, F. Q., WALLINEM R., EARNEST, D. J. (1998). Circadian rhythm of brain-derived neurotrophic factor in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett* Jul 31;251(3):209
- LIN, C. H., HANSEN, S., WANG, Z., STORM, D. R., TAPSCOTT, S. J. & OLSON, J. M. (2005). The dosage of the neuroD2 transcription factor regulates amygdala development and emotional learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14877-82.
- LIU, I. Y., LYONS, W. E., MAMOUNAS, L. A. & THOMPSON, R. F. (2004). Brain-derived neurotrophic factor plays a critical role in contextual fear conditioning. *J Neurosci* 24, 7958-63.
- LOWENSTEIN, D.H., ARSENAULT, L. (1996). Dentate granule cell layer collagen explant cultures: spontaneous axonal growth and induction by brain-derived neurotrophic factor or basic fibroblast growth factor. *Neuroscience*. Oct;74(4):1197-208
- LYDEN, D., YOUNG, A.Z., ZAGZAG, D., YAN, W., GERALD, W., O'REILLY, R., BADER, B.L., HYNES, R.O., ZHUANG, Y., MANOVA, K., BENEZRA, R. (1999). Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature*. Oct 14;401(6754):670-7.
- MA, P. C., ROULD, M. A., WEINTRAUB, H. & PABO, C. O. (1994). Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. *Cell* 77, 451-9.
- MANSUY, I. M., WINDER, D. G., MOALLEM, T. M., OSMAN, M., MAYFORD, M., HAWKINS, R. D., KANDEL, E. R. (1998). Inducible and reversible gene expression with the rtTA system for the study of memory. *Neuron*. Aug;21(2):257-65.
- MARKEL, P., SHU, P., EBELING, C., CARLSON, G. A., NAGLE, D. L., SMUTKO, J. S. & MOORE, K. J. (1997). Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains. *Nat Genet* 17, 280-4.
- MARTIN, S. J., DE HOZ, L. & MORRIS, R. G. (2005). Retrograde amnesia: neither partial nor complete hippocampal lesions in rats result in preferential sparing of remote spatial memory, even after reminding. *Neuropsychologia* 43, 609-24.
- MASSARI, M. E. & MURRE, C. (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* 20, 429-40.
- MATSUYAMA, S., NAMGUNG, U. & ROUTTENBERG, A. (1997). Longterm potentiation persistence greater in C57Bl/6 than DBA/2 mice - predicted on basis of protein kinase C levels and learning performance. *Brain Research* 763, 127—130.
- MAYFORD, M., BARANES, D., PODSYPANINA, K. & KANDEL, E. R. (1996). The 3'-untranslated region of CaMKII alpha is a cis-acting signal for the localization and translation of mRNA in dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13250-5.
- MCCORMICK, M.B., TAMIMI, R.M., SNIDER, L., ASAKURA, A., BERGSTROM, D., TAPSCOTT, S.J. (1996). NeuroD2 and neuroD3: distinct expression patterns and transcriptional activation potentials within the neuroD gene family. *Mol Cell Biol*. Oct;16(10):5792-800.
- MIYAZAKI, T., FUKAYA, M., SHIMIZU, H. & WATANABE, M. (2003). Subtype switching of vesicular glutamate transporters at parallel fibre-Purkinje cell synapses in developing mouse cerebellum. *Eur J Neurosci* 17, 2563-72.
- MORRIS, R. G. M. (1981). Spatial localisation does not depend on the presence of local cues. *Learning and Motivation* 12: 239-260.
- MORRIS, R. G. M., GARRUD, P., RAWLINS, J. N. P., O'KEEF, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297: 681-683.
- MORRIS, R. (1984). Developments of water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11: 47-60.

