

**Charakterisierung von stressregulierten Genen als potentielle  
Modulatoren von Lernen und Angst**

**Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg August Universität zu Göttingen**

**vorgelegt von  
André Fischer  
aus Flensburg**

**Göttingen 2002**

**D7**

**Referent: Prof. Dr. Rüdiger Hardeland**

**Korreferent: PD Dr. Michael Hörner**

**Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.2002**

## Inhaltsverzeichnis

Seite

### Abkürzungsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Lernen und Gedächtnis	1
1.2	Klassische Konditionierung	3
1.2.1	Die Furchtkonditionierung	3
1.2.2	Extinktion: Modifizierung eines Verhaltens	5
1.3	Molekulare Mechanismen der Gedächtniskonsolidierung	7
1.4	Modulation der Gedächtniskonsolidierung durch Stress	9
1.5	Das limbische System: Septum und Hippokampus	12
1.5.1	Septum	12
1.5.2	Hippokampus	14
1.6	Zielsetzung der Arbeit	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1	Material	18
2.1.1	Bakterienstamm	18
2.1.2	Plasmide	18
2.1.3	DNA/RNA Längenstandards	19
2.1.4	Chemikalien	19
2.1.5	Enzyme und Antikörper	21
2.1.6	Sonstige Materialien und Geräte	22
2.1.7	Nährmedien, Lösungen, Puffer	24
2.1.7.1	Nährmedien	24
2.1.7.2	Lösungen und Puffer	25
2.1.8	Versuchstiere	26
2.2	Methoden	26
2.2.1	Immobilisationsstress	26

2.2.2	Entnahme von Hirngewebe	27
2.2.3	Molekularbiologische Methoden	27
2.2.3.1	Kultivierung und Lagerung von <i>E. coli</i>	27
2.2.3.2	Transformation von <i>E. coli</i>	27
2.2.3.3	Isolierung von PolyA+RNA aus Hirngewebe	28
2.2.3.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	29
2.2.3.5	Fällung von Nukleinsäuren mit Ethanol	30
2.2.3.6	Extraktion von DNA mit Phenol/Chloroform und Chloroform oder Butanol	31
2.2.3.7	Agarose-Gelelektrophorese	31
2.2.3.8	SMART cDNA Synthese	32
2.2.3.9	Aufreinigung von PCR-Produkten	33
2.2.3.10	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	35
2.2.3.11	Plasmidisolierung in analytischen Mengen (Mini-Präparation)	35
2.2.3.12	Ligation doppelsträngiger DNA	36
2.2.3.13	Differentielles Screening	36
2.2.3.14	Polymerase Kettenreaktion; PCR	39
2.2.3.15	Durchführung einer semiquantitativen PCR	42
2.2.3.16	Sequenzierung von DNA	42
2.2.3.17	SMART 3`RACE PCR Amplifikation	43
2.2.3.18	Auftrennen von RNA in einem Formaldehydgel	45
2.2.3.19	RNA Markierung mit Digoxigenin-UTP durch in vitro Transkription	46
2.2.3.20	<i>In situ</i> Hybridisierung	47
2.2.3.21	Markierung von DNA-Sonden mit $\alpha$ -[ <sup>32</sup> P] dATP	48
2.2.3.22	Isolierung von cytoplasmatischen Proteinen aus Hirngewebe	49
2.2.3.23	Isolierung von nativen cytoplasmatischen Proteinen aus Hirngewebe	49
2.2.3.24	Isolierung von Kernproteinen aus Hirngewebe	50
2.2.3.25	Vermessung von Proteinen	51

2.2.3.26	Immunopräzipitation von Proteinen	51
2.2.3.27	Bestimmung der CDK5 Kinaseaktivität	52
2.2.3.28	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE	52
2.2.3.29	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen	54
2.2.3.30	Immunologische Detektion von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot)	54
2.2.3.31	Immunohistochemie	56
2.2.3.31.1	Perfusion	56
2.2.3.31.2	Hirnschnitte	57
2.2.3.31.3	Immundetektion	57
2.2.3.31.4	Immunodetektion mit 2 Antikörpern (Doppelfärbung)	58
2.2.3.31.5	Mikroskopie	59
2.2.3.32	Verhaltensexperimente	60
2.2.3.32.1	Kontextabhängige Furchtkonditionierung	60
2.2.3.32.2	Kontext-und Tonabhängige Furchtkonditionierung	61
2.2.3.32.3	Extinktion der konditionierten Furcht	61
2.2.3.32.4	Erhöhter-Plus-Labyrinth Test	62
2.2.3.33	Statistische Analyse	62
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>63</b>
3.1	Nach einstündigem Immobilisationsstress differentiell exprimierte Sequenzen des lateralen Septum: Auswahl geeigneter Kandidaten für die weitere Analyse	63
3.2	Klon A6	64
3.3	<i>CDK5</i> ist ein differentiell exprimiertes Gen im lateralen Septum	66
3.4	Analyse der differentiellen Cdk5 Proteinproduktion durch immunohistochemische Detektion in Gehirnschnitten.	68
3.5	Lokalisation der induzierbaren Cdk5 Proteinproduktion durch immunohistochemische Doppelfärbung in Gehirnschnitten.	70

3.6	Analyse des Cdk5 Aktivator-Protein p35 und der Cdk5 Kinaseaktivität.	71
3.7	Butyrolactone I ist ein geeigneter Inhibitor der Cdk5 Kinaseaktivität im septo-hippokampalen System	73
3.8	Butyrolactone I hat keinen Einfluß auf die stressmodulierte Angst von Balb/c Mäusen	74
3.9	Inhibition der stress-verbesserten Gedächtniskonsolidierung durch Butyrolactone I	75
3.10	Assoziatives Lernen induziert Cdk5/p35 Proteinproduktion im Septum und Hippokampus von Balb/c Mäusen	77
3.11	Assoziatives Lernen induziert Butyrolactone I sensitive Cdk5 Kinaseaktivität im septo-hippokampalen System von Balb/c Mäusen	79
3.12	Butyrolactone I inhibiert die kontext-abhängige Furchtkonditionierung	80
3.13	Butyrolactone I verschlechtert assoziatives Lernen in C57BL/6J Mäusen	84
3.14	Der Cdk5 Inhibitor Roscovitin verschlechtert assoziatives Lernen in Balb/c und C57BL/6J Mäusen	86
3.15	Butyrolactone I vermindert assoziatives Lernen von C57BL/6J Mäusen durch Inhibierung der basalen Cdk5 Kinaseaktivität im septo-hippokampalen System	87
3.16	C57BL/6J Mäuse haben eine höhere, basale Cdk5 und p35 Proteinproduktion als Balb/c Mäuse	92
3.17	Spezifische Produktion von Transkriptionsfaktoren könnte den unterschiedlichen Cdk5 und p35 Gehalt in C57BL/6J und Balb/c Mäusen erklären	94
3.18	Cdk5 reguliert die Extinktion konditionierter Furcht	98
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>100</b>
4.1	Identifikation differentiell exprimierter Gene	100
4.2	Septo-hippokampale Cdk5 wird in Balb/c Mäusen durch Immobilisationsstress induziert	101
4.3	Bedeutung der Cdk5 für die Gedächtniskonsolidierung	103

4.3.1	Cdk5 reguliert assoziatives Lernen in Balb/c Mäusen	103
4.3.2	Cdk5 reguliert assoziatives Lernen in verschiedenen Mausstämmen	105
4.4	Cdk5 reguliert die Extinktion konditionierter Furcht	107
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung und abschließende Betrachtung</b>	<b>109</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur</b>	<b>113</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>129</b>
7.1	Genfragment für <i>CDK5</i>	129
7.2	Fragmente weiterer in dieser Arbeit identifizierten Klone	129
	Danksagung	133
	Lebenslauf	134

## Abkürzungen

A	Adenin
Abb	Abbildung
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Zelsius
C	Cytosin
ca.	Zirka
cDNA	komplementäre (engl.: <i>copy</i> ) DNA
Ci	Curie
CRF	Corticotropin <i>releasing</i> Faktor
db	Dezibel
DEPC	Diethyl Pyrocarbonat
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
ddNTP	Didesoxy-Nukleotide
dNTP	Desoxy-Nukleotide
ds	Doppelsträngig
DTT	D, L-Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
i.c.v.	Intracerebroventriculare Injektion
i.h.	Intrahippokampale Injektion
i.s.	Intraseptale Injektion
J	Joule
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
lacZ	lacZ Gen kodierend für die $\beta$ Galaktosidase
M	Molar
mM	Millimolar
mm	Millimeter
max	Maximal
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter



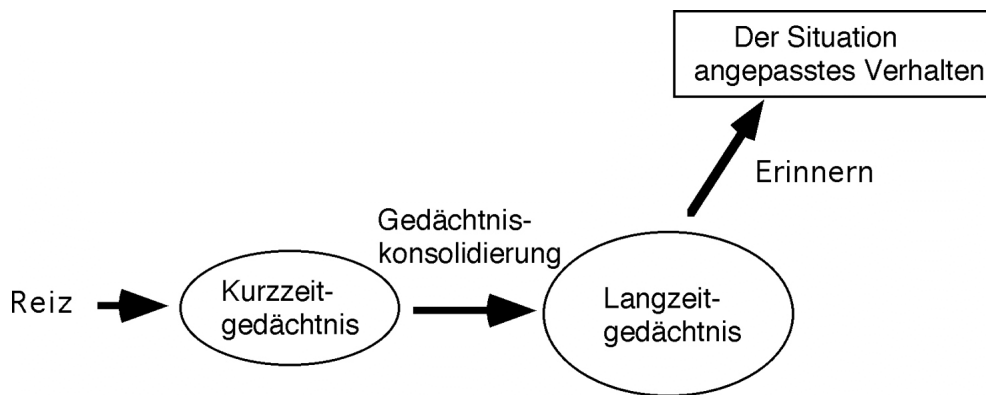
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. : <i>messenger RNA</i> )
OD	Optische Dichte
ori	Replikationsursprung (engl.: <i>origin of replication</i> )
p.A	Für die Analyse
PVN	paraventrikulärer Nukleus
PCR	Polymerasekettenreaktion
RACE	engl.: <i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
S.F.	Standardfehler
SPL	Schalldruckpegel
SMART	engl.: <i>switch mechanism at 3` end of RNA template</i>
ss	Einzelstrang
T	Thymin
TRIS	N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin
U	Einheit für Enzymaktivität (Unit)
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehung pro Minute
V	Volt
vs	versus; gegen
v/w	Volumen pro Gewicht
v/v	Volumen pro Volumen
Vol	Volumen
X-Gal	Substrat der $\beta$ -Laktamase
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 1. Einleitung

### 1.1 Lernen und Gedächtnis

Eine wichtige Aufgabe der Neurowissenschaft ist es, die Vorgänge zu verstehen, welche „Lernen“ und „Gedächtnis“ zu Grunde liegen. Dabei beschreibt „Lernen“ den Vorgang der zum Erwerb von Informationen führt, wogegen „Gedächtnis“ als Aufbewahrung dieser Informationen definiert ist, die durch „Erinnern“ abgerufen und auf eine bestimmte Situation angewendet werden kann.

Alle Organismen sind ständig einer Vielzahl von Umweltreizen ausgesetzt, die mit entsprechenden Sinnesorganen wahrgenommen werden und als Information zunächst in das Kurzzeitgedächtnis gelangen. Im Kurzzeitgedächtnis kann eine begrenzte Zahl von Informationen für eine limitierte Zeit gespeichert werden. Experimente mit menschlichen Versuchspersonen ergaben, dass wir uns im Durchschnitt sieben neue Informationen für ungefähr 10 s im Kurzzeitgedächtnis merken können, also etwa eine Telefonnummer oder eine Adresse. Handelt es sich um eine besonders wichtige Information, kann diese direkt in das Langzeitgedächtnis übergehen und praktisch für immer erhalten bleiben. Meist erfordert die Abspeicherung im Langzeitgedächtnis jedoch ausreichende Übung und damit einhergehende Wiederholung der Reize. Die Fixierung einer Information im Langzeitgedächtnis wird dabei auch als Gedächtniskonsolidierung beschrieben. Das Gedächtnis lässt sich also vereinfacht in ein Kurzzeit- und ein Langzeitgedächtnis einteilen (siehe Abb.1.1). Im Alltag verschmilzt das Kurzzeitgedächtnis aber mit dem Langzeitgedächtnis zum sogenannten Arbeitsgedächtnis, welches es z.B. ermöglicht sich mit jemanden zu unterhalten (Thompson R. F., 1994).



**Abb.1.1.** Schematische Darstellung der Gedächtniskonsolidierung und des Erinnerns bei Säugetieren.

Ein Umweltreiz wird als Information zunächst im Kurzzeitgedächtnis gespeichert und kann durch den Prozess der Gedächtniskonsolidierung im Langzeitgedächtnis fixiert werden. Die Information ist dann in der Regel das gesamte Leben lang abrufbar und kann erinnert werden, was in einem der jeweiligen Situation angepassten, veränderten Verhalten resultiert.

Das Langzeitgedächtnis läßt sich in verschiedenen Arten unterscheiden. Das *episodische* Langzeitgedächtnis ist zeitbezogen. In diesem Fall erinnert sich der Organismus an zeitlich zurückliegenden Ereignisse und Erfahrungen. Das *semantische* Langzeitgedächtnis ist nicht zeitbezogen und umfaßt beim Menschen z.B. die Bedeutungen von Wörtern. Episodisches und semantisches Gedächtnis, werden auch als *deklaratives* Gedächtnis, dem Lernen des „Was“ bezeichnet und entsprechen somit dem Gedächtnis für Fakten oder allgemeinem Wissen. Demgegenüber steht das *prozedurale* Gedächtnis, das Lernen des „Wie“, welches das Erlernen motorischer Fähigkeiten beinhaltet.

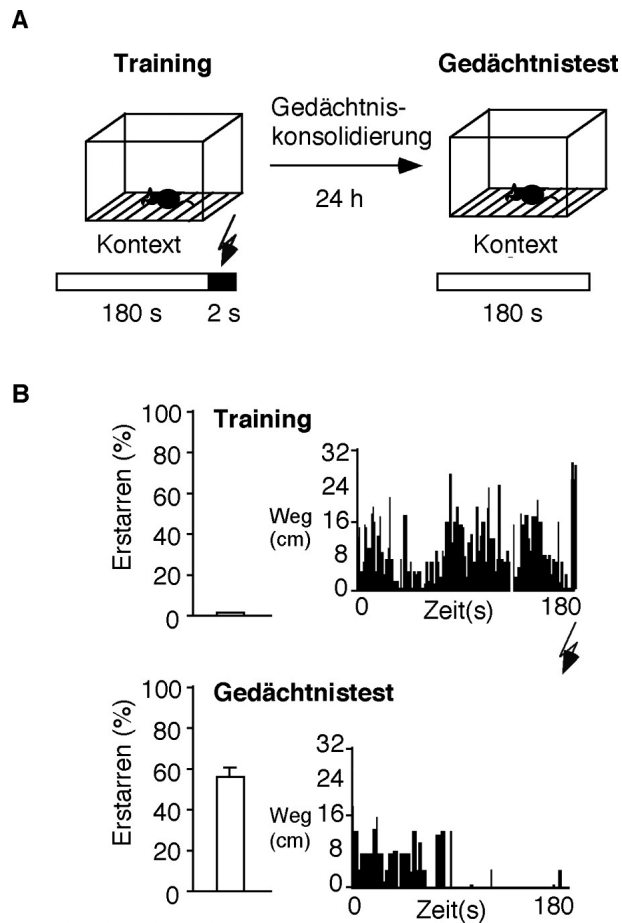
Die intensive Forschung der letzten Jahre hat vor allem zu einem besseren Verständnis der molekularen Vorgänge während Gedächtniskonsolidierung und der dabei beteiligten

Gehirnstrukturen geführt. Insbesondere Arbeiten mit Nagetieren haben geholfen, synaptische Plastizität, die funktionellen und strukturellen Veränderungen der Neuronen in Antwort auf Informationsverarbeitung, besser zu verstehen. Es wurden verschiedene Methoden entwickelt, um Gedächtniskonsolidierung in Maus oder Ratte zu untersuchen. Hierbei haben sich vor allem Lernmodelle, die assoziatives Lernen untersuchen als besonders geeignet erwiesen. Ein solches Modell ist die im Folgenden vorgestellte klassische Konditionierung.

## **1.2 Klassische Konditionierung**

### **1.2.1 Die Furchtkonditionierung**

Das Konzept des assoziativen Lernens wurde schon von den klassischen griechischen Philosophen beschrieben. Die Grundannahme ist dabei die, dass Ereignisse, die dazu neigen zeitlich zusammenzutreffen, vom Gehirn miteinander verknüpft werden. Dieses zeitliche Zusammentreffen nennt man auch Kontiguität. Viele Lernprozesse sind assoziativ, d.h. die Organismen lernen zwei Reize miteinander zu verknüpfen. Dabei ist der Lernerfolg umso größer, wenn das Erlernte einen adaptiven Wert hat und beispielsweise der Nahrungsaufnahme oder dem Vermeiden einer unangenehmen Situation dient. Bei der klassischen oder Pawlowschen Konditionierung handelt es sich um ein Verfahren, bei dem ein neutraler Reiz, der konditionierte Reiz, mit einem unkonditionierten Reiz gepaart wird, der eine bestimmte unkonditionierte Reaktion hervorruft (Pawlow, 1903). Der Organismus assoziiert dann den konditionierten Reiz mit dem unkonditionierten und reagiert fortan bereits auf die Präsentation des konditionierten Reizes mit einer konditionierten Reaktion. Ein Beispiel der klassischen Konditionierung ist die Furchtkonditionierung von Nagetieren (Blanchard und Blanchard, 1969). Eine Maus wird in eine für sie neue Umgebung, die Versuchsbox (Kontext) gesetzt und erkundet diese (siehe Abb. 1.2).



**Abb.1.2.** Schematische Übersicht der kontextabhängigen Furchtkonditionierung.

A. Typische Ergebnisse einer kontextabhängigen Furchtkonditionierung von Balb/c Mäusen. Während dem Training erkundet die Maus für 180 s die für sie unbekannte Versuchsbox (Kontext = konditionierter Reiz) und erhält im Anschluß für 2 s einen milden Elektroschock (unkonditionierter Reiz). Für den Gedächtnistest wird die Maus 24 h später erneut für 180 s in die Versuchsbox gesetzt und das Erstarren gemessen B. Oben: Während dem Training zeigt die Maus kein Erstarren (links) und erkundet die Umgebung (rechts), was sich in hoher Aktivität (Weg/Zeit) äußert. Unten: Während des Gedächtnistests erstarrt die Maus (rechts) und verharrt meist unbeweglich in der Versuchsbox (links), was in niedriger Aktivität resultiert. Pfeil, Elektroschock.

Der Kontext stellt in diesem Fall den neutralen, konditionierten Reiz dar. Nach 3 min erhält das Versuchstier einen leichten, aber unangenehmen Elektroschock. Der Elektroschock stellt hierbei den unkonditionierten Reiz dar. Wird die Maus zum Gedächtnistest 24 h später wieder in die

Versuchsbox gesetzt, beobachtet man ein vollkommen anderes Verhalten als am Tag zuvor. Die Aktivität ist gering und die Maus zeigt eine Verhaltensweise die als "Erstarren" bezeichnet wird, dabei verharrt die Maus bis auf Atmung und Herzschlag vollkommen reglos. Das Erstarren ist ein natürliches, angeborenes Verhalten bei Nagetieren die Furcht haben. Die Furcht ist in diesem Fall die konditionierte Reaktion, denn die Tiere haben gelernt, dass die Umgebung der Versuchsbox (Kontext) mit dem unangenehmen Erlebnis des Elektroschocks verknüpft ist. Das Erstarren kann daher als Maß für assoziatives Lernen und Gedächtniskonsolidierung verwendet werden. Die Bedeutung der Kontiguität für assoziatives Lernen läßt sich anhand der Furchtkonditionierung anschaulich demonstrieren. Erhält das Versuchstier den Elektroschock unmittelbar nachdem es in die Versuchsbox gesetzt wurde und erst danach die Gelegenheit die neue Umgebung zu erkunden, findet keine Assoziation von Kontext und Elektroschock statt und das Tier zeigt im Gedächtnistest keine konditionierte Furcht (Milanovic et al., 1998). Zusammenfassend gilt also, dass es sich bei klassischen Konditionierungen um einen Vorgang handelt, bei dem Organismen von Erfahrungen profitieren und ihr künftiges Verhalten danach ausrichten. Ein System also, mit welchem Organismen, einschließlich dem Mensch lernen, ursächliche Zusammenhänge der Welt zu begreifen.

Da die Furchtkonditionierung nur eine einzige Paarung von konditioniertem und unkonditioniertem Reiz benötigt, stellt sie eine sehr einfache und reproduzierbare Möglichkeit dar, assoziatives Lernen experimentell zu untersuchen und molekularbiologische Fragestellungen zur Gedächtniskonsolidierung zu bearbeiten.

### **1.2.2 Extinktion: Modifizierung eines Verhaltens**

Assoziative Erinnerungen sind sehr stabil. So kann man Nager, die mittels Furchtkonditionierung trainiert wurden (siehe 1.2.1) ohne weiteres mehrere Wochen nach dem Training im

Gedächtnistest untersuchen, ohne dass diese Zeitspanne zu einer Abschwächung der konditionierten Furcht führt (Sacchetti et al., 2001; Fischer, André, unveröffentlichte Beobachtung). Es ist hierbei wichtig zu beachten, dass die Tiere während des Gedächtnistests nur dem konditionierten Reiz, d.h. dem Kontext und/oder dem Ton ausgesetzt werden, wogegen der unkonditionierte Reiz, d.h. der Elektroschock in der Regel nicht noch einmal verabreicht wird. Präsentiert man den Tieren nun mehrmals hintereinander nur den konditionierten Reiz, erlangen diese mit der Zeit eine neue Information. Sie lernen, dass dem konditionierten Reiz nicht immer ein Elektroschock folgt. Als Reaktion läßt das aversive Verhalten, d.h. das Erstarren nach, bis es gänzlich verschwindet. Diesen Vorgang bezeichnet man als Extinktion (engl., *extinction*: Auslöschung). Die Extinktion ist also ein aktiver Prozeß und bei der Therapie von aversiven Verhaltensweisen, wie Posttraumatischen Belastungsstörungen (engl.: *posttraumatic stress disorders: PTSD*), Phobien oder bei unerwünschten Verhaltensweisen wie Sucht und Abhängigkeit von Bedeutung (Koob, 2000; Conklin und Tiffany, 2002; Kodituwakku, 2001; Wessa und Flor, 2002). Es ist hierbei zu beachten, dass Extinktion nicht mit Vergessen gleichzusetzen ist, wie aus der Beobachtung folgt, dass Nagetiere nach der Extinktion der konditionierten Furcht wieder Erstarren zeigen, wenn sie einen sogenannten „Erinnerungs-Schock“ erhalten haben (Bouton, 1993). Hierbei werden die Versuchstiere in eine für sie neue Versuchsbox gesetzt, wo sie unmittelbar einen milden Elektroschock, den „Erinnerungs-Schock“, erhalten und erst anschließend den neuen Kontext erkunden können. Der unmittelbare Elektroschock führt dabei aufgrund fehlender Kontiguität nicht zu einer assoziativen Verknüpfung dieses neuen Kontext mit dem Elektroschock (siehe 1.2.1). Werden die Tiere zum Gedächtnistest in diesen Kontext gesetzt, zeigen sie daher kein Erstarren. Werden die Tiere allerdings erneut im Gedächtnistest in dem Kontext untersucht, der ursprünglich für die Furchtkonditionierung und anschließende Extinktion verwendet wurde, ist erneut die aversive Verhaltensweise des Erstarrens zu beobachten.

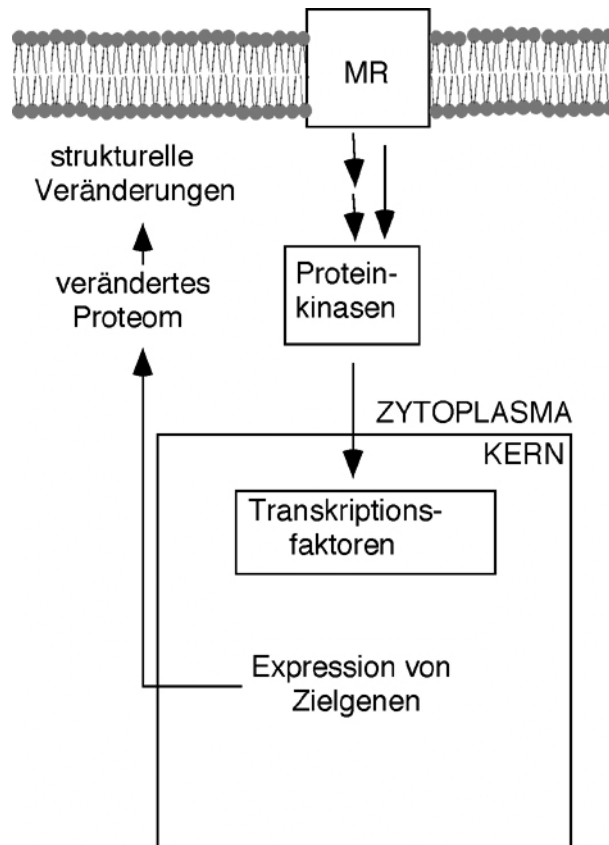
### 1.3 Molekulare Mechanismen der Gedächtniskonsolidierung

Mit der fortschreitenden Entwicklung neuer molekularbiologischer Methoden wurde es möglich spezifische Vorgänge der Gedächtniskonsolidierung auf zellulärer Ebene zu untersuchen. Schon früh fand man heraus, dass zur Abspeicherung einer Information im Langzeitgedächtnis, nicht aber im Kurzzeitgedächtnis, *de novo* mRNA- und Proteinsynthese notwendig war. Dieser Befund konnte in zahlreichen Arbeiten sowohl für Invertebraten, als auch für Säuger bestätigt werden und gilt seitdem als Voraussetzung für Gedächtniskonsolidierung (Flexner et al., 1963; Agranoff, 1967; Barondes, 1975; Davis und Squire, 1984; Castellucci et al., 1989; Tully et al., 1994; Rose, 1995). Inhibitoren der mRNA oder Proteinsynthese wirkten dabei nur, wenn sie während eines bestimmten Zeitraumes der Gedächtniskonsolidierung verabreicht wurden. Wurden die Inhibitoren nach diesem kritischen Zeitpunkt injiziert, hatten sie keinen Einfluss auf die Ausbildung des Langzeitgedächtnis. Wichtig war auch die Entdeckung der sogenannten Langzeitpotenzierung (LTP; Bliss und Lømo, 1973). Sie war die Bestätigung der von Donald Hebb bereits 1949 aufgestellte Hypothese, dass das gleichzeitige Feuern miteinander vernetzter Neuronen, die Erregbarkeit der Zielzelle über einen langen Zeitraum hin verstärken kann (Hebb, 1949). Vor allem an hippokampalen Gewebeschnitten konnte gezeigt werden, dass vernetzte Neuronen, die mehrmals mit einer bestimmten Frequenz elektrisch stimuliert wurden, anschließend in Antwort auf einen bestimmten Reiz deutlich stärker feuerten als zuvor (Kandel, 1997; Millner, 1998). Da Proteinsynthese auch für die Ausbildung der LTP notwendig ist (Nguyen et al., 1994) vermutete man, dass die während der Gedächtniskonsolidierung neusynthetisierten Proteine vor allem die Erregbarkeit der Neuronen durch strukturelle Modifikationen beeinflussen. In den folgenden Jahren begann die Suche nach molekularen Mechanismen und den entsprechenden Genen, die während dieser proteinsyntheseabhängigen Phase der Gedächtniskonsolidierung aktiviert werden.



Ein entscheidender Mechanismus ist der intrazelluläre Anstieg der cAMP Konzentration, der durch die Adenylat-Zyklase vermittelt wird (Roberson und Sweatt, 1996). Die Proteinkinase A (PKA) wird daraufhin aktiviert und phosphoryliert weitere Komponenten des Signalweges (Roberson und Sweatt, 1996; Sananbenesi et al., 2002), unter anderem Transkriptionsfaktoren. Ein solcher Transkriptionsfaktor ist z.B. das cAMP-Antwort-Element Bindeprotein (Creb; Kaang et al., 1993; Alberini, 1999). In transgenen Mäusen mit deletiertem *CREB* Gen, konnte dessen Funktion während der Gedächtniskonsolidierung bestätigt werden, da diese Mäuse in der Furchtkonditionierung, im Morris-Wasser-Labyrinth-Test und auch bezüglich der Ausbildung von LTP deutlich inhibiert sind (Bourtchuladze et al., 1994). Mittlerweile mehren sich Hinweise, dass Creb nicht nur durch den cAMP/PKA Weg, sondern auch durch weitere Proteinkinasen wie die Proteinkinase C (PKC) oder den Mitogen-aktivierten (MAP) Kinase Weg aktiviert werden kann (Wolfman et al., 1994; Deisseroth et al., 1996; Atkins et al., 1998) und dass all diese Signalwege zudem miteinander interagieren können.

Zusammenfassend ist also zu sagen, dass Nervenzellen, die durch Neurotransmitterausschüttung prä-synaptischer Nervenendigungen gereizt werden eine intrazelluläre Signalkaskade aktivieren, die u.a. zu einer veränderten Genexpression führt, was in einer strukturellen Veränderung des Neurons resultiert. Vermutlich sind solche strukturellen und morphologischen Veränderungen die Grundlage für eine Informationsverarbeitung während der Gedächtniskonsolidierung (Rossum und Hanisch, 1999; Abb.1.3). Es wird aber auch deutlich, dass trotz intensiver Forschung das Wissen um die Komponenten dieser Signalwege und deren Funktion noch sehr begrenzt ist. Die Entdeckung weiterer beteiligter Gene und Proteine und deren Charakterisierung ist daher unerlässlich, um so komplexe Prozesse wie die Gedächtniskonsolidierung zu verstehen.



**Abb.1.3.** Schematische Darstellung der molekularen Ereignisse während der Gedächtniskonsolidierung.

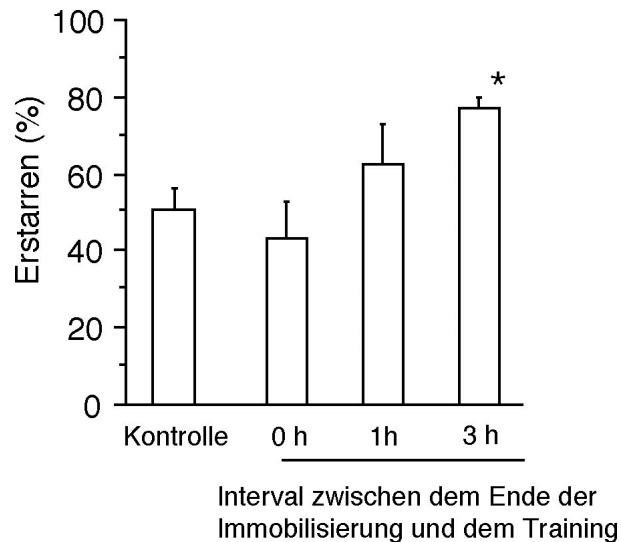
Membranrezeptoren (MR) werden durch Neurotransmitter aktiviert und aktivieren direkt (Pfeil) oder indirekt (Doppelpfeil), z.B. über die Adenylat-Zyklase, zytoplasmatische Proteinkinasen, was eine Signalkaskade auslöst, die über das Anschalten von Transkriptionsfaktoren zur Expression von Genen führt und so schließlich das Proteom der Nervenzelle verändert, was als Voraussetzung für Gedächtniskonsolidierung betrachtet wird.

#### 1.4 Modulation der Gedächtniskonsolidierung durch Stress

Anfang des 20. Jh. erkannte der amerikanische Physiologe Walter B. Cannon, dass durch erregende psychische oder emotionale Reize wie Schmerz, Hunger, Angst oder Wut bei Mensch und Tier ein vielfältiges Mosaik von körperlichen Veränderungen auftritt. Die Magen- und Darm-Tätigkeit verminderte sich, die Durchblutung und Leistungsfähigkeit der Herz- und Skelett-Muskulatur erhöhte sich dagegen. Zudem war eine Steigerung von Blutdruck, Atem und

Herzschlagfrequenz, ein Anstieg der roten Blutkörperchen und des Blutzuckergehalts zu beobachten (Cannon, 1923). Cannon sah den biologischen Nutzen dieser körperlichen Veränderung in der Fähigkeit des Individuums, sich aktiv mit kritischen Umweltbedingungen auseinanderzusetzen, es also auf Kampf oder Flucht vorzubereiten. Er war sich aber auch bewußt, dass nicht jeder emotionale Prozess den Organismus aktiviert. Eine missliche Situation konnte auch in ein apathisches, inaktives Verhalten münden, wenn sie sich durch Handeln nicht vermeiden ließ. Herzschlagfrequenz und Blutdruck sanken dann. Schon Charles Darwin hatte das in seinem 1872 erschienen Buch „Der Ausdruck der Gemütsbewegung bei Menschen und Tieren“ beschrieben [Darwin, 2000 (Herausgabe)]. Er sprach dabei von einem Gefühl des Verzweifeltseins oder tiefen Kummers, wenn der Organismus sich in einer ausweglosen Situation befand. Die von Cannon beobachteten körperlichen Veränderungen nennt man heute Stress. Ursprünglich ist Stress ein technischer Begriff um eine Ursache zu beschreiben, die ein Ungleichgewicht herbeiführt. Die Biologie hat sich dieses Wort zu eigen gemacht und versteht unter einem Stressor eine Herausforderung an einen Organismus, die das physiologische Gleichgewicht, die Homöostase verändert. Die Reaktion des Körpers auf den auslösenden Stressor ist dann der Stress. Interessanterweise führt Stress sowohl bei Menschen, als auch bei Versuchstieren zu Änderungen des Verhaltens, wie z.B. verstärkter Angst (Radulovic et al., 1999) oder der Modulation von kognitiven Eigenschaften (Radulovic et al., 1999, Kim und Diamond, 2002; Bartolomucci et al., 2002). Hierbei ist es notwendig zwischen akutem (kurzfristigem) und chronischem Stress zu unterscheiden, dem der Organismus regelmäßig, über einen langen Zeitraum ausgesetzt ist. Interessanterweise fand man heraus, dass die Gedächtniskonsolidierung durch bestimmte Formen von akutem Stress deutlich verbessert werden konnte (Shors et al., 1992; Radulovic et al., 1999). Mäuse die für 1h einem akuten Immobilisationsstress ausgesetzt wurden, erlernten die konditionierte Furcht deutlich besser als entsprechend nicht gestresste Tiere, wenn sie 3 h nach Ende der Immobilisation mittels kontext-

und tonabhängiger Furchtkonditionierung trainiert wurden (Abb. 1.3, nach Radulovic et al., 1999).



**Abb. 1.4.** Immobilisationsstress verbessert die Furchtkonditionierung von Balb/c Mäusen.

Männliche Balb/c Mäuse wurden durch Immobilisierung für 1 h akutem Stress ausgesetzt. Wurden die Tiere 3 h nach dem Ende der Immobilisierung mittels kontextabhängiger Furchtkonditionierung trainiert, zeigten sie im 24 h später durchgeführten Gedächtnistest ein signifikant verstärktes Erstarren ( $*P < 0,005$  vs. Kontrolle), was auf eine verbesserte Gedächtniskonsolidierung schließen lässt. Als Kontrolle wurden Tiere verwendet, die vor dem Training nicht gestresst wurden.

Diese Versuche deuten darauf hin, dass die molekularen Kaskaden, die durch einen externen Stressor ausgelöst werden, mit den bei der Gedächtniskonsolidierung aktivierten Kaskaden interferieren (Silva et al., 1997; Serova et al., 1998, Cammarota et al., 2000).

## 1.5 Das limbische System: Septum und Hippokampus

Das limbische System ist evolutiv gesehen eine sehr alte Struktur und entwickelte sich als erster Teil des Vorderhirns. Bei relativ einfachen Wirbeltieren wie dem Krokodil macht es annähernd das gesamte Vorderhirn aus und dient vor allem dem Geruchssinn, also der Analyse von Intensität, Qualität und Richtung von Gerüchen, der dann anschließend eine geeignete Reaktion folgt. Im Laufe der Evolution gingen die olfaktorischen Funktionen des limbischen Systems fast vollständig verloren. Bei höheren Säugern dienen die Strukturen hauptsächlich der Koordination von Verhaltensmustern wie Nahrungsaufnahme, Verteidigung und Reproduktion, vor allem aber der Regulation von Emotionen. Außerdem ist das limbische System in den komplexen Vorgang der Gedächtnisbildung involviert. Dieses Wechselspiel von Emotionen und Gedächtnis ist dabei im evolutiven Zusammenhang zu sehen. Gedächtnis förderte sehr wahrscheinlich das Überleben, da es wichtig war den Geruch und Geschmack von bekömmlicher und schädlicher Nahrung zu erinnern. Das limbische System umfaßt Teile des Frontallappens, Amygdala, Hypothalamus, Thalamus, Hippokampus und Septum (siehe Paxinos, G.: The Rat Nervous System, 2<sup>nd</sup> Edition, Academic Press). Für die vorliegende Arbeit sind insbesondere das Septum und der Hippokampus von Bedeutung und sollen daher eingehender besprochen werden.

### 1.5.1 Septum

Das Septum ist eine telencephale Struktur und liegt unterhalb der vorderen und mittleren Regionen des Corpus callosum, zwischen dem vorderen Horn der lateralen Ventrikel. Man unterteilt das Septum in einen medialen, lateralen und vorderen Abschnitt, wobei die Zellen des lateralen Septum vor allem immunoreaktiv für  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) sind. Das mediale Septum zeigt Immunoreaktivität für Acetylcholin und GABA, wogegen das vordere Septum in Bezug auf die verwendeten Neurotransmitter nur wenig untersucht ist. Efferente Bahnen

projizieren vom lateralen Septum zum Hypothalamus, insbesondere zum paraventriculären Nucleus (PVN), zum Hippokampus, insbesondere zu den Regionen CA1 und CA3, sowie zum Bed Nucleus des Stria Terminalis (BST). Der Hippokampus macht 55% der gesamten afferenten Bahnen aus, die in das laterale Septum projizieren. Auch das mediale Septum projiziert in den Hippokampus. Über die Fimbria/Fornix-Verbindung enden die vorwiegend cholinergen und GABA-ergen Neuronen im Fascia dentata, in CA1 und CA2. GABA-erge nicht-pyramidale Zellen, des Stratum oriens der Regionen CA1, CA2 und CA3 innervieren umgekehrt das mediale Septum. Wegen der engen Verbindung von Septum und Hippokampus spricht man daher auch vom septo-hippokampalen System. Intra-septale Verbindungen vom lateralen zum medialen Septum sind zwar vermutet, bisher aber nicht eindeutig nachgewiesen worden. Eine Verbindung vom medialen zum lateralen Septum gilt dagegen als sicher (siehe Paxinos, G.: *The Rat Nervous System*, 2<sup>nd</sup> Edition, Academic Press). Das Septum ist u.a. an der Regulation der Gedächtniskonsolidierung beteiligt. So konnte gezeigt werden, dass septale Läsionen die kontextabhängige Furchtkonditionierung in Ratten verbessern, jedoch keinen Einfluß auf den Erwerb tonabhängiger Furcht haben (Sparks und LeDoux, 1995). Das eine intraseptale Injektion des Corticotropin Releasing Faktor (CRF)-Rezeptor 2 Antagonisten Anitsauvagine-30, ebenfalls assoziatives Lernen in Mäusen verbessert (Radulovic et al., 1999), deutet auf eine inhibitorische Funktion des Septum während der Furchtkonditionierung hin. In Einklang damit sind Studien, in denen eine durch hochfrequente Stimulation der Fimbria/Fornix Verbindung im Septum induzierte LTP, die kontextabhängige Furchtkonditionierung in Mäusen verschlechtert (Vouimba et al, 1998, Desmedt et al., 1999). Andererseits führt die pharmakologische Inhibition septaler NMDA Rezeptoren zu einer Verschlechterung der kontextabhängigen Furchtkonditionierung in Mäusen (Radulovic et al., 2000). In einer anderen Form des Lernens, dem räumlichen Lernen mittels dem Morris-Wasser-Labyrinth-Test (Morris, 1991) verhindern sowohl Läsionen des Septum, als auch der Fimbria/Fornix Verbindung das Lernen (Segal et al., 1989; Marston et al,

1993), was darauf hinweist, dass das Septum sehr spezifisch, positiv als auch negativ auf die Gedächtniskonsolidierung einwirken kann.

