

Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München / Klinikum
rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann)

Die molekulare Rolle hippocampaler $\text{Ca}_v1.2\text{-L-Typ-Ca}^{2+}$ -Kanäle für synaptische Plastizität und räumliches Lernen

Nicolas Alfred Martin Langwieser

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann
2. Univ.-Prof. Dr. A. R. Ludwig

Die Dissertation wurde am 10.11.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 08.02.2006 angenommen.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	IV
1 Einleitung	1
1.1 Was ist Lernen und Gedächtnis?	1
1.2 Die Rolle des Hippocampus für Lernen und Gedächtnis	2
1.3 Molekularbiologische und elektrophysiologische Grundlagen von Lernen und Gedächtnis	2
1.4 Einteilung spannungsabhängiger Ca ²⁺ -Kanäle	5
1.5 Maustechnologie	8
1.6 Zielsetzung	9
2 Material und Methoden	11
2.1 Verwendete Mausstämme	11
2.2 Histochemische Methoden und Immunfärbung	11
2.2.1 Fixierung von Geweben der Maus	11
2.2.2 Lösungen	12
2.2.3 Durchführung der X-Gal-Färbung	12
2.2.4 Anfertigung von Paraffin Gewebeschnitten	12
2.3 Präparation und Vorbehandlung der verwendeten Gewebe	13
2.4 Trennung und Detektion von Proteinen	14
2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach der BCA-Methode	14
2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	15
2.4.3 Probenvorbereitung und Elektrophorese	17
2.4.4 Elektroblob von Polyacrylamidgelen	17
2.4.5 Immundetektion (Western Blot)	18
2.4.6 Stripping nach Immundetektion	19
2.5 Enzymatische Modifikation von DNS	20

Inhaltsverzeichnis

2.5.1	Restriktionsenzyme	20
2.5.2	Restriktionsverdau	20
2.6	Sequenzierung von Plasmid-DNS	21
2.6.1	Sequenzreaktion	21
2.6.2	Reinigung des Sequenzierungsprodukts	22
2.7	Reinigung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	23
2.7.1	Phenol/Chloroform-Extraktion	23
2.7.2	Präzipitation	23
2.8	Auftrennung und Isolierung von DNS- Fragmenten	23
2.8.1	Agarose-Gelelektrophorese	24
2.8.2	Elektroelution	24
2.9	<i>In situ</i>- Hybridisierung	25
2.9.1	Verwendete Lösungen	25
2.9.2	Herstellung der RNS-Gensonden	27
2.9.3	Anfertigung von Gewebeschnitten	27
2.9.4	Standardprotokoll der <i>In situ</i> -Hybridisierung	28
2.9.5	Histologische Färbungen	29
2.9.6	Mikroskopie und Photographie	30
2.10	Messung der Langzeitpotenzierung	30
2.11	Verhaltensversuche	31
2.11.1	<i>Open field test</i>	31
2.11.2	<i>Rotarod test</i>	32
2.11.3	<i>Water maze task</i>	32
2.11.4	<i>“Labyrinth maze test”</i>	33
3	Ergebnisse	35
3.1	Nachweis der Expression der Ca_v1.2 und Ca_v1.3 L-Typ Ca²⁺-Kanäle im murinen Hippocampus mittels <i>In situ</i>-Hybridisierung	35
3.2	Überprüfung der Cre-Rekombinase-Aktivität im Hippocampus von Nex-Cre-Mäusen mittels X-Gal-Färbung	36
3.3	Untersuchung des Ca_v1.2-Kanals im Hippocampus auf Proteinebene	39

Inhaltsverzeichnis

3.3.1	Überprüfung der Spezifität des Ca _v 1.2-Antikörpers an Membranproteinen aus HEK _{α1β2a} -Zellen (Seisenberger C. <i>et al.</i> , 1995)	39
3.3.2	Nachweis der Deletion des Ca _v 1.2 Kanals im Hippocampus bei Ca _v 1.2 ^{HCKO} -Mäusen	40
3.3.3	Keine kompensatorische Hochregulation von NMDAR und Ca _v 1.3-Kanälen in Ca _v 1.2 ^{HCKO} -Mäusen im Vergleich zur CTR-Gruppe	42
3.4	Histomorphologische Untersuchung an Gehirnschnitten von Ca_v1.2^{HCKO}- und CTR-Mäusen	45
3.5	Langzeitpotenzierung	47
3.6	Untersuchung der zeitabhängigen CREB-Phosphorylierung bei Ca_v1.2^{HCKO}-Mäusen im Vergleich zur CTR-Gruppe	51
3.7	Untersuchung der zeitabhängigen CREB-Phosphorylierung unter Zugabe des NMDAR-Blockers APV	54
3.8	Untersuchung der zeitabhängigen ERK1/2-Phosphorylierung bei Ca_v1.2^{HCKO}-Mäusen im Vergleich zu CTR-Mäusen	55
3.9	Auswirkungen der Deletion des Ca_v1.2-L-Typ-Ca²⁺-Kanals auf Lernen und Gedächtnis	58
4	Diskussion	61
5	Zusammenfassung	64
6	Literaturverzeichnis	65

Abkürzungen

A	Adenin oder Ampere
AA	Acrylamid
ACSF	<i>artificial cerebrospinal fluid</i>
Ala	Alanin
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure Glutamatrezeptor
APS	Ammoniumpersulfat
APV	D,L-2-Amino-5-Phosphonovaleriansäure
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
BA	Bisacrylamid
BCA	2,2`-Bis(chinolin-4-carbonsäure)
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
c	Centi (10^2)
CA	Cornu ammonis
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CaM	Calmodulin
CaMKIV	Calmodulinkinase IV
Ca _v 1.2 ^{HCKO}	<i>Ca_v1.2-hippocampus-cortex-specific-knockout</i>
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGKI	cGMP-abhängigen Proteinkinase Typ I
CNG	cyclic nucleotide gated
Cre	<i>cyclisation recombination</i>
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element binding protein
cRNS	komplementäre Ribonukleinsäure
CTR	Kontrolle
D	Dal ton
DAG	Diacylglycerol
ddNTP	2`,3`-Didesoxynukleosid-5`-triphosphat
DHP	Dihydropyridin

Abkürzungen

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2`-Desoxynukleosid-5`-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N`-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)- N,N,N',N`-tetraessigsäure
ERK 1/2	<i>extracellular regulated kinase 1/2</i>
EtOH	Ethanol
flox	loxP-flankiert
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
HRPO	<i>horseradish peroxidase</i>
HVA	<i>high voltage activated</i>
Hz	Hertz
kb	Kilobase
l	Liter
loxP	locus of cross over of P1
LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung
LVA	<i>low voltage activated</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
μ	Mikro (10 ⁶)
min	Minute
m	Milli (10 ⁻³) oder Meter
M	Molar oder Mega (10 ⁶)
mRNS	<i>messenger-RNS</i>
n	Nano (10 ⁻⁹)
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NEX	neuronales helix-loop-helix Protein
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NR1	NMDA-Rezeptoruntereinheit 1
OD	optische Dichte

Abkürzungen

OT	Objektträger
p	Piko (10^{-12})
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
p.c.	post coitum
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
p-CREB	phosphoryliertes CREB
PP1	Proteinphosphatase 1
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rdu	<i>relative densitometric units</i>
RNase	RNS spaltendes Enzym
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
rp max	maximale <i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
^{35}S	radioaktiver Schwefel
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBST	Tris-NaCl-Tween20 Puffer
TEA	Tetra-Ethyl-Ammonium
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	α,α,α -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
U	Unit, Einheit oder Uridin
V	Volt
x	-fach
x g	-fache Erdbeschleunigung
ZNS	zentrales Nervensystem

*Nichts kann von außen Wunder in uns wirken,
wenn es nicht aus unserem Interesse
eine wundersame Antwort erhält.*

Herman Melville

1 Einleitung

1.1 Was ist Lernen und Gedächtnis?

Was ist eine Erinnerung? Wie funktioniert das Lernen? Aristoteles dachte im vierten Jahrhundert v. Chr., der Sitz der geistigen Fähigkeiten befände sich im Herz (Dudai, 1989). Seit dieser Zeit wurden viele Anstrengungen unternommen, die zu den heutigen Vorstellungen von der Entstehung von Lernen und Gedächtnis geführt haben. Nach diesen kann man das Gedächtnis in zwei große Kategorien einteilen. Der eine Teil beinhaltet die spezifischen Erinnerungen an Fakten und Geschehnisse. Dieser Typ von Gedächtnis, der als explizites, deklaratives oder engrammatisches (Lashley, 1950) Erinnerungsvermögen bezeichnet wird, umfasst etwa die Telefonnummer des eigenen Labors, die Antworten auf Günther Jauchs Fragen in der Quizshow „Wer wird Millionär“ oder das oftmals schwierige Problem, wo man denn gerade seinen Autoschlüssel hingelegt hat. Experimente, die explizites Gedächtnis untersuchen, sollen daher die Frage: „Was ist eine Erinnerung?“ beantworten.

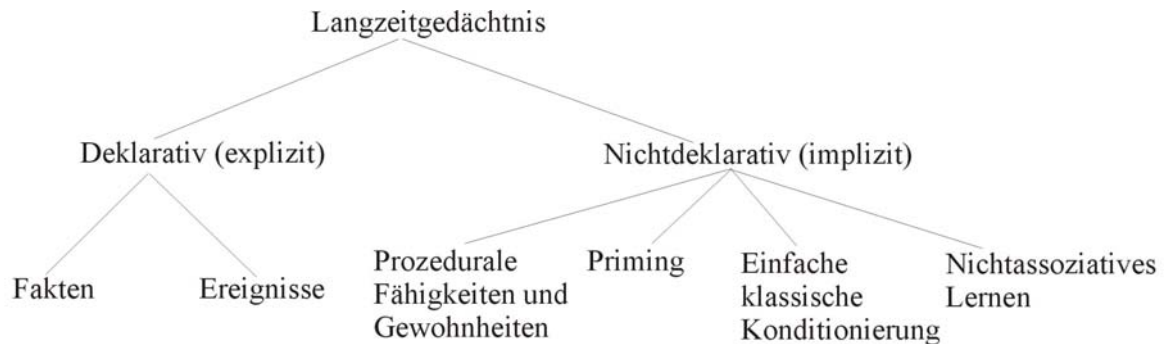


Abbildung 1.1 Klassifizierung der Erinnerung

Das deklarative (explizite) Gedächtnis bezieht sich auf das bewusste Zurückerschließen von Fakten und Ereignissen und hängt von der Integrität des Cortex des medialen Temporallappens ab.

Das nichtdeklarative (implizite) Gedächtnis bezieht sich auf das Sammeln von Fähigkeiten und ist unabhängig vom medialen Temporallappen. Nichtassoziatives Lernen beinhaltet Habituation und Sensibilisierung. Im Falle des nichtdeklarativen Gedächtnisses verändert Erfahrung das Verhalten auf unbewusster Ebene.

Der andere Teil, der als prozedurales, implizites oder semantisches Erinnerungsvermögen bezeichnet wird, umfasst das Erlernen von Fertigkeiten, Gewohnheiten und komplexen Reflexen, wie z.B. das Benutzen eines Telefons oder das Drehen des Autoschlüssels im Schloss (Abbildung 1.1) (Milner et al., 1998). Die meisten der gegenwärtigen Erkenntnisse

Einleitung

über die neurochemischen, neurophysiologischen und neuroanatomischen Mechanismen, die Lernen und Gedächtnis zugrunde liegen, betreffen das prozedurale Erinnerungsvermögen. Studien, die implizites Gedächtnis untersuchen, sollen daher die Fragen: „Wie entsteht Gedächtnis?“ oder „Wie funktioniert das Lernen?“ beantworten.

1.2 Die Rolle des Hippocampus für Lernen und Gedächtnis

Der Hippocampus ist das „Lieblingsforschungsobjekt“ vieler Wissenschaftler, die sich mit dem Lernverhalten von Säugetieren beschäftigen. Dieses Interesse geht auf neuropsychologische Befunde an hirnerkrankten und am Gehirn operierten Patienten zurück. Besonders der Patient H.M. gilt als Paradebeispiel für Gedächtnisstörung nach Hippocampusläsion. Er verlor die Fähigkeit sich neue Information zu merken (anterograde Amnesie), nachdem er aufgrund einer unheilbaren Epilepsie einer beidseitigen Resektion medialer Temporallappenstrukturen unterzogen worden war (Scoville und Milner, 1957). Diese am Patienten gewonnenen Erkenntnisse über die Funktion des Hippocampus konnten auch in Tiermodellen bestätigt werden. So konnte die herausragende Rolle des Hippocampus besonders für das räumliche Lernen in einem speziell entwickelten Verhaltenstest, dem sogenannten *Morris water maze* Test, belegt werden. Bilateral hippocampektomierte Ratten lernen in diesem Modell deutlich schlechter (Morris et al., 1982). Man nimmt an, dass die Umgebung im Hippocampus durch sogenannte Platzzellen wie in einer Art „kognitiver Landkarte“ repräsentiert wird (Muller, 1996). Neben dem räumlichen Lernen scheint der Hippocampus auch eine Rolle bei der nicht-räumlichen Gedächtnisbildung zu spielen, z.B. dem Erinnern an Gerüche oder an eine bestimmte Verkettung von Ereignissen im Versuchsablauf (Wood et al., 1999).

1.3 Molekularbiologische und elektrophysiologische Grundlagen von Lernen und Gedächtnis

Welche Veränderungen spielen sich nun auf zellulärer Ebene in Neuronen des Hippocampus während des Lernens ab?

Es existiert ein reges Interesse an den Mechanismen, die für die langfristigen Veränderungen der synaptischen Übertragung, wie z.B. der Langzeitpotenzierung (LTP), eine Rolle spielen. Die genaue Kenntnis dieser Mechanismen scheint Möglichkeit zu bieten, einen Einblick in die

Einleitung

molekularen Prozesse zu gewinnen, die der Gedächtnisbildung sowohl beim lebenden Tier wie ebenso auch beim Menschen zugrunde liegen (Kandel, 2001; Martin & Morris, 2002). Abhängig von der Art der neuronalen Stimulation besteht die LTP aus einer frühen Phase (E-LTP), die kovalenter Proteinmodifikationen bedarf, und einer späten Phase (L-LTP), in der Proteine neu synthetisiert werden (Frey et al., 1988). Die L-LTP gilt als zelluläres Äquivalent des Langzeitgedächtnisses (Kandel, 2001). Dementsprechend wird durch eine Blockade der Proteinsynthese nicht nur L-LTP im Hippocampus unterbunden, sondern auch Hippocampus-abhängiges Lernen vermindert. Darüberhinaus gibt es wesentliche Hinweise darauf, dass sowohl die synaptische Plastizität im Hippocampus als auch verschiedene Formen des lernbezogenen Verhaltens von der Aktivierung der ERK-Signaltransduktionskaskade und der daraus resultierenden Stimulierung der Gentranskription und der *de novo*-Proteinsynthese, z.B. über das *cAMP response element binding protein* (CREB), abhängig sind (Kandel, 2001; English & Sweatt, 1997; Atkins et al., 1998; Hardingham et al., 2001; Wu et al., 2001; Pittenger et al., 2002; Thomas & Huganir, 2004) (Abbildung 1.2).

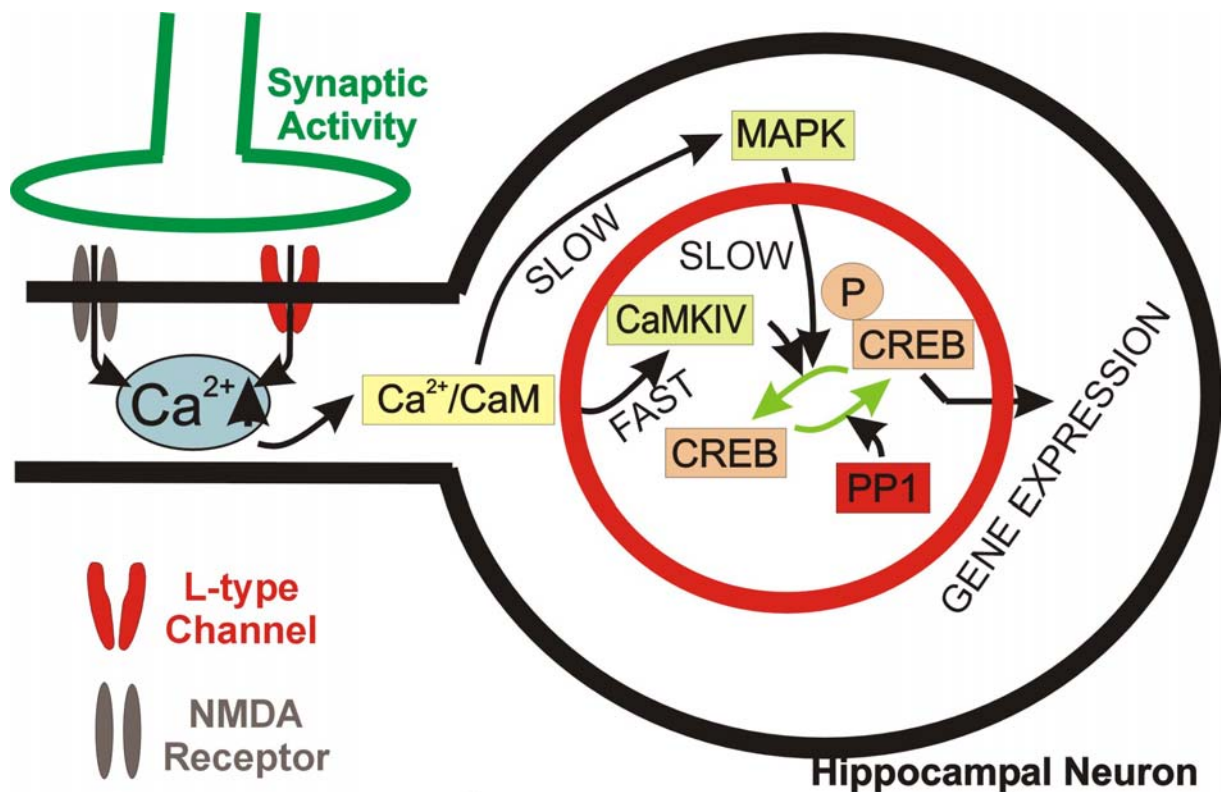


Abbildung 1.2 Aktivierung CREB-abhängiger Gentranskription

Einleitung

Es gilt allgemein als erwiesen, dass ein Anstieg der postsynaptischen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration für die Induktion der L-LTP an den Synapsen der Schaffer-Kollateralen der CA1-Region und für die Aktivierung der ERK-Signaltransduktionskaskade in Neuronen der CA1-Region des Hippocampus notwendig ist (Kandel, 2001; Bito et al., 1996). In der CA1-Region des Hippocampus wurden Erhöhungen der postsynaptischen Ca^{2+} -Konzentration bisher hauptsächlich mit Ca^{2+} -Einstrom über NMDA-Rezeptoren (NMDAR) in Verbindung gebracht (Sabatini & Svoboda, 2000; Kovalchuk et al., 2000). Obwohl der Ca^{2+} -Einstrom über L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle lediglich einen kleinen Anteil des postsynaptischen Ca^{2+} -Transienten zu bilden scheint, ist der von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen unterhaltene Ca^{2+} -Einstrom in der Lage, die Transkription Ca^{2+} -abhängiger Gene, z.B. *Zif/268* und *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), spezifisch auszulösen. Diese Gene spielen eine wichtige Rolle für das Lernen und adaptive Prozesse im ZNS (Murphy et al., 1991; West et al., 2001). In Anwesenheit von NMDAR-Antagonisten kann der Ca^{2+} -Einstrom über L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle eine langdauernde Phosphorylierung von CREB, eine Expression der CRE-abhängigen Gene in den Neuronen des Hippocampus und eine Induktion NMDAR-unabhängiger L-LTP bewirken (Dolmetsch et al., 2001; Impey et al., 1996). Die funktionelle Bedeutung dieser Erkenntnisse bleibt jedoch unklar, da ein Beweis für die Rolle der L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-abhängigen, NMDAR-unabhängigen synaptischen Plastizität für die Gedächtnisbildung beim lebenden Tier aufgrund fehlender transgener Mausmodelle bisher nicht erbracht wurde.

Von den beiden Isoformen des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals, $\text{Ca}_v1.2$ und $\text{Ca}_v1.3$, die in den Pyramidenzellen des Hippocampus identifiziert wurden (s. 1.4), stellt sich die $\text{Ca}_v1.2$ -Isoform als der absolut dominante Subtyp dar (Hell et al., 1993; Davare et al., 2001; Sinnegger-Brauns et al., 2004). Außerdem führt eine Deletion des $\text{Ca}_v1.3$ -Gens zu keinen offensichtlichen Defekten der LTP im Hippocampus (Clark et al., 2003). Darüber hinaus sind die $\text{Ca}_v1.2$ -Kanäle im Gegensatz zu den $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen nicht nur im Soma der Neuronen des Hippocampus lokalisiert, sondern auch in hoher Dichte in kleinen Bündeln in den Dendriten und den Zweigen des Dendritenbaums (Hell et al., 1993; Obermair et al., 2004). Um ihre Rolle für die synaptische Plastizität und die Gedächtnisbildung im Hippocampus zu erforschen, wurde eine Mauslinie mit einer Inaktivierung des $\text{Ca}_v1.2$ -Gens generiert. Dabei war die Inaktivierung durch Verwendung von Nex-Cre-Mäusen hauptsächlich auf den Hippocampus und den Neocortex ($\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$) beschränkt (s. 1.5).

Einleitung

1.4 Einteilung spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte die Rolle der Ca_v1.2 L-Typ Ca²⁺-Kanäle für Lernen und Gedächtnis untersucht werden. Wie sieht so ein Kanal nun eigentlich aus?

Der Ca_v1.2 L-Typ Ca²⁺-Kanal gehört zu den *high voltage* aktivierten Ca²⁺-Kanälen, die heterooligomere Komplexe aus bis zu vier Untereinheiten bilden (Abbildung 1.3).

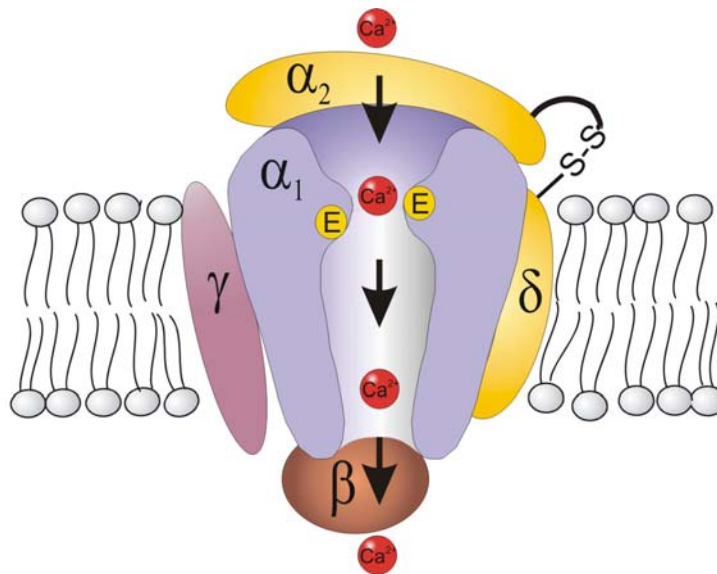


Abbildung 1.3 Zusammensetzung eines high-voltage aktivierten Kalziumkanalkomplexes

Die wichtigste und größte ist die α₁ Untereinheit, ein Transmembranprotein, das aus vier homologen Domänen gebildet wird, die sich wiederum aus sechs transmembranen Segmenten zusammensetzen. Sie enthält die Pore, den Spannungssensor, den Ionen-Selektivitätsfilter und die Bindungsstellen für alle bekannten Ca²⁺-Kanalblocker. Die anderen am Aufbau beteiligten Proteine, nämlich die β Untereinheit, die α₂δ Untereinheit und die γ Untereinheit, beeinflussen unter anderem die Kinetik und die Amplitude des Kalziumstroms und die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und Inaktivierung von Ca²⁺-Kanalblockern. Teilweise sind diese sogenannten Hilfsuntereinheiten auch für den richtigen Einbau des gesamten Ca²⁺-Kanals in der Zellmembran wichtig (Shistik et al., 1995).

Bis zum heutigen Tag sind zehn Gene identifiziert worden, die für die α₁ Untereinheit spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle kodieren (Tabelle 1.1).

