

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

LEHRSTUHL FÜR ZOOLOGIE

Genetische Charakterisierung der Rolle von Calciumkanälen für die neuronale Entwicklung und Funktion

Angela Maria Jurik

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

genehmigten Dissertation.

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

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. H. Luksch

2. Univ.-Prof. Dr. F. B. Hofmann (i. R.)

Die Dissertation wurde am 05.06.2012 bei der Technischen Universität eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 06.08.2012 angenommen.

Meiner Familie

Gliederung

I.	Inhaltsverzeichnis	I
II.	Abbildungs- u. Tabellenverzeichnis	V
III.	Abkürzungsverzeichnis	VII
IV.	Abstract und Zusammenfassung	X
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	14
3.	Ergebnisse	41
4.	Diskussion	72
5.	Anhang	83
6.	Literaturverzeichnis	87
V.	Danksagung	100

I. Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Spannungsabhängige Calciumkanäle (<i>voltage gated calcium channels</i> , VGCCs)....	1
1.1.1	L-Typ Calciumkanäle.....	3
1.1.2	Autoregulation von L-Typ Calciumkanälen.....	5
1.1.2.1	Fazilitierung.....	5
1.1.2.2	Inaktivierung	5
1.2	Die Funktion des Ca _v 1.2 Kanals im Zentralnervensystem	7
1.3	Mutationen des <i>Cacna1c</i> Gens	10
1.3.1	<i>Knock-out</i> des <i>Cacna1c</i> Gens	10
1.3.2	<i>Gain of function</i> Mutationen des <i>Cacna1c</i> Gens	11
1.3.3	Mutation des IQ-Motivs im <i>Cacna1c</i> Gen	11
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit	12
2	Material und Methoden	14
2.1	Versuchstiere.....	14
2.1.1	<i>Cacna1c knock-out</i> -Mäuse.....	14
2.1.2	Cre Mäuse	15
2.1.3	Ca _v 1.2 ^{EQ} Maus	16
2.2	Verhaltensversuche.....	17
2.2.1	Sozialverhalten.....	17
2.2.1.1	<i>Discrimination Chamber</i> -Test	17
2.2.1.2	<i>Social Interaction</i> -Test	18
2.2.1.3	Objekt Exploration-Test	18
2.2.1.4	<i>Resident/Intruder</i> -Test	18
2.2.2	Angstverhalten	19
2.2.2.1	<i>Open Field</i> -Test	19
2.2.2.2	<i>Elevated Plus Maze</i> -Test.....	19
2.2.2.3	<i>Dark/Light Box</i> -Test.....	20
2.2.2.4	<i>Acoustic Startle</i> -Test	20
2.2.2.5	<i>Marble Burying</i> -Test	21
2.2.2.6	<i>Fear conditioning</i> -Test	21
2.2.3	Versuche für Depressions-assoziiertes Verhalten.....	22
2.2.3.1	Sukrosepräferenztest	22
2.2.3.2	<i>Forced Swim</i> -Test.....	23

Inhaltsverzeichnis

2.2.3.3	<i>Tail Suspension-Test</i>	23
2.2.3.4	Intracerebroventrikuläre Injektion (ICV) von Kanalblockern.....	23
2.3	Analyse von Neurotransmittern <i>in vivo</i> im Hippocampus.....	24
2.3.1	<i>In vivo</i> Mikrodialyse	24
2.3.2	HPLC (High Performance Liquid Chromatography).....	25
2.4	Präparation von Embryonen	26
2.4.1	Zygotenpräparation	26
2.4.2	Blastozystenpräparation	26
2.4.3	Embryonenpräparation von Tag 6.5 <i>p.c.</i> bis Tag 12.5 <i>p.c.</i>	27
2.5	Molekularbiologische Methoden.....	27
2.5.1	Isolierung von Nukleinsäuren.....	27
2.5.1.1	Isolierung von genomischer DNS aus Mausgewebe	27
2.5.1.2	Isolierung von RNS aus Gewebe	27
2.5.1.3	Synthese von cDNS	28
2.5.2	Gelelektrophorese	28
2.5.3	Reinigung von Nukleinsäuren.....	30
2.5.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	30
2.5.5	Sequenzanalyse von DNS	30
2.5.6	Polymerase-Kettenreaktion.....	31
2.5.6.1	Verwendete Polymerase.....	31
2.6	Biochemische Methoden	32
2.6.1	Proteingewinnung aus murinem Gewebe mittels SDS/Tris-Aufschluss.....	32
2.6.2	Membranpräparation aus murinem Gewebe	32
2.6.3	Aufkonzentration von Membranproteinen	33
2.6.4	Calmodulin(CaM)-Sepharose-Präzipitation	33
2.6.5	Biotinylierung von Membranproteinen.....	34
2.6.6	Quantitative Proteinbestimmung mittels BCA-Methode	35
2.6.7	Western Blot	35
2.7	Histologische Untersuchungen.....	38
2.7.1	Perfusion	38
2.7.2	Anfertigung von Paraffinschnitten	38
2.7.3	Nissl-Färbung	39
2.7.4	Golgi-Cox Färbung	39
2.7.5	Neuronalentwicklung und Proliferation mittels BrdU- und Ki67-Färbung.....	39
2.8	Statistik.....	40

3	Ergebnisse.....	41
3.1	Grundcharakterisierung der Ca _v 1.2 ^{+EQ} Maus.....	41
3.1.1	Embryonale Letalität.....	41
3.1.2	Postnatale Entwicklung.....	42
3.1.3	Proteinexpression.....	43
3.2	Grundcharakterisierung der gehirnspezifischen Ca _v 1.2 ^{EQ/L2} Nestin ^{+Cre} Maus.....	44
3.2.1	Postnatale Entwicklung.....	44
3.2.2	Proteinexpression des Ca _v 1.2-Kanals.....	45
3.2.3	mRNS-Level von Ca _v 1.2.....	47
3.2.4	Proteinexpression des Ca _v 1.3 Kanals.....	48
3.2.5	Präassoziation von Calmodulin an den C-Terminus des Ca _v 1.2 Proteins.....	49
3.3	Morphologische Untersuchungen.....	50
3.3.1	Grundcharakterisierung mittels Nissl-Färbung.....	50
3.3.2	Golgi Cox-Färbung.....	51
3.3.3	Neuronalentwicklung und Proliferation.....	53
3.4	Verhaltensuntersuchungen.....	54
3.4.1	Sozialverhalten.....	54
3.4.1.1	<i>Discrimination Chamber</i>	55
3.4.1.2	Sozialer Interaktions-Test.....	55
3.4.1.3	Objekt Explorations-Test.....	56
3.4.1.4	<i>Resident/Intruder-Test</i>	57
3.4.2	Angstverhalten.....	57
3.4.2.1	<i>Open Field-Test</i>	57
3.4.2.2	<i>Elevated Plus Maze-Test</i>	61
3.4.2.3	<i>Dark/Light Box-Test</i>	61
3.4.2.4	<i>Marble Burying-Test</i>	62
3.4.2.5	<i>Acoustic Startle-Test</i>	62
3.4.2.6	<i>Fear Conditioning</i>	64
3.4.3	<i>Stress-Coping-Verhalten</i>	66
3.4.3.1	Sukrosepräferenztest.....	66
3.4.3.2	<i>Forced Swim-Test</i>	66
3.4.3.3	<i>Tail Suspension-Test</i>	67
3.4.3.4	Neurotransmitteranalyse.....	69
4	Diskussion.....	72
4.1	Funktionen des C-Terminus.....	72

Inhaltsverzeichnis

4.2	Gehirnspezifischer, konditionaler <i>knock-in</i> im Mausmodell	72
4.3	Veränderungen im Verhalten der gehirnspezifischen, konditionalen <i>knock-in</i> -Tiere	74
4.4	Elektrophysiologische Messungen.....	79
4.5	Untersuchung der Neurotransmitterausschüttung.....	80
4.6	Ausblick	81
5	Anhang	83
6	Literaturverzeichnis	87

II. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Aufbau eines L-Typ Calciumkanals.....	3
Abbildung 1.2: Struktur der α_{1C} -Untereinheit.....	4
Abbildung 1.3: Calcium (CDI) - spannungsabhängige (VDI) Inaktivierung der α_{1C} -Untereinheit	6
Abbildung 1.4: Autoregulation von L-Typ Calciumkanälen	7
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der <i>Cacna1c</i> Allele	15
Abbildung 2.2: Konditionale Expression des <i>Cacna1c knock-out</i> Gens im gesamten Gehirn	15
Abbildung 3.1: Genotypisierungs-PCR der präparierten Embryonen von Tag 0,5 <i>p.c.</i> , Tag 2,5 <i>p.c.</i> , Tag 6,5 <i>p.c.</i> , Tag 8,5 <i>p.c.</i> und Tag 12,5 <i>p.c.</i>	42
Abbildung 3.2: Gewichtsstatistik.....	43
Abbildung 3.3: Proteinexpression des $Ca_v1.2$ Kanals in Herz und Gehirn	44
Abbildung 3.4: Gewichtsstatistik.....	45
Abbildung 3.5: Proteinexpression des $Ca_v1.2$ Kanals im Gehirn	46
Abbildung 3.6: Proteinexpression des $Ca_v1.2$ Kanals in der Membran von Zellen im Gehirn nach Biotinylierung	47
Abbildung 3.7: mRNA-Expression des <i>Cacna1c</i> Gens im Gehirn	48
Abbildung 3.8: Proteinexpression des $Ca_v1.3$ Kanals im Gehirn	49
Abbildung 3.9: Präassoziation des $Ca_v1.2$ Kanals mit Calmodulin in Abhängigkeit von Ca^{2+} - Ionen.....	50
Abbildung 3.10: Morphologische Untersuchungen mittels Nissl-Färbung	51
Abbildung 3.11: Morphologische Untersuchungen mittels Golgi Cox-Färbung	52
Abbildung 3.12: Golgi Cox-Färbung der Neuronen der CA1 Region im Hippocampus.....	53
Abbildung 3.13: Überleben und Proliferation von hippocampalen Neuronen	54
Abbildung 3.14: <i>Discrimination Chamber</i>	55
Abbildung 3.15: Sozialer Interaktions-Test.....	56
Abbildung 3.16: Objekt Explorations-Test	56
Abbildung 3.17: <i>Resident/Intruder</i> -Test	57
Abbildung 3.18: Gesamtdistanz im <i>Open Field</i> -Test	58
Abbildung 3.19: Zeit und Distanz im Zentralbereich im <i>Open Field</i> -Test	59
Abbildung 3.20: Vertikale Exploration im <i>Open Field</i> -Test.....	60
Abbildung 3.21: Mobilität im runden <i>Open Field</i> -Test.....	60
Abbildung 3.22: Zeit und Anzahl der Eintritte in die offenen Arme im <i>Elevated Plus Maze</i> - Test	61
Abbildung 3.23: <i>Dark/Light Box</i> -Test.....	62
Abbildung 3.24 <i>Acoustic Startle</i> -Test	63
Abbildung 3.25: <i>fear conditioning</i>	65
Abbildung 3.26: Sukrosepräferenztest	66
Abbildung 3.27: <i>Forced Swim</i> -Test.....	67
Abbildung 3.28: <i>Tail Suspension</i> -Test.....	67
Abbildung 3.29: <i>Tail Suspension</i> -Test mit gehirnspezifischen <i>knock-out</i> -Tieren	68
Abbildung 3.30: <i>Tail Suspension</i> -Test nach Injektion von Verapamil	69
Abbildung 3.31: <i>Tail Suspension</i> -Test nach Injektion von Verapamil bei C57/Bl6/N Tieren ..	69
Abbildung 3.32: Mikrodialyse im ventralen Hippocampus.....	71

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Klassifizierungsschema der spannungsabhängigen Calciumkanäle..... 2
Tabelle 2.1: Versuchsaufbau des *fear conditioning*-Tests 22

III. Abkürzungsverzeichnis

[Ca ²⁺] _i	Intrazelluläre Calciumkonzentration
°C	Grad Celsius
5HIAA	5-Hydroxyindolylessigsäure
A, mA, pA	Ampere, Milliampere, Picoampere
AKAP150	A-Kinase Anker-Protein 150
Akt/PKB	Serin-/Threonin Proteinkinase, Proteinkinase B
AMPAR	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor</i>
AP	Aktionspotential
apoCaM	apoCalmodulin
Asp	Aspartat
ASR	<i>Acoustic Startle Response</i>
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BDNF	<i>Brain derived neurotrophic factor</i>
bp, kb	Basenpaar, Kilobasenpaar
Bpm	<i>Beats per minute</i> (Schläge pro Minute)
BrdU	Bromdesoxyuridin
BTZ	Benzothiazepin
Ca ²⁺	Calcium
CaM	Calmodulin
CamKII	Calmodulin-abhängige Kinase II
cAMP	zyklisches (<i>cyclic</i>) Adenosinmonophosphat
CDF	<i>calcium dependent facilitation</i> (Calciumabhängige Fazilitierung)
CDI	<i>calcium dependent inactivation</i> (Calcium abhängige Inaktivierung)
cDNS	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i> (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CIP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i> (alkalische Phosphatase aus Kälberdarm)
Cl ⁻	Chlor
cm, mm	Zentimeter, Millimeter
CMV	Cytomegalovirus
Cre	<i>cAMP response element</i>
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
CS	<i>Conditioned stimulus</i> (Konditionierter Stimulus)
C-Terminus, C-terminal	Carboxy-Terminus, Carboxy-terminal
Ctr	Kontrolle
dB(A)	Dezibel
DHP	Dihydropyridin
D-LTP	<i>Decremental LTP</i> (Kurzzeit-LTP)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonuklein-5'-Triphosphat
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure
E	Glutaminsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPM	<i>Elevated Plus Maze</i>
EQ	Glutaminsäure/Glutamin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen

Abkürzungsverzeichnis

EtOH	Ethanol
F, pF	Farad, Picofarad
FDI	<i>calcium dependent facilitation</i> (Calcium abhängige Fazilitierung)
FST	<i>Forced Swim-Test</i>
G	Glutamin
g, mg, µg, ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
GluA2	Glutamatrezeptor
GVIA	w-Conotoxin GVIA
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HEK293T-Zellen	<i>human embryonic kidney cells</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRP	<i>horse radish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HVA	<i>high voltage activated</i> (Hochspannungsaktiviert)
HVA	Homovanillinsäure
I	Isoleucin
I_{Ba}	Bariumeinstrom
I_{Ca}	Calciumeinstrom
ICV	Intracerebroventrikulär
IPI	Interpulsintervall
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
IQ-Motiv	Isoleucin/Glutamin-Motiv
Iso	Isoprenalin
K⁺	Kalium
K_D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KI	<i>knock-in</i>
KO	<i>knock-out</i>
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LK1	spezifische Ca _v 1.2-cDNS für glatte Muskulatur
L-LTP	<i>Longlasting LTP</i> (Langzeit-LTP)
loxP	<i>floxed by loxP-sites</i> (flankiert von loxP-Stellen)
LTCC	<i>L-type calcium channels</i> (L-Typ Calciumkanäle)
LTD	<i>long term depression</i> (Langzeitdepression)
LTM	<i>long term memory</i> (Langzeitgedächtnis)
LTP	<i>long term potentiation</i> (Langzeitpotenzierung)
L-Typ	<i>longlasting-Typ</i>
LVA	<i>low voltage activated</i> (Niederspannungsaktiviert)
M, mM, µM, nM	Molar, Millimolar, Mikromolar, Nanomolar
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
min, s, ms	Minute, Sekunde, Millisekunde
mRNS	<i>messenger RNS</i>
MVIIC	w-Conotoxin MVIIC
Na⁺	Natrium
NMDAR	N-Methyl-S-Aspartat-Rezeptor
N-Typ	<i>Neither l-type nor t-Type</i>
p.c.	<i>post coitum</i> (nach dem Geschlechtsverkehr)
P/Q-Typ	Purkinje-Typ
PAA	Phenylalkylamin
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	pH-Wert
PKA	Proteinkinase A
PP	<i>Prepulse</i> (Präpuls)

Abkürzungsverzeichnis

PPF	<i>prepulse facilitation</i> (Präpulsfazilitierung)
PPI	<i>prepulse inhibition</i> (Präpulsinhibition)
R	Arginin
RNase	Ribonuklease
RNS	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
R-Typ	<i>Resistant</i> -Typ
S	Serin
S1-S6	Segment1- Segment 6
SERCA	<i>sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
ssDNS	<i>single stranded DNA</i> (Einzelstrang-Desoxyribonukeinsäure)
TBE	Trisborat-gepufferte EDTA-Lösung
TBS	Trisborat-gepufferte Salzlösung
TE	Tris-EDTA-Puffer
TGA; TAA	Stop-Codon (Tyrosin-Guanin-Adenosin; Tyrosin-Adenosin-Adenosin)
TST	<i>Tail Suspension</i> -Test
T-Typ	<i>Transient</i> -Typ
U	<i>unit</i> (Einheit)
Ü. N.	über Nacht
US	<i>Unconditioned stimulus</i> (Unkonditionierter Stimulus)
V, mV	Volt, Millivolt
VDF	<i>voltage dependent facilitation</i> (Spannungsabhängige Fazilitierung)
VDI	<i>voltage dependent inactivation</i> (Spannungsabhängige Inaktivierung)
VGCC	<i>Voltage gated calcium channel</i> (Spannungsabhängiger Calciumkanal)
vs	versus
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
Zif/268	<i>zinc finger protein 225</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem
α_{1C}	Ca _v 1.2-Untereinheit

IV. Abstract und Zusammenfassung

Abstract

Ca_v1.2 L-type Ca²⁺ channels mediate Ca²⁺ entry into neurons, which modulates neuronal plasticity and initiates transcriptional events that support learning and memory. These channels are examples of molecular signal-transduction units that regulate themselves through their own activity. Among the many types of voltage-gated Ca²⁺ channels, Ca_v1.2 L-type Ca²⁺ channels display inactivation and facilitation, both of which are depending on Ca²⁺ ions entry. Calmodulin, a Ca²⁺ binding protein, is a critical Ca²⁺ sensor for both inactivation and facilitation, and the nature of the modulatory effect depends on residues within the IQ motif at the C-terminal part of the channels' α_{1C} subunit which is important for calmodulin binding. Mutation of the isoleucine residue to glutamate in the IQ motif results in loss of calcium dependent inactivation and facilitation *in vitro*.

We have generated a mouse line, which carries this mutation from isoleucine (I) to glutamate (E) in the α_{1C} subunit of the Ca_v1.2 L-type calcium channel (the so called EQ mouse). As homozygous EQ mice die early during embryonic development, I developed a brain specific knock in (KI) mouse line with this mutation. These brain specific knock in mice are viable and were analysed during my PhD thesis to evaluate the importance of the IQ motif in brain.

KI mice are lighter in body weight than controls in the first three months of life. No morphological differences and no differences in proliferation rate of neurons could be detected in brains of KI animals compared to controls. Total Ca_v1.2 protein level was reduced in neuron membrane preparations from KI mice compared to controls, whereas there was no difference at the mRNA level. It has been shown, that CaM is preassociated at the C-terminus in regions N-terminal of the IQ motif *in vitro*. These data could be confirmed in the EQ mouse.

As the *Cacna1c* gene is associated with depression and bipolar disorder in genome-wide association analysis, I made a behavioural screening of the KI mice. These mice show an increased novelty fear in the open field test and the light/dark box test, enhanced anxiety in fear conditioning, and a less depressive-like behaviour compared to controls in the tail suspension test and forced swim test. No differences in social behaviour could be detected. By now, electrophysiological experiments in neurons are performed to confirm the results of Poomvanicha et al. (2011). They showed that in ventricular cardiomyocytes of heart specific IQ/EQ knock in mice Ca²⁺ dependent inactivation and facilitation was abolished.

These results show that the IQ motif is important for normal integration of the Ca_v1.2 channel into the plasma membrane and for normal development of embryonic stages. As reported recently in literature, the *Cacna1c* gene has been shown to be associated with psychiatric disorders in this work. Thus, the brain specific EQ mouse could be a possible model for with Ca_v1.2 associated psychiatric disorders in humans.

IV. Abstract und Zusammenfassung

Zusammenfassung

Ca_v1.2 L-Typ Calciumkanäle vermitteln im Gehirn den Calciumeinstrom in erregbare Zellen, der die neuronale Plastizität, Lernen und Gedächtnis moduliert. Der Ca_v1.2 Kanal kann seine Aktivität durch zwei Regulationsmechanismen, der Inaktivierung und der Fazilitierung, regulieren. Beide Mechanismen sind eng an einen Einstrom von Calcium-Ionen durch den Ca_v1.2 Kanal gekoppelt. Calmodulin, ein Calcium-bindendes Protein, ist ein entscheidender Sensor für Inaktivierung und Fazilitierung. Abhängig sind Inaktivierung und Fazilitierung des Kanals von Aminosäuren innerhalb des sogenannten IQ-Motivs im C-terminalen Bereich der α_{1C} -Untereinheit des Ca_v1.2 Kanals. Calmodulin bindet an das IQ-Motiv. Eine Mutation von Isoleucin zu Glutaminsäure im IQ-Motiv (I1624E) resultiert in einem Verlust der Calcium-abhängigen Inaktivierung und Fazilitierung *in vitro*. Unser Labor generierte eine Mauslinie, die die Mutation von Isoleucin (I) zu Glutaminsäure (E) in der α_{1C} -Untereinheit des Ca_v1.2 L-Typ Calciumkanal trägt (die sogenannte EQ-Maus). Da homozygote Mäuse früh während der embryonalen Entwicklung starben, wurde mittels Cre-Rekombinase eine konditionale Gehirnspezifische *knock-in*-Maus mit dieser Mutation gezüchtet, welche lebensfähig war. Mittels dieser Gehirnspezifischen *knock-in*-Maus (KI) wurde in dieser Arbeit die Wichtigkeit des IQ-Motivs im Gehirn erforscht.

Das Gewicht der KI Tiere war bis zum dritten Monat geringer als das von Kontrollen. Die Gehirne der KI Tiere unterschieden sich morphologisch nicht von denen der Kontrollen, auch die Proliferationsrate der Neuronen wies keine Unterschiede auf. Der Gesamt-Proteinlevel des Ca_v1.2 Kanals im Gehirn der KI Tiere war stark reduziert im Vergleich zu Kontrollen, wobei kein Unterschied auf mRNA Level zu finden war. *In vitro* war gezeigt worden, dass CaM präassoziiert am C-Terminus in Regionen N-terminal des IQ-Motivs vorliegt. Diese *in vitro* Ergebnisse konnten mit der EQ-Maus *in vivo* in Präassoziationsstudien bestätigt werden.

Da das *Cacna1c* Gen bei Genom-weiten Assoziationsstudien mit Depression und bipolarer Störung assoziiert ist, wurde ein Verhaltensscreening mit den EQ-Mäusen durchgeführt. Die KI Tiere zeigten eine erhöhte Angst vor neuen Umgebungen im *Open Field*-Test und im *Dark/Light Box*-Test, eine verstärkte Ängstlichkeit im *fear conditioning*-Test, und ein weniger stark ausgeprägtes depressiv-ähnliches Verhalten als ihre Kontrollgeschwister im *Tail Suspension*-Test und *Forced Swim*-Test. Im Sozialverhalten waren keine Unterschiede zwischen KI Tieren und Kontrollen vorhanden.

Aktuell durchgeführte elektrophysiologische Experimente sollen die Ergebnisse von Poomvanicha et al. (2011) bestätigen, die nachwies, dass in ventrikulären Kardiomyozyten einer herzspezifischen IQ/EQ *knock-in*-Maus die Calcium-abhängige Inaktivierung und Fazilitierung des Ca_v1.2 Kanals aufgehoben sind.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das IQ-Motiv für eine unveränderte Integration des $Ca_v1.2$ Kanals in die Plasmamembran und für eine normale Entwicklung im Embryonalstadium wichtig ist. Eine Mutation von I zu E im IQ-Motiv führt in einem sehr frühen Entwicklungsstadium (vor Tag 2,5 *p.c.*) zu einem letalen Phänotyp. Auch eine in der Literatur beschriebene Assoziation des *Cacna1c* Gens mit psychiatrischen Krankheiten konnte nachgewiesen werden. Aufgrund der untersuchten Parameter ist die EQ Maus ein mögliches Modell für mit $Ca_v1.2$ assoziierte psychische Störungen in Menschen. Die gezielte pharmakologische Beeinflussung der $Ca_v1.2$ Aktivität könnte vielversprechende Ansätze zur Therapie dieser Erkrankungen des zentralen Nervensystems bieten.

1 Einleitung

Eine Vielzahl der physiologischen Prozesse in Eukaryonten wird von Calcium (Ca^{2+}) als ubiquitär vorkommendes Signaltransduktionsmolekül kontrolliert - von der Kontraktion glatter Muskulatur und Skelettmuskulatur bis zur Informationsverarbeitung und Gedächtnisbildung im Gehirn. Nach einem transienten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration bei all diesen Prozessen kommt es zu einem raschen Rückfall auf den Basalwert (Bootman and Berridge, 1995). Während die basalen, intrazellulären Calciumkonzentrationen beispielsweise über Natrium-Calcium-Austauscher oder SERCA (*sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase*) auf etwa 100 nM gehalten werden, kommt es durch die Depolarisation der Zellmembran zur Öffnung von spannungsabhängigen Calciumkanälen. Durch das Öffnen dieser Calciumkanäle strömen Calcium-Ionen entlang eines 20.000-fachen Gradienten zwischen der intrazellulären (etwa 100 nM freies Calcium) und der extrazellulären Calciumkonzentration (1,5 mM) ins Cytosol ein (Clapham, 2007). Aufgrund der dadurch erfolgenden transienten Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration werden unterschiedliche Reaktionen und Signalwege (z.B. Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen Kinase CaMKII und des Calciumsensors Calmodulin, Aktivierung des Ryanodinrezeptors im sarkoplasmatischen Retikulum und die anschließende Entleerung des sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Speichers) aktiviert. Neben Spannungsänderungen gibt es eine Vielzahl von Modulatoren wie Hormone, Phosphatasen, Proteinkinasen und Pharmaka, die das Öffnen der Calciumkanäle beeinflussen können (Hofmann et al., 1999; Moosmang et al., 2005a). Veränderungen in der Expression und der Funktion der Calciumkanäle können zu zellulären Fehlfunktionen und dadurch zu einer Reihe von Erkrankungen führen, wie z. B. Arrhythmien, Herzinsuffizienz, dem Timothy-Syndrom (Splawski et al., 2004; Splawski et al., 2005) oder auch Erkrankungen des zentralen Nervensystems (Abrahams and Geschwind, 2008; Ferreira et al., 2008; Sklar et al., 2008; Green et al., 2010). Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem L-Typ $\text{Ca}_v1.2$ Kanal und dessen Rolle im Gehirn bei Lernprozessen und psychischen Störungen.

1.1 Spannungsabhängige Calciumkanäle (*voltage gated calcium channels, VGCCs*)

Spannungsabhängige Calciumkanäle zählen entwicklungsgeschichtlich zur Gruppe transmembranärer Ionenkanäle, zu der auch spannungsabhängige Natrium- und Kaliumkanäle gehören. VGCCs sind große, multimere Proteinkomplexe, die sich aufgrund unterschiedlicher elektrophysiologischer Eigenschaften in zwei Gruppen unterteilen lassen: die HVA (*high voltage activated*) und die LVA (*low voltage activated*) Calciumkanäle (Yaari et al., 1987). Pharmakologische Eigenschaften der VGCCs werden durch die porenbildende $\text{Ca}_v\alpha_1$ -Untereinheit festgelegt. Für den Transport des Kanalkomplexes zur Zellmembran

(*trafficking*) sowie für die Kinetik und die Amplitude des Stroms sind die Kanaluntereinheiten $Ca_v\beta_{1-4}$, $Ca_v\alpha_2\delta$ und $Ca_v\gamma$ und der Calciumsensor Calmodulin (CaM) nötig (Birnbaumer et al., 1998).

Zehn für die $Ca_v\alpha_1$ -Untereinheit kodierende Gene sind bisher identifiziert worden. Es existieren 4 Klassen von HVA (L-, P/Q-, R-, N-Typ) und eine Klasse von LVA (T-Typ) Calciumkanälen.

Die T-Typ-Calciumkanäle werden den LVA-Kanälen zugeordnet. Sie zeichnen sich durch eine Aktivierung bei niedrigem Membranpotential (-70 mV bis -60 mV), eine geringe Leitfähigkeit (*tiny*, -30 mV bis -10 mV) und schnelle Inaktivierung (nach 10 ms) aus (Cribbs et al., 1998; Perez-Reyes, 1998). Des Weiteren sind sie insensitiv gegenüber Dihydropyridinen. Zu den HVA-Kanälen gehören die L-Typ Calciumkanäle (*L-type calcium channel*, *LTCC*), die sich durch eine große Leitfähigkeit (*large conductance*) und eine lange Öffnungszeit (*long lasting opening*) mit Barium als Ladungsträger auszeichnen, erst bei großer Depolarisation (*large depolarisation*) der Zellmembran aktiviert werden und sensitiv gegenüber Dihydropyridinen, Phenylalkylaminen und Benzothiazepinen sind. Des Weiteren werden noch die P/Q- (Purkinje), R- (*remaining*) und N- (*neither L- nor T-type*) Typ Calciumkanäle unterschieden. Auch diese drei Calciumkanalgruppen benötigen starke Depolarisationen, um aktiv zu werden, sind allerdings gegenüber den L-Typ-Antagonisten insensitiv. Tabelle 1.1 fasst die verschiedenen Subtypen zusammen und zeigt die Expression der Kanäle in den verschiedenen Geweben (Hofmann et al., 1999).

Bezeichnung		Gewebeexpression	Spezifische Blocker	Literaturangabe	
HVA	L	$Ca_v1.1$ (α_{1S})	Skelettmuskel	(Tanabe et al., 1987)	
		$Ca_v1.2$ (α_{1C})	Herzmuskulatur, glatte Muskulatur, Neuronen, Pankreas	1,4-Dihydropyridine(DHP) Phenylalkylamine (PAA) Benzothiazepine (BTZ)	(Mikami et al., 1989) (Biel et al., 1990) (Snutch et al., 1991)
		$Ca_v1.3$ (α_{1D})	Sinusknoten, Haarzellen der Cochlea, Neuronen, Pankreas, Niere		(Seino et al., 1992)
		$Ca_v1.4$ (α_{1F})	Retina	cis-Diltiazem	(Strom et al., 1998)
	P/Q	$Ca_v2.1$ (α_{1A})	Neuronen	ω -Agatoxin, ω -Conotoxin (MVIIC)	(Mori et al., 1991) (Starr et al., 1991)
N	$Ca_v2.2$ (α_{1B})	Neuronen	ω -Conotoxin (GVIA, MVIIC)	(Williams, 1992) (Dubel et al., 1992)	
R	$Ca_v2.3$ (α_{1E})	Neuronen, Pankreas	SNX-482	(Niidome et al., 1992) (Jing et al., 2005)	
LVA	T	$Ca_v3.1$ (α_{1G})	Neuronen, Sinusknoten	Kurtoxin	(Perez-Reyes, 1998; Perez-Reyes et al., 1998)
		$Ca_v3.2$ (α_{1H})	Neuronen, Koronararterien	Kurtoxin	(Cribbs et al., 1998)
		$Ca_v3.3$ (α_{1I})	Neuronen	Kurtoxin	(Lee et al., 1999b)

Tabelle 1.1: Klassifizierungsschema der spannungsabhängigen Calciumkanäle

Aufgrund unterschiedlicher elektrophysiologischer und pharmakologischer Eigenschaften der HVA- und LVA-Calciumkanäle erfolgt eine Einteilung in mehrere Subtypen.

1.1.1 L-Typ Calciumkanäle

Die L-Typ Calciumkanäle bestehen aus einer porenbildenden $Ca_v\alpha_1$ -Untereinheit sowie aus zwei akzessorischen Untereinheiten, der $Ca_v\beta$ - und $Ca_v\alpha_2\delta$ -Untereinheit (siehe Abbildung 1.1). In Nerven- und Skelettmuskelzellen findet man überdies die $Ca_v\gamma$ -Untereinheit (Letts et al., 1998), über deren Funktion bislang allerdings sehr wenig bekannt ist (Catterall, 2000). Ein weiterer wichtiger Bestandteil ist der Calciumsensor Calmodulin (CaM) (Van Petegem and Minor, 2006).

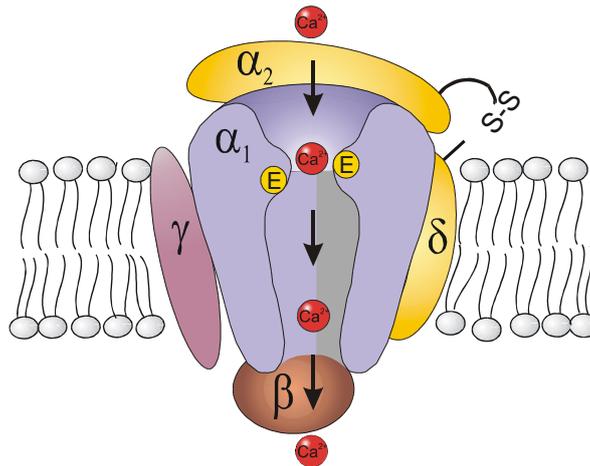


Abbildung 1.1: Aufbau eines L-Typ Calciumkanals

Die $Ca_v\alpha_1$ -Untereinheit bildet die Pore, die akzessorischen Untereinheiten $Ca_v\alpha_2\delta$ und $Ca_v\gamma$ sind transmembranär bzw. teilweise extrazellulär an die $Ca_v\alpha_1$ -Untereinheit angeordnet, $Ca_v\beta$ ist zyttoplasmatisch an die $Ca_v\alpha_1$ -Untereinheit angelagert (Lacinova, 2005).

Die $Ca_v\alpha_1$ -Untereinheit ist die größte und funktionell wichtigste Untereinheit. Sie bestimmt primär die physikalischen und pharmakologischen Eigenschaften des Kanals (Catterall, 2000) und kann auch ohne andere Untereinheiten einen möglicherweise eingeschränkt funktionsfähigen Calciumkanal bilden (Perez-Reyes et al., 1989; Weissgerber et al., 2006). Außerdem binden hier die Calciumantagonisten vom Typ der Benzothiazepine, Phenylalkylamine und Dihydropyridine (Striessnig, 1999). Die übrigen Untereinheiten $Ca_v\beta$, $Ca_v\alpha_2\delta$ und $Ca_v\gamma$ werden als akzessorisch angesehen und beeinflussen die Expression des Kanals und die Kinetik und die Amplitude des Calciumstromes (Gao et al., 1999; Bers, 2002). Sie sind zusätzlich - und hier in besonderem Maße die $Ca_v\beta$ -Untereinheit - am Kanal-*trafficking*, also dem Transport und Einbau des Kanals in die Zellmembran, beteiligt (Shistik et al., 1995).

Die $Ca_v\alpha_1$ -Untereinheit ist ein Membranprotein, das aus vier homologen Domänen (I-IV) mit je sechs Transmembransegmenten (S1-S6) besteht, die als α -Helices vorliegen. Sie enthält die Bindungsstellen für die bekannten Calciumkanalblocker und -aktivatoren, die Spannungssensoren im jeweils vierten Segment jeder Domäne (IS4-IVS4), die Änderungen des Zellmembranpotentials registrieren, und den Selektivitätsfilter (IS5/S6-IVS5/S6) für zweiwertige Kationen (Guy and Conti, 1990). Bereits der Austausch von drei Aminosäuren in

dieser Schleife verändert die Selektivität (Feng et al., 2001). In der intrazellulären Schleife zwischen Domäne 1 und 2 liegt die Interaktionsstelle für die $\text{Ca}_v\beta$ -Untereinheit des Kanals (Pragnell et al., 1994; Hofmann et al., 1999). Im Carboxy-Terminus des $\text{Ca}_v1.2$ Kanals, der ca. 700 Aminosäuren umfasst, sind eine Vielzahl von regulatorischen Strukturelementen lokalisiert, wie z. B. ein CaM-bindendes EF Hand Motiv, das Calcium bindet, eine AKAP150-Bindestelle, die Interaktionen zwischen dem Calciumkanal und der Proteinkinase A ermöglicht, sowie diverse Phosphorylierungsstellen (Blaich et al., 2010). Auch das sogenannte IQ Motiv (benannt nach den beiden ersten Aminosäuren Isoleucin und Glutamin) ist 148 Aminosäuren carboxy-terminal vom letzten transmembranären Segment IV S6 lokalisiert (Zuhlke et al., 1999). Es besteht aus 12 Aminosäuren, an denen Calmodulin (CaM) bindet (siehe Abbildung 1.2). Calmodulin, ein 17 kDa großes Protein, gehört zur Familie der EF Hand Proteine und dient in eukaryontischen Zellen als Calciumsensor. Wichtig ist die Calmodulinbindung an das IQ-Motiv für die Autoregulation des $\text{Ca}_v1.2$ Kanals (Zuhlke et al., 2000) und für die Steuerung der Signalkaskaden, die im Zellkern die Transkription bestimmter Gene regulieren (Dolmetsch et al., 2001). Der distale Bereich des C-Terminus spielt weiterhin eine wichtige Rolle bei der Regulation der Transkription einer Vielzahl von Genen (Dolmetsch et al., 2001). Veränderungen am C-Terminus können die Inaktivierung des Kanals massiv beeinflussen (De Jongh et al., 1996; Davare et al., 2001; Hulme et al., 2006; Fuller et al., 2010).