### 1.5.2 Hippokampus

Der Hippokampus besteht aus dem Fascia dentata (engl.: *dentate gyrus*) und den Regionen CA1, CA2 und CA3. Manche Autoren zählen auch den subikularen Komplex und den entorhinalen Cortex zum Hippokampus und sprechen dann von der hippokampalen Formation. Der Fascia dentata wird in drei Schichten unterteilt. Die granuläre Schicht enthält viele, meist unmyelierte Neurone, die vorwiegend GABA als Neurotransmitter verwenden. Die molekulare Schicht besteht hauptsächlich aus Dendriten der Neuronen der granulären Schicht aber auch eigenen Zellkörpern. Granuläre und molekulare Schicht umschließen u-förmig die polymorphe Schicht, die aus großen Neuronen besteht, welche immunoreaktiv für Somatostatin sind. Der entorhinale Cortex, das Septum, der vordere Hypothalamus, der blaue Kern (Locus coeruleus) und der Nucleus Raphe entsenden afferente Bahnen in den Fascia dentata. Die typischen Zellen des Hippokampus sind die Pyramidenzellen, die sich in den Regionen CA1, CA2 und CA3 finden. In der Region CA3 erreichen die Dendriten der pyramidalen Zellen Längen bis zu 16 mm, wogegen die Zellen des CA1 deutlich kleiner sind. Die Region CA2 besteht aus dunklen, großen Pyramidenzellen, die große Mengen an Acetylcholinesterase und dem Kalzium-Binde-Protein aufweisen. CA3 projiziert sowohl in die Regionen CA1 und CA2, als auch in das Septum, wobei diese Verbindung bilateral ist (siehe 1.5.1). CA2 sendet afferente Bahnen in die polymorphe Schicht des Fascia dentata und in die Region CA1. Efferente Bahnen erreichen die Region CA2 vom vorderen Hypothalamus und von CA3. Die Region CA1 empfängt, wenn auch geringer als CA3, afferente Bahnen vom Septum und der Amygdala. Wie das Septum ist auch der Hippokampus in die Regulation von Emotionen und Gedächtniskonsolidierung involviert.

Hippokampale Läsionen verhindern den Erwerb von kontext- aber nicht tonabhängiger Furcht in Ratten. Wurde die Läsion eine Woche nach dem Training durchgeführt, zeigten die Tiere in dem anschließenden Gedächtnistest allerdings keine Defizite (Kim und Fanselow, 1992), was zeigt, dass die Information während der Gedächtniskonsolidierung durch den Hippokampus verarbeitet, dort aber nicht gespeichert wird. Neben der Furchtkonditionierung konnte für eine Reihe weiterer Lernmodelle eine essentielle Funktion des Hippokampus beschrieben werden (Castro et al., 1989; Marston, 1993; Shinjo et al., 1998; Luo et al., 2002). Da der Hippokampus nicht nur in Nagetieren, sondern auch bei Menschen wichtig für die Ausbildung von Erinnerungen ist, wurde besonders an dem Fall des Patienten H.M. deutlich. Aufgrund einer lebensgefährlichen Epilepsie hatte sich H.M. zu einem chirurgischen Eingriff entschlossen, bei dem ihm der gesamte Hippokampus entfernt worden war. Die Folge war zwar eine deutliche Verbesserung der Symptome der Epilepsie aber auch eine retrograde Amnesie, d.h. H.M. erinnert sich zwar an sein Leben vor der Operation, ist aber unfähig neue Informationen im Langzeitgedächtnis abzuspeichern, wobei das Kurzzeitgedächtnis unbeeinträchtigt blieb (Scoville und Milner, 1957).

## **1.6 Zielsetzung der Arbeit**

Unser Labor konnte kürzlich zeigen, dass 1 h Immobilisationsstress die Gedächtniskonsolidierung von Balb/c Mäusen verbessert, wenn die Tiere 3 h nach der Beendigung der Immobilisierung mittels der Furchtkonditionierung trainiert wurden (siehe Abb. 1.4). Daneben konnte auch eine Verstärkung der Angst beobachtet werden, wenn die Tiere 0,5 h nach Ende der Immobilisierung im Erhöhten-Plus-Labyrinth-Test untersucht wurden. Es zeigte sich, dass sowohl das Septum als auch der Hippokampus für die stressvermittelte Modulierung der Angst und Gedächtniskonsolidierung verantwortlich waren (Radulovic et al., 1999). Da die beobachteten Verhaltensänderungen in einem Zeitfenster von 0,5 -3 h nach der Beendigung der Immobilisierung auftraten, wurde die Vermutung aufgestellt, dass eine veränderte Genexpression



im Septum und Hippokampus hierfür verantwortlich sein könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde in einer vorangegangenen Arbeit mittels einer Subtraktiver Hybridisierung (Diatchenko et al., 1996) nach Genen gesucht, die zu den Zeitpunkten 0,5 und 3 h nach einer einstündigen Immobilisierung im Septum und Hippokampus von Balb/c Mäusen differentiell exprimiert sind (Fischer, 2000). Das Ergebnis waren subtrahierte cDNA-Bibliotheken von Sequenzen, die sich von Genen ableiten, die wahrscheinlich durch Immobilisationsstress reguliert wurden. Durch „Differentielles Screening“ (Sambrook et al., 1989; Clontech „*PCR Select Differential Screening Kit*“ Benutzerhandbuch) konnten verschiedenen Sequenzen dieser cDNA-Bibliotheken identifiziert werden. Dabei war zu beachten, dass durch jedes „Differentielle Screening“ jeweils 96 Klone, also immer nur ein Teil der subtrahierten Bibliothek analysiert werden kann (Fischer, 2000).

Ziel dieser Arbeit war es, durch ein nochmaliges „Differentielles Screening“ weitere Sequenzen der subtrahierten cDNA Bibliothek zu identifizieren. Aus den so erhaltenen und bereits zuvor beschriebenen Sequenzen (Fischer, 2000), sollte im Anschluss ein geeigneter Kandidat für eine eingehende Untersuchung ausgewählt werden. Dabei sollten solche Gene im Vordergrund stehen, die bisher weder mit Stress, Angst oder Gedächtniskonsolidierung in Verbindung gebracht wurden. Zunächst sollte mittels RT-PCR und *In Situ* Hybridisierung die differentielle Genexpression in Abhängigkeit von Immobilisationsstress verifiziert werden. Anschließend sollte auch die entsprechende Proteinproduktion durch Immunoblot und immunohistochemische Analysen untersucht werden. Außerdem sollte die strukturelle und zelluläre Lokalisation des entsprechenden Proteins durch immunohistochemische Doppelfärbungen mit geeigneten Marker-Proteinen bestimmt werden.

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollten Untersuchungen durchgeführt werden, die dazu dienen eine mögliche Funktion des für die Untersuchung ausgewählten Proteins während der stressvermittelten Angst oder Gedächtniskonsolidierung zu beweisen. Hierzu sollten sowohl

molekular- als auch verhaltensbiologische Methoden zur Anwendung kommen. Der Ansatz dieser Arbeit erlaubte es dabei, Gene zu identifizieren, die möglicherweise Einfluss auf die stressvermittelte Angst oder die stressvermittelte Gedächtniskonsolidierung ausüben. Sollte sich im Verlauf der Experimente herausstellen, dass das untersuchte Protein tatsächlich an der Regulation einer dieser Gehirnfunktionen beteiligt ist, sollte sich die weitere Arbeit darauf konzentrieren die Rolle dieses Proteins für diese Gehirnfunktion zu analysieren. Um abschätzen zu können, inwieweit eine das Verhalten beeinflussende Funktion des Proteins zwischen verschiedenen Mausstämmen konserviert ist, sollten diesbezüglich auch C57BL/6J Mäusen untersucht werden, da dieser Mausstamm sich in seinen kognitiven Fähigkeiten signifikant von Balb/c Mäusen unterscheidet.

## 2. Material und Methoden

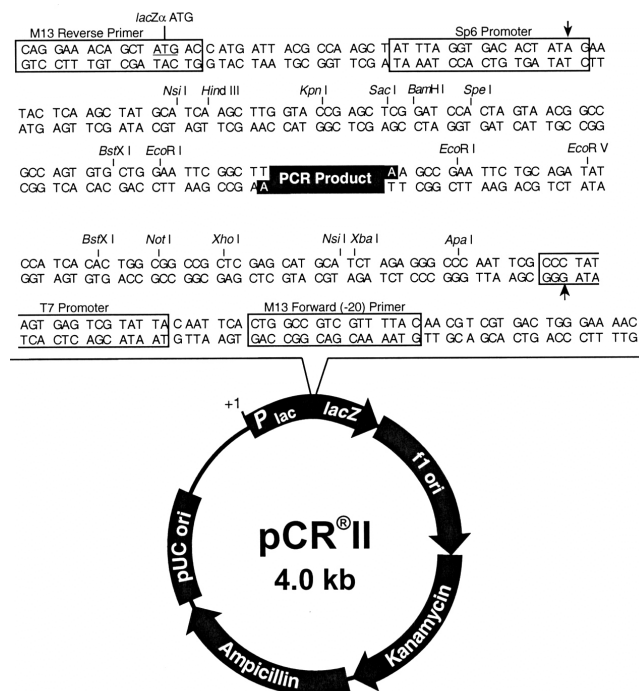
### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterienstamm

*E. coli* One Shot™ INVαF<sup>-</sup> (Invitrogen)

[endA1, recA1, hsdR17(r<sup>-k</sup>m<sup>+k</sup>), supE44, λ<sup>-</sup>, thi-1, gyrA, relA1, φ80 lacZΔM15Δ (lacZYA-argF), deoR<sup>+</sup>, F<sup>-</sup>]

#### 2.1.2 Plasmide



**Abb.2.1.2.** Schematische Darstellung des pCR®II Plasmids (nach dem Invitrogen Handbuch).

Für die Klonierung von PCR-Produkten wurde der Vektor pCRII aus dem *TA Cloning Kit*

(Invitrogen) verwendet. pCRII ist ein 3932 langer linearisierter Vektor mit zwei 3`-

Didesoxythymine-Überhängen. PCR-Produkte (PCR, Polymerase-Ketten-Reaktion; Mullis &

Fallona, 1987, Saiki et al., 1988), welche durch die matrizenunabhängige Aktivität der Taq-Polymerase am 3'-Ende des Duplex-Moleküls einzelne Deoxyadenosin-Reste tragen, können daher direkt mit dem Vektor ligiert werden. Es entsteht so ein zirkuläres DNA-Molekül mit zwei Nicks an den Insertionsstellen, welches direkt zur Transformation in *E.coli* eingesetzt werden kann. Die zwei dT-Überhänge des Vektors werden von jeweils einer EcoRI-Schnittstelle flankiert und befinden sich innerhalb des Mehrfachklonierungsbereiches. Dieser codiert 18 potentielle Restriktionsschnittstellen und wird von den Promotoren SP6 und T7, sowie von einer Bindungsstelle der M13-reverse und M13-forward Primer flankiert. Um eine Identifikation von rekombinanten Plasmiden zu erleichtern trägt der Vektor ein *lacZ* Gen unter der Kontrolle eines *lac* Promotors (*Plac*). Die Integration eines Inserts führt zu einem defekten *lacZ* Gen und somit zum Verlust der Fähigkeit des Abbaus von X-Gal durch  $\alpha$ -Komplementation der  $\beta$ -Galaktosidase in den  $\phi 80$  *lacZ* $\Delta$ qM15 kompetenten Zellen. Blaue Kolonien verfügen also über ein funktionelles *lacZ* Gen und tragen daher kein Insert, wogegen weiße Kolonien ein Plasmid mit integriertem Insert tragen (Marchuk et al., 1991). Der Vektor trägt zusätzlich eine Kanamycin- und Ampicillinresistenz sowie den ColE1 Replikationsursprung, der die Replikation des Vektors in *E.coli* ermöglicht.

### 2.1.3 DNA/RNA Längenstandards

1-KB-Leiter (Gibco BRL, Eggerstein; D)

$\phi$ X174 DNA/Hea III Fragmente (Gibco BRL, Eggerstein; D)

0,24 - 9,4 Kb-RNA-Leiter (Gibco BRL, Eggerstein; D)

### 2.1.4 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung Ultra Pure Protogel<sup>TM</sup> (National dDiagnostics, Atlanta, USA)

ATP (Sigma, Deisenhofen, D)

$\alpha$ 32-P dATP (Amersham, Little Chalfont, Buckinghamshire, GB)

$\gamma$ 32-P dATP (Amersham, Little Chalfont, Buckinghamshire, GB)

Agarose (Gibco BRL, Eggerstein; D)

Alkylphenylpolyethylenglykol (Triton<sup>®</sup> X-100, TX-100, Pierce Rockford, USA)

Anisomycin (Sigma, Deisenhofen, D)

Ampicillin (Natriumsalz) (Biomol, Hamburg, D)

Ammoniumpersulfat (APS; Biorad, München, D)

Bacto-Agar (Difco, Dreieich, D)

Bacto-Trypton (Difco, Dreieich, D)

$\beta$ -Mercaptoethanol (Flika, Buchs, CH)

Butyrolactone I (Calbiochem, Darmstadt, D)

Bromphenolblau (Pierce, Rockford, USA)

5'-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid (X-Gal; Biomol, Hamburg, D)

Cytochalasin D (Biomol, Hamburg, D)

3,3'-Diaminobenzidine Tablet Sets (DAB, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D)

Dimethylsulfoxid (DMSO; Fluka, Neu-Ulm, D)

Dithiothreitol (DTT; Serva, Heidelberg, D)

dNTP-Mix (Gibco BRL, Eggerstein; D)

Ethanol (Riedel de Haen, Seelze, D)

Ethidiumbromid (Gibco BRL, Eggerstein, D)

Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (EDTA; Serva, Heidelberg, D)

Färbelösung-Konzentrat Protein Assay (BioRad München, D)

Formamid (Fluka, Neu-Ulm, D)

Gelatine, (Merck, Darmstadt, D)

Glycerin (Biomol, Hamburg, D)

Hefe-Extrakt (Difco, Dreieich, D)

Histone H1 (Gibco BRL, Eggerstein, D)

I-Block<sup>™</sup> (Tropix, Bedford, USA)

Natriumazid (Merck, Darmstadt, D)

Natriumdodecylsulfat (SDS; BioRad, München, D)  
Natriumethylmercurithiosalicylsäure (Thimerosal, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D)  
Nonidet<sup>®</sup> P40, wässrige Lösung 10 % (w/v) (Boehringer Mannheim, Mannheim, D)  
Paraformaldehyd (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D)  
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF, Merck, Darmstadt, D)  
Phenol, TE-gesättigt (Gibco BRL, Eggerstein, D)  
Polyoxyethylen-Sorbitan Monolaurat (Tween<sup>®</sup> 20, BioRad, München, D)  
Ponceau S (Merck, Darmstadt, D)  
Rinderserumalbumin (BSA, Pierce, Rockford, USA)  
SDS-PAGE Proteinstandard (BioRad, München, D)  
Szintillationslösung ECOLUMETM (ICN Biomedicals Inc., Irvine, USA)  
N, N, N', N'-Tetramethyl-ethyl-diamine(TEMED, Serva, Heidelberg, D)  
Tribromethanol (Sigma, Deisenhofen, D)  
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS; Sigma, Deisenhofen, D)  
Ultra-Pure Protogel (Kimberly Research; Atlanta, GE, USA)

Alle nicht aufgeführten Chemikalien (p.a. Qualität) stammen von der Firma Merck (Darmstadt, D).

### **2.1.5 Enzyme und Antikörper**

Alkaline Phosphatase konjugierter Ziege Anti-Kaninchen Antikörper (Tropix, Bedford, MA, USA)  
Alkaline Phosphatase konjugierter Ziege Anti-Maus Antikörper (Tropix, Bedford, MA, USA)  
Anti-Acetylcholinesterase Antikörper, E-19 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D)  
Anti-Cdk1/Cdc2, 06-141 Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D)  
Anti-Cdk2 Antikörper, H-298 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D)  
Anti-Cdk5 Antikörper, J-3 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D)

Anti-cFos Antikörper (Oncogene science, Cambridge, MA, USA)  
Anti-Digoxigenin AP Fab Fragment (Gibco BRL, Eggerstein, D)  
Anti-GFAP Antikörper (PharMingen, San Diego, CA, USA)  
Anti-Neurofilament 68 Antikörper, Klon NR4 (Sigma, Deisenhofen, D)  
Anti-p35 Antikörper, H-72 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D)  
Anti-p35 Antikörper, N-19 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D)  
Anti-p35 Antikörper, C-20 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D)  
Anti-Sp1 Antikörper (Upstate Biotechnologies, Hamburg, D)  
Anti-Sp3 Antikörper (Upstate Biotechnologies, Hamburg, D)  
Anti-Sp4 Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D)  
50 x Advantage cDNA Polymerase-Mix (Clontech, Palo Alto, CA, USA)  
EcoRV Restriktionsenzym (MBI Fermentas, Vilnius, Lit)  
Exo(-) Klenow-Enzym (5 U/μl; Clontech, Palo Alto; CA, USA)  
RibonukleaseH 5U/μl; MBI Fermentas, Vilnius, Lit)  
Ribonuklease-Inhibitor (20 U/μl; MBI Fermentas, Vilnius, Lit)  
Superscript II Reverse Transkriptase (Gibco BRL, Eggerstein, D)  
SpeI Restriktionsenzym (MBI Fermentas, Vilnius, Lit)  
Sp6 RNA Polymerase (Gibco BRL, Eggerstein, D)  
T4-DNA-Ligase (400 U/μl; New England Biolabs, GB)  
T7 RNA Polymerase (Gibco BRL, Eggerstein, D)

### **2.1.6 Sonstige Materialien und Geräte**

Adolf Kühne AG, CH: Lab-Therm-Schüttelinkubator  
Applied Biosystems, Weierstadt, D: DNA-Sequenzierer 373 A, DNA Synthesizer 392A, ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit  
Appligene Oncor, Strassburg, F: Crocodile II-PRC-Gerät, Positive Membranen für Dot- und  
Bachhofer, Tübingen, D: Transilluminator, Filter 302 nm

Beckmann, München, D: Tischkühlzentrifuge GPR und GS6R

Becton/Dickson Labware, NJ, USA: Falcon-Röhrchen 50 ml

Bender & Hobein AG, Zürich, CH: Vortex Genie2

Biometra, Göttingen, D: PCR-Cycler Gradient

BioRad, München, D: Power Supply 3000 V

Clontech, Palo Alto, CA, USA: PCR-Select<sup>TM</sup> cDNA Subtraction Kit, PCR-Select<sup>TM</sup> Differential Screening Kit, ExpressHyb Hybridisation Solution

Conrad Elektronik, Hirschau, D: Breitbandlautsprecher KT-25-DT

Cybertech, Berlin, D: CCD-Kamera mit angeschlossener CS-1 Kontrolleinheit; Win Cam 2.0 Analysesoftware

Fuji, J: BAS Reader II (BAS2000 Fujix Bio-Image Analyzer)

Gilson, Villiers-le-Bel, F: Pipetten

Greiner, Nürtingen, D: 15 ml Röhrchen

Helma, Mülheim, Baden, D: Quarzküvetten

Heraeus Instruments, Hanau, D: Backschrank Kelvitron F6120, -80°C Kühltruhe, Tischzentrifuge Biofuge *pico*

H + P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, D: Varioklav-Dampfsterilisator 500

IKA Staufen, D: Magnetrührer Combimag RCO

Invitrogen, Leek, NL: TA Cloning<sup>TM</sup> Kit

Konica, Salzgitter, D: Röntgenfilmentwickler QX-70

Leica Instruments GmbH, Nußloch, D: Kryostat CM 3050 Mikrotom

LKB Wallac, Turku, Fin: 1209 Rackbeta Flüssigkeitsscintillationszähler

Memmert GmbH & Co KG, Schwabach, D: Trockenschrank Modell 800

Messgeräte-Werk Lauda, Lauda, D: M3 Lauda Wasserbad, GW Lauda RC6-Kühlwasserbad

Metabion, Martinsried, D: Primer

Millipore, Bedford, USA: Milli-Q-Wassersystem

Milteny Biotech: Protein A- und Protein G Microbeads, µMACS Säulen.

Perkin Elmer, Rockville, USA: Gene Amp PCR-System 2400



Phase GmbH, Lübeck, D: Semi Dry Blotter PEGASUS Modell S  
Pharmacia/LKB, Freiburg, D: Gene Quant II-Spektral-Photometer  
Qiagen, Hildesheim, D: Qiagen-Plasmid-Kit, PCR-Purification Kit, QAIEX II  
Gel Extraction Kit  
Hoffmann LaRoche, Basel, CH: DIG RNA Labeling Kit (Sp6/T7)  
Sartorius, Göttingen, D: Feinwaagen  
Savant, NY, USA: Vakuum-Zentrifuge  
Scanbur, Koege, DK: Laminar Flow Cabinet Scantainer  
Schleicher & Schuell, Dassel, D: Rundfilter, Einmalfiltrationsgeräte  
Schütt, Hofheim, D: pH-Meter CG840, Elektrode N1042A  
Sorvall, Bad Nauheim, D: Zentrifuge RC-5B, RC-5C, Rotoren SS34, GSA  
Tropix, MA, USA: CDP-Star, Nitroblock II, Blocking Reagent, 2. Antikörper  
TSE, Bad Homburg, D: Analysesystem 303410 für Furchtkodierung  
Vector, CA, USA: Vectastain®ABC Kit  
Whatman, Mainstone, GB: Filterpapier 3 MM

### **2.1.7 Nährmedien, Lösungen, Puffer**

Alle Nährmedien, Lösungen und Puffer wurden aus voll entsalztem und sterilem Wasser (Milli Q Water System) hergestellt. Zur Sterilfiltration wurden 150 ml oder 500 ml Zelluloseacetatfilter (0.2 µm) verwendet. Die Lagerung erfolgte bis auf die angeführten Ausnahmen bei Raumtemperatur (RT).

#### **2.1.7.1 Nährmedien**

Die Nährmedien wurden jeweils 20 min bei 120°C und 1 atm autoklaviert. Antibiotika wurden den flüssigen Medien jeweils erst kurz vor Gebrauch zugefügt, den festen Medien direkt nach dem Autoklavieren. Ampicillin wurde in einer Endkonzentration von 100 µg/ml

eingesetzt. Zum Nachweis der  $\beta$  Galaktosidase-Aktivität von Transformanten wurden LB-Amp-Platten vor dem Ausplattieren der Zellen mit 50  $\mu$ l X-Gal-Lösung in 100 mg/ml DMSO ausgestrichen. Die Platten wurden anschließend 15 min mit halbgeöffnetem Deckel im Brutschrank bei 37°C inkubiert, um das DMSO zu verdampfen.

LB-Medium: 0.5% Hefe-Extrakt, 1% NaCl, 1% Trypton

### 2.1.7.2 Lösungen und Puffer

Artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF): 10 mM D-Glukose, 2,4 mM  $MgSO_4$ , 2,5 mM  $CaCl_2$ , 124 mM NaCl, 3,3 mM KCl, 1,2 mM  $KH_2PO_4$ , 26,4 mM  $NaHCO_3$

Ampicillin-Stammlösung: 100 mg/ml Ampicillin (Na-Salz) in  $H_2O$ , sterilfiltriert

Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch: Gemisch im Verhältnis 24:1

EDTA-Stammlösung: 0,5 M Stammlösung, pH 8.0 mit 10 N NaOH einstellen

20x EDTA/Glykogen-Gemisch: 0,2 M EDTA, 1 mg/ml Glykogen

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch: Gemisch im Verhältnis 25:24:1

$\beta$ -Mercaptoethanol: 5 M Stammlösung

NaCl-Lösung: 5 M Stammlösung in DEPC behandeltem Wasser

NaOH: 10 N Stammlösung

5x PBS-Puffer: 231 mM  $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ , 85 mM  $NaH_2PO_4 \times H_2O$ , 342 mM NaCl, pH 7,3-7,4; autoklavieren

20x SSC-Puffer: 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0, autoklavieren

50 x TBE-Puffer: 890 mM Tris-Base, 890 mM Borsäure, 25 mM EDTA

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 bzw. pH 8,5

Tris/HCl: 1 M Stammlösung mit HCl auf pH 7,5 einstellen; autoklavieren

Spezielle Lösungen, Puffer und Reaktionszusätze werden im Rahmen der entsprechenden Methoden aufgeführt.

### **2.1.8 Versuchstiere**

Die Experimente wurden mit männlichen, 9 Wochen alten Mäusen des Zuchtstammes Balb/c oder C57BL/6J durchgeführt. Nach der Lieferung wurden die Mäuse einzeln in Standard-Macrolon-Käfigen (Typ 2: 22 cm x 16 cm x 13 cm, Länge x Breite x Höhe) gehalten, welche sich in schallgeschützten, temperatur- und feuchtigkeitskontrollierten Containern (Scantainer) befanden (Raumtemperatur 22 +/- 1°C); Luftfeuchtigkeit 55 +/- 10 %). Die Scantainer standen in lichtgeschützten Schränken, in denen ein künstlicher Tag-Nacht-Zyklus (12 h/12 h) aufrecht erhalten wurde, wobei der Tag-Zyklus jeweils um 7.00 Uhr begann. Die Tiere wurden *ad libitum* mit Standardfutter und Wasser versorgt. Alle Experimente wurden vier Tage nach Liefertermin und 2,5 h nach Beginn des Tag-Zyklus begonnen und stets während des Tag-Zyklus beendet. Der Immobilisationsstress und die Dekapitierung und anschließende Gewebeentnahme fanden in getrennten Räumen statt.

Alle Experimentalbedingungen entsprachen den Richtlinien der Gesellschaft für Labortierwissenschaft Deutschland. Eine entsprechende Genehmigung der Tierversuche durch die Bezirksregierung Braunschweig (604.42502/02-02.97) lag vor.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Immobilisationsstress**

Die Tiere wurden aus ihrem Käfig entnommen und kurz mit Isofluran (Forene®) betäubt. Anschließend wurden die Extremitäten mit Klebestreifen auf einem Tisch fixiert. Nach einer Stunde wurden die Tiere befreit und zurück in ihren Käfig gesetzt, welcher wieder in den Scantainer gestellt wurde.

## 2.2.2 Entnahme von Hirngewebe

Die Entnahme des Hirngewebes wurde auf einer sterilen Metallplatte durchgeführt, die von der Unterseite her durch Trockeneis gekühlt wurde. Dieses diente dazu die Aktivität von endogenen RNasen und Proteasen zu minimieren. Nach der Dekaptierung wurde die Hirnschale geöffnet, das Hirn entnommen und mit einer sterilen Pinzette das laterale Septum und der Hippokampus entnommen.

## 2.2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.3.1 Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

Die Bakterien wurden in SOC- oder LB/Amp-Medium angezogen und bei 37°C bei 200 - 225 Upm geschüttelt (Lab-Therm-Schüttelinkubator). Zur dauerhaften Lagerung der Bakterien bei -80°C wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden Übernachtskulturen im gleichen Verhältnis (v/v) mit steriler 30% Glycerollösung verdünnt.

### 2.2.3.2 Transformation von *E. coli*

Die Transformation erfolgte in modifizierter Form nach Sambrook et al. (1989). Unter sterilen Bedingungen wurden 50 µl *One Shot™ INVαF<sup>+</sup>* kompetente Zellen aus dem *TA Cloning™ Kit* (Invitrogen) langsam auf Eis aufgetaut, vorsichtig zuerst mit 2 µl 0,5 M β-Mercaptoethanol und dann mit 2 µl Ligationsansatz vermischt und dann 30 min auf Eis inkubiert. Danach erhielten die Zellen für 30 s einen Hitzeschock in einem 42°C Wasserbad und wurden im Anschluß daran für 2 min wieder auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurde der Transformationsansatz zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz für 1 h bei 225 Upm geschüttelt (37°C). Pro Ansatz wurden jeweils 50 µl und 200 µl Zellen auf LB-Amp-X-Gal-Platten ausgestrichen und für 18 h bei 37°C inkubiert. Die Farbentwicklung der Kolonien

erfolgte anschließend für 3 h bei 4°C im Kühlschrank. Danach konnten weiße Transformanten selektioniert werden.

### 2.2.3.3 Isolierung von PolyA+RNA aus Hirngewebe

Das verwendete Prinzip zur Isolierung von PolyA+RNA beruht auf der quantitativen Bindung der PolyA+RNA an magnetisch aktive Oligo(dT)Microbeads, wozu der  $\mu$ MACS mRNA Isolation Kit der Firma Milteny verwendet wurde. Nach der Bindung der PolyA+RNA an die Oligo(dT)Microbeads wird die Lösung auf eine in einem magnetischen Feld befindliche Säule gegeben, so dass die Oligo(dT)Microbeads in der Säule verbleiben, andere RNA-Spezien und DNA aber gewaschen werden können. Mit einem Natriumacetatpuffer kann die reine mRNA anschließend von der Säule eluiert werden. Je 60 mg Gewebe wurden in einem durch flüssigen Stickstoff gekühlten Mörser zu einem feinen Gewebepulver zerrieben und anschließend mit einem sterilen, ebenfalls mit flüssigem Stickstoff gekühlten Spatel in ein 4 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 2ml Lysis/Binding-Puffer versetzt. Die Gewebesuspension wurde durch auf- und abziehen mittels einer sterilen Einwegspritze und einer 21 Gauge-Nadel homogenisiert und anschließend 3 min gevortext. Danach wurde die Gewebesuspension auf eine Clear-Lysate-Säule gegeben und 3 min zentrifugiert (13000 x g), um Zellreste zu entfernen und somit die Viskosität der Suspension zu verringern. Anschließend wurden 50  $\mu$ l einer Oligo(dT)Microbead-Lösung durch auf- und abpipettieren in die Gewebesuspension eingemischt. Zuvor wurde eine MACS-Säule in einem Magnetfeld platziert und mit 100 $\mu$ l Lysis/Binding-Puffer äquilibriert. Danach wurde die Oligo(dT)Microbeads enthaltende Gewebesuspension auf die Säule gegeben und 2 x mit 200  $\mu$ l Lysis/Binding-Puffer gewaschen. Diesen Waschschritten folgten zwei weitere mit je 100  $\mu$ l Wasch-Puffer. Anschließend wurde die Säule 2 x mit 25  $\mu$ l DNaseA Lösung gewaschen und je 10 min bei 37°C inkubiert. Nach 4 Waschschritten mit je 100  $\mu$ l Wasch-Puffer wurde die mRNA mit 120  $\mu$ l Elutions-Puffer von der Säule gewaschen und anschließend die Konzentration des Eluats photometrisch vermessen. Um die mRNA für die nachfolgende

cDNA-Synthese einzusetzen wurden jeweils zwei Elutate des gleichen Gewebetyps vereinigt und mit 10 µl Glykol-Carrier-Lösung und 600 µl Ethanol (abs.) bis zur weiteren Verwendung bei -80°C präzipitiert. Vor Gebrauch wurden die Proben 30 min bei 15000 x g in einer Kühlzentrifuge (4°C) zentrifugiert und anschließend in einem geeigneten Volumen DEPC-Wasser aufgenommen.

DEPC-Wasser: 200 µl Diethyl-Pyrocbonat (Sigma, Deisenhofen) in 1 L Millipore-Wasser über Nacht verdampft und anschließend autoklaviert.

Lysis/Binding-Puffer: Hochsalz-Puffer, der 1% SDS enthält .

DNaseA Lösung: Tris/Hcl Puffer, pH 7,2, DNaseA (2 U)

Elutions-Puffer: RNase-freies Wasser mit 1 mM EDTA

Oligo(dT)Microbeads: Super-paramagnetische MACS-Microbeads, an die ein (dT)24-Oligo gekoppelt ist. Der Aufbewahrungspuffer enthält 0,1% SDS.

Wasch-Puffer: Niedrigsalz-Puffer, der NaCl, Tris-HCl und EDTA enthält

#### **2.2.3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Eine grobe Abschätzung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte, indem ein Aliquot der Probe zusammen mit einem Längenstandard bekannter Konzentration auf einem Agarosegel aufgetrennt wurde. Durch den Vergleich der mit Ethidiumbromid gefärbten Nukleinsäuren konnte die Konzentration der Probe abgeschätzt werden. Da Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum bei 260 nm zeigen, konnte die Konzentration einer Probe auch photometrisch bestimmt werden, da nach dem Lambert-Beerschen Gesetz die Absorption einer Lösung der Konzentration der gelösten Substanz proportional ist. Für die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration gelten hierbei folgende Entsprechungen:

$$\begin{aligned} 1 \text{ OD}_{260} &= 50 \text{ ng/}\mu\text{l doppelsträngige DNA} \\ &= 40 \text{ ng/}\mu\text{l RNA} \\ &= 20 \text{ ng/}\mu\text{l Oligonukleotide} \end{aligned}$$

Die Extinktion der Probe wurde außerdem bei 280 nm gemessen, da hier das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt. Der Quotient  $\text{OD}_{260/280}$  gibt daher den Grad der Verunreinigung der Probe durch Proteine an. Reine Präparationen sollen daher einen Quotient  $\text{OD}_{260/280}$  von über 1,6 aufweisen, wenn es sich um DNA und von 2,0, wenn es sich um RNA handelte. Alle photometrischen Messungen wurden in einer Quarzküvette (Helma, Schichtdicke = 1 cm) gegen reines  $\text{H}_2\text{O}$  als Referenzwert durchgeführt.

### **2.2.3.5 Fällung von Nukleinsäuren mit Ethanol**

Die Fällung von DNA oder RNA mit Ethanol dient der Konzentrierung der nukleotidhaltigen Lösung und der Entfernung von Salzen sowie freien Nukleotiden. Bei dieser Methode wird die Konzentration monovalenter Kationen stark erhöht und so die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäure neutralisiert. Durch Zugabe von Ethanol (abs) wird das Lösungsmittel  $\text{H}_2\text{O}$  entzogen und der Nukleinsäure-Salz-Komplex ausgefällt. DNA wurde mit 1/2 Vol. 4 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$  und 2,5 Vol kaltem Ethanol (abs.) versetzt und anschließend 10-30 min bei  $-20^\circ\text{C}$  gefällt. Anschließend wurde die DNA abzentrifugiert (30 min, 15000 x g, bei  $4^\circ\text{C}$ ). Der Überstand wurde verworfen und die pelletierte DNA mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, um verbliebene Salze zu entfernen. Es folgte eine weitere Zentrifugation (10 min, 15000 x g,  $4^\circ\text{C}$ ), wonach der Überstand sorgfältig entfernt und das DNA-Pellet anschließend 5 min bei  $37^\circ\text{C}$  getrocknet wurde, um restliches Ethanol zu verdampfen. Die gereinigte DNA wurde dann in einem geeigneten Volumen  $\text{H}_2\text{O}$  oder TE-Puffer aufgenommen und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. RNA wurde mit 1/6 Vol. 2 M  $\text{NaAc}$  und 1/20 Vol. Glykogen (2mg/ml) gemischt, mit 2,5 Vol. eiskaltem Ethanol (abs) versetzt und bei  $-80^\circ\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung präzipitiert. Vor der Weiterverarbeitung wurde die RNA dann abzentrifugiert (30 min,

15000 x g, 4°C), der Überstand sorgfältig abgenommen, das RNA-Pellet 5-10 min bei RT getrocknet und anschließend in einem geeigneten Volumen DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **2.2.3.6 Extraktion von DNA mit Phenol/Chloroform und Chloroform oder Butanol**

Zur Entfernung von Proteinen aus einer wässrigen DNA-Lösung, wurde diese mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und gründlich gemischt. Die anschließende Trennung der Phasen wurde durch eine Zentrifugation (5 min 13000 x g, RT) beschleunigt. Im Anschluss wurde die obere, wässrige Phase abgenommen und mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, ebenfalls gründlich gemischt und anschließend zentrifugiert (5 min 13000 x g; RT). Es wurde erneut die obere wässrige Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Aus dieser wässrigen Lösung konnte die nun proteinfreie DNA bei Bedarf mit Ethanol ausgefällt werden. Bei Bedarf konnte die Extraktion anstatt mit Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) auch mit Butanol durchgeführt werden. Hierzu wurde die wässrige Phase nach der Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) Extraktion mit 7 Vol. Butanol versetzt, gründlich gemischt und zentrifugiert (5 min 13000 x g, RT). Anschließend wurde die obere Butanolphase abgenommen. Die Extraktion mit Butanol hat den Vorteil, dass hierdurch das Volumen der wässrigen Phase verringert und die DNA somit konzentriert werden kann.

### **2.2.3.7 Agarose-Gelelektrophorese**

Diese Art der Gelelektrophorese wurde zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNA-Fragmenten angewendet. Es wurden Agarosegele unterschiedlicher Größe und Konzentration (0,8%-2%) eingesetzt, wobei kurze DNA-Fragmente in hochprozentigen und lange in niederprozentigen Gelen aufgetrennt wurden. Die Agarose wurde in 1 x TBE-Puffer (50-100 ml) in einer Mikrowelle aufgeköcht und anschließend mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid



versetzt. Nach dem Abkühlen auf 50°C wurde die Agaroselösung in eine Flachbettgelappatur mit einem darüberhängenden Taschenformer der erforderlichen Größe gegossen. Nach der Verfestigung des Gels konnte der Kamm vorsichtig herausgelöst und das Gel in eine mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt werden. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen an Gelbeladungspuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die anschließende Auftrennung der DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe erfolgte bei einer Feldstärke von 15-20 Volt/cm. Anschließend wurden die DNA-Banden auf einem UV-Leuchttisch (Transilluminator, Filter 302 nm; Bachhofer, Tübingen, D) sichtbar gemacht und mit einer CCD-Kamera mit angeschlossener CS-1 Kontrolleinheit (Cybertech, Berlin, D) dokumentiert.

Ethidiumbromid-Stammlösung: 10 mg/ml in H<sub>2</sub>O lichtgeschützt bei 4°C

#### **2.2.3.8 SMART cDNA Synthese**

Mittels der cDNA-Synthese nach der SMART (engl.: *switch mechanism at 3`end of RNA template*) Technologie konnte die Information der mRNA in cDNA umgeschrieben werden, wobei gleichzeitig eine Amplifikation des Ausgangsmaterials stattfand (Chan et al., 1997). Hierbei wird mit einem speziellen cDNA-Synthese-Primer und einer Reversen Transkriptase eine Erststrang cDNA synthetisiert, die am Ende drei überhängende Cytosine besitzt. Ein SMART Oligonukleotid mit drei Guaninen am 3` Ende bindet die überhängenden Cytosine und die Reverse Transkriptase synthetisiert das gesamte 5` Ende der cDNA. Durch den cDNA Synthese-Primer und das SMART Oligonukleotid werden außerdem Anlagerungsstellen für einen PCR-Primer geschaffen. In einer anschließenden PCR-Reaktion kann die Erststrang cDNA amplifiziert werden, so dass eine cDNA Population entsteht, die der Information der mRNA entspricht. Um sicherzugehen, dass die Quantitäten der einzelnen mRNA`s sich in der PCR-

Reaktion nicht verändern, muß darauf geachtet werden, dass diese sich bis zum Abschluß der Reaktion in der exponentiellen Phase befindet.

200 ng mRNA wurden in 3 µl DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt und mit 1 µl cDNA Synthese-Primer und 1 µl SMART Oligonukleotid gemischt und 2 min bei 70 ° C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl 5 x Erststrang-Puffer, 1 µl 20 mM DTT, 1 µl dNTP und 1 µl Superscript II Reverse Transkriptase (GibcoBRL) zu dem Ansatz pipettiert und dieser für 1 h bei 42°C in einem Luftinkubator inkubiert. Der Ansatz wurde mit 120 µl TE-Puffer verdünnt und für 7 min bei 70°C inkubiert. Anschließend konnte die fertige Erststrang cDNA bei -20°C gelagert werden. Für die PCR-Reaktion wurde ein Mastermix für jeweils drei Reaktionen zu je 100 µl pipettiert (siehe 2.2.3.14) und 4 µl der verdünnten Erststrang cDNA als Ausgangsmaterial dazugemischt. Ein Ansatz diente dabei als Kontrolle, um die optimale Anzahl von Amplifikationszyklen zu bestimmen. Alle drei Reaktionen wurden zunächst für 15 Zyklen ( 5 sec 95°C, 5 sec 65°C, 6 min 68°C) inkubiert. Zwei Proben wurden dann auf Eis gestellt. Aus dem verbleibenden Ansatz wurden 15 µl für die Analyse auf einem 1,2 % Agarosegel entnommen und die restlichen 85 µl für 3 weitere PCR-Zyklen inkubiert. Wiederum wurden 15 µl für die Analyse auf dem Agarosegel entnommen und drei weitere PCR-Zyklen durchgeführt. Diese Prozedur wurde wiederholt bis 24 PCR-Zyklen abgeschlossen waren. Die entnommenen Proben wurden dann auf einem 1,2 % Agarosegel aufgetrennt, um die optimale Zyklenzahl für die PCR-Reaktion zu ermitteln. Ein hochmolekularer Schmier zeigt dabei an, dass die PCR-Reaktion die exponentielle Phase verlassen hat. Die Anzahl der Zyklen wurde daher so gewählt, dass die PCR-Reaktion einen Zyklus vor dem Erreichen des Plateaus beendet wurde. Die PCR-Produkte wurden gemäß 2.2.3.9 aufgereinigt, vermessen und auf einem Agarosegel analysiert.