Einleitung

	Typ	alt	neu	Spleißvar.	Vorkommen	Blocker	Literaturangabe
HVA	L-Typ	α_{1S}	Ca _v 1.1		Skelettmuskel	DHP PAA BTZ	Tanabe et al.,1987
		α_{1C}	Ca _v 1.2	a	Herz		Mikami et al.,1989
				b	Skelettmuskel		Biel et al.,1990
				c	Hirn,Herz,Gl.pit.,NeNi	Snutch et al.,1991	
	α_{1D}	Ca _v 1.3		Hirn,Pancreas,Niere, Ovar,Cochlea		Williams et al.,1992b Seino et al.,1992	
	α_{1F}	Ca _v 1.4		Retina	*	Strom et al.,1998	
	P/Q-Typ	α_{1A}	Ca _v 2.1	a	Hirn,Cochlea,Gl.pit.	ω -Aga	Mori et al.,1991
b					Starr et al.,1991		
N-Typ	α_{1B}	Ca _v 2.2	a	Hirn, peripheres	ω -CTX	Williams et al.,1992a Dubel et al.,1992	
			b	Nervensystem			
R-Typ	α_{1E}	Ca _v 2.3	a	Hirn,Cochlea,Retina, Herz,Gl.pit.	n.b.	Niidome et al.,1992 Soong et al.,1993 Schneider et al.,1994	
			b	Hirn,Cochlea,Retina			
LVA	T-Typ	α_{1G}	Ca _v 3.1	a,b m.meh- reren Un- terformen	Hirn, Herz, peripheres Nervensystem	Mi, Kur- toxin	Perez-Reyes et al.,1998 Klugbauer et al.,1999a Monteil et al.,2000
		α_{1H}	Ca _v 3.2		Hirn,Herz,Niere,Leber	Mi	Cribbs et al.,1998
		α_{1I}	Ca _v 3.3.		Hirn	Mi	Lee et al.,1999

Tabelle 1.1: Nomenklatur und Verteilung der HVA und LVA Kalziumkanäle. BTZ: Benzothiazepine; DHP: Dihydropyridine; Gl.pit.: Glandula pituitaria; Mi: Mibefradil; n.b.: nicht beschrieben; NeNi: Nebennieren; PAA: Phenylalkylamine; ω -Aga: ω -Agatoxin GIVA; ω -CTX: ω -Conotoxin GVIA; *: Kanal nicht genauer charakterisiert

Zu einem sehr frühen Zeitpunkt während der Evolution trennte sich die Gruppe der *low voltage* aktivierten (LVA) von der der *high voltage* aktivierten (HVA) Ca²⁺-Kanäle ab (Abbildung 1.4). Beide Gruppen zeigen unterschiedliche elektrophysiologische und pharmakologische Eigenschaften (Hofmann et al., 1999). LVA-Kanäle, die auch als T-Typ Ca²⁺-Kanäle bezeichnet werden, beginnen sich zu öffnen, wenn das Membranpotential der Zelle auf -60 bis -40 mV depolarisiert wird. Sie öffnen und inaktivieren sehr schnell. HVA-Kanäle dagegen öffnen erst bei Membranpotentialwerten über -30mV. Auch in der Inaktivierung zeigen sich signifikante Unterschiede. Während LVA-Kanäle sich nach ihrer Aktivierung bereits nach wenigen Millisekunden wieder schließen, bleiben z.B. L-Typ-Kanäle etwa 500 ms geöffnet. LVA-Kanäle besitzen im Vergleich zu HVA-Kanälen nur eine geringe Leitfähigkeit (Klugbauer, 1999c).

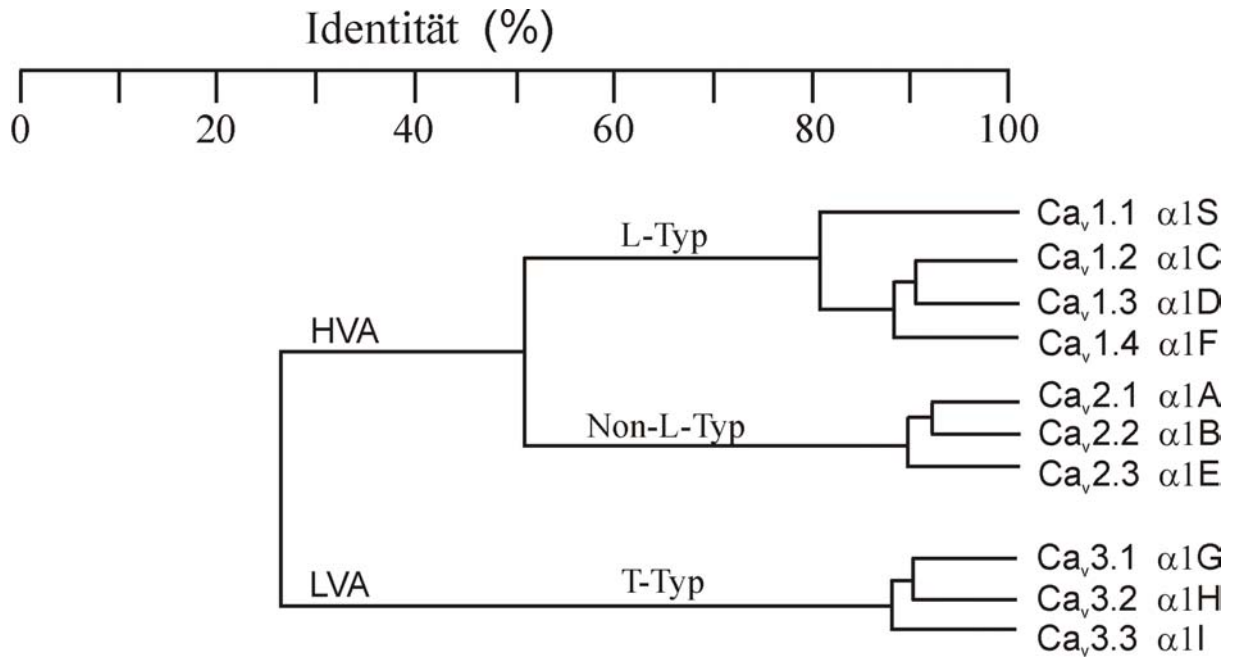


Abbildung 1.4 Phylogenetischer Stammbaum der spannungsaktivierten Ca²⁺-Kanäle

Um eine übersichtlichere Einteilung der einzelnen Kanäle innerhalb der verschiedenen Kanalklassen zu erreichen, schlugen Ertel et al. (2000) eine neue Nomenklatur der einzelnen α_1 Untereinheiten vor. Sie ist in Tabelle 1.1 der von Birnbaumer et al. (1994) etablierten Nomenklatur gegenübergestellt.

Die Familie der LVA-Kanäle umfasst drei Mitglieder, α_{1G} , α_{1H} und α_{1I} (Perez-Reyes et al., 1998; Cribbs et al., 1998; Klugbauer et al., 1999b; Lee et al., 1999). Die Familie der HVA-Kanäle lässt sich weiter unterteilen in die Gruppe der L-Typ Ca²⁺-Kanäle und der „Nicht-L-Typ-Ca²⁺Kanäle“.

Die Gruppe der „Nicht-L-Typ-Ca²⁺Kanäle“ umfasst die α_{1A} , α_{1B} und α_{1E} Untereinheiten. Sie wurden in neuronale und endokrinen Geweben identifiziert.

Zu den L-Typ-Kanälen zählen die α_{1S} , α_{1C} , α_{1D} , und α_{1F} Untereinheiten. Die α_{1S} Untereinheit wird im Skelettmuskel exprimiert (Tanabe et al., 1987). Die α_{1D} Untereinheit wurde in neuronalen und endokrinen Geweben (Williams et al., 1992b; Seino et al., 1992) und der Cochlea (Kollmar et al., 1997 a+b) identifiziert, die α_{1F} Untereinheit in der Retina (Strom et al., 1998).

Das α_{1C} Gen, das für den im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchten Ca_v1.2 L-Typ Ca²⁺-Kanal kodiert, wird in Herz, Muskel und Gehirn exprimiert (Mikami et al., 1989; Biel et al., 1990; Snutch et al., 1991).

1.5 Maustechnologie

Der $\text{Ca}_v1.2$ L-Typ Ca^{2+} -Kanal spielt bei der Funktion vieler Gewebe eine entscheidende Rolle (s. 1.4), wie z.B. der Kontraktion des Herzmuskels oder der Sekretion verschiedener Hormone. Da Mäuse, denen dieser Kanal komplett fehlte, vor dem Tag 14,5 p.c. starben, konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht mit $\text{Ca}_v1.2$ -Total-Knockouts gearbeitet werden. Deshalb wurden mit Hilfe der konditionalen Gen-Inaktivierung unter Verwendung des Cre/loxP-Rekombinationssystems (Hoess und Abremski, 1990) Mäuse gezüchtet (Abbildung 1.5), denen der $\text{Ca}_v1.2$ L-Typ Ca^{2+} -Kanal lediglich auf neuronaler Ebene fehlte und die infolgedessen eine normale Lebenserwartung hatten.

Die Cre-Rekombinase (*cyclisation recombination*) ist ein Protein, das die Exzision von „geflochten“ Gensequenzen katalysiert. Solche Gensequenzen werden von zwei gleichgerichteten loxP-Rekombinationssequenzen flankiert. Bei den hier verwendeten Mäusen wurde der für Exon 14 und 15 kodierende Abschnitt des $\text{Ca}_v1.2$ -Gens dementsprechend „geflocht“. Mäuse, mit einem „geflochten“ $\text{Ca}_v1.2$ Allel (L2) wurden mit sogenannten Nex-Cre-Mäusen verpaart. Bei diesen fand sich anstelle des Gens für das neuronale *helix-loop-helix* Protein (NEX) das Cre-Rekombinase-Gen (knock-in: $\text{NEX}^{+/Cre}$). Die Transkription des Cre Rekombinase-Gens stand dabei unter Kontrolle des NEX-Promotors. Man erwartete sich davon, dass die Cre Rekombinase bei diesen Mäusen das gleiche Expressionsmuster aufwies wie NEX, welches nur im ZNS vorkommt. Tatsächlich zeigte sich bei LacZ-Reportermäusen ein weitgehend auf Hippocampus und Cortex beschränktes Rekombinationsmuster (s. 3.2). Wurden nun Mäuse mit einem „geflochten“ $\text{Ca}_v1.2$ Allel (L2) mit den Nex-Cre-Mäusen verpaart, wurde das $\text{Ca}_v1.2$ -Gen (das L2 Allel) durch Exzision in die inaktivierte Form (L1) überführt. Diese Mäuse, die also den Genotyp $+/L1$ besitzen, wurden wiederum mit Nex-Cre-Mäusen gekreuzt. Bei Verpaarung der Nachkommen ($+/L1 \text{NEX}^{+/Cre}$) mit den für das „geflochte“ Gen homozygoten Mäusen (L2/L2) erhielt man gemäß den Mendelschen Regeln zwei Mauslinien: eine Linie mit dem Genotyp $+/L2 \text{NEX}^{+/Cre}$, die im Rahmen dieser Doktorarbeit als Kontroll-Gruppe (CTR-Gruppe) dienten, und eine Linie mit dem Genotyp $L1/L2 \text{NEX}^{+/Cre}$, der *hippocampus-cortex-specific-Ca_v1.2-knockout*-Gruppe ($\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$). Die Genotypisierung erfolgte durch Analyse aus dem Schwanz isolierter genomischer DNS.

1.6 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle des $\text{Ca}_v1.2$ L-Typ Ca^{2+} -Kanals für Lernen und Gedächtnis untersucht werden.

Dazu musste erst einmal die tatsächliche Expression des $\text{Ca}_v1.2$ L-Typ Ca^{2+} -Kanals im Hippocampus eruiert werden. Ein erstes Ziel der Arbeit bestand also darin, $\text{Ca}_v1.2$ und $\text{Ca}_v1.3$ L-Typ Ca^{2+} -Kanäle im murinen Hippocampus mittels *In situ*-Hybridisierung zu untersuchen.

Da der $\text{Ca}_v1.2$ -Kanal im Hippocampus deletiert werden sollte, musste anschließend mittels X-Gal-Färbung überprüft werden, ob die Cre-Rekombinase in der Hippocampusformation von Nex-Cre-Mäusen aktiv ist.

Um diese Versuche zu verifizieren, bestand das nächste Ziel der Arbeit in der Untersuchung der Hippocampi auf Proteinebene. Dazu galt es, zuerst einmal die Spezifität des $\text{Ca}_v1.2$ -Antikörpers an Membranproteinen aus $\text{HEK}_{\alpha1\beta2a}$ -Zellen (Seisenberger C. et al., 1995) zu überprüfen. Anschließend sollte mittels dieses Antikörpers zum einen die Deletion des $\text{Ca}_v1.2$ Kanals im Hippocampus bei $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäusen bestätigt werden, zum anderen die Expression des $\text{Ca}_v1.2$ L-Typ Ca^{2+} -Kanals in 14 Tage alten $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Jungmäusen gezeigt werden.

Da bei den $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäusen durch die Deletion des $\text{Ca}_v1.2$ -Kanals ein wichtiger Weg des durch Membrandepolarisation ausgelösten Ca^{2+} -Influges im Hippocampus beseitigt worden war, wäre es denkbar gewesen, dass kompensatorisch andere Ionenkanäle, wie z. B. die $\text{Ca}_v1.3$ L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle oder die NMDAR hochreguliert würden. Deshalb sollte die Expression des $\text{Ca}_v1.3$ -Kanals in Hippocampus, Klein- und Großhirn, sowie der NMDAR im Hippocampus in $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäusen im Vergleich zur CTR-Gruppe mittels Western Blot kontrolliert werden.

Da außerdem denkbar gewesen wäre, dass bei der $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Gruppe durch Deletion des $\text{Ca}_v1.2$ -Kanals schon auf lichtmikroskopischer Ebene Veränderungen bzw. Defekte gegenüber der CTR-Gruppe entstehen, wurden als nächster Schritt Genotypen histomorphologisch untersucht und miteinander verglichen.

Durch Betrachtung der molekularbiologischen und elektrophysiologischen Grundlagen von Lernen und Gedächtnis ergaben sich die nächsten Aufgaben, um die Rolle des $\text{Ca}_v1.2$ L-Typ Ca^{2+} -Kanals für Lernen und Gedächtnis aufzuklären.

Einleitung

Zunächst sollte der Vorgang der Langzeitpotenzierung (LTP) in der CA1 Region des Hippocampus bei $Ca_v1.2^{HCKO}$ - und CTR-Mäusen untersucht werden. Anschließend sollte die zeitabhängige CREB-Phosphorylierung und die zeitabhängige ERK1/2-Phosphorylierung unter Nachahmung synaptischer Aktivität (Depolarisation) beobachtet werden. Dabei sollte zusätzlich noch der Einfluss eines NMDAR-Blockers auf die CREB-Phosphorylierung überprüft werden.

Abschließend sollten mögliche Auswirkungen der beschriebenen hippocampusspezifischen Deletion des $Ca_v1.2$ L-Typ Ca^{2+} -Kanals auf das Verhalten und die Lernfähigkeit $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse in verschiedenen Verhaltensmodellen untersucht werden.

Alles in allem zielte diese Arbeit darauf ab, eine Verbindung zwischen *in vivo*-adaptivem Lernen, hippocampaler LTP und der Aktivierung von CREB und ERK zu etablieren und mit Hilfe der $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Maus die Rolle des $Ca_v1.2$ L-Typ Ca^{2+} -Kanals in diesem Gesamtkonzept zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Mausstämme

In der vorliegenden Arbeit sollte bei *Ca_v1.2-hippocampus-cortex-specific-knockout*-Mäusen ($Ca_v1.2^{HCKO}$) die Rolle der $Ca_v1.2$ -Kanäle in der neuronalen Gentranskription untersucht werden.

Die Erzeugung der konditionalen $Ca_v1.2$ (α_1c) knock out Mäuse wurde von Frau Dr. Verena Schulla im Rahmen ihrer Doktorarbeit vorgenommen, die NexCre-Mäuse wurden uns von der Arbeitsgruppe um M. H. Schwab und K.-A. Nave zur Verfügung gestellt (Schwab et al., 2000) (s. 1.5). Durch Verpaarung der beiden Mauslinien entstanden die in dieser Arbeit verwendeten Genotypen.

- Kontroll (CTR)-Gruppe: $Ca_v1.2^{+/L2}NexCre^{+/-}$
- knock out ($Ca_v1.2^{HCKO}$)-Gruppe: $Ca_v1.2^{L1/L2}NexCre^{+/-}$

2.2 Histochemische Methoden und Immunfärbung

2.2.1 Fixierung von Geweben der Maus

- Gewebe (1 h bei RT) in 2% Formaldehyd, 0,2% Glutaraldehyd (in PBS; s. 2.2.2) fixieren
- Gewebe 2x mit PBS waschen; in PBS bei 4°C lagern

2.2.2 Lösungen

10x PBS:

NaCl 80g
KCl 2g
Na₂HPO₄ (wasserfrei) 6,2g
KH₂PO₄ 2g
H₂O, ad 1000ml, pH 7,4

X-Gal Stammlösung (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl β-D-Galactosid, Roth):

40 mg/ml DMSO

Aliquots à 1 ml bei -20°C lagern

X-Gal Färbelösung (in PBS)

2,0 mM MgCl₂ 1 ml (1 M)
2,5 mM K₃Fe(CN)₆ 0,83 g
2,5 mM K₄Fe(CN)₆ 1,07 g
ad 500 ml PBS, pH 7,4

bei RT lagern

+ 1 mg/ml X-Gal (immer frisch zugeben)

2.2.3 Durchführung der X-Gal-Färbung:

- fixiertes Mausegewebe (s.2.2.1) bei RT über Nacht in X-Gal Färbelösung schwenken
- mit PBS waschen und in PBS bei 4°C lagern

2.2.4 Anfertigung von Paraffin Gewebeschnitten

- fixiertes (s. 2.2.1) und u.U. X-Gal gefärbtes (s.2.2.2) Mausegewebe dehydratisieren
aufsteigende Ethanolreihe

70% EtOH 30-60 min (Lagerung möglich)

80% EtOH 30-60 min

90% EtOH 30-60 min

96% EtOH I 30-60 min

96% EtOH II 30-60 min

Material und Methoden

100% EtOH I 30-60 min

100% EtOH II 30-60 min

100% EtOH/Toluol (1:1) 1x15 min

100% Toluol (Roth) 3x10 min (Vorsicht: X-Gal-Färbung wird durch Toluol ausgewaschen)

· dehydratisierte Gewebe in flüssigem Paraffin (60°C, „Paraplast“, Sigma) einlegen

Paraplast I ca. 30 min

Paraplast II ca. 30 min

Paraplast III ca. 60 min

in Paraplast III einbetten und erkalten lassen

· Schnitte (8-12 µm) mit einem Microtom (Microm HM 335 E) anfertigen, auf Objektträger platzieren und

2-12 h bei 37°C trocknen

· Schnitte auf Objektträgern entparaffinisieren und rehydrieren

Entparaffinisieren: 100% Toluol 2x 1 min

Rehydrieren: 100% EtOH ca. 2 min

96% EtOH ca. 2 min

90% EtOH ca. 2 min

70% EtOH ca. 2 min

2x mit H₂O waschen und lufttrocknen

2.3 Präparation und Vorbehandlung der verwendeten Gewebe

Die folgende Präparation wurde freundlicherweise von PD Dr. Thomas Kleppisch vorgenommen:

Nach Tötung der Mäuse wurden die Gehirne zügig entnommen und entlang der Fissura Magna geteilt. Anschließend wurden mit Hilfe eines scharfen Löffels spezifisch die Hippocampi entnommen. Groß- und Kleinhirn wurden isoliert und sofort schockgefroren.

Nach zweistündiger Inkubation in „artificial cerebrospinal fluid“ (ACSF) wurden die Hippocampi für 0, 5 bzw. 30 min in ACSF-Lösung mit Tetra-Ethyl-Ammonium (TEA) (Aniksztejn et al., 1991) behandelt und anschließend sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Zum Aufschluss wurden die Gewebe auf Trockeneis in Mörser und Pistill zerkleinert, die Partikel in Eppendorf-Gefäße überführt und in 2% SDS/50mMTris (90°C) gelöst (100µl pro

Material und Methoden

verwendetem Hippocampus). Dieser Ansatz wurde für 10 min bei 95°C gekocht (Vortex nach 3 min) und 5 min bei r_{max} zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

ACSF:		ACSF+TEA:	
Glucose	10 mM	Glucose	10 mM
KCl	3,5 mM	KCl	3.5 mM
NaCl	126 mM	NaCl	101 mM
NaHCO ₃	25 mM	NaHCO ₃	25 mM
CaCl ₂	2 mM	CaCl ₂	2 mM
MgCl ₂	1,3 mM	MgCl ₂	1,3 mM
NaH ₂ PO ₄	1,2 mM	NaH ₂ PO ₄	1.2 mM
bei 32°C, 5% CO ₂ , 95% O ₂ , pH 7,4		TEA	25mM
		bei 32°C, 5% CO ₂ , 95% O ₂ , pH 7,4	

2.4 Trennung und Detektion von Proteinen

2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach der BCA-Methode

Es handelt sich hierbei um eine spektrophotometrische Methode zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen (Smith et al., 1985), die eine Modifikation des von Lowry 1951 beschriebenen Prinzips darstellt. Dabei werden Metallionen in alkalischer Lösung durch Proteine reduziert; aus zweiwertigen entstehen einwertige Kupferionen, die mit einem spezifischen Reagenz, der 2,2'-Bis(chinolin-4-carbonsäure) (BCA) einen violett gefärbten Komplex bilden. Die Extinktion dieses Komplexes kann bei 540 nm gemessen werden. Da die Intensität der Färbung von Reaktionszeit und Temperatur abhängt, muss bei jeder Bestimmung eine Eichkurve mit Lösungen bekannter Konzentration angefertigt werden.

Das bei (Lagerung instabile) BCA Reagenz wurde jeweils kurz vor Gebrauch aus dem Reagenz A und B (Pierce) im Verhältnis 50 zu 1 angesetzt.

Material und Methoden

Reagenz A:

1% 2,2'-Bis(chinolin-4-carbonsäure)-Na₂

0,4% NaOH

2% Na₂CO₃ x H₂O

0,16% Na₂-Tartrat

0,95% NaHCO₃

Reagenz B:

4% CuSO₄ x H₂

Standards:

0,5, 1, 2, 3, 4 µg BSA/ 50µl H₂O

Die zu erwartenden Proteinkonzentrationen betragen um die 15 mg/ml (Gewebe). Nach Mischen der verdünnten Proteinlösungen (1:100 bis 1:300) mit BCA Reagenz wurde für 60 min bei 60°C inkubiert und die Farbreaktion über einen ELISA-Reader (Titertek) ausgewertet. Anhand der Werte der Standards ließ sich die gesuchte Proteinkonzentration berechnen.

2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen und Proteinkomplexen nach ihrer Größe im elektrischen Feld erfolgt mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Das SDS erfüllt dabei zwei entscheidende Aufgaben. Zum einen denaturiert es die Proteine und dissoziiert Komplexe in ihre Untereinheiten, zum anderen lagert sich das Detergens im konstanten Gewichtsverhältnis (1 SDS-Molekül pro 2 Aminosäure-Reste) an die Oberfläche der Proteine, wodurch ein negatives Ladungsgleichgewicht zwischen den einzelnen Proteinen erzeugt wird und gleichzeitig eine Linearisierung erfolgt. Somit wird lediglich eine Auftrennung nach Masse, nicht aber nach Ladung der Protein erzielt.

Die Trennung im Gel erfolgt durch den sogenannten Molekularsiebeffekt anhand der Größe des Proteins im elektrischen Feld. Durch die Änderung des Vernetzungsgrades des Acrylamids (AA) mit Bisacrylamid (BA) lassen sich die Trenneigenschaften des Gels variieren. Die Polymerisation des Gels erfolgt durch eine radikalische Reaktion durch den Zusatz von Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalstarter und N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) als Katalysator.

Material und Methoden

Das SDS-Polyacrylamidgel besteht aus Trenn- und Sammelgel, wobei die Proteine erst das Sammelgel durchlaufen, in dem sie fokussiert und vorsortiert werden, um dann im Trenngel aufgetrennt zu werden.

Zur Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele wurden Gießvorrichtungen der Firma LabTech verwendet. Die Dicke der Gele betrug 0,75 mm, die Größe der Beladungstaschen 5mm (10 Taschen pro Gel). Es wurden circa 4 ml des Trenngels in die Apparatur eingefüllt, mit Ethanol überschichtet und nach Abschluss der Polymerisation (circa 30 min) mit 1x Tris/HCl, pH 6,8 gewaschen. Nach Absaugen des Tris/HCl wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen.

Trenngel	7%	10%	Sammelgel	7%, 10%
30%AA/0,8%BA (BioRad)	3,50 ml	5,0 ml	30%AA/0,8BA (BioRad)	650 µl
4x Tris/HCl, pH 8,8	3,75 ml	3,75 ml	4x Tris/HCl, pH 6,8	1,25 ml
H ₂ O	7,75 ml	6,25 ml	H ₂ O	3,05 ml
10% APS (Sigma)	50 µl	50 µl	10% APS (Sigma)	12,5 µl
TEMED (Sigma)	10µl	10 µl	TEMED (Sigma)	5 µl

Tabelle 2.1 Zusammensetzung von 7%igen und 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen; die Mengen sind jeweils für 2 Gele angegeben.

Trenngel	11%	Sammelgel	11%
30%AA/0,2%BA (Fluka)	5,5 ml	30%AA/0,8%BA (BioRad)	650 µl
4x Tris/HCl, pH 8,8	3,75 ml	4x Tris/HCl, pH 8,8	1,25 ml
H ₂ O	5,75 ml	H ₂ O	3,05 ml
10% APS (Sigma)	50 µl	10% APS (Sigma)	12,5 µl
TEMED (Sigma)	10µl	TEMED (Sigma)	5 µl

Tabelle 2.2 Zusammensetzung von 11%igen SDS-Polyacrylamidgelen; die Mengen sind für 2 Gele angegeben.