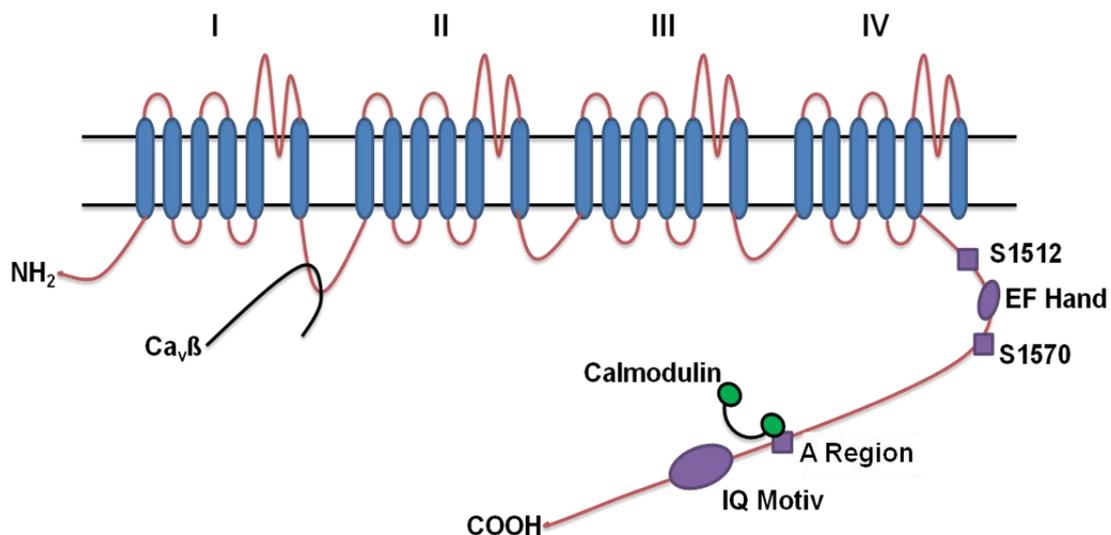


Abbildung 1.2: Struktur der α_{1C} -Untereinheit

Die α_{1C} -Untereinheit ist in blau mit ihren 4 Domänen dargestellt. Am C-Terminus sind wichtige Motive (IQ Motiv, EF Hand Motiv) und Phosphorylierungsstellen zu erkennen. Die Bindung an die $\text{Ca}_v\beta$ -Untereinheit und an Calmodulin ist ebenfalls schematisch dargestellt.

Unterteilt werden die L-Typ Calciumkanäle in $Ca_v1.1$ bis $Ca_v1.4$. Während $Ca_v1.1$ im Skelettmuskel exprimiert wird (Tanabe et al., 1987; De Jongh et al., 1991), wurde $Ca_v1.2$ in verschiedenen Geweben gefunden: im Herzen (Bohn et al., 2000), in der glatten Muskulatur (Moosmang et al., 2003), im Pankreas (Schulla et al., 2003), der Nebenniere und dem Gehirn (Hell et al., 1993). $Ca_v1.3$ wird ebenso im Gehirn exprimiert (Striessnig et al., 2006), daneben findet er sich noch im Herz, den Nieren, dem Ovar, dem Pankreas und der Cochlea (Kollmar et al., 1997). Der $Ca_v1.4$ Kanal findet sich in der Retina (Strom et al., 1998), im Lymphgewebe und den Rückenmarksneuronen (McRory et al., 2004).

1.1.2 Autoregulation von L-Typ Calciumkanälen

L-Typ Calciumkanäle zeigen das Phänomen der Autoregulation, bei welcher Calmodulin als zentrales Regulationsmolekül im Vordergrund steht. Auf der einen Seite hemmt calciumgebundenes Calmodulin (Ca^{2+}/CaM) den L-Typ Calciumkanal während der sogenannten calciumabhängigen Inaktivierung (*calcium dependent inactivation*, CDI). Auf der anderen Seite kann dieser Ca^{2+}/CaM -Komplex durch Aktivierung der Calmodulin-Kinase II (CaMKII) zu einer Erhöhung des Calciumeinstromes durch den L-Typ Calciumkanal führen (*calcium dependent facilitation*, CDF) (Wu et al., 2004).

1.1.2.1 Fazilitierung

Die Fazilitierung ist ein positiver Feedback-Mechanismus. Bei diesem entsteht nach Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration [Ca^{2+}], (*voltage dependent facilitation*, VDF) nach Depolarisation (Noble and Shimoni, 1981a) oder nach mehreren aufeinanderfolgenden Depolarisationen der Zelle (*calcium dependent facilitation*, CDF) (Noble and Shimoni, 1981b; Marban and Tsien, 1982; Gurney et al., 1989) ein veränderter Zustand der L-Typ Calciumkanäle. Dieser wird auch als *mode2*-Zustand bezeichnet (Dzhura et al., 2000). Während des *mode2*-Zustandes werden lange Öffnungszeiten und eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit vorgefunden. Die VDF beruht auf einer CaMKII abhängigen Phosphorylierung an den Positionen S1512 und S1570 der α_{1C} -Untereinheit (Erleben et al., 2006; Blauch et al., 2010), während für die CDF die Bindung von Calmodulin und CaMKII an den Carboxy-Terminus eine wichtige Rolle spielen (Lee et al., 1999a; Zuhlke et al., 1999; Poomvanicha et al., 2011).

1.1.2.2 Inaktivierung

Bei der Inaktivierung wird der Calciumeinstrom (I_{Ca}) über den Kanal entweder durch das Membranpotential (*voltage dependent inactivation*, VDI) oder durch Calcium selbst (*calcium dependent inactivation*, CDI) terminiert. Nachweise für eine calciumabhängige Komponente beim Schließen des Kanals sind Experimente mit Barium (Ba^{2+}) als Ladungsträger, bei denen die Inaktivierung wesentlich langsamer voranschreitet (siehe Abbildung 1.3).

Einleitung

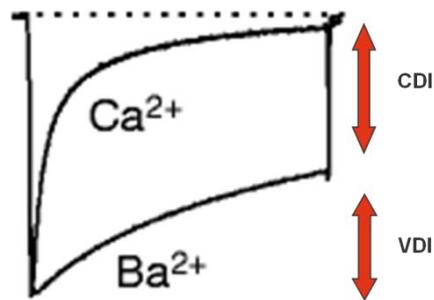


Abbildung 1.3: Calcium (CDI) - spannungsabhängige (VDI) Inaktivierung der α_{1C} -Untereinheit

Gezeigt ist der Verlauf von I_{Ca} und I_{Ba} nach Depolarisation der Zellmembran von -80 mV (Haltepotential) auf 0 mV (Findlay, 2002).

Calmodulin vermittelt die CDI des L-Typ Calciumkanals (Zuhlke and Reuter, 1998), wobei gezeigt wurde, dass CaM an der sogenannten A-Region zwischen EF Hand Motiv und der IQ-Domäne des carboxy-terminalen Endes des L-Typ Calciumkanals präassoziiert vorliegt (Pitt et al., 2001; Kim et al., 2004a). Nach Bindung des Calciums an Calmodulin während der CDI, ändert CaM seine Konformation und interagiert mit dem IQ-Motiv (Peterson et al., 1999). Der Kanal geht in den inaktiven Zustand über und schließt. Dies soll als Schutz vor einer zu hohen Calciumkonzentration dienen (Zuhlke and Reuter, 1998). Durch Mutationsstudien *in vitro* wurde nachgewiesen, dass die erste Aminosäure des IQ-Motivs, das Isoleucin, die für die Wechselwirkung mit Calmodulin verantwortliche Aminosäure im IQ-Motiv ist (Zuhlke et al., 2000). Zusätzlich konnte diese Interaktion durch Erkenntnisse anhand der Kristallstruktur des Proteinkomplexes aus $\text{Ca}_v1.2$ -Carboxy-Terminus und Ca^{2+} /CaM Kristallstruktur bestätigt werden (Van Petegem et al., 2005). Auch beim *Trafficking* der α_{1C} -Untereinheit zur Membran spielt Calmodulin eine wichtige Rolle (Wang et al., 2007) (siehe Abbildung 1.4).

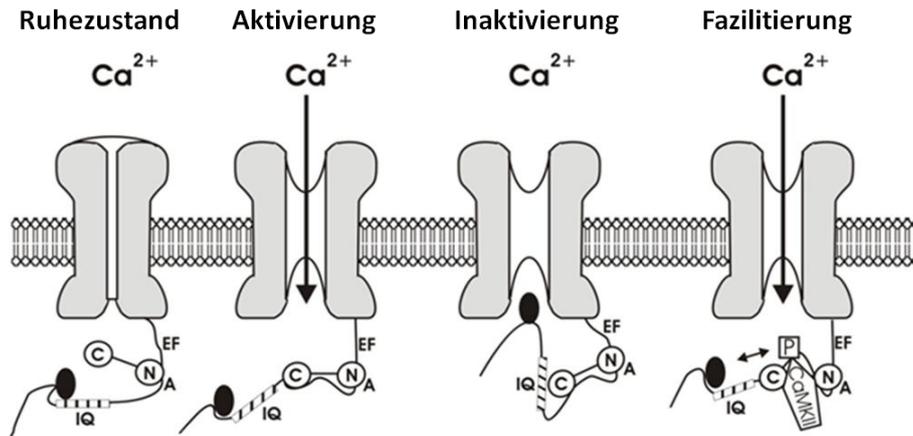


Abbildung 1.4: Autoregulation von L-Typ Calciumkanälen

Im Ruhezustand ist der Kanal geschlossen, es kann kein Calcium in die Zelle strömen. Nach Depolarisation der Zellmembran öffnet sich der Kanal und Calcium strömt in den Intrazellularraum. Durch Bindung der Ca²⁺-Ionen an Calmodulin verändert dieses seine Konformation, bindet an das IQ-Motiv, der Kanal wird inaktiv und schließt sich. Neben der Inaktivierung gibt es auch die Fazilitierung, die durch Phosphorylierung durch die CaMKII verursacht wird (Maier and Bers, 2002).

1.2 Die Funktion des Ca_v1.2 Kanals im Zentralnervensystem

Ungefähr 80% der im Gehirn exprimierten L-Typ Calcium-Kanäle sind Ca_v1.2 Kanäle (Hell et al., 1993; Ludwig et al., 1997; Davare et al., 2001; Clark et al., 2003; Sinnegger-Brauns et al., 2004; Pinard et al., 2005; Hetzenauer et al., 2006; Sinnegger-Brauns et al., 2009), wobei der Ca_v1.2 Kanal überwiegend in Cerebellum, Hippocampus, Bulbus Olfactorius und Amygdala exprimiert wird (Hell et al., 1993; Ludwig et al., 1997; Clark et al., 2003). Außerdem ist der Ca_v1.2 Kanal im Gegensatz zum Ca_v1.3 Kanal nicht nur im Soma der Neuronen lokalisiert (Westenbroek et al., 1990), sondern auch in hoher Dichte in den Dendriten exprimiert (Hell et al., 1993; Davare et al., 2001; Obermair et al., 2004; Pinard et al., 2005; Tippens and Lee, 2007).

Ein phylogenetisch älterer Teil des Cortexes, die Hippocampus-Formation, ist wichtig für Lernen und Gedächtnis. Diese Formation besteht neben dem Hippocampus selbst aus *Gyrus dentatus* und *Subiculum*. Der Hippocampus gehört zum limbischen System und ist eine bilateral angelegte, symmetrische Hirnstruktur im medialen Bereich des *Lobus temporalis*. Er spielt eine wichtige Rolle bei bestimmten Lern- und Gedächtnisleistungen (Zola-Morgan et al., 1986; Mishkin and Appenzeller, 1987; Squire et al., 1988; Zola-Morgan et al., 1993; Whitlock et al., 2006). So konnte in einem speziell entwickelten Verhaltenstest für Nagetiere, dem *Morris Water Maze*-Test, belegt werden, dass der Hippocampus besonders beim räumlichen Lernen die entscheidende Rolle inne hat. Bilateral hippocampektomierte Ratten lernen in diesem Modell schlechter (Morris et al., 1982; Garrud et al., 1984). Es wird angenommen, dass die Umgebung im Hippocampus durch so

genannte „*place cells*“ in der Art einer „kognitiven Landkarte“ repräsentiert wird. Nicht nur für das räumliche Lernen scheint der Hippocampus wichtig zu sein, sondern auch für episodisches Gedächtnis *per se*, z.B. eine bestimmte Verkettung von Ereignissen im Versuchsablauf (Wood et al., 1999).

Neben dem Hippocampus gibt es als weitere bedeutsame Hirnstruktur für Lernen und Gedächtnis die Amygdala (*Corpus amygdaloideum*; Mandelkern), ein Komplex aus ungefähr 12 Einzelkernen, der tief im humanen *Lobus temporalis* liegt und ebenfalls zum limbischen System gehört. Darüber hinaus bestehen eine afferente und eine efferente Verknüpfung mit dem Hippocampus. Die Amygdala gilt als das Zentrum für emotionales Lernen und ist vor allem für die Bildung und Speicherung des Angst-Gedächtnisses verantwortlich (Maren, 1996; LeDoux, 1998). Sie bildet sowohl die anatomische als auch molekulare Basis für Furcht (*conditioned fear*). Furcht entsteht, wenn ein initial neutraler Stimulus (*conditioned stimulus*, CS) mit einem biologisch relevanten aversiven Stimulus (*unconditioned stimulus*, US, z.B. elektrischer Fußschock) zeitlich gepaart wird. Abhängig ist das Erlernen der Ton-/Fußschock-Assoziation von der Verarbeitung in der Amygdala (auditives Angstgedächtnis). Neben der Ton-/Fußschock-Assoziation wird auch eine Assoziation zum Kontext während der Konditionierung erlernt (kontextuales Angstgedächtnis). Diese Assoziation ist nicht nur von der Amygdala, sondern auch von der Verarbeitung im Hippocampus abhängig.

Beim *fear conditioning* werden zwei Phasen in der Ausbildung des Angst-Gedächtnisses unterschieden: Zum Einen der eigentliche Lernvorgang *per se* (Akquisition) und zum Anderen die Überführung des Gelernten (Konsolidierung) in das Langzeit-Gedächtnis (*long term memory*, LTM). Die Konditionierung an Tag 0 führt zur Akquisition, in den darauffolgenden Testphasen wird das Erlernete im Sinne eines *Retrievals* abgerufen. Eine Umkehrung der Aversivität des CS bei wiederholter Präsentation des CS in Abwesenheit des US wird als Extinktion bezeichnet.

Im Hippocampus konnte erstmals nachgewiesen werden, dass Veränderungen in der Stärke der synaptischen Übertragung mögliche Mechanismen für Lernen und Gedächtnis darstellen (Bliss and Lomo, 1973; Chen and Tonegawa, 1997; Carey and Lisberger, 2002). Dabei werden zwei Veränderungen unterschieden: die aktivitätsabhängige, langanhaltende Verstärkung der synaptischen Übertragung, die auch Langzeitpotenzierung (*long term potentiation*, LTP) genannt wird, und die Verminderung dieser Stärke, die Langzeitdepression (*long term depression*, LTD).

Während einer LTP kommt es zu einem erhöhten Calciumeinstrom über N-Methyl-D-Aspartat Rezeptoren (NMDAR) und dadurch zu einem hohen Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration in der postsynaptischen Bereich (Bliss and Collingridge, 1993). Wird

der Calciumeinstrom jedoch über postsynaptische $Ca_v1.2$ oder $Ca_v1.3$ Kanäle hervorgerufen, so spricht man von einer NMDAR-unabhängigen LTP (Morgan and Teyler, 1999).

Ebenso wie beim Gedächtnis existiert auch bei der LTP eine Kurzzeit-(D (*decremental*))-LTP, 1-3 h) und eine Langzeitform (L (*longlasting*))-LTP, > 3 h). Studien zeigten, dass L-LTP, nicht aber D-LTP mit CRE (*cAMP response element*)-regulierter Genexpression assoziiert ist (Impey et al., 1996). Des Weiteren wurde gezeigt, dass L-LTP im Gegensatz zu D-LTP unabhängig von den NMDAR sein kann (Grover and Teyler, 1990; Aniksztejn and Ben-Ari, 1991; Huang and Malenka, 1993; Hanse and Gustafsson, 1995; Moosmang et al., 2005b), und stark von der Aktivität der L-Typ Calciumkanäle abhängig ist (Impey et al., 1996).

Auch in der Amygdala kann eine NMDAR-abhängige LTP und LTD gemessen werden (Chapman et al., 1990; Huang and Kandel, 1998). Für die LTP des thalamo-amygdalären Signalweges wurde jedoch auch eine NMDAR-unabhängige Variante diskutiert (Weisskopf et al., 1999).

Zahlreiche Hinweise zeigen, dass sowohl die synaptische Plastizität im Hippocampus 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. Ein Beispiel hierfür ist 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). Der Transkriptionsfaktor CREB spielt bei der Ausbildung des Langzeitgedächtnisses sowohl in Invertebraten als auch Vertebraten eine wichtige Rolle (Dash et al., 1990; Bourchouladze et al., 1994; Josselyn et al., 2001). Die Aktivierung von CREB erfolgt hauptsächlich über den cAMP-Signalweg und den Ca^{2+} -CaM-abhängigen Proteinkinase-Weg (Deisseroth et al., 1996; West et al., 2001).

Für die Induktion der L-LTP und die Aktivierung der ERK-Signaltransduktionskaskade in Neuronen des Hippocampus ist ein Anstieg der postsynaptischen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nötig (Bito et al., 1996; Kandel, 2001). Erhöhungen der postsynaptischen Ca^{2+} -Konzentration im Hippocampus wurden bisher hauptsächlich mit einem Ca^{2+} -Einstrom über NMDARs in Verbindung gebracht (Kovalchuk et al., 2000; Sabatini and Svoboda, 2000). Der Anteil des postsynaptischen Calcium-Transienten, welcher über L-Typ Calciumkanäle einströmt, ist zwar gering, aber dennoch ausreichend, um die Transkription calciumabhängiger Gene, z.B. *Zif/268* und *brain derived neurotrophic factor* (BDNF), spezifisch auszulösen. Diese Gene sind ebenfalls wichtig für das Lernen und für adaptive Prozesse im ZNS (Murphy et al., 1991b; West et al., 2001). In Anwesenheit von NMDAR-Antagonisten entsteht durch den Ca^{2+} -Einstrom über L-Typ Kanäle eine langanhaltende Phosphorylierung von CREB, eine Expression der CRE-abhängigen Gene in den Neuronen des Hippocampus und eine Induktion NMDAR-unabhängiger L-LTP (Impey et al., 1996;

Dolmetsch et al., 2001; Moosmang et al., 2005b). Auch in der Amygdala wird die Ausbildung des Kurz- und Langzeitgedächtnisses durch den Einstrom von Calcium, die Aktivierung calciumabhängiger Signalkaskaden und den Transkriptionsfaktor CREB bestimmt (Schafe et al., 2000; Schafe and LeDoux, 2000; Josselyn et al., 2001). Die Rolle des L-Typ Calciumkanals in diesem System wurde allerdings noch nicht abschließend geklärt. Anhand von gehirnspezifischen *Cacna1c knock-out*-Tieren konnte die Verantwortlichkeit des *Cacna1c* Gens für die Akquisition des Angstgedächtnisses und für die synaptische Plastizität in der lateralen Amygdala nachgewiesen werden. Außerdem führt der *knock-out* zu einer homöostatischen Veränderung in der Expression der postsynaptischen, Ca²⁺-permeablen und GluA2-freien AMPA-Rezeptoren, um die normale neuronale Funktion beizubehalten (Langwieser et al., 2010).

1.3 Mutationen des *Cacna1c* Gens

1.3.1 *Knock-out* des *Cacna1c* Gens

Um eine globale *Cacna1c knock-out*-Maus (Nullmutante) zu generieren, wurde durch Insertion einer Neomycin-Resistenz-Kassette im Exon 3 der Leserahmen des Ca_v1.2 Gens unterbrochen. Dadurch kann sich kein funktionsfähiger Kanal mehr bilden, was zum Absterben der Embryonen vor Tag 14,5 *p.c.* führt (Seisenberger et al., 2000). Um trotz des embryonal letalen Phänotyps der Ca_v1.2 Nullmutanten die physiologische Funktion des Ca_v1.2 Proteins analysieren zu können, wurde die konventionelle *knock-out*-Strategie mit dem Cre/*loxP*-System gekoppelt. Das Cre/*loxP*-System hat sich in Säugerzellen trotz des viralen Ursprungs der Cre-Rekombinase als sehr effizient erwiesen. Es wird dazu verwendet, gezielte Modifikationen von ES-Zellen oder Somazellen in der Maus herbeizuführen (Rajewsky et al., 1996). Hierbei kann die Cre-Rekombinase zwischen zwei *loxP*-Stellen, die entweder gezielt durch homologe Rekombination in ES-Zellen oder zufällig über ein konventionelles Transgen in das Chromosom eingeführt wurden, rekombinieren. Am häufigsten wird dieses System *in vivo* zur Inaktivierung von Genen durch Cre-vermittelte Exzision *loxP*-flankierter („gefloxter“) DNS-Sequenzen verwendet (Nagy, 2000). Zur Erzeugung von gewebsspezifischen, konditionalen *Cacna1c knock-out*-Mäusen wurde die Cre-Rekombinase mittels geeigneter Promotoren bzw. durch die Verwendung ligandenabhängiger Cre-Rekombinasen gewebespezifisch exprimiert (Feil et al., 1996; Brocard et al., 1997). Mäuse, die z.B. eine Cre-Rekombinase unter dem Nestin-Promotor exprimieren (Tronche et al., 1999), haben im ZNS einen globalen *knock-out* des *Cacna1c* Gens. Diese Tiere haben eine normale Lebenserwartung, ein normales Körpergewicht und keine offensichtlichen morphologischen Abnormalitäten im Gehirn (Langwieser et al., 2010).

1.3.2 *Gain of function* Mutationen des *Cacna1c* Gens

Genomische Veränderungen im *Cacna1c* Gen durch Veränderungen der Basentriplets können zu veränderten Aminosäuren führen. Aufgrund dieser Mutationen kann es zu *gain of function* und *loss of function* Effekten kommen, die humanpathologischen Wert erzielen können. Ein Beispiel für eine *gain of function* Mutation ist das *Timothy*-Syndrom (Reichenbach et al., 1992), bei dem durch eine Mutation die Aminosäure Glycin zu Serin bzw. zu Arginin an Position 406 des *Cacna1c* Gens (G402S oder G406R) ausgetauscht wird (Splawski et al., 2004; Splawski et al., 2005). Klinisch manifestiert sich diese Krankheit unter anderem durch eine Verlängerung der QT-Zeit im Elektrokardiogramm, Syndaktylie, strukturelle Herzdefekte und psychiatrische Autismus-Spektrum-Krankheiten (Reichenbach et al., 1992; Marks et al., 1995a; Marks et al., 1995b). Auch die Entwicklung des zentralen Nervensystems ist verzögert (Splawski et al., 2004; Splawski et al., 2005; Sklar et al., 2008). Ein Mausmodell mit der G406R Mutation zeigte repetitives, eingeschränktes Verhalten und ein verändertes Sozialverhalten. Dieses veränderte Verhalten deutet auf mögliche Parallelen zu Symptomen von Autismus beim Menschen hin (Bader et al., 2011). Während Mäuse mit dieser Mutation keine Unterschiede im Gesundheitsstatus, der Lokomotion und dem Angstlevel gegenüber Wildtypen zeigten, vergruben sie doppelt so viele Murmeln im *Marble Burying*-Test, was auf repetitives Verhalten schließen ließ. Im *Morris Water Maze*-Test und im *Water-Y Maze*-Test benötigten die Tiere mit der G406R Mutation signifikant mehr Zeit zum Umlernen als ihre Kontrollgeschwister, was auf perseveratives Verhalten hindeutete. Der Ca_v1.2 Kanal spielt eine Rolle bei psychiatrischen Krankheiten. Genomweite Assoziationsstudien zeigten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen SNPs (*single-nucleotide polymorphisms*) im *Cacna1c* Gen und Autismus-Spektrum-Krankheiten (Abrahams 2008, Wang 2009). Ein weiterer SNP (rs1006737), der im dritten Intron des *Cacna1c* Gens lokalisiert ist, wurde sehr stark mit bipolarer Störung assoziiert (Ferreira et al., 2008; Sklar et al., 2008). Auch Schizophrenie und Depression sind mit SNPs im *Cacna1c* Gen verbunden (Moskvina et al., 2009; Sullivan et al., 2009; Green et al., 2010; Nyegaard et al., 2010; Shi et al., 2011). Des Weiteren zeigten Studien, dass ein SNP im *Cacna1c* Gen zu einer Vergrößerung der grauen Substanz im Gehirn führte (Kempton et al., 2009), das Sprechen auf semantischen Niveau und die damit verbundenen neuronalen Systeme beeinflusste (Krug et al., 2010) und die limbische Aktivität (Wessa et al., 2010) in gesunden Menschen veränderte.

1.3.3 Mutation des IQ-Motivs im *Cacna1c* Gen

Eine wichtige Sequenz im C-terminalen Bereich des *Cacna1c* Gens ist das IQ-Motiv. CaM bindet nach Öffnen des Calciumkanals und Einströmen von Ca²⁺-Ionen an das IQ-Motiv (Zuhlke et al., 1999; Kim et al., 2004c; Van Petegem et al., 2005; Halling et al., 2006). Besonders wichtig für die Bindung von CaM an das IQ-Motiv ist das erste Isoleucin an

Position 1624. Eine Mutation dieses Isoleucins (I) im IQ-Motiv zu Glutaminsäure (E) (I1624E) erniedrigt die Affinität von CaM, an den Calciumkanal zu binden, *in vitro* um das 100-Fache (Zuhlke et al., 1999; Zuhlke et al., 2000). Außerdem hebt die I/E Mutation die CDF und die CDI von L-Typ Ca^{2+} -Strömen, die in *Xenopus* Oocyten exprimiert werden, auf (Zuhlke et al., 2000). Mäuse, die diese Mutation homozygot besitzen, sterben während der Embryonalentwicklung. Um die Mutation im adulten Tier gewebespezifisch im Herzen zu untersuchen, wurde ein konditionaler Herz-spezifischer *knock-in* der I/E Mutation generiert. Innerhalb von drei Wochen nach Behandlung mit Tamoxifen starben die Tiere, wobei keine CaM/CaMKII-vermittelte Regulation des $\text{Ca}_v1.2$ Kanals im Herzen der I/E Tiere mehr vorhanden war (Poomvanicha et al., 2011). Tamoxifen induziert die Cre-Rekombinase, welche dann im Herzen das „gefloxte“ *Cacna1c* Gen rekombiniert. Somit wird nur das EQ-Allel exprimiert, welches aufgrund der geringen Expression in der Zellmembran die Eigenschaften des Herzens so stark verändert, dass eine dilatative Kardiomyopathie entsteht, die letztendlich zum Tod führt (Poomvanicha et al., 2011; Blaich et al., 2012).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel der Arbeit war es, die Effekte der I/E Mutation im $\text{Ca}_v1.2$ Kanal des Gehirns zu analysieren. Dazu wurden zunächst Tiere, die heterozygot global die I1624E Mutation exprimierten, auf Unterschiede in der Proteinebene und morphologische Unterschiede untersucht. Homozygote Tiere mit der I/E Mutation starben während der Embryonalentwicklung. Der Zeitpunkt des Todes sollte bestimmt werden.

Um die Effekte der I/E Mutation im Gehirn besser erforschen zu können, wurde durch konditionale Cre-Rekombination eine Mauslinie generiert, die im Gehirn nur die mutierte Variante des *Cacna1c* Gens trug, während der restliche Körper das normale *Cacna1c* Gen exprimiert (KI Maus). Im Herzen konnte bereits gezeigt werden, dass die I/E Mutation zu einem Verlust der CDF führt und die CDI moduliert. Diese KI Mäuse sollten Aufschluss über die Wichtigkeit des IQ-Motivs und die Effekte der I/E Mutation im Gehirn geben.

Hierfür sollte zunächst die Protein- und RNS-Ebene auf mögliche Unterschiede untersucht werden. Des Weiteren sollte eine *in vitro* gezeigte Präassoziation von CaM an den C-Terminus der α_{1C} -Untereinheit des $\text{Ca}_v1.2$ Kanals *in vivo* mittels Assoziationsstudien überprüft werden.

Zur Untersuchung der Morphologie des Gehirns und der Proliferation der Neuronen sollten verschiedene Färbemethoden angewandt werden.

Einleitung

Da Mutationen im Ca_v1.2 Kanal mit verschiedenen psychischen Krankheiten assoziiert sind, sollte ein breit angelegtes Verhaltens-Screening durchgeführt werden, um eventuelle Änderungen im Verhalten detektieren zu können.

Mögliche Auswirkungen der I1624E Mutation auf die Neurotransmitterausschüttung sollten mittels Mikrodialyse aufgedeckt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

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

Die Tiere wurden unter einem 12:12 h Hell-/Dunkelzyklus gehalten (9:00-21:00 Uhr dunkel, 21:00-9:00 Uhr hell) und erhielten Futter und Wasser *ad libitum*. Die Nachkommen aus den Verpaarungen wurden 7-10 Tage nach Geburt genotypisiert, indem eine PCR-Analyse mit Schwanzgewebe durchgeführt wurde. Im Alter von vier Wochen wurden die Jungtiere nach Geschlecht von den Müttern getrennt.

Neben den nachstehend erklärten, genetisch veränderten Mäusen wurden auch männliche BalbC-Tiere im Alter von vier Monaten und männliche C57/Bl6/N Mäuse für Versuche verwendet.

2.1.1 *Cacna1c* knock-out-Mäuse

Durch Cre-vermittelte Rekombination in embryonalen Stammzellen wurden zwei unterschiedliche *Cacna1c* (Ca_v1.2) Allele hergestellt (L1 und L2 Allel; siehe Abbildung 2.1). Im L2 Allel („gefloxtes“ Allel) sind die Exone 14 und 15 des *Cacna1c* Gens durch zwei gleich orientierte, 34 bp lange *loxP*-Sequenzen flankiert. Diese beiden Exone kodieren für die IIS5 und IIS6 Transmembransegmente und den *pore loop* in der Domäne II des Ca_v1.2 Kanals. Trotz Einbringen der beiden *loxP*-Sequenzen kodiert dieses Allel für ein funktionelles Ca_v1.2 Protein.

Im L1 Allel wurden die Exone 14 und 15 durch Cre-Rekombinase vermittelte Rekombination entfernt (siehe Abbildung 2.1). 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 Stopcodons in Exon 16 (*loss of function* Allel) (Seisenberger et al., 2000).

Material und Methoden

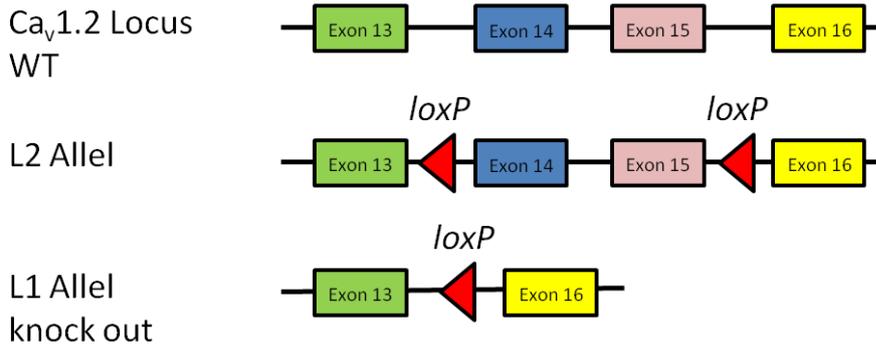


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der *Cacna1c* Allele

Dargestellt sind das Wildtyp (WT), das gefloxtes Allel (L2) und das *knock-out* (L1) Allel des *Cacna1c* Gens, die Zahlen entsprechen den Exonnummern. Durch die Cre-Rekombinase kommt es zum Verlust von Exon 14 und Exon 15.

2.1.2 Cre Mäuse

Mit Hilfe von Mäusen, die die Cre-Rekombinase unter dem Nestin-Promotor tragen (Tronche et al., 1999), konnten die *Cacna1c knock-out*-Mäuse mit einem globalen *knock-out* des *Cacna1c* Gens im Gehirn erzeugt werden. Als genetischer Hintergrund dieser Tiere diente der C57/Bl6/N Stamm.

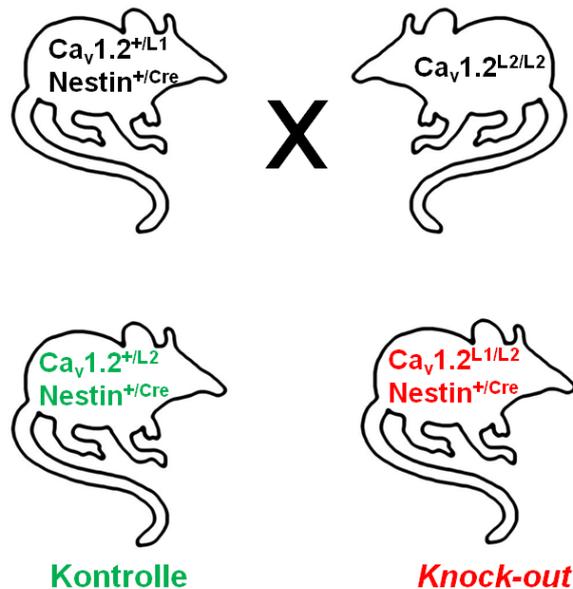


Abbildung 2.2: Konditionale Expression des *Cacna1c knock-out* Gens im gesamten Gehirn

Um den globalen *Cacna1c knock-out* im Gehirn zu erhalten, wurden zunächst Tiere, die heterozygot das rekombinierte L1-Allel und die Cre-Rekombinase unter dem Nestin-Promotor trugen (Ca_v1.2^{+/L1} Nestin^{+/Cre}), mit Tieren verpaart, die homozygot für das gefloxtes *Cacna1c* Gen waren (Ca_v1.2^{L2/L2}). Die aus dieser Verpaarung hervorgehenden Tiere wurden als Kontrollen (Ca_v1.2^{+/L2} Nestin^{+/Cre}) oder als *knock-out-Tiere* (Ca_v1.2^{L1/L2} Nestin^{+/Cre}) für die Versuche eingesetzt. Als genetischer Hintergrund dieser Tiere diente der C57/Bl6/N Stamm.

2.1.3 $Ca_v1.2^{EQ}$ Maus

Die von Dr. Stefanie Fischer (AG Moosmang, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU München) erzeugte transgene $Ca_v1.2^{EQ}$ Maus entstand durch eine Mutation von Isoleucin (I) zu Glutaminsäure (E) an Position 1624 in Exon 40 des *Cacna1c* Gens. Nach erfolgreichem Vektordesign, Einbringen des Vektors in Stammzellen und danach in Blastozysten wurden hochchimäre Tiere geboren. Es konnten heterozygote $Ca_v1.2^{EQ}$ Tiere gezüchtet werden. Als genetischer Hintergrund diente eine Mischung aus 129X1/SvJx129S1/SV-+p+ *Tyr-cKitlSl-J/+* und C57/Bl6/N-Stämmen.

Die homozygoten Mäuse mit dieser *knock-in* Mutation sind nicht lebensfähig. Die heterozygoten $Ca_v1.2^{EQ}$ Mäuse wurden zunächst auf einen C57/Bl6/N-Hintergrund über fünf Generationen hinweg verpaart. Die heterozygoten $Ca_v1.2^{EQ}$ Nachkommen dieser Verpaarungen wurden anschließend mit Mäusen, die die Cre-Rekombinase unter dem Nestin-Promotor trugen, verpaart. Heterozygote $Ca_v1.2^{EQ}$ Tiere mit der Cre-Rekombinase ($Ca_v1.2^{+EQ}$ Nestin^{+Cre}) wurden anschließend mit für das L2 Allel des *Cacna1c* Gens homozygoten Tieren ($Ca_v1.2^{L2/L2}$) verpaart, um Kontroll- und KI Tiere zu erhalten (siehe Abbildung 2.2). Tiere, die heterozygot für das L2 Allel sind und die Cre-Rekombinase unter dem Nestin-Promotor exprimieren, haben nur ein funktionsfähiges *Cacna1c* Gen im Gehirn, das andere wurde über die Cre-vermittelte Rekombination zu einem L1-Allel rekombiniert, das nicht funktionsfähig ist (Kontroll-Tiere). Tiere, die die I/E Mutation auf einem Allel, das L2 Allel auf dem anderen Allel des *Cacna1c* Gens und die Cre-Rekombinase unter dem Nestin-Promotor exprimieren, bilden im Gehirn nur das Protein mit der I/E Mutation aus, da das zweite Allel nicht mehr funktionsfähig ist (*knock-in*-Tiere, KI Tiere) (siehe Abbildung 2.2).

