

# INAUGURAL-DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlichen-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht – Karls – Universität  
Heidelberg

vorgelegt von:

Thilo Borchardt  
aus Flehingen

Tag der mündlichen Prüfung:

# **Die Konstruktion von Mäusen mit veränderten AMPA-Rezeptoren**

**Gutachter: Prof. Dr. Peter H. Seeburg  
Prof. Dr. Klaus Armin Nave**

Ich erkläre hiermit, daß ich die vorliegende Dissertation selbst verfaßt und mich dabei keiner anderen Mittel, als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Desweiteren erkläre ich hiermit, daß ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt, beziehungsweise die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Heidelberg, 5. Juni, 2002

## Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Peter H. Seeburg für die freundliche Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit, sowie die exzellenten Arbeitsbedingungen.

Dr. Rolf Sprengel für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit, seine wertvollen Ideen, sowie den großzügigen Freiraum, den er mir in der experimentellen Ausarbeitung dieses Projektes gewährt hat.

Jochen Hartner, Liliana Layer, Volker Mack, Derya Shimshek, Simone Freese, André Mihaljewic, und Dr. Bernard Lakaye für die freundschaftliche Zusammenarbeit und Unterstützung.

Liliana Layer für die Betreuung der Mäuse in den Verhaltensversuchen.

Dr. Miyoko Higuchi für ihre experimentelle Unterstützung und motivierenden Ratschläge.

Dr. Frank Single für die Einführung in Stammzell-Kultivierung.

Tina Miucci, Giovanni Miucci, Andrea Gentner, Axel Erharth, Marc Westermann und Rita Pfeffer für die Hilfe bei der Aufzucht der Mauslinien.

PD Dr. Georg Köhr, Verena Pawlak und Bettina Schupp, Dr. Katharina Kaiser, Prof. Nail Burnashev, Dr. Andrei Rozov, Dr. Vidar Jensen, und Dr. Øivind Hvalby für die wissenschaftliche Zusammenarbeit und die elektrophysiologischen Analysen der Mauslinien.

Prof. Dr. Klaus Armin Nave danke ich sehr für die Begutachtung meiner Dissertation.

Ein besonderer Dank geht an Claudia und meine Familie, für die seelische und moralische Unterstützung während meiner gesamten Studienzzeit.

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurden Mausmutanten zur *in vivo* Funktionsanalyse von AMPA-Rezeptorkanälen mit fehlender GluR-C Untereinheit generiert. Die Mauslinien RC2 und RC3 sollen die konditionale und zellspezifische Eliminierung von GluR-C durch in das GluR-C Gen eingebrachte loxP-Elemente ermöglichen. In der Mauslinie RC1 wurde GluR-C im Gesamtorganismus eliminiert. Die Deletion von GluR-C führte in RC1 Mäusen zu Verhaltensbeeinträchtigungen in Angstkonditionierung und feinmotorischer Koordination, die möglicherweise durch veränderte AMPA-Rezeptor vermittelte Reizweiterleitung im limbischen System und im Kleinhirn verursacht wurden. Bei der Analyse der hippokampalen Verschaltungen wurde zu keinem Entwicklungsstadium eine Funktionseinschränkung der durch AMPA-Rezeptoren vermittelten Prozesse, inklusive der Langzeitpotenzierung, beobachtet, obwohl sich das Fehlen von GluR-C in einer selektiven Reduktion von GluR-B Untereinheiten, besonders im jungen Tier, bemerkbar machte. Gleichzeitig wurde eine Anreicherung der GluR-B Untereinheit in den Zellkörpern von Prinzipalneuronen des Hippokampus beobachtet, was auf eine Rolle von GluR-C für die AMPA-Rezeptor Verteilung im Dendritenbaum hinweist. In den Purkinjoneuronen des Kleinhirns ließ sich eine somatische GluR-B Anreicherung nach dem Verlust von GluR-C nicht beobachten, was auf unterschiedliche AMPA-Rezeptor Transportmechanismen in Kleinhirn und Hippokampus hindeuten könnte. Dies konnte durch Mäuse, denen sowohl GluR-A als auch GluR-C fehlt, bestätigt werden. Auch in GluR-A/C defizienten Mäusen lokalisierten GluR-B Untereinheiten in Purkinjenzellen nach wie vor im Dendritenbaum, während sie in CA1-Pyramidalneuronen noch stärker somatisch akkumulierten und der Großteil der GluR-B Untereinheiten nicht über mediale Golgi-Kompartimente hinaus prozessiert wurde. Infolgedessen war die AMPA-Rezeptor vermittelte, synaptische Reizweiterleitung in CA1-Pyramidalzellen kaum noch nachweisbar. Nach tetanischer Stimulation konnte in GluR-A/C defizienten Mäusen keine Langzeitpotenzierung an hippokampalen CA3/CA1 Synapsen induziert werden, die jedoch nach experimenteller Depolarisation der postsynaptischen Zelle im "Pairing" Protokoll immer noch erreicht wurde. Dies weist darauf hin, daß AMPA-Rezeptoren im jungen Tier für die Initiierung synaptischer Reizverstärkung an CA3/CA1 Synapsen des Hippokampus benötigt werden, nicht aber für die Aufrechterhaltung von Langzeitpotenzierung. Erstaunlicherweise waren diese Mäuse, trotz des Verlustes von AMPA-Rezeptor vermittelter Transmission, bis zur Pubertät lebensfähig und wiesen keine morphologischen Abnormitäten in der Entwicklung hippokampaler und cerebellärer Strukturen auf. Dies zeigt, daß die Etablierung zellulärer Strukturen auch ohne erregende Reizweiterleitung durch AMPA-Rezeptoren stattfinden kann.

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Glutamat gesteuerte Ionenkanäle	2
1.2 AMPA-Rezeptoren	4
1.3 Modulation synaptischer Erregungsleitung durch AMPA- und NMDA-Rezeptoren	5
1.4 Die Rolle von AMPA-Rezeptoren bei der Langzeitpotenzierung im Hippokampus	6
1.5 Die Rolle von AMPA-Rezeptoren im Kleinhirn	9
1.6 Säugetiermodelle zur <i>in vivo</i> Charakterisierung von AMPA-Rezeptoren	11
1.7 Ziel der Arbeit	12
<b>2. Ergebnisse</b>	<b>13</b>
2.1 Gezielte Modulation des <b>GluR-C Genlokus auf dem X-Chromosom</b>	<b>13</b>
2.1.1 Isolation einzelner GluR-C Gensegmente	13
2.1.2 Der “Gene-Targeting” Vektor	14
2.1.3 Homologe ES-Zell Rekombination im GluR-C Gen	16
2.1.4 Cre-Rekombination in ES-Zellen zur Deletion der Neomycin-Resistenz Kassette und funktionellen Ausschaltung der GluR-C Expression	18
2.1.5 Etablierung der Mauslinien mit genetisch manipuliertem GluR-C Genlokus	20
2.1.6 Im RC1 Genotyp entstehen verkürzte mRNAs, im RC3 Genotyp werden Transkripte korrekt prozessiert	21
2.1.7 Die Deletion von Exon 11 führt zur funktionellen Ausschaltung der GluR-C Proteinexpression	22
2.2 <b>Verhaltensphänotyp von Mäusen mit deletierter GluR-C Untereinheit</b>	<b>23</b>
2.2.1 Die lokomotorische Aktivität zur Erkundung neuer Umgebungen ist in GluR-C defizienten Mäusen beeinträchtigt	23
2.2.2 GluR-C defiziente Mäuse sind in ihrer Körperbalance signifikant beeinträchtigt	24
2.2.3 Die Deletion von GluR-C führt zu verlangsamtem motorischen Lernen im beschleunigenden Rotarod-Test	25
2.2.4 GluR-C defiziente Mäuse sind in angstbezogenen Verhaltensweisen gestört	26
2.2.5 Die Defizienz von GluR-C vermindert die Fähigkeit zur Gedächtnisbildung für angstbezogenes Verhalten	28

---

<b>2.3 Biochemische und elektrophysiologische Charakterisierung im Hippokampus von GluR-C defizienten Mäusen</b>	<b>30</b>
2.3.1 Reduzierte Expression der GluR-B Untereinheit im Hippokampus GluR-C defizienter Mäuse	30
2.3.2 Der Verlust von GluR-C führt zur Akkumulation von GluR-B Untereinheiten in den Zellkörpern von Pyramidalneuronen	32
2.3.3 GluR-C Defizienz führt zum partiellen Rückhalt von GluR-B Untereinheiten in Endoplasmatischem Retikulum und medialen Golgi Kompartimenten	34
2.3.4 Normale synaptische und extrasynaptische AMPA-Rezeptor vermittelte Transmission in GluR-C defizienten Mäusen	37
2.3.5 Wildtyp LTP an CA3/CA1 Synapsen von GluR-C defizienten Mäusen	39
2.3.6 Der gleichzeitige Verlust von GluR-A und GluR-C führt in Mäusen zu schwerwiegenden Verhaltensdefiziten und zum Verlust synaptischer AMPA-Rezeptor Reizweiterleitung im Hippokampus	40
2.3.6.1 <i>Der gleichzeitige Verlust von GluR-A und GluR-C führt zum Verbleib des Großteils der GluR-B Untereinheiten in unmaturiertem Zustand</i>	40
2.3.6.2 <i>Der gleichzeitige Verlust von GluR-A und GluR-C führt im Hippokampus zu nahezu vollständigem Verbleib von GluR-B in den Zellkörpern von Pyramidalneuronen</i>	42
2.3.6.3 <i>Das Verhältnis synaptischer, AMPA/NMDA-Rezeptor vermittelter Ströme ist in Doppelmutanten um 96% reduziert gegenüber dem Wildtyp bei Abwesenheit von spontan aktivierten AMPA-Rezeptor Strömen</i>	43
2.3.6.4 <i>In 14 Tage alten GluR-A/C defizienten Mäusen findet nach tetanischer Stimulation keine synaptische Potenzierung in der CA1-Region des Hippokampus statt</i>	44
2.3.6.5 <i>Die Ausbildung zellulärer Strukturen und synaptischer Verbindungen im Hippokampus wird durch den gleichzeitigen Verlust von GluR-A und GluR-C nicht beeinflusst</i>	45
<b>2.4 Biochemische und elektrophysiologische Charakterisierung im Kleinhirn von GluR-C defizienten Mäusen</b>	<b>47</b>
2.4.1 Die Deletion von GluR-C im Kleinhirn führt zu Veränderungen der entwicklungsabhängigen Expression von AMPA-Rezeptor Untereinheiten	47
2.4.2 GluR-C Defizienz verändert die zelltypspezifische Expression von AMPA-Rezeptoren nicht	48

---

2.4.3 Die subzelluläre Verteilung von GluR-B und GluR-D wird durch Deletion von GluR-A und GluR-C nicht verändert	50
2.4.4 Die GluR-C Defizienz führt zur Abschaltung extrasynaptischer AMPA-Rezeptor Ströme in Sternzellen des Kleinhirnes	51
<b>3. Diskussion</b>	<b>53</b>
<b>3.1 GluR-C defiziente Mauslinien sind in lebensnotwendigen Körperfunktionen nicht beeinträchtigt</b>	<b>53</b>
<b>3.2 GluR-C defiziente Mäuse sind in ihrer Motorkoordination beeinträchtigt und zeigen Auffälligkeiten angstbezogenen Verhaltens</b>	<b>54</b>
<b>3.3 Der Verlust der AMPA-Rezeptor Untereinheiten GluR-A und GluR-C führt im Hippokampus zur Destabilisierung des Rezeptorpartners GluR-B</b>	<b>58</b>
<b>3.4 Die AMPA-Rezeptor vermittelte Transmission findet im Hippokampus auch ohne GluR-C haltige Rezeptoren uneingeschränkt statt</b>	<b>62</b>
<b>3.5 Eine AMPA-Rezeptor vermittelte Transmission an hippocampalen SC/CA1 Synapsen ist für die Induktion, nicht aber für die Expression juveniler Langzeitpotenzierung essentiell</b>	<b>64</b>
<b>3.6 Die zellulären Strukturen des Hippokampus bilden sich auch ohne AMPA-Rezeptor vermittelte Transmission aus</b>	<b>66</b>
<b>3.7 Die GluR-C Defizienz verändert die Expression von AMPA-Rezeptor Untereinheiten im Kleinhirn, beeinflusst aber nicht die subzelluläre Lokalisation verbleibender Rezeptoren, z.B in Purkinjezellen</b>	<b>67</b>
<b>3.8 GluR-C ist für die AMPA-Rezeptor vermittelte Transmission in Sternzellen des Kleinhirnes essentiell</b>	<b>68</b>
<b>4. Material und Methoden</b>	<b>69</b>
<b>4.1 Methoden</b>	<b>70</b>
4.1.1 Isolierung subgenomischer Maus-DNA aus einer genomischen $\lambda$ -Phagen Bibliothek	70
4.1.2 Restriktionskartierung der genomischen Klone	70
4.1.3 Konstruktion eines konditionalen “Targeting”-Vektors	71
4.1.4 Kultur, Transformation und Selektion von ES-Zellen der Maus	72
4.1.5 Cre-loxP vermittelte DNA-Rekombination und Negativ-Selektion in ES-Zellen	73



4.1.6 Herstellung und Haltung transgener Mäuse	73
4.1.7 Genotypisierung der mutanten Mauslinien	73
4.1.8 DNA-Sequenzierung	74
4.1.9 Oligonukleotidsynthese	74
4.1.10 Gesamt-RNA Isolation	74
4.1.11 RT-PCR	74
4.1.12 Protein-Präparation aus Hirngewebe	75
4.1.13 Immunpräzipitation von AMPA-Rezeptoren	75
4.1.14 Enzymatische Protein-Deglykosilierung	76
4.1.15 Western Blot	76
4.1.16 Immunhistochemische Untersuchung von Gehirnschnitten der Maus	77
4.1.17 „Nucleated soma patch“-Ableitungen	77
4.1.18 Gesamtzell-Ableitungen synaptischer Ströme	78
4.1.19 Messung des „Pairing“-induzierten LTPs an CA3/CA1 Synapsen	79
4.1.20 Ableitungen extrazellulärer Feldpotentiale (Feld-LTP)	79
<b>4.2 Material</b>	<b>80</b>
4.2.1 Eukaryotische Zellen	80
4.2.2 Mauslinien	80
4.2.3 Sequenzen verwendeter Oligonukleotide	80
4.2.4 Verwendete Antikörper	81
<b>5. Abkürzungen</b>	<b>82</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>7. Publikationen</b>	<b>100</b>

## 1. Einleitung

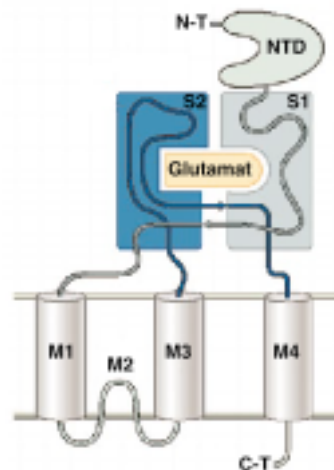
Nahezu alle Körperfunktionen werden durch das Nervensystem gesteuert. Nervenzellen kontrollieren die Koordination des Bewegungsapparates, sowie die Aktivität endo- und exokriner Drüsen. Sensorische Nervenzellen empfangen Signale der Umwelt und der Körperorgane und leiten diese zur Weiterverarbeitung an höhere Nervenzentren. Das Gehirn, als komplexe Schaltzentrale, enthält rund eine Billion ( $10^{12}$ ) Neurone, die durchschnittlich mit je 1000 anderen Nervenzellen Kontakte ausbilden. Die grundlegende Funktion von Nervenzellen liegt in der Weiterleitung, Speicherung und Verarbeitung von Informationen, die sie als elektrische oder chemische Signale erhalten. Die schnelle elektrische Übertragung durch Gap-Junctions erfolgt nahezu ohne zeitliche Verzögerung und ermöglicht den direkten Austausch von Ionen zwischen Nervenzellen. Im Vergleich dazu können chemische Synapsen schnell oder langsam sein, sie können erregend oder hemmend wirken. Ein ankommendes Aktionspotential in der Präsynapse von Nervenzellen führt zum Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die präsynaptische Endigung. Die Calcium-Ionen lösen eine vesikuläre Ausschüttung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt aus, die mehrere tausend Transmittermoleküle aus jedem synaptischen Vesikel freisetzt. Die Neurotransmitter binden an der Postsynapse an langsame G-Protein gekoppelte Rezeptoren oder schnelle ligandengesteuerte Ionenkanäle. Die Bindung des Neurotransmitters an schnelle, erregende Ionenkanäle führt in der Regel zum Einstrom von  $\text{Na}^+$ -Ionen in die Postsynapse, wodurch die Membran depolarisiert wird. Die Bindung an schnelle, hemmende Ionenkanäle führt in der Regel zum Einstrom von  $\text{Cl}^-$ -Ionen, was zu einer Hyperpolarisation der Membran führt. Obwohl die Signalübertragung an chemischen Synapsen mit einer zeitlichen Verzögerung von etwa 0,3ms stattfindet, besitzen chemische Synapsen den entscheidenden Vorteil Signale verstärken und abschwächen zu können. Postsynaptische Zellen empfangen hemmende und erregende Informationen von multiplen präsynaptischen Nervenendigungen. Die Erzeugung eines Aktionspotentials hängt von der räumlichen und zeitlichen Integration der eingehenden Signale in der postsynaptischen Zelle ab.

Der wichtigste erregende Neurotransmitter im Zentralnervensystem ist die Aminosäure L-Glutamat (Dingledine et al., 1999), der wichtigste hemmende Neurotransmitter ist  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) (Bormann, 2000). Die langsame, indirekte Form der chemischen Signal-Transmission, erfolgt durch G-Protein gekoppelte, metabotrope Rezeptoren (Nakanishi, 1992) und moduliert die synaptische Übertragung durch die Auslösung von "second messenger" Kaskaden (Fagni et al., 2000).

## 1.1 Glutamat gesteuerte Ionenkanäle

Die schnelle, chemische Signalübertragung wird durch ionotrope Glutamatrezeptoren vermittelt. Die funktionelle Modulierbarkeit glutamaterger Synapsen spielt eine wesentliche Rolle bei unterschiedlichen Vorgängen im Zentralnervensystem, wie sensorische Signalübertragung (Cardozo et al., 1991), Lernvorgänge (Maren und Baudry, 1995) und die Gedächtnisbildung (Asztely und Gustaffson, 1996). Basierend auf ihrer Sequenzhomologie in den kanalformenden Domänen wird angenommen, daß ionotrope Glutamatrezeptoren mit dem KcsAK<sup>+</sup> Kalium-Kanal aus *Streptomyces*, der aus vier individuellen Untereinheiten besteht (Doyle et al., 1998), strukturverwandt sind. In Säugetieren wurden bisher 18 verschiedene Glutamat-Rezeptor Untereinheiten identifiziert, die entsprechend ihrer Sequenzhomologie und pharmakologischen Eigenschaften in L- $\gamma$ -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure- (AMPA), Kainat-, und N-methyl-D-Aspartat- (NMDA) Rezeptoren eingeteilt wurden (Dingledine et al., 1999). Eine vierte Familie von Delta-Rezeptoren ist in der Aminosäuresequenz zu 15-25% mit Glutamat-Rezeptoren verwandt (Sprengel et al., 2001). Obwohl Delta-Untereinheiten in vitro keine funktionellen Rezeptoren formen, führt in der „Lurcher“-Maus Mutante eine Mutation in der Delta 2-Untereinheit zu starken konstitutiven Einwärtsströmen, die als Modell für Übererregbarkeit von Nervenendigungen gelten. Die vorraussichtliche Molekülstruktur von ionotropen Glutamat-Rezeptoren (Abb 1) besteht aus einem grossen extrazellulären N-Terminus, der essentiell für die korrekte Assemblierung von Rezeptor Komplexen ist (Ayalon und Stern-Bach 2001) und mit einer carboxy-terminal gelegenen Region die Glutamatbindungsstelle bildet. Ionotrope Glutamat-Rezeptoren enthalten drei Transmembrandomänen (M1, M3 und M4), sowie eine, der zytosolischen Seite zugewandte, in die Membran ragende Schleife (M2), die an der Kanalbildung beteiligt ist und die Ionenselektivität des Rezeptors bestimmt (Hollmann und Heinemann, 1994; Dingledine et al., 1999). Der Carboxy-Terminus ist intrazellulär lokalisiert

und interagiert mit einer Reihe von Proteinen in der postsynaptischen Spezialisierungsregion, die gerichteten Transport und Lokalisation von Glutamat-Rezeptoren regulieren (Sheng und Sala, 2001; Tomita et al., 2001).



**Abbildung 1:** Funktionelle Domänen von Glutamat-Rezeptor Untereinheiten. Der extrazelluläre  $\text{NH}_2$ -Terminus (N-T) wird gefolgt von einer 400 Aminosäure großen, globulären Domäne, an die der N-terminale Teil der Glutamat-Bindungsregion (S1) anschließt. An die Transmembranregion 1 (M1) schließt eine Membranschleife (M2) an, gefolgt von Transmembranregion 3 (M3). Der C-terminale Teil der Glutamatbindungsregion (S2) mündet in Transmembranregion 4 (M4), die mit einem intrazellulären Carboxy-Terminus (C-T) endet (geändert nach Sun et al, 2002).

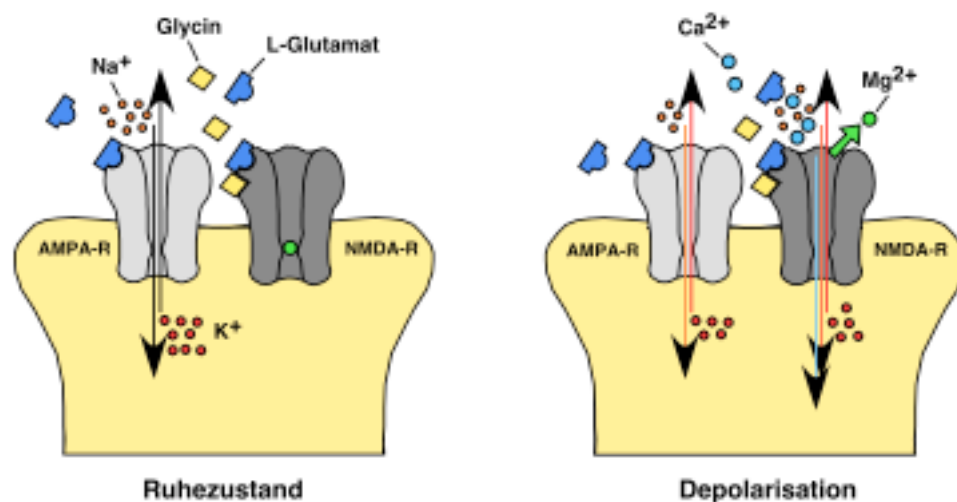
AMPA- und Kainat-Rezeptoren weisen eine schnelle Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik (Trussel und Fischbach, 1989), sowie eine in der Regel niedrige Durchlässigkeit für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf (Jonas und Burnashev, 1995). Eine Ausnahme bilden AMPA-Rezeptor Komplexe in Interneuronen von Hippokampus und Kleinhirn, sowie Bergmann Glia-Zellen (Wenthold et al., 1996; Liu und Cull-Candy, 2000; Geiger et al, 1995). NMDA-Rezeptoren besitzen eine langsamere Kinetik mit verzögerter, spannungsabhängiger und langanhaltender Öffnung des Ionenkanals (Lester et al, 1990). Sie vermitteln einen relative hohen Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (Mac Dermott et al, 1986) und benötigen Glyzin als Koaktivator (Johnson und Ascher, 1987; Mayer und Westbrook, 1987; Ascher und Nowak, 1988; Monaghan et al, 1989).

## 1.2 AMPA-Rezeptoren

Die schnelle, synaptische Erregungsleitung im Zentralnervensystem von Säugetieren wird vornehmlich von AMPA-Rezeptoren vermittelt. Zur Bildung der vermutlich tetrameren Struktur von AMPA-Rezeptoren (Mano und Teichberg, 1998; Rosenmund et al., 1998) stehen vier Untereinheiten zur Verfügung, die als GluR-A bis-D (Keinänen et al., 1990) bzw. GluR1 bis 4 (Boulter et al., 1990) bezeichnet werden. Jede dieser Untereinheiten kommt in zwei alternativ gespleißten Formen mit unterschiedlichen Desensitisierungskinetiken vor (Flop und Flip), von denen die Flop-Isoform in frühen Entwicklungsstadien nur schwach exprimiert wird, wohingegen die Flip-Isoform durch alle Entwicklungsstadien hindurch exprimiert wird (Monyer et al., 1991). Durch *in vitro* Studien in heterologen Zellkultursystem konnte gezeigt werden, daß AMPA-Rezeptor Untereinheiten sowohl homooligomere Kanäle bilden als auch mit anderen AMPA-Rezeptor Untereinheiten zu heterooligomeren Kanälen assemblieren können (Keinänen et al., 1990; Sommer et al., 1990; Wenthold et al., 1992). Die Rezeptor-Assemblierung erfolgt vermutlich über die Zwischenstufe von Dimeren, die sich zu symmetrischen Tetrameren verbinden (Ayalon und Stern-Bach, 2001; Mansour et al., 2001). AMPA-Rezeptoren, die GluR-B enthalten, sind nahezu undurchlässig für  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen (Hume et al., 1991; Hollmann et al., 1991; Verdoorn et al., 1991). Im Unterschied zu den anderen Untereinheiten trägt GluR-B an der sogenannten Q/R-Stelle in der M2-Membranschleife anstatt der Aminosäure Glutamin ein Arginin, das den Durchtritt bivalenter Kationen verhindert. Der Unterschied in einer Aminosäure ist nicht in der kodierenden Region enthalten, sondern wird durch einen der seltenen, bekannten Fälle von RNA-Editierung eingeführt (Sommer et al., 1991; Higuchi et al., 1993). Die essentielle Funktion der RNA-Editierung konnte in genetisch veränderten Mäusen gezeigt werden, die konstitutiv GluR-B (Q) Untereinheiten exprimieren. Bereits die Expression eines GluR-B (Q) Alleles führt in mutanten Mäusen zu früh auftretender Epilepsie und vorzeitigem Tod im Alter von etwa drei Wochen (Brusa et al., 1995; Feldmeyer et al., 1999).

### 1.3 Modulation synaptischer Erregungsleitung durch AMPA- und NMDA-Rezeptoren

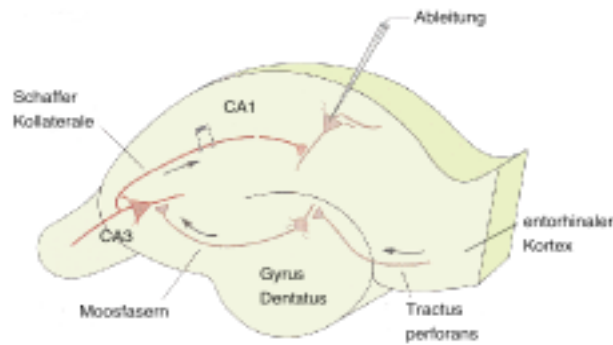
Eine grundlegende Komponente aktivitätsabhängiger, synaptischer Modulation stellt das Zusammenspiel von AMPA- und NMDA-Rezeptoren dar. In den meisten erregenden Synapsen des Zentralnervensystems sind AMPA- und NMDA-Rezeptoren kolokalisiert. Die Ausschüttung von L-Glutamat in den synaptischen Spalt öffnet nach Glutamatbindung schnelle AMPA-Rezeptoren, die durch  $\text{Na}^+$ - Ioneneinstrom und  $\text{K}^+$ - Ionenausstrom die postsynaptische Membran depolarisieren. Beim Ruhepotential von  $-65\text{mV}$  bleiben NMDA-Rezeptoren trotz Glutamat- und Glyzin-Bindung geschlossen, da die Kanalpore von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen blockiert wird. Erst die Membrandepolarisation führt zu einer Lösung der spannungsabhängigen Magnesiumblockade und öffnet die langsameren NMDA-Rezeptoren, die deshalb als Koinzidenz-Detektoren prä- und postsynaptischer Aktivität fungieren können (Abb 2) (Mayer und Westbrook, 1987; Stern et al., 1992; Bliss und Collingridge, 1993). Die Öffnung der NMDA-Rezeptoren führt zum Einstrom von  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, sowie zum Ausstrom von  $\text{K}^+$ -Ionen, die eine weitere Depolarisation der Membran bewirken und zur Auslösung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger „second messenger“ Kaskaden (Bading und Greenberg, 1991; Bading et al., 1993) führen.



**Abbildung 2:** Koinzidenz Detektion durch den NMDA-Rezeptor. Modell des funktionellen Prinzips einer glutamatergen Synapse mit kolokalisierten AMPA- und NMDA-Rezeptoren unmittelbar nach Glutamatausschüttung (Ruhezustand) und nach Membrandepolarisation (Depolarisation). Bei einem Membranruhepotential von  $-65\text{mV}$  ist der NMDA-Rezeptor durch  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen blockiert. Führt die Aktivierung von AMPA-Rezeptoren zu einer ausreichenden Membrandepolarisation, verläßt  $\text{Mg}^{2+}$  den Ionenkanal und Glutamat und Glyzin können den Ioneneinstrom durch den NMDA-Rezeptor auslösen.

## **1.4 Die Rolle von AMPA-Rezeptoren bei der Langzeitpotenzierung im Hippokampus**

Das am besten untersuchte, experimentelle Modell für die Modulation synaptischer Effizienz ist die NMDA-Rezeptor abhängige Langzeitpotenzierung (LTP) der synaptischen Transmission. Es wird angenommen, daß diese aktivitätsabhängige Änderung synaptischer Effizienz auf molekularer Ebene der Speicherung neuronaler Informationen, bestimmter Formen des Lernens und der Erinnerung zu Grunde liegt. Die repetitive Aktivierung erregender Synapsen im Hippokampus bewirkt eine langanhaltende Steigerung synaptischer Effizienz (Bliss und Lomo, 1973). Über die mögliche Ausbildung von LTP existieren unterschiedliche Hypothesen. Diskutiert wird die Veränderung der präsynaptischen Transmitterfreisetzung (Engert et al., 1999), die Anzahl synaptischer Verbindungen (Choi et al., 2000) und die postsynaptische Rezeptorantwort (Shi et al., 1999; Zhu et al., 2000; Hayashi et al., 2000). Die Mehrzahl der Untersuchungen weisen darauf hin, daß eine anhaltende, synaptische Potenzierung mit einer verstärkten postsynaptischen Antwort durch AMPA-Rezeptoren einhergeht. Für die AMPA-Rezeptor vermittelte Modifikation synaptischer Verstärkung wurden verschiedene Mechanismen, wie die Phosphorylierung der AMPA-Rezeptoren (Barria et al., 1997; Lee et al., 1998) oder der aktivitätsabhängige Transport von AMPA-Rezeptoren in die Synapse (Shi et al., 1999; Zhu et al., 1999; Hayashi et al., 2000) postuliert. Der Hauptanteil der experimentellen Ansätze zur Untersuchung der für die Langzeitpotenzierung verantwortlichen Mechanismen wurde an synaptischen Verbindungen der Schaffer-Kollateralen und kommissuralen Fasern zu den apikalen Dendriten der hippocampalen CA1-Pyramidalzellen durchgeführt (Abb 3). Die Induktion von LTP an diesen Verbindungen erfordert eine Depolarisierung der postsynaptischen Membran, die experimentell durch wiederholte, tetanische Stimulation (Andersen et al., 1977; Andersen, 1983) oder direkte Depolarisation der postsynaptischen Zelle bei gleichzeitiger synaptischer Aktivierung („Pairing“) erreicht wird (Gustaffson et al., 1987; Malinow et al., 1991).



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Hippokampusformation mit den hippokampalen Subregionen und den Haupteingangspfaden in den Hippokampus am Beispiel der zellulären Ableitung in CA1-Prinzipalneuronen.

Der Großteil der AMPA-Rezeptoren in CA1-Pyramidalzellen besteht aus heteromeren GluR-A/-B und GluR-B/-C Komplexen (Wentholt et al., 1996). Eine wichtige Rolle bei Transport und Modulation von AMPA-Rezeptoren kommt den intrazellulären Carboxy-Termini zu. Für mehrere synaptische Proteine konnten spezifische Interaktionen mit den C-Termini von GluR-A (Leonard et al., 1998; Sans et al., 2001) und GluR-B oder -C (Dong et al., 1997; Xia et al., 1999; Srivastava et al., 1998) nachgewiesen werden. Für die GluR-B Untereinheit wurde zudem die Interaktion mit der ATPase NSF (Osten et al., 1998; Nishimune et al., 1998; Song et al., 1998) gezeigt, die eine wichtige Funktion bei Membran-Fusionsereignissen ausübt. Eine weitere wichtige Regulationsmöglichkeit besteht in der Phosphorylierung der C-Termini von AMPA-Rezeptoren. Beispielsweise kann die GluR-A Untereinheit an Serin-Rest 831 von der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin abhängigen Kinase II (CaMKII) und von Protein-Kinase C (PKC) phosphoryliert werden, wohingegen die Protein-Kinase A (PKA) den Serin-Rest 845 phosphoryliert (McGlade-McCulloh, 1993; Pettit et al., 1994; Yakel et al., 1995; Lledo et al., 1995; Roche et al., 1996; Barria et al., 1997 b). LTP-Induktion verstärkt spezifisch die Phosphorylierung von Serin-Rest 831 (Barria et al., 1997 a; Barria et al., 1997 b) und erhöht in Zellkulturmodellen die Leitfähigkeit von homomeren GluR-A Rezeptoren (Derkach et al., 1999). Die Phosphorylierung von GluR-B und -C an Serin-Rest 880 durch Protein-Kinase C (PKC) reduziert die Bindung von GluR-B und -C Carboxy-Termini an das Interaktionsprotein GRIP1, rekrutiert den Interaktionspartner PICK1 in synaptische Kompartimente und führt zu schneller Internalisierung von GluR-B Untereinheiten in hippokampalen Neuronen (Chung et al., 2000). Eine weitere Regulationsmöglichkeit synaptischer Modulation wurde mit dem aktivitätsabhängigen Einbau von AMPA-Rezeptoren in Synapsen entdeckt. „Stille Synapsen“ enthalten ausschließlich NMDA-Rezeptoren und

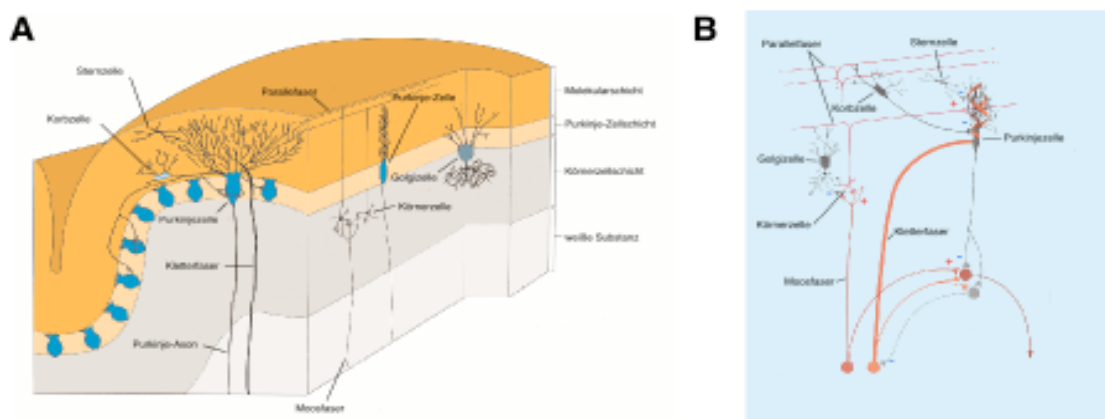


können während basaler synaptischer Transmission nicht zur Generierung postsynaptischer Ströme beitragen (Isaac et al., 1995; Montgomery et al., 2001). Nach LTP-Induktion sind an diesen zuvor stillen Synapsen AMPA-Rezeptor vermittelte Ströme nachweisbar. Zellkulturstudien an dissoziierten, hippocampalen Neuronen (Lu et al., 2001; Liao et al., 2001; Shi et al., 1999; Hayashi et al., 2000) und die Quantifizierung von AMPA-Rezeptoren nach elektrophysiologischer Stimulation in akuten Gehirnschnitten der Ratte (Heynen et al., 2000) bestätigten den aktivitätsabhängigen Transport von AMPA-Rezeptoren in die Synapse und deren Beteiligung an der synaptischen Transmission nach LTP-Induktion. Neuere Untersuchungen zeigen, daß individuelle synaptische Kontakte stark in der Anzahl funktioneller AMPA-Rezeptoren variieren. In dissoziierten, hippocampalen Neuronen reicht die Spanne von stillen Synapsen in dünnen Kontakten bis zu 140 AMPA-Rezeptoren in dicken, synaptischen Kontakten (Matsuzaki et al., 2001). Untersuchungen an genetisch veränderten, GluR-A defizienten Mäusen (Zamanillo et al., 1999; Jensen et al., 2002) erbrachten den Beweis, daß die erhöhte, synaptische Transmission an CA3/CA1 Synapsen nach tetanischer Stimulation oder Depolarisation auf einer verstärkten Antwort durch GluR-A enthaltende AMPA-Rezeptoren beruht. Obwohl ein initialer Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch NMDA-Rezeptoren nach experimenteller Depolarisation der postsynaptischen CA1-Zellen vorhanden war, konnte in adulten Tieren keine Langzeitpotenzierung erreicht werden. Die starke Reduktion extrasynaptischer AMPA-Rezeptor Ströme in GluR-A defizienten Mäusen wies darauf hin, daß AMPA-Rezeptor Populationen in nicht synaptischen Kompartimenten für die Ausprägung von LTP benötigt werden. Obwohl GluR-A defiziente Mäuse Defekte in synaptischer Plastizität aufwiesen, konnte keine Beeinträchtigung im Hippokampus bezogenen, räumlichen Lernvermögen dieser Mäuse festgestellt werden. Untersuchungen an GluR-B defizienten Mäusen (Jia et al., 1996) zeigten im Gegensatz dazu eine Verstärkung der synaptischen Langzeitpotenzierung an CA3/CA1 Synapsen. Die Voraussetzungen zur Ausbildung synaptischer Langzeitpotenzierung waren in GluR-B defizienten Mäusen offenbar erhalten geblieben. Eine Induktion der synaptischen Verstärkung war in diesem Mausmodell unabhängig von der Aktivierung der NMDA-Rezeptoren und wurde wahrscheinlich durch den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch  $\text{Ca}^{2+}$ -durchlässige AMPA-Rezeptoren vermittelt. Eine mögliche Erklärung für die phänotypischen Unterschiede in der Ausprägung von LTP an CA3/CA1 Synapsen könnte in der spezifischen Regulation des Transportes von AMPA-Rezeptoren mit unterschiedlicher Komposition der Untereinheiten liegen. Neuere Studien in hippocampalen Schnittkulturen (Shi et al., 1999; Shi et al., 2001) erbrachten Hinweise darauf,

daß CA1-Pyramidalneurone einen extrasynaptischen Anteil an GluR-A/B Rezeptor Komplexen besitzen, der für den schnellen Einbau zusätzlicher AMPA-Rezeptoren in Synapsen nach LTP-Induktion bestimmt ist, während GluR-B/C Rezeptor Komplexe aktivitätsunabhängig durch konstitutives „Recycling“ zwischen synaptischen und extrasynaptischen Kompartimenten zirkulieren.