2.4.3 Probenvorbereitung und Elektrophorese

Die Proben wurden mit 6x Auftragspuffer nach Laemmli verdünnt, 3 min bei 95°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Als Proteingrößen-Standard diente der Precision Plus Protein™ Standard All Blue der Firma BioRad. Die Elektrophorese wurde in 1x Laufpuffer mit 90 V gestartet und nach Erreichen des Trenngels auf 180 V erhöht.

Auftragspuffer:		10x Laufpuffer:	
Tris/HCl, pH 6,7	300 mM	Tris/HCl, pH 8,3	250 mM
DTT	200mM	Glycin	1,92 M
Bromphenolblau	0,04%	SDS	1%
Glycerin	40%		

2.4.4 Elektroblob von Polyacrylamidgelen

Der Transfer auf eine spezielle Membran ermöglicht eine spezifische Identifizierung und Charakterisierung der aufgetrennten Proteine und macht sie für eine Immundetektion (s. 2.15.5) zugänglich. Nach dem „Semi-Dry“-Verfahren werden die Proteine im elektrischen Feld vertikal auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon-P, Millipore) transferiert. Die Membran eignet sich zum Transfer von Proteinen > 10 kD.

Die Proben wurden elektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.15.3) und in einer Transfer-Apparatur der Firma Novablot nach folgendem Blotting-Schema (von unten nach oben) auf die Membran übertragen:

Anode (Graphitplatte)
3 Lagen Filterpapier, getränkt in Anodenlösung I
2 Lagen Filterpapier, getränkt in Anodenlösung II
Membran, in Methanol geschwänkt, getränkt in Anodenlösung II
SDS-Polyacrylamidgel
5 Lagen Filterpapier, getränkt in Kathodenlösung
Kathode (Graphitplatte)

Material und Methoden

Die Filter (GB001, Schleicher & Schüll) und die Membran wurden auf die Größe des SDS-Polyacrylamidgels zugeschnitten, der Blot luftblasenfrei aufgebaut und die Proteine 1 h bei konstanter Stromstärke von 0,8 mA/cm² auf die Membran transferiert.

Anodenlösung I:

Tris/HCl, pH 10,4 300 mM

Methanol 20%

Kathodenlösung:

Tris/HCl, pH 7,6 25 mM

ε-Aminocaprinsäure (Sigma) 40 mM

Methanol 20%

Anodenlösung II:

Tris/HCl, pH 10,4 30 mM

Methanol 20%

2.4.5 Immundetektion (Western Blot)

Im Western Blot können Proteine nach Auftrennung durch SDS-PAGE mit spezifischen Antikörpern identifiziert und durch einen gekoppelten Enzymassay sichtbar gemacht werden. Diese Methode setzt sich aus drei Schritten (SDS-PAGE-Elektroblot-Immundetektion) zusammen und ermöglicht je nach Qualität des verwendeten Antikörpers eine sehr sensitive und spezifische Detektion eines Proteins.

Um unspezifische Bindungen zu minimieren, wurde die Membran nach dem Elektroblotten (s. 2.15.4) über Nacht in 3% BSA-Lösung blockiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran mit einem spezifischen Antikörper (primärer Antikörper) für 2 h bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler inkubiert. Der Blot wurde anschließend gewaschen (3x 10 min in 1x TBST) und für weitere 2 h mit einem an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten anti-Immunglobulin-Antikörper (sekundärer Antikörper) inkubiert. Nach erneutem Waschen (3x 10 min in 1x TBST) wurde der Antigen-Antikörperkomplex durch eine Chemilumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht.

Da Meerrettich-Peroxidase (*Horseradish Peroxidase*, HRPO) in Anwesenheit von H₂O₂ Luminol oxidiert, entsteht vorübergehend ein lichtemittierender, angeregter Zustand. Diese sogenannte Chemilumineszenz wird durch p-Iodophenol verstärkt und kann durch Schwärzung eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden.

Hierfür wurde die Membran mit dem Chemilumineszenzreagenz der Firma NEN Life Science Products für 1 min inkubiert, der Blot in Klarsichtfolie eingewickelt und durch Auflegen eines

Material und Methoden

Films (Hyperfilm, Amersham) detektiert. Die Belichtungszeiten variierten von 1 s bis 30 min. Die Filme wurden zum Abschluss mit einer Entwicklermaschine der Firma Agfa (Curix 60) entwickelt.

Antigen	Hersteller	Organismus	Klassifizierung	Western Blot
CREB	Upstate	Kaninchen	polyklonal	1:1000
phospho-CREB	Upstate	Kaninchen	Polyklonal	1:1000
NR1	Upstate	Kaninchen	polyklonal	1µg/µl
p44/42 MAP Kinase	Cell Signaling	Kaninchen	polyklonal	1:1000
phospho-p44/42 MAP Kinase	Cell Signaling	Kaninchen	polyklonal	1:1000
cGKI	Schlossmann	Kaninchen	polyklonal	1:200
Ca _v 1.2	Koller	Kaninchen	polyklonal	1:250
Ca _v 1.3	Chemicon	Kaninchen	polyklonal	1:200

Tabelle 2.3 Primäre Antikörper

Konjugat	Antigen	Hersteller	Organismus
HRPO	Kaninchen	Dianova	Ziege

Tabelle 2.4 Sekundärer Antikörper

10x TBST:

Tris/HCl, pH 8,0	100 mM
NaCl	1,5 M
Tween 20 (Serva)	0,5%

Antikörperlösung:

BSA (Roth)	5%
Natriumazid	0,05%
in TBST	

2.4.6 Stripping nach Immundetektion

Um die einzelnen Blots mit verschiedenen Antikörpern einer Immundetektion unterziehen können, wurden sie nach erfolgter Immundetektion 15 min bei Raumtemperatur in einer *stripping solution* inkubiert. Dabei werden Antikörper von der Nitrocellulosemembran entfernt, ohne dass die zuvor aufgetrennten Proteine wesentlich beeinflusst werden.

Stripping solution:

Re-Blot Plus (Chemicon)	400 µl
H ₂ O	3.6 mL

2.5 Enzymatische Modifikation von DNS

2.5.1 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme sind bakterielle Endonukleasen, die spezifische Sequenzen innerhalb der DNS-Doppelhelix erkennen und die DNS in beiden Strängen mit definierten Enden schneiden. Die verwendeten Typ II-Endonukleasen spalten ihr DNS-Substrat innerhalb oder unmittelbar neben der meist palindromischen Erkennungssequenz. Bei der Hydrolyse der Phosphodiesterbindung entstehen entweder glatte Enden („blunt ends“) oder einander komplementäre, 5`- bzw. 3`- überhängende Enden („sticky ends“), die immer eine 5`Phosphat- und eine 3`Hydroxyl-Gruppe besitzen, was eine spätere Neuverknüpfung (Ligation) kompatibler Enden ermöglicht.

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 2-5 aufgeführten Restriktionsenzyme der Firma Roche und NEB mit den zugehörigen Puffersystemen verwendet.

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz
Asp 718 I (Roche)	5`-G/GTACC-3`
Xho I (NEB)	5`-C/TCGAG-3`

Tabelle2-5 Verwendete Restriktionsenzyme.

Die Schnittstellen sind mit / gekennzeichnet.

2.5.2 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau wurde zur Analyse isolierter DNS eingesetzt. Dazu wurde 1 µg Plasmid-DNS in 20 µl Reaktionsansatz 1,5 h geschnitten und bei 37°C (optimale Temperatur für die angegebenen Enzyme) inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz gelelektrophoretisch (s. 2.7) untersucht. Pro µg DNS und pro h wurden 5-10 Units Enzym eingesetzt.

2.6 Sequenzierung von Plasmid-DNS

Die Sequenzanalyse von rekombinanter Plasmid-DNS erfolgte nach einer modifizierten Methode von Sanger (Sanger et al., 1977). Mit Hilfe eines spezifischen Primers synthetisiert eine DNS-Polymerase *in vitro* einen komplementären Strang des gewünschten DNS-Fragments. Dem Reaktionsansatz werden neben der zu sequenzierenden DNS, dem Primer und der DNS-Polymerase noch Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP) und fluoreszenzmarkierte 2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTP) zugesetzt. Nach dem Einbau eines ddNTPs kommt es zu Kettenabbrüchen, da das Fehlen der OH-Gruppe in der 3'-Position eine Verlängerung der DNS verhindert. Bei sorgfältiger Wahl des Verhältnisses zwischen dNTPs und ddNTPs entsteht eine Mischung aus allen möglichen unterschiedlich langen DNS-Fragmenten. Diese unterschiedlich langen DNS-Fragmente werden durch den Einbau der mit Fluoreszenzfarbstoffen versehenen Didesoxynukleosidtriphosphate markiert. Dadurch können Guanin, Cytosin, Adenin und Thymin in einem Ansatz sequenziert werden, da jede der vier Basen einen anderen Fluoreszenzfarbstoff trägt.

Die Auftrennung erfolgte automatisch durch Kapillarelektrophorese (ABI Prism™ 310 Sequencer, PE, Applied Biosystems). Die markierten ddNTPs werden dabei mit einem Laser angeregt, das emittierte Licht der vier verschiedenen Wellenlängen (ddGTP: 540 nm, ddATP: 570 nm, ddTTP: 600 nm, ddCTP: 630 nm) detektiert und die Sequenz computergestützt ausgewertet.

2.6.1 Sequenzreaktion

Für die Sequenzreaktion wurden 0,5 µg DNS (Maxi-Präparation) eingesetzt.

Reaktionsansatz für Terminator Cycle Sequencing:

Terminator Ready Reaction Mix (Perkin Elmer)	4 µl
Primer [0,8 pmol/µl]	4 µl
DNS	x µl
H ₂ O	ad 20 µl

Material und Methoden

Der gebrauchsfertige Terminator Ready Reaction Mix (ABI Prism Dye Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, PE, Applied Biosystems) enthält die DNS-Polymerase, dNTPs und die fluoreszenzmarkierten ddNTPs. Der Mix wurde aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

Der Ansatz der Sequenzreaktion wurde kurz gemixt und in einem Thermocycler der Firma Biometra (UNO Thermoblock) amplifiziert. Zunächst wurde die DNS für 2 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden 25 Zyklen des folgenden Programms durchgeführt:

Denaturierung:	95°C	30 s
Annealing:	50°C	40 s
Elongation:	60°C	4 min

Die unterschiedlichen Temperaturen wurden langsam über einen Temperaturgradienten (1°C pro s) eingestellt.

Da der Sequenzierungsansatz nur einen Primer enthält, findet bei dieser Reaktion nur eine lineare Amplifikation der Matrize statt und nicht wie bei einer PCR eine exponentielle Vermehrung.

2.6.2 Reinigung des Sequenzierungsprodukts

Das Reaktionsprodukt des Cycle Sequencings wurde über eine Gelfiltrationssäule (CentriSep Column, Perkin Elmer) von überschüssigen, fluoreszierenden Nukleotiden gereinigt. Die Säulen wurden mit $800\ \mu\text{l}$ H_2O versetzt und für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert, um diese zu quellen. Nach dem Quellvorgang ließ man das Wasser aus der Säule für circa 5 min abtropfen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt ($525 \times g$, 1,5 min), um das überschüssige Wasser vollständig zu entfernen. Anschließend wurde das Produkt der Sequenzreaktion auf die Säule pipettiert, die Säule in ein Auffanggefäß gestellt und erneut für 1,5 min bei $525 \times g$ zentrifugiert. Nach dem Zentrifugationsschritt befand sich die gereinigte DNS in dem Gefäß und wurde für 20-30 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Das Pellet wurde in $20\ \mu\text{l}$ Template Suppression Reagent (Perkin Elmer) resuspendiert, für 3 min bei 95°C denaturiert und entweder sofort in den Sequencer ABI Prism™ 310 gestellt oder bei -20°C aufbewahrt.

Der Sequencer zog die Probenlösung automatisch in eine, mit Polymer (Perkin Elmer) gefüllte Kapillare, in der die DNS-Fragmente durch die angelegte Spannung von $12,2\ \text{kV}$ in $5' \rightarrow 3'$ -Richtung auf den Laserdetektor zuwandern. Aus der Abfolge der von dem Laserdetektor bestimmten Farbsignale errechnet der Computer die Nukleotidsequenz.

2.7 Reinigung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

2.7.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Mit Hilfe der Phenol/Chloroform-Extraktion können Proteine aus wässrigen Nukleinsäurelösungen entfernt werden. Dazu wurden die Nukleinsäurelösungen mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1, Roth) versetzt, kräftig geschüttelt und abzentrifugiert (12.000 rpm, 5 min). Die nukleinsäurehaltige wässrige Oberphase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Chloroformextraktion von restlichen Phenolspuren befreit. Im Anschluss wurden die Nukleinsäuren mit Ethanol präzipitiert.

2.7.2 Präzipitation

Nukleinsäuren wurden zur Aufkonzentrierung und Reinigung mit Ethanol gefällt (Sambrook et al., 1989). Zu einer wässrigen DNS- bzw. RNS-Lösung wurden hierfür 1/10 Volumen 5 M NaCl und 2,5 Volumen Ethanol zugegeben. Der Ansatz wurde für 15 min bei -80°C inkubiert, abzentrifugiert (12.000 rpm, 15 min, 4°C) und der Überstand vorsichtig abgegossen. Das Pellet wurde zum Entsalzen mit 70%igem, eiskalten Ethanol gewaschen, bei 37°C getrocknet und zuletzt in einer geringen Menge Wasser aufgenommen.

2.8 Auftrennung und Isolierung von DNS- Fragmenten

Nukleinsäuren sind aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen und können daher im elektrischen Feld nach Masse und Konformation aufgetrennt werden. Durch die Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid, der in ein Gel mit eingegossen werden kann, können die aufgetrennten DNS-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Für den Größenvergleich wurde ein DNS-Standard (1 kb Ladder, Gibco-BRL) mit auf das Gel aufgetragen.

Material und Methoden

10x TBE:

Tris (USB)	0,9 M
Borsäure (Merck)	0,9 M
EDTA, pH 8,0 (ICN)	20 mM

Auftragspuffer (6x Dye):

Ficoll Typ 400 (Sigma)	18%
EDTA	1,2 mM
10x TBE	6%
Bromphenolblau (IBI)	0,15%
Xylencyanol FF (Sigma)	0,15%

Laufpuffer:

1x TBE (1 Teil 10x TBE + 9 Teile H₂O)

Ethidiumbromidstammlösung:

10 mg/ml (Sigma), wässrig

2.8.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNS-Fragmenten im Bereich von 1 bis 12 kb wurde die horizontale Gelelektrophorese in Agarosegelen (Sambrook et al., 1989) angewendet.

Verwendete Gele:

2% Agarosegele:	für Fragmente im Bereich von 100-1000 bp
0,7% Agarosegele:	für Fragmente im Bereich von 1-10 kb

Die Agarose (Seakem LE, Biozym) wurde in 1x TBE aufgeschmolzen, auf 60°C im Wasserbad abgekühlt und nach Zugabe von 0,1 µl/ml Ethidiumbromid in eine horizontale Gelkammer luftblasenfrei gegossen. Die Proben wurden mit 1/6 Volumen Auftragspuffer versetzt, auf das Gel aufgetragen und bei 60-120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1x TBE.

2.8.2 Elektroelution

Für die Isolierung eines DNS-Fragmentes mit bestimmter Größe wurde eine Elektroelution modifiziert nach Davis et al. (1986) angewendet. Zu Beginn wurde eine gelelektrophoretische Auftrennung (s. 2.8.1/2.8.2) der DNS-Fragmente durchgeführt und die gewünschte Bande unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Das Gelstück wurde zusammen mit 300 µl 1x TBE in einen Dialyseschlauch (Sigma) überführt und die DNS in einer horizontalen

Elektrophoresekammer bei 145 mA auf Eis aus dem Gel eluiert. Nach 1-2 h wurde die DNS durch eine Ethanol-fällung (s. 2.6.2) isoliert.

2.9 *In situ*-Hybridisierung

Wenn die Methoden der Nukleinsäure-Hybridisierung direkt an einem Gewebeschnitt angewandt werden, um Boten-RNS-Moleküle im Gewebe (*in situ*) nachzuweisen und zu lokalisieren, spricht man von *In situ*-Hybridisierung.

Es wurden eine 274 bp und eine 578 bp lange DNS-Sequenz verwendet, die einem Abschnitt der zu untersuchenden mRNA entsprachen und einzigartig für das zu untersuchende Gen waren. Diese wurden in den Transkriptionsvektor PCR-blunt II - TOPO kloniert. DNS-abhängige RNS-Polymerasen, die ihren jeweiligen Promotor erkennen, synthetisieren cRNS nach Linearisierung des Plasmids durch Xho I bzw. Asp 718 I. Je nach Orientierung entsteht der Antisense-Grenzstrang, der komplementär zur Boten-RNS ist, oder der Sense-cRNS-Einzelstrang. Durch Einbau von ³⁵S-UTP werden die RNS-Gensonden radioaktiv markiert. Nach Zugabe der Gensonden auf vorbehandelte Gewebeschnitte bildet die Antisenseprobe ein stabiles mRNA/cRNS-Hybrid mit der mRNA im Gewebe. RNase baut spezifisch einzelsträngige RNS ab, nicht aber das doppelsträngige Hybrid. Durch Autoradiographie kann die erfolgreiche Hybridisierung sichtbar gemacht werden.

2.9.1 Verwendete Lösungen

1M Tris:

Tris-Base 121g
H₂O ad 1000ml
pH mit HCl_{conc} auf 8.0 einstellen.

10x PBS

s. 2.2.2

5x Rnase-A-Puffer:

5M NaCl 250ml
1M Tris pH 8,0 25ml

0,5M EDTA, pH 8,0:

Na₂EDTA*2H₂O 186,1g
H₂O ad 1000ml
Mit 5M NaOH auf pH 8,0 einstellen.

5x Protease-Puffer:

1M Tris pH 8,0 250ml
0,5M EDTA pH 8,0 25ml
H₂O ad 1000ml

3M Natriumacetat, pH 5,2:

Natriumacetat*3H₂O 40,8g

Material und Methoden

0,5M EDTA pH 8,0	5ml	H ₂ O	ad 1000ml
H ₂ O	ad 500ml	Mit Eisessig auf pH 5,2 einstellen.	

Alle oben genannten Lösungen wurden RNase-frei hergestellt und durch Autoklavieren sterilisiert.

1M DTT:

Dithiothreitol(ICN)	1,5g
3M NaAcetat	33µl
H ₂ O	ad 10ml

Sterilfiltrieren, aliquotiert bei -20°C haltbar.

50% Dextran:

Dextransulfat (MG=5x10 ⁵)	12.5g
H ₂ O	ca.12ml
3h bei 68 °C lösen	
H ₂ O	ad 25ml

Bei -20°C lagern.

Formamid (deionisiert):

Ionenaustauscherharz (BioRad)	ca.5g
Formamid	ca. 45ml

bei 4°C lagern.

50x Denhardt:

Ficoll	1g
Polyvinylpyrrolidon	1g
BSA	1g
H ₂ O	ad 100ml

Sterilfiltrieren, aliquotiert bei -20°C lagern.

Chloralhydratlösung:

Chloralhydrat	3,0g
10x PBS pH 7,4	1ml
H ₂ O	ad 10ml

Sterilfiltrieren, bei 4°C 4 Wo. haltbar.

Box- Puffer:

Formamid	50ml
20x SSC	20ml
H ₂ O	ad 100ml

4% PFA:

Paraformaldehyd	6g
10x PBS	15ml
H ₂ O	ad 150ml
bei 60°C lösen, auf 4°C abkühlen, frisch zubereiten.	

1,25x Hybridisierungspuffer:

1M Tris pH 8,0	0,625ml
5M NaCl	3,75ml
0,5M EDTA pH 8,0	0,125ml
50x Denhardt	1,25ml
50% Dextran	12,5ml
Formamid (deionisiert)	31,25 ml
H ₂ O	ad 50 ml

2.9.2 Herstellung der RNS-Gensonden

Für die Sense- bzw. Antisense-Sonde werden je 12 µg Plasmid-DNS mit Xho I bzw. Asp 718 über Nacht bei 37°C linearisiert (s.2.4.1) und nach Phenol/Chloroform-Reinigung (s. 2.6.1) mit Ethanol gefällt (2.6.2), in 10 µl H₂O gelöst und bei -20°C gelagert. Die *In vitro*-Transkription wird mit jeder Probe einmal ohne das radioaktiv markierte ³⁵S-UTP „kalt“ getestet und das entsprechende RNS-Produkt gelelektrophoretisch untersucht. Anschließend wiederholt man die *In vitro*-Transkription mit radioaktivem ³⁵S-UTP. Die T7-RNS-Polymerase synthetisiert bei diesem System einen RNS-Strang, der komplementär zur entsprechenden Boten-RNS ist, die sogenannte Antisense-Probe. Die T3-Polymerase synthetisiert den zur Antisense-Probe komplementären Sense-Strang. DNase baut nach erfolgter *In vitro*-Transkription die DNS-Matrize ab. Es folgt die chromatographische Auftrennung des Ansatzes (NickTM Column, Pharmacia). Von den Fraktionen 1 bis 5 pipettiert man jeweils 2µl zu 3 ml Szintillationsflüssigkeit und misst die Aktivität im Szintillationszähler. Die radioaktiv markierte Gensonde befindet sich in Fraktion 2 und wird zur besseren Stabilität in Hybridisierungslösung auf eine Konzentration von 1x 10⁷dpm/ml verdünnt und mit Transfer-RNS (tRNS, RNase-frei, Boehringer) mit einer Endkonzentration von 0,5µg/µl und DTT mit einer Endkonzentration von 10mM gemischt. Dabei dient DTT als Antioxidans der Stabilität des ³⁵S und die tRNS der Verminderung unspezifischer Bindungen und des Hintergrundrauschens.

2.9.3 Anfertigung von Gewebeschnitten

Für die *In situ*-Hybridisierung entstammten wiederum den in 2.1 beschriebenen Mauslinien. Die entnommenen Gehirne wurden auf Eis zwischengelagert und in 2-Methylbutan eingefroren, das in einer Trockeneis-Ethanol-Mischung auf -40°C gekühlt wurde. In luftdichten Gefäßen konnten die Organe bei -80°C gelagert werden.

In einem Kryostat (Leica, Jung CM 3000) wurden bei -20°C 16 µm dicke Präparate von den Gehirnen geschnitten und auf Polylysin-beschichtete Objektträger (PolylysineTM, Menzel Gläser) aufgeschmolzen. Die Objektträger wurden eine halbe Stunde unter Vakuum getrocknet und bei Raumtemperatur mit 4%iger Paraformaldehydlösung für 30 min fixiert. Nach einem Waschgang mit PBS wurden die Schnitte in aufsteigenden Ethanolkonzentrationen (50%, 70%, 95%, 100%) entwässert. Die Schnitte wurden für

Material und Methoden

mindestens 30 min vakuumgetrocknet. Falls sie nicht gleich zur *In situ*-Hybridisierung weiterbearbeitet wurden, konnten sie bei -80°C in einer luftdichten Box zusammen mit viel Trockenmittel (Sililkagel) über Monate hinweg gelagert werden.

2.9.4 Standardprotokoll der *In situ*-Hybridisierung (nach Simmons et al., 1989)

Die trockenen, fixierten Schnitte wurden für 15 min mit 2 µg/µl Proteinase K in 1x Proteasepuffer vorbehandelt.

-Waschschritt: 5 min in 0,5x SSC

Um eine unspezifische Bindung der Sonde an den Schnitten zu vermeiden, wurde das Gewebe azetyliert:

-3 min in 0.1M TEA (Triethanolaminhydrochlorid) pH 8,0 inkubieren

-10 min in 0,25%iger Essigsäureanhydridlösung in 0,1M TEA

-2 Waschschrte: je 2 min in 2x SSC

Entwässerung der Schnitte:

-je 3 min in 50%, 70%, 95%, 100% Ethanol

-5 min lufttrocknen

-30 min vakuumtrocknen

Die Objektträger (OT) wurden in einer dicht verschließbaren Box waagrecht auf ein Gitter gelegt und die Gewebeschnitte mit der dickflüssigen Prähybridisierungslösung bedeckt, die aus 8 Anteilen 1,25x Hybridisierungspuffer, 1 Anteil 1M DTT und 1Anteil H₂O bestand. Um ein feuchtes Milieu in der Box aufrechtzuerhalten und damit ein Antrocknen der Hybridisierungslösung zu verhindern, wurde Saugpapier auf den Gefäßboden gelegt und mit Boxpuffer getränkt. Die Prähybridisierung erfolgte für 2 Stunden bei 42°C.

Sense- und Antisenseproben (mit 1x 10⁷dpm/ml Hybridisierungspuffer) wurden 10 min im 65°C Wasserbad erhitzt und nach Zugabe von 80µl 1M DTT pro 1ml Probenlösung zentrifugiert (2 min, 2000 rpm). 30 bis 100µl der Hybridisierungslösung mit Antisense- bzw. Sense- Probe wurden auf die prähybridisierten Schnitte pipettiert, die man danach bei 55°C für etwa 16 h inkubierte.

