

Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Technischen Universität München

**Molekulare und funktionelle Analyse der Rolle des  
CACNA1C Gens bei synaptischer Plastizität und dem  
Lernverhalten der Maus**

**Nicole Nadine Langwieser**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan  
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur  
Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigte Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. S. Scherer

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. W. Wurst
2. Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann

Die Dissertation wurde am 17.01.2007 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für  
Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 12.03.2007 angenommen.



**Für meine Mama**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Spannungsabhängige Kalziumkanäle	1
1.1.1	Einteilung spannungsabhängiger Kalziumkanäle	2
1.1.1.1	<i>High voltage</i> aktivierte Kalziumkanäle	2
1.1.1.2	<i>Low voltage</i> aktivierte Kalziumkanäle	3
1.2	Inaktivierung des <i>CACNA1C</i> Gens ( $Ca_v1.2$ ) in Mäusen	4
1.2.1	Totaler Knockout (Nullmutante) des <i>CACNA1C</i> Gens	4
1.2.2	Konditionaler Knockout des <i>CACNA1C</i> Gens	4
1.3	Die Funktion des $Ca_v1.2$ im Zentralnervensystem	6
1.3.1	Der $Ca_v1.2$ im Hippokampus und der Amygdala	6
1.3.1.1	Elektrophysiologische Grundlagen	8
1.3.1.2	Molekulare Grundlagen	9
1.4	Zielsetzung der Arbeit	11
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>12</b>
2.1	Versuchstiere	12
2.1.1	<i>CACNA1C</i> Mäuse	12
2.1.2	Cre Mäuse	12
2.1.3	CRE-LacZ Reporter Mäuse	13
2.1.4	Konditional <i>CACNA1C</i> defiziente Mäuse – Zuchtschema 1	13
2.1.5	Konditional <i>CACNA1C</i> defiziente Mäuse – Zuchtschema 2	14
2.2	Verhalten	14
2.2.1	<i>Open field</i> Test	14
2.2.2	Rotarod Untersuchung	15
2.2.3	Wasserlabyrinth	15
2.2.3.1	Wasserlabyrinth – diskriminatorischer Test	15
2.2.3.2	Wasserlabyrinth – <i>distal landmark</i> Test	16
2.2.4	Labyrinthtest	17
2.2.5	<i>Conditioned fear</i> Test	18
2.2.5.1	Intracerebroventrikuläre Injektionen (ICV) von Kanalblockern - <i>conditioned fear</i> Test	19
2.2.6	<i>Wheel Running</i> Test	19
2.3	Elektrophysiologie	20
2.3.1	<i>Field</i> EPSP und <i>whole-cell</i> Ableitungen	20
2.3.2	<i>Whole-cell</i> Ableitungen in hippocampalen Neuronen	22
2.4	Molekular- und zellbiologische Methoden	23
2.4.1	Bakterienkultur	23
2.4.1.1	Verwendeter Stamm	23
2.4.1.2	Nährmedien und Antibiotika	23

## Inhaltsverzeichnis

2.4.1.3	Kultivierung .....	23
2.4.1.4	Bestimmung der Zelldichte .....	24
<b>2.4.2</b>	<b>Verwendete Plasmide.....</b>	<b>24</b>
<b>2.4.3</b>	<b>Transformation von Bakterien.....</b>	<b>24</b>
2.4.3.1	Erzeugung kompetenter Bakterienzellen – chemisch kompetente Zellen .....	24
2.4.3.2	Erzeugung kompetenter Bakterienzellen – elektrokompente Zellen.....	24
2.4.3.3	Transformation von <i>E. coli</i> .....	25
<b>2.4.4</b>	<b>Isolierung von Plasmid-DNS (Mini-Präparation).....</b>	<b>25</b>
<b>2.4.5</b>	<b>Alkalische Lyse mit Säulenchromatographie (Maxi-Präparation).....</b>	<b>26</b>
<b>2.4.6</b>	<b>Enzymatische Modifikation von DNS.....</b>	<b>26</b>
2.4.6.1	Restriktionsverdau .....	26
<b>2.4.7</b>	<b>Reinigung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....</b>	<b>26</b>
2.4.7.1	Phenol/Chloroform-Extraktion.....	26
2.4.7.2	Präzipitation .....	26
2.4.7.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	26
<b>2.4.8</b>	<b>Sequenzierung von DNS.....</b>	<b>27</b>
2.4.8.1	Sequenzreaktion .....	27
2.4.8.2	Reinigung des Sequenzierungsproduktes .....	28
<b>2.4.9</b>	<b>Auftrennung und Isolation von DNS-Fragmenten .....</b>	<b>28</b>
2.4.9.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	29
2.4.9.2	Agarose-Gelelektrophorese .....	29
2.4.9.3	Elektroelution .....	29
<b>2.4.10</b>	<b>Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....</b>	<b>30</b>
2.4.10.1	Standardprotokoll.....	30
<b>2.4.11</b>	<b>Isolation von genomischer DNS.....</b>	<b>31</b>
<b>2.4.12</b>	<b>Isolation von RNS aus eukaryotischen Zellen .....</b>	<b>31</b>
2.4.12.1	Isolation von Gesamt-RNS .....	31
2.4.12.2	Isolation von Boten-RNS mittels Dynabeads® .....	32
2.4.12.3	Synthese von einzelsträngiger cDNS .....	33
<b>2.4.13</b>	<b>Trennung und Detektion von Proteinen.....</b>	<b>33</b>
2.4.13.1	Bestimmung der Proteinkonzentration - BCA-Methode .....	34
2.4.13.2	Probengewinnung, Probenvorbereitung und Elektrophorese .....	34
2.4.13.3	Elektroblot von Polyacrylamidgelen .....	35
<b>2.4.14</b>	<b>Immundetektion (Western Blot).....</b>	<b>35</b>
<b>2.4.15</b>	<b>Spezielle Methoden zur Charakterisierung von Proteinen.....</b>	<b>36</b>
2.4.15.1	Membranpräparation aus verschiedenen Geweben .....	36
<b>2.4.16</b>	<b>Agonisten-Behandlung perfundierter hippokampaler Schnittpräparate .....</b>	<b>37</b>
<b>2.4.17</b>	<b><i>In situ</i> Hybridisierung.....</b>	<b>37</b>
2.4.17.1	Herstellung der RNS-Sonden .....	39
2.4.17.2	Standardprotokoll für die <i>in situ</i> Hybridisierung .....	39
<b>2.4.18</b>	<b>Immunhistologische Untersuchungen .....</b>	<b>40</b>
<b>2.4.19</b>	<b>Histologische Untersuchungen.....</b>	<b>41</b>
2.4.19.1	Anfertigung von Gefrierschnitten .....	41
2.4.19.2	Anfertigung von Paraffinschnitten .....	41
2.4.19.3	Hämatoxylin/Eosin Färbung (H/E Färbung) .....	41
2.4.19.4	Nissl Färbung .....	42
2.4.19.5	Zellkernfärbung mit Hoechst 33258.....	42
2.4.19.6	Golgi Cox Färbung.....	42
2.4.19.7	X-Gal Färbung.....	43

<b>2.5</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>43</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b>Generierung und Charakterisierung des Hippokampus-spezifischen KO-Modells .....</b>	<b>44</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Grundcharakterisierung.....</b>	<b>44</b>
3.1.1.1	Expression des Ca <sub>v</sub> 1.2 und Ca <sub>v</sub> 1.3 L-Typ Kalziumkanals im ZNS.....	44
3.1.1.2	Morphologische Untersuchung der Ca <sub>v</sub> 1.2 <sup>HCKO</sup> Tiere.....	45
3.1.1.3	Golgi Cox Färbung.....	45
<b>3.1.2</b>	<b>Rekombinations- und Expressionsanalyse.....</b>	<b>46</b>
3.1.2.1	Expressionsanalyse mittels X-Gal Färbung.....	46
3.1.2.2	Rekombination auf genomischer und mRNS Ebene.....	47
3.1.2.3	Expressionsanalyse im Western Blot.....	48
<b>3.1.3</b>	<b>Verhaltensbiologische Analyse.....</b>	<b>50</b>
3.1.3.1	<i>Open field</i> Test.....	50
3.1.3.2	Rotarod Test.....	50
3.1.3.3	<i>Distal landmark</i> Test.....	50
3.1.3.4	Diskriminatorisches Wasserlabyrinth.....	51
3.1.3.5	Labyrinthtest.....	53
<b>3.1.4</b>	<b>Elektrophysiologische Untersuchungen.....</b>	<b>54</b>
3.1.4.1	Ca <sub>v</sub> 1.2 L-Typ Kalziumströme in CA1 Pyramidenzellen.....	54
<b>3.1.5</b>	<b>Untersuchung von Signaltransduktionskaskaden .....</b>	<b>61</b>
3.1.5.1	Die MAPK/ERK-Signalkaskade.....	61
3.1.5.2	Die CRE-abhängige Signalkaskade.....	62
<b>3.2</b>	<b>Generierung und Charakterisierung des Gehirn-spezifischen Knockoutmodells .....</b>	<b>66</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Grundcharakterisierung.....</b>	<b>66</b>
3.2.1.1	Morphologische Untersuchung der KO-Nestin Tiere.....	66
3.2.1.2	Golgi Cox Färbung.....	67
<b>3.2.2</b>	<b>Rekombinations- und Expressionsanalyse.....</b>	<b>68</b>
3.2.2.1	Expressionsanalyse mittels X-Gal Färbung.....	68
3.2.2.2	Rekombination auf genomischer und mRNS Ebene.....	69
3.2.2.3	Expressionsanalyse im Western Blot.....	71
<b>3.2.3</b>	<b>Verhaltensbiologische Analyse.....</b>	<b>72</b>
3.2.3.1	<i>Open field</i> Test.....	72
3.2.3.2	Rotarod Test.....	72
3.2.3.3	Circadianer Rhythmus – <i>Wheel Running</i> .....	73
3.2.3.4	<i>Conditioned fear</i> Test – genetisches Modell.....	78
3.2.3.5	<i>Conditioned fear</i> Test – pharmakologischer Ansatz.....	80
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>83</b>
<b>4.1</b>	<b>Hippokampus-abhängiges Lernen .....</b>	<b>84</b>
4.1.1	Generierung der Hippokampus- und Cortex-spezifischen <i>CACNA1C</i> defizienten Mäuse.....	84
4.1.2	Hippokampus-abhängiges räumliches Lernen in Ca <sub>v</sub> 1.2 <sup>HCKO</sup> Tieren.....	85
4.1.3	NMDAR-unabhängige Langzeitpotenzierung im Hippokampus der Ca <sub>v</sub> 1.2 <sup>HCKO</sup> Tiere.....	85
4.1.4	Signaltransduktionskaskaden im Hippokampus der Ca <sub>v</sub> 1.2 <sup>HCKO</sup> Tiere.....	86

## Inhaltsverzeichnis

<b>4.2</b>	<b>Circadiane Rhythmizität.....</b>	<b>87</b>
4.2.1	Generierung der Gehirn-spezifischen <i>CACNA1C</i> defizienten Mäuse .....	87
4.2.2	Circadiane Rhythmizität in KO-Nestin Tieren.....	87
<b>4.3</b>	<b>Angst-Gedächtnis.....</b>	<b>88</b>
4.3.1	Das Angst-Gedächtnis in KO-Nestin Tieren.....	88
<b>4.4</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>91</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>93</b>
<b>6</b>	<b>TABELLEN .....</b>	<b>95</b>
6.1	Für die Genotypisierung verwendete Oligonukleotide.....	95
6.2	Verwendete Oligonukleotide .....	95
6.3	Verwendete Restriktionsenzyme .....	95
6.4	Verwendete primäre Antikörper.....	96
6.5	Verwendete sekundäre Antikörper.....	96
6.6	Verwendete Mauslinien.....	96
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>99</b>

# 1 Einleitung

Nahezu alles was wir tun, wird von Kalzium kontrolliert – unsere Bewegungen, der Herzschlag und die Informationsverarbeitung und Gedächtnisbildung in unserem Gehirn. Um alle diese Prozesse ausführen zu können, arbeitet Kalzium als intrazellulärer Bote in den verschiedenen Zelltypen und reguliert dadurch deren Aktivität. Der Großteil des Kalziumeinstroms in die Zelle erfolgt über spannungsabhängige Kalziumkanäle, die über Depolarisation der Zellmembran aktiviert werden und die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration drastisch erhöhen können. In Ruhe: ca. 100 nM; stimuliert: bis zu 1  $\mu\text{M}$ .

Darüber hinaus ist eine Vielzahl von Modulatoren (Hormone, Proteinkinasen, Proteinphosphatasen und Pharmaka) bekannt, die in diesen Prozess mit eingreifen (Hofmann et al., 1999; Moosmang et al., 2005a).

## 1.1 Spannungsabhängige Kalziumkanäle

Entwicklungsgeschichtlich zählen die spannungsabhängigen Kalziumkanäle zur Gruppe transmembranärer Ionenkanäle, die auch spannungsabhängige Natrium- und Kaliumkanäle umfasst. Zentraler Bestandteil aller spannungsaktivierten Kalziumkanäle ist die transmembranäre  $\alpha 1$  Untereinheit. Sie besteht aus 4 homologen Domänen mit jeweils 6 Transmembransegmenten, enthält die Pore, den Spannungssensor, den Ionenselektivitätsfilter und die Bindungsstelle für die klassischen Kalziumkanalblocker.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind 10 Gene identifiziert worden, die für die  $\alpha 1$  Untereinheit kodieren. Es existieren 4 Klassen von *high voltage* aktivierten (HVA) Kalziumkanälen (L (*long lasting*)-, N (*neither L-nor T*)-, P/Q (Purkinje)- und R (*remaining*)-Typ) und eine Klasse von *low voltage* aktivierten (LVA) Kanälen (T (*tiny/transient*)-Typ) (Nowycky et al., 1985; Hofmann et al., 1999; Striessnig, 1999). Erst kürzlich wurde jedoch noch ein weiteres Gen entdeckt, das für die  $\alpha 1$  Untereinheit kodiert. Der zugehörige Kanal, VGCNL1 (*voltage gated channel like*), ist strukturell sowohl mit Natrium- als auch Kalziumkanälen verwandt (Yu and Catterall, 2004).

Um eine überschaubare Einteilung aller Kanalklassen gewährleisten zu können, wurde 2000 eine neue Nomenklatur für die  $\alpha 1$  Untereinheiten von Ertel et al. vorgeschlagen (Ertel et al., 2000), die nun auch gültig ist. In Tabelle 1.1 wurde sie der etablierten, aber älteren Nomenklatur von Birnbaumer (Birnbaumer et al., 1994) gegenübergestellt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die neue Nomenklatur verwendet.

	Typ	alt	neu	Spleißvar.	Vorkommen	Blocker	Literaturangabe
<b>HVA</b>	L-Typ	$\alpha_{1S}$	Ca <sub>v</sub> 1.1		Skelettmuskel		(Tanabe et al., 1987)
		$\alpha_{1C}$	Ca <sub>v</sub> 1.2	a	Herz	DHP PAA BTZ	(Mikami et al., 1989)
				b	Glatter Muskel		(Biel et al., 1990)
				c	Hirn, Herz, Gl.pit., NeNi		(Snutch et al., 1991)
	$\alpha_{1D}$	Ca <sub>v</sub> 1.3		Hirn, Pancreas, Niere, Ovar, Cochlea		(Seino et al., 1992)	
	$\alpha_{1F}$	Ca <sub>v</sub> 1.4		Retina	*	(Strom et al., 1998)	
	P/Q-Typ	$\alpha_{1A}$	Ca <sub>v</sub> 2.1	a b	Hirn, Cochlea, Gl.pit.	$\omega$ -Aga	(Mori et al., 1991) (Starr et al., 1991)
N-Typ	$\alpha_{1B}$	Ca <sub>v</sub> 2.2	a	Hirn, peripheres Nervensystem	$\omega$ -CTX	(Williams, 1992) (Dubel et al., 1992)	
R-Typ			b				
<b>LVA</b>	T-Typ	$\alpha_{1G}$	Ca <sub>v</sub> 3.1	a, b m. mehreren Unterformen	Hirn, Herz, peripheres Nervensystem	Mi, Kurtoxin	(Perez-Reyes, 1998; Perez-Reyes et al., 1998)
		$\alpha_{1H}$	Ca <sub>v</sub> 3.2		Hirn, Herz, Niere, Leber	Mi	(Cribbs et al., 1998)
		$\alpha_{1I}$	Ca <sub>v</sub> 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; NeNi: Nebennieren; PAA: Phenylalkylamine;  $\omega$ -Aga:  $\omega$ -Agatoxin GIVA;  $\omega$ -CTX:  $\omega$ -Conotoxin GVIA; \*: Kanal nicht genauer charakterisiert.

### 1.1.1 Einteilung spannungsabhängiger Kalziumkanäle

Sequenzvergleiche legen nahe, dass sich die HVA Kalziumkanäle bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt während der Evolution von den LVA Kalziumkanälen abgetrennt haben. Die beiden Gruppen unterscheiden sich sowohl hinsichtlich ihrer elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften als auch in ihrem strukturellen Aufbau (Yaari et al., 1987; Hofmann et al., 1999; Moosmang et al., 2005a).

#### 1.1.1.1 High voltage aktivierte Kalziumkanäle

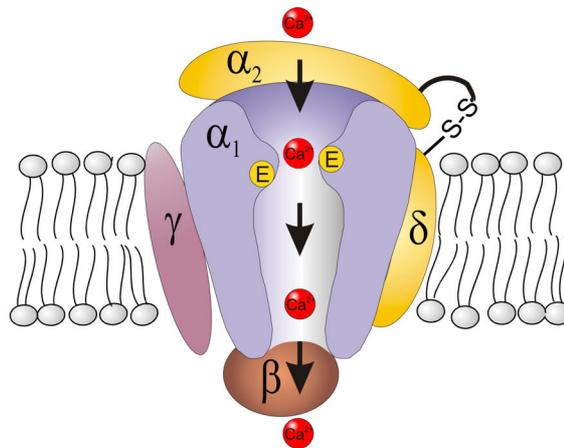
HVA Kalziumkanäle bilden eine Familie heterooligomerer Komplexe, die aus bis zu fünf Untereinheiten bestehen, nämlich einer zentralen  $\alpha_1$  Untereinheit sowie modulatorischen  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\alpha_2$  und  $\gamma$  Untereinheiten (Abbildung 1.1). Zur Gruppe der L-Typ Kalziumkanäle zählen die vier Mitglieder *CACNA1S* (Ca<sub>v</sub>1.1 ( $\alpha_{1S}$ )), *CACNA1C* (Ca<sub>v</sub>1.2 ( $\alpha_{1C}$ )), *CACNA1D* (Ca<sub>v</sub>1.3 ( $\alpha_{1D}$ )) und *CACNA1F* (Ca<sub>v</sub>1.4 ( $\alpha_{1F}$ )). Ca<sub>v</sub>1.2 und Ca<sub>v</sub>1.3 besitzen eine vergleichbare Ionenselektivität, Inaktivierungskinetik und Dihydropyridin (DHP)–Sensitivität.

Die HVA Kalziumkanäle öffnen sich bei Membranpotentialen zwischen –50 mV (z.B. Ca<sub>v</sub>1.3: Cochlea (Koschak et al., 2001)) und größer –30 mV (z.B. Ca<sub>v</sub>1.2: Herz (Hofmann et al., 1999)). Der darauf folgende Kalziumstrom in die Zelle führt zu einem deutlichen Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration.

Im Herzen und in der glatten Muskulatur ist der vorherrschende L-Typ Kanal der Ca<sub>v</sub>1.2 (Mikami et al., 1989; Welling et al., 1997; Moosmang et al., 2003). Auch für den Ca<sub>v</sub>1.3 wurde eine Expression in unterschiedlichen Geweben gezeigt (Yaney et al., 1992; Takimoto et al., 1997; Bohn et al., 2000;

Platzer et al., 2000). Es ist jedoch nach wie vor unklar, welche physiologischen Funktionen den einzelnen L-Typ Kalziumkanälen zukommen.

In einigen Arbeiten wurde gezeigt, dass sie bei der Muskelkontraktion, der Transmitterfreisetzung an Synapsen, der Insulinsekretion im Pankreas und der Blutdruckregulation eine entscheidende Rolle spielen (Tanabe et al., 1988; Tsien et al., 1991). Des Weiteren sind die *high voltage* aktivierten Kalziumkanäle an einigen Erbkrankheiten beteiligt. So soll z.B. dem  $Ca_v1.2$  eine Beteiligung am Timothy-Syndrom zukommen (Splawski et al., 2004), dem  $Ca_v1.4$  an der stationären Nachtblindheit (Naylor et al., 2000) oder dem  $Ca_v2.1$  an der familiären hemiplegischen Migräne (Tottene et al., 2002). Eine knappe Zusammenfassung über alle genetischen Erbkrankheiten, die durch Mutationen in Kalziumkanälen auftreten, findet sich bei Bidaud (Bidaud et al., 2006).



**Abbildung 1.1: Aufbau eines *high voltage* aktivierten Kalziumkanals**  
Erläuterungen siehe Text.

Das *CACNA1C* Gen wird unter anderem im Herz, im glatten Muskel und im Gehirn exprimiert. Das Gen umfasst circa 150 kb und ist aus 44 invarianten und mehr als 6 alternativen Exons zusammengesetzt (Soldatov, 1994; Liao et al., 2005). Im Herzen, im glatten Muskel und im Gehirn wurden auch unterschiedliche Spleißformen des *CACNA1C* Gens gefunden. Die Spleißformen des kardialen (Mikami et al., 1989) und des glatt-muskulären (Biel et al., 1990) Kalziumkanals unterscheiden sich am Aminotermus, in den Transmembransegmenten IS6 und IVS3 und in einem Insert in der intrazellulären Schleife zwischen Domäne I und II.

#### 1.1.1.2 *Low voltage* aktivierte Kalziumkanäle

Die LVA Kalziumkanäle werden vorrangig im Gehirn exprimiert (Tabelle 1.1) und spielen dort unter anderem eine Rolle bei der Ausbildung von Aktionspotentialen in neuronalen Netzwerken (Magee and Johnston, 1995; McCormick, 2005). Auch an der Mechanozeption (Shin et al., 2003), der Relaxation von Koronargefäßen (Chen et al., 2003), der Regulation des Schlaf/Wachrhythmus (Anderson et al., 2005) und im Sinusknoten (Mangoni et al., 2006) sind die *low voltage* aktivierten Kalziumkanäle beteiligt.

Die LVA Kanäle öffnen schon bei einer Depolarisation auf  $-60$  bis  $-40$  mV und inaktivieren sehr schnell. Sie leiten  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Ba}^{2+}$  in etwa gleich gut bei einer relativ geringen Einzelkanalleitfähigkeit von 5 bis 9 ps (Carbone et al., 1997).

## 1.2 Inaktivierung des *CACNA1C* Gens ( $\text{Ca}_v1.2$ ) in Mäusen

### 1.2.1 Totaler Knockout (Nullmutante) des *CACNA1C* Gens

Durch zufällige Integration von Transgenen oder die gezielte Veränderung von Genen durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) besteht die Möglichkeit, das Mausgenom zu modifizieren und dadurch die Funktion einzelner Gene zu untersuchen (Jaenisch, 1988; Capecchi, 1994). Da diese Methoden eine permanente genetische Modifikation in der Keimbahn der Maus erzeugen, führt das konventionelle Ausschalten eines Gens (Knockout) in allen Zellen des Tieres während der prä- und postnatalen Entwicklung zum Verlust der Genfunktion. Häufig führen solche Gen-Knockouts jedoch zu embryonaler Letalität oder einer stark reduzierten Lebenserwartung aufgrund schwerwiegender Defekte. Daher lässt sich meist die zeit- und zellspezifische Funktion eines Gens an diesen konventionellen Nullmutanten nicht analysieren.

Da die konventionelle Knockout-Mauslinie für das *CACNA1C* Gen, bei der durch Insertion einer Neomycin-Resistenz-Kassette im Exon 3 der Leserahmen von  $\text{Ca}_v1.2$  unterbrochen wurde und sich dadurch kein funktionsfähiger Kanal mehr bilden kann, zum Absterben der Embryonen vor Tag 14 *p.c.* führt (Seisenberger et al., 2000), musste eine andere Methode zur Generierung eines Knockout-Modells herangezogen werden.

### 1.2.2 Konditionaler Knockout des *CACNA1C* Gens

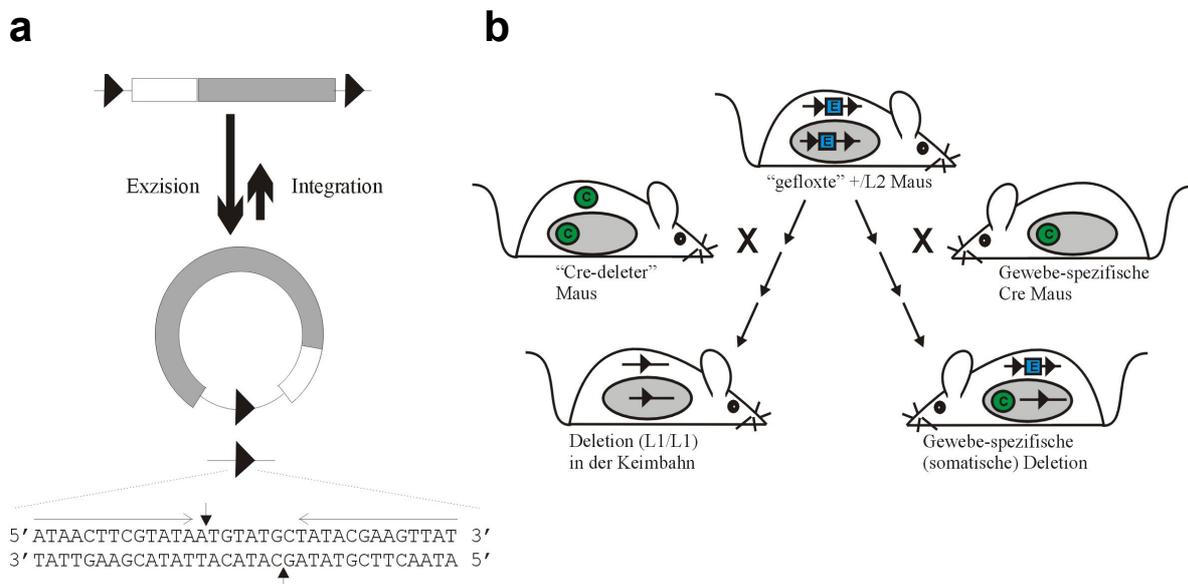
Um trotz des embryonal letalen Phänotyps der  $\text{Ca}_v1.2$  Nullmutanten die physiologische Funktion des  $\text{Ca}_v1.2$  analysieren zu können, sollten im Rahmen dieser Arbeit zwei Mauslinien mit Hilfe einer konditionalen Geninaktivierung generiert und analysiert werden.

Aus diesen Gründen wurde die konventionelle Knockout-Strategie mit einem Rekombinationssystem gekoppelt, das auf einem katalytischen Austausch zwischen zwei kurzen DNS-Erkennungssequenzen basiert. Das am häufigsten verwendete Rekombinationssystem ist das *Cre/loxP*-System, welches sich, obwohl die Cre-Rekombinase (*cyclization recombination*) viralen Ursprungs ist, auch in Säugerzellen als sehr effizient erwiesen hat. Es wird zur gezielten Modifikation von ES-Zellen oder Somazellen der Maus verwendet (Rajewsky et al., 1996).

Die Cre-Rekombinase ist ein 38 kD Protein, das aus dem Bakteriophagen P1 stammt. Das Enzym katalysiert die Rekombination zwischen zwei 34 bp *loxP*-(*locus of crossing over of P1*) Sequenzen. Abhängig von der Orientierung der *loxP*-Sequenzen und dem Ort ihrer Integration kann durch die Cre-vermittelte Rekombination eine Inversion, Exzision bzw. Integration oder Translokation von DNS erfolgen (Abbildung 1.2). Das *Cre/loxP*-Rekombinationssystem kann somit für eine Vielzahl von Genommodifikationen eingesetzt werden, wobei es *in vivo* am häufigsten zur Inaktivierung von Genen durch Cre-vermittelte Exzision *loxP*-flankierter („gefloxter“) DNS-Sequenzen verwendet wird (Nagy, 2000). Dazu werden *loxP*-Sequenzen entweder gezielt durch homologe Rekombination in ES-Zellen oder zufällig über ein konventionelles Transgen in das Chromosom eingeführt. Durch die Expression

von Cre kann dann eine Rekombination zwischen den eingefügten *loxP*-Sequenzen hervorgerufen werden.

Eine Rekombination kann in ES-Zellen (Gu et al., 1993), in befruchteten Eizellen (Araki et al., 1997) oder über die transiente Cre-Expression ebenso wie über Cre-transgene Mäuse (Lakso et al., 1992; Orban et al., 1992) erfolgen. Wird in Mäusen die Cre-Rekombinase in einem frühen Entwicklungsstadium oder in den Keimzellen exprimiert, so kann die rekombinierte DNS über die Keimbahn weitergegeben werden (*germ line transmission*). Hierfür werden sogenannte *Cre-deleter* Mäuse mit „gefloxten“ Tieren verkreuzt, was zur Folge hat, dass es zu einer Exzision der *loxP*-flankierten DNS-Sequenzen aus dem Genom der Mäuse kommt. Dadurch können „gefloxte“ Markergene entfernt oder Nullmutanten erzeugt werden (Rajewsky et al., 1996).



**Abbildung 1.2: Das Cre/*loxP*-Rekombinationssystem**

a) Cre verursacht die Rekombination zwischen zwei 34 bp langen *loxP*-Erkennungssequenzen (Dreiecke). Die *loxP*-Sequenz besteht aus zwei 13 bp Palindromen (waagrechte Pfeile), die eine asymmetrische 8 bp *core* Region flankieren. Die Phosphodiesterbindungen, die Cre spaltet, sind durch senkrechte Pfeile gekennzeichnet.

b) Rekombination zwischen *loxP*-Sequenzen *in vivo* mittels Cre-transgenen Mäusen. Links: Durch Kreuzungen mit einer *Cre-deleter* Maus und mehreren Verpaarungsschritten lässt sich ein Nullallel oder eine Deletion bereits in der Keimbahn erzeugen. Rechts: Durch Kreuzungen mit Mäusen mit gewebespezifischer Expression von Cre (graues Oval) lassen sich gewebespezifische (somatische) Deletionen erzeugen. +: Wildtyp Allel; L: „gefloxtes“ Allel mit zwei *loxP*-Stellen; L1: deletiertes Allel mit einer *loxP*-Stelle.

In einigen Fällen wäre es jedoch wünschenswert, wenn die Modifikation des Genoms konditional, also nur in einem bestimmten Zelltyp und zur gewünschten Zeit während des Lebens der Tiere, induzierbar wäre. Diese konditionale somatische Mutagenese lässt sich z.B. durch gewebespezifische Expression der Cre-Rekombinase mittels geeigneter Promotoren bzw. durch die Verwendung Ligandenabhängiger Cre-Rekombinasen erreichen (Abbildung 1.2) (Feil et al., 1996; Brocard et al., 1997).

Das Problem bei vielen transgenen Cre-Mauslinien besteht aber darin, dass die Rekombination zu unerwünschten Zeitpunkten oder in unerwünschten Geweben stattfindet (*leakiness*) oder dass Cre mosaik exprimiert wird. Wenn also die Cre-Rekombinase bereits während der frühen embryonalen Entwicklung ektopisch aktiv ist, kann die DNS in den meisten Zellen des adulten Tieres rekombiniert sein. Auch wenn die Rekombination nur in einem kleinen Teil der Zellen eines bestimmten Gewebes

stattfindet, erschwert dies die Analyse des Phänotyps. Andererseits könnte die Generierung von mosaiken Mutationen in einigen Fällen auch von Vorteil sein, da sie sich zur Etablierung von Krankheitsmodellen wie z.B. Krebs eignen könnten. Um die eben erwähnten Probleme ausschließen zu können, ist daher eine detaillierte Analyse der verwendeten transgenen Cre-Mauslinie unerlässlich.

Transgene Mauslinien, welche die Cre-Rekombinase gewebespezifisch exprimieren (Abbildung 1.2), haben jedoch zweifellos zur Aufklärung vieler biologischer Fragestellungen beigetragen (Garcia-Otin and Guillou, 2006) und durch die selektive Cre-vermittelte Geninaktivierung in einem gewünschten Gewebe können Probleme der konventionellen Gendelektion wie embryonale Letalität umgangen werden.

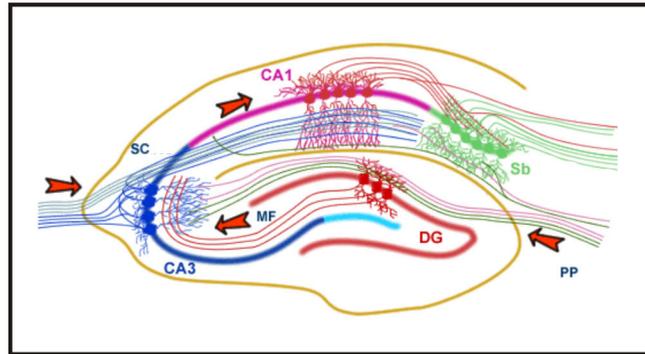
### 1.3 Die Funktion des $Ca_v1.2$ im Zentralnervensystem

Ein wichtiges Anliegen der modernen Neurobiologie stellt die Aufklärung von kognitiven Phänomenen dar, wie z.B. dem Lernen und Gedächtnis, beginnend mit den molekularen Mechanismen bis hin zum Verhalten.

#### 1.3.1 Der $Ca_v1.2$ im Hippokampus und der Amygdala

Ein phylogenetisch älterer Teil des Cortex, die Hippokampus-Formation, ist für Lernen und Gedächtnis von großer Bedeutung. Diese Formation umfasst neben dem Hippokampus selbst den *Gyrus dentatus* und das *Subiculum*. Der Hippokampus ist eine bilateral angelegte, symmetrische Hirnstruktur im medialen Bereich des *Lobus temporalis* und wird dem limbischen System zugeordnet. Diese Gehirnregion unterscheidet sich vom Neocortex durch seinen nur dreischichtigen Aufbau und seine strukturelle Organisation in Lamellen. Die größte Neuronenpopulation im Hippokampus stellen die Pyramidenzellen dar, deren Somata im *Stratum pyramidale* der CA3 bis CA1 Region lokalisiert sind. Die apikalen Dendritenbäume ragen in das *Stratum radiatum*, während die basalen Dendriten im *Stratum oriens* liegen. Die unipolaren Körnerzellen bilden mit ihren Somata das *Stratum granulosum* im *Gyrus dentatus*. Die Dendriten der Körnerzellen liegen im *Stratum moleculare*.

Im Hippokampus gibt es einen sehr wichtigen Signalweg, den sogenannten *trisynaptic pathway*, der über drei exzitatorische Bahnen verfügt (Abbildung 1.3). Die erste exzitatorische Bahn, der *Tractus perforans*, bilden efferente Fasern aus dem entorhinalen Cortex, die auf die Dendriten der Körnerzellen in der Molekularschicht verschalten. Die zweite exzitatorische Bahn projiziert über Axone der Körnerzellen im *Gyrus dentatus*, die sogenannten Moosfasern, zum proximalen Ansatz der apikalen Dendriten von Pyramidenzellen in der CA3 Region. Die Axone dieser Zellen verzweigen sich im *Stratum oriens*. Die meisten Ausläufer, sogenannte Schaffer Kollaterale kreuzen die Zellschicht und verlaufen entlang des *Stratum radiatum* zur CA1 Region, wo sie auf den apikalen Dendritenbaum der Pyramidenzellen verschalten. Diese Synapsen bilden die dritte exzitatorische Bahn im Hippokampus, den Schaffer Kollateral Signalweg (Trommald et al., 1995).



**Abbildung 1.3: Zytoarchitektur des Hippokampus**

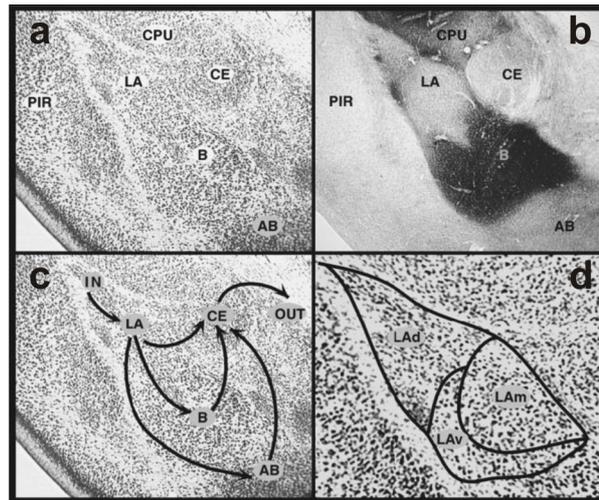
Gezeigt ist die schematische Darstellung eines transversalen Schnitts durch den Hippokampus mit allen *inputs* und *outputs*. Der Hippokampus erhält über den entorhinalen Cortex (EC) Signale, die mit dem *Gyrus dentatus* (DG) und den CA3 Pyramidenzellen über den sogenannten *perforant path* (PP) eine Verknüpfung eingehen. Die CA3 Neuronen sind auch mit dem DG über die *mossy fibres* (MF) verknüpft. Die *mossy fibres* wiederum senden Axone zu den CA1 Pyramidenzellen über den sogenannten Schaffer Kollateral Signalweg (SC). Die CA1 Neuronen bekommen auch direkt vom PP Signale zugesandt, die sie über ihre Axone zum *Subiculum* (Sb) weitergeben. Diese Neuronen senden ihrerseits den hippokampalen Haupt-*output* zum EC und somit bildet sich eine Schleife in diesem System. Abbildung wurde vereinfacht und stammt aus dem Internet: [www.bris.ac.uk](http://www.bris.ac.uk).

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass der Hippokampus eine wesentliche Rolle bei bestimmten Lern- und Gedächtnisleistungen spielt (Zola-Morgan et al., 1986; Mishkin and Appenzeller, 1987; Squire et al., 1988; Zola-Morgan et al., 1993; Whitlock et al., 2006) und es konnte in einem speziell entwickelten Verhaltenstest für Nagetiere, dem *Morris Water Maze Test*, belegt werden, welche entscheidende Rolle der Hippokampus besonders beim räumlichen Lernen spielt. Bilateral hippokampektomierte Ratten lernen in diesem Modell deutlich schlechter (Morris et al., 1982; Garrud et al., 1984). Man nimmt an, dass die Umgebung im Hippokampus durch sogenannte Platzzellen in der Art einer „kognitiven Landkarte“ repräsentiert wird (Muller, 1996). Neben dem räumlichen Lernen scheint der Hippokampus 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).

Eine weitere bedeutsame Hirnstruktur für Lernen und Gedächtnis stellt neben dem Hippokampus der sogenannte Mandelkern (*Corpus amygdaloideum*; kurz: Amygdala) dar, ein Komplex aus ungefähr 12 Einzelkernen, der tief im *Lobus temporalis* liegt und ebenfalls dem limbischen System zugeordnet wird. Darüber hinaus ist das System afferent und efferent mit dem Hippokampus verknüpft.

Die Amygdala ist das Zentrum für emotionales Lernen und vor allem für die Bildung und Speicherung des Angst-Gedächtnisses verantwortlich (Maren, 1996; LeDoux, 1998). Diese Hirnstruktur bildet sowohl die anatomische als auch molekulare Basis für das sogenannte *conditioned fear*, einen etablierten Verhaltensversuch, der auf einer klassischen Konditionierung nach Pavlov (1927) beruht. Bei diesem Verhaltensversuch wird ein initial neutraler Stimulus (*conditioned stimulus*; CS; z.B.: Ton) mit einem biologisch relevanten Stimulus (*unconditioned stimulus*; US; z.B.: Stromschlag) zeitlich gepaart, was tiefgreifende Auswirkungen auf das Verhalten eines Tieres hervorrufen kann. In Zusammenhang mit dem *conditioned fear* sind besonders 4 Bereiche der Amygdala von Bedeutung: die lateralen (LA), die basalen (B), die akzessorisch basalen (AB) und die zentralen (CE) Kerne und alle Verknüpfungen zwischen ihnen. In diesem System projizieren LA auf B, AB und CE (Abbildung 1.4).

## Einleitung



### Abbildung 1.4: Die Kernregionen der Amygdala und ihre Signalwege

Dargestellt sind die für das *conditioned fear* bedeutenden Kerne: lateraler (LA), basaler (B), akzessorisch basaler (AB) und zentraler (CE) Nucleus. Der Vergleich zwischen der Nissl Färbung (a) und der Azetylcholinesterase Färbung (b) hilft bei der Identifizierung der einzelnen Kernregionen. Die Hauptsignalwege verbinden LA, B, AB und CE (c). In d) ist eine Vergrößerung des LA gezeigt, die verdeutlichen soll, dass jeder Kern noch in Sub-Kerne unterteilt ist.

CPU: Putamen; PIR: piriformer Cortex.

Abbildung aus: "Emotion circuits in the brain"; LeDoux, 2000.

Auditorische *inputs* erreichen die LA entweder über den auditorischen Thalamus oder den auditorischen Cortex, wobei ein einfacher akustischer Stimulus über beide Signalwege verschaltet werden kann (Romanski and LeDoux, 1992). Da der cortikale Signalweg jedoch langsamer „lernt“ als der thalamische, lässt sich vermuten, dass Plastizität in der Amygdala initial über den thalamischen Signalweg auftritt (Quirk et al., 1995; Quirk et al., 1997). Damit überhaupt eine Konditionierung stattfinden kann, müssen die Signalwege, die den CS und US vermitteln, zeitgleich im Gehirn der Tiere terminieren. Dass der CS in Kernbereichen der Amygdala ankommt, wurde bereits gezeigt. Es stellt sich nun aber die Frage, ob dies auch für den US gilt. Thalamische Regionen, die über Afferenzen des spino-thalamischen Traktes versorgt werden, projizieren sehr wohl auf die LA (Ledoux et al., 1987; LeDoux et al., 1990). Darüber hinaus können Zellen in der LA auf nozizeptive Stimulation ansprechen (Romanski et al., 1993; Romanski and LeDoux, 1993). Somit sollte eine Konditionierung (Assoziation von CS und US) auf molekularer Ebene in der Amygdala erfolgen können.

Wie rufen nun die in der Amygdala eintreffenden Signalwege das typische Angst-Verhalten in den Tieren hervor? Hierfür projizieren Neuronen des zentralen Nucleus zu Regionen des Hirnstamms, welche für die Erzeugung der Angstreaktionen sorgen (Aggleton et al., 1992). Bei einer Beschädigung des CE kommt es folglich auch zu einer gestörten Angst-Antwort (Kapp et al., 1979).

### 1.3.1.1 Elektrophysiologische Grundlagen

Im Hippokampus konnte erstmals gezeigt werden, dass Veränderungen in der Stärke der synaptischen Übertragung potentielle Mechanismen für Lernen und Gedächtnis darstellen (Bliss and Lomo, 1973; Chen and Tonegawa, 1997; Carey and Lisberger, 2002).

Zwei der wichtigsten Veränderungen sind: 1. die aktivitätsabhängige, langanhaltende Verstärkung der synaptischen Übertragung, die auch als Langzeitpotenzierung (LTP) bezeichnet wird und 2. die Verminderung dieser Stärke, die Langzeitdepression (LTD).

Bei diesen beiden Prozessen handelt es sich um universelle Phänomene der synaptischen Übertragung, die *in vivo* und *in vitro* durch Reizung präsynaptischer Fasern induziert werden können. Eine besonders stabile LTP kann in den Pyramidenzellen der CA1 Region des Hippokampus erzeugt werden, indem die präsynaptischen Schaffer Kollateralen hochfrequent gereizt werden. Auf molekularer Ebene kommt es zu einem erhöhten Kalziumeinstrom über N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptoren (NMDAR) und dadurch zu einem massiven Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration in der Postsynapse (Bliss and Collingridge, 1993).

Neben dieser NMDAR-abhängigen Langzeitpotenzierung existiert jedoch auch eine NMDAR-unabhängige LTP, die durch den  $Ca^{2+}$ -Einstrom über postsynaptische  $Ca_v1.x$  Kanäle hervorgerufen wird (Grover and Teyler, 1990; Grover, 1998; Morgan and Teyler, 1999).

Interessanterweise findet man bei der LTP wie beim Gedächtnis eine Kurzzeit- (D (*decremenatl*)-LTP, 1-3 h) und eine Langzeitform (L (*longlasting*)-LTP, > 3 h). Studien haben ergeben, dass zwar L-LTP, nicht aber D-LTP mit CRE (*cAMP response element*)-regulierter Genexpression verschaltet ist (Impey et al., 1996). Weiterhin wurde gezeigt, dass L-LTP im Gegensatz zu D-LTP unabhängig von den NMDAR ist (Grover and Teyler, 1990; Aniksztejn and Ben-Ari, 1991; Huang and Malenka, 1993; Hanse and Gustafsson, 1995), aber stark von der Aktivität der L-Typ Kalziumkanäle abhängt (Impey et al., 1996).

In letzter Zeit häufen sich die Befunde, dass es auch in anderen Hirnarealen möglich ist, LTP und LTD zu messen. Hierunter fällt insbesondere die Amygdala, für die ebenfalls eine NMDA-Rezeptor-abhängige LTP und LTD im kortikal-amygdalären Signalweg gezeigt werden konnte (Chapman et al., 1990; Huang and Kandel, 1998). Besonderes Interesse gilt aber vor allem der LTP des thalamo-amygdalären Signalweges. Für diese LTP wurde postuliert, dass es zwar postsynaptisches Kalzium benötigt, dieses Kalzium jedoch nicht über NMDA-Rezeptoren in die Zelle einströmt, sondern hauptsächlich über L-Typ Kalziumkanäle (Weisskopf et al., 1999). Somit existieren auch in der Amygdala zwei unterschiedliche Formen von LTP: eine NMDAR-abhängige und eine NMDAR-unabhängige Komponente.

### 1.3.1.2 Molekulare Grundlagen

Es besteht ein reges Interesse an der Aufklärung der Mechanismen, die für die langfristigen Veränderungen der synaptischen Übertragung eine Rolle spielen. Die genaue Kenntnis dieser Mechanismen bietet eventuell die Möglichkeit, einen Einblick in die molekularen Prozesse zu gewinnen, die der Gedächtnisbildung sowohl beim lebenden Tier als auch beim Menschen zugrunde liegen (Kandel, 2001; Martin and Morris, 2002).