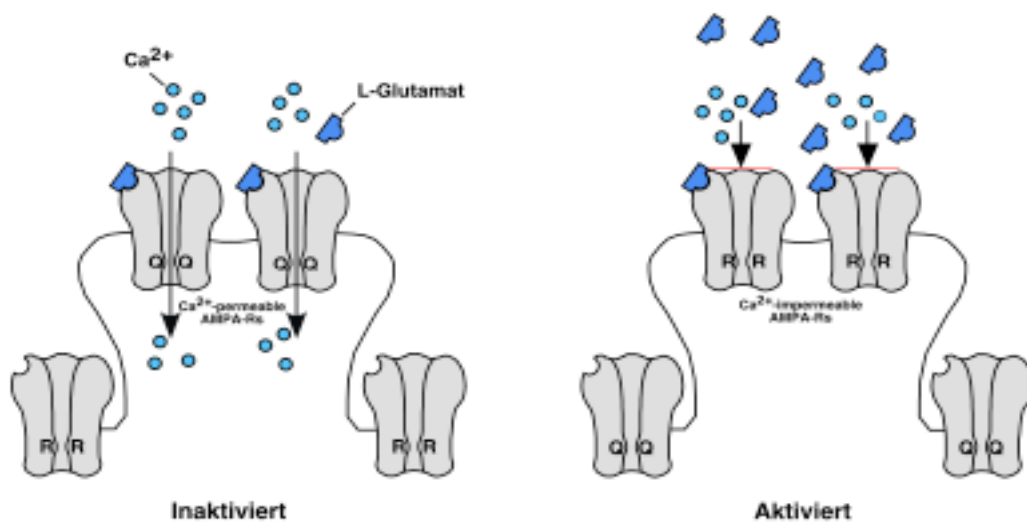
### 1.5 Die Rolle von AMPA-Rezeptoren im Kleinhirn

Das Kleinhirn (Cerebellum) enthält mehr als 50% aller Nervenzellen des Gehirns. Diese Neuronen sind als sich wiederholende Einheiten organisiert, von denen jede ein grundlegendes Modul eines synaptischen Kreislaufes darstellt. Drei Hauptaspekte der Organisation des Kleinhirnes verdeutlichen dessen Funktion. Erstens wird das Kleinhirn mit Information über Absichten, Befehlen und Rückmeldungen versorgt, die mit der Programmierung und Ausführung von Bewegung in Zusammenhang stehen. Zweitens projizieren die ausgehenden Signale des Kleinhirnes hauptsächlich auf Areale des prämotorischen und motorischen Systems in der Vorderhirnrinde und des Hirnstammes, die direkte Kontrolle auf Interneurone des Rückenmarkes und Motorneurone ausüben. Drittens sind diese synaptischen Kreisläufe plastisch, eine Voraussetzung für motorische Anpassung und Lernen. Ein Entfernen des Kleinhirnes führt nicht zu Veränderungen sensorischer Grenzwerte oder der Muskelkontraktion, sondern zum Verlust von räumlicher und zeitlicher Koordination von Bewegungen. Anatomische Besonderheit des Kleinhirnes ist der dreischichtige Aufbau der Kleinhirnrinde, welche die fünf bekannten Zelltypen inhibitorischer Stern-, Korb-, Purkinje- und Golgi- Neuronen, sowie erregende Körnerzellen enthält (Abb 4).



**Abbildung 4:** Funktioneller Aufbau der Kleinhirnrinde. A) Der dreischichtige Aufbau der Kleinhirnrinde und B) die Organisation der glutamatergen Reizweiterleitung in den fünf Zellpopulationen des Kleinhirnes.

Auch im Kleinhirn wird die erregende Reizweiterleitung hauptsächlich durch L-Glutamat vermittelt (Voogd et al., 1996) und AMPA-Rezeptoren werden von allen Neuronentypen des Kleinhirnes exprimiert (Bahn und Wisden, 1997). Für die Ausbildung von synaptischer Langzeitdepression (LTD) im Kleinhirn wird ebenfalls ein AMPA-Rezeptor vermittelter Mechanismus postuliert. Interessanterweise findet die Ausbildung von Langzeitdepression im Kleinhirn unabhängig von NMDA-Rezeptoren statt. Die synaptische Transmissionseffizienz wird durch Protein Kinase C regulierte Interaktion der Carboxy-Termini von GluR-B und GluR-C mit „PDZ-Proteinen“ (PSD95, Discs large, ZO-1 homolog) vermittelt (Xia et al., 2000; Kim et al., 2001). Eine Internalisierung von AMPA-Rezeptoren nach LTD-Induktion wird durch die Interaktion von GluR-B mit NSF reguliert (Lüscher et al., 1999; Lüthi et al., 1999). Der Carboxy-Terminus von GluR-B interagiert im Cerebellum mit der Kinase Lyn, die durch Stimulation von AMPA-Rezeptoren in ihrer Aktivität verstärkt wird und den Mitogen aktivierten Protein Kinase Signal-Pfad (Hayashi et al., 1999) auslöst. Elektrophysiologische LTD-Induktion führt zum Verlust synaptischer AMPA-Rezeptoren, nicht jedoch von NMDA-Rezeptoren (Carroll et al., 1999). Ein weiteres Modell synaptischer Modulation wurde in den Synapsen von inhibitorischen Sternzellen des Kleinhirnes untersucht (Liu und Cull-Candy, 2000). Hochfrequenz-Stimulation von erregenden Parallelfasern führte innerhalb von 30 Minuten zu einer langanhaltenden Änderung der Untereinheiten-Zusammensetzung und  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität in Sternzell-Synapsen des Kleinhirnes (Abb 5).



**Abbildung 5:** Modell synaptischer Modulation durch aktivitätsabhängigen Austausch synaptischer AMPA-Rezeptoren in Sternzell-Synapsen des Kleinhirnes. Im inaktivierten Zustand liegen  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable AMPA-Rezeptoren in der Synapse vor. Nach Hochfrequenz-Stimulation werden innerhalb von 15 bis 30 Minuten  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable durch  $\text{Ca}^{2+}$ -impermeable Rezeptoren in der Synapse ausgetauscht.

## 1.6 Säugetiermodelle zur *in vivo* Charakterisierung von AMPA-Rezeptoren

Bisher existieren nur wenige Modelle für die funktionelle Charakterisierung von AMPA-Rezeptor vermittelter Transmission *in vivo*. Durch die Generation GluR-A (Zamanillo et al., 1999) und GluR-B defizienter Mäuse (Jia et al., 1996) konnten wesentliche Erkenntnisse über die Beteiligung von AMPA-Rezeptoren an synaptischer Langzeitpotenzierung und Lernprozessen gewonnen werden. In einem transgenen Mausmodell, welches GFP-markierte GluR-A Untereinheiten im Hippokampus GluR-A defizienter Mäuse exprimiert (Mack et al., 2001), konnte die Beteiligung von GluR-A enthaltenden AMPA-Rezeptoren für die Ausprägung von LTP demonstriert werden.

GluR-C ist die einzige Untereinheit von ionotropen Glutamat-Rezeptoren, die mit einer Humanpathologie in Verbindung gebracht wird. Rasmussen Encephalitis ist eine progressiv fortschreitende Kinderkrankheit, die mit schwerer Epilepsie, halbseitiger Lähmung, Demenz und Entzündungsreaktionen im Gehirn einhergeht. Hinweise auf eine Autoimmunreaktion kamen aus Kaninchen, in denen Antikörper gegen GluR-C generiert wurden (Rogers et al., 1994). Während des Immunisierungsprozesses entwickelten Kaninchen epileptische Anfälle und histopathologische Abnormitäten, die der Rasmussen Erkrankung stark ähnelten. Die Untersuchung von Serumproben aus mehreren Rasmussen Patienten detektierten Autoimmunreaktivität gegen GluR-C (Rogers et al., 1994; Frassoni et al., 2001). Als Mechanismus zur Ausbildung des Krankheitsbildes wird die Überaktivierung von AMPA-Rezeptoren im Neokortex und Hippokampus durch Autoantikörper diskutiert (He et al., 1998; Levite et al., 1999).

Von den AMPA-Rezeptor Untereinheiten wurde GluR-C bisher am wenigsten funktionell charakterisiert. Das Gen für GluR-C (*gria3*) ist in Maus und Mensch auf dem langen Arm des X-Chromosoms in Region Xq 25-26 (McNamara et al., 1992; Gregor et al., 1993) lokalisiert. Die Charakterisierung des humanen GluR-C Genes erfolgte im Zuge von Familienstudien, die einen Zusammenhang zwischen X-chromosomal lokalisierten, mentalen Beeinträchtigungen und Mutationen im GluR-C Gen untersuchten (Gecz et al., 1999). Das humane GluR-C Transkript von 5894 Basen setzt sich aus 17 Exons zusammen mit einem untranslatierten Exon 1 und wird in weiblichen Individuen auf einem Allel „X-inaktiviert“.

### **1.7 Ziel der Arbeit**

Die vorliegende Arbeit diene der *in vivo* Charakterisierung der AMPA-Rezeptor Untereinheit GluR-C. Durch die Generierung von genetisch veränderten Mäusen in denen die AMPA-Rezeptor Untereinheit GluR-C bzw. GluR-A und GluR-C funktionell deletiert wurden, sollten die Auswirkungen auf die AMPA-Rezeptor vermittelte Reizweiterleitung und deren verhaltensrelevante Konsequenzen für synaptische Plastizität und Lernvorgänge untersucht werden.

## 2. Ergebnisse

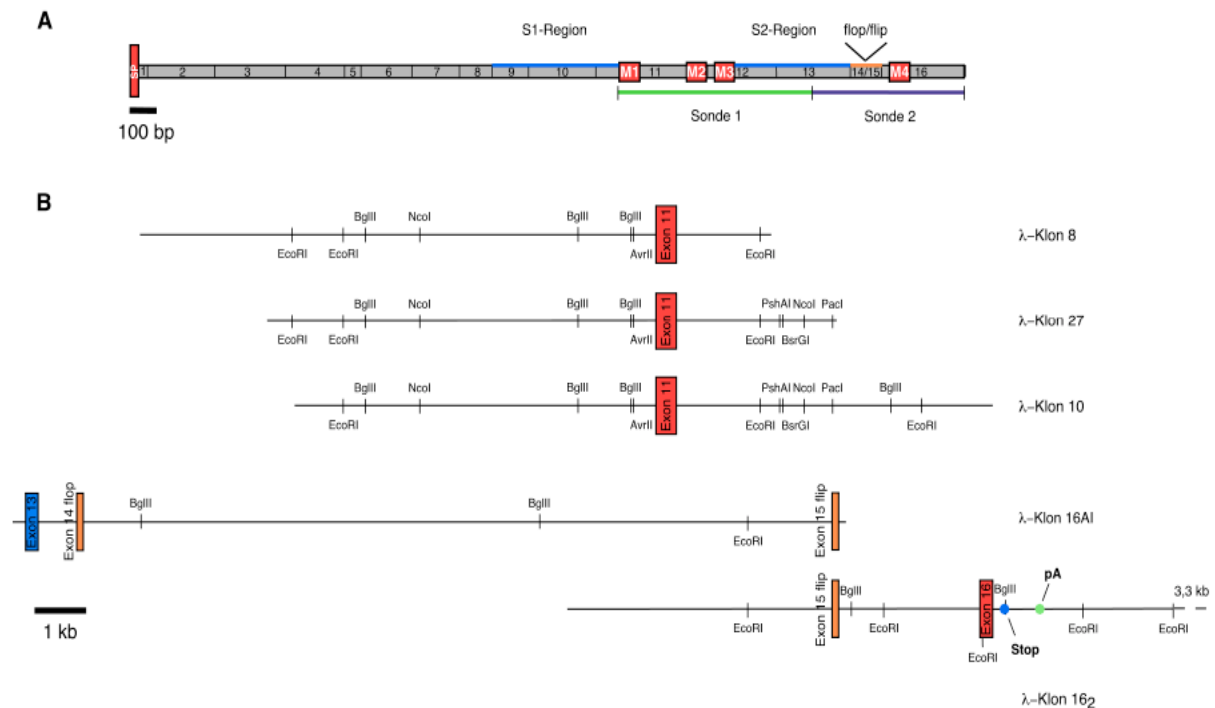
### 2.1 Gezielte Modulation des GluR-C Genlokus auf dem X-Chromosom

Zur gezielten Eliminierung GluR-C haltiger AMPA-Rezeptoren im Gehirn von Mäusen wurde der endogene GluR-C Genlokus der Maus so abgeändert, daß eine konditionale Deletion eines wesentlichen Genbereiches möglich gemacht wurde, und somit die Bildung der GluR-C Untereinheit unterbunden werden konnte. Das gezielte Ausschneiden des M1/M2 kodierenden Genbereiches mit Exon Nummer 11 bot sich zur Unterdrückung der GluR-C Untereinheit an, da bereits für die GluR-A bzw. GluR-B Untereinheiten gezeigt war, daß die funktionelle Ausprägung der Untereinheit durch diese Gendeletion verhindert wurde (Zamanillo et al., 1999; Jia et al., 1996; Mack et al., 2001). Mittels eines "Targeting"-Vektors, der entsprechend veränderte GluR-C Genbereiche trug, wurde das Genom von murinen ES-Zellen manipuliert und durch Blastozysten-Injektion genetisch veränderte Mauslinien generiert.

#### 2.1.1 Isolation einzelner GluR-C Gensegmente

Eine Genom-Bibliothek der Mauslinie 129SV ( $\square$ -FixII, Stratagene), die in Form von  $1 \times 10^6$  unabhängigen Einzelphagen mit einem durchschnittlich 20kb großen Mausgenomfragment vorlag, wurde auf 30 Platten ( $\varnothing$  13 cm) ausgesät und nach Bildung lytischer Plaques auf Nitrocellulosefilter transferiert (spezieller Methodenteil). Die Exon tragenden Gensegmente der GluR-C Untereinheit wurden mit Hilfe von zwei unterschiedlichen cDNA Sonden des GluR-C Transkripts der Ratte isoliert (Abb 1 A). Fünf GluR-C Gen haltige Phagen wurden aufgespürt und deren insertierte Genomfragmente in den Vektor pBluescriptII überführt. Durch Restriktionskartierung, Southern Blot und DNA-Sequenzierung wurden die genomischen Klone im Detail charakterisiert. Die Genomfragmente deckten im Wesentlichen zwei Bereiche des GluR-C Gens ab (Abb 1 B). Drei Klone umfassten die kodierende Region der membranständigen Domänen M1 und M2 in Exon 11, zwei weitere Klone enthielten die Exone 13 bis 16. Exon 13 kodiert für einen grossen Teil der S2-Region der Glutamatbindungsstelle, Exon 14 und 15 für die alternativ gespleissten Flop- bzw. Flip-Regionen und Exon 16 für die vierte Membrandomäne, den intrazellulären Carboxy-

Terminus, sowie 3'untranslatierte Bereiche des GluR-C Gens mit möglichen Polyadenylierungssignalen.

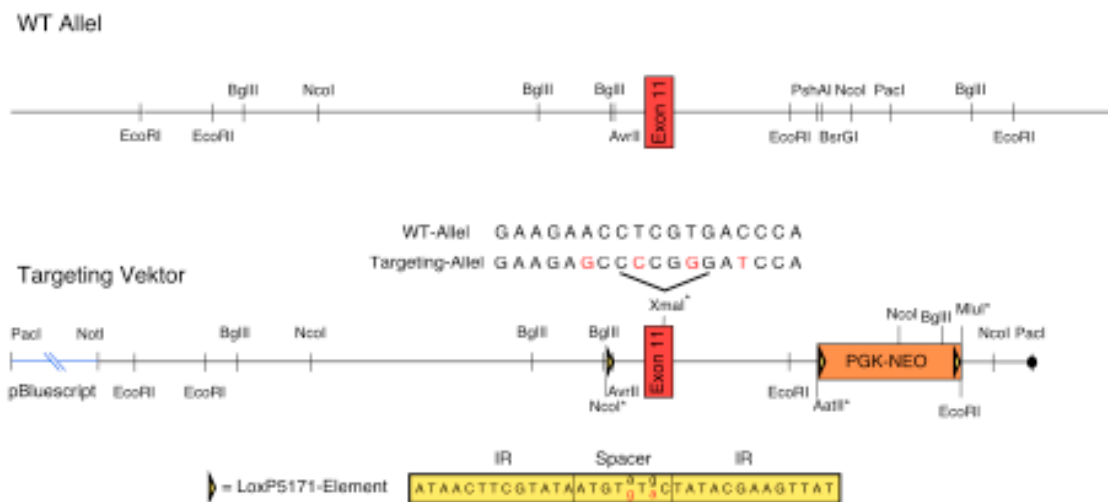


**Abbildung 1:** Die genomische Organisation GluR-C haltiger Gensegmente. **A)** Schematische Darstellung der cDNA von GluR-C mit Orientierung funktioneller Proteindomänen. Die Abkürzungen bezeichnen: Signalpeptid (SP), membrandurchspannende Domänen (M1-M4), Glutamatbindungsdomänen (S1 und S2), alternativ gespleisste Exone (flop/flip), cDNA-Sonden aus GluR-C Rattentranskript, Sonde 1 und 2; Maßstab = 100bp. **B)** Die Exon-Intron Struktur isolierter GluR-C Gensegmente, analytisch relevante Schnittstellen wurden eingezeichnet. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: Codierende Regionen (Exon 11, 13, 14 flop, 15 flip, 16), Polyadenylierungskonsensus (pA). Maßstab = 1kb.

### 2.1.2 Der “Gene-Targeting” Vektor

Mit dem “Targeting”-Vektor für GluR-C sollten zwei loxP-Elemente, links und rechts vom M1/M2 kodierenden Exon Nummer 11, zusammen mit einem synthetischen Gen für die Neomycinphosphotransferase in Intron 11 des GluR-C Gens eingefügt werden. Die

Neomycinphosphotransferase verleiht seiner Wirtszelle Resistenz gegen das Antibiotikum G418 und erlaubt eine pharmakologische Selektion der Zellen, die den “Targeting”-Vektor in ihr Genom integriert haben. Die Flankierung von Gensegmenten mit loxP-Elementen ermöglicht die Deletion von DNA-Sequenzen durch Cre vermittelte Rekombination (Sternberg et al., 1986; Sauer, 1992). Um eine Unterscheidung von WT und modifiziertem GluR-C Gen auf RNA-Ebene zu ermöglichen, wurden zusätzlich vier stille Mutationen in Exon 11 eingeführt (siehe spezieller Methodenteil). Der fertige “Targeting”-Vektor (Abb 2) umfasste relativ zum *neo*-Gen einen 11.8kb langen 5'-Arm und einen kurzen Arm von 1.1kb, der die Analyse homologer Rekombinationsereignisse durch PCR-Amplifikation ermöglichte.

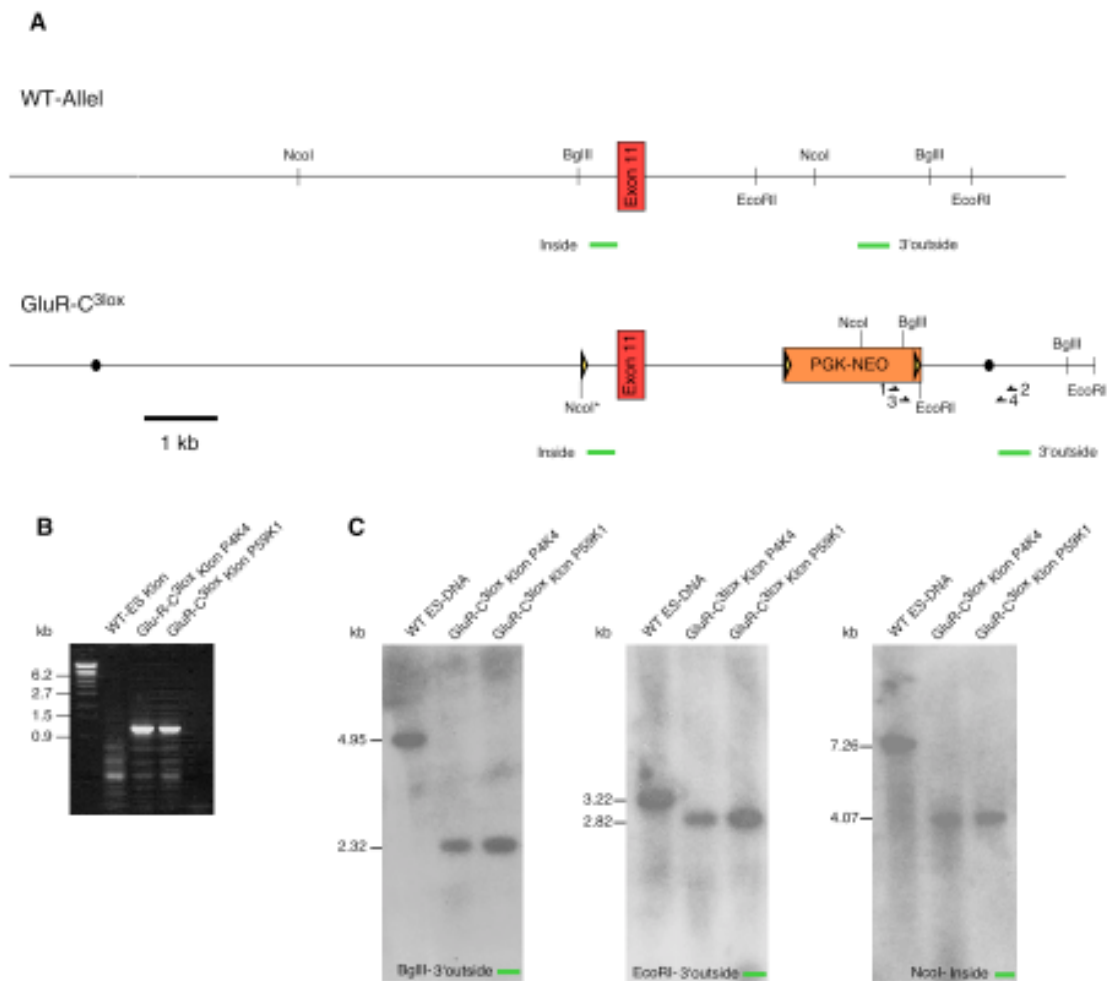


**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des GluR-C Genabschnittes und des daraus abgeleiteten “Targeting”-Vektors. WT-Allel: Die Genabschnitte wurden in 5’ nach 3’ Orientierung dargestellt, für die Analyse relevante Restriktionsschnittstellen wurden eingezeichnet. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: Kodierende Region (Exon 11, rotes Rechteck). “Targeting”-Vektor: Aus Klonierungs- und für analytische Zwecke in den “Targeting”-Vektor eingeführte Schnittstellen wurden mit \* markiert. Mit roten Buchstaben über der eingeführten XmaI-Schnittstelle wurde die veränderte Basenabfolge gegenüber WT gekennzeichnet. Verwendete Abkürzungen: Vektor-Rückgrat (pBluescript, blau), synthetisches Neomycinphosphotransferase-Gen (PGK-NEO, orange), Linearisierungsschnittstelle PacI (schwarzer Punkt), loxP5171-Elemente (Pfeilspitzen, gelb). Dargestellt wurde die Sequenz von WT und mutierten loxP5171-Elementen. In roten, tiefgestellten Kleinbuchstaben wurden gegenüber der WT-Sequenz veränderte Basen dargestellt. Invertierte Sequenzwiederholungen wurden mit IR abgekürzt, die variable Region mit Spacer.



### 2.1.3 Homologe ES-Zell Rekombination im GluR-C Gen

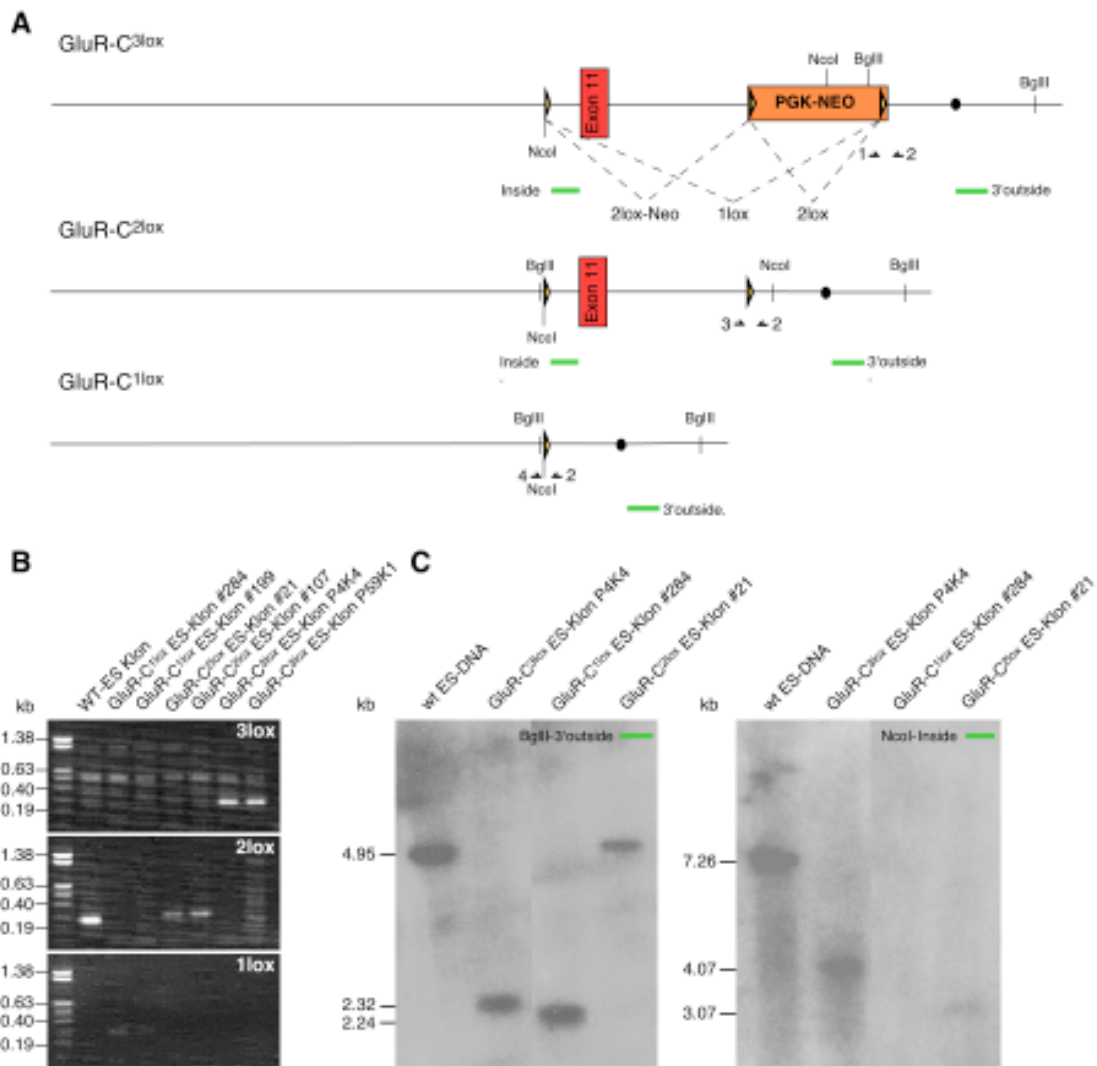
Je  $1 \times 10^7$  embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der männlichen Linie R1 (Nagy et al., 1993) wurden mit  $30 \mu\text{g}$  *PacI* linearisiertem "Targeting"-Plasmid elektroporiert und je  $2 \times 10^6$  ES-Zellen auf Feederzell-Platten ( $\varnothing$  9cm) ausgesät. Nach 9-10 Tagen Selektion in G418 enthaltendem ES-Zellkulturmedium wurden resistente ES-Zellkolonien isoliert. In einer Zweischritt PCR mit den Oligonukleotiden PGK Term4 (1) und CIII-4as (2) und nachfolgend mit den Oligonukleotiden PGK Term3 (3) und CIII-1as (4) wurden Klone identifiziert, die den "Targeting"-Vektor durch homologe Rekombination aufgenommen hatten. Im Falle homologer Rekombination wurde ein 1140bp großes DNA-Fragment amplifiziert (Abb 3 A, B). Für die Bestätigung der PCR-positiven ES-Klone wurde deren genomische DNA nach Verdau mit den Restriktionsenzymen *BglII*, *EcoRI* und *NcoI* im Southern Blot analysiert. Als radioaktive Sonde für die Restriktionsverdau mit *BglII* bzw. *EcoRI* wurde ein 450bp langes DNA-Fragment verwendet (3' outside), welches auf einem Sequenzbereich 3' außerhalb des "Targeting"-Vektors hybridisiert. Für den Verdau mit *NcoI* wurde eine 400bp lange Sonde (Inside) gewählt, die zwischen dem einzelnen loxP-Element und Exon Nummer 11 hybridisiert. Die unterschiedlichen DNA-Fragmentgrößen des GluR-C Wildtyps und des GluR-C<sup>3lox</sup> Alleles bestätigten die homologen Rekombinationsereignisse. Für die Restriktionsverdau mit *BglII* wurden nach erfolgreicher homologer Rekombination im GluR-C Gen ein DNA-Fragment von 2.32kb detektiert und im WT ein Fragment von 4.95kb. Nach *EcoRI*-Verdau wurde im GluR-C<sup>3lox</sup> Allel ein Fragment von 2.82kb und im WT Allel ein Fragment von 3.22kb detektiert. Der *NcoI*-Restriktionsverdau unterschied ein 4.07kb Fragment nach homologer Rekombination von einem WT-Fragment mit 7.25kb. Aus insgesamt 2400 isolierten ES-Kolonien wurden zwei ES-Klone P4K4 und P59K1 mit korrektem Rekombinationsereignis nachgewiesen (Abb 3C). Der ES-Klon P4K4 wurde für die *in vitro* Cre-Rekombination verwendet, ES-Zellklon P59K1 wurde für die Blastozysten-Injektion vorbereitet.



**Abbildung 3:** Strategie zur Identifizierung homologer Rekombinationsereignisse im GluR-C Gen. **A)** Schematische Darstellung des WT- und GluR-C<sup>3lox</sup> Allels nach homologer Rekombination. Die Oligonukleotide für die Zwei-Schritt PCR wurden mit folgenden Ziffern abgekürzt: PGK Term4 (1) und CII-as4 (2), sowie PGK Term3 (3) und CII-1as (4). Die Position der Hybridisierungssonden “3’outside” und “Inside” wurde mit grünen Balken markiert, die kodierende Region mit Exon 11 in rot. LoxP-Elemente wurden mit gelben Pfeilspitzen markiert und das synthetische Neomycinphosphotransferase-Gen mit PGK-NEO in orange. Für die Southern Blot Analyse relevante Restriktionsschnittstellen wurden eingezeichnet, 5’- und 3’-Ende des “Targeting”-Vektors wurden mit schwarzen Punkten gekennzeichnet. **B)** Agarosegele der Zwei-Schritt PCR Analyse von WT, GluR-C<sup>3lox</sup> Klon P4K4 und GluR-C<sup>3lox</sup> Klon P59K1. **C)** Southern Blot Analyse von WT, GluR-C<sup>3lox</sup> Klon P4K4 und GluR-C<sup>3lox</sup> Klon P59K1 mit der Sonde 3’outside, nach BglII-Verdau (links) und EcoRI-Verdau (mitte), sowie der Southern Blot nach Verdau mit NcoI und Detektion mit der Sonde Inside (rechts). DNA-Fragmentgrößen wurden in Kilobasen (kb) angegeben.

### **2.1.4 Cre-Rekombination in ES-Zellen zur Deletion der Neomycin-Resistenz Kasette und funktionellen Ausschaltung der GluR-C Expression**

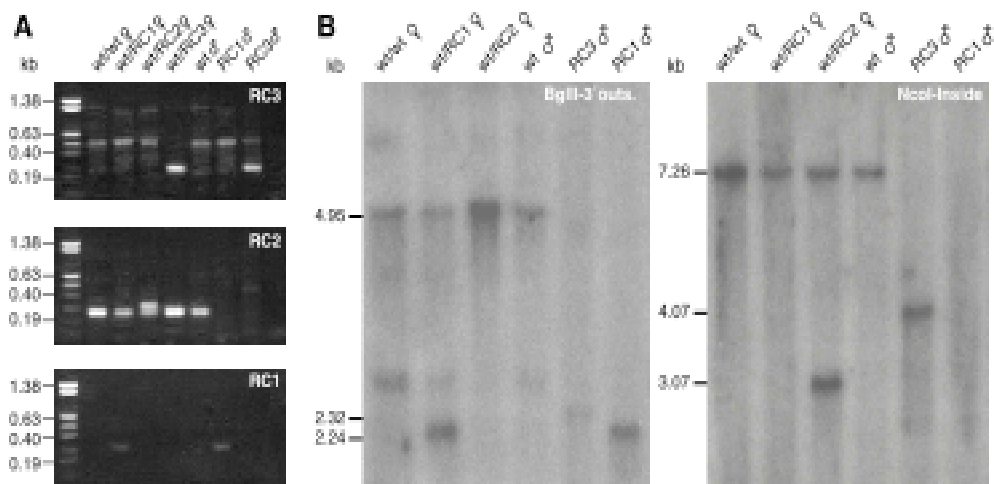
Zur Deletion der kodierenden Region von Exon 11 und der Neomycinphosphotransferase, wurden ES-Zellen des Klones P4K4 transient mit Cre-Rekombinase transfiziert. Durch Entfernen der PGK-NEO-Kassette sollte die korrekte Prozessierung des GluR-C Transkriptes sichergestellt werden, um eine dem WT vergleichbare Expression im daraus resultierenden konditional ausschaltbaren GluR-C<sup>2lox</sup> Allel zu erzielen. Die zusätzliche Deletion von Exon 11 sollte die Ausschaltung des GluR-C Genes bereits in der Keimbahn ermöglichen. Hierzu wurden je  $1 \times 10^7$  ES-Zellen mit 10  $\mu$ g ungeschnittenem PMC-Cre Plasmid (Gu et al., 1993) elektroporiert, das Cre-Rekombinase unter Kontrolle eines modifizierten Thymidinkinase-Promotors exprimiert. Nach 8-10 Tagen Kultivierung wurden 600 ES-Klone isoliert und durch Negativselektion in G418 haltigem ES-Medium auf erfolgreiche Cre vermittelte Rekombination überprüft. Replikaklone G418 sensitiver ES-Zellen wurden durch PCR-Analyse auf die Rekombinationsereignisse GluR-C<sup>1lox</sup>, GluR-C<sup>2lox</sup> und GluR-C<sup>3lox</sup> (Abb. 4 A) analysiert. Im GluR-C<sup>3lox</sup> Allel wurde mit den Oligonukleotiden PGK Term3 (1) und screen as3-2 (2) ein 270bp Fragment amplifiziert. Das GluR-C<sup>2lox</sup> Allel wurde mit den Oligonukleotiden screen s2-2 (3) und screen as3-2 (2) im Wildtyp als 240bp Fragment und im GluR-C<sup>2lox</sup> Allel als 300bp Fragment amplifiziert (Abb 4 B, 2lox). Das GluR-C<sup>1lox</sup> Allel (Abb 4 B, 1lox) wurde mit den Oligonukleotiden screen s1-2 (4) und screen as3-2 (2) als 260bp Fragment amplifiziert. Die Bestätigung Cre rekombinierter ES-Zell Klone erfolgte durch Southern Blot Analyse der genomischen DNA, nach Restriktionsverdau mit den Enzymen BglII und NcoI (Abb 4 C). Durch Hybridisierung der BglII-verdauten ES-Zell DNA mit der Sonde "3'outside" wurden im GluR-C<sup>1lox</sup> Allel ein DNA Fragment von 2.24kb und im GluR-C<sup>2lox</sup> Allel ein Fragment von 5.0kb bestätigt (Abb 4 C). Die Hybridisierung NcoI-verdauter DNA mit der Sonde "Inside" bestätigte für GluR-C<sup>1lox</sup> die Abwesenheit des DNA-Segmentes und für GluR-C<sup>2lox</sup> ein 3.07kb DNA-Fragment (Abb. 4 C). Aus 600 isolierten ES-Klonen wurden drei GluR-C<sup>1lox</sup>, sechs GluR-C<sup>2lox</sup> und ein gemischter GluR-C<sup>1lox/2lox</sup> ES-Klon identifiziert.



**Abbildung 4** : Strategie und Analyse der Cre-Rekombination im GluR-C<sup>3lox</sup> Allel. **A**) Schema der PCR Strategie und Southern Blot Analyse zur Identifizierung Cre rekombinierter ES-Zellen des GluR-C<sup>3lox</sup> Klonen P4K4. Die Oligonukleotide für die PCR-Analyse wurden durch Ziffern abgekürzt: PGK-Term3 (1), screen as3-2 (2), screen s2-2 (3) und screen s1-2 (4). Die möglichen Cre-Rekombinationsereignisse wurden mit 2lox-Neo, 1lox und 2lox bezeichnet und die Sonden "Inside" und "3'outside" mit grünen Balken gekennzeichnet. Die PacI-Linearisierungsschnittstelle wurde mit schwarzem Punkt markiert. Für die Southern Blot Analyse relevante Restriktionsschnittstellen wurden eingezeichnet. **B**) PCR Analyse von WT ES-DNA, GluR-C<sup>1lox</sup> Klonen #284 und #199, GluR-C<sup>2lox</sup> Klonen #21 und #107 und den GluR-C<sup>3lox</sup> Klonen P4K4 und P59K1. Die PCR Analyse von GluR-C<sup>3lox</sup> Klonen erfolgte mit den Oligonukleotiden PGK Term3 und screen as3-2, GluR-C<sup>2lox</sup> Rekombinationsereignisse mit den Oligonukleotiden screen s2-2 und screen as3-2 und GluR-C<sup>1lox</sup> Rekombinationsereignisse mit den Oligonukleotiden screen s1-2 und screen as3-2. **C**) Southern Blot Analyse von WT ES-DNA, GluR-C<sup>3lox</sup> Klon P4K4, GluR-C<sup>1lox</sup> Klon #284 und GluR-C<sup>2lox</sup> Klon #21 durch BglII-Verdau und Hybridisierung mit der Sonde "3'outside" (BglII-3'outside) und NcoI-Verdau und Hybridisierung mit der Sonde "Inside" (NcoI-Inside). DNA-Fragmentgrößen wurden in Kilobasen (kb) angegeben.