Die Objektträger wurden am nächsten Tag in einen Glasträger gestellt und in Glasgefäßen von unspezifisch gebundener Probe befreit. Um den im RNS/RNS-Hybrid gebundenen ³⁵S zu stabilisieren, enthielten die Waschlösungen 1mM DTT und 1mM EDTA pH 8,0. Die mit Sense- und Antisense-Probe hybridisierten Schnitte wurden vollkommen gleich behandelt.

- 2 Waschschrte: je 10 min 2x SSC

Material und Methoden

- RNase A-Verdau: 30 min in 20µg/µl RNase A in 1x RNase-Puffer

RNase baut spezifisch einzelsträngige RNS ab, RNS/RNS-Hybride bleiben davon unberührt.

- 2 Waschschrirte: je 10 min in 2x SSC bei Raumtemperatur
- 2 Waschschrirte: je 1h in 0,1x SSC bei 60 bis 70°C
- 3 Waschschrirte: je 10 min in 0,5x SSC bei Raumtemperatur
- Entwässern: je 3 min in 50%, 70%, 95%, 100% Ethanol

Die verdünnten Ethanolösungen enihielten je 2,3% Ammoniumacetat, um das RNS/RNS-Hybrid zu stabilisieren.

- 5 min lufttrocknen
- 30 min vakuumtrocknen

Die getrockneten Objektträger wurden auf Karton aufgeklebt und ein Film (Kodak BioMax MR) aufgelegt. Nach 6 bis 20 Tagen Exposition bei 4°C wurde der Film entwickelt.

2.9.5 Histologische Färbungen

Um die Morphologie der Gewebeschnitte untersuchen zu können, wurden sie nach der Filmentwicklung mit Toluidinblau und nach Nissl behandelt. Toluidinblau stellt sowohl Kerne als auch Zytoplasma blau dar, während bei der Nissl-Methode Teile des Zellkerns und extranukleäre RNS blau gefärbt wird. Nach der Färbung wurden die Gewebeschnitte mit DePeX-Harz (Serva) und Deckgläschen bedeckt und standen für die Mikroskopie zur Verfügung.

Toluidinblau-Färbung:

OT für 30 min in Toluidinblaulösung
3x in H₂O tauchen
in 30% Ethanol nach Bedarf entfärben
trocknen lassen
2x2 min in Xylol

Toluidinblau-Lösung:

Toluidinblau (Sigma) 10g/l

Nissl-Färbung:

2 min in 1% Cresylviolettlösung
jeweils kurz in folgender Reihe:

- H₂O
- 70% Ethanol
- 70% Ethanol + 30mM Essigsäure
- 70% Ethanol

Cresylviolett-Lösung:

Cresylviolett (Sigma) 10 g/l,
anschließend filtrieren

- 95% Ethanol
- 100% Ethanol

2 min in Xylol

2.9.6 Mikroskopie und Photographie

Die angefärbten Gewebeschnitte wurden mit einem Zeiss Axioskop im Hellfeld (s. 2.9.5) untersucht und anschließend mit einer Contax 167MT-Kamera aufgenommen. Als Farbfilm wurde der KODAK EPY64T Film verwendet.

2.10 Messung der Langzeitpotenzierung

Die Versuchstiere wurden durch Genickbruch getötet und die Gehirne in eisgekühlter, mit Carbogen (95% O_2 , 5% CO_2) begaster ACSF aufbewahrt. Nach Präparation des Hippocampus wurden 400 μm dicke, transversale Schnittpräparate angefertigt und nach ca. 90 min in eine Messkammer eingebracht. Die ACSF in der Messkammer wurde auf 30°C erwärmt, um die Versuche unter nahezu physiologischen Bedingungen durchzuführen, da die Temperatur Einfluss auf die Größe und Latenz der elektrophysiologischen Signale hat (Kleppisch et al., 2003).

ACSF-gefüllte Glaspipetten (Widerstand von $\sim 8 M\Omega$) wurden im Stratum radiatum der CA1 Region der Schnitte positioniert, wobei sie mit ACSF (s. 2.3) umspült wurden. Die Schaffer-Kollateralen, welche die CA1 Pyramidenzellen des Hippocampus innervieren, wurden mit *monopolar tungsten* Elektroden stimuliert, die 100 μs anhaltende Strompulse erzeugten. Die Stimulation und die Datenerfassung wurden mit Hilfe der Pulse Software (HEKA) über ein ITC-16 Interface kontrolliert. Die Intensität während der Gewinnung der Grundlinie wie auch während der tetanischen Stimulation wurde auf 50 % der maximalen Reizintensität festgesetzt. Ohne dass es zu einer Blockade der NMDAR kam, wurden LTP und LTD induziert, indem ein „theta-burst“-Protokoll (12 x 4 Impulse @ 1 Hz) und eine Niederfrequenzstimulation (900 Impulse @ 1 Hz) verwendet wurde. Eine BDNF-abhängige Form der LTP (Zakharenko et al., 2003), die durch 10 Einheiten einer tetanischen Stimulation (200 Hz, 200 ms) mit 5 s Pause zwischen den Durchläufen hervorgerufen wurde, wurde in An- und Abwesenheit des NMDA-Rezeptorantagonisten APV (50 μM) untersucht. Die NMDAR-unabhängige Spätphasen-LTP (L-LTP) wurde darüberhinaus mit einem 100 Hz Tetanus (4 x 100 Hz für 1 s mit 5 s Pause) wie bei Impey et al. (1996) studiert. Bei diesen

Versuchen wurde die Stimulusintensität während des Tetanus erhöht, um ein rhythmisches Feuern von Aktionspotentialen der postsynaptischen Neurone sicherzustellen. Eine andere Form der NMDAR-unabhängigen LTP (LTP_K) wurde induziert, indem die Schnitte für 15 min mit einer modifizierten ACSF, die 10 mM Glukose, 100 mM NaCl, 3 mM KCL, 1,25 mM KH_2PO_4 , 26 mM $NaHCO_3$, 2 mM $MgSO_4$, 2mM $CaCl_2$, 24 mM Tetraethylammoniumchlorid (TEA-Cl) und zusätzlich während des gesamten Experiments den NMDA-Rezeptorantagonisten APV (50 μ M) enthielt, umspült wurden. In allen Messungen der synaptischen Plastizität wurde die Stimulusintensität nach Aufnahme einer Reizintensitätskurve (Input-Output-Relation) so gewählt, daß sie zwischen 30% und 40% der maximal möglichen Reizantwort (maximale fEPSP Amplitude) auslöste. Als Maß für die LTP wurde die Anstiegssteilheit des fEPSP zur gemittelten Grundlinie vor Gabe des Tetanus oder Umspülen mit TEA normalisiert. Alle Versuche wurden doppelblind ausgeführt.

2.11 Verhaltensversuche

Die Tiere wurden bei einem jeweils zwölfstündigen Hell-Dunkel-Zyklus gehalten. Wasser und Futter waren *ad libidum* vorhanden. In allen Versuchen Geschwistertiere beider Genotypen im Alter von 8 bis 15 Wochen verwendet. Alle Versuche wurden stets doppelblind ausgeführt.

2.11.1 *Open field test*

Die Testanlage bestand aus einem Plastikboden (63 x 63 cm), der durch auf den Boden gezeichnete Linien in 49 Quadrate unterteilt worden war. Eine 5 cm hohe Plastikwand umgab die Konstruktion. Die 25 Quadrate, die nicht an die Wand angrenzten, wurden als innere Quadrate bezeichnet, die restlichen als äußere. Mäuse, die anfangs mit der Anlage unvertraut waren, wurden an fünfmal täglich an 4 aufeinanderfolgenden Tagen mit jeweils einer Stunde Pause dazwischen auf ein eckständiges Quadrat gesetzt. Dabei durften sie die Anlage jeweils 5 min frei erkundschaften, wobei die Anzahl der Quadrate (gesamt, innere, äußere) gezählt wurden, die mit beiden Vorderpfoten gleichzeitig betreten wurden.

2.11.2 Rotarod test

Alle Tiere wurden einmal täglich an 5 aufeinanderfolgenden Tagen untersucht, wobei die Fähigkeit, auf einem rotierenden Zylinder zu balancieren, mit Hilfe eines computer-assistierten *rotarod* (TSE) aufgezeichnet wurde. Während jedes Testlaufs wurden die Mäuse zuerst für 30 s auf das stehende *rotarod* gesetzt und dieses anschließend schrittweise von 5 rpm auf 60 rpm beschleunigt. Die Zeit bis zum Herunterfallen wurde automatisch aufgezeichnet.

2.11.3 Water maze task

Erwachsene CTR- und $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse (10 männliche Tiere pro Genotyp) wurden an das Wasser gewöhnt und in einem *discriminatory water maze task* (Arns et al., 1999; Kleppisch et al., 2003) untersucht. Dabei mussten CTR- und $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse eine fixierte Plattform identifizieren (*correct choice*), die visuell einer zweiten sinkbaren Plattform (*incorrect choice*) entsprach. Die Position der inkorrekten Plattform wurde nach dem Zufallsprinzip gewählt. Die Umgebung der Anlage im Labor enthielt periphere räumliche Landmarken. Ein Durchgang wurde abgebrochen, falls es eine Maus nicht innerhalb von 60 s schaffte, auf eine der Plattformen zu klettern. Im Falle der *incorrect choice* wurde die Maus vom Untersucher auf die korrekte Plattform gesetzt. Sämtliche Mäuse blieben für mindestens 10 s auf dieser Plattform, bevor sie wieder in den Käfig zurückgesetzt wurden. Potentielle nahe Landmarken, z.B. Fäzes, wurden zwischen den Durchgängen beseitigt. Der Lernprozess wurde während 5 Trainingseinheiten aufgezeichnet (Tag 1-5). Jede Einheit enthielt 10 Durchgänge mit zwei- bis vierminütigen Unterbrechungen. Um sicherzugehen, dass die Mäuse räumliche Landmarken benutzten, um die korrekte Plattform zu lokalisieren, wurde eine zusätzliche *reversal* Einheit durchgeführt. Dabei wurde die korrekte Plattform am Tag 12 in den gegenüberliegenden Quadranten des *water maze* gebracht. Die Anzahl der *correct choices* und die Dauer bis zum Erreichen der Plattform wurden als Maß der Gedächtnisbildung gewertet.

2.11.4 „Labyrinth“ maze test

Diese räumliche Lernaufgabe setzte sich aus einem horizontalen *maze* aus transparenten Acrylglasröhren (50 cm lang, 5 cm Durchmesser; Abbildung 2.1) zusammen. Die Gabelungen bestanden aus vertikalen Röhren und waren mit 1 cm hohem Wasser befüllt, damit sich die Mäuse dort nicht ausruhten. Die Mäuse mussten nun vom Anfangspunkt auf der einen Seite zu ihrem dunklen Käfig auf der Seite des *maze* gelangen. Der Antrieb bestand in der Flucht aus den hell erleuchteten Röhren. Nach jedem Durchgang wurden die Tuben nach dem Zufallsprinzip ausgetauscht, um den Einfluss eventueller olfaktorischer Landmarken zu eliminieren. Um vom Anfangspunkt zum Ausgang in die *dark box* zu gelangen, mussten die Tiere mindestens neun „räumliche Entscheidungen“ (neun Gabelungen) treffen. Falsche Entscheidungen an Gabelungen führten die Mäuse in Sackgassen, wo sie umkehren mussten. Die Leistung wurde anhand der Anzahl der durchlaufen Röhren (inklusive der Wiederholungen) auf ihrem Weg zur *dark box* gemessen. Während der dreitägigen Vorbereitung wurden die Mäuse dreimal täglich an das eine Ende einer Acrylglasröhre gesetzt und durften anschließend durch die Röhre in *dark box* laufen.

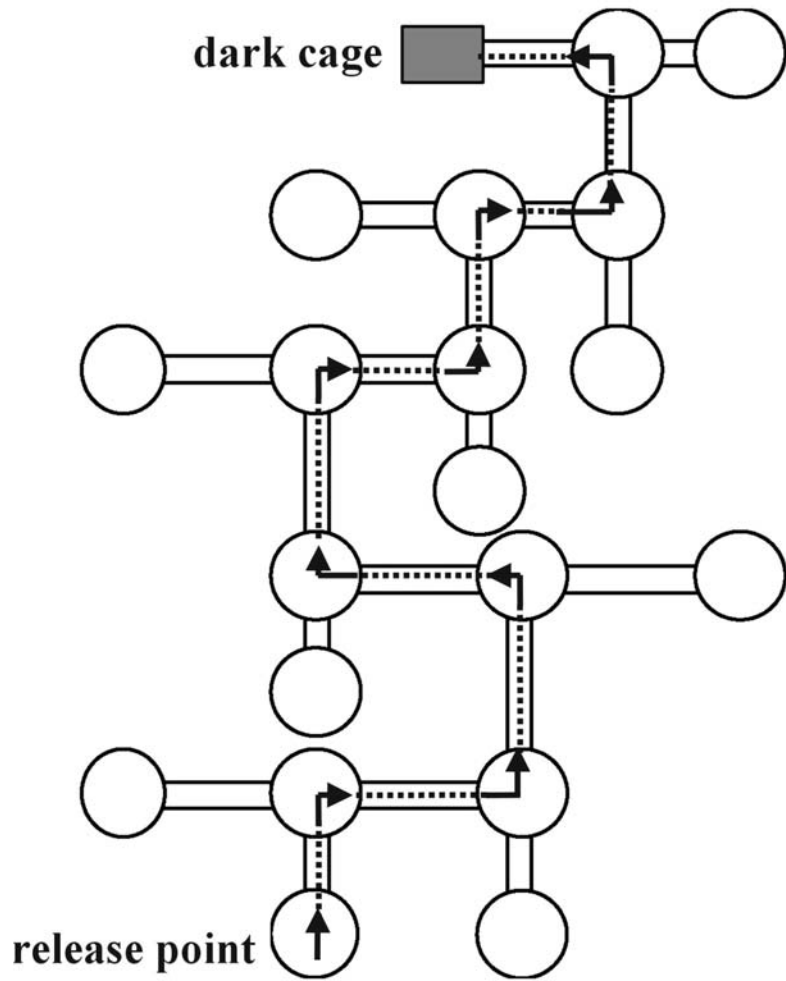


Abbildung 2.1 Aufbau des "labyrinth" maze tests

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis der Expression der $Ca_v1.2$ und $Ca_v1.3$ L-Typ Ca^{2+} -Kanäle im murinen Hippocampus mittels *In situ*-Hybridisierung

Als Voraussetzung für alle weiteren Arbeiten galt es, die Expression der $Ca_v1.2$ und $Ca_v1.3$ L-Typ Ca^{2+} -Kanäle im murinen Hippocampus zu demonstrieren.

Dazu wurden Sagittalschnitte (s. 2.9.3) von Gehirnen adulter CTR-Mäuse angefertigt und einer *In situ*-Hybridisierung (s. 2.9) mit für $Ca_v1.2$ und $Ca_v1.3$ spezifischen Gensonden (s. 2.9.2) unterzogen.

Wie aus der Abbildung 3.1 hervorgeht, war sowohl $Ca_v1.2$ - als auch $Ca_v1.3$ -mRNS im Gyrus dentatus und in den Regionen CA1 bis CA3 exprimiert. Für die $Ca_v1.2$ -mRNS war im Vergleich zur $Ca_v1.3$ -mRNS eine Abnahme der Expression in der CA1-Region festzustellen. Ein direkter quantitativer Vergleich zwischen den beiden Signalen war allerdings nicht möglich, da die $Ca_v1.2$ -Sonde mit 274 bp nicht einmal die halbe Länge der $Ca_v1.3$ -Sonde (578 bp) besaß und daher autoradiographisch im Vergleich zur $Ca_v1.3$ -Sonde wesentlich schwächer strahlte.

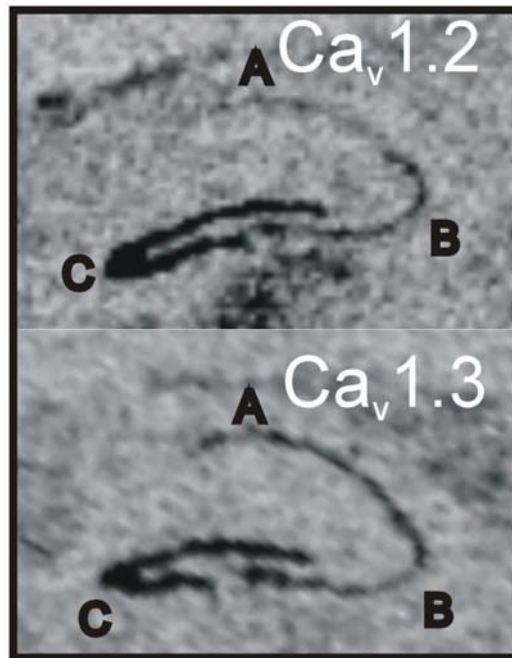


Abbildung 3.1 *In situ*-Hybridisierung an Sagittalschnitten adulter CTR-Mäuse mit Ca_v1.2 L-Typ Ca²⁺-Kanal- und Ca_v1.3 L-Typ Ca²⁺-Kanal-spezifischen Sonden. Sowohl Ca_v1.2- als auch Ca_v1.3-mRNS wird im Gyrus dentatus und in den Regionen CA1 bis CA3 exprimiert. Bezüglich der Ca_v1.2-mRNS ist in der CA1-Region eine Abnahme festzustellen.
Ca_v1.2: Ca_v1.2 L-Typ Ca²⁺-Kanal; Ca_v1.3: Ca_v1.3 L-Typ Ca²⁺-Kanal; A: CA1; B: CA3; C: Gyrus dentatus

3.2 Überprüfung der Cre-Rekombinase-Aktivität im Hippocampus von Nex-Cre-Mäusen mittels X-Gal-Färbung

Da der Ca_v1.2-Kanal im Hippocampus deletiert werden sollte, musste zunächst untersucht werden, ob die Cre-Rekombinase in der Hippocampusformation von Nex-Cre-Mäusen aktiv ist. Um die Rekombinationseffizienz in Neuronen von Nex-Cre-Mäusen zu bestimmen, wurden diese Linien mit der ACZL Rekombinations-Reportermaus (Akagi et al., 1997) gekreuzt (Abbildung 3.2).

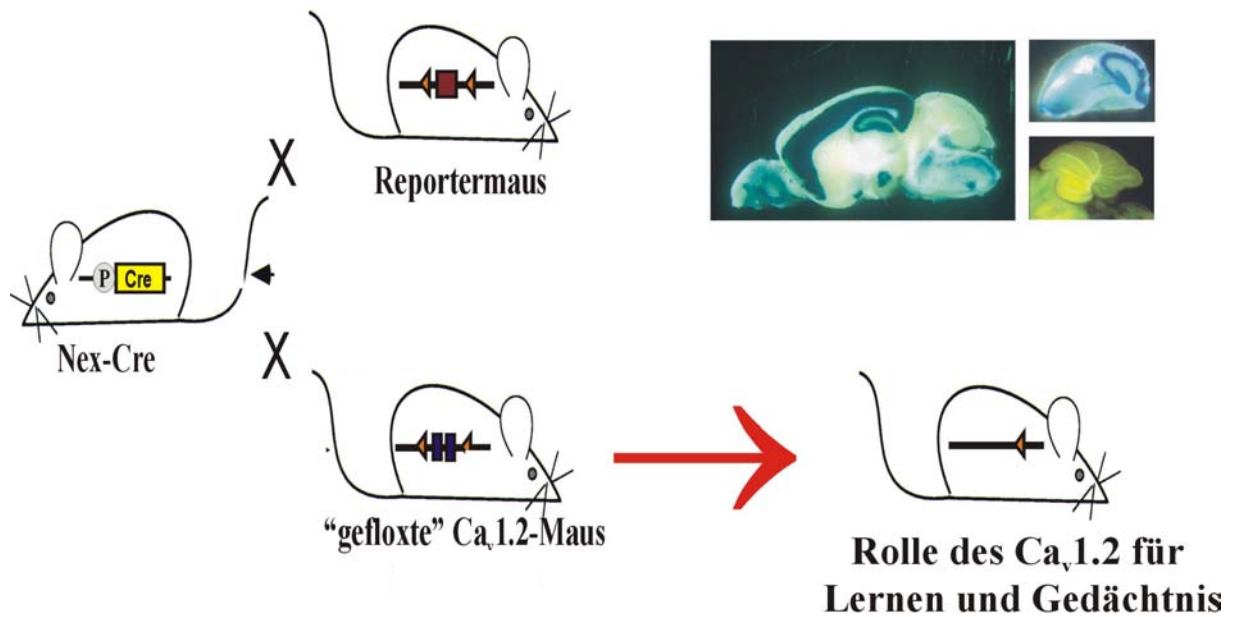


Abbildung 3.2 Verpaarung der Nex-Cre-Maus mit der ACZL Rekombinations-Reportermaus als Kontrolle für die $Ca_v1.2^{L1/L2}NexCre^{+/(-)}-(Ca_v1.2^{HCKO})$ -Maus
 Um die Rekombinationseffizienz in Neuronen von Nex-Cre-Mäusen zu bestimmen, wurde diese Linie mit der ACZL Rekombinations-Reportermaus (Akagi et al., 1997) gekreuzt.

Die ACZL Maus exprimiert die β -Galaktosidase nach Cre-vermittelter Exzision eines *loxP*-flankierten CAT Gens in einer großen Anzahl von Geweben inklusive dem ZNS. Die β -Galaktosidaseaktivität und damit indirekt die Rekombination kann durch X-Gal Färbung nachgewiesen werden. Zellen und Gewebe, die β -Galaktosidase exprimieren, können durch Anfärbung mit dem chromogenen β -Galaktosidase Substrat X-Gal detektiert werden. Nach Hydrolyse und Luftoxidation entsteht aus X-Gal ein blauer, schwer löslicher Indigofarbstoff, der nicht aus den Zellen herausdiffundiert.

Wie aus Abbildung 3.3 hervorgeht, besaßen sowohl Hippocampus als auch Neocortex sowie Teile des Riechhirns und verschiedene Kerne im Hirnstamm eine hohe Cre-Rekombinase-Aktivität, während die Cre-Rekombinase z.B im Kleinhirn nicht schnitt. Bei Verpaarung der NexCre-Mauslinie mit „Ca_v1.2-geflochten“ Mäusen war also damit zu rechnen, dass vor allem im Hippocampus und im Neocortex große Teile des Ca_v1.2-Kanals deletiert wurden.

Ergebnisse

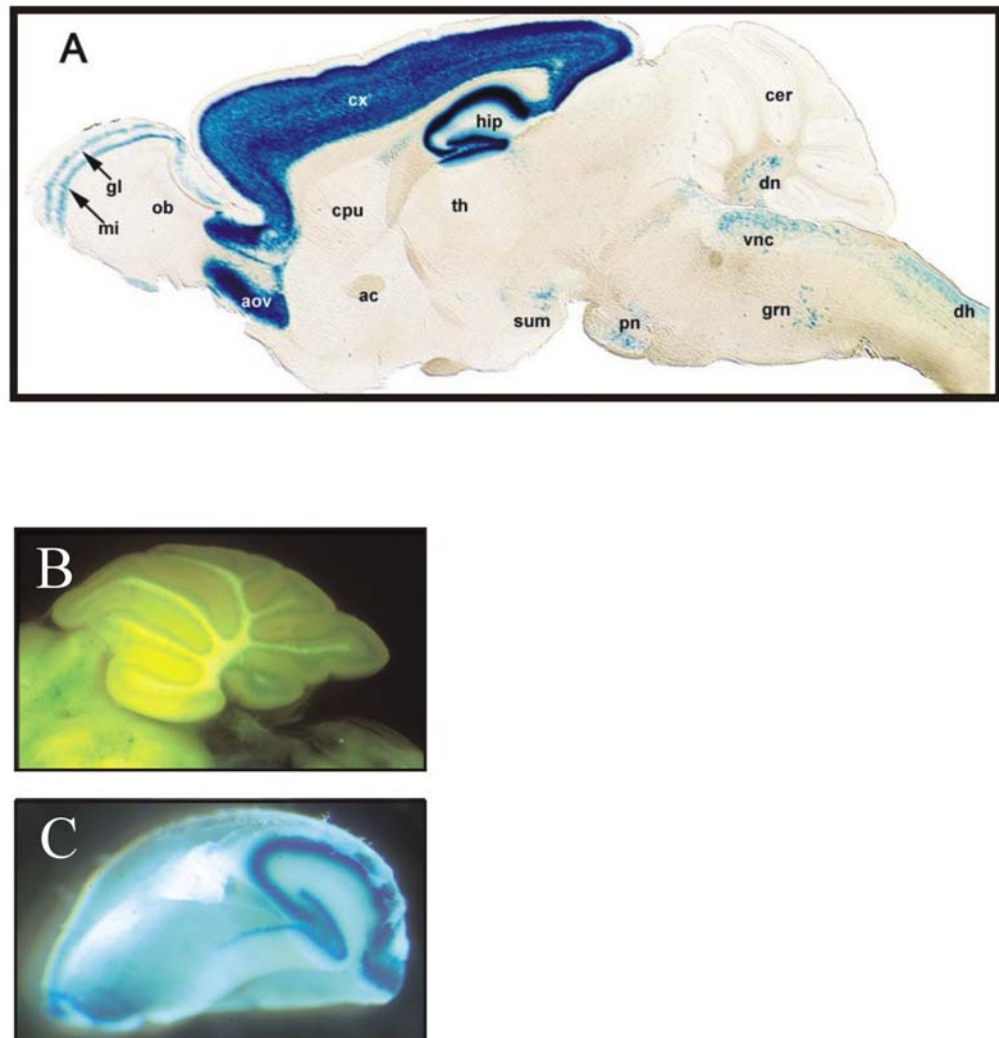


Abbildung 3.3 Überprüfung der Cre-Rekombinase-Aktivität im Hippocampus von Nex-Cre-Mäusen mittels X-Gal-Färbung

In blau gefärbten Zellen war die Cre-Rekombinase aktiv. Hippocampus und Cortex besitzen hohe Cre-Rekombinase-Aktivitäten, im Cerebellum ist kaum Aktivität zu detektieren.