### **2.2.3.9 Aufreinigung von PCR-Produkten**

PCR-Produkte wurden mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit oder des QIAEX II Kit (Qiagen, Hildesheim) über eine Silika-Matrix aufgereinigt . Durch Verwendung dieser

Methoden konnten die PCR-Produkte sowohl von Salzen und Enzymen, als auch von DNA-Fragmenten (< 100 bp) getrennt werden. Für die Aufreinigung durch den QIAquick PCR Purification Kit wurde die zu reinigende Probe mit 5 Volumen an PB-Puffer verdünnt und anschließend auf eine QIAquick Spin-Säule gegeben. DNA-Fragmente (> 100bp) binden dabei an eine Silika-Membran, wobei Enzyme und Salze durch abzentrifugieren und einen anschließenden Waschschrift mit 0,75 ml PE-Puffer entfernt werden. Zur Elution der DNA von der Säule wurden 50 µl Elutions-Puffer auf die Silika-Membran pipettiert und die Säule zentrifugiert (1 min, 13000 x g, RT). Bei Verwendung des QIAEX II Kits wurde die aufzureinigende Probe mit 3 Volumen QX1-Puffer verdünnt und anschließend mit 10 µl QIAEX II-Lösung vermischt. Die QIAEXII-Lösung stellt eine Silika-Matrix dar, die DNA-Fragmente (> 100 bp) binden kann. Um eine optimale Bindung der DNA an die Matrix zu ermöglichen, wurde der Ansatz 10 min bei RT inkubiert und alle 2 min geschüttelt. Danach wurde die Suspension zentrifugiert (30 sec., 13000 x g, RT) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 0,5 ml PE-Puffer resuspendiert und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt und das Pellet anschließend 10-15 min bei RT getrocknet. Die Elution der DNA erfolgte durch Zugabe von 20 µl Elutionspuffer und einer folgenden 10 minütigen Inkubation bei RT, wobei die Suspension alle 2 min geschüttelt wurde. Die Suspension wurde dann zentrifugiert (30 s, 13000 x g, RT) und der Überstand mit der DNA abgenommen. Die Elution wurde in gleicher Weise wiederholt und die Eluate vereinigt.

PB-Puffer: keine Angaben der Herstellerfirma (Qiagen)

PE-Puffer: keine Angaben der Herstellerfirma (Qiagen)

QIAEX II-Lösung: keine Angaben der Herstellerfirma (Qiagen)

Elutions-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8,5

### 2.2.3.10 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen vom Typ II wurden benutzt, um DNA an definierten Stellen zu schneiden. Die Enzyme wurden in glyzerinhaltigem Puffer bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Plasmide wurden mit 5 U Enzym pro  $\mu\text{g}$  DNA für 2 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Das Volumen des Restriktionsansatzes betrug zwischen 20 und 300  $\mu\text{l}$ , wobei darauf geachtet wurde, dass die Konzentration des Glycerins aus dem Enzymlagerungspuffer unter 5 % (v/v) lag, um eine optimale Aktivität der Enzyme zu gewährleisten. Es wurden die empfohlenen und mitgelieferten Puffer für die Reaktionen verwendet. Sofern vorgeschlagen, wurde auch acetyliertes BSA in einer Endkonzentration von 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  zugesetzt. Die Wahl des geeigneten Puffers ist wichtig, da Salz- und pH-Bedingungen kritisch für die Enzymaktivität sind.

Die Reaktion wurde anschließend auf einem Agarosegel kontrolliert.

### 2.2.3.11 Plasmidisolierung in analytischen Mengen (Mini-Präparation)

Die Mini-Präparation erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen SDS-Lyse (Birnboim & Doly, 1979) und Aufreinigung der DNA durch eine Silika-Membran unter Verwendung des Mini-Präp-Kits der Firma Qiagen (Hildesheim, D). In dem ersten Schritt erfolgt die alkalische Lyse von 2 ml Übernachtskultur. Die freigesetzte Plasmid-DNA wird dann unter Hochsalz-Bedingungen an eine Silika-Membran im Zentrifugenröhrchen gebunden und nach zwei Waschschrritten mit PB- bzw. PE-Puffer unter Niedrigsalz-Bedingungen eluiert. Die Ausbeute liegt bei den verwendeten Bakterienstämmen bei ca. 20  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA. Die so gewonnene DNA ist qualitativ für den Verdau mit Restriktionsenzymen, für Transformationen, Ligationen und Sequenzierreaktionen geeignet.

### 2.2.3.12 Ligation doppelsträngiger DNA

Doppelsträngige PCR-Produkte wurden in den doppelsträngigen DNA-Vektor pCR®II aus dem *TA Cloning™ Kit* (Invitrogen) ligiert. Hierbei wurde ein molares Vektor:Insert Verhältnis von 1:1 bis 1:3 gewählt. Um optimale Ligationsraten zu erhalten, wurden ausschließlich frische PCR-Produkte verwendet, da die Deoxyadenosinreste an den 3'-Enden degradieren können. Die Ligation erfolgte in 10x Ligations-Puffer, wobei jeweils 50 ng des Vektors und 4 U T<sub>4</sub>-DNA-Ligase eingesetzt wurden. Der Reaktionsansatz besaß ein Gesamtvolumen von 10 µl und wurde bei 14°C ü.N. inkubiert. Das entstehende zirkuläre Produkt konnte direkt zur Transformation kompetenter *E. coli* verwendet werden.

Ligations-Puffer (10x): keine Angaben der Herstellerfirma (Invitrogen)

### 2.2.3.13 Differentielles Screening

Im Anschluß an eine Subtraktive Hybridisierung (Diatchenko et al., 1996) stellt sich die Frage, welche der angereicherten Gene für die weitere Analyse ausgewählt werden. Hierbei ist zu beachten, dass sich in der subtrahierten Probe je nach eingesetztem Gewebe eine bestimmte Anzahl von Falschpositiven Sequenzen befindet. Falschpositive Sequenzen können durch ein Differentielles Screening identifiziert werden. Ein Vorteil dieser Methode besteht darin, dass eine subtrahierte cDNA Bibliothek durch "differentielles Screenen" beliebig oft nach positiven Klonen durchsucht werden kann. Von der subtrahierten cDNA-Bibliothek wurden 2 µl in *One Shot™INFACT* kompetente Zellen transformiert und anschließend auf Agarplatten ausplattiert. 94 weiße Klone wurden zufällig gepickt und in je 100 µl LB-Amp Medium auf einer *96-well-plate* 2 h bei 37°C geschüttelt. Aufgrund der Subtraktiven Hybridisierung tragen alle Genfragmente der subtrahierten Bibliothek am 3' und 5' Ende Adaptoren, die es ermöglichten, jedes Fragment unter Einsatz der *nested* Primer 1 und 2R zu amplifizieren. Hierzu wurde ein Master-Mix (19 µl pro PCR-Reaktion) für alle 94 Klone

pipettiert, wobei ein einzelner PCR-Ansatz ein Gesamtvolumen von 20 µl besaß. Je 1 µl Bakterienkultur wurde als Ausgangsmaterial eingesetzt und mit 19 µl Master-Mix vermischt. Die PCR-Reaktion wurde zuerst 30 s bei 94°C durchgeführt um die Bakterien aufzubrechen, anschließend folgten 23 Amplifikationszyklen (30 s 95°C, 3 min 68°C).

Je 5 µl jedes PCR-Produkts wurde auf eine neue *96 well plate* übertragen und mit 5 µl Denaturierungspuffer vermischt. Aus jedem *well* wurden danach je 1,5 µl denaturierte PCR-Fragmente entnommen und in identischer Weise auf zwei Nylonmembranen transferiert. Im Anschluß daran wurden die Blots 2 min in Neutralisierungspuffer inkubiert und danach kurz mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Zuletzt wurde die DNA mit UV-Licht (UV Stratalinker, Stratagene; *autocrosslink*, 120 mJ) auf der Membran fixiert. Die Membranen waren nun vorbereitet und konnten bis zur Hybridisierung bei – 20 °C gelagert werden.

Anschließend wurde die cDNA von gestressten und naiven Mäusen radioaktiv markiert. Hierzu wurden je 100 ng cDNA mit H<sub>2</sub>O auf 9 µl aufgefüllt, 8 min bei 95°C denaturiert und dann auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden pro Reaktion 3 µl ATP-Reaktionspuffer, 2 µl *Random Primer Mix*, 5 µl α-<sup>32</sup>P-dATP (3000 Ci/mmol) und 1 µl Klenow-Enzym (5 U/µl) zugegeben und die Sonden 30 min bei 37°C markiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µl Stop-Lösung beendet. Die beiden markierten cDNA-Proben wurden über Sephadex G-50 Säulen aufgereinigt, um verbliebene Nukleotide abzutrennen. Anschließend wurde die spezifische Aktivität der Proben mit einem Szintillationszähler bestimmt. Dazu wurde 2 x je 1 µl markierte Probe auf ein Filterpapier überführt. Eines der Filterpapiere wurde jeweils 3 x 2 min mit 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> gewaschen. Danach wurde die Flüssigkeit aus beiden Filterpapieren verdampft und im Szintillationszähler (1209 Rackbeta, LKB Wallac) gemessen. Die gemessene Radioaktivität des ungewaschenen Filterpapiers stellte dabei die Radioaktivität der gereinigten Probe dar, wogegen auf dem gewaschenen Filterpapier ausschließlich die Radioaktivität der markierten Fragmente (ohne evtl. verbliebene freie Nukleotide) gemessen wurde. Aus der Differenz der beiden Werte konnte auf die Effizienz der Markierungsreaktion geschlossen werden.

Für die Hybridisierung der PCR-Fragmente auf den beiden Nitrozellulose-Membranen mit den radioaktiv markierten Proben, wurde pro Membran 100  $\mu$ l 20 x SSC mit 100  $\mu$ l einer Block-Lösung 5 min gekocht, auf Eis abgekühlt und mit 10 ml auf 68°C erwärmter ExpressHyb-Hybridisierungslösung (Clontech) gemischt. Jede der beiden Membranen wurde dann mit dieser Hybridisierungslösung je 40 min bei 72°C in einem Hybridisierungsröllchen unter konstanter Bewegung prähybridisiert.

Anschließend wurde je  $10^7$  CPM der markierten Proben mit jeweils 50  $\mu$ l 20 x SSC und 50  $\mu$ l Block-Lösung versetzt, 5 min gekocht und dann auf Eis abgeschreckt. Ohne die Membran direkt zu berühren wurden die denaturierten Proben in die entsprechenden Hybridisierungsröllchen gegeben und die Hybridisierung bei 72°C über Nacht fortgeführt. Am nächsten Tag wurden die Membranen 4x 20 min mit niedrigstringentem Puffer bei 68°C und danach 2 x 20 min bei 68°C mit hochstringentem Puffer gewaschen. Zur Detektion der radioaktiven Signale wurden die Membranen mit dem BAS-Reader (BAS2000, Fujix) vermessen. Der Vergleich der Signalintensitäten der entsprechenden Klone auf beiden Membranen wurde mit dem Programm Tina 2.09 ausgeführt.

ATP-Reaktionspuffer: 333 mM Tris/HCl pH 8.0, 33.3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 170  $\mu$ M dCTP, 170  $\mu$ M dGTP, 170  $\mu$ M dTTP

*Random Primer Mix*: 0.9 mg/ml *Random nonamers*, 50 mM Tris/HCl pH 7.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 50  $\mu$ g/ml BSA

Stop-Lösung: 0.1 M EDTA, 500  $\mu$ g/ml Hefe-tRNA

Denaturierungspuffer: 0.6 N NaOH, frisch angesetzt

Neutralisierungspuffer: 0.5 M Tris/HCl pH 7.5

ExpressHyb-Hybridisierungslösung: keine Angaben der Herstellerfirma (Clontech)

niedrigstringenter Puffer: 2x SSC, 0.5% SDS

hochstringenter Puffer: 0.2x SSC, 0.5% SDS

Block-Lösung: 10 mg/ml gescherte Herings-Spermien-DNA, 0.3 mg/ml Oligonukleotide

### 2.2.3.14 Polymerase Kettenreaktion; PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR; Mullis & Fallona, 1987; Saiki *et al.*, 1988) dient der enzymatischen *in vitro* Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente. Die Reaktion besteht aus aufeinanderfolgenden Amplifikationszyklen, die jeweils durch drei Phasen unterschiedlicher Temperatur charakterisiert sind. In der ersten Phase, der Denaturierungsphase, wird eine doppelsträngige DNA-Matrize bei einer Temperatur von 94 - 95°C in eine von Sekundärstrukturen freie Einzelstrang-DNA überführt. In der zweiten Phase, der Anlagerungsphase (*annealing*), wird die Temperatur auf 50 - 68°C abgesenkt. Dadurch können sich spezifische Oligodesoxynukleotide (Primer), die jeweils in entgegengesetzter Orientierung die Zielregion in einer Duplex-DNA flankieren, an die komplementäre Zielregion der denaturierten Matrizen-DNA anlagern. In der Extensionsphase werden dann die Oligodesoxynukleotide durch eine thermostabile DNA-Polymerase bei 68°C bzw. 72°C in 5→3'-Richtung komplementär zur Zielregion verlängert. In den aufeinanderfolgenden Amplifikationszyklen kommt es damit zur exponentiellen Anreicherung der durch die beiden Primer flankierten Ziel-DNA-Sequenz. Um optimale Anlagerungsbedingungen für beide Primer zu schaffen und damit eine spezifische Amplifikation zu gewährleisten, durften sich die eingesetzten Oligodesoxynukleotide nur wenig in Länge und GC-Gehalt voneinander unterscheiden (Wu *et al.*, 1991). Zusätzlich sollten komplementäre Sequenzen innerhalb der Oligodesoxynukleotide vermieden werden, um die Ausbildung von Sekundärstrukturen (Dimere) zu unterdrücken. Für die Synthese der PCR-Produkte wurden *Taq*-Polymerasen verschiedener Hersteller (Qiagen, GibcoBRL, Clontech) und die jeweils mitgelieferten Puffer verwendet.

Die PCR-Reaktionen wurden in 0,2 ml-Reaktionsgefäßen in 20-100 µl-Ansätzen durchgeführt. Für ein Gesamtvolumen von 30 µl wurden die einzelnen Komponenten in folgendem Verhältnis eingesetzt:



Primer ( <i>up</i> ) (10 $\mu$ M):	1 $\mu$ l
Primer ( <i>low</i> ) (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
10 x Puffer	3 $\mu$ l
dNTP-Mix (10 mM)	0,5 $\mu$ l
Taq-Polymerase	0,5 - 1 $\mu$ l
zu amplifizierende DNA	20-100 ng in 2 $\mu$ l
	add 30 $\mu$ l H <sub>2</sub> O

Für alle PCR-Reaktionen wurde ein *hot start* durchgeführt, d.h. dass eine Reaktionskomponente physikalisch und funktional von den anderen Komponenten getrennt ist, bis der erste Amplifikationszyklus beginnt. Auf diese Weise konnte die Bildung unspezifischer PCR-Produkte vor dem Beginn der Reaktionszyklen verhindert werden. Diese können durch die Verlängerung falsch angelagerter oder durch Sekundärstrukturen verzerrter Primer entstehen. Hierzu wurden die PCR-Ansätze erst in die PCR-Maschine gestellt, wenn diese während einer Phase vor dem erstem Amplifikationszyklus 94°C erreicht hatte. Für die Reaktionen wurden PCR-Geräte von Perkin-Elmer (GeneAmp 2400) und Biometra (*TGradient*) verwendet, die mit einem beheizbaren Deckel ausgestattet sind. Es wurde wahlweise der Heizdeckel oder Mineralöl als Verdunstungsschutz gewählt.

Sollte das PCR Produkt für eine anschließende Klonierung mittels eines T/A-Klonierungssystems eingesetzt werden, wurde der Ansatz nach dem letzten Zyklus für 10 min bei 72°C inkubiert. Durch die matrizenunabhängige Aktivität der *Taq*-Polymerase am 3'-Ende des Duplex-Moleküls, werden hierbei einzelne Deoxyadenosin-Reste angefügt. Das PCR-Produkt konnte daher direkt für eine Ligationsreaktion in einen Vektor mit dT-Überhängen eingesetzt werden.

Sofern sie nicht zur Verfügung standen, wurden als Primer Oligodesoxynukleotide von 18-25 Nukleotiden Länge gewählt, die mit dem Programm OLIGO 4.0 entworfen wurden.

Bei der Erstellung der Primer wurde darauf geachtet, dass die Primer wenig Möglichkeiten zur Sekundärstrukturausbildung hatten und der G/C-Gehalt über 50% lag.

Tab.2.1: Verwendete Primer

Primer	Sequenz
G3PDH 3'	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'
G3PDH 5'	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
SMART II Oligo-Nukleotid	5'AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG-3'
SMART-cDNA Synthese Primer	5'AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACT (30)N -1 N-3'
SMART-PCR Primer	5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGGT-3'
cDNA-Synthese Primer	5'-TTTTGTACAAGCTT( 30)-N1-N-3'
3'RACE-cDNA-Synthese Primer	5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTAC(T)30 N -1 N-3'
3'RACE-Primer-Mix	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAA CAACGCAGAGT-3' 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
<i>nested</i> Primer 1	5'-TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT-3'
<i>nested</i> Primer 2R	5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'
A6RACE	5'-TGGGGTAAGAGGCATGAACTGGGTT-3'
CDK5 UP	5'-GATGACGATGAGGGTGTGCCAAGTT-3'
CDK5 LOW	5'-ACATCATTGCCAGGGAAGAGAGGTC-3'
A6 1 UP	5'-TCAAACATGGCAACGGCAGCAAGC-3'
A6 1 LOW	5'-GTCATAGTAGGTTTCATCCCCAGGT-3'
A6 2 UP	5'-AGGGGTGTAGGGAAGTGAGAATGGA-3'
A6 2 LOW	5'-TGGAACAATCTGGAAGGGGTGAGGA-3'
A6 3 UP	5'-CTTCTCCCTTTGTGCTTTCCCGTGA-3'
A6 3 LOW	5'-CTGACCCTACCCACTAATGACCAT-3'
A6 4 UP	5'-TCCCTTCCAAAGACCAATACCCACC-3'
A6 4 LOW	5'-CCTGCTGGCTCCTCTTCTCTGTTTCCTTT-3'
A6 5 UP	5'-TTCCCACAAAGCCCCACAAAGCCAA-3'
A6 5 LOW	5'-GCATGTTGCTTCTTCCGGAGTGTGT-3'
A6 6 UP	5'-CCTTCGGAAAAACAGTCAGTGCTCG-3'
A6 6 LOW	5'-GGCACGAGATGTGGTATGAGCAGGA-3'

### 2.2.3.15 Durchführung einer semiquantitativen PCR

Durch semiquantitative PCR können Konzentrationsunterschiede eines PCR-Fragmentes in verschiedenen Reaktionsansätzen bestimmt werden. Der Vergleich von PCR-Produkten ist möglich, wenn die Amplifikationskurven der entsprechenden PCR's parallel verlaufen, d.h. sich in der linearen Phase befinden und die Reaktionen gleiche Effizienz aufweisen (Köhler, 1995). Die Identifikation von gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Fragmenten im linearen Bereich erfolgte über Intensitätsbestimmung der Banden bei jeweils unterschiedlichen Zyklenzahlen. Aus den Konzentrationsunterschieden der PCR-Fragmente ließ sich dann auf Mengenunterschiede eines bestimmten Ausgangsproduktes rückschließen. Die Auswertung und Intensitätsbestimmung gelelektrophoretisch aufgetrennter PCR-Fragmente erfolgte mit dem Programm WINCAM 2.2.

### 2.2.3.16 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode mit Didesoxynukleotiden (Sanger et al., 1977). Bei dieser Methode werden DNA-Sequenzen ermittelt, indem man Fragmente durch kontrollierte Unterbrechung der enzymatischen Reaktion erzeugt. Die zu sequenzierenden DNA-Stränge werden hierbei in Verbindung mit spezifischen Primern für die Polymerasereaktion verwendet. Dabei werden neben Desoxynukleotiden (dNTP's) gleichzeitig auch vier fluoreszenzmarkierte 2'-3'-Didesoxynukleotide (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) eingesetzt. Die vier ddNTP's sind mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die eine spezifische Basenerkennung erlauben. Beim Einbau eines der vier ddNTP's in den synthetisierten DNA-Strang, wird die Kettenverlängerung aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe der Ribose gestoppt. Da dNTPs und ddNTPs statistisch mit gleicher Wahrscheinlichkeit verteilt eingebaut werden, entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge. Diese können in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt werden. Für die Sequenzanalyse wurde

ein 373A-Sequenzier-Gerät (Applied Biosystems) und für die jeweilige PCR-Reaktion das ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) verwendet. Der Sequenziermix enthält dNTPs, fluoreszenzmarkierte ddNTPs, Tris/HCl (pH 9,0), MgCl<sub>2</sub> und die thermostabile AmpliTaq DNA Polymerase. Die AmpliTaq DNA Polymerase ist eine modifizierte Taq-DNA-Polymerase ohne 5'-3'-Exonuklease-Aktivität, die nur geringfügig zwischen dNTP's und ddNTP's unterscheiden kann. Der dNTP-Mix enthält zudem dITP statt dGTP, um die Ausbildung von Sekundärstrukturen innerhalb der synthetisierten Einzelstränge zu unterdrücken. Für die PCR-Reaktion wurden jeweils 200-500 ng doppelsträngige Plasmid-DNA, 3,2 pMol des Sequenzierprimers (*nested* Primer1 bzw. *nested* Primer2, spezifische Primer) und 4 µl *Terminator Ready Reaction-Mix* eingesetzt und mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Die Sequenzierreaktion fand in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen statt:

5 min            95°C

30 Zyklen:

Denaturierungsphase:	30 s	95°C
Anlagerungsphase:	10 s	50-55°C
Extensionsphase:	4 min	60°C

Die Proben wurden anschließend in einem Polyacrylamid-Gel (4%) mittels des 373A-Sequenzier-Gerät (Applied Biosystems) elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit den Programmen von Applied Biosystems ausgewertet.

### 2.2.3.17 SMART 3` RACE PCR Amplifikation

Die SMART RACE PCR Reaktion (Clontech) dient dazu, ausgehend von einer bekannten Sequenz (Minimum 30 bp) die entsprechende vollständige cDNA Sequenz aus einer cDNA Population zu klonieren. Grundlage hierfür ist eine cDNA Synthese mit einem cDNA-

Synthese-Primer, der die eine Anlagerungssequenz für den Primer der späteren 3`RACE PCR Reaktion einführt. In Verbindung mit genspezifischen Primern kann nun durch eine 3` RACE-PCR Reaktion das 3`Ende der cDNA amplifiziert werden. Für die 3`RACE wurden 500 ng mRNA auf ein Volumen von 4 µl verdünnt und mit 1 µl 3`cDNA Synthese-Primer versetzt. Die Proben wurden 2 min bei 70°C inkubiert, auf Eis abgeschreckt und anschließend jeweils mit 2 µl 5 x Erststrangpuffer, 1 µl DTT (10 mM), 1 µl dNTP-Mix und 1 µl Superscript II Reverse Transkriptase (GibcoBRL) gemischt. Die Erststrang cDNA-Synthese erfolgte für 1,5 Std. bei 42 ° C in einem Luftinkubator. Hiernach wurden die Proben mit 180 µl Tricine-EDTA Puffer verdünnt, 7 min bei 72°C inkubiert und konnten anschließend bei -20°C aufbewahrt werden. Für die Amplifikation der 3` Enden wurde ein Mastermix für jeweils 50 µl gemäß 2.2.3.16 pipettiert und mit 2,5 µl 3` Erststrang cDNA und den entsprechenden Primern versetzt. Um die Spezifität der Amplifikation zu erhöhen wurde eine *touchdown* PCR durchgeführt. Die Bedingungen sind im folgenden dargestellt.

5 Zyklen: 94°C 30 sec; 72°C 3 min

5 Zyklen: 94°C 30 sec; 70°C 30 sec, 72°C 3 min

27 Zyklen: 94°C 30 sec; 68°C 30 sec, 72°C 3 min

Dem Reaktionsansatz wurde danach 1 µl entnommen mit 49 µl Mastermix vermischt und erneut für 35 Zyklen (94°C 30 sec; 68°C 30 sec, 72°C 3 min) inkubiert.

Die erhaltenen Fragmente wurden auf einem 1,2 % Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht dokumentiert.

### 2.2.3.18 Auftrennen von RNA in einem Formaldehydgel

Ein Formaldehyd-haltiges Gel gewährt bei der Elektrophorese von RNA die Auftrennung der RNA unter denaturierenden Bedingungen. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte in Anlehnung an Sambrook et al. (1989).

Vor der Elektrophorese wurden Gelkammer und Taschenformer mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gespült und anschließend mit Ethanol (abs.) getrocknet. Zur Herstellung eines 1 % Formaldehyd-Agarose-Geles wurden 1 g Agarose mit 88 ml DEPC-H<sub>2</sub>O aufgeköcht, auf 60°C abgekühlt und dann mit 10 ml 10 x MOPS und 1,8 ml 37% Formaldehyd versetzt. Anschließend wurde das Gel in die vorbereitete Apparatur gegossen.

Die gewünschte Menge an RNA wurde dann auf ein Volumen von 4,5 µl gebracht, mit 10 µl Formamid, 2 µl 10 x MOPS-Puffer und 3,5 µl 37 % Formaldehyd gemischt, 15 min bei 65°C inkubiert, um Sekundärstrukturen aufzulösen und bis zum Auftragen auf Eis aufbewahrt.

Analog wurde mit 2 µl der 0.24 - 9.5 Kb-RNA-Leiter (1 µg/µl) verfahren. Die Proben wurden dann umgehend auf das Gel aufgetragen, wobei zuvor noch 2 µl Probenbeladungspuffer zugegeben wurde. Die Elektrophorese wurde für ca. 2 h in 1 x MOPS-Puffer bei 100 V (10-15 V/cm) durchgeführt.

Sollten die Gele zu analytischen Zwecken genutzt werden, wurde den Proben nach der Hitzeinkubation bei 65°C noch 2 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugesetzt, so dass die Banden unter UV-Licht detektiert werden konnten.

10x MOPS-Puffer: 0,2 M MOPS (3-(N-Morpholin)propansulfonsäure), 80 mM NaAcetat; in DEPC-H<sub>2</sub>O aufnehmen und mit 10 N NaOH auf pH 7 einstellen, anschließend 10 mM EDTA zufügen und mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf entsprechendes Volumen auffüllen.

Lauf-Puffer: 1x Mops-Puffer

### 2.2.3.19 RNA Markierung mit Digoxigenin-UTP durch *in vitro* Transkription

DIG markierte, einzelsträngige RNA-Proben wurden durch *in vitro* Transkription der "Template DNA" mit DIG-UTP und der SP6 bzw. T7 RNA Polymerase mittels des "DIG RNA Labeling Kit" (Hoffmann La Roche, Basle, CH) hergestellt.

Hierzu wurde die "Template DNA" in den pCR®II Vektor kloniert und anschließend deren Orientierung bestimmt. Hierbei wurde unterschieden, ob die "Template DNA" in gleicher oder entgegengesetzter Orientierung wie das *lacZ* Gen vorlag. Nachfolgend wurde das Plasmid mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten, so dass die *in vitro* Transkription jeweils nach der Schnittstelle abbricht, weshalb man auch von "run off" Transkription spricht. In dieser Arbeit lag die *CDK5* Sequenz in gleicher Orientierung wie das *lacZ* Gen vor. Der Vektor wurde mit den Restriktionsendonukleasen EcoRV oder SpeI geschnitten. Durch *in vitro* Transkription konnte dann mittels der SP6 RNA Polymerase die Anti-sense Sonde und unter Verwendung der T7 RNA Polymerase die Sense-Sonde synthetisiert werden.

Ein Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

- 1 µg gereinigte, linearisierte "Template DNA"
- 2 µl 10 x NTP Mix (ohne UTP)
- 1 µl RNase Inhibitor
- 2 µl RNA Polymerase (T7 oder SP6)

Der Ansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl DNaseI zugegeben und die Inkubation für weitere 15 min bei 37°C fortgesetzt. Die Reaktion wurde durch 2 µl 0.2 M EDTA (pH 8) gestoppt. Durch eine limitierte alkaline Hydrolyse wurden die Sonden dann auf eine Länge von ca. 200 bp eingestellt. Hierzu wurde der Reaktionsansatz mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 100 µl gebracht und mit 100 µl 0.2 N NaOH vermischt und auf Eis

inkubiert. Die Inkubationszeit richtete sich nach der Länge der Sonde und wurde nach folgender Formel berechnet:

$$t(\text{min}) = L_S - L_E / K \times L_S \times L_E$$

wobei gilt:  $L_S$  = Ausgangslänge der Sonde in kB;  $L_E$  = Angestrebte Länge der hydrolysierten Sonde in kB (200 kB);  $K = 0,1101$  kB/min.

Die Qualität des vollständigen und des hydrolysierten Transkripts wurde durch Elektrophorese in einem Formaldehyd-Agarosegel analysiert. Anschließend wurde die cRNA gefällt und in DEPC Wasser resuspendiert.

### **2.2.3.20 *In situ* Hybridisierung**

Nach Beendigung des jeweiligen Versuchs wurde den Tieren das Gehirn entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Mittels eines Mikrotoms wurden die Hirne anschließend bei  $-20^\circ\text{C}$  in  $20\ \mu\text{M}$  dünne Scheiben geschnitten, welche auf einem sterilen Objektträger aufgenommen wurden. Die Objektträger wurden 5 min in 4% Paraformaldehyd inkubiert und danach 3 x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte 5 min mit 0,1 M Triethanolamin (TEA) gewaschen und für 15 min mit 0,1 M TEA/0.5 % Aceticanhydrid inkubiert.

Die Pre-Hybridisierung erfolgte durch eine vierstündige Inkubation der Objektträger in Hybridisierungspuffer. Hierzu wurden die Objektträger zusammen mit einem in Formaldehyd/5xSSC (1:1) Filterpapier in eine Petrischale gelegt,  $150\ \mu\text{l}$  Hybridisierungspuffer auf die Schnitte gegeben und die Objektträger anschließend mit sterilem Parafilm abgedeckt. Die Petrischale wurde verschlossen und mit Parafilm abgedichtet. Zur Hybridisierung wurde die Anti-sense- bzw. Sense-Sonde in Hybridisierungspuffer verdünnt (1:20-1:100) und analog zur Pre-Hybridisierung auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation wurde für 16-18 h bei  $48^\circ\text{C}$  durchgeführt. Anschließend wurden die Objektträger 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  mit RNaseA ( $50\ \mu\text{g/ml}$ ) behandelt und danach jeweils 10 min in 2 x SSC (RT) und 0,2 x SSC ( $58^\circ\text{C}$ ) gewaschen und schließlich für 1h mit



Block-Puffer inkubiert. Im Folgenden wurde der mit alkaliner Phosphatase konjugierte Anti-DIG Antikörper 1:2000 in Block-Puffer verdünnt und für 1 h zu den Schnitten gegeben. Abschließend wurden die Objektträger mehrmals mit Entwicklungspuffer gewaschen und danach für 12-16 h lichtgeschützt mit BCIP/NBT inkubiert, bis ein ausreichendes Signal zu beobachten war.

Hybridisierungspuffer: 50% Formamid, 2% Blocking Reagenz (Boehringer Mannheim), 0.02% SDS, 0.1 % Sarcosyl/1x SSC

TEA: 1M Stammlösung (pH 8)

RNase Puffer: 10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 500 mM NaCl (pH 8)

Block-Puffer: 0,1 M Maleinsäure, 1% Blocking Reagenz (Boehringer Mannheim)

Entwicklungspuffer: 100 mM Tris HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>

BCIP/NBT: 225 µl NBT (100 mg/ml), 175 µl BCIP (50 mg/ml) in 50 ml Entwicklungspuffer

### 2.2.3.21 Markierung von DNA-Sonden mit $\alpha$ -[<sup>32</sup>P] dATP

Zur radioaktiven Markierung von DNA-Sonden wurde der *Prime-It II Random Primer Labeling Kit* (Stratagene) verwendet. Dabei werden zufällig konstruierte (*random*) 9-mer Primer eingesetzt, die sich an unterschiedlichen Stellen der DNA-Matrize (Sonde) anlagern. Der gebildete Primer-Matrizen-Komplex stellt ein geeignetes Substrat für das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I dar. Dieses Enzym synthetisiert DNA-Moleküle durch Einfügen von dNTP's an das freie 3'-OH Ende der angelagerten Primer. Ihre radioaktive Markierung erhält die neusynthetisierte DNA-Sonde durch den Austausch eines nichtradioaktiv markierten Nukleotids mit einem radioaktiv markierten, z.B. <sup>32</sup>P-dATP. Für die Markierung wurden 25 ng DNA-Sonde mit sterilem H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 26 µl aufgefüllt, mit 10 µl *random* Primer vermischt und 5 min bei 100°C in einem kochenden Wasserbad denaturiert. Während der anschließenden 10 min Inkubation bei 37°C konnten die

Primer an die DNA binden. Dem Reaktionsansatz wurden danach 10 µl 5x dATP-Puffer, 5 µl  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dATP (3000 Ci/mmol) und 1 µl Exo(-) Klenow-Enzym (5 U/µl) zugefügt. Die Synthese verlief 15 min bei 37°C und wurde durch Zugabe von 48 µl TE beendet. Die markierte Sonde wurde danach über Sephadex G-50 Säulen aufgereinigt (Zentrifugation: Beckman-Tischkühlzentrifuge GPR 1000 x g, 2 min, RT). Die Effizienz der Markierung wurde wie in 2.2.3.18 beschrieben analysiert,

5x dATP-Puffer: 0.1 mM dCTP, 0.1 mM dGTP, 0.1 mM dTTP, gepufferte wäßrige Lösung

### **2.2.3.22 Isolierung von cytoplasmatischen Proteinen aus Hirngewebe**

Der isolierte Hippokampus jeweils einer Maus wurde in 400 µl Extraktions-Puffer aufgenommen und mit einer Schere zu feinen Gewebestücken zerkleinert. Die Gewebesuspension wurde 5 min bei 98°C inkubiert, 20 sec in einem Wasserbad sonifiziert und anschließend 10 min zentrifugiert (4°C; 10000 x g). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und stellte den Proteinextrakt dar. Sollten Proteine aus dem Septum isoliert werden, wurde das entsprechende Gewebe in 50 µl Extraktions-Puffer aufgenommen, wogegen bei der Herstellung von septo-hippokampalen Extrakten 450 µl verwendet wurden.

Extraktionspuffer: 125 mM Tris HCl (pH 6,8) 3% SDS, 5% β-Mercaptoethanol

### **2.2.3.23 Isolierung von nativen cytoplasmatischen Proteinen aus Hirngewebe**

Native Proteine wurden isoliert, wenn in weiterführenden Experimenten Immunopräzipitationen durchgeführt oder Kinaseaktivitäten gemessen werden sollten. Hierzu wurde der Hippokampus je einer Maus in 400 µl RIPA-Puffer aufgenommen, mit einer Schere zu feinen Gewebestücken zerkleinert, 15 min bei 4°C inkubiert und anschließend zentrifugiert (14000 x g). Das Septum wurde entsprechend in 50 µl bzw. Hippokampus und

Septum in 450 µl aufgenommen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und stellte den Proteinextrakt dar.

RIPA-Puffer: Tris HCl 50 mM (pH 7,4), 1% NP-40, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA; unmittelbar vor Gebrauch wurden 1 mM PMSF, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> und 1mM NaF zugesetzt um endogenen Proteasen und Phosphatasen zu inhibieren.

#### **2.2.3.24 Isolierung von Kernproteinen aus Hirngewebe**

Aus insgesamt 5 Mäusen wurde der Hippokampus oder Hippokampus und Septum isoliert, in zunächst 1,5 ml Puffer A aufgenommen und mit einem Polytron homogenisiert.

Anschließend wurden 4,5 ml Puffer A zugesetzt und das Lysat für 10 min zentrifugiert (4°C, 2300 x g). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 5 ml Puffer A/ 40µl NP 40 resuspendiert und erneut für 10 min zentrifugiert (4°C, 2300 x g). Der Überstand wurde erneut verworfen, das Sediment in 50 µl Puffer B gelöst und mit einem Potter homogenisiert. Der Potter wurde mit gesamt 70 µl Puffer B ausgespült und die insgesamt 120 µl Lysat in ein neues Reaktionsgefäß überführt, welches 1 h auf Eis (alle 20 min wurde das Lysat kurz gevortext) inkubiert wurde. Abschließend wurde das Lysat 15 min zentrifugiert (4°C, 13000 x g) und der Überstand, der den nuklearen Proteinextrakt darstellte, in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Puffer A: 10 mM HEPES, 10 mM KCl, 100 µM EDTA, 100 µM EGTA, 1 mM DTT, 50 µM PMSF

Puffer B: 150 µM HEPES, 0,4 M NaCl, 100 µM EDTA, 100 µM EGTA, 50 µM PMSF

Die Puffer wurden unmittelbar vor Gebrauch aus entsprechenden Stammlösungen angesetzt und auf eine pH Wert von 7,9 eingestellt.

### 2.2.3.25 Vermessung von Proteinen

Der Proteingehalt der Extrakte wurde über einen Bradfordtest ermittelt. Dieser Test basiert auf der Beobachtung, dass das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliant Blue G-250 in saurer Lösung von 465 nm auf 595 nm steigt, wenn der Farbstoff an Proteine bindet (Bradford, 1976).

Jeweils 1 µl eines jeden Extrakts wurde auf 800 µl mit Wasser aufgefüllt. Nach Zugabe von 200 µl Färbelösung wurde die Lösung gut gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Als Leerwert wurden 800 µl Wasser entsprechend behandelt. Die Proben wurden bei 595 nm gegen den Leerwert gemessen.

Der Proteingehalt wurde anhand einer Eichgeraden ermittelt, die mit BSA im Bereich von 0,5 µg bis 8 µg Protein pro Ansatz erstellt wurde.

### 2.2.3.26 Immunopräzipitation von Proteinen

Durch Immunopräzipitation wurden Proteine mittels spezifischer Antikörper aus dem Proteingemisch eines Zelllysates isoliert. Hierzu wurden 0,1 - 0,5 mg Gesamtprotein mit 2 µg des entsprechenden Antikörpers vermischt und für 1 h bei 4°C in einem Überkopffroller inkubiert. Anschließend wurden 50 µl magnetisch markierte ProteinA oder ProteinB Microbeads (Milteny Biotec) zugegeben und das Gemisch für 30 min auf Eis inkubiert. ProteinA Microbeads wurden verwendet, wenn der spezifische Antikörper in der Maus hergestellt wurde. ProteinB Microbeads kamen dagegen zur Anwendung, wenn der verwendete spezifische Antikörper aus einem Kaninchen stammte. Im Anschluß wurde das Gemisch auf eine µMacS Säule (Milteny Biotec) gegeben, die sich in einem magnetischen Separator befand und zuvor mit 100 µl Lysispuffer äquilibriert wurde. Die Säule wurde im folgenden 3 x mit Lysispuffer und 4 x mit Waschpuffer gewaschen. Die immunopräzipitierten Proteine konnten jetzt entweder mit 50 µl Elutionspuffer (95°C) von der Säule eluiert werden oder direkt für einen Kinase Assay verwendet werden.

### 2.2.3.27 Bestimmung der Cdk5 Kinaseaktivität

Um die Kinaseaktivität von Cdk5 zu bestimmen, wurden zunächst native Proteine aus entsprechenden Tieren isoliert und anschließend Cdk5 immunopräzipitiert. Allerdings wurde der Cdk5 Komplex nicht von der  $\mu$ Macs Säule eluiert, sondern 2 x mit Kinasepuffer gewaschen. Da das Ausschlußvolumen der Säule 25  $\mu$ l betrug wurden 2 x je 25  $\mu$ l Reaktionspuffer auf die Säule gegeben und jeweils 15 min bei 30°C inkubiert. Der Reaktionspuffer enthielt neben radioaktiv markierten ATP auch das Cdk5 Substrat Histon H1. Abschließend wurde die Säule nochmals mit 25  $\mu$ l Reaktionspuffer gewaschen, um insgesamt 50  $\mu$ l phosphoryliertes Substrat-Eluat zu erhalten. Dieses Eluat wurde dann auf einem 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert. Die Quantifizierung des radioaktiven Histon H1 Signals wurde entweder densitometrisch, oder durch flüssige Scintillationsmessung bestimmt. Für Letztere wurde das Gel zunächst mit Coomassie gefärbt, die korrespondierenden Histon H1 Banden aus dem Gel herausgeschnitten und im Scintillationszähler vermessen.