- MORRIS, R. (1985). Thy-1 in developing nervous tissue. *Dev Neurosci* 7, 133-60.
- MORRIS, R. G., ANDERSON, E., LYNCH, G. S. & BAUDRY, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319, 774-6.
- MU, J. S., LI, W. P., YAO, Z. B. & ZHOU, X. F. (1999). Deprivation of endogenous brain-derived neurotrophic factor results in impairment of spatial learning and memory in adult rats. *Brain Res* 835, 259-65.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G., ERLICH, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51 Pt 1:263-73.
- MUÑOZ, E. M., BAILEY, M. J., RATH, M. F., SHI, Q., MORIN, F., COON, S. L., MØLLER, M., KLEIN, D. C. (2007). NeuroD1: developmental expression and regulated genes in the rodent pineal gland. *J Neurochem.* Aug;102(3):887-99.
- MURRE, C., MCCAW, P. S. & BALTIMORE, D. (1989a). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 56, 777-83.
- MURRE, C., MCCAW, P. S., VAESSIN, H., CAUDY, M., JAN, L. Y., JAN, Y. N., CABRERA, C. V., BUSKIN, J. N., HAUSCHKA, S. D., LASSAR, A. B. & ET AL. (1989b). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58, 537-44.
- MURRE, C., BAIN, G., VAN DIJK, M.A., ENGEL, I., FURNARI, B.A., MASSARI, M.E., MATTHEWS, J.R., QUONG, M.W., RIVERA, R.R., STUIVER, M.H. (1994). Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochim Biophys Acta.* Jun 21;1218(2):129-35. Review.
- MÜLHARDT, C. *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics.* Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2003.
- NADEL, L., WINCOUR, G., RYAN, L. & MOSCOVITCH, M. (2007). Systems consolidation and hippocampus: two views. *Debates Neurosci.* 6 Mar 2007
- NAKAMURA, Y., SAKAKIBARA, S., MIYATA, T., OGAWA, M., SHIMAZAKI, T., WEISS, S., KAGEYAMA, R. & OKANO, H. (2000). The bHLH gene *hes1* as a repressor of the neuronal commitment of CNS stem cells. *J Neurosci* 20, 283-93.
- NAKASHIMA, K., TAKIZAWA, T., OCHIAI, W., YANAGISAWA, M., HISATSUNE, T., NAKAFUKU, M., MIYAZONO, K., KISHIMOTO, T., KAGEYAMA, R., TAGA, T. (2001). BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* May 8;98(10):5868-73.
- NAYA, F. J., HUANG, H. P., QIU, Y., MUTOH, H., DEMAYO, F. J., LEITER, A. B., TSAI, M. J. (1997). Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev.* Sep 15;11(18):2323-34.
- NEUMAN, T., KEEN, A., ZUBER, M. X., KRISTJANSSON, G. I., GRUSS, P., NORNES, H. O. (1993). Neuronal expression of regulatory helix-loop-helix factor *Id2* gene in mouse. *Dev Biol.* Nov;160(1):186-95.
- NEUMAN, K., NORNES, H. O., NEUMAN, T. (1995). Helix-loop-helix transcription factors regulate *Id2* gene promoter activity. *FEBS Lett.* Oct 30;374(2):279-83.
- NICHOLAS, B., RUDRASINGHAM, V., NASH, S., KIROV, G., OWEN, M. J. & WIMPORY, D. C. (2007). Association of *Per1* and *Npas2* with autistic disorder: support for the clock genes/social timing hypothesis. *Mol Psychiatry* 12, 581-92.
- NIETO, M., SCHUURMANS, C., BRITZ, O., GUILLEMOT, F. (2001). Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron.* Feb;29(2):401-13.
- O'CALLAGHAN, J. P. & HOLTZMAN, S. G. (1985). Quantification of the analgesic activity of narcotic antagonists by a modified hot-plate procedure. *J Pharmacol Exp Ther* 192, 497-505.