A: Gesamtquerschnitt eines murinen Gehirns; cx: Cortex; hip: Hippocampus; ob: Bulbus olfactorius; gl: Glomerularschicht; mi: Mitralzellschicht; aov: Ventraler Nucleus olfactorius anterior; dn: Nucleus dentatus; cer: Cerebellum; th: Thalamus; cpu: Striatum (N. caudatus und Putamen); ac: Commissura anterior; sum: Nucleus supramammillarius; pn: Nuclei pontini; vnc: Vestibulärer nukleärer Komplex; grn: Nucleus reticularis gigantocellularis; dh: Dorsales Horn B: Querschnitt des Cerebellums; C: Whole-Mount-Präparat des murinen Hippocampus

3.3 Untersuchung des Ca_v1.2-Kanals im Hippocampus auf Proteinebene

3.3.1 Überprüfung der Spezifität des Ca_v1.2-Antikörpers an Membranproteinen aus HEK_{α1β2a}-Zellen (Seisenberger C. *et al.*, 1995)

Die Spezifität des Ca_v1.2-Antikörpers wurde mittels Western-Blot an HEK_{α1β2a}-Zellen und untransfizierten HEK-Zellen als Kontrolle untersucht. Proteinextrakt von diesen Zellen wurde freundlicherweise von Frau S. Paparisto zur Verfügung gestellt.

Um in der SDS-PAGE gleiche Proteinmengen einsetzen zu können, wurden zunächst mittels BCA-Methode (s. 2.4.1) die Proteinkonzentrationen bestimmt. Der darauffolgende Blot wurde auf einer Höhe von ca. 100 kD durchtrennt, um die obere Hälfte (Ca_v1.2 mit einer Größe von ca. 260-270 kD) mit dem Antikörper gegen Ca_v1.2 und die untere Hälfte (Proteine mit einer Größe von 20 bis 90 kD) mit einem Antikörper gegen das „housekeeping“-Protein cGKI detektieren zu können. Die Immundetektion der cGKI erfolgte als zusätzliche Beladungskontrolle des Gels.

Der Western Blot in Abbildung 3.4 zeigt, dass in HEK_{α1β2a}-Zellen eine sehr spezifische Bande für das Ca_v1.2-Protein auftrat, während es bei untransfizierten HEK-Zellen fehlte. Die Größe des murinen Ca_v1.2-Proteins lag bei ca. 260-270 kD.

Die gleichmäßige Beladung des Gels konnte in allen Ansätzen durch die cGKI-Ladekontrolle verifiziert werden. So konnten die für das murine Ca_v1.2-Protein erhaltenen Banden miteinander verglichen werden.

Ergebnisse

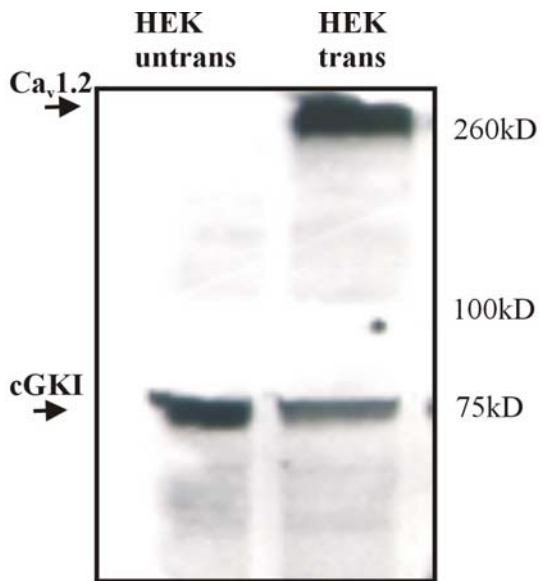


Abbildung 3.4 Expression des Ca_v1.2 L-Typ Ca²⁺-Kanals in Ca_v1.2 L-Typ Ca²⁺-Kanal-transfizierten und untransfizierten HEK-Zellen. Im Gegensatz zu untransfizierten HEK-Zellen zeigt sich bei transfizierten HEK-Zellen ein deutliches Signal für Ca_v1.2. Gleiche Beladung der Spuren (150 µg) wurde mit cGKI als Ladekontrolle bestätigt. HEK trans: Ca_v1.2 L-Typ Ca²⁺-Kanal-transfizierte human embryonic kidney cells; HEK untrans: untransfizierte human embryonic kidney cells; Ca_v1.2: Ca_v1.2 L-Typ Ca²⁺-Kanal; cGKI: cGMP-regulierte Proteinkinase

3.3.2 Nachweis der Deletion des Ca_v1.2 Kanals im Hippocampus bei Ca_v1.2^{HCKO}-Mäusen

Als weitere Voraussetzung galt es, die Expression des Ca_v1.2 Kanals im Hippocampus, im Neocortex und im Kleinhirn bei Ca_v1.2^{HCKO}-Mäusen und CTR-Mäusen sowie im Hippocampus von 14 Tage alten Ca_v1.2^{HCKO}-Jungtieren zu vergleichen.

Zunächst wurden die Tiere der jeweiligen Versuchsgruppen getötet, die Hippocampi, die Groß- und die Kleinhirne isoliert (s. 2.3) und schockgefroren.

Im Anschluss an den Aufschluss wurde nach dem gleichen Schema vorgegangen wie bei der Prüfung des Ca_v1.2-Antikörpers (s. 3.3.1).

Die Western Blots in Abbildung 3.5 und 3.6 zeigen, dass in der CTR-Fraktion, in der Ca_v1.2^{HCKO}-Fraktion und bei den Ca_v1.2^{HCKO}-Jungtieren eine sehr spezifische Bande für das Ca_v1.2-Protein in einer Größenordnung von ca. 260-270 kD auftrat. Der Western Blot in Abbildung 3.5 zeigt, dass das Signal entsprechend zu den Ergebnissen der X-GAL-Färbung (s. 3.2) bei der Ca_v1.2^{HCKO}-Gruppe im Hippocampus und im Neocortex um bis zu 90% schwächer war, während es im Kleinhirn hingegen bei beiden Genotypen gleich war.

Ergebnisse

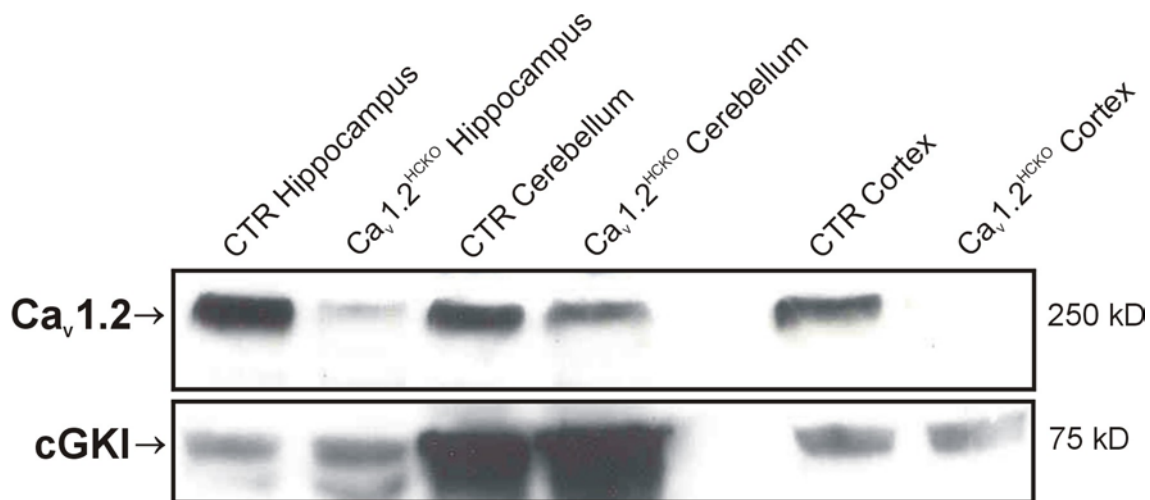


Abbildung 3.5 Expression des Ca_v1.2 L-Typ Ca²⁺-Kanals in Hippocampus, Cerebellum und Cortex von Ca_v1.2^{HCKO}- und CTR-Mäusen.

Im Hippocampus und im Cortex ist das Signal für Ca_v1.2 in CTR-Mäusen gegenüber Ca_v1.2^{HCKO}-Mäusen deutlich erhöht, während sich im Cerebellum für beide Genotypen eine annähernd gleiche Expression zeigt. Die gleichmäßige Beladung aller Spuren (150µg) wurde mit cGKI als Ladekontrolle bestätigt.

Ca_v1.2^{HCKO}: Ca_v1.2^{HCKO}-Mäuse; CTR: CTR-Mäuse; Hippo: Hippocampus; Cereb: Cerebellum;

Ca_v1.2:Ca_v1.2 L-Typ Ca²⁺-Kanal; cGKI:cGMP-regulierte Proteinkinase

Beim Western Blot in Abbildung 3.6 ergab sich für das Signal des Ca_v1.2-Protein bei 14 Tage alten Ca_v1.2^{HCKO}-Jungtieren lediglich eine Reduktion auf ca. 30% im Vergleich zur CTR-Gruppe. Der Nex-Cre-Promoter wird erst zwischen dem 12. und 16. Tag p.c. aktiviert (Schwab et al., 2000). Wie für glattmuskuläre Organe beschrieben (Moosmang et al., 2003), beträgt die Zeitspanne zwischen Aktivierung der Cre-Rekombinase und dem Verschwinden des Ca_v1.2-Proteins mehrere Wochen. Es war also wahrscheinlich, dass die Differenz der vorhandenen Ca_v1.2-Proteinmengen dieses Turnoverphänomen widerspiegelte.

Ergebnisse

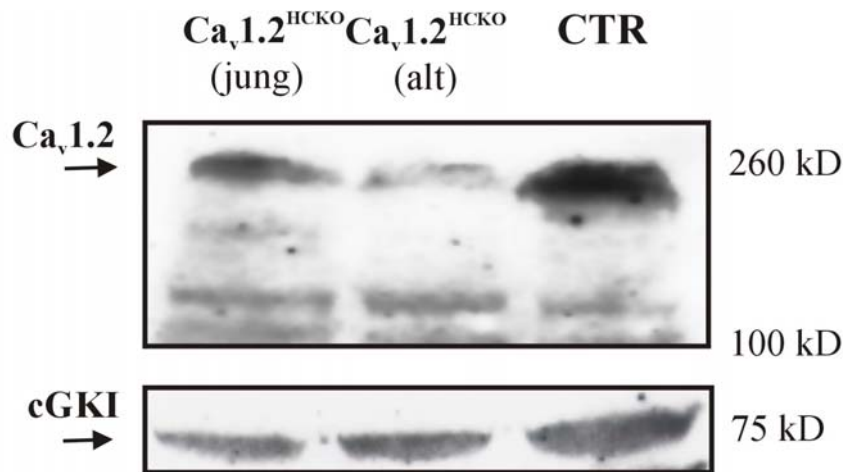


Abbildung 3.6: Altersabhängige Expression des Ca_v1.2 L-Typ Ca²⁺ Kanals im Hippocampus.

Das Signal für Ca_v1.2 im Hippocampusareal junger Ca_v1.2^{HCKO}-Mäuse ist noch deutlich stärker als das Signal bei alten Ca_v1.2^{HCKO}-Mäusen. Gleichmäßige Beladung aller Spuren (150 µg) wurde mit cGKI als Ladekontrolle bestätigt.

Ca_v1.2^{HCKO} (jung): 14 Tage alte Ca_v1.2^{HCKO}-Mäuse; Ca_v1.2^{HCKO} (alt): mind. 3 Mon. alte Ca_v1.2^{HCKO}-Mäuse; CTR: mind. 3 Monate alte CTR-Mäuse; Ca_v1.2: Ca_v1.2 L-Typ Ca²⁺ Kanal; cGKI: cGMP-regulierte Proteinkinase

Die gleichmäßige Beladung des Gels konnte wiederum in allen Ansätzen durch die cGKI-Ladekontrolle verifiziert werden. So konnten die für das murine Ca_v1.2-Protein erhaltenen Banden miteinander verglichen werden.

3.3.3 Keine kompensatorische Hochregulation von NMDAR und Ca_v1.3-Kanälen in Ca_v1.2^{HCKO}-Mäusen im Vergleich zur CTR-Gruppe

Bei den Ca_v1.2^{HCKO}-Mäusen ist durch die Deletion des Ca_v1.2-Kanals ein wichtiger Weg des durch Membrandepolarisation ausgelösten Ca²⁺-Influges im Hippocampus beseitigt worden. Es wäre daher denkbar gewesen, dass kompensatorisch andere Ionenkanäle, wie z. B. die Ca_v1.3-Kanäle oder der NMDAR hochreguliert würden. Deshalb wurde die Expression des Ca_v1.3-Kanals in Hippocampus, Kleinhirn und Neocortex, sowie der NMDAR im Hippocampus in Ca_v1.2^{HCKO}-Mäusen im Vergleich zur CTR-Gruppe mittels Western Blot kontrolliert. Dazu wurde bis zur Immundetektion genauso vorgegangen wie bei der Untersuchung des Ca_v1.2-Kanals (s. 3.3.2).

Der Western Blot in Abbildung 3.7 zeigte, dass nach Inkubation mit dem Ca_v1.3-Antikörper sowohl in der CTR- als auch in der Ca_v1.2^{HCKO}-Gruppe bei einer Größe von ca. 260 kD eine spezifische Bande für das Ca_v1.3-Protein auftrat.

Ergebnisse

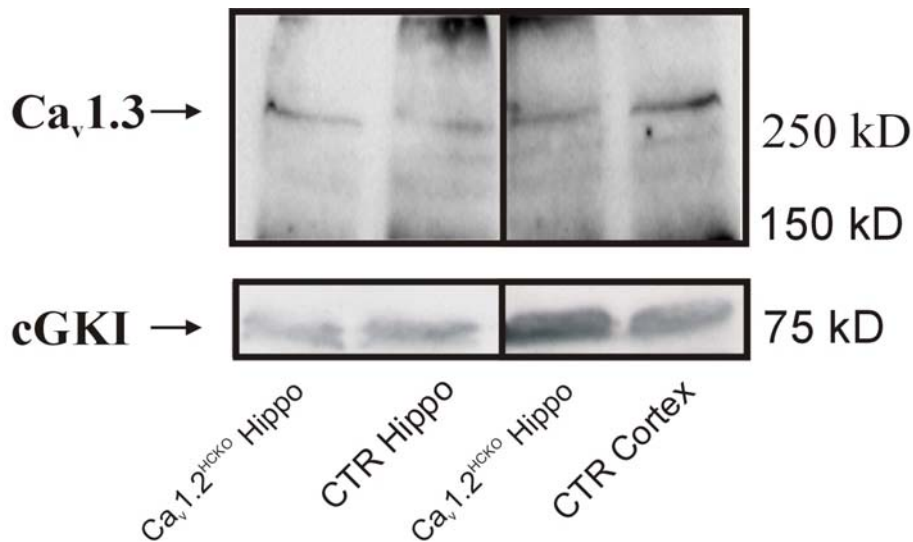


Abbildung 3.7 Expression des Ca_v1.3 L-Typ Ca²⁺-Kanals in Hippocampus und Cortex von Ca_v1.2^{HCKO}- und CTR-Mäusen.

Sowohl im Hippocampus als auch im Cortex zeigt sich für Ca_v1.3 ein annähernd gleiches Signal bei Ca_v1.2^{HCKO}- und CTR-Mäusen. Die gleichmäßige Beladung aller Spuren (150µg) wurde mit cGKI als Ladekontrolle bestätigt.

Hippo: Hippocampus; Ca_v1.3: Ca_v1.3 L-Typ Ca²⁺-Kanal; cGKI: cGMP-regulierte Proteinkinase

Beim Western Blot in Abbildung 3.8 zeigt sich nach Inkubation mit dem NR1-Antikörper bei der CTR- und bei der Ca_v1.2^{HCKO}-Gruppe bei einer Größe von 120 kD eine spezifische Bande für das NR1-Protein, einem obligatorischen Bestandteil der NMDAR.

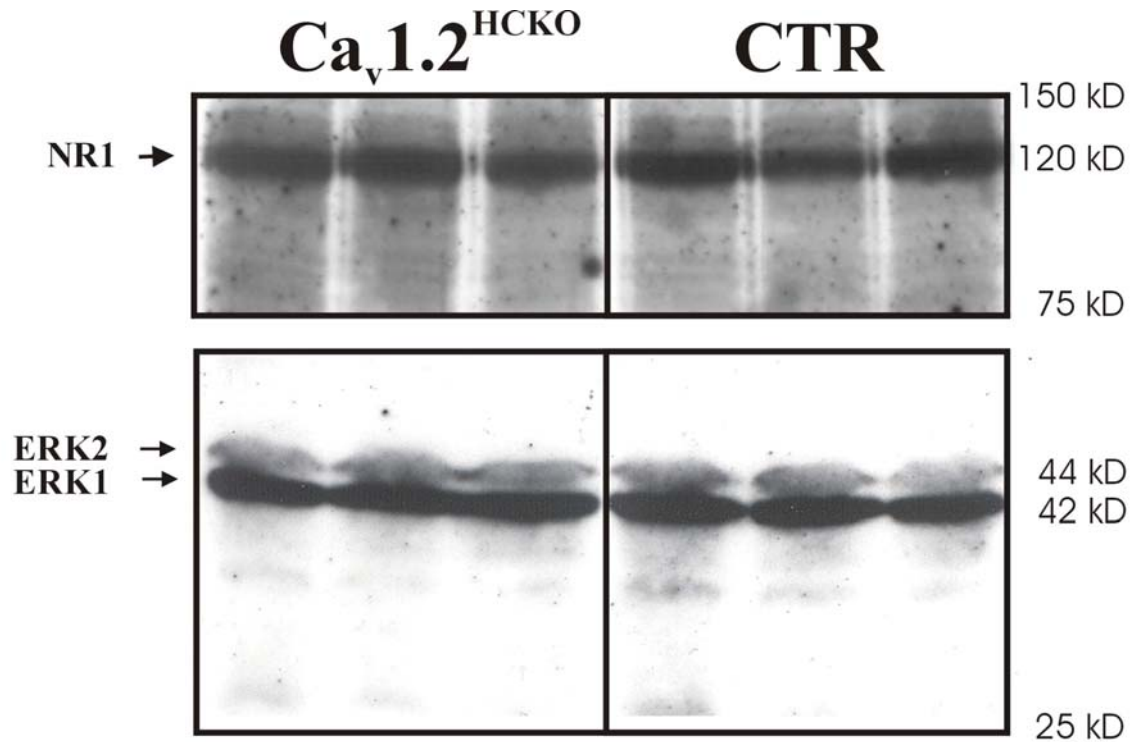


Abbildung 3.8 Expression der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors im Hippocampus von jeweils 3 unabhängigen $Ca_v1.2^{HCKO}$ - bzw. CTR-Mäusen. Gleichmäßige Beladung aller Spuren (150 μ g) wurde mit ERK 1/2 als Ladekontrolle bestätigt. Es zeigte sich bei allen Proben ein annähernd gleiches Signal für die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors.
 ERK2: Extracellular signal-regulated kinase 2; ERK1: Extracellular signal-regulated kinase 1; Nr1: NMDA-Rezeptor 1

Beim anschließenden Vergleich des $Ca_v1.3$ -Proteins aus Hippocampus, Kleinhirn und Neocortex von CTR- und $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäusen ergab sich kein Unterschied in der Intensität der Bande. Auch beim Vergleich des NR1-Proteins aus dem Hippocampus von CTR- und $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäusen konnte kein Unterschied in der Intensität der Bande im SDS-PAGE festgestellt werden. Daraus wurde geschlossen, dass weder die $Ca_v1.3$ -Kanäle noch die NMDAR bei der $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Gruppe kompensatorisch hochreguliert wurden.

Die gleichmäßige Beladung des Gels konnte einerseits durch ERK1/2, andererseits durch cGKI als Ladekontrolle verifiziert werden. Dazu wurden die Blots durchtrennt (auf einer Höhe von 100 kD für $Ca_v1.3$ und auf einer Höhe von 95 kD für NR1) und die unteren Hälften mit dem ERK1/2-, bzw. dem cGKI-Antikörper inkubiert.

3.4 Histomorphologische Untersuchung an Gehirnschnitten von $Ca_v1.2^{HCKO}$ - und CTR-Mäusen

Es wäre denkbar gewesen, dass bei der $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Gruppe durch die gewebsspezifische Deletion des $Ca_v1.2$ -Kanals schon auf lichtmikroskopischer Ebene Veränderungen bzw. Defekte gegenüber der CTR-Gruppe entstehen. Deshalb wurden beide Gruppen histomorphologisch untersucht und miteinander verglichen.

Dazu wurden bei Mäusen beider Gruppen Gehirnschnitte angefertigt (s. 2.9.3), und nach Nissl gefärbt (s. 2.9.5).

Wie aus Abbildung 3.9 hervorgeht, ergaben sich histologisch zwischen CTR- und $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Gruppe keine Unterschiede. Sowohl Aufbau der Hirnstrukturen als auch Anordnung und Form der einzelnen Neurone entsprachen bei beiden Gruppen der Norm.

CTR

Ca_v1.2^{HCKO}

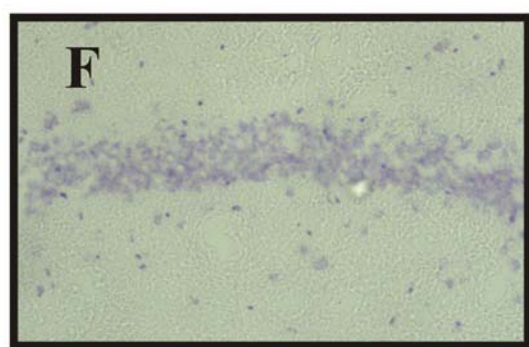
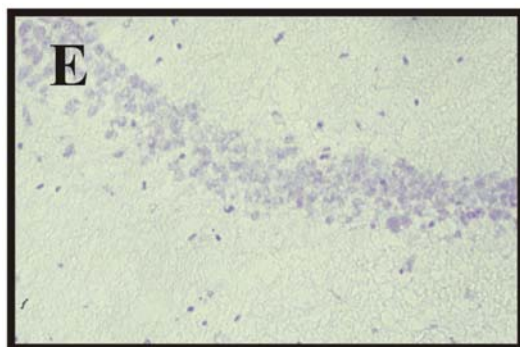
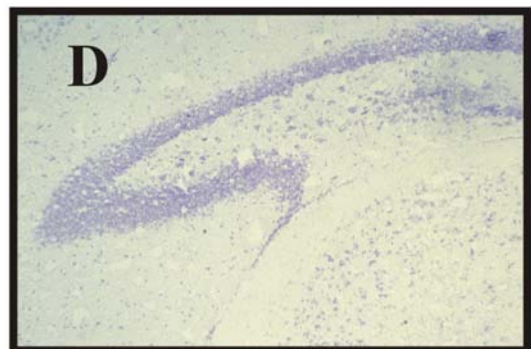


Abbildung 3.9 Nissl-Färbung an Hippocampusschnitten

A,C,E: Querschnitte durch die Hippocampusformation einer CTR-Maus

B,D,E: Querschnitte durch die Hippocampusformation einer Ca_v1.2^{HCKO}-Maus

Vergrößerungen: A, B: 50x; C, D: 200x; E, F: 400x

3.5 Langzeitpotenzierung

Die folgenden Ergebnisse wurden mir freundlicherweise von Herrn PD Thomas Kleppisch zur Verfügung gestellt:

Um mögliche generelle Defekte der synaptischen Transmission durch die Deletion des $Ca_v1.2$ -Kanäle auszuschließen, wurde die Abhängigkeit der Steigung des „field excitatory postsynaptic potential“ (fEPSP) von der sog. „stimulus intensity“ (IOR; Abbildung 3.10-A) und der sog. „paired-pulse facilitation“ (PPF; Abbildung 3.10-B) in Hippocampusschnitten untersucht. Weder IOR noch PPF zeigten einen Unterschied zwischen CTR- und $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäusen. Desweiteren zeigten $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse normale NMDAR-abhängige LTP, die durch eine „theta-burst stimulation“ induziert wurde (Abbildung 3.10-C). Darüberhinaus verursachte eine 1 Hz „stimulation protocol“, das bekanntermaßen NMDAR-abhängige LTD induziert (Nicoll et al., 1998), dasselbe Ausmaß an LTD bei beiden Genotypen (Abbildung 3.10-D). Das spricht dafür, dass die basale synaptische Transmission und die NMDAR-abhängige synaptische Plastizität durch die Deletion des $Ca_v1.2$ -Gens nicht beeinflusst wurde.