Darüber hinaus gibt es wesentliche Hinweise darauf, dass sowohl die synaptische Plastizität im Hippokampus und der Amygdala als auch verschiedene Formen des lernbezogenen Verhaltens von der Aktivierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden und der daraus resultierenden Stimulierung der Gentranskription und der *de novo* Proteinbiosynthese abhängig sind, z.B. über das *cAMP response element binding protein* (CREB) (English and Sweatt, 1997; Atkins et al., 1998; Hardingham et al., 2001; Kandel, 2001; Wu et al., 2001; Pittenger et al., 2002; Thomas and Huganir, 2004). Vor allem für den Transkriptionsfaktor CREB konnte gezeigt werden, dass er bei der Ausbildung des Langzeitgedächtnisses sowohl in Invertebraten als auch Vertebraten eine wichtige

Rolle spielt (Dash et al., 1990; Bourtchuladze et al., 1994; Josselyn et al., 2001). Die Aktivierung von CREB erfolgt hauptsächlich über zwei Signalkaskaden: den cAMP-Signalweg und den Kalzium-Calmodulin-abhängigen Proteinkinase Weg (Deisseroth et al., 1996; West et al., 2001).

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 Hippokampus notwendig ist (Bito et al., 1996; Kandel, 2001). In der CA1 Region des Hippokampus wurden Erhöhungen der postsynaptischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration bisher hauptsächlich mit  $Ca^{2+}$ -Einstrom über NMDARs in Verbindung gebracht (Kovalchuk et al., 2000; Sabatini and Svoboda, 2000). Obwohl der  $Ca^{2+}$ -Einstrom über L-Typ Kalziumkanäle lediglich einen kleinen Anteil des postsynaptischen  $Ca^{2+}$ -Transienten zu bilden scheint, ist der von L-Typ Kalziumkanälen 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 ebenfalls 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 Kanäle eine langanhaltende Phosphorylierung von CREB, eine Expression der CRE-abhängigen Gene in den Neuronen des Hippokampus und eine Induktion NMDAR-unabhängiger L-LTP bewirken (Impey et al., 1996; Dolmetsch et al., 2001; Moosmang et al., 2005b).

Auch in der Amygdala scheinen die Verhältnisse ähnlich zu sein wie im Hippokampus. Durch einen Anstieg der Kalziumkonzentration kommt es ebenfalls zur Aktivierung verschiedener Kalzium-abhängiger Signalkaskaden, die sowohl für die Ausbildung des Kurzzeit- als auch des Langzeitgedächtnisses eine wichtige Rolle spielen (Schafe et al., 2000; Schafe and LeDoux, 2000). Bei diesen Prozessen scheint auch CREB beteiligt zu sein (Josselyn et al., 2001). Es bleibt jedoch die Frage offen, welche Rolle der L-Typ Kalziumkanal in diesem System spielt.

Von den beiden Isoformen des L-Typ Kalziumkanals,  $Ca_v1.2$  und  $Ca_v1.3$ , die in den Pyramidenzellen des Hippokampus und der Amygdala identifiziert wurden, stellt sich die  $Ca_v1.2$ -Isoform als der absolut dominante Subtyp dar (Hell et al., 1993; Davare et al., 2001; Sinnegger-Brauns et al., 2004; Pinard et al., 2005; Hetzenauer et al., 2006). Außerdem führt eine Deletion des *CACNA1D* Gens zu keinen offensichtlichen Defekten der LTP im Hippokampus (Clark et al., 2003). Darüber hinaus ist der  $Ca_v1.2$  im Gegensatz zum  $Ca_v1.3$  nicht nur im Soma der Neuronen des Hippokampus und der Amygdala 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; Pinard et al., 2005).

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Funktion des  $Ca_v1.2$  L-Typ Kalziumkanals für Lernen und Gedächtnis zu klären.

Hierzu sollten für das ZNS zwei Modelle etabliert werden: zum einen sollte unter Zuhilfenahme der „geflochten“  $Ca_v1.2$  Tiere zusammen mit verschiedenen Cre-transgenen Mauslinien ein Cortex- und Hippokampus-spezifisches Knockoutmodell und zum anderen ein komplett Gehirn-spezifisches Knockoutmodell erstellt werden.

Anhand dieser beiden Knockoutmodelle sollte nach einer ausführlichen molekularbiologischen Charakterisierung der Tiere geklärt werden, welche Rolle der  $Ca_v1.2$  bei der Gedächtnisbildung spielt, in welcher Art und Weise der  $Ca_v1.2$  in die verschiedenen Formen der synaptischen Plastizität involviert ist und welche Transkriptionsfaktoren und Gene in den untersuchten Gehirnarealen  $Ca_v1.2$ -abhängig aktiviert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

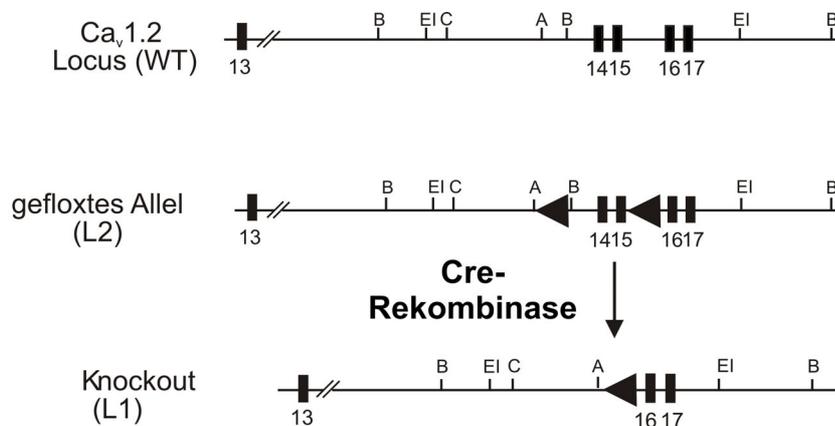
Alle Versuche wurden gemäß den Tierschutzrichtlinien durchgeführt und von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

Der C57Bl/6N Inzuchtstamm wurde von der Firma Charles River, Sulzfeld, bezogen.

#### 2.1.1 CACNA1C Mäuse

Durch Cre-vermittelte Rekombination in embryonalen Stammzellen wurden zwei unterschiedliche *CACNA1C* ( $Ca_v1.2$ ) Allele hergestellt (L1 und L2 Allel; Abbildung 2.1). Im L2 Allel („gefloxtes“ Allel) sind die Exone 14 und 15 des *CACNA1C* Gens, die für die IIS5 und IIS6 Transmembransegmente und den *pore loop* in der Domäne II des  $Ca_v1.2$  Kanals kodieren, durch zwei gleich orientierte 34 bp lange *loxP*-Sequenzen flankiert. Damit kann dieses Allel trotz Einbringen der beiden *loxP*-Sequenzen für ein funktionelles  $Ca_v1.2$  Protein kodieren.

Im L1 Allel wurden die Exone 14 und 15 entfernt. Zusätzlich zu der Deletion der beiden Exone kommt es zu einem falschen Spleißen von Exon 13 auf ein 5' von Exon 16 gelegenes Intron und dadurch zur Erzeugung eines vorzeitigen Stopcodons im Exon 16 (*loss of function* Allel) (Seisenberger et al., 2000).



**Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der *CACNA1C* Allele**

Dargestellt sind das Wildtyp (WT), das Knockout (L1) und das konditionale *CACNA1C* Allel (L2). Die Zahlen entsprechen den Exonnummern. Durch eine Cre-Rekombinase kommt es zur Deletion der Exone 14 und 15. Die Restriktionsstellen entsprechen A, *Acc65I*; B, *BamHI*; C, *ClaI*; EI, *EcoRI*.

#### 2.1.2 Cre Mäuse

Die verwendeten Cre Mauslinien sind im Anhang in Tabelle 6.6 aufgeführt.

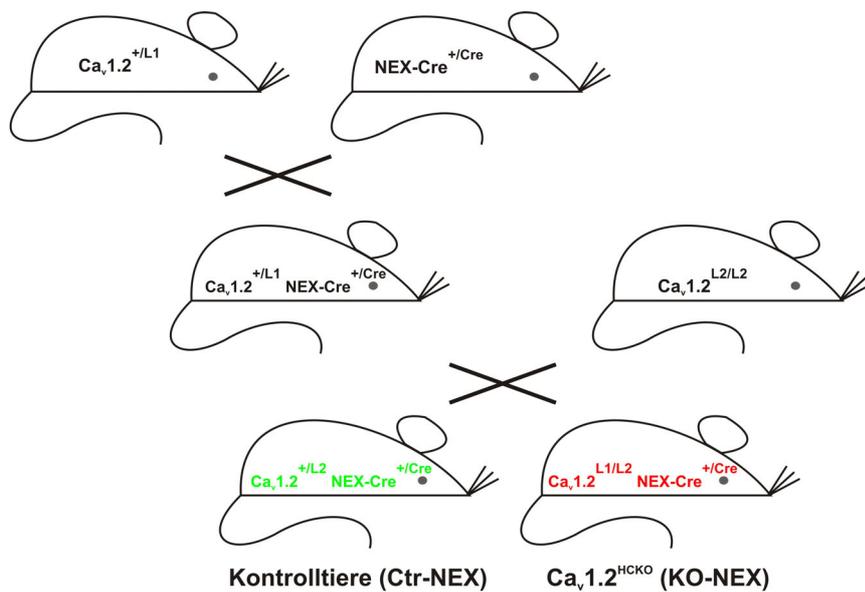
Mit Hilfe von zwei Linien dieser Cre Mäuse konnten die transgenen Linien erzeugt werden, welche die Inaktivierung des *CACNA1C* Gens in unterschiedlichen Gehirnregionen tragen.

### 2.1.3 CRE-LacZ Reporter Mäuse

Bei den CRE-(*cAMP response element*) LacZ Reporter Mäusen handelt es sich um transgene Tiere, die durch Mikroinjektion des CRE-LacZ Konstruktes in C57Bl6/SJL F2 Blastozysten generiert wurden (Impey et al., 1996). Das Konstrukt setzt sich aus einem minimalen RSV Promotor, der die Expression des  $\beta$ -Galaktosidase Gens steuert und sechs *upstream* gelegenen CRE Sequenzen zusammen (Meinkoth et al., 1990).

Mit Hilfe dieser Mauslinie kann die CRE-vermittelte Genexpression in verschiedenen Gehirnarealen untersucht werden.

### 2.1.4 Konditional *CACNA1C* defiziente Mäuse – Zuchtschema 1



#### Abbildung 2.2: Konditionale Inaktivierung des *CACNA1C* Gens im Hippokampus und Neocortex

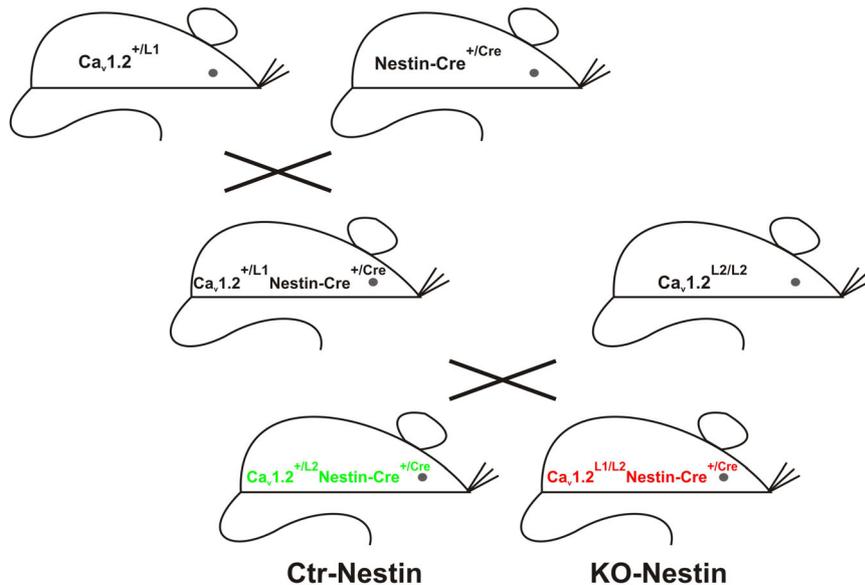
Um die transgene Linie mit der Inaktivierung des *CACNA1C* ( $Ca_v1.2$ ) Gens im Hippokampus und Neocortex zu erzeugen ( $Ca_v1.2^{HCKO}$ ), wurden zunächst  $Ca_v1.2^{+/L1}$  Tiere (Mäuse, die ein L1 und ein Wildtypallel tragen) mit Tieren verkreuzt, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des NEX Promotors exprimieren (Schwab et al., 2000). Die aus dieser Verpaarung resultierenden  $Ca_v1.2^{+/L1} NEX-Cre^{+/Cre}$  Mäuse wurden im Anschluss mit  $Ca_v1.2^{L2/L2}$  Tieren zusammengesetzt (Mäuse, die homozygot für das L2 Allel sind), um die  $Ca_v1.2^{L1/L2} NEX-Cre^{+/Cre}$  ( $Ca_v1.2^{HCKO}$ ) und  $Ca_v1.2^{+/L2} NEX-Cre^{+/Cre}$  Tiere (Kontrolltiere) zu erhalten. Als genetischer Hintergrund dieser Tiere diente der C57Bl/6N Stamm. Beide transgenen Linien waren lebensfähig und zeigten keine offensichtlichen Auffälligkeiten.

Die CRE-LacZ Reporterlinie (2.1.3) wurde zusätzlich für einige Experimente mit den  $Ca_v1.2^{HCKO}$  und Kontrolltieren gekreuzt.

Die Tiere wurden unter einem 12:12 h Licht/Dunkelzyklus gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter *ad libitum*. Die Nachkommen aus einer Verpaarung wurden im Alter von 7-14 Tagen durch PCR Analyse der DNS aus Schwanzgewebe (s. 2.4.11) genotypisiert, im Alter von 4 Wochen von den Müttern abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt.

Für alle Versuche wurden Geschwistertiere der jeweiligen Knockout- und Kontrollgenotypen im Alter von 8-15 Wochen verwendet.

### 2.1.5 Konditional *CACNA1C* defiziente Mäuse – Zuchtschema 2



**Abbildung 2.3: Konditionale Inaktivierung des *CACNA1C* Gens im gesamten Gehirn**

Um die transgene Linie mit der Inaktivierung des *CACNA1C* ( $Ca_v1.2$ ) Gens in allen Gehirnregionen zu erzeugen, wurden zunächst  $Ca_v1.2^{+/L1}$  Tiere (Mäuse, die ein L1 und ein Wildtypallel tragen) mit Tieren verkreuzt, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Nestin Promotors exprimieren (Tronche et al., 1999). Die aus dieser Verpaarung resultierenden  $Ca_v1.2^{+/L1}$  Nestin-Cre<sup>+/Cre</sup> Mäuse wurden im Anschluss mit  $Ca_v1.2^{L2/L2}$  Tieren zusammengesetzt (Mäuse, die homozygot für das L2 Allel sind), um die  $Ca_v1.2^{L1/L2}$  Nestin-Cre<sup>+/Cre</sup> (KO-Nestin) und  $Ca_v1.2^{+/L2}$  Nestin-Cre<sup>+/Cre</sup> Tiere (Ctr-Nestin) zu erhalten. Als genetischer Hintergrund dieser Tiere diente der C57Bl/6N Stamm. Beide transgenen Linien waren lebensfähig und zeigten keine offensichtlichen Auffälligkeiten.

## 2.2 Verhalten

Für alle Verhaltensversuche wurden männliche Geschwistertiere der jeweiligen Kontroll- und Knockoutgenotypen im Alter von 8-15 Wochen verwendet. Der Versuchsleiter war bei den jeweiligen Experimenten in Bezug auf den Genotyp verblindet.

### 2.2.1 *Open field Test*

Das Testfeld bestand aus einem Plastikboden (63 x 63 cm), der durch schwarze Linien in 49 Quadrate unterteilt und von einer 5 cm hohen Plastikwand umgeben war. Die 25 Quadrate, die nicht an die Wand angrenzten, wurden als „innere Quadrate“ bezeichnet, die übrigen als „äußere Quadrate“. Mäuse, die dem Test gegenüber naiv waren, wurden an 4 aufeinander folgenden Tagen fünfmal

täglich (mit je einer Stunde Pause zwischen den Versuchen) in ein Eckquadrat des Feldes gesetzt. Während der 5 minütigen Explorationszeit der Tiere wurde die Anzahl der beschrifteten Quadrate aufgezeichnet. Sobald beide Vorderpfoten ein Quadrat berührten, wurde dieses Quadrat als betreten registriert.

### 2.2.2 Rotarod Untersuchung

Die Fähigkeit der Tiere, auf einem rotierenden Zylinder zu balancieren, wurde mit Hilfe eines computergesteuerten Rotarods (TSE) untersucht. Die Ca<sub>v</sub>1.2 NEX-Cre Versuchstiere wurden dreimal täglich über einen Zeitraum von 5 Tagen getestet. Zu Beginn einer jeden Sitzung wurden die Mäuse für 30 Sekunden auf den ruhenden Zylinder gesetzt. Daraufhin wurde die Rotation von 5 auf 60 Umdrehungen pro Minute (rpm) beschleunigt. Die Zeit, während der sich die Tiere auf dem Zylinder halten konnten, wurde elektronisch aufgezeichnet.

Die Ca<sub>v</sub>1.2 Nestin-Cre Versuchstiere wurden vier Tage in Folge getestet. Dabei wurde der Versuch an den ersten drei Trainingstagen nach demselben Tagesprotokoll und zur selben Tageszeit durchgeführt. An jedem Versuchstag wurden die Mäuse insgesamt viermal täglich getestet. Zu Beginn einer jeden Sitzung wurden die Mäuse für 30 Sekunden auf den ruhenden Zylinder gesetzt. Danach wurde die Umdrehungsgeschwindigkeit von 5 auf 44 rpm innerhalb von 300 Sekunden beschleunigt. Am vierten Tag wurde das Programm des Rotarods umgestellt, um die erlernte Lauffähigkeit in einer neuen „Programmier-Umgebung“ zu testen. Die Mäuse mussten nun bei gleich bleibenden Geschwindigkeiten, welche in den Schritten 44 – 33 – 31 – 24 – 18 – 11 und 5 rpm gestaffelt wurden, jeweils 2 Minuten laufen. Die Zeiten, während der sich die Tiere auf dem Zylinder halten konnten, wurden elektronisch aufgezeichnet.

### 2.2.3 Wasserlabyrinth

Ein rundes Schwimmbecken (80 cm Durchmesser, 30 cm Höhe, aus weißem Plastik) wurde bis zu einer Tiefe von 24 cm mit Wasser gefüllt (21 ± 1°C; undurchsichtig durch die Zugabe von Deckweiß). Am Außenrand des Beckens waren 8 Startboxen (10 x 10 x 26 cm) angebracht, die ebenfalls mit Wasser gefüllt und mit Schiebetüren versehen waren. Von diesen Boxen aus konnten die Tiere nach Hochziehen der Türe in das Wasserlabyrinth schwimmen.

Es wurden 2 identisch aussehende, runde Plattformen mit weißer Oberfläche und schwarzem Rand verwendet (10 cm Durchmesser, ca. 5 cm über die Wasseroberfläche ragend). Eine dieser Plattformen war fix vor einer der Startboxen angebracht und konnte nicht untergehen (*correct platform*); die andere Plattform konnte jede beliebige Position im Becken einnehmen und sank, sobald ein Tier versuchte auf sie zu klettern (*incorrect platform*).

Am Tag vor Versuchsbeginn wurden die Mäuse in einem rechteckigen Becken an das Wasser gewöhnt.

#### 2.2.3.1 Wasserlabyrinth – diskriminatorischer Test

Bei dieser Variante des Wasserlabyrinths (Morris et al., 1986a; Arns et al., 1999; Kleppisch et al., 2003) mussten die Tiere die fixe Plattform im Becken mit Hilfe von verschiedenen Wegweisern, die sich deutlich sichtbar im Raum befanden, auffinden (*correct choice*). Die zweite gleich aussehende,

jedoch sinkbare Plattform durfte hingegen nicht betreten werden (*incorrect choice*) (Abbildung 2.4 a). Die sinkbare Plattform und die Startpositionen aus den Boxen wurden zwischen den Versuchsdurchgängen an pseudozufällig verteilte Positionen verschoben. Des Weiteren wurde die räumliche Beziehung zwischen den beiden Plattformen so gewählt, dass diese nicht Entscheidungen für eine Richtung bevorzugte und dass der mittlere Abstand der Start- und Zielpunkte über die Versuchstage konstant blieb.

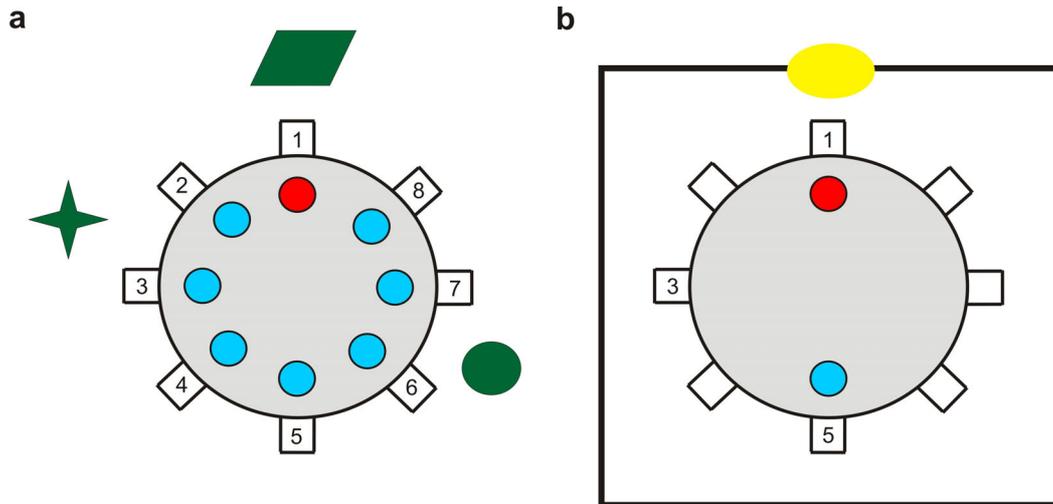
Ein Versuch wurde abgebrochen, sobald ein Tier nicht innerhalb von 60 Sekunden auf eine Plattform stieg. Bei einer *incorrect choice* wurden die Tiere per Hand auf die richtige Plattform gesetzt. Alle Tiere verblieben mindestens 10 Sekunden auf der korrekten Plattform, bevor sie in ihren Heimatkäfig zurückgesetzt wurden.

Mögliche proximale visuelle oder olfaktorische Wegweiser wurden zwischen den Durchgängen entfernt.

Das Lernverhalten wurde während der 5 initialen Sitzungen ermittelt (Tag 1-5). Die Anzahl der *correct choices* wurde als Maß für die Gedächtnisbildung verwendet; als zusätzlicher Parameter wurde, falls die richtige Plattform ausgewählt wurde, die *escape latency* (Zeit bis zum Auffinden der korrekten Plattform) aufgezeichnet. Um zu überprüfen, ob sich die Mäuse tatsächlich mit Hilfe der Wegweiser im Raum orientiert hatten, um die fixe Plattform zu finden, wurde eine anschließende *reversal* Sitzung durchgeführt. Hierbei wurde die stabile Plattform in den gegenüberliegenden Quadranten des Beckens gesetzt (Rv, Tag 12)

### 2.2.3.2 Wasserlabyrinth – *distal landmark* Test

Um Sehdefekte und Motivationsstörungen bei den untersuchten Tieren auszuschließen, wurde ein *distal landmark* Test durchgeführt. Hierfür wurde das gleiche Wasserlabyrinth verwendet, das unter Punkt 2.2.3.1 erläutert wurde (Abbildung 2.4 b). Allerdings wurde der Versuchsablauf folgendermaßen abgeändert: die Position der stabilen Plattform war durch einen deutlich sichtbaren „Wegweiser“ gekennzeichnet, der aus einem 20 cm<sup>2</sup> großen, hell erleuchteten Quadrat bestand und in 120 cm Entfernung vom Becken an der Wand angebracht war. Ansonsten war der komplette Raum (Wände und Decke) mit schwarzen Vorhängen ausgekleidet und auch abgedunkelt, um alle übrigen sichtbaren Wegweiser zu eliminieren. Die Position der sinkenden Plattform (gegenüber der stabilen Plattform) und der Startbox (zentriert zwischen den beiden Plattformen) wurde während des Versuchs nicht verändert.



**Abbildung 2.4: Aufbau des Wasserlabyrinths**

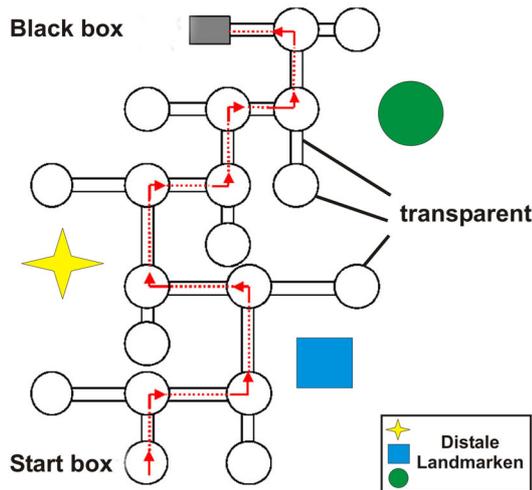
a) Diskriminatorisches Wasserlabyrinth. Mit Hilfe von distalen Landmarken (grün) konnten sich die Tiere im Raum orientieren und so die Lage der stabilen Plattform (rot) erlernen. Die sinkbare, falsche Plattform (blau) und die Startboxen wechselten während der Durchgänge in pseudozufälliger Reihenfolge.

b) *distal landmark* Test. Die Positionen der stabilen (rot) und sinkbaren (blau) Plattform sowie der Startbox blieben während der Durchgänge unverändert. Als distale Landmarke diente eine gut sichtbare Lichtquelle unmittelbar vor der stabilen Plattform.

#### 2.2.4 Labyrinthtest

Mit diesem Test kann ebenfalls das räumliche Lernverhalten von Mäusen untersucht werden. Das horizontale Labyrinth (Abbildung 2.5) besteht aus transparenten Plexiglasröhren (Länge 50 cm, Innendurchmesser 5 cm), die an den Kreuzungspunkten mit Wasser gefüllt sind (1 cm über dem Boden), um die Tiere am Ruhen zu hindern. Die Aufgabe der Tiere besteht darin, vom Startpunkt am einen Ende des Labyrinths zu ihrem abgedunkelten Heimatkäfig am gegenüberliegenden Ende zu finden. Als Motivation für die Tiere, den Test zu absolvieren, diente die Flucht aus den hell beleuchteten Plexiglasröhren. Nach jedem Durchgang wurden die Röhren zufällig untereinander ausgetauscht, um jegliche olfaktorischen Orientierungshilfen auszuschließen. Auf dem direkten Weg von der Startbox zum Heimatkäfig mussten die Mäuse minimal neun räumliche Entscheidungen treffen (Entscheidung an neun Kreuzungen). Eine falsche Entscheidung führte die Tiere in Sackgassen, in denen sie zum Umkehren gezwungen wurden. Die Lernleistung wurde als die Gesamtzahl der Röhren bestimmt, welche die Tiere auf ihrem Weg zum Ziel durchliefen (einschließlich aller wiederholt durchlaufenen Röhren).

Während einer 3-tägigen *pretraining* Phase wurden die Tiere dreimal täglich in ein Ende einer 50 cm langen Acrylröhre gesetzt und mussten diese Röhre in ihren abgedunkelten Heimatkäfig hinein durchlaufen.



**Abbildung 2.5: Der Labyrinthtest**

Dieser Test für räumliches Lernen besteht aus einem horizontalen Labyrinth aus transparenten Plexiglasröhren.

### 2.2.5 Conditioned fear Test

Seit Pavlov (Pavlov and Anrep, 1927) ist bekannt, dass ein initial neutraler Stimulus (*conditioned stimulus*; CS), der mit einem biologisch relevanten Stimulus (*unconditioned stimulus*; US) zeitlich gepaart wird, tief greifende Auswirkungen auf das Verhalten eines Tieres hervorrufen kann. Beim *conditioned fear* Test wird ein solcher CS (Sinus-Ton, 9 kHz, 80 dB) mit einem US (milder Stromschlag – „Fußschock“, 0,7 mA) in einer definierten Umgebung (Kontext A) gepaart und im Anschluss das typische Verhalten (totale Bewegungslosigkeit, *freezing*) der Tiere auf die Präsentation des CS alleine in einer veränderten Umgebung (Kontext B) untersucht (Davis, 1992; Fendt and Fanselow, 1999; LeDoux, 2000).

In diesem Versuchsaufbau besteht die Möglichkeit, den Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuchs Pharmaka zu verabreichen (z.B. intraventrikulär) und das eventuell veränderte Lernverhalten zu untersuchen (s. 2.2.5.1).

Die Versuche wurden in einer Konditionierungskammer (MED Associates; USA) durchgeführt, das *freezing* Verhalten der Mäuse per Videoüberwachung aufgenommen und im Anschluss manuell mit Hilfe des Softwareprogramms *Winrat* (freundlicherweise von Dr. C. Wotjak, MPI für Psychiatrie, zur Verfügung gestellt) ausgewertet.

#### Versuchsablauf:

Tag/Bezeichnung	Parameter	Kontextbeschaffenheit
<u>Tag 0/Konditionierung</u>	180 s Pause (preconditioning)	Kontext A:
	28 s Ton (Sinuston 9 kHz, 80 dB)	Lichtintensität: 2,5
	2 s Ton + Fußschock (0,7 mA)	Boden: Metallgitter
	30 s Pause	Box: quadratisch
		Reinigungsmittel: 70% Ethanol
<u>Tag 1 und 7/Testing</u>	180 s Pause (pretone)	Kontext B:
	180 s Ton (Sinuston 9 kHz, 80 dB)	Lichtintensität: 5,0
		Boden: Einstreu
		Box: rund
		Reinigungsmittel: 1% Essigsäure

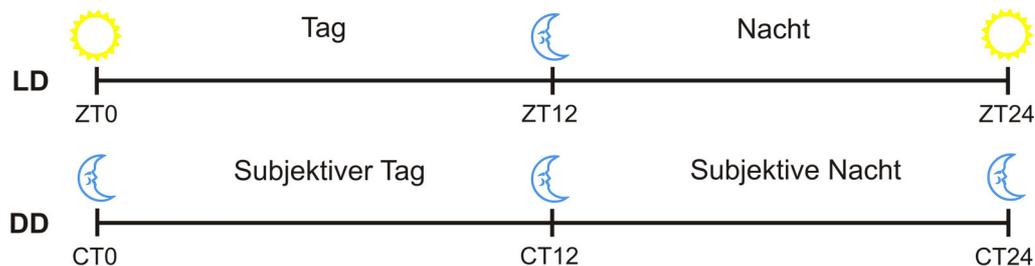


Aktivitätsbeginn in dieser Phase ( $\tau$ ) wird als circadiane Zeit (CT) 12 festgelegt. Bei Tieren, die im circadianen Rhythmus phänotypisch unauffällig sind, zeigt sich auch weiterhin eine Periodizität im Laufverhalten (Reppert and Weaver, 2001; Pittenger et al., 2002).

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, Phasenverschiebungen im circadianen Rhythmus hervorzurufen. Diese Phasenverschiebungen sind die Konsequenzen von Störungen der Uhr durch Umwelteinflüsse wie Licht, Lärm oder Futterangebot. Licht jedoch hat den stärksten Einfluss auf die innere Uhr und wurde daher auch für die induzierten Phasenverschiebungen verwendet.

Hat ein Tier eine stabile *free running* Periode ausgebildet, so kann nun der Effekt eines einzelnen Lichtpulses (15 min) auf das System untersucht werden. Wird der Lichtpuls während des subjektiven Tages (Ruhephase) der Maus appliziert, so wird dadurch die innere Uhr nicht beeinflusst. Licht hat nur dann einen Einfluss auf die Uhr, wenn es während der Aktivitätsphasen (subjektive Nacht) des Tieres verabreicht wird. Wenn der Lichtpuls im zweiten Teil der subjektiven Nacht (CT18 und CT24) gegeben wird, so kommt es zum sogenannten *phase advance*, der sich durch einen früheren Aktivitätsstart am nächsten Tag auszeichnet. Wird der Lichtpuls zwischen CT12 und CT18-20 präsentiert, so wird das Tier am nächsten Tag einen späteren Aktivitätsbeginn aufzeigen (*phase delay*).

Diese Versuche wurden in Kooperation mit Herrn Professor U. Albrecht in der Schweiz durchgeführt (für die verwendeten Materialien und Geräte siehe (Albrecht and Foster, 2002)).



**Abbildung 2.6: Wheel Running Test**

Im 12:12 h Licht/Dunkelzyklus (LD) wird zu den Zeitpunkten ZT0 und ZT24 (Zeitgeber) das Licht an- und an ZT12 das Licht ausgeschaltet. Der Aktivitätsbeginn der Tiere unter LD-Bedingungen wird als ZT12 definiert. In konstanter Dunkelheit (DD) wird der Aktivitätsbeginn durch die *free running* Periode oder  $\tau$  bestimmt und als CT12 (circadiane Zeit) definiert.

## 2.3 Elektrophysiologie

### 2.3.1 Field EPSP und whole-cell Ableitungen

Die Versuchstiere wurden durch Genickbruch getötet und die Gehirne in eisgekühlter, mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) begaster aCSF superfundiert. *Field excitatory postsynaptic potentials* (fEPSP) und *whole-cell* Ströme aus CA1 Pyramidenzellen wurden in transversalen Schnittpräparaten (300-400  $\mu$ m) der Gehirnregion in einer Submersionskammer vermessen (Kleppisch et al., 2003) und mit Hilfe eines Axoclamp B Verstärkers (AXON Instr.), eines EPC9 und der *Pulse Software* (HEKA) aufgezeichnet. Messungen im Hippokampus verliefen wie folgt: Elektroden wurden in der CA3 Region des Hippokampus positioniert, um die Schaffer Kollateralen mittels 100  $\mu$ s Strompulsen zu stimulieren, welche die CA1 Pyramidenzellen des Hippokampus innervieren. Als Ableitelektroden wurden

## Material und Methoden

Glaspipetten mit aCSF gefüllt (Widerstand von  $\sim 8 \text{ M}\Omega$ ) und im *Stratum radiatum* der CA1 Region positioniert. Die Reizintensität während der Grundlinie wurde auch während des Tetanus verwendet.

Protokolle für die Auslösung von *long term potentiation* (LTP) im Hippokampus:

1. Theta Burst Protokoll (Induktion von LTP ohne Block der NMDA-Rezeptoren):  
12 x 4 Pulse je 100 Hz mit 200 ms Pause zwischen den Bursts
2. Induktion einer BDNF-abhängigen LTP Variante (Zakharenko et al., 2003):  
10 x 200 Hz mit 5 s Pause zwischen den Bursts  $\pm 50 \mu\text{M}$  APV (NMDAR-Antagonist; Tocris)
3. NMDAR-unabhängige late phase LTP (Impey et al., 1996):  
4 x 100 Hz über 1 s mit 5 s Pause
4. NMDAR-unabhängige LTP ( $\text{LTP}_K$ ) (Aniksztejn and Ben-Ari, 1991):  
Superfusion der Schnittpräparate über 15 min mit einer modifizierten aCSF (+TEA-Cl; Sigma)

Bei allen Messungen der synaptischen Plastizität wurde eine Reizintensität verwendet, die fEPSPs entsprechend 30-40% der Maximalwerte hervorrief.

In Versuchen mit dem  $\text{Ca}_v1.2$  Antagonisten Isradipin (Novartis) wurde die Substanz mit einer Konzentration von  $20 \mu\text{M}$  verwendet.

### Lösungen:

	aCSF (in mM) Hippokampus	aCSF + TEA-Cl (24) (in mM) Hippokampus
Glukose (Roth)	10	10
NaCl (Roth)	124	100
KCl (Merck)	3	3
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (Roth)	1,25	1,25
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (Roth)	-	-
$\text{MgSO}_4$ (Roth)	2	2
$\text{NaHCO}_3$ (Roth)	26	26
$\text{CaCl}_2$ (Merck)	2	2

### 2.3.2 Whole-cell Ableitungen in hippocampalen Neuronen

Alle *whole-cell* Aufzeichnungen wurden an Schnittpräparaten (6-8 Wochen alte Mäuse) mit einem EPC9 und der *Pulse Software* (HEKA) erhoben. Die Schnittpräparate (300 µm) wurden in eiskalter aCSF an einem Vibratom (Microm) angefertigt. Die Präparate wurden anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert, bevor die Aufzeichnung begann.

I<sub>Ca</sub> Einwärtsströme im Hippokampus wurden bei einem Haltepotential von -65 mV mittels *voltage-clamp* Rampen von -80 mV bis +80 mV mit 0,5 mV/ms ausgelöst. Die Strom-Spannungsbeziehung des I<sub>Ca</sub> wurde anhand folgender Funktion ermittelt (Markwardt and Nilius, 1988):  $I_{Ca} (V) = G_{rel} * (V - V_{rev}) / [1 + \exp(-(V - V_h)/K)]$ .

In Versuchen mit dem Ca<sub>v</sub>1.2 Antagonisten Isradipin (Novartis) wurde die Substanz mit einer Konzentration von 20 µM verwendet.

#### Lösungen:

	Pipettenlösung (in mM)		Badlösung (in mM)
K-Glukonat (Sigma)	120	Glukose	10
KCl (Merck)	20	CaCl <sub>2</sub>	2
MgCl <sub>2</sub> (Merck)	2	TEA-Cl (Sigma)	124
ATP Natriumsalz (Sigma)	2	KCl	3
GTP Natriumsalz (Sigma)	0,25	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25
HEPES (pH 7,4)	10	NaHCO <sub>3</sub>	26
		TTX (Tocris)	0,001
		pH 7,4, wenn begast	

	Pipettenlösung (in mM) Hippokampus
Cs-Glukonat (Sigma)	120
K-Glukonat	-
TEA-Cl	20
KCl	-
EGTA (Roth)	1
ATP Magnesiumsalz	4
GTP Natriumsalz	0,4
HEPES (pH 7,4)	10

## 2.4 Molekular- und zellbiologische Methoden

### 2.4.1 Bakterienkultur

#### 2.4.1.1 Verwendeter Stamm

Zur Amplifikation von Plasmiden wurde als Wirtsorganismus der *Escherichia coli* Stamm XL-Blue MRF<sup>+</sup> (Stratagene) verwendet.

#### 2.4.1.2 Nährmedien und Antibiotika

Die Züchtung der Bakterien erfolgte im Vollmedium Luria-Bertani (LB) mit Glucose. Zur Sterilisation wurde das LB-Medium für 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert und anschließend bei Raumtemperatur aufbewahrt. Frisch transformierte Bakterien wurden nach der Transformation bzw. Elektroporation (s. 2.4.3.3) in LB- bzw. SOC(+)-Medium resuspendiert.

	LB-Medium (pH 7,2-7,5)	SOC(-)-Medium
Pepton (Gibco-BRL)	10 g/l	20 g/l
Hefeextrakt (Gibco-BRL)	5 g/l	5 g/l
NaCl (Roth)	5 g/l	10 mM
KCl (Merck)	-	2,5 mM
Glucose (Roth)	1 g	-
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	ad 1000 ml

	SOC(+)-Medium
SOC(-)-Medium	4,8 ml
1 M MgCl <sub>2</sub> (Merck)	50 µl
1 M MgSO <sub>4</sub> (Sigma)	50 µl
20% Glukose (Roth)	100 µl

Verwendete Antibiotika: Ampicillin (Sigma), Kanamycin (Sigma).

#### 2.4.1.3 Kultivierung

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte aerob in LB-Medium. Flüssigkulturen wurden in Glasröhrchen oder Erlenmeyerkolben angezogen und bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. Kleinere Flüssigkulturen (3 ml) wurden direkt mit einer Einzelkolonie angeimpft, wohingegen die Kulturen mit größeren Volumina (500 ml) mit einer circa 6 Stunden gewachsenen Vorkultur 1:1000 angeimpft wurden. Das Ausstreichen von Bakteriensuspensionen auf LB-Platten (+Antibiotikum, Endkonzentration 100 µg) diente sowohl der kurzfristigen Aufbewahrung als auch der Gewinnung von Einzelkolonien. Die Platten wurden bei 37°C inkubiert und bis zu 8 Wochen bei 4°C gelagert. Längere Aufbewahrung war durch Mischung gleicher Volumina logarithmisch wachsender Kulturen mit autoklaviertem Glycerol (ICN) und Lagerung bei -80°C möglich.

#### 2.4.1.4 Bestimmung der Zelldichte

Durch regelmäßiges Messen der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm wurde das Wachstum der Zellen in Kultur über deren Zelldichte verfolgt. LB-Medium diente dabei als Referenzlösung.

#### 2.4.2 Verwendete Plasmide

Plasmid	Selektionsmarker	Größe	Eigenschaften	Verwendung	Referenz
pAL (pUC19-Abkömmling)	Amp <sup>R</sup>	2,6 kb	T3/T7 Promotoren	In vitro Transkription	(Ludwig et al., 1997)
pCRII-TOPO	Kana <sup>R</sup>	4 kb	SP6/T7 Promotoren	In vitro Transkription	Invitrogen
pBlue-Script II KS +	Amp <sup>R</sup>	3 kb	T3/T7 Promotoren LacZ	Klonierung	Stratagene
pcDNA 3.1	Amp <sup>R</sup>	5,4 kb	CMV Promotor	Klonierung	Invitrogen

#### 2.4.3 Transformation von Bakterien

##### 2.4.3.1 Erzeugung kompetenter Bakterienzellen – chemisch kompetente Zellen

Für die Aufnahme exogener DNS werden *E. coli* Zellen in einen transformationskompetenten Zustand überführt. Hierzu wurden *E. coli* Bakterien kurz mit Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck) behandelt. Man beimpfte 100 ml LB(-)-Medium (ohne Glucose) mit 1 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* XL-Blue MRF'. Die Kultur wurde nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,35 bis 0,38 abgekühlt und anschließend abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 15 ml 1 x TTS (*Transformation and Storage Solution*) resuspendiert, aliquotiert, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

	1x TTS
PEG (Polyethylenglykol) 3350 (Sigma)	12,5 ml
1 M MgCl <sub>2</sub> (Merck)	2,5 ml
100% DMSO (Sigma)	2,5 ml
LB-Medium	50 ml

##### 2.4.3.2 Erzeugung kompetenter Bakterienzellen – elektrokompente Zellen

Um elektrokompente *E. coli* XL1-Blue MRF' herzustellen, wurden 250 ml LB-Medium mit einer XL1-Blue MRF' Übernachtskultur 1:1000 beimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,7 inkubiert. Nach Abkühlen auf Eis wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 4000 x g, 4°C) geerntet. Im Anschluss wurde das Zellpellet zuerst mit eiskaltem H<sub>2</sub>O und dann mit 10%iger Glycerinlösung (Roth) gewaschen. Das Zellpellet wurde 1:1 in 10% Glycerin resuspendiert und als 50 µl Aliquots bei -80°C eingefroren.

### 2.4.3.3 Transformation von *E. coli*

Das Einschleusen fremder DNS in Bakterienzellen nennt man Transformation. Bei geeignetem Selektionsdruck, der sich durch die Zugabe eines Antibiotikums erzielen lässt, wird ein in die Zelle eingebrachtes Plasmid stabil auf die Tochterzellen vererbt.

Für eine bevorstehende Transformation mittels chemisch kompetenten Bakterienzellen wurden diese auf Eis aufgetaut, mit 1-50 ng DNS vorsichtig vermischt und zur Aufnahme der DNS 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Erholungsphase in LB-Medium bei 37°C, wurde die Suspension auf Agarplatten (+ Antibiotikum) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet. Die erhaltenen Klone wurden erneut expandiert, die Plasmid-DNS isoliert (s. 2.4.4) und durch eine Restriktionsanalyse (s. 2.4.6.1) überprüft.

Bei der Verwendung von elektrokompetenten Zellen wurden diese zuerst auf Eis aufgetaut, mit 100-500 ng DNS vermischt und 1 min auf Eis inkubiert. Das Gemisch wurde daraufhin in eine Elektroporationsküvette (Equibio) überführt und die Elektroporation mit dem GENE Pulser (Biorad) durchgeführt. Im Anschluss wurde sofort 1 ml SOC(+)-Medium zum Ansatz gegeben und die Zellen zur Erholung 1 h bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. 200 µl dieser Kultur wurden auf selektive LB-Agarplatten ausplattiert und ÜN bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### 2.4.4 Isolierung von Plasmid-DNS (Mini-Präparation)

Die Isolierung der Plasmid-DNS im kleinen Maßstab erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979). Die Bakterien werden hierbei in NaOH/SDS lysiert, Proteine und DNS denaturiert. Die freigesetzte RNS wird durch die Zugabe von RNase A abgebaut.

Durch die Zugabe von Kaliumazetat renaturiert die kleine Plasmid-DNS wieder und bleibt in Lösung, während denaturierte chromosomale DNS, Zelltrümmer, ausgefallene Salze und SDS durch Zentrifugation abgetrennt werden können.

Eine am Vortag mit einer Einzelkolonie beimpfte, über Nacht gewachsene 7 ml LB-Bakterienkultur wurde durch Abzentrifugieren geerntet. Das Bakterienpellet wurde in 250 µl MP1 resuspendiert und nach Zugabe von 250 µl MP2 für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 250 µl MP3 zugegeben und für 15 min auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation (25 min, 15.000 rpm, 4°C) wurde die im Überstand befindliche Plasmid-DNS mit Isopropanol (Roth) gefällt und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in Wasser gelöst. Die Ausbeute lag bei etwa 20 µg. 1/20 der Präparation wurde für eine Restriktionsanalyse (s. 2.4.6.1) verwendet.

MP1 (Resuspension)	MP2 (Lyse)	MP3 (Neutralisation)
50 mM Tris-Cl (ICN) 10 mM EDTA (Roth) 100 µg/ml RNase A (Roche) pH 8,0	200 mM NaOH (Roth) 1% SDS	3 M Kaliumazetat (Sigma) pH 5,5

#### **2.4.5 Alkalische Lyse mit Säulenchromatographie (Maxi-Präparation)**

Werden größere Mengen an Plasmid-DNS benötigt, so können mit dem Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen) bis zu 750 µg DNS aus einer 250-500 ml Bakterienkultur aufgereinigt werden.