### 2.1.5 Etablierung der Mauslinien mit genetisch manipuliertem GluR-C Genlokus

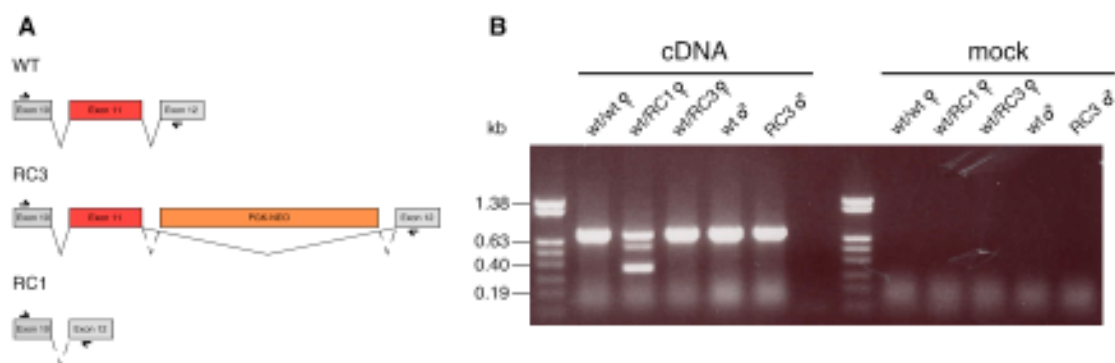
Die positiven GluR-C<sup>3lox</sup> ES-Zell Klone P4K4 und P59K1, sowie der GluR-C<sup>1lox</sup> ES-Klon #284 und der GluR-C<sup>2lox</sup> ES-Klon #107 wurden für die Injektion in C57Bl/6 Mausblastozysten eingesetzt. Nur die hochchimären Nachkommen aus der Injektion des GluR-C<sup>3lox</sup> Klones P59K1 gaben das manipulierte GluR-C Allel in der Keimbahn weiter. Als Nachkommen wurden hemizygoten GluR-C<sup>3lox</sup> Weibchen erhalten, mit denen die Mauslinie RC3 etabliert wurde. Nach Verpaarung der hemizygoten RC3 Weibchen, sowie der chimären Männchen mit Cre-deleter Mäusen (Schwenk et al., 1995) konnten Mauslinien mit GluR-C<sup>1lox</sup>-Rekombinationsereignis (RC1) und GluR-C<sup>2lox</sup> Rekombinationsereignis (RC2) etabliert werden. Eine Überprüfung der Genotypen der Mauslinien RC3, RC2 und RC1 erfolgte durch PCR und Southern Blot Analyse gemäß den Strategien für homologe und Cre vermittelte Rekombination in ES-Zellen. Es konnten für alle generierten Mauslinien die korrekten Rekombinationsereignisse durch PCR-Analyse (Abb 5 A) und Southern Blot nachgewiesen werden (Abb 5 B). Die standardisierte Genotypisierung der Mauslinien erfolgte durch PCR.



**Abbildung 5:** Genotypisierung der Mauslinien WT, RC3, RC2 und RC1 durch PCR und Southern Blot. **A)** PCR Analyse der Mauslinien RC3, RC2 und RC1 mit WT weiblich, WT/RC1, WT/RC2, WT/RC3, WT männlich, RC1 homozygot männlich und RC3 homozygot männlich mit den Oligonukleotiden screen s1-2 und CIII-1as (RC1), screen s2-2 und screen as3-2 (RC2) und PGK-Term3 und screen as3-2 (RC3). **B)** Southern Blot Analyse der Mauslinien RC3, RC2 und RC1 mit WT weiblich, WT/RC1 weiblich, WT/RC2 weiblich, WT männlich, RC3 homozygot männlich und RC1 homozygot männlich durch Restriktionsverdau mit BglII und Hybridisierung mit der Sonde “3’outside” (BglII-3’outs.) und NcoI-Verdau und Hybridisierung mit der Sonde “Inside” (NcoI-Inside). DNA-Fragmentgrößen wurden in Kilobasen (kb) angegeben.

### 2.1.6 Im RC1 Genotyp entstehen verkürzte mRNAs, im RC3 Genotyp werden Transkripte korrekt prozessiert

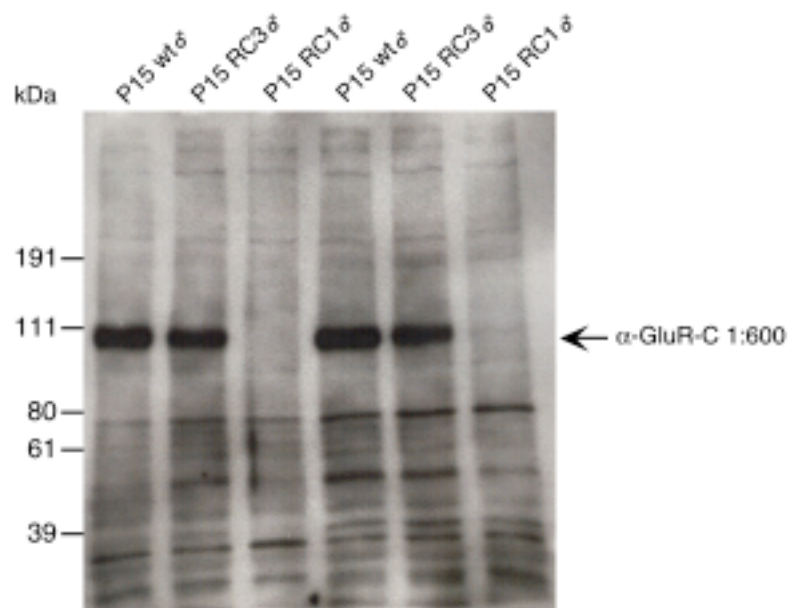
Zur Untersuchung der posttranskriptionellen prä-mRNA Prozessierung von RC3- und RC1-Allelen wurde Gesamt-RNA aus den Gehirnen, hemi- und homozygoter Mäuse der Genotypen RC1 und RC3 mit Gesamt-RNA aus Wildtyp verglichen. Nach Isolierung durch TRI-Reagenz wurde die Gesamt-RNA durch reverse Transkription in cDNA umgewandelt (siehe spezieller Methodenteil). Die Analyse der prä-mRNA Prozessierung erfolgte durch PCR-Amplifikation mit Oligonukleotiden, die auf Exon 10 (Exo10s) und Exon 12 (TM3as) hybridisieren. Sowohl von cDNA aus Wildtyp, als auch aus RC3 Männchen wurde ein PCR Fragment von 700bp amplifiziert (Abb 6). Dies entsprach der korrekten Länge der korrespondierenden mRNA. Von der cDNA hemizygoter RC1 Weibchen konnte sowohl das WT-Fragment, als auch ein verkürztes Produkt von 360bp amplifiziert werden (Abb 6). Das kurze DNA-Fragment entsprach der Länge des Spleissproduktes von Exon 10 und Exon 12, welches das Leseraster der Basentriplets verschiebt und in Exon 12 zu mehreren Translationsstop-Kodons führt. Eine Kontrolle ohne Reverse Transkriptase stellte sicher, daß keine genomische DNA amplifiziert wurde.



**Abbildung 6:** RT-PCR aus Gesamthirn von WT, RC3 und RC1. **A)** Schematische Darstellung möglicher Spleissvorgänge in prä-mRNA von WT, RC3 und RC1. Die kodierenden Regionen wurden mit Exon 10, 11 und 12 abgekürzt, die Neomycinphosphotransferase mit PGK-NEO und die Oligonukleotide Exo10s (Rechtspfeil) und TM3as (Linkspfeil). **B)** Agarose-Gele der PCR-Amplifikationen aus revers transkribierter Gesamthirn RNA (cDNA) und nicht revers transkribierter Gesamthirn RNA (mock) von Wildtyp weiblich (wt/wt), RC1 hemizygot (wt/RC1), RC3 hemizygot (wt/RC3), Wildtyp männlich (wt) und RC3 homozygot (RC3). DNA-Fragmentgrößen wurden in Kilobasen (kb) angegeben.

### 2.1.7 Die Deletion von Exon 11 führt zur funktionellen Ausschaltung der GluR-C Proteinexpression

Aus Gesamthirn von 15 Tage alten Wildtyp-, homozygoten RC3- und homozygoten RC1-Tieren wurden Proteinextrakte isoliert. Durch Immunoblot mit einem N-terminalen GluR-C Antikörper wurde in den Gehirnextrakten von Wildtyp und RC3 eine prominente GluR-C Bande bei 105kDa detektiert, wohingegen in Gehirnextrakten von RC1 kein prominentes Proteinprodukt detektiert werden konnte (Abb 7). Nebenbanden, die in allen 3 untersuchten Genotypen beobachtet wurden, waren demnach auf unspezifische Kreuzreaktionen des Antikörpers zurückzuführen. Das Transkript des GluR-C<sup>lox</sup> Allels und dessen mögliches Proteinprodukt wiesen offensichtlich nicht genügend Stabilität für die Expression in Nervenzellen auf.



**Abbildung 7:** Immunoblot aus Gesamthirn von 15 Tage alten Mäusen der Genotypen WT, RC3 und RC1.

Western Blot gegen GluR-C (α-GluR-C mono 1:600) aus Gesamthirn je zweier 15 Tage alter Tiere von Wildtyp männlich (P15 wt), RC3 homozygot (P15 RC3) und RC1 homozygot (P15 RC1). Proteingrößenmarker wurden in Kilodalton (kDa) angegeben.

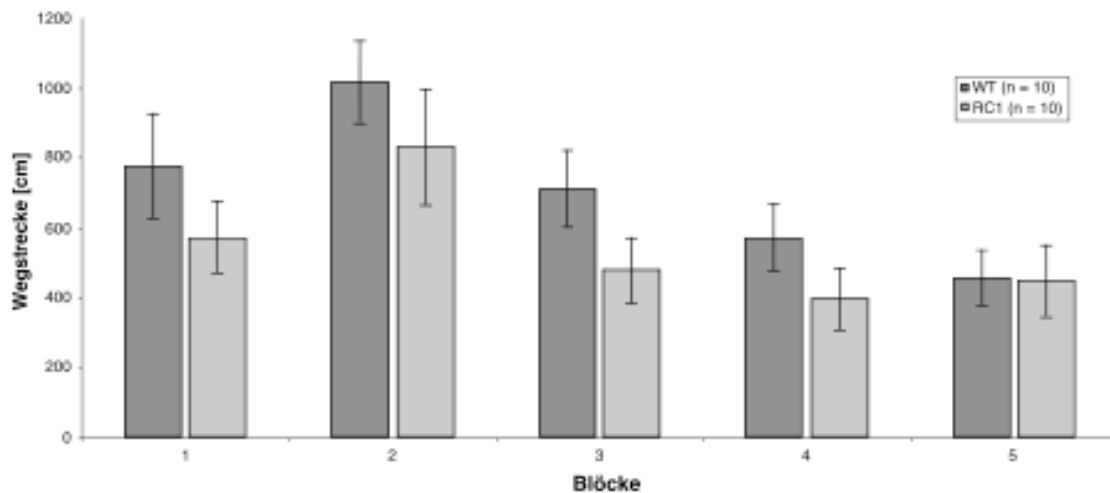
## **2.2 Verhaltensphänotyp von Mäusen mit deletierter GluR-C Untereinheit**

Der Verlust der GluR-C Untereinheit führte zu keinen Einschränkungen im Zuchtverhalten. Das RC1 Allel wurde nach Mendel vererbt. Wurfanzahl, Körpergröße, Gewicht und Lebensdauer waren zwischen Wildtyp und RC1 Genotyp vergleichbar. Allerdings konnten bei genauerer Verhaltensanalyse Auffälligkeiten beobachtet werden, die auf den Verlust der GluR-C Untereinheit zurückgeführt werden müssen.

### **2.2.1 Die lokomotorische Aktivität zur Erkundung neuer Umgebungen ist in GluR-C defizienten Mäusen beeinträchtigt**

Motorisches Verhalten stellt einen allgemeinen Verhaltensphänotyp dar. Defekte in Genen, die zur Veränderung von neuronalen Netzwerken, Muskelfunktion und Skelettbau führen, können sich in einer Beeinträchtigung der motorischen Fähigkeiten ausdrücken. Der am besten standardisierte Ansatz zur generellen Messbarkeit motorischer Fähigkeiten besteht in spontaner motorischer Aktivität in einem offenen Feld (open field). Ein Maß für die motorische Aktivität kann die horizontale und vertikale Aktivität sein, aber auch die Gesamtstrecke, die innerhalb eines bestimmten Zeitraumes zurückgelegt wurde oder das Bewegungsmuster innerhalb des Feldes. Um die generelle motorische Aktivität von RC1-Mäusen zu untersuchen, wurden je zehn Mäuse des Genotyps RC1 und ihre Wildtyp-Geschwister im Alter von drei bis sechs Monaten im "open field" von etwa 1m<sup>2</sup> Fläche verglichen. Vier Testblöcke von je 5 minütiger Dauer wurden durch automatische Video-Überwachung aufgezeichnet und nach zurückgelegter Gesamtwegstrecke ausgewertet. In Testblock fünf wurde in die Mitte des offenen Feldes ein rotes Holzobjekt plaziert, um das Neugierverhalten gegenüber neuen Objekten zu untersuchen. In den Testblöcken eins bis vier wurde durchgehend eine geringere lokomotorische Aktivität im RC1-Genotyp festgestellt (Abb 8, Blöcke 1-4). Eine Analyse der Bewegungsmuster der einzelnen Tiere ergab keine Unterschiede der bevorzugten Verhaltensmuster, die die geringere Gesamtlokomotion in GluR-C defizienten Mäusen erklärte, wie beispielsweise Angst vermittelte Bewegungsstarre oder das Entlanggehen an den Rändern des offenen Feldes. Das Neugierverhalten von Wildtyp und GluR-C defizienten Mäusen war vergleichbar, beide Genotypen zeigten ähnliche lokomotorische Aktivität (Abb 8, Block 5) mit bevorzugtem Aufenthalt im mittleren Bereich des offenen Feldes.

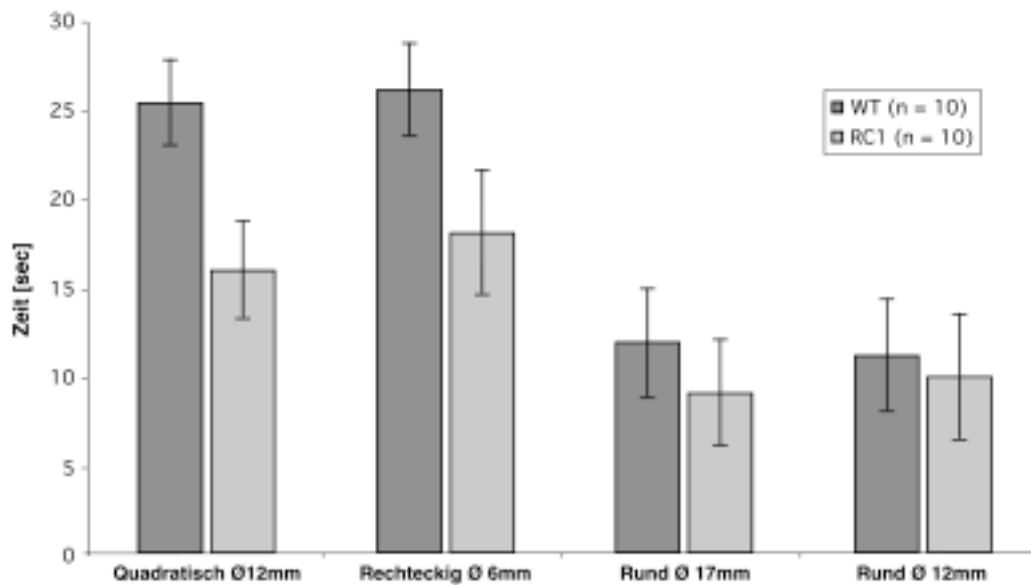




**Abbildung 8:** Lokomotorische Aktivität im offenen Feld Test. Mit 1-5 sind 5 aufeinanderfolgende Testblöcke von je 5 minütiger Dauer für die jeweiligen Genotypen zusammengefasst. In Testblock 5 wurde ein “Novel Object Recognition” Test von 5 minütiger Dauer durchgeführt. Die zurückgelegte Wegstrecke wurde in Zentimeter [cm] für WT (dunkelgraue Balken, n = 10) und RC1 Genotyp (hellgraue Balken, n = 10) angegeben. Fehlerbalken repräsentieren die Abweichungen vom Mittelwert in  $\pm$  SEM.

### 2.2.2 GluR-C defiziente Mäuse sind in ihrer Körperbalance signifikant beeinträchtigt

Eine zusätzliche Analyse motorischer Koordinationsfähigkeit und Körperbalance stellt der “Balance Beam” Test dar. Mäuse müssen hierbei auf einer Reihe von schmalen Stangen mit zunehmend dünner werdendem Durchmesser balancieren. Als Maß für die Koordinationsfähigkeit kann die Aufenthaltsdauer auf den Stangen betrachtet werden, wobei im durchgeführten Versuch eine Dauer von 30 Sekunden als Referenzwert für gute Körperbalance gewertet wurde. Wildtypen zeigten auf den quadratischen und rechteckigen Stangen gute Balancefähigkeiten, Mäuse des Genotyps RC1 waren auf diesen Objekten signifikant schlechter. Ihre Balancefähigkeiten erreichten hierbei nur 63%  $p < 0.03$  (quadratisch), beziehungsweise 70%  $p < 0.02$  (rechteckig) des Wildtyps. Auf den Stangen mit runder Form waren die Balancefähigkeiten beider Genotypen eingeschränkt.

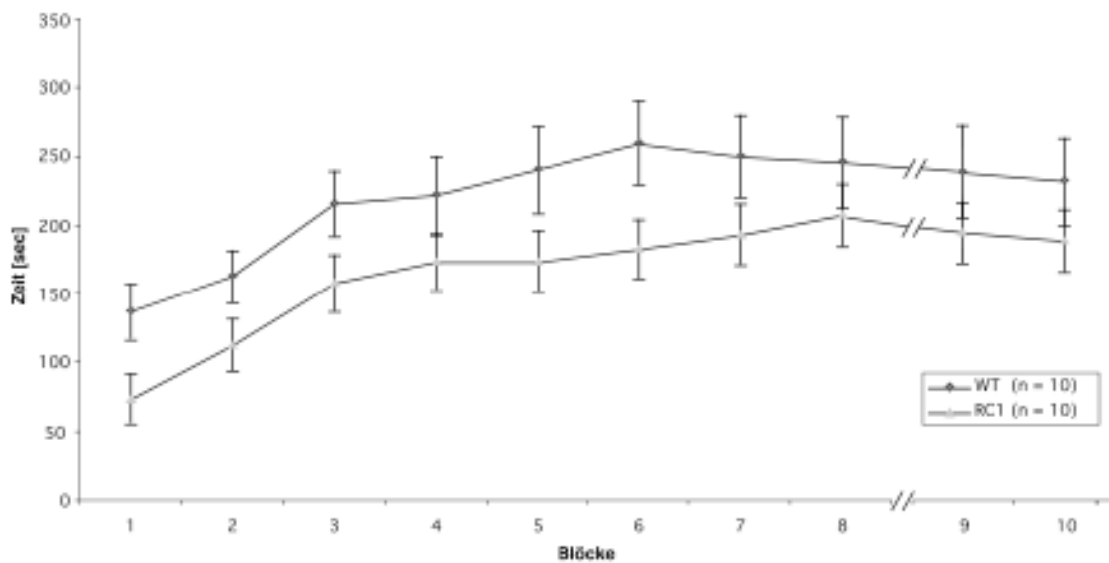


**Abbildung 9:** “Balance Beam” Test. Dargestellt wurde die Aufenthaltsdauer in Sekunden [sec] auf den quadratischen (Quadratisch Ø 12mm), rechteckigen (Rechteckig Ø 6mm), und runden Stangen (Rund Ø 17mm, 12mm) für Wildtypen (WT, n = 10) und GluR-C<sup>-</sup> (RC1, n = 10). Fehlerbalken repräsentieren die Abweichungen vom Mittelwert in  $\pm$  SEM.

### 2.2.3 Die Deletion von GluR-C führt zu verlangsamt motorischen Lernen im beschleunigenden Rotarod-Test

Die Beeinträchtigung der Motorkoordination und Körperbalance zeigt sich deutlich auf einer sich drehenden Rolle (Rotarod). Versuchsreihen mit mehreren Trainingsblöcken führen zu einer Verbesserung motorischer Fähigkeiten, die sich in einer erhöhten Aufenthaltsdauer auf dem Rotarod auswirkt. Sie kann als Maß für das Erlernen motorischer Fähigkeiten betrachtet werden. Auf einem beschleunigenden Rotarod, welcher über einen Zeitraum von 5 Minuten die Umdrehungsgeschwindigkeit von 4 rpm auf 40 rpm erhöht, wurden Wildtyp und RC1-Genotyp in acht aufeinanderfolgenden Trainingsblöcken, die aus je drei Trainingseinheiten bestanden, auf ihre motorische Lernfähigkeit untersucht. Neben der beeinträchtigten Motorkoordination wurde in diesem Experiment auch eine verzögerte motorische Lernfähigkeit der RC1 Mäuse offensichtlich. Nach insgesamt sechs Trainingsblöcken an drei aufeinanderfolgenden Tagen, hatten Wildtyp-Tiere bereits ihre maximalen koordinatorischen Fähigkeiten erlernt. Tiere des RC1 Genotyps erreichten auch nach acht Trainingsblöcken nicht die maximale motorische Lernfähigkeit ihrer Wildtyp Geschwister. Zwölf Tage nach

Beendigung des Rotarod-Versuches wurden Wildtyp und GluR-C defiziente Mäuse erneut in zwei Trainingsblöcken auf ihre motorischen Koordinationsfähigkeiten untersucht, um die Ausbildung des motorischen Gedächtnisses beider Genotypen vergleichen zu können. In keiner der beiden Mauslinien wurde eine signifikante Verschlechterung der motorischen Fähigkeiten beobachtet, was eine Beeinträchtigung des motorischen Langzeitgedächtnisses in GluR-C defizienten Mäusen ausschließt (Abb 10).

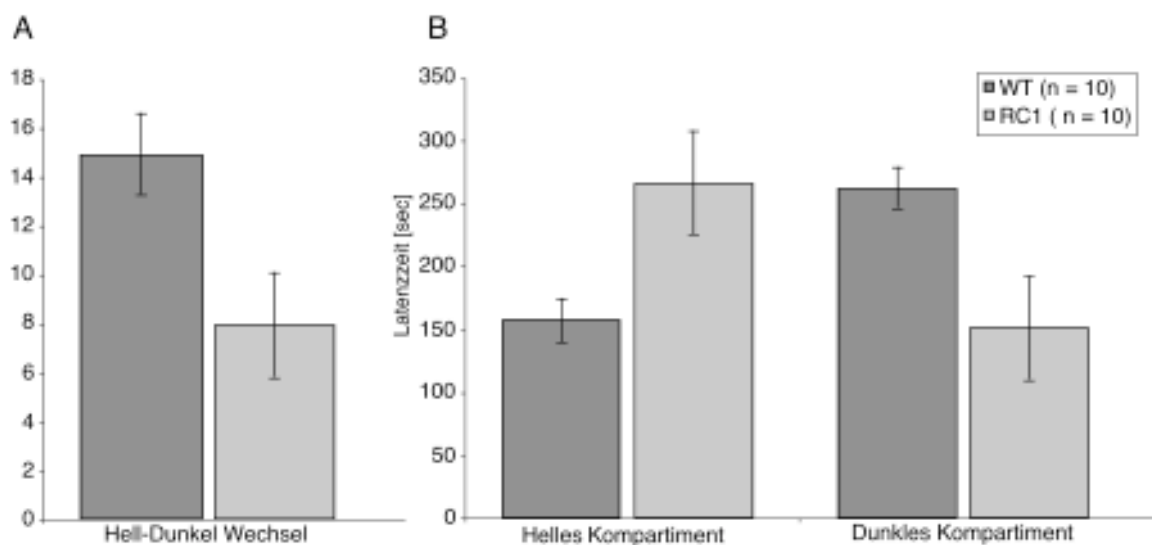


**Abbildung 10:** Aufenthaltsdauer im beschleunigenden Rotarod nach aufeinanderfolgenden Trainingseinheiten. Rotarod-Training von Wildtyp (WT, n = 10, dunkelgraue Rechtecke) und GluR-C<sup>-</sup> Mäusen (RC1, n = 10, hellgraue Dreiecke) in acht aufeinanderfolgenden Trainingsblöcken (Blöcke 1-8). In den Blöcken neun und zehn (9, 10) wurde 12 Tage nach Rotarod-Training das motorische Gedächtnis getestet. Die Aufenthaltsdauer auf dem Rotorod wurde in [sec] angegeben. Fehlerbalken repräsentieren die Abweichungen vom Mittelwert in  $\pm$  SEM.

#### 2.2.4 GluR-C defiziente Mäuse sind in angstbezogenen Verhaltensweisen gestört

Die Neugier, eine neue Umgebung zu erforschen und dabei eine aversive Umgebung zu vermeiden, stellt einen natürlichen Konflikt zwischen exploratorischem und angstbezogenem Verhalten dar. Dieser läßt sich in einem Hell/Dunkel Test untersuchen, bei dem Mäuse zwischen der Tendenz, sich bevorzugt in einem sicheren dunklen Kompartiment aufzuhalten und der Neugier eine neue Umgebung zu erforschen, unterscheiden müssen. Jeweils zehn GluR-C defiziente Mäuse wurden mit ihren Wildtyp Geschwistern verglichen. Aufgezeichnet

wurde die tatsächliche lokomotorische Aktivität, die sich an der Anzahl der Wechsel zwischen hellen und dunklen Kompartimenten messen läßt und die Tendenz sich bevorzugt in aversiver oder nicht aversiver Umgebung aufzuhalten. Die erniedrigte Anzahl der Hell/Dunkel Wechsel bestätigte die im offenen Feld beobachtete geringere exploratorische Aktivität von GluR-C defizienten Mäusen in signifikantem Ausmaß. Die Anzahl der durchschnittlichen Hell/Dunkel Wechsel innerhalb eines Zeitraumes von sechs Minuten verringerte sich im RC1 Genotyp auf 8 gegenüber 15 im WT ( $p < 0.03$ ). Es ließen sich in diesem Test auch signifikante Unterschiede beider Genotypen bezüglich der bevorzugten Kompartimente feststellen. Wildtypen zeigten trotz höherer exploratorischer Aktivität mit 63% der Gesamtaufenthaltsdauer eine klare Präferenz für das nicht-aversive dunkle Kompartiment. Die im Verhältnis kürzere Aufenthaltsdauer von GluR-C<sup>-</sup>-Mäusen im dunklen Kompartiment von 37% ( $p < 0.03$ ) deutete auf eine Beeinträchtigung des angstbezogenen Verhaltens hin.

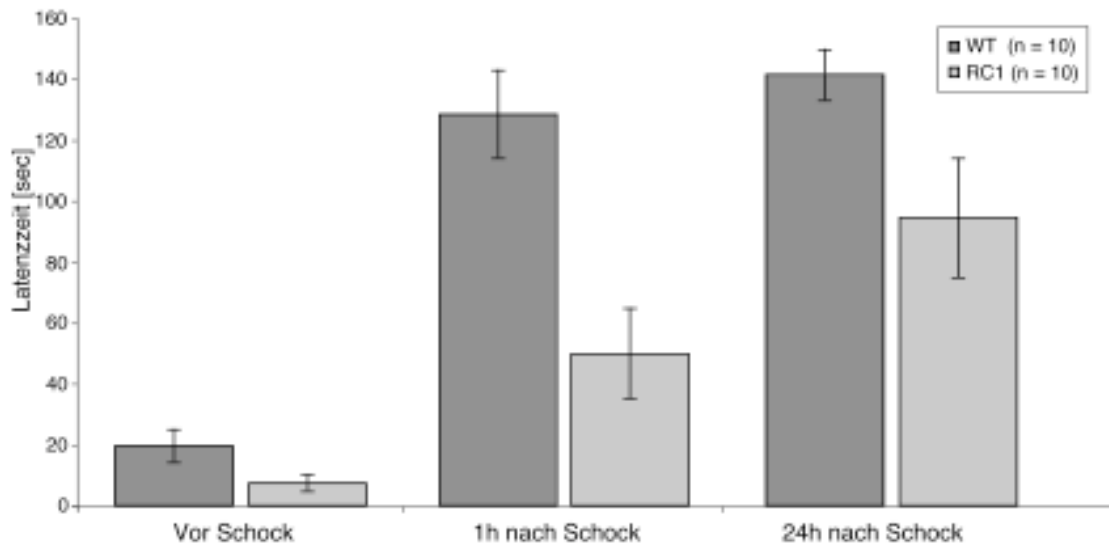


**Abbildung 11:** Hell/Dunkel Feld Test von Wildtyp (WT, n = 10, dunkelgraue Balken) und GluR-C<sup>-</sup> (RC1, n = 10, hellgraue Balken). **A)** Anzahl der Wechsel zwischen hellem und dunklem Kompartiment. **B)** Gesamtaufenthaltsdauer in aversiver (Helles Kompartiment) oder sicherer (Dunkles Kompartiment) Umgebung in Sekunden [sec]. Fehlerbalken repräsentieren die Abweichungen vom Mittelwert in  $\pm$  SEM.

### **2.2.5 Die Defizienz von GluR-C vermindert die Fähigkeit zur Gedächtnisbildung für angstbezogenes Verhalten**

Die Fähigkeit eine Verknüpfung zweier Reize herzustellen und für diese ein Gedächtnis auszubilden stellt eine Form des sogenannten impliziten Lernens dar. Eine Art des assoziativen, impliziten Lernens ist die Vermeidung einer bestimmten Verhaltensweise im Kontext eines aversiven Reizes. Experimentell kann dies beispielsweise durch passive Abneigungstests erfasst werden, bei denen als aversiver Stimulus ein milder Fußschock in einer bestimmten Umgebung appliziert wird, der nach erfolgter Assoziation zu einer Vermeidung des Ortes führt, an dem der Stimulus erfolgte. Je zehn Wildtypen und GluR-C<sup>-</sup>-Mäuse wurden in einem passiven Abneigungstest auf ihre Fähigkeit untersucht, ein Gedächtnis für aversive, assoziative Reize auszubilden. Als Maß für die passive Abneigung wurde die Latenzzeit gemessen, um von einem stark beleuchteten, etwa 20cm<sup>2</sup> großen Kompartiment mit allen 4 Pfoten in eine dunkle 400cm<sup>2</sup> große Kammer zu wechseln. Nach Applikation eines milden Fußschockes von 0,8mA für 1s im Dunkelkompartiment wurden die Mäuse zur Bildung einer Assoziation für weitere 10 Sekunden in der dunklen Kammer eingeschlossen und danach in ihre Heimkäfige zurückgesetzt. Nach 1h, um die Ausbildung eines sogenannten Kurzzeitgedächtnisses zu erfassen, sowie nach 24h zur Erfassung eines Langzeitgedächtnisses wurde die Abneigung der Mäuse, in das dunkle Kompartiment einzutreten, untersucht. Die Latenzzeiten beider Genotypen waren vor Konditionierung sehr gering, was die aversive Umgebung des hellen Kompartimentes unterstrich (Abb 12 A). Eine Stunde nach Fußschock hatten Wildtyp-Mäuse bereits ein Gedächtnis für den angstausslösenden Stimulus ausgebildet. Im Gegensatz zu GluR-C defizienten Mäusen, deren Gedächtnisausbildung in diesem kurzen Zeitraum stark beeinträchtigt war (Abb 12 B). Die mittlere Latenzzeit bis zum Eintritt in das Dunkelkompartiment betrug im Wildtyp  $128.8 \pm 14.3$  Sekunden, im RC1 Genotyp  $50.4 \pm 14.9$  Sekunden ( $p < 0.01$ ). Im Falle eines Eintretens in das Dunkelkompartiment innerhalb der experimentellen Dauer von 150 Sekunden, wurden die Mäuse einem erneuten Fußschock gleicher Intensität ausgesetzt. Nach 24 Stunden verbesserte sich das angstbezogene Gedächtnis von GluR-C<sup>-</sup>-Mäusen mit einer gemessenen Latenzzeit von  $95 \pm 19.6$  Sekunden, blieb aber dennoch signifikant schlechter als in Wildtyp-Geschwistern mit einer Latenzzeit von  $141.8 \pm 8.2$  Sekunden ( $p < 0,04$ ) (Abb 12 C). GluR-C<sup>-</sup> Mäuse erreichten somit, trotz einer zweiten negativen Erfahrung, auch nach 24 Stunden kein absolutes Vermeidungsverhalten des Dunkelkompartimentes, was auf offensichtliche

Beeinträchtigungen des angstbezogenen Verhaltens und impliziten Lernens aversiver Reize zurückzuführen war.



**Abbildung 12:** Passives Abneigungsverhalten nach aversivem Reiz. Die Latenzzeit [sec] für den Eintritt in das Dunkelkompartiment vor Konditionierung (Latenzzeit vor Schock) und eine Stunde (Latenzzeit 1h nach Schock) bzw. 24 Stunden (Latenzzeit 24 h nach Schock) nach Fußschock wurde in Wildtypen (WT, n = 10, dunkelgraue Balken), und GluR-C-Mäusen (RC1, n = 10, hellgraue Balken) gemessen. Fehlerbalken repräsentieren die Abweichungen vom Mittelwert in  $\pm$  SEM.

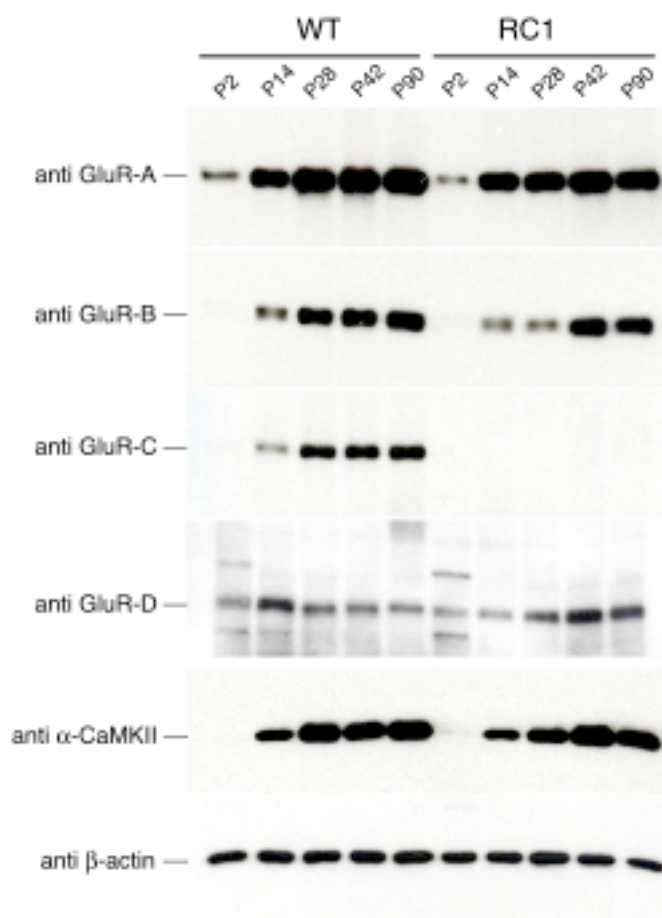
## **2.3 Biochemische und elektrophysiologische Charakterisierung im Hippokampus von GluR-C defizienten Mäusen**

Der Hippokampus ist diejenige Region des Säuger-Gehirns, die wesentlich an der Ausbildung von Kurzzeitgedächtnis beteiligt ist (Milner, 1998). Die synaptischen Verbindungen des Hippokampus gehören zu den am besten charakterisierten neuronalen Vernetzungen des Gehirns. Der Hauptanteil erregender synaptischer Übertragung im Hippokampus wird dabei durch den Neurotransmitter L-Glutamat vermittelt. Glutamat-Rezeptoren des AMPA-Typs bestehen aus heterooligomeren Komplexen der vier Untereinheiten GluR-A, -B, -C und -D (Dingledine et al., 1999; Hollmann und Heinemann, 1994; Seeburg, 1993), deren Hauptpopulation im Hippokampus sich aus GluR-A/B und GluR-B/C Rezeptorkomplexen zusammensetzt (Wentholt et al., 1996). Der Hippokampus stellt deshalb ein wichtiges Modellsystem für die Beteiligung von AMPA-Rezeptoren in der Formation von Gedächtnis und Lernen auf molekularer Ebene dar.