- OHTSUKA, T., SAKAMOTO, M., GUILLEMOT, F., KAGEYAMA, R. (2001). Roles of the basic helix-loop-helix genes *Hes1* and *Hes5* in expansion of neural stem cells of the developing brain. *J Biol Chem*. Aug 10;276(32):30467-74
- OWEN, E. H., LOGUE, S. F., RASMUSSEN, D. L. & WEHNER, J. M. (1997). Assessment of learning by the Morris water task and fear conditioning in inbred mouse strains and F1 hybrids: implications of genetic background for single gene mutations and quantitative trait loci analyses. *Neuroscience* 80, 1087-99.
- PASTALKOVA, E., SERRANO, P., PINKHASOVA, D., WALLACE, E., FENTON, A. A. & SACKTOR, T. C. (2006). Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science* 313, 1141-4.
- PAVLOV, I. P. (1927). *Conditioned reflexes*. Oxford University Press, Oxford, England, U.K.
- PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S. E. & BRILEY, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14, 149-67.
- PEPITONI, S., WOOD, I. C. & BUCKLEY, N. J. (1997). Structure of the *m1* muscarinic acetylcholine receptor gene and its promoter. *J Biol Chem* 272, 17112-7.
- PITT, D. AND HOPKINS, I. (1978). A syndrome of mental retardation, wide mouth and intermittent overbreathing. *Aust. Paediatr. J.* 14:182-184.
- POO, M. M. (2001). Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci* 2, 24-32.
- PORSOLT, R. D., LE PICHON, M. & JALFRE, M. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730-2.
- RAVANPAY, A. C. & OLSON, J. M. (2008). E protein dosage influences brain development more than family member identity. *J Neurosci Res* 86, 1472-81.
- RIGAUT, G., SHEVCHENKO, A., RUTZ, B., WILM, M., MANN, M. & SERAPHIN, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* 17, 1030-2.
- ROBERTS, V.J., STEENBERGEN, R., MURRE, C. (1993). Localization of *E2A* mRNA expression in developing and adult rat tissues. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* Aug 15;90(16):7583-7.
- ROBERTSON, A., PEREA, J., TOLMACHOVA, T., THOMAS, P. K. & HUXLEY, C. (2002). Effects of mouse strain, position of integration and tetracycline analogue on the tetracycline conditional system in transgenic mice. *Gene* 282, 65-74.
- ROTHSCHILD, G., ZHAO, X., IAVARONE, A. & LASORELLA, A. (2006). E Proteins and *Id2* converge on *p57Kip2* to regulate cell cycle in neural cells. *Mol Cell Biol* 26, 4351-61.
- ROYLE, S. J., COLLINS, F. C., RUPNIAK, H. T., BARNES, J. C., ANDERSON, R. (1999). Behavioural analysis and susceptibility to CNS injury of four inbred strains of mice. *Brain Res.* Jan 23;816(2):337-49.
- SAKAMOTO, K., NAGASE, T., FUKUI, H., HORIKAWA, K., OKADA, T., TANAKA, H., SATO, K., MIYAKE, Y., OHARA, O., KAKO, K., ISHIDA, N. (1998). Multitissue circadian expression of rat period homolog (*rPer2*) mRNA is governed by the mammalian circadian clock, the suprachiasmatic nucleus in the brain. *J Biol Chem*. Oct 16;273(42):27039-42.
- SANDERS, M. J., WILTGEN, B. J. & FANSELOW, M. S. (2003). The place of the hippocampus in fear conditioning. *Eur J Pharmacol* 463, 217-23.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec;74(12):5463-7.
- SCHWAB, M. H., DRUFFEL-AUGUSTIN, S., GASS, P., JUNG, M., KLUGMANN, M., BARTHOLOMAE, A., ROSSNER, M. J. & NAVE, K. A. (1998). Neuronal basic helix-loop-helix proteins (*NEX*, *neuroD*, *NDRF*): spatiotemporal expression and targeted disruption of the *NEX* gene in transgenic mice. *J Neurosci* 18, 1408-18.
- SCHWAB, M. H., BARTHOLOMAE, A., HEIMRICH, B., FELDMEYER, D., DRUFFEL-AUGUSTIN, S., GOEBBELS, S., NAYA, F. J., ZHAO, S., FROTSCHER, M., TSAI, M. J. & NAVE, K. A.