Die Methode beruht auf demselben Prinzip wie in Punkt 2.4.4 beschrieben (Birnboim and Doly, 1979). Die Bedingungen für den Auftrag auf die Säule und die Waschschritte sind so gewählt, dass Proteine, Polysaccharide, RNS und andere Verunreinigungen abgetrennt werden. Die eluierte Plasmid-DNS wurde gefällt, getrocknet, in 250 µl Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert. Die Konzentration von Aliquots der DNS wurde photometrisch bestimmt und eine Restriktionsanalyse (s. 2.4.6.1) durchgeführt.

#### **2.4.6 Enzymatische Modifikation von DNS**

Die in der Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme sind im Anhang zu finden (Tabelle 6.3).

##### 2.4.6.1 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. 2.4.9) untersucht. Pro µg DNS und pro h wurden 5-10 Units Enzym eingesetzt.

#### **2.4.7 Reinigung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

##### 2.4.7.1 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.

##### 2.4.7.2 Präzipitation

Nukleinsäuren wurden zur Aufkonzentrierung und Reinigung mit Ethanol gefällt. Zu einer wässrigen DNS- bzw. RNS-Lösung wurden hierfür 1/10 Volumen 5 M NaCl und 2,5 Volumen 100% 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% eiskaltem Ethanol gewaschen, bei 37°C getrocknet und zuletzt in einer geringen Menge Wasser aufgenommen.

##### 2.4.7.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren zu bestimmen, wurde die Absorption eines geeignet verdünnten Aliquots bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Über die Absorption der Nukleinsäurelösung bei 260 nm kann bei einer Schichtdicke von 1 cm die Konzentration der Probe folgendermaßen ermittelt werden:

1 OD<sub>260</sub> = 50 µg/ml dsDNS

1 OD<sub>260</sub> = 40 µg/ml ssRNS

Die Reinheit von DNS und RNS kann aus dem Verhältnis OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> abgeschätzt werden. Dieser Quotient sollte über 1,7 liegen.

#### 2.4.8 Sequenzierung von DNS

Die Sequenzanalyse von rekombinanter Plasmid-DNS erfolgte nach einer modifizierten Methode von Sanger (Sanger et al., 1992). 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'-Dideoxynukleosidtriphosphate (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 Dideoxynukleosidtriphosphate 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.

##### 2.4.8.1 Sequenzreaktion

Die für die Sequenzreaktion eingesetzten DNS-Mengen variierten je nach Herkunft der DNS.

DNS Mengen:

DNS aus Mini-Präparation	1 µl
DNS aus Maxi-Präparation	0,5 µg
DNS aus PCR	30-90 ng

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 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 35 Zyklen des folgenden Programms durchgeführt:

Denaturierung:	95°C	30 sek
Annealing:	50°C	40 sek
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.

#### 2.4.8.2 Reinigung des Sequenzierungsproduktes

Das Reaktionsprodukt des *cycle sequencing* wurde über eine Gelfiltrationssäule (*CentriStep Column*, Perkin Elmer) von überschüssigen, fluoreszierenden Nukleotiden gereinigt. Die Säulen wurden mit 800 µl H<sub>2</sub>O 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 x 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 x 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 µl *Template Suppression Reagent* (Perkin Elmer) resuspendiert, für 3 min bei 95°C denaturiert und entweder sofort in den Sequenzierer ABI Prism™ 310 gestellt oder bei -20°C aufbewahrt.

Der Sequenzierer zieht die Probenlösung automatisch in eine mit Polymer (Perkin Elmer) gefüllte Kapillare, in der die DNS-Fragmente durch die angelegte Spannung von 12,2 kV in 5'→3'-Richtung auf den Laserdetektor zuwandern. Aus der Abfolge der von dem Laserdetektor bestimmten Farbsignale errechnet der Computer die Nukleotidsequenz.

#### 2.4.9 Auftrennung und Isolation 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 (EtBr), 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.

#### Lösungen:

10x TBE	Laufpuffer	Auftragspuffer (6 x dye)	EtBr-Stammlösung
0,9 M Tris-Cl (ICN) 0,9 M Börsäure (Merck) 20 mM EDTA (Roth)	1 x TBE	18% Ficoll Typ 400 (Sigma) 1,2 mM EDTA 6% 10 x TBE 0,15% Bromphenolblau (IBI) 0,15% Xylencyanol FF (Sigma)	10 mg/ml (Sigma)

#### 2.4.9.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Für die Auftrennung von DNS-Fragmenten mit einer Größe von 50-1000 bp eignet sich eine vertikale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE). Hierfür wurden 5%ige Polyacrylamidgele in 1 x TBE als Laufpuffer verwendet (Maniatis et al., 1982). Die Trennstrecke betrug 15 cm und die Dicke 0,75 mm bei analytischen Gelen bzw. 1,5 mm bei präparativen Gelen.

	<b>analytischer Maßstab</b>
Rothiphoresegel (Acrylamid/N,N'-Bisacrylamid 29:1, 40%, Roth)	3,75 ml
10 x TBE	3 ml
H <sub>2</sub> O	ad 30 ml
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin, Sigma)	35 µl
20% APS (Ammoniumpersulfat, Sigma)	80 µl

Die DNS-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 1/6 Volumen Auftragspuffer versetzt. Zum Einlaufen wurde eine Spannung von 110 V angelegt, zur Trennung der DNS-Fragmente schließlich 270 V für 1 h.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 10 min in einer Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) gefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht.

#### 2.4.9.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNS-Fragmenten im Bereich von 1 bis 12 kb wurde die horizontale Gelelektrophorese in Agarosegelen (Maniatis et al., 1982) angewendet.

2% Agarose            Für Fragmente von 100-1000 bp  
 0,7% Agarose        Für Fragmente von 1-10 kb

Die Agarose (Seakem LE, Biozym) wurde in 1 x TBE aufgeschmolzen, auf 60°C im Wasserbad abgekühlt und nach Zugabe von 0,1 µg/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 1 x TBE.

#### 2.4.9.3 Elektroelution

Für die Isolierung eines DNS-Fragmentes mit bestimmter Größe wurde eine Elektroelution modifiziert nach Davis (Davis et al., 1986) angewendet. Zu Beginn wurde eine gelelektrophoretische Auftrennung (s. 2.4.9) der DNS-Fragmente durchgeführt und die gewünschte Bande unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Das Gelstück wurde zusammen mit 300 µl 1 x 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. 2.4.7.2) isoliert.

### 2.4.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) ist ein *in vitro* Verfahren zur gezielten Amplifikation von definierten Nukleinsäuresequenzen (Mullis and Faloona, 1987; Saiki et al., 1992). Die DNS-Matrize wird zunächst durch Hitzedenaturierung (94°C) in ihre beiden Einzelstränge aufgeschmolzen. An die so entstandenen Einzelstränge können nun spezifische Oligonukleotid-Primer binden, die einen Startpunkt für die DNS-Synthese durch eine DNS-Polymerase festlegen. Für die Reaktion werden zwei Primer in großem molaren Überschuss verwendet, die sich zum einen an den kodierenden Strang (*forward* Primer) zum anderen an den nicht-kodierenden Strang (*reverse* Primer) der zu amplifizierenden DNS anlagern (*Primer Annealing*, 45-60°C). Ausgehend von diesem kurzen doppelsträngigen Bereich wird der fehlende, komplementäre Einzelstrang in 5'→3'-Richtung synthetisiert (Elongation, 72°C). Nach einer erneuten Denaturierung der DNS und dem *Primer-Annealing* erfolgt erneut eine Elongation durch die hitzestabile DNS-Polymerase. Mit jedem Zyklus kommt es im Idealfall zu einer Verdoppelung der DNS und damit in einer Kettenreaktion zu einer exponentiellen, selektiven Anreicherung der durch die Primer flankierten DNS-Sequenz. Theoretisch entstehen bei n Zyklen  $2^{n-1}$  amplifizierte Moleküle.

#### 2.4.10.1 Standardprotokoll

Die PCR wurde in einem *Thermo Cycler* der Firma Biometra (UNO Thermoblock; UNO II) durchgeführt. Als thermostabile DNS-Polymerase wurde die Taq DNS-Polymerase (5 U/μl) der Firma Promega verwendet. Als Ausgangs-DNS wurden entweder 10-20 ng Plasmid-DNS, 10 ng Oligo(dT)-*primed* cDNS oder 10 ng cDNS eingesetzt.

Reaktionsansatz		
	Primer A (10 pmol/μl)	1,25 μl
	Primer B (10 pmol/μl)	1,25 μl
	[Primer C (10 pmol/μl)]	1,25 μl
	10 x PCR-Puffer (Promega)	2,5 μl
	Taq Polymerase	0,25 μl
	DNS	x μl
	H <sub>2</sub> O	ad 25 μl

Phase	Initiale Denaturierung	Zyklus Nr. 1-40	Verlängerung (Extension)
Denaturierung	94°C, 1,5-5 min	94°C, 30 sek	
Primer-Anlagerung ( <i>Annealing</i> )		45-65°C, 1 min	
Polymerisation (Elongation)		72°C, 30 sek	72°C, 5 min

### 2.4.10.2 Oligonukleotide

Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang zu finden (Tabelle 6.1).

### 2.4.11 Isolation von genomischer DNS

Ein kleiner Teil eines Mäuseschwanzes wurde ÜN bei 55°C in 750 µl Lysepuffer (100 mM Tris pH 8,5, 5 mM EDTA, 0,2% SDS, 200 mM NaCl, 1 mg Proteinase K) verdaut. Am nächsten Tag wurde die Lösung 5 min bei 12.000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Lösung wurde nacheinander extrahiert mit 1 Vol Phenol, 1 Vol Phenol/Chloroform und 1 Vol Chloroform. Zwischen den einzelnen Schritten wurde die Lösung jeweils 5 min zentrifugiert (12.000 rpm) und die obere, wässrige Phase abgehoben. Anschließend wurde die DNS mit 1 Vol Isopropanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und zuletzt bei 37°C getrocknet. Die DNS wurde in circa 200 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Die isolierte DNS wurde zur Genotypisierung mittels PCR (s. 2.4.10) verwendet.

### 2.4.12 Isolation von RNS aus eukaryotischen Zellen

Bei Arbeiten mit RNS ist stets darauf zu achten, dass eine Kontamination der RNS-haltigen Lösungen mit Ribonukleasen vermieden und die Aktivität der anwesenden RNasen vermindert wird. Da RNasen sehr stabile Proteine sind, die selbst Abkochen unbeschadet überstehen, ist die Inaktivierung dieser Proteine nur durch reduzierende Agentien wie β-Mercaptoethanol oder auch Guanidiniumisothiocyanat möglich (Chirgwin et al., 1979). Alle hitzestabilen Verbrauchsmaterialien wurden zur RNase-Dekontamination für mindestens 5 h bei 250°C gebacken.

#### 2.4.12.1 Isolation von Gesamt-RNS

Zur Isolierung aller RNS-Formen eines Gewebes wurde das TRIZOL LS Reagenz (Gibco-BRL) verwendet. Das frisch präparierte und anschließend schockgefrorene Gewebe wurde zunächst mit Mörser und Pistill pulverisiert. Daraufhin folgte eine Homogenisierung des Gewebes in Guanidiniumisothiocyanat-haltiger Lösung (TRIZOL LS Reagenz) mit Hilfe eines Teflon-Potters (pro 50-100 mg Gewebe 0,75 ml TRIZOL LS Reagenz). Das Homogenisat wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um eine vollständige Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe zu gewährleisten. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform, kräftigem Schütteln und erneuter Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz abzentrifugiert (12.000 rpm, 4°C, 15 min). Durch diesen Zentrifugationsschritt kommt es zu einer Phasentrennung in eine untere Phenol/Chloroform-Phase, eine Interphase und eine obere, wässrige Phase. Da sich RNS ausschließlich in der oberen, wässrigen Phase befindet, wird diese in eine frisches Reaktionsgefäß überführt, mit Isopropanol gefällt und mit 75% Ethanol gewaschen. Das RNS-Pellet wird nach der Trocknung in wenig RNase-freiem Wasser (H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>) aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt. Die Ausbeute betrug in etwa 0,5 bis 1,0 µg Gesamt-RNS pro 1 mg Gewebe. Die auf diese Weise gewonnene Gesamt-RNS konnte zur Synthese von cDNS verwendet werden (s. 2.4.12.3).

2.4.12.2 Isolation von Boten-RNS mittels Dynabeads®

Fast alle eukaryotischen Boten-RNS-Moleküle werden nach der Transkription am 3`-Ende mit Poly(A)-Schwänzen versehen. Diese Poly(A)-Schwänze können durch Basenpaarbindung an Polythymidilsäure zur affinitätschromatographischen Reinigung von Boten-RNS aus Gesamt-RNS oder direkt aus Gewebe benutzt werden. In dem *Dynabeads Biomagnetic Separation System* der Firma Dynal sind die Oligo(dT)-Ketten kovalent an die Oberfläche magnetischer Polystyrolkugeln (*Dynabeads Oligo (dT)<sub>25</sub>*) gebunden. Durch die Inkubation der Dynabeads mit homogenisiertem Gewebe wird die dort exprimierte Poly(A)-RNS gebunden. In einem Magneten werden die Dynabeads immobilisiert, wodurch die anschließenden Waschschrte sowie die Elution erleichtert werden.

Zur Isolierung von Poly(A)-RNS wurden 10-20 mg schockgefrorenes Gewebe mit Mörser und Pistill pulverisiert. Das zerkleinerte Gewebe wurde mit 900 µl GTC-Lösung erst in einem Teflon-Potter, dann durch dreimaliges Auf- und Abziehen mit einer Spritze (24G) homogenisiert. Das aufgeschlossene Gewebe wurde mit 800 µl Bindungs-Puffer versetzt, gevortext und im Anschluss bei 11.800 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde zu 50 µl gewaschenen und equilibrierten Dynabeads gegeben, der Ansatz für 5 min im Überkopfschüttler inkubiert (Bindung der Poly(A)-RNS an die Dynabeads) und im Anschluss in den Magneten gestellt. Der Überstand wurde erneut entfernt und die Dynabeads dreimal mit je 300 µl Wasch-Puffer gereinigt. Im letzten Waschschrte wurde der Überstand vollständig entfernt und 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> zu den mit der Poly(A)-RNS beladenen Dynabeads zugegeben. Nach einer 2-minütigen Inkubation bei 65°C wurde der Ansatz wieder in den Magneten gestellt und der Überstand mit der Boten-RNS in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

Die Poly(A)-RNS wurde entweder bei -80°C aufbewahrt oder direkt zur Synthese von cDNS verwendet (s. 2.4.12.3).

4 M Guanidiniumisothiocyanat (GTC)-Lösung		H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	
H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	27,5 ml	Diethylpyrocarbonat (Sigma)	1 g
3 M Natriumazetat, pH 5,4	330 µl	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
Guanidiniumisothiocyanat (Roth)	23,65 g	Über Nacht rühren	
1 M DTT (Roth)	5 µl	autoklavieren	
Lauroylsarcosinat (Roth)	0,25 g		
H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	ad 50 ml		

	1 x Bindungs-Puffer	1 x Wasch-Puffer
1 M Tris/HCl, pH 8,0	5 ml	500 µl
Lithiumchlorid (Roth)	0,848 g	0,318 g
0,5 M EDTA	2 ml	100 µl
H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	ad 50 ml	ad 50 ml

#### 2.4.12.3 Synthese von einzelsträngiger cDNS

Um aus Boten-RNS einzelsträngige, komplementäre DNS (cDNS) zu erhalten, wurde eine RNS-abhängige DNS-Polymerase (*Superscript II Reverse Transcriptase*, Gibco-BRL) verwendet. Das Enzym benötigt als Startpunkt seiner Synthesefunktion einen Primer. Dazu wurden entweder sogenannte *Random-Hexamer-Primer* oder *Oligo(dT)-Primer* verwendet, wobei sich die *Random-Hexamer-Primer* an zufällig komplementäre RNS anlagern und die *Oligo(dT)-Primer* doppelsträngige Bereiche mit den Poly(A)-Schwänzen der Boten-RNS ausbilden.

Nach Anlagerung der Primer wird in Anwesenheit von dNTPs und Polymerase der erste cDNS-Strang gebildet. Nach Abschluss der Synthesereaktion wird die Reverse Transkriptase durch Hitze inaktiviert und die verbliebene RNS des RNS/DNS-Hybrids durch Zugabe von RNase H verdaut. Die so gewonnene cDNS wurde als Template zur PCR (s. 2.4.10) eingesetzt.

Zur Synthese einzelsträngiger cDNS wurde ein Kit der Firma Gibco-BRL (*SuperScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis*) verwendet. Das Kit enthält die Primer, dNTPs, Polymerase, RNase H, alle weiteren Lösungen und Puffer. Für die Synthesereaktion wurden 10 µl RNS-Lösung eingesetzt.

#### 2.4.13 Trennung und Detektion von Proteinen

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 Detergenz 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 Proteine 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'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator.

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 aufzutrennen 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 5 mm (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 H<sub>2</sub>O gewaschen. Nach Absaugen des Wassers wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen.

Trenngel	10%	Sammelgel	5%
30% AA/0,8% BA (BioRad)	2,85 ml	30% AA/0,8% BA (BioRad)	415 µl
1 M Tris/HCl, pH 8,8	1,8 ml	0,6 M Tris/HCl, pH 6,8	250 µl
H <sub>2</sub> O	3,7 ml	H <sub>2</sub> O	1,8 ml
10% SDS	83,5 µl	10% SDS	25 µl
10% APS (Sigma)	100 µl	10% APS (Sigma)	25 µl
TEMED (Sigma)	10 µl	TEMED (Sigma)	5 µl

#### 2.4.13.1 Bestimmung der Proteinkonzentration - BCA-Methode

Es handelt sich hierbei um eine spektrophotometrische Methode zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen, die eine Modifikation des von Lowry (Lowry et al., 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 (0,5, 1, 2, 3, 4 µg BSA/50 µl H<sub>2</sub>O) angefertigt werden.

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

Nach Mischen der verdünnten Proteinlösungen (1:30 bis 1:500) 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.

#### 2.4.13.2 Probengewinnung, Probenvorbereitung und Elektrophorese

Zum Aufschluss wurden die Gewebe auf Trockeneis mit Mörser und Pistill zerkleinert, die Partikel in Eppendorf-Gefäße überführt und in 2% SDS/50 mM Tris (90°C) gelöst (100 µl pro 10 mg Gewebe). Dieser Ansatz wurde für 10 min bei 95°C gekocht (nach 3 min vortexen) und 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Proben wurden mit 6 x 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* (BioRad). Die Elektrophorese wurde in 1 x Laufpuffer mit 50 V gestartet und nach Erreichen des Trenngels auf 80-100 V erhöht.

Auftragspuffer	10 x Laufpuffer
200 mM Tris/HCl, pH 6,7	250 mM Tris/HCl, pH 8,3
5% SDS	1,92 M Glycin (Roth)
200 mM DTT	1% SDS
0,04% Bromphenolblau	
40% Glycerin	

#### 2.4.13.3 Elektroblot von Polyacrylamidgelen

Der Transfer auf eine spezielle Membran ermöglicht eine spezifische Identifizierung und Charakterisierung der aufgetrennten Proteine und macht sie für eine Immundetektion (s. 2.4.14) 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 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, kurz in Methanol getaucht, getränkt in Anodenlösung II
- SDS-Polyacrylamidgel
- 5 Lagen Filterpapier, getränkt in Kathodenlösung
- Kathode (Graphitplatte)

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/cm<sup>2</sup> auf die Membran transferiert.

Anodenlösung I	Anodenlösung II	Kathodenlösung
300 mM Tris/HCl, pH 10,4	30 mM Tris/HCl, pH 10,4	25 mM Tris/HCl, pH 7,6
20% Methanol	20% Methanol	40 mM ε-Aminocapronsäure (Sigma)
		20% Methanol

#### 2.4.14 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. 2.4.13.3) über Nacht in 3% BSA-Lösung blockiert. Am folgenden Tag wurde die Membran mit einem spezifischen Antikörper (primärer Antikörper; Tabelle 6.4) für 2 h bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler inkubiert. Die Membran wurde anschließend gewaschen (3 x 10 min in 1 x

TBST/1% Milchpulver) und für weitere 2 h mit einem an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten anti-Immunglobulin-Antikörper (sekundärer Antikörper; Tabelle 6.5) inkubiert. Nach erneutem Waschen (3 x 10 min in 1 x TBST) wurde der Antigen-Antikörperkomplex durch eine Chemilumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht.

Da Meerrettich-Peroxidase (*Horseradish*, HRPO) in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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, die Membran in Klarsichtfolie eingewickelt und durch Auflegen eines Films (*Hyperfilm*, Amersham) detektiert. Die Belichtungszeiten variierten von 1 bis 30 min. Die Filme wurden zum Abschluss mit einer Entwicklermaschine der Firma Agfa (Curix 60) entwickelt.

Die in der Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper sind im Anhang in Tabelle 6.4 und 6.5 aufgeführt.

**Lösungen:**

10 x TBS		3% BSA-Lösung		1 x TBST ± Milchpulver	
Tris-Base (ICN)	6,05 g	BSA (Roth)	0,6 g	10 x TBST	100 ml
NaCl	43,8 g	1 x TBST	20 ml	1% Triton (Merck)	1 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml			H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
pH 8,2				1% Milchpulver (Reformhaus)	10 g

**2.4.15 Spezielle Methoden zur Charakterisierung von Proteinen**

2.4.15.1 Membranpräparation aus verschiedenen Geweben

Um membrangebundene Proteine wie z.B. Kalziumkanäle aus fetthaltigen Geweben anzureichern, kann durch Differentialzentrifugation die sogenannte Mikrosomenfraktion (MiP) von den restlichen Zellbestandteilen abgetrennt werden. Die hier beschriebene Methode kann im entsprechenden Maßstab zur Isolierung der Mikrosomenfraktion aus allen Geweben angewendet werden.

Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C mit vorgekühlten Lösungen durchgeführt, um einen lytischen Abbau der Proteine zu vermeiden.

Das schockgefrorene Gewebe wurde zunächst mit Mörser und Pistill pulverisiert, in einer entsprechenden Menge (bei 200 mg Ausgangs-Gewebe 1,5 ml Puffer) Puffer A aufgenommen, im Ultra Turrax homogenisiert und im Anschluss zentrifugiert (5.900 rpm, 4°C, 2 min). Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und einem ersten Ultrazentrifugationsschritt unterzogen (70.000 g, 4°C, 30 min). Der daraus resultierende Überstand wird zytosolischer Überstand genannt. Das zugehörige Pellet wurde je nach Größe in Puffer B aufgenommen, in einem Teflon-Potter homogenisiert und einer zweiten Ultrazentrifugation unterzogen (70.000 g, 4°C, 30 min). Der gewonnene Überstand, der die Membranproteine (MiP) enthalten sollte, wurde aliquotiert und bei –80°C aufbewahrt. Das Pellet der zweiten Ultrazentrifugation wurde nochmals in Puffer B aufgenommen, gepottert und ebenfalls bei –80°C gelagert.

Puffer A	Puffer B	Proteaseinhibitoren
300 mM Sucrose (Roth)	1% Desoxycholat (Sigma)	200 nM PMSF (Sigma)
75 mM NaCl	20 mM EDTA	8 µg/ml Calpain I (Sigma)
20 mM EDTA	10 mM EGTA	8 µg/ml Calpain II (Sigma)
10 mM Tris/HCl, pH 7,4	10 mM Tris/HCl, pH 7,4	

Die Puffer wurden bei 4°C aufbewahrt und die Proteaseinhibitoren wurden dem Puffer A immer frisch zugesetzt.

#### 2.4.16 Agonisten-Behandlung perfundierter hippokampaler Schnittpräparate

Transversale 400 µm hippokampale Schnittpräparate wurden kontinuierlich mit oxygenierter aCSF bei 32°C über 2-3 h vor der Zugabe von TEA-Cl (Sigma) perfundiert. D-APV (50 µM; Sigma) bzw. U0126 (40 µM; Tocris) wurden dem Perfusat 1 h vor und während der Stimulation mit TEA-Cl zugegeben.

Anschließend wurden die Schnittpräparate entweder für die Paraffineinbettung (s. 2.4.19.2) vorbereitet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für die Immundetektion im Western Blot (s. 2.4.13.2) aufbereitet.

#### 2.4.17 *In situ* Hybridisierung

Diese Methode wird angewendet, um *messenger* RNS (mRNS) direkt im Gewebe (*in situ*) nachzuweisen. Für die Lokalisation der Ca<sub>v</sub>1.2 und Ca<sub>v</sub>1.3 Untereinheiten im Schnitt wurden 200-300 bp lange DNS Sequenzen (Ca<sub>v</sub>1.2: nt 2355-2628; Ca<sub>v</sub>1.3: AS 777-858), die einem Abschnitt der zu untersuchenden mRNS entsprechen, in Transkriptionsvektoren (pAL und pCRII TOPO, s. 2.4.2) kloniert. Nach Linearisierung der Plasmide (mit *Bam*HI bzw. *Asp*718) wird durch DNS-abhängige RNS-Polymerasen cRNS synthetisiert. Je nach Orientierung entsteht ein *antisense* Gegenstrang, der komplementär zur mRNS ist, oder ein *sense* Strang. Durch den Einbau von <sup>35</sup>S-UTP werden die RNS-Sonden radioaktiv markiert. Nach Zugabe der radioaktiven Sonden auf vorbehandelte Gewebeschnitte (s. 2.4.19) bildet die *antisense* Sonde ein stabiles mRNS/cRNS-Hybrid aus. Durch die Zugabe von RNase A wird spezifisch einzelsträngige RNS abgebaut, das doppelsträngige Hybrid bleibt stabil. Durch Autoradiographie wird die Hybridisierung sichtbar gemacht.

#### Lösungen:

10 x PBS		1 M Tris		0,5 M EDTA	
NaCl	80 g	Tris-Base (ICN)	121 g	Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O (Roth)	186,1 g
KCl	2 g	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (wasserfrei)	6,2 g	pH 7,5 bzw. 8,0		pH 8,0	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g				
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml				
pH 7,4					

Material und Methoden

<b>5 x Protease-Puffer</b>		<b>5 x RNase A-Puffer</b>		<b>3 M Natriumazetat</b>	
1 M Tris pH 8,0	250 ml	5 M NaCl	250 ml	Natriumazetat x 3 H <sub>2</sub> O (Merck)	40,8 g
0,5 M EDTA pH 8,0 H <sub>2</sub> O	25 ml ad 500 ml	1 M Tris pH 8,0 0,5 M EDTA pH 8,0 H <sub>2</sub> O	25 ml 5 ml ad 500 ml	H <sub>2</sub> O pH 5,2	ad 100 ml

<b>1 M DTT</b>		<b>Box-Puffer</b>		<b>50% Dextran</b>	
Dithiothreitol (Roth)	1,5 g	Formamid	50 ml	Dextransulfat (MG≈5x10 <sup>5</sup> ; Sigma)	12,5 g
3 M NaAzetat pH 5,2 H <sub>2</sub> O steril filtrieren, -20°C	33 µl ad 10 ml	20 x SSC H <sub>2</sub> O	20 ml ad 100 ml	H <sub>2</sub> O 3 h bei 65°C lösen H <sub>2</sub> O -20°C	12 ml ad 25 ml

<b>4% PFA</b>		<b>5 x Protease-Puffer</b>		<b>1,25 x Hybridisierungs-Puffer</b>	
Paraformaldehyd (Sigma)	6 g	1 M Tris pH 8,0	250 ml	1 M Tris pH 8,0	0,626 ml
10 x PBS H <sub>2</sub> O Bei 60°C lösen, 4°C	15 ml ad 150 ml	0,5 M EDTA pH 8,0 H <sub>2</sub> O	25 ml 225 ml	5 M NaCl 0,5 m EDTA pH 8,0 50 x Denhardt (Sigma) 50 x Dextran Formamid (deion.; Roth) H <sub>2</sub> O	3,75 ml 0,125 ml 1,25 ml 12,5 ml 31,25 ml ad 50 ml

<b>20 x SSC</b>		<b>0,1 M TEA</b>		<b>0,25% Azetanhydrid-Lösung</b>	
NaCl	87,65 g	TEA-HCl (Sigma)	5,6 g	Azetanhydrid (Sigma)	375 µl
Natriumcitrat (Merck) H <sub>2</sub> O	44,10 g ad 500 ml	5 M NaOH H <sub>2</sub> O pH 8,0	3,1 ml ad 300 ml	0,1 M TEA rühren	150 ml

#### 2.4.17.1 Herstellung der RNS-Sonden

Für jede cRNS-Sonde wurden jeweils 20 µg der entsprechenden Plasmid-DNS mit *Bam*HI und *Asp*718 in 2 getrennten Ansätzen linearisiert, mittels Phenol/Chloroform-Extraktion (s. 2.4.7.1) gefällt, in 11 µl H<sub>2</sub>O gelöst und bei –20°C gelagert. In der anschließenden *in vitro* Transkription synthetisieren die jeweiligen RNS-Polymerasen die *antisense* bzw. *sense* Sonden, die nun radioaktiv markiert sind. Nach Abschluss der *in vitro* Transkription wird durch Zugabe von DNase I (Roche) die DNS Matrize abgebaut, der Ansatz chromatographisch gereinigt (*Nick<sup>TM</sup> Column*, Pharmacia) und aufgetrennt. Von den dadurch gesammelten Fraktionen 1-5 wurden jeweils 2 µl in ein Plastikgefäß überführt, 2 ml Szintillationsflüssigkeit (Roth) zugegeben und die Aktivität im Szintillationszähler vermessen. Die radioaktiv markierten Sonden sollten sich in Fraktion 2 befinden. Das notwendige Endvolumen des Hybridisierungspuffers wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{ml (Hyb-Puffer)} = \frac{400 \mu\text{l (Probenvolumen)} \times \text{cpm}/\mu\text{l (gemessen)} \times 1,4 \text{ (Effizienzfaktor)}}{1 \times 10^7 \text{ dpm/ml (gewünschte Konzentration)}}$$

Zur Verminderung unspezifischer Bindungen und zur Reduktion des Hintergrundsignals wurde dem Ansatz noch RNase-freie Transfer-RNS (Roche), zur Stabilisierung des Schwefels-35 DTT (Roth) zugegeben.

Die Sonden wurden dann auf je 1,2 ml aliquotiert und bei –20°C aufbewahrt.

#### 2.4.17.2 Standardprotokoll für die *in situ* Hybridisierung

Das Protokoll für die *in situ* Hybridisierung wurde in abgeänderter Form von Simmons et al., 1989 übernommen.

##### **Protokoll:**

- Getrocknete, fixierte Gewebeschnitte (s. 2.4.19.1/2.4.19.2) wurden für 15 min mit 7 µg/µl Proteinase K (Roche) in 1 x Protease-Puffer vorbehandelt
- 10 min in 0,5 x SSC
- Azetylierung, um unspezifische Bindungen der Sonden zu vermeiden:
  - 3 min 0,1 M TEA (Triethylammoniumazetat)
  - 10 min in 0,25% Azetanhydrid-Lösung
- 2 x 2 min in 2 x SSC
- Dehydrierung der Schnitte:
  - je 5 min in 50%, 70%, 95%, 100% Ethanol
- 5 min lufttrocknen
- 30 min vakuumtrocknen
- Prähybridisierung:
  - Die Objektträger (OT) wurden in eine dicht verschließbare Kammer waagrecht auf ein Gitter gelegt und die Schnitte mit je 70 µl 1 x Hybridisierungspuffer bedeckt
  - Um die Schnitte vor dem Austrocknen zu bewahren, wurde mittels Box-Puffer getränkten Papiertüchern ein feuchtes Milieu in der Kammer erzeugt
  - Die Prähybridisierung erfolgte für 2-3 h bei 42°C in einem Ofen (Hybaid)

## Material und Methoden

- Hybridisierung:  
Die Sonden wurden für 10 min bei 65°C erhitzt und zu den 1,2 ml Aliquots wurden 100 µl 1 M DTT zugegeben. Für die Hybridisierung wurden dann pro Schnitt 70 µl der *antisense* bzw. *sense* Sonde zu den bereits prähybridisierten Schnitten hinzugefügt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 55°C in einem Ofen (Hybaid)
- Am folgenden Tag wurden die OTs von unspezifisch gebundener Sonde befreit. Die folgenden Waschlösungen enthielten 1 mM DTT und 1 mM EDTA pH 8,0.
  - 2 x 10 min 2 x SSC
  - 30 min in 10 mg/ml RNase A in 1 x RNase A-Puffer
  - 2 x 10 min 2 x SSC
  - 2 x 1 h in 0,1 x SSC bei 60-70°C im Wasserbad
  - 3 x 10 min 0,5 x SSC
- Dehydrierung der Schnitte:
  - je 5 min in 50%, 70%, 95%, 100% Ethanol (+ je 2,3% Ammoniumazetat)
- 5 min lufttrocknen
- 30 min vakuumtrocknen
- die trockenen OTs wurden auf einen Karton aufgeklebt und ein Film (Kodak BioMAX MR) aufgelegt. Nach 4-20 Tagen Exposition wurde der Film entwickelt

### 2.4.18 Immunhistologische Untersuchungen

Um die Verteilung und Anwesenheit von Proteinen im Gewebeschnitt zu analysieren, wurden immunhistologische Methoden gekoppelt mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern eingesetzt, die anschließend durch konfokale Laserscan Mikroskopie (LSM 510 Zeiss Axiovert 100) detektiert werden konnten.

Die in der Arbeit eingesetzten primären und sekundären Antikörper sind in Tabelle 6.4 und 6.5 im Anhang aufgelistet.

#### Protokoll:

- Paraffin- bzw. Kryo-Schnittpräparate wurden, wie in 2.4.19.1/2.4.19.2 beschrieben, vorbehandelt
- OTs 5 min in 1 x PBS waschen
- Blockierung:  
ÜN bei 4°C in 10% NGS (*Normal Goat Serum*; Vector)/0,3% Triton/PBS
- Inkubation mit Primäantikörper:  
Der primäre Antikörper wurde in 5% NGS/0,2% Triton/PBS in der jeweiligen Verdünnung aufgenommen und für 2-4 h auf die Schnitte aufgebracht
- 3 x 20 min in 2% NGS waschen
- Inkubation mit Sekundäantikörper:  
Der Fluoreszenz-markierte, sekundäre Antikörper wurde in 2% NGS/PBS in der jeweiligen Verdünnung aufgenommen und für 1-2 h auf die Schnitte aufgebracht und vor Licht geschützt
- 2 x 5 min in 1 x PBS waschen
- optionaler Färbeschritt mit Hoechst 33258 (0,2 µg/ml; Sigma):  
10 min in Färbelösung
- 2 x 5 min 1 x PBS waschen

- OTs mit Permafluor (Beckman Coulter) einbetten
- OTs bei 4°C lichtgeschützt aufbewahren

### 2.4.19 Histologische Untersuchungen

Um die Morphologie von verschiedenen Geweben auf unterschiedliche Gesichtspunkte hin untersuchen zu können, wurden verschiedene Färbetechniken eingesetzt.

#### 2.4.19.1 Anfertigung von Gefrierschnitten

Die entnommenen Gewebe wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend in einem Kryostaten (Leica) bei -20°C 8-16 µm dick geschnitten. Die Schnitte wurden auf Polylysin beschichtete Objektträger (Menzel) aufgebracht und bei -80°C aufbewahrt.

Für die Verwendung der Kryoschnitte wurde immer nur die Anzahl an OTs, die für den Versuch benötigt wurden bei 4°C aufgetaut und anschließend folgendermaßen behandelt:

- OTs 30 min unter Vakuum trocknen
- 15-20 min in 4% PFA (Fixierung)
- in 1 x PBS aufbewahren

#### 2.4.19.2 Anfertigung von Paraffinschnitten

Die entnommenen Gewebe wurden in 1 x PBS gewaschen und anschließend folgendem Protokoll unterworfen:

- Fixierung:  
ÜN bei 4°C in 4% PFA unter Schütteln
- Dehydrierung der Schnitte:  
je 1 h bei 4°C in 50%, 70%, 95%, 100% Ethanol unter Schütteln
- je 1 h bei RT in 50/50 (v/v) Ethanol/Toluol, 100% Toluol unter Schütteln
- jeweils für mindestens 1 h bei 60°C in Paraplast I-III (Sigma)
- Einbettung der Gewebe in frisches Paraplast und bei 4°C erstarren lassen
- Mit einem Microtom (Microm HM 335 E) wurden 4-16 µm dicke Schnitte angefertigt und auf polylysinierete OTs (Menzel) aufgezogen
- Vorbereitung der Schnitte für Färbungen und Immunfluoreszenz:  
2 x mindestens 20 min in 100% Toluol (Entparaffinisierung)  
je 5 min in 50%, 70%, 95%, 100% Ethanol (Dehydrierung)  
in 1 x PBS aufbewahren

#### 2.4.19.3 Hämatoxylin/Eosin Färbung (H/E Färbung)

Bei dieser Färbung wurden die Kerne blauviolett und das Zytoplasma rosa angefärbt.

#### Protokoll:

- Objektträger für 10 s in die Hämatoxylinlösung tauchen
- 2 x 2 min in H<sub>2</sub>O waschen
- kurzer Dip in 0,1% Ammoniaklösung (frisch; Merck)

## Material und Methoden

- für 3-10 s in die Eosinlösung
- 8 x Dip in 95% Ethanol
- 8 x Dip in 100% Ethanol
- 2 min in 100% Ethanol
- 2 min in Xylol
- OTs mit DePeX-Harz (Serva) einbetten

### Lösungen:

Hämatoxylin nach Harris		Eosin	
Hämatoxylin (Sigma)	7,5 g	Eosin Y (Sigma)	6,0 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	Phloxine B (Sigma)	1,5 g
		70% Ethanol	ad 250 ml

### 2.4.19.4 Nissl Färbung

Bei der Nissl Färbung werden Teile des Zellkerns und der extranukleären RNS blau gefärbt.

#### Protokoll:

- Objektträger für 2 min in 1% Cresylviolettlösung tauchen
- 1 min in H<sub>2</sub>O waschen
- kurzer Dip in 70% Ethanol, 70% Ethanol+30 mM Essigsäure (Roth), 70%, 95%, 100% Ethanol
- 2 min in Xylol
- OTs mit DePeX-Harz (Serva) einbetten

#### Lösung:

Cresylviolett	
Cresylviolett (Sigma)	10 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
filtrieren	

### 2.4.19.5 Zellkernfärbung mit Hoechst 33258

Für die Visualisierung von Zellkernen bzw. deren DNS wurde das Bisbenzimid Hoechst 33258 der Firma Sigma verwendet. Da der Fluoreszenz-Farbstoff (Absorption bei 350 nm, Emission bei 450 nm) in AT-reiche Regionen der DNS interkaliert, kann die DNS der Zellkerne nach Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden.

### 2.4.19.6 Golgi Cox Färbung

Um eine detaillierte Aussage über die Morphologie der untersuchten Gehirnregionen treffen zu können, wurde eine Golgi Cox Färbung mit dem *FD Rapid GolgiStain™ Kit* der Firma FD NeuroTechnologies durchgeführt. Die Methode ermöglicht die Anfärbung von Neuronen und Gliazellen und es können sogar Veränderungen in neuronalen Dendriten und dendritischen Spines detektiert werden, sofern vorhanden.

Alle benötigten Reagenzien und Lösungen waren im Kit bereitgestellt.

2.4.19.7 X-Gal Färbung

Das für die  $\beta$ -Galaktosidase kodierende *lacZ* Gen von *E. coli* wird in großem Umfang als Reporter gen für Expressionsstudien eingesetzt. X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid) ist ein sensibler Farbindikator für die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität. Das farblose X-Gal wird durch  $\beta$ -Galaktosidase hydrolysiert, in anschließenden Reaktionen oxidiert und letztendlich zu einem blauen, unlöslichen Indigofarbstoff dimerisiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Mausgewebe für die X-Gal Färbung eingesetzt.

**Protokoll:**

- Entnahme des Gewebes
- Waschen in 1 x PBS
- Fixierung des Gewebes in *Cell Fix* für mindesten 1 h bei RT
- Waschen in 1 x PBS
- ÜN bei RT in X-Gal Färbelösung + 1 mg/ml X-Gal (immer frisch zugeben) (lichtgeschützt)

**Lösungen:**

Cell Fix		X-Gal Färbelösung		X-Gal	
2% Formaldehyd (Merck)	27 ml	1 M MgCl <sub>2</sub>	1 ml	X-Gal (Roth)	40 mg
0,2% Glutaraldehyd (Sigma)	4 ml	2,5 mM K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> (Roth)	0,83 g	DMSO (Merck)	1 ml
1 x PBS	ad 500 ml	2,5 mM K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> (Roth)	1,07 g	bei -20 °C lagern	
		1 x PBS	ad 500 ml		

**2.5 Statistik**

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwerts dargestellt. Die statistischen Auswertungen wurden mittels ANOVA (wiederholte Messungen, nicht paarweise Vergleiche), dem Dunnet *ad hoc* Test und *t*-Tests durchgeführt, um Unterschiede zwischen bestimmten Zeitpunkten zu evaluieren. Das gewählte Signifikanzniveau betrug  $p < 0,05$ .

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Generierung und Charakterisierung des Hippokampus-spezifischen KO-Modells

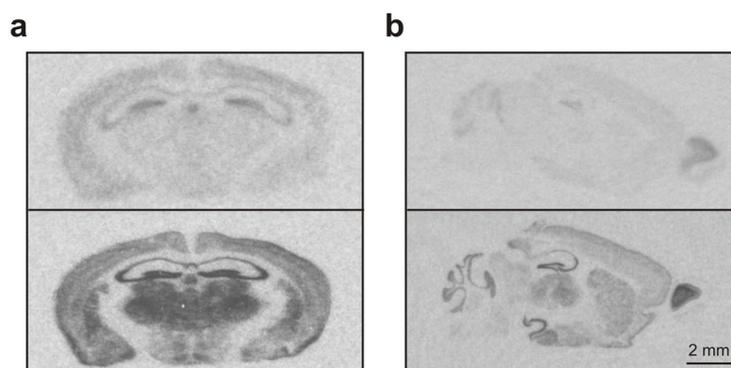
Da Mäuse mit einer globalen Inaktivierung des *CACNA1C* Gens ( $Ca_v1.2$ ) am Tag 14,5 *p.c. in utero* sterben (Seisenberger et al., 2000), wurde das Cre-Rekombinase System unter Verwendung der NEX-Cre transgenen Mauslinie (Tabelle 6.6) zur Generierung von Cortex- und Hippokampus-spezifischen *CACNA1C* Knockouttieren eingesetzt. Die NEX-Cre Mauslinie exprimiert die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des endogenen NEX Promotors hauptsächlich in der CA1 bis CA3 Region des Hippokampus (Schwab et al., 2000). Für den Nachweis des NEX Wildtyp Allels (+) und des NEX Knockin Allels (-) mittels PCR (2.4.10) wurden die Primer NEX1, RF113 und RF114 (Tabelle 6.1) verwendet.

##### 3.1.1 Grundcharakterisierung

Die Nachkommen aus der Versuchstierzucht (Kontroll- und  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Tiere; s. 2.1.4) waren lebensfähig und fertil. Auch die Lebenserwartung und das Körpergewicht der  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Tiere wiesen keine Veränderungen im Vergleich zu den Kontrolltieren auf (Daten nicht gezeigt).

##### 3.1.1.1 Expression des $Ca_v1.2$ und $Ca_v1.3$ L-Typ Kalziumkanals im ZNS

Um vorab die Expression der beiden L-Typ Kalziumkanäle im ZNS zu untersuchen, wurden *in situ* Hybridisierungen (2.4.17) mit spezifischen Sonden für die Gene durchgeführt. Wie in Abbildung 3.1 zu sehen ist, werden sowohl der  $Ca_v1.2$  als auch der  $Ca_v1.3$  Kanal in kortikalen, hippokampalen und cerebellären Neuronen der Maus exprimiert, wobei der  $Ca_v1.2$  Kanal den vorherrschenden Subtyp darstellt.



**Abbildung 3.1: *In situ* Hybridisierung auf den  $Ca_v1.2$  und  $Ca_v1.3$  L-Typ Kalziumkanal**

a) Frontale Schnitte durch das Mäuse-Gehirn. Oben: Expression der  $Ca_v1.3$  mRNS. Unten: Expression der  $Ca_v1.2$  mRNS.

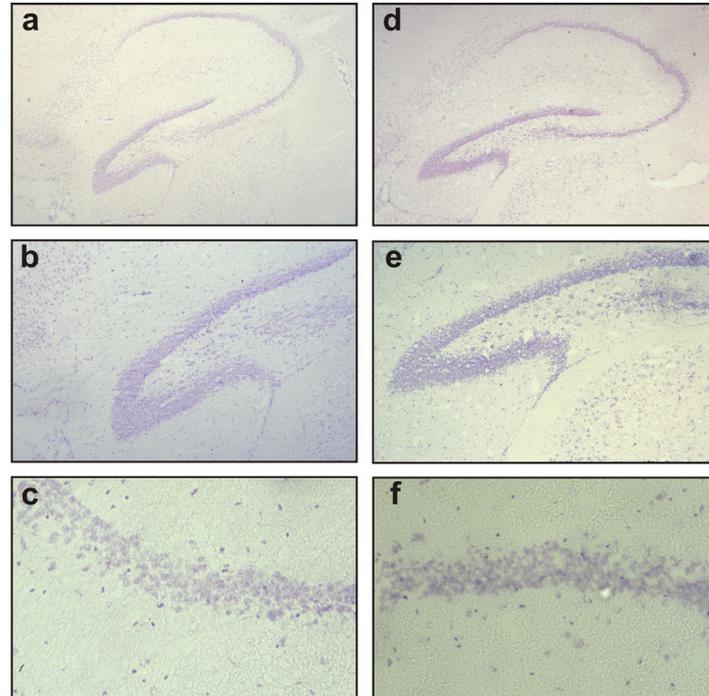
b) Sagittale Schnitte durch das Mäuse-Gehirn. Oben: Expression der  $Ca_v1.3$  mRNS. Unten: Expression der  $Ca_v1.2$  mRNS.

Die Expression des  $Ca_v1.2$  L-Typ Kalziumkanals auf mRNS Ebene *in situ* ist deutlich stärker als die für den  $Ca_v1.3$  Kanal. Besonders hohe Expressionslevel des  $Ca_v1.2$  Kanals sind im Bulbus, Cortex, Hippokampus und Thalamus zu detektieren.