Kinasepuffer: 50 mM Tris, 2.5 mM  $MgCl_2$ , 1 mM EGTA, pH 7.4

Reaktionspuffer: Kinasepuffer mit 5 $\mu$ g Histon H1, 5  $\mu$ Ci [ $\gamma$ -p32]-ATP

### 2.2.3.28 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zu analytischen Zwecken wurden Proteine in denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen ihrer Größe nach aufgetrennt. Dieses ist möglich, da das negativ geladene SDS die denaturierten Proteine bindet und diese im elektrischen Feld daher zur Kathode wandern. Ein eventuell vorhandener Ladungsunterschied wird dabei durch die stöchiometrische Bindung des SDS ausgeglichen. Das Gel bestand aus zwei Gelphasen, einem Sammel- und einem Trenngel. Das Sammelgel hat im Gegensatz zum Trenngel einen sehr großen Porenabstand und einen niedrigen pH-Wert, um die Proteinproben zunächst zu konzentrieren, bevor sie im

Trenngel aufgetrennt werden. Zunächst wurde das Trenngel in eine Gelapparatur (BioRad, München, D) gegossen und mit H<sub>2</sub>O überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nachdem das Trenngel polymerisiert war wurde das H<sub>2</sub>O abgenommen und das Sammelgel in die Gelapparatur gegeben. In das noch flüssige Sammelgel wurde ein Taschenformer erforderlicher Größe gesteckt und nach dem Polymerisieren wieder herausgezogen. Die Stromstärke während der Elektrophorese betrug im Sammelgel 15 mA und im Trenngel 30 mA pro Gel. Es wurden sowohl 10 %, als auch 12,5 % Gele verwendet.

<b>2 Sammelgele</b>	
30 % Acrylamid-Lösung ( ml)	0,97
Tris/SDS-Puffer, pH 6,8 (ml)	1,87
H <sub>2</sub> O ( ml)	4,37
APS (µl)	37
TEMED (µl)	10

<b>2 Trenngele</b>	<b>10 %</b>	<b>15 %</b>
30 % Acrylamid-Lösung ( ml)	3,8	5,6
Tris/SDS-Puffer, pH 8,8 (ml)	2,8	2,8
H <sub>2</sub> O ( ml)	4,7	2,8
APS (µl)	50	40
TEMED (µl)	8	8

### 2.2.3.29 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine mit Antikörpern zu detektieren, mußten die Proteine zuerst aus dem Gel mittels Elektrotransfer auf eine proteinbindende Membran übertragen werden. Dazu wurde eine Semi-Dry-Blotkammer und Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen mit einer Porengröße von 0,45 µm verwendet.

Zuerst wurden drei Filterpapiere (9,7 cm x 6,7 cm) in Kathodenpuffer B gewaschen und auf die Kathode der Apparatur gelegt. Dann wurde das in Kathodenpuffer B getränkte Gel, eine mit Anodenpuffer AI getränkte PVDF-Membran und drei in Anodenpuffer AI gewaschene Filterpapiere daraufgelegt. Den Abschluß bildeten drei in Anodenpuffer AII gewaschene Filterpapiere. Damit die stark hydrophobe PVDF-Membran benetzt werden konnte, mußte sie vorher 30 s in Methanol inkubiert werden.

Über den Stapel wurde die Anodenplatte gelegt. Der Transfer erfolgte bei konstantem Strom von 100 mA pro Gel ( $\sim 2 \text{ mA/cm}^2$ ) und maximal 25 V bei 4 °C über einen Zeitraum von 2,5 h.

Anodenpuffer A I: 30 mM Tris Base, 20 % (v/v) Methanol (pH 10,5)

Anodenpuffer A II: 300 mM Tris Base, 20 % (v/v) Methanol (pH 10,5)

Kathodenpuffer B: 25 mM Tris Base, 40 mM  $\beta$ -Amino-n-Capronat, 20 % (v/v) Methanol, pH 9,4

### 2.2.3.30 Immunologische Detektion von Proteinen auf PVDF-Membranen

#### (Western Blot)

Die Proteine wurden mittels spezifischer Antikörper auf der PVDF-Membran detektiert. Dazu wurde das Chemilumineszenzsystem von Tropix verwendet.

Alle Inkubationen wurden bei RT auf dem Schüttler durchgeführt. Für die Inkubationen mit der Antikörperlösung, dem Nitroblock II, sowie dem Substrat wurde die Membran in eine Polyethylenfolie eingeschweißt. Bei der Verwendung größerer Volumina der Lösungen (ca.

40 ml) wurden die Schritte in einer Plastikschaale (11 cm x 11 cm x 5 cm, L x B x H) durchgeführt. Die angegebenen Volumina beziehen sich jeweils auf eine Membran.

Um die Positionen der Markerbanden festzustellen wurde die PVDF-Membran zunächst 10 min mit Ponceau S-Färbelösung inkubiert und anschließend mit 5 % (v/v) Essigsäure entfärbt, bis sich die Banden deutlich vom Hintergrund abhoben. Dadurch wurden alle Proteine, die sich auf der Membran befanden sichtbar gemacht. Die Membran wurde photokopiert und die Kopie zur Bestimmung der Molekulargewichte verwendet. Zudem konnte man abschätzen, ob in jeder Spur die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde.

Die mit Ponceau S gefärbten Membranen wurden zweimal für jeweils 5 min mit PBS-Puffer gewaschen, um restliches Methanol zu entfernen. Nach einer einstündigen Inkubation in Blockierungspuffer, die zur Absättigung aller freien Bindungsstellen der Membran erforderlich war, wurde die Membran für eine weitere Stunde mit 5 ml einer geeigneten Verdünnung des ersten Antikörpers in 1:1 (v/v) Wasch-/Blockierungspuffer inkubiert und anschließend zweimal 10 min in Blockierungspuffer gewaschen. Dann wurde der zweite Antikörper, der gegen den ersten gerichtet und an alkalische Phosphatase gekoppelt war, 1:10000 in 1:1 (v/v) Wasch-/Blockierungspuffer verdünnt und 30 min inkubiert. Nach 3 x 10 min in Blockierungspuffer und 2 x 5 min in Assaypuffer wurde die Membran für 5 min in 5 ml Nitroblock II-Lösung inkubiert. Nach dem Waschen der Membran für 2 x 5 min mit Assaypuffer erfolgte die Inkubation in 5 ml CDP-Star<sup>TM</sup>-Substrat-Lösung. Die Membran wurde mit Papierhaushaltstüchern getrocknet und die Signale durch Exposition auf einem Röntgenfilm detektiert.

Assaypuffer: 0,1 M Diethanolamin, 1 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 10,0); sterilfiltrieren

Blockierungspuffer: 0,2 % (w/v) I-Block, 0,1 % (v/v) Tween 20, 20 % (v/v) 5x PBS

CDP-Star<sup>TM</sup>-Substrat-Lösung: 0.1 % (v/v) CDP-Star<sup>TM</sup> in Assaypuffer Nitroblock II-Lösung: 2,5 % (v/v) Nitroblock II in Assaypuffer

5x PBS-Puffer: 231 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, 85 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 342 mM NaCl, (pH 7,3 – 7,4); autoklavieren; Zugabe von 0,5 % (w/v) Natriumazid.



Ponceau S-Färbelösung: 0,2 % (w/v) Ponceau S in 1 % (v/v) Essigsäure

Waschpuffer: 0,1 % (v/v) Tween 20, in 1x PBS, sterilfiltrieren

### **2.2.3.31 Immunohistochemie**

#### **2.2.3.31.1 Perfusion**

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden die Mäuse nach Beendigung des jeweiligen Experiments mit 0,5 ml Avertin (intraperitoneal) narkotisiert. Sobald die narkotische Wirkung eingetreten war, wurde der Thorax bis zum Herz geöffnet und das linke Ventrikel zur Einleitung der Perfusionslösungen und das rechte Atrium zum Auslauf eingeschnitten. Nachdem die Perfusionskanüle eingeführt war, wurden über eine Peristaltikpumpe zuerst ca. 50 ml PB-Puffer (4°C) zum Auswaschen des Blutes und anschließend ca. 100 ml PFA-Lösung (4°C) zur Fixierung des Gewebes appliziert. Dann wurden die Tiere dekaptiert und das Gehirn entnommen. Zur Postfixierung wurden die Gehirne in jeweils 20 ml PFA-Lösung 48 h bei 4°C inkubiert. Danach folgten jeweils 24 h dauernde Inkubationen in 10 %, 20 % und 30 % (w/v) Saccharoselösungen.

Avertin: 1,4 % (w/v) Tribromethanol, 1,4 % Amylalkohol in Wasser gut schütteln; Lagerung im Dunkeln bei 4 °C.

PB-Puffer: 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 75 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , pH 7,4

PFA-Lösung: 4 % (w/v) Paraformaldehyd in PB-Puffer, pH 7,4

10 % (w/v) Saccharoselösung: 10 % (w/v) Saccharose in PB-Puffer

20 % (w/v) Saccharoselösung: 20 % (w/v) Saccharose in PB-Puffer

30 % (w/v) Saccharoselösung: 30 % (w/v) Saccharose in PB-Puffer

### 2.2.3.31.2 Hirnschnitte

Um die Gehirne zu schneiden, wurden sie in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und mit Einbettmedium überschichtet. Mit einem Mikrotom wurden 50 µm dicke Frontalschnitte angefertigt, die in Lagerungs-Puffer gesammelt wurden. Unter diesen Bedingungen konnten die Hirnschnitte mehrere Wochen bei 4 °C gelagert werden.

Lagerungs-Puffer: 0,01 M PBS, 2,7 mM KCl und 137 mM NaCl, 0,4 µg/ml Methiolat (pH 7,4)

### 2.2.3.31.3 Immundetektion

Alle Schritte wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei RT auf dem Schüttler in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen durchgeführt. Eine Vertiefung enthielt 3 bis 6 Schnitte und wurde mit 0,5 -1 ml der jeweiligen Lösung aufgefüllt. Zuerst wurden die Schnitte in PBS-Puffer gewaschen. Dann wurden die Schnitte 15 min in 1 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol inkubiert, 2 x 10 min TBS-Puffer gewaschen, um das Gewebe zu permeabilisieren, und schließlich 2-6 h mit Sättigungspuffer inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verringern. Dann wurden die Schnitte mit einer geeigneten Verdünnung des 1. Antikörpers 24-72 h bei 4 °C inkubiert, anschließend 3 x 10 min mit Waschpuffer gewaschen und 1 h mit dem biotinylierten 2. Antikörper bei RT inkubiert. Zum Schluß wurden die Schnitte 1 h mit dem ABC-Komplex inkubiert, 3 mal mit PBS-Puffer gewaschen und dann mit DAB-Lösung gefärbt, bis ein guter Farbkontrast zum Hintergrund sichtbar wurde. Die Farbreaktion wurde durch zweimaliges Waschen in PBS-Puffer gestoppt.

Sättigungspuffer: 5 % (v/v) Ziegen Serum, 0,3 % TX-100 in 0,01 M PBS

TBS-Puffer: 0,2 % (w/v) TX-100 in 0,01 M PBS

AK-Lösung: 0,5 % (v/v) 2. Antikörper (biotinylierter Ziegen-anti-Kaninchen-Antikörper; biotinylierter Ziegen-anti-Maus-Antikörper) in Sättigungspuffer

ABC-Komplex (Vector Kit): 1 % (v/v) Reagenz A, 1 % (v/v) Reagenz B, 5 % (v/v)

Ziegenserum, 0,3 % (v/v) TX-100 in 0,01 M PBS

DAB-Lösung: 0,07 % (w/v) 3,3'-Diaminobenzidin, 0,2 % (w/v) Urea, 0,06 M Tris

Waschpuffer: 1 % (v/v) Ziegenserum in TBS

#### 2.2.3.31.4 Immunodetektion mit 2 Antikörpern (Doppelfärbung)

Mittels der Doppelfärbung konnten zwei verschiedene Proteine im selben Schnitt immunologisch detektiert werden. Hierzu wurde das TSA<sup>TM</sup>Fluorescence System der Firma NEN<sup>TM</sup> Life Science verwendet. Das System beruht auf den unterschiedlichen Anregungs- und Emissions-Eigenschaften der beiden Fluorophore Tetramethylrhodamin und Fluorescein.

Fluorophor	Anregung	Emission
Tetramethylrhodamin	550 nm	570 nm (rot)
Fluorescein	494 nm	517 nm (grün-gelb)

Die Detektion wird durch die Tatsache ermöglicht, dass die Fluorophore sich an die Peroxidase anlagern und die Schnitte anschließend mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert werden können. Zunächst wurden die Schnitte wie unter 2.2.3.31.3 beschrieben behandelt und nach der Inkubation mit dem ABC Komplex 3 x mit PBS-Puffer gewaschen und 10 min mit Tetramethylrhodamin (1:50 in PBS) inkubiert. Für alle folgenden Schritte wurde die Zellkulturplatten in Alufolie verpackt um den Lichteinfall zu minimieren. Die Schnitte wurden nun erneut in PBS-Puffer gewaschen, 15 min in 1 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol inkubiert, 2 x 10 min TBS-Puffer gewaschen und schließlich 2-6 h mit Sättigungspuffer inkubiert. Dann wurden die Schnitte mit einer geeigneten Verdünnung des 1. Antikörpers für das 2. zu detektierende Protein 24-72 h bei 4 °C inkubiert, anschließend 3 x 10 min mit

Waschpuffer gewaschen und 2 h mit dem 2. Antikörper (1:25) bei RT inkubiert. Dieser 2. Antikörper (Sigma, Deisenhofen, D) war nicht biotinyliert, sondern direkt mit einer Peroxidase gekoppelt, um Wechselwirkungen mit dem in der ersten Färbung verwendeten ABC-Komplex zu vermeiden. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte 10 min mit Fluorescein (1:50 in PBS) inkubiert, anschließend erneut 3 x mit PBS gewaschen, auf Objektträger aufgezogen und für die Mikroskopie in Vectashield® (Vector) Aufziehmedium eingebettet.

### **2.2.3.31.5 Mikroskopie**

Die Schnitte wurden zum Betrachten unter dem Mikroskop auf Objektträger transferiert. Dazu wurden sie erst in einer Petrischale in Aufziehmedium gelegt und mit einem Pinsel auf die Objektträger gebracht. Bevor sie mit einem Deckglas versehen werden konnten, mußten die Schnitte mit Ethanol in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe (50 %, 70 %, 95 % und 2 mal 100 %) für jeweils 1 min dehydriert werden. Dann wurden sie 2 mal für jeweils 1 min in 100 % Xylol getaucht und mit einem nicht-wässrigen Eindeckmedium die Deckgläser auf dem Objektträger befestigt. Nach 24 h waren sie getrocknet und konnten unter dem Mikroskop betrachtet werden. Das Mikroskop war mit einer Kamera ausgestattet, die die Daten zu einem Computer transferierte, mit welchem die Bilder bearbeitet werden konnten.

Für die Betrachtung von fluoreszierenden Gewebeschnitten wurden diese nach dem Aufziehen auf Objektträger in Vectashield® (Vector) Aufziehmedium eingebettet und mittels eines dreifachen Bandpass Filters (Appligene) unter dem Mikroskop betrachtet.

**Aufziehmedium:** 0,1 % (w/v) Gelatine, 10 % (v/v) Ethanol

### **2.2.3.32 Verhaltensexperimente**

Die Verhaltensexperimente wurden mit einem computerunterstützten Furchtkonditionierungssystem der Firma TSE ausgeführt. Dabei wurden die Mäuse in eine Plexiglaskammer (Trainingskammer: 35 cm x 20 cm x 20 cm, Länge x Breite x Höhe) gesetzt, deren Boden aus einem Gitter rostfreien Stahls (Durchmesser der Stäbe 4 mm, Abstand 9 mm) bestand. Das Gitter war mit einer Steuereinheit verbunden, die elektrischen Strom definierter Intensität (0,7 mA) und Dauer (2 s) erzeugte. Die Plexiglaskammer und das Gitter wurden vor jedem Versuch mit 70 %igem Ethanol ausgewaschen, um den Geruch der Mäuse aus vorangegangenen Experimenten zu neutralisieren.

Die Kammer befand sich in einem Plastikgehäuse an dessen Decke sich eine Lampe (12 V) und ein Lautsprecher (Hintergrundrauschen 60 dB SPL) befanden. Ein Computer, der die Steuereinheit kontrollierte, diente zur Eingabe der Versuchsstruktur.

#### **2.2.3.32.1 Kontextabhängige Furchtkonditionierung**

Hierzu wurden die Mäuse jeweils 180 s lang in die Trainingskammer (Kontext) gesetzt und hatten somit die Gelegenheit diese neue Umgebung zu entdecken. Darauf folgte direkt ein 2 s dauernder elektrischer Fußschock (S) mit der Intensität von 0,7 mA. Danach wurden die Mäuse zurück in ihren Käfig gesetzt. Der Gedächtnistest wurde 24 h später durchgeführt, indem die Tiere erneut für 180 s in die Trainingsbox gesetzt wurden.

Als Maß für konditionierte Furcht wurde während dieses Zeitintervalls jede 10 s (18 mal in 180 s) dokumentiert, ob die Tiere erstarren. Erstarrung ist definiert als das Fehlen jeder Bewegung außer Atmung und Herzschlag und ist ein angeborenes Verhalten, das Mäuse zeigen, die Furcht haben. Die Messungen wurden von zwei geschulten Beobachtern durchgeführt, von denen einer nicht in das jeweilige Experiment eingeweiht war. Die Erstarrung, als Maß für Gedächtniskonsolidierung, wurde dabei als Prozentwert, bezüglich aller 18 Beobachtungen während des Gedächtnistest angegeben.

Sollte den Tieren nach dem Training für weiterführende Experimente das Septum oder der Hippokampus entnommen werden, wurden folgende Kontrollgruppen eingeführt, die nicht zu assoziativem Lernen führen (siehe auch Einleitung 1.2):

naive Gruppe (N, keine Behandlung), kontextstimulierte Gruppe (K, 180 s dem Kontext ausgesetzt ohne Elektroschock) und schock-kontextstimulierte Gruppe (S/K, zuerst 2 s elektrischer Schock und anschließend 180 s im Kontext) .

#### **2.2.3.32.2 Kontext- und Tonabhängige Furchtkonditionierung**

Hierzu wurden die Tiere wie bei der kontextabhängigen Furchtkonditionierung jeweils 180 s lang in die Trainingskammer (Kontext) gesetzt, darauf folgte zunächst für 30 s ein Ton (10 kHz, 75 dB SPL) und direkt danach ein 2 s dauernder elektrischer Fußschock (S) mit der Intensität von 0,7 mA.

Der kontextuelle Gedächtnistest wurde 24 h später wie beschrieben durchgeführt, indem die Tiere erneut für 180 s in die Trainingsbox gesetzt wurden.

Um das tonabhängige, assoziative Lernen zu analysieren wurden die Tiere im Anschluß für 320 s in eine zweite Kammer (Plexiglaskammer 35 cm x 20 cm x 20 cm, Länge x Breite x Höhe) gesetzt, die sich von der Trainingskammer durch das Fehlen des Bodengitters unterschied. Zudem wurde diese Kammer (Neue Kammer) nicht mit Ethanol, sondern mit 1% Essigsäure ausgewischt. Nach 180 s wurde für die verbleibenden 180 s erneut der Ton präsentiert. Während dieser Zeit wurde das Erstarren wie beschrieben (2.2.3.32.1) dokumentiert und analysiert.

#### **2.2.3.32.3 Extinktion der konditionierten Furcht**

Um eine Extinktion der konditionierten Furcht zu erreichen (siehe 1.2.1), wurden die Tiere an 4-5 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils dem konditionierten Reiz in Form eines Gedächtnistests ausgesetzt, d.h. die Tiere wurden jeweils für 3 min in den Kontext gesetzt,

worauf für 30 s der Ton erklang, jedoch kein Elektroschock folgte. Der Versuch wurde beendet, wenn das Erstarren sich signifikant von dem Wert des ersten Gedächtnistests unterschied. Das Nachlassen des aversiven Verhaltens in Form des Erstarrens wurde als Extinktion gewertet.

#### **2.2.3.32.4 Erhöhter-Plus-Labyrinth Test**

Um Angst von Nagetieren experimentell messen zu können, wurden verschiedene Tests entwickelt. Dabei findet der Erhöhter-Plus-Labyrinth Test am häufigsten Anwendung, da er einfach durchzuführen ist und zudem erlaubt, Angst in verschiedener Intensität zu unterscheiden (Lister, 1987, Rodgers und Johnson, 1995). Die Versuchsanordnung besteht aus einer erhöhten Plus-förmigen Plattform, wovon zwei Arme durch Seitenwände geschlossen und die anderen beiden Arme offen sind. Hierbei wird der Aufenthalt in den geschlossenen Armen als Angst gewertet.

Die Versuchstiere wurden zu Beginn des Test in die Mitte der Versuchsanordnung gesetzt und deren Verhalten mittels eines computerunterstützten Videosystems für 5 min analysiert. Anschließend wurde die in den offenen Armen verbrachte Zeit, die Anzahl der Eintritte in die offenen Arme und die insgesamt zurückgelegte Distanz analysiert und statistisch ausgewertet.

#### **2.2.3.33 Statistische Analyse**

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit der Varianzanalyse (ANOVA) des Statistikprogramms Statview 4.51. Als *post hoc*-Test zur Bestimmung der Signifikanzen wurde der Student's t-Test, mit nachfolgendem Scheffe's Test verwendet. Als signifikant wurden Daten gewertet, bei denen für die Irrtumswahrscheinlichkeit ( $p$ ),  $p < 0,05$  galt. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (S.F.) angegeben.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Nach einstündigem Immobilisationsstress differentiell exprimierte

##### Sequenzen des lateralen Septum: Auswahl geeigneter Kandidaten für die weitere Analyse

In vorangegangenen Arbeiten wurde mittels Subtraktiver Hybridisierung nach Genen gesucht, die in Balb/c Mäusen durch einen einstündigen Immobilisationsstress induziert werden konnten (Fischer, 2000). Der Vorteil dieser Methode liegt darin begründet, daß eine einmal angelegte subtrahierte cDNA Bibliothek im Weiteren beliebig oft durch "differentielles Screening" analysiert werden kann (siehe 2.2.3.13). Neben bereits beschriebenen Sequenzen (Fischer, 2000) konnten so weitere Fragmente bisher unbekannter, als auch bekannter Gene, wie z.B. die für Transkriptionsfaktoren codierenden Gene *c-Fos* und *zif268* (*Egr-1*, *Knox-24*) isoliert werden. Ein 302 bp großes Genfragmente (siehe Anhang 7.1) wurde durch Sequenzvergleich mit der Datenbank (GenBank Database, *basic logical alignment tool fileserver*) als Gen für die Cyklin-abhängige Kinase 5 (*Cdk5*, engl.: *cycline dependent kinase 5*) identifiziert. Aufgrund des ständig wachsenden Umfangs der *GenBank* Datenbank, konnten durch Sequenzvergleiche im Verlauf der vorliegenden Arbeit auch weitere Sequenzen, entsprechenden Genen zugeordnet werden (Tab.3.1). Bei der Auswahl der Kandidaten, die sich für eine weitere Analyse anboten, wurden zunächst die bereits charakterisierten Gene gewählt, da in diesen Fällen entsprechende Antikörper verfügbar waren, die es ermöglichten unmittelbar die Produktion des entsprechenden Proteins zu analysieren. Dieses waren zu Beginn dieser Arbeit die Gene für *CDK5*, *cFOS* und *EGR-1*. Es wurde entschieden zuerst *CDK5* weitergehend zu untersuchen, da dieses im Gegensatz zu *cFOS* (Radulovic et al., 1998; Morrow et al., 1999) und *EGR-1* (Tischmeyer und Grimm, 1999; Malkani und Rosen, 2000) bisher weder mit Stress noch mit Gedächtniskonsolidierung in Verbindung gebracht wurde. Gleichzeitig wurde die bisher unbekannte Sequenz des Klon A6 aus vorangegangenen Arbeiten (Fischer, 2000) für die weitere Analyse ausgewählt.



Klon	Ähnlichkeit zu Sequenzen der Datenbank (Genbank)	Ähnlichkeit in %	Zugangsnummer
A4	Mus musculus mismatch repair protein ( <i>MSH6</i> )	99%	AF031087
A10	Mus musculus <i>CDK5</i>	100%	D29678
B4	Mus musculus similar to Acyl-CoA desaturase 2	100%	XM123465
B7	Mus musculus <i>EGR-1</i> ( <i>KROX-24</i> )	99%	NM007913
B11	Mus musculus protocadherin gamma C-V	99%	AF464163
D3	Mus musculus zinc finger protein spalt-3 ( <i>Sal-3</i> )	99%	AF315353
D12	Keine signifikante Ähnlichkeit	-	-
F1	1200017E04 Gen, Klon MGC:6287	100%	BC005766
G2	c 2410030A14 Gen, Klon MGC:41428	100%	BC027563
H2	Mus musculus <i>cFOS</i>	100%	V00727

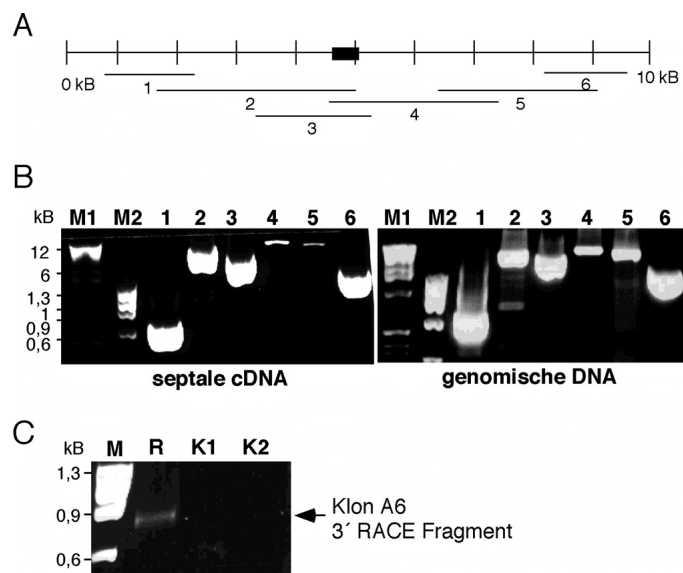
**Tab.3.1.** Potentiell, differentiell exprimierte Sequenzen im lateralen Septum von Balb/c Mäusen, 0,5 h nach einer einstündigen Immobilisierung.

Insgesamt 94 Klone der subtrahierten cDNA Bibliothek wurden durch differentielles Screening analysiert, wovon 10 Sequenzen für eine anschließende Sequenzierung ausgewählt wurden. Zu Beginn der Arbeit konnten die Klone A10 (*CDK5*), B7 (*EGR-1*) und H2 (*cFOS*) durch Vergleich mit der Genbank Datenbank den entsprechenden Genen zugeordnet werden. Aufgrund der steigenden Zahl bekannter Sequenzen konnten im Verlauf der Arbeit auch die übrigen Klone, außer Klon D12, bekannten Sequenzen zugeordnet werden.

### 3.2 Klon A6

Die Sequenz für den Klon A6 konnte in vorangegangenen Arbeiten als differentiell exprimierte Sequenz des lateralen Septum identifiziert werden (Fischer, 2000). Die differentielle Expression wurde durch semiquantitative PCR und Northern Blot bestätigt (Fischer, 2000). Der Vergleich mit der Datenbank zeigte zu Beginn dieser Arbeit eine zu 100 % signifikante Ähnlichkeit zu einem Abschnitt des Klonen rp23-402k12 (Zugangscode: AC024913.25), einer chromosomalen *Mus musculus* (C57BL/6J) Sequenz. Der 381 bp umfassende Klon A6 war zu den Basenpaaren 4670-

5051 dieses 10 kB langen Abschnittes des rp23-402k12 homolog. Da es sich bei dieser Sequenz um genomische DNA handelte wurde vermutet, dass der Klon A6 ein Exon darstellt. Ausgehend von der 10 kB umfassenden Sequenz wurden daher 6 verschiedene Primer hergestellt, die es ermöglichten in mehreren PCR Reaktionen den gesamten Abschnitt zu amplifizieren (Abb.3.2 A). Als Startmaterial wurde septale cDNA von immobilisierten Mäusen verwendet. Es wurde vermutet, dass bei einer solchen PCR Reaktion nur Primerpaare, die sich innerhalb eines Exon anlagern, in einer Amplifikation resultieren. Zur Kontrolle wurde eine gleiche Reaktion, jedoch mit genomischer DNA als Startmaterial durchgeführt. Alle 6 Fragmente konnten aus genomischer cDNA amplifiziert werden. Allerdings ergaben sich Fragmente gleicher Größe, wenn septale cDNA als Startmaterial verwendet wurde (Abb.3.2.B), was darauf hindeutete, dass die gesamten 10 kB umfassende Sequenz ein Exon darstellte. Parallel zu den beschriebenen Versuchen konnte ausgehend von der Sequenz des Klons A6 mittels RACE-PCR das 3' Ende amplifiziert werden (Abb.3.2 C). Das 3' RACE Fragment wurde in den pCRII Vektor kloniert und anschließend sequenziert.



**Abb. 3.2.** Analyse des Klons A6.

A. Schematische Darstellung des Klons rp23-402k12. Der schwarze Balken markiert die Position der 381 bp großen Sequenz des Klons A6. Die nummerierten Linien geben die Größenverhältnisse und die Lokalisation der durch die verwendeten 6 Primerpaare (1-6) amplifizierten Fragmente wieder. B. Unter Verwendung der Primerpaare A6-1 bis A6-6 (1-6) konnten die entsprechenden Fragmente aus septaler cDNA (links) und genomischer DNA (rechts) amplifiziert

werden. M1, 1KB Leiter, M2,  $\phi$ X174 RF. C. Ausgehend von der septalen SMART cDNA immobilisierter Balb/c Mäuse wurde unter Verwendung eines A6-3'RACE Primers und eines Primers, der spezifisch die Adaptorsequenz des verwendeten SMART cDNA Syntheseprimers bindet (SMART RACE-Primer), das 3' Ende des Klonen A6 amplifiziert aus dem Agarosegel eluiert und zur Sequenzierung in den pCRII Vektor kloniert. R, 3'RACE PCR Produkt, K1, Kontrollreaktion unter alleiniger Verwendung des SMART RACE-Primers. K2, , Kontrollreaktion unter alleiniger Verwendung A6-3'RACE Primers.

Es zeigte sich, dass diese 705 bp große Sequenz ebenfalls zu dem Klon rp23-402k12 homolog war.

Interessanterweise endete das 3' RACE Fragment an eine Stelle im Genom, die 28 Adenosin-Nukleotide aufweist. Es wurde daher vermutet, dass es sich bei dem Klon A6 um eine Kontamination genomischer DNA handeln könnte, da:

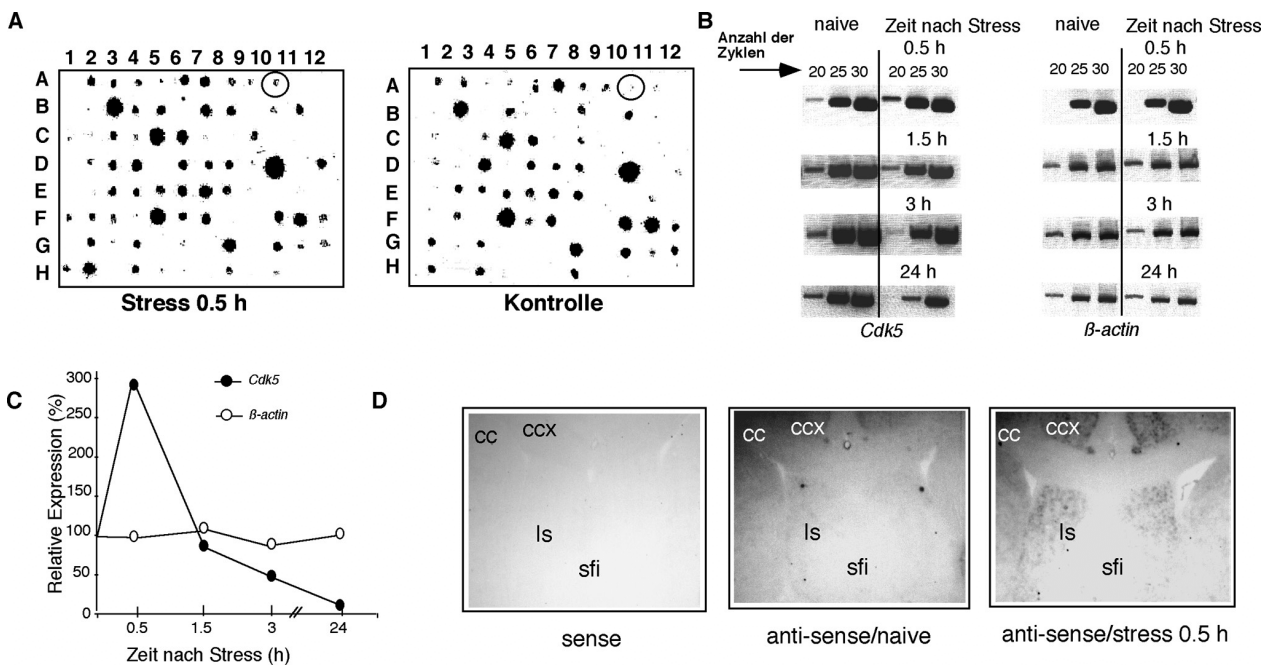
- die Sequenz keine Homologie zu *Expression Tags*, der in der Datenbank vorhandenen Spezies zeigt, jedoch homolog zu einer genomischen Sequenz eines *Mus musculus* Chromosoms ist und zudem ein Exon mit einer Länge von mindestens 10 kb unwahrscheinlich ist.
- die 3' RACE an der Stelle abbricht, an der im Genom 28 Adenosin-Nukleotide aufeinander folgen, die während der cDNA Synthese als Bindestelle für den poly-dT cDNA Syntheseprimer gedient haben könnten.

Der Klon A6 wurde in dieser Arbeit daher nicht weiter untersucht. Im folgenden sollen daher die teilweise parallel durchgeführten Arbeiten zur Charakterisierung des Cdk5 Gens und des entsprechenden Proteinprodukts beschrieben werden

### 3.3 CDK5 ist ein differentiell exprimiertes Gen im lateralen Septum

Die 302 bp umfassende Sequenz des Klon A10 (siehe Anhang 7.1) konnte durch Sequenzvergleich mit der Datenbank (GenBank Database, *basic logical alignment tool files server*) als Gen für die Zyklin-abhängige Kinase 5 (*Cdk5*, engl.: *cycline dependent kinase 5*) identifiziert werden. Mittels semiquantitativer PCR (Abb.3.3 B, C) und *in situ* Hybridisierung ( Abb. 3.3 D) konnte die Aufregulation (Abb.3.3 A) von *Cdk5* verifiziert werden. Es zeigte sich, dass die Genregulation transient ist und zum Zeitpunkt 0,5 h nach dem Ende der Immobilisierung am stärksten war. Zum

Zeitpunkt 1,5 h entsprach die *Cdk5* Expression wieder der Basaltranskription, gefolgt von einer Herunterregulation nach 24 h (Abb.3.3 B, C).



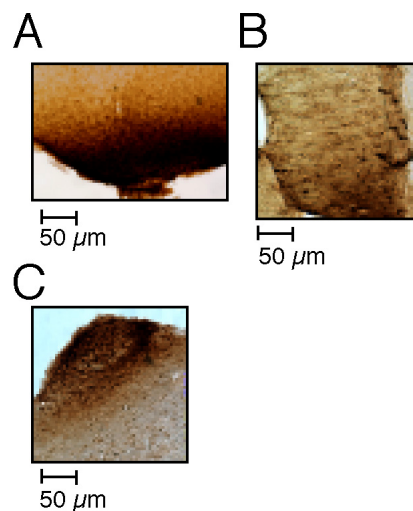
**Abb. 3.3.** Die *Cdk5* Expression im lateralen Septum wird durch Immobilisationsstress induziert.

A. Differenzielles Screening der subtrahierten cDNA Bibliothek. Das mit dem Kreis gekennzeichnete 302 bp große Fragment, wurde durch Sequenzanalyse als *Mus musculus Cdk5* Gen identifiziert. B. Repräsentative semiquantitative RT-PCR Reaktion, welche die Amplifikation von *Cdk5* und *β-Aktin* nach jeweils 20, 25 und 30 Zyklen zeigt. C. Repräsentative densitometrische Analyse der RT-PCR Signale für *Cdk5* und *β-Aktin* aus mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen nach 20 Zyklen. Das Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander wiederholt, wobei die PCR Reaktionen für *Cdk5* und *β-Aktin* stets parallel durchgeführt wurden.

D. Repräsentative *in situ* Hybridisierung an Hirnschnitten von naiven oder immobilisierten Balb/c Mäusen. Ein einstündiger Immobilisationsstress führt 0,5 h nach dem Ende des Stress zu einem deutlichen Anstieg der mRNA für *Cdk5* im lateralen Septum. Abkürzungen: cc, Corpus callosum, ccx, cingulativer Cortex, sfi, septofimbriärer Nucleus, ls, laterales Septum

### 3.4 Analyse der differentiellen Cdk5 Proteinproduktion durch immunohistochemische Detektion in Gehirnschnitten

Um die Frage zu beantworten, ob die verstärkte Expression des *Cdk5* Gens auch in einer verstärkten Produktion des entsprechenden Proteins resultiert, wurden Balb/c Mäusen (3/Gruppe) durch eine einstündige Immobilisation gestresst und die Cdk5 Proteinproduktion 0,5, 3, und 24 h nach Ende der Immobilisierung immunohistochemisch analysiert. Als Kontrolle dienten nicht-gestresste, naive Tiere. In Einklang mit vorherigen Arbeiten konnte in naiven Mäusen eine starke Cdk5 Produktion im arkuaten Nucleus des Hypothalamus, der Area Postrema, dem Cerebellum (Pigino et al., 1997) und der weißen Substanz (Tsai et al., 1993) inklusive der Fimbria/Fornix Verbindung beobachtet werden (Abb 3.4.1).

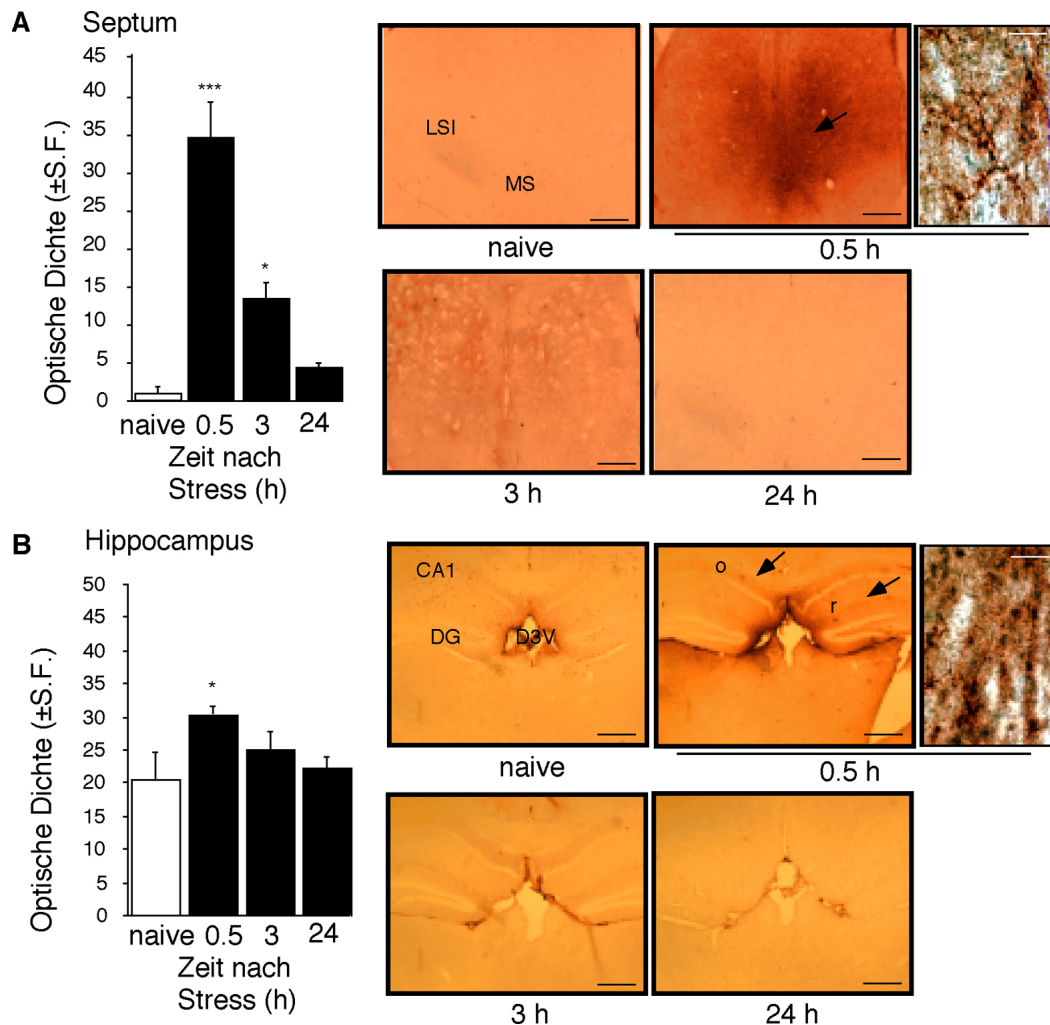


**Abb.3.4.1.** Cdk5 Produktion in naiven Balb/c Mäusen.

Die Cdk5 Produktion in naiven Balb/c Mäusen wurden immunohistochemisch an sagitalen Hirnschnitten analysiert. A. Cdk5 Immuofärbung im arkuaten Nucleus des Hypothalamus, der Fimbria/Fornix Verbindung (B) und der Area Postrema (C).