- (2000). Neuronal basic helix-loop-helix proteins (NEX and BETA2/Neuro D) regulate terminal granule cell differentiation in the hippocampus. *J Neurosci* 20, 3714-24.
- SCOVILLE, W.B., MILNER, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. Feb;20(1):11-21.
- SHEARMAN, L. P., ZYLKA, M. J., WEAVER, D. R., KOLAKOWSKI, L. F., JR. & REPERT, S. M. (1997). Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron* 19, 1261-9.
- SHIMIZU, C., AKAZAWA, C., NAKANISHI, S., KAGEYAMA, R. (1995). MATH-2, a mammalian helix-loop-helix factor structurally related to the product of *Drosophila* proneural gene *atonal*, is specifically expressed in the nervous system. *Eur J Biochem*. Apr 1;229(1):239-48.
- SILVER, L. *Mouse Genetics, Concepts and Applications* (Oxford University Press, New York, 1995).
- SOOSAAR, A., CHIARAMELLO, A., ZUBER, M. X., NEUMAN, T. (1994). Expression of basic-helix-loop-helix transcription factor ME2 during brain development and in the regions of neuronal plasticity in the adult brain. *Brain Res Mol Brain Res*. Aug;25(1-2):176-80.
- SOUTHERN, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*. Nov 5;98(3):503-17.
- SQUIRE, L. R. & BAYLEY, P. J. (2007). The neuroscience of remote memory. *Curr Opin Neurobiol* 17, 185-96.
- STERÚ, L., CHERMAT, R., THIERRY, B. & SIMON, P. (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 85, 367-70.
- SÚPER, H., SORIANO, E. (1994). The organization of the embryonic and early postnatal murine hippocampus. II. Development of entorhinal, commissural, and septal connections studied with the lipophilic tracer DiI. *J Comp Neurol*. Jun 1;344 (1):101-20.
- SWANSON, H. I., CHAN, W. K., BRADFIELD, C. A. (1995). DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins. *J Biol Chem*. Nov 3;270(44):26292-302.
- TEI, H., OKAMURA, H., SHIGEYOSHI, Y., FUKUHARA, C., OZAWA, R., HIROSE, M. & SAKAKI, Y. (1997). Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. *Nature* 389, 512-6.
- TOMA, J. G., EL-BIZRI, H., BARNABE-HEIDER, F., ALOYZ, R. & MILLER, F. D. (2000). Evidence that helix-loop-helix proteins collaborate with retinoblastoma tumor suppressor protein to regulate cortical neurogenesis. *J Neurosci* 20, 7648-56.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. & GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4.
- TSIEN, J. Z., CHEN, D. F., GERBER, D., TOM, C., MERCER, E. H., ANDERSON, D. J., MAYFORD, M., KANDEL, E. R. & TONEGAWA, S. (1996a). Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell* 87, 1317-26.
- TSIEN, J. Z., HUERTA, P. T. & TONEGAWA, S. (1996b). The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87, 1327-38.
- UCAR, O. S., WICHERT, S. P., BRZÓZKA, M. M., NAVE, K.-A., ROSSNER, M. J., SCHWAB, M. H. Neuronal basic helix-loop-helix protein NEX-1 is required for hippocampus-dependent memory acquisition. In Vorbereitung.
- UCAR, O. S. (2007). The role of bHLH transcription factor NEX in neuronal differentiation and experience-dependent plasticity. Doktorarbeit.
- UEDA, H. R., CHEN, W., ADACHI, A., WAKAMATSU, H., HAYASHI, S., TAKASUGI, T., NAGANO, M., NAKAHAMA, K., SUZUKI, Y., SUGANO, S., IINO, M., SHIGEYOSHI, Y. &