### **2.3.1 Reduzierte Expression der GluR-B Untereinheit im Hippokampus GluR-C defizienter Mäuse**

In der Maus führt der Verlust der AMPA-Rezeptor Untereinheit GluR-A zur Reduktion der Untereinheiten GluR-B und GluR-D, den Partnern von GluR-A in Pyramidalneuronen bzw. Interneuronenpopulationen im Hippokampus (Zamanillo et al., 1999; Jensen et al., 2002), und zu einer gegenüber dem Wildtyp verzögert erreichten Maximalexpression. Deshalb wurde untersucht, ob die Deletion von GluR-C ebenfalls die Expression anderer Untereinheiten beeinflusst. Aus dem Hippokampus von Wildtyp und GluR-C<sup>-</sup> Mäusen (RC1) wurden zum Zeitpunkt perinataler, präpubertärer, halbwüchsiger, geschlechtsreifer und erwachsener Entwicklungsstadien (P2, P14, P28, P42 und P90) Proteinextrakte isoliert. Für den direkten Vergleich wurden 8µg Gesamtprotein der jeweiligen Entwicklungsstadien von Wildtyp und GluR-C<sup>-</sup> auf einem Immunoblot analysiert. Der Verlust von GluR-C führt zu Veränderungen in der GluR-B Expression. Bis zur Pubertät (P28) wurde in GluR-C defizienten Mäusen eine 40%ige Reduktion der GluR-B Untereinheit im Vergleich zum Wildtyp festgestellt. Erst ab P42 war die GluR-B Menge zwischen Wildtypen und RC1 Genotypen vergleichbar (Abb 13). Desweiteren wurde eine Reduktion der Proteinmenge von GluR-A in allen Entwicklungsstadien beobachtet, die etwa 80% der WT-Expression erreichte (Abb 13). Eine Verzögerung der entwicklungsabhängigen Expression von GluR-A wurde nicht detektiert. Im RC1 Genotyp wurde kein GluR-C detektiert, während im Wildtyp die Expression von GluR-

C parallel zu GluR-A und GluR-B Untereinheiten anstieg. Die Expression von GluR-D im Hippokampus beider Genotypen war in allen Entwicklungsstadien schwach detektierbar, zeigte jedoch einen ähnlichen entwicklungsabhängigen Verlauf, wie bereits für GluR-A bis -C beobachtet. Unterschiede in RC1 Genotyp und Wildtyp-Mäusen wurden nicht festgestellt. Das Expressionsprofil von  $\alpha$ -CaMKII war in beiden Genotypen identisch und zeigte einen ansteigenden Verlauf mit maximaler Expression bei P28. Der interne  $\beta$ -Actin Standard zeigte, daß aus allen Entwicklungsstadien gleich viel Gesamtprotein aufgetragen wurde.

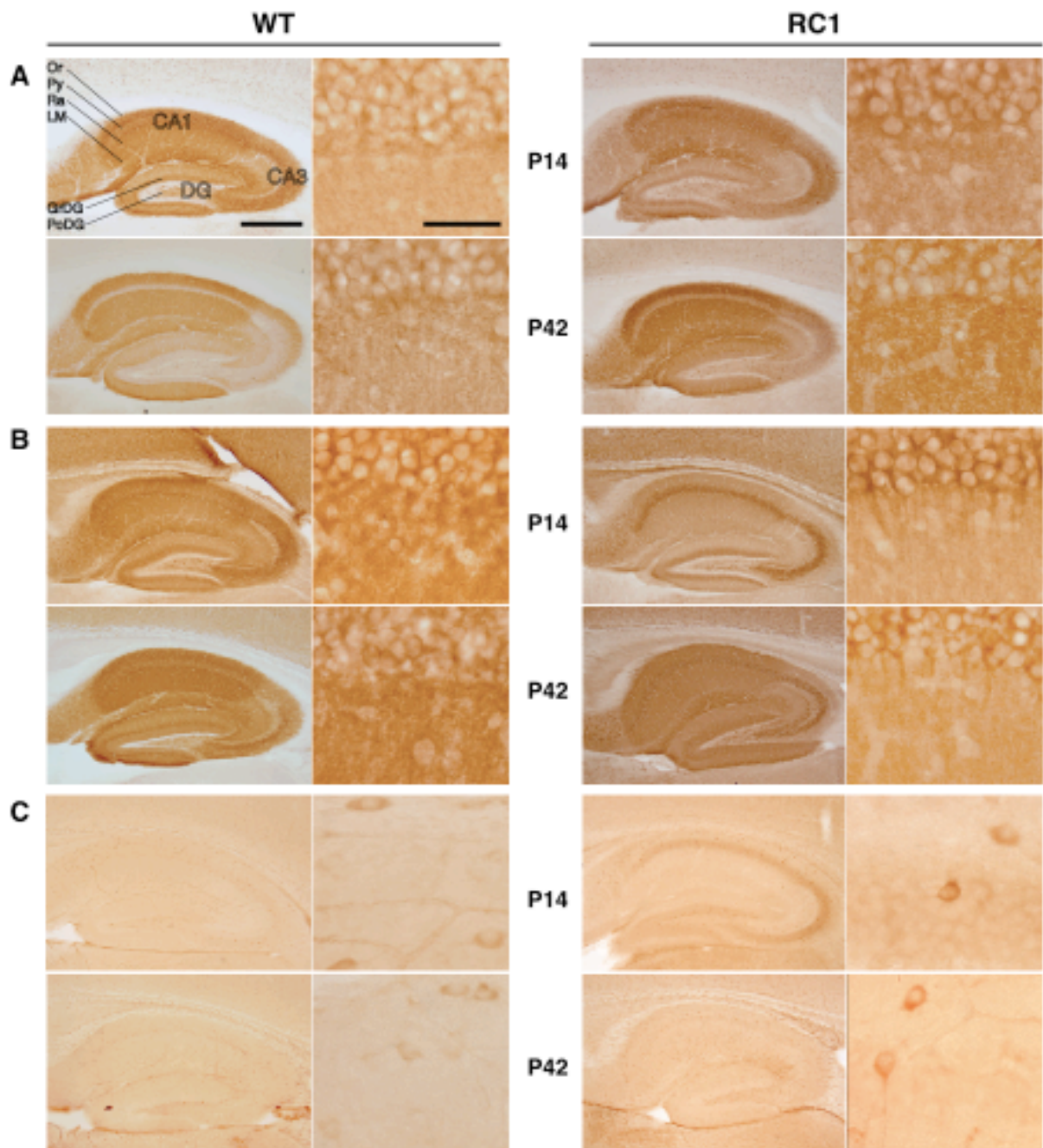


**Abbildung 13:** Immunoblot aus hippocampalen Proteinextrakten fortlaufender postnataler Entwicklungsstadien (P2, P14, P28, P42 und P90) gegen die AMPA-Rezeptor Untereinheiten GluR-A bis -D (anti GluR-A bis -D) aus Wildtyp- (WT, links), und GluR-C<sup>-</sup>-Homogenaten (RC1, rechts). Als entwicklungsabhängiges Markerprotein wurde ein Antikörper gegen Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin abhängige KinaseII (anti  $\alpha$ -CaMKII) verwendet. Als Kontrolle für gleich geladene Gesamtproteinmengen wurde ein  $\beta$ -Aktin Antikörper eingesetzt.



### **2.3.2 Der Verlust von GluR-C führt zur Akkumulation von GluR-B Untereinheiten in den Zellkörpern von Pyramidalneuronen**

AMPA-Rezeptor Untereinheiten, die in GluR-C defizienten Mäusen keine heteromeren Rezeptorkomplexe bilden können, werden möglicherweise wie in GluR-A<sup>-/-</sup> Mäusen in somatischen Kompartimenten von Pyramidalneuronen zurückgehalten. Es wurde deshalb zu den postnatalen Entwicklungszeitpunkten P14 und P42 die regionale und subzelluläre Lokalisation von AMPA-Rezeptor Untereinheiten im Hippokampus von Wildtypen und GluR-C<sup>-</sup> Mäusen immunhistochemisch untersucht. Sagittale Gehirnschnitte wurden mit Antikörpern gegen GluR-A, -B, und -D inkubiert; ein monospezifischer Antikörper, der die GluR-C Untereinheit in Gewebeschnitten detektiert, war nicht verfügbar. Durch Detektion mit Peroxidase gekoppeltem Sekundärantikörper und anschließender DAB-Präzipitation wurden die Immunreaktionen gegen die jeweiligen AMPA-Rezeptor Untereinheiten sichtbar gemacht. Die regionale und subzelluläre Verteilung von GluR-A war in Wildtyp und RC1 Mäusen identisch. In jungen Tieren wurde ein substantieller Anteil an GluR-A in den Zellkörpern von Pyramidalneuronen detektiert. In 42 Tage alten Tieren wurde eine Umverteilung der GluR-A Untereinheit von somatodendritischer zu vorwiegend dendritischer Lokalisation in Pyramidalneuronen beobachtet (Abb 14 A). Die GluR-B Immunreaktion unterschied sich in jungen Wildtyp und RC1 Mäusen wesentlich bezüglich der subzellulären Lokalisation in Pyramidalneuronen. Wie bereits für GluR-A defiziente Mäuse beschrieben ( Zamanillo et al., 1999; Jensen et al., 2002) führte der Verlust eines Assoziationspartners zum Verbleib der GluR-B Untereinheit in somatischen Kompartimenten, wohingegen im Wildtyp eine gleichmäßige Verteilung in den apikalen und basalen Dendriten beobachtet werden konnte. In 42 Tage alten Wildtypen wurde eine Umlagerung von GluR-B in dendritische Fortsätze beobachtet, bei gleichzeitiger Abnahme der Intensität in den Zellkörpern. In 42 Tage alten RC1 Mäusen wurde ebenfalls eine Umlagerung der GluR-B Untereinheit zu dendritischen Kompartimenten hin beobachtet, jedoch verblieb ein beträchtlicher Anteil von GluR-B in den Zellkörpern der Pyramidalneurone (Abb 14 B). Bei der Immunfärbung gegen GluR-D wurden keine Unterschiede zwischen Wildtyp und GluR-C<sup>-</sup> beobachtet. In beiden untersuchten Altersstufen wurden Interneuronenpopulationen im Stratum oriens der CA1-Region, sowie in der Pyramidalschicht und Stratum radiatum von CA1 und CA3 detektiert. Eine spezifische Färbung in den Prinzipalneuronen konnte nicht detektiert werden (Abb 14 C).

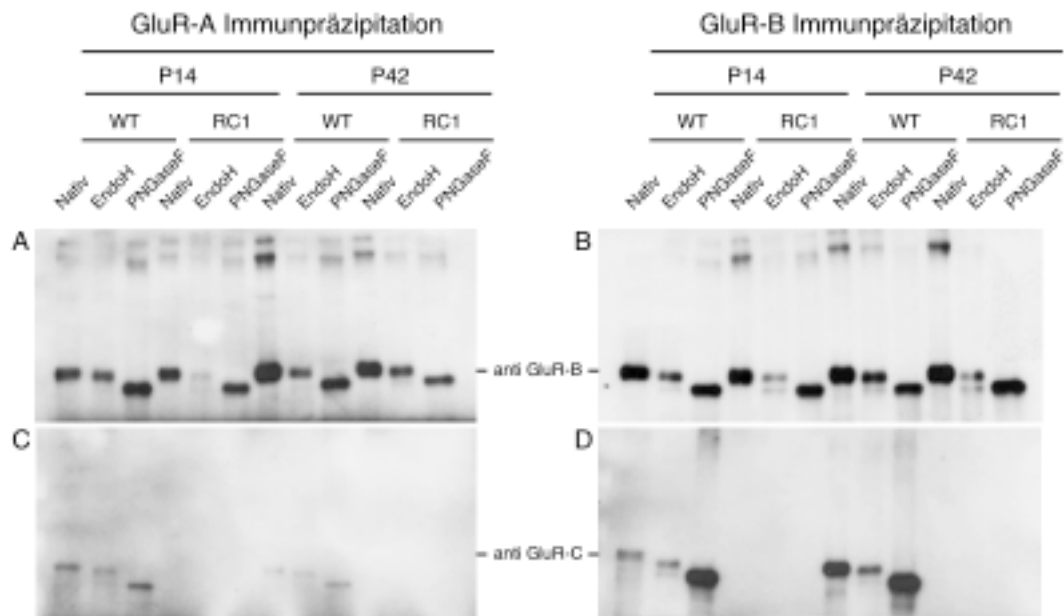


**Abbildung 14:** DAB-Immunhistochemie gegen die AMPA-Rezeptor Untereinheiten GluR-A (A), GluR-B (B) und GluR-D (C) in sagittalen Hippokampuschnitten von 14 (P14) und 42 (P42) Tage alten Wildtyp- (WT) und GluR-C<sup>-</sup>-Mäusen (RC1). Die hippocampalen Subregionen wurden wie folgt abgekürzt: Cornu Ammonis 1, 3 (CA1, CA3), Gyrus dentatus (DG), Pyramidalzellschicht und Stratum radiatum von CA1 und CA3 (Py und Ra), Polymorph-Schicht und Körnerzell-Schicht im Gyrus dentatus (PoDG und GrDG). Übersichtsaufnahmen wurden in 5facher Vergrößerung aufgenommen (Skalierung: 500µm), CA1-Aufnahmen in 63facher Vergrößerung (Skalierung: 50µm).

### **2.3.3 GluR-C Defizienz führt zum partiellen Rückhalt von GluR-B Untereinheiten in Endoplasmatischem Retikulum und medialen Golgi Kompartimenten**

Die Deletion von GluR-C hatte deutliche Einflüsse auf die Proteinexpressionshöhe und subzelluläre Lokalisation der GluR-B Untereinheit im Hippokampus. Es wurde untersucht, in welchen subzellulären Kompartimenten sich somatisch akkumulierte GluR-B Untereinheiten befinden und ob somatisch akkumuliertes GluR-B als heteromerer oder homomerer AMPA-Rezeptor Komplex vorliegt. Anhand der Glykosilierungsmuster wurden post Golgi Rezeptorkomplexe von Rezeptoren in ER bis medial Golgi unterschieden, unter der Annahme, daß funktionelle AMPA-Rezeptorkomplexe eine abgeschlossene Assemblierung und postrtranslationale Modifikation in Endoplasmatischem Retikulum (ER) und Golgi-Apparat durchlaufen haben. Nach Immunpräzipitationen gegen GluR-A und -B aus Hippokampus-Extrakten 14 und 42 Tage alter Tiere von Wildtyp und GluR-C<sup>-</sup> wurden die Immunpräzipitate, sowie ungebundene Proteine des Überstandes mit Endoglykosidase H (EndoH) oder N-glykosidase F (PNGaseF) behandelt (Davidson und Balch, 1993; Kornfeld und Kornfeld, 1985). Die genaue Wirkungsweise der Enzyme ist im speziellen Methodenteil aufgeführt. Die EndoH-Behandlung erlaubte die Unterscheidung der AMPA-Rezeptor Untereinheiten in ER bis medial Golgi von Rezeptorkomplexen, die mediale Golgi Kompartimente bereits durchlaufen hatten. PNGaseF entfernt nahezu alle N-verknüpften Oligosaccharide und diente zur Identifizierung komplett deglykosilierter AMPA-Rezeptor Untereinheiten. Durch Änderungen der apparenten Molekulargewichte nach Endoglykosidase Behandlung wurden komplett prozessierte von "unreifen" AMPA-Rezeptor Untereinheiten im Immunoblot unterschieden. GluR-B Untereinheiten, die mit GluR-A kopräzipitierten, waren unabhängig von Alter und Genotyp zu über 90% EndoH insensitiv (Abb 15 A), womit bestätigt wurde, daß GluR-A/B Komplexe mediale Golgi-Komplexe durchlaufen konnten. Die komplette Population von GluR-B Untereinheiten war, unabhängig vom Alter der Tiere, in Wildtypen zu etwa 90% EndoH insensitiv, in GluR-C<sup>-</sup> Mäusen hingegen waren nahezu 40% aller GluR-B Untereinheiten sensitiv gegenüber EndoH (Abb 15 B). In GluR-C defizienten Mäusen existierte damit eine große Population unreifer GluR-B Untereinheiten, die nicht als heteromere GluR-A/B Komplexe vorlagen. In GluR-C defizienten Mäusen wurde GluR-C nicht detektiert, im Wildtyp hingegen wurden GluR-A/C und GluR-B/C Komplexe kopräzipitiert. Etwa 10% der mit GluR-B kopräzipitierten GluR-C Untereinheiten waren in jungen Tieren sensitiv gegenüber EndoH Behandlung, wogegen in erwachsenen Tieren ausschließlich EndoH insensitive GluR-C Untereinheiten in den Immunpräzipitaten detektiert

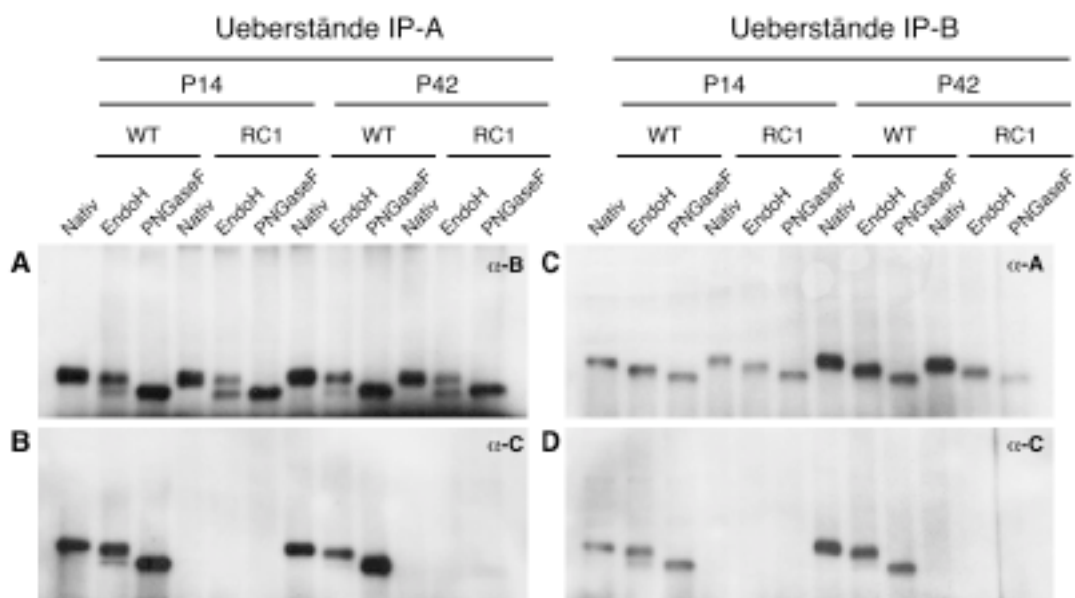
wurden ( Abb 15 C, D). Damit wurde gezeigt, daß auch GluR-A/C und GluR-B/C Rezeptor Komplexe effektiv zu funktionellen AMPA-Rezeptoren prozessiert wurden.



**Abbildung 15:** Immunoblots gegen die AMPA-Rezeptor Untereinheiten GluR-B (anti GluR-B) und GluR-C (anti GluR-C) nach Immunpräzipitationen gegen GluR-A (A, C) und GluR-B (B, D) aus Hippokampusextrakten 14 und 42 Tage alter Tiere der Genotypen Wildtyp (WT) und GluR-C<sup>-</sup> (RC1). Immunpräzipitate aus 25µg Gesamtprotein wurden unbehandelt (Nativ), mit Endoglycosidase H behandelt (EndoH) oder mit N-glycosidase F behandelt (PNGaseF) nach Auftrennung durch 7% SDS-PAGE im Immunblot detektiert.

Nach Immunpräzipitation wurden nicht kopräzipitierte Proteine aus den Überständen gefällt und die darin enthaltenen GluR-A, -B und -C Untereinheiten auf ihren Glykosylierungsgrad untersucht. GluR-B und GluR-C Untereinheiten, die nicht mit GluR-A kopräzipitierten, waren in jungen Wildtypen zu etwa 10% und in erwachsenen Wildtypen zu etwa 5% EndoH-sensitiv (Abb 16 A, B; Abb 15 D), was die effektive Prozessierung des Großteils von GluR-B/C Rezeptor Komplexen bestätigte. Im RC1 Genotyp hingegen stieg, unabhängig vom Alter, der Anteil EndoH sensitiver GluR-B Untereinheiten des Überstandes auf mehr als 50% (Abb 16 A), was darauf hindeutet, daß GluR-B haltige Rezeptoren ohne die Assoziationspartner, GluR-A oder -C, in ER bis medialen Golgi-Kompartimenten zurückgehalten wurden. GluR-A/C Rezeptoren oder andere GluR-A enthaltende Rezeptorpopulationen konnten offenbar effizient mediale Golgi-Kompartimente passieren, da keine komplett deglykosilierten GluR-A

Untereinheiten detektiert wurden (Abb 16 B). Für nicht mit GluR-B kopräzipitiertes GluR-C, wurde in jungen Wildtypen ein etwa 10%iger Anteil EndoH sensibler Untereinheiten beobachtet, der im Erwachsenenstadium nicht mehr detektiert werden konnte, was die effektive Prozessierung GluR-C enthaltender AMPA-Rezeptoren bestätigte. Es wurde in diesem Versuchsansatz deutlich, daß GluR-B Untereinheiten, die in den Somata von Pyramidalneuronen akkumulieren, nicht als GluR-A/B oder GluR-B/C Rezeptor Komplexe vorlagen und deshalb in ER bis medialen Golgi Kompartimenten zurückgehalten wurden. Im Gegensatz zu GluR-A oder -C können GluR-B Untereinheiten im Hippokampus offensichtlich keine funktionellen homomeren Rezeptoren bilden.

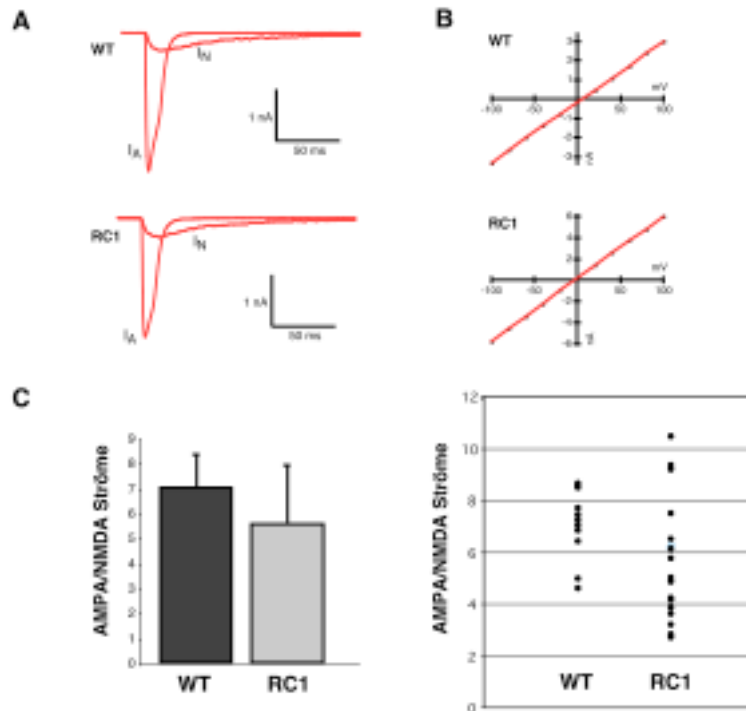


**Abbildung 16:** Immunoblots gegen die ungebundenen AMPA-Rezeptor Untereinheiten GluR-A (□-A), GluR-B (□-B) und GluR-C (□-C) nach Immunpräzipitationen gegen GluR-A (Überstände IP-A) und GluR-B (Überstände IP-B) aus Hippokampusextrakten 14 - und 42 Tage alter Tiere der Genotypen Wildtyp (WT) und GluR-C<sup>-</sup>(RC1) wurden die Überstände aus 25µg Gesamtprotein unbehandelt (Nativ), mit Endoglycosidase H behandelt (EndoH) und N-glycosidase F behandelt (PNGaseF) nach Auftrennung durch 7% SDS-PAGE im Immunblot detektiert.

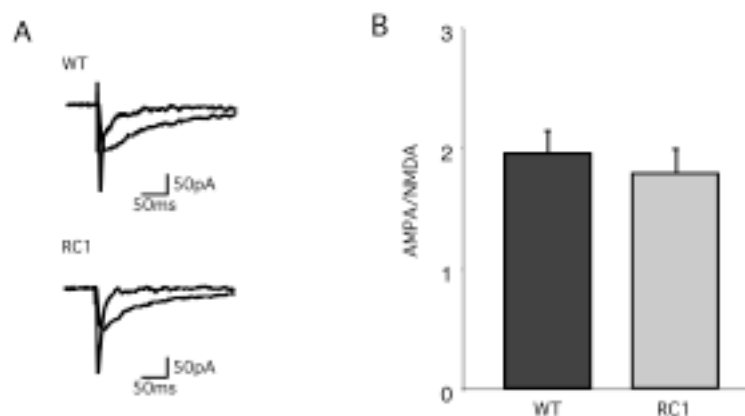
### 2.3.4 Normale synaptische und extrasynaptische AMPA-Rezeptor vermittelte Transmission in GluR-C defizienten Mäusen

In GluR-C defizienten Mäusen fehlen GluR-B/C Rezeptor Komplexe für die AMPA-Rezeptor vermittelte Transmission in synaptischen und extrasynaptischen Kompartimenten von Pyramidalneuronen. Um zu untersuchen, welchen Anteil GluR-C Untereinheiten an der synaptischen und extrasynaptischen Transmission von AMPA-Rezeptoren vermitteln, wurden extrasynaptische “soma patch” Ableitungen in Zellkörpern von CA1-Pyramidalneuronen durchgeführt und synaptisch aktivierte Gesamtzellströme von CA1 Pyramidalneuronen nach Stimulation in den Schaffer-Kollateralen gemessen. Die extrasynaptischen AMPA- und NMDA-Rezeptor Ströme waren in Wildtyp- und GluR-C-Mäusen vergleichbar; es wurden hierbei keine Unterschiede in Amplitude und Kinetik beobachtet (Abb 18 A). Die Strom/Spannung Kurve extrasynaptischer AMPA-Rezeptor Ströme war in GluR-C defizienten Mäusen und Wildtypen linear (Abb 18 B). Das Verhältnis von AMPA/NMDA Strömen in “soma patches” wurde mit  $7.1 \pm 1.35$  für WT und  $5.6 \pm 2.36$  für den RC1 Genotyp gemittelt (Abb 18 A) und zeigte somit keine signifikanten Unterschiede im Vergleich beider Genotypen (Abb 18 C). Die AMPA/NMDA-Rezeptor Ströme wiesen jedoch in GluR-C defizienten Mäusen eine große Streuung auf (Abb 18 C). Möglicherweise wurden unterschiedliche Populationen von Neuronen mit unterschiedlicher Expression von AMPA-Rezeptoren gemessen. Die Menge an vorhandenen AMPA-Rezeptor Komplexen reichte jedoch aus, um eine reguläre AMPA-Rezeptor vermittelte Transmission in extrasynaptischen Kompartimenten zu ermöglichen.

Einzelmessungen von synaptischen AMPA- und NMDA-Rezeptor Strömen in CA1-Pyramidalneuronen GluR-C defizienter Mäuse waren in Amplitude und Kinetik gegenüber dem Wildtyp unverändert (Abb 19 A). Die Analyse der synaptischen AMPA/NMDA Ströme ergab für die WT-Messungen ein Verhältnis von  $1.97 \pm 0.19$  und für den RC1 Genotyp ein Verhältnis von  $1.81 \pm 0.2$  (Abb 18 B). Auch für die Aufrechterhaltung AMPA-Rezeptor vermittelter synaptischer Transmission wurden offenbar keine GluR-B/C Rezeptoren benötigt. Die vorhanden AMPA-Rezeptoren reichten aus, um eine dem Wildtyp vergleichbare synaptische Reizweiterleitung zu ermöglichen.



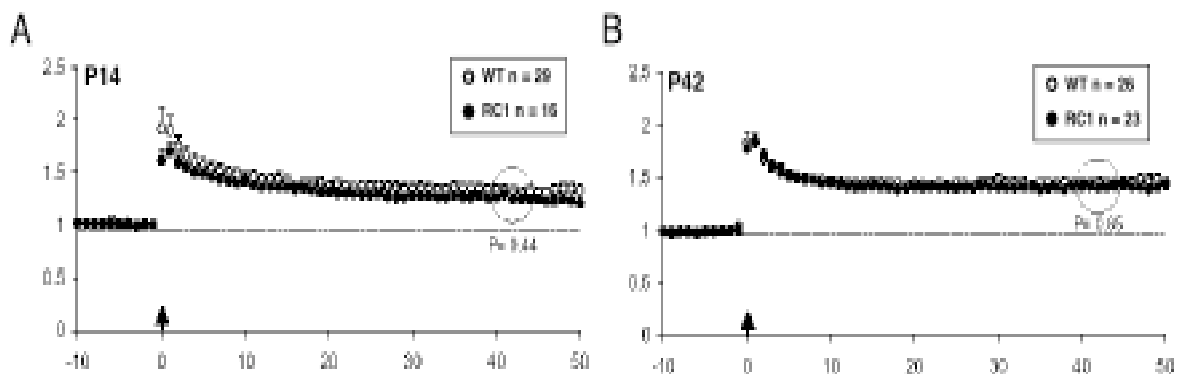
**Abbildung 17:** “Soma patch”-Ableitungen an CA1 Pyramidalneuronen von 14 Tage alten Wildtypen (WT) und GluR-C<sup>-/-</sup> Mäusen (RC1) **A)** Einzelmessung extrasynaptischer AMPA/NMDA Ströme bei  $-80\text{mV}$  Haltepotential von Wildtyp (WT) und GluR-C<sup>-/-</sup> (RC1) bei Skalierung der y-Achse von  $1\text{nA}$  und der x-Achse von  $50\text{ms}$ . **B)** AMPA Rezeptor Strom-/Spannungskurve von Wildtyp (WT) und GluR-C<sup>-/-</sup> (RC1) in CA1 Pyramidalneuronen mit gemessener Stromstärke  $I$  [nA], bei verschiedenen Haltepotentialen  $V$  [mV]. **C)** Verhältnis der extrasynaptischen AMPA/NMDA Rezeptor Ströme (links) in WT (dunkelgrauer Balken) und RC1 (hellgrauer Balken) bei  $-80\text{mV}$  Haltepotential mit Verteilungsgraphik der Einzelwerte (rechts). Fehlerbalken repräsentieren die Abweichungen vom Mittelwert in  $\pm\text{SEM}$ .



**Abbildung 18:** Synaptisch vermittelte AMPA/NMDA Gesamtzellströme in CA1 Pyramidalneuronen von 14 Tage alten Wildtypen (WT) und GluR-C<sup>-/-</sup> Mäusen (RC1). **A)** Einzelmessungen von WT und RC1 Genotyp bei  $-70\text{mV}$  Haltepotential. Die Stromamplitude [pA], und Messdauer [ms] sind angegeben. **B)** Verhältnis der synaptischen AMPA/NMDA Ströme in Wildtyp (WT, dunkelgrauer Balken) und GluR-C<sup>-/-</sup> (RC1, hellgrauer Balken) bei  $-70\text{mV}$  Haltepotential. Fehlerbalken repräsentieren die Abweichungen vom Mittelwert in  $\pm\text{SEM}$ .

### 2.3.5 Wildtyp LTP an CA3/CA1 Synapsen von GluR-C defizienten Mäusen

Für die Analyse der LTP Expression an CA3/CA1 Synapsen wurden Feld-LTP Messungen durchgeführt (spezieller Methodenteil). Frische Gehirnschnitte aus Wildtyp und GluR-C<sup>-</sup> Mäusen wurden im Alter von 14 und 42 Tagen auf die LTP-Expression in der CA1-Pyramidalzellschicht des Hippokampus untersucht. In den Feld-LTP Messungen wurden keine Abweichungen in Induktion, Expressionshöhe und Dauer gegenüber Wildtyp detektiert. Die Steigungen der Feldpotentiale waren zu keinem Zeitpunkt signifikant unterschiedlich zwischen Wildtypen und GluR-C<sup>-</sup> Mäusen. Eine posttetanische Potenzierung war in beiden Genotypen festzustellen. Die Vergleiche der Feldpotential-Steigungen nach 45min ergaben nur insignifikante Abweichungen zwischen Wildtyp und GluR-C<sup>-</sup> im Alter von 14 (P14,  $p = 0.44$ ) und 42 Tagen (P42,  $p = 0.65$ ). Es konnte somit ausgeschlossen werden, daß GluR-B/C AMPA-Rezeptor Komplexe für die Ausprägung synaptischer Potenzierung an SC-CA1 Synapsen in jungen Tieren benötigt wurden. Ebenso konnte eine Beteiligung von B/C Komplexen an der Aufrechterhaltung synaptischer Potenzierung in erwachsenen Tieren ausgeschlossen werden. Die Anwesenheit von GluR-A/B Rezeptor Komplexen und/oder homomeren Calcium durchlässigen GluR-A Rezeptoren war ausreichend, um reguläre synaptische Potenzierung unabhängig vom Alter der Tiere zu erzielen.



**Abbildung 19:** LTP Expression in der hippocampalen CA1 Pyramidalzellschicht von 14 bis 42 Tage alten Wildtyp (WT) und GluR-C<sup>-</sup> Mäusen. A) Steigungen der relativen synaptischen Potenzierung im Vergleich zum unstimulierten Kontrollpfad in 14 Tage alten (P14) und B) 42 Tage alten (P42) Tieren der Genotypen WT (weiße Kreise) und RC1 (schwarze Kreise). Fehlerbalken repräsentieren die Abweichungen vom Mittelwert in  $\pm$  SEM.



### 2.3.6 Der gleichzeitige Verlust von GluR-A und GluR-C führt in Mäusen zu schwerwiegenden Verhaltensdefiziten und zum Verlust synaptischer AMPA-Rezeptor Reizweiterleitung im Hippokampus

In Jungtieren von GluR-A defizienten Mauslinien (Jensen et al., 2002) wurde eine synaptische Plastizität im Hippokampus gemessen, die in erwachsenen Tieren abwesend war. Zur Untersuchung AMPA-Rezeptor vermittelter, synaptischer Potenzierung im Hippokampus von Jungtieren wurde eine Mauslinie generiert, der die Untereinheiten GluR-A und GluR-C fehlten (1lox/RC1). GluR-A/C defiziente Mäuse zeigten schwere körperliche Defizite auf, die sich in geringerem Gewicht und Körpergröße, als deren einfach mutante oder Wildtyp Geschwister ausprägte. Die Lebensdauer von Mäusen des 1lox/RC1 Genotyps konnte nicht über ein Alter von 25 Tagen hinaus verlängert werden. Die Tiere zeigten schwerwiegende Beeinträchtigungen der Motorkoordination, die sich in starkem Tremor und spontanem Umkippen ausprägte. Die Aufricht-Reflexe waren jedoch intakt, da ein erzwungenes Umkippen zu sofortiger Korrektur der Körperhaltung führte.

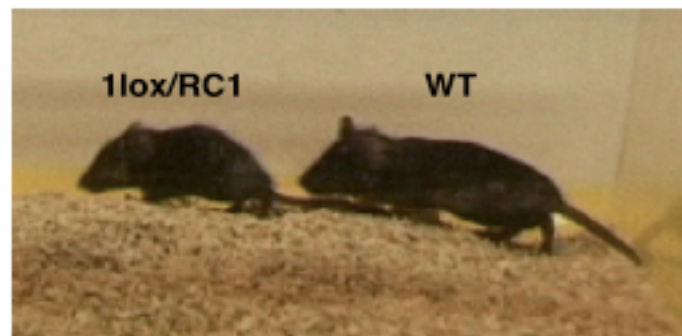
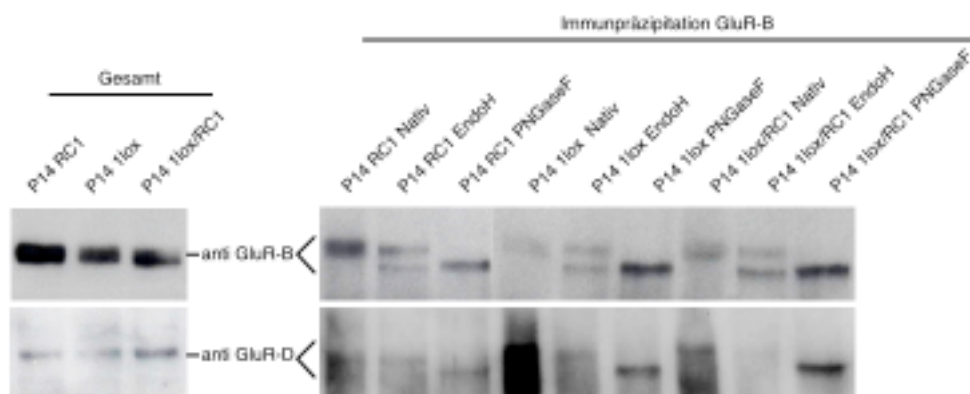


Abbildung 20: Größenvergleich 18 Tage alter Geschwister von GluR-A<sup>-/-</sup>/C<sup>-/-</sup> (1lox/RC1) und Wildtyp (WT).