Die Cdk5 Produktion im Neocortex, Septum (Abb.3.4.2. A) und Hippokampus (Abb. 3.4.2. B) war dagegen nicht nachweisbar oder sehr schwach. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass im Striatum der Ratte und in sich daraus ableitenden Zellkulturen Cdk5 nachzuweisen ist (Bibb et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte im Striatum von Balb/c Mäuse keine Cdk5 Produktion beobachtet

werden. In Antwort auf einen einstündigen Immobilisationsstress wurde ein signifikanter Anstieg der Cdk5 Produktion im lateralen medialen Septum und im dorsalen Hippokampus gemessen (Abb.3.4.2), wogegen andere Gehirnbereiche mit Cdk5 Produktion keinen Unterschied erkennen ließen. Der beobachtete Anstieg des Cdk5 Protein im Septum war auf die caudale Region (+ 0,6 bis 0.38 mm anterior zum Bregma) beschränkt (Franklin and Paxinos, 1997)



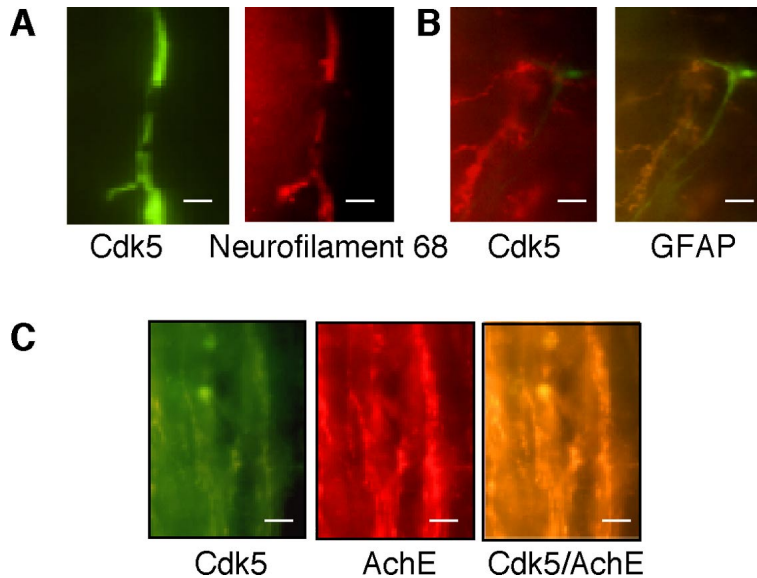
**Abb. 3.4.2.** Die Cdk5 Proteinproduktion im Septum und Hippocampus in Balb/c Mäusen nach einer einstündigen Immobilisierung.

A. Cdk5 Proteinproduktion im Septum zu verschiedenen Zeitpunkten nach Ende der Immobilisierung. Links, densitometrische Quantifizierung der für Cdk5 immunogefärbten Hirnschnitte. Jeder Zeitpunkt setzt sich aus den Ergebnissen von jeweils 3 Tieren zusammen. Rechts, Repräsentative Immunofärbung des Septums mit einem Cdk5 Antikörper. Schwarzer Balken, Skalierung = 200  $\mu$ m; weißer Balken, Skalierung 10  $\mu$ m. B. Cdk5 Proteinproduktion im Hippocampus zu verschiedenen Zeitpunkten nach Ende der Immobilisierung. Links, densitometrische Quantifizierung der für Cdk5 immunogefärbten Hirnschnitte. Jeder Zeitpunkt setzt sich aus den Ergebnissen von jeweils 3 Tiere zusammen. Rechts, Repräsentative Immunofärbung des Hippocampus mit einem Cdk5 Antikörper. Schwarzer Balken, Skalierung = 400  $\mu$ m, weißer Balken, Skalierung 10  $\mu$ m. Statistische Unterschiede: \*  $P < 0,05$ ; \*\*\*  $P < 0,0001$  vs. naive. Abkürzungen:

CA1, hippocampales Feld CA1, D3V, drittes dorsales Ventikel, LSI, intermediäres laterales Septum, MS, mediales Septum, O, Stratum oriens, r, Stratum radatum. Pfeile kennzeichnen die Gebiete verstärkter Cdk5 Produktion. Für die jeweilige Kontext-Schock Gruppe stellt das rechte Bild eine  $10^4$  fache Vergrößerung des Bereiches starker Cdk5 Immunoreaktivität dar.

### **3.5 Lokalisation der induzierbaren Cdk5 Proteinproduktion durch immunohistochemische Doppelfärbung in Gehirnschnitten**

Um zu klären, ob die beobachtete Aufregulation von Cdk5 neuronal oder in Gliazellen lokalisiert ist, wurden Balb/c Mäuse 0,5 h nach dem Ende eines einstündigen Immobilisationsstress getötet und histologische Schnitte des septo-hippokampalen Systems hergestellt. Die Schnitte wurden zunächst mit Antikörpern gegen Cdk5 und GFAP (engl. *glial fibrillary acid protein*) doppelfärbt. Alternativ dazu wurden Schnitte mit Antikörpern gegen Cdk5 und Neurofilament 68 doppelfärbt. Die Tatsache, dass Cdk5 mit Neurofilament 68 (Abb.3.5 A) aber nicht mit dem für Gliazellen spezifischen GFAP co-lokalisiert (Abb. 3.5 B), zeigt, dass die beobachtete Cdk5 Produktion auf Neuronen beschränkt ist. Weiterhin gilt zu bemerken, dass Cdk5 ausschließlich cytoplasmatisch lokalisiert ist. In weiteren Experimenten wurden Gehirnschnitte der gleichen Präparation mit Antikörpern gegen Cdk5 und Acetylcholinesterase doppelfärbt. Es zeigte sich, dass die Zellen im Septum und der Fimbria/Fornixverbindung, die Acetylcholinesterase enthalten auch für Cdk5 positiv gefärbt waren (Abb.3.5 C). Die beschriebenen Versuche zeigen, dass die Aufregulation von Cdk5 in septo-hippokampalen cholinergen Neuronen lokalisiert ist.



**Abb. 3.5.** Die stressinduzierte Cdk5 Produktion ist in cholinergen septo-hippokampalen Neuronen lokalisiert.

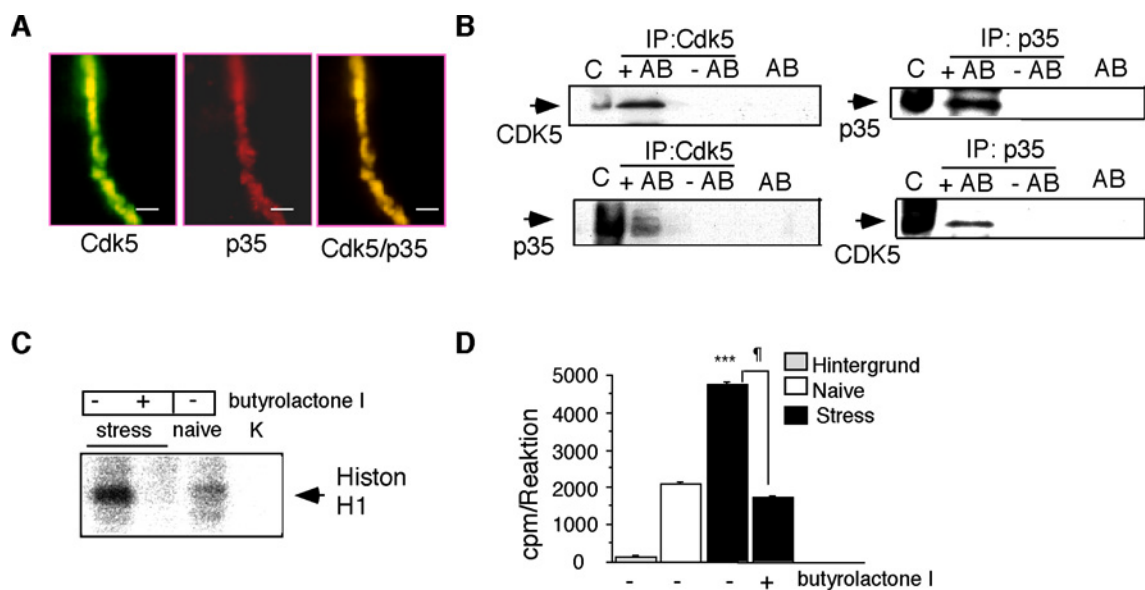
Für alle Immunofärbungen wurden Hirnschnitte von Balb/c Mäusen verwendet, die 0,5 h nach einem einstündigen Immobilisationsstress dekaptiert wurden. A, Immunodoppelfärbung für Cdk5 (grün) und Neurofilament 68 (rot). Skalierung = 10  $\mu$ M. B, Immunodoppelfärbung für Cdk5 (rot) und GFAP (grün, *glial fibrillary acidic protein*). Skalierung = 10  $\mu$ M. C, Immunodoppelfärbung für Cdk5 (grün, Cdk5), Acetylcholinesterase (rot, AChE) und deren Co-Lokalisation (gelb, Cdk5/AchE) in Neuronen des septo-hippokampalen System. Skalierung = 50  $\mu$ M.

### 3.6 Analyse des Cdk5 Aktivator-Protein p35 und der Cdk5 Kinaseaktivität

Die Cdk5 Kinaseaktivität wird durch die Bindung des spezifischen Aktivator-Protein p35 reguliert (Tsai et al., 1994). Um herauszufinden, ob p35 im cholinergen, septo-hippokampalen System als Aktivator von Cdk5 wirken kann, wurden von Balb/c Mäusen (3/Gruppe) 0,5 h nach dem Ende des Immobilisationsstress histologische Schnitte des septo-hippokampalen Systems hergestellt. Die Schnitte wurden mit Antikörpern gegen Cdk5 und p35 doppelgefärbt. Die überlagerten Signale für p35 und Cdk5 zeigten, dass beide Proteine in den gleichen Zellen des septo-hippokampalen Systems lokalisiert sind (Abb.3.6 A). Diese überlappende Lokalisation lässt vermuten, dass neuronale Funktionen im septo-hippokampalen, cholinergen System durch die cytoplasmatische Kinaseaktivität des Cdk5/p35 Komplex moduliert werden.



Konsistent mit dieser Vermutung ist das Resultat, dass eine Interaktion zwischen Cdk5 und p35 auch durch Co-Immunopräzipitation gezeigt werden konnte (Abb.3.6 B). Außerdem zeigte das aus septo-hippokampalen Lysaten von immobilisierten Mäusen immunopräzipitierte Cdk5 Protein eine signifikant höherer Histon H1 *in vitro* Kinaseaktivität als entsprechende Immunopräzipitate naiver Mäuse. Die Cdk5 Aktivität konnte durch den selektiven Cdk5 Inhibitor Butyrolactone I (Kitagawa et al., 1994) blockiert werden (Abb. 3.6 C, D).

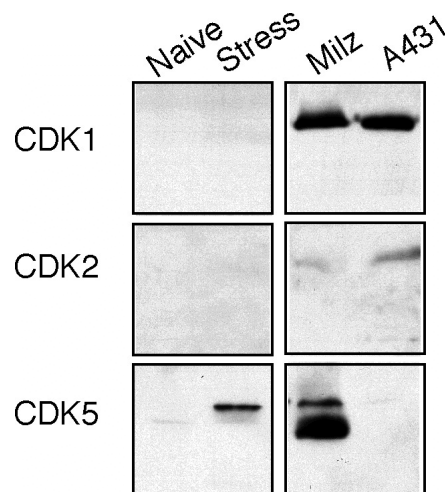


**Abb.3.6.** Cdk5 ist im septo-hippokampalen System mit p35 co-lokalisiert und zeigt ein stressinduzierbare Kinaseaktivität.

A. Immunodoppelfärbung für Cdk5 (grün), p35 (rot) und deren Co-Lokalisation (gelb) in Neuronen des septo-hippokampalen System 0,5 h nach einer einstündigen Immobilisierung. Skalierung: 10  $\mu$ M. B. Co-Immunopräzipitation von Cdk5 und p35 aus septo-hippokampalen Zelllysaten, die aus Balb/c Mäusen 0,5 h nach einer einstündigen Immobilisierung gewonnen wurden. C, totales Zelllysate, IP, der für die Immunopräzipitation verwendete Antikörper. Die Zelllysate wurden mit (+AB) oder zur Kontrolle ohne (-AB) den spezifischen Antikörper inkubiert. Eine weitere Kontrolle stellte ein ansonsten gleich behandelte Ansatz dar, der kein Zelllysate enthielt (AB). Die Pfeile kennzeichnen, welcher Antikörper für den Immunoblot verwendet wurde. C. Repräsentatives Autoradiogramm eines Cdk5 Kinaseassays. Cdk5 wurde immunopräzipitiert und anschließend die Phosphorylierung des Cdk5 Substrat Histone H1, ohne oder in Gegenwart von Butyrolactone I (10  $\mu$ M, Butyrolactone I wurde als 5 mM Stammlösung in DMSO gelöst und im Kinasepuffer auf 10  $\mu$ M verdünnt) analysiert. K, Kontrolle, ein Ansatz ohne Immunopräzipitat wurde entsprechend behandelt. D. Das unter C beschriebene Experiment wurde für jeweils 3 Mäuse reproduziert und statistisch analysiert. Abkürzungen: cpm, Radioaktiver Zerfall pro min (engl.: *counts per minute*). Statistische Unterschiede: \*\*\* $p < 0.0001$  vs. naive,  $^{\#}p < 0.0001$  vs. Butyrolactone I.

### 3.7 Butyrolactone I ist ein geeigneter Inhibitor der Cdk5 Kinaseaktivität im septo-hippokampalen System

Für weiterführende Verhaltensexperimente in denen der Einfluss von Cdk5 auf die stressmodulierte Angst und Gedächtniskonsolidierung untersucht werden sollte, war es notwendig einen geeigneten Inhibitor für Cdk5 auszuwählen. Butyrolactone I inhibiert selektiv die Kinaseaktivität von Cdk1, Cdk2 und Cdk5 (Pigino et al., 1997, siehe auch 3.6). Durch Western Blot Analyse konnte gezeigt werden, dass weder Cdk1 noch Cdk2 im septo-hippokampalen System von naiven oder gestressten Balb/c Mäusen produziert wird. In Einklang mit den zuvor beschriebenen Daten zeigte sich dagegen 0,5 h nach dem Ende der Immobilisierung ein deutlicher Anstieg der Cdk5 Produktion (Abb. 3.7). Auf dieser Grundlage wurde Butyrolactone I für weiterführenden verhaltensbiologische Experimente, als selektiver Inhibitor der Cdk5-Kinaseaktivität gewählt.

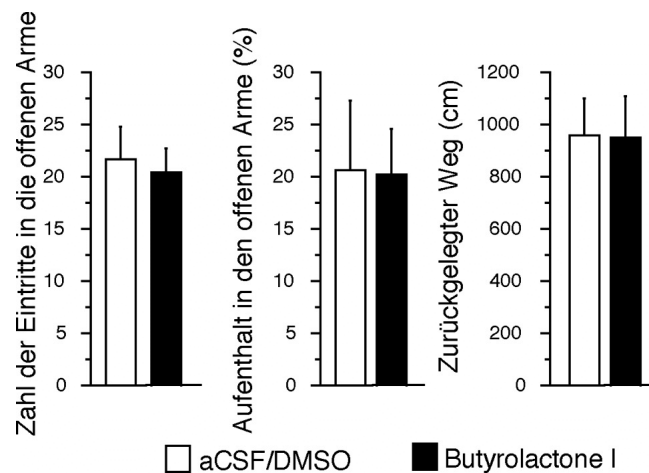


**Abb. 3.7.** Butyrolactone I ist ein geeigneter Inhibitor um die Cdk5 Kinaseaktivität *in vivo* zu blockieren.

Es wurden septo-hippokampale Zelllysate von naiven bzw. von Mäusen, die 1 h immobilisiert und 0,5 h danach dekaptiert wurden, hergestellt. Die Proteine (30 µg) wurden in einem SDS Gel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Antikörpern gegen Cdk1, Cdk2 und Cdk5 detektiert. Als positive Kontrolle für die Cdk1 und Cdk2 Signale dienten Zelllysate der Milz (30 µg) und Lysate der mit EGF (engl.: *epidermal growth factor*) stimulierten Mauszelllinie A431 (20 µg).

### 3.8 Butyrolactone I hat keinen Einfluß auf die stressmodulierte Angst von Balb/c Mäusen

Ein einstündiger Immobilisationsstress führt in Balb/c Mäusen zu einer erhöhten Angst, wenn die Tiere 0,5 h nach dem Stressende im Erhöhter-Plus-Labyrinth Test analysiert werden (Raduovic et al., 1999). Um die Möglichkeit zu überprüfen, dass Cdk5 in die stressvermittelte Erhöhung der Angst involviert ist, wurden Balb/c Mäuse (10/Gruppe) in die lateralen Gehirnv ventrikel (i.c.v.) mit aCSF/DMSO oder Butyrolactone I (4ng/Maus; Butyrolactone I wurde als 5 mM Stammlösung in DMSO gelöst und aCSF verdünnt; aCSF, artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit) injiziert, für 1 h immobilisiert und 0,5 h nach dem Ende der Immobilisierung im Erhöhter-Plus-Labyrinth Test analysiert. Es konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der in den offenen Armen verbrachten Zeit, der Zahl der Eintritte in die offenen Arme und den insgesamt zurückgelegten Weg beobachtet werden (Abb.3.8). Gleiche Ergebnisse wurden erzielt, wenn die Butyrolactone I Konzentration auf 50ng/Maus erhöht wurde. Diese Resultate deuten darauf hin, dass Cdk5 Aktivität nicht an der Regulation von stressvermittelter Angst beteiligt ist.



**Abb. 3.8.** Erhöhter-Plus-Labyrinth Test in immobilisierten Balb/c Mäusen.

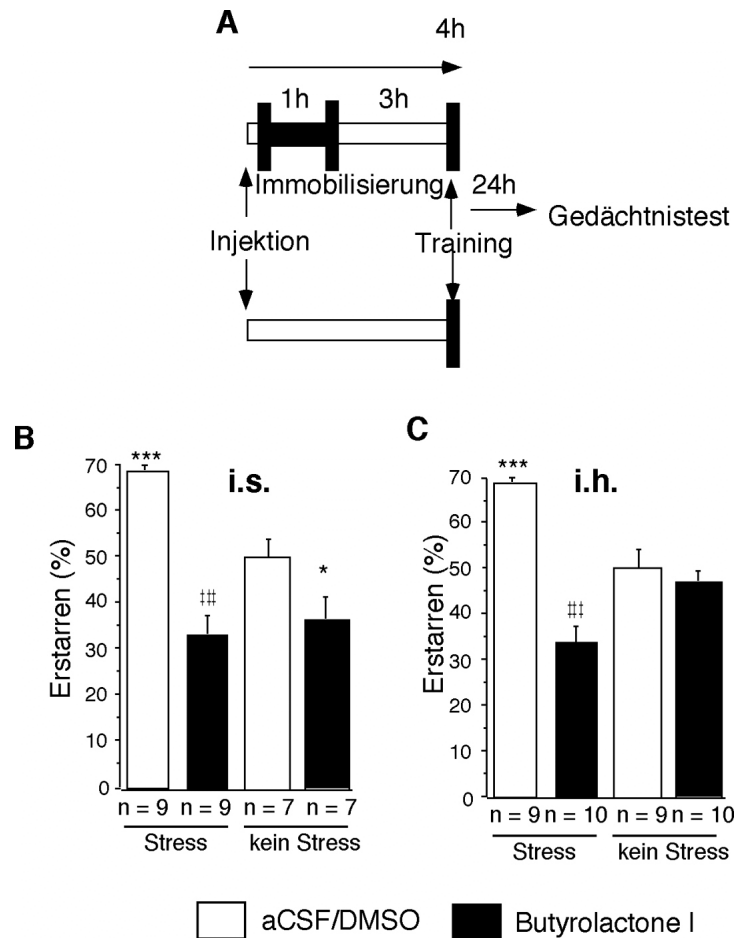
Balb/c Mäuse wurden mit aCSF/DMSO oder Butyrolactone I injiziert und anschließend für 1 h immobilisiert. Die Tiere zeigten 0,5 h nach dem Ende der Immobilisierung keinen signifikanten Unterschied bezüglich der in den offenen Armen verbrachten Zeit, der Zahl der Eintritte in die offenen Arme und dem insgesamt zurückgelegten Weg.

### **3.9 Inhibition der stress-verbesserten Gedächtniskonsolidierung durch Butyrolactone I**

Um die Rolle von Cdk5 während des stress-verbesserten Lernens zu untersuchen, wurde Butyrolactone I (4 ng/Maus) oder aCSF/DMSO 15 min vor einem einstündigen Immobilisierungsstress in das laterale Septum (i.s.) oder den mediodorsalen Hippokampus (i.h.) injiziert. Drei Stunden nach Beendigung der Immobilisierung wurden die Tiere mittels der Kontext-abhängigen Furchtkonditionierung trainiert. Hierzu wurden die Tiere für 3 min in die Versuchsbox (Kontext) gesetzt und erhielten direkt im Anschluss für 2 s einen Elektroschock (0,7 mA, Gleichstrom). Der Gedächtnistest wurde 24 h später durchgeführt, indem die Tiere für 3 min in dem gleichen Kontext exponiert wurden. Während dieser Zeit wurde das Erstarren der Tiere als Index für die gelernte Furcht gemessen. Als Kontrolle dienten Tiere, die nicht immobilisiert wurden, d.h. 4 h nach der Injektion von Butyrolactone I oder aCSF/DMSO trainiert wurden. In Einklang mit vorherigen Arbeiten (Radulovic et al., 1999) zeigte sich, dass immobilisierte Tiere signifikant mehr erstarren, als Tiere, die nicht immobilisiert wurden. Die i.s. oder i.h. Injektion von Butyrolactone I verhinderte dieses vermehrte Erstarren (Abb. 3.9). Es konnte somit gezeigt werden, dass Cdk5 in die Regulation des stress-verbesserten Lernens involviert ist.

Interessanterweise wurde bei nicht immobilisierten Mäusen, die i.s. mit Butyrolactone I injiziert wurden, ein signifikant vermindertes Erstarren beobachtet.

Dieser Befund deutet darauf hin, dass Cdk5 auch während des assoziativen Lernens von nicht gestressten Mäusen eine wichtige Funktion haben könnte.

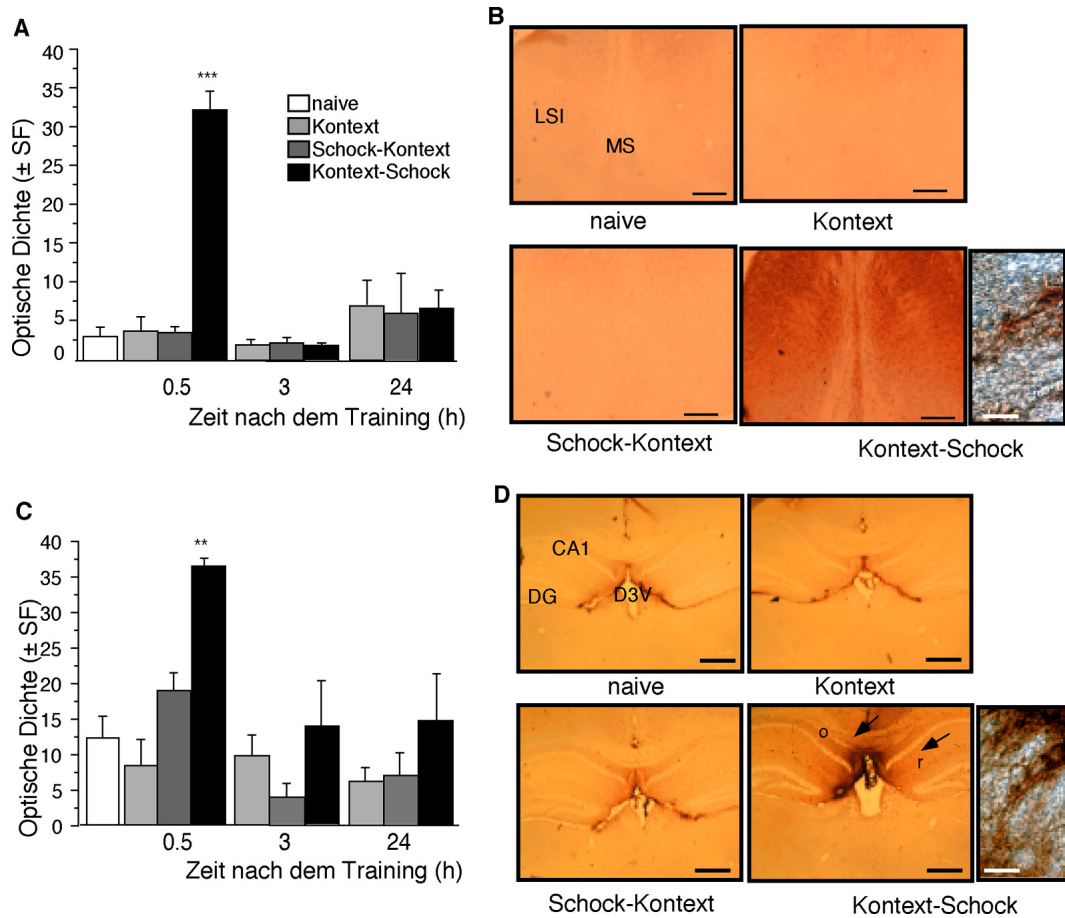


**Abb 3.9.** Butyrolactone I inhibiert die stressinduzierte Verbesserung der Kontext-abhängigen Furchtkonditionierung.

A. Übersichtsschema des Experiments. Butyrolactone I (4ng/Maus) oder aCSF/DMSO wurde 15 min vor einem einstündigen Immobilisierungsstress in das laterale intermediale Septum oder den mediodorsalen Hippokampus injiziert. Drei Stunden nach Beendigung der Immobilisierung wurden die Mäuse trainiert und 24 h später im Gedächtnistest analysiert. Als Kontrolle dienten Tiere, die nicht immobilisiert wurden, d.h. 4 h nach der Injektion von Butyrolactone I oder aCSF/DMSO trainiert wurden. B. Effekt von i.s. injiziertem Butyrolactone I vor Immobilisationsstress oder Furchtkonditionierung. Signifikante Gruppenunterschiede,  $F(3,30) = 17,14$ ,  $P < 0.0001$ . C. Effekt von i.h. injiziertem Butyrolactone I vor Immobilisationsstress oder Furchtkonditionierung. Signifikante Gruppenunterschiede,  $F(3,35) = 8,673$ ,  $P < 0.0001$ . Statistische Unterschiede: \* $P < 0,05$  vs. aCSF/DMSO kein Stress Gruppe, \*\*\* $P < 0,01$  vs. aCSF/DMSO kein Stress Gruppe, ### $P < 0.001$  vs. Stress aCSF/DMSO Gruppe. n, Zahl der Tiere pro Gruppe

### **3.10 Assoziatives Lernen induziert Cdk5/p35 Proteinproduktion im Septum und Hippokampus von Balb/c Mäusen**

Um die Frage zu beantworten, ob Cdk5 auch während stress-unabhängigem, assoziativem Lernen eine Funktion zukommt, wurde die entsprechende Proteinproduktion im septo-hippokampalen System nach kontextabhängiger Furchtkonditionierung gemessen. Als Kontrolle wurden Tiere verwendet, die entweder keinen Elektroschock (Kontext-Gruppe), oder aber den Elektroschock sofort erhielten, nachdem sie in den Kontext gesetzt wurden (Schock-Kontext-Gruppe). Beide Trainingsbedingungen führen nicht zur assoziativen Verknüpfung des Kontext mit dem Schock und resultieren daher nicht in Erstarren während des Gedächtnistest (Atkins et al., 1998; Milanovic et al., 1998). So war es möglich zwischen dem Einfluss von assoziativem Lernen, nichtassoziativem Lernen und der unspezifischen Stressreaktion des Elektroschocks auf die Cdk5 Produktion zu unterscheiden. In der Kontext-Gruppe und Schock-Kontext-Gruppe war kein signifikanter Anstieg der Cdk5 Produktion im Septum (Abb.3.10.1 A, B) und Hippokampus (Abb.3.10.1 C, D) zu beobachten. Nur in Mäusen, die den Elektroschock nach der dreiminütigen Kontextexposition erhielten, wurde Cdk5 sowohl im Septum, als auch im Hippokampus vermehrt produziert. Wie bei der Induktion nach Immobilisationsstress ist die Cdk5 Produktion während des assoziativen Lernens transient und zum Zeitpunkt 3h nach dem Training nicht mehr von naiven Mäusen zu unterscheiden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die septo-hippokampale Cdk5 Produktion unter den beschriebenen Bedingungen spezifisch für assoziatives Lernen ist.

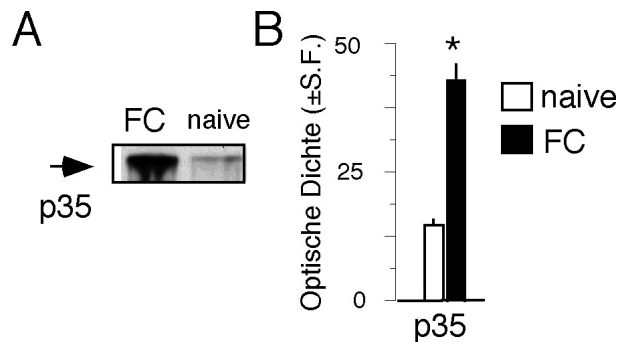


**Abb.3.10.1.** Kontextabhängige Furchtkonditionierung induziert die septo-hippocampal Cdk5 Produktion.

A. Verstärkte Cdk5 Produktion im Septum 0,5 h nach dem Training. Die Quantifizierung stellt den jeweiligen Mittelwert von 3 Mäuse dar. B. Repräsentative Immunofärbung der unter A präsentierten Quantifizierung. Skalierung: schwarzer Balken: 200  $\mu\text{m}$ ; weißer Balken: 10  $\mu\text{m}$ . C. Verstärkte Cdk5 Produktion im Hippocampus 0,5 h nach dem Training. Die Quantifizierung stellt den jeweiligen Mittelwert von 3 Mäuse dar. D. Repräsentative Ergebnisse der Immunofärbung der unter C präsentierten Quantifizierung. Skalierung: schwarzer Balken: 400  $\mu\text{m}$ ; weißer Balken: 10  $\mu\text{m}$ . Statistische Unterschiede: \*\* $p < 0,01$  vs naive, \*\*\* $p < 0,001$  vs naive. Abkürzungen: CA1, hippocampales Feld CA1, D3V, drittes dorsales Ventikel, LSI, intermediäres laterales Septum, MS, mediales Septum, O, Stratum oriens, r, Stratum radatum. Pfeile kennzeichnen die Gebiete verstärkter Cdk5 Produktion. Für die jeweilige Kontext-Schock Gruppe stellt das rechte Bild eine  $10^4$  fache Vergrößerung des Bereiches starker Cdk5 Immunoreaktivität dar.

Um zu überprüfen, ob Furchtkonditionierung auch die Synthese von p35 induziert wurden Balb/c Mäuse (3/Gruppe) mittels kontextabhängiger Furchtkonditionierung trainiert und 0,5 h später septo-hippocampale Zelllysate hergestellt, welche anschließend durch Immunoblot mit einem

spezifischen Antikörper gegen p35 analysiert wurden. Als Kontrolle dienten naive Tiere (3/Gruppe). Auch die Proteinsynthese von p35 stieg nach Furchtkonditionierung signifikant an (Abb.3.10.2).



**Abb.3.10.2.** Furchtkonditionierung induziert p35 Synthese.

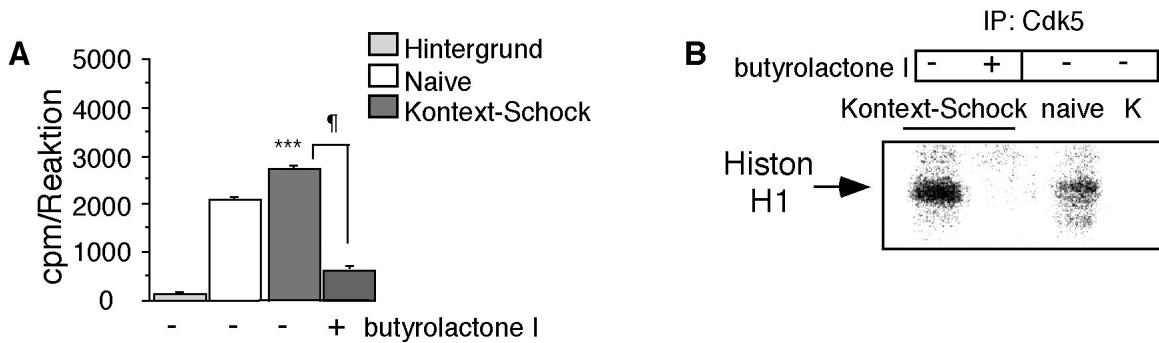
A. Repräsentativer Immunoblot. Septo-hippocampale Lysate von Balb/c Mäusen (3/Gruppe) wurden 0,5 h nach Furchtkonditionierung hergestellt. Der p35 Proteingehalt wurde durch Immunoblot analysiert. Als Kontrolle dienten Lysate naiver Tiere. B. Die Signale der Immunoblots wurden densitometrisch quantifiziert und statistisch ausgewertet. Statistische Unterschiede: \* $P < 0.05$  vs. naive.

### 3.11 Assoziatives Lernen induziert Butyrolactone I sensitive Cdk5

#### Kinaseaktivität im septo-hippocampalen System von Balb/c Mäusen

Um zu überprüfen, ob die vermehrte Cdk5 Produktion gleichzeitig zu einer erhöhten Kinaseaktivität führt wurde Cdk5 aus dem septo-hippocampalen System von Balb/c Mäusen 0,5 h nach dem Training mittels kontextabhängiger Furchtkonditionierung immunopräzipitiert und anschließend die Histon H1-Phosphorylierung gemessen. Der Versuch ergab, dass die Kinaseaktivität zu naiven Mäusen signifikant unterschiedlich ist und durch Butyrolactone I gehemmt werden konnte (Abb.3.11).



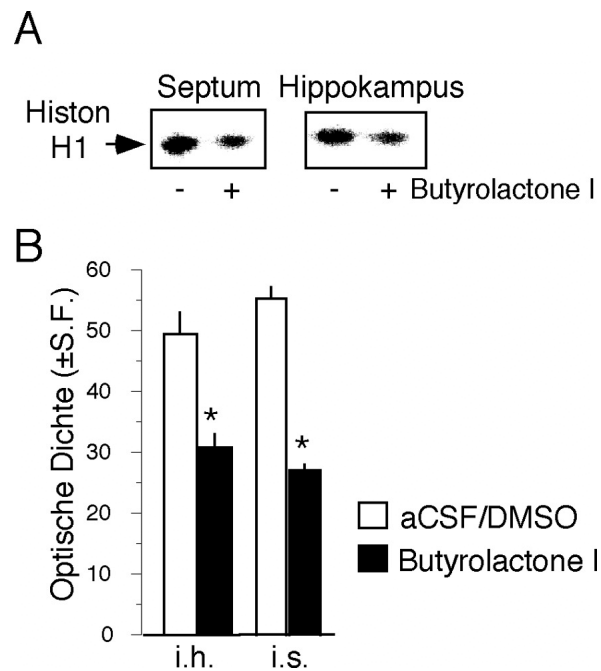


**Abb.3.11.** Verstärkte septo-hippokampale Cdk5 Kinaseaktivität 0,5 h nach Furchtkonditionierung.

A. Statistischer Vergleich der Histon H1 Phosphorylierung, durch 0,5 h nach dem Training aus dem septo-hippokampalen System immunpräzipitiertes Cdk5. B. Repräsentatives Autoradiogramm des unter A beschriebenen Versuchs. Cdk5 wurde 0,5 h nach der Furchtkonditionierung aus dem septo-hippokampalen System immunpräzipitiert und anschließend die Phosphorylierung des Cdk5 Substrats Histon H1, ohne oder in Gegenwart von Butyrolactone I (10  $\mu$ M) analysiert. K, Kontrolle, ein Ansatz ohne Immunopräzipitat wurde entsprechend behandelt. Statistische Unterschiede: \*\*\* $P < 0.001$  vs naive,  $^{\#}P < 0.001$  vs Butyrolactone I.

### 3.12 Butyrolactone I inhibiert die kontext-abhängige Furchtkonditionierung

Die vorherigen Ergebnisse wiesen auf eine Funktion der Cdk5 während der Gedächtniskonsolidierung hin. Im folgenden Experiment sollte diese Annahme überprüft werden. Um sicherzustellen, dass Butyrolactone I die Cdk5 Kinaseaktivität inhibiert, wenn es durch Mikroinjektion in das Septum oder den Hippokampus appliziert wird, wurde die *in vivo* Kinaseaktivität gemessen. Hierzu wurden Balb/c Mäuse zunächst mit Mikrokannülen versehen, die es ermöglichen Lösungen direkt in das Septum oder den Hippokampus einzubringen. Butyrolactone I oder die entsprechende Kontrollflüssigkeit aCSF/DMSO (4 ng/Maus, Kontrollflüssigkeit war DMSO 1:500 in aCSF) wurden 15 min vor dem Training der Furchtkonditionierung injiziert, die Tiere 0,5 h nach dem Training dekaptiert und septale bzw. hippocampale Zellysate hergestellt. Im Folgenden wurde die Histon H1-Phosphorylierung gemessen, die durch die Applikation von Butyrolactone I deutlich niedriger war (Abb. 3.12.1).



**Abb.3.12.1.** Butyrolactone I inhibiert die *in vivo* Cdk5 Aktivität im Septum und Hippokampus.

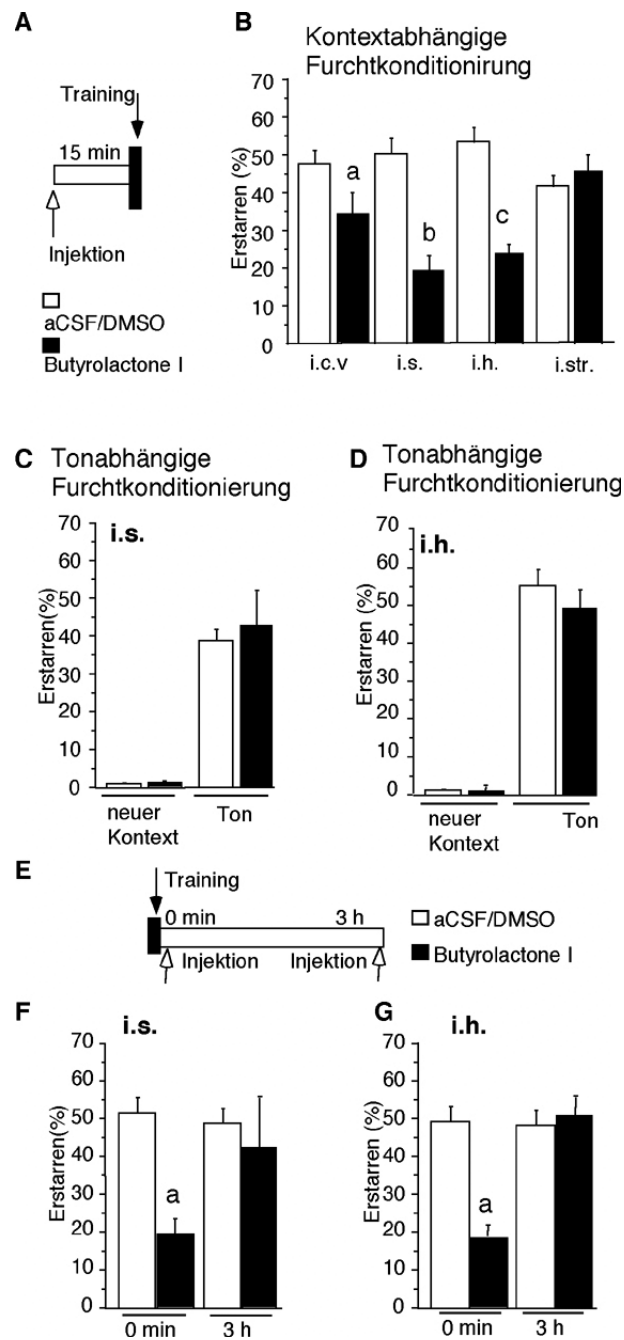
A. Mikrokannülen wurden in das laterale Septum oder den Hippokampus von jeweils 3 Balb/c Mäusen plaziert. Die Tiere wurden 15 min vor dem Training mit Butyrolactone I (4ng/Maus) oder aCSF/DMSO injiziert und 0,5 später dekaptiert. Anschließend wurden entsprechende native Zellysate hergestellt und die Phosphorylierung des Histon H1 gemessen. B. Die Signale der entsprechenden Autoradiogramme wurden densitometrisch vermessen und analysiert. \* $P < 0.05$  vs. aCSF/DMSO.