- HASHIMOTO, S. (2002). A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature* 418, 534-9.
- UEDA, H. R., HAYASHI, S., CHEN, W., SANO, M., MACHIDA, M., SHIGEYOSHI, Y., IINO, M., HASHIMOTO, S. (2005). System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nat Genet.* Feb;37(2):187-92.
- UITTENBOGAARD, M. & CHIARAMELLO, A. (1999). Expression of the basic Helix-Loop-Helix ME1 E-protein during development and aging of the murine cerebellum. *Neurosci Lett* 274, 191-4.
- UITTENBOGAARD, M. & CHIARAMELLO, A. (2000). Differential expression patterns of the basic helix-loop-helix transcription factors during aging of the murine brain. *Neurosci Lett* 280, 95-8.
- UITTENBOGAARD, M. & CHIARAMELLO, A. (2002). Expression of the bHLH transcription factor Tcf12 (ME1) gene is linked to the expansion of precursor cell populations during neurogenesis. *Brain Res Gene Expr Patterns* 1, 115-21.
- UITTENBOGAARD, M., MARTINKA, D. L. & CHIARAMELLO, A. (2003). The basic helix-loop-helix differentiation factor Nex1/MATH-2 functions as a key activator of the GAP-43 gene. *J Neurochem* 84, 678-88.
- UITTENBOGAARD, M., CHIARAMELLO, A. (2005). The basic helix-loop-helix transcription factor Nex-1/Math-2 promotes neuronal survival of PC12 cells by modulating the dynamic expression of anti-apoptotic and cell cycle regulators. *J Neurochem.* Feb;92(3):585-96.
- UITTENBOGAARD, M., MARTINKA, D. L., JOHNSON, P. F., VINSON, C. & CHIARAMELLO, A. (2007). 5'UTR of the neurogenic bHLH Nex1/MATH-2/NeuroD6 gene is regulated by two distinct promoters through CRE and C/EBP binding sites. *J Neurosci Res* 85, 1-18.
- UPCHURCH, M. & WEHNER, J. M. (1989). Inheritance of spatial learning ability in inbred mice: a classical genetic analysis. *Behav Neurosci* 103, 1251-8.
- VILLARES, R. & CABRERA, C. V. (1987). The achaete-scute gene complex of *D. melanogaster*: conserved domains in a subset of genes required for neurogenesis and their homology to *myc*. *Cell* 50, 415-24.
- VITATERNA, M. H., SELBY, C. P., TODO, T., NIWA, H., THOMPSON, C., FRUECHTE, E. M., HITOMI, K., THRESHER, R. J., ISHIKAWA, T., MIYAZAKI, J., TAKAHASHI, J. S. & SANCAR, A. (1999). Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12114-9.
- VORONOVA, A. & BALTIMORE, D. (1990). Mutations that disrupt DNA binding and dimer formation in the E47 helix-loop-helix protein map to distinct domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4722-6.
- WEINTRAUB, H., DWARKI, V. J., VERMA, I., DAVIS, R., HOLLENBERG, S., SNIDER, L., LASSAR, A. & TAPSCOTT, S. J. (1991). Muscle-specific transcriptional activation by MyoD. *Genes Dev* 5, 1377-86.
- WHELAN, J., CORDLE, S. R., HENDERSON, E., WEIL, P. A. & STEIN, R. (1990). Identification of a pancreatic beta-cell insulin gene transcription factor that binds to and appears to activate cell-type-specific expression: its possible relationship to other cellular factors that bind to a common insulin gene sequence. *Mol Cell Biol* 10, 1564-72.
- WOLFER, D. P., LIPP, H. P. (2000). Dissecting the behaviour of transgenic mice: is it the mutation, the genetic background, or the environment? *Exp Physiol.* Nov;85(6):627-34.
- WU. S.-X., GOEBBELS, S., NAKAMURA, K., NAKAMURA, K., KOMETANI, K., MINATO, N., KANEKO, T., NAVE, K.-A., TAMAMAKI, N. (2005). Pyramidal neurons of upper cortical layers generated by NEX-positive progenitor cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 102: 17172–17177.