#### 2.3.6.1 Der gleichzeitige Verlust von GluR-A und GluR-C führt zum Verbleib des Großteils der GluR-B Untereinheiten in unentwickeltem Zustand

Die Auswirkungen des Verlustes der beiden Hauptpartner der GluR-B Untereinheit im Hippokampus wurden durch Expressionsanalyse und Deglykosilierungsstudien untersucht. Der Wegfall von GluR-A und GluR-C sollte verdeutlichen, ob GluR-B als einzig verbliebene AMPA-Rezeptor Untereinheit in Pyramidalneuronen homomere Rezeptorkomplexe bilden kann, die zu funktionellen AMPA-Rezeptoren prozessiert werden. Hierzu wurden hippokampale Proteinextrakte von 14 Tage alten Tieren der Genotypen 1lox (GluR-A<sup>-/-</sup>), RC1 (GluR-C<sup>-/-</sup>) und 1lox/RC1 (GluR-A<sup>-/-</sup>/GluR-C<sup>-/-</sup>) im Immunoblot auf die Expressionshöhe und

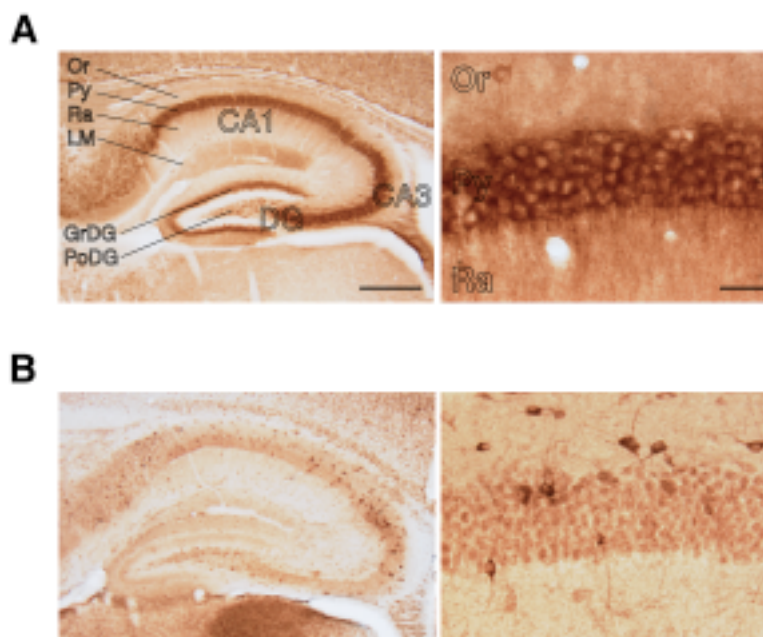
den posttranslationalen Reifestatus von AMPA-Rezeptor Untereinheiten untersucht. Die Expression der GluR-B Untereinheit war in GluR-A<sup>-/-</sup> Mäusen noch stärker verringert, als im RC1 Genotyp. Durch die gleichzeitige Defizienz von GluR-A und GluR-C wurde keine weitere Reduktion der GluR-B Expression gegenüber GluR-A defizienten Mäusen beobachtet. Die Expression der GluR-D Untereinheit war in GluR-A<sup>-/-</sup> Mäusen ebenfalls gegenüber RC1 Mäusen verringert. In der Doppelmutante wurde keine weitere Reduktion der GluR-D Expression beobachtet (Abb 21, Gesamt). Die Behandlung der Immunpräzipitate mit EndoH ergab, daß in GluR-C defizienten Mäusen 30-40% EndoH sensitive GluR-B Untereinheiten vorhanden waren, deren Anteil in GluR-A defizienten Mäusen auf etwa 50% und in doppelt homozygoten 1lox/RC1 Mäusen auf über 75% anstieg. Erstaunlicherweise erreichte trotz Abwesenheit der beiden Hauptpartner, GluR-A und GluR-C, ein substantieller Anteil an GluR-B Untereinheiten einen EndoH insensitive Reifestatus (Abb 21, Immunpräzipitation GluR-B). Es konnte nicht ausgeschlossen werden, daß die Deglykosylierung durch EndoH nicht vollständig stattfand; möglicherweise wurden aber auch GluR-B/D Rezeptor Komplexe gebildet, die in GluR-A und GluR-A/C defizienten Mäusen in synaptische und extrasynaptische Kompartimente transportiert wurden. Verdeutlicht wurde dies durch eine mehr als zweifach erhöhte Menge an kopräzipitierten GluR-B/D Rezeptor Komplexen in GluR-A<sup>-/-</sup> und GluR-A<sup>-/-</sup>/GluR-C<sup>-/-</sup> gegenüber dem RC1 Genotyp nach Immunpräzipitation gegen die GluR-B Untereinheit (Abb 21, Immunpräzipitation GluR-B).



**Abbildung 21:** Immunoblot-Analyse von Proteinextrakten aus dem Hippokampus 14 Tage alter Tiere der Genotypen RC1, 1lox und 1lox/RC1 gegen GluR-B (anti GluR-B) und GluR-D (anti GluR-D). Expression der AMPA-Rezeptor Untereinheiten aus 10µg Hippokampus-Extrakt (links) und posttranslationaler Reifestatus von GluR-B und GluR-D Untereinheiten nach Immunpräzipitation (Nativ) gegen die GluR-B Untereinheit und Behandlung mit EndoH oder PNGaseF (rechts).

### 2.3.6.2 Der gleichzeitige Verlust von GluR-A und GluR-C führt im Hippokampus zu nahezu vollständigem Verbleib von GluR-B in den Zellkörpern von Pyramidalneuronen

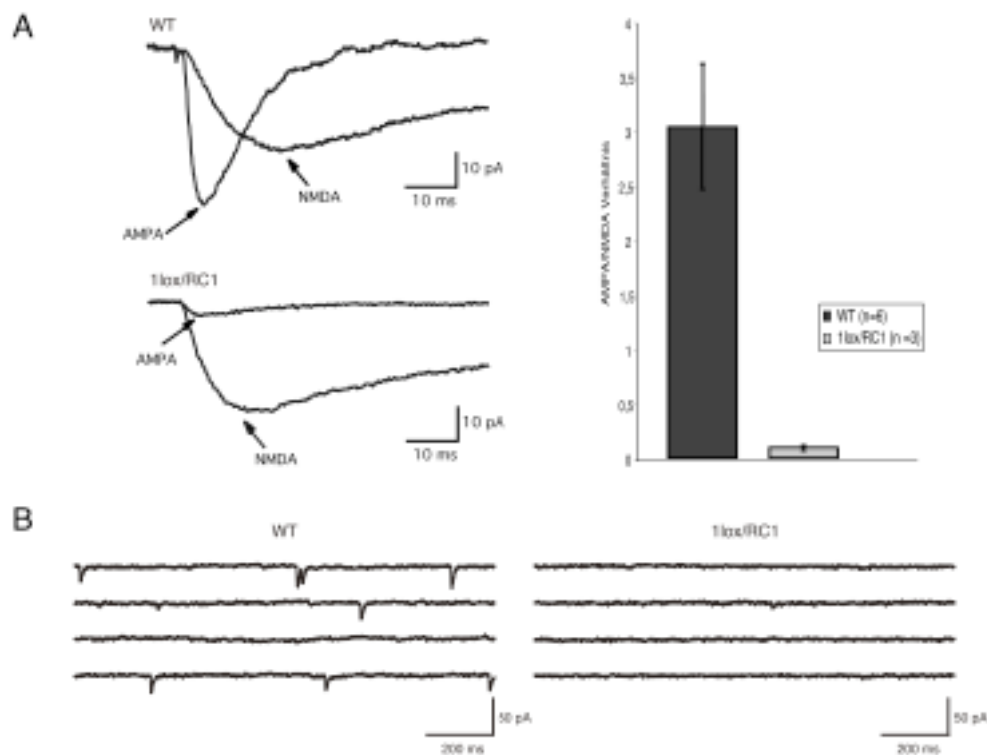
Die GluR-B Untereinheit in GluR-A/C defizienten Mäusen akkumulierte noch stärker in somatischen Kompartimenten von Pyramidalneuronen als in GluR-C<sup>-</sup> Mäusen (Abb 22 A). GluR-D lokalisierte nach wie vor vornehmlich in Interneuronenpopulationen des Stratum oriens und der Pyramidal-Zellschicht. Schwache Färbung wurde allerdings in den Zellkörpern von Pyramidalneuronen beobachtet, die jedoch auch auf unspezifischer Hintergrundfärbung beruhen kann (Abb 22 B).



**Abbildung 22:** Immunhistochemische Färbungen im Hippokampus von 14 Tage alten GluR-A<sup>-/-</sup>/GluR-C<sup>-/-</sup> Mäusen (1lox/RC1). Die hippocampalen Subregionen wurden wie folgt abgekürzt: Stratum oriens (Or), Pyramidalschicht (Py), Stratum radiatum (Ra), Gyrus dentatus Körnerzellschicht (GrDG), Gyrus dentatus Polymorphschicht (PoDG), Cornu ammonis 1 und 3 (CA1, 3) und Gyrus dentatus (DG). **A)** Immunfärbung gegen GluR-B und **B)** Immunfärbung gegen GluR-D. Die Übersichtsaufnahmen wurden in 5facher Vergrößerung aufgenommen (Skalierung = 500µm), die CA1-Aufnahmen wurden in 40facher Vergrößerung aufgenommen (Skalierung = 50µm).

### 2.3.6.3 Das Verhältnis synaptischer, AMPA/NMDA-Rezeptor vermittelter Ströme ist in Doppelmutanten um 96% reduziert gegenüber dem Wildtyp bei Abwesenheit von spontan aktivierten AMPA-Rezeptor Strömen

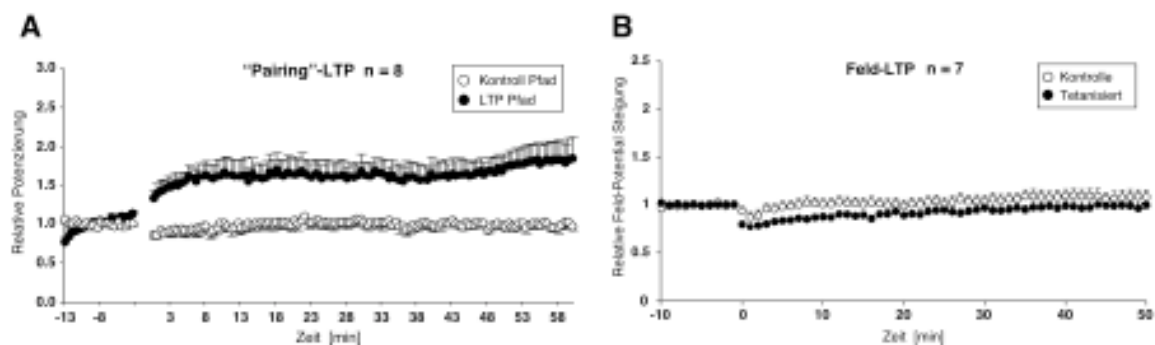
Zur Charakterisierung der synaptischen Transmission wurden AMPA- und NMDA- Rezeptor vermittelte Ströme in 21 Tage alten Wildtypen und GluR-A<sup>-/-</sup>/GluR-C<sup>-/-</sup> Mäusen (1lox/RC1) in Mg<sup>2+</sup> freier Lösung gemessen. Das Verhältnis von synaptischen AMPA- zu NMDA-Rezeptor Strömen fiel von  $3.06 \pm 0.57$  im Wildtyp auf  $0.12 \pm 0.03$  mit  $p < 0.005$  in GluR-A/C doppelt defizienten Mäusen (Abb 23 A). Messungen spontan aktivierter, synaptischer AMPA-Rezeptor Ströme in Anwesenheit von TTX bestätigten die Abwesenheit von funktionellen AMPA-Rezeptoren in den Synapsen von CA1-Pyramidalneuronen (Abb 23 B).



**Abbildung 23:** AMPA- und NMDA-Rezeptor vermittelte Ströme in CA1-Pyramidalneuronen von 21 Tage alten Wildtyp (WT) und GluR-A<sup>-/-</sup>/C<sup>-/-</sup> Doppelmutanten (1lox/RC1). **A)** Einzelmessung synaptischer AMPA- und NMDA-Rezeptor Ströme (links) und Verhältnis von synaptischen AMPA/NMDA Strömen (rechts) in WT (dunkelgrauer Balken) und 1lox/RC1 (hellgrauer Balken) Genotyp, mit Stromstärke I [pA] und Messdauer [ms]. **B)** Spontan aktivierte postsynaptische AMPA-Rezeptor Ströme in Wildtyp (WT) und GluR-A<sup>-/-</sup>/C<sup>-/-</sup> (1lox/RC1) in Anwesenheit von TTX mit Stromstärke I [pA] und Meßdauer [ms]. Fehlerbalken repräsentieren die Abweichungen vom Mittelwert in  $\pm$  SEM.

### 2.3.6.4 In 14 Tage alten GluR-A/C defizienten Mäusen findet nach tetanischer Stimulation keine synaptische Potenzierung in der CA1-Region des Hippokampus statt

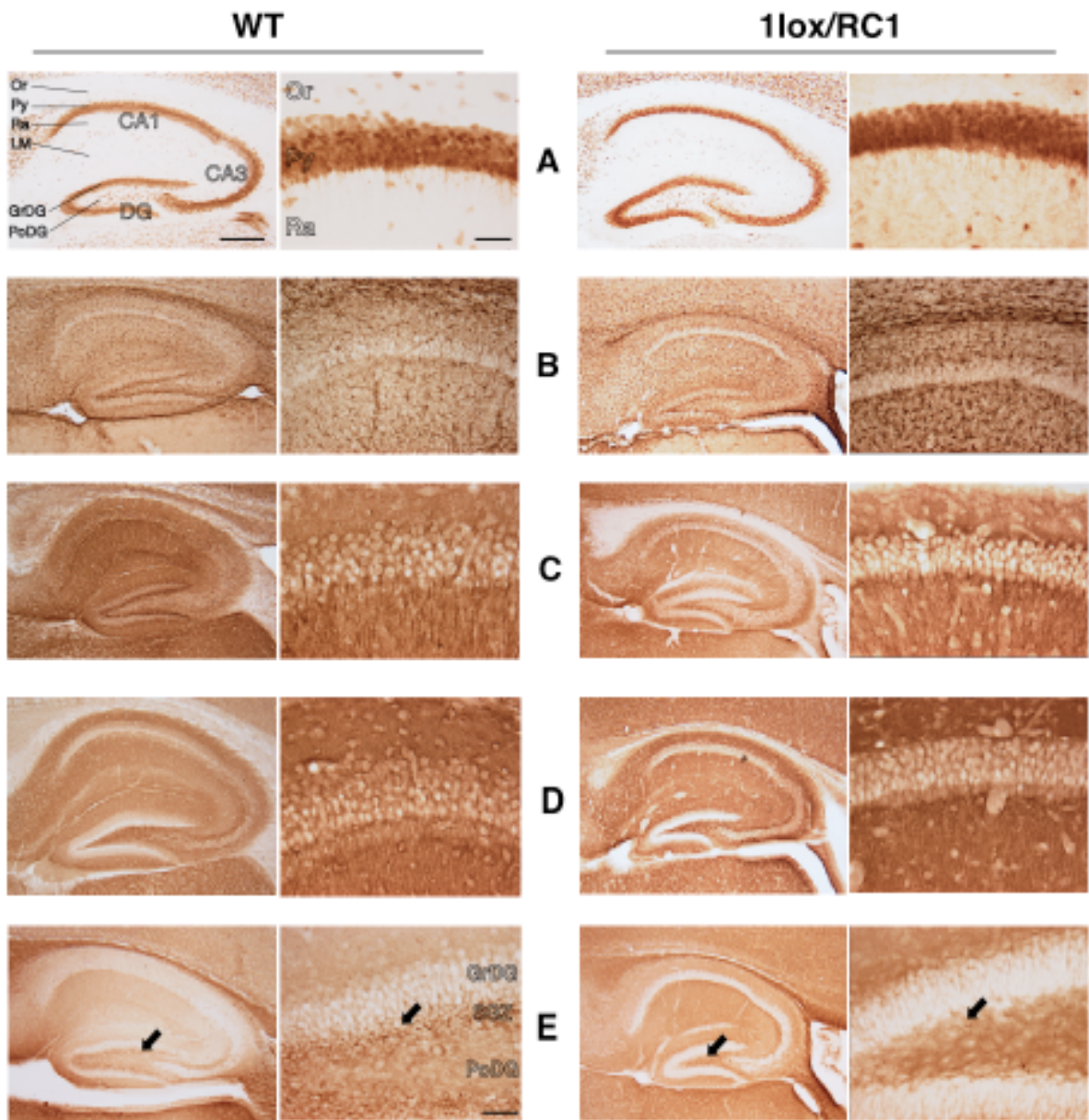
Zur Überprüfung, ob eine erhöhte postsynaptische Potenzierung bei fast völligem Verlust der AMPA vermittelten Ströme noch erreicht werden kann, wurden zelluläre “Pairing”-LTP und Feld-LTP Messungen in der CA1 Pyramidalzellschicht nach Stimulation der Schaffer Kollateralen durchgeführt. Während in zellulären “Pairing”-LTP Messungen eine dem Wildtyp vergleichbare synaptische Potenzierung gemessen wurde (Abb 24 A), konnte in Feld-LTP Messungen nach tetanischer Stimulation keine Langzeit-Potenzierung induziert werden. In den ersten 15 Minuten nach Tetanus wurde sogar synaptische Depression aufgezeichnet (Abb 24 B). Die dreiminütige Depolarisation der postsynaptischen CA1-Pyramidalneurone im “Pairing”-Protokoll umging offenbar den initialen Schritt der Membrandepolarisation durch AMPA-Rezeptoren, weshalb in diesen Messungen ein Ioneneinstrom durch NMDA-Rezeptoren dennoch stattfinden konnte und damit eine Langzeit-Potenzierung in CA1-Zellen. Eine initiale Membrandepolarisation durch AMPA-Rezeptoren fand nach tetanischer Stimulation nicht statt, weshalb eine Aktivierung von NMDA-Rezeptoren nicht möglich war.



**Abbildung 24:** LTP-Messungen an 14 Tage alten Tieren des Genotyps 1lox/RC1 an CA3/CA1 Synapsen im Hippokampus. **A)** Zelluläre “Pairing”-LTP Messungen in CA1-Pyramidalzellen. Der nichtgepaarte Kontrollpfad wurde mit weissen Kreissen dargestellt, der gepaarte LTP-Pfad mit schwarzen Kreisen. Y-Achse: relative Potenzierung im Vergleich zum Kontrollpfad und x-Achse Meßdauer [min]. **B)** Feld-LTP Messungen in der CA1-Pyramidalschicht nach tetanischer Stimulation. Der nicht tetanisierte Kontrollpfad wurde in weissen Kreisen dargestellt, der tetanisierte LTP-Pfad in schwarzen Kreisen. Y-Achse: Mittelwerte der Steigungen der Feldpotentiale nach tetanischer Stimulation im Vergleich zum Kontrollpfad, x-Achse: Meßdauer [min]. Fehlerbalken repräsentieren die Abweichungen vom Mittelwert in  $\pm$  SEM.

### **2.3.6.5 Die Ausbildung zellulärer Strukturen und synaptischer Verbindungen im Hippokampus wird durch den gleichzeitigen Verlust von GluR-A und GluR-C nicht beeinflusst**

Die Abwesenheit AMPA-Rezeptor vermittelter Ströme war nicht auf Verluste synaptischer Kontakte in der CA1-Pyramidalzellschicht oder einen massiven Verlust von Neuronen in der CA1-Region zurückzuführen. Dies konnte durch immunhistochemische Färbungen gegen prä- und postsynaptische Markerproteine, sowie Astroglia-Marker gezeigt werden. Die Immunfärbung gegen NeuN, ein kernlokalisiertes Neuronen spezifisches Protein, konnte keine signifikanten Unterschiede in der Gesamtneuronenzahl von Wildtyp und GluR-A/C doppelt defizienten Mäusen detektieren (Abb 25 A). Anzahl und Ausdehnung von Astroglia-Zellen waren in Wildtyp und 1lox/RC1 Genotyp vergleichbar (Abb 25 B). Die Immunfärbung gegen Proteine des Zellskelettes dendritischer Fortsätze, wie beispielsweise MAP2, konnte keine Umorganisation in Ausrichtung und Länge dendritischer Neuronenfortsätze detektieren (Abb 25 C). Durch Synaptophysin-Antikörper wurden präsynaptische Endigungen angefärbt. Auch hier konnten keine wesentlichen Unterschiede in Dichte und Projektion synaptischer Kontakte beobachtet werden (Abb 25 D). Die Abwesenheit synaptischer AMPA-Rezeptoren hatte demnach keinen Einfluß auf die Entwicklung zellulärer Strukturen und synaptischer Verbindungen im Hippokampus. Lediglich die Immunfärbung gegen  $\beta$ III-Tubulin zeigte auf, daß im Gegensatz zum Wildtyp, im Gyrus dentatus offenbar die Färbung der unteren Körnerzellschicht abwesend war, von der aus neuronale Stammzellen in die verschiedenen Subregionen des Hippokampus auswandern (Abb 25 E, Pfeile).



**Abbildung 25:** Immunhistochemische Färbungen im Hippokampus von 14 Tage alten Wildtyp (WT) und GluR-A<sup>-/-</sup>/GluR-C<sup>-/-</sup>-Mäusen (1lox/RC1). Die hippocampalen Subregionen wurden wie folgt abgekürzt: Stratum oriens (Or), Pyramidalschicht (Py), Stratum radiatum (Ra), Gyrus dentatus Körnerzellschicht (GrDG), Gyrus dentatus Polymorphschicht (PoDG), Subgranuläre Zone (SGZ), Cornu ammonis 1 und 3 (CA1, 3) und Gyrus dentatus (DG). **A)** Immunfärbung gegen NeuN **B)** Immunfärbung gegen GFAP, **C)** Immunfärbung gegen MAP2, **D)** Immunfärbung gegen Synaptophysin, **E)** Immunfärbung gegen ̢III-Tubulin. Die subgranuläre Schicht wurde durch Pfeile markiert. Die Übersichtsaufnahmen wurden in 5facher Vergrößerung aufgenommen (Skalierung = 500µm), die CA1 und Gyrus dentatus Aufnahmen wurden in 40facher Vergrößerung aufgenommen (Skalierung = 50µm).

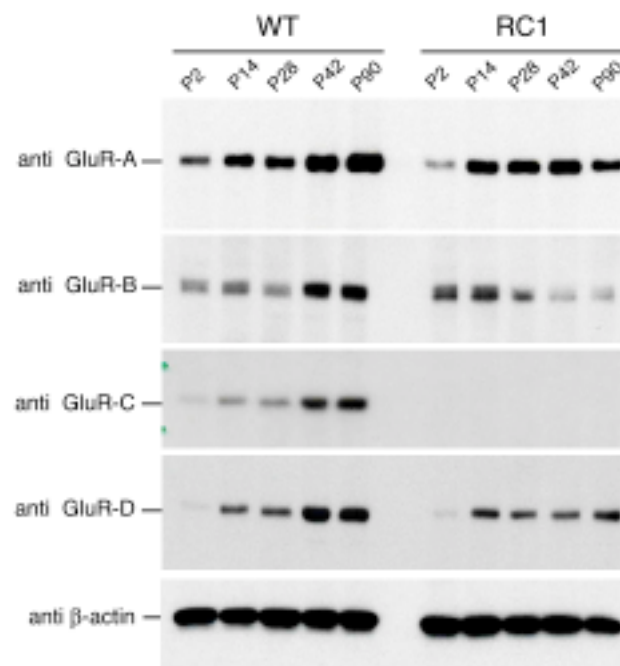
## **2.4 Biochemische und elektrophysiologische Charakterisierung im Kleinhirn von GluR-C defizienten Mäusen**

Da GluR-C in allen inhibitorischen Neuronen des Kleinhirnes vorhanden ist, konnte davon ausgegangen werden, daß die GluR-C Defizienz auch im Kleinhirn die Expression von AMPA-Rezeptor Untereinheiten und die AMPA-Rezeptor vermittelte Transmission beeinträchtigt.

### **2.4.1 Die Deletion von GluR-C im Kleinhirn führt zu Veränderungen der entwicklungsabhängigen Expression von AMPA-Rezeptor Untereinheiten**

Aus den Kleinhirnen von Wildtypen und GluR-C defizienten Mäusen wurde analog zu den Expressionsstudien im Hippokampus Proteinextrakte aus den postnatalen Entwicklungsstadien P2, P14, P28, P42 und P90 isoliert und durch Immunoblot auf die Expression von AMPA-Rezeptor Untereinheiten untersucht. Im RC1 Genotyp wurde eine Reduktion der GluR-A Expression in allen Entwicklungsstadien festgestellt, die etwa 70% des Wildtyps betrug. Zudem nahm die GluR-A Expression in adulten RC1-Mäusen stark ab, wohingegen im Wildtyp zum gleichen Zeitpunkt maximale Expression erreicht wurde (Abb 26). Für GluR-B wurde im Vergleich zum Wildtyp ein umgekehrtes Expressionsprofil beobachtet. Im Wildtyp stieg die Expression von GluR-B mit zunehmendem Alter, wohingegen in GluR-C defizienten Mäusen die GluR-B Expression in den Entwicklungsstadien von P2 bis P14 erhöht war, dann jedoch abnahm und die niedrigste Expression bei P90 erreichte (Abb 26). Im RC1 Genotyp wurde GluR-C nicht detektiert. Im Wildtyp stieg die Expressionshöhe von GluR-C parallel zu anderen AMPA-Rezeptor Untereinheiten an (Abb 26). Die Expression von GluR-D stieg im Wildtyp, ähnlich zu anderen AMPA-Rezeptor Untereinheiten mit zunehmendem Alter. Im RC1 Genotyp hingegen war die Expressionshöhe bei gleichem Expressionsverlauf gegenüber Wildtyp um 50 % reduziert (Abb 26). Die Immunoblots gegen  $\alpha$ -Actin verdeutlichten, daß in allen Entwicklungsstadien bei beiden Genotypen etwa gleiche Gesamtproteinmengen aufgetragen wurden. Insgesamt wirkte sich das Fehlen von GluR-C im Kleinhirn deutlicher auf die Expression verbliebener AMPA-Rezeptor Untereinheiten aus als im Hippokampus. Die GluR-C Untereinheit bildet im ausgereiften Kleinhirn den Hauptpartner von GluR-B haltigen Rezeptoren und GluR-C Defizienz unterdrückt die Expression anderer AMPA-Rezeptor Untereinheiten.





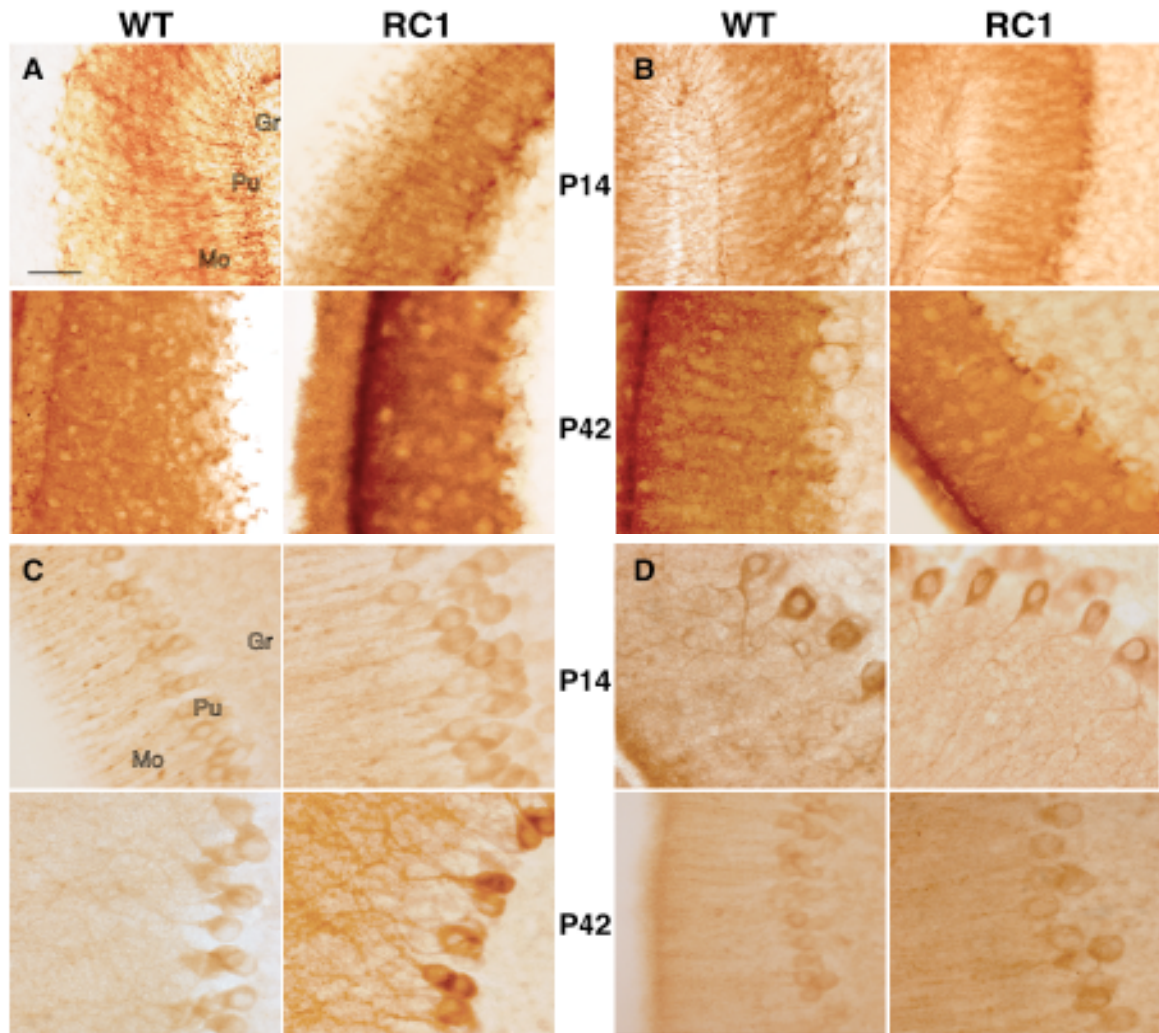
**Abbildung 26:** Expression von AMPA-Rezeptor Untereinheiten im Kleinhirn von Wildtyp (WT) und GluR-C<sup>-</sup> (RC1) zu den postnatalen Entwicklungszeitpunkten P2, P14, P28, P42 und P90. Dargestellt sind Immunoblots gegen GluR-A (anti GluR-A), GluR-B (anti GluR-B), GluR-C (anti GluR-C) und GluR-D (anti GluR-D). Als interne Ladekontrolle für gleiche Gesamtproteinmengen wurde ein  $\beta$ -Actin Antikörper (anti  $\beta$ -actin) verwendet.

#### 2.4.2 GluR-C Defizienz verändert die zelltypspezifische Expression von AMPA-Rezeptoren nicht

Zur Analyse der AMPA-Rezeptor Verteilung im Kleinhirn wurden immunhistochemische DAB-Färbungen gegen die Untereinheiten GluR-A bis -D durchgeführt. Die Färbungen erfolgten, wie bereits für hippocampale Immunhistochemie beschrieben. GluR-A wurde in beiden Genotypen hauptsächlich in Bergmann-Glia Zellen detektiert. Um die Zellkörper der Purkinje-Neuronen wurde eine punktierte Färbung beobachtet. Im Gegensatz zu P42 war in jungen Tieren eine Färbung in der Körnerzellschicht zu sehen. Ungefärbte Bereiche in der Molekularschicht waren möglicherweise auf Stern- und Korbzellen zurückzuführen, die wahrscheinlich kein GluR-A exprimieren (Abb 27 A). Für die GluR-D Untereinheit wurde ebenfalls eine prominente Färbung in Bergmann-Glia Zellen beobachtet. Um die Zellkörper der Purkinje-Neuronen wurden Immunsignale detektiert, die jedoch nicht, wie bei der GluR-A Immunfärbung beobachtet, ein punktiertes Muster aufwiesen. Die Körnerzellschicht zeigte in

beiden Altersstufen eine detektierbare Immunfärbung, die im Vergleich beider Genotypen keine Unterschiede aufwies. In der Molekularschicht wurden ebenfalls ungefärbte Bereiche beobachtet, die auch hier eventuell auf die Zellkörper inhibitorischer Interneurone des Stern- und Korbtyps zurückzuführen waren, die wahrscheinlich kein GluR-D exprimieren (Abb 27 B). Für GluR-B wurden in beiden Genotypen Immunsignale in den Zellkörpern und Hauptfortsätzen der Dendritenbäume von Purkinje-Neuronen sichtbar. In koronalen Schnitten wurde eine punktierte Färbung detektiert, die mögliche synaptische Kontaktstellen mit den Parallelfasern aus der Körnerzellschicht darstellten. Die punktierte Färbung war in beiden Genotypen sichtbar, jedoch in GluR-C<sup>-</sup> Tieren weniger intensiv. In der Körnerzellschicht wurde unabhängig von Alter und Genotyp eine diffuse GluR-B Immunreaktion detektiert. Eine eindeutige Färbung in Stern- und Korbzellen wurde nicht beobachtet (Abb 27 C). Ein für die GluR-C Untereinheit monospezifischer Antikörper war nicht verfügbar. Es wurde deshalb ein Antikörper verwendet, welcher die C-terminalen Epitope in GluR-B und GluR-C erkennt. Neben starker Immunfärbung in Zellkörpern und dendritischen Fortsätzen von Purkinje-Zellen wurden im Gegensatz zur GluR-B Färbung Immunsignale in den Zellkörpern von Stern- und Korbzellen des Wildtyps beobachtet. Diese Signale wurden im RC1 Genotyp nicht detektiert und waren ein Hinweis darauf, daß GluR-C in dieser Zellpopulation prominent exprimiert wurde. Die Immunfärbung in der Granulärschicht zeigte eindeutige Signale für die Zellkörper von Körnerzellen (Abb 27 D).

Im Gegensatz zu Pyramidalneuronen des Hippokampus wurde durch die Abwesenheit von GluR-C im Kleinhirn keine Beeinflussung der subzellulären Verteilung von GluR-B Untereinheiten beobachtet. Trotz Unterdrückung der Expression aller AMPA-Rezeptor Untereinheiten, blieb deren zelltypspezifische Expression erhalten.

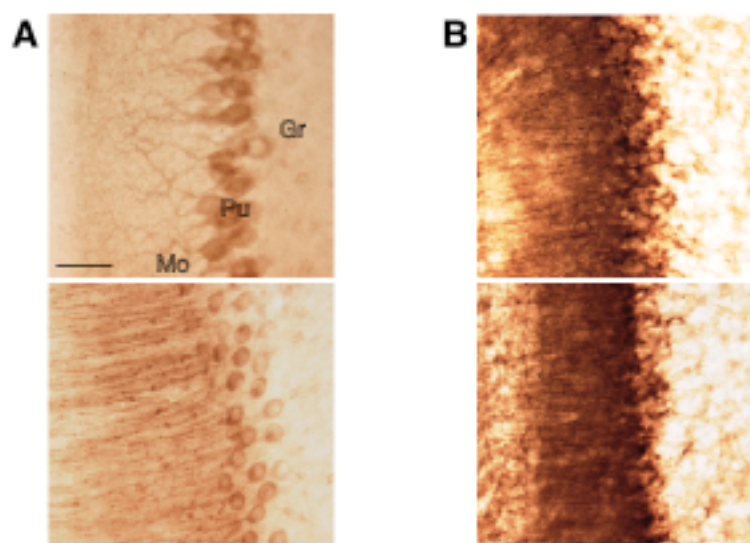


**Abbildung 27:** Immunhistochemie gegen die AMPA-Rezeptor Untereinheiten GluR-A (A), GluR-D (B), GluR-B (C) und GluR-B/C (D) im Kleinhirn von 14 (P14) und 42 Tage alten (P42) Wildtypen (WT) und GluR-C<sup>-</sup>Mäusen (RC1). Die cerebellären Subregionen wurden wie folgt abgekürzt: Molekularschicht (Mo), Purkinje-Zellschicht (Pu) und Körnerzellschicht (Gr). Die Immunfärbungen wurden in 40facher Vergrößerung aufgenommen; Maßstab (50µm).

### 2.4.3 Die subzelluläre Verteilung von GluR-B und GluR-D wird durch Deletion von GluR-A und GluR-C nicht verändert

In GluR-A/C Doppelmutanten wurde ebenfalls die subzelluläre Verteilung der verbliebenen AMPA-Rezeptor Untereinheiten GluR-B und GluR-D im Kleinhirn untersucht. Weder für GluR-B noch für GluR-D konnten wesentliche Veränderungen in der subzellulären und zellspezifischen Expression beobachtet werden. GluR-B lokalisierte in Zellkörpern und Dendritenbäumen von Purkinje-Zellen. Eine Färbung in Stern- oder Korbzellen wurde nicht beobachtet, wohingegen in den Körnerzellen schwache Immunsignale detektiert werden

konnten (Abb 28 A). Für GluR-D wurde eine starke Färbung in Bergmann-Glia Zellen beobachtet. Punktierte Immunsignale konnten um die Purkinje-Zellsomata detektiert werden. Die Immunsignale in der Körnerzellschicht waren ebenfalls mit Wildtyp und GluR-C<sup>-/-</sup> vergleichbar (Abb 28 B). Im Unterschied zu Pyramidalneuronen im Hippokampus führt die Abwesenheit der Hauptpartner, GluR-A und GluR-C, nicht zur somatischen Anreicherung der GluR-B Untereinheiten. Möglicherweise existieren in Hippokampus und Cerebellum unterschiedliche Assemblierungs- und Transportmechanismen zur Regulation GluR-B haltiger AMPA-Rezeptoren.

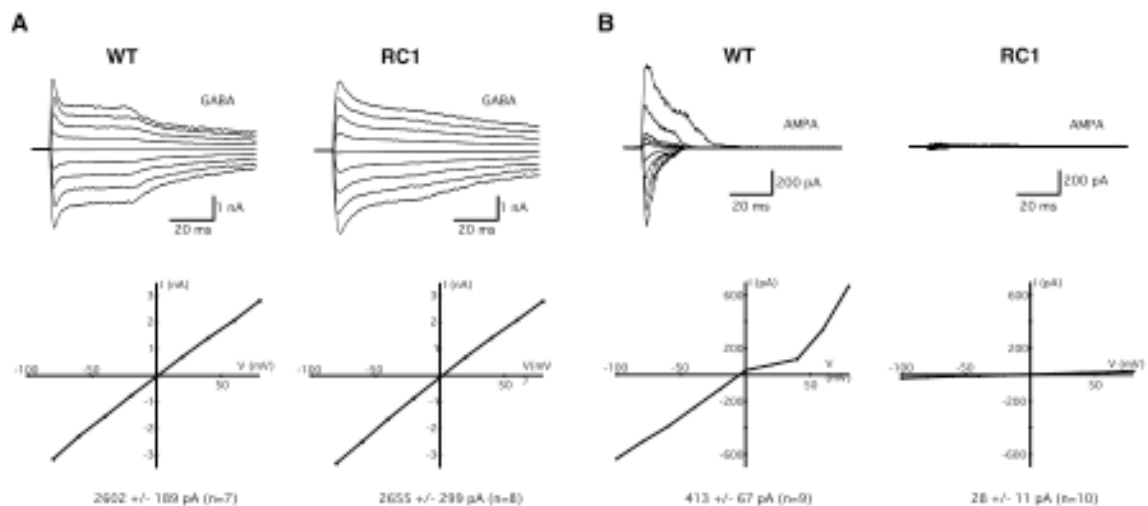


**Abbildung 28:** Immunhistochemie im Kleinhirn von 14 Tage alten GluR-A<sup>-/-</sup>/C<sup>-/-</sup> Mäusen (1lox/RC1) gegen die AMPA-Rezeptor Untereinheiten GluR-B (A) und GluR-D (B). Die cerebellären Subregionen wurden wie folgt abgekürzt: Molekularschicht (Mo), Purkinje-Zellschicht (Pu) und Körnerzellschicht (Gr). Die Immunfärbungen wurden in 40facher Vergrößerung aufgenommen. Maßstab (50µm).