Im Anschluss wurden Mikrokannülen in den dorsalen Hippokampus von Balb/c Mäusen oder das laterale Septum eingeführt und die Tiere mittels Furchtkonditionierung trainiert. Die i.s. und i.h. Injektion von Butyrolactone I (4 ng/Maus) 15 min vor dem kontextabhängigen Training mittels Furchtkonditionierung resultiert in einer signifikanten Verminderung der Gedächtniskonsolidierung (Abb. 3.12 Abb. B). Konsistent mit diesen Ergebnissen ist der Befund, dass die i.c.v. Injektion von Butyrolactone I (4ng/Maus) auch zu einer signifikanten Verminderung der Gedächtniskonsolidierung führt, jedoch weniger deutlich (Abb.3.12 B). Wurde Butyrolactone I (4ng/Maus) zur Kontrolle ins Striatum injiziert, war kein Effekt bezüglich der Gedächtniskonsolidierung zu beobachten, was die spezifische Funktion von Cdk5 im septo-hippokampalen System unterstreicht (Abb.3.12 B).

Außerdem hat die i.s. oder i.h. Injektion von Butyrolactone I keinen Einfluss auf die tonabhängige Furchtkonditionierung, was für eine spezifische Rolle von Cdk5 während Kontext-abhängiger Gedächtniskonsolidierung spricht (Abb.3.12 C, D).

Hierbei ist zu bemerken, dass das Septum (Sparks et al., 1995) und der Hippokampus (Kim und Fanselow, 1992) nicht für tonabhängiges assoziatives Lernen benötigt werden.

Als weitere Kontrolle wurden Tiere trainiert, aber erst 3 h später i.s. oder i.h. mit Butyrolactone I (4ng/Maus) injiziert. Diese Injektion hatte keine Auswirkung auf die Gedächtniskonsolidierung und zeigt, dass Cdk5 für die Konsolidierung von kontextuellen Erinnerungen während eines Zeitfensters von weniger als 3 h nach dem Training essentiell ist. Gleiche Ergebnisse wurden erzielt, wenn die Butyrolacton I-Konzentration auf 50ng/Maus erhöht wurde.



**Abb. 3.12.** Effekt von i.s. oder i.h. injiziertem Butyrolactone I auf die Furchtkonditionierung von Balb/c Mäusen.

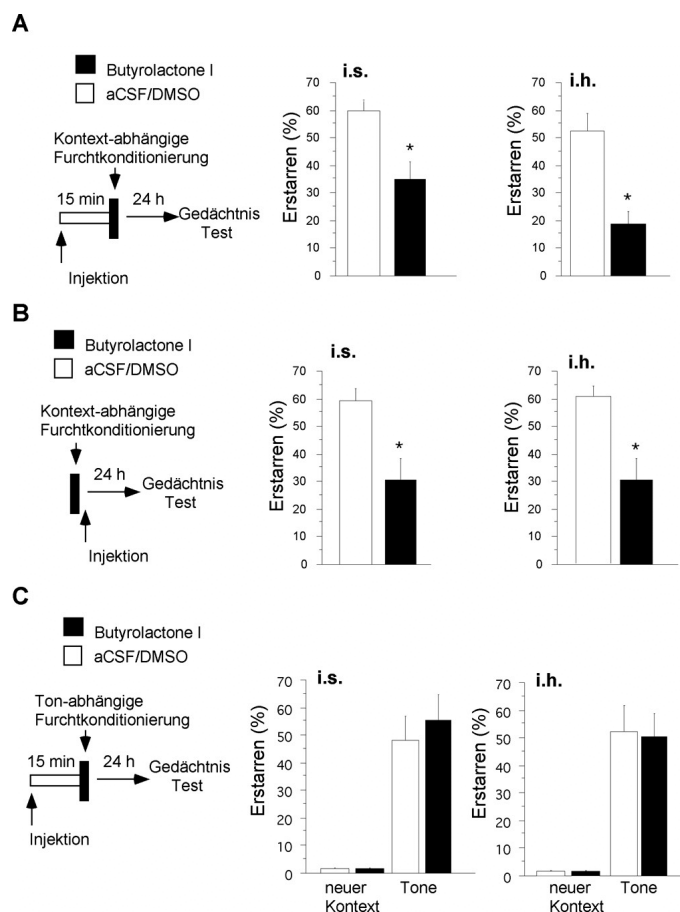
A. Versuchsaufbau für die Prä-Training-Injektionen. B. Effekt von 15 min vor dem Training i.c.v., i.s., i.h. oder i.str. injiziertem Butyrolactone I (4ng/Maus) auf das Erstarren während des Gedächtnistests. Folgende statistische Unterschiede wurden beobachtet: i.c.v.,  $t_{(1,23)} = 2,538$ , i.s.,  $t_{(1,12)} = 3,888$ , i.h.,  $t_{(1,15)} = 3,403$  und i.str.,  $t_{(1,7)} = 7,221$ . <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs. aCSF/DMSO i.c.v.; <sup>b</sup> $P < 0,01$  vs. aCSF/DMSO i.s.; <sup>c</sup> $P < 0.001$  vs. aCSF/DMSO i.h.. C. Effekt von 15 min

vor dem Training i.s. injiziertem Butyrolactone I (4ng/Maus) auf das Erstarren während des Gedächtnistests der tonabhängigen Furchtkonditionierung. Es wurden weder im neuen Kontext,  $t_{(1,31)} = 1,003$ ,  $P = 0,3337$ , noch als Reaktion auf den Ton,  $t_{(1,31)} = 0,529$ ,  $P = 0,4809$  signifikante Unterschiede beobachtet. D. Effekt von 15 min vor dem Training i.h. injiziertem Butyrolactone I (4ng/Maus) auf das Erstarren während des Gedächtnistests der tonabhängigen Furchtkonditionierung. Es wurden weder im neuen Kontext,  $t_{(1,23)} = 0,553$ ,  $p = 0,4645$ , noch als Reaktion auf den Ton,  $t_{(1,23)} = 1,74$ ,  $P = 0,2001$  signifikante Unterschiede beobachtet. E. Versuchsaufbau für Post-Training-Injektionen. F. Effekt von unmittelbar oder 3 h nach dem Training i.s. injiziertem Butyrolactone I (4ng/Maus) auf das Erstarren während des Gedächtnistests der kontext-abhängigen Furchtkonditionierung. Injektionen unmittelbar nach dem Training verschlechterten das Erstarren während des Gedächtnistests signifikant,  $t_{(1,11)} = 3,128$ , jedoch nicht, wenn die Injektionen 3 h nach dem Training stattfanden,  $t_{(1,12)} = 0,027$ .  $^aP < 0,01$  vs. aCSF/DMSO i.s.0 min. G. Effekt von unmittelbar oder 3 h nach dem Training i.h. injiziertem Butyrolactone I (4ng/Maus) auf das Erstarren während des Gedächtnistest der kontext-abhängigen Furchtkonditionierung. Injektionen unmittelbar nach dem Training verschlechterten das Erstarren während des Gedächtnistest signifikant,  $t_{(1,14)} = 5,958$ , jedoch nicht, wenn die Injektionen 3 h nach dem Training stattfanden,  $t_{(1,14)} = 0,033$ .  $^aP < 0,01$  vs. aCSF/DMSO i.h.0 min.

### 3.13 Butyrolactone I verschlechtert assoziatives Lernen in C57BL/6J Mäusen

Die vorhergehenden Experimente haben gezeigt, dass Cdk5 an der Gedächtniskonsolidierung von Balb/c Mäusen beteiligt ist. Um die Funktion von Cdk5 während des assoziativen Lernens eingehender zu untersuchen, wurde im folgenden Experiment überprüft, ob Cdk5 auch eine Funktion bei der Gedächtniskonsolidierung in C57BL/6J Mäusen zukommt. Dieser Zuchtstamm wurde gewählt, da Unterschiede zu Balb/c Mäusen in verschiedenen Versuchen zur Gedächtniskonsolidierung (Francis et al, 1995; Bao et al., 1998; Heyser et al, 1999), inklusive der Furchtkonditionierung (Chen et al., 1996) beschrieben wurden. Die Injektion von Butyrolactone I (50 ng/Maus) i.s. und i.h. 15 min vor dem kontext-abhängigen Training mittels Furchtkonditionierung resultiert in einer signifikanten Verminderung des Erstarrens während des Gedächtnistests (Abb. 3.13 A,  $P < 0,01$ ). Ähnliche Ergebnisse wurden erzielt, wenn Butyrolactone I unmittelbar nach dem Training injiziert wurde (Abb.3.13 B,  $P < 0,01$ ). Auf die tonabhängige Furchtkonditionierung hatten i.s oder i.h. Injektionen von Butyrolactone I keinen Einfluss, da Butyrolactone I und aCSF/DMSO injizierte Mäuse kein signifikant unterschiedliches Erstarren zeigten, wenn der Ton 24 h nach dem Training in einem neuen Kontext präsentiert wurde (Abb.

3.13 C,  $P = 0.8181$ ). Diese Ergebnisse deuten auf eine spezifische Funktion der Cdk5 während der kontextabhängigen Furchtkonditionierung von C57BL/6J Mäusen hin. Die Tatsache, dass für die Inhibierung der Gedächtniskonsolidierung in C57BL/6J Mäusen eine höhere Butyrolactone I Konzentration verwendet werden mußte als in Balb/c Mäusen, ist im Einklang mit Beobachtungen für Inhibitoren der Extrazellulär Regulierten Proteinkinase 1/2 (Erk 1/2) (Sananbenesi, persönliche Mitteilung) und der Tatsache, dass der i.h. injizierte Proteinsynthese-Inhibitor Anisomycin in einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{g}/\text{Maus}$  die Gedächtniskonsolidierung in Balb/c Mäusen signifikant hemmt, für C57BL/6J Mäuse jedoch 5  $\mu\text{g}/\text{Maus}$  notwendig sind (Fischer, unveröffentlichte Beobachtung).



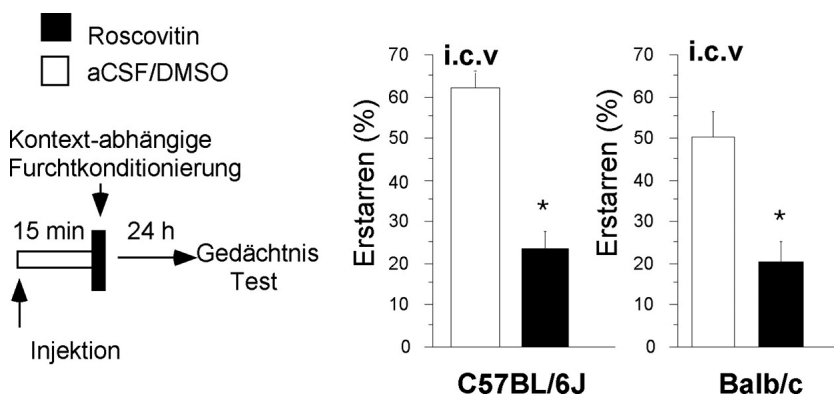
**Abb. 3.13.** Butyrolactone I inhibiert Kontext-abhängige Furchtkonditionierung in C57BL/6J Mäusen.

A. Wird Butyrolactone I (50ng/Maus) 15 min vor dem Training der kontextabhängigen Furchtkonditionierung i.s. [ $t(1,17) = 10,974$ ] oder i.h. [ $t(1,15) = 6,165$ ] injiziert, ist das Erstarren während des Gedächtnistests signifikant

reduziert. B Ähnliche Resultate wurden erzielt, wenn Butyrolactone I unmittelbar nach dem Training injiziert wurde. Statistische Unterschiede wurden nach i.s. [ $t(1,17) = 8,790$ ] und i.h. [ $t(1,17) = 7,476$ ] Injektion beobachtet. C. Wurde Butyrolactone I 15 min vor der tonabhängigen Furchtkonditionierung injiziert, hatte das keine Auswirkung auf das Erstarren im folgenden Gedächtnistest. Jede Gruppe bestand aus 8-9 Tieren. \* $P < 0.01$  vs. aCSF/DMSO injizierte Mäuse.

### 3.14 Der Cdk5 Inhibitor Roscovitin verschlechtert assoziatives Lernen in Balb/c und C57BL/6J Mäusen

Ein weiterer Inhibitor der Cdk5 Kinaseaktivität ist Roscovitin (Meijer et al., 1997). Es war daher zu vermuten, dass die Mikoinjektion von Roscovitin die kontextabhängige Furchtkonditionierung in Balb/c und C57BL/6J Mäusen verschlechtern würde. Balb/c und C57BL/6J Mäuse wurden Mikrokanülen in die lateralen Ventrikel (i.c.v.) implantiert. Vor dem Training der kontextabhängigen Furchtkonditionierung wurden je neun Tiere mit aCSF/DMSO und weitere neun Tiere mit Roscovitin (50ng/Maus) injiziert. Im nachfolgenden Gedächtnistest zeigten die mit Roscovitin injizierten Tiere signifikant weniger Erstarren, als die entsprechenden Kontrolltiere [Abb. 3.13,  $F(1,15) = 8.339$ ] was durch eine verschlechterte Gedächtniskonsolidierung erklärt werden kann.



**Abb. 3.14.** Roscovitin inhibiert die kontextabhängige Furchtkonditionierung in C57BL/6J und Balb/c Mäusen.

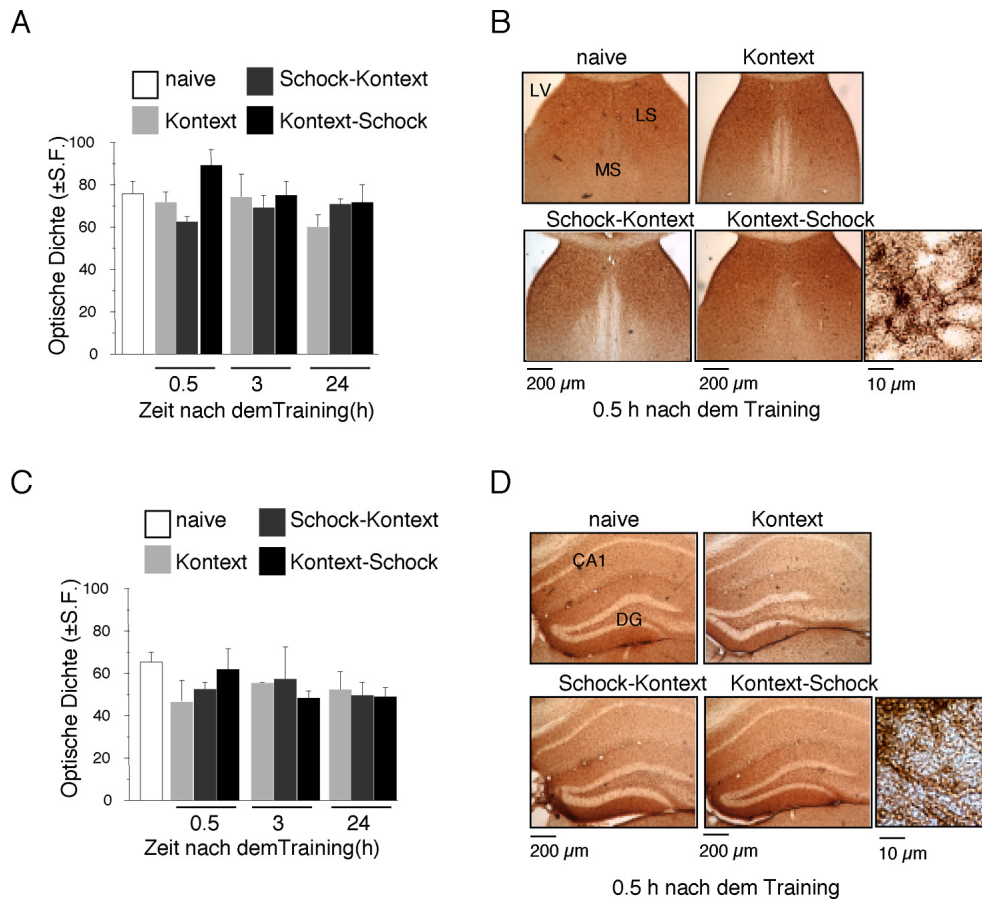
Wird Roscovitin (50 ng/Maus) 15 min vor dem Training injiziert, zeigen die Tiere im 24 h später durchgeführten Gedächtnistest, weniger Erstarren, als die entsprechenden Kontrolltiere. \* $P < 0.05$  vs. aCSF/DMSO injizierte Mäuse.

Jede Gruppe bestand aus 9 Tieren. Eine Injektion in die lateralen Ventrikel ermöglicht die Diffusion des Inhibitors in Hippokampus und Septum.

### **3.15 Butyrolactone I vermindert assoziatives Lernen von C57BL/6J Mäusen durch Inhibierung der basalen Cdk5 Kinaseaktivität im septo-hippokampalen System**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sowohl Butyrolactone I als auch Roscovitin die Gedächtniskonsolidierung in C57BL/6J Mäusen empfindlich stören wurde vermutet, dass wie für Balb/c Mäuse eine Induktion des Cdk5 Proteins in Abhängigkeit von assoziativem Lernen eintritt. Um diese Möglichkeit zu überprüfen wurden C57BL/6J Mäuse mittels kontextabhängiger Furchtkonditionierung trainiert und nach jeweils 0,5, 1 und 3 h die Cdk5 Proteinproduktion mittels immunohistochemischer Analyse untersucht. Entsprechende Kontrollgruppen bestanden aus Mäusen, die entweder nur dem Kontext (Kontext) oder einem unmittelbaren Schock (Schock-Kontext) ausgesetzt wurden. Jede Gruppe bestand aus 3 Tieren. Anders als erwartet zeigte sich, dass weder im Septum [Abb. 3.15.1 A, B,  $F(1,3) = 0.970$ ,  $P = 0.498$ ], noch im Hippokampus [Abb. 3.15.1 C, D,  $F(1,3) = 0.739$ ,  $P = 0.730$ ] Unterschiede bezüglich der Cdk5 Produktion zu beobachten waren.





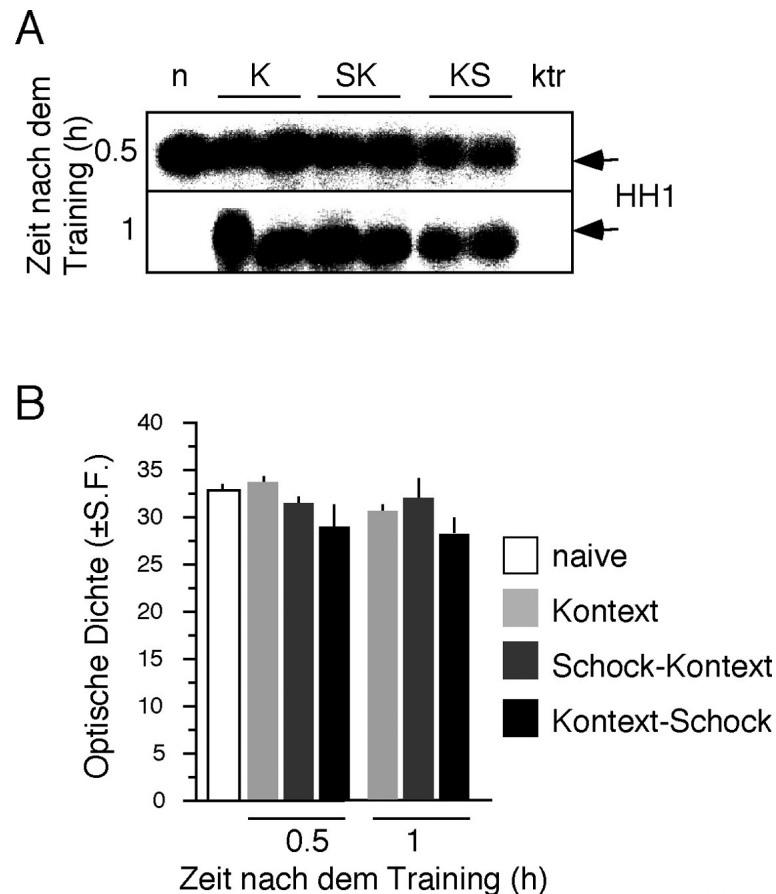
**Abb. 3.15.1.** Septo-hippokampale Cdk5 Proteinproduktion nach kontextabhängiger

#### Furchtkonditionierung.

A. Die Cdk5 Proteinproduktion wurde nach Furchtkonditionierung densitometrisch analysiert (4 Mäuse/Gruppe). Es wurden keine signifikanten Unterschiede im Septum beobachtet [ $F(1,3) = 0,970$ ]. B. Repräsentative Aufnahmen des Septums zum Zeitpunkt 0,5 h nach dem Training. Für die Kontext-Schock Gruppe ist zusätzlich eine repräsentative hoch vergrößerte Aufnahme dargestellt, die Cdk5 positive Neuronen zeigt. C. Die Cdk5 Proteinproduktion wurde nach Furchtkonditionierung densitometrisch analysiert (4 Mäuse/Gruppe). Es wurden keine signifikanten Unterschiede im Hippokampus beobachtet [ $F(1,3) = 0,739$ ]. D. Repräsentative Aufnahmen des Hippokampus zum Zeitpunkt 0,5 h nach dem Training. Für die Kontext-Schock Gruppe ist zusätzlich eine repräsentative hoch vergrößerte Aufnahme (DG) dargestellt, die Cdk5 positive Neuronen zeigt. CA1, hippocampales Subfeld, DG, fascia dentata (dentate gyrus), LSI, laterales intermediäres Septum, LV, laterale Ventrikel, M, mediales Septum

Es verblieb die Möglichkeit, dass assoziatives Lernen Einfluss auf die Cdk5 Kinaseaktivität ausübt, ohne dass die Proteinmenge sich ändert. Daher wurden analog zu dem beschriebenen Experiment weitere Mäuse mittels kontextabhängiger Furchtkonditionierung trainiert. Nach 0,5

und 1 h wurden septo-hippokampale Zelllysate hergestellt, Cdk5 immunopräzipitiert und die Kinaseaktivität mittels dem Cdk5 Substrat Histon H1 analysiert. Es konnten keine signifikanten Unterschiede [F(1,3) = 0,970] bezüglich der Histon H1 Phosphorylierung gemessen werden (Abb. 3.15.2 A, B).



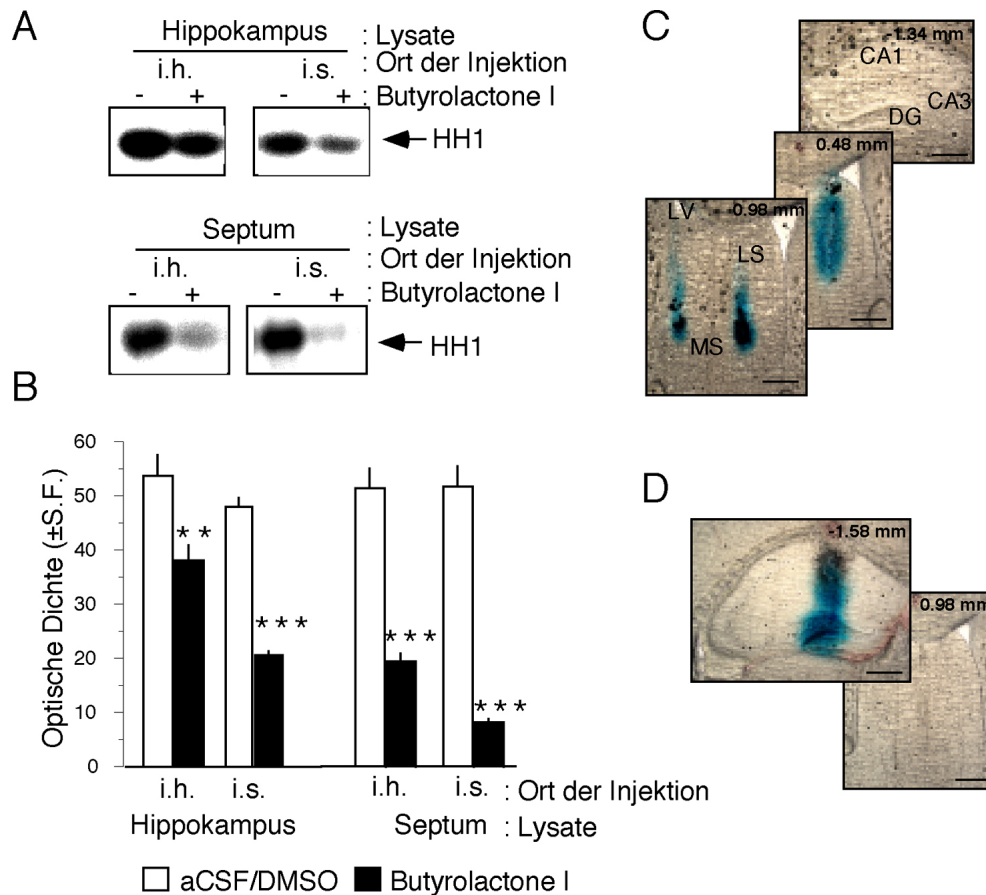
**Abb. 3.15.2.** Die Cdk5 Aktivität im septo-hippokampalen System wird nicht durch Furchtkonditionierung beeinflusst.

A. Repräsentatives Ergebnis der Histon H1 Phosphorylierung durch Cdk5, die 0,5 und 1 h nach dem Training der kontextabhängigen Furchtkonditionierung aus dem septo-hippokampalen System immunopräzipitiert wurde. Dazu wurden septo-hippokampale Lysate von naiven Mäusen (n, 3/Gruppe), nach Präsentation des Kontext (K), Schock-Kontext (SK) und Kontext-Schock (KS) hergestellt. Als Kontrolle (ktr) wurde eine Probe simultan, aber ohne Lysat behandelt. B. Die Ergebnisse wurden in zwei unabhängigen Versuchen reproduziert und die Signale densitometrisch analysiert. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen beobachtet werden.

Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass Butyrolactone I die kontextabhängige Furchtkonditionierung in C57BL/6J Mäusen vermindert, indem es die basale Cdk5

Kinaseaktivität verändert. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde die *in vivo* Kinaseaktivität nach Butyrolactone I Injektion analysiert. Wurde Butyrolactone I 15 min vor dem Training i.h. injiziert, war die hippocampale Cdk5 Kinaseaktivität 30 min nach dem Training signifikant niedriger als in entsprechenden Tieren, die mit aCSF/DMSO injiziert wurden (Fig. 3.15.3 A, B,  $P < 0.0001$ ). Überraschend war das Ergebnis, dass nach i.h. Injektion von Butyrolactone I auch die Cdk5 Kinaseaktivität im Septum signifikant vermindert war (Fig. 3.15.3 A, B,  $P < 0,0001$ ). Ähnliche Resultate wurden erzielt, wenn Butyrolactone I in das laterale Septum injiziert wurde, was zu einer signifikanten Verminderung der Kinaseaktivität im Septum und Hippokampus führte (Fig. 3.15.3 A, B,  $P < 0,0001$ ).

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass i.h. injiziertes Butyrolactone I die septale Cdk5 Aktivität und *vice versa* durch Diffusion inhibiert, wurden drei C57BL/6J Mäuse jeweils i.s. oder i.h. mit Methylenblau injiziert und 45 min später dekaptiert. Die anschließende histologische Analyse zeigte, dass Methylenblaufärbung nur in der jeweils injizierten Region zu finden war und sich nicht durch Diffusion im gesamten septo-hippokampalen System verteilte (Fig 3.15.3 C). Die Ergebnisse zeigen, dass der Effekt von Butyrolactone I auf die kontextabhängige Furchtkonditionierung von C57BL/6J Mäusen (Fig. 3.13) durch eine Inhibierung der basalen Cdk5 Aktivität im septo-hippokampalen System vermittelt werden konnte.



**Abb.3.15.3.** Butyrolactone I vermindert die Cdk5 Aktivität im septo-hippokampalen System während der Gedächtniskonsolidierung.

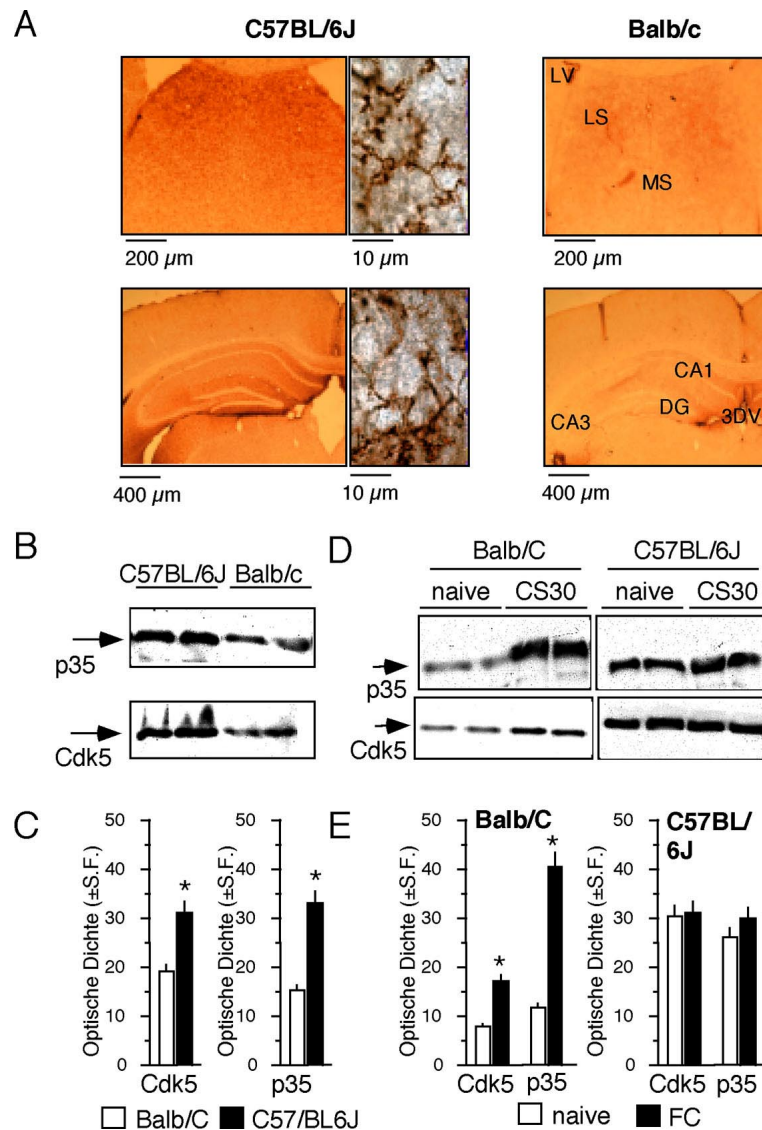
A. C57BL/6J Mäuse (4/Gruppe) wurden 15 min vor dem Training i.s. oder i.h. mit Butyrolactone I oder aCSF/DMSO injiziert und septo-hippokampale Lysate 0,5 h nach dem Training hergestellt. Sowohl die i.h., als auch die i.s. Injektion verminderte die hippocampale Cdk5 Aktivität (oben). Ähnliche Ergebnisse wurden für die Cdk5 Aktivität im Septum erzielt (unten). B. Die Resultate wurden in zwei unabhängigen Experimenten reproduziert und die Signale densitometrisch quantifiziert. \*\* $P < 0,001$  vs. aCSF/DMSO Injektion, \*\*\* $P < 0,0001$  vs. aCSF/DMSO Injektion. C. Repräsentative Abbildungen von Septum und Hippokampus. C57BL6/J Mäuse (3/Gruppe) wurden i.s. mit Methylenblau injiziert und 45 min später dekaptiert. Die Methylenblaufärbung war auf die injizierte Region beschränkt, da keine Färbung im Hippokampus beobachtet werden konnte. D. Repräsentative Abbildungen des Hippokampus und Septum. C57BL6/J Mäuse (3/Gruppe) wurden i.h. mit Methylenblau injiziert und 45 min später dekaptiert. Die Methylenblaufärbung war auf die injizierte Region beschränkt, da keine Färbung im Septum beobachtet werden konnte.

### 3.16 C57BL/6J Mäuse haben eine höhere, basale Cdk5 und p35

#### Proteinproduktion als Balb/c Mäuse

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse wiesen darauf hin, dass C57BL/6J Mäuse unter basalen Bedingungen mehr Cdk5 und p35 Protein produzieren, als Balb/c Mäuse.

Um zu untersuchen, ob die Proteinproduktion von Cdk5 und p35 in unterschiedlichen Mausstämmen variiert, wurde die entsprechende Proteinmenge unter naiven Bedingungen und nach Furchtkonditionierung in C57BL/6J und Balb/c Mäusen untersucht. Im septohippokampalen System von C57BL/6J Mäusen war die basale Cdk5 und p35 Proteinproduktion signifikant höher als in Balb/c Mäusen (Abb. 3.16 A-C,  $P < 0,05$ ). Furchtkonditionierung führte dagegen zu einem signifikanten Anstieg von Cdk5 und p35 in Balb/c Mäusen ( $P < 0,05$ ). Im Vergleich dazu hatte die Furchtkonditionierung keinen Einfluss auf den hohen basalen Cdk5 und p35 Gehalt in C57BL/6J Mäusen (Abb. 3.16 D, E).

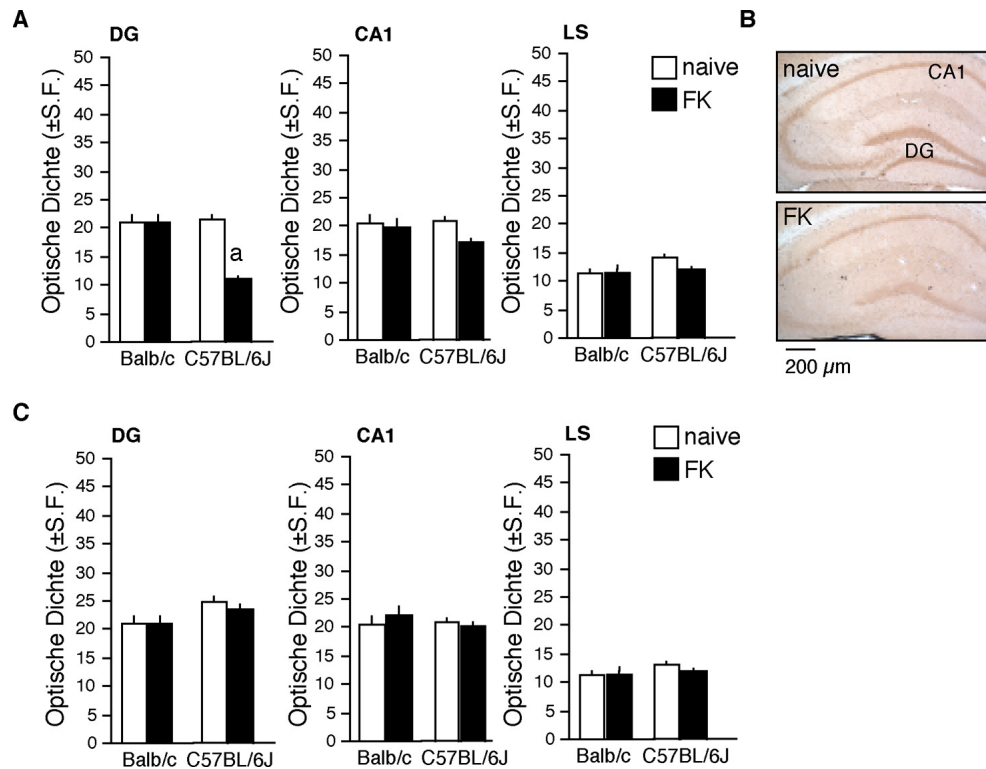


**Abb.3.16.** Die basale Proteinproduktion von Cdk5 und p35 in C57BL/6J Mäusen ist höher als in Balb/c Mäusen und nicht durch Furchtkonditionierung induzierbar.

A. Cdk5 Gehalt im Septum und Hippokampus von naiven C57BL/6J Mäusen (links, das kleine Bild zeigt jeweils eine hohe Vergrößerung der Cdk5 positiven Neuronen im DG und LS) ist höher als in naiven Balb/c Mäusen (rechts). B. Durch Immunoblot konnte gezeigt werden, dass die basale Cdk5 und p35 Produktion im septo-hippokampalen System von C57BL/6J Mäusen höher ist als in Balb/c Mäusen. C. Die unter (B) beschriebenen Ergebnisse wurden zweimal wiederholt und die Signale densitometrisch quantifiziert. Der basale Proteingehalt von Cdk5 und p35 in C57BL/6J Mäusen war signifikant höher als in Balb/c Mäusen (\* $P < 0.05$  vs. Balb/c). D. Für beide Stämme wurden septo-hippokampale Lysate von naiven Mäusen und Mäusen die 0,5 h nach dem Training der kontextabhängigen Furchtkonditionierung dekaptiert wurden hergestellt. Mittels Immunoblot wurde gezeigt, dass der Proteingehalt von Cdk5 und p35 in Balb/c Mäusen durch Furchtkonditionierung induzierbar ist, in C57BL/6J Mäusen jedoch nicht. E. Die unter (D) beschriebenen Ergebnisse wurden zweimal wiederholt und die Signale densitometrisch quantifiziert (\* $P < 0.05$  vs. naive.); \* $P < 0.05$  vs. naive.

### **3.17 Spezifische Produktion von Transkriptionsfaktoren könnte den unterschiedlichen Cdk5 und p35 Gehalt in C57BL/6J und Balb/c Mäusen erklären**

Der unterschiedliche Cdk5 und p35 Gehalt in C57BL/6J und Balb/c Mäusen ist am wahrscheinlichsten auf eine jeweils spezifische Regulation der entsprechenden Promotoren zurückzuführen. Kürzlich konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die GC-Element-Bind-Faktoren Sp1, Sp2 und Sp4 wichtig für die Transkription von p35 sind (Ross et al., 2002). Über die Lokalisation dieser Transkriptionsfaktoren im ZNS ist bisher jedoch wenig bekannt. Die Analyse des *CDK5* Promotors hat gezeigt, dass ebenfalls GC-reiche Sequenzen und u.a. eine AP-1 Bindestelle vorkommen (Ishizuka et al., 1995). Es wurde daher die Vermutung aufgestellt, dass Transkriptionsfaktoren der Sp-Familie und auch cFos an der Regulation von Cdk5 und p35 in C57BL/6J und Balb/c Mäusen beteiligt sein könnten. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde die septo-hippokampale Proteinproduktion von Sp1, Sp3, Sp4 und cFos 0,5 h nach der kontextabhängigen Furchtkonditionierung und in naiven C57BL/6J und Balb/c Mäusen untersucht. Es konnte kein Mausstamm spezifischer Unterschied für den basalen Proteingehalt von Sp1 und Sp3 beobachtet werden (Abb. 3.17.1 A, B). Furchtkonditionierung führte im DG von C57BL/6J zu einer signifikanten Abnahme des Sp1 Gehalts.



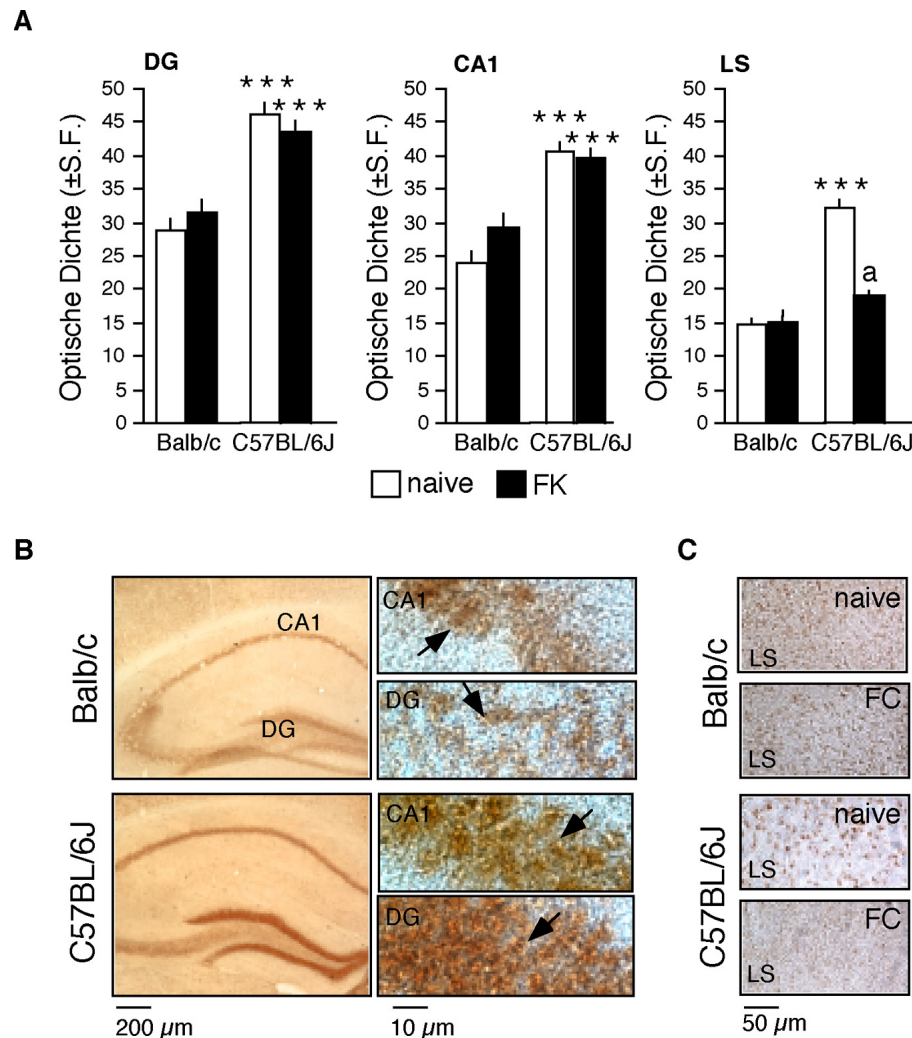
**Abb.3.17.1.** Vergleich der Proteinproduktion von Sp1 und Sp3 0,5 h nach Furchtkonditionierung und in naiven C57BL/6J und Balb/c Mäusen.