## Ergebnisse

### 3.1.1.2 Morphologische Untersuchung der $Ca_v1.2^{HCKO}$ Tiere

Zunächst wurden die Gehirne der  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Tiere auf grundsätzliche morphologische Veränderungen hin untersucht. Hierfür wurde eine Nissl Färbung (2.4.19.4) durchgeführt und sämtliche Gehirnareale auf Auffälligkeiten überprüft. In den Knockouttieren zeigten sich jedoch keine ersichtlichen morphologischen Veränderungen. In Abbildung 3.2 ist der Hippokampus in unterschiedlichen Auflösungen dargestellt.



**Abbildung 3.2: Morphologische Untersuchung der  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Tiere mittels Nissl Färbung**

Gezeigt sind mittels Nissl angefärbte sagittale Gehirnschnitte der Maus im Bereich des Hippokampus. Zwischen den Kontroll- (a-c)) und Knockouttieren (d-f)) waren keine morphologischen Unterschiede in den CA Regionen des Hippokampus zu erkennen.

a)-c):  $Ca_v1.2^{+/L2}$  NEX-Cre<sup>+Cre</sup>; d)-f):  $Ca_v1.2^{HCKO}$ ; a),d): 5 x; b),e): 10 x; c),f): 20 x.

### 3.1.1.3 Golgi Cox Färbung

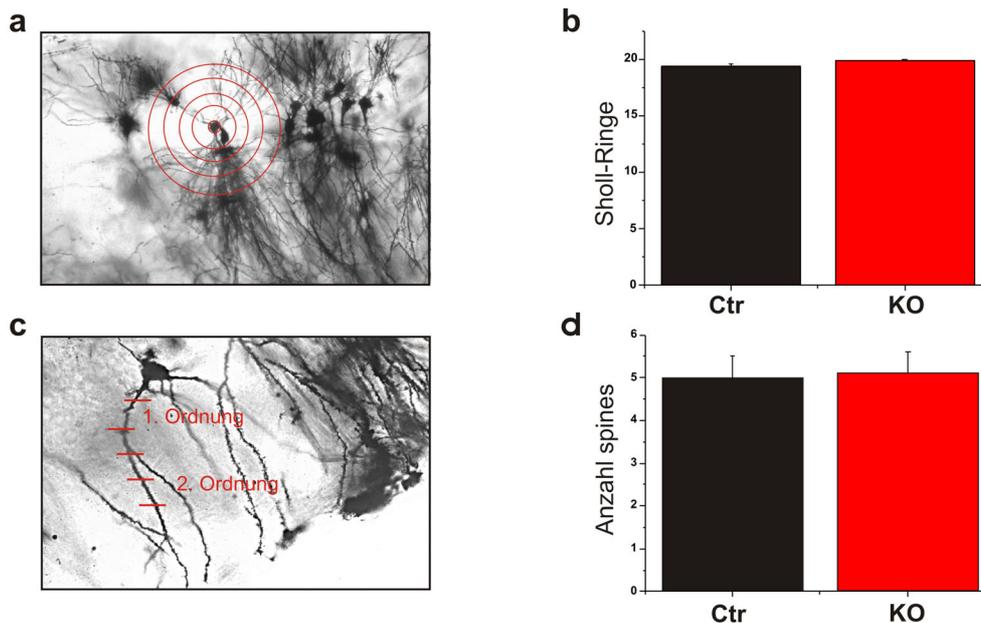
Um eine detaillierte Aussage über die Morphologie der einzelnen Gehirnregionen treffen zu können, wurde eine Golgi Cox Färbung (2.4.19.6) durchgeführt. Dadurch wird es möglich, Neuronen und Gliazellen spezifisch anzufärben und Veränderungen in neuronalen Dendriten und dendritischen *spines* zu detektieren.

Besondere Beachtung galt dem Hippokampus, da sich diese Region zum einen für eine detaillierte Auswertung eignet und zum anderen für die anschließenden Lernversuche eine wichtige Rolle spielt. Auf den ersten Blick waren keinerlei Auffälligkeiten in der Morphologie der angefärbten Neuronen im Hippokampus erkennbar. Daher wurden im Folgenden einzelne Neuronengruppen mit speziellen Methoden untersucht. Die Pyramidenzellen der CA1 Region des Hippokampus wurden mit der sogenannten Sholl-Methode (Sholl, 1955) ausgewertet. Diese Methode ermöglicht die Längenbestimmung der einzelnen Dendritenbäume durch Zuhilfenahme der angelegten Sholl-Kreise (Abstand zwischen den einzelnen Ringen: 30  $\mu$ m) (Beispielbild s. Abbildung 3.3 a). Die Auswertung

## Ergebnisse

der Dendritenlängen der Pyramidenzellen ergab keinerlei Unterschiede zwischen den Kontroll- und Knockouttieren (Abbildung 3.3 b). Der nächste Zelltypus der untersucht wurde, die Körnerzellen des *Gyrus dentatus*, wurde hinsichtlich zwei verschiedener Kriterien ausgewertet. Zum einen wurde die Verzweigungszahl der dendritischen Äste bestimmt und zum anderen die Anzahl der dendritischen *spines* in diesen Ästen. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Genotypen (Abbildung 3.3 d).

Aus diesen Daten kann somit gefolgert werden, dass es in den  $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$  Mäusen zu keinen morphologischen Auffälligkeiten in den Neuronen des Hippokampus kommt.



**Abbildung 3.3: Golgi Cox Färbung der hippocampalen Neuronen aus  $\text{Ca}_v1.2$  NEX-Cre Mäusen**

a) Beispielbild der hippocampalen CA1 Region. Dargestellt sind die Pyramidenzellen und eine angedeutete Schablone der Sholl-Ringe (nicht maßstabsgetreu). Mit Hilfe dieser Schablone (Abstand der Ringe beträgt  $30 \mu\text{m}$ ) kann die Länge der pyramidalen Dendriten bestimmt werden.

b) Auswertung der Pyramidenzellen von Kontroll- und  $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$  Tieren (je  $n = 10$ ). Es ergaben sich keinerlei Unterschiede in den Dendritenlängen.

c) Beispielbild einer Körnerzelle aus dem *Gyrus dentatus*. Die Körnerzellen wurden in Segmente mit einem Abstand von  $50 \mu\text{m}$  eingeteilt (hier nicht maßstabsgetreu) und die *spines* darin ausgezählt. Auch der Verzweigungsgrad der Dendritenäste wurde ermittelt.

d) Auswertung der *spines* auf den Dendriten der Körnerzellen von Kontroll- und  $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$  Tieren (je  $n = 10$ ). Es waren keine Unterschiede in der Anzahl der *spines* detektierbar.

### 3.1.2 Rekombinations- und Expressionsanalyse

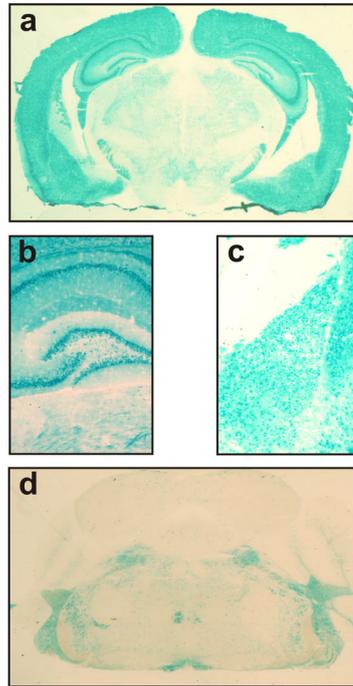
#### 3.1.2.1 Expressionsanalyse mittels X-Gal Färbung

Um überprüfen zu können, in welchen Gehirnregionen die Cre-Rekombinase aktiv ist, wurde die NEX-Cre Mauslinie zusätzlich mit einer lacZ Reporterlinie (ACZL; s. Tabelle 6.6) verpaart und die Rekombination mittels X-Gal Färbung (2.4.19.7) überprüft. In der ACZL Reporterlinie steht ein lacZ Gen unter der Kontrolle eines ubiquitär aktiven Promotors (CAT Gen). Vor dem offenen Leserahmen des lacZ Gens ist eine, durch loxP-Seiten flankierte, Stop-Sequenz eingefügt, die durch Cre-vermittelte Exzision entfernt werden kann.

Durch Entfernen der Stop-Sequenz wird dann die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase möglich, die nun mit Hilfe der X-Gal Färbung in den Organen nachgewiesen werden kann.

## Ergebnisse

Die Färbung ergab nur im Vorhirn der Tiere (v.a. Hippokampus und Cortex) ein spezifisches Signal (Abbildung 3.4); andere Organe waren nicht gefärbt (Daten nicht gezeigt).



### Abbildung 3.4: X-Gal Färbung von NEX-Cre Mäusen nach Verpaarung mit ACZL Reporterlinie

Die NEX-Cre Mauslinie wurde mit der ACZL Reporterlinie verkreuzt und im Anschluss eine X-Gal Färbung auf Cryoschnitten des Gehirns durchgeführt. Eine Blaufärbung nach X-Gal Färbung tritt nur in den Geweben auf, in denen die Cre-Rekombinase aktiv war und die Stop-Sequenz vor dem lacZ Gen entfernen konnte.

a) Gesamtübersicht des Gehirns (2,5 x). Eine hohe Rekombination hat im Cortex, Hippokampus und Thalamus stattgefunden.

b) + c) Im Hippokampus (10 x) und der Amygdala konnte eine nahezu vollständige Rekombination detektiert werden.

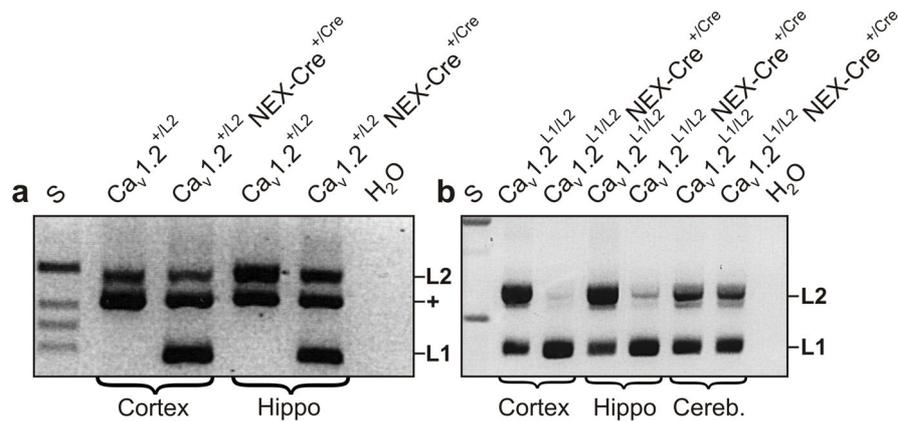
d) Im Cerebellum (2,5 x) war nur in einigen spezialisierten Zellen eine schwache Blaufärbung erkennbar.

### 3.1.2.2 Rekombination auf genomischer und mRNA Ebene

Die PCR Analyse der DNS (2.4.11) und mRNA (2.4.12) aus verschiedenen Gehirnteilen von  $Ca_v1.2^{+/L2}$  NEX-Cre<sup>+Cre</sup> (DNS) bzw.  $Ca_v1.2^{L1/L2}$  NEX-Cre<sup>+Cre</sup> Mäusen (mRNA) und  $Ca_v1.2^{+/L2}$  (DNS) bzw.  $Ca_v1.2^{L1/L2}$  (mRNA) Tieren ohne NEX-Cre (Kontrolle) ergab, dass die Rekombination, d.h. die Exzision der „geflochten“ Exone 14 und 15 des *CACNA1C* Gens durch die Cre-Rekombinase, in den Zellen des Gehirns und dort vor allem im Hippokampus, sowohl auf genomischer als auch auf mRNA Ebene stattgefunden hat (Abbildung 3.5). In den oben genannten Kontrollen kam es aufgrund des Fehlens des NEX-Cre zu keiner Rekombination. Der geringe Anteil an nicht umgesetztem L2 Allel im Hippokampus bzw. in der Amygdala (Abbildung 3.5) der Knockouttiere kommt vermutlich durch nicht-neuronale Zellen zustande, die zwar  $Ca_v1.2$  exprimieren, denen jedoch die für den Umsatz notwendige Cre-Rekombinase fehlt (z.B. Calbindin-positive Interneuronen; S. Goebbels, persönliche Mitteilung).

Das Cerebellum, in dem Cre nur in einer sehr kleinen Gruppe von Neuronen aktiv ist, zeigte keine Rekombinationsunterschiede auf mRNA Ebene zwischen den beiden verwendeten Genotypen.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.5: Rekombination auf genomischer und mRNA Ebene in  $Ca_v1.2$  NEX-Cre Tieren**

a) Rekombination auf genomischer Ebene. In den  $Ca_v1.2^{+/L2}$  Tieren ohne NEX-Cre kommt es zu keiner Exzision der Exone 14 und 15 und daher auch nicht zum Auftreten eines L1 Allels. Bei den Kontrolltieren ( $Ca_v1.2^{+/L2}$  NEX-Cre<sup>+Cre</sup>) tritt durch Cre-vermittelte Rekombination ein L1 Allel im Cortex und Hippokampus auf.

b) Rekombination auf mRNA Ebene. In den  $Ca_v1.2^{L1/L2}$  Mäusen, die über keine Rekombinase verfügen, kann es auf mRNA Ebene zu keinem Umsatz des L2 Allels in ein L1 Allel kommen. Bei den Knockouttieren ( $Ca_v1.2^{HCKO}$ ) jedoch tritt sowohl im Cortex als auch im Hippokampus eine nahezu vollständige Rekombination ein und das L2 Allel wird komplett in das L1 (Knockout) Allel umgewandelt. Im Cerebellum, in dem das NEX-Cre so gut wie nicht aktiv ist, kommt es auch in den  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Tieren zu keiner Rekombination auf mRNA Ebene.

S: Standard-Marker; L2: gefloxtes *CACNA1C* Allel; +: WT Allel; L1: Knockout Allel; Hippo: Hippokampus; Cereb.: Cerebellum.

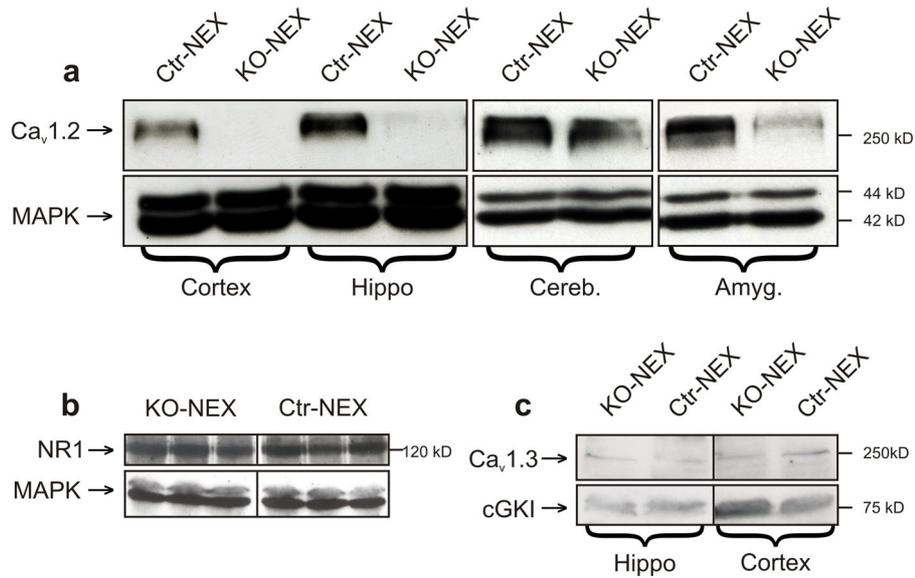
### 3.1.2.3 Expressionsanalyse im Western Blot

In den Proteinproben (2.4.13.2) aus Hippokampus und Cortex von  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Tieren war die Expression des  $Ca_v1.2$  Proteins gegenüber Kontrollmäusen stark vermindert. Alle anderen getesteten Gewebe zeigten eine normale  $Ca_v1.2$  Expression (Abbildung 3.6 a). Wie bereits auf mRNA Ebene gezeigt werden konnte, waren die Level des  $Ca_v1.2$  Proteins im Cerebellum zwischen den Kontroll- und Knockouttieren unverändert.

Die sehr schwache  $Ca_v1.2$  Bande, die noch im Hippokampus der  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Mäuse detektierbar war, resultiert vermutlich, wie oben beschrieben, aus nicht-neuronalen Zelltypen. Auch in der Amygdala der  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Tiere konnte kein  $Ca_v1.2$  mehr nachgewiesen werden.

Um eventuelle kompensatorische Hochregulationen von anderen Kalzium-permeablen Ionenkanälen als mögliche Folge der *CACNA1C* Geninaktivierung auszuschließen, wurden die Expressionen des  $Ca_v1.3$  Kanals und der NR1-Untereinheit des N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA) Rezeptors (NMDAR) auf Proteinebene untersucht. Wie Abbildung 3.6 b und c zeigt, kommt es jedoch zu keiner Hochregulation der beiden Kanalproteine.

## Ergebnisse



### Abbildung 3.6: Western Blot Analysen in Ca<sub>v</sub>1.2<sup>HCKO</sup> Tieren

a) Der Western Blot von Proteinpräparationen des Gehirns der Maus mit einem anti-Ca<sub>v</sub>1.2 Antikörper zeigt eine starke Reduktion des Ca<sub>v</sub>1.2 Proteins im Cortex und Hippokampus von Ca<sub>v</sub>1.2<sup>HCKO</sup> Mäusen (KO-NEX). Der Proteinlevel im Cerebellum ist unverändert. Auch in der Amygdala von Knockouttieren war die Expression des Ca<sub>v</sub>1.2 Proteins deutlich geringer als in den Kontrollen (Ctr-NEX). Als Ladekontrolle wurde die MAPK verwendet.

b) + c) Western Blots auf die NMDAR-Untereinheit NR1 und den Ca<sub>v</sub>1.3 Kalziumkanal. Als Ladekontrollen wurden die MAPK und die cGKI verwendet.

Ctr-NEX: Ca<sub>v</sub>1.2<sup>+L2</sup> NEX-Cre<sup>+Cre</sup>; KO-NEX: Ca<sub>v</sub>1.2<sup>L1/L2</sup> NEX-Cre<sup>+Cre</sup>; Hippo: Hippokampus; Cereb.: Cerebellum; Amyg.: Amygdala.

Die Ergebnisse der Grundcharakterisierung haben gezeigt, dass mit Hilfe der NEX-Cre Mauslinie eine erfolgreiche Cortex- und Hippokampus-spezifische Inaktivierung des *CACNA1C* Gens erfolgen konnte.

### 3.1.3 Verhaltensbiologische Analyse

Im nächsten Schritt wurden die Knockoutmäuse in verschiedenen Lernversuchen getestet, um eventuelle Veränderungen, die durch das Fehlen des *CACNA1C* Gens im Hippokampus zustande kommen könnten, aufzudecken.

Um Defekte in anderen Teilbereichen des Verhaltens ausschließen zu können, die eventuell das Lernvermögen der Tiere beeinflussen könnten, mussten zu Beginn eine Reihe von Kontrolleexperimenten durchgeführt werden (*Open field*-, Rotarod- und *distal landmark* Test).

#### 3.1.3.1 *Open field* Test

Für die Untersuchung des Explorations- und Angstverhaltens von Mäusen kann ein *Open field* Test (2.2.1) durchgeführt werden, in dem die Tiere eine offene, unbekannte Fläche zu erkunden haben. Für den Versuch wurden jeweils 10 Kontroll- ( $Ca_v1.2^{+/L2}$  NEX-Cre<sup>+/Cre</sup>) und 10 Knockoutmäuse ( $Ca_v1.2^{HCKO}$ ) eingesetzt.

Über die 4 getesteten Tage hinweg bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen. Die Gesamtzahl der von den Kontrolltieren betretenen Felder ( $119 \pm 20$  an Tag 1 und  $89 \pm 9$  an Tag 4) entsprach jener der Knockouttiere ( $112 \pm 19$  an Tag 1 und  $70 \pm 18$  an Tag 4). Beide Genotypen betraten vor allem die äußeren Felder, nämlich  $114 \pm 18$  (Tag 1) und  $85 \pm 7$  (Tag 4) bei den Kontrollen sowie  $105 \pm 19$  (Tag 1) und  $70 \pm 15$  (Tag 4) bei den  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Mäusen.

Somit konnten unspezifische Effekte durch die Inaktivierung des *CACNA1C* Gens auf das Explorations- und Angstverhalten ausgeschlossen werden.

#### 3.1.3.2 Rotarod Test

Für viele Lernversuche spielt es auch eine entscheidende Rolle, dass die Tiere über ausreichende motorische Fähigkeiten verfügen und daher wurde mit Hilfe des Rotarod Tests (2.2.2) die Motorik der Mäuse überprüft.

Alle Versuchstiere (10 pro Genotyp) wurden dreimal täglich über einen Zeitraum von 5 Tagen im Rotarod getestet. Sowohl die Kontroll- als auch die Knockouttiere zeigten beide ein gleich gutes Ergebnis in diesem Test. Die mittlere Zeitdauer, während derer die Mäuse der beiden Versuchsgruppen es schafften, auf dem beschleunigenden Stab zu balancieren, nahm bei den Gruppen in gleichem Maße auf einen fast identisches Level am Tag 3 zu und blieb während der sich anschließenden Tage konstant (Daten nicht gezeigt).

#### 3.1.3.3 *Distal landmark* Test

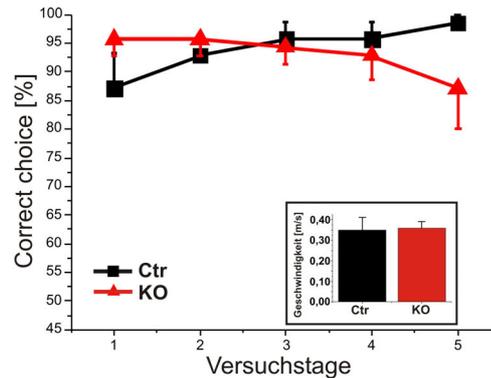
Da in beiden im Anschluss aufgeführten Lernversuchen mit distalen visuellen Markierungen gearbeitet wurde, musste vorab untersucht werden, ob die Tiere in der Lage sind, die Markierungen richtig zu sehen.

Um diesem Problem zu begegnen, wurden wiederum 10 Mäuse pro Genotyp in einem speziellen diskriminatorischen Wasserlabyrinth Test trainiert, der zur Überprüfung der Sehfähigkeit diente. In diesem *distal landmark* Test (2.2.3.2) mussten die Tiere eine stabile Plattform, die durch einen deutlich sichtbaren distalen „Wegweiser“ (helle Lichtquelle) gekennzeichnet war und deren Position sich während der 5 Tage Versuchszeit nicht änderte, in einem ansonsten abgedunkelten Raum

## Ergebnisse

auffinden. Auch in diesem Test unterschieden sich die Knockouttiere nicht von den Kontrollen, d.h. beide Gruppen waren in der Lage, die Markierung als distale Landmarke zu erkennen und dadurch die Position der stabilen Plattform im Wasserlabyrinth mit einer hohen *correct choice* über die Versuchstage aufzufinden (Abbildung 3.7).

Zugleich konnte mit Hilfe dieses Tests die Schwimgeschwindigkeit der Mäuse bestimmt werden. Auch hier ergaben sich keinerlei Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Kontrollen:  $0,35 \pm 0,06$  m/s; Knockouts:  $0,36 \pm 0,03$  m/s) (Abbildung 3.7 klein).



**Abbildung 3.7: Keine Seh- und Motivationsstörungen in  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Mäusen - *distal landmark* Test**

*Correct choice* Werte von Mäusen, die darauf trainiert wurden, die richtige Plattform in einem *distal landmark* Test zu finden, indem sie sich an dem hell erleuchteten Wegweiser in einem ansonsten dunklen Raum orientieren. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontroll- und Knockouttieren (je  $n = 10$ ).

Klein: Schwimgeschwindigkeit. Die Kontroll- und Knockouttiere weisen die gleiche Schwimgeschwindigkeit (m/s) auf ( $n = 10$ ).

■:  $Ca_v1.2^{+/L2} NEX-Cre^{+/Cre}$ ; ▲:  $Ca_v1.2^{L1/L2} NEX-Cre^{+/Cre}$ .

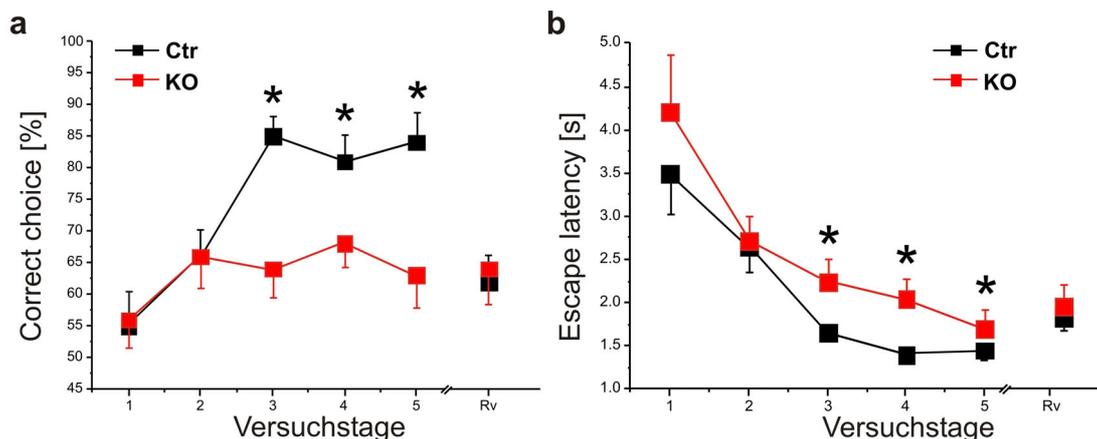
### 3.1.3.4 Diskriminatorisches Wasserlabyrinth

Ein gut etablierter Test, um das Hippokampus-abhängige räumliche Lernen zu untersuchen, ist der diskriminatorische Wasserlabyrinth Test (Arns et al., 1999; Steckler et al., 1999; Kleppisch et al., 2003), der von Morris (Morris et al., 1986b) entwickelt wurde. Es wurde bereits mit Hilfe von Läsionen gezeigt, dass dieser Test entscheidend von der Funktion des Hippokampus abhängt (Arns et al., 1999). Der in dieser Arbeit verwendete Test unterscheidet sich in einigen Punkten von dem oben erwähnten nicht-diskriminatorischen *Morris Water Maze*. Zum einen werden sichtbare und keine unsichtbaren Plattformen verwendet; dadurch wird den Tieren erspart, dass sie überhaupt einmal lernen müssen, dass sich eine Plattform im Labyrinth befindet. Zum anderen sind die Fluchtzeiten (*escape latencies*) deutlich verkürzt, wodurch die Mäuse, die sehr wasserscheu sind, weniger Stress ausgesetzt sind. Der diskriminatorische Test mit den zwei Plattformen bietet darüber hinaus auch noch die Möglichkeit, das räumliche Lernen unter Verwendung eines Wahrscheinlichkeits-Faktors zu erfassen. Dieser Faktor, nämlich die Wahrscheinlichkeit der Wahl der richtigen Plattform, ist nicht so störungsanfällig wie z.B. die Fluchtzeit oder die Weglänge im Becken, die von dem Tier zurückgelegt werden muss.

Die beiden Versuchsgruppen (pro Genotyp  $n=10$ ) wurden über 5 Tage im diskriminatorischen Wasserlabyrinth (2.2.3.1) darauf trainiert, die richtige, unsinkbare Plattform im Becken mit Hilfe von deutlich sichtbaren Markierungen, die sich im umliegenden Raum befanden, zu finden. Während der

## Ergebnisse

ersten beiden Tage zeigten sich keine Unterschiede in der *correct choice* zwischen Kontroll- und Knockouttieren und auch der Anstieg dieses Parameters von Tag 1 auf Tag 2 war vergleichbar. Ab dem Tag 2 jedoch änderten sich die Verhältnisse in der Lernleistung zwischen den Kontroll- und  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Tieren dramatisch. Während die Knockoutmäuse ihre Leistung nicht weiter steigern konnten, sie blieben bei einer *correct choice* von ca. 65%, verbesserte sich die Wahrscheinlichkeit die richtige Plattform zu finden bei den Kontrollen signifikant auf über 80% (Abbildung 3.8 a). Auch wenn die  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Tiere die richtige Plattform fanden, dann war jedoch auch die *escape latency* signifikant erhöht. Um zu testen, ob die Tiere unter Umständen das Aussehen einer der Plattformen zur Unterscheidung herangezogen haben, wurde die stabile Plattform nach den 5 Versuchstagen in den gegenüberliegenden Quadranten gewechselt (*reversal*) und die Tiere erneut getestet. Während dieses *reversal* Tests (Rv) fiel die Wahrscheinlichkeit der *correct choices* sowohl der Kontroll- als auch der Knockouttiere auf die Werte ab, die für eine zufällige Wahl der Plattformen sprechen (Abbildung 3.8). Daraus kann gefolgert werden, dass die beiden Plattformen nicht anhand ihres Aussehens unterschieden wurden, sondern dass die Tiere tatsächlich visuelle Markierungen im Raum zur Orientierung verwendet haben.



**Abbildung 3.8: Vermindertes räumliches Lernen in  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Tieren - diskriminatorischer Test**

a) *Correct choice* Werte von Tieren, die darauf trainiert wurden, die richtige Plattform in einem diskriminatorischen Wasserlabyrinth Test anhand von distalen Wegweisern zu finden. Pro Versuchstag wurden 10 Durchgänge absolviert. Die Knockouttiere (■) zeigten ab Tag 3 einen signifikant geringeren *correct choice* Wert ( $p < 0,05$ ) als die Kontrollen (■). Während des anschließenden *reversal* (Rv) Durchgangs fiel der *correct choice* Wert der Kontrolltiere auf einen Wert, der der Ratewahrscheinlichkeit entspricht.

b) Der Graph zeigt die *escape latency* (Fluchtzeit) der Mäuse, die die korrekte Plattform im Labyrinth fanden. Die  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Mäuse benötigten ab Tag 3 eine signifikant längere Fluchtzeit als die entsprechenden Kontrollen.

■:  $Ca_v1.2^{+/L2} NEX-Cre^{+/Cre}$ ; ■:  $Ca_v1.2^{L1/L2} NEX-Cre^{+/Cre}$ . Pro Genotyp n = 10 Mäuse; \*,  $p < 0,05$ .

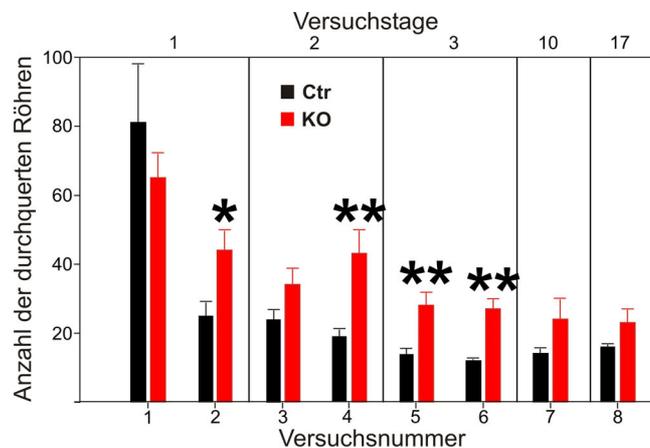
Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das Hippokampus-abhängige räumliche Lernverhalten der  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Mäuse stark beeinträchtigt ist.

### 3.1.3.5 Labyrinthtest

Um die im diskriminatorischen Wasserlabyrinth Test erhaltenen Daten noch zu untermauern, wurde ein zweiter, komplexerer Lernversuch durchgeführt. Dieser Labyrinthtest unterscheidet sich vom Wasserlabyrinth Test nicht nur in der Komplexität, sondern auch in der Aufgabe der Mäuse und in der Art des Motivationsfaktors. Im bereits etablierten Labyrinth Test (Tang et al., 1999; Adelsberger et al., 2005) (2.2.4) wurden erneut 10 Mäuse pro Genotyp daraufhin trainiert, sich den Weg durch ein Labyrinth, das aus transparenten Acrylglasröhren bestand, in ihren dunklen Heimatkäfig am Ausgang zu suchen. Für die Orientierung befanden sich deutlich sichtbare distale Markierungen im Raum. Da dieser Test vor allem auf einer positiven Motivation der Tiere beruht, kann hier das Entkommen aus dem erzwungenen Schwimmen vermieden werden.

Während der ersten Versuchstage war die Anzahl der durchquerten Röhren bis zum Erreichen des Heimatkäfigs zwischen Kontroll- und  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Tieren nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 3.9). Daraus kann gefolgert werden, dass die beiden naiven Versuchsgruppen ähnlich effektive Suchstrategien anwenden. Die Anzahl der durchquerten Röhren sollte während des Trainings in einem Maße abfallen, das die Effizienz der räumlichen Lernstrategie und die Bildung von räumlichem Gedächtnis widerspiegelt. Die Knockouttiere benötigten jedoch während aller weiteren Versuchstage eine signifikant längere Wegstrecke als die Kontrollen (Abbildung 3.9).

Die Ergebnisse aus dem Labyrinthtest stehen somit in guter Übereinstimmung mit denen aus dem diskriminatorischen Wasserlabyrinth Test und bestätigen ein Defizit im Hippokampus-abhängigen räumlichen Lernvermögen der  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Tiere.



**Abbildung 3.9: Vermindertes räumliches Lernen in  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Tieren - Labyrinthtest**

Das räumliche Lernen wurde mit Hilfe eines Labyrinths untersucht, das aus durchsichtigen, hell erleuchteten Röhren bestand und in dem nur ein richtiger Weg in den dunklen Heimatkäfig führte. Das Ergebnis ist als Anzahl der Röhren ausgedrückt, die die Mäuse bis zum Ziel durchlaufen. Es wurden zwei Durchgänge an den ersten drei Tagen und ein Durchgang am Tag 10 und 17 durchgeführt. Pro Genotyp n = 10.

■:  $Ca_v1.2^{NEX-Cre^{+/Cre}}$ ; ■:  $Ca_v1.2^{HCKO}$ ; \*, \*: p < 0,05; \*\*, \*\*: p < 0,01.

### 3.1.4 Elektrophysiologische Untersuchungen

Viele Gehirnbereiche können sich in Abhängigkeit von sensorischer Erfahrung strukturell und funktionell auf synaptischer Ebene verändern. Dieses Phänomen wird daher auch als synaptische Plastizität bezeichnet und in Zusammenhang mit Lern- und Gedächtnisprozessen gebracht (Zola-Morgan et al., 1986; Mishkin and Appenzeller, 1987; Squire et al., 1988; Zola-Morgan et al., 1993; Whitlock et al., 2006). Da es zahlreiche Hinweise darauf gibt, dass der Hippokampus eine wesentliche Rolle bei bestimmten Lern- und Gedächtnisleistungen spielt, wurde mit Hilfe der Elektrophysiologie das zelluläre Korrelat dieser Prozesse untersucht. Dabei wird eine sogenannte Langzeitpotenzierung (LTP), die als aktivitätsabhängige, langanhaltende Verstärkung der synaptischen Übertragung definiert ist, in Präsynapsen mit Hilfe von verschiedenen Stimuli in Gehirnschnitten ausgelöst.

Eine besonders stabile LTP kann in den Pyramidenzellen der CA1 Region des Hippokampus erzeugt werden, indem die präsynaptischen Schaffer Kollateralen hochfrequent gereizt werden. Auf molekularer Ebene kommt es zu einem erhöhten Kalizumeinstrom über NMDA-Rezeptoren (NMDAR) und dadurch zu einem massiven Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration in der Postsynapse (Bliss and Collingridge, 1993).

Neben dieser Form der NMDAR-abhängigen Langzeitpotenzierung existiert auch eine NMDAR-unabhängige LTP, die durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über postsynaptische  $\text{Ca}_v1.x$  Kanäle hervorgerufen wird (Grover and Teyler, 1990; Grover, 1998; Morgan and Teyler, 1999).

Wie bereits in der *in situ* Hybridisierung und im Western Blot gezeigt, ist der  $\text{Ca}_v1.2$  L-Typ Kalziumkanal im Hippokampus von Mäusen die vorherrschende  $\text{Ca}_v1.x$  Isoform. Weitere Befunde deuten darauf hin, dass der  $\text{Ca}_v1.2$  Kanal in hippokampalen Neuronen nicht nur extrasynaptisch lokalisiert ist, sondern auch gehäuft an glutamatergen Synapsen in dendritischen Spines auftritt (Davare et al., 2001; Yasuda et al., 2003; Hoogland and Saggau, 2004; Obermair et al., 2004).

Somit deutet eine Vielzahl von Argumenten daraufhin, dass dem  $\text{Ca}_v1.2$  L-Typ Kalziumkanal eine Funktion bei synaptischer Plastizität zukommen könnte.

#### 3.1.4.1 $\text{Ca}_v1.2$ L-Typ Kalziumströme in CA1 Pyramidenzellen

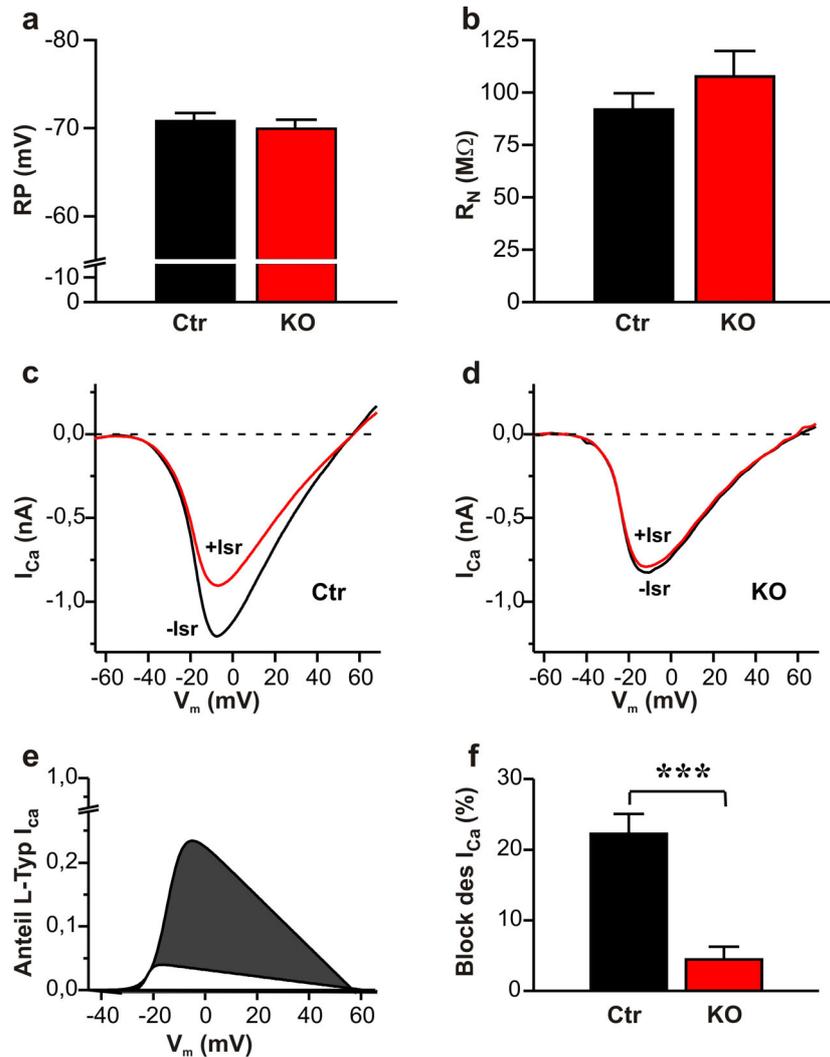
Die folgenden elektrophysiologischen Untersuchungen wurden in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. T. Kleppisch durchgeführt. Zu Beginn wurden in hippokampalen Schnittpräparaten die *whole-cell*  $\text{Ca}^{2+}$ -Einwärtsströme in CA1 Pyramidenzellen (2.3.2) aus Kontroll- und Knockouttieren bestimmt. Beide Gruppen zeigten stabile *whole-cell*  $\text{Ca}^{2+}$ -Einwärtsströme bei Testpotentialen positiver als  $-40$  mV (Abbildung 3.10 c, d). Um den Verlust von funktionellen  $\text{Ca}_v1.2$  Kanälen in den  $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$  Pyramidenzellen bestätigen zu können, wurden Dihydropyridin- (DHP) sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -Einwärtsströme mit Hilfe von Spannungs-Rampen hervorgerufen. Nachdem sich ein stabiler Grundlinienstrom ausgebildet hatte, wurde das DHP Isradipin ( $10 \mu\text{M}$ ) in die Badlösung zugegeben. Dadurch konnte ein deutlicher Abfall in der Amplitude des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms in den CA1 Neuronen der Kontrolltiere ausgelöst werden. Im Gegensatz dazu hatte Isradipin nahezu keinen Einfluss auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme der CA1 Neuronen der Knockouttiere. Im Mittel war der durch Isradipin blockierbare Spitzenkalziumeinwärtsstrom  $22,3 \pm 2,8\%$  (Kontrollen,  $n = 14$ ) gegenüber  $4,4 \pm 1,8\%$  (Knockouts,  $n = 9$ ). Dies entspricht einer mehr als 80%igen Reduktion des DHP-sensitiven Stroms bei CA1 Neuronen der  $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$  Tiere. Der verbliebene DHP-sensitive Reststrom kommt vermutlich durch  $\text{Ca}_v1.3$

## Ergebnisse

Kanäle zustande. Da postuliert wurde, dass eine Population von DHP-sensitiven Kalziumkanälen in CA1 Pyramidenzellen unter physiologischen Bedingungen bei bis zu  $-70$  mV hyperpolarisierten Membranpotentialen aktiv sein soll (Magee et al., 1996), wurde noch zusätzlich ein möglicher Effekt der  $Ca_v1.2$  Kanal-Inaktivierung auf das Ruhemembranpotential (RP) und den Eingangswiderstand ( $R_N$ ) beim RP überprüft. Keiner der beiden Parameter war bei CA1 Pyramidenzellen der  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Tiere signifikant verändert (Abbildung 3.10 a, b).

Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass eine effiziente Deletion des *CACNA1C* Gens in hippocampalen CA1 Neuronen der  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Tieren stattgefunden hat, die weder das Ruhemembranpotential noch den Eingangswiderstand unter Ruhebedingungen beeinflusst.

## Ergebnisse



### Abbildung 3.10: $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme in hippocampalen CA1 Pyramidenzellen

a) Mittleres Ruhemembranpotential (RP) in hippocampalen CA1 Pyramidenzellen aus Kontroll- (schwarzer Balken,  $n = 13$ ) und  $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$  (roter Balken,  $n = 10$ ) Mäusen im *current-clamp* Modus.

b) Durchschnittlicher Eingangswiderstand ( $R_N$ ) von CA1 Zellen aus Kontroll- (schwarzer Balken,  $n = 8$ ) und  $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$  (roter Balken,  $n = 6$ ) Mäusen bestimmt durch Injektion hyperpolarisierender Ströme ausgehend von einem Membranpotential von  $-70$  mV.

c) + d) Beispiele von *whole-cell*  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen ( $I_{\text{Ca}}$ ), die mittels Spannungs-Rampen von  $-80$  bis  $+80$  mV ( $0,5$  ms/mV) bei CA1 Neuronen aus Kontroll- (Ctr) und  $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$  (KO) Tieren vor (-Isr) und nach (+Isr) Isradipin Gabe ( $10 \mu\text{M}$ ) hervorgerufen wurden. Das Haltepotential betrug  $-65$  mV und als Ladungsträger wurden  $2$  mM  $\text{Ca}^{2+}$  verwendet.

e) Dargestellt ist der Anteil des gesamten spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einwärtsstroms, der durch Isradipin geblockt werden konnte. Der Graph zeigt die gefitteten I - V Kurven der DHP-sensitiven Stromkomponente bei Kontroll- (schwarz) und Knockoutmäusen (rot), die auf den entsprechenden Spitzeneinwärtsstrom in der Abwesenheit von Isradipin normalisiert wurden.

f) Durchschnittlicher Anteil des gesamten  $\text{Ca}^{2+}$ -Stromblocks durch Isradipin Applikation. Dargestellt ist die Reduktion des Spitzeneinwärtsstroms aus Kontroll- (schwarz,  $n = 14$ ) und  $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$  (rot,  $n = 9$ ) Mäusen in Prozent. (\*\*\*,  $p < 0,001$ ).

### 3.1.4.2 NMDAR-unabhängige Langzeitpotenzierung im Hippokampus

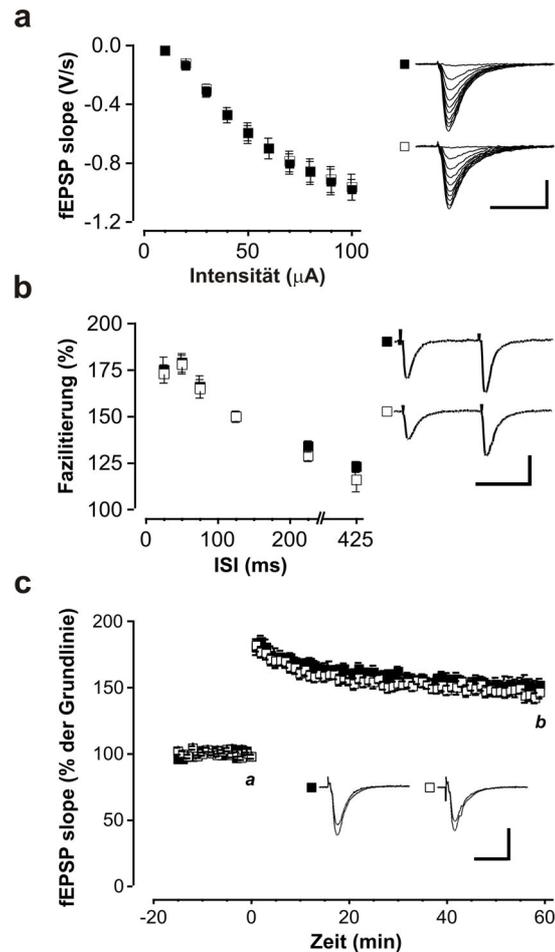
Die nachfolgenden Untersuchungen sollten den Beitrag des  $Ca_v1.2$  Kanals an der synaptischen Plastizität im Hippokampus klären. Hierfür wurden sowohl NMDAR-abhängige als auch NMDAR-unabhängige Formen der Langzeitpotenzierung angewendet.