#### 2.4.4 Die GluR-C Defizienz führt zur Abschaltung extrasynaptischer AMPA-Rezeptor Ströme in Sternzellen des Kleinhirnes

Synaptische Aktivierung von Parallelfasern führt in Sternzellen des Kleinhirnes zu einer schnellen und langanhaltenden Änderung in der Ca<sup>2+</sup>-Permeabilität von AMPA-Rezeptor Populationen (Liu und Cull-Candy 2000). Es lag deshalb nahe, die AMPA-Rezeptor vermittelte Transmission in Sternzellen GluR-C defizienter Mäuse zu untersuchen. In frischen Kleinhirnschnitten aus 12-14 Tage alten Tieren von Wildtyp und GluR-C defizienten Mäusen wurden hierzu “soma patch” Ableitungen durchgeführt. Die Messung der Ionenströme durch

GABA-Rezeptoren waren in WT und RC1-Genotyp identisch. Für Wildtypen wurden bei  $-80\text{mV}$  Haltepotential absolute GABA-Rezeptor vermittelte Ströme von  $2602 \pm 189\text{pA}$  gemessen ( $n = 7$ ), für den RC1-Genotyp  $2655 \pm 299\text{pA}$  ( $n = 8$ ). Die Strom-/Spannungskurven verliefen in beiden Fällen linear (Abbildung 29 A). Die somatischen AMPA-Rezeptor Ströme unterschieden sich in Wildtyp und GluR-C<sup>-</sup> Mäusen drastisch. Während im Wildtyp AMPA-Rezeptorströme von  $413 \pm 67\text{pA}$  ( $n = 9$ ) gemessen wurden, waren die AMPA-Rezeptor vermittelten Ströme in GluR-C defizienten Mäusen um 93% auf  $28 \pm 11\text{pA}$  ( $n = 10$ ) reduziert (Abb 29 B). Die Strom-/Spannungsdiagramme zeigten im Wildtyp auswärts rektifizierende Ströme, die auf das Vorhandensein extrasynaptisch lokalisierter, GluR-B haltiger Rezeptoren hindeuteten (Liu und Cull-Candy, 2000). In GluR-C defizienten Mäusen waren die restlichen AMPA-Ströme sowohl auswärts, als auch einwärts rektifizierend (Abb 29 B). Offensichtlich wird in extrasynaptischen Kompartimenten cerebellärer Sternzellen der Großteil AMPA-Rezeptor vermittelter Transmission von GluR-C haltigen Rezeptor Komplexen vermittelt, die entweder als heteromere GluR-B/C oder homomere GluR-C Rezeptor Komplexe vorliegen. Der drastische Effekt in dieser regulatorischen Ineruronen-Population des Kleinhirnes könnte mit Beeinträchtigungen motorischer Verhaltensweisen in GluR-C defizienten Mäusen in Zusammenhang stehen.



**Abbildung 29:** Extrasyntaptische AMPA- und GABA-Rezeptor vermittelte Ströme in cerebellären Sternzellen 12 bis 14 Tage alter Tiere der Genotypen Wildtyp (WT) und GluR-C<sup>-</sup> (RC1). **A)** GABA-Rezeptor vermittelte Ströme in “outside-out patches” cerebellärer Sternzellen bei verschiedenen Haltepotentialen und zugehörige Strom-/Spannungskurve GABA-Rezeptor vermittelter Ströme mit Stromstärke [nA], Meßdauer [ms] und Haltepotential V [mV]. **B)** AMPA-Rezeptor Ströme in “outside-out patches” von cerebellären Sternzellen bei verschiedenen Haltepotentialen und zugehöriger Strom-/Spannungskurve AMPA-Rezeptor vermittelter Ströme mit Stromstärke I [pA], Meßdauer [ms] und Haltepotential V [mV].

### 3. Diskussion

Die Etablierung von Mausmodellen zur Untersuchung der *in vivo* Funktion von Proteinen erlaubt im Gegensatz zu Zellkulturmodellen oder *ex vivo* Schnittpräparaten die Charakterisierung einzelner Proteine im Kontext ihrer natürlichen und geordneten Umgebung. Eine Möglichkeit, auf die Funktion einzelner Untereinheiten zu schließen, ist die genetisch manipulierte Deletion von Genen im Gesamtorganismus oder deren zelltyp- und entwicklungspezifische Ausschaltung. In dieser Dissertation wurden Mauslinien generiert, die anhand der genetischen Deletion der X-chromosomal lokalisierten AMPA-Rezeptor Untereinheit GluR-C weitere Einsichten über molekulare Mechanismen Glutamat-vermittelter erregender Reizweiterleitung und deren Auswirkungen auf synaptische Plastizität und daraus resultierenden Verhaltensveränderungen erbringen sollte.

#### 3.1 GluR-C defiziente Mauslinien sind in lebensnotwendigen Körperfunktionen nicht beeinträchtigt

Die etablierten Mauslinien RC3 und RC2 ermöglichen die zell- und entwicklungspezifische Ausschaltung der GluR-C Untereinheit. Es ist hierzu notwendig, daß genetisch manipulierte Allele vor Ausschaltung eine dem Wildtyp entsprechende korrekte Prozessierung und eine vergleichbare Proteinexpression aufweisen. Für die Mauslinie RC3, deren GluR-C Gen durch intronische Insertion von loxP-Elementen und einem synthetischen Neomycinphosphotransferase Gen modifiziert wurde, konnte durch RT-PCR eine korrekte prä-mRNA Prozessierung der kodierenden Regionen nachgewiesen werden. Da die PCR-Amplifikation der cDNA kein direktes Maß für die Menge transkribierter GluR-C Gene darstellt, konnte von der geringeren Intensität des amplifizierten Fragmentes vom RC3 Allel nicht direkt auf eine geringere Menge transkribierter mRNA geschlossen werden. Erst die Western Blot Analyse bestätigte eine Reduktion in der Expression von GluR-C in RC3 Mäusen auf etwa 75% des Wildtyp Alleles. Unter der Annahme, daß eine 25%ige Abweichung gegenüber dem Wildtyp der allgemeinen Variabilität der Expressionshöhe entspricht, kann bereits die RC3 Mauslinie für die Generierung konditionaler Mausmutanten verwendet werden. Die Analyse der RC2 Mauslinie, in der die synthetische Neomycinphosphotransferase entfernt wurde, wird weitere Aufschlüsse über die Auswirkung der verbliebenen loxP-Elemente auf die Prozessierung und Expression von GluR-C ergeben.

Es ist wahrscheinlich, daß die Entfernung der Neomycinphosphotransferase eine weitere Annäherung der Expressionshöhe von GluR-C an die des Wildtyp-Alleles ermöglicht.

Durch Verpaarung der Mauslinie RC3 mit Mäusen, die Cre-Rekombinase transient im sehr frühen Embryonalstadium exprimieren, wurde die Mauslinie RC1 generiert. In dieser Mauslinie wurde das GluR-C Gen im Gesamtorganismus ausgeschaltet. Obwohl in RC1 Mäusen die RT-PCR Analyse Spleißprodukte von Exon 10 nach Exon 12 identifizierte, konnten im Western Blot mit einem N-terminalen GluR-C Antikörper keinerlei GluR-C Restprodukte detektiert werden. Offensichtlich war die Stabilität der trunkierten Spleißprodukte im RC1 Allel für eine Translation nicht gewährleistet. Es konnte hiermit gezeigt werden, daß auch im GluR-C Gen die Strategie, Exon 11 und flankierende Intronsequenzen zu deletieren, ähnlich wie für die Deletion von GluR-A (Zamanillo et al., 1999) und GluR-B (Jia et al., 1996), zu einer kompletten Unterdrückung der GluR-C Proteinexpression führt.

Von Charakterisierungsstudien der humanen GluR-C Expression (Gecz et al., 1999) ist bekannt, daß GluR-C, außer in der fötalen Lunge, exklusiv im Gehirn exprimiert wird. Dies wurde zum Anlaß genommen, die RC1 Mauslinie für die weitere in vivo Charakterisierung der GluR-C Proteinfunktion zu verwenden.

Bei den etablierten Mauslinien wurden in der Käfighaltung keine generellen Beeinträchtigungen von Zuchtverhalten und Lebensdauer gegenüber Wildtyp Geschwistern beobachtet. Wurfanzahl, Aufzucht und Fertilität waren zwischen Wildtyp und RC1 Genotyp vergleichbar. Obwohl GluR-C in Regionen des Hirnstammes, wie Medulla und Pons, die Blutdruck und Atemrhythmen regulieren, exprimiert wird, führte der Verlust der GluR-C Expression zu keinen Einschränkungen lebensnotwendiger Körperfunktionen.

### **3.2 GluR-C defiziente Mäuse sind in ihrer Motorkoordination beeinträchtigt und zeigen Auffälligkeiten angstbezogenen Verhaltens**

Die GluR-C Expression ist im Gehirn, mit Ausnahme subthalamischer und mammilärer Nuklei, nahezu ubiquitär (Sato et al., 1993). Eine starke Expression wird im limbischen System, welches essentiell für die Ausbildung und Verarbeitung von Gedächtnisinhalten ist, und im Kleinhirn, das für das Erlernen und die Feinabstimmung von motorischen Fähigkeiten benötigt wird, beobachtet. Zur Untersuchung von Verhaltensveränderungen, die durch eine veränderte Neurotransmission im limbischen System und im Kleinhirn verursacht werden können, wurden Verhaltensanalysen durchgeführt.

Ein akzeptierter, experimenteller Standard zur Erfassung genereller, lokomotorischer Aktivität ist der "open field" Test, mit dem exploratorische Aktivität, motorische Antwort und Neugierverhalten in einer neuen Umgebung untersucht werden können. Ein Vergleich von 10 Tieren der RC1 Mauslinie mit Wildtyp Geschwistern im "open field" ergab in mehreren Durchgängen eine generell geringere motorische Gesamtaktivität der GluR-C defizienten Mäuse. Durch Videoaufzeichnung konnten die exakten Bewegungsmuster der Tiere verglichen werden. Es wurden dabei keine präferentiellen Unterschiede in der Bewegungsstrategie zwischen Wildtyp und RC1 Mäusen beobachtet, die eventuell Aufschlüsse über die geringere Gesamtdistanz geben konnten. In beiden Genotypen wurden Strategien des Entlanggehens an den Rändern beobachtet, wie auch Aufenthalte in den mittleren Bereichen des "open field". In einer fünften Testreihe wurde das Neugierverhalten beider Genotypen durch Platzierung eines für die Mäuse unbekanntes Objektes in der Mitte des "open field" untersucht. Die zurückgelegte Gesamtdistanz war dabei in beiden Genotypen vergleichbar. Damit konnte die geringere lokomotorische Gesamtaktivität im RC1 Genotyp nicht auf ein verändertes Neugierverhalten zurückgeführt werden. GluR-C defiziente Mäuse unterscheiden sich somit von GluR-B und GluR-A defizienten Mäusen, die beide eine erhöhte exploratorische Aktivität besitzen (Gerlau et al., 1998; Vekovischewa et al., 2001). Die GluR-C Defizienz deutet eher auf eine generelle Beeinträchtigung des motorischen Koordinationszentrums im Kleinhirn und Hirnstamm hin, weshalb RC1 Mäuse in weiteren Versuchsreihen auf ihre Fähigkeit motorischer Feinkoordination und motorischen Lernens untersucht wurden. In einem Balance Test wurde eine signifikante Verschlechterung der Balancefähigkeiten GluR-C defizienter Mäuse gegenüber ihren Wildtyp Geschwistern festgestellt, die eine Beeinflussung motorischer Zentren in Kleinhirn und Hirnstamm wahrscheinlich macht. Zur weiteren Untersuchung motorischen Lernens wurden die Mäuse auf der beschleunigenden Laufrolle getestet, mit der Motorkoordination, Balance und die Verbesserung motorischer Bewegungsabläufe erfaßt werden, ohne daß dafür außergewöhnliche Muskelkraft oder Ausdauer benötigt würden. GluR-C defiziente Mäuse waren grundsätzlich in der Lage ihre motorischen Fähigkeiten zu verbessern, jedoch war ihre Geschicklichkeit in allen Testblöcken geringer als die der Wildtypen. Zudem war die Verbesserung motorischer Koordination in GluR-C defizienten Mäusen langsamer als bei ihren Geschwistern mit funktioneller GluR-C Untereinheit. Während Wildtypen bereits nach 6 Trainingsblöcken die maximale koordinatorische Leistung zeigten, wurden vom RC1 Genotyp die Maximalwerte auch nach 8 Trainingseinheiten nicht erreicht. Ähnliche



Motorkoordinationsprobleme wurden bereits bei GluR-B defizienten Mäusen beobachtet (Gerlai et al., 1998). Dies verdeutlicht die Beteiligung der AMPA-Rezeptoren in erworbener und erlernter Körperkoordination. Ein erneuter Test motorischer Fähigkeiten 12 Tage nach Beendigung des motorischen Lernversuches zeigte keine signifikante Verschlechterung der RC1 Mäuse auf der Laufrolle, was zeigte, daß zwar die Anpassung motorischen Verhaltens durch die GluR-C Defizienz beeinträchtigt wird, nicht jedoch eine langfristige Speicherung der erlernten Fähigkeiten.

Es wird weitgehend akzeptiert, daß der Hippokampus wesentlich für die Etablierung bestimmter Formen von Gedächtnisbildung ist. Deklaratives und räumliches Gedächtnis sind hippokampusabhängig. Prozedurale und implizite Lernformen, zu denen angstbezogene Verhaltensweisen gezählt werden, stehen nicht in direktem Zusammenhang mit der Hippokampusstruktur; sie werden eher mit der Amygdalaformation im limbischen System in Verbindung gebracht (Medina et al., 2002).

Eine experimentelle Erfassung angstbezogener Verhaltensveränderungen kann beispielsweise in einem Hell/Dunkel Test erfolgen, mit dem das Verhältnis von Neugier- und Angstverhalten erfaßt wird. Gemessen wird das Verhältnis der Aufenthaltsdauer in einem sicheren Dunkelkompartiment gegenüber einem aversiven, hell beleuchteten Kompartiment. GluR-C defiziente Mäuse halten sich nicht, wie ihre Wildtyp Geschwister, präferentiell im sicheren Dunkelkompartiment auf, sondern bevorzugen im Gegenteil das aversive hell beleuchtete Feld. Da für GluR-C defiziente Mäuse im "novel object recognition" Test keine Unterschiede im Neugierverhalten gegenüber dem Wildtyp festgestellt wurden, könnte dies für eine geringere Ängstlichkeit in RC1 Mäusen sprechen. Allerdings kann eine Beeinträchtigung des visuellen Systems in GluR-C defizienten Mäusen nicht ausgeschlossen werden. Hierzu sind jedoch weitere Analysen notwendig, wie z. B. Ängstlichkeitstests im "elevated T-maze".

Einer der klarsten Hinweise auf die Lokalisation von Gedächtnis in bestimmten Gehirnregionen wurde durch Untersuchungen assoziativer Lernformen, im Besonderen durch die Verwendung klassischer Konditionierung erhalten. Das klassische Konditionierungsmodell, auch als Pavlovsches Modell bekannt, wurde zum generell anwendbaren Beispiel für assoziative Lernformen. In einem typischen Konditionierungsexperiment lernen Tiere eine Antwort auf einen konditionierten Stimulus (Ton, Licht, Raum) zu geben, der mit einem unkonditionierten Stimulus (Fußelektroschock) gepaart ist. Die Fähigkeit, eine Verknüpfung der beiden Stimuli herzustellen und hierfür ein Gedächtnis auszubilden, stellt die klassische Form impliziten Lernens dar. Für die

Untersuchung angstbezogenen Lernens in GluR-C defizienten Mäusen wurde die kontextbezogene Angstkonditionierung gewählt. Als kontextbezogener Stimulus diente der Übergang von einem kleinen, hell beleuchteten Kompartiment in eine große, dunkle Kammer. Bei komplettem Eintritt der Tiere in das Dunkelkompartiment wurde als unconditionierter, gepaarter Stimulus ein milder Fußschock appliziert. Für die kontextbezogene Angstkonditionierung reicht im Wildtyp bereits eine negative Erfahrung aus, um ein Gedächtnis hierfür auszubilden. In GluR-C defizienten Mäusen jedoch, führt eine einmalige, negative Erfahrung nicht zu einer wesentlichen Verlängerung der Latenzzeit bis zum Eintritt in das Dunkelkompartiment, was eine signifikante Beeinträchtigung in der Verknüpfung beider Stimuli vermuten läßt. Wildtypen hatten auch noch nach 24 Stunden die Assoziation zwischen Dunkelkompartiment und unconditioniertem Stimulus behalten, wohingegen GluR-C defiziente Mäuse eine zweite negative Erfahrung für eine wesentliche Verbesserung benötigten. Nach weiteren 24 Stunden wurde zwar eine längere Latenzzeit vor dem Wechsel in das Dunkelkompartiment gemessen, jedoch konnte ein absolutes Vermeidungsverhalten des Dunkelkompartimentes immer noch nicht erreicht werden. Offensichtlich ist die Fähigkeit kontextbezogener Konditionierung nicht nur verlangsamt, sondern auch in ihrer Qualität gegenüber dem Wildtyp signifikant beeinträchtigt. Eine klare Zuordnung zu einer Gehirnregion kann aber mit der gewählten Form der Angstkonditionierung nicht erfolgen, da inzwischen mehrfach bestätigt wurde, daß bei kontextbezogener Angstkonditionierung implizite Lernvorgänge mit deklarativen Lernprozessen, an denen die Hippokampusformation beteiligt ist, verknüpft werden (Fanselow, 2000). Areale des ventralen Hippokampus projizieren in die basalen (B) und akzessorisch basalen (AB) Nuklei der Amygdala. Läsionen dieser Regionen interferieren mit Kontext bezogenem Lernen (LeDoux, 2000). Der Hippokampus ist notwendig um eine Repräsentation des Kontextes herzustellen, die dann in den akzessorisch basalen Nuklei der Amygdala modifiziert werden. Hinweise für eine Beteiligung des Hippokampus an Kontext bezogener Angstkonditionierung kamen von Mäusen mit einer CA1 spezifischen Deletion der NR1-Untereinheit im Hippokampus (Huerta et al., 2000). Sie zeigten, daß die hippokampale CA1-Region zwar für die Memorisierung der Konditionierung wichtig ist, wenn unconditionierte und konditionierte Stimuli mehr als 30 Sekunden zeitlich versetzt erfolgen, nicht aber wenn beide Stimuli zum gleichen Zeitpunkt enden. Es wird allgemein angenommen, daß die Amygdala der Ort von Plastizität während der Konditionierung ist, welcher konditionierte und unconditionierte Stimuli verknüpft. Es existieren ein Reihe von Untersuchungen zur Langzeitpotenzierung in der Amygdala.

Beispielsweise wurde gezeigt, daß eine vorherige Angstkonditionierung zu einer langanhaltenden Verstärkung der synaptischen Antwort in der Amygdala-Region führt (Stevens, 1998). Sie stellt damit eine weitere Korrelation zwischen synaptischer Langzeitpotenzierung und Lernen her. Um in GluR-C defizienten Mäusen eine Trennung zwischen der Beteiligung des Hippokampus und der Amygdala an kontextbezogener Angstkonditionierung untersuchen zu können, müssen andere Formen der Angstkonditionierung untersucht werden, wie beispielsweise konditionierte, auditorische oder visuelle Stimuli, bei denen eine Beteiligung deklarativer Lernprozesse ausgeschlossen wird. Es bleibt weiterhin zu klären, ob die GluR-C Defizienz zu Beeinträchtigungen hippokampusbezogenen räumlichen Lernens führt, die beispielsweise im “water maze” Test ermittelt werden können.

### **3.3 Der Verlust der AMPA-Rezeptor Untereinheiten GluR-A und GluR-C führt im Hippokampus zur Destabilisierung des Rezeptorpartners GluR-B**

Die Rolle des Hippokampus bei der Ausbildung des Kurzzeitgedächtnisses im Säugerhirn ist unbestritten. Der Großteil der erregenden Reizweiterleitung wird im Hippokampus durch Glutamat-Rezeptoren vermittelt. Die für die schnelle synaptische Übertragung verantwortlichen AMPA-Rezeptoren bestehen in Pyramidalneuronen aus heterooligomeren Komplexen von GluR-A/B und GluR-B/C Untereinheiten (Wenthold et al., 1996). Für die Deletion der GluR-A Untereinheit wurde bereits eine Reduktion von GluR-B und GluR-D Untereinheiten und eine perisomatische Akkumulation von GluR-B in CA1-Pyramidalneuronen beschrieben (Jensen et al., 2002). Es wäre daher nicht verwunderlich, wenn auch die Deletion von GluR-C, als Bestandteil heteromerer GluR-B/C Rezeptoren, die Stabilität von GluR-B im Hippokampus beeinflusst. Von frühen, postnatalen Stadien bis zur Pubertät im Alter von 4 Wochen wurde in GluR-C defizienten Mäusen eine starke Reduktion in der GluR-B Proteinmenge gegenüber gleichaltrigen Wildtyp Präparationen detektiert. Möglicherweise findet unter *in vivo* Bedingungen eine Assemblierung homooligomerer GluR-B Komplexe im Hippokampus gar nicht oder nur unvollständig statt, weshalb nicht korrekt assemblierte GluR-B Untereinheiten für degradative Prozesse markiert werden. Die Reduktion von GluR-B konnte in GluR-C defizienten Mäusen erst in erwachsenen Stadien teilweise kompensiert werden. Erklärt werden kann dies möglicherweise durch die im Alter zunehmende Expression von GluR-A, die dann mit dem Großteil der vorhandenen GluR-B

Untereinheiten assemblieren und damit GluR-B stabilisieren. Da im Wildtyp bis zu 10% der AMPA-Rezeptoren von GluR-A/C Heteromeren gebildet werden (Wenthold et al., 1996), könnte die Reduktion der GluR-A Proteinmenge in GluR-C defizienten Mäusen ebenfalls auf degradative Prozesse zurückzuführen sein. Eine Kompensation durch Aufregulation von GluR-D Untereinheiten wurde in GluR-C defizienten Mäusen nicht beobachtet, womöglich deshalb, weil GluR-D im Hippokampus lediglich in Interneuronenpopulationen prominent exprimiert wird, die keine oder nur sehr geringe Mengen der GluR-B und GluR-C Untereinheiten exprimieren. Der Destabilisierungseffekt konnte durch den Vergleich der GluR-B und GluR-D Mengen in jungen GluR-C, GluR-A und GluR-A/C defizienten Mäusen bestätigt werden. Die GluR-B Proteinmenge war in GluR-A und GluR-A/C defizienten Mäusen noch stärker als in GluR-C defizienten Mäusen verringert, während sich die GluR-D Expression nur unwesentlich änderte.

Der Reifungsprozeß von Transmembranproteinen und deren Assemblierung zu Oligomeren findet hauptsächlich im Endoplasmatischen Retikulum statt (Tsai et al., 2001). Falsch gefaltete Proteinkomplexe werden im ER durch Chaperone renaturiert. Jedoch können mißgefaltete Proteine nicht immer in ihren nativen Zustand rückgefaltet werden, weshalb sie für den kontrollierten Abbau markiert werden. Ursprünglich wurde angenommen, daß die Degradation von Proteinen innerhalb des ER-Lumens oder der ER-Membran stattfindet. Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch, daß deren Abbau im Zytosol bewerkstelligt wird (Kopito et al., 1997). Mißgefaltete Proteine werden durch sogenannte Retrotranslokation aus dem ER in das Zytosol transportiert, weshalb immer wahrscheinlicher wird, daß Transmembranproteine über den gleichen Ubiquitin-Proteasom Pfad abgebaut werden, dem auch zytosolische Proteine unterliegen. Zukünftige Versuche können eventuell die Reduktion von GluR-A und GluR-B Untereinheiten in GluR-C defizienten Mäusen über eine Ubiquitin vermittelte Degradation aufklären. Möglicherweise ist ein Großteil der GluR-B Untereinheiten in GluR-A und GluR-C defizienten Mäusen für den Abbau durch den Proteasom-Komplex mittels Ubiquitinierung markiert.

Ein erstes Indiz für den ER-Proteasom vermittelten Abbau von überschüssigen GluR-B Untereinheiten wurde in immunhistochemischen Hippokampusfärbungen GluR-C defizienter Mäuse erhalten. Während die subzelluläre Lokalisation von GluR-A Untereinheiten in Wildtyp und GluR-C defizienten Mäusen vergleichbar war, wurden für die GluR-B Lokalisation wesentliche Unterschiede beobachtet. So akkumulierte die GluR-B Untereinheit in GluR-C defizienten Mäusen in somatischen Kompartimenten und distalen Regionen des

Hauptdendritenbaumes. In jungen Wildtypen war GluR-B zwar in perisomatischen Kompartimenten zu finden, jedoch wurde in adulten Tieren eine Abnahme der Färbung in den Zellkörpern und eine verstärkte Färbung in den dendritischen Bereichen beobachtet. In adulten RC1 Mäusen fand zwar ebenfalls eine entwicklungsabhängige Umverteilung von GluR-B zu dendritischen Kompartimenten statt, aber es verblieb ein beträchtlicher Anteil in somatischen Kompartimenten. GluR-D scheint in GluR-C defizienten Mäusen an diesen Prozessen nicht beteiligt zu sein, da keine Unterschiede in der Immunfärbung beider Genotypen detektiert wurden. Die GluR-D Immunfärbung blieb auf Interneuronenpopulationen in Stratum oriens und Pyramidalzellschicht, sowie vereinzelte Neuronenpopulationen im Stratum radiatum beschränkt; eine Aufregulation der GluR-D Untereinheiten in Pyramidalneuronen konnte nicht detektiert werden. Die gefundenen Immunsignale in der Pyramidalzellschicht variierten von Färbung zu Färbung und waren möglicherweise auf unspezifische Kreuzreaktion der Antikörper zurückzuführen.

Hiermit konnten weitere Parallelen zu GluR-A defizienten Mäusen gezogen werden, die für die subzelluläre Lokalisation von GluR-B Untereinheiten im Hippokampus einen sehr ähnlichen Phänotyp aufweisen (Jensen et al., 2002).

Die gleichzeitige Deletion von GluR-A und GluR-C führt in jungen Tieren zu noch stärkerer Akkumulation von GluR-B in den Zellkörpern von CA1-Pyramidalzellen. Damit wird bestätigt, daß auch ein Überangebot von GluR-B Untereinheiten eine somatische Akkumulation homooligomerer GluR-B Rezeptoren nicht kompensieren kann.

Ein weiteres Kontrollmerkmal von Transmembranproteinen oder oligomeren Transmembranproteinkomplexen, die für den Export aus dem Endoplasmatischen Retikulum bestimmt sind, ist die korrekte Verknüpfung von Oligosaccharidketten an dafür vorgesehenen Erkennungssequenzen. Die Art der angehängten Oligosaccharidketten und weitere posttranslationale Modifikationen, wie beispielsweise Sulfatierung und Fettsäure-Acylierung, entscheiden über den spezifischen Transport in zelluläre Subkompartimente. Der posttranslationale Reifestatus von Proteinen kann deshalb anhand der bereits angefügten Polysaccharidketten identifiziert werden. Im Endoplasmatischen Retikulum und bis zu medialen Golgi Kompartimenten werden N-verknüpfte Oligosaccharid-Ketten des "high Mannose" Typs zu komplexen N-verknüpften Zuckerketten umgewandelt (Helenius und Aebi, 2001). Durch Behandlung von Proteinextrakten mit dem Enzym Endoglykosidase H, welches Zuckerketten entfernt, die sich im Umwandlungsprozeß von "high Mannose" zu komplexen Oligosacchariden befinden, konnten ER bis medial Golgi residente AMPA-

Rezeptor Untereinheiten von "reifen" AMPA-Rezeptoren unterschieden werden. Die Ko-Immunpräzipitationen von GluR-B und GluR-A Untereinheiten bestätigte die Annahme, daß GluR-B Untereinheiten im Hippokampus nur mit einem geeigneten Partner zu oligomeren Komplexen assembliert werden und erst dann das Endoplasmatische Retikulum verlassen können. Sowohl in Wildtyp, als auch in RC1 Mäusen ist nur ein geringer Teil der GluR-B Untereinheiten in GluR-A/B Rezeptoren sensitiv für EndoH. Höchstwahrscheinlich repräsentieren diese unreifen GluR-A/B Rezeptor Komplexe den Rezeptoranteil, der das Endoplasmatische Retikulum noch nicht verlassen hat und/oder nicht korrekt gefaltet ist. Ein identisches Resultat wurde im Wildtyp für GluR-B/C Rezeptoren beobachtet. Wenn GluR-B mit seinem heteromeren Partner GluR-C assoziiert ist, können beide Untereinheiten effektiv aus ER bis medialen Golgi Kompartimenten transportiert werden, was auch für heteromere GluR-A/C Rezeptoren im Wildtyp gilt. Im Unterschied hierzu waren in GluR-C defizienten Mäusen etwa 40% der GluR-B Untereinheiten EndoH sensitiv, die "unreifes" GluR-B repräsentieren, welches im Endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten wird.

Die Bestätigung, daß GluR-B Untereinheiten ohne heteromeren Partner nicht über das Endoplasmatische Retikulum hinaus transportiert werden, wurde mit dem Vergleich unreifer GluR-B Untereinheiten in jungen GluR-C, GluR-A und GluR-A/C defizienten Mäusen gezeigt. Während in GluR-C defizienten Mäusen der Anteil der EndoH sensitiven GluR-B Gesamtpopulation bei 30 - 40% lag, stieg er in GluR-A defizienten Mäusen auf etwa 50% und in doppelt defizienten Mäusen auf über 75% an. Die Tatsache, daß auch in doppelt defizienten Mäusen ein substantieller Anteil an reifen GluR-B Untereinheiten detektiert wurde, kann mehrere Ursachen haben. Es kann sich hierbei um Intermediate der posttranslationalen Prozessierung handeln, die zwar insensitiv für EndoH Behandlung sind, aber dennoch nicht der Qualitätskontrolle des Endoplasmatischen Retikulums entkommen (Ellgaard et al., 1999). Welcher Anteil der GluR-B Untereinheiten eventuell für die Ubiquitin-Proteasom Degradation bestimmt ist, kann erst durch zukünftige Studien erfolgen. Die Modifizierung von AMPA-Rezeptor Untereinheiten durch Ubiquitin Konjugation oder deren Assoziation mit den ER residenten Faltungschaperonen Calnexin und BiP, die falsch gefaltete Proteinkomplexe für die Retrotranslokation in das Zytosol vorbereiten (Tsai et al., 2002), wird eventuell weitere Erkenntnisse über die regulierte Assemblierung von AMPA-Rezeptoren im Hippokampus ergeben. Eine mögliche Erklärung hierfür kann aber auch sein, daß in doppelt defizienten Mäusen durch das Überangebot von GluR-B zwangsläufig ein geringer Anteil an homooligomeren GluR-B Rezeptoren der Qualitätskontrolle im ER

entkommt und weiter prozessiert wird. Ein Teil dieser GluR-B Rezeptoren wird eventuell über alternative Pfade, die sonst nicht für den AMPA-Rezeptor Transport verantwortlich sind, in Golgi-Kompartimente transportiert, in denen eine derartige Qualitätskontrolle nicht mehr existiert (Helenius und Aebi, 2001). Viele *in vitro* Studien untersuchten durch Überexpression in hippokampaler Zellkultur und Schnittkulturen den regulierten Transport von GluR-B Untereinheiten (Passafaro et al., 2001; Shi et al., 2001; Osten et al., 2000). Sie vernachlässigten jedoch die tatsächliche Zusammensetzung von AMPA-Rezeptoren und die intrazelluläre Akkumulation beim Ungleichgewicht der Untereinheiten. Lediglich eine dieser Studien (Shi et al., 1999) verweist darauf, daß die Überexpression von AMPA-Rezeptor Untereinheiten sich unterschiedlich in dissoziierten neuronalen Kulturen und in Schnittpräparaten verhält. Am Beispiel der GluR-A Untereinheit wurde beobachtet, daß diese in dissoziierten Kulturen in synaptische Strukturen transportiert werden, nicht jedoch in Schnittkulturen. Es ist hierbei weiterhin zu berücksichtigen, daß dissoziierte neuronale Kulturen aus embryonalen Entwicklungsstadien entnommen werden und Schnittkulturen zu perinatalen Entwicklungsstadien. Dies entspricht Zeitpunkten, zu denen *in vivo* die koordinierten, synaptischen Verschaltungen im Hippokampus noch nicht etabliert sind. Es ist davon auszugehen, daß sich auch der regulierte Transport von AMPA-Rezeptor Untereinheiten mit der Entwicklung synaptischer Verschaltungen im Hippokampus verändert.

### **3.4 Die AMPA-Rezeptor vermittelte Transmission findet im Hippokampus auch ohne GluR-C haltige Rezeptoren uneingeschränkt statt**

Aktivitätsabhängige Veränderungen in der Stärke synaptischer Kommunikation, werden als grundlegende Voraussetzung für die erfahrungsabhängige Modifikation neuronaler Verschaltungen betrachtet, von denen angenommen wird, daß sie vielen Formen von Lernen und Gedächtnis zugrunde liegen. Untersuchungen an SC/CA1 Synapsen mehrten die Hinweise, daß eine aktivitätsabhängige Modulation erregender, synaptischer Reizweiterleitung durch Veränderung von Anzahl und Modifikation postsynaptischer AMPA-Rezeptoren vermittelt wird. Ein wichtiger Hinweis auf solche Mechanismen war die Entdeckung stiller SC/CA1 Synapsen in jungen Tieren. Während in den meisten Synapsen AMPA- und NMDA-Rezeptoren kolokalisieren, sind in stillen Synapsen ausschließlich NMDA-Rezeptoren vorhanden. Nach experimenteller Induktion von Langzeitpotenzierung konnten an diesen zuvor stillen Synapsen AMPA-Rezeptor Ströme gemessen werden (Isaac et

al., 1995; Montgomery et al., 2001). Für den Einbau von AMPA-Rezeptoren in hippocampale Synapsen werden zwei unabhängige Mechanismen diskutiert. Der erste Mechanismus benötigt synaptische Aktivität oder NMDA-Rezeptor Aktivierung und wird durch GluR-A/B Rezeptor Komplexe vermittelt. Der zweite Mechanismus nutzt GluR-B enthaltende AMPA-Rezeptoren, die konstitutiv in und aus der Synapse wandern. Die Autoren verweisen darauf, daß im Hippokampus hauptsächlich GluR-A/B und GluR-B/C Rezeptor Komplexe existieren, und der konstitutive Pfad über hochmobile GluR-B/C Rezeptoren vermittelt wird. Warum GluR-A/B Rezeptor Komplexe nicht konstitutiv in- und aus der Synapse wandern, wird mit der dominanten Rolle von GluR-A in solchen Rezeptor Komplexen erklärt (Passafaro et al., 2001; Shi et al., 1999; Shi et al., 2001). Gleich zwei Mausmodelle bestätigen die dominante Rolle von GluR-A für die aktivitätsabhängige Verstärkung AMPA-Rezeptor vermittelter Transmission und unterstreichen die Beteiligung eines extrasynaptischen GluR-A/B Rezeptor pools für die aktivitätsabhängige Plastizität der Synapsen. In GluR-A defizienten Mäusen sind AMPA-Rezeptor Ströme in extrasynaptischen Kompartimenten stark reduziert, was in adulten GluR-A defizienten Mäusen zum Ausbleiben der LTP-Expression führt (Jensen et al., 2002). In GluR-B defizienten Mäusen wird im Gegensatz hierzu eine Abnahme synaptischer AMPA-Rezeptor Ströme, bei gleichzeitig stark erhöhtem  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch homomere GluR-A und/oder heteromere GluR-A/C Rezeptoren (Jia et al., 1996) beschrieben. Trotz der synaptisch reduzierten AMPA-Rezeptor Ströme reichte die Menge vorhandener GluR-A enthaltender Rezeptoren für die LTP-Expression im Hippokampus aus.

Um die Beteiligung von GluR-B/C Rezeptoren an der regulären AMPA-Rezeptor vermittelten Transmission in CA1-Pyramidalzellen des Hippokampus zu ermitteln, wurden synaptische und extrasynaptische AMPA-Rezeptor Ströme in jungen GluR-C defizienten Mäusen gemessen. Erstaunlicherweise waren die synaptischen AMPA-Rezeptor Ströme gegenüber dem Wildtyp unverändert. Dies deutet auf eine dominante Beteiligung von GluR-A/B Rezeptoren bei normaler synaptischer Transmission hin und wirft die Frage auf, wofür die konstitutiv in und aus der Synapse zirkulierenden GluR-B/C Rezeptor Komplexe benötigt werden, wenn GluR-A/B Rezeptor Komplexe stabil in Synapsen verbleiben können. Eine Analyse der extrasynaptischen AMPA-Rezeptor Ströme in jungen GluR-C defizienten Mäusen ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede gegenüber gleichaltrigen Wildtypen. Es konnte allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß die starke Variabilität extrasynaptisch gemessener AMPA/NMDA-Rezeptor Ströme in GluR-C defizienten Mäusen durch Messung unterschiedlicher Zellpopulationen verursacht wurde. Der Großteil gemessener Zellen des



RC1 Genotyp zeigte niedrigere AMPA/NMDA-Rezeptor Ströme als der Wildtyp. Eine geringe Anzahl von Zellen wiederum zeigte ein deutlich höheres AMPA/NMDA Stromverhältnis als der Wildtyp. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß neben Pyramidalneuronen auch Interneurone mit einer höheren extrasynaptischen AMPA-Rezeptor Dichte, wie z.B. GluR-A und GluR-D exprimierende Interneurone in der Pyramidalzellschicht, gemessen wurden. Eine Unterscheidung der sogenannten "spiking patterns" von Pyramidalneuronen und eventuell gemessenen Interneuronen, konnte mit der gewählten Messanordnung nicht erfolgen, da die verwendeten Lösungen auf Cäsium haltigen Lösungen basierten, die das nicht erlauben. Diese Messungen müssen mit einer größeren Anzahl von Zellen mit Meßlösungen auf Kaliumbasis wiederholt werden. Dennoch muß abschließend hinzugefügt werden, daß der Verlust von GluR-B/C Rezeptoren zu keiner signifikanten Beeinträchtigung der synaptischen und extrasynaptischen AMPA-Rezeptor vermittelten Transmission führte. Der Verlust wurde offensichtlich komplett durch die vorhandenen GluR-A/B Rezeptoren kompensiert.

In GluR-A/C defizienten Jungtieren waren die synaptischen Ströme in SC/CA1 Synapsen auf ein kaum messbares Signal reduziert, wohingegen die NMDA-Rezeptor Ströme gegenüber dem Wildtyp weitgehend unverändert blieben. Eventuell vorhandene homooligomere GluR-B Rezeptoren können aufgrund ihrer geringen Leitfähigkeit nicht zu synaptischen AMPA-Strömen beitragen, jedoch könnte die Analyse der subzellulären Lokalisation weitere Aufschlüsse über ihr Transportverhalten liefern.