Ergebnisse

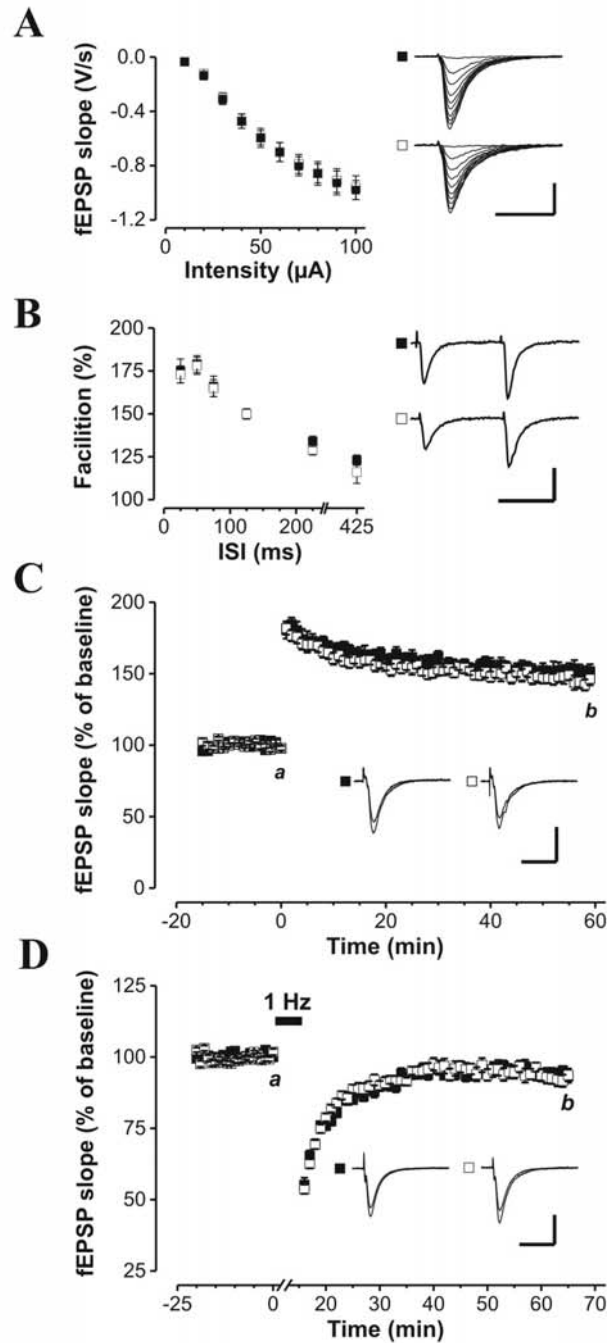


Abbildung 3.10 Normale basale synaptische Transmission und NMDAR-abhängige synaptische Plastizität in der CA1-Region des Hippocampus der $Ca_1.2^{HCKO}$ -Mäuse. fEPSPs in Antwort auf Stimulation der Schaffer-Kollateralen wurden in Schnitten von CTR- (schwarzes Kästchen) und $Ca_1.2^{HCKO}$ -Mäusen (weißes Kästchen) aufgezeichnet.

(A) "Input-output relation curves" von 37 CTR- und 41 $Ca_1.2^{HCKO}$ -Mäusen zeigten keinen Unterschied. Repräsentative Aufzeichnungen sind rechts in den Einheiten 20 ms und 1 mV gezeigt.

(B) "Short-term" Plastizität wurde durch Messen der "paired-pulse facilitation" (PPF) an den "interstimulus intervals" (ISI) von 25, 20, 75, 125, 225 und 425 ms evaluiert. Es zeigte sich kein Unterschied der PPF bei CTR- (n=27 Schnitte) und $Ca_1.2^{HCKO}$ -Mäusen (N=25 Schnitte). Repräsentative PPF-Aufzeichnungen sind rechts in den Einheiten 50 ms und 1mV gezeigt.

(C) NMDAR-abhängige LTP in der CA1-Region der Schaffer-Kollateralen wurde durch eine "theta burst stimulation" (12 x 4 Stromstöße a 400 Hz, 200 ms Pause) zum Zeitpunkt 0 induziert. Der Zeitverlauf der fEPSP-Schleife (Mittelwert \pm SEM) erhielt man von Schnitten von 8 CTR- und 9 $Ca_1.2^{HCKO}$ -Mäusen. Repräsentative fEPSPs in den Einheiten 20 ms und 1 mV zu den Zeitpunkten a und b sind in der entsprechenden Einfügung gezeigt.

(D) Homosynaptische NMDAR-abhängige LTD wurde durch eine "low frequency stimulation" (900 Stromstöße von 1Hz) zum Zeitpunkt 0 induziert. Der Zeitverlauf der fEPSP-Schleife (Mittelwert \pm SEM) erhielt man von Schnitten von 12 Mäusen jedes Genotyps. Repräsentative fEPSPs in den Einheiten 20 ms und 1 mV zu den Zeitpunkten a und b sind in der entsprechenden Einfügung gezeigt.

Ergebnisse

Im Gegensatz zur Situation bei der NMDAR-abhängigen synaptischen Plastizität, könnte der $Ca_v1.2$ -Kanal essentiell für die NMDAR-abhängige synaptische Plastizität sein. Robuste NMDAR-unabhängige LTP kann durch einen 200 Hz „tetanus“ hervorgerufen werden (Grover & Teyler, 1990). Indem man ihre postsynaptische Lokalisation berücksichtigt, soll nach neuen Studien die Aktivierung des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals durch eine 200 Hz „tetanic stimulation“ ein retrogrades Signal erzeugen, das zur präsynaptischen BDNF-Freisetzung und letztendlich zur Induzierung der präsynaptischen Komponente der LTP führen (Zakharenko, 2003). In der Tat zeigten $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse verglichen mit CTR-Mäusen eine deutlich reduzierte LTP. Der Unterschied der LTP nahm Schritt für Schritt mit der Zeit zu, bis er ca. 2 Stunden nach dem Tetanus Signifikanz ($p < 0,05$) mit „fEPSP slopes“ von $136,5 \pm 6,5$ ($n=7$) und $167,6 \pm 10,5$ ($n=10$) erreichte. Um herauszufinden, ob diese Abnahme von LTP auf einer Reduktion der NMDAR-unabhängigen Komponente beruhte, wurde weiterhin eine 200 Hz LTP in Anwesenheit des NMDAR-Antagonisten APV ($50 \mu M$) untersucht. Auch unter diesen Bedingungen zeigten die $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse signifikant reduzierte LTP ($p < 0,05$; Abbildung 3.11-A). Das Ausmaß der Abnahme der LTP in Gegenwart von APV war beinahe gleich wie ohne APV, was für einen selektiven Defekt bei der NMDAR-unabhängigen LTP bei den $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäusen spricht. Um die Hinweise auf eine spezifische Rolle des $Ca_v1.2$ -Kanals für die NMDAR-unabhängige synaptische Plastizität weiter zu evaluieren, wurde eine multiple starke 100 Hz „tetanic stimulation“ benutzt und die L-LTP in Anwesenheit von APV bis zu 4 Stunden nach dem Tetanus untersucht. Allein bei den CTR-Mäusen wurde eine signifikante L-LTP beobachtet (Abbildung 3.11-B), wobei einmal mehr der Unterschied zwischen den Genotypen schrittweise zunahm und ca. 2 Stunden nach dem Tetanus ersichtlich wurde.

Ergebnisse

Ein anderer Test für NMDAR-unabhängige synaptische Plastizität ist die Untersuchung von LTP_K , das heißt LTP, die durch ein kurzes Einwaschen des Kaliumkanalblockers TEA-Cl (25mM) in Hippocampus-Schnitte induziert wird. Die LTP_K soll nach gängiger Meinung hauptsächlich über Ca^{2+} -Influx über L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle vonstatten gehen (Aniksztejn & Ben-Ari, 1991; Zaharenko et al., 2001). Nach fünfzehnminütigem Einwaschen einer modifizierten, TEA-enthaltenden ACSF wurde die LTP in $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäusen und in CTR-Mäusen verglichen, wobei während dem gesamten Experiment APV anwesend war. Unter diesen Bedingungen zeigten CTR-Mäuse eine robuste LTP sogar 2 Stunden nach dem Auswaschen von TEA ($147,4 \pm 11,3$, $n=15$; Abbildung 3.12). Im scharfen Kontrast dazu zeigten $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse lediglich marginale LTP 2 Stunden nach der Behandlung mit TEA ($113,1 \pm 4,47$, $n=11$) ($p < 0,05$; Abbildung 3.11-C). Die LTP bei den CTR-Mäusen 2 Stunden nach dem Einwaschen von TEA könnte die sogenannte „late phase LTP (L-LTP) darstellen, ein Kennzeichen derer in der Abhängigkeit von der *de novo*-Proteinsynthese besteht (1,3). Um diese obligatorische Eigenschaft zu testen, wurden zusätzliche Versuche mit Hippocampuschnitten von CTR-Mäusen unternommen, in denen der Proteinsynthesehemmer Anisomycin ($20 \mu M$) während des gesamten Experiments anwesend war. Anisomycin reduzierte die TEA-induzierte L-LTP in der CA1-Region dieser Schnitte signifikant auf $121,8 \pm 8,3$ ($n=8$) ($p < 0,05$; Abbildung 3.11-D).

Ergebnisse

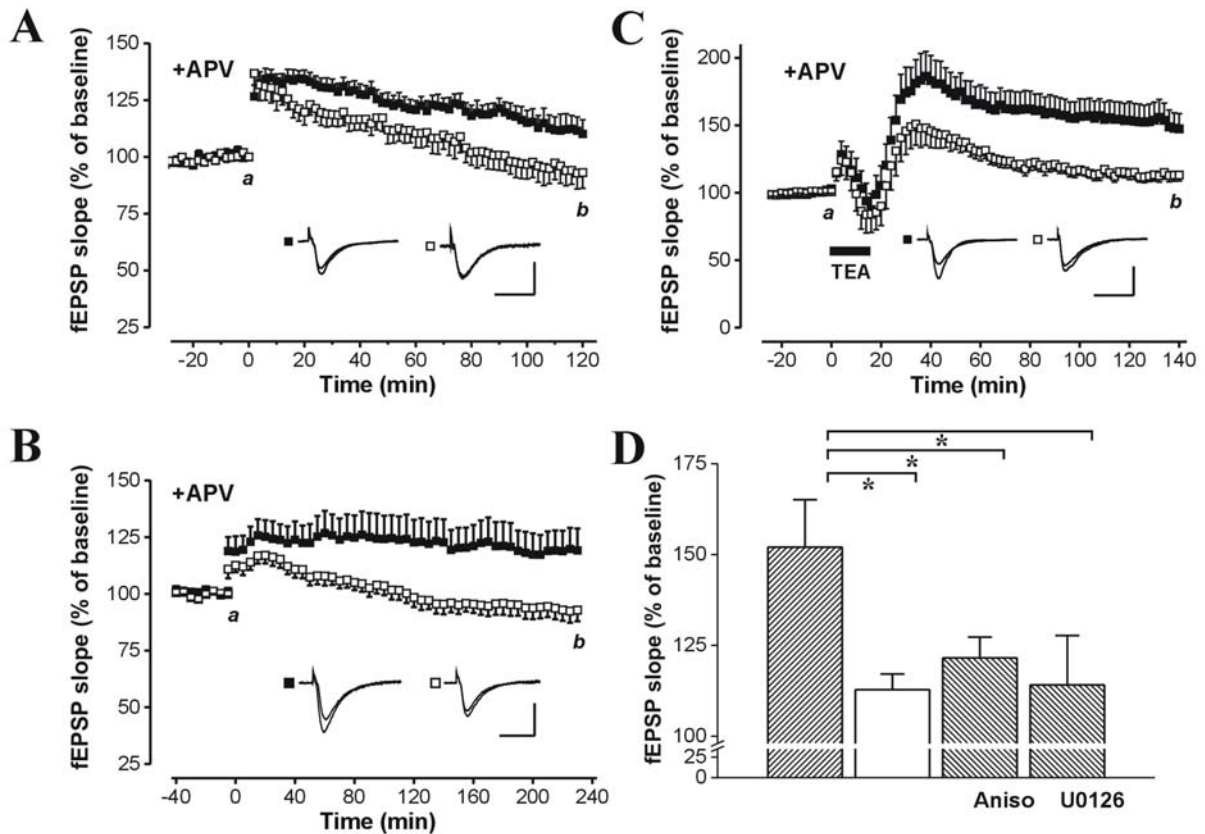


Abb. 3.11 Verringerung der NMDAR-unabhängigen LTP in der CA1-Region des Hippocampus der $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse. fEPSPs in Antwort auf Stimulation der Schaffer-Kollateralen wurden in Schnitten von CTR- (schwarzes Kästchen) und $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäusen (weißes Kästchen) aufgezeichnet.

(A) LTP wurde zum Zeitpunkt 0 durch eine tetanische 200 Hz-Stimulation induziert, wobei der NMDAR-Antagonist APV während des ganzen Versuchs vorhanden war. Der Zeitverlauf der fEPSP-Schleife (Mittelwert+SEM) erhielt man von Schnitten von 8 Mäusen jedes Genotyps. Repräsentative fEPSPs in den Einheiten 20 ms und 1 mV zu den Zeitpunkten a und b sind in der entsprechenden Einfügung gezeigt.

(B) LTP wurde zum Zeitpunkt 0 durch multiple starke 100 Hz-Tetani induziert, wobei APV während des gesamten Versuchs vorhanden war. Der Zeitverlauf der fEPSP-Schleife (Mittelwert+SEM) erhielt man von Schnitten von 10 CTR- und 14 $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäusen. Repräsentative fEPSPs in den Einheiten 20 ms und 1 mV zu den Zeitpunkten a und b sind in der entsprechenden Einfügung gezeigt.

(C) LTP_K wurde durch fünfzehnminütiges Umspülen des Hippocampuschnittes mit ACSF, die 25 mM des Kaliumkanalblockers TEA enthielt, induziert. APV war während des gesamten Versuchs vorhanden. Der Zeitverlauf der fEPSP-Schleife (Mittelwert+SEM) erhielt man von Schnitten von 15 CTR- und 11 $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäusen. Repräsentative fEPSPs in den Einheiten 20 ms und 1 mV zu den Zeitpunkten a und b sind in der entsprechenden Einfügung gezeigt.

(D) Höhe der LTP_K 2 h nach Behandlung mit TEA (L- LTP_K). Der Proteinsyntheseinhibitor Anisomycin (n=8) und der MEK 1/2-Inhibitor U0126 (n=7) reduzierten L- LTP_K in CTR-Mäusen signifikant ($p < 0,05$) auf ein mit den $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäusen vergleichbares Level (n=11).

Alles in allem demonstrieren diese Ergebnisse, dass die NMDAR-unabhängige, proteinsyntheseabhängige L-LTP in der CA1-Region des Hippocampus von den $Ca_v1.2$ -Kanälen abhängig ist.

3.6 Untersuchung der zeitabhängigen CREB-Phosphorylierung bei $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäusen im Vergleich zur CTR-Gruppe

Es existiert eine große Anzahl an Arbeiten, nach denen das „cAMP responsive binding protein“ (CREB) eine Schlüsselkomponente des molekularen Netzwerks ist, um das Kurzzeit- in Langzeitgedächtnis umzusetzen (Kandel, 2001; English & Sweatt, 1997; Atkins et al., 1998; Hardingham et al., 2001; Wu et al., 2001; Pittenger et al., 2002; Thomas & Huganir, 2004). Speziell wurde gezeigt, dass der Ca^{2+} -Einstrom durch L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle eng mit der Aktivierung von CREB gekoppelt ist (Deisseroth et al., 1998). Im folgenden sollte daher untersucht werden, ob mit der gestörten L-LTP und dem gestörten Lernverhalten auch bei den $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäusen im Vergleich zur CTR-Gruppe auch eine Veränderung in der CREB-Signaltransduktionskaskade assoziiert ist.

Dazu wurden Hippocampi sowohl der CTR- als auch der $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Gruppe präpariert, 2 h in ACSF inkubiert und anschließend in ACSF mit TEA für 0, 5 bzw. 30 min. depolarisiert (s. 2.3), was zu einer Aktivierung der CREB-Signaltransduktionskaskade, im speziellen zur Phosphorylierung der Aminosäure Serin 133 des CREB-Proteins (p-CREB) führen sollte (Brindle & Montminy, 1992). Mit der zweistündigen Vorinkubation in ACSF sollten durch eine Ruhigstellung der neuronalen Aktivität in einer physiologischen Umgebung möglichst niedrige Level an aktiven Bestandteilen der CREB-Signaltransduktionskaskade erreicht werden, um später die Veränderungen durch die Depolarisation besser hervorheben zu können.

Aus der Abbildung 3.12 eines repräsentativen Western Blots und der Statistik (Abbildung 3.13; n=6) geht hervor, dass sich sowohl in der CTR- als auch in der $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Gruppe eine sehr spezifische Bande für p-CREB in einer Größenordnung von ca. 43 kD ergab. Beim 0-min-Wert zeigte sich bei der CTR-Gruppe ($0,45 \pm 0,06$ rdu; $p < 0,05$) ein deutlich höherer Basallevel an p-CREB als bei der $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Gruppe ($0,28 \pm 0,05$ rdu). Nach fünfminütiger Depolarisation durch TEA zeigte sich bei beiden Gruppen ein annähernd gleicher Anstieg des p-CREB-Levels gegenüber der Ausgangssituation. Nach dreißigminütiger Depolarisation fand sich bei der $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Gruppe ein deutlicher Rückgang in Richtung Ausgangsniveau, während bei der CTR-Gruppe das p-CREB-Level nach 30 min Depolarisation immer noch nahezu gleich war wie nach 5 min (CTR: $0,72 \pm 0,03$ rdu; $Ca_v1.2^{HCKO}$: $0,27 \pm 0,02$ rdu; $p < 0,001$).

Ergebnisse

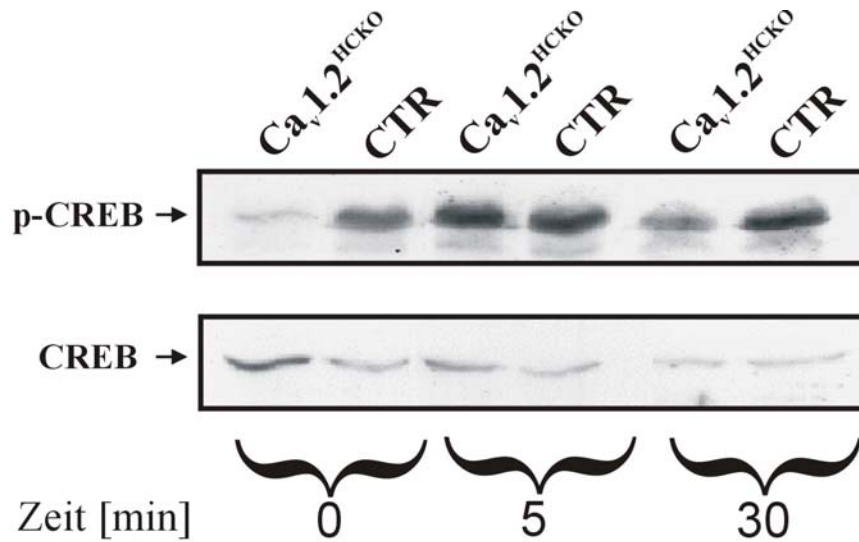


Abbildung 3.12 Expression von phosphorylierten CREB (p-CREB) im Hippocampus von Ca_v1.2^{HCKO}- und CTR-Mäusen. Bei beiden Genotypen führt die fünfminütige Depolarisation durch TEA zu einem deutlichen Anstieg im p-CREB-Level. Nach dreißigminütiger Depolarisation bleibt bei der CTR-Gruppe das erhöhte p-CREB-Level erhalten, während es bei der Ca_v1.2^{HCKO}-Gruppe wieder deutlich in Richtung Ausgangslevel absinkt. p-CREB: phosphoryliertes *cAMP responsive element binding protein*; CREB: *cAMP responsive element binding protein*

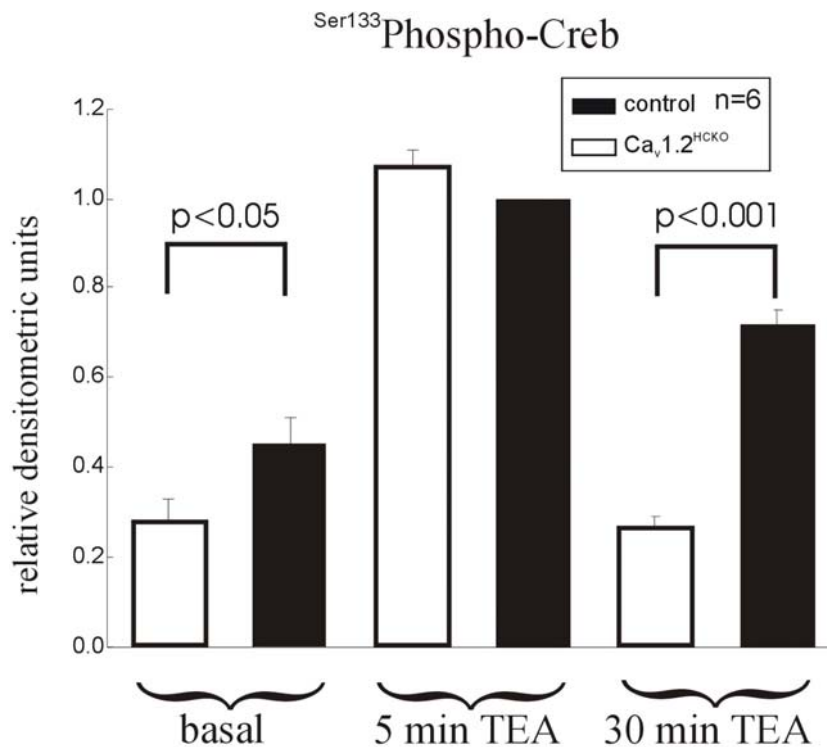


Abbildung 3.13 Densitometrische Analyse der CREB-Phosphorylierung an Ser¹³³ an Western Blots. Die Werte wurden auf den 5-Minuten-Wert von p-CREB Ser¹³³ normalisiert.

Ergebnisse

Diese Ergebnisse sprachen dafür, dass die schnelle CREB-Phosphorylierung in einem Bereich von 5 Minuten nach Depolarisationsbeginn bei beiden Genotypen über einen Mechanismus geschieht, der relativ unabhängig vom $\text{Ca}_v1.2$ -Kanal ist. Die späte CREB-Phosphorylierung scheint, nachdem die Schlüsselrolle der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle bei der CREB-Phosphorylierung nach länger dauernder Depolarisation bei gleichzeitiger Inkubation mit Dihydropyridinen bereits gezeigt wurde (Dolmetsch et al, 2001), in bedeutender Weise vom $\text{Ca}_v1.2$ -Kanal abzuhängen.

Zur quantitativen Kontrolle wurden die Blots gestripped (s. 2.4.6) und anschließend mit dem Antikörper gegen CREB inkubiert. Dabei ergibt sich sowohl bei der $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ - als auch bei CTR-Gruppe eine spezifische Bande in einer Größenordnung von ca. 43kD. Wie aus Abbildung 3.12 hervorgeht, konnte eine Abhängigkeit des p-CREB-Levels der einzelnen Versuchsgruppen vom jeweiligen CREB-Level ausgeschlossen werden. Darüber hinaus kann mit CREB als Ladekontrolle die gleichmäßige Beladung des Gels verifiziert werden.

3.7 Untersuchung der zeitabhängigen CREB-Phosphorylierung unter Zugabe des NMDAR-Blockers APV

Die späte CREB-Phosphorylierung schien also in bedeutender Weise vom $\text{Ca}_v1.2$ -Kanal abzuhängen. Die schnelle CREB-Phosphorylierung in einem Bereich von 5 Minuten nach Depolarisationsbeginn geschah also bei beiden Genotypen über einen in weiten Teilen vom $\text{Ca}_v1.2$ -Kanal unabhängigen Mechanismus (s. 3.6). Da in früheren Studien schon gezeigt wurde, dass CREB auch über Ca^{2+} -Influx durch NMDAR aktiviert werden kann (Deisseroth et al., ?), war es interessant zu beobachten, wie sich die CREB-Phosphorylierung unter einem NMDAR-Blocker verhalten würde. Dazu wurde 2 Hippocampi der CTR-Gruppe nach demselben Versuchsaufbau wie unter 3.6 5 bzw. 30 min behandelt, wobei der ACSF+TEA-Lösung noch 50 μM des NMDAR-Blockers APV waren.