Zu Beginn musste jedoch sichergestellt werden, dass keine prinzipiellen Defekte in der basalen synaptischen Transmission in  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Mäusen vorliegen. Daher wurde zunächst die basale synaptische Transmission in hippocampalen Schnittpräparaten von Kontroll- und Knockoutmäusen verglichen. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen, weder bei der Abhängigkeit der *field*EPSP Steigung von der Reizintensität noch bei der Amplitude der *fiber volleys* (Daten nicht gezeigt).

Eine weitere Form der Plastizität ist die sogenannte *paired pulse facilitation* (PPF), die über präsynaptische Mechanismen bestimmt wird und nur eine sehr kurz anhaltende Variante der Plastizität darstellt. Die PPF wird mittels zwei kurz aufeinander folgender Stimuli ausgelöst und sollte in einer Potentialverstärkung auf den zweiten Stimulus hin resultieren. Dadurch gibt die PPF Aufschluss darüber, wie vital die Neuronen der Schnittpräparate sind und ob eine präsynaptische Transmission prinzipiell vonstatten gehen kann.

Auch in der PPF gab es keinerlei Unterschiede zwischen Kontroll- und  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Tieren (Abbildung 3.11), woraus geschlossen werden kann, dass das Ausschalten des *CACNA1C* Gens keinen Einfluss auf die präsynaptische Übertragung *per se* hat.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.11: Basale synaptische Übertragung und NMDAR-abhängige synaptische Plastizität in CA1 Pyramidenzellen von  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Tieren**

a) Die *input-output* Beziehungskurven aus 37 Kontroll- (■) und 41 Knockout- (□) Schnittpräparaten zeigen keine Unterschiede. Beispiel-Aufzeichnungen sind rechts gezeigt, Maßstab 20 ms und 1 mV.

b) Die kurzzeitige Plastizität wurde durch Messung der *paired pulse facilitation* (PPF) mit Interstimulusintervallen (ISI) von 25, 50, 75, 125, 225, 425 ms bestimmt. PPF war bei Kontroll- (n = 27) und  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Tieren nicht unterschiedlich. Repräsentative PPF Aufzeichnungen des 75 ms Intervalls sind rechts dargestellt, Maßstab 50 ms und 1 mV.

c) Durch *theta burst* Stimulation (TBS: 12 x 4 Pulse a 100 Hz, 200 ms Pause) am Zeitpunkt 0 ausgelöstes NMDAR-abhängige LTP zeigte keinerlei Unterschiede zwischen den Kontroll- (n = 8) und Knockoutmäusen (n = 9). Repräsentative fEPSPs zu den Zeitpunkten a und b sind klein im Bild dargestellt, Maßstab 20 ms und 1 mV.

Nach Stimulation mit einem schwachen *theta burst*, der NMDAR-abhängige LTP auslöst (Bliss and Collingridge, 1993; Kleppisch et al., 1999) ließ sich sowohl in den Kontrollen als auch in den Mutanten eine stabile Langzeitpotenzierung hervorrufen (Abbildung 3.11 c).

Zusammenfassend wurde mit diesen Versuchen gezeigt, dass die verwendeten Knockoutmäuse keine generellen Defekte in der basalen synaptischen Transmission aufweisen und über eine normale NMDAR-abhängige LTP verfügen.

Im Folgenden wurde die Rolle des  $Ca_v1.2$  L-Typ Kanals bei der NMDAR-unabhängigen LTP untersucht. Es wurde bereits gezeigt, dass mittels eines 200 Hz Tetanus-Protokolls eine stabile NMDAR-unabhängige LTP induziert werden kann (Grover and Teyler, 1990). Kürzlich wurde berichtet, dass die Aktivierung von postsynaptischen  $Ca_v1.x$  Kanälen durch 200 Hz Stimulation ein retrogrades

## Ergebnisse

Signal auslöst, das zu einer präsynaptischen BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) Freisetzung und letztendlich zur Induktion einer präsynaptischen Komponente von LTP führt (Zakharenko et al., 2003).

Nach solch einer 200 Hz Stimulation wiesen die  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Mäuse im Vergleich zu den Kontrollen eine deutlich reduzierte LTP auf (Faktor Genotyp:  $F = 4,72$ ,  $p = 0,048$ ; ANOVA). 2 Stunden nach Induktion betrug die Steigung des *field*EPSP  $136,5 \pm 6,5$  ( $n = 7$ ) gegenüber  $167,6 \pm 10,5$  ( $n = 10$ ). Um sicher gehen zu können, dass es sich bei dieser Verringerung an LTP um eine Reduktion der NMDAR-unabhängigen Komponente handelte, wurde die 200 Hz Stimulation unter Anwesenheit des NMDAR-Blockers APV (2-Amino-5-Phosphonopentanoat) ( $50 \mu\text{M}$ ) untersucht. Auch unter diesen Bedingungen zeigten die Knockouts eine signifikant reduzierte LTP auf (Faktor Genotyp:  $F = 7,55$ ,  $p = 0,018$ ; ANOVA) (Abbildung 3.12 a).

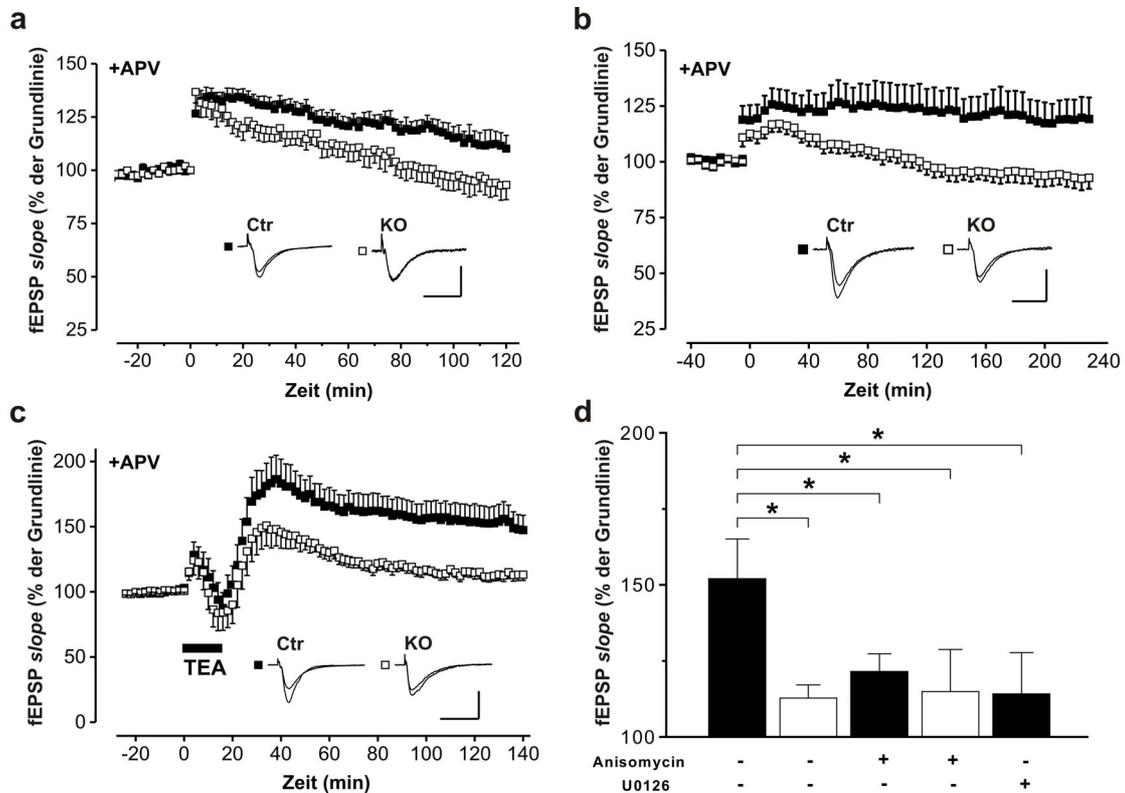
Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass das Ausmaß der Reduktion an LTP in Anwesenheit des Blockers nahezu identisch zu dem Ausmaß ohne APV war, was für einen selektiven Defekt der NMDAR-unabhängigen LTP bei  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Mäusen spricht.

Um diesen Befund zu bekräftigen, wurde ein weiteres NMDAR-unabhängiges Stimulationsprotokoll verwendet. Hierbei werden wiederholt 100 Hz Stimuli verabreicht (Impey et al., 1996). Der Versuch wurde sowohl ohne als auch mit APV durchgeführt und es zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie bei der 200 Hz Stimulation. Erneut war ein signifikanter Unterschied in der LTP bzw. in der *late phase*-LTP (langanhaltende LTP, in der Proteinbiosynthese stattfindet) zwischen Kontroll- und Knockouttieren festzustellen (Faktor Genotyp:  $F = 6,28$ ,  $p = 0,02$ ; ANOVA) (Abbildung 3.12 b). Somit konnte auch mit Hilfe dieses NMDAR-unabhängigen Stimulationsprotokolls praktisch keine LTP in den *CACNA1C* defizienten Mäusen ausgelöst werden.

Eine weitere Form der Langzeitpotenzierung ist die sogenannte  $LTP_K$ , die durch eine Superfusion mit dem Kaliumkanalblocker TEA-Cl (Tetraethylammonium-Cl) ausgelöst wird und eine weitere Möglichkeit bietet, NMDA-unabhängige synaptische Plastizität zu testen.  $LTP_K$  soll nach allgemeiner Ansicht wesentlich vom  $Ca^{2+}$ -Einstrom über L-Typ Kanäle abhängen (Aniksztejn and Ben-Ari, 1991; Zakharenko et al., 2001). Um diese  $LTP_K$  zu untersuchen, wurden Schnittpräparate von Kontroll- und  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Tieren jeweils 15 min mit einer modifizierten aCSF-Lösung (plus 24 mM TEA-Cl und APV) superfundiert und die ausgelöste LTP bestimmt. Bei den Kontrollen stellte sich eine robuste LTP ein, die auch 2 h nach dem Auswaschen des TEA-Cl noch stabil blieb ( $147,4 \pm 11,3$ ;  $n = 15$ ) (Abbildung 3.12 c). In den Knockouts jedoch stellte sich nur eine sehr marginale LTP 2 h nach der TEA-Cl-Behandlung ein ( $113,1 \pm 4,47$ ;  $n = 11$ ;  $p < 0,05$ ) (Abbildung 3.12 c). Die LTP, die 2 h nach der Superfusion mit TEA-Cl in den Kontrollen auftrat, könnte der oben erwähnten *late phase*-LTP (L-LTP) entsprechen, deren wesentliches Merkmal die Abhängigkeit von *de novo* Proteinbiosynthese ist (Frey et al., 1988; Kandel, 2001). Um die induzierte  $LTP_K$  auf das Merkmal der Proteinbiosyntheseabhängigkeit hin zu untersuchen, wurde zu den hippokampalen Schnittpräparaten ein Blocker der Proteinbiosynthese (Anisomycin,  $20 \mu\text{M}$ ) hinzugefügt. Anisomycin konnte die LTP 2 h nach Stimulation mit TEA-Cl in den Kontrollschnitten signifikant reduzieren ( $121,8 \pm 8,3$ ;  $n = 8$ ;  $p < 0,05$  verglichen mit der LTP ohne Anisomycin), in den Knockoutpräparaten hatte der Proteinbiosyntheseblocker jedoch keinen Effekt ( $114,4 \pm 12,9$ ;  $n = 8$ ) (Abbildung 3.12 d).

## Ergebnisse

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse sehr klar, dass die NMDAR-unabhängige, Proteinbiosynthese-abhängige L-LTP in der CA1 Region des Hippokampus von  $Ca_v1.2$  L-Typ Kalziumkanälen abhängt.



**Abbildung 3.12: NMDAR-unabhängige LTP in hippocampalen CA1 Pyramidenzellen in  $Ca_v1.2^{\text{HCKO}}$  Mäusen**

Gezeigt sind fEPSPs nach Stimulation der Schaffer Kollateralen in Schnittpräparaten aus Kontroll- (■) und Knockouttieren (□).

a) LTP wurde zum Zeitpunkt 0 durch eine Stimulation mit 200 Hz ausgelöst, während des gesamten Experiments war der NMDAR-Blocker APV (50  $\mu\text{M}$ ) zugegen. Der Zeitverlauf der fEPSP Steigung (fEPSP *slope*) entspricht den Mittelwerten von 8 Schnittpräparaten aus je 5 Mäusen pro Genotyp. Repräsentative fEPSPs sind klein gezeigt, Maßstab 20 ms und 1 mV.

b) Dargestellt ist die LTP, die durch mehrere starke 100 Hz Stimuli ausgelöst wurde, während des gesamten Experiments befand sich APV im Ansatz. Der Zeitverlauf der fEPSP Steigung (fEPSP *slope*) entspricht den Mittelwerten von 10 Schnittpräparaten aus 6 Kontrollen und 14 Schnittpräparaten aus 6  $Ca_v1.2^{\text{HCKO}}$  Mäusen. Repräsentative fEPSPs sind klein gezeigt, Maßstab 20 ms und 1 mV.

c) LTP<sub>K</sub> wurde durch die Superfusion der hippocampalen Schnittpräparate mit 25 mM TEA-Cl (Balken) über einen Zeitraum von 15 min ausgelöst. Der NMDAR-Blocker APV war während des gesamten Experiments anwesend. Der Zeitverlauf der fEPSP Steigung (fEPSP *slope*) entspricht den Mittelwerten von 15 Schnittpräparaten aus 12 Kontrollen und 11 Schnittpräparaten aus 7  $Ca_v1.2^{\text{HCKO}}$  Mäusen. Repräsentative fEPSPs sind klein gezeigt, Maßstab 20 ms und 1 mV.

d) Effekt des Proteinbiosyntheseinhibitors Anisomycin (20  $\mu\text{M}$ ) und des MEK1/2 Inhibitors U0126 (40  $\mu\text{M}$ ) auf die LTP<sub>K</sub>. Die schwarzen Balken zeigen die Größe der LTP<sub>K</sub> 2 h nach Behandlung mit TEA bei Kontrollen in unveränderter aCSF, mit Anisomycin (n = 8 Schnittpräparate aus 5 Mäusen) und U0126 (n = 7 Schnittpräparate aus 5 Mäusen). Die weißen Balken entsprechen der Größe der 2 h nach Behandlung mit TEA bei  $Ca_v1.2^{\text{HCKO}}$  Mäusen in unveränderter aCSF und mit Anisomycin (n = 11 Schnittpräparate aus 7 Mäusen).

\*,  $p < 0,05$ .

### 3.1.5 Untersuchung von Signaltransduktionskaskaden

#### 3.1.5.1 Die MAPK/ERK-Signalkaskade

In zahlreichen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass die *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)/ *extracellular signal-related protein kinase* (ERK) Signalkaskade sowohl für die hippokampale synaptische Plastizität als auch für verschiedene Formen des Lernens eine Rolle spielt. Besonders entscheidend für diese Prozesse sind die Stimulation der Gentranskription und die *de novo* Proteinbiosynthese wie z.B. die Aktivierung des *cAMP response element binding proteins* (CREB) (English and Sweatt, 1997; Atkins et al., 1998; Hardingham et al., 2001; Kandel, 2001; Wu et al., 2001; Pittenger et al., 2002; Thomas and Huganir, 2004). Sowohl die Induktion von L-LTP an den Schaffer Kollateralen/CA1 Pyramidenzellen als auch die Aktivierung des ERK/CREB-Signalweges in hippokampalen Neuronen benötigen einen Anstieg der postsynaptischen intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration (Shaywitz and Greenberg, 1999; Kandel, 2001). Obwohl die postsynaptische  $Ca^{2+}$ -Erhöhung in diesen Neuronen hauptsächlich durch den  $Ca^{2+}$ -Einstrom über NMDA-Rezeptoren zu Stande kommt (Kovalchuk et al., 2000; Sabatini and Svoboda, 2000), kann der  $Ca^{2+}$ -Einstrom über L-Typ Kalziumkanäle spezifisch die Transkription von Kalzium regulierten Genen auslösen, wie z.B. von *Zif/268* und *brain derived neurotrophic factor* (BDNF), die beide eine wichtige Rolle bei Lernvorgängen und adaptiven Prozessen im Nervensystem spielen (Murphy et al., 1991; West et al., 2001).

Experimente an neuronalen Zellkulturen haben bereits gezeigt, dass ein  $Ca^{2+}$ -Einstrom effektiv die ERK/MAPK-Signalkaskade aktivieren kann (Murphy et al., 1991; Rosen et al., 1994; Dolmetsch et al., 2001; Hardingham et al., 2001; West et al., 2001).

Um nun eine mögliche Funktion des  $Ca_v1.2$  L-Typ Kalziumkanals bei der Aktivierung von ERK1/2 genauer zu untersuchen, wurden hippokampale CA1 Pyramidenzellen mit dem Kaliumkanalblocker TEA-Cl behandelt und mittels konfokaler Immunfluoreszenz die Phosphorylierung bzw. die Translokation von ERK in den Zellkern bestimmt. Die Bedingungen für diesen Versuch wurden so gewählt, dass sie mit den elektrophysiologischen Daten, die eine robuste  $LTP_K$  durch TEA Superfusion ergaben, vergleichbar waren.

Im Folgenden wurden hippokampale Schnittpräparate wie in Punkt 2.4.16 mit TEA-Cl behandelt und im Anschluss für die Immunhistologie (2.4.18) auf ERK1/2 vorbereitet. Wie in Abbildung 3.13 a zu sehen ist, konnte durch die Superfusion mit TEA-Cl ein deutlicher Anstieg an phosphorylierter und damit aktivierter ERK in den postsynaptischen CA1 Pyramidenzellen ausgelöst werden. Bei unbehandelten Präparaten konnte jedoch kein spezifisches Signal für phospho-ERK nachgewiesen werden. Ein weiterer interessanter Befund war, dass weder die nukleäre Translokation noch die Phosphorylierung von ERK1/2 in Kontrollschnitten durch die Zugabe des NMDAR-Blockers APV beeinflusst wurde. Ganz im Gegensatz zu den Ergebnissen bei den Schnittpräparaten aus Kontrolltieren konnte in den TEA-behandelten Schnitten der  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Tieren nahezu kein dendritisches phospho-ERK Signal detektiert werden. Auch die Anzahl an phospho-ERK positiven Zellkernen war vernachlässigbar.

Um zu überprüfen, ob die Störung der durch TEA hervorgerufenen NMDAR-unabhängigen L-LTP, die in den Knockoutmäusen gefunden wurde (Abbildung 3.12), durch eine defiziente MAPK-Signalkaskade verursacht wurde, wurde der Effekt des MAPK-Inhibitors U0126 auf diese Form der synaptischen Plastizität in hippokampalen Schnittpräparaten von Kontrollen untersucht. Entsprechend

## Ergebnisse

der oben gestellten Vermutung, erzielte U0126 (40  $\mu\text{M}$ ) denselben Effekt wie der Proteinbiosyntheseblocker Anisomycin in diesen Tieren (Abbildung 3.13 f). Daher kann geschlossen werden, dass die Aktivität von ERK für die NMDAR-unabhängige, Proteinbiosynthese-abhängige L-LTP in hippocampalen CA1 Neuronen notwendig ist.

### 3.1.5.2 Die CRE-abhängige Signalkaskade

Basierend auf den erhaltenen Ergebnissen wurde im Folgenden untersucht, ob Effektoren des ERK1/2-Signalwegs, die mit synaptischer Plastizität und Gedächtnisbildung in Verbindung gebracht werden, bei den  $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$  Tieren verändert sind.

Die Aktivierung der ERK/MAPK-Signalkaskade kann über verschiedene Mechanismen zur Gedächtnisbildung beitragen, zu denen unter anderem die Transkription von Genen gehört, die mit Lernvorgängen assoziiert sind (Sweatt, 2004). Eine besonders bedeutende Rolle kommt in diesem Zusammenhang einem *downstream effector* von ERK1/2 zu, nämlich dem Transkriptionsfaktor CREB. Dieser Transkriptionsfaktor ist an synaptischer Plastizität beteiligt und gilt als essentiell für verschiedene Formen der Gedächtnisbildung (Silva et al., 1998; Lonze and Ginty, 2002). Die CRE-abhängige Genexpression hängt entscheidend von der Phosphorylierung des CREB an Serin133 ab (Brindle and Montminy, 1992), die als zeitabhängiger Steuermechanismus fungiert, da nur ein anhaltendes phospho-CREB-Ser<sup>133</sup> (pCREB-Ser<sup>133</sup>) Signal ausreicht, um die CRE-abhängige Transkription zu aktivieren (Bitto et al., 1996).

Als Folge dessen wurde als nächster Schritt untersucht, ob die verminderte ERK-Aktivität in den hippocampalen Neuronen der  $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$  Mäuse mit einer Unterdrückung der anhaltenden Aktivierung von CREB einhergeht.

Hierfür wurden aus Hippokampi, die vor und an verschiedenen Zeitpunkten nach einer Behandlung mit TEA-Cl gewonnen wurden, Proteinextrakte hergestellt und diese mit einem phosphospezifischen Antikörper gegen CREB-Serin<sup>133</sup> geblottet. Das Hippokampus-Gewebe aus Knockouttieren wies im Vergleich zu den Kontrollen ( $0,45 \pm 0,06$  rdu;  $p < 0,05$ ) einen deutlich reduzierten, basalen pCREB-Ser<sup>133</sup> Level auf ( $0,28 \pm 0,05$  rdu). Dieser Unterschied ist wohl auf die spontane Aktivität der  $\text{Ca}_v1.2$  Kanäle zurückzuführen.

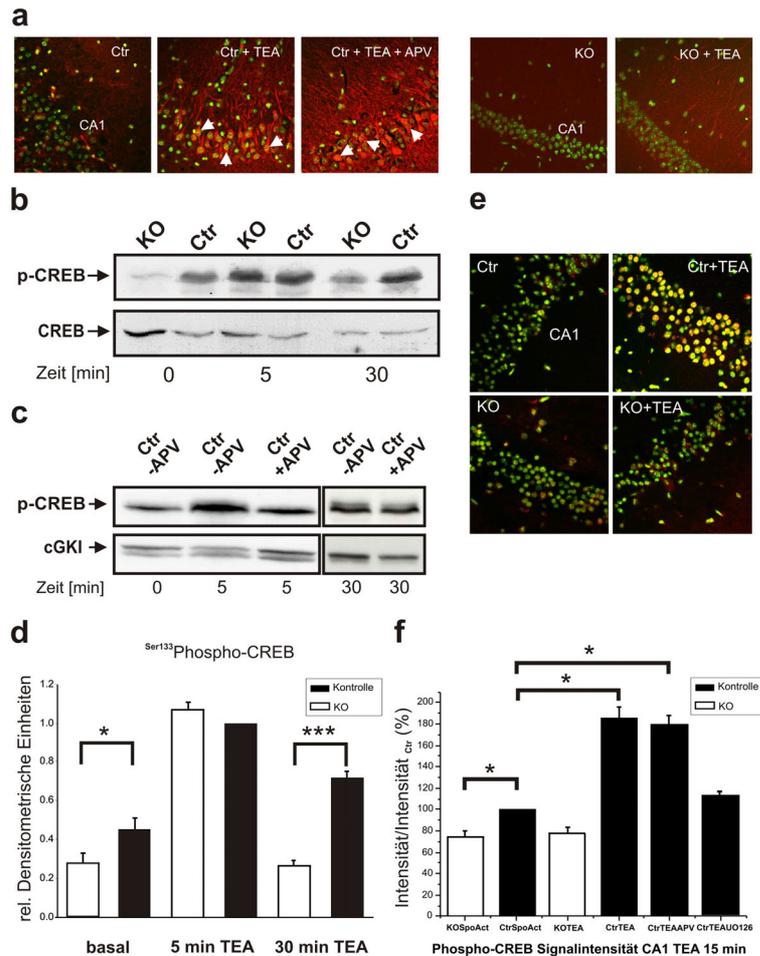
Die Behandlung mit TEA löste in den Hippokampi der Kontrollen eine starke CREB-Phosphorylierung aus, die bereits nach 5 Minuten nachweisbar war und für ungefähr 30 Minuten anhielt (Abbildung 3.13 b). Die initiale, TEA-induzierte CREB-Phosphorylierung zum Zeitpunkt 5 min konnte interessanterweise auch in den Hippokampi der  $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$  Tiere nachgewiesen werden. In deutlichem Gegensatz zu den Befunden bei Kontrollen jedoch, war die CREB-Phosphorylierung nach 30 Minuten wieder komplett auf das Ausgangsniveau zurückgekehrt (Kontrollen:  $0,72 \pm 0,03$  rdu; Knockouts:  $0,27 \pm 0,02$  rdu;  $p < 0,001$ ). Hippokampalen Neuronen aus  $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$  Mäusen fehlte unter diesen Bedingungen also spezifisch die anhaltende CREB-Phosphorylierung. Eine zusätzliche Analyse der TEA-induzierten CREB-Aktivierung in hippocampalen Gewebe aus Kontrolltieren unter Zugabe des NMDAR-Blockers APV zeigte auf, dass die frühe Phase (5 min) wohl durch NMDA-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zu Stande kommen muss. APV beeinflusste jedoch nicht die CREB-Phosphorylierung nach 30 min, was die Rolle eines NMDAR-unabhängigen Mechanismus bei der langanhaltenden CREB-Aktivierung unterstreicht (Abbildung 3.13 c).

## Ergebnisse

In der nächsten Serie von Experimenten wurde erneut die konfokale Immunfluoreszenz verwendet, um die Lokalisation von phosphoryliertem CREB im Zellkern nachzuweisen sowie die CRE-abhängige Transkription in CA1 Neuronen unter Bedingungen darzustellen, die zu L-LTP<sub>K</sub> führen.

Die Behandlung mit TEA führte in Hippokampi aus Kontrolltieren zu einer deutlichen Erhöhung des nukleären phospho-CREBs (pCREB), in den Knockouts hingegen war nahezu keine Translokation von pCREB in den Zellkern zu detektieren (Abbildung 3.13 e).

## Ergebnisse



**Abbildung 3.13: Gestörte MAPK-Aktivierung und verminderte CREB-Phosphorylierung in Schnittpräparaten von  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Tieren nach L-LTP Stimulationsparadigma**

a) Repräsentative Beispiele einer Immunhistochemie auf phospho-ERK1/2 in unbehandelten Kontrollpräparaten (Ctr), in Schnittpräparaten, die mit TEA behandelt wurden ( $\pm$  APV) und in unbehandelten bzw. behandelten Knockoutschnitten (KO). Grün: Hoechst 33258; rot: phospho-ERK1/2; gelb: *overlay*. Pfeile: Lokalisation von ERK1/2 im Zellkern. Vergrößerung: 400x.

b) Zeitverlauf der CREB-Ser<sup>133</sup> Phosphorylierung in hippocampalen Neuronen im Western Blot. Die Depolarisation erfolgte mit TEA in Kontroll-(Ctr) und Knockouttieren (KO). Der Kalziumeinstrom über  $Ca_v1.2$  resultiert in einer anhaltenden CREB-Phosphorylierung (30 min). Die Blots (n = 6) wurden gestrippt und danach auf CREB getestet.

c) Western Blot über den Zeitverlauf der CREB-Phosphorylierung in hippocampalen Neuronen, die mit TEA depolarisiert wurden, bei Ctr-Mäusen in der Anwesenheit (+APV) oder ohne den (-APV) NMDAR-Antagonisten APV. NMDAR-Aktivität trägt zur frühen Phase (5 min), aber nicht zur späten Phase der CREB-Phosphorylierung bei (30 min). Die Blots (n = 6) wurden gestrippt und nochmals mit cGKI getestet.

d) Densitometrische Analyse der Western Blots auf pCREB-Ser<sup>133</sup> Phosphorylierung. Die Werte sind normalisiert auf phospho-CREB Ser<sup>133</sup> bei Kontrolltieren nach 5 min TEA-Behandlung.

e) Repräsentative Beispiele der phospho-CREB Immunfluoreszenz in unbehandelten Kontrollpräparaten (Ctr), in Schnittpräparaten, die mit TEA behandelt wurden und in unbehandelten bzw. behandelten Knockoutschnitten (KO). Grün: Hoechst 33258; rot: pCREB-Ser<sup>133</sup>; gelb: *overlay*. Vergrößerung: 400x.

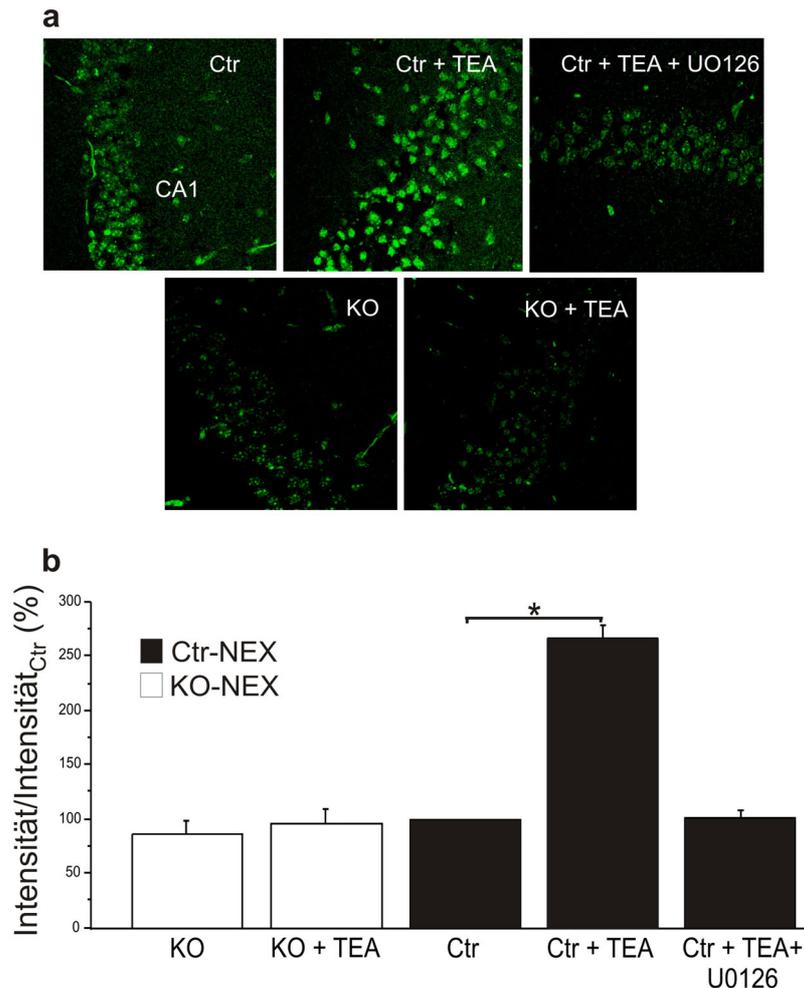
f) Anstieg der pCREB-Ser<sup>133</sup> Immunfluoreszenz verglichen mit unbehandelten Schnitten (Spontane Aktivität, SpoAct). Die Schnittpräparate wurden mit TEA, das L-LTP auslöst, behandelt ( $\pm$  APV) oder mit TEA + U0126 (ERK-Blocker). Die Präparate (n = 12) wurden 30 min nach der LTP-Induktion fixiert.

Um die CRE-abhängige Genexpression im Schnitt untersuchen zu können, wurden Kontroll- und Knockouttiere verwendet, die zusätzlich ein Transgen für ein CRE-reguliertes Reporterkonstrukt enthielten (s. 2.1.3; (Impey et al., 1996)). Die Schnittpräparate aus diesen Mäusen wurden im Anschluss mit einem  $\beta$ -Galaktosidase Antikörper behandelt und die CRE-LacZ Expression mittels Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. Auch in Hippokampuspräparaten aus diesen Tieren, die mit TEA vorbehandelt wurden, war nur in den Kontrollen eine CRE-abhängige Gentranskription nachzuweisen

## Ergebnisse

(Abbildung 3.14 a), nicht jedoch in den  $Ca_v1.2$  defizienten Tieren. Es waren auch weder die Translokation in den Kern noch die Phosphorylierung von CREB durch die Zugabe des NMDAR-Blockers APV beeinflussbar (Abbildung 3.14 a). Ganz im Gegensatz dazu konnte durch die Zugabe des ERK-Blockers U0126 das nukleäre pCREB-Ser<sup>133</sup> Signal aufgehoben werden (Abbildung 3.13 f) und blockierte darüber hinaus die Aktivierung der CRE-vermittelten Gentranskription nach TEA-Behandlung (Abbildung 3.14 ).

Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, dass sowohl die L-LTP<sub>K</sub> wie auch der Anstieg der CRE-vermittelten Genexpression mit erhöhter ERK1/2-Aktivität verbunden ist.



### Abbildung 3.14: CRE-LacZ Expression in hippocampalen CA1 Schnittpräparaten

a) Repräsentative Beispiele der CRE-abhängigen Gentranskription durch Visualisierung der CRE-LacZ Expression in hippocampalen Schnittpräparaten aus Kontroll- (Ctr) und Knockouttieren (KO). Die Schnitte waren entweder unbehandelt, mit TEA oder mit TEA plus U0126 behandelt. Alle Experimente wurden in Anwesenheit des NMDAR-Blockers APV durchgeführt. In grün:  $\beta$ -Galaktosidasereporterprotein.

b) Prozentualer Anstieg der  $\beta$ -Galaktosidase Immunhistochemie (Intensität) im Vergleich zu unbehandelten Schnittpräparaten (Intensität<sub>Ctr</sub>). Die Präparate (n = 12) wurden 240 min nach LTP-Induktion fixiert und weiter behandelt.

Ctr-NEX:  $Ca_v1.2^{+/L2} NEX-Cre^{+/Cre}$ ; KO-NEX:  $Ca_v1.2 NEX-Cre^{+/Cre}$ .

## 3.2 Generierung und Charakterisierung des Gehirn-spezifischen Knockoutmodells

Im nächsten Schritt sollte eine Mauslinie erzeugt werden, in welcher der  $Ca_v1.2$  Kalziumkanal in allen Gehirnarealen ausgeschaltet sein sollte. Zur Generierung dieser Gehirn-spezifischen *CACNA1C* Knockouttiere wurde erneut das Cre-Rekombinase System unter Verwendung der Nestin-Cre transgenen Mauslinie (Tabelle 6.6) eingesetzt. Die Nestin-Cre Mauslinie exprimiert die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Ratten-Nestin Promotors und *Enhancers* in Glia- und neuronalen Vorläuferzellen (Tronche et al., 1999). Für den Nachweis des transgenen Nestin-Allels (tg) mittels PCR (2.4.10) wurden die Primer TK140 und TK142 (Tabelle 6.1) verwendet.

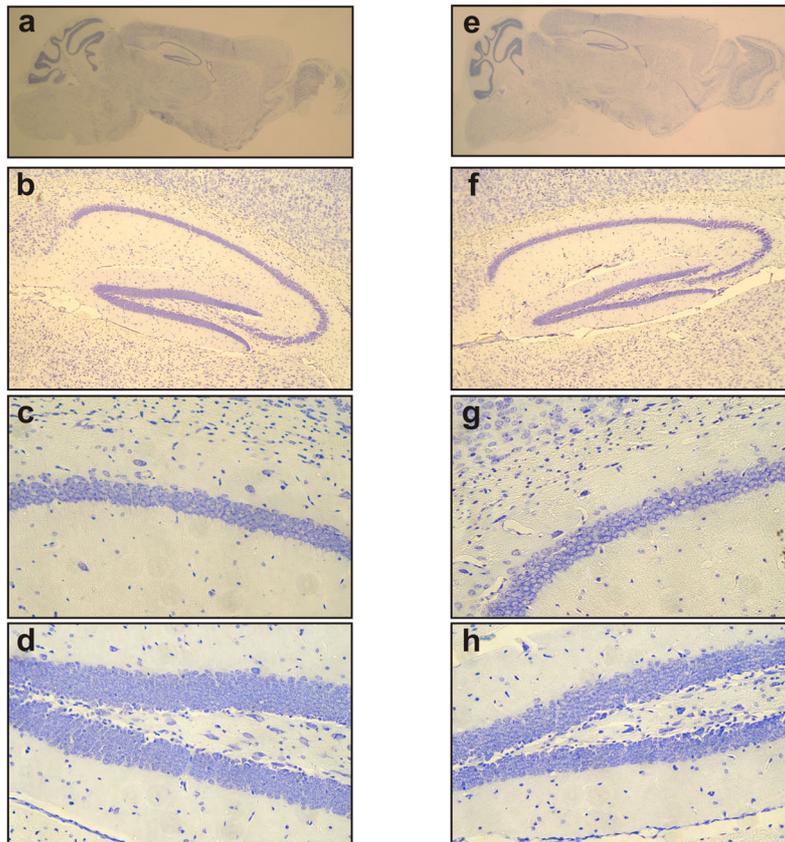
### 3.2.1 Grundcharakterisierung

Die Nachkommen aus der Versuchstierzucht (Kontroll- und Knockouttiere) waren lebensfähig und fertil. Auch die Lebenserwartung und das Körpergewicht der Knockouttiere wiesen keine Veränderungen im Vergleich zu den Kontrolltieren auf (Daten nicht gezeigt).

#### 3.2.1.1 Morphologische Untersuchung der KO-Nestin Tiere

Zunächst wurden die Gehirne der KO-Nestin Tiere ( $Ca_v1.2^{L1/L2}$  Nestin-Cre<sup>+Cre</sup>) auf grundsätzliche morphologische Veränderungen hin untersucht. Hierfür wurde eine Nissl Färbung (2.4.19.4) durchgeführt und sämtliche Gehirnareale auf Auffälligkeiten überprüft. In den Knockouttieren zeigten sich jedoch keine ersichtlichen morphologischen Veränderungen (Abbildung 3.15).

## Ergebnisse



### Abbildung 3.15: Morphologische Untersuchung der $Ca_v1.2$ Nestin-Cre Tiere mittels Nissl Färbung

Gezeigt sind mittels Nissl angefärbte sagittale Gehirnschnitte der Maus. Zwischen den Kontroll- (a) und Knockouttieren (e) waren keine morphologischen Unterschiede in den einzelnen Gehirnregionen zu erkennen.

b)-d) Hippokampus einer Ctr-Nestin Maus in unterschiedlichen Auflösungen.

f)-h) Hippokampus einer KO-Nestin Maus in unterschiedlichen Auflösungen.

Zwischen den beiden Genotypen zeigten sich keinerlei morphologische Unterschiede in den einzelnen CA Regionen des Hippokampus.

a)-d):  $Ca_v1.2^{+/L2}$  Nestin-Cre<sup>+/Cre</sup>; e)-h):  $Ca_v1.2^{L1/L2}$  Nestin-Cre<sup>+/Cre</sup>; a), e): 2,5 x; b), f): 5 x; c), g): 10 x; d), h): 20 x.

#### 3.2.1.2 Golgi Cox Färbung

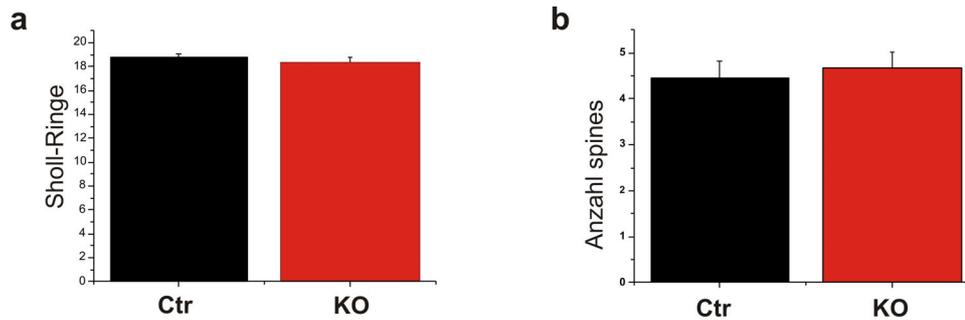
Um eine detaillierte Aussage über die Morphologie der einzelnen Gehirnregionen treffen zu können, wurde erneut eine Golgi Cox Färbung (2.4.19.6) durchgeführt, um eventuelle Veränderungen in neuronalen Dendriten und dendritischen *spines* zu detektieren.

Auch in dieser Mauslinie wurde der Hippokampus einer detaillierten Auswertung unterzogen.

Die Pyramidenzellen der CA1 Region des Hippokampus wurden mit der Sholl-Methode (Sholl, 1955) ausgewertet (s. 3.1.1.3; Beispielbild). Die Auswertung der Dendritenlängen der Pyramidenzellen ergab keinerlei Unterschiede zwischen den Kontroll- und Knockouttieren (Abbildung 3.16 a). Der nächste Zelltypus der untersucht wurde, die Körnerzellen des *Gyrus dentatus*, wurde erneut auf die Verzweigungszahl der dendritischen Äste und auf die Anzahl der dendritischen *spines* in diesen Ästen hin untersucht. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Genotypen (Abbildung 3.16 b).

Diese Daten zeigen, dass es in den KO-Nestin Mäusen zu keinen morphologischen Auffälligkeiten in den Neuronen des Hippokampus kommt.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.16: Golgi Cox Färbung der hippocampalen Neuronen in  $Ca_v1.2$  Nestin-Cre Mäusen**

a) Auswertung der Pyramidenzellen von Kontroll- und KO-Nestin Tieren (je  $n = 10$ ). Es ergaben sich keinerlei Unterschiede in den Dendritenlängen der CA1 Pyramidenzellen.

b) Auswertung der *spines* auf den Dendriten der Körnerzellen im *Gyrus dentatus* von Kontroll- und Knockouttieren (je  $n = 10$ ). Auch in der Anzahl der *spines* waren keine Unterschiede detektierbar.

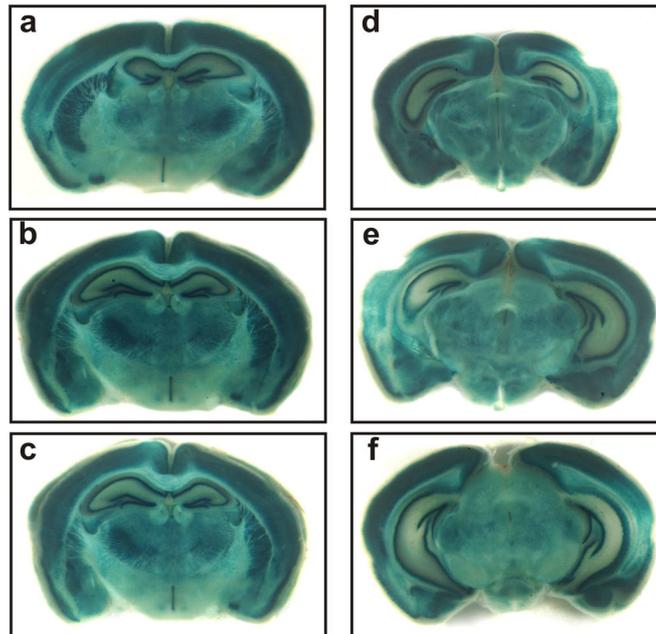
### 3.2.2 Rekombinations- und Expressionsanalyse

#### 3.2.2.1 Expressionsanalyse mittels X-Gal Färbung

Um überprüfen zu können, ob die Cre-Rekombinase auch tatsächlich in allen Gehirnregionen aktiv ist, wurde die Nestin-Cre Mauslinie zusätzlich mit einer lacZ Reporterlinie (ACZL; Tabelle 6.6) verpaart und die Rekombination mittels X-Gal Färbung (2.4.19.7) überprüft.

Die Färbung zeigte eine spezifische Aktivität der Rekombinase im gesamten ZNS der untersuchten Tiere. Neben dem gesamten Gehirn (Abbildung 3.17) waren auch das Rückenmark und die dorsalen Wurzelganglien (DRG) stark gefärbt (Daten nicht gezeigt). Alle anderen untersuchten Organe waren negativ. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Verwendung der Nestin-Cre Rekombinase zu einer Gehirn-spezifischen Deletion des *CACNA1C* Gens führt.

## Ergebnisse



### Abbildung 3.17: X-Gal Färbung von Nestin-Cre Mäusen nach Verpaarung mit ACZL Reporterlinie

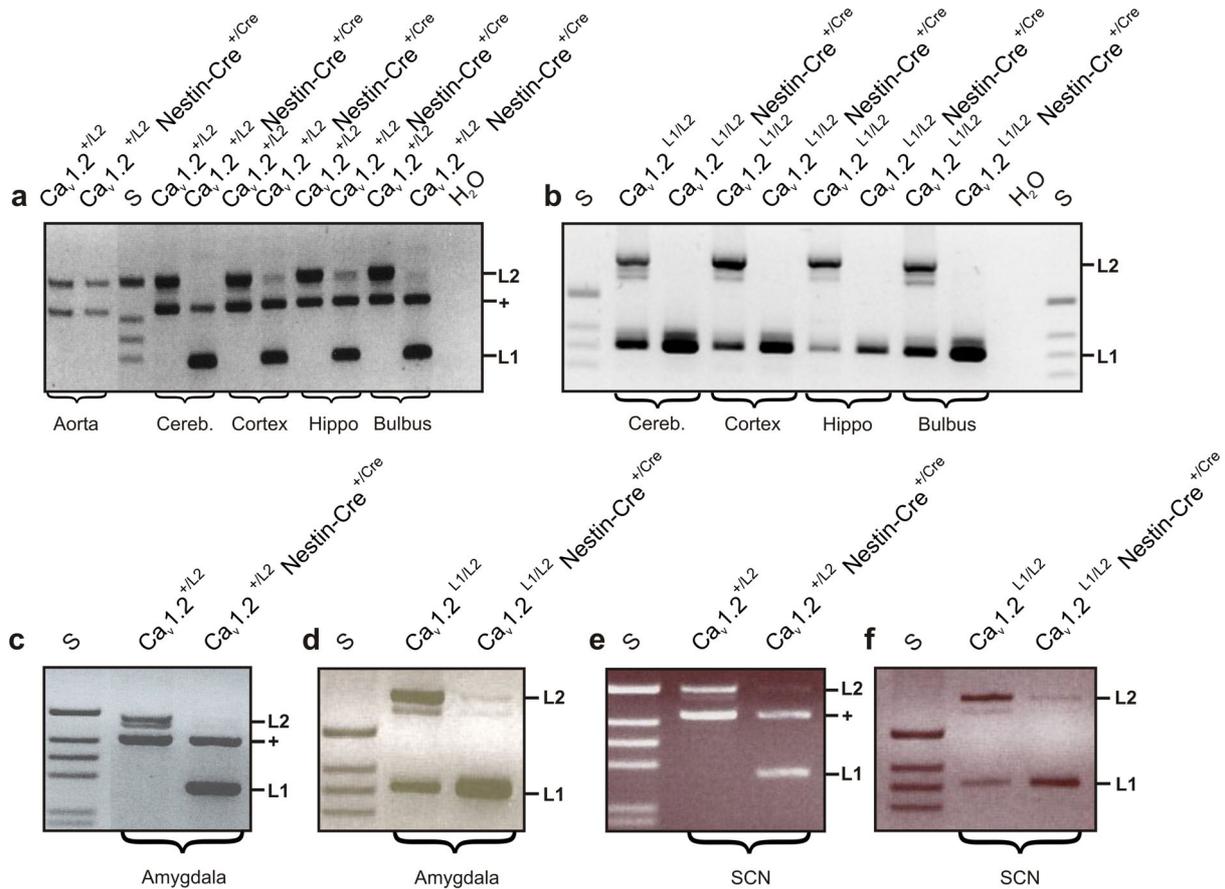
Gezeigt sind koronare Schnitte (300  $\mu\text{m}$ ) durch ein mittels X-Gal gefärbtes Gehirn einer ACZL<sup>+/tg</sup>, Nestin-Cre<sup>+/Cre</sup> Maus. Die Cre-Rekombinase schneidet in nahezu allen Gehirnteilen mit einer sehr hohen Effizienz, wodurch es durch das Einkreuzen der Nestin-Cre Mauslinie in die gefloxt Ca<sub>v</sub>1.2 Maus zu einem kompletten Gehirnspezifischen Knockout kommt.

a) 2.34 mm, -1.46; b) 2.22 mm, -1.58 mm; c) 2.10 mm, -1.70 mm; d) 1.34 mm, -2.46 mm; e) 1.10 mm, -2.70 mm; f) 0.88 mm, -2.92; erster Wert: Interaural, zweiter Wert: Bregma; nach Franklin und Paxinos, 1992.