### **3.5 Eine AMPA-Rezeptor vermittelte Transmission an hippocampalen SC/CA1 Synapsen ist für die Induktion, nicht aber für die Expression juveniler Langzeitpotenzierung essentiell**

LTP stellt eine attraktive Hypothese dar, um zelluläre Mechanismen zu erklären, die bestimmten Formen des Lernens und der Gedächtnisbildung zugrunde liegen. Sowohl pharmakologische als auch genetische Manipulation von LTP scheinen im Hippokampus mit Verhaltensveränderungen zu korrelieren, die sich in einer Beeinträchtigung von räumlich bezogenem Lernen manifestieren. Die Diskussion, ob ein direkter Zusammenhang zwischen räumlichem Lernvermögen und Langzeitpotenzierung im Hippokampus besteht, bleibt aber kontrovers. So zeigen beispielsweise GluR-B defiziente Mäuse (Jia et al., 1996) und PSD 95 defiziente Mäuse (Migaud et al., 1998) eine verstärkte Langzeitpotenzierung an CA1

Synapsen bei gleichzeitiger Beeinträchtigung des räumlichen Lernvermögens. In einem weiteren Mausmodell, bei dem die GluR-A Untereinheit deletiert wurde (Zamanillo et al., 1999), wurde eine Abwesenheit von Langzeitpotenzierung an CA1 Synapsen adulter Mäuse beobachtet, die jedoch das räumliche Lernvermögen in diesen Mäusen nicht beeinflusste. Zumindest zwei andere genetische Mausmodelle weisen eindeutig auf einen direkten Zusammenhang von räumlichem Lernvermögen und Langzeitpotenzierung im Hippokampus hin. Die CA1 spezifische Deletion der NMDA-Rezeptor Untereinheit NR1 (Tsien et al., 1996) und die Deletion der Calcium/Calmodulin Kinase II (Bach et al., 1995) zeigen bei Abwesenheit von Langzeitpotenzierung an SC/CA1 Synapsen eine signifikante Beeinträchtigung im “hidden platform water maze” Test. Es bleibt zu klären, ob das räumliche Lernvermögen in GluR-C defizienten Mäusen beeinträchtigt ist.

In Feld-LTP Messungen wurden unabhängig vom untersuchten Alter GluR-C defizienter Mäuse keinerlei Veränderungen in Kinetik und Höhe der relativen LTP-Expression beobachtet. Es konnte damit ausgeschlossen werden, daß GluR-C enthaltende AMPA-Rezeptoren für eine normale LTP-Expression benötigt werden. Allerdings sollten zur Vervollständigung der LTP-Analysen Messungen über einen längeren Zeitraum als 60 Minuten erfolgen. Möglicherweise ist die Aufrechterhaltung von LTP über längere Zeiträume in GluR-C defizienten Mäusen beeinträchtigt. In jüngster Zeit wird für die Veränderung AMPA-Rezeptor vermittelter Plastizität im Hippokampus ein sogenannter Platzhaltermechanismus diskutiert. GluR-A/-B Rezeptoren, die nach NMDA-Rezeptor Aktivierung oder LTP-Induktion sich in Synapsen befinden, werden nach diesem Modell durch konstitutiv in und aus der Synapse wandernde GluR-B/C Rezeptoren ersetzt. Wenn für die Aufrechterhaltung und Veränderbarkeit von synaptischer Stärke durch AMPA-Rezeptoren ein solcher Mechanismus existiert, dann sollten in GluR-C defizienten Mäusen Veränderungen in der Langzeitexpression von LTP oder in erneuter Aktivierbarkeit dieser Synapsen bestehen.

Die Beteiligung von AMPA-Rezeptoren bei der Induktion von LTP konnte erst in jungen Tieren GluR-A/C defizienter Mäuse gezeigt werden. Nach tetanischer Stimulation kann in diesen Mäusen in den CA1-Pyramidalneuronen mangels Membrandepolarisation kein LTP induziert werden. Im “Pairing” Protokoll, bei dem die postsynaptische Membran bei gleichzeitiger Niedrigfrequenzstimulation für 3 Minuten depolarisiert wird, kann die LTP Expression jedoch sehr wohl erfolgen. Damit wurde belegt, daß die initiale Membrandepolarisation, die eine Aktivierung von NMDA-Rezeptoren erlaubt, nahezu

ausschließlich durch AMPA-Rezeptoren vermittelt wird. Die Tatsache, daß die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren in jungen Tieren immer noch zur Expression von LTP führt, macht einen zweiten LTP-Mechanismus in jungen Tieren wahrscheinlich. Dieser unterscheidet sich von LTP-Mechanismen in erwachsenen Tieren darin, daß er ohne AMPA-Rezeptoren ausgeprägt werden kann. Es kann bisher nicht ausgeschlossen werden, daß juvenile LTP-Formen von NMDA-Rezeptoren getragen werden; entsprechende Analysen zur pharmakologischen Blockierung von NMDA-Rezeptoren nach LTP-Induktion stehen deshalb noch aus. Auch eine präsynaptische Beteiligung an der Ausprägung synaptischer Langzeitpotenzierung kann in jungen Tieren nicht ausgeschlossen werden.

### **3.6 Die zellulären Strukturen des Hippokampus bilden sich auch ohne AMPA-Rezeptor vermittelte Transmission aus**

Erstaunlicherweise waren GluR-A/C defiziente Mäuse bis zur Pubertät lebensfähig. Es wurden schwere Beeinträchtigungen motorischer Fähigkeiten beobachtet, die eine Beteiligung der AMPA-Rezeptor Untereinheiten GluR-A und GluR-C an motorischer Regulation im Hirnstamm belegt. Es wurde dabei aber offensichtlich, daß die Etablierung hippokampaler Strukturen weder in ihrem schichtweisen Aufbau, noch in der Differenzierung neuronaler Verbindungen gestört waren. Die Anzahl der Pyramidalneurone und inhibitorischer Interneurone war zwischen GluR-A/C defizienten Mäusen und Wildtypen vergleichbar. Die Organisation dendritischer und axonaler Fortsätze von Nervenzellen war vom Wildtyp morphologisch nicht zu unterscheiden. Proteine präsynaptischer Endigungen konnten auch in GluR-A/C defizienten Mäusen nachgewiesen werden. Eine veränderte Anzahl an Astrogliazellen wurde ebenfalls nicht festgestellt. Morphologische Unterschiede wurden nur in der subgranulären Schicht des Gyrus dentatus beobachtet, von der aus normalerweise neuronale Stammzellen in die Pyramidalschicht des Hippokampus einwandern (Van Praag et al., 2002). Die Immunfärbung gegen betaIII-Tubulin, ein Markerprotein undifferenzierter neuronaler Stammzellen, war in der subgranulären Schicht GluR-A/C defizienter Mäuse nicht vorhanden. Über die Ursachen der fehlenden Färbung kann nur spekuliert werden, bisher ist noch zu wenig darüber bekannt, welche Faktoren neuronale Stammzellen in welchem Differenzierungsstadium zurückhalten. Es bleibt zu klären, ob die präsynaptische Transmitterfreisetzung in diesen Tieren dem Wildtyp entspricht. Es könnte damit bewiesen werden, ob für die Ausbildung präsynaptischer Strukturen spontane postsynaptische Aktivität

benötigt wird. Dies würde neuere Beobachtungen bestätigen, die zeigen, daß für die Ausbildung regulärer postsynaptischer Strukturen keinerlei präsynaptische Transmitterfreisetzung benötigt wird (Verhage et al., 2000). Prä- und postsynaptische Strukturen werden damit möglicherweise unabhängig voneinander ausgebildet.

### **3.7 Die GluR-C Defizienz verändert die Expression von AMPA-Rezeptor Untereinheiten im Kleinhirn, beeinflusst aber nicht die subzelluläre Lokalisation verbleibender Rezeptoren z.B in Purkinjellen**

Das Kleinhirn ist die zentrale Gehirnregion für die Steuerung feinmotorischer Koordination und motorischen Lernens. Auch im Kleinhirn ist der Hauptneurotransmitter L-Glutamat (Voogd et al, 1996) und AMPA-Rezeptoren sind in allen Neuronentypen des Kleinhirnes vorhanden (Bahn und Wisden, 1997). Aufgrund der Beeinträchtigung motorischer Fähigkeiten in GluR-C defizienten Mäusen konnten auch im Kleinhirn Auswirkungen auf Expression und subzelluläre Verteilung verbleibender AMPA-Rezeptor Untereinheiten erwartet werden. Tatsächlich waren die Proteinmengen aller verbleibender AMPA-Rezeptor Untereinheiten reduziert. Die Reduktion von GluR-A und GluR-D im Kleinhirn GluR-C defizienter Mäuse deutet anders als im Hippokampus auf eine Assemblierung beider Untereinheiten mit GluR-C hin. Der drastischste Effekt wurde allerdings für die Expression der GluR-B Untereinheit beobachtet. Während im Wildtyp die Expression von GluR-B analog zu den anderen Untereinheiten entwicklungsbedingt anstieg, wurde in GluR-C defizienten Mäusen in jungen Entwicklungsstadien mehr GluR-B detektiert, wohingegen in adulten Entwicklungsstadien die GluR-B Menge stark reduziert war. Entweder ist GluR-B in jungen Tieren nicht von einer Koexpression der GluR-C Untereinheit abhängig oder fehlende GluR-C Untereinheiten können durch GluR-A und GluR-D im Kleinhirn kompensiert werden. Die immunhistochemischen Färbungen deuteten jedoch auf unterschiedliche AMPA-Rezeptor Transportmechanismen in Kleinhirn und Hippokampus hin. Für GluR-A und GluR-D wurden keine Veränderungen in der zellspezifischen Expression beobachtet. Beide Untereinheiten lokalisieren vornehmlich in Bergmann-Gliazellen. Aufgrund der starken Färbung in Bergmann-Gliazellen kann eine Lokalisation von GluR-A und -D in den Dendritenbäumen von Purkinjoneuronen nicht ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zu hippokampalen Pyramidalneuronen wird GluR-B in Purkinjellen GluR-C defizienter Mäuse nach wie vor prominent im Dendritenbaum detektiert, was für unterschiedliche AMPA-Rezeptor

Transportmechanismen in Pyramidalneuronen des Hippokampus und Purkinjezellen des Kleinhirnes spricht. Entweder existieren in Purkinjoneuronen nicht die gleichen stringenten Rückhalte-mechanismen wie in Pyramidalzellen oder im Kleinhirn wird der Transport von GluR-B durch andere Interaktionspartner vermittelt. Die GluR-B Immunfärbungen in GluR-A/C defizienten Mäusen bestätigten die Vermutung, daß GluR-B in Purkinjoneuronen, im Gegensatz zu Pyramidalzellen des Hippokampus, weder GluR-A noch GluR-C als Partner für den Transport in die Dendritenbäume benötigt. Die Analyse posttranslationaler Reifestadien und der subzellulären Lokalisation von AMPA-Rezeptor Untereinheiten in Purkinjoneuronen werden möglicherweise weitere Erkenntnisse über Unterschiede und Gemeinsamkeiten des regulierten Transportes von AMPA-Rezeptoren in Zellpopulationen des Kleinhirnes und des Hippokampus erbringen.

### **3.8 GluR-C ist für die AMPA-Rezeptor vermittelte Transmission in Sternzellen des Kleinhirnes essentiell**

Im Gegensatz zu Pyramidalneuronen des Hippokampus existieren in inhibitorischen Interneuronen des Kleinhirnes AMPA-Rezeptor vermittelte Plastizitätsmechanismen, die unabhängig von NMDA-Rezeptoren operieren. Die synaptische Aktivierung weniger Parallelfasern führt in Sternzellen des Kleinhirnes zu einer schnellen und langanhaltenden Änderung in der  $Ca^{2+}$ -Permeabilität synaptischer AMPA-Rezeptoren ohne die extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren zu aktivieren (Liu und Cull-Candy, 2000). Da eine starke Expression von GluR-C in diesen Zellpopulationen beobachtet wurde, konnte davon ausgegangen werden, daß die GluR-C Defizienz die AMPA-Rezeptor vermittelte Übertragung in Sternzellen beeinträchtigt. Tatsächlich wurde in "soma patches" von Sternzellen GluR-C defizienter Tiere eine fast vollständige Reduktion der AMPA-Rezeptor Ströme gemessen. Hiermit konnte gezeigt werden, daß die GluR-C Untereinheit in Sternzellen nicht nur als Partner in heterooligomeren GluR-B/C Kanälen fungiert, sondern vielmehr homooligomere GluR-C Kanäle den Großteil der  $Ca^{2+}$  durchlässigen AMPA-Rezeptoren in Sternzellen repräsentieren. Ob diese starke Reduktion auch für synaptische AMPA-Rezeptor Ströme gilt, wurde bisher nicht untersucht. Es bleibt deshalb abzuwarten, ob für die synaptische Transmission ein ähnlicher Effekt in GluR-C defizienten Mäusen beobachtet wird. Es wird damit deutlich, daß in unterschiedlichen Subregionen des Gehirns verschiedene AMPA-Rezeptor vermittelte Plastizitätsmechanismen existieren.

## 4. Material und Methoden

Zell- und molekularbiologische Standardverfahren wurden, soweit nicht explizit erwähnt, folgenden Standardwerken entnommen.

Current Protocols in Molecular Biology

F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl

Wiley Interscience, 1989

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition

J. Sambrook, E.F. Fritschy, T. Maniatis

Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

Gene Targeting: A Practical Approach

A.L. Joyner

Oxford University Press, 1993

Manipulating the Mouse Embryo

B. Hogan, R. Beddington, F. Costantini, E. Lacy

Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994

The Atlas of Mouse Development

M. H. Kaufman

Academic Press, 1999

## 4.1 Methoden

### 4.1.1 Isolierung subgenomischer Maus-DNA aus einer genomischen $\lambda$ -Phagen Bibliothek

Eine Genom-Bibliothek der Mauslinie 129SV ( $\lambda$ -FixII, Stratagene), die in Form von  $1 \times 10^6$  unabhängigen Einzelphagen mit einem durchschnittlich 20kb großen Mausgenomfragment vorlag, wurde ausplattiert. Nach Bildung lytischer Plaques wurden die Phagen in doppelter Ausführung auf Nitrocellulosefilter transferiert. Die DNA-Isolation auf den Nitrocellulosefiltern erfolgte durch alkalische Lyse (200mM NaOH; 1500mM NaCl) und anschließende Reneutralisierung (400mM Tris·HCl pH 7.6; 300mM NaCl; 30mM Na-Citrat). Die Prähybridisierung der Filter erfolgte für 12-18h bei 42°C. Für die Identifizierung von GluR-C Gen enthaltenden genomischen Klonen, wurde ein BamHI-SalI cDNA-Fragment des Ratten Transkriptes von GluR-C flip (Sonde 1) und ein SalI-BglII cDNA-Fragment des Ratten-Transkriptes von GluR-C flip und flop (Sonde 2) verwendet. Nach Hybridisierung mit den radioaktiv markierten cDNA-Sonden (Random Prime DNA Labelling Kit, Boehringer Mannheim) wurden die Nitrocellulosefilter 2 mal mit 2x SSC (300mM NaCl; 30mM Na-Citrat) und 1 mal mit 0,1x SSC bei 50°C gewaschen und für 3-7 Tage autoradiographiert. Positionen doppelt positiver Signale wurden aus den Agarplatten gestochen und nach Bakterientransfektion in einer weiteren Runde ausplattiert. Nach Erhalt von Einzelklonen wurden die  $\lambda$ -Plaques für 1h bei 37°C in Phagenpuffer (100mM NaCl; 10mM Tris·HCl pH 7.6; 10mM MgSO<sub>4</sub>) inkubiert und in unterschiedlichen Verdünnungen mit 250 $\mu$ l einer frischen Bakterienkultur (C600) in NZYDT-Medium für 8-11 h kultiviert. Nach Erreichen des lytischen Stadiums wurde die Phagen-DNA durch Phenol/Chloroform Extraktion isoliert. Nach Verdau mit NotI wurden die subgenomischen DNA-Fragmente in den bakteriellen Klonierungsvektor pBluescript kloniert und durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Southern Blot Analyse verifiziert.

### 4.1.2 Restriktionskartierung der genomischen Klone

Die positionelle Kartierung von Restriktionsschnittstellen erfolgte durch Doppelrestriktionsverdau mit NotI und variablen Restriktionsenzymen und anschließender Southern Blot Analyse. Restriktionsverdauete Teilfragmente wurden subkloniert und durch 5' und 3' Endsequenzierung näher charakterisiert. Datenbankabgleiche mit bekannten genomischen Sequenzen dienten zur Verifizierung der isolierten genomischen DNA Klone.

#### 4.1.3 Konstruktion eines konditionalen “Targeting”-Vektors

Für die konditionale Genausschaltung wurde das Cre-loxP System verwendet. (Sternberg et al., 1986; Sauer, 1992). Ausgangspunkt für die Herstellung des “Targeting”-Vektors war der genomische  $\lambda$ -Klon 27, der 7.5kb genomischer DNA-Sequenz von Intron 10, das kodierende Exon 11, sowie 3.7kb von Intron 11 enthielt. Nach NotI-Restriktionsverdau von  $\lambda$ -Klon 27 wurde das subgenomische DNA-Fragment in den Vektor pBluescript (pBS) ligiert. Im resultierenden pBS-Klon 27 wurden durch *Pfu*-PCR in Exon 11 vier stille Mutationen und eine XmaI-Restriktionsschnittstelle eingefügt, um die Expression des konditionalen Allels von der des WT-Allels auf RNA-Ebene unterscheiden zu können. Für die 5'PCR wurde ein 2.5kb Fragment, beginnend mit einer 5'-XbaI-Schnittstelle und endend mit einem 3'Oligonukleotid, welches drei stille Punktmutationen in Exon 11 einführt und somit eine XmaI-Restriktionsschnittstelle generiert, amplifiziert (*Pfu*-Xba-Xma). Das PCR-Fragment wurde nach XbaI-XmaI Restriktionsverdau in pBS subkloniert. Zur Insertion der loxP-Elemente wurde eine mutierte Form dieser Erkennungssequenz verwendet (Lee und Saito, 1998), welche *in vitro* keine Kreuzrekombination mit nicht mutierten loxP-Elementen aufzeigt. Im subklonierten XbaI-XmaI Fragment wurde hierzu an einer 900bp aufwärts von Exon 11 gelegenen AvrII-Schnittstelle ein 34bp langes loxP-Element mit einer 5'angehängten, analytischen NcoI- und einer 3'angehängten AvrII-Schnittstelle in Sinn-Orientierung eingefügt (*Pfu*-Lox-Xba-Xma). Das 2.5kb-*Pfu*-PCR Fragment mit insertiertem loxP 5171 Element wurde nach XbaI- und XmaI-Verdau in den XbaI-XmaI verdauten pBS-Klon 27 ligiert (New short arm). Für die 3'PCR wurde aus Klon 27 ein 2.3kb Fragment, dessen 5'Ende komplementär zum 3'Ende der ersten PCR war, amplifiziert und eine weitere stille Punktmutation eingeführt. Das PCR-Produkt wurde durch XmaI-EcoRV Verdau in pBS subkloniert (Sma-RV). In diesen Subklon wurde durch Verdau mit BsrGI und PshAI ein Linker mit 5'-AatII und 3'-MluI Schnittstelle insertiert (Sma-RV-Adap). Der Subklon mit Linker wurde mit EcoRV und KpnI verdaut und ein 5.4kb EcoRV-KpnI Fragment aus Klon 27 am 3'Ende angehängt (Sma-RV-Adap + long arm). Dieses Fragment wurde über XmaI-KpnI Verdau in den Subklon mit einzeltem loxP-Element und mutiertem 5'Teil der eingeführten stillen Mutationen in Exon 11 kloniert (New short arm + Sma-RV-Adap + long arm). Nach Verdau mit PacI und KpnI wurde ein PacI-KpnI Linker für das 3'Ende insertiert (New short + long arm-Adap-Pac-Kpn). Als Selektionsmarker für genomische Rekombinationsereignisse wurde nach Verdau des Subklons mit AatII und MluI eine Neomycinphosphotransferase (PGK-NEO) eingefügt (New Targeting Construct). Sie verleiht



Resistenz gegenüber dem Antibiotikum G418. Die PGK-NEO Kasette enthielt regulatorische Elemente der Phosphoglyzerat-Kinase 2 und zwei links und rechts der NEO-Kasette eingefügte loxP 5171 Sequenzen, welche eine spätere Entfernung des Resistenzgenes durch Cre-Rekombinase ermöglichten. Der asymmetrische "Targeting"-Vektor bestand relativ zum PGK-NEO Gen aus einem 11.8kb langen 5'- und einem 1.1kb kurzen 3'rekombinogenen Arm, der die PCR-Analyse homologer Rekombinationsereignisse erlaubte. Nach Sequenzanalyse des fertiggestellten "Targeting-Vektors" wurde das Konstrukt an der 3' gelegenen PacI-Schnittstelle linearisiert und für die Elektroporation aufgereinigt.

#### **4.1.4 Kultur, Transformation und Selektion von ES-Zellen der Maus**

Pluripotente, embryonale Stammzellen der männlichen Linie R1 (Nagy et al., 1993) wurden in ES-Zellmedium ("Dulbecco's Modified Eagle Medium" mit hohem Glukoseanteil; 2 mM Glutamin; 0.1mM nicht essentiellen Aminosäuren; 1mM Natriumpyruvat; 0.1mM  $\beta$ -Mercaptoethanol; 20% fötalem Kälberserum; 50  $\mu$ g/ml Penicillin/Streptomycin; 1000U/ml Leukämie-Inhibitionsfaktor) kultiviert. Für die Transfektion wurden die aufgereinigten "Gene Targeting"-Vektoren durch PacI-Restriktionsverdau linearisiert und nach Ethanolpräzipitation in PBS gelöst. Um eine Phenolisierung zu vermeiden wurde die DNA über eine mit PBS umgepufferte Gelfiltrationssäule (Chroma Spin TE-1000, Clontech) aufgereinigt. Für die Elektroporation (BioRad Genepulser mit 500 $\mu$ F und 240V) der vereinzelt ES-Zellen in einer PBS-Suspension wurden 30 $\mu$ g des linearisierten "Gene Targeting"-Vektors eingesetzt. Die transformierten Zellen wurden auf mit Gelatine (0.1%) überzogenen Kulturplatten für 8-10 Tage mit G418 (250 $\mu$ g/ml) selektioniert. G418 resistente ES-Klone wurden isoliert und zur Expansion auf Muldenplatten überführt, die entweder für die spätere DNA-Isolierung mit Gelatine (0.1%) oder zur Expansion der ES-Zellen mit mitotisch inaktivierten (Mitomycin C) primären Maus Fibroblasten beschichtet waren. Ein Teil der Zellen wurde für die DNA-Analyse durch PCR verwendet, wobei in der Regel sechs Einzelklone zur Analyse vereinigt und positive Pools anschließend auf Einzelklonebene getestet wurden. PCR-positive Klone wurden im Southern Blot überprüft. ES-Klone mit homologem Rekombinationsereignis wurden expandiert, tiefgefroren (5 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml) und bis zur Injektion in C57BL/6-Mausblastozysten in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### 4.1.5 Cre-loxP vermittelte DNA-Rekombination und Negativ-Selektion in ES-Zellen

Für die *in vitro* Cre-Rekombination wurden je  $1 \times 10^7$  ES-Zellen transient mit 10 µg zirkulärem PMC-Cre Plasmid (Gu et al., 1993) transfiziert. Die elektroporierten ES-Zellen wurden zu je fünf Platten von  $10^5$ ,  $10^3$  und  $10^2$  Zellen ausplattiert. Von zwei aufeinanderfolgenden Elektroporationen wurden je 288 ES-Klone isoliert und auf drei unterschiedlichen 96-Muldenplatten kultiviert. Die Platten 1 und 2 waren mit Gelatine beschichtet. In Platte 1 wurden die ES-Kulturen in ES-Medium kultiviert für die spätere fibroblastenfreie Isolation von ES-DNA. In Platte 2 wurden Cre-rekombinierte ES-Klone in G418 haltigem ES-Medium negativ selektioniert. In Platte 3 wurden die ES-Klone auf Mitomycin behandelten primären Fibroblasten für die Expansion von Klonen mit korrektem Cre-Rekombinationsereignis kultiviert. Die Analyse der Rekombinationsereignisse in Replikaklonen negativ selektionierter ES-Zellen erfolgte durch PCR-Analyse und Verifizierung mittels Southern Blot.

#### 4.1.6 Herstellung und Haltung transgener Mäuse

Mausblastozysten-Injektionen und Embryo-Transfers wurden in der transgenen Einheit des ZMBH von Frank Zimmermann durchgeführt. Es wurden hierbei je 15-20 ES-Zellen in Mausblastozysten des Inzuchtstammes C57Bl/6 injiziert und je 8-10 Blastozysten in scheinchwangere C57Bl/6 Mäuse transplantiert. Die chimären Nachkommen und in C57Bl/6 rückgekreuzte Folgegenerationen wurden entsprechend dem Tierschutzgesetz in dafür vorgesehenen Räumen in der Versuchstierhaltung des ZMBH und im zentralen Tierlabor des MPI gehalten. Die behördliche Zulassung der transgenen Manipulationen erfolgte durch das Regierungspräsidium Karlsruhe.

#### 4.1.7 Genotypisierung der mutanten Mauslinien

Mausschwanzbiopsien wurden mit Proteinase K (1 mg/ml) in TENS-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0; 100 mM EDTA; 100 mM NaCl; 1% SDS) bei 55 °C verdaut. Nach Präzipitation in 0.8 Volumina Isopropanol und Waschen in 70% Ethanol wurde die genomische DNA in 300-600 µl sterilem H<sub>2</sub>O-Millipore gelöst und für die Genotypisierung durch PCR-Analyse eingesetzt. Ein 10 µl PCR-Ansatz enthielt PCR-Puffer (GibcoBRL), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTP-Mix (0.2 mM pro Nukleotid), spezifische Sinn- und Gegensinn-Oligonukleotide (jeweils 0.4 µM), 0.2 U Taq-Polymerase, ddH<sub>2</sub>O und 1 µl Matrizen-DNA-Lösung (10-100 ng/µl). Einer initialen Denaturierung (10 min, 94 °C) folgten 20-35 Zyklen mit je 20 s, 94 °C (Denaturierung), 30 s,

55°C (Oligonukleotid-Anlagerung), 1min/Kb, 72°C (Extension). Nach dem letzten Zyklus wurde eine finale Extension (5min bei 72°C) durchgeführt.

#### **4.1.8 DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Fragmenten erfolgte, basierend auf der Kettenabbruchmethode (Sanger et al, 1977), nach Protokollen der Firma ABI (Applied Biosystems) durch "Dye Terminator Cycle Sequencing" auf der automatischen Sequenziermaschine 377 (Applied Biosystems). Pro Reaktion wurden 100-200ng/kb Plasmid bzw. 10-20ng/kb PCR-Produkt in 5.5µl ddH<sub>2</sub>O, 0.5µl Oligonukleotid (10µM) und 4µl „Big Dye-Terminator“-Mix (ABI) eingesetzt.

#### **4.1.9 Oligonukleotidsynthese**

Synthetische Oligonukleotide wurden von der Arbeitsgruppe Dr. R. Frank am ZMBH nach der Phosphotriester methode auf einem DNA-Synthesegerät der Firma ABI (Applied Biosystems) hergestellt. Eine Auflistung der verwendeten Oligonukleotide ist im Material-Teil angegeben.

#### **4.1.10 Gesamt-RNA Isolation**

RNA wurde aus Gehirngewebe nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) mit TRI-Reagenz (TRI-REAGENT, Molecular Research Center Inc.) isoliert. 10-20µg RNA wurden für 1h bei 37°C mit 20U Rnase freier DNaseI (Boehringer Mannheim) und 40U RNasin (MBI-Fermentas) in 60µl Puffer B (10mM Tris·HCl pH 7.5; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 50mM NaCl; 1mM DTT) inkubiert und nach Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanolpräzipitation in 20µl H<sub>2</sub>O gelöst.

#### **4.1.11 RT-PCR**

Von Gesamt-RNA wurden 1-5µg mit 200ng Hexamer-Oligonukleotiden (d(N)<sub>6</sub>, 10ng/µl, Boehringer Mannheim) in einem Volumen von 20µl für 10min bei 70°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Danach wurden 10µl RT-Mix (50mM Tris·HCl pH8.5; 75mM KCl; 3mM MgCl<sub>2</sub>; 10mM DTT; 20U RNasin [MBI-Fermentas]), 500µM je dNTP (Amersham-Pharmacia) zugegeben, ein 10µl Aliquot für Kontrollreaktionen entnommen und die verbleibenden 20µl mit 200U Reverser Transkriptase (MMLV, Gibco-BRL) für 60min bei 37°C inkubiert. Nach Denaturierung verbliebener RNA (10min, 95°C) wurden 1-3µl in die

PCR-Reaktion eingesetzt. Die Größe der PCR-Produkte wurde anschließend durch Agarosegelelektrophorese überprüft.

#### **4.1.12 Protein-Präparation aus Hirngewebe**

Alle Präparationsschritte wurden bei 4°C in Anwesenheit von Proteinase-Inhibitoren (Complete, EDTA-free, Roche Diagnostics) durchgeführt. Hippokampus oder Kleinhirn von Mäusen wurde durch 10-15 maliges Auf- und Abziehen bei 900rpm im Glas-Teflon Potter in 25mM HEPES pH 7.4 homogenisiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Homogenate wurden durch Zentrifugation bei 900 x g für 5min von Zellkernen und großen Zelltrümmern getrennt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration durch die BCA-Methode (Pierce, Rockford) wurden die Homogenate entweder direkt für die Western Blot Analyse verwendet oder für die Immunpräzipitationsreaktionen solubilisiert.

#### **4.1.13 Immunpräzipitation von AMPA-Rezeptoren**

Immunpräzipitationen erfolgten bei 4°C und in Anwesenheit von Proteinase-Inhibitoren (Complete, EDTA-free, Roche Diagnostics). Hippokampushomogenate wurden im Verhältnis 1:1 mit Puffer 2 (25mM HEPES pH 7.4; 300mM NaCl; 2% Triton-X 100) gemischt und für 60min im Überkopfschüttler inkubiert. Nach Zentrifugation für 10min bei 10.000 x g wurden die Proteinkonzentrationen der Überstände nach der BCA-Methode bestimmt. Solubilisierte Proteine (4µg/µl) wurden mit Puffer 3 (25mM HEPES pH 7.4; 150mM NaCl) 1:5 verdünnt. Je 200-250µg Protein in Puffer 4 (Puffer 2 + Puffer 3 im Verhältnis 1:5), wurden für die Immunpräzipitation eingesetzt. Zur Reduktion unspezifischer Reaktionen wurde die Protein A-Sepharose (Pierce Rockford) dreimal in Puffer 4 vorgewaschen und anschließend für 1h mit den Proteinhomogenaten vorinkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Homogenatüberstände über Nacht mit 1.5µg der entsprechenden Primärantikörper inkubiert (anti-GluR1; anti-GluR2). Nach der Antikörperinkubation wurde jede der Immunpräzipitationen für 1h mit 20µl vorgewaschener Protein A-Sepharose inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Überstände in einem zweiten Präzipitationsschritt mit Protein A-Sepharose, die mit Antikörper für 1h vorinkubiert und anschließend gewaschen wurde, erneut präzipitiert. Nach Immunpräzipitation wurden die Protein A-Sepharose Sedimente vereinigt und je zwei mal mit 800µl Puffer 4 und Puffer 3 durch Pelletierung für 2min bei 3000 x g gewaschen. Die Präzipitate wurden in 60µl Denaturierungspuffer (0.5% SDS; 1% β-Mercaptoethanol; NEB) resuspendiert und durch Denaturierung bei 95°C für 5min eluiert. Die

Überstände nicht immunpräzipitierter Proteine wurden nach Methanol/Chloroform Präzipitation (Wessel-Flügge) in 60µl Denaturierungspuffer resuspendiert und bei 95°C für 5min denaturiert.

#### 4.1.14 Enzymatische Protein-Deglykosilierung

Der postrationale Reifestatus von Glykoproteinen kann anhand der Sensitivität gegenüber bestimmten Deglykosylasen untersucht werden. Endoglykosidase H (Endo H) schneidet ausschließlich N-Zucker des „High Mannose“-Typs und einige Hybrid-Oligosaccharide, welche zwischen Endoplasmatischem Retikulum und medialem Golgi Kompartiment angefügt werden. Peptid: N-Glykosidase F (PNGase F) schneidet am innersten Kern nahezu aller N-verknüpften Oligosaccharide (Davidson und Balch, 1993; Kornfeld und Kornfeld, 1985). Die Immunpräzipitate, sowie ungebundene Proteine des Überstandes wurden mit 50U Endo H (NEB) in 50mM Na-Citrat pH 5.5 oder 20U PNGaseF (NEB) in 50mM Na-Phosphat pH 7.5, 1% NP-40 für 90min bei 37°C inkubiert. Nach Denaturierung für 5min bei 95°C wurden die Proben mit 2x Laemmli SDS-Ladepuffer (125mM Tris·HCl pH 6.8; 10% Glycerin; 0.01% Bromphenolblau; 5% β-Mercaptoethanol; 2% SDS) 1:2 verdünnt und für die Western Blot Analyse verwendet.

#### 4.1.15 Western Blot

Je nach Experiment wurden unterschiedliche Proteinmengen aus Protein-Präparationen in 2x SDS-Ladepuffer für 5min bei 95°C denaturiert und durch 7%ige SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt (Mini-Protean 3, Bio-Rad). Der Naß-Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte bei 30V, 90mA für 16h (Protran BA 85, Schleicher & Schuell; Mini Trans-Blot, Bio-Rad) in Transferpuffer (25mM Tris; 192mM Glyzin; 10% Methanol). Die Membranen wurden mit Block-Puffer (0.1% Tween 20; 10% Magermilchpulver in PBS pH 7.4) für 2–3h bei RT geblockt. Die Inkubation mit den spezifischen Primärantikörpern erfolgte in PBS/0,1% Tween 20 (PBS-T), für 2h bei Raumtemperatur. Nach viermaligem Waschen für jeweils 10min in PBS-T erfolgte die Detektion der Primärantikörper durch speziesspezifische Meerrettich-Peroxidase gekoppelte anti-IgG Sekundärantikörper für 45min in PBS-T (1:15000 anti-Kaninchen IgG oder anti-Maus IgG; Dianova). Die Detektion der Antigen-Antikörperreaktionen erfolgte durch „Verstärkte Chemilumineszenz“ (ECL+Plus, Amersham Pharmacia).

#### 4.1.16 Immunhistochemische Untersuchung von Gehirnschnitten der Maus

Nach tiefer Anästhesie mit Halothan wurden die Mäuse intrakardial mit PBS pH 7.4 und anschließend mit 4% Paraformaldehyd in PBS (4% PFA/PBS) perfundiert. Die Gehirne wurden entnommen und für 2h in 4% PFA/PBS bei 4°C nachfixiert. Nach Waschen in großen Volumina PBS/0.01% NaN<sub>3</sub> wurden die Gehirne in 2% Agarose/PBS eingebettet. Vibratomschnitte (Leica VT1000S, Leica Microsystems, Nußloch, Germany) wurden in 60-70µm Dicke für sagittale bzw. 40-50µm Dicke für coronale Präparationen geschnitten. Die Schnitte wurden für 30min in Tag 1-Puffer (PBS; 2.0% BSA; 0.3% Triton X-100) permeabilisiert. Anschließend wurde die endogene Peroxidase-Aktivität durch 5 minütige Inkubation in PBS/2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> blockiert. Nach viermaligem Waschen in PBS für je 10min wurden die Schnitte für 1h zur Reduktion unspezifischer Antikörperreaktionen in Tag 1-Puffer/10% Normal Serum aus Ziege (NGS) blockiert. Die Inkubation mit Primärantikörpern (siehe Materialteil) erfolgte in Tag 1-Puffer/5% NGS über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen in Tag 2-Puffer (0.6% BSA; 0.1% Triton X-100 in PBS) erfolgte die Inkubation mit Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörpern (1:600, Dianova) für 1h bei Raumtemperatur. Nach zweimaligem Waschen in Tag 2-Puffer und PBS wurden die Schnitte durch Peroxidase-Präzipitation von 0.05% DAB (Diaminobenzidin-Hydrochlorid, Sigma) in 20mM Tris·HCl pH 7.6 /0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entwickelt. Nach zweimaligem Waschen in PBS und 10mM Tris·HCl pH 7.6 wurden die Schnitte auf Objektträgern getrocknet. Nach Inkubation in Xylol für 1min wurden die Schnitte in Eukitt (Kindler GmbH, Freiburg) eingebettet.

#### 4.1.17 „Nucleated soma patch“-Ableitungen

„Nucleated soma patch“-Ableitungen wurden in der Abteilung Molekulare Neurobiologie (Prof. Seeburg) von PD Dr. Georg Köhr und Verena Pavlak durchgeführt. Transversale, hippokampale Schnitte (250µm) bzw. sagittale Kleinhirnschnitte (250µm) wurden aus den Gehirnen 13-15 Tage alter Mäuse präpariert. CA1-Pyramidalneurone bzw. zerebelläre Sternzellen wurden durch Infrarot-Differential Interferenz Kontrast (DIC) Mikroskopie identifiziert. Alle Messungen wurden bei 22°C mit einem EPC-9 Verstärker (HEKA Elektronik) durchgeführt. Bei der Ableitung isolierter Zellen (Sather et al, 1992) wurde die Meßpipette an das Zellsoma angesetzt und die Plasmamembran durchbrochen. Durch Anlegen eines negativen Drucks wird der Zellkern angesaugt und aus dem Schnitt herausgezogen. Dabei schließt sich die Plasmamembran des Zellkörpers um den angesaugten Kern und erlaubt die Messung der Ströme der Glutamat-Rezeptoren in dieser Membran. Somatische

Ableitungen wurden bei einem Pipettenwiderstand von 5-6M $\Omega$  in 135mM NaCl, 5.4mM KCl, 1.8mM CaCl<sub>2</sub>, 5mM HEPES, pH 7.25·NaOH mit einer piezo-elektrisch gesteuerten Glutamat-Applikationspipette durchgeführt. Die intrazelluläre Lösung enthielt 140mM CsCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM Na<sub>2</sub>-ATP, 10mM EGTA, 10mM HEPES, pH 7.25·CsOH. AMPA-Rezeptor vermittelte Ströme wurden durch Applikation von 1mM Glutamat für 5ms aktiviert, wobei NMDA-Rezeptorströme in Anwesenheit von 50 $\mu$ M AP5 und 1mM Mg<sup>2+</sup> blockiert wurden. Die Aktivierung der NMDA-Rezeptorströme erfolgte durch Applikation von 1mM Glutamat für 20ms in Anwesenheit des Koaktivators Glyzin (10 $\mu$ M) und 5 $\mu$ M NBQX um AMPA-Rezeptorströme zu blockieren. Rezeptor vermittelte Ströme wurden bei Haltepotentialen von -100mV bis +100mV in 20mV Schritten gemessen. Die Verhältnisse absoluter AMPA/NMDA Rezeptorströme wurde bei einem Haltepotential von -60mV ausgewertet. Zur Bestimmung der mittleren Stromamplituden wurden 4-5 Einzelmessungen gemittelt. Meßwerte wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben.