A. Die Proteinproduktion von Sp1 wurde 0,5 h nach Furchtkonditionierung und in naiven C57BL/6J und Balb/c Mäusen (5 /Gruppe) immunohistochemisch und densitometrisch analysiert. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen naiven und furchtkonditionierten Mäusen beider Stämme im LS und CA1 beobachtet werden. Im DG von C57BL/6J Mäusen war Sp1 0,5 h nach der Furchtkonditionierung signifikant reduziert. B. Repräsentative Aufnahme des Hippokampus von C57BL/6J Mäusen, die eine verminderte Sp1 Immunofärbung 0,5 h nach Furchtkonditionierung zeigt. C. Für die Sp3 Proteinproduktion konnte kein signifikanter Unterschied zwischen naiven und furchtkonditionierten und Mäusen beider Stämme beobachtet werden.

Im septo-hippokampalen System von naiven C57BL/6J Mäusen war dagegen signifikant mehr Sp4 zu beobachten, als in Balb/c Mäusen (Abb. 3.17.2 A-C,  $P < 0.0001$ ).

Furchtkonditionierung führte im LS von C57BL/6J zu einer signifikanten Abnahme des Sp4 Gehalts.





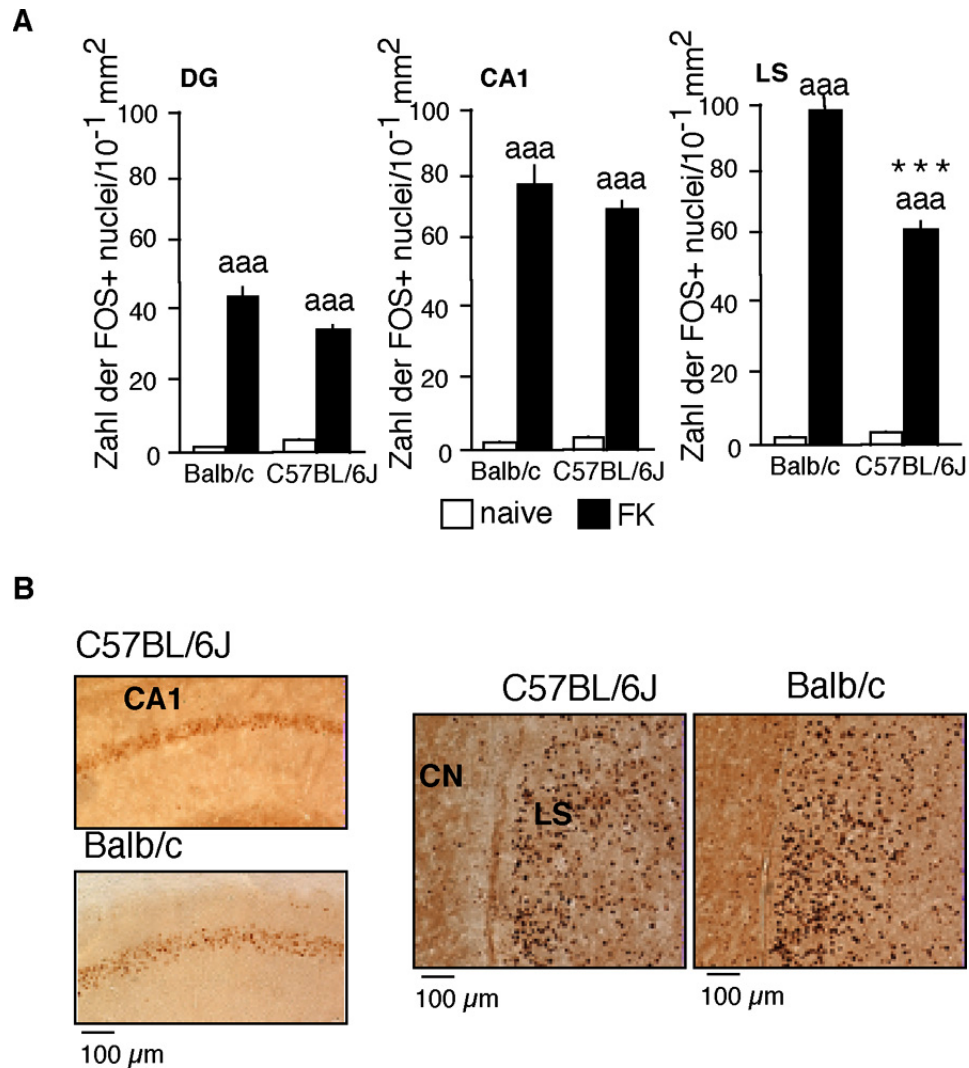
**Abb.3.17.2.** Vergleich der Proteinproduktion von Sp4 0,5 h nach Furchtkonditionierung und in naiven C57BL/6J und Balb/c Mäusen.

A. Die Proteinproduktion von Sp4 wurde 0,5 h nach Furchtkonditionierung und in naiven C57BL/6J und Balb/c Mäusen (5 /Gruppe) immunohistochemisch und densitometrisch analysiert. Die basale Sp4 Proteinproduktion war im septo-hippokampalen System von C57BL/6J Mäusen signifikant stärker als in Balb/c Mäusen. Furchtkonditionierung hatte keinen Einfluss auf den Sp4 Gehalt im Hippokampus, verminderte diesen jedoch im LS von C57BL/6J Mäusen. B. Repräsentative Aufnahmen des Hippokampus (links sind hochvergrößerte Aufnahmen des CA1 und DG mit Sp4 Färbung dargestellt, Pfeile markieren Sp4 positive Nuklei) von naiven Balb/c Mäusen im Vergleich zu C57BL/6J Mäusen, die einen verstärkten Sp4 Gehalt in C57BL/6J Mäusen zeigen. C. Repräsentative Aufnahmen des Septums von naiven und furchtkonditionierten Balb/c Mäusen im Vergleich zu C57BL/6J Mäusen, die einen reduzierten Sp4 Gehalt im LS von C57BL/6J Mäusen 0,5 h nach Furchtkonditionierung zeigen. Statistische Unterschiede: <sup>a</sup> $P < 0.0001$  vs. naive; <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.0001$  vs. entsprechende Gruppe in Balb/c Mäusen.

In naiven Mäusen konnte cFos in keinem Stamm nachgewiesen werden.

Furchtkonditionierung führte dagegen in beiden Stämmen zu einem signifikanten Anstieg des

cFos Proteingehalts. Dieser Anstieg war im lateralen Septum von Balb/c Mäusen signifikant höher als in C57BL/6J Mäusen (Abb. 3.17.3 A, B,  $P < 0,0001$ ).

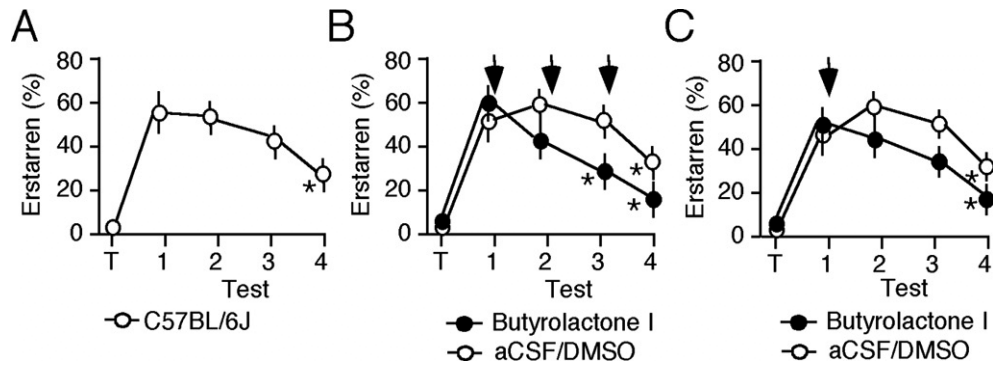


**Abb.3.17.3.** Vergleich der Proteinproduktion von cFos 0,5 h nach Furchtkonditionierung und in naiven C57BL/6J und Balb/c Mäusen.

A. Die Proteinproduktion von cFos wurde 0,5 h nach Furchtkonditionierung und in naiven C57BL/6J und Balb/c Mäusen immunohistochemisch analysiert (5 Mäuse/Gruppe) und anschließend densitometrisch quantifiziert. In naiven Tieren konnte kein cFos Protein beobachtet werden, nach Furchtkonditionierung stieg die cFos Produktion in allen Tieren signifikant an. Der Anstieg im lateralen Septum von Balb/c Mäusen war signifikant höher, als in C57BL/6J Mäusen. B. Links, repräsentative Aufnahmen der hippocampalen CA1 Region von C57BL/6J und Balb/c Mäusen 0,5 h nach Furchtkonditionierung. Rechts, repräsentative Aufnahmen des lateralen Septum von C57BL/6J und Balb/c Mäusen 0,5 h nach Furchtkonditionierung. Statistische Unterschiede: <sup>aaa</sup> $P < 0,0001$  vs. naïve; <sup>\*\*\*</sup> $P < 0,0001$  vs. entsprechenden Gruppe in Balb/c Mäusen

### 3.18 Cdk5 reguliert die Extinktion konditionierter Furcht

Um den Einfluss von Cdk5 auf die Extinktion konditionierter Furcht zu untersuchen wurden C57BL/6J Mäuse zunächst mittels kontext- und tonabhängiger Furchtkonditionierung trainiert und an den folgenden Tagen im Gedächtnistest analysiert. Dabei bestand der Gedächtnistest aus der Präsentation des Kontext (3 min) und des Tons (30 sec) und war soweit dem Training identisch, wobei jedoch kein Elektroschock verabreicht wurde. Es zeigte sich, dass C57BL/6J Mäuse im Test 4 signifikant weniger erstarren als während Test 1, was als Extinktion der konditionierten Furcht gewertet wurde (Abb. 3.18 A). Anschließend wurden C57BL/6J Mäuse mit intrahippokampalen Mikrokanülen versehen, wie beschrieben trainiert und an den folgenden Tagen im Gedächtnistest analysiert. Unmittelbar nach jedem Test wurden die Tiere i.h. mit Butyrolactone I (50 ng/Maus) injiziert. Im Vergleich zu Kontrolltieren, die mit aCSF/DMSO injiziert wurden, zeigte die Butyrolactone I Gruppe bereits im Test 3 signifikant weniger Erstarren (Abb. 3.18 B), wogegen dieses in Kontrolltieren erst im Test 4 zu beobachten war. Als Kontrolle wurde ein Versuch durchgeführt bei dem Butyrolactone I (50 ng/Maus) nur nach Test 1 injiziert wurde. Wie die entsprechende Kontrollgruppe zeigen diese Tiere im Test 4 signifikant weniger Erstarren als im Test 1 (Abb.3.18 C). Werden die einzelnen Tests als Extinktionskurve begriffen, so zeigt die statistische Analyse jedoch einen signifikanten Unterschied zwischen der Extinktionskurve Butyrolactone I injizierter Tiere, gegenüber der Kontrollgruppe [ $F(1,47)= 6,841$ ;  $P < 0,05$ ]. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Injektion von Butyrolactone I zu einer signifikant schnelleren Extinktion der konditionierten Furcht führt, die Cdk5 Aktivität also in die Erhaltung konditionierter Furcht involviert ist, indem Extinktion verhindert wird.



**Abb. 3.18.** Butyrolactone I erleichtert die Extinktion konditionierter Furcht.

A. C57BL/6J Mäuse (n=9) wurden mittels kontext- und tonabhängiger Furchtkonditionierung trainiert (T = Training) und das Erstarren während der folgenden Gedächtnistests analysiert. B. C57BL/6J Mäuse (n= 7/Gruppe) wurden trainiert und das Erstarren während der folgenden Gedächtnistests analysiert. Unmittelbar nach jedem Gedächtnistest wurde Butyrolactone I (50 ng/Maus) oder aCSF/DMSO i.h. injiziert. C. Der Versuch wurde wie unter (B) beschrieben durchgeführt, wobei die Mäuse (n= 8/Gruppe) nur nach dem ersten Gedächtnistest i.h. injiziert wurden. Statistische Unterschiede: \* $P < 0,05$  vs. Test 1. Pfeil; Injektion.

## 4. Diskussion

### 4.1 Identifikation differentiell exprimierter Gene

Die Sequenzierung vollständiger Genome, wie z.B. das des Menschen, ist ein großer Fortschritt für die Biologie und Medizin. Es stellt sich nun die Frage nach der Funktion der vorhandenen Gene. Die Kenntnis des Transkriptoms in einer bestimmten Situation kann hierbei ein erster Schritt sein, um das komplexe Zusammenspiel von Genen und letztlich auch Proteinen zu verstehen. Ein möglicher, methodischer Angang dieser Fragestellung ist die Suche nach differentiell exprimierten Sequenzen in spezifischen Situationen, mittels Subtraktiver Hybridisierung und anschließendem „Differenziellen Screening“. Durch die vollständige Sequenzierung des menschlichen Genoms und die täglich wachsende Zahl bekannter Sequenzen des Mausgenoms, stellt die Tatsache, dass mit Methoden wie der Subtraktiven Hybridisierung nur Genfragmente gefunden werden können, keinen Nachteil mehr da. Ein Beispiel hierfür ist die Tatsache, dass im Laufe der vorliegenden Arbeit alle, bis auf zwei der hier besprochenen Sequenzen, entsprechenden Genen oder vollständigen cDNA Klonen zugewiesen werden konnten. Vielmehr ist die Tatsache, dass eine Sequenz keine Ähnlichkeit zu Genen der Datenbank oder zumindest Expressionsstücken (*expressed sequence tags (EST)*); cDNA wird mit einem Restriktionsenzym geschnitten und zur Sequenzierung in Vektoren kloniert. Diese Sequenzen sind dann in der Datenbank abrufbar. Durch Vergleich überlappender ESTs kann ein vollständiger cDNA Klon erhalten werden) aufweist ein Hinweis darauf, dass es sich um eine Kontamination handeln könnte. Diese Möglichkeit trifft für den hier beschriebenen Klon A6 zu, der keine Ähnlichkeit zu cDNA Sequenzen, jedoch zu chromosomaler DNA zeigte. Es wurde vermutet, dass diese chromosomale Sequenz aufgrund einer Abfolge von Adenosinnukleotiden während der cDNA Synthese isoliert wurde, da das durch 3'RACE PCR amplifizierte Fragment genau an einer solchen Stelle im Genom endet. Diese einzelsträngige DNA könnte so durch den anschließenden DNase Verdau nicht eliminiert worden sein und wäre dann als genomische

Kontamination erhalten geblieben. Da Klon A6 in der cDNA Population immobilisierter Mäuse quantitativ häufiger vorkam als in naiven Mäusen, ist zu vermuten, dass eine solche Kontamination kein quantitatives Ereignis ist. Von den übrigen Klonen wurde in dieser Arbeit die Cdk5 charakterisiert, wobei die gezeigte Funktion während der Gedächtniskonsolidierung neue Forschungsansätze ermöglicht und somit den Ansatz dieser Arbeit rechtfertigt. Die Suche nach differentiell exprimierten Genen mittels Subtraktiver Hybridisierung ist somit eine Möglichkeit die Informationen der Genomanalyse in biologisches Wissen auf Proteinebene umzusetzen. Bisher konnte so vor allem in Systemen mit Tumorzelllinien (Eleveld-Trancikova et al., 2002) Ergebnisse erzielt werden. Aber auch neue Einblicke in entwicklungsbiologische Fragestellungen sind möglich. So konnten nach Überexpression spezifischer mRNA in *Xenopus laevis* neue Komponenten von Signalwegen charakterisiert werden (Maurus, Daniel, persönliche Mitteilung). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass auch Gene identifiziert werden konnten, die durch verhaltensbiologische Experimente an Mäusen aktiviert werden. In Zukunft verspricht vor allem die Kombination subtrahierter cDNA Bibliotheken und der DNA-Chip Technologie weitere Ergebnisse auf diesem Gebiet.

#### **4.2 Septo-hippokampale Cdk5 wird in Balb/c Mäusen durch Immobilisationsstress induziert**

Mit der vorliegenden Arbeit konnte ein mittels subtraktiver Hybridisierung gefundenes Genfragment als Zyklin-abhängige Kinase (Cdk) 5 identifiziert werden. Mittels semiquantitativer RT-PCR und *in situ* Hybridisierung konnte die transiente Aufregulation des *CDK5* Gens in Antwort auf einen einstündigen Immobilisationsstress bestätigt werden. Immunohistochemische Analysen zeigten, dass ein einstündiger Immobilisationsstress auch das Cdk5 Protein transient aufreguliert, wobei die vermehrte Cdk5 Produktion auf cholinerge Neuronen des septo-hippokampalen Systems beschränkt war. Durch die Tatsache, dass Cdk5, welche 0,5 h nach dem Ende einer einstündigen Immobilisierung aus dem septo-hippokampalen System von Balb/c Mäusen immunopräzipitiert wurde, *in vitro* das Cdk5

Substrat Histon H1 phosphorylierte, konnte geschlossen werden, dass Cdk5 im septohippokampalen System in aktiver Form vorliegt. Die *in vitro* Kinaseaktivität war dabei signifikant höher als in naiven Tieren, was in Einklang mit der stressvermittelten Aufregulation des Cdk5 Proteins ist. In bisherigen Arbeiten konnte eine Cdk5 Aufregulation ausschließlich nach  $\Delta FOSB$  Überexpimierung in transgenen Mäusen (Bibb et al., 2001), nachdem Mäusen Kokain verabreicht wurde (Bibb et al., 2001) und nach chronischer Elektroschockbehandlung (Neystat et al., 2001) beobachtet werden.

Cdk5 ist eine Serin/Threonin Kinase und Mitglied der Cdk Familie von Protein Kinasen, welche in die Regulation des Zellzyklus involviert sind (Lew und Wang, 1995). Cdk5 wurde aufgrund seiner Ähnlichkeit zu Cdk2 isoliert (Meyerson et al, 1992). Anders als die übrigen Cdk5 wird Cdk5 jedoch nicht durch Cykline, sondern durch die Regulator-Proteine p35 (Tsai et al., 1994) oder p39 (Tang et al., 1995) aktiviert. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass die Cdk5 Aktivität nicht an der Regulation des Zellzyklus beteiligt, sondern auf postmitotische, nicht mehr teilungsfähige Neuronen beschränkt ist (Ko et al., 2001; Harada et al; 2001, Dhavan and Tsai, 2001). Die physiologische Funktion der Cdk5 wurde bisher mit Prozessen der Gehirnentwicklung (Smith and Tsai, 2002), wie der Phosphorylierung des Zytoskeletts und damit verbundenen neuronaler Migration (Ohshima et al., 1996; Chae et al., 1997), der Axonbildung (Nikolic et al., 1998) aber möglicherweise auch der Neurosekretion (Matsubara et al., 1996; Fletcher et al., 1999) in Verbindung gebracht. Deregulierte Cdk5 Aktivität, die vermutlich durch das Regulator-Protein p25 (Yoo und Lubec, 2001; Takashima et al., 2001), ein Spaltprodukt von p35, vermittelt wird, ist eventuell an der Entstehung der Alzheimer Krankheit beteiligt (Town et al., 2002; Smith and Tsai, 2002). Zudem deuten kürzlich veröffentlichte Daten auf eine Beteiligung der Cdk5 bei der Entstehung von amyotropher lateraler Sklerose (ALS) hin (Patzke and Tsai, 2002). Über die physiologischen Funktionen der Cdk5 im adulten Gehirn ist dagegen nur wenig bekannt.

Das in dieser Arbeit gezeigte Ergebnis, dass die Cdk5 Proteinproduktion und Aktivität durch physiologische Umweltreize verändert werden kann, war daher unerwartet und überraschend.

### 4.3 Bedeutung der Cdk5 für die Gedächtniskonsolidierung

#### 4.3.1 Cdk5 reguliert assoziatives Lernen in Balb/c Mäusen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Cdk5 Protein und die Cdk5 Aktivität durch einen einstündigen Immobilisationsstress induziert werden konnten. Durch immunohistologische Doppelfärbung konnte gezeigt werden, dass Cdk5 zusammen mit dem Aktivatorprotein p35 in cholinergen Neuronen des septo-hippokampalen System lokalisiert ist, was darauf hinweist, dass Cdk5 und p35 einen aktiven Komplex in diesem Gehirngebiet bilden. Diese Vermutung wurde durch den Befund belegt, dass Cdk5 und p35 aus dem septo-hippokampalen System von immobilisierten Balb/c Mäusen co-immunopräzipitiert werden konnten. Interessanterweise konnte mittels Immunoblot demonstriert werden, dass auch das septo-hippokampale p35 Protein 0,5 h nach dem Ende einer einstündigen Immobilisierung signifikant aufreguliert war. Die Mikroinjektion des Cdk5 Inhibitors Butyrolactone I in das laterale Septum oder den Hippokampus verhinderte, die stressvermittelte Verbesserung der kontextuellen Furchtkonditionierung von Balb/c Mäusen. In Einklang damit konnte gezeigt werden, dass die intraseptale oder intrahippokampale Injektion von Butyrolactone I die *in vivo* Kinaseaktivität von Cdk5 signifikant vermindert.

Interessanterweise führte die intraseptale oder intrahippokampale Mikroinjektion von Butyrolactone I auch in Abwesenheit von Stress, zu einer Verschlechterung der kontextabhängige Furchtkonditionierung. Die Butyrolactone I Injektion hatte dabei keinen Einfluss auf die tonabhängige Furchtkonditionierung, was in Einklang mit der vorherrschenden Darstellung ist, dass Septum (Sparks und LeDoux, 1995) und Hippokampus (Kim und Fanselow, 1992) nicht in den Erwerb von tonabhängiger Furcht involviert sind. Zudem hatte eine Blockierung der Cdk5 Aktivität keinen Einfluss auf die stressmodulierte Angst, was ebenfalls auf eine spezifische Funktion der Cdk5 während der Gedächtniskonsolidierung hinweist. Dass die induzierbare Cdk5 Aktivität im septo-hippokampalen System für assoziatives Lernen und dessen stressvermittelte Verbesserung



essentiell ist, demonstriert eine neue, unerwartete Funktion des Cdk5 Proteins. Kürzlich veröffentlichte Arbeiten bestätigen diese Ergebnisse. So konnte inzwischen gezeigt werden, dass Cdk5 N-methyl-d-aspartat (NMDA) Rezeptoren phosphoryliert und die Inhibierung der Cdk5 Aktivität die Ausbildung der Langzeitpotenzierung (LTP) in hippokampalen Hirnschnitten von Ratten blockiert (Li et al., 2001). Die Phosphorylierung von P/Q-spannungsabhängigen Kalziumkanälen durch Cdk5 ist eventuell in die Ausschüttung von Neurotransmitter involviert (Tomizawa et al, 2002; Yan et al., 2002). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Cdk5 die Gedächtniskonsolidierung durch die Phosphorylierung von synaptischen Membranrezeptoren modulieren könnte. Diese Vermutung ist in Einklang mit der in dieser Arbeit beschriebenen, ausschließlich cytoplasmatischen Lokalisation von Cdk5 in Balb/c und C57BL/6J Mäusen. Es darf aber auch spekuliert werden, dass ähnliche Funktionen, wie sie für Cdk5 während der Gehirnentwicklung beschrieben wurden, auch für die Gedächtniskonsolidierung wichtig sind. So wurde gezeigt, dass für die Entstehung von LTP, ein dynamisches Zytoskelett, welches zu neuronalen, morphologischen Veränderungen führt, essentiell ist (Rossum und Hanisch, 1999; Hatada et al., 2000). Zudem verändert die Modulation des Zytoskeletts, die Aktivität und Zellmembran-Verankerung von nikotinischen und muskarinen Acetylcholin-Rezeptoren (Bencherif und Lukas, 1993). Cdk5 könnte die Gedächtniskonsolidierung also auch durch strukturelle Veränderungen des Zytoskeletts beeinflussen. Hierfür sprechen auch noch unveröffentlichten Arbeiten in denen gezeigt werden konnte, dass die i.h. Injektion von Cytochalasin D, einer Substanz, welche die Polymerisierung von Aktin inhibiert ohne die normale synaptische Aktivität zu beeinflussen (Krucker et al., 2000), die Furchtkonditionierung in Balb/c und C57BL/6J Mäusen signifikant verschlechtert (Fischer, Andre und Radulovic, Jelena, unveröffentlichte Beobachtung). Ein möglicher Mechanismus könnte die Phosphorylierung der Proteinkinase Pak-1 (p21 aktivierte Kinase) sein. Es konnte gezeigt werden, dass die Cdk5/p35 vermittelte Phosphorylierung von Pak-1 deren Kinaseaktivität vermindert (Nikolic et al., 1998). Ein Substrat der Pak-1 ist eine weitere Proteinkinase, die LIM-Kinase (Edwards et al., 1999), welche nach Pak-1 vermittelter Phosphorylierung das Aktin-regulierende Protein Cofilin phosphorylieren kann (Arber et al.,

1998; Yang et al, 1998). Cofilin bewirkt die Depolymerisierung von Aktin, wobei die Phosphorylierung von Cofilin dessen Aktivität inhibiert (Bamburg et al., 1999). Dieser hypothetische Signalweg lässt vermuten, dass die Cdk5 Aktivität während der Gedächtniskonsolidierung zu einer verstärkten Depolymerisierung von Aktin führen könnte. Gleichzeitig moduliert Cdk5 auch das Mikrotubuli-Gerüst der Zelle, indem es z.B. MAP-1 (Mikrotubuli-assoziiertes Protein; Smith und Tsai, 2002) und TAU phosphorylieren kann (Baumann. 1993; Flaherty et al., 2000). Vor diesem Hintergrund ist zu bemerken, dass die Cdk5 vermittelte Hyperphosphorylierung des Zytoskeletts (Patrick und Zuckerberg, 1999, Alvarez et al., 2001) und verminderte cholinerge Neurotransmission (Morrison und Hof, 1997) wichtige Bestandteile der Pathogenese der Alzheimer Krankheit sind. Daher kann vermutet werden, dass eine deregulierte Cdk5 Aktivität im cholinergen septo-hippokampalen System an der pathophysiologischen Cdk5 Hyperaktivität, wie sie während der Alzheimer Krankheit beobachtet wird, beteiligt ist. Die in dieser Arbeit beschriebenen Daten, dass die Blockierung der Cdk5 Aktivität die Gedächtniskonsolidierung verschlechtert, lassen aber auch eine andere Interpretation zu. Demnach könnte die erhöhte Cdk5 Aktivität in den Gehirnen von Alzheimer Patienten auch einen Mechanismus darstellen, der dazu dienen könnte die kognitiven Defizite zu kompensieren.

#### **4.3.2 Cdk5 reguliert assoziatives Lernen in verschiedenen**

##### **Mausstämmen**

Um die Funktion der Cdk5 während der Gedächtniskonsolidierung eingehender zu untersuchen, wurde deren Einfluss auf die Furchtkonditionierung von C57BL/6J Mäusen untersucht. Dieser Stamm wurde gewählt, da er zum einen häufiger für Experimente verwendet wird als Balb/c Mäuse und so einen direkteren Vergleich mit Ergebnissen anderer Laboratorien ermöglicht. Andererseits wurden für die kognitiven Fähigkeiten in verschiedenen Lernexperimenten (Francis et al., 1995; Bao et al. 1998; Heyser et. al, 1999) inklusive der Furchtkonditionierung (Chen at al., 1996) signifikante Unterschiede zu Balb/c Mäusen

beschrieben. Die Mikroinjektion von Butyrolactone I in das septo-hippokampale System von C57BL/6J Mäusen verminderte die basale Cdk5 Aktivität und die kontextabhängige Furchtkonditionierung signifikant und bestätigt somit die zuvor beschriebenen Ergebnisse an Balb/c Mäusen (4.3.1). Ähnliche Ergebnisse wurden auch durch die Injektion von Rocovitin, einem weiteren Cdk5 Inhibitor, erzielt, wenn dieser in die lateralen Ventrikel (i.c.v.) injiziert wurde. Überraschenderweise blockierte intrahippokampal injiziertes Butyrolactone I nicht nur die Cdk5 *in vivo* Aktivität im Hippokampus sondern auch im Septum. Umgekehrt blockierte auch die intraseptale Injektion die Cdk5 *in vivo* Aktivität im gesamten septo-hippokampalen System. Da dieser Effekt nicht auf Diffusion beruhte, ist zu vermuten, dass die Cdk5 Aktivität im septo-hippokampalen System funktionell verknüpft ist. Für eine solche Annahme sprechen Experimente in denen die Fimbria/Fronix-Verbindung, ein massives Faserbündel welches Hippokampus und Septum verbindet (siehe auch 1.5), zerstört wurden. Eine solche Läsion führt in Ratten zu einer Verschlechterung des assoziativen Lernens (Taubenfeld et al., 1999), verhindert u.a. die Phosphorylierung des Creb-Proteins (siehe auch 1.3) und die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren im Hippokampus (Taubenfeld et al., 2001). Furchtkonditionierung hatte im Gegensatz zu Balb/c Mäusen keinen Einfluss auf die septo-hippokampale Cdk5/p35 Proteinproduktion und Cdk5 Aktivität in C57BL/6J Mäusen, was dadurch erklärt werden kann, dass dieser Stamm unter naiven Bedingungen signifikant mehr Cdk5 und p35 produziert als Balb/c Mäuse. Tatsächlich entsprach die basale Cdk5 und p35 Proteinproduktion in naiven C57BL/6J Mäusen der induzierbaren Cdk5/p35 Proteinmenge in Balb/c Mäusen, so dass vermutet werden kann, dass eine Aufregulation in C57BL/6J Mäusen nicht notwendig war, um die Cdk5 Aktivität während der Gedächtniskonsolidierung zu gewährleisten. Vor diesem Hintergrund kann spekuliert werden, dass die im Vergleich zu Balb/c Mäusen signifikant höhere basale Proteinproduktion von Cdk5/p35 und eventuell anderen Proteinen, wie z.B. pElk und dpErk, die an der Gedächtniskonsolidierung beteiligt sind (Radulovic, Jelena, persönliche Mitteilung), zumindest teilweise für die bessere Furchtkonditionierung von C57BL/6J Mäusen (Chen et al., 1996) verantwortlich sein könnte. Tatsächlich wurde in einer kürzlich veröffentlichten

Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass die Quantität der translatierten Proteine im Gehirn in einem direkten Verhältnis zu den entsprechenden kognitiven Eigenschaften steht (Enard et al., 2002). Der höhere basale Proteingehalt von Cdk5 und p35 in C57BL/6J Mäusen und die transiente Induzierbarkeit in Balb/c Mäusen ist am einfachsten durch die spezifische Aktivität von Transkriptionsfaktoren zu erklären. Wie kürzlich gezeigt werden konnte, sind die GC-Element-Bindefaktoren Sp1, Sp2 und Sp4 essentiell und ausreichend für die Expression von p35 in Neuronen (Ross et al., 2002). Über die Lokalisation dieser Transkriptionsfaktoren im Zentralen Nervensystem ist jedoch nur wenig bekannt. Das 5' Ende des *CDK5*-Promotors ist ebenfalls GC-reich und weist zudem eine AP-1, zwei AP-2 und eine CRE (cAMP Antwort Element) Bindestelle auf (Ishizuka et al., 1995). Das Vorhandensein der AP-1 Bindestelle ist in Einklang mit Ergebnissen, die eine erhöhte Cdk5 Produktion nach  $\Delta FOSB$  Überexprimierung in transgenen Mäusen zeigten (Bibb et al., 2001). Der in dieser Arbeit beschriebene, im Vergleich zu Balb/c Mäusen signifikant erhöhte Sp4 Gehalt im septo-hippokampalen System von C57BL/6J Mäusen, ist ein Hinweis, dass Sp4 einer der Transkriptionsfaktoren sein könnte, die für die höhere basale Cdk5 und p35 Proteinproduktion in C57BL/6J Mäusen verantwortlich ist. Andererseits könnten früh exprimierte Gene wie *cFOS* (Radulovic et al, 1998), die bei einer Vielzahl von Umweltreizen aktiviert werden (Robertson, 1992), für die induzierte Cdk5 Produktion in Balb/c Mäusen mitverantwortlich sein. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist die cFos Produktion in Antwort auf Furchtkonditionierung im Septum von Balb/c Mäusen tatsächlich signifikant höher als in C57BL/6J Mäusen. Diese Ergebnisse unterstützen die aufgestellte Vermutung, dass eine spezifische Verwendung bestimmter Transkriptionsfaktoren den unterschiedlichen Cdk5 und p35 Gehalt in C57BL/6J und Balb/c Mäusen erklären könnte.

#### **4.4 Cdk5 reguliert die Extinktion konditionierter Furcht**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cdk5 in die Gedächtniskonsolidierung während der Furchtkonditionierung involviert ist. Es sollte daher auch überprüft werden, ob dessen Aktivität Einfluss auf verwandte kognitive Eigenschaften, wie die Extinktion (siehe

auch 1.2.2) der konditionierten Furcht hat.. Über die molekularen Ereignisse, die der Extinktion zu Grunde liegen ist noch relativ wenig bekannt. Es gibt immerhin Hinweise, dass z.B. NMDA-Rezeptoren neben ihrer Funktion während der Gedächtniskonsolidierung auch für die Extinktion wichtig sein könnten (Falls et al., 1992; Johnson et al., 2000), was darauf hindeutet, dass Mechanismen die zum Erwerb von Informationen führen, zumindest teilweise auch an deren Extinktion beteiligt sein könnten. Die Daten auf diesem Gebiet sind zudem noch sehr kontrovers (Nader et al., 2000; Lattal et al., 2001, Fischer et al., 2002). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die intrahippokampale Injektion von Butyrolactone I zu einer signifikant schnelleren Extinktion des Erstarrens führte. Dieses Ergebnis resultiert aus dem Befund, dass mit Butyrolactone I injizierte Tiere schon im Test 3 signifikant weniger Erstarren als im Test 1, wenn sie sowohl nach Test 1 und nach Test 2 injiziert wurden. Für Kontrolltiere konnte erst im Test 4 ein signifikanter Unterschied zum Erstarren gegenüber Test 1 beobachtet werden. Dieser Effekt war durch die alleinige Butyrolactone I-Injektion nach Test 1 nicht zu erreichen, wobei sich bei einem Vergleich der Extinktionskurven dennoch ein signifikanter Unterschied zu Kontrolltieren zeigte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Cdk5 Aktivität nach Test 1 und Test 2 modulierend auf die Extinktion der konditionierten Furcht einwirkt. Die Cdk5 Aktivität ist also sowohl an der Gedächtniskonsolidierung, d.h. der Abspeicherung der Furchterinnerung im Langzeitgedächtnis, als auch an der Regulation der Extinktion dieser Furchterinnerung beteiligt. Es kann daher spekuliert werden, dass die gleichen Cdk5 vermittelten zellulären Mechanismen, die zum Erwerb der Furchterinnerung führen, auch während der Extinktion aktiviert werden. Das die Injektion von Butyrolactone I die Extinktion konditionierter Furcht signifikant beschleunigt, widerspricht allerdings dieser Vermutung, wenn man annimmt, dass auch Extinktion eine Form von Lernen darstellt. Nach dieser Theorie lernen die Versuchstiere als neue Information während der Extinktion, dass ein zuvor konditionierter Reiz nicht mehr aversiv ist (Berman und Dudai, 2001). Demnach würde Cdk5 während der Furchtkonditionierung die Gedächtniskonsolidierung verbessern, wogegen die Gedächtniskonsolidierung während der Extinktion der konditionierten Furcht durch Cdk5

verschlechtert wird. Andererseits kann spekuliert werden, dass es zelluläre Mechanismen gibt, die die Extinktion verhindern, also daran teilhaben die Furchterinnerung aufrechtzuerhalten. Die Tatsache, dass Cdk5 an einem solchen Mechanismus beteiligt ist, erlaubt die Annahme, dass diese Mechanismen auf molekularer Ebene, denen während der Gedächtniskonsolidierung entsprechen könnten. Die molekularen Vorgänge, die beteiligten Hirnregionen und zellulären Komponenten während der Extinktion sind ein wichtiges, allerdings noch weitgehend unerforschtes Gebiet. Eine Reihe von Arbeiten deutet zudem darauf hin, dass Mechanismen, die eine Extinktion konditionierter Furcht regulieren, auch für die Extinktion aversiver Verhaltensweisen, wie Sucht und Abhängigkeit oder Posttraumatischen Belastungsstörungen (PTSD) von Bedeutung sind (Koob, 2000; Conklin und Tiffany, 2002; Kodituwakku, 2001; Wessa und Flor, 2002). Die in dieser Arbeit gezeigte Funktion, dass Cdk5 Aktivität die Extinktion konditionierten Furcht verhindert, eröffnet somit die Möglichkeit neuer therapeutischer Ansätze. In zahlreichen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass z.B. Alkohol- oder Kokainabhängigkeit im Mausmodell untersucht werden kann (Stitzer et al, 1985; Sillaber et al., 2002). Es wird daher interessant sein, zu analysieren, inwiefern die Blockierung der Cdk5 Aktivität diese Prozesse beeinflussen kann.

## **5. Zusammenfassung und abschließende Betrachtung**

- 1) Durch die Kombination verhaltens- und molekularbiologischer Methoden konnte in dieser Arbeit das Gen für die Cyclin abhängige Kinase (Cdk) 5, als differentiell exprimiertes Gen des lateralen Septums entdeckt werden. Cdk5 ist eine Serin/Threonin Kinase und Mitglied der Cdk Familie von Protein Kinasen, welche häufig in die Regulation des Zellzyklus involviert sind (Lew und Wang, 1995). Anders als die übrigen Mitglieder der Cdk Proteinfamilie wird die Cdk5 nicht durch Cycline, sondern vor allem durch das Regulatorprotein p35 aktiviert. Obwohl Cdk5 zu den übrigen Cdks Homologien von 55-83% aufweist, ist für die Cdk5 keine Funktion während des Zellzyklus bekannt (Dhavan und Tsai, 2001). Dagegen konnte gezeigt werden, dass die Cdk5-Aktivität für verschiedene Prozesse der Gehirnentwicklung wichtig ist (Smith and Tsai, 2002). Über

die physiologischen Funktionen der Cdk5 im adulten Gehirn war bisher nur wenig bekannt.

- 2) In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass das Cdk5 Gen in Antwort auf einen einstündigen Immobilisationsstress im lateralen Septum von Balb/c Mäusen induziert wurde. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass auch das Cdk5 Protein 0,5 h nach dem Ende des Immobilisationsstress transient aufreguliert wurde. Dabei war die verstärkte Proteinproduktion auf cholinerge Neuronen des septo-hippokampalen Systems beschränkt.
- 3) Der Cdk5/p35 Komplex konnte aus dem septo-hippokampalen System von immobilisierten Balb/c Mäusen immunpräzipitiert werden und phosphorylierte *in vitro* das Cdk5 Substrat Histon H1. Zudem war die *in vitro* Cdk5 Kinaseaktivität 0,5 h nach dem Ende einer einstündigen Immobilisierung signifikant höher als in naiven Balb/c Mäusen, was demonstrierte, dass Immobilisationstress zu einer erhöhten Cdk5 Aktivität im septo-hippokampalen System von Balb/c Mäusen führte.
- 4) Die Mikroinjektion des Cdk5 Inhibitors Butyrolactone I in das laterale Septum (i.s.) oder den Hippokampus (i.h.), verminderte die *in vivo* Cdk5 Kinaseaktivität signifikant und blockierte gleichzeitig die stressinduzierte Verstärkung der kontextuellen Furchtkonditionierung. Interessanterweise blockierte die intraseptale oder intrahippokampale Injektion von Butyrolactone I auch in Abwesenheit von Stress die Furchtkonditionierung von Balb/c Mäusen. In Einklang damit konnte gezeigt werden, dass auch das Training der kontextuellen Furchtkonditionierung zu einer transienten Aufregulation der Cdk5 im septo-hippokampalen System führte. Die Butyrolactone I-Injektion hatte keinen Einfluss auf die stressvermittelte Angst von Balb/c Mäusen.