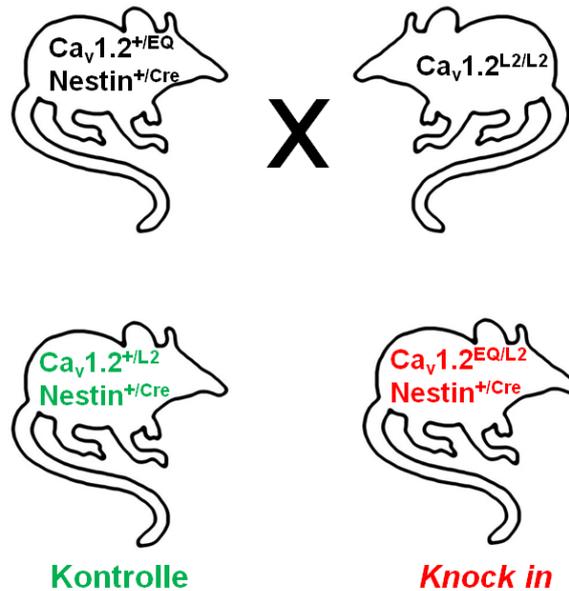


Abbildung 2.3: Konditionale Expression der I/E Mutation des *Cacna1c* Gens im gesamten Gehirn
 Um den globalen *knock-in* der I/E Mutation im Gehirn zu erhalten, wurden zunächst Tiere, die heterozygot für die I/E Mutation des *Cacna1c* Gens waren und die Cre-Rekombinase unter dem Nestin-Promotor trugen ($Ca_v1.2^{+/EQ}$ Nestin^{+/Cre}), mit Tieren verpaart, die homozygot für das gefloخته *Cacna1c* Gen waren ($Ca_v1.2^{L2/L2}$). Die aus dieser Verpaarung hervorgegangenen Tiere wurden als Kontrollen ($Ca_v1.2^{+/L2}$ Nestin^{+/Cre}) oder als *knock-in-Tiere* ($Ca_v1.2^{EQ/L2}$ Nestin^{+/Cre}) für die Versuche eingesetzt. Als genetischer Hintergrund dieser Tiere diente der C57/Bl6/N Stamm.

2.2 Verhaltensversuche

Für alle Verhaltensversuche wurden männliche Geschwistertiere der Kontroll- und *knock-in*- (KI) Tiere im Alter von 12-20 Wochen verwendet. Diese wurden nach einer Eingewöhnungszeit von zwei Wochen, in der sie einzeln in ihren Käfigen lebten, für Verhaltensversuche verwendet. Die Tiere wurden bei einem inversen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten (dunkel: 9:00-21:00 Uhr; hell: 21:00-9:00 Uhr). Der Zeitabstand zwischen zwei Versuchen betrug zwei bis drei Tage. Nach jedem Versuch wurden die Tiere direkt in ihren Heimkäfig zurückgesetzt. Der Versuchsleiter war bei den jeweiligen Experimenten in Bezug auf den Genotyp verblindet.

2.2.1 Sozialverhalten

2.2.1.1 *Discrimination Chamber-Test*

Um das Sozialverhalten zu erforschen, wurde eine rechteckige Box verwendet, die in drei gleich große Kompartimente (30 cm x 30 cm x 30 cm) unterteilt war. Die Kompartimente waren untereinander mit verschließbaren Türen (6 cm x 5 cm) verbunden (Crawley et al., 2007). Jede Maus konnte 5 min lang bei Rotlicht frei das zentrale Kompartiment explorieren (Habituation), dann wurden die Türen geöffnet und die Maus konnte alle drei Kompartimente für weitere 5 min frei erkunden, wobei die Zeit, die sie in den jeweils äußeren Kompartimenten verbrachte, gestoppt wurde. In beiden äußeren Kompartimenten war ein

unbelebtes Objekt (hier: umgedrehte Gitterbox). Anschließend wurde die Maus in das zentrale Kompartiment zurückgesetzt, und in das äußere Kompartiment, das seltener aufgesucht wurde, eine unbekannte, männliche BalbC-Maus in die Gitterbox gesetzt. Danach wurde die freie Exploration der Maus für 5 min in allen drei Kompartimenten gemessen. Nach jedem Durchgang wurde der Apparat mit neutraler Seife gereinigt. Alle Versuche wurden mit einer Videokamera dokumentiert. Offline wurden die Zeit und die Anzahl der Interaktionen des Versuchstieres mit der leeren und der mit der BalbC-Maus besetzten Gitterbox mit dem Programm ANY-MAZE (Stoelting) ausgewertet.

2.2.1.2 Social Interaction-Test

Bei diesem Test wurden entweder zwei Kontroll-Tiere oder zwei KI Tiere, die aus einem Wurf stammten, zusammen bei Rotlicht in einen neuen Makrolon Typ II-Käfig mit frischer Streu gesetzt. Der Deckel des Käfigs wurde durch eine Verlängerung der Wände mit transparentem Plastik (Höhe 12,5 cm) ersetzt. Über 5 min wurden die sozialen Interaktionen der beiden Tiere wie Schnüffeln, Ablecken, Aggression, Sexualverhalten oder gegenseitiges Putzen gemessen (Smit-Rigter et al., 2010). Alle Versuche wurden mit einer Videokamera dokumentiert und offline mit dem Programm ANY-MAZE (Stoelting) ausgewertet.

2.2.1.3 Objekt Exploration-Test

Um die Exploration der Tiere auf unbelebte Objekte zu messen, wurde für 5 min bei Rotlicht auf die jeweils gleiche Seite des Heimkäfigs, die nicht Nestseite des Tieres war, eine Glühbirne gelegt und die Exploration des fremden Objektes gemessen. Nach jedem Durchgang wurde die Lampe mit neutraler Seife gereinigt. Alle Versuche wurden mit einer Videokamera dokumentiert. Offline wurden die Anzahl und Zeit der Exploration der Glühbirne mit dem Programm ANY-MAZE (Stoelting) ausgewertet.

2.2.1.4 Resident/Intruder-Test

Um die Reaktion der Versuchstiere auf fremde Tiere in ihrem Heimkäfig zu untersuchen, wurde für 5 min bei Rotlicht eine fremde, männliche BalbC-Maus in den Heimkäfig eines jeden Tieres gesetzt und das Verhalten gegenüber dem Eindringling gemessen (Aggression, Exploration, Sexualverhalten). Alle Versuche wurden mit einer Videokamera dokumentiert und offline mit dem Programm ANY-MAZE (Stoelting) ausgewertet. Im Unterschied zu 2.2.1.2 sollte hier das Verhalten eines fremden Eindringlings, der nicht aus demselben Wurf stammt, in den Heimkäfig der Versuchstiere untersucht werden.

2.2.2 Angstverhalten

2.2.2.1 *Open Field-Test*

Explorationsverhalten und Angst-assoziiertes Verhalten der Tiere konnte mit diesem Test evaluiert werden (Jacob et al., 2009). Jedes Tier wurde in die Mitte einer quadratischen Box (26 cm x 26 cm) gesetzt, die mit Infrarot-Sensoren und Lichtschranken ausgestattet war (TruScan; Coulbourn Instruments, Allentown, PA, USA). Über 30 min bei Rotlicht wurde die Lokomotion der Maus mit Hilfe von Sensoren gemessen, die mit einem Computer mit der TruScan Software Version 99 (Coulbourn Instruments) verbunden waren. Die Boxen und Sensoren waren von einer zusätzlichen Box aus blickdichtem Plexiglas, aber ohne Boden und Deckel, umgeben (47 cm x 47 cm x 38 cm). Der zentrale Bereich entsprach einem Durchmesser von 15 cm, der Randbereich hatte einen Durchmesser von je 3 cm. Horizontale Lokomotion (Gesamtdistanz, Distanz, die im zentralen oder inneren Bereich der Box zurückgelegt wurde), vertikale Bewegung (*rearings*) und Ruhepausen wurden über die 30 minütige Dauer mit einer Frequenz von 4 Hz gemessen. Neben der Lokomotion kann mit diesem Versuch auch das Angstverhalten gemessen werden. Ängstliche Tiere bewegen sich mehr im äußeren Bereich und treten seltener und kürzer in den zentralen Bereich der *Open Field Box* ein. Der Versuch wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen ausgeführt, um eventuelle Habituationseffekte beobachten zu können. Nach jedem Durchgang wurde der gesamte Apparat mit neutraler Seife gesäubert und gut getrocknet.

Um zu sehen, ob die Mäuse sich lieber in den Ecken aufhalten, wurde neben einer viereckigen Box auch ein rundes Behältnis (Durchmesser 70 cm) verwendet. Der zentrale Bereich entsprach einem Durchmesser von 20 cm, der Randbereich hatte einen Durchmesser von je 5 cm. Hier wurden ebenfalls horizontale Lokomotion (Gesamtdistanz, Distanz, die im äußeren oder inneren Bereich der Box zurückgelegt wurde), vertikale Bewegung (*rearings*) und Ruhepausen über eine 15 minütige Dauer gemessen und offline mit dem Programm ANY-MAZE (Stoelting) ausgewertet. Nach jedem Durchgang wurde der gesamte Apparat mit neutraler Seife gesäubert und gut getrocknet.

2.2.2.2 *Elevated Plus Maze-Test*

Um das Angstverhalten der Tiere zu evaluieren, wurde der *Elevated Plus Maze-Test* (EPM) verwendet. Dieser Apparat bestand aus zwei sich gegenüberliegenden offenen Armen (30 cm x 5 cm) und zwei sich gegenüberliegenden geschlossenen Armen (30 cm x 5 cm x 14 cm), die über eine zentrale Plattform (5 cm x 5 cm) miteinander zu einem Kreuz verbunden waren (Pellow et al., 1985). Ängstliche Mäuse verbleiben in den geschlossenen Armen und zeigen weniger Eintritte in die offenen Arme. Die Maus wurde in die Mitte des Kreuzes mit dem Kopf zu den geschlossenen Armen gesetzt und 5 min, bei 300 lux in den offenen und 30 lux in den geschlossenen Armen, unter folgenden Gesichtspunkten beobachtet: Anzahl der Eintritte in offene bzw. geschlossene Arme und

verbrachte Zeit in den jeweiligen Armen. Der Eintritt in einen Arm war dadurch definiert, wenn alle vier Pfoten des Tieres die Linie zwischen Arm und zentraler Plattform übertreten hatten. Nach jedem Durchgang wurde der Boden des *Elevated Plus Maze* mit einem Tuch abgewischt. Alle Versuche wurden mit einer Videokamera dokumentiert und offline mit dem Programm ANY-MAZE (Stoelting) ausgewertet.

2.2.2.3 Dark/Light Box-Test

Der Apparat der Dark/Light Box war in zwei Kompartimente unterteilt: ein dunkles Kompartiment (15 cm x 20 cm x 38 cm) mit schwarzen Wänden und ein helles Kompartiment (15 cm x 20 cm x 38 cm) mit weißen Wänden. Beide Kompartimente waren mit einem 4 cm langen Tunnel verbunden (Jacob et al., 2009). Die Lichtintensität betrug 300 lux im hellen und 30 lux im dunklen Bereich. Zu Beginn wurde die Maus in eine Ecke des dunklen Kompartiments gesetzt; gemessen wurden in einem Zeitraum von 5 min die Eintritte in die helle bzw. dunkle Box und die Dauer des Aufenthalts in jedem Bereich. Nach jedem Durchgang wurde der Apparat mit neutraler Seife gereinigt. Alle Versuche wurden mit einer Videokamera dokumentiert und offline mit dem Programm ANY-MAZE (Stoelting) ausgewertet.

2.2.2.4 Acoustic Startle-Test

Der Startle Reflex ist eine motorische Antwort auf einen plötzlichen, beispielsweise akustischen Reiz, durch den es zu einer starken Zuckung im Körper der Maus kommt. Inhibiert werden kann diese akustische Startle-Antwort (*acoustic startle response*, ASR) durch einen schwachen Prästimulus (*prepulse inhibition*, PPI). Die Mäuse wurden in einen Plexiglaszylinder (Innendurchmesser 4 cm, Länge 8 cm), der auf einer Plastikplattform fixiert war, gegeben (SR-LAB, San Diego Instruments SDI, San Diego, USA). Die Bewegung des Zylinders wurde durch ein piezoelektrisches Element gemessen, das unter der Plattform befestigt war. Die Spannung dieses Elementes wurde amplifiziert und durch einen Computer digitalisiert (I/O board von SDI). Die Startle-Amplitude wurde definiert als der Peak der Spannungskurve gemessen innerhalb der ersten 50 ms nach der Stimulusgabe. Um die Startle-Reaktion der Tiere zu testen, wurden den Tieren an Tag 1 vier verschiedene Startle-Stimuli von einer Dauer von 20 ms und einer Intensität von 75, 90, 105 und 115 dB(A) bei einem konstanten Hintergrundrauschen von 50 dB(A) präsentiert. Die Stimulus-Intensität wurde vor dem Experiment mit einem Audiometer gemessen (Radio Shack, 33-2055, RadioShack, Forth Worth, USA). Als Kontrollexperiment wurde nur das Hintergrundrauschen präsentiert. Nach einer 5 minütigen Akklimatisierungsphase wurden den Tieren 10 x das Hintergrundrauschen und 20 Startle Stimuli von jeder Intensität nach dem Zufallsprinzip präsentiert. Die Pause zwischen den Stimuli betrug 15 ms. Nach jedem Versuch wurde der Plexiglaszylinder mit Seife gut gesäubert.

An Tag 2 wurde die ASR durch einen Stimulus von 115 dB(A) von 20 ms bei einem konstanten Hintergrundrauschen von 50 dB(A) hervorgerufen. Nach einer 5 minütigen Akklimatisierungsphase wurden den Tieren 20 dieser Startle Stimuli präsentiert, um eine Habituation der ASR zu erreichen. Anschließend wurden 22 ASRs, 210 Präpulse (*prepulse*, PP) mit drei unterschiedlichen Intensitäten und 18 Kontroll-PP (nur Präsentation des PP ohne Startle Stimulus) nach dem Zufallsprinzip präsentiert, wobei kein Stimulus zwei Mal in Folge präsentiert wurde. Drei verschiedene PP von 55, 65 und 75 dB(A) wurden mit einem Interpuls-Intervall (IPI, von Beginn des PP bis zum Beginn des Stimulus) von 5, 10, 25, 50 und 100 ms benutzt. Die Dauer des PP betrug 10 ms. Die Präpulsinhibition (*prepulse inhibition*, PPI) und die Präpulsfazitierung (*prepulse facilitation*, PPF) wurden als prozentuale Veränderung der ASR (Δ ASR) ausgedrückt.

2.2.2.5 Marble Burying-Test

Eine weitere Methode, um das Angstverhalten und auch repetitives Verhalten von Mäusen zu messen, ist der *Marble Burying-Test*. Ein Objekt (hier: Murmel), von dem ein aversiver Stimulus ausgeht, wird schon nach einmaligem Erleben erkannt und vergraben (Poling et al., 1981; Broekkamp et al., 1986). Mit Hilfe von Anxiolytika oder Antidepressiva kann das Vergraben der Murmeln reduziert werden, so dass im engeren Sinn von einem Test für psychopharmakologische Wirksamkeit von potentiellen Anxiolytika gesprochen wird. 12 Murmeln wurden, in regelmäßigen Abständen verteilt, in den Heimkäfig des Tieres gelegt. 15 min lang wurde das Verhalten der Tiere beim Vergraben der Murmeln beobachtet und am Ende des Experiments wurden die komplett vergrabenen Murmeln gezählt. Der Versuch wurde bei Rotlicht durchgeführt.

2.2.2.6 Fear conditioning-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, tiefgreifende Auswirkungen auf das Verhalten eines Tieres haben kann. Beim *fear conditioning* wird ein Sinus-Ton (CS, 9 kHz, 80 dB) mit einem „Fußschock“ (US, 0,7 mA, 2 sek) in einer Konditionierungskammer gepaart und im Anschluss das typische *Freezing*-Verhalten (Bewegungslosigkeit) der Tiere auf eine Präsentation des CS in Testkammern mit unterschiedlichem Geruch, Boden und Form der Box untersucht (Davis, 1992; Fendt and Fanselow, 1999; LeDoux, 2000; Kamprath and Wotjak, 2004). Unter *Freezing* versteht man die Immobilität oder auch Angststarre, welche durch Gefahren- oder Stress-Situationen ausgelöst werden kann (Blanchard and Blanchard, 1988; Paylor et al., 1994).

Die Versuche wurden in verschiedenen Konditionierungs- und Testkammern (MED Associates; USA, siehe Tabelle 2.1) durchgeführt, mit einer Videokamera aufgenommen und offline das *Freezing*-Verhalten, ausgewertet als Immobilität, mit dem Programm Eventlog untersucht.

Tag/Bezeichnung	Parameter	Kontextbeschaffenheit
Tag 0/Konditionierung	180 s <i>preconditioning</i> -Phase	Kontext A:
	18 s Ton (Sinus-Ton, 9 kHz, 80 dB)	Lichtintensität 2,5 lux Boden: Metallgitter
	2 s Ton + Fußschock (0,7 mA)	Box: quadratisch
	120 s Pause	Reinigungsmittel: 70 % Ethanol
Tag 1/Testing	180 s <i>pretone</i> -Phase	Kontext B:
	180 s Ton (Sinus-Ton, 9 kHz, 80 dB)	Lichtintensität 2,5 lux Boden: Streu Box: Zylinder Reinigungsmittel: Essigsäure
	180 s ohne Ton	Kontext C: Lichtintensität 2,5 lux Boden: Gitter Box: Hexagon Reinigungsmittel: Isoamylacetat
Tag 6/Testing	180 s ohne Ton	Kontext D: Lichtintensität 2,5 lux Boden: Metallgitter, darunter Streu Box: quadratisch Reinigungsmittel: 70 % Ethanol
	180 s <i>pretone</i> -Phase	Kontext B:
	180 s Ton (Sinus-Ton, 9 kHz, 80 dB) 60 s Pause	Lichtintensität 2,5 lux Boden: Streu Box: Zylinder Reinigungsmittel: Essigsäure

Tabelle 2.1: Versuchsaufbau des *fear conditioning*-Tests

Nach der Konditionierung (Tag 0) wurden an Tag 1 und Tag 6 verschiedene Kammern mit unterschiedlichem Geruch und unterschiedlichem Boden mit und ohne Ton getestet. Dargestellt sind die verschiedenen Versuchsbedingungen.

2.2.3 Versuche für Depressions-assoziiertes Verhalten

2.2.3.1 Sukrosepräferenztest

Ein Merkmal einer depressiven Episode ist die Anhedonie, d.h. der Verlust von Interesse und Freude. Als Anhalt für Anhedonie bei Mäusen kann auf die nicht vorhandene Präferenz der Tiere von süßen Lösungen gegenüber Wasser getestet werden. Während des Sukrosepräferenztests hatten die Mäuse 10 h die freie Entscheidung zwischen zwei Flaschen (Flasche A: 2,5 % Sukroselösung, Flasche B: Wasser) an zwei aufeinanderfolgenden Tagen (Strekalova and Steinbusch, 2010). Um mögliche Effekte einer Seitenpräferenz der Trinkflasche zu vermeiden, wurden die Positionen der Flaschen nach

der Hälfte der Zeit vertauscht. Einen Tag vor Beginn des Tests wurden die Mäuse für 2 h mit 2,5 % Sukroslösung habituiert. Der Konsum von Wasser, Sukroslösung und der gesamten Flüssigkeitsmenge wurde durch Wiegen der Flaschen vor und nach Ende des Versuchs gemessen. Die Sukrose-Präferenz wurde für jede Maus als prozentualer Anteil der konsumierten Sukrose-Lösung zum Gesamtanteil der getrunkenen Flüssigkeit beider Tage berechnet.

2.2.3.2 Forced Swim-Test

Mit dem *Forced Swim*-Test (FST) kann depressionsähnliches Verhalten in Form von „*behavioral despair*“ gemessen werden. Jede Maus wurde einzeln für 5 min bei Rotlicht in einen durchsichtigen Zylinder (Höhe 23,5 cm, Durchmesser 16,5 cm) gegeben, der 15 cm hoch mit Wasser einer Temperatur von $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ befüllt war (Steiner et al., 2008). Nach anfänglich heftigen Bewegungen des Tieres nahm die Bewegung ab, bis das Tier eine immobile Körperhaltung (*floating*) einnahm, was einem Aufgeben des Tieres entspricht. Die Zeit, in der das Tier eine immobile Körperhaltung einnimmt, wird als passives *Stress-Coping* interpretiert. Zuvor verabreichte Antidepressiva verringern die Zeit, in der die Tiere während des Tests immobil sind (Porsolt et al., 1978). Jedes Tier wurde gefilmt und die Dauer der Immobilität offline mit dem Programm ANY-MAZE (Stoelting) ausgewertet. Nach jedem Durchgang wurde das Wasser gewechselt.

2.2.3.3 Tail Suspension-Test

Der *Tail Suspension*-Test (TST) dient, ähnlich wie der FST, der Messung depressionsähnlichen Verhaltens. Jede Maus wurde einzeln für 5 min bei Rotlicht an ihrem Schwanz freischwebend fixiert, so dass es ihr nicht möglich war, den Boden oder die Wände zu berühren (Steru et al., 1985). Nach heftigen Bewegungen des Tieres nahm die Bewegung ab, bis das Tier eine immobile Körperhaltung einnahm, was ebenso einem passiven *Stress-Coping* oder „*despair*“ entspricht. Wie beim FST kann auch dieses Verhalten mittels Antidepressiva zugunsten einer Verringerung der Immobilität beeinflusst werden (Steru et al., 1985). Jedes Tier wurde gefilmt. Danach wurde die Dauer der Immobilität offline mit dem Programm ANY-MAZE (Stoelting) ausgewertet.

2.2.3.4 Intracerebroventrikuläre Injektion (ICV) von Kanalblockern

Nach Implantation einer Führungskanüle in den lateralen Ventrikel von Mäusen kann an verschiedenen Zeitpunkten des Versuchsprotokolls eine Injektion von unterschiedlichen Pharmaka erfolgen.

Nach der Betäubung der Maus über eine Inhalationsnarkose (1% Isofluran), wurde der Mausschädel mit Hilfe der sogenannten Ohrdornen in den Stereotakten eingespannt und fixiert. Die Schädeldecke wurde durch einen kleinen Hautschnitt am Schädel freigelegt. Lambda und Bregma wurden mittels 3% H_2O_2 sichtbar gemacht und die Führungskanüle

(8 mm lange 21G Kanülen, Braun) wurde exakt auf der Schnittstelle von Lambda und Bregma justiert. Die daraus resultierenden Koordinaten (ventral, lateral, posterior) wurden abgelesen und die ventrikulären Implantationskoordinaten (abgelesene Werte + Werte für den lateralen Ventrikel, ermittelt von Paxinos und Watson (1992) mit Hilfe des stereotaktischen Atlases) wurden berechnet (Koordinaten des rechten, lateralen Ventrikels: 1,0 mm lateral von der Mittellinie; 0,3 mm posterior von Bregma; 1,2 mm ventral in den Schädel). Mit Hilfe eines Zahnarztbohrers wurden das Kanülenloch und ein weiteres Loch für die Befestigung einer stabilisierenden Schraube gebohrt. Anschließend wurde die Führungskanüle in den Schädel eingebracht und die Kanüle und die Schraube mit Zahnzement am Schädelknochen fixiert. Die Haut um die implantierte Kanüle herum wurde vernäht.

Nach einer einwöchigen Erholungsphase, wobei während der ersten drei Tage das veterinärmedizinische Analgetikum Meloxicam ins Wasser gemischt wurde, konnte den Mäusen für den TST 2 µl Verapamil (2 µg/µl) oder als Kontrolle 2 µl Ringerlösung injiziert werden.

Nach Abschluss der Experimente wurden die Mäuse mit einer Überdosis Isofluran getötet, die Hirne entnommen, Schock gefroren und die richtige Position der Kanülen wurde mittels Nissl-Färbung überprüft.

2.3 Analyse von Neurotransmittern *in vivo* im Hippocampus

2.3.1 *In vivo* Mikrodialyse

Um die Ausschüttung von Neurotransmittern im Hippocampus zu überprüfen und die Veränderung der Neurotransmitterausschüttung nach Stress zu testen, wurden den Mäusen Mikrodialysekanülen in den Hippocampus implantiert.

Nach der Betäubung der Maus über eine Inhalationsnarkose (1% Isofluran), wurde der Mausschädel mit Hilfe der sogenannten Ohrdornen in den Stereotakten eingespannt und fixiert. Die Schädeldecke wurde durch einen kleinen Hautschnitt am Schädel freigelegt. Lambda und Bregma wurden mittels 3% H₂O₂ sichtbar gemacht und die Führungskanüle (MAB 4.15.IC, Microbiotech, mit eingefügtem Dummy als Platzhalter) wurde exakt auf der Schnittstelle von Lambda und Bregma justiert. Die daraus resultierenden Koordinaten (ventral, lateral, posterior) wurden abgelesen und die hippocampalen Implantationskoordinaten (abgelesene Werte + Werte für den ventralen Hippocampus, ermittelt von Paxinos und Watson (1986) mit Hilfe des stereotaktischen Atlases) wurden berechnet (Koordinaten des ventralen Hippocampus: 3,1 mm lateral von der Mittellinie; 2,9 mm posterior von Bregma; 1,1 mm ventral in den Schädel). Mit Hilfe eines Zahnarztbohrers wurden das Kanülenloch und drei weitere Löcher für die Befestigung einer stabilisierenden

Schraube gebohrt. Anschließend wurde die Führungskanüle in den Schädel eingebracht und die Kanüle und die Schrauben mit Zahnzement am Schädelknochen fixiert.

Nach einer einwöchigen Erholungsphase, wobei während der ersten drei Tage das veterinärmedizinische Analgetikum Meloxicam ins Wasser gemischt wurde, konnten die Mäuse für das Mikrodialyse-Experiment vorbereitet werden.

Nach Säuberung der Schläuche des Mikrodialyse-Gerätes (4 h 70 % EtOH, 2 h H₂O, über Nacht Ringerlösung) mit einer Fließgeschwindigkeit von 3 µl/min, wurde die Mikrodialyse-Sonde (MAB 4.15.3.Cu, Microbiotech) an die Mikrodialyse-Schläuche angeschlossen. Die Sonde wurde für 10 min mit Ringerlösung (147.1 mM Na⁺, 2.25 mM Ca²⁺, 4 mM K⁺, 155.6 mM Cl⁻, pH 7.4; Fresenius, Bad Homburg, Germany) inkubiert. Die Maus wurde mit Isofluran betäubt und der Dummy entfernt. Danach wurde die Mikrodialyse-Sonde eingeführt. Die Maus wurde über Nacht an den Dialyse-Aufbau (Sonde und zuführende Schläuche) mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,3 µl/min habituiert. Im Anschluss wurde das Mikrodialyse-Experiment durchgeführt.

Protokoll des Mikrodialyse-Experiments:

- Basalmessung: Abnahme von 6 Mikrodialyse-Proben alle 20 min, Fließgeschwindigkeit 1,5 µl/min (= Basalwert, Volumen jeder Probe 30 µl)
- Akuter Stress: Jedes Tier wurde für 5 min in einen durchsichtigen Zylinder gesetzt (Höhe 23,5 cm, Durchmesser 16,5 cm), der 15 cm hoch mit Wasser einer Temperatur von 25°C ± 1°C befüllt war
- Poststress-Messung: Abnahme von 6 Mikrodialyse-Proben alle 20 min, Fließgeschwindigkeit 1,5 µl/min (= Stresswert, Volumen jeder Probe 30 µl)
- Lagerung der Proben bei -80°C

Nach Abschluss der Experimente wurden die Mäuse mit einer Überdosis Isofluran getötet, die Gehirne entnommen, Schock gefroren und die richtige Position der Sonden überprüft. Dialyseproben von Tieren mit falscher Sondenposition wurden nicht analysiert.

2.3.2 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Die bei -80°C gelagerten Proben der Mikrodialyse wurden innerhalb von 2-3 Wochen nach Durchführung des Mikrodialyse-Experiments analysiert. Mittels Reversed-Phase HPLC gekoppelt mit amperometrischer Detektion wurden die Neurotransmitter Serotonin, Dopamin und Noradrenalin und deren Metaboliten Vanillinmandelsäure, 5-Hydroxyindolylessigsäure und Dihydroxyphenylelessigsäure untersucht. Als flüssiges isokratisches System diente SunFlow100 (SunChrom), als amperometrischer Detektor eine Decade von ANTEC, Leyden. Die mobile Phase beinhaltete 0,09 M Natriumphosphat, 0,05 M Natriumcitrat, 1,7 mM Natriumoctansulfat, 0,05 mM Na-EDTA und 10% Acetonitril (v/v) (pH=3.0, eingestellt mit

10 M NaOH). Die mobile Phase wurde durch einen 0,22 µm dicken Nylonfilter gefiltert und mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 0,6 ml/min durch das System gepumpt. Die Monoamine wurden auf einer analytischen Säule (C18, 150mm x 3,2 mm, 3 µm, YMC-PackProC18, YMC Europe GmbH) getrennt. Detektiert wurden die Proben mit einer Glas-Karbon-Elektrode bei einem Oxidationspotential von +650 mV gegen eine Ag/AgCl Elektrode. Pro Probe wurden 20 µl in das System injiziert. Die Retentionszeiten der unterschiedlichen Monoamine wurden durch Injektion von Referenzlösungen ermittelt. Für die Quantifizierung wurde für jedes Monoamin mittels Referenzkonzentration anhand der Fläche der Peaks eine Standardgleichung bestimmt.

2.4 Präparation von Embryonen

2.4.1 Zygotenpräparation

Für die Präparation von Zygoten an Tag 0.5 *p.c.* wurden heterozygote $Ca_v1.2^{EQ}$ Mäuse über Nacht verpaart und am Folgetag auf Vorhandensein eines Vaginalplugs (Plug+) bei den Weibchen geprüft. Ein Vaginalplug bedeutet, dass die Kopulation erfolgt ist und somit auch die Befruchtung der Eizellen möglich war. Die Plug+-Weibchen wurden separiert und an Tag 0.5 *p.c.* wurde das Ovidukt und der Beginn des Uterus entnommen und in M2-Medium (HEPES-gepuffert, Sigma), versetzt mit Hyaluronidase (0,3 mg/ml, Sigma), gegeben. Nahe dem Infundibulum sind die Zygoten umgeben von Kumuluszellen. Das Ovidukt wurde dort geöffnet, die Zellen wurden heraus geschwemmt und die Kumuluszellen mittels Hyaluronidase verdaut. Die Zygoten wurden mit einer Mikropipette (Transferpipette, 115-124 µm, Biomedical Instruments) in M2-Medium aufgesammelt und einzeln kurz in 1 x PBS gespült. Danach wurden sie in 10 x Taq-Puffer (Genscript) und Proteinase K für 3 h bei 56°C verdaut, 10 min bei 95°C inaktiviert und für eine Genotypisierungs-PCR eingesetzt.

2.4.2 Blastozystenpräparation

Für die Gewinnung der Eizellen im Blastozystenstadium wurden heterozygote $Ca_v1.2^{EQ}$ Mäuse über Nacht verpaart und am Folgetag auf Vorhandensein eines Vaginalplugs (Plug+) bei den Weibchen geprüft. Die Plug+-Weibchen wurden separiert und an Tag 2,5 *p.c.* und Tag 3,5 *p.c.* die Uteri entnommen. Durch Spülen der Uteri in M2-Medium (HEPES-gepuffert, Sigma) wurden die Blastozysten gewonnen, mit einer Mikropipette (Transferpipette, 115-124 µm, Biomedical Instruments) eingesammelt und in 10 x Taq-Puffer (Genscript) und Proteinase K für 3 h bei 56°C verdaut, 10 min bei 95°C inaktiviert und für eine Genotypisierungs-PCR eingesetzt.

2.4.3 Embryonenpräparation von Tag 6.5 p.c. bis Tag 12.5 p.c.

Für die Präparation von Embryonen von Tag 6.5 p.c., 8.5 p.c. und 12.5 p.c. wurden heterozygote $Ca_v1.2^{EQ}$ Mäuse über Nacht verpaart und am Folgetag auf Vorhandensein eines Vaginalplugs (Plug+) bei den Weibchen geprüft. Die Plug+-Weibchen wurden separiert und an den entsprechenden Tagen die Uteri entnommen. Die Embryonen wurden vorsichtig aus dem Uterus präpariert, die Reichert-Membran entfernt, die Embryonen durch Dekapitation euthanasiert, ein kleines Gewebestück des Beines abgenommen und in 10 x Taq-Puffer (Genscript) und Proteinase K für 3 h bei 56°C verdaut, 10 min bei 95°C inaktiviert und für eine Genotypisierungs-PCR eingesetzt.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.5.1.1 Isolierung von genomischer DNS aus Mausgewebe

Aufgrund der Größe der genomischen DNS-Stränge besteht die Gefahr des Zerbrechens dieser Stränge. Daher wird auf Scherkräfte durch Pipettieren und Zentrifugieren verzichtet. Stattdessen wird ein Detergens-haltiger Puffer verwendet, um die Zellmembran zu solubilisieren (10 x Taq-Puffer von Genscript). Für die Genotypisierung der Mäuse wurde DNS aus einer Gewebsbiopsie (Schwanzspitze) isoliert. Dazu wurde das Gewebe über Nacht in einer Mischung aus Wasser, 10 x Taq-Puffer und Proteinase K (89 μ l + 10 μ l + 1 μ l) bei 55°C verdaut. 1 μ l des Verdauungsaftes wurde für die Genotypisierungs-PCR verwendet.

2.5.1.2 Isolierung von RNS aus Gewebe

Um die funktionale Transkription der genomischen DNS in RNS zu untersuchen, wurde RNS aus Mausgewebe isoliert. Nach der Isolation wurde die RNS in cDNS transkribiert. Für das Gewinn der RNS wurden Gehirne verwendet, die nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert wurden. Schwierigkeit der RNS-Isolierung ist die geringe Stabilität der RNS aufgrund der ubiquitär vorkommenden RNasen. Bei der Arbeit mit RNS wird daher mit RNase-freien Arbeitsmaterialien gearbeitet. Wasser wird mit Hilfe von Diethylpyrocarbonat (DEPC, Roth) behandelt, wodurch die Aktivität der RNasen gehemmt wird. Alle benötigten, hitzestabilen Verbrauchsmaterialien werden über Nacht bei 250°C gebacken, um RNasen zu denaturieren. Bei der Extraktion der Gesamt-RNS wird im ersten Schritt das chaotrope Salz Guanidinisothiocyanat eingesetzt, das stark denaturierend auf Proteine und auch auf RNasen wirkt. Anschließend wird die RNS durch phenolische Extraktion von DNS und Proteinen abgetrennt, in Isopropanol präzipitiert, gewaschen und gelöst. Zu 100 mg gemörsertem Gewebe wurden 750 μ l TRIzol (chaotrope Salze, Invitrogen) zugesetzt und auf Eis mit einem Potter homogenisiert. Nach 5 min Inkubation bei

Raumtemperatur wurden 200 µl Phenol-Chloroform-Lösung (Roth) zugegeben, kurz bei Raumtemperatur inkubiert und abzentrifugiert (10 min, 14.000 x g, 4°C). Die oberste Phase (enthält die RNS; DNS und Proteine befinden sich in der Inter- bzw. in der Phenolphase) wurde abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß die darin befindliche RNS mit 500 µl Isopropanol gefällt. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, 14.000 x g, 4°C) entstand ein RNS-Pellet, das zweimal mit Ethanol (70%) gewaschen wurde. Anschließend wurde das Pellet bei 37°C getrocknet, in 20 µl RNase-freiem DEPC-Wasser (1%) gelöst und bei -80°C aufbewahrt. Die RNS konnte nun zur cDNS-Synthese eingesetzt werden.

2.5.1.3 Synthese von cDNS

Bei der Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) wird mit Hilfe des viralen Enzyms Reverse Transkriptase RNS in cDNS umgeschrieben. In dieser Arbeit wurde das SuperScript II Reverse Transcriptase-PCR-Systems (Invitrogen) verwendet. Zunächst wurde die aus Gewebe isolierte RNS mit Oligo-dT-Primern (2,5 mM) bei 70°C für 10 min inkubiert, um die Sekundärstruktur der RNS aufzuschmelzen. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur gehalten, um die Oligo-dT-Primer an den Poly-A+-Schwanz der RNA binden zu lassen. Durch Mischen mit 5 x First Strand Buffer, Dithiothreitol (10 mM), dNTPs (10 mM) und Zugabe von SuperScript II wurde bei 42°C cDNS aus RNS synthetisiert (60 min Inkubation). Bei 95°C wurde das Enzym inhibiert und die entstandenen DNS-RNS-Hybride geschmolzen. Abschließend wurde die RNS durch Zugabe von RNaseH (10 mg/ml) und Inkubation für 30 min bei 37°C abgebaut. Die cDNS diente als Template für PCR-Reaktionen und Sequenzanalysen.