#### 4.1.18 Gesamtzell-Ableitungen synaptischer Ströme

Die Messungen synaptischer Glutamat-Rezeptorströme wurden in der Abteilung Zellphysiologie (Prof. Dr. Sakmann) von Dr. Andrei Rozov und in der Abteilung Molekulare Neurobiologie von Bettina Schupp durchgeführt. Die Ableitung synaptischer Ströme erfolgte in Gesamtzell-Konfiguration, bei der die Zellemban mit der Meßpipette durchstoßen wurde. Die Ableitung der Ströme erfolgte im Soma der Pyramidalneuronen. Nach Identifikation der Zellkörper durch Infrarot DIC-Mikroskopie wurden die Zellen mit der Meßpipette durchstoßen und das Zytosol durch Meßlösung (130mM Cs-Gluconat; 20mM CsCl; 10mM NaCl; 10mM HEPES·CsOH pH 7.25; 0.2mM EGTA; 4mM ATP-Mg; 0.3mM GTP-Na<sub>3</sub>) ersetzt. Die Messungen erfolgten mit Hilfe eines HEKA EPC9 Verstärkers (HEKA Elektronik). Synaptische AMPA- und NMDA-Rezeptor vermittelte, erregende postsynaptische Ströme (EPSCs) wurden durch Stimulation der Schaffer-Kollateralen für 100 $\mu$ s bei -70mV mit einer monopolen Elektrode ausgelöst. Die Stimulationsintensität wurde solange erhöht, bis eine verlässliche Rezeptorantwort meßbar war. AMPA-Rezeptor vermittelte EPSCs wurden in Anwesenheit von 50 $\mu$ M AP5, NMDA-Rezeptor vermittelte EPSCs in Anwesenheit von 5 $\mu$ M NBQX aufgezeichnet.  $I_{\text{AMPA}} : I_{\text{NMDA}}$  Verhältnisse wurden aus den höchsten Amplituden beider Ströme berechnet. Messwerte wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben.

#### 4.1.19 Messung des „Pairing“-induzierten LTPs an CA3/CA1 Synapsen

Zelluläre „Pairing“-LTP Messungen wurden von Katharina M. Kaiser in der Abteilung Zellphysiologie des MPI durchgeführt. CA1-Pyramidalzellen wurden in 250µm dicken, transversalen Gehirnschnitten 14 Tage alter Mäuse unter visueller Kontrolle durchstoßen und Gesamtzell-Spannungsableitungen durchgeführt. Alle 5 Sekunden wurden durch Stimulierung der Schaffer-Kollateralen an den CA3/CA1 Synapsen EPSCs ausgelöst. Es wurden dabei zwei unabhängige Stimulationswege als Induktionsspfad und Kontrollpfad verwendet. Der Induktionsspfad wurde im Stratum radiatum (apikal) induziert, der Kontrollpfad im Stratum oriens (basal) plziert. Beide Stimulationselektroden waren mehr als 200µm voneinander entfernt. Nach einer stabilen Meßphase von ca. 10min wurde zur Induktion von LTP das Membranpotential der postsynaptischen Zelle von -70mV auf 0mV geändert und nur der Induktionsspfad für 3 Minuten alle 1.5 Sekunden stimuliert. Nach Einstellung des Haltepotentials auf -70mV wurden beide Stimulationspfade angeregt und die erzeugten postsynaptischen Ströme über einen Zeitraum von ca. 60min gemessen. Die Amplituden wurden gegen die mittleren EPSCs vor „Pairing“ angeglichen und waren entweder als Einzelwerte oder als Mittelwert ± SEM angegeben. Zur statistischen Auswertung diente der gepaarte, zweiseitige *t*-Test (*p*).

#### 4.1.20 Ableitungen extrazellulärer Feldpotentiale (Feld-LTP)

Experimente zur Bestimmung des Feld-LTP wurden von Dr. Vidar Jensen und Dr. Øivind Hvalby in der Abteilung Neurophysiologie (Prof. Dr. Per Andersen) am Institut für medizinische Grundlagenforschung der Universität Oslo durchgeführt. Die Analyse erfolgte an akuten, transversalen Schnittpräparaten des Hippokampus von Mäusen im Alter von 14 und 42 Tagen. Die synaptische Stimulation (50µs, 100µA, 0.2Hz) erfolgte abwechselnd über zwei Wolfram-Elektroden an zwei unabhängigen Pfaden in der CA1-Region des Hippokampus, orthodromisch an den Synapsen der apikalen (Stratum radiatum) und der basalen (Stratum oriens) Dendriten. Extrazelluläre Antworten wurden mit zwei Glas-Elektroden in den entsprechenden Schichten abgeleitet. Nach einer stabilen Meßphase über 15min wurde einer der Pfade tetanisch stimuliert (1 x 100 Hz, 1s). Die Stärke der Stimulation wurde so gewählt, daß sie knapp über dem Schwellenwert lag, durch den ein einzelner Test-Stimulus eine Antwort hervorrufen konnte. Die synaptische Stärke wurde durch die Messung der Steigung im mittleren Drittel der Anstiegsphase von Feldpotentialen ermittelt. Sechs aufeinanderfolgende Messungen wurden gemittelt und gegen die Werte normalisiert, die



4–7min vor der tetanischen Stimulation gemessen wurden. Die Meßwerte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Zur statistischen Auswertung diente der gepaarte, zweiseitige *t*-Test (p).

## 4.2 Material

### 4.2.1 Eukaryotische Zellen

R1 ES-Zellen:	Pluripotente, embryonale Stammzellen aus der inneren Zellmasse von 129/SVx129/SVJ-Mausblastozysten (Nagy et al., 1993)
Feeder-Zellen:	Primäre Maus-Fibroblasten aus E13.5 NMRI-Embryonen (Passage 2)

### 4.2.2 Mauslinien

C57BL/6:	Fa. Charles River (Deutschland) oder Fa. RCC/BRL (Basel)
Cre-deleter:	Prof. Klaus Rajewsky

### 4.2.3 Sequenzen verwendeter Oligonukleotide

screen s1-2	GGT AGA TAC TGA AGC ATA GCT ATG C
screen s2-2	CCA ATG TTG TGC TTT AGC CTT TGC
screen as3-2	GGT ATA TCT TCC CAG CCC CAA G
PGK Term3	CGA GAT CAG CAG CCT CTG TTC AC
PGK Term4	CAC TTT GTG GTT CTA AGT ACT GTG G
CIII-1as	GTC TAA CTT GTC GTT TTT AGT ATC AGC
CIII-4as	TTT CAG GAT CAC AGA AAA GTC ATA GC
C outside s4	CCT TCA GTG ATT ACC TCC TAA AAG G
Ko SmaI as	TCC CCC CGG GGC TCT TCA TTG TTG TCT TCC AAG TGC CAC
Ko SmaI sense	TCC CCC CGG GAT CCA CAA AGC CCT CCT GAT CCT C
Ko-ERV as	CCC TGA TAT CAC AAA ATG ATA CAC TCT G
Lox5171 Nco s	CTA GCC ATG GAT AAC TTC GTA TAA TGT GTA CTA TAC GAA GTT ATC GC
Lox5171 as NcoI	CTA GGC GAT AAC TTC GTA TAG TAC ACA TTA TAC GAA GTT ATC CAT GG

AatII+MluI-se	GTA CTG ACG TCT ACA CGC GTA C
AatII+MluI-as	GTA CGC GTG TAG ACG TCA
Adap. Pac-Kpn s	TAA CCG CGG TAC
Adap. Kpn-Pac as	CGC GGT TAA T

#### 4.2.4 Verwendete Antikörper

Rabbit polyclonal Anti-Glutamate Receptor 1, AB1504, Chemicon  
Rabbit polyclonal Anti-Glutamate Receptor 2, AB1768, Chemicon  
Rabbit polyclonal Anti-Glutamate Receptor 2 & 3, AB1506, Chemicon  
Rabbit polyclonal Anti-Glutamate Receptor 4, PC262L Oncogene Research Products  
Rabbit polyclonal Anti-NMDA Receptor 1, AB AB1516 Chemicon  
Rabbit polyclonal Anti-GFAP (Glial-Fibrillary-Acid-Protein), Z 0334, DAKO

Mouse monoclonal Anti-Glutamate Receptor 3 , 32-0400, Zymed  
Mouse monoclonal Anti-NeuN (Neuronal Nuclei), MAB377, Chemicon  
Mouse monoclonal Anti-Synaptophysin, clone SY38 MAB5258-20UG, Chemicon  
Mouse monoclonal Anti-MAP2, Clone HM-2, M4403, Sigma  
Mouse monoclonal Anti- $\alpha$ -CaMKII Clone , MAB3119, Chemicon  
Mouse monoclonal Anti- $\alpha$ -III Tubulin Clone TU-20, MAB1637, Chemicon  
Mouse monoclonal Anti- $\alpha$ -Actin, Clone AC-15, A5441, Sigma  
Peroxidase-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), 111-035-144, Dianova  
Peroxidase-conjugated Goat Anti-Mouse IgG (H+L), 115-035-100, Dianova

## 5. Abkürzungen

α	Alpha
α-	Anti-
β	Beta-
μ	Mikro
A	Ampere
Abb	Abbildung
AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure
AP5	2-Amino-5-phosphonovaleriansäure
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
CA	Cornu ammonis
CaMKII	Calcium/Calmodulin abhängige ProteinkinaseII
Cs	Cäsium
cDNA	Zur mRNA komplementärer DNA-Strang
Cre	Cre-Rekombinase
DAB	Diaminobenzidin-Hydrochlorid
DG	Gyrus dentatus
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Deoxyuridintriphosphat
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ES	Embryonale Stammzelle
EPSC	exzitatorischer postsynaptischer Strom
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere
FCS	Fötales Kälberserum

---

FD	Faraday
g	Gramm
G	Giga
G418	Geneticin
GABA	γ-aminobutyric acid
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GluR	Glutamat-Rezeptor-Untereinheit
Gr	Granule cell layer
GrDG	Granule cell layer Dentate gyrus
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-ethansulfonsäure
Hz	Hertz
K	Kalium
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LIF	Leukaemia Inhibitory Factor
LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung
m	Milli
M	Mol
min	Minute
Mo	Molecular layer
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
n	nano
Na	Natrium
NBQX	1.2.3.4-Tetrahydro-6-nitro-2.3-dioxo-benzo[f]quinoxalin-7-sulfonamid
NMDA	N-methyl-D-aspartat
NEO	Neomycinphosphotransferase
ng	Nanogramm
Nt	Nukleotid
Ω	Ohm
Or	Stratum oriens
p	Pico

---

P	Postnataler Tag
pA	Polyadenylierungssignal
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	potentia Hydroxy
PFA	Paraformaldehyd
PGK	Phosphoglyceratkinase
PoDG	Polymorph layer Dentate gyrus
Pu	Purkinje cell layer
Py	Stratum pyramidale
Ra	Stratum radiatum
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
S	Schwefel
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Lösung
TE	Tris/EDTA-Puffer
TENS	Tris-EDTA-Natriumchlorid-SDS-Puffer
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
UTR	Untranslatierte Region
V	Volt
W	Watt

## 6. Literaturverzeichnis

Andersen, P. (1983). Possible cellular basis for prolonged changes of synaptic efficiency--a simple case of learning. *Prog Brain Res* 58, 419-26.

Andersen, P., Sundberg, S. H., Sveen, O., and Wigstrom, H. (1977). Specific long-lasting potentiation of synaptic transmission in hippocampal slices. *Nature* 266, 736-7.

Ascher, P., and Nowak, L. (1988). The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. *J Physiol* 399, 247-66.

Asztely, F., and Gustafsson, B. (1996). Ionotropic glutamate receptors. Their possible role in the expression of hippocampal synaptic plasticity. *Mol Neurobiol* 12, 1-11.

Ayalon, G., and Stern-Bach, Y. (2001). Functional assembly of AMPA and kainate receptors is mediated by several discrete protein-protein interactions. *Neuron* 31, 103-13.

Bach, M. E., Hawkins, R. D., Osman, M., Kandel, E. R., and Mayford, M. (1995). Impairment of spatial but not contextual memory in CaMKII mutant mice with a selective loss of hippocampal LTP in the range of the theta frequency. *Cell* 81, 905-15.

Bading, H., Ginty, D. D., and Greenberg, M. E. (1993). Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science* 260, 181-6.

Bading, H., and Greenberg, M. E. (1991). Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by NMDA receptor activation. *Science* 253, 912-4.

Bahn S., Wisden W. ,(1997): A map of non-NMDA receptor subunit expression in the vertebrate brain derived from in situ hybridisation histochemistry. In: Monaghan DT, Wenthold RJ (Eds), *The ionotropic Glutamate Receptors*. Totowa, NJ: Humana Press Inc., pp 149-187.

- Barria, A., Derkach, V., and Soderling, T. (1997). Identification of the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in the alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type glutamate receptor. *J Biol Chem* 272, 32727-30.
- Barria, A., Muller, D., Derkach, V., Griffith, L. C., and Soderling, T. R. (1997). Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science* 276, 2042-5.
- Bliss, T. V., and Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-9.
- Bliss, T. V., and 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.
- Bormann, J. (2000). The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 21, 16-9.  
1\_00001413 1\_00001413.
- Boulter, J., Hollmann, M., O'Shea-Greenfield, A., Hartley, M., Deneris, E., Maron, C., and Heinemann, S. (1990). Molecular cloning and functional expression of glutamate receptor subunit genes. *Science* 249, 1033-7.
- Brusa, R., Zimmermann, F., Koh, D. S., Feldmeyer, D., Gass, P., Seeburg, P. H., and Sprengel, R. (1995). Early-onset epilepsy and postnatal lethality associated with an editing-deficient GluR-B allele in mice. *Science* 270, 1677-80.
- Cardozo, B. N., Buijs, R., and Van der Want, J. (1991). Glutamate-like immunoreactivity in retinal terminals in the nucleus of the optic tract in rabbits. *J Comp Neurol* 309, 261-70.
- Carroll, R. C., Lissin, D. V., von Zastrow, M., Nicoll, R. A., and Malenka, R. C. (1999). Rapid redistribution of glutamate receptors contributes to long-term depression in hippocampal cultures. *Nat Neurosci* 2, 454-60.

Choi, S., Klingauf, J., and Tsien, R. W. (2000). Postfusional regulation of cleft glutamate concentration during LTP at 'silent synapses'. *Nat. Neurosci.* 3, 330-6.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-9.

Chung, H. J., Xia, J., Scannevin, R. H., Zhang, X., and Huganir, R. L. (2000). Phosphorylation of the AMPA receptor subunit GluR2 differentially regulates its interaction with PDZ domain-containing proteins. *J Neurosci* 20, 7258-67.

Davidson, H. W., and Balch, W. E. (1993). Differential inhibition of multiple vesicular transport steps between the endoplasmic reticulum and trans Golgi network. *J Biol Chem* 268, 4216-26.

Daw, M. I., Chittajallu, R., Bortolotto, Z. A., Dev, K. K., Duprat, F., Henley, J. M., Collingridge, G. L., and Isaac, J. T. (2000). PDZ proteins interacting with C-terminal GluR2/3 are involved in a PKC- dependent regulation of AMPA receptors at hippocampal synapses. *Neuron* 28, 873-86.

Derkach, V., Barria, A., and Soderling, T. R. (1999). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3- hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3269-74.

Dong, H., O'Brien, R. J., Fung, E. T., Lanahan, A. A., Worley, P. F., and Huganir, R. L. (1997). GRIP: a synaptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA receptors. *Nature* 386, 279-84.

Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* 280, 69-77.

Ellgaard, L., Molinari, M., and Helenius, A. (1999). Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* 286, 1882-8.



Engert, F., and Bonhoeffer, T. (1999). Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399, 66.

Fagni, L., Chavis, P., Ango, F., and Bockaert, J. (2000). Complex interactions between mGluRs, intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and ion channels in neurons. *Trends Neurosci* 23, 80-8. 2\_00001492 2\_00001492.

Fanselow, M. S. (2000). Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behav Brain Res* 110, 73-81.

Feldmeyer, D., Kask, K., Brusa, R., Kornau, H. C., Kolhekar, R., Rozov, A., Burnashev, N., Jensen, V., Hvalby, O., Sprengel, R., and Seeburg, P. H. (1999). Neurological dysfunctions in mice expressing different levels of the Q/R site-unedited AMPAR subunit GluR-B. *Nat Neurosci* 2, 57-64.

Frassoni, C., Spreafico, R., Franceschetti, S., Aurisano, N., Bernasconi, P., Garbelli, R., Antozzi, C., Taverna, S., Granata, T., and Mantegazza, R. (2001). Labeling of rat neurons by anti-GluR3 IgG from patients with Rasmussen encephalitis. *Neurology* 57, 324-7.

Gecz, J., Barnett, S., Liu, J., Hollway, G., Donnelly, A., Eyre, H., Eshkevari, H. S., Baltazar, R., Grunn, A., Nagaraja, R., Gilliam, C., Peltonen, L., Sutherland, G. R., Baron, M., and Mulley, J. C. (1999). Characterization of the human glutamate receptor subunit 3 gene (GRIA3), a candidate for bipolar disorder and nonspecific X-linked mental retardation. *Genomics* 62, 356-68.

Geiger, J. R., Melcher, T., Koh, D. S., Sakmann, B., Seeburg, P. H., Jonas, P., and Monyer, H. (1995). Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca<sup>2+</sup> permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* 15, 193-204.

Gerlai, R., Henderson, J. T., Roder, J. C., and Jia, Z. (1998). Multiple behavioral anomalies in GluR2 mutant mice exhibiting enhanced LTP. *Behav Brain Res* 95, 37-45.

- Gregor, P., Reeves, R. H., Jabs, E. W., Yang, X., Dackowski, W., Rochelle, J. M., Brown, R. H., Jr., Haines, J. L., O'Hara, B. F., Uhl, G. R., and et al. (1993). Chromosomal localization of glutamate receptor genes: relationship to familial amyotrophic lateral sclerosis and other neurological disorders of mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 3053-7.
- Gu, H., Zou, Y. R., and Rajewsky, K. (1993). Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* *73*, 1155-64.
- Gustafsson, B., Wigstrom, H., Abraham, W. C., and Huang, Y. Y. (1987). Long-term potentiation in the hippocampus using depolarizing current pulses as the conditioning stimulus to single volley synaptic potentials. *J Neurosci* *7*, 774-80.
- Hayashi, T., Umemori, H., Mishina, M., and Yamamoto, T. (1999). The AMPA receptor interacts with and signals through the protein tyrosine kinase Lyn. *Nature* *397*, 72-6.
- Hayashi, Y., Shi, S. H., Esteban, J. A., Piccini, A., Poncer, J. C., and Malinow, R. (2000). Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* *287*, 2262-7.
- He, X. P., Patel, M., Whitney, K. D., Janumpalli, S., Tenner, A., and McNamara, J. O. (1998). Glutamate receptor GluR3 antibodies and death of cortical cells. *Neuron* *20*, 153-63.
- Helenius, A., and Aebi, M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* *291*, 2364-9.
- Heynen, A. J., Quinlan, E. M., Bae, D. C., and Bear, M. F. (2000). Bidirectional, activity-dependent regulation of glutamate receptors in the adult hippocampus in vivo. *Neuron* *28*, 527-36.
- Higuchi, M., Single, F. N., Kohler, M., Sommer, B., Sprengel, R., and Seeburg, P. H. (1993). RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a base-paired intron-exon structure determines position and efficiency. *Cell* *75*, 1361-70.

Hollmann, M., Hartley, M., and Heinemann, S. (1991). Ca<sup>2+</sup> permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 252, 851-3.

Hollmann, M., and Heinemann, S. (1994). Cloned Glutamate receptors. *Ann. Rev. Neurosci.* 17, 31.

Hollmann, M., Maron, C., and Heinemann, S. (1994). N-glycosylation site tagging suggests a three transmembrane domain topology for the glutamate receptor GluR1. *Neuron* 13, 1331-43.

Huerta, P. T., Sun, L. D., Wilson, M. A., and Tonegawa, S. (2000). Formation of temporal memory requires NMDA receptors within CA1 pyramidal neurons. *Neuron* 25, 473-80.

Hume, R. I., Dingledine, R., and Heinemann, S. F. (1991). Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science* 253, 1028-31.

Isaac, J. T., Nicoll, R. A., and Malenka, R. C. (1995). Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP. *Neuron* 15, 427-34.

Jensen, V., Kaiser, K.M., Borchardt, T., Rozov, A., Burnashev, N., Adelmann, G., Brix, C., Frotscher, M., Seeburg, P.H., Hvalby, Ø., Sakmann, B., Sprengel, R.(2002). A juvenile form of hippocampal LTP in GluR-A deficient mice. *Neuron* (in press).

Jia, Z., Agopyan, N., Miu, P., Xiong, Z., Henderson, J., Gerlai, R., Taverna, F. A., Velumian, A., MacDonald, J., Carlen, P., Abramow-Newerly, W., and Roder, J. (1996). Enhanced LTP in mice deficient in the AMPA receptor GluR2. *Neuron* 17, 945-56.

Johnson, J. W., and Ascher, P. (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325, 529-31.

Jonas, P., and Burnashev, N. (1995). Molecular mechanisms controlling calcium entry through AMPA-type glutamate receptor channels. *Neuron* 15, 987-90.

Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M. (2000) Principles of Neural Science. Fourth Edition, McGraw-Hill, Health Professions Division.

Keinänen, K., Wisden, W., Sommer, B., Werner, P., Herb, A., Verdoorn, T. A., Sakmann, B., and Seeburg, P. H. (1990). A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science* 249, 556.

Kim, C. H., Chung, H. J., Lee, H. K., and Huganir, R. L. (2001). Interaction of the AMPA receptor subunit GluR2/3 with PDZ domains regulates hippocampal long-term depression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11725-30.

Kopito, R. R. (1997). ER quality control: the cytoplasmic connection. *Cell* 88, 427-30.

Kornfeld, R., and Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54, 631-64.

LeDoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23, 155-84.

Lee, G., and Saito, I. (1998). Role of nucleotide sequences of loxP spacer region in Cre-mediated recombination. *Gene* 216, 55-65.

Lee, H. K., Kameyama, K., Huganir, R. L., and Bear, M. F. (1998). NMDA induces long-term synaptic depression and dephosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors in hippocampus. *Neuron* 21, 1151-62.

Lee, H. K., Barbarosie, M., Kameyama, K., Bear, M. F., and Huganir, R. L. (2000). Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature* 405, 955-9.

Leonard, A. S., Davare, M. A., Horne, M. C., Garner, C. C., and Hell, J. W. (1998). SAP97 is associated with the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor GluR1 subunit. *J Biol Chem* 273, 19518-24.

- Lester, R. A., Clements, J. D., Westbrook, G. L., and Jahr, C. E. (1990). Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. *Nature* *346*, 565-7.
- Levite, M., Fleidervish, I. A., Schwarz, A., Pelled, D., and Futerman, A. H. (1999). Autoantibodies to the glutamate receptor kill neurons via activation of the receptor ion channel. *J Autoimmun* *13*, 61-72.
- Liao, D., Scannevin, R. H., and Huganir, R. (2001). Activation of silent synapses by rapid activity-dependent synaptic recruitment of AMPA receptors. *J Neurosci* *21*, 6008-17.
- Liu, S. Q., and Cull-Candy, S. G. (2000). Synaptic activity at calcium-permeable AMPA receptors induces a switch in receptor subtype. *Nature* *405*, 454-8.
- Lledo, P. M., Hjelmstad, G. O., Mukherji, S., Soderling, T. R., Malenka, R. C., and Nicoll, R. A. (1995). Calcium/calmodulin-dependent kinase II and long-term potentiation enhance synaptic transmission by the same mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 11175-9.
- Lu, W., Man, H., Ju, W., Trimble, W. S., MacDonald, J. F., and Wang, Y. T. (2001). Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons. *Neuron* *29*, 243-54.
- Luscher, C., Xia, H., Beattie, E. C., Carroll, R. C., von Zastrow, M., Malenka, R. C., and Nicoll, R. A. (1999). Role of AMPA receptor cycling in synaptic transmission and plasticity. *Neuron* *24*, 649-58.
- Luthi, A., Chittajallu, R., Duprat, F., Palmer, M. J., Benke, T. A., Kidd, F. L., Henley, J. M., Isaac, J. T., and Collingridge, G. L. (1999). Hippocampal LTD expression involves a pool of AMPARs regulated by the NSF-GluR2 interaction. *Neuron* *24*, 389-99.
- MacDermott, A. B., Mayer, M. L., Westbrook, G. L., Smith, S. J., and Barker, J. L. (1986). NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature* *321*, 519-22.

- Mack, V., Burnashev, N., Kaiser, K. M. M., Rozov, A., Jensen, V., Hvalby, O., Seeburg, P. H., Sakmann, B., and Sprengel, R. (2001). Conditional Restoration of Hippocampal Synaptic Potentiation in GluR-A Deficient Mice. *Science*.
- Malinow, R. (1991). Transmission between pairs of hippocampal slice neurons: quantal levels, oscillations, and LTP. *Science* 252, 722-4.
- Mano, I., and Teichberg, V. I. (1998). A tetrameric subunit stoichiometry for a glutamate receptor-channel complex. *Neuroreport* 9, 327-31.
- Mansour, M., Nagarajan, N., Nehring, R. B., Clements, J. D., and Rosenmund, C. (2001). Heteromeric AMPA receptors assemble with a preferred subunit stoichiometry and spatial arrangement. *Neuron* 32, 841-53.
- Maren, S., and Baudry, M. (1995). Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationships to learning and memory. *Neurobiol Learn Mem* 63, 1-18.
- Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G. C., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M., and Kasai, H. (2001). Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 4, 1086-92.
- Mayer, M. L., and Westbrook, G. L. (1987). The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog Neurobiol* 28, 197-276.
- McGlade-McCulloh, E., Yamamoto, H., Tan, S. E., Brickey, D. A., and Soderling, T. R. (1993). Phosphorylation and regulation of glutamate receptors by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Nature* 362, 640-2.
- McNamara, J. O., Eubanks, J. H., McPherson, J. D., Wasmuth, J. J., Evans, G. A., and Heinemann, S. F. (1992). Chromosomal localization of human glutamate receptor genes. *J Neurosci* 12, 2555-62.

Medina, J. F., Christopher Repa, J., Mauk, M. D., and LeDoux, J. E. (2002). Parallels between cerebellum- and amygdala-dependent conditioning. *Nat Rev Neurosci* 3, 122-31.

Migaud, M., Charlesworth, P., Dempster, M., Webster, L. C., Watabe, A. M., Makhinson, M., He, Y., Ramsay, M. F., Morris, R. G., Morrison, J. H., O'Dell, T. J., and Grant, S. G. (1998). Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* 396, 433-9.

Milner, B., Squire, L. R., and Kandel, E. R. (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20, 445-68.

Monaghan, D. T., Bridges, R. J., and Cotman, C. W. (1989). The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 29, 365-402.

Montgomery, J. M., Pavlidis, P., and Madison, D. V. (2001). Pair recordings reveal all-silent synaptic connections and the postsynaptic expression of long-term potentiation. *Neuron* 29, 691-701.

Monyer, H., Seeburg, P. H., and Wisden, W. (1991). Glutamate-operated channels: developmentally early and mature forms arise by alternative splicing. *Neuron* 6, 799-810.

Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., and Roder, J. C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8424-8.

Nakanishi, S. (1992). Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258, 597-603.

Nishimune, A., Isaac, J. T., Molnar, E., Noel, J., Nash, S. R., Tagaya, M., Collingridge, G. L., Nakanishi, S., and Henley, J. M. (1998). NSF binding to GluR2 regulates synaptic transmission. *Neuron* 21, 87-97.

- Osten, P., Srivastava, S., Inman, G. J., Vilim, F. S., Khatri, L., Lee, L. M., States, B. A., Einheber, S., Milner, T. A., Hanson, P. I., and Ziff, E. B. (1998). The AMPA receptor GluR2 C terminus can mediate a reversible, ATP- dependent interaction with NSF and alpha- and beta-SNAPs. *Neuron* 21, 99-110.
- Osten, P., Khatri, L., Perez, J. L., Kohr, G., Giese, G., Daly, C., Schulz, T. W., Wensky, A., Lee, L. M., and Ziff, E. B. (2000). Mutagenesis reveals a role for ABP/GRIP binding to GluR2 in synaptic surface accumulation of the AMPA receptor. *Neuron* 27, 313-25.
- Passafaro, M., Piech, V., and Sheng, M. (2001). Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 4, 917-26.
- Pettit, D. L., Perlman, S., and Malinow, R. (1994). Potentiated transmission and prevention of further LTP by increased CaMKII activity in postsynaptic hippocampal slice neurons. *Science* 266, 1881-5.
- Roche, K. W., O'Brien, R. J., Mammen, A. L., Bernhardt, J., and Huganir, R. L. (1996). Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit. *Neuron* 16, 1179-88.
- Rogers, S. W., Andrews, P. I., Gahring, L. C., Whisenand, T., Cauley, K., Crain, B., Hughes, T. E., Heinemann, S. F., and McNamara, J. O. (1994). Autoantibodies to glutamate receptor GluR3 in Rasmussen's encephalitis. *Science* 265, 648-51.
- Rosenmund, C., Stern-Bach, Y., and Stevens, C. F. (1998). The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science* 280, 1596-9.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-7.
- Sans, N., Racca, C., Petralia, R. S., Wang, Y. X., McCallum, J., and Wenthold, R. J. (2001). Synapse-associated protein 97 selectively associates with a subset of AMPA receptors early in their biosynthetic pathway. *J Neurosci* 21, 7506-16.



Sather, W., Dieudonne, S., MacDonald, J. F., and Ascher, P. (1992). Activation and desensitization of N-methyl-D-aspartate receptors in nucleated outside-out patches from mouse neurones. *J Physiol* 450, 643-72.

Sato, K., Kiyama, H., and Tohyama, M. (1993). The differential expression patterns of messenger RNAs encoding non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptor subunits (GluR1-4) in the rat brain. *Neuroscience* 52, 515-39.

Sauer, B. (1992). Identification of cryptic lox sites in the yeast genome by selection for Cre-mediated chromosome translocations that confer multiple drug resistance. *J Mol Biol* 223, 911-28.

Schwenk, F., Baron, U., and Rajewsky, K. (1995). A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP- flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res* 23, 5080-1.

Seeburg, P. H. (1993). The TiPS/TINS lecture: the molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Pharmacol Sci* 14, 297-303.

Sheng, M., and Lee, S. H. (2001). AMPA receptor trafficking and the control of synaptic transmission. *Cell* 105, 825-8.

Shi, S., Hayashi, Y., Esteban, J. A., and Malinow, R. (2001). Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons. *Cell* 105, 331-43.

Shi, S. H., Hayashi, Y., Petralia, R. S., Zaman, S. H., Wenthold, R. J., Svoboda, K., and Malinow, R. (1999). Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science* 284, 1811-6.

Sommer, B., Keinänen, K., Verdoorn, T. A., Wisden, W., Burnashev, N., Herb, A., Kohler, M., Takagi, T., Sakmann, B., and Seeburg, P. H. (1990). Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science* 249, 1580-5.

- Sommer, B., Kohler, M., Sprengel, R., and Seeburg, P. H. (1991). RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* 67, 11-9.
- Song, I., Kamboj, S., Xia, J., Dong, H., Liao, D., and Huganir, R. L. (1998). Interaction of the N-ethylmaleimide-sensitive factor with AMPA receptors. *Neuron* 21, 393-400.
- Sprengel, R., Aronoff, R., Volkner, M., Schmitt, B., Mosbach, R., and Kuner, T. (2001). Glutamate receptor channel signatures. *Trends Pharmacol Sci* 22, 7-10.
- Srivastava, S., Osten, P., Vilim, F. S., Khatri, L., Inman, G., States, B., Daly, C., DeSouza, S., Abagyan, R., Valtschanoff, J. G., Weinberg, R. J., and Ziff, E. B. (1998). Novel anchorage of GluR2/3 to the postsynaptic density by the AMPA receptor-binding protein ABP. *Neuron* 21, 581-91.
- Stern, P., Behe, P., Schoepfer, R., and Colquhoun, D. (1992). Single-channel conductances of NMDA receptors expressed from cloned cDNAs: comparison with native receptors. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 250, 271-7.
- Sternberg, N., Sauer, B., Hoess, R., and Abremski, K. (1986). Bacteriophage P1 cre gene and its regulatory region. Evidence for multiple promoters and for regulation by DNA methylation. *J Mol Biol* 187, 197-212.
- Stevens, C. F. (1998). A million dollar question: does LTP = memory? *Neuron* 20, 1-2.
- Tomita, S., Nicoll, R. A., and Brecht, D. S. (2001). PDZ protein interactions regulating glutamate receptor function and plasticity. *J Cell Biol* 153, F19-24.
- Trussell, L. O., and Fischbach, G. D. (1989). Glutamate receptor desensitization and its role in synaptic transmission. *Neuron* 3, 209-18.
- Tsai, B., Ye, Y., and Rapoport, T. A. (2002). Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 246-55.

Tsien, J. Z., Huerta, P. T., and Tonegawa, S. (1996). The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87, 1327-38.

van Praag, H., Schinder, A. F., Christie, B. R., Toni, N., Palmer, T. D., and Gage, F. H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415, 1030-4.

Vekovischeva, O. Y., Zamanillo, D., Echenko, O., Seppala, T., Uusi-Oukari, M., Honkanen, A., Seeburg, P. H., Sprengel, R., and Korpi, E. R. (2001). Morphine-induced dependence and sensitization are altered in mice deficient in AMPA-type glutamate receptor-A subunits. *J Neurosci* 21, 4451-9.

Verdoorn, T. A., Burnashev, N., Monyer, H., Seeburg, P. H., and Sakmann, B. (1991). Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. *Science* 252, 1715-8.

Verhage, M., Maia, A. S., Plomp, J. J., Brussaard, A. B., Heeroma, J. H., Vermeer, H., Toonen, R. F., Hammer, R. E., van den Berg, T. K., Missler, M., Geuze, H. J., and Sudhof, T. C. (2000). Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science* 287, 864-9.

Voogd, J., Gerrits, N. M., and Ruigrok, T. J. (1996). Organization of the vestibulocerebellum. *Ann N Y Acad Sci* 781, 553-79.

Wenthold, R. J., Petralia, R. S., Blahos, J., II, and Niedzielski, A. S. (1996). Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J Neurosci* 16, 1982-9.

Wenthold, R. J., Yokotani, N., Doi, K., and Wada, K. (1992). Immunochemical characterization of the non-NMDA glutamate receptor using subunit-specific antibodies. Evidence for a hetero-oligomeric structure in rat brain. *J Biol Chem* 267, 501-7.

Wisden W., Seeburg P.H., and Monyer H. (2000): AMPA, kainate and NMDA ionotropic glutamate receptor expression- an in situ hybridisation atlas. In: Ottersen O.P., Storm-

Mathisen J. (Eds), *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, Vol. 18: Glutamate, Elsevier Science, pp 99-143

Xia, J., Chung, H. J., Wihler, C., Huganir, R. L., and Linden, D. J. (2000). Cerebellar long-term depression requires PKC-regulated interactions between GluR2/3 and PDZ domain-containing proteins. *Neuron* 28, 499-510.

Xia, J., Zhang, X., Staudinger, J., and Huganir, R. L. (1999). Clustering of AMPA receptors by the synaptic PDZ domain-containing protein PICK1. *Neuron* 22, 179-87.

Yakel, J. L., Vissavajhala, P., Derkach, V. A., Brickey, D. A., and Soderling, T. R. (1995). Identification of a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1376-80.

Zamanillo, D., Sprengel, R., Hvalby, O., Jensen, V., Burnashev, N., Rozov, A., Kaiser, K. M., Koster, H. J., Borchardt, T., Worley, P., Lubke, J., Frotscher, M., Kelly, P. H., Sommer, B., Andersen, P., Seeburg, P. H., and Sakmann, B. (1999). Importance of AMPA receptors for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning. *Science* 284, 1805.

Zhu, B. G., Chen, Y. Z., and Xing, B. R. (1999). Effect of calcium on the uptake of glutamate by synaptosomes: possible involvement of two different mechanisms. *J Neural Transm* 106, 257-64.

Zhu, J. J., Esteban, J. A., Hayashi, Y., and Malinow, R. (2000). Postnatal synaptic potentiation: Delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. *Nat. Neurosci.* 3, 1098.

## 7. Publikationen

Borchardt, T., Camakaris, J., Cappai, R., Masters, C. L., Beyreuther, K., and Multhaup, G. (1999). Copper inhibits beta-amyloid production and stimulates the non-amyloidogenic pathway of amyloid-precursor-protein secretion. *Biochem J* 344 Pt 2, 461-7.

Borchardt, T., Schmidt, C., Camarkis, J., Cappai, R., Masters, C. L., Beyreuther, K., and Multhaup, G. (2000). Differential effects of zinc on amyloid precursor protein (APP) processing in copper-resistant variants of cultured Chinese hamster ovary cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 46, 785-95.

Multhaup, G., Hesse, L., Borchardt, T., Ruppert, T., Cappai, R., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1999). Autoxidation of amyloid precursor protein and formation of reactive oxygen species. *Adv Exp Med Biol* 448, 183-92.

Zamanillo, D., Sprengel, R., Hvalby, O., Jensen, V., Burnashev, N., Rozov, A., Kaiser, K. M., Koster, H. J., Borchardt, T., Worley, P., Lubke, J., Frotscher, M., Kelly, P. H., Sommer, B., Andersen, P., Seeburg, P. H., and Sakmann, B. (1999). Importance of AMPA receptors for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning. *Science* 284, 1805-11.