Wie aus Abbildung 3.14 hervorgeht, stieg p-CREB nach fünfminütiger Depolarisation ohne APV erwartungsgemäß an, während es unter APV auf nahezu demselben Level blieb wie der Ausgangswert. Nach dreißigminütiger Depolarisation kam es jedoch auch unter APV zu einem deutlichen Anstieg im p-CREB-Level.

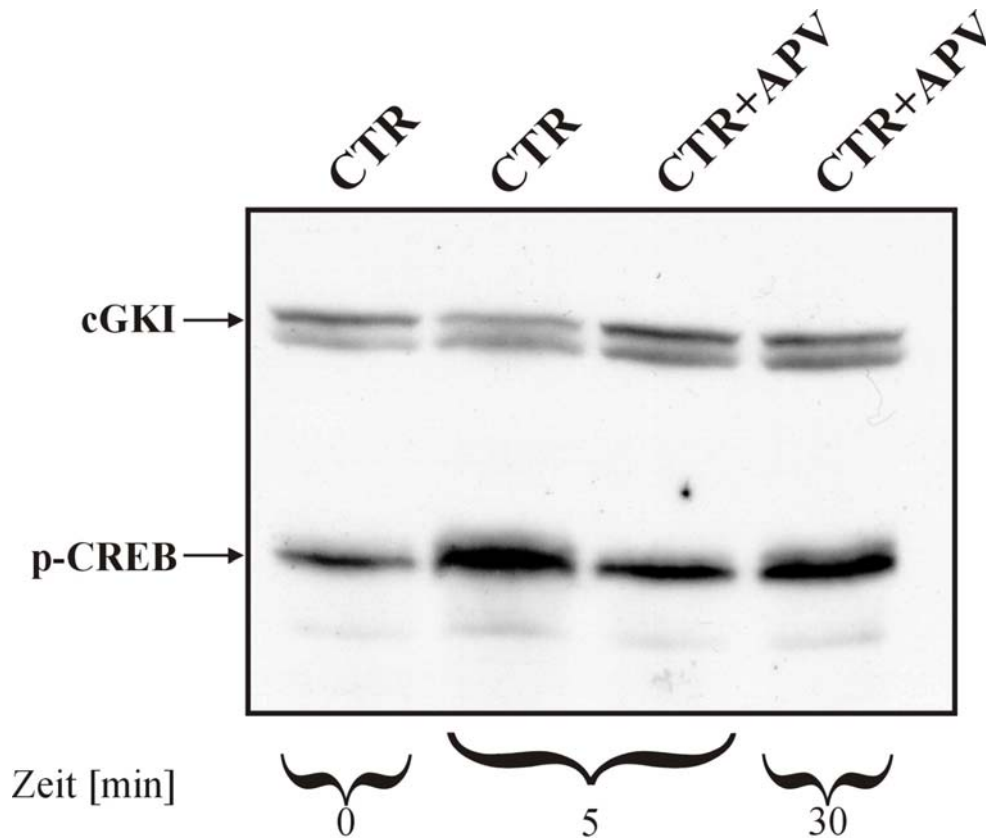


Abbildung 3.14 Expression von phosphorylierten CREB (p-CREB) im Hippocampus von CTR-Mäusen nach Depolarisation in ACSF + TEA mit oder ohne dem NMDAR-Blocker APV
 Fünfminütige Depolarisation ohne APV führt zu einem deutlichen Anstieg im p-CREB-Level, mit APV zu keinem wesentlichen Anstieg. Bei dreißigminütiger Depolarisation kommt es auch mit APV zu einem Anstieg im p-CREB-Level.
 p-CREB: phosphoryliertes *cAMP responsive element binding protein*; cGKI: cGMP-regulierte Proteinkinase

Diese Ergebnisse sprachen dafür, dass im Gegensatz zur Langzeitphosphorylierung die Kurzzeitphosphorylierung stark von den NMDAR abhängen.

Die gleichmäßige Beladung des Gels konnte mit cGKI als Ladekontrolle bestätigt werden.

3.8 Untersuchung der zeitabhängigen ERK1/2-Phosphorylierung bei $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäusen im Vergleich zu CTR-Mäusen

Die Ras-ERK-Signaltransduktionskaskade mit Phosphorylierung von ERK1/2 an Threonin²⁰²/Tyrosin²⁰⁴ gilt als entscheidender und spezifischer Weg für die späte Phase der CREB-Phosphorylierung (Dolmetsch et al., 2001). Darüber hinaus wird der Ras-ERK-Signaltransduktionskaskade auch unabhängig von CREB eine wichtige Rolle bei der Bildung des Langzeitgedächtnisses (Impey et al., 1999) zugeschrieben. Daher war es interessant zu untersuchen, ob die Deletion des $Ca_v1.2$ L-Typ Ca^{2+} -Kanals im Hippocampus zu einer Veränderung innerhalb dieser Signaltransduktionskaskade führen würde.

Ergebnisse

Dazu wurden dieselben Vorversuche unternommen wie bei der Untersuchung der CREB-Phosphorylierung, d.h. die Hippocampi wurden 2 h in ACSF vorbehandelt und dann für 0, 5 und 30 min in ACSF + TEA depolarisiert. Die darauffolgenden Blots wurden mit einem Antikörper gegen Phospho-p44/42 Kinase (p-ERK1/2) inkubiert. Es trat sowohl bei der $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ - als auch bei der CTR-Gruppe eine spezifische Doppelbande in einer Größenordnung von 42 bzw.44 kD auf, wobei die p-p44-ERK1/2 deutlicher schwächer ausgeprägt war.

Wie es aus der Abbildung 3.15 eines repräsentativen Western Blots und der Statistik (Abbildung 3.16; n=6) hervorgeht, ergab sich beim 0-min-Wert bei beiden Genotypen ein annähernd gleicher, relativ niedriger Basallevel für p-ERK1/2. Depolarisation durch TEA führt sowohl in der CTR- als auch in der KO-Gruppe zu einem starken Anstieg von p-ERK1/2 gegenüber dem Ausgangslevel. Nach 30-minütiger Depolarisation allerdings ist bei der $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Gruppe ein Rückgang des p-ERK1/2-Levels bis auf das Ausgangsniveau zu beobachten, während es bei der CTR-Gruppe auf demselben Niveau bleibt wie der 5-min-Wert (CTR: $0,28 \pm 0,02$ rdu; $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$: $1,19 \pm 0,03$ rdu; $p < 0,01$).

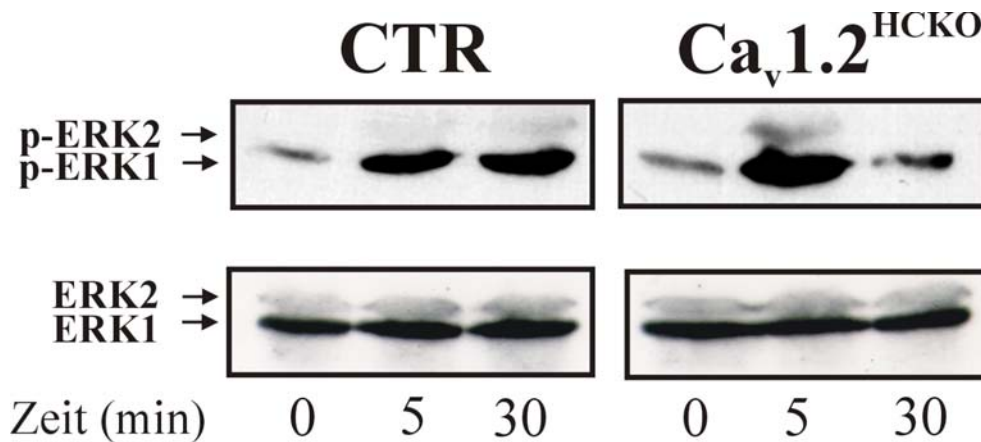


Abbildung 3.15 Expression der phosphorylierten *extracellular regulated kinase* (p-ERK 1/2) im Hippocampus von $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ - sowie CTR-Mäusen nach 0, 5, und 30 min Depolarisation in ACSF + TEA

Bei beiden Genotypen kommt es nach fünfminütiger Depolarisation zu einem deutlichen Anstieg im p-ERK1/2-Level. Dieser bleibt in der CTR-Gruppe auch nach dreißigminütiger Depolarisation erhalten, während er bei der $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Gruppe wieder bis auf das Anfangslevel absinkt. Die gleichmäßige Beladung des Gels (150 μg) wurde mit ERK1/2 als Ladekontrolle, das nach *stripping* der Membran ermittelt wurde, bestätigt.

p-ERK1/2: phosphorylierte *extracellular regulated kinase* (p-ERK1/2); ERK1/2: *extracellular regulated kinase* (ERK1/2)

Ergebnisse

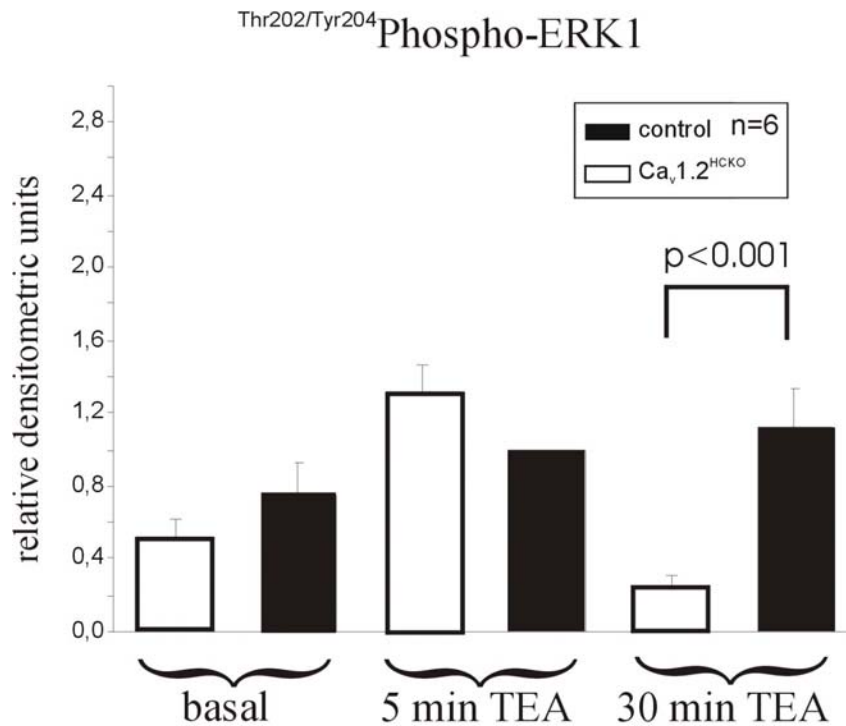


Abbildung 3.16 Densitometrische Analyse der ERK1/2-Phosphorylierung an Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ an Western Blots.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass auch die schnelle ERK1/2-Phosphorylierung in einem Bereich von 5 Minuten nach Depolarisationsbeginn bei beiden Genotypen über einen Mechanismus geschieht, der relativ unabhängig vom Ca_v1.2-Kanal ist. Die späte ERK1/2-Phosphorylierung scheint dagegen wiederum in bedeutender Weise vom Ca_v1.2-Kanal abzuhängen.

Die Blots wurden auch hier gestrippt (s. 2.4.6) und anschließend mit dem Antikörper gegen p44/p42-ERK1/2 inkubiert. Dabei ergab sich sowohl bei der Ca_v1.2^{HCKO}- als auch bei CTR-Gruppe eine spezifische Doppelbande in einer Größenordnung von 42 bzw. 44kD, wobei die p44-Bande wieder ein deutlich schwächeres Signal erzeugte. Wie aus Abbildung 3.15 hervorgeht, war der p-ERK1/2 der einzelnen Versuchsgruppen nicht abhängig vom jeweiligen ERK1/2-Level. Darüber hinaus konnte mit der ERK1/2 als Ladekontrolle die gleichmäßige Beladung des Gels verifiziert werden.

3.9 Auswirkungen der Deletion des $\text{Ca}_v1.2$ -L-Typ- Ca^{2+} -Kanals auf Lernen und Gedächtnis

Hat die in 1.5 beschriebene hippocampuspezifische Deletion des $\text{Ca}_v1.2$ L-Typ Ca^{2+} -Kanals nun Auswirkungen auf das Verhalten und die Lernfähigkeit der $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäuse?

Dazu untersuchte zuerst Frau Dip. Biol. Nicole Haider das hippocampusabhängige räumliche Lernen in einem gut etablierten „discriminatory water maze task“ (Arns et al., 1999; Kleppisch et al., 2003) und stellte mir anschließend freundlicherweise die Ergebnisse zur Verfügung.

Während man ihnen weiter entfernte Landmarken zeigte, wurden $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ - und CTR-Mäuse trainiert, eine fixierte Plattform zu finden, die visuell einer zweiten, sinkbaren Plattform identisch war. Beide Genotypen zeigten dieselbe initiale Rate an korrekten Treffern und einen äquivalenten Anstieg dieses Parameters vom 1. und 2. Tag. Jedoch wurde ein dramatischer Unterschied in der Leistung von CTR- zu $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäusen jenseits des 2. Trainingstages beobachtet (Abbildung 3.17-A). Während $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäuse ihre Quote an korrekten Treffern ausgehend vom Wert am 2. Tag (ca. 65%) nicht mehr weiter verbesserten, erhöhte sich die Leistung der CTR-Mäuse signifikant auf ca. 80 %. Darüberhinaus verlängerte sich die Dauer der Zeit, die gebraucht wurde, zur richtigen Plattform zu steuern, bei den $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäusen signifikant (Abbildung 3.17-B). Diese Ergebnisse lassen auf eine massive Unfähigkeit räumlichen Lernens bei $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäusen vermuten. Um sicherzugehen, dass die Mäuse beider Genotypen die richtige Plattform identifizierten, indem sie räumliche statt anderer Landmarken (z.B. akustische oder olfaktorische) benutzten, wurden die Tiere in einem zusätzlichen Umlauf getestet, nachdem die korrekte Plattform in den gegenüberliegenden Quadranten versetzt worden waren. Während dieses sogenannten „reversal trial“ fiel der Anteil der korrekten Entschlüsse sowohl der $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ - als auch der CTR-Mäuse nahezu auf die Ausgangslage zurück, was dafür spricht, dass die Mäuse beider Genotypen sich in der Tat für ihre Entscheidung räumlich orientierten.

Ergebnisse

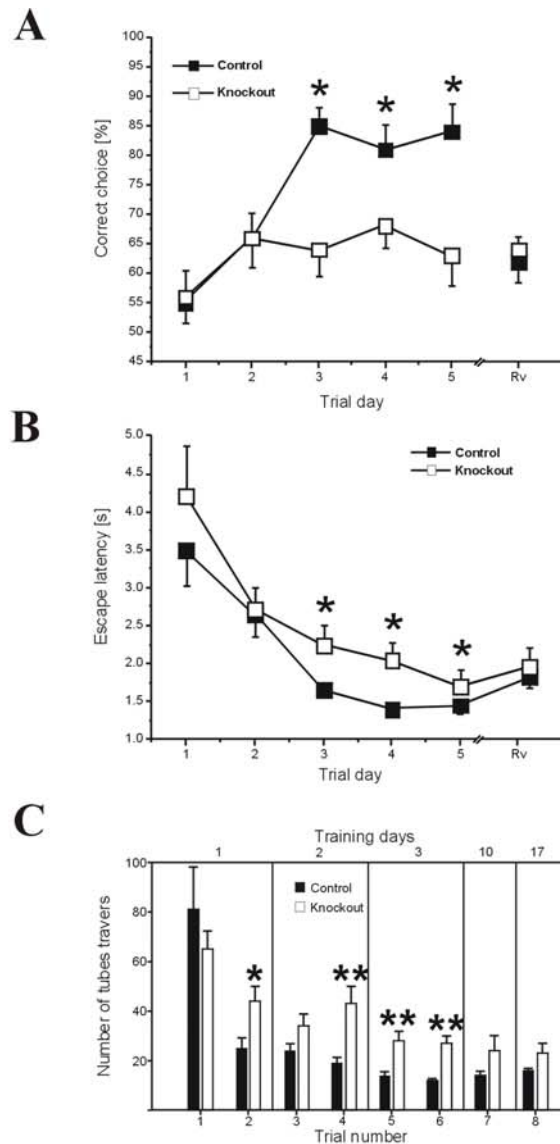


Abbildung 3.17 Defekte in der räumlichen Gedächtnisbildung bei $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäusen

(A,B) Die Leistung der $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse im *water maze*. (A) Bei $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse zeigt sich ein deutlicher Defekt beim Lernen im *discriminatory water maze task*. Der Graph stellt die Rate der *correct choice* der Mäuse dar, die trainiert wurden, mithilfe peripherer Landmarken die korrekte Plattform in einem *discriminatory water maze* zu finden. Die $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse (weiße Kästchen) erbringen ab Tag 3 (10 Durchläufe pro Tag) eine signifikant ($p < 0,05$) kleinere *correct choice*-Rate als die CTR-Mäuse (schwarze Kästchen) ($n=10$). Bei dem zur Kontrolle ausgeführten *reversal trial* (Rv) fiel der Anteil der *correct choices* der CTR- und der $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse auf ein ähnliches Level nahe dem Ausgangslevel, was dafür spricht, dass räumliche Suchstrategien benutzt wurden.

(B) $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse sind im Erlernen des *discriminatory water maze task* langsamer. Der Graph stellt die Fluchtzeiten der Mäuse dar. $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse (weiße Kästchen) ($n=10$) benötigen ab Tag 3 (10 Durchläufe pro Tag) mehr Zeit als CTR-Mäuse (schwarze Kästchen) ($n=10$). Auch wurde die beste Leistung der CTR-Mäuse von den $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäusen nicht erreicht, obwohl sich die $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse etwas verbesserten.

(C) Räumliches Lernen in einem "labyrinth" maze aus transparenten, hell erleuchteten Glassröhren mit einem einzigen richtigen Weg zur *dark box*. Die Leistung wurde anhand der Anzahl der durch CTR- (schwarze Balken) und $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse (weiße Balken) passierten Röhren auf ihrem Weg zur *dark box* evaluiert. An den ersten 3 Tagen wurden 2 Durchläufe durchgeführt ($n=11$ pro Genotyp) und ein Durchlauf an Tag 10 und 17 ($n=5$ pro Genotyp). Die

Um andere Veränderungen (z.B. im motorischen System), die auf der Inaktivierung des $Ca_v1.2$ -Gens beruhen könnten, auszuschließen, wurden eine Reihe von Standardkontrolltests

Ergebnisse

unternommen. CTR- und $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse ($n=10$ für beide Gruppen) zeigten keine signifikanten Unterschiede in der lokomotorischen Aktivität, Erkundungsverhalten und der Angst im „open field test“, was gegen unspezifische Effekte der Inaktivierung des $Ca_v1.2$ -Gens spricht. Die Gesamtzahl der betretenen Felder der CTR-Mäuse (119 ± 20 am 1. Tag und 89 ± 9 am 4. Tag) stimmte mit der der $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse (112 ± 19 am 1. Tag und 70 ± 18 am 4. Tag) nahezu überein. Die große Mehrzahl bestand in Betreten der äußeren Felder sowohl bei den CTR-Mäusen (114 ± 18 am 1. Tag und 85 ± 7 am 4. Tag) als auch bei den $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäusen (105 ± 19 am 1. Tag und 70 ± 15 am 4. Tag). Weiterhin zeigten Mäuse beider Genotypen (jeweils $n=10$) die gleiche Leistung im „rotarod test“ über die gesamten 5 Tage der Untersuchung. Sowohl CTR- als auch $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse verlängerten die mittlere Zeitdauer, während der sie es schafften, auf dem schneller werdenden „rotarod“ zu balancieren, auf ein ähnliches Level, das nach dem 3. Tag konstant blieb.

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass $Ca_v1.2$ -L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-vermittelte, NMDAR-unabhängige synaptische Plastizität essentiell für das Erlangen eines räumlichen Gedächtnisses ist. Um diesen Schluss zu untermauern, wurde von Herrn Prof. Helmut Adelsberger folgende Lernaufgabe für die Mäuse entwickelt, durchgeführt und mir die Ergebnisse anschließend freundlicherweise zur Verfügung gestellt: in einem aus Acrylglasröhren gefertigten Labyrinth mussten die Mäuse den schnellsten Weg in ihren eigenen Käfig finden (s. Abbildung 2.1). Der Test basierte primär auf positiver Motivation der Tiere. Sowohl die Anzahl der getroffenen Entscheidungen als auch der Richtungsänderungen wurden gezählt. Beim ersten Versuch wurden keine Unterschiede zwischen $Ca_v1.2^{HCKO}$ - und CTR-Mäusen gemessen (Abbildung 3.17-C). Dies spricht dafür, dass die Mäuse beider Genotypen dasselbe Suchmuster verwendeten. Erwartungsgemäß nehmen die Anzahl der durchschrittenen Röhren mit der Dauer des Trainings ab. Das Ausmaß dieser Abnahme hängt von der Effektivität der Lernstrategien und der Bildung eines räumlichen Gedächtnisses ab. Beide Genotypen zeigten eine schrittweise Abnahme der durchschrittenen Röhren auf dem Weg zur „dark box“ (Abbildung 3.17-C), aber diese Abnahme war signifikant kleiner bei den $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäusen.

Betrachtet man nun die Koinzidenz im räumlichen Lernen, den Defekten in der NMDAR-unabhängigen proteinsyntheseabhängigen synaptischen Plastizität und in der Verringerung der ERK1/2- sowie der p-CREB-Aktivierung auf biochemischer Ebene bei der $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Maus, legen diese Ergebnisse eine funktionelle Verbindung zwischen diesen Prozessen nahe.

4 Diskussion

Die wichtige Funktion des NMDA-Rezeptors (NMDAR) für die synaptische Plastizität, die Gedächtnisbildung und die Darstellung der sog. *place cells* ist gut belegt. Zahlreiche Studien haben sowohl anhand von *loss of function*- als auch von *gain of function*-Ansätzen den pharmakologischen und genetischen Beweis erbracht, dass NMDAR-abhängige LTP in der CA1-Region des Hippocampus mit bestimmten Arten des Lernens in Verbindung steht (Morris et al., 1986; McHugh et al., 1996; Tang et al., 1999; Tsien et al., 1996). Jedoch lässt sich die synaptische Plastizität und die Gedächtnisbildung im Hippocampus nur mittels NMDAR-vermittelter Prozesse in bestimmten Aspekten nicht ausreichend erklären (Impey et al., 1996; Grover & Teyler, 1990; Aniksztejn & Ben-Ari, 1991; Morgan & Teyler, 1999; Rampon & Tsien, 2000; Woodside et al., 2004; Borroni et al., 2000). Ein Ansatz zur Schaffung eines Gesamtbilds beruht auf der funktionellen Beziehung zwischen NMDAR-unabhängiger synaptischer Plastizität und Hippocampus-abhängigem Lernen. Infolgedessen versuchten wir ein transgenes Mausmodell zu generieren, mit dessen Hilfe eben diese Beziehung untersucht werden konnte.

Es ist möglich, Langzeitpotenzierung auf eine Art, die einerseits vom L-Typ Ca^{2+} -Kanal abhängig, andererseits vom NMDA-Rezeptor unabhängig ist, in der CA1-Region zu induzieren. Beispiele dafür bestehen in der 200 Hz Stimulation oder der TEA-induzierten LTP_K (Impey et al., 1996; Zakharenko et al., 2001; Aniksztejn & Ben-Ari, 1991). Auch biochemische Prozesse, wie die Aktivierung von ERK und seiner vielen Substrate und Zielgene, die wie z.B. CREB in die Gedächtnisbildung miteingebunden sind, stehen mit L-Typ Ca^{2+} -Kanal-Aktivität in verschiedensten neuronalen Zellkultursystemen in Verbindung (Wu et al., 2001; Dolmetsch et al., 2001). Deshalb erstellten wir die Hypothese, dass NMDAR-unabhängige, L-Typ Ca^{2+} -Kanal-abhängige synaptische Plastizität ähnlich den NMDAR-aktivierten Prozessen für räumliches Lernen beim lebenden Tier notwendig sein konnte.

In den Pyramidenzellen des Hippocampus wurden bislang zwei Isoformen von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen, nämlich $\text{Ca}_v1.2$ und $\text{Ca}_v1.3$, identifiziert (Hell et al., 1993; Davare et al., 2001; Sinnegger-Brauns et al., 2004). Mäuse mit einer globalen Inaktivierung des $\text{Ca}_v1.2$ -Gens sind nicht lebensfähig (Seisenberger et al., 2000). Deshalb generierten wir mittels der Cre/loxP-Technik und Nex-Cre Mäusen eine *knockout*-Mauslinie der zweiten Generation (Schwab et al., 2000). Als erstes großes Ziel dieser Arbeit wurde diese Mauslinie ($\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäuse) dahingehend charakterisiert, dass ihr das $\text{Ca}_v1.2$ -Protein im Telencephalon inklusive der

Hippocampusformation größtenteils fehlte. Eine kompensatorische Hochregulation der $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle sowie der NMDA-Rezeptoren als Ersatz für den Defekt im Ca^{2+} -Influx wurde mittels Western Blot ausgeschlossen. Weiterhin wurde die wichtige, von der Entwicklungsphase abhängige Deletion des $\text{Ca}_v1.2$ -Gens gezeigt. So ergab sich bei 2-3 Wochen alten $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäusen ein normales Level an $\text{Ca}_v1.2$ -Protein, während das Protein bei adulten Mäusen fehlte, d.h. nachdem die zelluläre Organisation und die Verbindungen im Hippocampus abgeschlossen war. Darüberhinaus zeigten sich im Rahmen dieser Arbeit keine Unterschiede im anatomischen Bild der Hirne der CTR- und der $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäuse. Daher ist eine postnatale *knockout* des $\text{Ca}_v1.2$ -Gens und damit die Vermeidung von beeinflussenden Faktoren während der Entwicklung belegt (Aizawa et al., 2004; Redmond et al., 2002).