2.5.2 Gelelektrophorese

Agarosegel

Das negativ geladene Ribose-Phosphat-Rückgrat von Nukleinsäuren ermöglicht eine Auftrennung der DNS-Stücke im elektrischen Feld über ein Agarosegel. Dabei wandern die einzelnen DNS-Fragmente entsprechend ihrer Masse und Konformation unterschiedlich schnell Richtung Kathode. Die Wanderungsgeschwindigkeit steigt mit abnehmender Masse und ist ebenfalls abhängig von der Porengröße des Gels. Zur Kontrolle des Elektrophoreseverlaufs wird die DNS mit einem Auftragspuffer versetzt, welcher die Farbstoffe Bromophenolblau und Xylencyanol enthält. Bromophenolblau wandert mit DNS-Fragmenten der Größe 100 bp, Xylencyanol mit Fragmenten der Größe 10 kb. Zur Visualisierung der DNS unter UV-Licht wird dem Gel der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (0,1 – 0,8 µg/ml) beigegeben. Ethidiumbromid interkaliert in die Doppelhelix der DNS, welche somit unter UV-Licht (254 nm) sichtbar wird. Als Elektrophoresepuffer wird 1 x TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer eingesetzt, der auch für die Herstellung der Gele

verwendet wird. Zur Bestimmung der Fragment-Größe wird ein Größenmarker (DNA Molecular Weight Marker X, Roche) verwendet.

Je nach Größe der zu trennenden DNS-Fragmente wurden Gele mit unterschiedlicher Agarosekonzentration (0,5 - 2 %) verwendet. 0,5 – 2 g/v Agarose (Biozym) wurde in einer Mikrowelle mit 1 x TBE-Puffer bei 1000 Watt aufgekocht, auf 50 °C abgekühlt und der klaren, flüssigen Agaroselösung Ethidiumbromid (Sigma) zur Endkonzentration 0,8 µg/ml zugesetzt. Anschließend wurde die Lösung in geeignete Gelschlitzen gegossen. Durch Einsetzen von Kämme entstanden nach dem Aushärten des Gels Probenauftragstaschen. Zum Auftrennen der Proben wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer mit 1 x TBE gesetzt, Proben und Größenstandard aufgetragen und eine Spannung von 10 V/cm Elektrodenabstand angelegt. Nach ausreichender Auftrennung wurde das Gel am GelBiodoc2000 (Biorad) analysiert und für die Dokumentation fotografiert.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zur Auftrennung sehr kleiner Fragmente wurde ein PAGE-Gel verwendet, welches ohne Ethidiumbromid gegossen wird. Bei dieser vertikalen Gelelektrophorese wurden die Proben wie beim Agarosegel mit 6 x Auftragspuffer versetzt, auf das Gel aufgetragen und in 1 x TBE-Puffer zum Einlaufen bei einer Spannung von 110 V für 15 min und anschließend einer Spannung von 250 V für 30 min aufgetrennt. Danach wurde das Gel in Ethidiumbromid-Lösung nachträglich für 20 min gefärbt, die Lösung abgesaugt und das Gel zweimal mit Wasser gewaschen. Die Dokumentation erfolgte am GelBiodoc 2000 (Biorad).

6 x Auftragspuffer	
Ficoll Typ 400	18 g
0,5 M EDTA pH 8,0	1 ml
10x TBE	60 ml
Bromophenolblau (50 mg/ml)	3 ml
Xylencyanol FF (50 mg/ml)	3 ml
H₂O	ad 1000 ml

Polyacrylamid-Gel, 5 %	
Rotiphorese®Gel 29:1	3,8 ml
1x TBE	Ad 30 ml
TEMED	35 µl
APS	80 µl

10 x TBE	
Tris-HCl	540 g
Borsäure	275 g
0,5 M EDTA, pH 8,0	200 ml
H₂O	ad 1000 ml

2.5.3 Reinigung von Nukleinsäuren

Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinen aus wässrigen DNS-Lösungen wurde Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:21:1, Roth) im Verhältnis 1:1 zugegeben, gut gemischt und in einer Mikrozentrifuge für 10 sek bei rpm_{max} zentrifugiert. Es entstanden unterschiedliche Phasen. In der wässrigen Phase blieb die DNS in Lösung und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Alkoholfällung wurde die DNS präzipitiert.

Alkoholfällung

DNS und RNS bilden mit Wassermolekülen aufgrund von polaren Wechselwirkungen eine Hydrathülle und liegen im Wasser gelöst vor. Gibt man eine Mischung aus einwertigen Kationen und Alkohol zu der wässrigen DNS -Lösung, so werden diese Wechselwirkungen zerstört und die DNS bzw. RNS fällt aus. Im Rahmen der Arbeit wurden Isopropanol und Ethanol für die Alkoholfällung verwendet. Bei der Isopropanolfällung wurden 0,6 – 0,8 Volumenanteile Isopropanol zu der DNS-Lösung gegeben, um die DNS bei Raumtemperatur zu präzipitieren. Bei der Fällung mit Ethanol wurde die DNS-Lösung mit 2,5 Volumenteilen Ethanol (100 %) und 1/10 Volumenteil Natriumchlorid (5 M) oder Natriumacetat (3 M) gemischt und über Nacht bei -20°C oder für 30 min bei -80°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei beiden Fällungen für 15 min bei $14.000 \times g$ zentrifugiert, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und schließlich in destilliertem und deionisiertem H_2O gelöst.

2.5.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der Nukleinsäure-Lösungen wurde photometrisch bei einer definierten Wellenlänge quantifiziert (Nanodrop®Spectrophotometer ND-1000, Peqlab). Durch die Bestimmung der optischen Dichte (OD) kann eine Aussage über Konzentration und Reinheit der Lösung getroffen werden. Die DNS-Konzentration wurde bei 260 nm bestimmt. Die Reinheit der Lösung kann durch den Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ ermittelt werden. Bei einem Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 ist von einer Lösung ohne Proteinverunreinigungen auszugehen. Die RNS-Konzentration einer Lösung wird ebenfalls bei 260 nm bestimmt. Hier gilt für eine reine RNS-Lösung der Quotient $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ von 2,0.

2.5.5 Sequenzanalyse von DNS

Um sicherzugehen, dass durch PCR-Reaktionen keine Punktmutationen bzw. in der cDNS oder genomischer DNS eines *knock-in*-Tieres die gewünschte Mutation an der richtigen Stelle vorhanden ist, wurden Sequenzanalysen von der Firma MWG Eurofins, Ebersberg, durchgeführt.

2.5.6 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist ein Verfahren, um bestimmte DNS-Sequenzen gezielt zu amplifizieren oder zu modifizieren (Mullis and Faloona, 1987). Sie besteht grundsätzlich aus drei Schritten: Denaturierung, Annealing und Elongation. Bei 95°C wird die doppelsträngige DNS aufgeschmolzen (Denaturierung). An die entstandenen Einzelstränge lagern sich während des Annealings Oligonukleotidprimer an. Dabei werden die Primer so gewählt, dass sie das zu amplifizierende DNS-Stück vom einen Ende her am kodierenden, vom anderen Ende her am nicht-kodierenden DNS-Strang flankieren. Die Annealing-Temperatur richtet sich dabei nach der Schmelztemperatur der Primer, sie liegt normalerweise zwischen 45°C und 60°C. Beim letzten Schritt, der Elongation, synthetisiert die DNS-Polymerase ausgehend von dem kurzen, doppelsträngigen DNS-Primer-Hybrid den fehlenden komplementären DNS-Strang in 5'→3'-Richtung. Die Elongationstemperatur liegt in der Regel bei 72°C, die Elongationszeit ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragments. Diese Abfolge aus Denaturierung, Annealing und Elongation wird mehrere Male wiederholt, rein rechnerisch findet dabei in jedem Zyklus eine Verdopplung des DNS-Fragmentes statt, so dass im Idealfall bei x Zyklen pro Ausgangsfragment 2^{x-1} Amplifikate entstehen.

2.5.6.1 Verwendete Polymerase

Taq-Polymerase (Genscript)

Die Taq-Polymerase wurde für die Genotypisierung der Mäuse verwendet. Die DNS-Syntheserate liegt bei ca. 2800 Nukleotiden pro Minute. Diese hohe Effizienz hat durch Fehlen der 3' - 5'-Korrekturfunktion eine hohe Fehlerrate zum Nachteil (0,1% falsch eingebaute Basen).

Reaktionsansatz Taq-Polymerase	
dNTPs (1,25 mM)	4 µl
10xTaq-Puffer	2,5 µl
Primer 1(10 µM)	1,25 µl
Primer 2 (10 µM)	1,25 µl
Taq-Polymerase (2 U/µl)	0,25 µl
DNS	1 µl
H ₂ O	ad 25 µl

PCR-Protokoll Taq-Polymerase		
95 °C	1 min	
95 °C	30 sec	} 35 x
45-60 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	

2.6 Biochemische Methoden

2.6.1 Proteingewinnung aus murinem Gewebe mittels SDS/Tris-Aufschluss

Das der Maus entnommene Gewebe wurde unverzüglich in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde es in einem Mörser auf Trockeneis zwischen mehreren Lagen Aluminiumfolie fein zermahlen. Das so entstandene Pulver wurde in 2 % SDS/50 mM Tris, pH 7,4 (90°C) gelöst (100µl/10 mg Gewebe) und 15 min bei 95°C unter gelegentlichem Vortexen gekocht. Danach wurde 5 min bei 20.000 x g zentrifugiert und der Überstand bei -80°C eingefroren.

2.6.2 Membranpräparation aus murinem Gewebe

Das der Maus entnommene Gewebe wurde unverzüglich in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde es in einem Mörser auf Trockeneis zwischen mehreren Lagen Aluminiumfolie fein zermahlen. Aus dem Pulver wurden die Membranproteine durch den Aufschluss mit einem geeigneten Detergens und mehreren Zentrifugationsschritten gewonnen. Das Detergens verdrängt die Phospholipide der Zellmembran und interagiert mit den Membranproteinen. Es bilden sich Micellen, die das Protein einschließen und in Lösung halten.

Membranpräp-Puffer pH 7,4	
EDTA	20 mM
EGTA	20 mM
Tris	10 mM
NaCl	300 mM

Solubilisierungspuffer	
EDTA	20 mM
EGTA	10 mM
Tris/HCl pH 7,4	10 mM
Deoxycholot	1 %

Inhibitor Cocktail pro 1 ml Puffer	
Calpain-Inhibitor I (Roche)	8 µg
Calpain-Inhibitor II (Roche)	8 µg
Protease Inhibitor Mixture (Sigma)	2 µl
PMSF 200 mM (Fluka)	1 µl

Auf 100 mg gemörsertes Gewebe wurde 1 ml Membranpräp-Puffer (+ Inhibitoren) zugegeben und mit Hilfe eines Ultraturrax (Polytron PT 1200, Kinematica AG) dreimal für je 10 sek auf Eis homogenisiert. Bei 4.000 x g und 4°C wurden große Zellfragmente für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt. Der klare Überstand wurde bei 100.000 x g 30 min in einer Ultrazentrifuge bei 4°C zentrifugiert, um Membranproteine von zytosolischen Proteinen abzutrennen. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Membranprotein-Pellet in Solubilisierungspuffer (+ Inhibitoren) gelöst und durch Pottern homogenisiert. Nach 20 min Durchmischen im Überkopfschüttler bei 4°C wurde durch erneute Ultrazentrifugation

(100.000 x g, 30 min, 4°C) eine reine Membranprotein-Fraktion im Überstand erhalten. Die Membranpräparation wurde in Aliquots bei -80°C gelagert.

2.6.3 Aufkonzentration von Membranproteinen

Um die Konzentration von Membranproteinen zu erhöhen und das Volumen der Lösung zu verringern, wurden Filter der Firma PALL, Life Sciences mit der Einheit 30K, red verwendet. Um das Säulchen zu reinigen, wurde zunächst 1 ml 70% Ethanol in das Röhrchen gegeben und 45 min bei 5.000 x g und 4°C zentrifugiert. Danach wurden 500 µl H₂O auf die Säule gegeben und 30 min bei 5.000 x g und 4°C zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Probe (maximal 800 µl) in das Röhrchen gegeben und 45 min bei 5.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der verbleibende Überstand wurde abgenommen, die Konzentration mittels BCA-Reihe bestimmt.

2.6.4 Calmodulin(CaM)-Sephrose-Präzipitation

Um Interaktionen von Proteinen mit Calmodulin zu bestätigen, wurde eine Präzipitation mit Calmodulin-Sephrose (Calmodulin Sepharose 4B, GE Healthcare) durchgeführt. Dabei wurden zunächst 200 µl CaM-Sephrose abgenommen, 10 sek in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die CaM-Sephrose dreimal mit Binde-Puffer, versetzt mit Protease-Inhibitoren, gewaschen. 100 µl der Membranpräparation wurden zu der Sepharose gegeben und nach Zugabe von 900 µM Ca²⁺ 20 h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Nach Abzentrifugieren in der Tischzentrifuge wurde der Überstand abgenommen (= nicht gebundene Proteine) und die CaM-Sephrose fünfmal mit Binde-Puffer inklusive Inhibitoren je 10 min bei 4°C im Überkopfschüttler gewaschen. Die Waschfraktionen wurden aufgefangen, sie enthielten ungebundene Proteine. Anschließend wurden alle ungebundenen Fraktionen mit 4 x Laemmli ohne DTT und auch die CaM-Sephrose mit 35 µl 4 x Laemmli ohne DTT versetzt, 5 min bei 95°C gekocht und 5 min bei 4°C und 5.000 x g zentrifugiert, um die gebundenen Proteine zu eluieren. Die Analyse erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blotting.

Binde-Puffer pH 7,4	
Tris/HCl pH 7,5	50 mM
NaCl	50 mM
CaCl ₂	2 mM

Inhibitor Cocktail pro 1 ml Puffer	
Calpain-Inhibitor I (Roche)	8 µg
Calpain-Inhibitor II (Roche)	8 µg
Protease Inhibitor Mixture (Sigma)	2 µl
PMSF 200 mM (Fluka)	1 µl

2.6.5 Biotinylierung von Membranproteinen

Die Biotinylierung von Membranproteinen ist eine Methode, um die Proteinexpression in der Membran lebender Zellen zu bestimmen. Dazu wurde zunächst das Gehirn einer Maus entnommen, kurz in aCSF-Lösung (95% O₂-Sättigung) inkubiert und danach am Vibratom in aCSF-Lösung (95% O₂-Sättigung) bei 4°C in 350 µm dicke Sektionen geschnitten. Schnitte, die den Hippocampus beinhalteten, wurden zur Fortführung des Experimentes benutzt. Die Schnitte wurden eine Stunde in aCSF-Lösung (95% O₂-Sättigung) bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde ein Aliquot Sulfo-NHS-SS-Biotin des *Cell Surface Protein Isolation Kit* (Perbio Science, Deutschland) in 12 ml aCSF (95% O₂-Sättigung) gelöst (1 mg/ml), die Hirnschnitte in die Biotinylierungslösung überführt und 45 min bei 4°C unter leichter Schüttelbewegung und Sauerstoffsättigung begast. Durch Zugabe von 500 µl *Quenching Buffer* wurde die Reaktion bei 4°C für 10 min gestoppt, die Schnitte wurden dreimal in kaltem aCSF gewaschen und mit 500 µl *Lysisbuffer* inklusive Inhibitoren versetzt. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren und zusätzlicher Behandlung für 5 sek mit Ultraschall wurde das Gewebe homogenisiert. Die gelösten Schnitte wurden 30 min auf Eis inkubiert und alle 5 min für 5 sek mit dem Vortexer gemischt und mit Ultraschall homogenisiert. Im Anschluss wurden die Proben bei 8.000 x g für 20 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt.

500 µl NeutrAvidin Agarose wurden auf ein Säulchen gegeben und 1 min in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die NeutrAvidin Agarose wurde dreimal mit je 500 µl *Wash Buffer* gewaschen, der Durchfluss wurde verworfen. Das Proteinlysate wurde über Nacht bei 4°C mit den NeutrAvidin *beads* auf einem Drehrad inkubiert. Die Probe wurde 1 min mit der Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Durchfluss wurde aufbewahrt (= nicht gebundene Proteine). Die NeutrAvidin Agarose wurde viermal mit je 500 µl *Wash Buffer* (+ Inhibitoren) gewaschen, der Durchfluss wurde jeweils aufgehoben (= nicht gebundene Proteine). Um die gebundenen Proteine zu eluieren, wurden 400 µl 4 x Laemmli + DTT auf die *beads* gegeben, bei 95°C 5 min gekocht und 2 min in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die Analyse erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blotting.

aCSF-Lösung	
NaCl	124 mM
KCl	3 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	3 mM
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	1,3 mM
Dextrose	10 mM
CaCl ₂	2 mM
Hepes	10 mM
H ₂ O	Ad 1000 ml
mit NaOH pH 7,4	

Hepes-Stocklösung	
Hepes	1 mM
H ₂ O	Ad 100 ml
mit NaOH pH 7,35	

2.6.6 Quantitative Proteinbestimmung mittels BCA-Methode

Für das Quantifizieren der Konzentration einer Proteinlösung wurde der *Pierce BCA Protein Assay* (Pierce, Thermo Scientific) verwendet. Dieser Test beruht auf einer Redoxreaktion in Kombination mit einer photometrischen Detektion eines farbigen Komplexes aus Cu⁺-Ionen mit Bicinchoninsäure (BCA). Dabei werden zunächst Cu²⁺-Ionen von Proteinen komplex gebunden und dadurch im alkalischen Medium zu Cu⁺ reduziert (Biuret-Reaktion). Die einwertigen Kupferionen bilden mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure einen Chelatkomplex, dessen Absorption bei 540 nm detektiert und photometrisch gemessen werden kann. Für die Quantifizierung wurde eine BSA-Standardreihe (0,5 – 5 µg BSA) hergestellt, mit deren Hilfe die Kalibriergleichung erstellt wurde. Die Proteinlösung wurde ebenfalls verdünnt (1:100 und 1:200). 50 µl der Verdünnungen wurden mit je 200 µl BCA-Lösung (BCA Protein Assay Reagent I und II, 50:1) gemischt und für 60 min bei 60°C inkubiert. Reagenz A enthält die Bicinchoninsäure, Reagenz B die Cu²⁺-Ionen. Anschließend wurden die Proben in eine Mikrotiterplatte überführt und die Absorption der Proben bei 540 nm gegen H₂O als Blank-Wert bestimmt (Titertek Multiskan MCC/340). Alle Proteinkonzentrationen wurden in Doppelbestimmungen ermittelt, ebenso die Werte der Standardgerade. Anhand der Absorption der Standardreihe kann die Proteinkonzentration der Proteinlösung errechnet werden.

2.6.7 Western Blot

Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht geschah über SDS-Gelelektrophorese. Die Denaturierung erfolgt in der Regel durch Natriumdodecylsulfat (SDS) und ist notwendig, da Proteine die Fähigkeit besitzen, Primär-, Sekundär- und Tertiär-Strukturen einzugehen, die eine elektrophoretische Auftrennung stark beeinflussen. Durch Kochen der Proteinlösung in SDS-haltigem 4 x Laemmli-Puffer werden diese Strukturen aufgebrochen. SDS, ein stark anionisches Detergens, überdeckt die Eigenladung der

Material und Methoden

Proteine und das dem Auftragspuffer zugesetzte Dithiothreitol (DTT) spaltet Disulfidbrücken zwischen Cysteinen (Laemmli, 1970). Die Proteine liegen nun in einem SDS-Komplex mit einer negativen Gesamtladung vor. Diese Behandlung stellt sicher, dass die Trennung aufgrund der Masse und nicht aufgrund der Faltung der Proteine stattfindet. Das verwendete Gel besteht aus einem engmaschigen Trenn- und einem weitmaschigen Sammelgel.

Für die Herstellung des SDS-Polyacrylamidgels (SDS-PAGE) wurden zunächst alle Komponenten für das Trenngel gemischt, danach wurde es zwischen zwei Glasscheiben (Gelgießapparatur, Biorad) gegossen und mit 100% Ethanol überschichtet, um eine exakte Trennlinie zu erhalten. TEMED und APS starten als Radikalbildner die Polymerisierungsreaktion des Acrylamids. Das Gel polymerisiert innerhalb von etwa 30 min. Der Ethanol wurde entfernt und auf das ausgehärtete Trenngel wurde nun das Sammelgel gegossen. Durch Einsetzen eines Kammes wurden Probestaschen erzeugt. Nach Erstarren des Sammelgels wurde das Gel in die MiniProtean3Cell Gelkammer (Biorad) eingesetzt, die Gelkammer mit 1 x SDS-Elektrophorese-Puffer befüllt und die Protein-Proben und 5 µl des Größenstandards (Precision Plus Protein Standard, Biorad) aufgetragen. Die Protein-Proben wurden zuvor mit 4 x Laemmli-Puffer versetzt, mit H₂O auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für 30 min bei 50 V und für ca. 60 min bei 120 V. Die Laufzeit endete, sobald die durch den Farbstoff Bromophenolblau markierte Lauffront am Ende des Gels angekommen war.

4x TrisCl/SDS, pH 8,8		4x TrisCl/ SDS, pH 6,8		10x TBS	
Tris	18,2 g	Tris	6,04 g	TrisBase	12,1 g
SDS	0,4 g	SDS	0,4 g	NaCl	87,6 g
H ₂ O	ad 100 ml	H ₂ O	ad 100 ml	H ₂ O	ad 1000 ml
mit HCl _{conc.} pH 8,8		mit HCl _{conc.} pH 6,8		mit HCl _{conc.} pH 8,2, autoklavieren	

10x SDS-Elektrophorese-Puffer		Trenngel 10%		Sammelgel	
TrisBase	30,2 g	Acrylamid 29:1	1,67 ml	Acrylamid 29:1	325 µl
Glycin	144 g	4x TrisCl/SDS, pH 8,8	1,25 ml	4x TrisCl/SDS, pH 6,8	625 µl
SDS	10 g	H ₂ O	2,08 ml	H ₂ O	1,525 ml
H ₂ O	Ad 1000 ml	TEMED	5 µl	TEMED	3 µl
		APS 20 %	12,5 µl	APS 20 %	6 µl

4x Auftragspuffer (Laemmli)	
1M TrisHCl pH 6,7	10 ml
DTT	2 mg
20 % SDS	12,5 ml
Bromophenolblau	20 mg
Glycerin	20 ml

1x TBST	
10x TBS	100 ml
Tween 20	1 ml
H ₂ O	ad 1000 ml

Western Blot

Zur Identifizierung der aufgetrennten Proteine wurden diese zunächst durch das *semi dry*-Verfahren aus dem SDS-PAGE-Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon-P, Millipore, Porengröße 0,45 µm) transferiert, auf der sie mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert werden können (Towbin et al., 1979; Burnette, 1981). Dazu wurden 10 Filterpapiere (Whatman 3 MM) in geeigneten Puffern durchtränkt. Der Aufbau erfolgte folgendermaßen: 3 Papiere, getränkt in Anodenpuffer I, wurden auf die Anodenplatte gelegt, darauf wurden 2 Papiere, getränkt in Anodenpuffer II, geschichtet und mit einer Stripette glatt gestrichen, um Luftblasen zu vermeiden. Darauf wurde die Membran, nachdem sie kurz in Methanol und Anodenpuffer II geschwenkt worden war, gelegt. Auf die Membran wurde das Gel gegeben, darauf wurden 5 Papiere, getränkt in Kathodenpuffer, geschichtet und wiederum alles glatt gestrichen. Nach Aufsetzen der Kathodenplatte wurde durch Anlegen einer definierten Spannung (0,8 mA/cm²) der Transfer von Proteinen auf die Membran ermöglicht. Nach 90 min wurde die Membran über Nacht in eine *Blocking*-Lösung gelegt (3 % BSA in 1 x TBST) und geschüttelt, um unspezifische Bindestellen abzusättigen.

Am Folgetag wurde die Membran kurz in 1 x TBST gewaschen und im Anschluss mit dem primären Antikörper in der entsprechenden Verdünnung 90 min lang bei Raumtemperatur auf dem Taumelmischer (Neolab) inkubiert. Im Anschluss wurde der Blot dreimal für je 10 min mit 1 x TBST + 1% BSA gewaschen und danach für 1 h bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden sekundären Antikörper inkubiert, an den das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt ist. Der sekundäre Antikörper reagiert mit dem Fc-Fragment des primären Antikörpers. Danach wurde der Blot gewaschen (zweimal je 5 min mit 1 x TBST + 1 % BSA, zweimal je 10 min mit 1 x TBST).

Die Detektion erfolgte mit dem *Western Lightning Chemiluminescence Reagent* (Perkin Elmer, Chemiluminescence Reagent und Oxidizing Reagent, 1:1), welcher Luminol enthält, ein Substrat der Meerrettichperoxidase. Dazu wurde die Membran 1 min mit der Lösung inkubiert, wobei die Meerrettichperoxidase eine Reaktion katalysiert, bei der Luminol oxidiert wird und dabei eine Lumineszenz entsteht. Die Membran wurde in einer Photokassette in Klarsichtfolie eingeschlagen, ein Photofilm (Hyperfilm ECL, GE) 10 – 20 min aufgelegt und anschließend in der Entwicklermaschine Curix 60 (AGFA) entwickelt.

Quantifiziert wurden die Banden mit dem Programm EZQuant-Gel Version 2.1.

Anodenpuffer I, pH 10,4		Anodenpuffer II, pH 10,4		Kathodenpuffer	
Tris	36,3 g	Tris	3,03 g	Tris	3,03 g
Methanol	100 ml	Methanol	100 ml	6-N-Hexansäure	5,2 g
H ₂ O	ad 1000 ml	H ₂ O	ad 1000 ml	Methanol	200 ml
NaCl	300 mM	Deoxycholat	1 %	H ₂ O	ad 1000 ml

2.7 Histologische Untersuchungen

Um die Morphologie von verschiedenen Geweben nach unterschiedlichen Gesichtspunkten zu untersuchen, wurden verschiedene Färbetechniken angewandt.

2.7.1 Perfusion

Die Tiere wurden zunächst intraperitoneal (pro Maus 100 µl der Narkoselösung aus 200 µl Ketavet 100 mg/ml, 200 µl Rompun 2%, 75 µl Vetranquil 1%, 50 µl Heparin 1% und 1,05 ml Natriumchlorid 0,9%) narkotisiert. Im Anschluss daran wurden die Mäuse in einer Halteapparatur fixiert und das Fell mit 70% EtOH befeuchtet. Das Fell von Thorax und Abdomen wurde abgelöst und der Brustkorb geöffnet. Es erfolgte eine Inzision in den rechten Vorhof, danach wurde eine Kanüle (gauge 23) in die linke Herzkammer eingeführt. Um das Blut aus dem Gefäßkreislauf zu entfernen, wurde zunächst mit 1 x PBS für ca. 10 min über die Kanüle vorgespült, bis die austretende Flüssigkeit klar war. Darauf wurde für 10 min mit 4% PFA in *Sorenson's Buffer* perfundiert, die Gehirne wurden entnommen und zur Nachfixierung in 4% PFA in *Sorenson's Buffer* über Nacht bei 4°C inkubiert.

Lösung A	
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	31,61 g
H ₂ O	Ad 1000 ml
autoklavieren	

Lösung B	
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	27,60 g
H ₂ O	Ad 1000 ml
pH 7,4, autoklavieren	

0,2 M <i>Sorenson's Buffer</i>
40,5 ml Lösung A + 9,5 ml Lösung B

2.7.2 Anfertigung von Paraffinschnitten

Die entnommenen Gewebe wurden kurz in 1 x PBS gewaschen und über Nacht in *Sorenson's Buffer* + 4 % PFA bei 4°C bei leichter Schüttelbewegung inkubiert. Nach Waschen des Gewebes in 1 x PBS für 1 h wurden die Gewebe in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe dehydriert (je 1 h in 50 %, 70 %, 95 % und 100 % Ethanol bei 4°C). Im Anschluss wurden die Gewebe je 1 h bei Raumtemperatur in 50/50 (v/v) Ethanol/Toluol und 100 % Toluol inkubiert. Die Gewebe wurden jeweils 1 h bei 60°C in Paraplast I-III (Sigma) inkubiert, in frisches Paraplast eingebettet und bei 4°C verfestigt. Mit einem Mikrotom

(Microm HM 340) wurden 10 µm dicke Schnitte angefertigt, die auf einen Polylysin-Objektträger (Menzel) aufgezogen wurden. Die Schnitte wurden bei -80°C bis zu ihrer Verwendung aufbewahrt.

2.7.3 Nissl-Färbung

Bei der Nissl-Färbung werden Teile des Zellkerns und der extranukleären RNS blau gefärbt. Die Färbung erfolgte an Paraffinschnitten, die zunächst 30 min bei Raumtemperatur aufgetaut und im Anschluss kurz in einen 37°C Trockenschrank gegeben worden waren. Danach wurden sie zweimal je 30 min in 100 % Toluol entparaffiniert, in einer absteigenden Ethanol-Reihe (100%, 95 %, 90 %, 70 % und 50 % Ethanol) je 5 min rehydriert und 5 min in 1 x PBS inkubiert. Die Objektträger wurden 2 min in 1 % Cresylviolettlösung getaucht, 1 min in H₂O gewaschen, kurz in 70 % Ethanol, dann in 70 % Ethanol + 30 mM Essigsäure zum Entfärben und Fixieren gegeben. Danach wurden die Schnitte kurz in 70 %, 95 % und 100 % Ethanol getaucht, 2-5 min in Xylol inkubiert und in Einbettmedium (DePeX-Harz) gegeben.

Cresylviolettlösung	
Cresylviolett	10 g
H ₂ O	Ad 1000 ml

2.7.4 Golgi-Cox Färbung

Um die Morphologie bestimmter Gehirnregionen genauer untersuchen zu können, wurde eine Golgi-Cox-Färbung mit dem *FD Rapid Golgi Stain™ Kit* (FD Neurotechnologies) durchgeführt. Durch diese Methode können Neuronen und Gliazellen angefärbt werden und es können Unterschiede in Dendriten und dendritischen *spines* detektiert werden, sofern vorhanden.

Alle benötigten Reagenzien und Lösungen waren im Kit bereitgestellt, der Versuch wurde genau nach dem im Kit vorhandenen Protokoll durchgeführt.

Die 80 µm dicken Schnitte wurden auf mit Gelatine überzogenen Objektträgern aufgezogen.

Gelatinelösung	
Gelatine	1,5 g
Chrom-Natrium-Sulfat	0,25 g
H ₂ O	Ad 500 ml
Auf 60°C erhitzen	

2.7.5 Neuronalentwicklung und Proliferation mittels BrdU- und Ki67-Färbung

Um Auskunft über die neuronale Entwicklung und Proliferation geben zu können, wurde den Tieren 100 mg/kg (Körpergewicht) BrdU (5'-bromo-2'-deoxyuridin) intraperitoneal injiziert.

Die Mäuse wurden entweder direkt am Tag der Injektion (Tag 1; 2 Stunden nach Injektion) oder nach 18 Tagen (Tag 18) getötet, um die Überlebensrate der Neuronen bestimmen zu können. Alle Mäuse wurden perfundiert. BrdU ist ein Thymidin-Analogon und inkorporiert in sich teilenden Zellen während der DNS-Synthese. Parallel dazu wurde eine Ki67-Färbung durchgeführt. Ki67 ist ein endogener Proliferationsmarker, der in sich teilenden Zellen während des Großteils der Mitose (nicht in der frühen G1-Phase und der Ruhephase) exprimiert wird.

Aus den perfundierten Gehirnen wurden am Mikrotom 40 µm dicke Schnitte hergestellt. Die Schnitte wurden dreimal für je 15 min in 0,1 M Tris Puffer (TBS, pH 7,5) gewaschen. Danach wurden sie zuerst in 2 M HCl bei 37°C für 30 min unter Schütteln zur DNS-Denaturierung inkubiert, im Anschluss in 0,1 M Boratpuffer für 10 min bei Raumtemperatur, und innerhalb 90 min sechsmal in 0,1 M TBS bei Raumtemperatur auf dem Schüttler gewaschen. Anschließend wurden sie in 3% Normalserum in 0,1 M TBS mit 0,25% Triton-X (TBS++) für 60 min geblockt und für 72 h im primären Antikörper gegen BrdU oder gegen Ki67 in TBS++ in der gewünschten Verdünnung inkubiert.

Danach wurden die Schnitte dreimal in 0,1 M TBS für jeweils 15 min gewaschen, 30 min in TBS++ inkubiert und schließlich für 120 min mit dem sekundären Antikörper in TBS++ geschüttelt. Die Schnitte wurden dreimal für 15 min gewaschen, auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 4°C getrocknet. Die Analyse erfolgte über ein Fluoreszenzmikroskop, alle Ki67 bzw. BrdU positiven Zellen im Hippocampus wurden ausgezählt und die Anzahl der gefärbten Zellen an Tag 1 ins Verhältnis zur Anzahl der positiven Zellen an Tag 18 gesetzt.

0,1 M TBS	
0,1 M Tris	12,1 g
150 mM NaCl	8,76 g
H ₂ O	ad 1000 ml
mit HCl _{conc.} pH 7,5, autoklavieren	

0,1 M Boratpuffer	
0,1 M H ₃ BO ₃	3,09 g
H ₂ O	ad 500 ml
mit 2 M NaOH pH 8,5	

2.8 Statistik

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwerts dargestellt. Die statistischen Auswertungen wurden durch *t*-Tests, ANOVA (wiederholte Messungen, nicht paarweise Vergleiche) und dem Dunnet *ad hoc* Test durchgeführt, um Unterschiede zwischen bestimmten Zeitpunkten zu evaluieren. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ gewählt.

3 Ergebnisse

3.1 Grundcharakterisierung der $Ca_v1.2^{+/EQ}$ Maus

Zunächst wurden heterozygote Tiere ($Ca_v1.2^{+/EQ}$ Tiere), die ein normales *Cacna1c* Allel und ein Allel mit der I1624E Mutation global im gesamten Körper besaßen, gegen Wildtypen ($Ca_v1.2^{+/+}$ Tiere) untersucht, um eine genauere Aussage über mögliche Effekte der I/E Mutation in heterozygoten Tieren treffen zu können.

3.1.1 Embryonale Letalität

Da homozygote $Ca_v1.2^{EQ/EQ}$ Tiere embryonal letal sind, sollte der genaue Zeitpunkt des Todes bestimmt werden. Dazu wurden Embryonen verschiedener embryonaler Entwicklungszeitpunkte präpariert (Tag 0,5 *p.c.*, Tag 2,5 *p.c.*, Tag 6,5 *p.c.*, Tag 8,5 *p.c.*, Tag 12,5 *p.c.*), Gewebestücke bzw. Blastozysten oder Zygoten mit Proteinase K verdaut und anschließend mittels einer PCR mit den Primern EQ_{for} und EQ_{rev} genotypisiert. Tiere, die heterozygot für die I1624E Mutation waren, zeigten je eine Bande mit 544 bp (*knock-in*-Bande mit *loxP*-Stelle) und eine Bande mit 439 bp (Wildtyp-Bande). Wildtypen zeigten eine Bande der Größe 439 bp, während bei homozygoten $Ca_v1.2^{EQ/EQ}$ Tieren nur eine Bande von 544 bp (*knock-in*-Bande mit *loxP*-Stelle) zu finden sein sollte. Pro Zeitpunkt wurden 10 schwangeren $Ca_v1.2^{+/EQ}$ Weibchen, die mit heterozygoten $Ca_v1.2^{+/EQ}$ Männchen verpaart worden waren, die Embryonen entnommen und diese genotypisiert. Von Tag 2,5 *p.c.* bis Tag 12,5 *p.c.* wurden heterozygote $Ca_v1.2^{+/EQ}$ Embryonen und Wildtypen identifiziert, allerdings keine homozygoten Embryonen (siehe Abbildung 3.1 (a) und (b)). Zygoten zeigten immer die Wildtyp- und die *knock-in*-Bande, was auf eine Verunreinigung durch mütterliches Gewebe bei der Präparation der Zygoten aus den Uteri der heterozygoten $Ca_v1.2^{+/EQ}$ Weibchen schließen ließ. Homozygote Embryonen sterben vor Tag 2,5 *p.c.* ab, was bedeutet, dass die I1624E Mutation einen extrem schwerwiegenden Phänotyp hervorruft.