### 3.2.2.2 Rekombination auf genomischer und mRNS Ebene

Die PCR Analyse der DNS (2.4.11) und mRNS (2.4.12) aus verschiedenen Gehirnteilen von Ca<sub>v</sub>1.2<sup>+/L2</sup> Nestin-Cre<sup>+/Cre</sup> (auf DNS Ebene) bzw. Ca<sub>v</sub>1.2<sup>L1/L2</sup> Nestin-Cre<sup>+/Cre</sup> (auf mRNS Ebene) Mäusen und Ca<sub>v</sub>1.2<sup>+/L2</sup> bzw. Ca<sub>v</sub>1.2<sup>L1/L2</sup> Tieren ohne Nestin-Cre (Kontrolle) ergab, dass die Rekombination, d.h. die Exzision der „gefloxten“ Exone 14 und 15 des *CACNA1C* Gens durch die Cre-Rekombinase, in allen untersuchten Gehirnteilen sowohl auf genomischer als auch auf mRNS Ebene stattgefunden hat (Abbildung 3.18). In den oben genannten Kontrollen kam es aufgrund des Fehlens des Nestin-Cre zu keiner Rekombination.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.18: Rekombination auf genomischer und mRNA Ebene in  $Ca_v1.2$  Nestin-Cre Tieren**

a) Rekombination auf genomischer Ebene. In den  $Ca_v1.2^{+/L2}$  Tieren ohne Nestin-Cre kommt es zu keiner Exzision der Exone 14 und 15 und daher auch nicht zum Auftreten eines L1 Allels. Bei den Kontrolltieren ( $Ca_v1.2^{+/L2}$  Nestin-Cre<sup>+/Cre</sup>) tritt durch Cre-vermittelte Rekombination ein L1 Allel in den aufgeführten Gehirnbereichen auf.

b) Rekombination auf mRNA Ebene. In den  $Ca_v1.2^{L1/L2}$  Mäusen, die über keine Rekombinase verfügen, kann es auf mRNA Ebene zu keinem Umsatz des L2 Allels in ein L1 Allel kommen. Bei den Knockouttieren ( $Ca_v1.2^{L1/L2}$  Nestin-Cre<sup>+/Cre</sup>) jedoch tritt in allen Gehirnbereichen eine vollständige Rekombination ein und das L2 Allel wird komplett in das L1 (Knockout) Allel umgewandelt.

c) + d) Rekombination in der Amygdala. c) Auf genomischer Ebene tritt eine vollständige Rekombination in den  $Ca_v1.2^{+/L2}$  Nestin-Cre<sup>+/Cre</sup> Tieren auf. d) Auch auf mRNA Ebene zeigt sich in der Amygdala der  $Ca_v1.2^{L1/L2}$  Nestin-Cre<sup>+/Cre</sup> Mäuse eine komplette Exzision der Exone 14 und 15.

e) + f) Rekombinationsereignisse in den suprachiasmatischen Nuklei. Sowohl auf genomischer (e) als auch auf mRNA Ebene kommt es zu einer nahezu vollständigen Rekombination.

S: Standard-Marker; L2: gefloxtes *CACNA1C* Allel; +: WT Allel; L1: Knockout Allel; Hippo: Hippokampus; Cereb.: Cerebellum.

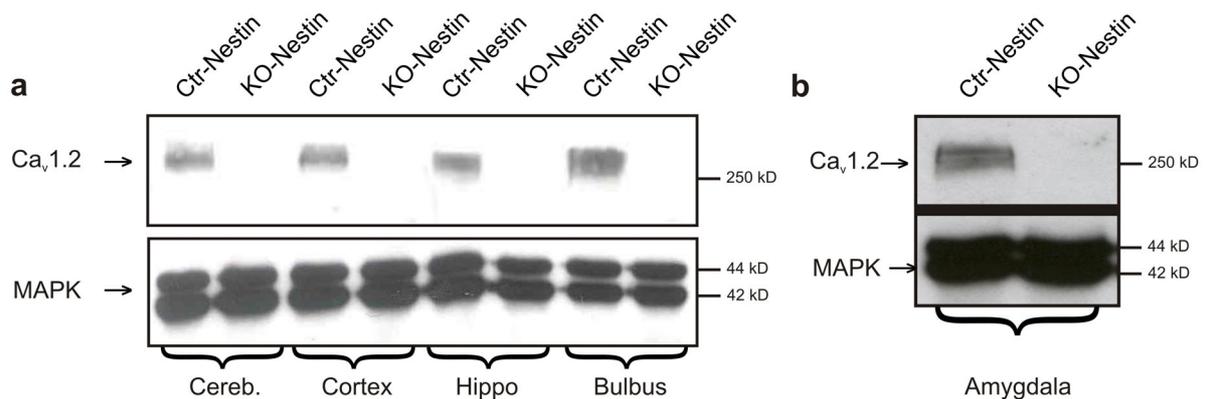
Des Weiteren wurden noch speziellere Gehirnbereiche untersucht, die für nachfolgende Versuche eine entscheidende Rolle spielen. Zum einen wurde die Rekombination in der Amygdala genauer betrachtet und zum anderen in den suprachiasmatischen Nuklei (Kernbereiche des anterioren Hypothalamus). Wie in Abbildung 3.18 c-f zu sehen ist, tritt sowohl in der Amygdala als auch im suprachiasmatischen Nukleus (SCN) eine vollständige Rekombination auf. Somit kann davon ausgegangen werden, dass auch in diesen spezialisierten Kernbereichen eine Deletion des  $Ca_v1.2$  Proteins erfolgt.

## Ergebnisse

### 3.2.2.3 Expressionsanalyse im Western Blot

In den Proteinproben (2.4.13.2) aus den Gehirnteilen von KO-Nestin Tieren, die auch schon für die Rekombinationsstudien herangezogen wurden, war keine Expression des  $Ca_v1.2$  Proteins gegenüber Kontrollmäusen mehr nachweisbar (Abbildung 3.19). Auch in der Amygdala konnte kein  $Ca_v1.2$  Protein mehr in den  $Ca_v1.2^{L1/L2}$  Nestin-Cre<sup>+Cre</sup> Mäusen (Abbildung 3.19 b) detektiert werden.

Da der SCN einen sehr kleinen Kernbereich des Hypothalamus mit ungefähr 20.000 Neuronen darstellt, war es bisher noch nicht möglich, ausreichend Gewebe für eine Proteinisolation zu gewinnen. Jedoch sprechen die Ergebnisse aus den Rekombinationsanalysen für eine komplette Deletion des *CACNA1C* Gens in diesem Gehirnbereich.



**Abbildung 3.19: Western Blot Analyse in  $Ca_v1.2$  Nestin-Cre Tieren**

a) Der Western Blot von Proteinpräparationen des Gehirns der Maus mit einem anti- $Ca_v1.2$  Antikörper zeigt keine Expression des  $Ca_v1.2$  Proteins in den Gehirnarealen von KO-Nestin Mäusen. Der Proteinlevel in den Kontrollen ist unverändert. Als Ladekontrolle wurde die MAPK verwendet.

b) Auch in der Amygdala von KO-Nestin Tieren konnte kein  $Ca_v1.2$  Protein mehr nachgewiesen werden. Die Expression in der Kontroll-Amygdala war unverändert. Als Ladekontrolle wurde die MAPK verwendet.

Ctr-Nestin:  $Ca_v1.2^{L1/L2}$  Nestin-Cre<sup>+Cre</sup>; KO-Nestin:  $Ca_v1.2^{L1/L2}$  Nestin-Cre<sup>+Cre</sup>; Hippo: Hippokampus; Cereb.: Cerebellum.

Die Ergebnisse der Grundcharakterisierung haben gezeigt, dass mit Hilfe der Nestin-Cre Mauslinie eine erfolgreiche Gehirn-spezifische Inaktivierung des *CACNA1C* Gens erfolgen konnte und auch sehr kleine Kernbereiche davon betroffen sind (Amygdala und SCN).

### 3.2.3 Verhaltensbiologische Analyse

Im Folgenden wurden die Nestin-Knockouttiere in verschiedenen verhaltensbiologischen Tests untersucht, um eventuelle Veränderungen, die durch das Fehlen des *CACNA1C* Gens im Gehirn zustande kommen könnten, aufzudecken.

Auch hier wurden zu Beginn einige Kontrollexperimente durchgeführt, um Defekte in anderen Teilbereichen des Verhaltens ausschließen zu können (*Open field*- und Rotarod Test).

#### 3.2.3.1 *Open field* Test

Wie bereits in Punkt 3.1.2.6 beschrieben, kann für die Untersuchung des Explorations- und Angstverhaltens von Mäusen ein *Open field* Test (2.2.1) durchgeführt werden, in dem die Tiere eine offene, unbekannte Fläche zu erkunden haben. Für den Versuch wurden jeweils 9 Kontroll- ( $Ca_v1.2^{+/L2}$  Nestin-Cre<sup>+Cre</sup>) und 9 Knockoutmäuse ( $Ca_v1.2^{L1/L2}$  Nestin-Cre<sup>+Cre</sup>) eingesetzt.

Der Versuchsablauf unterschied sich dahingehend von dem in Punkt 3.1.2.6, dass in diesem Fall das TSE-System, in dem das in Punkt 3.2.2.4 beschriebene *conditioned fear* durchgeführt wurde, zum Einsatz kam und dass nur ein Tag aufgewendet wurde, um die Tiere in ihrem Explorationsverhalten zu untersuchen. Hierfür wurden die Mäuse in die *conditioned fear* Box (480 mm x 480 mm) gesetzt und eine Erkundungsphase von 3 min anberaumt. In dieser Zeit wurde mit Hilfe der integrierten Lichtschranken die Aktivität der Mäuse aufgezeichnet. Wie aus der computergestützten Auswertung hervorgeht, konnten keine signifikanten Unterschiede in der Grundaktivität (Grundaktivität Ctr-Nestin: 28,2 % ± 2,1 % SEM; Grundaktivität KO-Nestin: 31,2 % ± 2,1 % SEM) der Tiere gefunden werden.

Somit konnten unspezifische Effekte durch die Inaktivierung des *CACNA1C* Gens auf das Explorations- und Angstverhalten ausgeschlossen werden.

#### 3.2.3.2 Rotarod Test

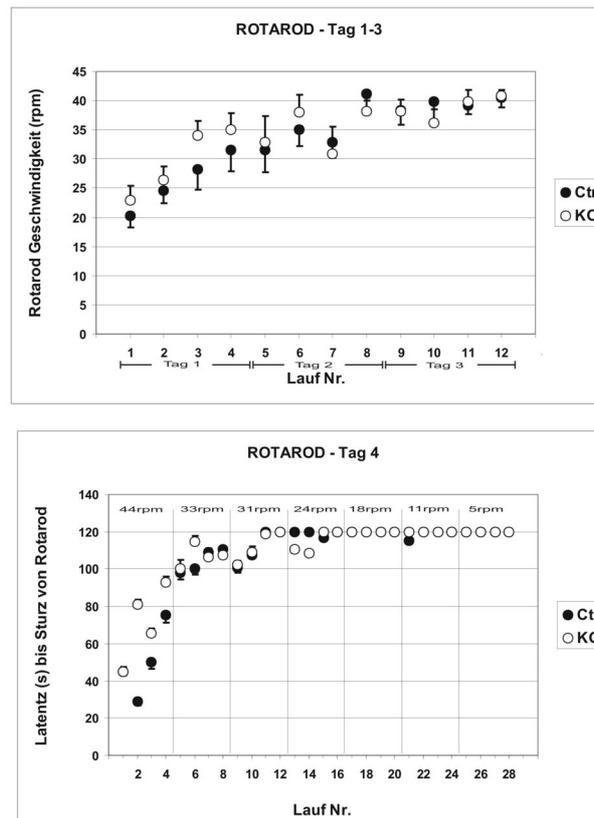
Um motorische Defizite in den Versuchstieren ausschließen zu können, wurde mit Hilfe des Rotarod Tests (2.2.2) die Motorik der Mäuse überprüft.

Das für die Nestin-Cre Tiere verwendete Protokoll ist im zweiten Teil des Abschnitts 2.2.2 aufgeführt.

Wie in Abbildung 3.20 dargestellt, ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen im *two-way* ANOVA.

Die Kurvenverläufe für die Kontroll- und Knockouttiere am Tag 4 ergaben in der Analyse im *two-way* ANOVA ebenfalls keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 3.20). Somit konnten im Rotarod Test keine Defizite in den  $Ca_v1.2^{L1/L2}$  Nestin-Cre<sup>+Cre</sup> Tieren festgestellt werden.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.20: Keine motorischen Störungen im Rotarod Test in KO-Nestin-Cre Mäusen**

a) Dargestellt ist die mittlere Geschwindigkeit bei der die Tiere der beiden Versuchsgruppen an den Tagen 1-3 vom Rotarod fielen. Bei der Auswertung der beiden Kurven ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im *two-way* ANOVA.

b) Der Graph zeigt die mittlere Latenzzeit in der sich die Tiere auf dem mit konstanter Geschwindigkeit rotierenden Stab halten konnten. Auch hier gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontroll- und Knockouttieren.

Ctr:  $Ca_v1.2^{+/L2}$  Nestin-Cre<sup>+/Cre</sup>; KO:  $Ca_v1.2^{L1/L2}$  Nestin-Cre<sup>+/Cre</sup>.

### 3.2.3.3 Circadianer Rhythmus – *Wheel Running*

In der X-Gal Färbung zeigte sich eine deutliche Aktivität der Cre-Rekombinase in den suprachiasmatischen Nuklei (SCN), einem Kernbereich des anterioren Hypothalamus. Auch die Rekombinationsanalysen (3.2.2.2) im SCN ergaben, dass es dort zu einer vollständigen Deletion des *CACNA1C* Gens kommt. Daher wurde im Folgenden die Rolle des L-Typ Kalziumkanals in diesem spezialisierten Kernbereich des Hypothalamus untersucht.

Der SCN spielt eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung und Regulation des tageszeitlichen (circadianen) Rhythmus in Säugern und wird auch als *master clock* bezeichnet, da er als übergeordnetes Steuerungszentrum für diese Prozesse dient. Tageszeitlich gesteuerte Rhythmen wie Schlaf/Wach-Zyklus, Hormonsekretion und lokomotorische Aktivität funktionieren jedoch nicht völlig exakt in einem 24 Stunden Zyklus und müssen daher jeden Tag neu über einen Eingangssignalweg zum SCN mittels des Licht/Dunkelzyklus eingestellt werden. Dieses sogenannte *resetting* verläuft über den retinohypothalamischen Trakt (RHT), der die Lichtinformation direkt auf den SCN verschaltet. Dadurch kommt es zur Generierung von Oszillationen, die über Ausgangssignalwege in verhaltensbiologische und physiologische Verhaltensweisen umgewandelt werden (Reppert and Weaver, 2001; Albrecht, 2004). Durch diese Verschaltung kommt es über Glutamatausschüttung zur

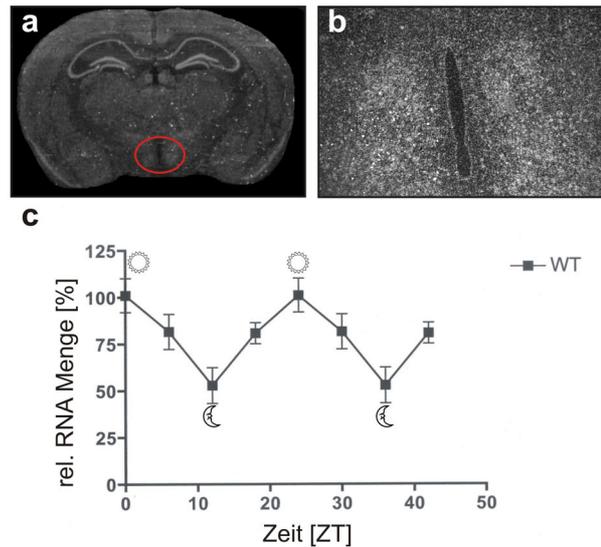
## Ergebnisse

Erregung der SCN-Neuronen und als Folge der verstärkten synaptischen Neurotransmission zur Öffnung von L-Typ Kalziumkanälen und NMDA-Rezeptoren und damit zum Kalziumeinstrom. Das über die L-Typ Kalziumkanäle eingeströmte Kalzium kann seinerseits die CREB-Signalkaskade aktivieren und dadurch die *mPer1*-Expression steuern (Mermelstein et al., 2000; Akiyama et al., 2001). *mPer1* ist eines der Gene, das mit einer Vielzahl von anderen sogenannten *clock*-Genen in einem komplexen transkriptionellen Netzwerk die endogene Rhythmizität im SCN selbst generiert (Reppert and Weaver, 2002). Dieses Netzwerk ist sehr robust und kann ohne äußere Einwirkungen die funktionellen Aufgaben des SCN steuern, es bedarf jedoch einer Feineinstellung durch den erwähnten Licht/Dunkelzyklus.

Damit einem Gen eine potentielle Rolle in der Regulation des *clock*-Netzwerkes zukommen kann, sollte es einige Voraussetzung erfüllen. Selbstverständlich muss es im SCN exprimiert werden, aber das alleine muss diesem Gen noch keine Aufgabe vermitteln und daher ist die circadiane Expression, die bei allen bekannten *clock*-Genen erfolgt, von entscheidender Bedeutung. Dass Spannungsabhängige Kalziumkanäle und besonders die L-Typ Kanäle im Ratten-SCN exprimiert werden, konnte bereits von Nahm und Mitarbeitern (Nahm et al., 2005) gezeigt werden. Auch die tageszeitliche Modulation von Kalziumströmen in SCN-Neuronen und die damit verbundene Generierung von spontanen Oszillationen in der Plasmamembran während des Tages untermauern die eventuelle Rolle von L-Typ Kalziumkanälen in diesem System (Colwell, 2000; Pennartz et al., 2002).

Um nun die Rolle des L-Typ Kalziumkanals  $Ca_v1.2$  im SCN zu untersuchen, musste zu Beginn nachgewiesen werden, dass der Kanal im SCN von Mäusen überhaupt exprimiert wird. Dafür wurden *in situ* Hybridisierungen mit der  $Ca_v1.2$  *antisense* Sonde auf Gehirnschnitten durchgeführt (2.4.17.2). Wie aus Abbildung 3.21 hervorgeht, wird der  $Ca_v1.2$  auch im SCN stark exprimiert. Vor allem in den Schnitten, die mit Fotoemulsion behandelt wurden, lässt sich die Expression besonders gut hervorheben (Abbildung 3.21). Hybridisierungen mit der  $Ca_v1.3$  *antisense* Sonde gaben kein nennenswertes Signal im SCN (Daten nicht gezeigt), weshalb davon ausgegangen werden kann, dass der  $Ca_v1.2$  der vorherrschende L-Typ Kalziumkanal in diesem System ist.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.21: Circadiane Expression des  $Ca_v1.2$  im SCN**

a) *in situ* Hybridisierung mit der  $Ca_v1.2$  antisense Sonde auf einem koronaren Hirnschnitt einer Wildtypmaus. Rot umrandet: Suprachiasmatische Nuklei. Vergrößerung: 5 x.

b) SCN aus a) vergrößert (10 x).

c) Circadiane Expression des  $Ca_v1.2$  auf mRNA Ebene. Aufgetragen sind die relativen mRNS Mengen, die sich nach der densitometrischen Auswertung der SCNs zu den verschiedenen Zeitgeber-Zeiten (ZT) ergaben. Es zeigte sich eine circadiane Expression des Kanals mit den höchsten Leveln bei "Tagesanbruch".

Als nächstes wurden Wildtypmäuse (WT) für 2 Wochen in einem 12:12 h Licht/Dunkelzyklus gehalten, um eine mögliche circadiane Expression des  $Ca_v1.2$  bestimmen zu können. Hierfür wurden die Tiere nach dieser Eingewöhnungsphase (*entrainment*) zu definierten Zeitpunkten getötet, die Hirne entnommen, Schnitte angefertigt und eine *in situ* Hybridisierung mit der  $Ca_v1.2$  antisense Sonde vorgenommen. Im Anschluss daran wurde die Expression des Kalziumkanals im SCN auf mRNS Ebene mit Hilfe des *QuantityOne* (BioRad) Computerprogramms densitometrisch zu den verschiedenen Zeitpunkten (ZTs) ausgewertet. Wie Abbildung 3.21 zeigt, ist die Expression des L-Typ Kalziumkanals  $Ca_v1.2$  tatsächlich einer circadianen Rhythmizität unterworfen. Der höchste Expressionslevel wird zu Tagesanbruch (Licht an, ZT0) erreicht und der Level sinkt sobald das Licht ausgeschaltet wird. Mit Hilfe dieses Versuches konnte auf mRNS Ebene gezeigt werden, dass der  $Ca_v1.2$  circadian exprimiert wird und ihm somit eine mögliche Rolle im SCN zukommen könnte.

Die anschließenden Versuche sollten die Frage klären, welche Bedeutung der L-Typ Kalziumkanal  $Ca_v1.2$  *in vivo* für die Funktion des SCN spielt. Dafür wurden jeweils 10 Kontroll- und 10 Knockout-Nestin-Cre Tiere einem *Wheel Running* Test unterzogen (2.2.6). Nach 2 Wochen *entrainment* in einem 12:12 h Licht/Dunkelzyklus, in dem sich beide Versuchsgruppen in gleichem Maße an die Licht/Dunkel-Bedingungen gewöhnt hatten und ein vergleichbares Laufverhalten im Aktogramm zeigten, wurden die Tiere den DD-Bedingungen (konstante Dunkelheit, *free running*) ausgesetzt. In dieser Phase des *Wheel Runnings* sollte die innere Uhr der Mäuse zum Tragen kommen. Dadurch sollte ihnen in konstanter Dunkelheit die Möglichkeit geben sein, die subjektive Nacht vom subjektiven Tag zu unterscheiden und auch eine Periodenlänge von ca. 23 Stunden aufrechtzuerhalten. Wie aus Abbildung 3.22 a hervorgeht, war es sowohl den Ctr- als auch den KO-Nestin Mäusen möglich sich auf die DD-Bedingungen einzustellen und eine circadiane Periodizität in ihrem Laufverhalten

## Ergebnisse

aufrechtzuerhalten. Somit konnten Defizite im endogenen *clock*-Netzwerk, das die Regulation der inneren Uhr steuert, in den Knockouttieren ausgeschlossen werden.

Im Folgenden wurden daher die durch Licht ausgelösten Phasenverschiebungen in den Versuchsgruppen untersucht. Wie bereits in Punkt 2.2.6 erläutert, können verschiedene Umwelteinflüsse wie Licht, Lärm oder Futterangebot den circadianen Rhythmus eines Tieres beeinflussen. Da Licht die stärksten Effekte auf das Verhalten und die molekularen Signalwege bewirkt, wurden während der *free running* Periode zu verschiedenen, definierten Zeitpunkten Lichtimpulse (15 min; 400 Lux) appliziert und daraufhin das Laufverhalten der Tiere untersucht.

Der Lichtpuls an CT10 diente als Kontrollpuls, da eine Lichtgabe während des subjektiven Tages prinzipiell keine Phasenverschiebung hervorrufen sollte. Wie Abbildung 3.22 b zeigt, bleibt der Kontrollpuls im Hinblick auf das Laufverhalten sowohl in den Kontrollen als auch in den Knockouts wie erwartet ohne Wirkung. Der zweite Lichtblitz wurde an CT14 (während der frühen subjektiven Nacht) appliziert und sollte zu einem sogenannten *phase delay*, also einem späteren Laufbeginn führen. Dies war auch in beiden Versuchsgruppen der Fall. Sowohl die  $Ca_v1.2^{+/L2}$  Nestin-Cre<sup>+Cre</sup> als auch die  $Ca_v1.2^{L1/L2}$  Nestin-Cre<sup>+Cre</sup> Mäuse zeigten im *Wheel Running* eine Phasenverschiebung und begannen dadurch später mit dem Laufen (Abbildung 3.22 c). Es ergaben sich jedoch keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den beiden Tiergruppen.

Der an CT22 (während der späten subjektiven Nacht) verabreichte Lichtpuls, der definitionsgemäß zu einem *phase advance* führen sollte (Aktivität der Tiere setzt deutlich früher ein), ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Kontroll- und Knockoutmäusen (Abbildung 3.22 d). Es fand zwar in beiden Gruppen eine Phasenverschiebung statt, jedoch fiel diese in den Knockouts deutlich geringer aus als in den Kontrollen (Abbildung 3.22 d).

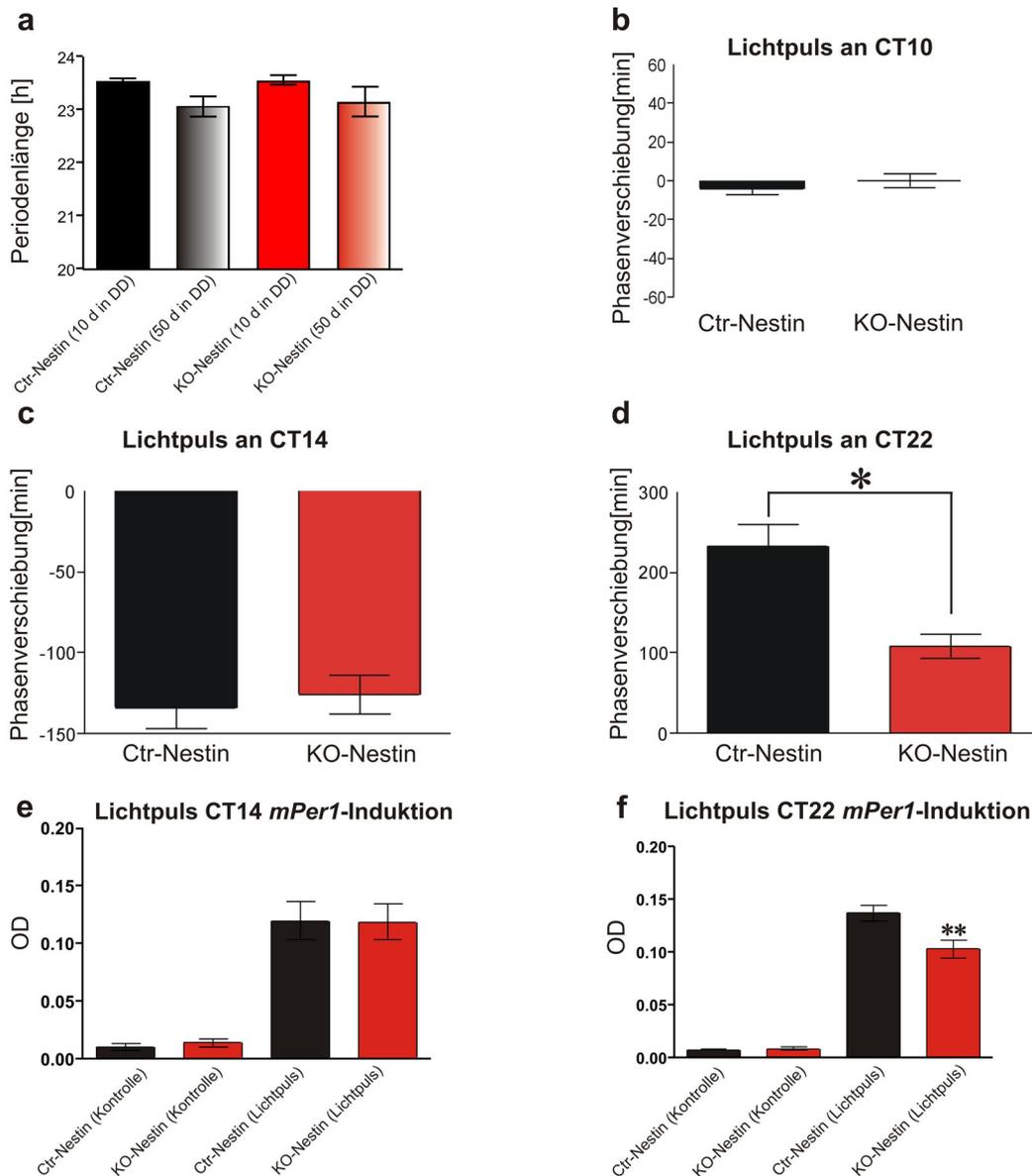
Wie bereits oben erwähnt, wird vermutet, dass es über den Einstrom von L-Typ Kalziumkanälen zur CREB-Aktivierung und dadurch zur Expression von *mPer1* kommt (Mermelstein et al., 2000; Akiyama et al., 2001). Interessanterweise ist zum CT22 auch der Level an aktivem, phosphoryliertem CREB auf dem höchsten Niveau und kann direkt über Lichtstimulation in konstanter Dunkelheit beeinflusst werden (Ginty et al., 1993). Dadurch würde es dann auch zu einer induzierten *mPer1*-Expression kommen. Daher wurden als nächstes die Tiere, die zum Zeitpunkt CT22 einen Lichtblitz erhalten haben, getötet, die Hirne in Dunkelheit entnommen und *in situ* Hybridisierungen mit einer *mPer1 antisense* Sonde durchgeführt, um überprüfen zu können, ob es tatsächlich zu einer Induktion der *mPer1*-Expression im SCN gekommen ist.

Die densitometrische Auswertung der SCNs ergab, dass es an CT22 sehr wohl zu einer Induktion der *mPer1*-Expression im Vergleich zu Kontrolltieren (Ctr- und KO-Nestin Tiere, die keinen Lichtpuls erhalten haben) gekommen ist, dass diese in den Knockouts erneut signifikant erniedrigt war (Abbildung 3.22 e und f).

Somit korreliert der verminderte *phase advance* mit einer erniedrigten *mPer1*-Induktion im SCN der Knockouttiere.

Diese Ergebnisse zeigen, dass dem  $Ca_v1.2$  L-Typ Kalziumkanal eine wichtige Rolle bei der Licht-induzierten Phasenverschiebung (*resetting*) und der damit gekoppelten *mPer1*-Genexpression zukommt.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.22: Free running Verhalten unter DD-Bedingungen**

a) Die Grafik zeigt die Periodenlängen der Kontroll- und Knockouttiere unter DD-Bedingungen. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen weder nach 10 noch nach 50 Tagen in kompletter Dunkelheit. Es war somit beiden Gruppen möglich ihre normale Periodenlänge von ca. 23 Stunden aufrechtzuerhalten.

b) Lichtpuls an CT10. Da dieser Lichtpuls als Kontrollpuls diente (Licht am subjektiven Tag), zeigten sich sowohl keine Phasenverschiebung als auch keine Unterschiede zwischen den Ctr- und KO-Nestin Mäusen.

c) Lichtpuls an CT14. Der Lichtpuls zu diesem Zeitpunkt entspricht einer Lichtgabe während der frühen subjektiven Nacht und sollte zu einem *phase delay* führen. Sowohl bei den Kontrollen als auch den Knockouts trat die erwartete Phasenverschiebung ein, jedoch gab es keinerlei Unterschiede zwischen den Gruppen.

d) Lichtpuls an CT22. Der Lichtpuls entspricht einer Lichtgabe während der späten subjektiven Nacht der Tiere und sollte daher zu einem *phase advance* führen. Die Phasenverschiebung trat auch bei beiden Versuchstiergruppen auf, aber es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Ctr- und KO-Nestin Mäusen. Der *phase advance* der KO-Tiere fiel deutlich geringer aus als der der Ctr-Tiere.

e) + f) *mPer1*-Induktion an CT14 und CT22. Unter Kontrollbedingungen (Kontrolle) kommt es in beiden Genotypen zu einer geringen, aber nicht unterschiedlichen *mPer1*-Induktion. Die *mPer1*-Genexpression ist jedoch in den KO-Nestin Tieren nach einem Lichtpuls an CT22 signifikant geringer als in den Kontrolltieren. Die Genexpression an CT14 hingegen zeigt keine Unterschiede.

Ctr-Nestin:  $Ca_v1.2^{+/L2}$  Nestin-Cre<sup>+Cre</sup>; KO-Nestin:  $Ca_v1.2^{L1/L2}$  Nestin-Cre<sup>+Cre</sup>; n = 10; OD: optische Dichte; \*: p < 0,05; \*\*: p < 0,01.

### 3.2.3.4 *Conditioned fear* Test – genetisches Modell

In der X-Gal Färbung zeigte sich nicht nur im SCN eine deutliche Aktivität der Cre-Rekombinase, sondern auch im sogenannten Mandelkern (*Corpus amygdaloideum*; kurz: Amygdala), ein Komplex aus mehreren Einzelkernen, der im Temporallappen liegt und dem limbischen System zugeordnet wird. Darüber hinaus ist das System afferent und efferent mit weiteren limbischen Zentren verbunden, wie z.B. mit dem Hippokampus. Da die Rekombinationsanalysen (3.2.2.2) der Amygdala zeigten, dass es dort zu einer vollständigen Deletion des *CACNA1C* Gens kommt, wurde im Folgenden die Rolle des L-Typ Kalziumkanals in diesem speziellen Komplex untersucht.

In einer Reihe von Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass der laterale Kern der Amygdala als der Bereich gilt, der eine Schlüsselrolle in der Gedächtnisausbildung während des sogenannten *conditioned fear* spielt (LeDoux, 2000; Maren et al., 2001). Das erwähnte *conditioned fear* ist einer der aussagekräftigsten Verhaltensversuche überhaupt, wenn man die neuronalen Grundlagen des emotionalen Angst-Gedächtnisses und die Gedächtnisausbildung im Allgemeinen untersuchen möchte, da sich der Lernvorgang sehr schnell vollzieht und auch lange anhält.

Bereits 1927 konnte Pavlov (Pavlov and Anrep, 1927) sehr eindrucksvoll zeigen, dass ein initial neutraler Stimulus (*conditioned stimulus*; CS), der mit einem biologisch relevanten Stimulus (*unconditioned stimulus*; US) zeitlich gepaart wird, tief greifende Auswirkungen auf das Verhalten eines Tieres haben kann. Beim hier angewendeten *conditioned fear* Test wird ein solcher CS in Form eines Tons (Sinus-Ton, 9 kHz, 80 dB) mit einem US (milder Stromschlag – „Fußschock“, 0,7 mA) in einer definierten Umgebung (Kontext A) zeitlich gepaart und im Anschluss das typische Verhalten (totale Bewegungslosigkeit, *freezing*) der Tiere auf die Präsentation des CS alleine in einer veränderten Umgebung (Kontext B) untersucht (*cued fear*) (Davis, 1997; Fendt and Fanselow, 1999; LeDoux, 2000) (zum Versuchsablauf siehe auch Punkt 2.2.4).

Bei dieser Art von Verhaltensversuch unterscheidet man zwei Phasen in der Ausbildung des Angst-Gedächtnisses. Zum einen den eigentlichen Lernvorgang *per se* (Akquisition) und zum anderen die Überführung des Gelernten (Konsolidierung) in das Langzeit-Gedächtnis (*long term memory*, LTM). Die oben dargestellte Ton-Schock Paarung (Trainingstag, Tag 0) führt zur Akquisition, wohingegen in den angeschlossenen Testphasen (Tag 1 und Tag 7; Präsentation des CS in Kontext B) die Konsolidierung des Erlernten erfolgt.

Welche molekularen Ereignisse diesen beiden Phasen der Gedächtnisausbildung zugrunde liegen, ist im Detail jedoch noch nicht genau untersucht. Mit Hilfe einer Vielzahl von genetischen und pharmakologischen Ansätzen konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl der NMDA-Rezeptor als auch der L-Typ Kalziumkanal eine wichtige Rolle bei der Bildung des Angst-Gedächtnisses in der Amygdala spielen.

In einigen dieser Arbeiten wurde postuliert, dass es durch die Präsentation des CS in der lateralen Amygdala zur Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat aus präsynaptischen Endigungen der auditorischen Eingangsfasern kommt (Li et al., 1995; Li et al., 1996; Farb and LeDoux, 1997). Das Glutamat bindet an NMDARs und AMPARs ( $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-Isoxazol-Rezeptoren) und durch die Aktivierung der AMPARs treten einzelne Aktionspotentiale auf. Sobald der US eintrifft, werden die Zellen der lateralen Amygdala stark depolarisiert (Blair et al., 2001) und es strömt Kalzium über die NMDARs ein, an die bereits Glutamat gebunden war (*CS-input synapses*). Durch den  $Ca^{2+}$ -

## Ergebnisse

Einstrom kommt es dann an den depolarisierten Neuronen zu Synapsen-spezifischer LTP (Weisskopf et al., 1999). Das auf diesem Wege eingeströmte Kalzium soll allerdings nur in der Lage sein, ein kurz andauerndes Gedächtnis (*short term memory*, STM) in der Amygdala auszubilden. Für die Überführung von STM in LTM ist allerdings ein höheres Level an Kalzium erforderlich, das während der starken US-Depolarisation durch den Einstrom spannungsabhängiger Kalziumkanäle erreicht wird (Bauer et al., 2002).

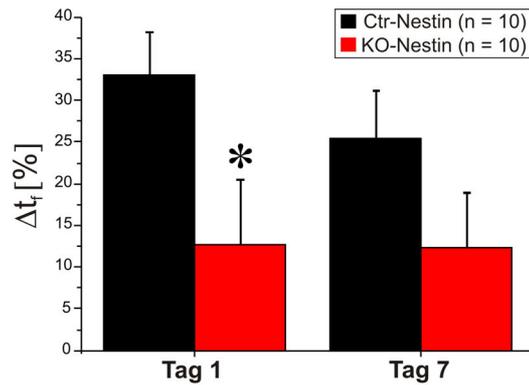
Für welche Phase der Angst-Gedächtnisausbildung nun der NMDAR bzw. der L-Typ Kalziumkanal zuständig ist, wird in der Literatur sehr kontrovers diskutiert. Daher soll im Folgenden mit Hilfe eines genetischen und eines pharmakologischen Modells (s. 3.2.2.5) geklärt werden, welche Rolle der L-Typ Kalziumkanal  $Ca_v1.2$  bzw. der NMDAR bei der Ausbildung des Angst-Gedächtnisses in der Amygdala spielt.

Für die Untersuchungen im genetischen Modell wurden jeweils 10 Kontroll- ( $Ca_v1.2^{+/L2}$  Nestin-Cre<sup>+tg</sup>) und 10 Knockouttiere ( $Ca_v1.2^{L1/L2}$  Nestin-Cre<sup>+Cre</sup>) einem *conditioned fear* Test nach dem in Punkt 2.2.4 beschriebenen Versuchsprotokoll unterzogen. In den ersten 180 sek (*pretone*) vor der Tonapplikation bestehen keine Unterschiede im *freezing* Verhalten zwischen den Kontroll- und Knockouttieren am Konditionierungs- bzw. Trainingstag (Ctr-Nestin: 8,8% ± 2,2% SEM; KO-Nestin: 8,03% ± 3,0% SEM). Daraus kann gefolgert werden, dass beide Versuchsgruppen dieselbe Grundaktivität aufweisen.

Die Tiere wurden nach der Konditionierung (CS-US Paarung) in ihre Heimatkäfige gesetzt und am folgenden Tag (Tag 1) und 7 Tage später (Tag 7) in einem veränderten Kontext (Kontext B) erneut dem *conditioned stimulus* ausgesetzt. Veränderungen im *freezing* Verhalten wurden über Bestimmung des *freezing* Zeitdifferenzwertes  $\Delta t_f$  ausgedrückt.  $\Delta t_f$  (s) beschreibt dabei die Differenz der *freezing* Zeiten eines Tieres nach Konditionierung vor erneuter Präsentation des erlernten Stimulus (*pretone*) und während des erlernten Stimulus (CS) im veränderten Kontext B. Am Tag 1 zeigte sich bei den KO-Nestin Mäusen ein signifikant verringertes *freezing* Verhalten im Gegensatz zu den Ctr-Nestin Tieren (Abbildung 3.23). Dieser Effekt in der KO-Gruppe war am Tag 7 nahezu verschwunden und es bestanden keine Unterschiede mehr zwischen den beiden Versuchstiergruppen (Tag 1 - Ctr-Nestin: 33,1 ± 5,1 s SEM; KO-Nestin: 12,6 ± 7,8 s SEM; Tag 7 - Ctr-Nestin: 25,4 ± 5,8 s SEM; KO-Nestin: 12,4 ± 6,4 s).

Somit scheint der L-Typ Kalziumkanal  $Ca_v1.2$  unter diesen Versuchsbedingungen eine Rolle bei der ersten Phase der Gedächtnisausbildung (Akquisition) in der Amygdala zu spielen. Die Konsolidierung ist durch das Fehlen des  $Ca_v1.2$  anscheinend nicht betroffen.

## Ergebnisse



### Abbildung 3.23: Conditioned fear Test - genetischer Ansatz

Dargestellt sind die Veränderungen im *freezing* Verhalten, die über Bestimmung des *freezing* Zeitdifferenzwertes  $\Delta t_f$  ausgedrückt wurden.  $\Delta t_f$  beschreibt dabei die Differenz der *freezing* Zeiten (*pretone* - CS im Kontext B).

Die KO-Nestin Mäuse zeigten am Tag 1 eine signifikant verringerte *freezing* Antwort im Vergleich zu den Ctr-Nestin Tieren. Dieser Effekt war am Tag 7 verschwunden.

Ctr-Nestin:  $Ca_v1.2^{+/L2} Nestin-Cre^{+/Cre}$ ; KO-Nestin:  $Ca_v1.2^{L1/L2} Nestin-Cre^{+/Cre}$ .

Um diese ersten Daten mit den Knockouttieren untermauern zu können, wurden im nächsten Schritt pharmakologische Untersuchungen mit einem L-Typ Kalziumkanalblocker *in vivo* durchgeführt. Für die Klärung der Frage, welche Rolle der NMDA-Rezeptor spielt, wurde der spezifische NR2B- (NMDAR-Untereinheit) Blocker Ifenprodil verwendet.

### 3.2.3.5 Conditioned fear Test – pharmakologischer Ansatz

Der pharmakologische Ansatz bietet im Gegensatz zum genetischen Modell einige Vorteile. Zum einen kann ein spezifischer Kanalblocker gezielt in das gewünschte Hirnareal injiziert und die Wirkung des Blockers direkt auf das Angstverhalten der Tiere untersucht werden. Zum anderen können sowohl kompensatorische Regulationsmechanismen, die unter Umständen durch das Ausschalten eines Gens auftreten können, als auch das Mitwirken anderer Hirnareale nahezu ausgeschlossen werden.

Für die im Folgenden aufgeführten Experimente wurden an C57BL/6OlaHsd (Harlan) Männchen unilaterale Kanülenimplantationen in den Seitenventrikel (ICV; s. 2.2.5.1) vorgenommen und die Tiere nach einer 1 wöchigen Erholungsphase einem *conditioned fear* Test unterzogen. Vor der Konditionierung wurde jedem Tier unter leichter Isofluran-Narkose eine 2  $\mu$ l Bolusgabe a) des L-Typ Kalziumkanalblockers Isradipin oder b) des NR2B-Blockers Ifenprodil verabreicht. Im Anschluss erfolgten die Konditionierung und die Test-Phasen an Tag 1 und 7 wie bereits beschrieben.

In Abbildung 3.24 a und b ist die *freezing* Antwort der mit Isradipin (gelöst in EtOH) injizierten Tiere dargestellt. Die Tiere, die mit Vehikel (1% EtOH) behandelt wurden, zeigten am Tag 1 einen typischen Kurvenverlauf in ihrem *freezing* Verhalten über die 180 sek, in denen sie den *conditioned stimulus* im Kontext B zu hören bekamen (hohes initiales *freezing*, das über die Zeit abnimmt, da sich die Tiere an den Ton gewöhnen). Die Mäuse, die eine Dosis von 10  $\mu$ M Isradipin erhalten hatten, verhielten sich sehr ähnlich zu den Vehikel-Tieren, woraus man schließen kann, dass sich mit dieser Dosis noch kein Effekt auf die L-Typ Kalziumkanäle erzielen lässt. Bei einer Behandlung mit einer Dosis von 100  $\mu$ M

## Ergebnisse

Isradipin zeigten die Mäuse jedoch eine signifikant geringere *freezing* Antwort auf den Ton im Vergleich zu der Vehikel- bzw. 10  $\mu$ M Isradipin-Gruppe.