Indem die $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäuse sowohl elektrophysiologisch als auch ethologisch analysiert wurden, wurde über einen genetischen *loss-of-function*-Ansatz der Beweis erbracht, dass eine funktionelle Beziehung zwischen NMDAR-unabhängiger synaptischer Plastizität in der CA1-Region des Hippocampus und Hippocampus-abhängigem räumlichen Lernen besteht. Drei Haupterkenntnisse führten zu diesem Beweis. Erstens fehlte NMDAR-unabhängige LTP im Schaffer-Kollateralen/CA1-*pathway* der $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäuse. Zweitens waren diese Defekte in der synaptischen Plastizität mit einer deutlich verringerten Fähigkeit zu räumlichem Lernen assoziiert, wie es in zwei verschiedenen Verhaltensmustern (einem *discriminatory water maze task* und einem „*labyrinth*“ *maze navigational task*) gezeigt wurde. Und drittens war als ein weiterer Hauptaspekt dieser Arbeit der Ablauf der ERK-Kinase-Kaskade reduziert, was von einer verminderten CRE-abhängigen Transkription in der CA1-Region nach L-LTP-Induktion begleitet wurde.

Interessanterweise waren die basale synaptische Transmission, die NMDAR-abhängige LTP und LTD in der CA1-Region der $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäuse nicht verändert. Diese Ergebnisse heben hervor, dass der beobachtete Defekt in der synaptischen Plastizität selektiv ist und nur NMDAR-unabhängige Formen betrifft. Anisomycin, ein Proteinsynthesehemmer, verminderte bei CTR-Mäusen die NMDAR-unabhängige LTP_K 2 h nach der Behandlung mit TEA auf ein ähnliches Level, wie es bei $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäusen beobachtet wurde. Das spricht klar dafür, dass $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäuse zu keiner proteinsynthesesabhängigen Spätphase-LTP (L-LTP) fähig sind, die explizit mit der Bildung eines Langzeitgedächtnisses verknüpft ist (Kandel, 2001; Martin & Morris, 2002).

Wenn man nun davon ausgeht, dass die $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäuse das erste Tiermodell darstellen, dem die NMDAR-unabhängige synaptische Plastizität fehlt, wie sehen dann die Konsequenzen dieses Defekts für das Lernverhalten aus?

Diskussion

$Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse, die in dem gut etablierten *discriminatory water maze task* (Arns et al., 1999; Kleppisch et al., 2003) getestet wurden, zeigten eine deutlich eingeschränkte Leistung. Die Schlussfolgerung auf einen Defekt im räumlichen Lernen bei den $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäusen wurde durch die Ergebnisse im zweiten komplexeren „*labyrinth*“ *maze* untermauert. Da die Inaktivierung des $Ca_v1.2$ -Gens bei den $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäusen nicht auf den Hippocampus beschränkt ist, konnten wir einen möglichen Beitrag anderer Regionen des Telencephalons, in denen dieser Kanal exprimiert wird, nicht vollständig ausschließen. Jedoch gilt der *water maze task* als sehr sensitiv für Defekte in der Funktion des Hippocampus (Arns et al., 1999; Morris, 2003).

Sowohl die L-LTP in der CA1-Region des Hippocampus als auch die Bildung von Langzeitgedächtnissen benötigen die ERK-Signaltransduktionskaskade und CRE-regulierte Transkription (Kandel, 2001; Pittenger et al., 2002). Passend hierzu zeigte sich in den Neuronen der CA1-Region des Hippocampus der $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse neben einem beinahe vollständigen Verlust der Aktivierung und Zellkerntranslokation von ERK1/2 eine hochgradige Verminderung der langdauernden CREB-Phosphorylierung und der CRE-abhängigen Transkription in Antwort auf synaptische Plastizität-induzierende Stimuli. Diese Ergebnisse untermauern die Ansicht, dass $Ca_v1.2$ -L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-vermittelter Ca^{2+} -Influx speziell mit der Langzeitphosphorylierung von CREB und dem Auslösen der *de novo*-Proteinsynthese über die ERK-Signaltransduktionskaskade assoziiert ist.

Alles in allem wird in dieser Arbeit die klare Verbindung zwischen NMDAR-unabhängiger, L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-abhängiger synaptischer Plastizität im Hippocampus und der räumlichen Gedächtnisbildung beim lebenden Tier hergestellt.

5 Zusammenfassung

Das Wissen um die Mechanismen der NMDAR-unabhängigen synaptischen Plastizität und ihrer Funktion für die Gedächtnisbildung beim lebenden Tier sind vor allem aufgrund fehlender transgener Mausmodelle begrenzt. Postsynaptische L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle sollen in NMDAR-unabhängige LTP involviert sein. Um die Funktion der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle für das räumliche Lernen, die synaptische Plastizität und das Auslösen von lernassoziierten biochemischen Prozessen zu erforschen, generierten wir eine Mauslinie mit einer Inaktivierung des $\text{Ca}_v1.2$ -Gens ($\alpha_1\text{c}$ -Gens) im Telencephalon ($\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$). Als erstes großes Ziel dieser Arbeit wurde diese Mauslinie ($\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäuse) dahingehend charakterisiert, dass ihr das $\text{Ca}_v1.2$ -Protein im Telencephalon inklusive der Hippocampusformation größtenteils fehlte. Weiterhin wurde die wichtige, von der Entwicklungsphase abhängige Deletion des $\text{Ca}_v1.2$ -Gens gezeigt. Bei der Erforschung der Mauslinie zeigten sich anschließend 3 Hauptergebnisse: Erstens ein selektiver Verlust der NMDAR-unabhängigen LTP der Schaffer-Kollateralen, zweitens eine deutlich eingeschränkte Fähigkeit zur hippocampusabhängigen räumlichen Gedächtnisbildung und drittens als zweites Hauptziel dieser Arbeit eine reduzierte Aktivierung der ERK-Kinase-Aktivierung und der CREB-Aktivierung als Teil der ERK-Signaltransduktionskaskade und der CRE-abhängigen Transkription in der CA1-Region. All diese Ergebnisse zusammen untermauern die funktionelle Relevanz der L-Typ Ca^{2+} -Kanal-abhängigen, NMDAR-unabhängigen synaptischen Plastizität im Hippocampus für die Bildung eines räumlichen Gedächtnisses beim lebenden Tier.

6 Literaturverzeichnis

Aizawa, H., Hu, S.C., Bobb, K., Balakrishnan, K., Ince, G., Gurevich, I., Cowan, M., Ghosh, A. Dendrite development regulated by CREST, a calcium-regulated transcriptional activator. *Science* **303**, 197-202 (2004).

Akagi, K., Sandig, V., Vooijs, M., Van der Valk, M., Giovannini, M., Strauss, M., Berns, A. Cre-mediated somatic site-specific recombination in mice. *Nucleic Acids Res* **25**, 1766-73 (1997).

Aniksztejn, L. & Ben-Ari, Y. Novel form of long-term potentiation produced by a K⁺ channel blocker in the hippocampus. *Nature* **349**, 67-9 (1991).

Arns, M., Sauvage, M., Steckler, T. Excitotoxic hippocampal lesions disrupt allocentric spatial learning in mice: effects of strain and task demands. *Behav Brain Res* **106**, 151-64 (1999).

Atkins, C.M., Selcher, J.C., Petraitis, J.J., Trzaskos, J.M., Sweatt, J.D. The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci* **1**, 602-9 (1998).

Biel, M., Ruth, P., Bosse, E., Hullin, R., Stuhmer, W., Flockerzi, V., Hofmann, F. Primary structure and functional expression of a high voltage activated calcium channel from rabbit lung. *FEBS Lett* **269**, 409-412 (1990).

Birnbaumer, L., Campbell, K.P., Catterall, W.A., Harpold, M.M., Hofmann, F., Horne, W.A., Mori, Y., Schwartz, A., Snutch, T.P., Tanabe, T. The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron* **13** 505-506 (1994).

Bito, H., Deisseroth, K., Tsien, R.W. CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca²⁺- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell* **87**, 1203-14 (1996).

Borrioni, A.M., Fichtenholtz, H., Woodside, B.L., Teyler, T.J. Role of voltage-dependent calcium channel long-term potentiation (LTP) and NMDA LTP in spatial memory. *J Neurosci* **20**, 9272-6 (2000).

Brindle, P.K. & Montminy, M.R. The CREB family of transcription activators. *Curr Opin Genet Dev* **2**, 199-204 (1992).

Clark, N.C., Nagano, N., Kuenzi, F.M., Jarolimek, W., Huber, I., Walter, D., Wietzorrek, G., Boyce, S., Kullmann, D.M., Striessnig, J., Seabrook, G.R. Neurological phenotype and synaptic function in mice lacking the Ca(V)1.3 alpha subunit of neuronal L-type voltage-dependent Ca(2+) channels. *Neuroscience* **120**, 435-442 (2003).

Cribbs, L.L., Lee, J.H., Yang, J., Satin, J., Zhang, Y., Daud, A., Barclay, J., Williamson, M.P., Fox, M., Rees, M., Perez-Reyes, E. Cloning and characterization of α_{1H} from human heart, a member of the T-type Ca²⁺ channel gene family. *Circ Res* **83**, 103-109 (1998).

Davare, M.A., Avdonin, V., Hall, D.D., Peden, E.M., Burette, A., Weinberg, R.J., Horne, M.C., Hoshi, T., Hell, J.W. A beta2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca²⁺ channel Cav1.2. *Science* **293**, 98-101 (2001).

Davis, G., Dibner, M.D., Battey, J.F. Basic methods in molecular biology. *Elsevier, New York* (1986).

Deisseroth, K., Heist, E.K., Tsien, R.W. Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature* **12**, 198-202 (1998).

Dolmetsch, R.E., Pajvani, U., Fife, K., Spotts, J.M., Greenberg, M.E. Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science* **294**, 333-9 (2001).

Dubel, S.J., Starr, T.V., Hell, J., Ahlijanian, M.K., Enyeart, J.J., Catterall, W.A., Snutch, T.P. Molecular cloning of the alpha-1 subunit of an omega-conotoxin-sensitive calcium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 5058-5062 (1992).

Dudai, Y. The Neurobiology of Memory: Concepts, Findings, Trends. *Oxford University Press, New York* (1989).

English, J.D. & Sweatt, J.D. A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation. *J Biol Chem* **272**, 19103-6 (1997).

Ertel, E.A., Campbell, K.P., Harpold, M.M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T.P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R.W., Catterall, W.A. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* **25**, 533-535 (2000).

Frey, U., Krug, M., Reymann, K.G., Matthies, H. Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro. *Brain Res* **452**, 57-65 (1988).

Grover, L.M. & Teyler, T.J. Two components of long-term potentiation induced by different patterns of afferent activation. *Nature* **347**, 477-9 (1990).

Hardingham, G.E., Arnold, F.J., Bading, H. A calcium microdomain near NMDA receptors: on switch for ERK-dependent synapse-to-nucleus communication. *Nat Neurosci* **4**, 565-6 (2001).

Hell, J.W., Westenbroek, R.E., Warner, C., Ahljianian, M.K., Prystay, W., Gilbert, M.M., Snutch, T.P., Catterall, W.A. Identification and differential subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel alpha 1 subunits. *J Cell Biol* **123**, 949-62 (1993).

Hoess, R.H. & Abremski K.E. The Cre-lox recombination system. *Nucleic Acids and Molecular Biology* **4**, 99-109 (1990).

Hofmann, F., Lacinová, L., Klugbauer, N. Voltage dependent calcium channels: From structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **139**, 35-87(1999).

Impey, S., Mark, M., Villacres, E.C., Poser, S., Chavkin, C., Storm, D.R. Induction of CRE-mediated gene expression by stimuli that generate longlasting LTP in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* **16**, 973-82 (1996).

Impey, S., Obrietan, K., Storm, D.R. Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity. *Neuron* **23**, 11-4 (1999).

Kandel, E.R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* **294**, 1030-8 (2001).

Kleppisch, T., Wolfsgruber, W., Feil, S., Allmann, R., Wotjak, C.T., Goebbels, S., Nave, K.A., Hofmann, F., Feil, R. Hippocampal cGMP-dependent protein kinase I supports an age- and protein synthesis-dependent component of long-term potentiation but is not essential for spatial reference and contextual memory. *J Neurosci* **23**, 6005-12 (2003).

Klugbauer, N., Marais, E., Lacinova, L., Hofmann, F. A T-type calcium channel from mouse brain. *Pflugers Arch* **437**, 710-715 (1999a).

Klugbauer, N., Lacinova, L., Marais, E., Hobom, M., Hofmann, F. Molecular diversity of the calcium channel alpha2delta subunit. *J Neurosci* **19**, 684-691 (1999b).

Klugbauer, N. Molekulare Grundlagen der Wirkung von Kalziumkanalblockern. *Med Welt* **50**, 506-511 (1999c).

Kollmar, R., Montgomery, L.G., Fak, J., Henry, L.J., Hudspeth, A.J. Predominance of the alpha1D subunit in L-type voltage-gated Ca²⁺ channels of hair cells in the chicken's cochlea. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14883-8 (1997a).

Kollmar, R., Fak, J., Montgomery, L.G., Hudspeth, A.J. Hair cell-specific splicing of mRNA for the alpha1D subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels in the chicken's cochlea. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14889-93 (1997b).

Kovalchuk, Y., Eilers, J., Lisman, J., Konnerth, A. NMDA receptor-mediated subthreshold Ca(2+) signals in spines of hippocampal neurons. *J Neurosci* **20**, 1791-9 (2000).

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5 (1970).

Lashley, K.S. In search of the engram. In: Society of Experimental Biology Symposium, No 4: Psychological mechanism in animal behaviour. Cambridge: *Cambridge University Press*. p. 454-480 (1950).

Lee, J.H., Daud, A.N., Cribbs, L.L., Lacerda, A.E., Pereverzev, A., Klockner, U., Schneider, T., Perez-Reyes, E. Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J Neurosci* **19**, 1912-1921 (1999).

Lonze, B.E. & Ginty, D.D. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* **35**, 605-23 (2002).

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-75 (1951).

Martin, S.J. & Morris, R.G. New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus* **12**, 609-36 (2002).

McHugh, T.J., Blum, K.I., Tsien, J.Z., Tonegawa, S., Wilson, M.A. Impaired hippocampal representation of space in CA1-specific NMDAR1 knockout mice. *Cell* **87**, 1339-49 (1996).

Mikami, A., Imoto, K., Tanabe, T., Niidome, T., Mori, Y., Takeshima, H., Narumiya, S., Numa, S. Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* **340**, 230-233 (1989).

Milner, B., Squire, L.R., Kandel, E.R. Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* **20**, 445-468 (1998).

Monteil, A., Chemin, J., Bourinet, E., Mennessier, G., Lory, P., Nargeot, J. Molecular and functional properties of the human alpha(1G) subunit that forms T-type calcium channels *J Biol Chem* **275**, 6090-6100 (2000).

Moosmang, S., Schulla, V., Welling, A., Feil, R., Feil, S., Wegener, J.W., Hofmann, F., Klugbauer, N. Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. *EMBO J* **22**, 6027-34 (2003).

Morgan, S.L. & Teyler, T.J. VDCCs and NMDARs underlie two forms of LTP in CA1 hippocampus in vivo. *J Neurophysiol* **82**, 736-40 (1999).

Mori, Y., Friedrich, T., Kim, M.S., Mikami, A., Nakai, J., Ruth, P., Bosse, E., Hofmann, F., Flockerzi, V., Furuichi, T. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature* **350**, 398-402 (1991).

Morris, R.G., Anderson, E., Lynch, G.S., Baudry, M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, APV. *Nature* **319**, 774-6 (1986).

Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* **297**, 681-3 (1982).

Morris, R.G. Long-term potentiation and memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**, 643-7 (2003).

Muller, R.U. A quarter of a century of place cells. *Neuron* **17**, 813-822 (1996).

Murphy, T.H., Worley, P.F., Nakabeppu, Y., Christy, B., Gastel, J., Baraban, J.M. Synaptic regulation of immediate early gene expression in primary cultures of cortical neurons. *J Neurochem* **57**, 1862-72 (1991).

Nicoll, R.A., Oliet, S.H., Malenka, R.C. NMDA receptor-dependent and metabotropic glutamate receptor-dependent forms of long-term depression coexist in CA1 hippocampal pyramidal cells. *Neurobiol Learn Mem* **70**, 62-72 (1998).

Niidome, T., Kim, M.S., Friedrich, T., Mori, Y. Molecular cloning and characterization of a novel calcium channel from rabbit brain. *FEBS Lett* **308**, 7-13 (1992).

Obermair, G.J., Szabo, Z., Bourinet, E., Flucher, B.E. Differential targeting of the L-type Ca²⁺ channel alpha 1C (CaV1.2) to synaptic and extrasynaptic compartments in hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* **19**, 2109-22 (2004).

Perez-Reyes, E., Cribbs, L.L., Daud, A., Lacerda, A.E., Barclay, J., Williamson, M.P., Fox, M., Rees, M., Lee, J.H. Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* **391**, 896-899 (1998)

Pittenger, C., Huang, Y.Y., Paletzki, R.F., Bourtchouladze, R., Scanlin, H., Vronskaya, S., Kandel, E.R. Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus-dependent spatial memory. *Neuron* **34**, 447-62 (2002).

Rampon, C. & Tsien, J.Z. Genetic analysis of learning behavior-induced structural plasticity. *Hippocampus* **10**, 605-9 (2000).

Redmond, L., Kashani, A.H., Ghosh, A. Calcium regulation of dendritic growth via CaM kinase IV and CREB-mediated transcription. *Neuron* **34**, 999-1010 (2002).

Sabatini, B.L. & Svoboda, K. Analysis of calcium channels in single spines using optical fluctuation analysis. *Nature* **408**, 589-93 (2000).

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467 (1977).

Schneider, T., Wei, X., Olcese, R., Costantin, J.L., Neely, A., Palade, P., Perez-Reyes, E., Qin, N., Zhou, J., Crawford, G.D. Molecular analysis and functional expression of the human type E neuronal Ca²⁺ channel alpha 1 subunit. *Receptors Channels* **2**, 255-270 (1994).

Schwab, M.H., Bartholomae, A., Heimrich, B., Feldmeyer, D., Druffel-Augustin, S., Goebbels, S., Naya, F.J., Zhao, S., Frotscher, M., Tsai, M.J., Nave, K.A. Neuronal basic helix-loop-helix proteins (NEX and BETA2/Neuro D) regulate terminal granule cell differentiation in the hippocampus. *J Neurosci* **20**, 3714-24 (2000).

Scoville, W.B. & Milner, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **12**, 103-13 (1957).

Seino, S., Chen, L., Seino, M., Blondel, O., Takeda, J., Johnson, J.H., Bell, G.I. Cloning of the alpha 1 subunit of a voltage-dependent calcium channel expressed in pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 584-588 (1992).

Seisenberger, C., Specht, V., Welling, A., Platzer, J., Pfeifer, A., Kuhbandner, S., Striessnig, J., Klugbauer, N., Feil, R., Hofmann, F. Functional embryonic cardiomyocytes after disruption of the L-type alpha1C (Cav1.2) calcium channel gene in the mouse. *J Biol Chem* **275**, 39193-9 (2000).

Seisenberger, C., Welling, A., Schuster, A., Hofmann, F. Two stable cell lines for screening of calcium channel blockers. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **352**, 662-9 (1995).

Shistik, E., Ivanina, T., Puri, T., Hosey, M., Dascal, N. Ca²⁺ current enhancement by alpha 2/delta and beta subunits in *Xenopus* oocytes: contribution of changes in channel gating and alpha 1 protein level. *J Physiol* **489**, 55-62 (1995).

Silva, A.J., Kogan, J.H., Frankland, P.W., Kida, S. CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* **21**, 127-48 (1998).

Sinnegger-Brauns, M.J., Hetzenauer, A., Huber, I.G., Renstrom, E., Wietzorrek, G., Berjukov, S., Cavalli, M., Walter, D., Koschak, A., Waldschutz, R., Hering, S., Bova, S., Rorsman, P., Pongs, O., Singewald, N., Striessnig, J.J. Isoform-specific regulation of mood behavior and pancreatic beta cell and cardiovascular function by L-type Ca²⁺ channels. *J Clin Invest* **113**, 1430-9 (2004).

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85 (1985).

Snutch, T.P., Tomlinson, W.J., Leonard, J.P., Gilbert, M.M. Distinct calcium channels are generated by alternative splicing and are differentially expressed in the mammalian CNS. *Neuron* **7**, 45-57 (1991).

Soong, T.W., Stea, A., Hodson, C.D., Dubel, S.J., Vincent, S.R., Snutch, T.P. Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family. *Science* **260**, 1133-1136 (1993).

Starr, T.V., Prystay, W., Snutch, T.P. Primary structure of a calcium channel that is highly expressed in the rat cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 5621-5625 (1991).

Strom, T.M., Nyakatura, G., Apfelstedt-Sylla, E., Hellebrand, H., Lorenz, B., Weber, B.H., Wutz, K., Gutwillinger, N., Ruther, K., Drescher, B., Sauer, C., Zrenner, E., Meitinger, T., Rosenthal, A., Meindl, A. An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet* **19**, 260-3 (1998).

Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T., Numa, S. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* **328**, 313-318 (1987).

Tang, Y.P., Shimizu, E., Dube, G.R., Rampon, C., Kerchner, G.A., Zhuo, M., Liu, G., Tsien, J.Z. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* **401**, 63-9 (1999).

Thomas, G.M. & Huganir, R.L. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* **5**, 173-83 (2004).

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

West, A.E., Chen, W.G., Dalva, M.B., Dolmetsch, R.E., Kornhauser, J.M., Shaywitz, A.J., Takasu, M.A., Tao, X., Greenberg, M.E. Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11024-31 (2001).

Williams, M.E., Brust, P.F., Feldman, D.H., Patthi, S., Simerson, S., Maroufi, A., McCue, A.F., Velicelebi, G., Ellis, S.B., Harpold, M.M. Structure and functional expression of an omega-conotoxin-sensitive human N-type calcium channel. *Science* **257**, 389-395 (1992a).

Williams, M.E., Feldman, D.H., McCue, A.F., Brenner, R., Velicelebi, G., Ellis, S.B., Harpold, M.M. Structure and functional expression of alpha 1, alpha 2 delta and beta subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron* **8**, 71-84 (1992b).

Wood, E.R., Dudchenko, P.A., Eichenbaum, H. The global record of memory in hippocampal neuronal activity. *Nature* **397**, 613-616 (1999).

Woodside, B.L., Borroni, A.M., Hammonds, M.D., Teyler, T.J. NMDA receptors and voltage-dependent calcium channels mediate different aspects of acquisition and retention of a spatial memory task. *Neurobiol Learn Mem* **81**, 105-114 (2004).

Wu, G.Y., Deisseroth, K., Tsien, R.W. Activity-dependent CREB phosphorylation: convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and a slow, less sensitive mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2808-13 (2001).

Zakharenko, S.S., Zablow, L., Siegelbaum, S.A. Visualization of changes in presynaptic function during long-term synaptic plasticity. *Nat Neurosci* **4**, 711-7 (2001).

Zakharenko, S.S., Patterson, S.L., Dragatsis, I., Zeitlin, S.O., Siegelbaum, S.A., Kandel, E.R., Morozov, A. Presynaptic BDNF required for a presynaptic but not postsynaptic component of LTP at hippocampal CA1-CA3 synapses. *Neuron* **39**, 975-90 (2003).

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Franz Hofmann für die Aufnahme an sein Institut, sein Interesse am Fortgang der Arbeit und die schnelle Durchsicht des Manuskriptes bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Sven Moosmang für die unkomplizierte Übernahme der Betreuung, seine fachliche Unterstützung und sein großes Engagement beim Fortgang der Arbeit. Vor allem durch seine witzigen Kommentare hat er mir über so manch schwere Phase hinweg geholfen. Vielen Dank für Alles, Sven!

Mein spezieller Dank gilt Frau Susanne Papparisto und Frau Astrid Vens für ihre unerschütterliche Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung der molekularbiologischen Methoden.

Frau Dr. Juliane Stieber und Herrn Stefan Hermann möchte ich für ihre fröhliche Art und ihre nützlichen Tipps danken, durch die der Laboralltag um einiges erträglicher wurde.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an alle anderen Mitarbeitern des Instituts für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Meinen Eltern Alfred und Monika Langwieser und meinen Geschwistern Viola und Richard möchte ich für jegliche Unterstützung während des Studiums danken.

Bei Frau Nicole Haider möchte ich mich für ihren steten Glauben in mich und ihre liebevolle Unterstützung herzlich bedanken. Danke, Schneck!