Ergebnisse

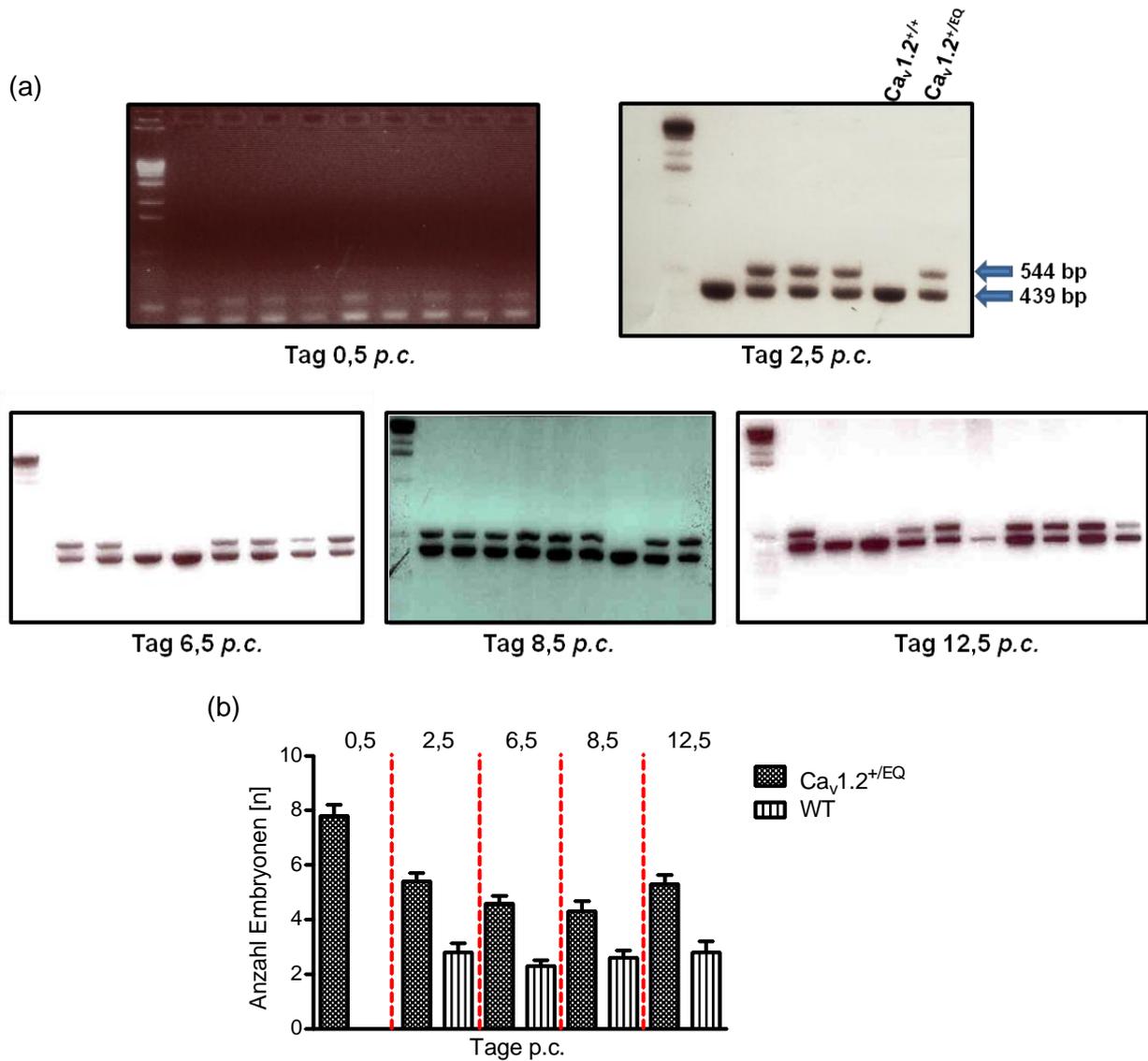


Abbildung 3.1: Genotypisierungs-PCR der präparierten Embryonen von Tag 0,5 p.c., Tag 2,5 p.c., Tag 6,5 p.c., Tag 8,5 p.c. und Tag 12,5 p.c.

Zu sehen sind (a) die *knock-in*-Bande (544 bp) und die Wildtyp-Bande (439 bp) der heterozygoten bzw. Wildtyp-Embryonen aus je einer Mutter zu jedem Zeitpunkt, allerdings keine Bande von homozygoten *knock-in*-Embryonen. Diese sterben in einem sehr frühen Embryonalstadium vor Tag 2,5 p.c. (b) zeigt die Statistik aller präparierten und genotypisierten Embryonen.

3.1.2 Postnatale Entwicklung

Heterozygote $Ca_v1.2^{+/EQ}$ Tiere zeigten äußerlich keine Unterschiede zu den aus denselben Verpaarungen hervorgegangenen Wildtypen. Auch das Körpergewicht, welches über 7 Wochen lang gemessen wurde, war zu den Wildtypen unverändert (siehe Abbildung 3.2).

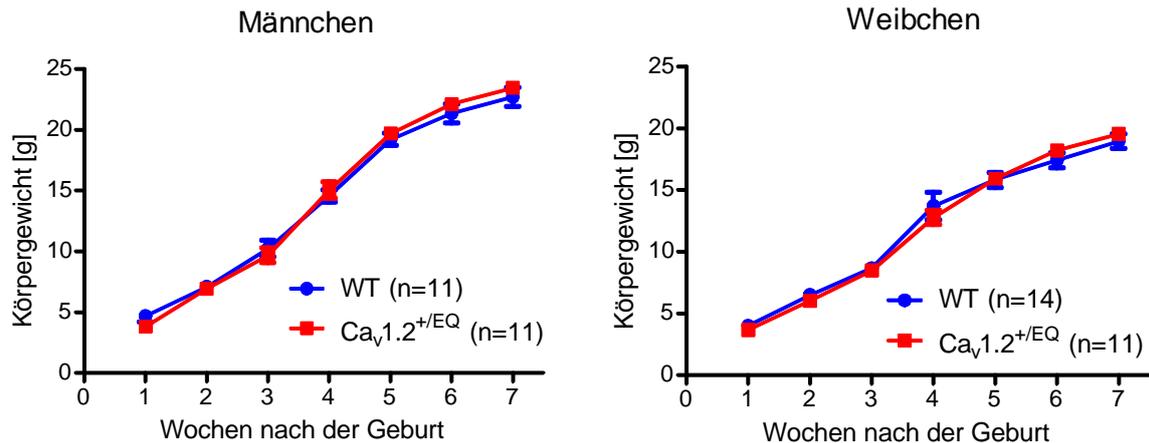


Abbildung 3.2: Gewichtsstatistik

Das Gewicht der Tiere wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten von Geburt an ermittelt und ein zeitlicher Verlauf erstellt. Links: Gewicht der Männchen; rechts: Gewicht der Weibchen. WT: Wildtyp ($Ca_v1.2^{+/+}$), $Ca_v1.2^{+/EQ}$: heterozygote I1426E Maus.

3.1.3 Proteinexpression

Es wurde untersucht, ob aufgrund der mutierten DNS-Sequenz und der noch vorhandenen *loxP*-Stelle die Expression des $Ca_v1.2$ Kanals in der Membran der Zellen von Herz und Gehirn verändert wird. Nach einer Membranpräparation aus Herz- und Hirngewebe wurde mittels Western Blot auf einem 10%igen Polyacrylamid-Gel mit einem Antikörper gegen die α_{1C} -Untereinheit die Expression des $Ca_v1.2$ Kanals in Wildtyp- und heterozygoten $Ca_v1.2^{+/EQ}$ -Tieren überprüft. Die α_{1C} -Untereinheit des $Ca_v1.2$ Komplexes ist ca. 270 kDa groß. In den heterozygoten $Ca_v1.2^{+/EQ}$ -Tieren war weder im Herzen noch im Gehirn ein signifikanter Unterschied in der Membrankonzentration des $Ca_v1.2$ Proteins zu den Kontrollen zu finden (normalisiert auf β_1 -Adrenorezeptor im Herzen, normalisiert auf MAPK im Gehirn) (siehe Abbildung 3.3 (a) und (b)). Als Ladekontrolle diente im Herzen der β_1 -Adrenorezeptor, im Gehirn die MAP-Kinase (MAPK).

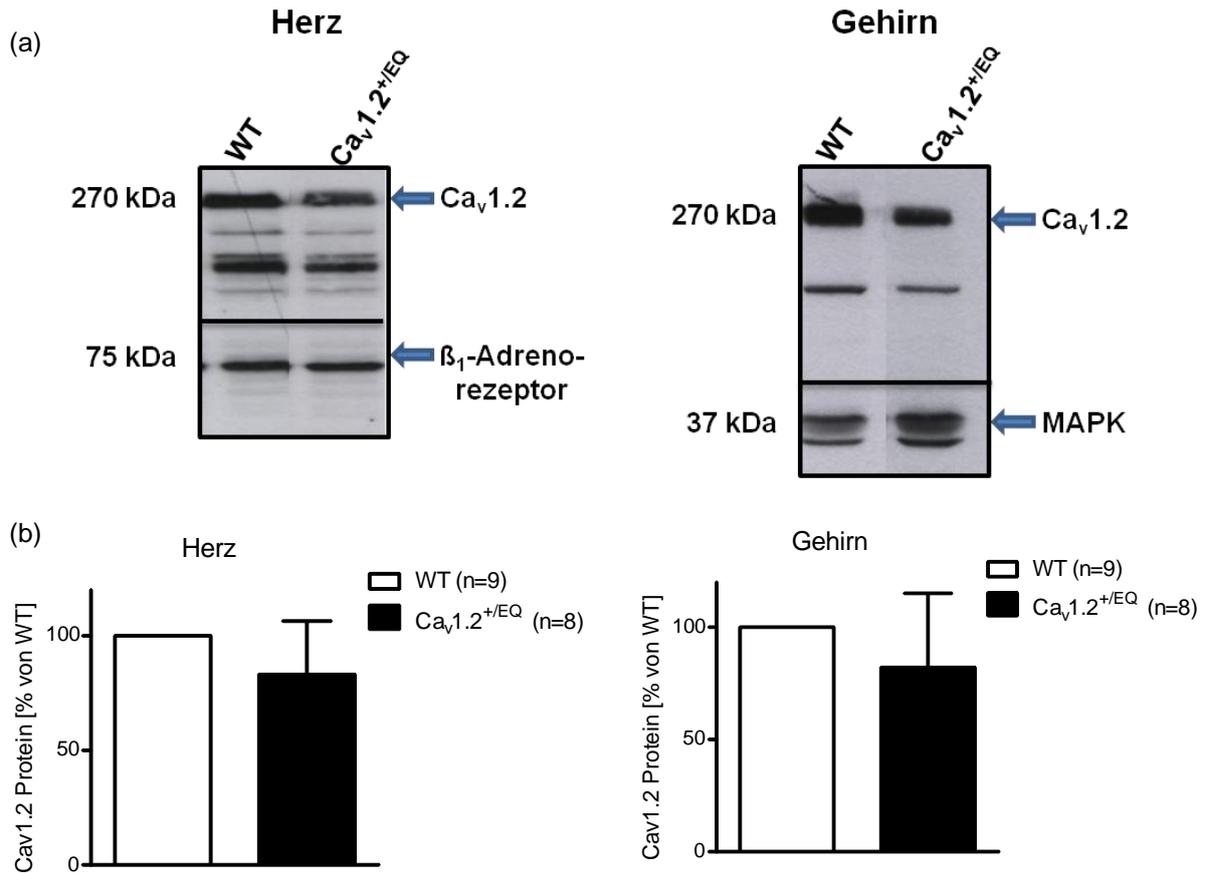


Abbildung 3.3: Proteinexpression des Ca_v1.2 Kanals in Herz und Gehirn

(a) Repräsentative Western Blot Analyse des Ca_v1.2 Kanals von Membranpräparationen aus Herz und Gehirn. (b) Statistische Auswertung: In heterozygoten Ca_v1.2^{+/EQ} Tieren war im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen (WT) kein signifikanter Unterschied in der Membrankonzentration des Ca_v1.2 Kanals im Herzen und im Gehirn zu finden. Die Ca_v1.2-Expression in den heterozygoten Ca_v1.2^{+/EQ} Tieren ist angegeben als Prozent von WT-Kontrolle (normalisiert auf β₁-Adrenorezeptor im Herz, bzw. auf MAPK im Gehirn).

3.2 Grundcharakterisierung der gehirnspezifischen Ca_v1.2^{EQ/L2} Nestin^{+Cre} Maus

Homozygote Ca_v1.2^{EQ/EQ} Tiere sind nicht lebensfähig und sterben früh in der embryonalen Entwicklung. Um die Bedeutung der I1624E Mutation im Gehirn zu erforschen, wurden gehirnspezifische Ca_v1.2^{EQ/L2} Nestin^{+Cre} *knock-in*-Tiere (KI) generiert und alle weiteren Experimente mit diesen Tieren durchgeführt. Als Kontrollen wurden Ca_v1.2^{+L2} Nestin^{+Cre} Tiere (Ctr) verwendet.

3.2.1 Postnatale Entwicklung

Kontroll- und *knock-in*-Tiere wurden über einen Zeitraum von 6 Wochen gewogen und zeigten signifikante Unterschiede im Körpergewicht. Sowohl weibliche als auch männliche *knock-in*-Tiere waren leichter im Vergleich zu ihren Geschwistertieren (Weibchen: Zeit [Wochen nach Geburt]: F(4,48)=194.8, p<0.001; Gewicht [g]: Ctr vs KI: F(1,12)=15.6, p=0.002; Interaktion Zeit/Genotyp: F(4,48)=6.2, p<0.001) (Männchen: Zeit [Wochen nach

Geburt]: $F(4,44)=351.5$, $p<0.001$; Gewicht [g]: Ctr vs KI: $F(1,11)=20.1$, $p=0.001$; Interaktion Zeit/Genotyp: $F(4,44)=4.1$, $p=0.007$) (siehe Abbildung 3.4 (a)). Die Retardierung der Entwicklung ist auf die I1624E Mutation zurückzuführen, allerdings entsteht die Verzögerung erst nach der Geburt, d.h. im Mutterleib werden alle Embryonen gleichmäßig versorgt. Im Alter von 3 Monaten haben weibliche und männliche KI Tiere dasselbe Gewicht wie ihre Kontrollgeschwister (siehe Abbildung 3.4 (b)).

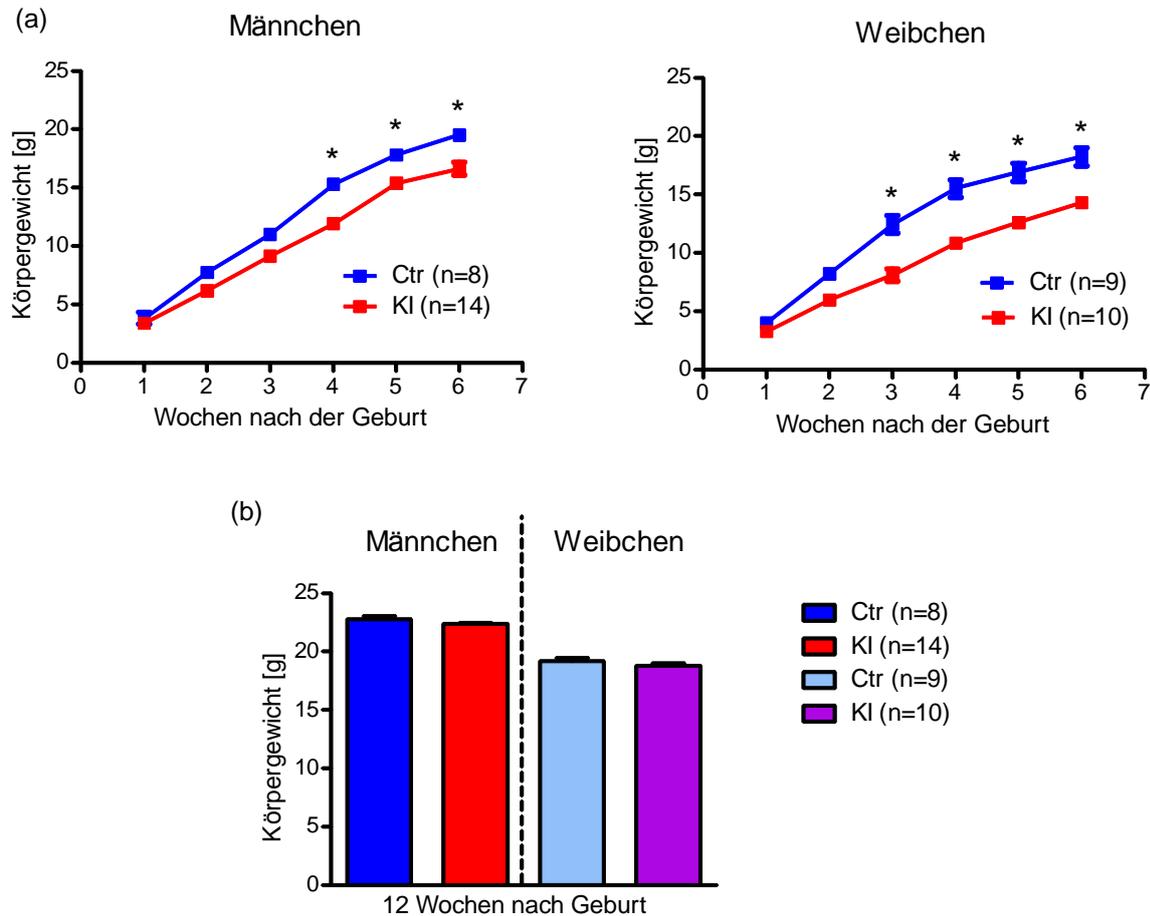


Abbildung 3.4: Gewichtsstatistik

Das Gewicht der Tiere wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten von Geburt an ermittelt und ein zeitlicher Verlauf erstellt. (a) Die Gewichtszunahme der KI Tiere (KI: $Ca_v1.2^{EQ/L2} Nestin^{+/Cre}$) im Vergleich zu den Kontrollen (Ctr: $Ca_v1.2^{+/L2} Nestin^{+/Cre}$) war signifikant geringer über die ersten 6 Wochen nach der Geburt. Links: Gewicht der Männchen; rechts: Gewicht der Weibchen. (b) Ab einem Alter von 3 Monaten war dieser Gewichtsunterschied bei beiden Geschlechtern nicht mehr vorhanden.

3.2.2 Proteinexpression des $Ca_v1.2$ -Kanals

Auch hier wurde untersucht, ob aufgrund der mutierten DNS-Sequenz und der noch vorhandenen *loxP*-Stelle die Expression des $Ca_v1.2$ Kanals in der Membran verändert wird. Zunächst wurden Gehirne von Kontroll- und *knock-in*-Mäusen mittels SDS/Tris-Präparation aufgeschlossen und 100 μ g der Proben über ein 10%iges Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Detektion mit dem Anti- $Ca_v1.2$ -Antikörper ergab eine sehr stark reduzierte Expression des Gesamtproteins in KI Tieren im Vergleich zu Kontroll-Tieren (siehe Abbildung 3.5 (a)).

Auch in Membranpräparationen aus Hirngewebe wurde nur eine schwache Bande der α_{1C} -Untereinheit in *knock-in*-Tieren detektiert (siehe Abbildung 3.5 (b)). Der $Ca_v1.2$ Kanal wurde in Membranen von KI Tieren nur noch zu ca. 15-20 % exprimiert (normalisiert auf MAPK) (siehe Abbildung 3.5 (c)).

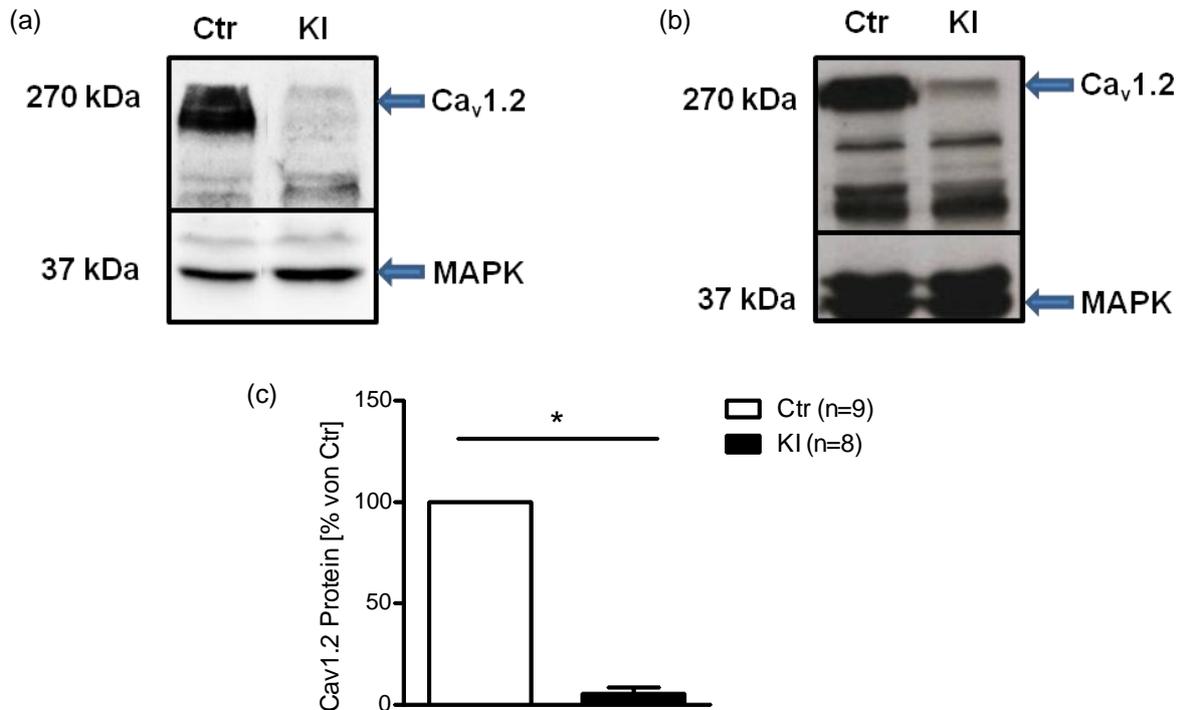


Abbildung 3.5: Proteinexpression des $Ca_v1.2$ Kanals im Gehirn

Repräsentative Western Blot Analyse von SDS/Tris-Präparationen (a) und Membranpräparationen (b) aus Gehirn: In *knock-in*-Tieren (KI: $Ca_v1.2^{EQ/L2} Nestin^{+/Cre}$) war eine starke Reduktion des $Ca_v1.2$ Kanals im Gehirn zu finden im Vergleich zu Kontroll-Tieren (Ctr: $Ca_v1.2^{+/L2} Nestin^{+/Cre}$). (c) Statistische Auswertung: Die $Ca_v1.2$ Kanal-Expression in den KI Tieren ist angegeben als Prozent von Ctr (normalisiert auf MAPK).

Um sicher zu gehen, dass der $Ca_v1.2$ Kanal in den *knock-in*-Mäusen aufgrund der Mutation keine geringere Stabilität aufweist und daher während der SDS/Tris-Präparation oder der Membranpräparation schneller abgebaut wird als der Wildtypkanal, wurden an hippocampalen Hirnschnitten von Kontroll-Tieren und KI Tieren die Membranproteine von intakten Zellen biotinyliert. Aufgrund dieser Biotinylierung von Membranproteinen an lebenden Zellen kann der an der Zelloberfläche exprimierte $Ca_v1.2$ Kanal direkt nachgewiesen werden ohne vorherigen Aufschluss der Zellen. Auch mit diesem Versuch konnte eine geringere Expression des mutierten $Ca_v1.2$ Kanals im Gehirn der KI Tiere im Vergleich zur Expression des Kanals im Gehirn der Kontroll-Tiere gezeigt werden (siehe Abbildung 3.6).

Ergebnisse

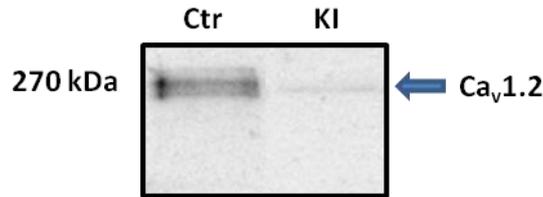


Abbildung 3.6: Proteinexpression des $Ca_v1.2$ Kanals in der Membran von Zellen im Gehirn nach Biotinylierung

Western Blot Analyse einer Biotinylierung aus hippocampalen Gewebsschnitten: In *knock-in*-Tieren (KI: $Ca_v1.2^{EQ/L2} Nestin^{+/Cre}$) war eine starke Reduktion des $Ca_v1.2$ Kanals im Gehirn im Vergleich zu Kontroll-Tieren (Ctr: $Ca_v1.2^{+/L2} Nestin^{+/Cre}$) zu finden.

3.2.3 mRNA-Level von $Ca_v1.2$

Aufgrund der starken Reduktion der $Ca_v1.2$ Kanal-Expression in den KI Tieren wurde untersucht, ob dies auch für die mRNA-Expression des *Cacna1c* Gens zutrifft. Dazu wurde mRNA aus Gehirnen von *knock-in*- und Kontroll-Tieren isoliert. Die mRNA wurde mittels semiquantitativer RT-PCR mit HighFidelity Polymerase in cDNS umgeschrieben. Diese wurde als Matrizen-DNS bei einer Taq-PCR-Reaktion mit verschiedenen Zykluslängen (27-35) eingesetzt, bei der für $Ca_v1.2$ spezifische Primer (VS9, VS18) sowie Primer für HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase, $HPRT_{for}$, $HPRT_{rev}$) als interne Kontrolle verwendet wurden. Über die Menge an cDNS, die proportional zur Menge an mRNA sein sollte, kann somit eine Aussage über Expression des *Cacna1c* Gens getroffen werden. Hier ergaben sich jedoch keine Unterschiede für den mRNA-Level des *Cacna1c* Gens in beiden Genotypen (siehe Abbildung 3.7 (a) und (b)).

Ergebnisse

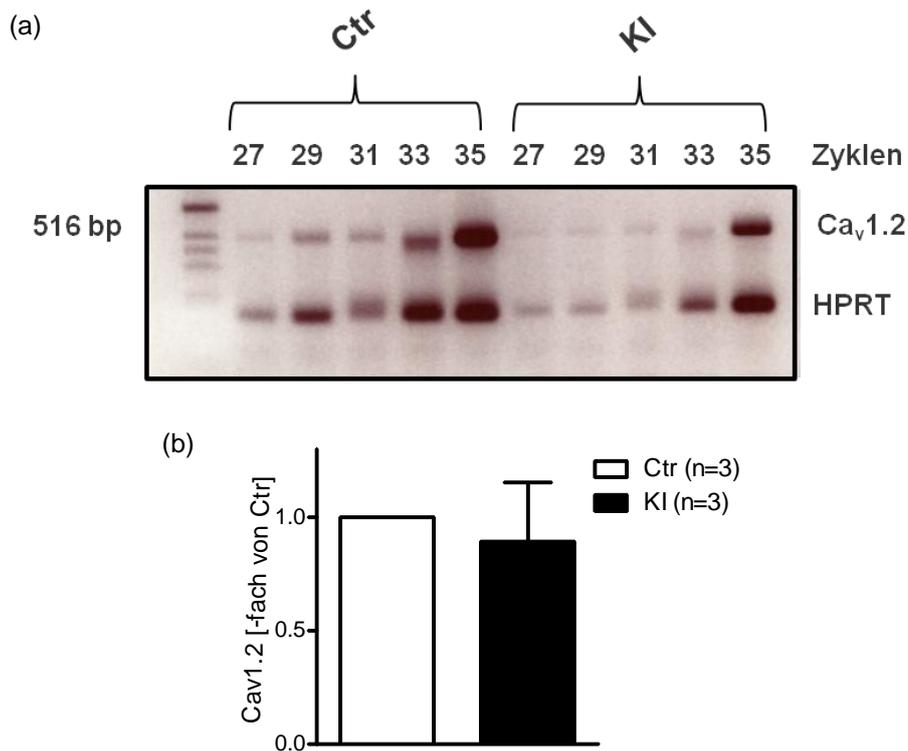


Abbildung 3.7: mRNA-Expression des *Cacna1c* Gens im Gehirn

(a) Repräsentative PCR auf mRNA des *Cacna1c* Gens, die in cDNS umgeschrieben worden war. In *knock-in*-Tieren (KI: $Ca_v1.2^{EQ/L2}$ Nestin^{+Cre}) und Kontroll-Tieren (Ctr: $Ca_v1.2^{+/L2}$ Nestin^{+Cre}) war kein signifikanter Unterschied zu finden. HPRT diente als Kontrollgen. (b) Statistische Auswertung (normalisiert auf HPRT).

3.2.4 Proteinexpression des $Ca_v1.3$ Kanals

Bereits früher wurde gezeigt, dass der Verlust des $Ca_v1.2$ Proteins im embryonalen Herzen zu einer gesteigerten Expression des $Ca_v1.3$ Calciumkanals führte (Seisenberger et al., 2000; Xu et al., 2003). Aufgrund des sehr geringen $Ca_v1.2$ Proteinlevels im Gehirn der *knock-in*-Mäuse im Vergleich zu den Kontroll-Tieren wurde überprüft, ob sich die Expression des $Ca_v1.3$ Calciumkanals im Gehirn in den *knock-in*-Tieren verändert hatte. Mit einem Western Blot wurde das $Ca_v1.3$ Protein in Membranpräparationen aus Gehirnen von KI Tieren und Kontrollen mit einem Antikörper gegen den $Ca_v1.3$ Calciumkanal detektiert (siehe Abbildung 3.8). Es konnte kein Unterschied in der Expression festgestellt werden.

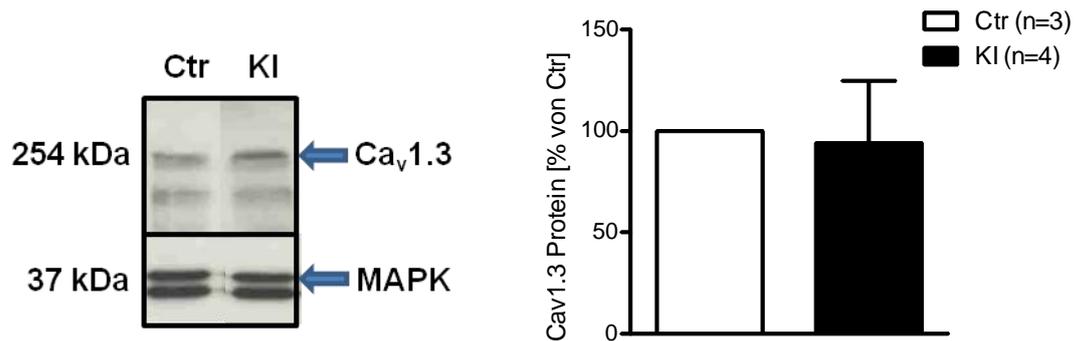


Abbildung 3.8: Proteinexpression des Ca_v1.3 Kanals im Gehirn

Links: Repräsentative Western Blot Analyse einer Membranpräparation: In *knock-in*-Tieren (KI: Ca_v1.2^{EQ/L2} Nestin^{+Cre}) und Kontroll-Tieren (Ctr: Ca_v1.2^{+L2} Nestin^{+Cre}) war kein Unterschied in der Expression des Ca_v1.3 Kanals zu finden. Als Ladekontrolle diente MAPK. Rechts: Statistische Auswertung: Die Ca_v1.3 Kanal-Expression in den KI Tieren ist angegeben als Prozent von Ctr (normalisiert auf MAPK).

3.2.5 Präassoziation von Calmodulin an den C-Terminus des Ca_v1.2 Proteins

Mehrere Studien zeigten, dass Calmodulin in *Xenopus* Oocyten und *in vitro* in HEK293T-Zellen präassoziiert am C-Terminus des Ca_v1.2 Kanals vorliegt (Zuhlke et al., 1999; Erickson et al., 2001; Pitt et al., 2001; Erickson et al., 2003; Kim et al., 2004b). Neben der Hauptbindestelle am IQ-Motiv wurden noch zusätzliche Bindestellen im C-Terminus des Ca_v1.2-Kanals gefunden (Pate et al., 2000; Mouton et al., 2001; Pitt et al., 2001), die generell als A-Region (Pitt et al., 2001) und CB-Region (auch preIQ-Region) (Pate et al., 2000) bezeichnet werden. Beide Regionen liegen N-terminal vom IQ-Motiv. Die genaue Bedeutung dieser Regionen für die Modulation des Ca_v1.2 Kanals ist noch unklar.

Auch apoCaM scheint an diesen Regionen binden zu können. Da Calmodulin aufgrund der I1624E Mutation nicht mehr am EQ-Motiv binden kann, wurde untersucht, ob Calmodulin in der Maus am Ca_v1.2 Kanal präassoziiert vorliegen kann. Dazu wurde das Ca_v1.2 Protein aus einer Membranpräparation mit Calmodulin-Sepharose in An- oder Abwesenheit von Ca²⁺-Ionen präzipitiert. Da die Ca_v1.2-Konzentrationen aus Membranpräparationen von KI Tieren sehr wenig Protein enthielten, wurden fünf Membranpräparationen von KI Tieren zusammengeführt, aufgereinigt und für den Versuch eingesetzt. Sowohl mit als auch ohne Ca²⁺-Ionen konnte der Kanal mit der Calmodulin-Sepharose präzipitiert werden. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden alle Präzipitate fünfmal gewaschen und die Waschfraktionen zur Kontrolle mit einem Western Blot analysiert. In der unspezifischen Fraktion war die Menge an Ca_v1.2 Kanal enthalten, die während der Präzipitation mit der CaM-Sepharose nicht gebunden wurde (siehe Abbildung 3.9). CaM und apoCaM können beide am Ca_v1.2 Calciumkanal binden, auch wenn die Bindestelle am IQ-Motiv zerstört ist. Allerdings ist die genaue Bindestelle noch unklar.

Ergebnisse

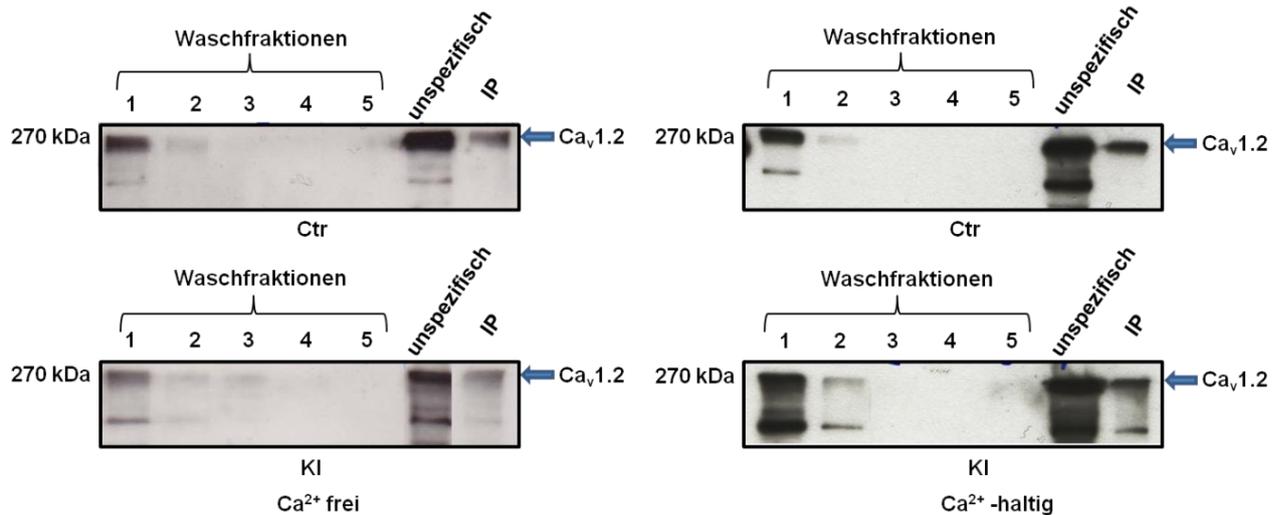


Abbildung 3.9: Präassoziation des Ca_v1.2 Kanals mit Calmodulin in Abhängigkeit von Ca²⁺-Ionen

Western Blot Analyse einer Präzipitation mit CaM-Sepharose: In *knock-in*-Tieren (KI: Ca_v1.2^{EQ/L2} Nestin^{+ /Cre}) und Kontroll-Tieren (Ctr: Ca_v1.2^{+ /L2} Nestin^{+ /Cre}) konnte sowohl ohne Ca²⁺ (linke Seite) als auch mit Ca²⁺ (rechte Seite) Calmodulin mit dem Ca_v1.2 Kanal interagieren.