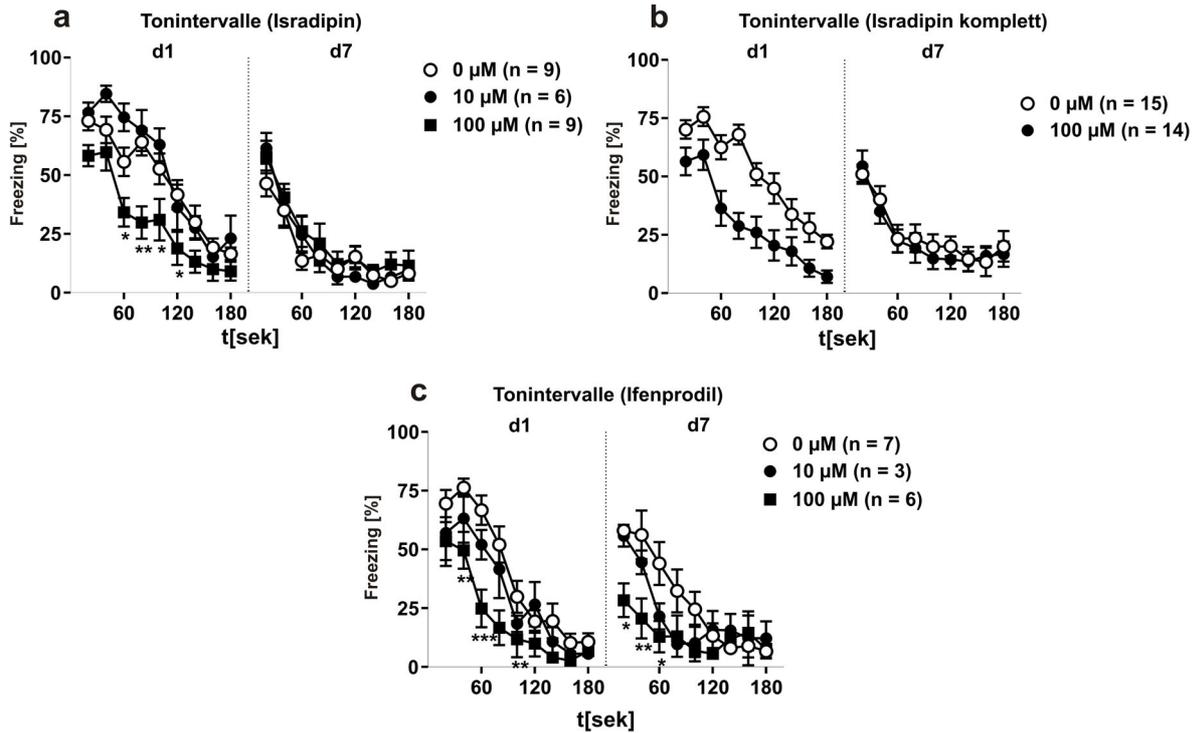
Am Tag 7 war kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen mehr erkennbar, d.h. Isradipin zeigte hier keinen Effekt mehr (Abbildung 3.24 a, b).

Somit ließen sich auch mit dem pharmakologischen Ansatz dieselben Ergebnisse erzielen wie im genetischen Modell.

Die Tiere, die vor der Konditionierung mit Ifenprodil (gelöst in H<sub>2</sub>O) behandelt wurden, zeigten am Tag 1 ebenfalls eine Veränderung in ihrem Angst-Gedächtnis im Vergleich zu der Vehikel (1 % EtOH) injizierten Gruppe (Abbildung 3.24 c). Die 10  $\mu$ M Dosis Ifenprodil löste keine veränderte *freezing* Antwort in den Versuchstieren aus und verhielt sich somit ähnlich wie die Vehikel-Gruppe. Die mit der hohen Dosis an Ifenprodil (100  $\mu$ M) injizierten Mäuse zeigten im Vergleich zu der Vehikel- und 10  $\mu$ M Ifenprodil-Gruppe jedoch ein signifikant verringertes *freezing* Verhalten am Tag 1, das auch am Tag 7 noch vorhanden war. Somit lässt sich durch die Blockade der NR2B-Untereinheit mit Ifenprodil die *freezing* Antwort sowohl an Tag 1 als auch an Tag 7 unter den gegebenen Bedingungen beeinflussen. Im Gegensatz zum L-Typ Kalziumkanal scheint der NMDA-Rezeptor sowohl einen Einfluss auf die Akquisition als auch auf die Konsolidierung des Angst-Gedächtnisses zu haben.

Daraus kann letztendlich gefolgert werden, dass der L-Typ Kalziumkanal eine wichtige Rolle bei der Akquisition des Angst-Gedächtnisses in der Amygdala spielt und der NMDAR bei der Akquisition und eventuell auch bei der Konsolidierung.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.24: Conditioned fear Test - pharmakologischer Ansatz**

Dargestellt sind die *freezing* Antworten der Wildtyptiere über die 180 sek, in denen der *conditioned stimulus* appliziert wurde.

a) + b) Nach ICV-Injektion des L-Typ Kalziumkanalblockers Isradipin kam es mit der Dosis von 100 µM zu einem signifikant geringeren Angstverhalten am Tag 1; dieser Effekt war am Tag 7 verschwunden. b) zeigt die kompletten Isradipin Daten, die mit der 100 µM Dosis erhalten wurden.

c) Auch die ICV-Injektion des NR2B-Blockers Ifenprodil reduzierte in der hohen Dosis die *freezing* Antwort der Mäuse am Tag 1 im Vergleich zur Vehikel-Applikation. Am Tag 7 war der Ifenprodil-Effekt immer noch vorhanden.

## 4 Diskussion

Die Vielzahl von Informationen, denen Säugetiere tagtäglich ausgesetzt sind, kann zwar im ZNS mit Hilfe von elektrischen Signalen verschlüsselt werden, doch um diesen Informationen einen dauerhaften Einfluss zu ermöglichen, bedarf es langanhaltender Veränderungen in der Struktur und Funktionalität der Neuronen. Plastizität ist hier die herausragend wichtige Eigenschaft des Gehirns, die es neuronalen Strukturen und Funktionen ermöglicht, sich auf verschiedene elektrische Aktivitäten einzustellen.

Biochemische Prozesse, die sich einer elektrischen Stimulation der Plasmamembran anschließen und zur Aktivierung von zahlreichen zytosolischen Signalproteinen führen, werden daher als ein weiterer wichtiger Baustein in dem Netzwerk der Informationsverarbeitung angesehen. Besondere Bedeutung hat in diesem Zusammenhang der Zellkern von Neuronen erlangt. Während der letzten Jahre stellte sich heraus, dass es der Zellkern ist, der auf die elektrische Stimulation und die biochemischen Signale reagiert, indem er aktiv die Expressionskontrolle von Genen steuert und dadurch zur Langzeitspeicherung von Informationen beiträgt. Allerdings schließt sich an dieser Stelle die Frage an, wie ein Zellkompartiment, das sich räumlich gesehen relativ weit weg von der Synapse befindet und zudem über eine vergleichsweise langsame Funktionsweise verfügt, mit diesen Informationen austauschen kann. Mittlerweile wird dieser *synapse-to-nucleus* Signalweg in einigen neuronalen Systemen, wie z.B. dem Hippokampus-abhängigen Lernen, der circadianen Rhythmisiertheit und dem Angst-Gedächtnis, deutlich besser verstanden.

Besondere Bedeutung hat in dem Zusammenhang der Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP response element binding protein*) erlangt, der über zwischengeschaltete Signalmoleküle in der Lage ist, Informationen von der Plasmamembran zum Zellkern zu transferieren und im Anschluss die CRE (*cAMP response element*)-abhängige Genexpression anzuschalten. An diesem Informationstransfer sind maßgeblich Kalziumionen beteiligt, die in Antwort auf physiologische synaptische Aktivität sowohl über N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA) Rezeptoren als auch über L-Typ Kalziumkanäle in die Postsynapse einströmen können und dadurch den nukleären Signalweg hin zu CREB auslösen können (Ginty et al., 1993; Deisseroth et al., 1996; Deisseroth et al., 1998). Prinzipiell ist eine Vielzahl von Kalziumkanälen im Stande den Kalziumspiegel in Neuronen dramatisch zu erhöhen, jedoch ist nur für L-Typ Kalziumkanäle und NMDA-Rezeptoren (NMDAR) gezeigt, dass sie CREB aktivieren können (Ginty et al., 1993; Deisseroth et al., 1996; Deisseroth et al., 1998; Dolmetsch et al., 2001). Speziell für den Ca<sub>v</sub>1.2 L-Typ Kalziumkanal wurde darüber hinaus postuliert, dass ein großer Kalziumstrom oder eine starke Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration alleine zu keiner CREB-Aktivierung (Phosphorylierung) führen, sondern dass eine Konformationsänderung im C-terminalen Bereich des Ca<sub>v</sub>1.2 dafür notwendig ist (Morad and Soldatov, 2005).

Letztendlich führt die CREB-Aktivierung zur Expression zahlreicher Gene, von denen eine Vielzahl an Lern- und Gedächtnisprozessen und, als Konsequenz davon, an biologischen Verhaltensweisen im Säugetier beteiligt sind.

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 Hippokampus mit bestimmten Arten des Lernens in Verbindung steht (Morris et al., 1986b; McHugh et al., 1996; Tsien et al., 1996; Tang et al., 1999). Jedoch lässt sich die synaptische Plastizität und die Gedächtnisbildung im Hippokampus und der Amygdala allein mittels NMDAR-vermittelter Prozesse nicht ausreichend erklären (Grover and Teyler, 1990; Aniksztejn and Ben-Ari, 1991; Impey et al., 1996; Morgan and Teyler, 1999; Weisskopf et al., 1999; Borroni et al., 2000; Rampon and Tsien, 2000; Woodside et al., 2004).

Da neben den NMDARs der L-Typ Kalziumkanal eine entscheidende Funktion bei den oben genannten biochemischen *synapse-to-nucleus* Kommunikationsprozessen zu übernehmen scheint, sollte mit Hilfe geeigneter Tiermodelle untersucht werden, welche Bedeutung dem  $Ca_v1.2$  bei der synaptischen Plastizität und den damit verbundenen Lern- und Gedächtnisprozessen in verschiedenen Hirnarealen zukommt.

### 4.1 Hippokampus-abhängiges Lernen

#### 4.1.1 Generierung der Hippokampus- und Cortex-spezifischen *CACNA1C* defizienten Mäuse

Für die Generierung der Hippokampus- und Cortex-spezifischen *CACNA1C* defizienten Mäuse wurde die NEX-Cre transgene Mauslinie verwendet (Schwab et al., 2000).

Vor der Untersuchung des Phänotyps der konditionalen Knockoutmäuse ( $Ca_v1.2^{HCKO}$ ) war es wichtig festzustellen, in welchen Geweben und in welchen Mengen das  $Ca_v1.2$  Knockout Allel gebildet wurde und ob es zu einer Reduktion des  $Ca_v1.2$  Protein in den gewünschten Organen gekommen war.

Die Analysen der DNS aus den  $Ca_v1.2^{+L2}$  NEX-Cre<sup>+Cre</sup> Tieren zeigte, dass es ausschließlich in den Frontalhirnregionen, wie Cortex, Hippokampus und Amygdala, zu rekombinierter DNS kam (Abbildung 3.5). Auch auf mRNA Ebene konnte eine nahezu vollständige Rekombination in den untersuchten Genotypen ( $Ca_v1.2^{L1/L2}$  NEX-Cre<sup>+Cre</sup>) beobachtet werden. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass nur in den gewünschten Gehirnregionen eine Rekombination auftrat. Im Western Blot wurden im Hippokampus der  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Mäuse noch Spuren des  $Ca_v1.2$  Proteins detektiert (Abbildung 3.6). Da jedoch die Deletion des *CACNA1C* Gens erst nach einigen Wochen der postnatalen Entwicklung effektiv wird und dadurch die hippokampalen  $Ca_v1.2$  Proteinmengen erst in adulten Tieren nahezu verschwunden sind, können zumindest entwicklungsbedingte Störungen der Hirnarchitektur ausgeschlossen werden. Des Weiteren kann angenommen werden, dass die Pyramidenzellen des Hippokampus ihr maximales Dendritenwachstum während der ersten postnatalen Wochen durchlaufen haben und auch die synaptischen Verknüpfungen bereits in dieser Zeit vollständig etabliert sind (Wong and Ghosh, 2002). Diese Annahme wurde durch den Befund gestützt, dass die Kontroll- und  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Mäuse keinerlei Unterschiede in der Neuroanatomie und den Charakteristika der basalen synaptischen Übertragung im Hippokampus aufweisen (Abbildung 3.2, 3.3 und 3.11).

#### 4.1.2 Hippokampus-abhängiges räumliches Lernen in $Ca_v1.2^{HCKO}$ Tieren

Um das räumliche, Hippokampus-abhängige Lernen der  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Mäuse untersuchen zu können, wurden zwei unterschiedliche Verhaltenstests durchgeführt. Sowohl im diskriminatorischen Wasserlabyrinth Test (Arns et al., 1999; Steckler et al., 1999; Kleppisch et al., 2003), der erstmals 1986 für Ratten beschrieben wurde (Morris et al., 1986b), als auch in einem komplexeren Labyrinth Test (Adelsberger et al., 2005) zeigten die Knockouttiere im Vergleich zu den Kontrollen ein schwer beeinträchtigtes räumliches Lernverhalten (Abbildung 3.8 und 3.9). Da die Deletion des  $Ca_v1.2$  jedoch auch im Cortex der  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Tiere stattgefunden hat, kann somit nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass das Fehlen des  $Ca_v1.2$  Proteins in diesem Hirnareal einen Einfluss auf die beiden Verhaltenstests hatte. Die erheblichen Unterschiede zwischen den Kontroll- und Knockouttieren wurden allerdings in Tests ermittelt, die dafür optimiert wurden, Defekte im hippokampalen Lernverhalten aufzudecken, wie z. B. dem gut etablierten Wasserlabyrinth Test (Morris et al., 1986b; Arns et al., 1999). Bei den durchgeführten Kontrollversuchen (*open field*, Rotarod und *distal landmark* Test), die zumindest teilweise von einer normalen Funktion des Cortex abhängen, erreichten beide Versuchstiergruppen vergleichbare Ergebnisse. Somit konnten in den  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Mäusen erhebliche Defizite im Hippokampus-abhängigen räumlichen Lernen in zwei unabhängigen Verhaltensversuchen festgestellt werden.

#### 4.1.3 NMDAR-unabhängige Langzeitpotenzierung im Hippokampus der $Ca_v1.2^{HCKO}$ Tiere

Da von einer Reihe von Arbeitsgruppen (Grover and Teyler, 1990; Aniksztejn and Ben-Ari, 1991; Impey et al., 1996; Grover, 1998; Borroni et al., 2000; Rampon and Tsien, 2000; Woodside et al., 2004) gezeigt werden konnte, dass die hippokampale synaptische Plastizität und die damit verknüpften Gedächtnisprozesse nicht nur über NMDAR-abhängige Signalkaskaden vermittelt werden, sondern auch auf eine  $Ca_v1.x$  Kanal-abhängige, NMDAR-unabhängige Weise erfolgen können, wurden verschiedene LTP auslösende Protokolle in den  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Mäusen untersucht.

Mit einem Stimulationsprotokoll, das eine NMDAR-abhängige LTP in den CA1 Pyramidenzellen hervorrufen sollte, konnte sowohl in den Kontroll- als auch in den Knockouttieren eine robuste LTP-Induktion beobachtet werden (Bliss and Collingridge, 1993; Kleppisch et al., 1999) (Abbildung 3.11 c). Somit konnte davon ausgegangen werden, dass Defekte, die bei den anderen Formen der synaptischen Plastizität auftraten, selektiver Art waren. Wurden nun Protokolle eingesetzt, für die bereits bekannt war, dass sie NMDAR-unabhängige LTP auslösen, so wurden erhebliche Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen deutlich (Grover and Teyler, 1990; Aniksztejn and Ben-Ari, 1991; Morgan and Teyler, 1999). Besonders für die sogenannten *late phase* LTP (L-LTP) konnte gezeigt werden, dass  $Ca_v1.2$  Kanäle essentiell sind. Damit einher traten im Schaffer Kollateral/CA1 Weg der  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Tiere massive Defekte auf (Abbildung 3.12). Hinzu kommt, dass der Proteinbiosynthesehemmstoff Anisomycin die NMDAR-unabhängige LTP<sub>K</sub> 2 Stunden nach der Behandlung mit TEA bei den Kontrolltieren auf den Wert der Knockouts reduzierte. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass den  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Tieren die Proteinbiosynthese-abhängige L-LTP fehlt, die als essentiell für die Bildung von langandauernden Gedächtnisinhalten gilt (Kandel, 2001; Martin and Morris, 2002).

#### 4.1.4 Signaltransduktionskaskaden im Hippokampus der $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ Tiere

Dass die  $\text{Ca}_v1.x$  Kanäle nicht nur zur NMDAR-unabhängigen Langzeitpotenzierung einen wichtigen Beitrag leisten, sondern auch auf biochemischer Ebene eine relevante Rolle spielen, wurde ebenfalls in einigen Arbeiten postuliert. So konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der *extracellular signal-related protein kinase* (ERK)/ *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) -Signalkaskade und die darauf folgende Phosphorylierung des *cAMP response element binding proteins* (CREB) mit einer Aktivität der  $\text{Ca}_v1.x$  Kanäle assoziiert ist (Impey et al., 1998; Mermelstein et al., 2000; West et al., 2001; Wu et al., 2001). Auch Experimente an neuronalen Zellkulturen haben ergeben, dass ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom effektiv die ERK/MAPK-Signalkaskade aktivieren kann (Rosen et al., 1994; Dolmetsch et al., 2001; Hardingham et al., 2001). Daher wurde in hippokampalen Schnittpräparaten von Kontroll- und Knockouttieren die Aktivierung des ERK/MAPK-Signalweges unter den Bedingungen ausgelöst, unter denen sich auch eine robuste L-LTP induzieren ließ.

Die in Kontrollschnitten durch TEA-Cl ausgelöste Aktivierung (Phosphorylierung) und anschließende Translokation von ERK in den Zellkern war in den Schnitten von  $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$  Tieren erheblich beeinträchtigt (Abbildung 3.13). Da die Aktivierung der ERK/MAPK-Signalkaskade über verschiedene Mechanismen zur Gedächtnisbildung beitragen kann, wie z.B. zur Transkription von Genen, die mit Lernvorgängen assoziiert sind (Sweatt, 2004), wurde der bedeutende *downstream effector* der ERK/MAPK-Kaskade, CREB, untersucht. Dieser Transkriptionsfaktor ist an synaptischer Plastizität beteiligt und gilt als essentiell für verschiedene Formen der Gedächtnisbildung (Silva et al., 1998; Lonze and Ginty, 2002). Die CRE-abhängige Genexpression wiederum hängt entscheidend von der Phosphorylierung des CREB an der Aminosäure Serin133 (pCREB-Ser<sup>133</sup>) ab (Brindle and Montminy, 1992), die als zeitabhängiger Steuermechanismus fungiert, da nur ein anhaltendes phospho-CREB Ser<sup>133</sup> Signal ausreicht, um die CRE-abhängige Transkription zu aktivieren (Bito et al., 1996).

Es zeigte sich, dass nicht nur die Aktivierung der ERK-Signalkaskade in den Knockouttieren maßgeblich gestört war, sondern auch die anhaltende CREB-Phosphorylierung (Abbildung 3.13). Des Weiteren war die CRE-abhängige Transkription in Antwort auf synaptische Plastizität-induzierende Stimuli in den  $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$  Mäusen stark vermindert (Abbildung 3.14).

Diese Ergebnisse untermauern die Ansicht, dass  $\text{Ca}_v1.2$  L-Typ Kalziumkanal-vermittelter  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx speziell mit der Langzeitphosphorylierung von CREB und dem Auslösen der *de novo* Proteinbiosynthese über die ERK-Signaltransduktionskaskade assoziiert ist.

In hippokampalen Neuronen wird neben dem  $\text{Ca}_v1.2$  auch der  $\text{Ca}_v1.3$  L-Typ Kalziumkanal exprimiert (Hell et al., 1993; Obermair et al., 2004), der ebenfalls in der Lage ist, eine CREB-Phosphorylierung auszulösen (Zhang et al., 2005). Es wurde allerdings gezeigt, dass der  $\text{Ca}_v1.3$  nur bei geringen Stimulationsintensitäten eine Rolle im phospho-CREB-*signaling* spielt (Zhang et al., 2006).

Die kombinierte verhaltensbiologische, elektrophysiologische und biochemische Analyse der Hippokampus- und Cortex-spezifischen *CACNA1C* defizienten Mäuse lieferte deutliche Indizien dafür, dass die NMDAR-unabhängige synaptische Plastizität in der hippokampalen CA1 Region funktionell mit Hippokampus-abhängigem räumlichen Lernen verknüpft ist.

## 4.2 Circadiane Rhythmizität

### 4.2.1 Generierung der Gehirn-spezifischen *CACNA1C* defizienten Mäuse

Für die Generierung der Gehirn-spezifischen *CACNA1C*-defizienten Mäuse wurde die Nestin-Cre transgene Mauslinie verwendet (Tronche et al., 1999).

Vor der Untersuchung des Phänotyps der konditionalen Knockouttiere (KO-Nestin) wurde zu Beginn untersucht, in welchen Geweben und in welchen Mengen das  $Ca_v1.2$  Knockout Allel gebildet wurde und ob es zur Reduktion des  $Ca_v1.2$  Protein in den gewünschten Organen gekommen war.

Die Analysen der DNS aus den  $Ca_v1.2^{+/L2}$  Nestin-Cre<sup>+Cre</sup> Tieren zeigte, dass es in allen untersuchten Gehirnregionen, wie Cortex, Hippokampus, Cerebellum, SCN und Amygdala zu rekombinierter DNS kam (Abbildung 3.18). Auch auf mRNA Ebene konnte eine vollständige Rekombination in den untersuchten Genotypen ( $Ca_v1.2^{L1/L2}$  Nestin-Cre<sup>+Cre</sup>) beobachtet werden. Im Western Blot konnte ebenfalls kein  $Ca_v1.2$  Protein in den untersuchten Hirnarealen von KO-Nestin Mäusen detektiert werden (Abbildung 3.19). Somit kann davon ausgegangen werden, dass mit Hilfe der Nestin-Cre Rekombinase ein vollständiger Gehirn-spezifischer  $Ca_v1.2$  Knockout generiert werden konnte.

Da die Nestin-Cre-vermittelte Rekombination ungefähr am Tag E 9,5 des Embryonalstadiums einsetzt, wurden die Kontroll- und speziell die Knockouttiere auf entwicklungsbedingte Störungen hin untersucht. Sowohl die Nissl als auch die Golgi Cox Färbung (Abbildungen 3.15 und 3.16) zeigten keinerlei morphologische Veränderungen in den KO-Nestin Schnitten auf, woraus sich prinzipiell schließen lässt, dass die Gehirnentwicklung normal verlaufen konnte.

### 4.2.2 Circadiane Rhythmizität in KO-Nestin Tieren

Die innere Uhr des superchiasmatischen Nukleus (SCN) umfasst ein sehr dynamisches System von verschiedenen regulatorischen Mechanismen, die in unterschiedlicher Art und Weise auf Licht reagieren. Während der Dunkelphase kann die innere Uhr über eine Vielzahl von Stimuli, wie z.B. Glutamat oder Licht, neu eingestellt werden (*resetting*), wobei diese Stimuli während des Tages keine Effekte erzielen können (Gillette and Mitchell, 2002). In den frühen Stunden der Nacht kann Licht durch glutamaterge Aktivierung des retinohypothalamischen Traktes (RHT) einen *phase delay* induzieren, wohingegen während der fortgeschrittenen Nacht ein *phase advance* der circadianen Rhythmizität beobachtet werden kann.

Bevor nun die Rolle des  $Ca_v1.2$  Kalziumkanals in diesem circadianen System untersucht wurde, wurde zu Beginn die Expression des L-Typ Kanals im SCN genauer betrachtet. Es stellte sich heraus, dass der  $Ca_v1.2$  auf mRNA Ebene circadian exprimiert wird (Abbildung 3.21 c). Dieser Befund stimmt mit Arbeiten an Ratten überein, in denen gezeigt werden konnte, dass der L-Typ Kalziumkanal im SCN exprimiert wird und dass es dort zu circadianen Modulationen von L-Typ Strömen kommt (Colwell, 2000; Pennartz et al., 2002). Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass nur  $Ca_v1.x$  Kanäle neben den NMDARs über eine L-Typ Kalziumkanal-abhängige Signalkaskade eine wichtige Funktion beim *entrainment* der inneren Uhr spielen, indem sie über CREB an *mPer1* koppeln (Mermelstein et al., 2000; Akiyama et al., 2001). Daher wurden die Kontroll- und Knockout-Nestin Mäuse einem *Wheel Running* Test unterzogen, um eventuelle Defekte im circadianen Rhythmus

aufzudecken. Sowohl unter einem 12:12 h Licht/Dunkelzyklus als auch unter DD-Bedingungen zeigten die KO-Nestin Tiere einen normalen circadianen Rhythmus mit einer Periodenlänge, die mit der der Kontrollen vergleichbar war (Abbildung 3.22 a). Aus diesen Befunden kann gefolgert werden, dass der  $Ca_v1.2$  keine Rolle für die normale Funktion der inneren Uhr spielt. Die anschließenden Versuche ließen jedoch vermuten, dass der  $Ca_v1.2$  eine bedeutende Funktion im *resetting* Mechanismus der Uhr übernimmt. Ein Lichtpuls während der späten subjektiven Nacht an CT22 rief eine starke Phasenverschiebung bei den Kontrolltieren hervor, wohingegen dieser *phase advance* in den Knockouts deutlich geringer ausfiel (Abbildung 3.22 d). Der induzierte *phase delay* hingegen war in den KO-Nestin Mäusen unverändert (Abbildung 3.22 c). Somit scheint der  $Ca_v1.2$  L-Typ Kalziumkanal eine entscheidende Rolle in den Signalwegen zu spielen, die zu *phase advances* führen.

Um Zielgene zu ermitteln, die  $Ca_v1.2$  vermittelt aktiviert werden, wurden *in situ* Hybridisierungen durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Induktion des *clock*-Gens *mPer1* nach Gabe eines Lichtpulses an CT22 in KO-Nestin Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant verringert war (Abbildung 3.22 e, f). Die Licht-induzierte *mPer1*-Induktion an CT14 war jedoch in den Knockouts nicht betroffen (Abbildung 3.22 e). Dieser Befund stützt sich auf Ergebnisse mit *mPer1*-Knockoutmäusen, an denen gezeigt werden konnte, dass *mPer1* als Vermittler eines *phase advance* fungiert (Zylka et al., 1998).

Die Reduktion der *mPer1*-Induktion an CT22 in den KO-Nestin Tieren korreliert also mit der verminderten Fähigkeit, einen *phase advance* herbeizuführen.

Anhand dieser Ergebnisse konnte erstmals eine Funktion des L-Typ Kalziumkanals  $Ca_v1.2$  *in vivo* für das Licht-induzierte *resetting* der inneren Uhr im suprachiasmatischen Nucleus gezeigt werden. Anscheinend vermittelt der  $Ca_v1.2$  die Licht-Information, die ein SCN-Neuron an CT 22 erhalten hat, über die Aktivierung der *mPer1*-Genexpression.

## 4.3 Angst-Gedächtnis

### 4.3.1 Das Angst-Gedächtnis in KO-Nestin Tieren

Für die Untersuchung des Angstverhaltens und der damit gekoppelten Rolle des  $Ca_v1.2$  L-Typ Kalziumkanals wurden die unter 4.2.1 beschriebenen  $Ca_v1.2$  Nestin-Cre Mäuse verwendet, da es in dieser Mauslinie zu einer erfolgreichen Deletion des *CACNA1C* Gens in der Amygdala kam. Es trat sowohl auf DNS als auch RNS Ebene eine vollständige Rekombination im Mandelkern mit Hilfe der Nestin-Cre-Rekombinase auf (Abbildung 3.18 c, d). Im Western Blot war in den Knockouts ebenfalls kein  $Ca_v1.2$  Protein in diesem Kernbereich mehr zu detektieren (Abbildung 3.19 b).

Auch in Ratten konnte bereits gezeigt werden, dass der  $Ca_v1.2$  Kalziumkanal hauptsächlich im Soma und in Dendriten von pyramidalen Neuronen der lateralen Amygdala vorkommt (Pinard et al., 2005). Somit kann davon ausgegangen werden, dass es in der lateralen Amygdala der  $Ca_v1.2^{L1/L2}$  Nestin-Cre<sup>+/Cre</sup> Mäuse zu einem vollständigen Verlust von  $Ca_v1.2$  Kanälen gekommen ist.

Da die momentan erhältlichen L-Typ-Kalziumkanalblocker einige unerwünschte Effekte im Säugetier hervorrufen können, war es bislang sehr schwierig, die Bedeutung der L-Typ Kanäle für das Angst-Gedächtnis *in vivo* zu charakterisieren. Ein wesentlicher Punkt ist, dass alle L-Typ-Blocker die Funktionalität des kardiovaskulären Systems in gewissem Umfang beeinträchtigen, was letztendlich

erhebliche Auswirkungen auf das ZNS haben kann. In einigen Arbeiten wurde sogar gezeigt, dass durch eine pharmakologische Blockade von L-Typ Kanälen bestimmte Formen von Lernen über Änderungen des cerebralen Blutflusses verbessert werden können (Deyo et al., 1989; Deyo and Hittner, 1995). Im Gegensatz dazu zeigte eine Studie im Zusammenhang mit dem Amygdala-abhängigen Lernen und Gedächtnis, dass die Blockade von L-Typ Kalziumkanälen durch Pharmaka die Gedächtnisleistung deutlich vermindert (Bauer et al., 2002).

Um nun die Funktion des  $Ca_v1.2$  in der Amygdala und dem in diesem Hirnareal gebildeten Angst-Gedächtnis näher zu untersuchen, wurden verschiedene Ansätze miteinander kombiniert. Im Hinblick auf die erwähnten Nachteile der L-Typ-Blocker wurde zunächst das genetische Mausmodell für das konditionierte Angstverhalten herangezogen. Nach einer klassischen Konditionierung wurden die Kontroll- und Knockoutmäuse auf ihr Angstverhalten hin untersucht. Es zeigte sich, dass die Knockouttiere am Tag 1 nach der Konditionierung eine deutlich reduzierte Angstantwort auf die Gabe des *conditioned stimulus* im Vergleich zu den Kontrollen aufwiesen (Abbildung 3.23). Der Effekt war am Tag 7 verschwunden. Abgesehen von der noch geringen Versuchstierzahl, lässt sich aus diesem Ergebnis folgern, dass der  $Ca_v1.2$  Kalziumkanal eine Rolle für die Akquisition des Gedächtnisses zu spielen scheint. Da jedoch in einer Vielzahl von Arbeiten postuliert wurde, dass vor allem die NMDA-Rezeptoren für die Akquisition des Angst-Gedächtnisses verantwortlich sein sollen, wurde im Folgenden ein pharmakologischer Ansatz für die detaillierte Aufschlüsselung der für die Akquisition bzw. Konsolidierung wichtigen Komponenten gewählt (Fanselow and Kim, 1994; Fanselow et al., 1994; Lee and Kim, 1998). Hierfür wurde für die Blockade der L-Typ Kalziumkanäle das DHP Isradipin verwendet und für die Blockade der NMDARs der spezifische NR2B-Blocker Ifenprodil. Aufgrund der Schädelanatomie der Maus konnte im Gegensatz zu den zahlreichen Studien an Ratten keine direkte Applikation der verwendeten Pharmaka in die Amygdala (intraamygdalär) erfolgen, sondern es wurde in diesem Fall eine intracerebroventrikuläre Injektion bevorzugt. Die Gabe des L-Typ-Blockers Isradipin vor der Konditionierung verringerte die *freezing* Antwort in einer Dosis-abhängigen Weise an Tag 1 und zeigte an Tag 7 keine Effekte mehr (Abbildung 3.24 a, b). Dieser Befund unterstützt die Daten aus dem genetischen Ansatz. Doch auch mit der Applikation des NR2B-Blockers Ifenprodil ließ sich ein verringertes Angstverhalten an Tag 1 in einer Dosis-abhängigen Weise erzielen (Abbildung 3.24 c). Im Gegensatz zu Isradipin konnte mit Ifenprodil jedoch auch ein Effekt auf das *freezing* der Tiere an Tag 7 beobachtet werden. Auch in Ratten wurde bereits durch die intraamygdaläre Injektion von Ifenprodil ein Effekt sowohl auf das Kurzzeit- als auch Langzeitgedächtnis beschrieben (Rodrigues et al., 2001). Somit scheinen für die Akquisition des Angst-Gedächtnisses in der Amygdala sowohl der  $Ca_v1.2$  L-Typ Kalziumkanal als auch der NMDA-Rezeptor eine entscheidende Rolle zu spielen.

Die Ausbildung der Akquisition im *conditioned fear* benötigt auf neuronaler Ebene das gleichzeitige Eintreffen des *conditioned* (CS) mit dem *unconditioned stimulus* (US) (LeDoux, 2000; Maren et al., 2001). Der CS löst die Ausschüttung von Glutamat aus, das an AMPARs ( $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-Isoxazol-Rezeptoren), NMDARs und metabotropen Glutamat-Rezeptoren (mGluRs) der Neuronen der lateralen Amygdala bindet. Durch das Eintreffen des US kommt es zur Depolarisation dieser Neuronen und Kalzium kann durch die NMDARs einströmen, an die Glutamat gebunden hat.

Die Erhöhung des intrazellulären Kalziums führt zur Aktivierung zahlreicher Proteinkinasen und *second messenger* Kaskaden, die für die Gedächtnisbildung essentiell sind. Neben den NMDARs sollen vor allem L-Typ Kalziumkanäle für die Akquisition eine bedeutende Rolle spielen (Weisskopf et al., 1999; Bauer et al., 2002; Shinnick-Gallagher et al., 2003). In einer Reihe von Verhaltensversuchen an Ratten konnte mit Hilfe von L-Typ Kalziumkanalantagonisten gezeigt werden, dass es zu einer Blockade des Angst-Gedächtnisses kommt, wenn der entsprechende Blocker vor der Konditionierung verabreicht wurde, der genaue Subtyp blieb dabei jedoch unbekannt (Bauer et al., 2002; Shinnick-Gallagher et al., 2003). Diese Befunde bekräftigen die Ergebnisse, die aus dem genetischen Ansatz und den pharmakologischen Studien mit dem L-Typ-Blocker Isradipin gewonnen werden konnten. Andererseits wurde durch die systemische Gabe von L-Typ Kalziumblockern an Mäusen gezeigt, dass nicht die Akquisition, sondern die Extinktion (Auslöschen des Gelernten) maßgeblich des Angst-Gedächtnisses betroffen ist (Cain et al., 2002; Cain et al., 2005). Es stellt sich allerdings die Frage, ob durch die systemische Gabe von L-Typ-Blockern überhaupt eine ausreichend hohe Konzentration an den Neuronen der lateralen Amygdala erreicht werden kann, auch wenn die verwendeten Substanzen die Blut-Hirn-Schranke passieren. Darüber hinaus ruft eine systemische Gabe von L-Typ Kalziumkanalblockern einen massiven Blutdruckabfall in Mäusen hervor (Moosmang et al., 2003), der sich auch auf das Verhalten der Tiere in einem Lernversuch auswirken kann.

Da die L-Typ Kalziumkanäle besonders bei starker Depolarisation geöffnet werden, die durch den US während der Ton-Schock-Paarung ausgelöst wird, können die Effekte der L-Typ Blockade als Defizit während des Trainings angesehen werden und unterstützen die Hypothese, dass die Funktion des  $Ca_v1.2$  bei der Akquisition benötigt wird (Abbildung 3.24).

NMDARs und L-Typ-Kalziumkanäle sind nicht nur bei der Ausbildung des *conditioned fear* beteiligt, sondern bilden auch die molekulare Grundlage für die Entstehung der Langzeitpotenzierung (LTP) in der Amygdala. Je nach Stimulationsprotokoll soll die LTP von NMDARs oder L-Typ Kanälen abhängig sein. So konnte in der Arbeit von Bauer (Bauer et al., 2002) mit einer 30 Hz Reizung des thalamischen Signalweges eine robuste LTP ausgelöst werden, die sensitiv auf eine L-Typ-Blockade (mit Verapamil) reagierte, jedoch unanfällig gegenüber einem NMDAR-Blocker (Ifenprodil) war. In weiterführenden Arbeiten konnte Herr Dipl. biol. C. Christel (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, TUM) mit diesem Stimulationsprotokoll zeigen, dass sowohl mit dem spezifischen L-Typ Kalziumkanalblocker Isradipin als auch mit dem NMDAR-Blocker Ifenprodil die induzierte LTP in der Amygdala deutlich reduziert wird.

Die Diskrepanz der NMDAR-Blocker-Wirkung ist vermutlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass in der Studie von Bauer et al. mit Ratten gearbeitet wurde und dadurch Spezies-abhängige Unterschieden auftreten können. Weiterhin ist Verapamil ein Molekül mit einer hohen Promiskuität, da es an zahlreiche Strukturmoleküle bindet. Dagegen ist Isradipin ein hochaffiner und spezifischer  $Ca_v1.2$  L-Typ Kalziumkanal-Blocker.

Zusammenfassend legen diese Ergebnisse den Schluss nahe, dass neben den NMDA-Rezeptoren der  $Ca_v1.2$  den entscheidenden L-Typ Kalziumkanal in den Neuronen der lateralen Amygdala darstellt, der sowohl für die Ausbildung der Akquisition des *conditioned fear* als auch für die Entstehung einer robusten Langzeitpotenzierung mit verantwortlich ist.

#### 4.4 Ausblick

Mit Hilfe der konditionalen  $Ca_v1.2$  Mausmutanten war es erstmals möglich, verschiedene physiologische Funktionen des  $Ca_v1.2$  L-Typ Kalziumkanals *in vivo* zu untersuchen.

Die Analyse der Cortex- und Hippokampus-spezifischen *CACNA1C* Mutanten hat ergeben, dass der  $Ca_v1.2$  eine bedeutende Rolle bei der NMDAR-unabhängigen synaptischen Plastizität in der hippokampalen CA1 Region spielt und eine wichtige Funktion beim Hippokampus-abhängigen räumlichen Lernen übernimmt. Auf biochemischer Ebene konnte gezeigt werden, dass der  $Ca_v1.2$ -vermittelte  $Ca^{2+}$ -Influx in der CA1 Region speziell mit der Langzeitphosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB und dem Auslösen der *de novo* Proteinbiosynthese über die MAPK/ERK-Signaltransduktionskaskade assoziiert ist.

Die herausragende Rolle der NMDARs bei der synaptischen Plastizität und der Gedächtnisbildung wurde über ihre einzigartige Eigenschaft erklärt: einen spannungsabhängigen Block durch  $Mg^{2+}$ , der es ihnen erlaubt, als Koinzidenzdetektoren nach Hebb zu fungieren (Bliss and Collingridge, 1993). Können  $Ca_v1.2$  Kanäle eine ähnliche Funktion erfüllen? Der  $Ca_v1.2$  Kanal-vermittelte dendritische  $Ca^{2+}$ -Einstrom soll durch eine starke Depolarisation zu Stande kommen, die durch sogenannte *backpropagating action potentials* (APs) ausgelöst wird (Spruston et al., 1995; Yuste and Denk, 1995; Magee and Johnston, 1997), die während der Induktion von NMDAR-unabhängiger LTP auftreten. In diesem Szenario würden die  $Ca_v1.2$  Kanäle das Aufsteigen von antidromischen APs in die distalen dendritischen Strukturen aktivitätsabhängig bestimmen (Magee and Johnston, 1997), und damit als Koinzidenzdetektoren dienen. Andererseits begünstigen die elektrophysiologischen Eigenschaften von  $Ca_v1.x$  Kanälen eher, dass der  $Ca^{2+}$ -Einstrom in Verbindung mit EPSPs (*excitatory postsynaptic potentials*) als mit APs erfolgt, was sich in einer deutlich stärkeren L-Typ Kalziumkanal-abhängigen CREB-Phosphorylierung als Antwort auf synaptische Aktivität zeigt (Mermelstein et al., 2000). Entsprechend dieser Befunde können  $Ca_v1.2$  Kanäle die synaptische Potenzierung unabhängig vom Feuern postsynaptischer Aktionspotentiale steigern, indem sie zu regenerativen lokalen dendritischen *spikes* beitragen (Golding et al., 2002). Weiterführende Studien wie zum Beispiel dendritisches  $Ca^{2+}$ -*imaging* bei  $Ca_v1.2^{HCKO}$  Tieren werden die genauen Mechanismen charakterisieren, wie  $Ca_v1.2$  als Koinzidenzdetektor nach Hebb fungieren kann.

Mit Hilfe der Gehirn-spezifischen *CACNA1C*-defizienten Mäuse konnte gezeigt werden, dass der  $Ca_v1.2$  L-Typ Kalziumkanal eine entscheidende Funktion bei der Feineinstellung der inneren Uhr über die Aktivierung der *mPer1*-Genexpression übernimmt. Dies konnte sowohl im Verhaltensexperiment als auch auf molekularer Ebene demonstriert werden. Da gezeigt wurde, dass die *mPer1*-Genexpression über die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB an Serin<sup>142</sup> induziert werden kann, sollte auch in den KO-Nestin Mäusen untersucht werden, ob die geringere *mPer1*-Expression an CT22 mit einer verminderten Phosphorylierung von CREB-Ser<sup>142</sup> einhergeht (Gau et al., 2002). Des Weiteren steht noch die Untersuchung der Kalziumströme im SCN der Ctr- und KO-Nestin Tiere aus, die zeigen soll, dass es in den Knockout-Neuronen zu einem Verlust des L-Typ Kalziumstromes gekommen ist.

Im Gehirn-spezifischen Knockout wurde neben der circadianen Rhythmizität das Angst-Gedächtnis in der Amygdala untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass der Kalziumstrom über den  $Ca_v1.2$  an der Ausbildung der Akquisition maßgeblich beteiligt ist und somit zu Lern- und Gedächtnisprozessen in der Amygdala beiträgt. Um diesen Befund zu bekräftigen, bedarf es weiterer pharmakologischer Versuche *in vivo*, in denen der L-Typ Kalziumkanalblocker Isradipin nach erfolgter Konditionierung verabreicht wird. Wenn der  $Ca_v1.2$  tatsächlich eine Rolle bei der Akquisition spielt, so sollte der Blocker keinerlei Effekte am Tag 1 mehr hervorrufen (Rodrigues et al., 2004). Besonders interessante Ergebnisse sollte die gemeinsame Applikation der beiden verwendeten Blocker (Isradipin + Ifenprodil) liefern, da es dadurch eventuell möglich werden würde aufzuklären, welcher Kanal für welche Phase der Angst-Gedächtnisbildung verantwortlich ist.

Sowohl in der vorgelegten Arbeit als auch in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass L-Typ Kalziumkanäle eine zentrale Rolle in der Regulation elektrischer und biochemischer Eigenschaften von Neuronen spielen. Einer der Wege über den z.B. der  $Ca_v1.2$  L-Typ Kanal an dieser Stelle eingreifen kann, ist über die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden, welche die Genexpression steuern. Dass jedoch nicht unbedingt die Kanalfunktion an sich ausschlaggebend sein muss, wurde von Gomez-Ospina und Mitarbeitern (Gomez-Ospina et al., 2006) eindrucksvoll gezeigt. In dieser Arbeit wurde postuliert, dass ein C-terminales Fragment des  $Ca_v1.2$  (*calcium channel associated transcription regulator*, CCAT) in den neuronalen Zellkern wandert und die Transkription von zahlreichen Genen steuert. Damit konnte erstmals die duale Funktion eines Kalziumkanals sowohl als Pore als auch als Transkriptionsfaktor belegt werden.

Darüber hinaus wurde erst kürzlich berichtet, dass ein einziger Aminosäure-Austausch (G406R) im  $Ca_v1.2$  Kanal zum Timothy-Syndrom führt, das sich durch Dysfunktion multipler Organe, kognitiver Störungen und Autismus auszeichnet (Splawski et al., 2004). Durch die Mutation kommt es zu einem fast vollständigen Verlust der Spannungs-abhängigen Inaktivierung des  $Ca_v1.2$  Kalziumkanals und als Folge dessen zu einer Kalziumüberladung in zahlreichen Zelltypen. Somit könnten Kalziumkanal-Antagonisten bei der Behandlung dieser und ähnlicher Störungen große Bedeutung erlangen.

Diese neuen Erkenntnisse zur Funktion des  $Ca_v1.2$  L-Typ Kalziumkanals auf neuronaler und pathophysiologischer Ebene demonstrieren eindrucksvoll, dass eine weitere, detaillierte Untersuchung der vorgestellten  $Ca_v1.2$  defizienten Mauslinien wohl in Zukunft noch einige wichtige, auch möglicherweise überraschende Funktionen der Kanäle in Physiologie und Pathologie offenbaren wird.

## 5 Zusammenfassung

Während der letzten Jahre konnten mit Hilfe des *gene targeting* eine Reihe von Tiermodellen für verschiedene spannungsabhängige Kalziumkanal-Gene etabliert werden (Muth et al., 2001; Moosmang et al., 2005a). Diese genetischen Modelle haben überraschende Einsichten in die physiologische Funktion der Kalziumkanäle geboten, und konnten darüber hinaus in einigen Fällen zur Erzeugung neuer pharmakologischer Konzepte führen.

Trotz dieser Möglichkeiten konnte bislang nur ein geringer Teil der biologischen Funktionen der L-Typ Kalziumkanal-abhängigen Signalwege aufgeklärt werden. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass für die L-Typ Kalziumkanäle die bekannten Beschränkungen des konventionellen *gene targeting* Ansatzes zutreffen: die funktionelle Redundanz der einzelnen Mitglieder der L-Typ Kalziumkanal Familie, die Induktion von kompensatorischen Prozessen und die embryonale Letalität durch den klassischen *CACNA1C* Knockout.