- YOKOTA, Y. (2001). Id and development. *Oncogene* 20, 8290-8.
- YOO, S. H., KO, C. H., LOWREY, P. L., BUHR, E. D., SONG, E. J., CHANG, S., YOO, O. J., YAMAZAKI, S., LEE, C. & TAKAHASHI, J. S. (2005). A noncanonical E-box enhancer drives mouse *Period2* circadian oscillations in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2608-13.
- ZERVOS, A. S., GYURIS, J. & BRENT, R. (1994). Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. *Cell* 79, following 388.
- ZHAO, G. Q., ZHAO, Q., ZHOU, X., MATTEI, M. G. & DE CROMBRUGGHE, B. (1993). TFEC, a basic helix-loop-helix protein, forms heterodimers with TFE3 and inhibits TFE3-dependent transcription activation. *Mol Cell Biol* 13, 4505-12.
- ZHUANG, Y., SORIANO, P. & WEINTRAUB, H. (1994). The helix-loop-helix gene *E2A* is required for B cell formation. *Cell* 79, 875-84.
- ZHUANG, Y., CHENG, P. & WEINTRAUB, H. (1996). B-lymphocyte development is regulated by the combined dosage of three basic helix-loop-helix genes, *E2A*, *E2-2*, and *HEB*. *Mol Cell Biol* 16, 2898-905.
- ZHUANG, Y., BARNDT, R. J., PAN, L., KELLEY, R. & DAI, M. (1998). Functional replacement of the mouse *E2A* gene with a human *HEB* cDNA. *Mol Cell Biol* 18, 3340-9.
- ZWEIER, C., PEIPPO, M. M., HOYER, J., SOUSA, S., BOTTANI, A., CLAYTON-SMITH, J., REARDON, W., SARAIVA, J., CABRAL, A., GÖHRING, I., DEVRIENDT, K., DE RAVEL, T., BILJSMA, E., HENNEKAM, R. C. M., ORRICO, A., COHEN, M., DREWEKE, A., REIS, A., NÜRNBERG, P., RAUCH, A. (2007). Haploinsufficiency of *TCF4* causes syndromal mental retardation with intermittent hyperventilation (Pitt-Hopkins syndrome), *Am. J. Hum. Genet.* 80: 994-1001.
- ZHOU, Q., WANG, S., ANDERSON, D. J. (2000). Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Neuron*. Feb;25(2):331-43

10 LEBENS LAUF

VORNAME, NAME:	Magdalena Marta Brzózka
GEBURTSDATUM:	27. September 1978
GEBURTSORT:	Warschau, Polen
STAATSANGEHÖRIGKEIT:	Polnisch
AUSBILDUNG:	
07/2004 - 09/2008	Promotion im Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen, Abteilung Neurogenetik; Thema: "Untersuchungen zur Funktion des basischen Helix-Loop-Helix-(bHLH)-Transkriptionsfaktors ME2 bei Lern- und Gedächtnisprozessen in der Maus"
01/2004 - 04/2004	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Kardiologie und Pneumologie, Universitätsklinikum Göttingen; Abteilungsleiter: Prof. Dr. G. Hasenfuß
11/2003 - 06/2004	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen, Abteilung Neurogenetik; Abteilungsleiter: Prof. Dr. K.-A. Nave
12/2002 - 11/2003	Diplomarbeit im III. Zoologischen Institut an der Georg-August-Universität Göttingen, Abteilung Entwicklungsbiologie; Thema: " <i>Outer dense fiber protein 2 (ODF2)</i> : Funktionelle Analysen durch Charakterisierung von Interaktionspartnern und Erzeugung von ODF2-defizienten Zelllinien"
11/2002	Diplomprüfungen Biologie; Hauptfach: Entwicklungsbiologie, Nebenfächer: Biochemie und Zoologie
10/2001	Vordiplomprüfungen Biologie; Fächer: Zoologie, Genetik, Anorganische Chemie und Physikalische Chemie
09/2001 - 11/2003	Studium der Biologie an der Georg-August-Universität in Göttingen
09/2000 - 08/2001	Erasmus-Stipendiatin in Göttingen
10/1997 - 08/2001	Studium der Biologie an der Universität Warschau
05/1997	Abiturprüfung in Warschau

PUBLIKATIONEN:

RADYUSHKIN, K., BAIER, P.C., WICHERT, S.P., BRZÓZKA, M.M., OSTER, H., EHRENREICH, H., TANEJA, R., NAVE, K.-A., ROSSNER, M.J. *Improved learning and altered sleep patterns in Sharp-1 and Sharp-2 mutant mice*. In Vorbereitung.

BRZÓZKA, M.M., WICHERT, S.P., ROSSNER, M.J. The transgenic overexpression of the Pitt-Hopkins Syndrome gene ME2 in mice leads to an impairment of the contextual and cued fear memory. In Vorbereitung.

UCAR O.S., WICHERT S.P., BRZÓZKA M.M., NAVE K.-A., ROSSNER M.J., SCHWAB M.H. Neuronal basic helix-loop-helix protein NEX-1 is required for hippocampus-dependent memory acquisition. In Vorbereitung.

BRZÓZKA, M.M., FALKAI, P., HAVEMANN-REINECKE, U. (2009). *Für Schizophrenia braucht man Drei*. Suchtmed 11 (3): 98-103.