3.3 Morphologische Untersuchungen

3.3.1 Grundcharakterisierung mittels Nissl-Färbung

Die Gehirne der KI Tiere und der Kontroll-Tiere wurden auf grundsätzliche morphologische Veränderungen untersucht. Hierfür wurde an jeweils 7 *knock-in*- und 7 Kontroll-Tieren im Alter von 6-8 Monaten eine Nissl-Färbung durchgeführt und sämtliche Areale auf Auffälligkeiten hin untersucht. Von besonderem Interesse waren die Regionen, in denen der Ca_v1.2 Calciumkanal stark exprimiert wurde (Hippocampus, Amygdala, Cerebellum, Bulbus Olfactorius). In den *knock-in*-Tieren zeigten sich allerdings keine groben morphologischen Veränderungen. Exemplarisch ist der Hippocampus in verschiedenen Auflösungen dargestellt (siehe Abbildung 3.10).

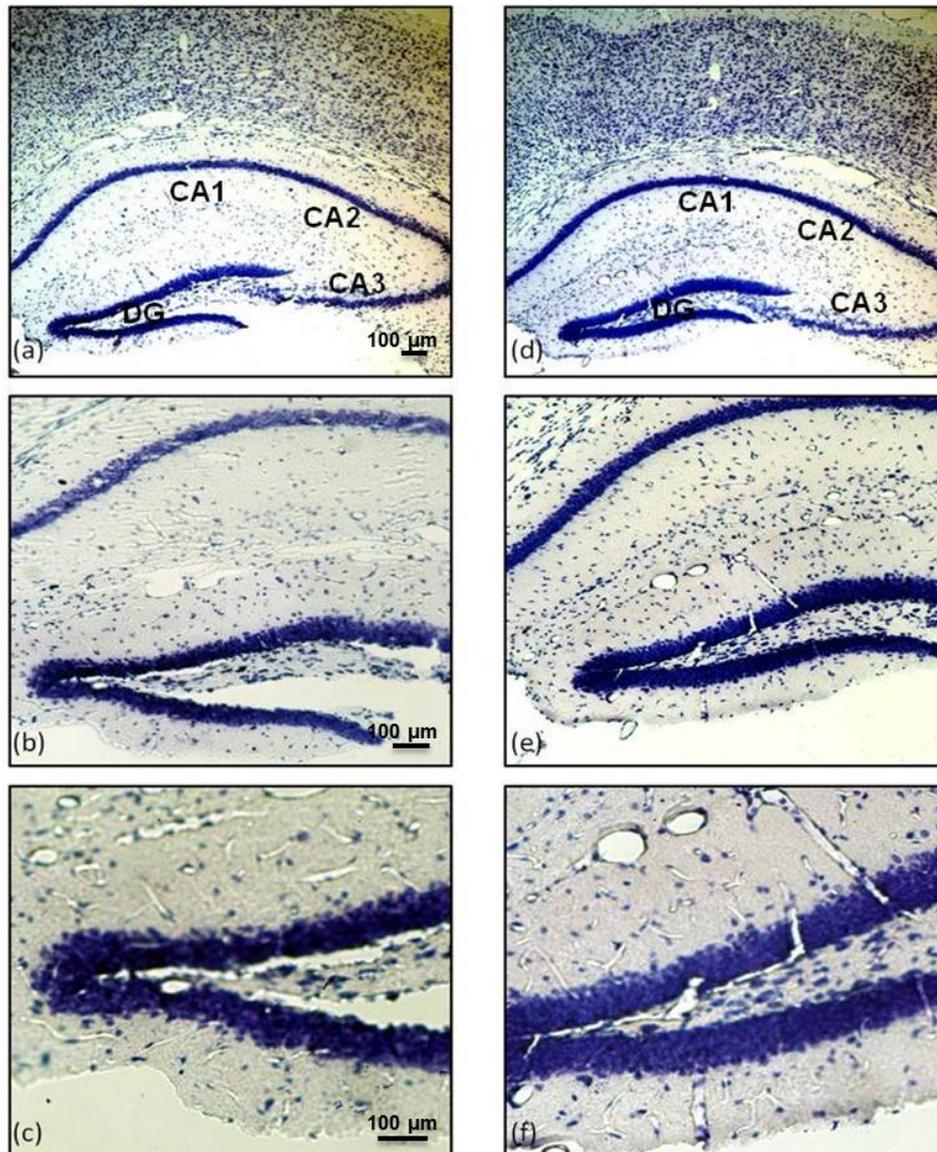


Abbildung 3.10: Morphologische Untersuchungen mittels Nissl-Färbung

Sagittale Hirnschnitte im Bereich des dorsalen Hippocampus von Kontrollen (Ctr: $Ca_v1.2^{+/L2} Nestin^{+/Cre}$) (a-c) und *knock-in*-Tieren (KI: $Ca_v1.2^{EQ/L2} Nestin^{+/Cre}$) (d-f) wurden mittels Nissl-Färbung angefärbt. Zwischen Kontroll-Tieren und *knock-in*-Tieren waren keine groben morphologischen Unterschiede im Hippocampus zu finden. Eingezeichnet in (a) und (d) sind die CA1-, CA2- und CA3-Regionen, sowie der *Gyrus dentatus* (DG, *dentate gyrus*). Vergrößerungen: (a), (d): 5 x; (b), (e): 10 x; (c), (f): 20 x

3.3.2 Golgi Cox-Färbung

Durch die Golgi Cox-Färbung ist es möglich, eine detailliertere Aussage über die Morphologie der verschiedenen Gehirnregionen als mit anderen Methoden, beispielsweise der Nissl-Färbung, zu treffen. Neuronen und Gliazellen können spezifisch angefärbt werden und Veränderungen in Dendriten und Axonen können detektiert werden. Ausgewertet wurde der Hippocampus, da diese Region eine wichtige Rolle bei den später durchgeführten Verhaltenstests spielt, und dort der $Ca_v1.2$ Kanal exprimiert wird. Pro Tiergruppe wurden 10 männliche Tiere im Alter von sechs Monaten verwendet.

Bei fünffacher Vergrößerung war zu erkennen, dass im Hippocampus der Kontrollen (siehe Abbildung 3.11 (a)) mehr Neuronen angefärbt wurden als im Hippocampus der *knock-in*-Tiere (siehe Abbildung 3.11 (b)). Wichtig hierbei war, dass alle Schnitte der beiden Tiergruppen gleichzeitig gefärbt wurden, um Effekte aufgrund unterschiedlicher Färbungen an verschiedenen Tagen zu verhindern.

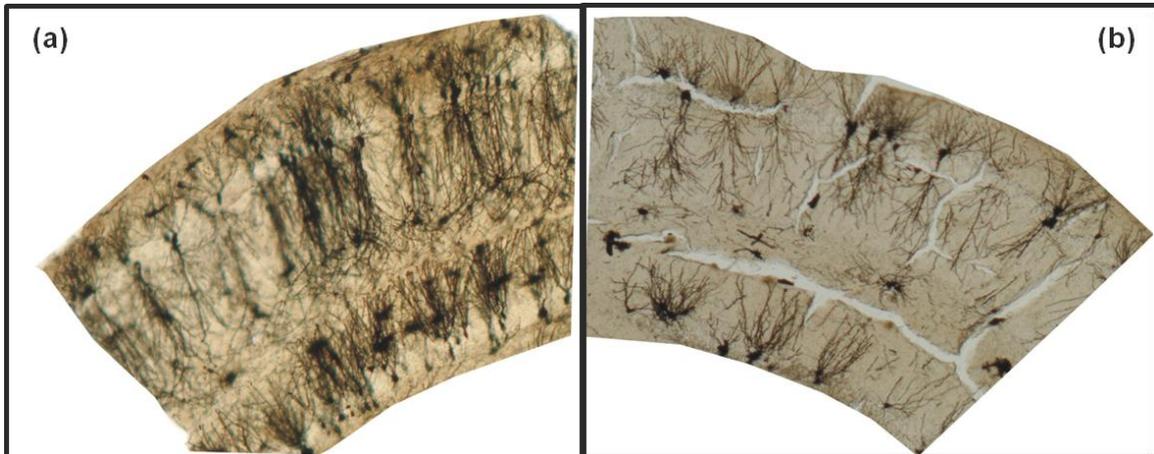


Abbildung 3.11: Morphologische Untersuchungen mittels Golgi Cox-Färbung

Zwischen (a) Kontroll-Tieren (Ctr: $Ca_v1.2^{+/L2} Nestin^{+/Cre}$) und (b) *knock-in*-Tieren (KI: $Ca_v1.2^{EQ/L2} Nestin^{+/Cre}$) waren Unterschiede in der Golgi-Cox-Färbung im Hippocampus zu sehen. Vergrößerung: 5 x

Die Auswertung der Pyramidenzellen in der *Gyrus dentatus* Region des Hippocampus erfolgte mit der sogenannten Sholl-Methode (Sholl, 1955). Dabei wurde die Länge der einzelnen Dendritenbäume (5-11 Neuronen pro Tier) mit Hilfe von Sholl-Ringen (Abstand zwischen den einzelnen Ringen 30 μm) bei 40 x und 100 x Vergrößerung mit dem Mikroskop Axiovert 135 bestimmt. Die Verzweigungszahl der dendritischen Äste und die Anzahl der *spines* in den dendritischen Ästen wurden ermittelt. Die Dendritenlängen der Pyramidenzellen waren nicht signifikant unterschiedlich in beiden Genotypen ($t=1.731$, $p=0.1005$), ebenso wenig die Gesamtanzahl der *spines* von KI Tieren und Kontrollen ($t=0.3825$, $p=0.7065$). Allerdings war die Verteilung der *spines* in den einzelnen Sholl-Ringen bei beiden Genotypen signifikant unterschiedlich: in den ersten sechs Sholl-Ringen wurden signifikant mehr *spines* bei Kontroll-Tieren gefunden als bei *knock-in*-Tieren (*spines*/Neuron [n]: $F=21.55$, $p<0.0001$; Shollringe [n]: $F=9.242$, $p<0.0001$). In den Ringen 7 bis 17 war kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der *spines* vorhanden (siehe Abbildung 3.12).

Ergebnisse

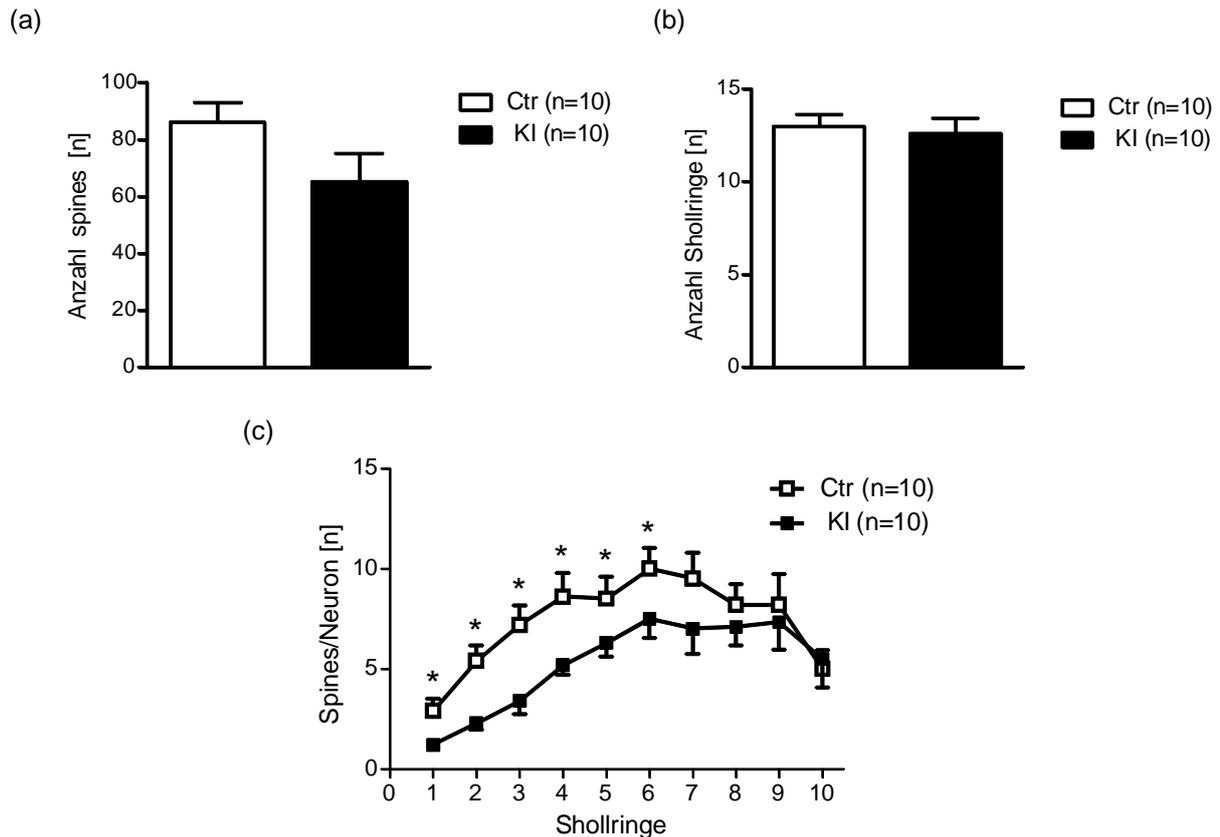


Abbildung 3.12: Golgi Cox-Färbung der Neuronen der CA1 Region im Hippocampus

In der Golgi Cox-Färbung war bei Kontroll-Tieren (Ctr: $Ca_v1.2^{+/L2} Nestin^{+/Cre}$) und *knock-in*-Tieren (KI: $Ca_v1.2^{EQ/L2} Nestin^{+/Cre}$) kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der *spines* pro Neuron (a) und in der Länge der Dendriten (b) zu finden. Bei Analyse der einzelnen Shollringe war allerdings ein signifikanter Unterschied in den Ringen 1-6 vorhanden (c). KIs zeigten weniger *spines* als die Ctr.

3.3.3 Neuronalentwicklung und Proliferation

Ein Marker, um die Neuronalentwicklung zu messen, ist BrdU. BrdU wird in sich teilende Zellen inkorporiert. Damit kann die Proliferationsrate von Neuronen bestimmt werden. Um zu sehen, wie viele Neuronen tatsächlich überleben, wurden KI Tiere und Kontroll-Tiere an Tag 1 mit BrdU intraperitoneal injiziert und 2 Stunden nach Injektion (n=5 je Genotyp) oder 18 Tage (Tag 18; n=5 je Genotyp) später perfundiert, dekapitiert und die Gehirne am Mikrotom geschnitten. BrdU-positive Zellen im Bereich des Hippocampus wurden ausgezählt (im Verhältnis zum Volumen des Hippocampus). Zwischen beiden Tiergruppen bestand kein signifikanter Unterschied an Tag 1 ($t=0.7746$, $p=0.4680$) und an Tag 18 ($t=0.9624$, $p=0.3726$). An Tag 18 war kein signifikanter Unterschied in der Proliferationsrate bei den *knock-in*-Tieren zu Tag 1 zu finden ($t=1.024$, $p=0.3399$). Allerdings war ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollen von Tag 1 und Kontrollen von Tag 18 vorhanden ($t=4.388$, $p=0.0046$). Insgesamt überlebten bei Kontroll-Tieren weniger Neuronen als bei KI Tieren (siehe Abbildung 3.13).

Parallel dazu wurde eine Ki67-Färbung von hippocampalen Schnitten von Mäusen, getötet an Tag 18, durchgeführt, um die Proliferationsrate zu bestimmen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Proliferation zwischen beiden Tiergruppen ($t=0.1129$, $p=0.9132$) (siehe Abbildung 3.13).

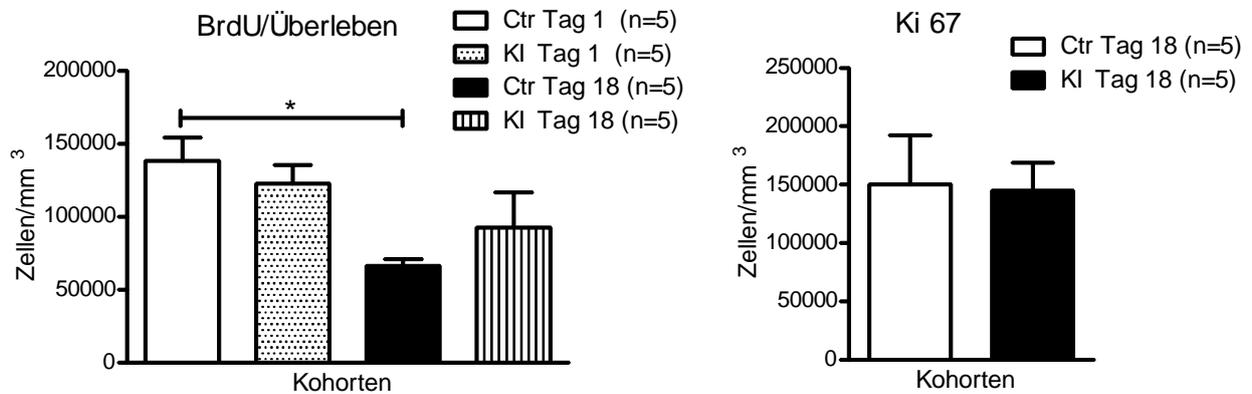


Abbildung 3.13: Überleben und Proliferation von hippocampalen Neuronen

Hippocampale Neuronen wurden mit BrdU (linke Seite) oder Ki67 (rechte Seite) markiert und das Überleben und die Proliferation bestimmt. Zwischen *knock-in*-Tieren (KI: $Ca_v1.2^{EQ/L2} Nestin^{+/Cre}$) und Kontrollen (Ctr: $Ca_v1.2^{+/L2} Nestin^{+/Cre}$) war kein signifikanter Unterschied im Überleben vorhanden, allerdings zeigten Kontroll-Tiere eine geringere Überlebensrate der Neuronen nach 18 Tagen. Bei der Proliferationsrate durch Ki67-Färbung war kein Unterschied zu sehen.

3.4 Verhaltensuntersuchungen

3.4.1 Sozialverhalten

Mutationen im *Cacna1c* Gen können zu Autismus-Spektrum-Krankheiten führen (Splawski et al., 2004; Splawski et al., 2005). Restriktives, perseveratives und stereotypisches Verhalten und verminderte soziale Interaktionen sind typisch für Autismus. Bei einem Mausmodell für das Timothy-Syndrom mit der Mutation G406R im $Ca_v1.2$ Kanal wurden Autismus-ähnliche Verhaltensweisen in einer Vielzahl von Verhaltensversuchen nachgewiesen (Bader et al., 2011). Diese *gain of function* Mutation verursacht eine veränderte Inaktivierung des Calciumkanals. Auch die I1624E Mutation verändert die Eigenschaften des $Ca_v1.2$ Calciumkanals (Poomvanicha et al., 2011). Bei den nachfolgenden Versuchen sollte daher das Sozialverhalten der *knock-in*-Mäuse im Vergleich zu Kontrollen untersucht werden.

3.4.1.1 Discrimination Chamber

Die Anzahl und die Zeit der Interaktionen von Kontrollen und KI Tieren mit der leeren oder der mit einer Maus besetzten Gitterbox wurden gemessen. Dabei wurde eine Box in drei Kompartimente unterteilt, wobei das zentrale Kompartiment leer war. In den beiden äußeren Kompartimenten war jeweils eine Gitterbox. Zunächst wurde nach einer Habituationszeit von 5 min, in der die Maus das zentrale Kompartiment frei explorieren konnte, über 5 min die Zeit gestoppt, die das Tier in jedem der beiden äußeren Kompartimente verbrachte. Weder für Kontrollen noch für KI Tiere konnte eine Seitenpräferenz bei der Exploration der äußeren Kompartimente gefunden werden. Danach wurde für 5 min die Exploration der äußeren Kompartimente mit einer leeren und einer von einer fremden, männlichen BalbC-Maus besetzten Gitterbox gemessen. Es wurde gezeigt, dass ein signifikanter Unterschied in der Zeit der Interaktionen mit und ohne Maus in der Gitterbox bei beiden Gruppen bestand (Ctr: Zeit [s]: $t=2.756$, $p=0.0126$; KI: Zeit [s]: $t=3.741$, $p=0.0016$). Beide Tiergruppen hielten sich länger an der Gitterbox mit der BalbC-Maus auf. Allerdings war kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen zu finden, was Zeit und Anzahl der Interaktionen mit und ohne Maus betraf (siehe Abbildung 3.14).

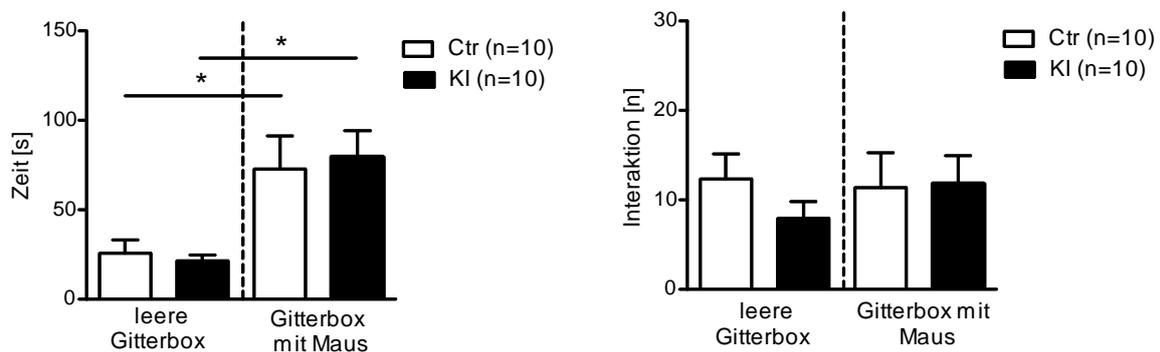


Abbildung 3.14: Discrimination Chamber

Die Zeit (links) und Anzahl (rechts) der Interaktionen von Kontrollen und KI Tieren mit der leeren oder der mit einer BalbC-Maus besetzten Gitterbox wurde gemessen. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen *knock-in*-Tieren (KI: $Ca_v1.2^{EQ/L2} Nestin^{+/Cre}$) und Kontrollen (Ctr: $Ca_v1.2^{+/L2} Nestin^{+/Cre}$) im Explorationsverhalten gegenüber der leeren und der mit einer BalbC-Maus besetzten Gitterbox vorhanden. Beide Tiergruppen explorierten signifikant länger die besetzte Gitterbox.

3.4.1.2 Sozialer Interaktions-Test

Um zu untersuchen, wie sich die Tiere ihren Geschwistertieren mit gleichem Genotypen gegenüber nach zweiwöchiger Trennung verhalten, wurde ein Sozialer Interaktions-Test in einem fremden Käfig durchgeführt. Kontrollen und KI Tiere zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Zeit und der Anzahl an Interaktionen des Explorationsverhaltens dem jeweils anderen Tier gegenüber (Zeit [s]: $t=1.438$, $p=0.1760$; Anzahl Interaktionen [n]:

$t=2.037$, $p=0.0643$). In beiden Gruppen war kaum Aggressions- oder Sexualverhalten zu finden (siehe Abbildung 3.15).

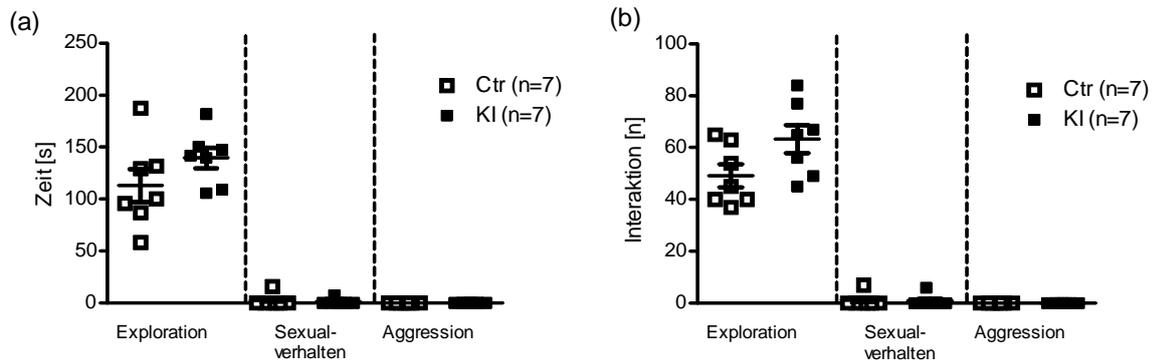


Abbildung 3.15: Sozialer Interaktions-Test

Die Zeit (a) und Anzahl (b) der Interaktionen von Kontrollen und KI Tieren mit ihrem jeweils gleichen Genotypen wurden mit folgenden Parametern gemessen: Exploration, Sexualverhalten, Aggression. Bei keinem dieser Parameter war ein signifikanter Unterschied zwischen *knock-in*-Tieren (KI: $Ca_v1.2^{EQ/L2} Nestin^{+/Cre}$) und Kontrollen (Ctr: $Ca_v1.2^{+/L2} Nestin^{+/Cre}$) vorhanden.

3.4.1.3 Objekt Explorations-Test

Als Kontrollexperiment zum Explorationsverhalten gegenüber einer anderen Maus wurde der Objekt-Explorations-Test durchgeführt. *Knock-in*-Tiere und Kontrollen zeigten in der Zeit, innerhalb der sie ein neues, unbelebtes Objekt (Glühbirne) explorierten, keinen signifikanten Unterschied (siehe Abbildung 3.16 (a)). Die Frequenz, mit der die Tiere das unbekannte Objekt untersuchten, war signifikant unterschiedlich in Kontrollen und KI Tieren (Anzahl Explorationen [n]: $t=2.736$, $p=0.0113$) (siehe Abbildung 3.16 (b)). KI Mäuse explorierten weniger oft, allerdings hielten sie sich länger am Objekt auf, da kein Unterschied in der Dauer der Exploration vorhanden war.

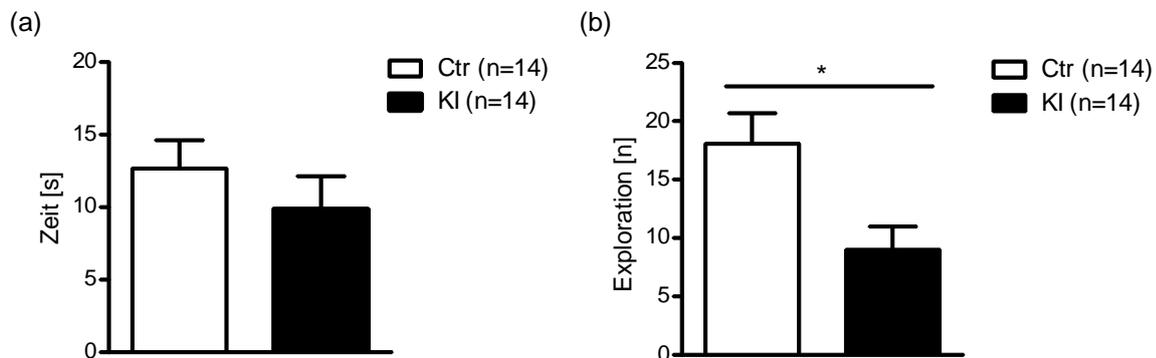


Abbildung 3.16: Objekt Explorations-Test

Die Zeit (a) und Anzahl der Explorationen (b) der Interaktionen von Kontrollen und KI Tieren mit einem unbekanntem, unbelebtem Objekt wurde gemessen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen *knock-in*-Tieren (KI: $Ca_v1.2^{EQ/L2} Nestin^{+/Cre}$) und Kontrollen (Ctr: $Ca_v1.2^{+/L2} Nestin^{+/Cre}$) in der Länge der Exploration, allerdings in der Anzahl der Explorationen.

3.4.1.4 Resident/Intruder-Test

Durch den *Resident/Intruder*-Test wird das Verhalten der Tiere auf fremde Mäuse in ihrem Heimkäfig untersucht. Kontrollen und KI Tiere zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Zeit und der Anzahl an Interaktionen gegenüber einer fremden, männlichen BalbC-Maus (Zeit Exploration [s]: $t=1.012$, $p=0.3212$; Anzahl Interaktionen [n]: $t=0.6339$, $p=0.5319$) (siehe Abbildung 3.17 (a) und (b)). In beiden Gruppen war kaum Aggressions- oder Sexualverhalten zu finden.

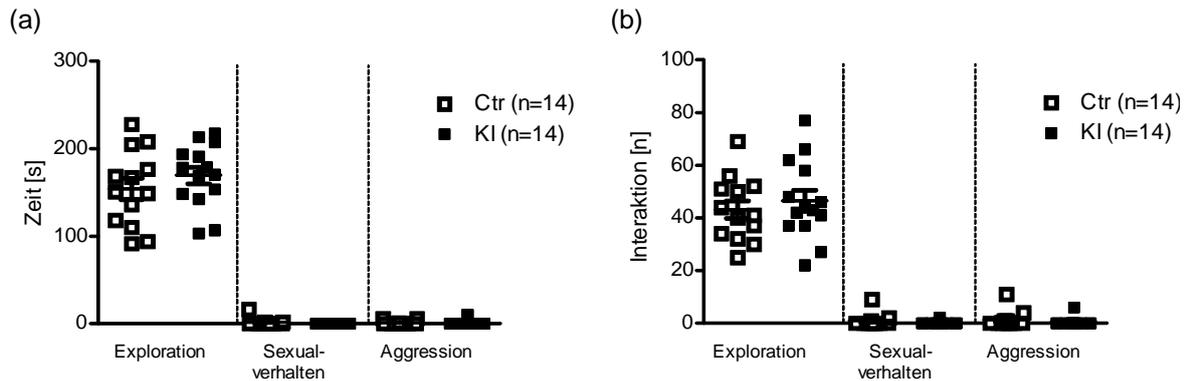


Abbildung 3.17: Resident/Intruder-Test

Die Zeit (a) und Anzahl (b) der Interaktionen von Kontrollen und KI Tieren mit einer fremden, männlichen BalbC-Maus wurden nach folgenden Parametern gemessen: Exploration, Sexualverhalten, Aggression. Bei keinem dieser Parameter war ein signifikanter Unterschied zwischen *knock-in*-Tieren (KI: $Ca_v1.2^{EQ/L2} Nestin^{+/Cre}$) und Kontrollen (Ctr: $Ca_v1.2^{+/L2} Nestin^{+/Cre}$) vorhanden.

3.4.2 Angstverhalten

3.4.2.1 Open Field-Test

Um das allgemeine Explorations- und unconditionierte Angstverhalten der Tiere zu untersuchen, wurde ein *Open Field*-Test durchgeführt. Die Fläche der *Open Field Box* wird in einen äußeren Randbereich und einen zentralen Mittelbereich eingeteilt. Ängstliche Mäuse halten sich mehr am Rand als in der Mitte auf. Der Versuch erfolgte für jeweils 30 min an zwei aufeinanderfolgenden Tagen, um einen Habituationseffekt messen zu können.

In der Lokomotion von Kontrollen und KI Tieren ergab sich kein Unterschied, da beide Tiergruppen an Tag 1 und Tag 2 dieselbe Gesamtdistanz zurücklegten (Tag 1 Distanz [cm]: Ctr vs KI: $F=1.560$, $p=0.2135$; Tag 2 Distanz [cm]: Ctr vs KI: $F=0.008138$, $p=0.9282$) (siehe Abbildung 3.18). Beide Gruppen zeigten an beiden Tagen einen Habituationseffekt, da sich die Gesamtdistanz, die Kontrollen und *knock-in*-Tiere zurücklegten, innerhalb der 30 min verringerte (Tag 1: Intervall [5 min]: $F=3.285$, $p=0.0075$; Tag 2: Intervall [5 min]: $F=4.069$, $p=0.0017$) (siehe Abbildung 3.18).

Ergebnisse

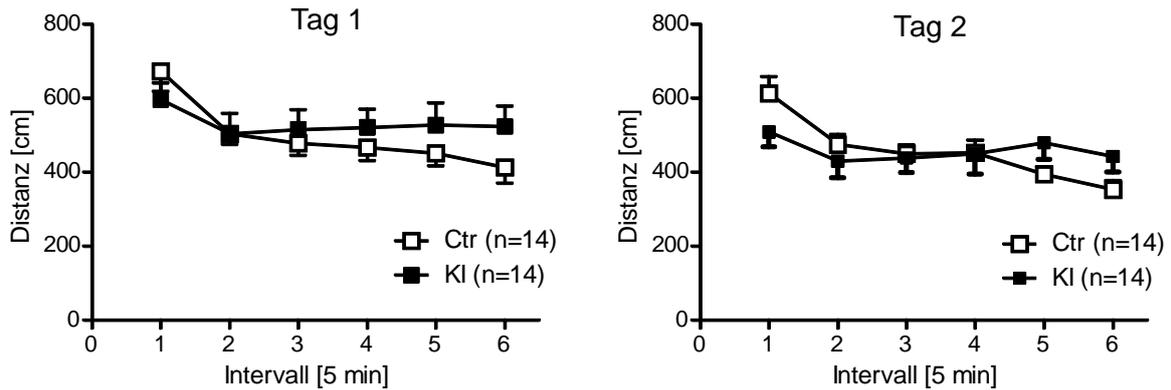


Abbildung 3.18: Gesamtdistanz im *Open Field*-Test

In der Gesamtdistanz, die beide Genotypen an beiden Tagen zurücklegten, war kein signifikanter Unterschied vorhanden. An beiden Tagen war ein Habituationseffekt innerhalb der 30 min des Tests bei Kontrollen (Ctr: $Ca_v1.2^{+/L2} Nestin^{+/Cre}$) und *knock-in*-Tieren (KI: $Ca_v1.2^{EQ/L2} Nestin^{+/Cre}$) zu finden.

Allerdings zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen *knock-in*-Tieren und Kontrollen bei der Zeit, die sie im zentralen Bereich (Tag 1: im Zentralbereich verbrachte Zeit [s]: Ctr vs KI: $F=5.159$, $p=0.0002$; Intervall [5 min]: $F=32.65$, $p<0.0001$) (Tag 2: im Zentralbereich verbrachte Zeit [s]: Ctr vs KI: $F=12.58$, $p<0.0001$; Intervall [5 min]: $F=30.74$, $p<0.0001$) (siehe Abbildung 3.19 (a)) und im Randbereich (Distanz [cm]: Ctr vs KI: $F=13.41$, $p<0.0001$; Intervall [5 min]: $F=11.82$, $p=0.0008$) der *Open Field* Box verbrachten. Erst in den letzten 5 min an beiden Tagen verbrachten beide Tiergruppen die gleiche Zeit im Zentralbereich. Auch die im Zentralbereich zurückgelegte Distanz war an Tag 1 in den ersten 15 min und an Tag 2 in den ersten 20 min signifikant unterschiedlich zwischen KI Tieren und Kontrollen (Tag 1: Distanz [cm]: Ctr vs KI: $F=1.285$, $p=0.2731$; Intervall [5 min]: $F=5.426$, $p=0.0211$) (Tag 2: Distanz [cm]: Ctr vs KI: $F=3.728$, $p=0.0032$; Intervall [5 min]: $F=22.78$, $p<0.0001$) (siehe Abbildung 3.19 (b)). *Knock-in*-Tiere blieben in den ersten 15 min mehr im Randbereich, wobei sie sich dort genauso viel bewegten wie Kontroll-Tiere im Zentralbereich (siehe Abbildung 3.18). KI Tiere gewannen erst im Laufe des Versuches mehr Interesse an der Exploration auch der zentralen Bereiche. Dies ließ auf eine erhöhte Ängstlichkeit gegenüber neuer Umgebung schließen.