- 5) Die Cdk5 Aktivität war auch für die Gedächtniskonsolidierung von C57BL/6J Mäusen essentiell. Diese Erkenntnis folgte aus der Beobachtung, dass die intraseptale oder intrahippokampale Injektion von Butyrolactone I oder die Injektion von Roscovitin, einem weiteren Cdk5 Inhibitor, die kontextuelle Furchtkonditionierung signifikant verschlechterte. Im Gegensatz zu Balb/c Mäusen war der Cdk5/p35 Komplex und dessen Aktivität in C57BL/6J Mäusen nicht durch Furchtkonditionierung induzierbar, was durch die Tatsache erklärt werden konnte, dass C57BL/6J Mäuse eine signifikant höhere, basale Cdk5/p35 Proteinproduktion aufwiesen. Eine mögliche Erklärung hierfür kann u.a. eine höhere, basale Proteinproduktion von Transkriptionsfaktoren sein. In Einklang mit dieser Sichtweise konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor Sp4, der möglicherweise an der Transkription des Cdk5 und p35 Gens beteiligt ist, in C57BL/6J Mäusen signifikant mehr produziert wird als in Balb/c Mäusen.
- 6) In weiterführenden Experimenten konnte demonstriert werden, dass die hippokampale Cdk5 Aktivität die Extinktion der konditionierter Furcht verhindert, also neben der Gedächtniskonsolidierung, die eine Abspeicherung von Informationen im Langzeitgedächtnis darstellt, auch an der Aufrechterhaltung der Furchterinnerung beteiligt war. Dieses kann bedeuten, dass die Cdk5 Aktivität während der Extinktion entweder die Furchterinnerung verstärkt oder aber die Umsetzung von Furchterinnerung in das aversive Verhalten des Erstarrens moduliert. Die Kenntnis darüber, inwieweit die durch Cdk5 regulierten molekularen Signalwege während der Gedächtniskonsolidierung und Extinktion gleich sind, ist dabei eine spannende Frage für die Zukunft.
- 7) Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse, dass die Cdk5 Aktivität für assoziatives Lernen in Balb/c und C57BL/6J Mäusen verantwortlich war, demonstrieren eine neue physiologische Funktion der Cdk5 und weisen zudem darauf hin, dass diese Funktion zwischen verschiedenen Mausstämmen und möglicherweise weiteren Spezies konserviert



ist. Andere Arbeiten haben mittlerweile gezeigt, dass Cdk5 NMDA-Rezeptoren phosphorylieren kann und Roscovitin die Ausbildung von Langzeitpotenzierung verhindert (Li et al., 2001). Potentielle Substrate der Cdk5 während der Gedächtniskonsolidierung sind daher möglicherweise Ionenkanäle. Andererseits kann spekuliert werden, dass Cdk5 Komponenten des Zytoskeletts phosphoryliert, was zu strukturellen Änderungen der Nervenzelle führen kann (siehe auch 4.3.1). Die vorliegende Arbeit beschreibt außerdem erstmals ein Protein, das sowohl für die Furchtkonditionierung, deren stressvermittelte Verstärkung und die Extinktion der konditionierten Furcht mitverantwortlich ist, was darauf hindeutet, dass Cdk5 ein zentraler Regulator dieser Gehirnfunktionen sein könnte.

## 6. Literatur

Abel T, Martin KC, Bartsch D, Kandel E (1998) Memory suppressor genes: Inhibitory constraints on the storage of long-term memory. *Science* 279:338-341

Agranoff BW (1967) Agents that block memory. *The Neuroscience: A study Program* (Herausgeber, Quarten GC, Melnechuk T, Schmitt FO, New York: Rockefeller University Press.

Alberini CM (1999) Genes to remember. *J Exp Biol* 21: 2887-2891

Alvarez A, Munoz JP, Maccioni RB (2001) A cdk5-p35 stable complex is involved in the beta-amyloid-induced deregulation of cdk5 activity in hippocampal neurons. *Exp Cell Res* 264: 266-274.

Arber S, Barbayannis FA, Hanser H, Schneider C, Stanyon CA, Bernard O, Caroni P (1998) Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 393: 805-809

Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD (1998) The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci* 7:602-609.

Baumann K, Mandelkow EM, Biernat J, Piwnicka-Worms H, Mandelkow E (1993) Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS Lett* 3: 417-424

Bamburg JR, McGough A, Ono S (1999) Putting a new twist on actin: ADF/cofilins modulate actin dynamics. *Trends Cell Biol* 9: 364-370

- Bao S, Chen L, Thompson R F (1998) Classical eyeblink conditioning in two strains of mice: conditioned responses, sensitization, and spontaneous eyeblinks. *Behavioral Neuroscience* 112: 714-718.
- Barondes SH (1975) Protein synthesis dependent and protein synthesis independent memory storage processes. *Short Term Memory* (Herausgeber, Deutsch D, Deutsch JA, New York, Academic Press.
- Bartolomucci A, De Biurrun G, Czeh B, Van Kampen M, Fuchs E (2002) Selective enhancement of spatial learning under chronic psychosocial stress. *Eur J Neurosci* 11:1 863-866
- Bencherif M, Lukas RJ (1993) Cytochalasin modulation of nicotinic cholinergic receptor expression and muscarinic receptor function in human TE671/RD cells: a possible functional role of the cytoskeleton. *J Neurochem* 61: 852-864.
- Berman DE, Dudai Y (2001) Memory extinction, learning a new, and learning the new: dissociation in the molecular machinery of learning in cortex. *Science* 291:2417-2419
- Bibb JA, Chen J, Taylor JR, Svenningsson P, Nishi A, Snyder GL, Yan Z, Sagawa ZK, Ouimet CC, Nairn AC, Nestler EJ, Greengard P (2001). Effects of chronic exposure to cocaine are regulated by the neuronal protein Cdk5. *Nature* 410: 376-380.
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 6:1513-1523
- Blanchard, RJ & Blanchard, DC (1969). *J. Comp. Physiol. Psychol.* 67, 370-375

Bliss TV, Lømo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 2: 331-56

Bouton ME. 1993. Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of Pavlovian learning. *Psychol. Bull.* 114: 80-99.

Bourtchuladze R, Frenquelli B, Blendy J, Cioffi D, Schutz G, Silva AJ (1994) Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* 1: 59-68

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 268;22663-22671

Cammarota, M, Bevilacqua, LR, Ardenghi, P, Paratcha G, Levi de Stein M, Izquierdo I, Medina, J.H. (2000) Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 76:36-46

Cannon, WB(1923) Bodily changes in pain, hunger, fear and rage; an account of recent researches into the function of emotional excitement. McGrath Pub. Co, 2nd edition.

Castellucci VF, Blumenfeld H, Goelet P, Kandel ER (1989) Inhibitor of protein synthesis blocks long-term behavioral sensitization in the isolated gill-withdrawal reflex of *Aplysia*. *J Neurobiol* 1: 1-9

Castro CA, Silbert LH, McNaughton BL, Barnes CA (1989) Recovery of spatial learning deficits after decay of electrically induced synaptic enhancement in the hippocampus. *Nature* 342: 545-548

Chae T, Kwon YT, Bronson R, Dikke P, Li E, Tsai LH (1997) Mice lacking p35, a neuronal specific activator of Cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality. *Neuron* 18: 29–42.

Chen C, Kim JJ, Thompson RF, Tonegawa S (1996) Hippocampal lesions impair contextual fear conditioning in two strains of mice. *Behavioral Neurosci.* 110: 1177-1180.

Chan J, Kan YW, Diatchenko LD, Vijaychanderb S, Chenchik A, Siebert PD (1997) Cloning Differentially Expressed Genes from Small Amounts of Total RNA with the CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit CLONTECHniques 1997 IV

Conklin CA, Tiffany ST (2002) Applying extinction research and theory to cue-exposure addiction treatments. *Addiction* 2:155-67

Davis HP, Squire LR (1984) Protein synthesis and memory: a review. *Psychol. Bull.* 96: 518-559

Darwin, C (2000) Ekman, P (Herausgeber) Eichborn Vlg., Ffm.

Deisseroth K, Bito H, Tsien RW (1996) Signaling from synapse to nucleus: postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity. *Neuron* 1: 89-101

Desmedt A, Garcia R, Jaffard R (1999) Vasopressin in the lateral septum promotes elemental conditioning to the detriment of contextual fear conditioning in mice. *Eur J Neurosci* 11: 3913-3921

Dhavan R, Tsai LH (2001) A decade of CDK5. *Nature Reviews Molecular and Cell Biology* 2: 749-759.

Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6025-6030

Edwards DC, Sanders LC, Bokoch GM, Gill GN (1999) Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol* 5: 253-259

Eleveld-Trancikova D, Kudela P, Majerciak V, Regendova M, Zelnik V, Pastorek J, Pastorekova S, Bizik J (2002) Suppression subtractive hybridisation to isolate differentially expressed genes involved in invasiveness of melanoma cell line cultured under different conditions. *Int J Oncol* 3: 501-508

Enard W, Khaitovich P, Klose J, Zollner S, Heissig F, Giavalisco P, Nieselt-Struwe K, Muchmore E, Varki A, Ravid R, Doxiadis GM, Bontrop RE, Paabo S (2002) Intra- and interspecific variation in primate gene expression patterns. *Science* 296: 340-343.

Falls WA, Miserendino MJ, Davis M (1992) Extinction of fear potentiated startle: blockade by infusion of an NMDA antagonist into the amygdala. *J Neuroscience* 12:854-863

Fischer A (2000) Subtraktive Hybridisierung im lateralen Septum und Hippokampus nach 1 h Immobilisationsstress . Diplomarbeit. Limitierte, selbstgebundene Auflage.

Fischer A, Sananbenesi F, Schrick C, Spiess J, Radulovic J (2002) Logic rules in the hippocampus: A basis for persistence and reduction of conditioned fear. *Hippocampus*, Submitted.

Flaherty DB, Soria JP, Tomasiewicz HG, Wood JG (2000) Phosphorylation of human tau protein by microtubule-associated kinases: GSK3beta and cdk5 are key participants. *J Neurosci Res* 3: 463-472

Fletcher AI, Shuang R, Giovannucci DR, Zhang L, Bittner MA, Stuenkel, EL (1999) Regulation of exocytosis by cyclin-dependent kinase 5 via phosphorylation of Munc 18. *Journal of Biological Chemistry* 274: 4027-4035.

Flexner JB, Flexner LB, Stellar E (1963) Memory in mice is affected by intracerebral puromycin. *Science* 141: 567-569

Francis DD, Zaharia MD, Shanks N, Anisman H, (1995) Stress-induced disturbances in Morris water-maze performance: interstrain variability. *Physiology and Behavior* 58: 57-65.

Franklin KBJ, Paxinos, G (1997) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic.

Hatada Y, Wu F, Sun ZY, Schacher S, Goldberg DJ (2000) Presynaptic morphological changes associated with long-term synaptic facilitation are triggered by actin polymerization at preexisting varicosities. *J Neurosci* 20: RC82.

Harada T, Morooka T, Ogawa S, Nishida E (2001) ERK induces p35, a neuron-specific activator of Cdk5, through induction of Egr1. *Nature Cell Biology* 5: 453-459.

Hebb DO (1949) *The organization of behaviour*. John Wiley&Sons

Heyser CJ, McDonald JS, Polis IY, Gold LH (1999) Strain distribution of mice in discriminated Y-maze avoidance learning: genetic and procedural differences. *Behavioral Neuroscience* 113: 91-102.

Ishizuka T, Ino H, Sawa K, Suzuki N, Tatibana M (1995) Promoter region of the mouse cyclin-dependent kinase 5-encoding gene. *Gene*. 166: 267-271.

- Johnson DM, Baker JD, Azorlosa JL (2000) Acquisition, extinction and reinstatement of Pavlovian fear conditioning: the roles of NMDA receptor and nitric oxide. *Brain Res* 857: 66-70
- Kaang BK, Kandel ER, Grant SG (1993) Activation of cAMP-responsive genes by stimuli that produce long-term facilitation in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron* 3: 427-35
- Kandel ER (1997) Genes, synapses, and long-term memory. *J. Cell. Physiol.* 173: 124-125
- Kim JJ, Fanselow MS (1992) Modality-specific retrograde-amnesia of fear. *Science* 256: 675-677.
- Kim JJ, Diamond DM (2002) The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci* 6: 453-462
- Kitagawa M, Higashi H, Takahashi IS, Okabe T, Ogino H, Taya Y, Hishimura S, Okuyama A (1994) A cyclin-dependent kinase inhibitor, butyrolactone-I, inhibits phosphorylation of Rb protein and cell cycle progression. *Oncogene* 9: 2549-2557.
- Ko J, Humbert S, Bronson RT, Takahashi S, Kulkarni, AB, Li E, Tsai LH (2001) p35 and p39 are essential for cyclin-dependent kinase 5 function during neurodevelopment. *Journal of Neuroscience* 17: 6758-6771.
- Kodituwakku PW, May PA, Clericuzio CL, Weers D (2001) Emotion-related learning in individuals prenatally exposed to alcohol: an investigation of the relation between set shifting, extinction of responses, and behavior. *Neuropsychologia* 7: 699-708



- Köhler T (1995) General aspects and chances of nucleic acid quantitation by PCR. In: Köhler T, Laßner D, Rost AK, Thamm B, Pustowitz B, Remke H. Quantitation of mRNA by polymerase chain reaction. Nonradioactive PCR methods. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
- Koob GF (2000) Animal models of craving ethanol. *Addiction* 2: 73-81
- Krucker T, Siggins GR, Halpain S (2000) Dynamic actin filaments are required for stable long-term potentiation (LTP) in area CA1 of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 12: 6856-6861
- Lattal KM, Abel T (2001). Different requirements for protein synthesis in acquisition and extinction of spatial preferences and context-evoked fear. *J Neurosci* 21: 5773-5780
- Lew J, Wang JH (1995) Neuronal cdc2-like kinase. *Trends Biochem Sci* 1:33-37
- Li BS, Sun K, Zhang L, Takahashi S, Ma W, Vinade L, Kulkarni AB, Brady RO, Pant HC (2001) Regulation of NMDA receptors by cyclin-dependent kinase-5. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98: 12742-12747.
- Lister RG (1987) The use of a plus maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 92: 180-185
- Luo Y, Long JM, Lu C, Chan SL, Spangler EL, Mascarucci P, Raz A, Longo DL, Mattson MP, Ingram DK, Weng NP (2002) A link between maze learning and hippocampal expression of neuroleukin and its receptor gp78. *J Neurochem* 2002 2: 354-361
- Malkani S, Rosen JB (2000) Specific induction of early growth response gene 1 in the lateral nucleus of the amygdala following contextual fear conditioning in rats. *Neuroscience* 4: 693-702

- Marchuk D, Drumm M, Saulino A, Collins FS (1991) Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res* 19:1154
- Marston HM, Everitt BJ, Robbins TW (1993) Comparative effects of excitotoxic lesions of the hippocampus and septum/diagonal band on conditional visual discrimination and spatial learning. *Neuropsychologia* 10: 1099-1118
- Matsubara M, Kusubata M, Ishiguro K, Uchida T, Titani K, Taniguchi H (1996) Site-specific phosphorylation of synapsin I by mitogen-activated protein kinase and Cdk5 and its effects on physiological functions. *Journal of Biological Chemistry* 271: 21108-21113.
- Meijer L, Borgne A, Mulner O, Chong JP, Blow JJ, Inagaki N, Inagaki M, Delcros JG, Moulinoux JP (1997) Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem* 1-2:527-536
- Meyerson M, Enders GH, Wu CL, Su LK, Gorke C, Nelson C, Harlow E, Tsai LH (1992) A family of human cdc2-related protein kinases. *EMBO J* 8:2909-2917
- Milanovic S, Radulovic J, Laban O, Stiedl O, Spiess J (1998) Production of the Fos protein after contextual fear conditioning of C57BL/6N mice. *Brain Res* 784:37-47
- Milner B, Squire LR, Kandel ER (1998) Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 3: 445-68
- Morris RG (1991) Distinctive computations and relevant associative processes: hippocampal role in processing, retrieval, but not storage of allocentric spatial memory. *Hippocampus* 3: 287-90

- Morrison JH, Hof P (1997) Life and death of neurons in the aging brain. *Science* 278: 412-419.
- Morrow BA, Elsworth JD, Inglis FM, Roth RH (1999) An antisense oligonucleotide reverses the footshock-induced expression of fos in the rat medial prefrontal cortex and the subsequent expression of conditioned fear-induced immobility. *J Neurosci* 13: 5666-5673
- Mullis KB, Faloona F.A (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed-chain reaction. *Meth. Enzymol* 155: 335-350.
- Nader K, Schafe GE, Le Doux JE (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406:722-726
- Neystat M, Rzhetskaya M, Oo TF, Kholodilov N, Yarygina O, Wilson A, El-Khodori BF, Burke RE (2001) Expression of cyclin-dependent kinase 5 and its activator p35 in models of induced apoptotic death in neurons of the substantia nigra in vivo. *J Neurochem.* 77:1611-1625.
- Nguyen PV, Abel T, Kandel ER (1994) Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science* 265:1104-1107
- Nikolic M, Chou MM, Lu W, Mayer BJ, Tsai LH (1998) The p35/Cdk5 kinase is a neuron-specific Rac effector that inhibits Pak1 activity. *Nature* 359: 194-198.
- Ohshima T, Ward JM, Huh G., Longenecker G, Veeranna, Pant HC, Brady RO, Martin LJ, Kulkarni AB (1996) Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 11173–11118.

Patrick GN, Zukerberg L (1999) Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402: 615-622.

Patzke H, Tsai LH (2002) Cdk5 sinks into ALS. *Trends in Neurosciences* 1: 8-10.

Pawlow, J. P. (1903). *Experimental psychology and the psycho-pathology of animals*. Bull. of the Imperial Medical Acad, 7.

Pigino G, Paglini G, Ulloa L, Avila J, Caceres A (1997) Analysis of the expression, distribution and function of cyclin dependent kinase 5 (cdk5) in developing cerebellar macroneurons *J Cell Sci* 110: 257-270.

Radulovic J, Kammermeier J, Spiess J (1998) Relationship between fos production and classical fear conditioning: effects of novelty, latent inhibition, and unconditioned stimulus preexposure. *J Neurosci* 18: 7452-61

Radulovic J, Rühmann A, Liepold T, Spiess J (1999) Modulation of learning and anxiety by corticotropin-releasing factor (CRF) and stress: differential roles of CRF receptors 1 and 2. *J Neurosci* 12:5016-5025.

Radulovic J, Fischer A, Katerkamp U, Spiess J (2000) Role of regional neurotransmitter receptors in corticotropin-releasing factor (CRF)-mediated modulation of fear conditioning. *Neuropharmacology* 4:707-710

Roberson ED, Sweatt JD (1996) Transient activation of cyclic AMP-dependent protein kinase during hippocampal long-term potentiation. *J Biol Chem* 48: 30436-30441

- Robertson HA (1992) Immediate-early genes, neuronal plasticity, and memory. *Biochem Cell Biol* 9: 729-737
- Rodgers RJ, Johnson NJ (1995) Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 52: 297-303
- Rose SPR (1995) memory formation: its molecular and cell biology. *Eur. Rev.* 3: 243-256
- Ross S, Tienhaara A, Lee MS, Tsai LH, Gill G (2002) GC box-binding transcription factors control the neuronal specific transcription of the cyclin-dependent kinase 5 regulator p35. *Journal of Biological Chemistry* 6: 4455-4464.
- Rossum D, Hanisch UK(1999) Cytoskeletal dynamics in dendritic spines: direct modulation by glutamate receptors? *Trends Neurosci* 7: 290-295
- Sacchetti B, Lorenzini CA, Baldi E, Bucherelli C, Roberto M, Tassoni G, Brunelli M(2001) Long-lasting hippocampal potentiation and contextual memory consolidation. *Eur J Neurosci* 12:2291-2298
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning – a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2<sup>nd</sup> Edition

- Sananbenesi F, Fischer A, Schrick C, Spiess J, Radulovic J (2002) Phosphorylation of hippocampal Erk-1/2, Elk-1 and p90-Rsk-1 during contextual fear conditioning: Interactions between Erk-1/2 and Elk-1. *Molecular and Cellular Neuroscience*, In Press
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* 74: 5463-5467
- Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2000 (classical article) 1: 103-113
- Segal M, Greenberger V, Pearl E (1989) Septal transplants ameliorate spatial deficits and restore cholinergic functions in rats with a damaged septo-hippocampal connection. *Brain Res.* 1-2: 139-148
- Serova, LI, Saez E, Speigelman BM, Sabban EL (1998) c-Fos deficiency inhibits induction of mRNA for some, but not all, neurotransmitter biosynthetic enzymes by immobilization stress. *J Neurochem* 70: 1935-1940.
- Shinjo H, Ueki A, Miwa C, Morita Y (1998) Effect of entorhinal cortex lesion on hippocampal cholinergic system in rat in operant learning task as studied by in vivo brain microdialysis. *J Neurol Sci* 1:13-18
- Shors TJ, Weiss C, Thompson RF (1992) Stress-induced facilitation of classical conditioning. *Science* 257: 537-539
- Sillaber I, Rammes G, Zimmermann S, Mahal B, Ziegler W, Würst W, Holsboer F, Spanagel R (2002) Enhanced and delayed stress-induced alcohol drinking in mice lacking functional CRH1 receptors. *Science* 296: 931-3

Silva AJ, Smith AM, Giese KP (1997) Gene targeting and the biology of learning and memory. *Annu Rev Genet* 31:527-546.

Smith DS, Tsai LH (2002) Cdk5 behind the wheel: a role in trafficking and transport? *Trends in Cell Biology* 1: 28-36.

Sparks PD, LeDoux, JE (1995) Septal-lesions potentiate freezing behavior to contextual but not to phasic conditioned-stimuli in rats. *Behav. Neurosci.* 109:184-188.

Stitzer ML, Bigelow GE, McCaul ME (1985) Behavior therapy in drug abuse treatment: review and evaluation. *NIDA Res Monogr* 1985: 31-50

Takashima A, Murayama M, Yasutake K, Takahashi H, Yokoyama M, Ishiguro K (2001) Involvement of cyclin dependent kinase5 activator p25 on tau phosphorylation in mouse brain. *Neurosci* 1-2: 37-40

Tang D, Yeung J, Lee, KY, Matsushita M, Matsui H, Tomizawa K, Hatase O, Wang JH (1995) An isoform of the neuronal cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) activator. *Journal of Biological Chemistry* 270: 26897-26903.

Taubenfeld SM, Wiig KA, Bear MF, Alberini CM (1999) A molecular correlate of memory and amnesia in the hippocampus. *Nature Neuroscience* 4: 309-310

Taubenfeld SM, Wiig KA, Monti B, Dolan B, Pollonini G, Alberini CM (2001) Fornix-dependent induction of hippocampal CCAAT enhancer-binding protein [beta] and [delta] Co-localizes with phosphorylated cAMP response element-binding protein and accompanies long-term memory consolidation. *Journal of Neuroscience* 1: 84-91.

Thompson, R F (1994) Das Gehirn. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford

Tischmeyer W, Grimm R (1999) Activation of immediate early genes and memory formation. *Cell Mol Life Sci* 4: 564-574

Tomizawa K, Ohta J, Matsushita M, Moriwaki A, Li ST, Takei K, Matsui H (2002) Cdk5/p35 regulates neurotransmitter release through phosphorylation and downregulation of P/Q-type voltage-dependent calcium channel activity. *Journal of Neuroscience* 7: 2590-2597.

Town T, Zolton J, Shaffner R, Schnell B, Crescentini R, Wu Y, Zeng J, DelleDonne A, Obregon D,

Tan J, Mullan M (2002) p35/Cdk5 pathway mediates soluble amyloid-beta peptide-induced tau phosphorylation in vitro. *J Neurosci Res* 3: 362-72

Tsai L-H, Takahashi T, Caviness, VS Jr, Harlow E (1993) Activity and expression pattern of cyclin-dependent kinase 5 in the embryonic mouse nervous system. *Development* 119:1029-1040.

Tsai LH, Delalle I, Caviness VS, Chae T, Harlow E (1994) P35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* 371:419-423.

Tully T, Preat T, Boynton SC, Del Vecchio M (1994) Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell* 1: 35-47

Vouimba RM, Garcia R, Jaffard R (1998) Opposite effects of lateral septal LTP and lateral septal lesions on contextual fear conditioning in mice. *Behav Neurosci* 4: 875-884



Wessa M, Flor H (2002) Posttraumatic stress disorder and trauma memory- a psychobiological perspective. *Z Psychosom Med Psychother* 1: 28-37

Wolfman C, Fin C, Dias M, Bianchin M, Da Silva RC, Schmitz PK, Medina JH, Izquierdo I (1994) Intrahippocampal or intraamygdala infusion of KN62, a specific inhibitor of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, causes retrograde amnesia in the rat. *Behav Neural Biol* 3: 203-5

Wu DY, Ugozzoli L, Pal BK, Qian J, Wallace RB (1991) The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell Biol* 3: 233-238

Yan Z, Chi P, Bibb JA, Ryan TA, Greengard P (2002) Roscovitine: a novel regulator of P/Q-type calcium channels and transmitter release in central neurons. *Journal of Physiology* 540: 761-70.

Yang N, Higuchi O, Ohashi K, Nagata K, Wada A, Kangawa K, Nishida E, Mizuno K (1998) Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* 393: 809-812

Yoo BC, Lubec G (2001) p25 protein in neurodegeneration. *Nature* 411:763-764

## 7. Anhang

### 7.1. Genfragment für *CDK5*

Ein 302 bp großes Genfragment wurde durch Sequenzvergleich mit der Datenbank (GenBank Database, *basic logical alignment tool fileserv*) als Gen für die Zyklin-abhängige Kinase 5 (*Cdk5*, engl.: *cycline dependent kinase 5*) identifiziert.

```
GTACCCAGCT ACAACATCCT TGGTGAACGT CGTGCCCAAG CTCAATGCCA
CGGGGAGGGA CCTGTTGCAG AACCTATTGA AGTGTAACCC TGTGCAGCGC
ATCTCAGCAG AGGAGGCCTT GCAGCACCCC TACTTCTCTG ACTTCTGTCC
CCCATAGGCT CTCTGAACCC CAGTGGCCAG GCTGGGGCCT GGCCTGTTTA
AGCCTCCCTC CCAGGAGGGT GGAAGAGTCG GGTGTGGGAT GCTGAGCGCC
AGCTGTGCTG GGCCAGCCAG GGCAGAGTTA CCCTGGCCCG CGGCTTTCCC TC
```

### 7.2 Fragmente weiterer in dieser Arbeit identifizierter Klone

#### Klon A4:

```
CTGTTCTTCT CTCTGATGTC AGCAAGTGCT TGGTCATAAT CAGAGTCAAA
CCCTGCTTTT GGAGTGATGA GTCCGGTCTT CCGAGCCTTC TCATGGTCAA
AGGCTGTGTC CCATCGCTGC AGTTCTGCAG TCAGGTCAGG AAAGCGGCCT
TTAGGACTTT TTGACTGCAG AGTAACAACC TGCTTGAGGG TTTTGGACGT
AAAACCACCC GCGACCTCCT CCAGAAGCCC TGAGACTTTA CACATTACTT
TGAATCCTTC TAGAGCAGAG AGAAAATCAA TGATCTTCTT TTTGCTGTAT
GTCGTTTCTT CGTACATTAT AGCCCTGCTG TCTGGATGGT TCTGGCTCTT
CAGGGGAGAC CCAACATTAT GAATCTTACT CAGTAGCCTC TCAAGGTCTG
GCAGCTTCTT TAAGAGGTCT GCAACTTCAG TGACCTTGTC AGGCACGGCC
ATCAGATCTT CCACCGCATC TAGACGGTCA CTGATGGCAG AAGGGCTGCA
GAGGGGGGCA CAGAGCCACT GTTTTAAGAG CCGCTTGCCA AAGGGCGTAT
GGCAAGTATC CAATCTCTCT AGCAGGGTCC CTTTCAGTAGA GCCATTTGTC
CCATTCAGGA AAATCTCCAG GTTGTTTAAT GTCACTGCGT CTAGCACCAT
CCGCTGACTG GCTTTAGTAA AGACAGCCCC AGGTTTACTG TGCTGACCCG
TGTCAGAATC CAAAGGGAAA TACTCTTCAA AATTAGCCAT TGACAGAACT
CCTGATCAAT CAGGCATTTT TTGAGGTAGA AAACAATACC
```

#### Klon A10:

```
GTACCCAGCT ACAACATCCT TGGTGAACGT CGTGCCCAAG CTCAATGCCA
CGGGGAGGGA CCTGTTGCAG AACCTATTGA AGTGTAACCC TGTGCAGCGC
ATCTCAGCAG AGGAGGCCTT GCAGCACCCC TACTTCTCTG ACTTCTGTCC
```

CCCATAGGCT CTCTGAACCC CAGTGGCCAG GCTGGGGCCT GGCCTGTTTA  
 AGCCTCCCTC CCAGGAGGGT GGAAGAGTCG GGTGTGGGAT GCTGAGCGCC  
 AGCTGTGCTG GGCCAGCCAG GGCAGAGTTA CCCTGGCCCG CGGCTTTCCC TC

**Klon B4:**

ATCAAGATTT TTAAAGCTCA AACCAAGTGA CACTTTTAAT AAGAGACTAA  
 GATCTGATTG AGGGAGTTTT CTAACAGTCC TTGCCTCGTG GACACGCTAA  
 AGTTTGACTT GGGTGCCTTA CCTCTTTTCT AACCAGTGTT GCTCGTGAGC  
 CTGTGGCGCT CGCTTGCTCG CTCGCTCGCT CGCTCCGTGG ATTCCTTAAA  
 ACCAGAGAGC CTGTAAGTGT GGCAAGATCA AAACTGGCCT GGCTGGAGGG  
 TTAGCTGGAC ATGGATCTGC AGGATTGCCT CTGGGGACCT CGTTTTGGGA  
 ACTTTTCTTG GGGCTGTTTT GCTCAAGTGC CCGTAGCTGA TGGATGGGTG  
 AAGTAATTTT GAACGTACCT

**Klon B7:**

GTACCCAGCA GCCTTCGCTC ACTCCACTAT CCACTATTAA AGCCTTCGCC  
 ACTCAGTCGG GCTCCCAGGA CTTAAAGGCT CTTAATACCA CCTACCAATC  
 CCAGCTCATC AAACCCAGCC GCATGCGCAA GTAC

**Klon B11:**

GTTGCTGTGG AGGATAGTGA AGGGTCACCA TTATCCCTCA CCAGGACCAC  
 CACCTGTTGG GTATCAGAGT CATCCTCCAA TAAGGCCCGG GCTGTGCGCA  
 CCTCACCAGT GTGTGCAGAT ACAAGGAACA GTCCGGGGGC TGTGGACTGT  
 GGTAAGAGAG AGTAAGAGAG CCATGCATTG TGACCAGCGT CAGCATCCAC  
 GGCTGTCACC TTGGTGACCA AAGAACCAGG AGGAGCAGAT CGGGGGAGAC  
 GCTGAGGGGC TGAGAACTCC CTGCCAGGTC TTGGGTGCAG CACAGCTGGG  
 GCATTATCAT TCTGATCGAG GACAAACACA TGGAGAGATG TGTTAGCATG  
 CAGTCGGGGA GAGCCGGAAT CACGGACCCC CACCACGATT TGCAGCATCT  
 GCAGTAACTC ATAGTCAAAG GTCCGCTGGG CAAAGATTCTG TCCATCCTCG  
 GGGTTGACAT ACACAAAGGA GGAGGCTGGG GCTCCCTGGA TTTGACTCCC  
 CACAATAGAA TAGGTGAGGC GGGCATTATC CCCCTCGTCT GGATCAGAGG

**Klon D3:**

TTTACGAAAC TGCCAACCCT TGACACACTG ACTCCCATCT GTCTCAACAG  
 CTGGCGGTGG CAGCTGGATT AGCACAGAGC CTTGCTAGCC AATCTGCCAA  
 CATCAGCGGT GTGAAGCAGC TTCCCCACGT CCAGCTACCT CAGAGCAGCT  
 CCGGCACCTC CATCGTCCCG CCCAGTGGTG GCACTTCTCC CAACATGAGC  
 ATAGTGACGG CTGCAGTGCC CACCCCGTCC TCAGAAAAAG TGGCTTCCAA  
 TGCTGGTGCC TCCCATGTCA GCTCCCCGGC CGTCTCAGCA TCGTCCTCAC  
 CAGCATTCGC AATAAGCAGT CTGTTGAGTC CTGAATCTAA CCCACTTCTA

CCTCAGCCGA	CCCCAGCTAA	CGCTGTTTTTC	CCTACCCCTT	TGCCTAACAT
TGCAACAACC	GCAGAAGATT	TGAACTCCCT	GTCTGCCTTG	GCCCAGCAA
GAAAAAGCAA	GCCACCAAAT	GTCACTGCCT	TTGAAGCGAA	AAGTACCTCG
GCCGCGACCA	CGCTAAGC			

**Klon D12:**

TTTTTTTTTTT	TTTTTTTTTTT	TCTAGGAGAA	CCAAACTTTT	GTTTAACTTT
TNTACGAATT	CCCAAGTAAG	GCAAACGTTT	ACTTCAAAC	TNTTTAATTT
CTAACTGAAT	CTTTGAATGT	AACTCATTTA	GTTTACACGT	CACCTTTCCT
GCATAAGGTT	CACGGGAAAC	AAATTGTTTT	AATNTTNTNT	AAAGGCATGC
ATCTTCCAAT	CATTGTATTA	ATTAAACATT	AAAGTNCCTC	GGCCGCNACC
AC				

**Klon F1:**

CATTGTGGGA	GGAGACCTGC	AGGGAGGCCA	GCACGTCGTC	CACTCGGGGT
AGGTTGGTGG	CAGCACATGC	TGGCATGGTG	TGGAATTTCC	ACTGTAGGAT
GTAGAAGCCT	GGCCACCTGG	TCACATGGGA	CCCCTGCACG	CTCTCTCCTT
CTTTGCAGAT	TAGAGGAGAC	TCCACCATGC	TATAGTCCC	GCCCAGCTGC
CAGACTTTGT	CTATCAGCTG	CACGTTGTTG	CCTCCTGGGG	AAGTGATGCT
GTGAGCCCCT	AGCGAGTCCT	TCTTGGGTGG	CTGGGGAGAC	CTCTTGGAGT
GATAAATGTT	AAAGACGATG	TCCCCTTTGC	ACACATCAA	ATCCCAGGTG
ATCACTGAGG	AGGCGTCCAC	AATCTGAATG	AGAATCTCAT	GTGGAGCTCC
TTTGAACACG	CTGGCAGACT	GGTAGATGGT	CTCCGTCCAG	AGCTTCAGGT
CTTCATTTTC	CAGCTCCTCT	GCAGTCCTGT	ACCTCGGCCG	

**Klon G2:**

TGTAACAAAT	TCCCGATTTT	TTCTGCTCAA	AAGTTCTTTG	AGACAATTCC
ATCAGCCTTA	GCCAATCGGA	GAATAGAATC	ATCTGACTCG	CCCATCCTGC
GAATGGCCCC	GCAGATGCCA	TAGGTTTTAA	ACTGGCCATT	AAACCGGCCT
GTGGTCCTAT	CAACCTCGGC	CGCGA		

**Klon H2:**

ACTCCGGGCT	GCACTACTTA	CACGTCTTCC	TTTGTCTTCA	CCTACCCTGA
AGCTGACTCC	TTCCCAAGCT	GTGCCGCTGC	CCACCGAAAG	GGCAGCAGCA
GCAACGAGCC	CTCCTCCGAC	TCCCTGAGCT	CACCCACGCT	GCTGGCCCTG
TGAGCAGTCA	GAGAAGGCAA	GGCAGCCGGC	ATCCAGACGT	GCCACTGCCC
GAGCTGGTGC	ATTACAGAGA	GGAGAAACAC	GTCTTCCCTC	GAAGGTTC
GTCGACCTAG	GGAGGACCTT	ACCTGTTTCGT	GAAACACACC	AGGCTGTGGG
CCTCAAGGAC	TTGCAAGCAT	CCACATCTGG	CCTCCAGTCC	TCACCTCTTC
CAGAGATGTA	GCAAAAACAA	AACAAAACAA	AACAAAAAAC	CGCATGGAGT

---

GTGTTGTTCC TAGTGACACC TGAGAGCTGG TAGTTAGTAG AGCATGTGAG  
TCAAGGCCTG GTCTGTGTCT CTTTTCTCTT TCTCCTTAGT TTTCTCATAG  
CACTAACTAA TCTGTTGGGT TCATTATTGG AATTAACCTG GTGCTGGATT  
GTATCTAGTG CAGCTGATTT TAACAATACC TACTGTGTTC CTGGCAATAG  
CGTGTTCCAA TTAGAAACGA CCAATATTAA ACTAAGAAAA GATAGGACTT  
TATTTTCCAG TAGATAGAAA TCAATAGCTA TATCCATGT

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof Dr. Hardeland und Herrn PD Dr. Hörner ganz herzlich für die externe Betreuung dieser Dissertation, sowie für ihre stete Diskussionsbereitschaft, ohne welche diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Jelena Radulovic für ihre Hilfe, Diskussionsbereitschaft und die Art und Weise, wie Sie es vermochte komplexe Fragestellungen der Neurobiologie zu vermitteln.

Herrn Prof. Dr. Dr. Spiess danke ich für die Überlassung dieses interessanten Themas, sowie dafür die Arbeit in der Abteilung „Molekulare Neuroendokrinologie“ anfertigen zu können.

Außerdem danke ich Chris und Farah für die tolle Atmosphäre in unserer Arbeitsgruppe, sowie allen Mitgliedern der Abteilung für Molekulare Neuroendokrinologie. Insbesondere seien hier Marko, Cedomir, Lothar, Thomas L., Thomas Z., Harry, Lars, Olaf und Oliver für stete Hilfsbereitschaft in nicht nur technischen Fragen erwähnt.

Dafür, dass sie mich immer wieder zu motivieren wußten danke ich ganz herzlich: Daniel, Anne, Ute, Dennis, Jörg, Stefan, Marcel, Pascal, Heino und Elke.

## Lebenslauf

- 12.6.1974 Geboren in Flensburg als Sohn von Heino Edmund Thorwald und Elke Angelika Fischer
- 1980-1984 Grundschule in Flensburg-Weiche
- 1984-1993 Gymnasium Kurt Tucholsky Schule in Flensburg
- 1993-1994 Zivildienst
- 1994-1999 Studium der Biologie an der Georg August Universität Göttingen
- 1999 Mündliche Diplomprüfungen in den Fächern Mikrobiologie, Genetik und Biochemie
- 1999-2000 Diplomarbeit in der Abteilung Molekulare Neuroendokrinologie bei Herrn Prof Dr. Dr. Jochim Spiess. Titel: „Subtraktive Hybridisierung im lateralen Septum und Hippokampus nach 1 h Immobilisationsstress“
- Mai 2000 Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation in der Abteilung für Molekulare Neuroendokrinologie in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Jelena Radulovic in der Abteilung Molekulare Neuroendokrinologie bei Prof Dr. Dr. Joachim Spiess.

### Wissenschaftliche Veröffentlichungen

- 1999 Sydow S, Flaccus A, Fischer A, Spiess J. The role of the fourth extracellular domain of the rat corticotropin-releasing factor receptor type 1 in ligand binding. Eur J Biochem 259 (1-2): 55-62
- 2000 Radulovic J, Fischer A, Katerkamp U, Spiess J. Role of regional neurotransmitter receptors in corticotropin-releasing factor (CRF)-mediated modulation of fear conditioning. Neuropharmacology 4: 707-710

- 2001 Radulovic J, Kammermeier J, Fischer A, Spiess J. Lernen, Angst und Streß: Molekulare Verknüpfungen. In Körper, Seele, Trauma. Biologie, Klinik und Praxis. Herausgeber: Streeck-Fischer A, Sachsse U, Özkan I. Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen
- 2002 Fischer A, Sananbenesi F, Schrick C, Spiess J, Radulovic J. Cyclin-dependent kinase 5 is required for associative learning. J Neurosci 9: 3700-3707
- 2002 Sananbenesi F, Fischer A, Schrick C, Spiess, J, Radulovic J. Phosphorylation of hippocampal Erk-1/2, Elk-1 and p90-Rsk-1 during contextual fear conditioning: Interactions between Erk-1/2 and Elk-1. Molecular and Cellular Neuroscience, „In Press“
- 2002 Fischer A, Sananbenesi F, Schrick C, Spiess J, Radulovic J. Regulation of contextual fear conditioning by baseline and inducible septo-hippocampal cyclin-dependent kinase 5. „Submitted“, Neuropharmacology
- 2002 Fischer A, Sananbenesi F, Schrick C, Spiess J, Radulovic J. Logic rules in the hippocampus: A basis for persistence and reduction of conditioned fear. „Submitted“, Hippocampus