Ziel dieser Arbeit war es, konditionale Mausmodelle für den Ca<sub>v</sub>1.2 L-Typ Kalziumkanal zu generieren, die Ca<sub>v</sub>1.2 Expression in den Tieren zu analysieren und deren Phänotyp im Anschluss zu charakterisieren. Es wurden zwei konditional *CACNA1C*-defiziente Mausmutanten erzeugt:

- Cortex- und Hippokampus-spezifische *CACNA1C*-defiziente Mäuse (Ca<sub>v</sub>1.2<sup>HCKO</sup>)
- Gehirn-spezifische *CACNA1C*-defiziente Mäuse (KO-Nestin)

Der gegenwärtige Wissensstand über die molekularen Mechanismen der NMDA-Rezeptor (NMDAR)-unabhängigen Langzeitpotenzierung (LTP) im Hippokampus und ihre Funktion bei der Gedächtnisbildung im lebenden Tier ist begrenzt. Da angenommen wird, dass für die NMDAR-unabhängige LTP in der CA1 Region des Hippokampus die Aktivierung von postsynaptischen L-Typ Kalziumkanälen (Ca<sub>v</sub>1.x) nötig, jedoch die zu Grunde liegende Isoform unbekannt ist, konnte mit Hilfe der Ca<sub>v</sub>1.2<sup>HCKO</sup> Tiere die Klärung dieser Frage angegangen werden.

In diesem Tiermodell zeigte sich:

- ein selektiver Verlust der Proteinbiosynthese-abhängigen, NMDAR-unabhängigen L-LTP in der hippokampalen CA1 Region
- eine schwere Beeinträchtigung des Hippokampus-abhängigen räumlichen Gedächtnisses
- eine verringerte Aktivierung des MAPK-Signalweges sowie eine reduzierte CRE-abhängige Transkription in den Pyramidenzellen der CA1 Region

Diese Ergebnisse belegen die Funktion von L-Typ Kalziumkanal-abhängiger, NMDAR-unabhängiger hippokampaler L-LTP bei der Bildung des räumlichen Gedächtnisses in der lebenden Maus und sprechen für die MAPK/CREB-Signalkaskade als molekulare Schnittstelle zwischen dem Ca<sub>v</sub>1.2-vermittelten Kalziumeinstrom und synaptischer Plastizität und Lernen.

## Zusammenfassung

Mit Hilfe der Gehirn-spezifischen  $Ca_v1.2$  Mutanten konnten zwei weitere Kalzium-abhängige Systeme im lebenden Tier untersucht werden. Zum einen der circadiane Rhythmus im suprachiasmatischen Nucleus (SCN) und zum anderen das Angst-Gedächtnis in der Amygdala. In beiden Hirnarealen konnte eine bedeutende Funktion für den  $Ca_v1.2$  Kanal festgestellt werden:

- Im SCN übernimmt der  $Ca_v1.2$ -vermittelte Kalziumeinstrom *in vivo* eine wichtige Funktion für das Licht-induzierte *resetting* über die Aktivierung der *mPer1*-Genexpression
- In der Amygdala spielt der  $Ca_v1.2$  neben den NMDA-Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der Akquisition des Angst-Gedächtnisses und der Entstehung der Langzeitpotenzierung über den thalamischen Signalweg

Diese Ergebnisse belegen, dass der  $Ca_v1.2$  L-Typ Kalziumkanal an der Regulation wichtiger physiologischer Prozesse beteiligt ist. Die gezielte pharmakologische Beeinflussung der  $Ca_v1.2$  Aktivität könnte vielversprechende Ansätze zur Therapie zahlreicher Erkrankungen des zentralen Nervensystems bieten.

## 6 Tabellen

### 6.1 Für die Genotypisierung verwendete Oligonukleotide

Mauslinie	Primer	Detektiertes Allel	Größe des Amplifikats
Ca <sub>v</sub> 1.2	VI4+VI10	WT	415 bp
	VI4+VI10	L2	500 bp
	VI8+VI10	L1	281 bp
CRE-LacZ	LacZ3+LacZ4	tg	650 bp
Nestin-Cre	TK140+TK142	tg	630 bp
NEX-Cre	NEX1+RF114	ki	400 bp
	NEX1+RF113	WT	640 bp

### 6.2 Verwendete Oligonukleotide

Primer	Gen	Sequenz in 5'-3'-Richtung
LacZ3	lacZ	ACCAGAAGCGGTGCCGAAAA
LacZ4	lacZ	CCCGTAGGTAGTCACGCAAC
NEX1	NEX-Cre f	GTA AATTAAGGTTAAAGAACCA
GAPDH f	GAPDH	CGGCAAATTC AACGGCACAGTCA
GAPDH r	GAPDH	GGTTTCTCCAGGCGGCACGTCA
RF113	NEX-Cre WT r	AGAATGTGGAGTAGGGTGAC
RF114	NEX-Cre ki r	CCGCATAACCAGTGAAACAG
TK140	Cre f	ATCCGAAAAGAAAACGTTGA
TK142	Cre r	ATCCAGGTTACGGATATAGT
VI4	CACNA1C	TGGCCCCTAAGCAATGA
VI8	CACNA1C	AGGGGTGTT CAGAGCAA
VI10	CACNA1C	CCCCAGCCAATAGAATGCCAA
VS9	CACNA1C	CTGAAACACAGTGAGGAGAGACT
VS18	CACNA1C	TCCTACTGAATGTGTTCTTGCCA

### 6.3 Verwendete Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Schnittstelle	Firma
<i>Asp718</i>	GGTACC	NEB
<i>Bam</i> HI	GGATCC	NEB
<i>Kpn</i> I	GGTACC	NEB
<i>Xba</i> I	TCTAGA	NEB
<i>Xho</i> I	CTCGAG	NEB

## 6.4 Verwendete primäre Antikörper

Primärer AK	Herkunft	Verdünnung	Referenz
β-Galaktosidase	polyklonal, Kaninchen	1:1000	Cappel
Ca <sub>v</sub> 1.2	polyklonal, Kaninchen	1:250	Institut für Pharmakologie, TUM
cGKI common	polyklonal, Kaninchen	1:1000	Keilbach et al., 1992
CREB	polyklonal, Kaninchen	1:1000	Upstate
p44/42 MAP Kinase (ERK1/ERK2)	polyklonal, Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
Phospho-p44/42 MAP Kinase	polyklonal, Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
Phospho-CREB	polyklonal, Kaninchen	1:1000	Upstate

## 6.5 Verwendete sekundäre Antikörper

Sekundärer AK	Verdünnung	Referenz
Cy3 Ziege Anti-Kaninchen IgG (H+L)	1:1000	Jackson Immunochemicals
Peroxidase-gekoppelter Ziege Anti-Kaninchen IgG (H+L)	1:50.000	Dianova

## 6.6 Verwendete Mauslinien

Mauslinie	Promotor		Expression der Cre-Rekombinase	Verwendung	Genetischer Hintergrund	Referenz
ACZL	CAG	tg		LacZ Rekombinationspromotor	gemischt	Akagi et al., 1997
CRE-lacZ	RSV	tg		CRE-vermittelte Expression	gemischt	Impey et al., 1996
Nestin-Cre	Nestin	tg	Gesamtes Gehirn	Gehirn-spezifischer CACNA1C Knockout	gemischt	Tronche et al., 1999
NEX-Cre	NEX	ki	Cortex, Hippokampus	Hippokampus-spezifischer CACNA1C Knockout	gemischt	Schwab et al., 2000

## 7 Abkürzungen

A	Adenin
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-Isoxazol
APS	Ammoniumpersulfat
APV	2-Amino-5-Phosphonovalerat
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumionen
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ca <sub>v</sub> 1.2	porenbildende Untereinheit des L-Typ Kalziumkanals
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGKI	cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I
CNG	<i>cyclic nucleotide gated</i>
cpm	<i>count per minute</i>
Cre	cyclization recombination
Ctrl	Kontrolle
D	Dalton
d	Tag
DAG	Diacylglycerol
ddNTP	2`,3`-Didesoxynukleosid-5`-triphosphat
DHP	Dihydropyridin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2`-Desoxynukleosid-5`-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N`,N`-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-N,N,N`,N`-tetraessigsäure
ES Zellen	embryonale Stammzellen
F	Farad
FCS	Fötales Rinderserum
lox	<i>loxP</i> -flankiert
G	Guanin
gefloxt	<i>loxP</i> -flankiert
h	Stunde
HVA	<i>high voltage activated</i>
ICV	intracerebroventrikulär
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat

## Anhang

kb	Kilobase
KO	Knockout
LB	Luria Bertani
<i>loxP</i>	<i>locus of cross over of P1</i>
LVA	<i>low voltage activated</i>
M	Mega ( $10^6$ ) bzw. molar
m	Milli ( $10^{-3}$ ) bzw. Meter
min	Minute(n)
ml	Milliliter
n	Nano ( $10^{-9}$ )
NMDA	N-Metyl-D-Aspartat
NMDAR	NMDA-Rezeptor
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
p	Piko ( $10^{-12}$ )
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Saline
p.c.	<i>post coitum</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
R	Rezeptor
RNase	RNS spaltendes Enzym
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBST	Tris-NaCl-Tween20 Puffer
TEA	Tetraethylammonium
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	$\alpha,\alpha,\alpha$ -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
$\mu$	Mikro ( $10^{-6}$ )
U	Unit, Einheit
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
x g	-fache Erdbeschleunigung

## 8 Literaturverzeichnis

- Adelsberger H, Tsien J, Konnerth A (2005) Superior learning abilities of NR2B transgenic mice in a new labyrinth task. In: Proceedings of the 6th Meeting of the German Neuroscience Society (Kriegstein K, ed).
- Aggleton JP, Kentridge RW, Sembi S (1992) Lesions of the fornix but not the amygdala impair the acquisition of concurrent discriminations by rats. *Behav Brain Res* 48:103-112.
- Akiyama M, Minami Y, Nakajima T, Moriya T, Shibata S (2001) Calcium and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induced expression of circadian clock gene *mPer1* in the mouse cerebellar granule cell culture. *J Neurochem* 78:499-508.
- Albrecht U (2004) The mammalian circadian clock: a network of gene expression. *Front Biosci* 9:48-55.
- Albrecht U, Foster RG (2002) Placing ocular mutants into a functional context: a chronobiological approach. *Methods* 28:465-477.
- Anderson MP, Mochizuki T, Xie J, Fischler W, Manger JP, Talley EM, Scammell TE, Tonegawa S (2005) Thalamic Cav3.1 T-type Ca<sup>2+</sup> channel plays a crucial role in stabilizing sleep. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1743-1748.
- Aniksztejn L, Ben-Ari Y (1991) Novel form of long-term potentiation produced by a K<sup>+</sup> channel blocker in the hippocampus. *Nature* 349:67-69.
- Araki K, Imaizumi T, Okuyama K, Oike Y, Yamamura K (1997) Efficiency of recombination by Cre transient expression in embryonic stem cells: comparison of various promoters. *J Biochem (Tokyo)* 122:977-982.
- Arns M, Sauvage M, Steckler T (1999) Excitotoxic hippocampal lesions disrupt allocentric spatial learning in mice: effects of strain and task demands. *Behav Brain Res* 106:151-164.
- Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD (1998) The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci* 1:602-609.
- Bauer EP, Schafe GE, LeDoux JE (2002) NMDA receptors and L-type voltage-gated calcium channels contribute to long-term potentiation and different components of fear memory formation in the lateral amygdala. *J Neurosci* 22:5239-5249.
- Bidaud I, Mezghrani A, Swayne LA, Monteil A, Lory P (2006) Voltage-gated calcium channels in genetic diseases. *Biochim Biophys Acta* 1763:1169-1174.
- Biel M, Ruth P, Bosse E, Hullin R, Stuhmer W, Flockerzi V, Hofmann F (1990) Primary structure and functional expression of a high voltage activated calcium channel from rabbit lung. *FEBS Lett* 269:409-412.
- Birnbaumer L, Campbell KP, Catterall WA, Harpold MM, Hofmann F, Horne WA, Mori Y, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, et al. (1994) The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 13:505-506.
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523.
- Bito H, Deisseroth K, Tsien RW (1996) CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca<sup>2+</sup>- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell* 87:1203-1214.
- Blair HT, Schafe GE, Bauer EP, Rodrigues SM, LeDoux JE (2001) Synaptic plasticity in the lateral amygdala: a cellular hypothesis of fear conditioning. *Learn Mem* 8:229-242.
- Bliss TV, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:331-356.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
- Bohn G, Moosmang S, Conrad H, Ludwig A, Hofmann F, Klugbauer N (2000) Expression of T- and L-type calcium channel mRNA in murine sinoatrial node. *FEBS Lett* 481:73-76.
- Borroni AM, Fichtenholtz H, Woodside BL, Teyler TJ (2000) Role of voltage-dependent calcium channel long-term potentiation (LTP) and NMDA LTP in spatial memory. *J Neurosci* 20:9272-9276.
- Bourtchuladze R, Fenguell B, Blendy J, Cioffi D, Schutz G, Silva AJ (1994) Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* 79:59-68.
- Brindle PK, Montminy MR (1992) The CREB family of transcription activators. *Curr Opin Genet Dev* 2:199-204.

- Brocard J, Warot X, Wendling O, Messaddeq N, Vonesch JL, Chambon P, Metzger D (1997) Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14559-14563.
- Cain CK, Blouin AM, Barad M (2002) L-type voltage-gated calcium channels are required for extinction, but not for acquisition or expression, of conditional fear in mice. *J Neurosci* 22:9113-9121.
- Cain CK, Godsil BP, Jami S, Barad M (2005) The L-type calcium channel blocker nifedipine impairs extinction, but not reduced contingency effects, in mice. *Learn Mem* 12:277-284.
- Capecchi MR (1994) Targeted gene replacement. *Sci Am* 270:52-59.
- Carbone E, Lux HD, Carabelli V, Aicardi G, Zucker H (1997) Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> permeability of high-threshold Ca<sup>2+</sup> channels and their voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> ions in chick sensory neurones. *J Physiol* 504 ( Pt 1):1-15.
- Carey M, Lisberger S (2002) Embarrassed, but not depressed: eye opening lessons for cerebellar learning. *Neuron* 35:223-226.
- Chapman PF, Kairiss EW, Keenan CL, Brown TH (1990) Long-term synaptic potentiation in the amygdala. *Synapse* 6:271-278.
- Chen C, Tonegawa S (1997) Molecular genetic analysis of synaptic plasticity, activity-dependent neural development, learning, and memory in the mammalian brain. *Annu Rev Neurosci* 20:157-184.
- Chen CC, Lamping KG, Nuno DW, Barresi R, Prouty SJ, Lavoie JL, Cribbs LL, England SK, Sigmund CD, Weiss RM, Williamson RA, Hill JA, Campbell KP (2003) Abnormal coronary function in mice deficient in alpha1H T-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Science* 302:1416-1418.
- Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18:5294-5299.
- Clark NC, Nagano N, Kuenzi FM, Jarolimek W, Huber I, Walter D, Wietzorrek G, Boyce S, Kullmann DM, Striessnig J, Seabrook GR (2003) Neurological phenotype and synaptic function in mice lacking the CaV1.3 alpha subunit of neuronal L-type voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuroscience* 120:435-442.
- Colwell CS (2000) Circadian modulation of calcium levels in cells in the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 12:571-576.
- Cribbs LL, Lee JH, Yang J, Satin J, Zhang Y, Daud A, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Perez-Reyes E (1998) Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca<sup>2+</sup> channel gene family. *Circ Res* 83:103-109.
- Dash PK, Hochner B, Kandel ER (1990) Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of Aplysia sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature* 345:718-721.
- Davare MA, Avdonin V, Hall DD, Peden EM, Burette A, Weinberg RJ, Horne MC, Hoshi T, Hell JW (2001) A beta2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca<sup>2+</sup> channel Cav1.2. *Science* 293:98-101.
- Davis LG, Dibner MD, Battley JF (1986) *Basic methods in molecular biology*. New York: Elsevier.
- Davis M (1992) The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu Rev Neurosci* 15:353-375.
- Davis M (1997) Neurobiology of fear responses: the role of the amygdala. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 9:382-402.
- Deisseroth K, Bito H, Tsien RW (1996) Signaling from synapse to nucleus: postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity. *Neuron* 16:89-101.
- Deisseroth K, Heist EK, Tsien RW (1998) Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature* 392:198-202.
- Deyo RA, Hittner JM (1995) Effects of the Ca<sup>2+</sup> channel antagonist flunarizine on visual discrimination learning. *Neurobiol Learn Mem* 64:10-16.
- Deyo RA, Straube KT, Disterhoft JF (1989) Nimodipine facilitates associative learning in aging rabbits. *Science* 243:809-811.
- Dolmetsch RE, Pajvani U, Fife K, Spotts JM, Greenberg ME (2001) Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science* 294:333-339.
- Dubel SJ, Starr TV, Hell J, Ahljianian MK, Enyeart JJ, Catterall WA, Snutch TP (1992) Molecular cloning of the alpha-1 subunit of an omega-conotoxin-sensitive calcium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5058-5062.
- English JD, Sweatt JD (1997) A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation. *J Biol Chem* 272:19103-19106.
- Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA (2000) Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25:533-535.

- Fanselow MS, Kim JJ (1994) Acquisition of contextual Pavlovian fear conditioning is blocked by application of an NMDA receptor antagonist D,L-2-amino-5-phosphonovaleric acid to the basolateral amygdala. *Behav Neurosci* 108:210-212.
- Fanselow MS, Kim JJ, Yipp J, De Oca B (1994) Differential effects of the N-methyl-D-aspartate antagonist DL-2-amino-5-phosphonovalerate on acquisition of fear of auditory and contextual cues. *Behav Neurosci* 108:235-240.
- Farb CR, LeDoux JE (1997) NMDA and AMPA receptors in the lateral nucleus of the amygdala are postsynaptic to auditory thalamic afferents. *Synapse* 27:106-121.
- Feil R, Brocard J, Mascres B, LeMeur M, Metzger D, Chambon P (1996) Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10887-10890.
- Fendt M, Fanselow MS (1999) The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev* 23:743-760.
- Frey U, Krug M, Reymann KG, Matthies H (1988) Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro. *Brain Res* 452:57-65.
- Garcia-Otin AL, Guillou F (2006) Mammalian genome targeting using site-specific recombinases. *Front Biosci* 11:1108-1136.
- Garrud P, Rawlins JN, Mackintosh NJ, Goodall G, Cotton MM, Feldon J (1984) Successful overshadowing and blocking in hippocampectomized rats. *Behav Brain Res* 12:39-53.
- Gau D, Lemberger T, von Gall C, Kretz O, Le Minh N, Gass P, Schmid W, Schibler U, Korf HW, Schutz G (2002) Phosphorylation of CREB Ser142 regulates light-induced phase shifts of the circadian clock. *Neuron* 34:245-253.
- Gillette MU, Mitchell JW (2002) Signaling in the suprachiasmatic nucleus: selectively responsive and integrative. *Cell Tissue Res* 309:99-107.
- Ginty DD, Kornhauser JM, Thompson MA, Bading H, Mayo KE, Takahashi JS, Greenberg ME (1993) Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. *Science* 260:238-241.
- Golding NL, Staff NP, Spruston N (2002) Dendritic spikes as a mechanism for cooperative long-term potentiation. *Nature* 418:326-331.
- Gomez-Ospina N, Tsuruta F, Barreto-Chang O, Hu L, Dolmetsch R (2006) The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel Ca(V)<sub>1.2</sub> encodes a transcription factor. *Cell* 127:591-606.
- Grover LM (1998) Evidence for postsynaptic induction and expression of NMDA receptor independent LTP. *J Neurophysiol* 79:1167-1182.
- Grover LM, Teyler TJ (1990) Two components of long-term potentiation induced by different patterns of afferent activation. *Nature* 347:477-479.
- Gu H, Zou YR, Rajewsky K (1993) Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* 73:1155-1164.
- Hanse E, Gustafsson B (1995) Long-term potentiation in the hippocampal CA1 region in the presence of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Neuroscience* 67:531-539.
- Hardingham GE, Arnold FJ, Bading H (2001) A calcium microdomain near NMDA receptors: on switch for ERK-dependent synapse-to-nucleus communication. *Nat Neurosci* 4:565-566.
- Hell JW, Westenbroek RE, Warner C, Ahljianian MK, Prystay W, Gilbert MM, Snutch TP, Catterall WA (1993) Identification and differential subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel alpha 1 subunits. *J Cell Biol* 123:949-962.
- Hetzenauer A, Sinnegger-Brauns MJ, Striessnig J, Singewald N (2006) Brain activation pattern induced by stimulation of L-type Ca<sup>2+</sup>-channels: contribution of Ca(V)<sub>1.3</sub> and Ca(V)<sub>1.2</sub> isoforms. *Neuroscience* 139:1005-1015.
- Hofmann F, Lacinova L, Klugbauer N (1999) Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 139:33-87.
- Hoogland TM, Saggau P (2004) Facilitation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in dendritic spines by activation of beta2 adrenergic receptors. *J Neurosci* 24:8416-8427.
- Huang YY, Malenka RC (1993) Examination of TEA-induced synaptic enhancement in area CA1 of the hippocampus: the role of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in the induction of LTP. *J Neurosci* 13:568-576.
- Huang YY, Kandel ER (1998) Postsynaptic induction and PKA-dependent expression of LTP in the lateral amygdala. *Neuron* 21:169-178.
- Impey S, Mark M, Villacres EC, Poser S, Chavkin C, Storm DR (1996) Induction of CRE-mediated gene expression by stimuli that generate long-lasting LTP in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 16:973-982.

- Impey S, Obrietan K, Wong ST, Poser S, Yano S, Wayman G, Deloulme JC, Chan G, Storm DR (1998) Cross talk between ERK and PKA is required for Ca<sup>2+</sup> stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron* 21:869-883.
- Jaenisch R (1988) Transgenic animals. *Science* 240:1468-1474.
- Jing X, Li DQ, Olofsson CS, Salehi A, Surve VV, Caballero J, Ivarsson R, Lundquist I, Pereverzev A, Schneider T, Rorsman P, Renstrom E (2005) CaV2.3 calcium channels control second-phase insulin release. *J Clin Invest* 115:146-154.
- Josselyn SA, Shi C, Carlezon WA, Jr., Neve RL, Nestler EJ, Davis M (2001) Long-term memory is facilitated by cAMP response element-binding protein overexpression in the amygdala. *J Neurosci* 21:2404-2412.
- Kandel ER (2001) The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294:1030-1038.
- Kapp BS, Frysinger RC, Gallagher M, Heselton JR (1979) Amygdala central nucleus lesions: effect on heart rate conditioning in the rabbit. *Physiol Behav* 23:1109-1117.
- Kleppisch T, Pfeifer A, Klatt P, Ruth P, Montkowski A, Fassler R, Hofmann F (1999) Long-term potentiation in the hippocampal CA1 region of mice lacking cGMP-dependent kinases is normal and susceptible to inhibition of nitric oxide synthase. *J Neurosci* 19:48-55.
- Kleppisch T, Wolfgruber W, Feil S, Allmann R, Wotjak CT, Goebbels S, Nave KA, Hofmann F, Feil R (2003) 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* 23:6005-6012.
- Koschak A, Reimer D, Huber I, Grabner M, Glossmann H, Engel J, Striessnig J (2001) alpha 1D (Cav1.3) subunits can form I-type Ca<sup>2+</sup> channels activating at negative voltages. *J Biol Chem* 276:22100-22106.
- Kovalchuk Y, Eilers J, Lisman J, Konnerth A (2000) NMDA receptor-mediated subthreshold Ca(2+) signals in spines of hippocampal neurons. *J Neurosci* 20:1791-1799.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lakso M, Sauer B, Mosinger B, Jr., Lee EJ, Manning RW, Yu SH, Mulder KL, Westphal H (1992) Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6232-6236.
- LeDoux J (1998) Fear and the brain: where have we been, and where are we going? *Biol Psychiatry* 44:1229-1238.
- LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23:155-184.
- LeDoux JE, Cicchetti P, Xagoraris A, Romanski LM (1990) The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J Neurosci* 10:1062-1069.
- Ledoux JE, Ruggiero DA, Forest R, Stornetta R, Reis DJ (1987) Topographic organization of convergent projections to the thalamus from the inferior colliculus and spinal cord in the rat. *J Comp Neurol* 264:123-146.
- Lee H, Kim JJ (1998) Amygdalar NMDA receptors are critical for new fear learning in previously fear-conditioned rats. *J Neurosci* 18:8444-8454.
- Lee JH, Daud AN, Cribbs LL, Lacerda AE, Pereverzev A, Klockner U, Schneider T, Perez-Reyes E (1999) Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J Neurosci* 19:1912-1921.
- Li XF, Phillips R, LeDoux JE (1995) NMDA and non-NMDA receptors contribute to synaptic transmission between the medial geniculate body and the lateral nucleus of the amygdala. *Exp Brain Res* 105:87-100.
- Li XF, Stutzmann GE, LeDoux JE (1996) Convergent but temporally separated inputs to lateral amygdala neurons from the auditory thalamus and auditory cortex use different postsynaptic receptors: in vivo intracellular and extracellular recordings in fear conditioning pathways. *Learn Mem* 3:229-242.
- Liao Y, Asakura M, Takashima S, Ogai A, Asano Y, Asanuma H, Minamino T, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M (2005) Benidipine, a long-acting calcium channel blocker, inhibits cardiac remodeling in pressure-overloaded mice. *Cardiovasc Res* 65:879-888.
- Lonze BE, Ginty DD (2002) Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35:605-623.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Ludwig A, Flockerzi V, Hofmann F (1997) Regional expression and cellular localization of the alpha1 and beta subunit of high voltage-activated calcium channels in rat brain. *J Neurosci* 17:1339-1349.

- Magee JC, Johnston D (1995) Synaptic activation of voltage-gated channels in the dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Science* 268:301-304.
- Magee JC, Johnston D (1997) A synaptically controlled, associative signal for Hebbian plasticity in hippocampal neurons. *Science* 275:209-213.
- Magee JC, Avery RB, Christie BR, Johnston D (1996) Dihydropyridine-sensitive, voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels contribute to the resting intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 76:3460-3470.
- Mangoni ME, Traboulsie A, Leoni AL, Couette B, Marger L, Le Quang K, Kupfer E, Cohen-Solal A, Vilar J, Shin HS, Escande D, Charpentier F, Nargeot J, Lory P (2006) Bradycardia and slowing of the atrioventricular conduction in mice lacking Ca<sub>v</sub>3.1/α1G T-type calcium channels. *Circ Res* 98:1422-1430.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Maren S (1996) Synaptic transmission and plasticity in the amygdala. An emerging physiology of fear conditioning circuits. *Mol Neurobiol* 13:1-22.
- Maren S, Yap SA, Goosens KA (2001) The amygdala is essential for the development of neuronal plasticity in the medial geniculate nucleus during auditory fear conditioning in rats. *J Neurosci* 21:RC135.
- Markwardt F, Nilius B (1988) Modulation of calcium channel currents in guinea-pig single ventricular heart cells by the dihydropyridine Bay K 8644. *J Physiol* 399:559-575.
- Martin SJ, Morris RG (2002) New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus* 12:609-636.
- McCormick DA (2005) Neuronal networks: flip-flops in the brain. *Curr Biol* 15:R294-296.
- McHugh TJ, Blum KI, Tsien JZ, Tonegawa S, Wilson MA (1996) Impaired hippocampal representation of space in CA1-specific NMDAR1 knockout mice. *Cell* 87:1339-1349.
- Meinkoth J, Alberts AS, Feramisco JR (1990) Construction of mammalian cell lines with indicator genes driven by regulated promoters. *Ciba Found Symp* 150:47-51; discussion 51-46.
- Mermelstein PG, Bito H, Deisseroth K, Tsien RW (2000) Critical dependence of cAMP response element-binding protein phosphorylation on L-type calcium channels supports a selective response to EPSPs in preference to action potentials. *J Neurosci* 20:266-273.
- Mikami A, Imoto K, Tanabe T, Niidome T, Mori Y, Takeshima H, Narumiya S, Numa S (1989) Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* 340:230-233.
- Mishkin M, Appenzeller T (1987) The anatomy of memory. *Sci Am* 256:80-89.
- Moosmang S, Lenhardt P, Haider N, Hofmann F, Wegener JW (2005a) Mouse models to study L-type calcium channel function. *Pharmacol Ther* 106:347-355.
- Moosmang S, Schulla V, Welling A, Feil R, Feil S, Wegener JW, Hofmann F, Klugbauer N (2003) Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. *Embo J* 22:6027-6034.
- Moosmang S, Haider N, Klugbauer N, Adelsberger H, Langwieser N, Muller J, Stiess M, Marais E, Schulla V, Lacinova L, Goebbels S, Nave KA, Storm DR, Hofmann F, Kleppisch T (2005b) Role of hippocampal Cav1.2 Ca<sup>2+</sup> channels in NMDA receptor-independent synaptic plasticity and spatial memory. *J Neurosci* 25:9883-9892.
- Morad M, Soldatov N (2005) Calcium channel inactivation: possible role in signal transduction and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Cell Calcium* 38:223-231.
- Morgan SL, Teyler TJ (1999) VDCCs and NMDARs underlie two forms of LTP in CA1 hippocampus in vivo. *J Neurophysiol* 82:736-740.
- Mori Y, Friedrich T, Kim MS, Mikami A, Nakai J, Ruth P, Bosse E, Hofmann F, Flockerzi V, Furuichi T, et al. (1991) Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature* 350:398-402.
- Morris RG, Hagan JJ, Rawlins JN (1986a) Allocentric spatial learning by hippocampectomised rats: a further test of the "spatial mapping" and "working memory" theories of hippocampal function. *Q J Exp Psychol B* 38:365-395.
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297:681-683.
- Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M (1986b) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319:774-776.
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350.

- Murphy TH, Worley PF, Nakabeppu Y, Christy B, Gastel J, Baraban JM (1991) Synaptic regulation of immediate early gene expression in primary cultures of cortical neurons. *J Neurochem* 57:1862-1872.
- Muth JN, Varadi G, Schwartz A (2001) Use of transgenic mice to study voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. *Trends Pharmacol Sci* 22:526-532.
- Nagy A (2000) Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26:99-109.
- Nahm SS, Farnell YZ, Griffith W, Earnest DJ (2005) Circadian regulation and function of voltage-dependent calcium channels in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci* 25:9304-9308.
- Naylor MJ, Rancourt DE, Bech-Hansen NT (2000) Isolation and characterization of a calcium channel gene, *Cacna1f*, the murine orthologue of the gene for incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Genomics* 66:324-327.
- Niidome T, Kim MS, Friedrich T, Mori Y (1992) Molecular cloning and characterization of a novel calcium channel from rabbit brain. *FEBS Lett* 308:7-13.
- Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW (1985) Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316:440-443.
- Obermair GJ, Szabo Z, Bourinet E, Flucher BE (2004) Differential targeting of the L-type Ca<sup>2+</sup> channel alpha 1C (CaV1.2) to synaptic and extrasynaptic compartments in hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 19:2109-2122.
- Orban PC, Chui D, Marth JD (1992) Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6861-6865.
- Pavlov IP, Anrep GV (1927) Conditioned reflexes; an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. [London]: Oxford University Press: Humphrey Milford.
- Pennartz CM, de Jeu MT, Bos NP, Schaap J, Geurtsen AM (2002) Diurnal modulation of pacemaker potentials and calcium current in the mammalian circadian clock. *Nature* 416:286-290.
- Perez-Reyes E (1998) Molecular characterization of a novel family of low voltage-activated, T-type, calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 30:313-318.
- Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, Lacerda AE, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Lee JH (1998) Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* 391:896-900.
- Pinard CR, Mascagni F, McDonald AJ (2005) Neuronal localization of Ca(v)1.2 L-type calcium channels in the rat basolateral amygdala. *Brain Res* 1064:52-55.
- Pittenger C, Huang YY, Paletzki RF, Bourtchouladze R, Scanlin H, Vronskaya S, Kandel ER (2002) Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus-dependent spatial memory. *Neuron* 34:447-462.
- Platzer J, Engel J, Schrott-Fischer A, Stephan K, Bova S, Chen H, Zheng H, Striessnig J (2000) Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Cell* 102:89-97.
- Quirk GJ, Repa C, LeDoux JE (1995) Fear conditioning enhances short-latency auditory responses of lateral amygdala neurons: parallel recordings in the freely behaving rat. *Neuron* 15:1029-1039.
- Quirk GJ, Armony JL, LeDoux JE (1997) Fear conditioning enhances different temporal components of tone-evoked spike trains in auditory cortex and lateral amygdala. *Neuron* 19:613-624.
- Rajewsky K, Gu H, Kuhn R, Betz UA, Muller W, Roes J, Schwenk F (1996) Conditional gene targeting. *J Clin Invest* 98:600-603.
- Rampon C, Tsien JZ (2000) Genetic analysis of learning behavior-induced structural plasticity. *Hippocampus* 10:605-609.
- Reppert SM, Weaver DR (2001) Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol* 63:647-676.
- Reppert SM, Weaver DR (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418:935-941.
- Rodrigues SM, Schafe GE, LeDoux JE (2001) Intra-amygdala blockade of the NR2B subunit of the NMDA receptor disrupts the acquisition but not the expression of fear conditioning. *J Neurosci* 21:6889-6896.
- Rodrigues SM, Schafe GE, LeDoux JE (2004) Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala. *Neuron* 44:75-91.
- Romanski LM, LeDoux JE (1992) Equipotentiality of thalamo-amygdala and thalamo-cortico-amygdala circuits in auditory fear conditioning. *J Neurosci* 12:4501-4509.
- Romanski LM, LeDoux JE (1993) Information cascade from primary auditory cortex to the amygdala: corticocortical and corticoamygdaloid projections of temporal cortex in the rat. *Cereb Cortex* 3:515-532.
- Romanski LM, Clugnet MC, Bordi F, LeDoux JE (1993) Somatosensory and auditory convergence in the lateral nucleus of the amygdala. *Behav Neurosci* 107:444-450.
- Rosen LB, Ginty DD, Weber MJ, Greenberg ME (1994) Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras. *Neuron* 12:1207-1221.

- Sabatini BL, Svoboda K (2000) Analysis of calcium channels in single spines using optical fluctuation analysis. *Nature* 408:589-593.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1992) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985. *Biotechnology* 24:476-480.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1992) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* 24:104-108.
- Schafe GE, LeDoux JE (2000) Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. *J Neurosci* 20:RC96.
- Schafe GE, Atkins CM, Swank MW, Bauer EP, Sweatt JD, LeDoux JE (2000) Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning. *J Neurosci* 20:8177-8187.
- Schwab MH, Bartholomae A, Heimrich B, Feldmeyer D, Druffel-Augustin S, Goebbels S, Naya FJ, Zhao S, Frotscher M, Tsai MJ, Nave KA (2000) Neuronal basic helix-loop-helix proteins (NEX and BETA2/Neuro D) regulate terminal granule cell differentiation in the hippocampus. *J Neurosci* 20:3714-3724.
- Seino S, Chen L, Seino M, Blondel O, Takeda J, Johnson JH, Bell GI (1992) Cloning of the alpha 1 subunit of a voltage-dependent calcium channel expressed in pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:584-588.
- Seisenberger C, Specht V, Welling A, Platzer J, Pfeifer A, Kuhbandner S, Striessnig J, Klugbauer N, Feil R, Hofmann F (2000) Functional embryonic cardiomyocytes after disruption of the L-type alpha1C (Cav1.2) calcium channel gene in the mouse. *J Biol Chem* 275:39193-39199.
- Shaywitz AJ, Greenberg ME (1999) CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 68:821-861.
- Shin JB, Martinez-Salgado C, Heppenstall PA, Lewin GR (2003) A T-type calcium channel required for normal function of a mammalian mechanoreceptor. *Nat Neurosci* 6:724-730.
- Shinnick-Gallagher P, McKernan MG, Xie J, Zinebi F (2003) L-type voltage-gated calcium channels are involved in the in vivo and in vitro expression of fear conditioning. *Ann N Y Acad Sci* 985:135-149.
- Sholl DA (1955) The organization of the visual cortex in the cat. *J Anat* 89:33-46.
- Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S (1998) CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* 21:127-148.
- Sinnesger-Brauns MJ, Hetzenauer A, Huber IG, 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 JJ (2004) Isoform-specific regulation of mood behavior and pancreatic beta cell and cardiovascular function by L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Clin Invest* 113:1430-1439.
- Snutch TP, Tomlinson WJ, Leonard JP, Gilbert MM (1991) Distinct calcium channels are generated by alternative splicing and are differentially expressed in the mammalian CNS. *Neuron* 7:45-57.
- Soldatov NM (1994) Genomic structure of human L-type Ca<sup>2+</sup> channel. *Genomics* 22:77-87.
- Splawski I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R, Napolitano C, Schwartz PJ, Joseph RM, Condouris K, Tager-Flusberg H, Priori SG, Sanguinetti MC, Keating MT (2004) Ca(V)<sub>1.2</sub> calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* 119:19-31.
- Spruston N, Schiller Y, Stuart G, Sakmann B (1995) Activity-dependent action potential invasion and calcium influx into hippocampal CA1 dendrites. *Science* 268:297-300.
- Squire LR, Zola-Morgan S, Chen KS (1988) Human amnesia and animal models of amnesia: performance of amnesic patients on tests designed for the monkey. *Behav Neurosci* 102:210-221.
- Starr TV, Prystay W, Snutch TP (1991) Primary structure of a calcium channel that is highly expressed in the rat cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5621-5625.
- Steckler T, Weis C, Sauvage M, Mederer A, Holsboer F (1999) Disrupted allocentric but preserved egocentric spatial learning in transgenic mice with impaired glucocorticoid receptor function. *Behav Brain Res* 100:77-89.
- Striessnig J (1999) Pharmacology, structure and function of cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Cell Physiol Biochem* 9:242-269.
- Strom TM, Nyakatura G, Apfelstedt-Sylla E, Hellebrand H, Lorenz B, Weber BH, Wutz K, Gutwillinger N, Ruther K, Drescher B, Sauer C, Zrenner E, Meitinger T, Rosenthal A, Meindl A (1998) An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet* 19:260-263.
- Sweatt JD (2004) Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* 14:311-317.

- Takimoto K, Li D, Nerbonne JM, Levitan ES (1997) Distribution, splicing and glucocorticoid-induced expression of cardiac alpha 1C and alpha 1D voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel mRNAs. *J Mol Cell Cardiol* 29:3035-3042.
- Tanabe T, Beam KG, Powell JA, Numa S (1988) Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. *Nature* 336:134-139.
- Tanabe T, Takeshima H, Mikami A, Flockerzi V, Takahashi H, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Hirose T, Numa S (1987) Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328:313-318.
- Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA, Zhuo M, Liu G, Tsien JZ (1999) Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401:63-69.
- Thomas GM, Huganir RL (2004) MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5:173-183.
- Tottene A, Fellin T, Pagnutti S, Luvisetto S, Striessnig J, Fletcher C, Pietrobon D (2002) Familial hemiplegic migraine mutations increase Ca<sup>2+</sup> influx through single human CaV2.1 channels and decrease maximal CaV2.1 current density in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13284-13289.
- Trommald M, Jensen V, Andersen P (1995) Analysis of dendritic spines in rat CA1 pyramidal cells intracellularly filled with a fluorescent dye. *J Comp Neurol* 353:260-274.
- Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, Bock R, Klein R, Schutz G (1999) Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet* 23:99-103.
- Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S (1996) The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87:1327-1338.
- Tsien RW, Ellinor PT, Horne WA (1991) Molecular diversity of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. *Trends Pharmacol Sci* 12:349-354.
- Weisskopf MG, Bauer EP, LeDoux JE (1999) L-type voltage-gated calcium channels mediate NMDA-independent associative long-term potentiation at thalamic input synapses to the amygdala. *J Neurosci* 19:10512-10519.
- Welling A, Ludwig A, Zimmer S, Klugbauer N, Flockerzi V, Hofmann F (1997) Alternatively spliced IS6 segments of the alpha 1C gene determine the tissue-specific dihydropyridine sensitivity of cardiac and vascular smooth muscle L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Circ Res* 81:526-532.
- West AE, Chen WG, Dalva MB, Dolmetsch RE, Kornhauser JM, Shaywitz AJ, Takasu MA, Tao X, Greenberg ME (2001) Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11024-11031.
- Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF (2006) Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313:1093-1097.
- Williams AJ (1992) Ion conduction and discrimination in the sarcoplasmic reticulum ryanodine receptor/calcium-release channel. *J Muscle Res Cell Motil* 13:7-26.
- Wong RO, Ghosh A (2002) Activity-dependent regulation of dendritic growth and patterning. *Nat Rev Neurosci* 3:803-812.
- Wood ER, Dudchenko PA, Eichenbaum H (1999) The global record of memory in hippocampal neuronal activity. *Nature* 397:613-616.
- Woodside BL, Borroni AM, Hammonds MD, Teyler TJ (2004) 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.
- Wu GY, Deisseroth K, Tsien RW (2001) 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* 98:2808-2813.
- Yaari Y, Hamon B, Lux HD (1987) Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons. *Science* 235:680-682.
- Yaney GC, Wheeler MB, Wei X, Perez-Reyes E, Birnbaumer L, Boyd AE, 3rd, Moss LG (1992) Cloning of a novel alpha 1-subunit of the voltage-dependent calcium channel from the beta-cell. *Mol Endocrinol* 6:2143-2152.
- Yasuda R, Sabatini BL, Svoboda K (2003) Plasticity of calcium channels in dendritic spines. *Nat Neurosci* 6:948-955.
- Yu FH, Catterall WA (2004) The VGL-kanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci STKE* 2004:re15.
- Yuste R, Denk W (1995) Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature* 375:682-684.
- Zakharenko SS, Zablow L, Siegelbaum SA (2001) Visualization of changes in presynaptic function during long-term synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 4:711-717.

- Zakharenko SS, Patterson SL, Dragatsis I, Zeitlin SO, Siegelbaum SA, Kandel ER, Morozov A (2003) Presynaptic BDNF required for a presynaptic but not postsynaptic component of LTP at hippocampal CA1-CA3 synapses. *Neuron* 39:975-990.
- Zhang H, Fu Y, Altier C, Platzer J, Surmeier DJ, Bezprozvanny I (2006) Ca<sub>v</sub>1.2 and Ca<sub>v</sub>1.3 neuronal L-type calcium channels: differential targeting and signaling to pCREB. *Eur J Neurosci* 23:2297-2310.
- Zhang H, Maximov A, Fu Y, Xu F, Tang TS, Tkatch T, Surmeier DJ, Bezprozvanny I (2005) Association of Ca<sub>v</sub>1.3 L-type calcium channels with Shank. *J Neurosci* 25:1037-1049.
- Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG (1986) Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci* 6:2950-2967.
- Zola-Morgan S, Squire LR, Clower RP, Rempel NL (1993) Damage to the perirhinal cortex exacerbates memory impairment following lesions to the hippocampal formation. *J Neurosci* 13:251-265.
- Zylka MJ, Shearman LP, Weaver DR, Reppert SM (1998) Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* 20:1103-1110.

**Eigene Veröffentlichungen:**

Originalarbeiten:

Moosmang S, Lenhardt P, Haider N, Hofmann F, Wegener JW (2005a) Mouse models to study L-type calcium channel function. *Pharmacol Ther* 106:347-355.

Moosmang S, Haider N, Klugbauer N, Adelsberger H, Langwieser N, Muller J, Stiess M, Marais E, Schulla V, Lacinova L, Goebbels S, Nave KA, Storm DR, Hofmann F, Kleppisch T (2005b) Role of hippocampal Cav1.2 Ca<sup>2+</sup> channels in NMDA receptor-independent synaptic plasticity and spatial memory. *J Neurosci* 25:9883-9892.

Moosmang S, Haider N, Bruderl B, Welling A, Hofmann F (2006) Antihypertensive effects of the putative t-type calcium channel antagonist mibefradil are mediated by the L-type calcium channel Cav1.2. *Circ Res* 98: 105-10.

Fuhrmann M, Bittner T, Mitteregger G, Haider N, Moosmang S, Kretzschmar H, Herms J (2006) Loss of the cellular prion protein affects the Ca<sup>2+</sup> homeostasis in hippocampal CA 1 neurons. *J Neurochem* 6: 1876-85.

Abstracts:

Moosmang S, Haider N, Brüderl B, Welling A, Hofmann F (2005) Antihypertensive effects of the putative t-type calcium channel antagonist mibefradil are mediated by the L-type calcium channel Cav1.2. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 371, 232.

Haider N, Hofmann F, Kleppisch T, Moosmang S (2005) The essential role of NMDA receptor-independent synaptic plasticity in learning and memory. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 371, 237.

Haider N, Wotjak C, Hofmann F, Moosmang S (2006) L-type voltage gated calcium channels contribute to fear memory formation in the lateral amygdala. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 372, 201.

Lacinova L, Moosmang S, Haider N, Hofmann F, Kleppisch T (2006) Bursting pattern of hippocampal CA1 pyramidal cells is modified by activity of the Cav1.2 calcium channel. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 372, 216.



## Danksagung

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

Bei Herrn Prof. Dr. Wurst möchte ich mich für die offizielle und unkomplizierte Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Sven Moosmang für seine fachliche Unterstützung, sein großes Engagement beim Fortgang der Arbeit und die freundschaftliche Unterstützung in jeder Lebenslage. Vielen Dank für Alles, Sven!

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas Kleppisch möchte ich mich für das große Engagement bei der Erhebung der elektrophysiologischen Daten bedanken!

Herrn Dr. Carsten Wotjak möchte ich für die tatkräftige Unterstützung und die hilfreichen Tipps bei jeglichen Verhaltensversuchen sehr herzlich danken! Ein großer Dank geht dabei auch an Frau Anja Mederer für ihre Hilfe bei den ICV-Versuchen.

Mein spezieller Dank gilt Frau Angelika Baumgartner und Frau Susanne Paporisto für ihre unerschütterliche Hilfe und Unterstützung bei sämtlichen Laboraufgaben und Auswertungen.

Steffi, Toni, Peter, Carl (lieben Dank für so manches Verhaltensexperiment!), Georg, Astrid, Dominik, Juliane und Stefan möchte ich für die angenehmen und äußerst lustigen Stunden im Labor und auch außerhalb danken. Durch Euch wurde der Laboralltag erträglich und nie langweilig!

Bei Herrn Durmaz und Herrn Sahiner bedanke ich mich für die tolle Betreuung der Mäuse und die Ablenkung durch diverse Literatur.

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

Vor allem meinen Eltern und Herrn Manfred Weickert möchte ich für jegliche Unterstützung während meiner Promotionszeit danken.

Bei meiner besten Freundin Daniela Reif bedanke ich mich von ganzem Herzen für ihre langjährige Freundschaft und Unterstützung in allen Lebenslagen. Danke, Ela!

Bei meinem Mann Nicolas möchte ich mich für seinen steten Glauben an mich sehr herzlich bedanken! Du hast mich weit gebracht, Schnecker!