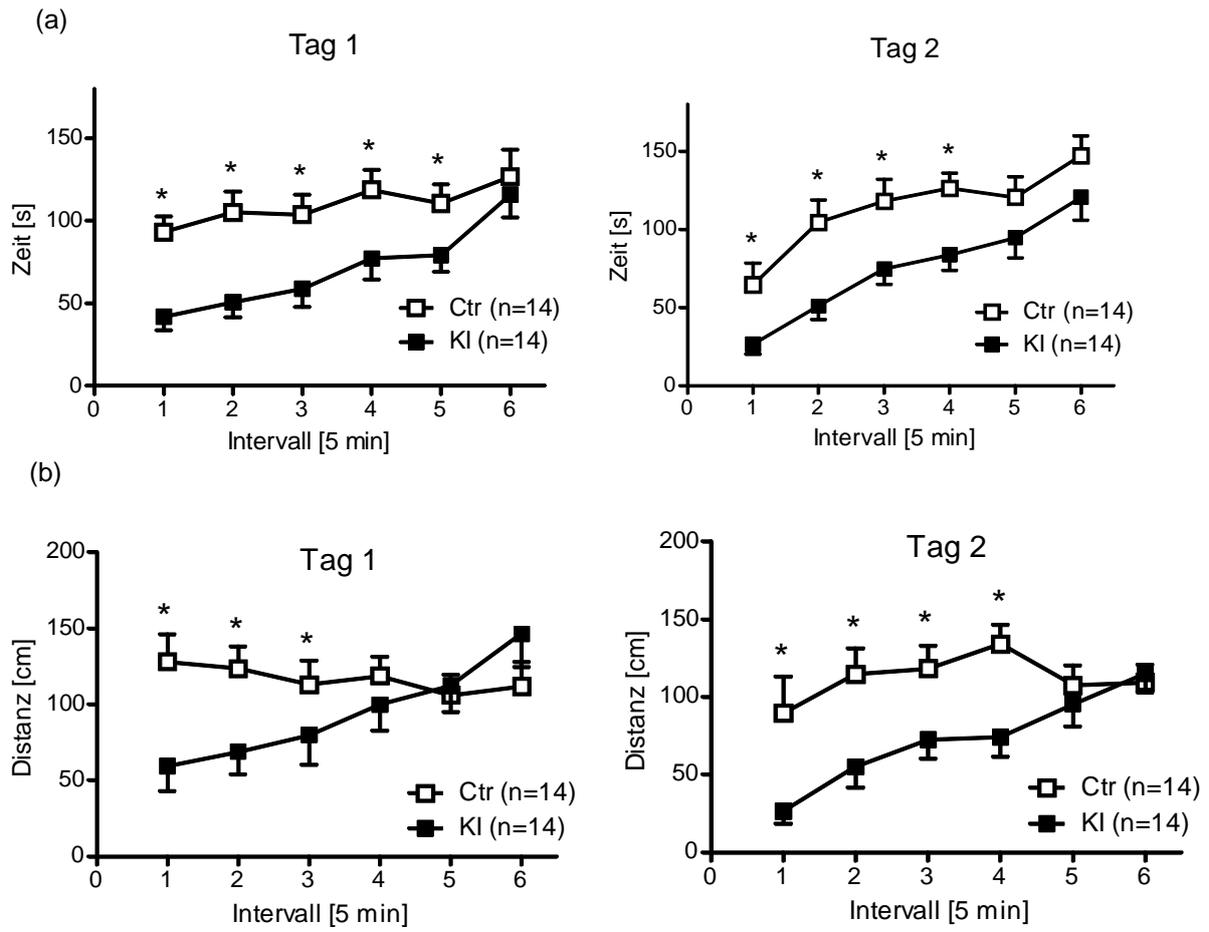


Abbildung 3.19: Zeit und Distanz im Zentralbereich im *Open Field-Test*

Kontrollen (Ctr: $Ca_v1.2^{+/L2}$ Nestin $^{+/Cre}$) und *knock-in*-Tiere (KI: $Ca_v1.2^{EQ/L2}$ Nestin $^{+/Cre}$) zeigten signifikante Unterschiede: (a) Die Zeit und (b) die Distanz, die KIs im Zentralbereich der *Open Field Box* verbrachten, war an beiden Tagen (Tag 1 und Tag 2) signifikant geringer als bei Ctr. Erst nach 15 min legten KI Tiere dieselbe Distanz im Zentralbereich zurück wie die Kontroll-Tiere.

Knock-in-Tiere zeigten auch während der ersten 20 min des *Open Field*-Tests kürzer (Zeit [s]: Ctr vs KI: $F=22.55$, $p<0.0001$; Intervall [5 min]: $F=2.703$, $p=0.0226$) und weniger häufig (Anzahl vertikaler Exploration [n]: Ctr vs KI: $F=18.59$, $p<0.0001$; Intervall [5 min]: $F=4.814$, $p=0.0004$) das Phänomen des „Männchen machens“, also vertikaler Exploration (siehe Abbildung 3.20).

Ergebnisse

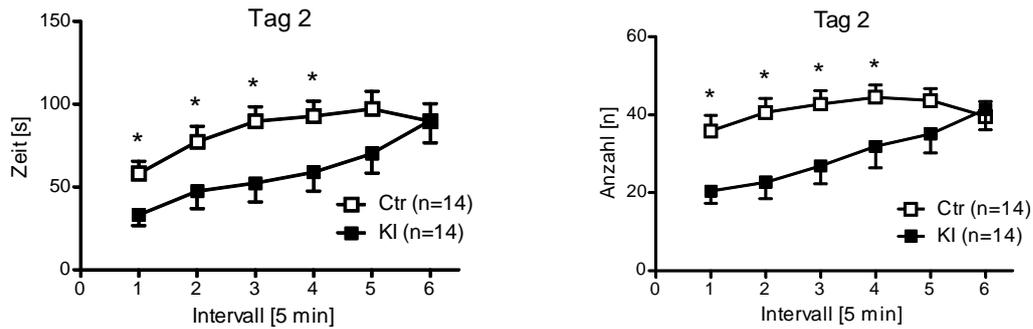


Abbildung 3.20: Vertikale Exploration im *Open Field*-Test

Kontrollen (Ctr: $Ca_v1.2^{+/L2} Nestin^{+/Cre}$) und *knock-in*-Tiere (KI: $Ca_v1.2^{EQ/L2} Nestin^{+/Cre}$) zeigten signifikante Unterschiede in Dauer (links) und Anzahl (rechts) in der vertikalen Exploration an Tag 2.

Um diese Effekte nochmals zu verdeutlichen, wurde erneut ein *Open Field*-Test für 15 Minuten durchgeführt, allerdings nicht in einer eckigen Box, sondern in einem runden Behältnis mit einem Durchmesser von 70 cm. So sollte ein möglicher Rückzug der Tiere in die Ecken der Box ausgeschlossen werden. Auch hier wurden ein Randbereich und ein zentraler Bereich definiert. Wieder zeigte sich kein Unterschied in der Gesamtdistanz, die beide Tiergruppen an beiden Tagen während des Versuches zurücklegten. Auch wurde derselbe Effekt gefunden, dass Kontroll-Tiere zu Beginn alle Bereiche stark explorieren, die Exploration über den Verlauf der Zeit jedoch abnimmt, während *knock-in*-Tiere zu Beginn des Versuches weniger den zentralen Bereich explorieren, sondern mehr am Rand bleiben, und erst im Verlauf der Zeit auch das Zentrum explorieren. Allerdings zeigte sich bei der Messung der Mobilität beider Gruppen, dass *knock-in*-Tiere an Tag 1 zu Beginn des Versuches signifikant weniger mobil sind im Vergleich zu den Kontrollen (Zeit [s]: Ctr vs KI $F=4.202$, $p=0.0455$; Intervall [5 min]: $F=15.45$, $p<0.0001$). Die Mobilität der KI Tiere nimmt über den Verlauf der Zeit zu, während die Mobilität der Kontroll-Tiere abnimmt. An Tag 2 ist kein Unterschied in der Mobilität zwischen den Tiergruppen zu finden (siehe Abbildung 3.21).

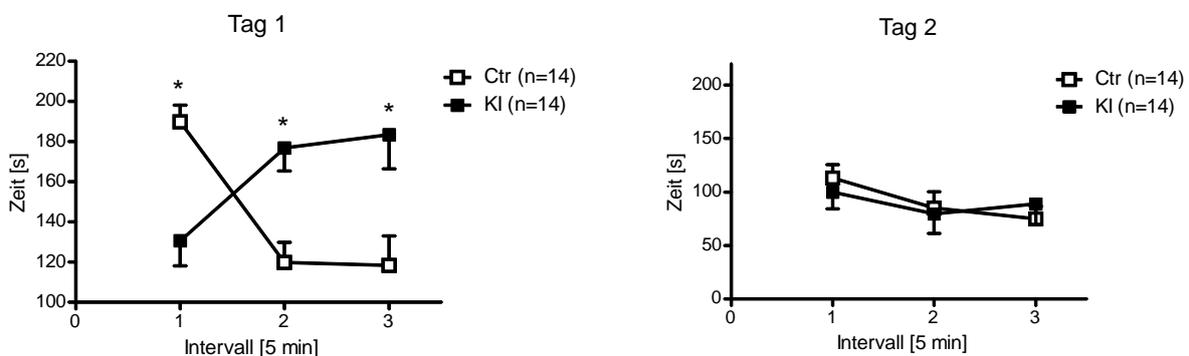


Abbildung 3.21: Mobilität im runden *Open Field*-Test

An Tag 1 zeigten *knock-in*-Tiere (KI: $Ca_v1.2^{EQ/L2} Nestin^{+/Cre}$) einen signifikanten Unterschied in der Mobilität im Vergleich zu Kontroll-Tieren (Ctr: $Ca_v1.2^{+/L2} Nestin^{+/Cre}$). An Tag 2 war kein Unterschied zwischen beiden Tiergruppen vorhanden.

3.4.2.2 *Elevated Plus Maze-Test*

Im *Elevated Plus Maze* verbringen Tiere mit erhöhter Ängstlichkeit mehr Zeit in den geschlossenen Armen als in den offenen Armen und betreten seltener die offenen Arme. Bei KI Tieren und Kontrollen war kein signifikanter Unterschied in der Zeit, die sie in den offenen Armen verbrachten ($t=0.4167$, $p=0.6809$), und in der Anzahl der Eintritte in die offenen Arme ($t=0.6492$, $p=0.5230$) zu finden (siehe Abbildung 3.22).

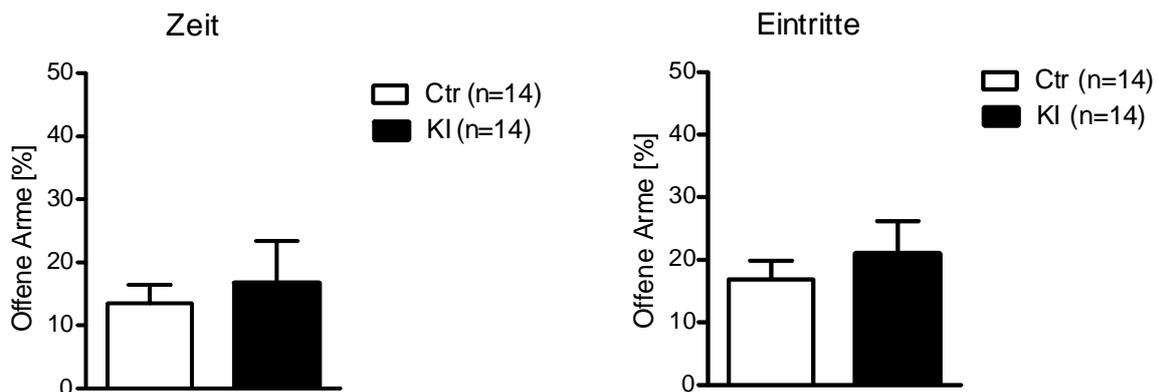


Abbildung 3.22: Zeit und Anzahl der Eintritte in die offenen Arme im *Elevated Plus Maze-Test*
Kontrollen (Ctr: $Ca_v1.2^{+/L2}$ Nestin $^{+/Cre}$) und *knock-in*-Tiere (KI: $Ca_v1.2^{EQ/L2}$ Nestin $^{+/Cre}$) zeigten keine signifikanten Unterschiede in Zeit und Anzahl der Eintritte in die offenen Arme.

3.4.2.3 *Dark/Light Box-Test*

In der *Dark/Light Box* verbringen Tiere mit erhöhter Ängstlichkeit mehr Zeit im dunklen Kompartiment und wechseln seltener zwischen dem dunklen und erleuchteten Kompartiment hin und her (Transitionen). KI Tiere verbrachten signifikant weniger Zeit im hellen Kompartiment ($t=3.902$, $p=0.0007$) und betraten dieses auch seltener ($t=4.028$, $p=0.0005$) (siehe Abbildung 3.23 (a)). Insgesamt zeigten die *knock-in*-Tiere weniger Transitionen ($t=3.346$, $p=0.0269$) (siehe Abbildung 3.23 (b)).

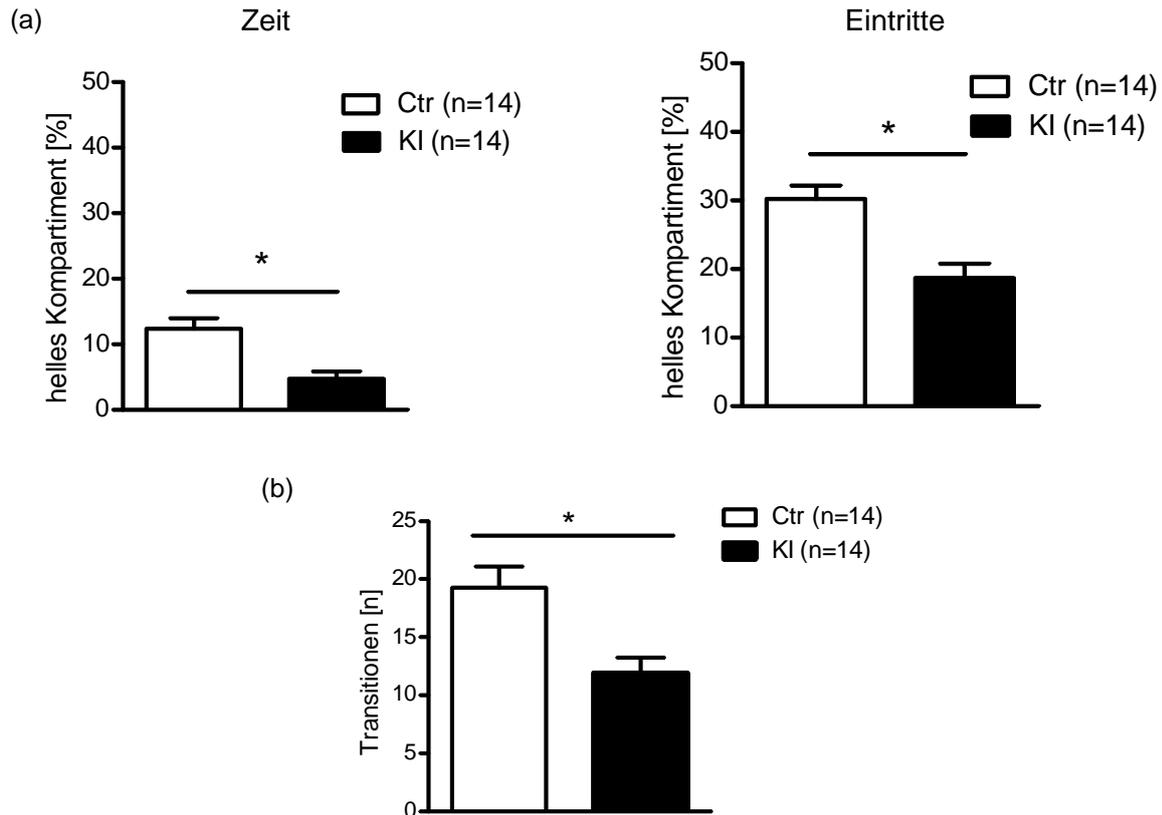


Abbildung 3.23: Dark/Light Box-Test

(a) Kontrollen (Ctr: $Ca_v1.2^{+/L2}$ Nestin^{+/Cre}) und *knock-in*-Tiere (KI: $Ca_v1.2^{EQ/L2}$ Nestin^{+/Cre}) zeigten signifikante Unterschiede in Zeit und Anzahl der Eintritte in das helle Kompartiment. KI Tiere betraten es weniger oft, und hielten sich auch kürzer darin auf. (b) Auch in den Transitionen wechselten die KI Tiere seltener die Kompartimente.

3.4.2.4 Marble Burying-Test

Um defensives Verhalten zu untersuchen, wurde der *Marble Burying*-Test durchgeführt. Das Vergraben von Murmeln kann durch Calciumkanal-Antagonisten inhibiert werden (Egashira et al., 2008). 12 Murmeln wurden zufällig über den gesamten Heimkäfig der Tiere verteilt. Die komplett vergrabenen Murmeln von Kontrollen und KI Tieren wurden gezählt. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen *knock-in*-Tieren und Kontrollen in der Anzahl der vergrabenen Murmeln (Ctr: 4.200 ± 1.031 , KI: 3.800 ± 1.191 , $t=0.2540$, $p=0.8024$).

3.4.2.5 Acoustic Startle-Test

Bei heterozygoten *Cacna1c knock-out*-Mäusen wurde eine veränderte Antwort im Acoustic Startle-Test gefunden (Dao et al., 2010). Auch Probanden mit dem SNP rs1006737 (*single nucleotide polymorphism*), bei dem an Position 2215556 eine Mutation von Guanin zu Alanin im dritten Intron des *Cacna1c* Gens vorliegt, zeigten eine veränderte Startle-Antwort (Roussos et al., 2011). Um zu untersuchen, ob durch die EQ-Mutation eine Veränderung in

der *Acoustic Startle*-Antwort zu finden ist, wurde zunächst die *Startle*-Reaktion an Tag 1 auf unterschiedliche Stimuli (75, 90, 105, 115 dB(A)) gemessen. Bei niedrigen Stimulus-Intensitäten zeigte sich kein Unterschied zwischen beiden Tiergruppen. Bei Stimulusintensitäten von 105 dB(A) und 115 dB(A) war die Startle-Antwort der Kontroll-Tiere signifikant höher als bei den *knock-in*-Tieren (ASR [mV]: Ctr vs KI: $F=22.05$, $p<0.0001$; Stimulusintensität [dbA]: $F=11.21$, $p=0.0011$, Interaktion: $F=3.786$, $p=0.0065$) (siehe Abbildung 3.24 (a)). An Tag 2 wurden die Präpulsfazilitierung und Präpulsinhibierung (PPF und PPI) anhand unterschiedlicher Präpulse (55, 65, 75 dB(A)) bei unterschiedlichen Interpulsintervallen (IPI) untersucht. Bei einem Präpuls von 55 oder 65 dB(A) war kein Unterschied zwischen beiden Tiergruppen vorhanden (siehe Abbildung 3.24 (b) und (c)). Bei einem Präpuls von 75 dB(A) reagierten die *knock-in*-Tiere mit einer abgeschwächten Antwort gegenüber den Kontroll-Tieren (ASR [%]: Ctr vs KI: $F=20.22$, $p<0.0001$; IPI [ms]: $F=33.94$, $p<0.0001$) (siehe Abbildung 3.24 (d)). Ängstliche Tiere reagieren allgemein weniger auf einen Präpuls.

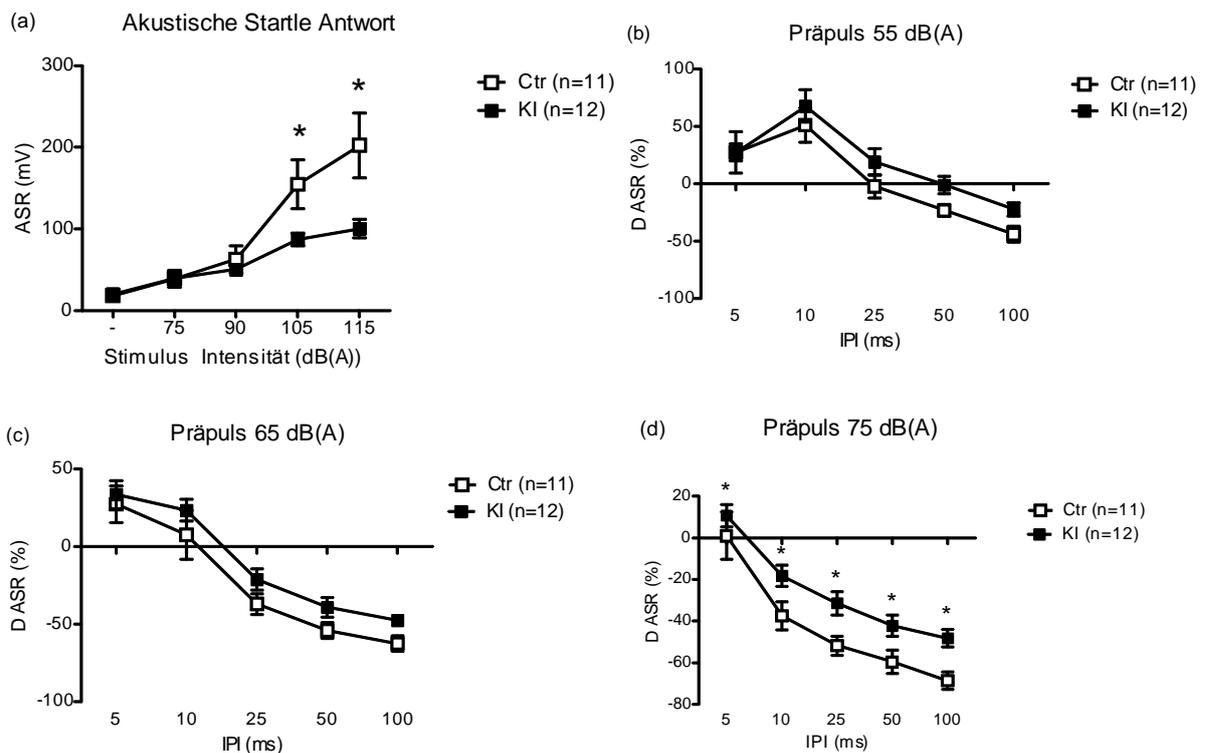


Abbildung 3.24 Acoustic Startle-Test

Die ASR (*acoustic startle response*) bei *knock-in*-Tieren (KI: $Ca_v1.2^{EQ/L2} Nestin^{+/Cre}$) und Kontrollen (Ctr: $Ca_v1.2^{+/L2} Nestin^{+/Cre}$) war bei hohen Stimuli signifikant verschieden (a). Die IPI war nicht unterschiedlich bei einem Präpuls von 55 dB(A) (b) oder einem Präpuls von 65 dB(A) (c). Bei einem Präpuls von 75 dB(A) (d) war die Reaktion der *knock-in*-Tiere signifikant schwächer gegenüber den Kontrollen.

3.4.2.6 *Fear Conditioning*

Die Furchtkonditionierung ist das bekannteste und am häufigsten genutzte Experiment zur Untersuchung des impliziten Gedächtnisses. Beim *fear conditioning* wird ein Ton (CS) mit einem milden Fußschock (US) gepaart. Im Anschluss kann das *Freezing*-Verhalten der Maus auf den Ton alleine in einer veränderten Umgebung oder auf eine Umgebung ähnlich der Umgebung während der Konditionierung ohne Ton untersucht werden.

Die Konditionierung an Tag 0 führt zur Akquisition. In den angeschlossenen Testphasen (Tag 1 und Tag 6; Präsentation des CS in Kontext B; Präsentation der Umgebung der Konditionierung ohne Tonsignal Kontext C und D) wird das Erlernete im Sinne eines *Retrievals* abgerufen. Eine Umkehrung der Aversivität des CS bei wiederholter Präsentation des CS in Abwesenheit des US wird als Extinktion bezeichnet.

Die molekularen Ereignisse dieser beiden Phasen der Gedächtnisausbildung und der Extinktion sind im Detail jedoch noch nicht genau verstanden. Welche Rolle der $Ca_v1.2$ Calciumkanal bei diesen Prozessen spielt, wird kontrovers diskutiert.

Die Infusion von L-Typ Calciumkanalblockern in die laterale Amygdala reduzierte die Akquisition des auditiven Angst-Gedächtnisses (Bauer et al., 2002), während eine periphere Infusion der Blocker keine Effekte auf das auditive Angst-Gedächtnis zeigte (Cain et al., 2002; Suzuki et al., 2004). Die Deletion des *Cacna1c* Gens im Vorderhirn verringerte nicht die Akquisition, Konsolidierung und Extinktion des kontextualen Angstgedächtnisses (McKinney et al., 2008). Doch konnte die Extinktion des kontextualen Angstgedächtnisses durch Gabe von L-Typ Calciumkanalblockern reduziert werden (Cain et al., 2002; Suzuki et al., 2004). Auch mit Isradipin behandelte Mäuse zeigten ein abgeschwächtes auditives Angstlernen (Langwieser et al., 2010).

Aufgrund dieser unterschiedlichen Aussagen wurde ein *fear conditioning* mit Kontrollen und KI Tieren durchgeführt (Tag 0). An Tag 1 und Tag 6 wurde das *Freezing*-Verhalten auf Tonpräsentation in einem unbekanntem Kontext untersucht (Kontext B, auditives Angstgedächtnis). In den letzten 20 sek vor der Tonapplikation bestanden keine Unterschiede im *Freezing*-Verhalten zwischen den Kontroll- und *knock-in*-Tieren an Tag 1. Beide Versuchsgruppen wiesen dieselbe Grundaktivität auf ($t=1.413$, $p=0.1722$) (siehe Abbildung 3.25 (a)). In einem unbekanntem Kontext (Kontext B) zeigten die *knock-in*-Tiere an Tag 1 und Tag 6 ein signifikant höheres *Freezing*-Verhalten auf die CS-Präsentation (Tag 1: $t=2.640$, $p=0.0141$; Tag 6: $t=2.362$, $p=0.026$) (siehe Abbildung 3.25 (a)). Während die Kontroll-Tiere eine starke Abnahme der Angstantwort während der Tonpräsentation zeigten, zeigten die *knock-in*-Tiere ein Defizit in der akuten Angstadaptation (*Freezing* [%]: Ctr vs KI: $p=0.0072$, $F=2.707$, Intervall [20 s]: $p<0.0001$, $F=17.62$) (siehe Abbildung 3.25 (b)).

Auch das kontextuale Angstgedächtnis wurde an Tag 1 mit zwei Umgebungen, die zum Teil der Umgebung der Konditionierung entsprachen, getestet (Kontext C: Gitter, Hexagon;

Kontext D: *fear conditioning* Box) (siehe Abbildung 3.25 (c)). Die KI Tiere zeigten an Tag 1 ein signifikant höheres *Freezing*-Verhalten im Hexagon (Kontext C) ($t=4.062$, $p=0.0004$) und in der *fear conditioning* Box (Kontext D) ($t=2.858$, $p=0.0083$) als die Kontrollen.

Knock-in-Tiere zeigten also ein erhöhtes auditives und ein erhöhtes kontextuales Angstgedächtnis.

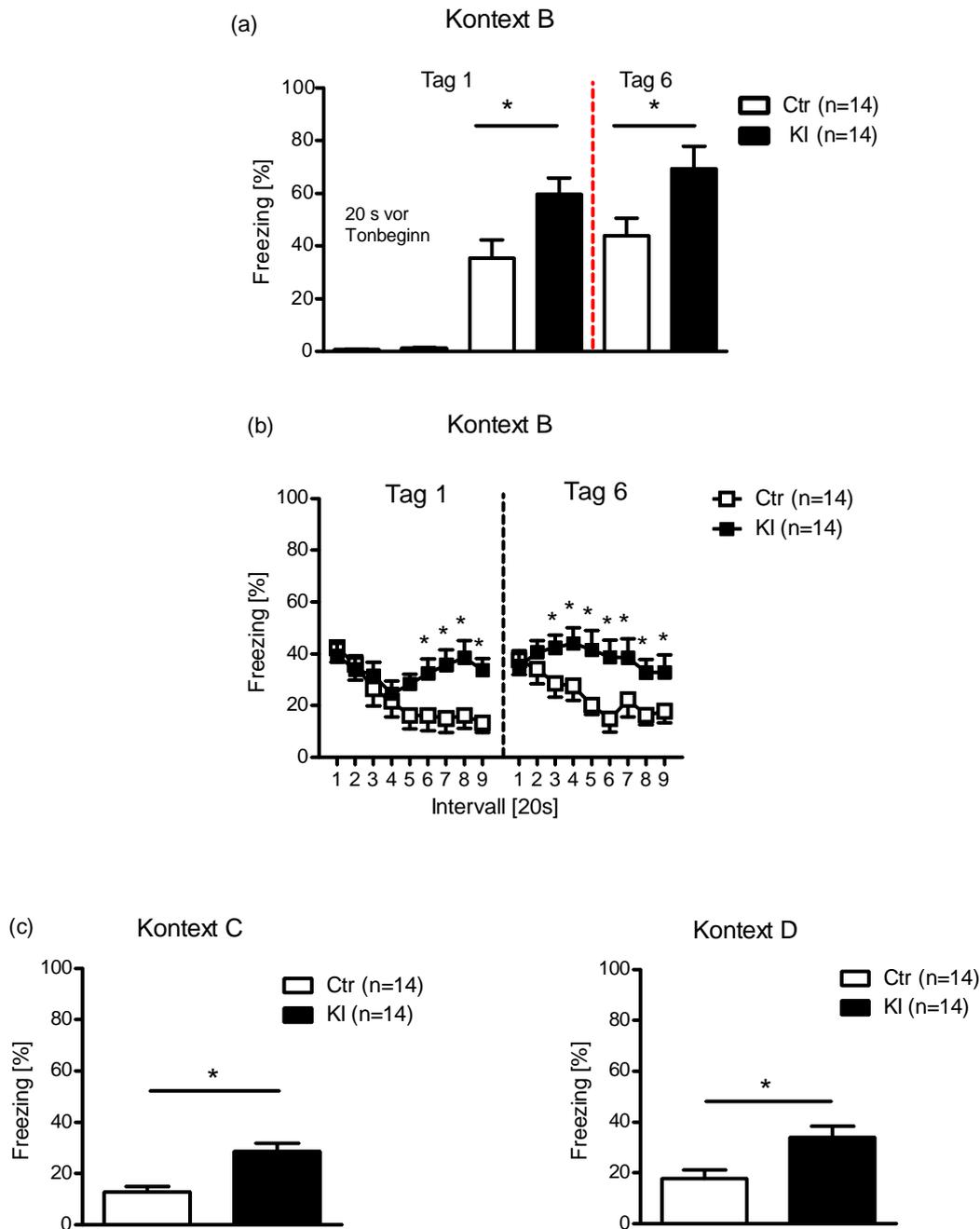


Abbildung 3.25: *fear conditioning*

(a) *Knock-in*-Tiere (KI: $Ca_v1.2^{EQ/L2} Nestin^{+/Cre}$) zeigten ein signifikant höheres *Freezing*-Verhalten nach Konditionierung an Tag 1 und Tag 6 bei einem Tonsignal in neuer Umgebung (auditives Angstgedächtnis). (b) Bei Aufteilung von (a) in 20 sek-Intervallen zeigten KI und Ctr Tiere dieselbe initiale Angstantwort. Der Verlauf war jedoch signifikant unterschiedlich, KI Tiere wiesen an Tag 1 und Tag 6 ein höheres *Freezing*-Verhalten auf als Kontrollen (Ctr: $Ca_v1.2^{+/L2} Nestin^{+/Cre}$). (c) Auch das *Freezing*-Verhalten in der *fear conditioning* Box (Kontext C, links) und im Hexagon (Kontext D, rechts) war signifikant unterschiedlich bei KI Tieren und Kontrollen (kontextuales Angstgedächtnis).

3.4.3 Stress-Coping-Verhalten

Ein SNP (rs1006737), der im dritten Intron des *Cacna1c* Gens lokalisiert ist, wird sehr stark mit bipolarer Störung assoziiert (Ferreira et al., 2008; Sklar et al., 2008). Um den Einfluss des veränderten $Ca_v1.2$ Kanals mit der EQ-Mutation auf das *Stress-Coping*-Verhalten zu untersuchen, wurden die folgenden Experimente durchgeführt.

3.4.3.1 Sukrosepräferenztest

Um anhedonisches Verhalten nachweisen zu können, wurde der Sukrosepräferenztest durchgeführt. Als Anhalt für Anhedonie bei Mäusen kann auf die nicht vorhandene Präferenz der Tiere von mit Sukrose gesüßtem Wasser gegenüber normalem Wasser getestet werden. Sowohl Kontrollen als auch KI Tiere tranken an zwei aufeinanderfolgenden Tagen insgesamt mehr von der Sukroselösung als vom reinen Wasser, es wurde kein signifikanter Unterschied gefunden ($t=0.1204$, $p=0.9058$) (siehe Abbildung 3.26). Beide Gruppen bevorzugten die süße Lösung gegenüber reinem Wasser. Zwischen beiden Tagen wurde kein Unterschied in der Menge des getrunkenen, gesüßten Wassers gefunden.

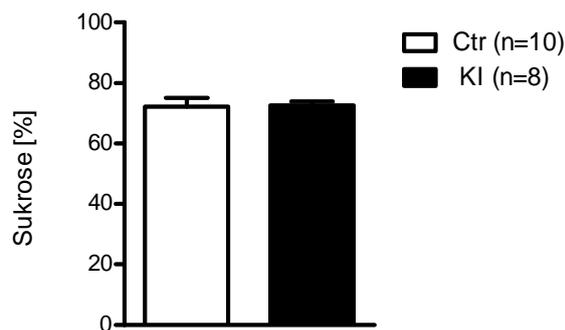


Abbildung 3.26: Sukrosepräferenztest

Kontrollen (Ctr: $Ca_v1.2^{+/L2}$ Nestin^{+/Cre}) und *knock-in*-Tiere (KI: $Ca_v1.2^{EQ/L2}$ Nestin^{+/Cre}) zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Menge der konsumierten Sukroselösung (gezeigt ist Tag 1).

3.4.3.2 Forced Swim-Test

Depressionsähnliches Verhalten wurde mit Hilfe des *Forced Swim*-Tests untersucht. Durch die Gabe von Nifedipin konnte die Immobilität von C57/Bl6/N-Mäusen reduziert werden, während durch Gabe von BayK8644, einem Dihydropyridin-sensitiven Calciumkanal-Agonisten, dieser Effekt teilweise rückgängig gemacht werden konnte (Cohen et al., 1997). In KI Tieren ist in der Zellmembran nur eine geringe Konzentration des $Ca_v1.2$ Proteins detektierbar. Im Experiment wurde ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Tiergruppen gefunden. Kontrollen zeigten eine höhere Immobilität als ihre *knock-in*-Geschwister ($t=2.179$, $p=0.0469$) (siehe Abbildung 3.27).

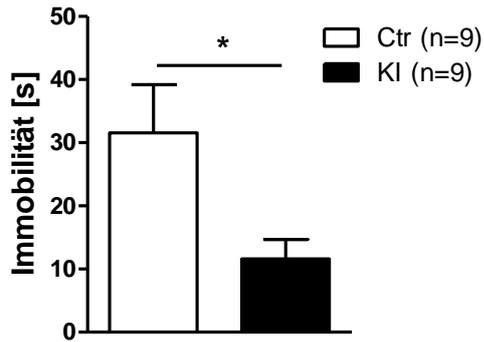


Abbildung 3.27: Forced Swim-Test

Kontrollen (Ctr: $Ca_v1.2^{+/L2} Nestin^{+/Cre}$) und *knock-in*-Tiere (KI: $Ca_v1.2^{EQ/L2} Nestin^{+/Cre}$) zeigten einen signifikanten Unterschied in der gemessenen Immobilität über die Gesamttestzeit des Versuches, wobei KI Tiere kaum Immobilität aufwiesen.

3.4.3.3 Tail Suspension-Test

Auch der *Tail Suspension*-Test ist geeignet, um depressionsähnliches Verhalten zu messen. Nach Gabe von Dihydropyridinen wie Nifedipin, Nicardipin, Nitrendipin, Isradipin, Felodipin und Nimodipin wurde die Immobilität von C57/Bl6/N-Tieren im *Tail Suspension*-Test signifikant reduziert (Cohen et al., 1997). Daher wurde die Immobilität beider Tiergruppen im *Tail Suspension*-Test gemessen. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll-Tieren und *knock-in*-Tieren ($t=8.042$, $p<0.0001$) (siehe Abbildung 3.28). KI Tiere waren kaum immobil im Gegensatz zu ihren Kontrollgeschwistern.

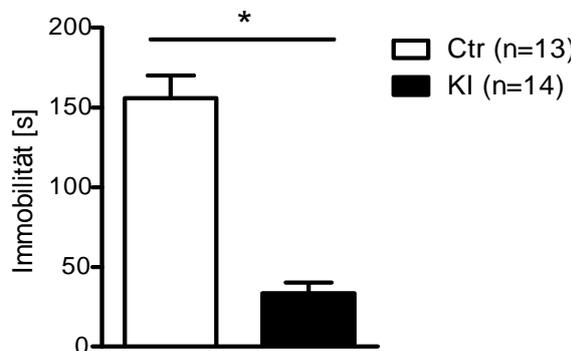


Abbildung 3.28: Tail Suspension-Test

Kontrollen (Ctr: $Ca_v1.2^{+/L2} Nestin^{+/Cre}$) und *knock-in*-Tiere (KI: $Ca_v1.2^{EQ/L2} Nestin^{+/Cre}$) zeigten einen signifikanten Unterschied in der gemessenen Immobilität über die Gesamtzeit des Versuches, wobei KI Tiere kaum Immobilität aufwiesen.

Aufgrund dieses Befundes wurden gehirnspezifische *Cacna1c* knock-out-Mutanten (KO, $Ca_v1.2^{L1/L2}$ Nestin^{+Cre}) mit den entsprechenden Kontrollgeschwistern (Ctr, $Ca_v1.2^{+/L2}$ Nestin^{+Cre}) ebenfalls im *Tail Suspension*-Test untersucht, um zu prüfen, ob ein ähnliches Ergebnis bei einem knock-out des *Cacna1c* Gens im Gehirn zu finden war. Es zeigte sich einen signifikanten Unterschied in der Immobilität, wobei KO Tiere kaum immobil waren ($t=5.987$, $p<0.0001$) (siehe Abbildung 3.29).

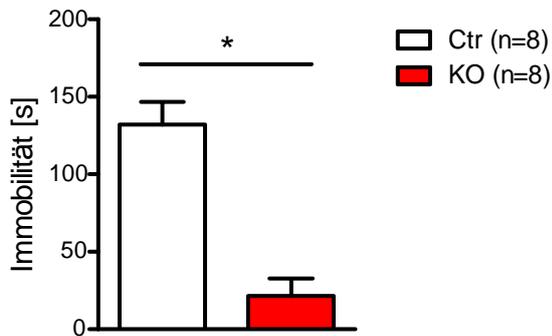


Abbildung 3.29: Tail Suspension-Test mit gehirnspezifischen knock-out-Tieren

Kontrollen (Ctr: $Ca_v1.2^{+/L2}$ Nestin^{+Cre}) und gehirnspezifische knock-out-Tiere (KO: $Ca_v1.2^{L1/L2}$ Nestin^{+Cre}) zeigten einen signifikanten Unterschied in der gemessenen Immobilität über die Gesamtzeit des Versuches, wobei KO Tiere kaum Immobilität aufwiesen.

Da die KI Tiere eine geringere $Ca_v1.2$ -Proteinkonzentration in der Membran zeigten (siehe 3.2.2), wurde mit einem pharmakologischen Ansatz geprüft, ob durch Gabe eines L-Typ Calciumkanalblockers bei Kontroll-Tieren ein ähnliches Ergebnis des *Tail Suspension*-Tests festgestellt werden konnte wie bei KI Mäusen. Es wurden bei Kontroll-Tieren und KI Tieren unilaterale Kanülenimplantationen in den Seitenventrikel vorgenommen. Nach einer einwöchigen Erholungsphase wurden alle Tiere einem *Tail Suspension*-Test unterzogen. 30 min vor dem Versuch wurde den Tieren unter leichter Isofluran-Narkose 2 μ l des L-Typ Calciumkanalblockers Verapamil (Konzentration 2 μ g/ μ l) oder als Kontrolle 2 μ l Ringerlösung verabreicht. Verapamil ist als einer der wenigen L-Typ Calciumkanalblocker in Ringerlösung löslich und muss nicht, wie viele andere, in Ethanol gelöst werden. So vermeidet man Nebenwirkungen des Ethanols, welche die Analyse verfälschen können. 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 Verhalten 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. Neben den Kontroll- und KI Tieren wurden auch C57/Bl6/N Mäuse getestet, denen ebenfalls zuvor Kanülen implantiert worden waren. Wiederum wurde ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll-Tieren und KI Tieren bei

Injektion von Ringerlösung ($t=2.951$, $p=0.0145$) und zwischen Kontrollen und KI Tieren bei Injektion von Verapamil ($t=7.010$, $p<0.0001$) gefunden (siehe Abbildung 3.30). Allerdings ergab sich kein signifikanter, Genotyp-unabhängiger Unterschied nach Injektion von Verapamil (Ctr: $t=1.285$, $p=0.2252$). (KI: $t=0.2657$, $p=0.7943$) (siehe Abbildung 3.30).

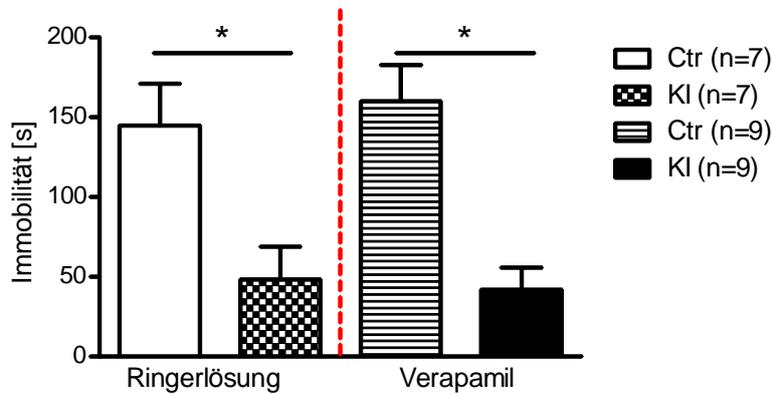


Abbildung 3.30: Tail Suspension-Test nach Injektion von Verapamil

Kontrollen (Ctr: $Ca_v1.2^{+/L2} Nestin^{+/Cre}$) und *knock-in*-Tiere (KI: $Ca_v1.2^{EQ/L2} Nestin^{+/Cre}$) zeigten einen signifikanten Unterschied in der Immobilität nach Injektion von Ringerlösung (2 μ l) oder Verapamil (2 μ l, 2 μ g/ μ l), allerdings zeigte sich kein Effekt bei Kontrollen mit und ohne Verapamil. Auch bei KI Tieren war mit oder ohne Verapamil kein Unterschied zu finden.

Auch bei C57/Bl6/N Tieren war kein Effekt nach Injektion von Verapamil zu sehen ($t=1.585$, $p=0.1439$) (siehe Abbildung 3.31).

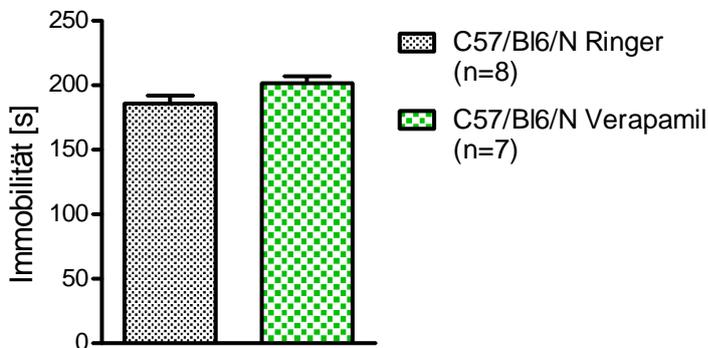


Abbildung 3.31: Tail Suspension-Test nach Injektion von Verapamil bei C57/Bl6/N Tieren

C57/Bl6/N Tiere zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Immobilität nach Injektion von Ringerlösung (2 μ l) oder Verapamil (2 μ l, 2 μ g/ μ l).

3.4.3.4 Neurotransmitteranalyse

VGCCs spielen eine wichtige Rolle bei der Ausschüttung von Neurotransmittern. Es gibt Evidenzen, dass L-Typ VGCCs eine Schlüsselrolle bei der selektiven dopaminergen Neurodegeneration in der *Substantia nigra pars compacta* bei Morbus Parkinson spielen (Chan et al., 2007; Putzier et al., 2009; Chan et al., 2010). Der $Ca_v1.3$ -Calciumkanal ist verantwortlich für die *Pacemaker*-Funktion von dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra* (Chan et al., 2007). Welche genaue Rolle der $Ca_v1.2$ Kanal spielt, ist noch nicht geklärt.

Allerdings wurde gezeigt, dass auch der $Ca_v1.2$ Calciumkanal mit Morbus Parkinson assoziiert ist (Wang et al., 2012). Aufgrund der verringerten $Ca_v1.2$ Proteinkonzentration in der Membran der Zellen wurde eine Mikrodialyse im ventralen Hippocampus durchgeführt, um die Konzentration von Norepinephrin, Serotonin, dessen Abbauprodukt 5-Hydroxyindolylessigsäure (5HIAA) sowie Dopamin und dessen Abbauprodukte 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC) und Homovanillinsäure (HVA) bestimmen zu können. Dafür wurden bei Kontroll-Tieren und KI Tieren unilaterale Mikrodialysesonden in den ventralen Hippocampus eingesetzt. Nach einer einwöchigen Erholungsphase wurden alle Tiere einer Mikrodialyse unterzogen. Nach Abnahme von vier Basalproben nach jeweils 20 Minuten wurden die Tiere gestresst, indem sie in einem Wasserbecken schwimmen mussten, um Unterschiede zwischen Basal- und Stresswerten sehen zu können. Wiederum wurden 6 post-Stress-Proben in 20 Minuten-Intervallen abgenommen. Alle Proben wurden mittels HPLC analysiert. Zwischen Kontroll-Tieren und KI Tieren war ein signifikanter Unterschied in der Serotoninkonzentration (Genotyp [Ctr vs KI]: $F=4.675$, $p=0.074$, Interaktion: Intervall [20 min] vs Genotyp: $F=2.432$, $p=0.045$) zu finden. In der 5HIAA-Konzentration (Genotyp [Ctr vs KI]: $F=2.425$, $p=0.17$, Interaktion: Intervall [20 min] vs Genotyp: $F=0.417$, $p=0,863$) und der Norepinephrinkonzentration (Genotyp [Ctr vs KI]: $F=3.634$, $p=0.105$, Interaktion: Intervall [20 min] vs Genotyp: $F=0.477$, $p=0.821$) war kein Unterschied vorhanden. Auch die Dopaminkonzentration stieg nach dem Schwimmen bei KI Tieren und Kontrollen gleichermaßen an (Genotyp [Ctr vs KI]: $F=0.374$, $p=0.563$, Interaktion: Intervall [20 min] vs Genotyp: $F=1.051$, $p=0.409$). Ebenso verhielten sich die Abbauprodukte von Dopamin, DOPAC (Genotyp [Ctr vs KI]: $F=1.786$, $p=0.230$, Interaktion: Intervall [20 min] vs Genotyp: $F=1.233$, $p=0.313$) und HVA (Genotyp [Ctr vs KI]: $F=4.080$, $p=0.09$, Interaktion: Intervall [20 min] vs Genotyp: $F=2.164$, $p=0.07$), bei beiden Tiergruppen gleich (siehe Abbildung 3.32).

Ergebnisse

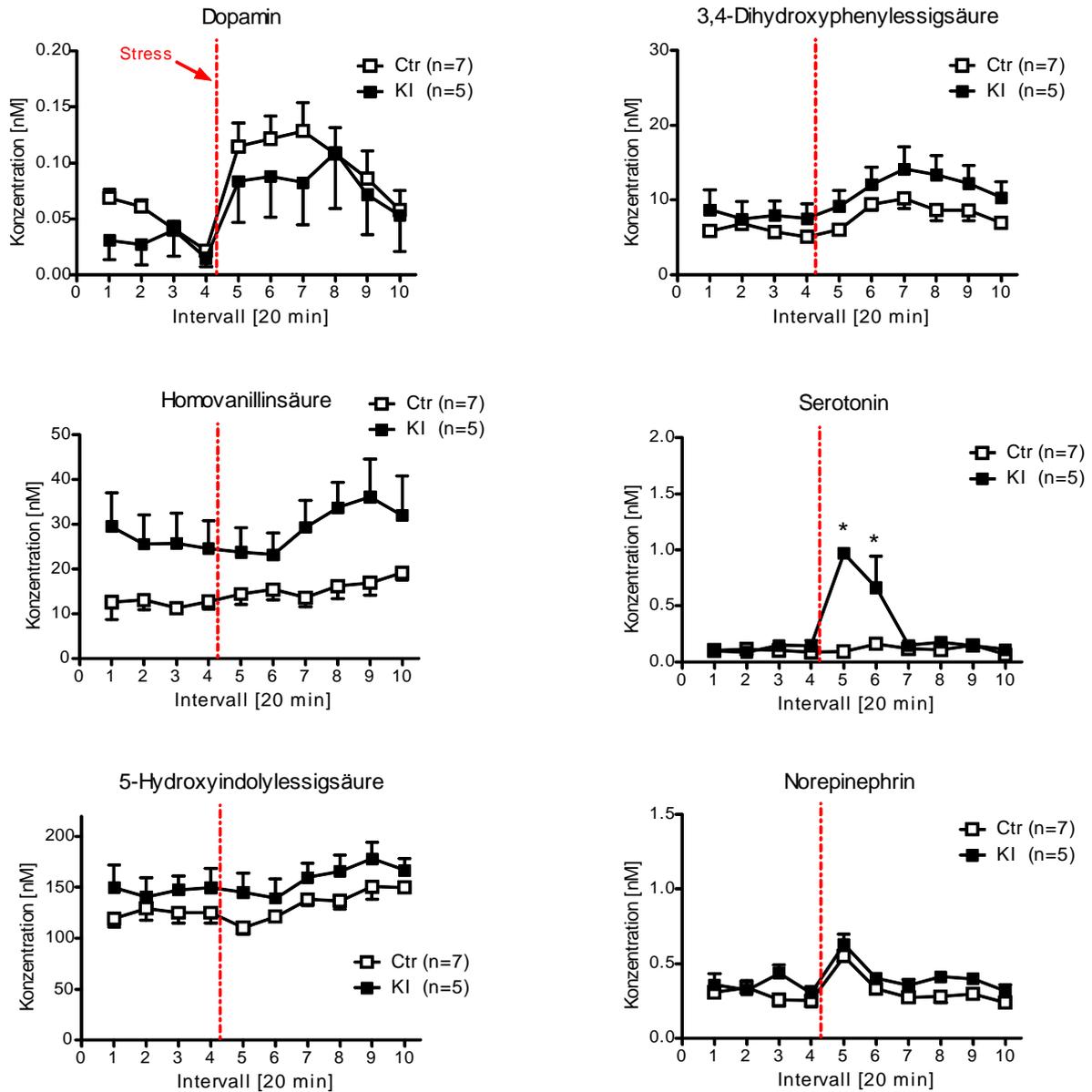


Abbildung 3.32: Mikrodialyse im ventralen Hippocampus

Nach Messung von 4 Basalwerten alle 20 min wurden die Tiere gestresst (rote Linie). Zwischen *knock-in-* (KI: $Ca_v1.2^{EQ/L2} Nestin^{+/Cre}$) und Kontroll-Tieren (Ctr: $Ca_v1.2^{+/L2} Nestin^{+/Cre}$) wurde nur bei Serotonin ein signifikanter Unterschied gefunden.

4 Diskussion

4.1 Funktionen des C-Terminus

Der C-Terminus des Ca_v1.2 Calciumkanals spielt eine wichtige Rolle als Träger einer Vielzahl potentieller regulatorischer Strukturelemente. So wurden in Expressionsversuchen bereits zahlreiche Ergebnisse erzielt, die belegen, wie der C-Terminus die Funktion des Kanals beeinflusst (De Jongh et al., 1996; Bunemann et al., 1999; Zuhlke et al., 1999; Dzhura et al., 2000; Gao et al., 2000; Davare et al., 2001; Dolmetsch et al., 2001; Gao et al., 2001; Hulme et al., 2006; Fuller et al., 2010). Durch Trunkierung des Kanals im Mausmodell wurde ebenfalls gezeigt, wie wichtig der C-terminale Bereich des Ca_v1.2 Calciumkanals ist. Mäuse, die homozygot den bei Asp1904 trunkierten Kanal exprimieren, sterben kurz nach der Geburt (Domes et al., 2011).

Eine große Rolle für die korrekte Regulation des Ca_v1.2 Calciumkanals spielt Calmodulin. Calmodulin bindet am IQ-Motiv, das im C-Terminus des Ca_v1.2 Calciumkanals lokalisiert ist. Wichtig ist die Calmodulinbindung an das IQ-Motiv für die Autoregulation des Ca_v1.2 Kanals (Zuhlke et al., 2000) und für die Steuerung der Signalkaskaden, die im Zellkern die Transkription bestimmter Gene regulieren (Dolmetsch et al., 2001).

Da Embryonen mit der homozygoten I1624E-Mutation im frühen Embryonalstadium sterben, wurde bereits ein konditionaler *knock-in* dieser Mutation im Herzen der Maus untersucht. Elektrophysiologische Ergebnisse zeigten, dass ein herzspezifischer, konditionaler *knock-in* der I1624E Mutation zu einer Reduktion der Fazilitierung führt und eine CaM/CaMKII-abhängige Regulation des Ca_v1.2 Kanals im Herzen verhinderte, während eine CDI noch vorhanden war (Poomvanicha et al., 2011).

Welche Rolle die I1624E Mutation allerdings im Gehirn spielt und ob die Bindung des Calmodulins an den Ca_v1.2 Kanal relevant ist für die Funktion des Kanals im Gehirn, wurde bisher noch nicht untersucht. Daher sollte mit Hilfe eines konditionalen, Gehirn-spezifischen *knock-in*-Mausmodells dieser Fragestellung nachgegangen werden.

4.2 Gehirnspezifischer, konditionaler *knock-in* im Mausmodell

Homozygote Ca_v1.2^{EQ/EQ} Mäuse sterben bereits sehr früh während der Embryonalentwicklung. Bereits an Tag 2,5 *p.c.* sind homozygote Ca_v1.2^{EQ/EQ} Tiere nicht mehr molekularbiologisch nachweisbar. Der *Cacna1c* Total-*knock-out* hingegen stirbt an Tag 12,5 *p.c.* (Seisenberger et al., 2000). Dass die Mutation I1624E einen stärkeren Einfluss auf die Embryonalentwicklung hat als der Total-*knock-out* des *Cacna1c* Gens, könnte an der fehlenden Eigenschaft der Calcium-abhängigen und auch der durch das IQ-Motiv

Diskussion

gesteuerten Fazilitierung und Inaktivierung liegen. Vermutlich ist ein nicht korrekt funktionierender Kanal während der ersten embryonalen Tage schwerwiegender als der komplette Verlust des Kanals. Über die Wichtigkeit des $Ca_v1.2$ Kanals während der frühen Embryogenese ist bisher kaum etwas bekannt.

Da die Cre-Rekombinase unter dem Nestin-Promotor an Tag 9,5 *p.c.* des Embryonalstadiums rekombiniert, wurden die Kontroll- und besonders die *knock-in*-Tiere auf entwicklungsbedingte Störungen hin untersucht. KI Tiere sind in der Entwicklung während der ersten 10 Wochen leichter als Kontrollen und daher in ihrer Entwicklung verzögert. Die Mutation des IQ-Motivs spielt auch hier eine Rolle. Erst nach 3 Monaten erreichen KI Tiere dasselbe Gewicht wie die Kontroll-Tiere.

In der Nissl-Färbung zeigten sich keinerlei morphologische Veränderungen in den Schnitten der KI Tiere, woraus sich prinzipiell schließen lässt, dass die Gehirnentwicklung normal verlaufen konnte. Allerdings war die Anzahl der *spines* in den ersten 6 Schollringen nach Golgi Cox-Färbung signifikant geringer in KI Tieren verglichen mit Kontrollen. In der Gesamtanzahl der *spines* pro Neuron wurde allerdings kein Unterschied gefunden. Auch in konditionalen, hirnspezifischen *Cacna1c knock-out*-Tieren konnte kein Unterschied in der Gesamtanzahl der *spines* pro Neuron und der Nissl-Färbung gezeigt werden (Langwieser et al., 2010). Durch BrdU- und Ki67-Färbung konnte nachgewiesen werden, dass weder die Proliferation noch die Überlebensrate der hippocampalen Neuronen durch die I1624E Mutation beeinträchtigt sind. Insgesamt beeinträchtigt die I1624E Mutation die Entwicklung der verschiedenen Regionen im Gehirn und die Proliferation der Neuronen nicht.

Allerdings zeigte sich aufgrund der EQ-Mutation eine starke Reduktion des $Ca_v1.2$ Proteins in der Zellmembran in verschiedenen proteinbiochemischen Versuchen. Dieser Effekt war auch in herzspezifischen, konditionalen *knock-in*-Tieren zu sehen (Poomvanicha et al., 2011). Es ist eine mögliche Hypothese, dass die nicht mehr vorhandene Bindung des Calmodulins an das IQ-Motiv des $Ca_v1.2$ Kanals das *trafficking* des Kanals zur Zellmembran während der Proteinbiosynthese verhindern kann. *In vitro* konnte dies nicht nachgewiesen werden. In einer *Splicing*-Variante der α_{1C} -Untereinheit, bei der das IQ-Motiv deletiert worden war, gab es in *Xenopus* Oocyten keinen negativen Effekt auf den Maximalstrom (Zuhlke and Reuter, 1998). Auch bei einer Mutation von I1624A (Alanin), die einen starken Effekt auf die CDF (*calcium dependent facilitation*) und auf die CDI (*calcium dependent inactivation*) hat, zeigten sich keine Unterschiede in der Assoziation mit Calmodulin in biochemischen Studien (Zuhlke et al., 2000) und in Kristallstrukturanalysen (Fallon et al., 2005). Ein weiterer Erklärungsversuch für die geringe Proteinkonzentration ist, dass das $Ca_v1.2$ Protein seine Struktur durch die I1624E in dem Maße verändert, dass die Effekte, die in dieser Arbeit beschrieben wurden, auch in einer veränderten Proteinstruktur begründet sind und nicht nur

in einer reduzierten Calmodulinbindung. *In vitro* Daten unterscheiden sich häufig von *in vivo* Daten: In hippocampalen Neuronen konnte gezeigt werden, dass Calmodulin das *trafficking* an die Zellmembran reguliert (Wang et al., 2007).

Des Weiteren besitzt das IQ-Motiv die Arginin- und Lysin-reiche Sequenz ¹⁶⁵⁹RKFKKRK¹⁶⁶⁵, ein polybasisches Motiv, das als ein ER Retentionssignal dienen könnte (Michelsen et al., 2005). Durch die Interaktion von Calmodulin an die α_{1C} -Untereinheit könnte das Retentionssignal maskiert werden. Diese Interaktion ist bei der EQ-Mutation nicht mehr möglich, weshalb der Kanal nicht mehr an die Zellmembran gebracht werden kann. Möglicherweise wird auch die Interaktion der α_{1C} -Untereinheit mit der β -Untereinheit, welche ebenfalls wichtig für das *trafficking* ist (Dolphin, 2003), durch das fehlende Calmodulin geschwächt. Es konnte gezeigt werden, dass ein Komplex aus dem C-Terminus der α_{1C} -Untereinheit und Calmodulin mit dem intrazellulären Linker der I-II Domäne der α_{1C} -Untereinheit interagieren konnte, der primären Bindestelle für die β -Untereinheit (Kim et al., 2004a). Möglicherweise unterstützt Calmodulin die Bindung der β -Untereinheit an die α_{1C} -Untereinheit.

In dieser Arbeit konnte erstmals *in vivo* im Gehirn gezeigt werden, dass ein intaktes IQ-Motiv wichtig für eine normale Kanalexpression in der Zellmembran ist.

Obwohl die Interaktion von Calmodulin an das IQ-Motiv zerstört wurde, konnte in dieser Arbeit Calmodulin dennoch zusammen mit dem Calciumkanal präzipitiert werden. Eine Erklärung hierfür ist, dass *in vitro* einige Bindestellen, die N-terminal des IQ-Motivs liegen, als mögliche Calmodulin-Interaktionspartner identifiziert wurden (Zuhlke et al., 1999; Erickson et al., 2001; Pitt et al., 2001; Erickson et al., 2003; Kim et al., 2004b). Hier wurde zum ersten Mal gezeigt, dass sowohl Calmodulin als auch apoCalmodulin in Tieren mit der konditionalen, Gehirn-spezifischen I1624E Mutation auch an anderen Stellen als dem IQ-Motiv assoziieren können. Welche Stellen genau die Interaktionspartner darstellen, muss noch geklärt werden.

4.3 Veränderungen im Verhalten der gehirnspezifischen, konditionalen *knock-in*-Tiere

Da es Nachweise gibt, dass Mutationen im *Cacna1c* Gen zu Autismus-Spektrum-Krankheiten führen können (Splawski et al., 2004; Splawski et al., 2005), wurde das Sozialverhalten der gehirnspezifischen *knock-in*-Tiere untersucht. Bei einem Tiermodell für das Timothy Syndrom, einem Mausmodell mit der Mutation G406R im $Ca_v1.2$ Kanal, wurden Autismus-assoziierte Verhaltensweisen in einer Vielzahl von Verhaltensversuchen nachgewiesen (Bader et al., 2011). Tiere, die die G406R Mutation heterozygot global im

Körper exprimieren, vergruben doppelt so viele Murmeln im *Marble Burying-Test*, was auf repetitives Verhalten schließen ließ. Im *Morris Water Maze-Test* und im *Water-Y Maze-Test* benötigten heterozygote Tiere mit der G406R Mutation signifikant mehr Zeit, um umzulernen als ihre Kontrollgeschwister, was auf perseveratives Verhalten hindeutete. Auch im Sozialverhaltens-Test waren die Mutanten mit der G406R Mutation weniger interessiert an einer fremden, in einer der beiden Gitterboxen sitzenden Maus als die Kontrollen. Im *Ultrasonic-Vocalisation-Test* waren die Ultraschallrufe der Mutanten-Jungtiere halb so lang wie bei Kontroll-Jungtieren, was auf eine reduzierte Kommunikationsfähigkeit schließen ließ. Die in dieser Arbeit verwendeten *knock-in*-Tiere zeigten allerdings keine Veränderung in den Sozialverhaltenstests. Weder in der *Discrimination Chamber*, im *Resident/Intruder-Test*, im Sozial-Interaktionstest noch im *Marble Burying-Test* wurden Unterschiede zwischen beiden Tiergruppen gefunden. Obwohl es einen signifikanten Unterschied in der Anzahl der Interaktionen mit einem unbekanntem, unbelebtem Objekt im Objekt-Explorations-Test gab, gilt anzumerken, dass bei einer Dauer des Testes von 5 Minuten insgesamt nur ungefähr 10 Sekunden das Objekt von beiden Kohorten inspiziert wurde. Dennoch ist aus diesen Tests zu schließen, dass die gehirnspezifischen, konditionalen *knock-in*-Mäuse keine Defizite im Sozialverhalten aufweisen, die I1624E Mutation im Sozialverhalten keine Rolle spielt und die KI Tiere keine Autismus-assoziierten Verhaltensweisen zeigen.

Das *Cacna1c* Gen ist in Genom-weiten Assoziationsstudien mit bipolarer Störung und Depression assoziiert (Ferreira et al., 2008; Sklar et al., 2008; Moskvina et al., 2009; Green et al., 2010; Liu et al., 2011). Bis jetzt ist nicht bekannt, wie diese SNPs die Funktion oder die Konzentration des Proteins in der Zellmembran beeinflussen. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit einer Haploinsuffizienz des *Cacna1c* Gens bereits deutliche Verhaltensunterschiede zu den Kontroll-Tieren aufwiesen. Diese haploinsuffizienten Tiere explorierten weniger im *Open Field-Test*, und zeigten abnormes *Stress-Coping*-Verhalten im *Tail Suspension-Test* und im *Forced Swim-Test* (Dao et al., 2010). Mäuse, deren Dihydropyridin-sensitive Bindestelle mutiert war, zeigten nach Gabe von Nifedipin kein anti-depressiv-ähnliches Verhalten mehr, während Wildtypen in diesem Versuch ein verändertes *Stress-Coping*-Verhalten aufwiesen (Sinnegger-Brauns et al., 2004). Auch andere L-Typ Calciumkanäle spielen eine Rolle beim *Stress-Coping*-Verhalten. So konnte nachgewiesen werden, dass Mäuse, deren Dihydropyridin-sensitive Bindestelle mutiert war, nach Gabe von Bay K8644, einem Calciumkanal-Agonisten, eine höhere Immobilität aufwiesen als Wildtypen. Dies spricht für eine Involvierung des *Cacna1d* Gens (kodiert für das Ca_v1.3 Protein) beim *Stress-Coping*-Verhalten (Busquet et al., 2010). In den KI Mäusen ist die Konzentration des Ca_v1.2 Proteins in der Membran stark reduziert. Im *Tail Suspension-Test* und im *Forced Swim-Test* war eine deutlich niedrigere Immobilität zu finden im Vergleich zu Kontroll-Tieren. Ein niedrigerer Proteinlevel scheint hier für ein verändertes *Stress-Coping*-

Diskussion

Verhalten verantwortlich zu sein. In Experimenten an hirnspezifischen *Cacna1c knock-out*-Mäusen wurde in dieser Arbeit derselbe *Stress-Coping*-Effekt im *Tail Suspension*-Test gefunden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Konzentration dieses Kanalproteins tatsächlich das *Stress-Coping*-Verhalten modulieren kann. Welche Mechanismen auf molekularer Ebene hierbei ablaufen, muss noch geklärt werden. Durch einen intakten $\text{Ca}_v1.2$ Calciumkanal kann eine Reihe von intrazellulären Signalwegen aktiviert werden: So aktiviert der Kanal den MAPK-Signalweg (Dolmetsch et al., 2001), erhöht die unmittelbar frühe (*immediate early*) Genexpression (Murphy et al., 1991a) und durch proteolytische Spaltung des C-terminalen Bereiches des Kanals dient dieser als Transkriptionsfaktor (Gomez-Ospina et al., 2006). Die durch den $\text{Ca}_v1.2$ Kanal regulierten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen beeinflussen des Weiteren eine Vielzahl von intrazellulären Signalkaskaden, die die Expression von Ca^{2+} -abhängigen Genen wie beispielsweise *BDNF*, *Bcl-2* und *c-fos* regulieren (West et al., 2001).

Um zu sehen, ob das *Stress-Coping*-Verhalten, das die *knock-in*-Tiere zeigten, auch bei Kontroll-Tieren und C57/Bl6/N Tieren zu finden ist, wurde der Calciumkanalblocker Verapamil intracerebroventrikulär injiziert. Verapamil ist der experimentell bei Patienten mit bipolarer Störung am häufigsten verwendete Calciumkanalblocker und kann in Frauen die manische Phase der Bipolaren Störung reduzieren (Wisner et al., 2002). Zusätzlich zu Interaktionen mit Calcium-Ionen kann Verapamil, ähnlich wie Lithium, die Ausschüttung des Thyroidea stimulierenden Hormons (TSH) inhibieren, die Adenylyl-Cyclase-Aktivität hemmen und das antidiuretische Hormon blockieren (Patterson, 1987; Walton et al., 1996). Da Verapamil den in der Blut-Hirn-Schranke exprimierten P-Glykoprotein-Transporter inhibiert und dabei selbst nicht in relevanten Dosen in das Gehirn gelangt (Aszalos et al., 1999), wurden den Mäusen Kanülen intracerebroventrikulär implantiert. In Ratten konnte durch Injektion von Verapamil über Kanülen in den Hippocampus im *Forced Swim*-Test eine Verlängerung des aktiven Schwimmens gezeigt werden (Bidzinski et al., 1990). Auch bei Mäusen konnte eine reduzierte Immobilität gefunden werden (Overstreet et al., 1995). Es wurde erwartet, dass sich aufgrund der Injektion von Verapamil die Immobilität verringert, wie auch schon in anderen Studien gezeigt werden konnte (Overstreet et al., 1995). In dieser Arbeit konnte allerdings kein Effekt von Verapamil gefunden werden. Bei den *knock-in*-Tieren wurde die Mobilität im *Tail Suspension*-Test nicht vermindert. Durch die niedrige Proteinkonzentration in der Zellmembran der KI Tiere war es nicht möglich, einen Effekt zu sehen, da Verapamil vermutlich kaum mit dem Calciumkanal interagieren konnte. Obwohl Verapamil ein starker Calciumkanalblocker ist, wurde ebenfalls kein Effekt auf die Kontroll-Tiere oder die C57/Bl6/N Tiere gefunden. Eine Erklärung hierfür ist, dass die verwendete Konzentration des Verapamils nicht hoch genug war, um einen Effekt zu erzielen oder der Calciumkanalblocker in der Zeit bis zum Test nicht genügend

diffundieren konnte. Um dies zu prüfen, müssen in zukünftigen Versuchen andere Calciumkanalblocker verwendet werden, die vergleichbare Resultate mit denen der *knock-in-Tiere* zeigen können.

Bei den Experimenten, die das Angst- und Explorationsverhalten untersuchten, zeigte sich im *Open Field*-Test eine erhöhte Ängstlichkeit der KI Tiere in neuer Umgebung. Die Lokomotion beider Tiergruppen war nicht verändert, da beide Kohorten an beiden Tagen die gleiche Strecke mit vergleichbarer Geschwindigkeit zurücklegten. *Knock-in*-Mäuse explorierten den Randbereich in den ersten 15 Minuten mehr als die Kontrollgruppe, und wagten sich erst danach in den zentralen Bereich vor. Derselbe Effekt konnte bei einer runden *Open Field* Arena gefunden werden. Mäuse mit einem konditionalen *knock-out* des *Cacna1c* Gens im Vorderhirn explorierten den zentralen Bereich während einer Versuchsdauer von 15 Minuten ebenfalls weniger als Kontrollen (Lee et al., 2012).

Auch im *Dark/Light Box*-Test war ein Unterschied vorhanden, KI Tiere explorierten weniger oft das helle Kompartiment als Kontrollen. Dieser Effekt wurde auch in weiblichen haploinsuffizienten *Cacna1c* Tieren gefunden (Dao et al., 2010). *Knock-in*-Mäuse sind ängstlicher und weniger risikobereit verglichen mit Kontrollen. Auch bei Mäusen, die im Vorderhirn einen konditionalen *knock-out* des *Cacna1c* Gens trugen, war eine erhöhte Ängstlichkeit im EPM und im *Dark/Light Box*-Test zu finden (Lee et al., 2012).

In der Antwort auf den *Acoustic Startle*-Test wurde gezeigt, dass KI Tiere bei hohen Stimulusintensitäten eine geringere *Startle*-Antwort aufwiesen und auf stärkere Präpulse schwächer reagierten als Kontroll-Tiere. Aufgrund der gleichen Reaktion der KI Tiere auf niedrigere Stimulusintensitäten kann ein nicht-spezifischer Effekt der geringeren $Ca_v1.2$ Proteinkonzentration auf das Hören der Tiere ausgeschlossen werden. Auch diese Ergebnisse wurden in haploinsuffizienten, weiblichen *Cacna1c* Tieren widergespiegelt (Dao et al., 2010). Die niedrigere *Startle*-Antwort könnte auf eine weniger hohe Aktivität der KI Tiere gegenüber aversiven Stimuli zurückzuführen sein.

Im *fear conditioning* zeigte sich sowohl im auditiven als auch im kontextualen Angst-Gedächtnis an Tag 1 und Tag 6 eine deutlich höhere *Freezing*-Antwort in *knock-in-Tieren*. Bei diesen Tieren war ein Defizit in der akuten Angstadaption zu finden und eine abgeschwächte Extinktion. Dieses Ergebnis entspricht anderen Studien, die auch eine Rolle des $Ca_v1.2$ Kanals im *fear conditioning* zeigten. Durch Gabe von zwei verschiedenen Calciumkanalblockern, Nifedipin und Nimodipin, konnten Cain et. al. als Erste einen Effekt auf die Extinktion im *fear conditioning* zeigen (Cain et al., 2002), wobei der Effekt spezifisch nur die Extinktion reduziert, während in der Furchtexpression oder in der Akquisition keine Unterschiede zu finden waren. Zum Teil wurden diese Ergebnisse in einer anderen Studie bestätigt (Suzuki et al., 2004). Interessanterweise konnte eine abgeschwächte Extinktion nach Nifedipin-Gabe nicht gezeigt werden, wenn mit dem Extinktions-Training direkt nach

der Akquisition begonnen wurde (Cain et al., 2005), was auf einen Unterschied im Mechanismus von lang- und kurzzeitigen Extinktions-Intervallen schließen lässt (Myers and Davis, 2007). Allerdings zeigte eine andere Studie, dass durch Gabe von Isradipin die Akquisition im *fear conditioning* geschwächt wurde (Langwieser et al., 2010). Eine Veränderung in der Akquisition konnte in dieser Arbeit allerdings nicht bestätigt werden, da die initiale Angstantwort in beiden Tiergruppen an Tag 1 und Tag 6 in neuer Umgebung die Gleiche war. L-Typ Calciumkanäle sind wichtig bei der Konsolidierung des Angst-Gedächtnisses und bei der Formation des Angst-Gedächtnisses während des *fear conditionings* (Bauer et al., 2002; McKinney and Murphy, 2006). Es gibt weitere Nachweise für eine mögliche Modulation des *fear conditionings* durch L-Typ Calciumkanäle. Beispielsweise wurde eine von L-Typ Calciumkanälen abhängige LTP (Langzeitpotenzierung) in Synapsen von thalamischen Neuronen in der lateralen Amygdala beschrieben, bei der die LTP durch Nifedipin blockiert werden konnte (Weisskopf et al., 1999). Diese Synapsen wurden mit dem *fear conditioning* in Zusammenhang gebracht. Vermutlich ist diese Inhibition der Extinktion bei Gabe von LTCC Calciumkanal-Blockern auf eine Blockierung der L-Typ Calciumkanäle in eben diesen Synapsen zurückzuführen. Außerdem wurde die Amplitude von exzitatorischen, postsynaptischen Strömen (*excitatory postsynaptic currents, EPSC*) in Neuronen der lateralen Amygdala nach Gabe von LTCC-Calciumblockern wie z.B. Nimodipin in Tieren, die dem *fear conditioning* unterworfen wurden, verkleinert, während dieser Effekt in naiven Tieren nicht vorhanden war (Shinnick-Gallagher et al., 2003). Es wird vermutet, dass diese Synapsen durch das *fear conditioning* sensibilisiert werden. Busquet et al. (2008) wiesen ebenfalls nach, dass der $Ca_v1.2$ Calciumkanal der für eine veränderte Extinktion verantwortliche Kanal ist. An Wildtyp-Mäusen, $Ca_v1.3$ *knock-out*-Mäusen und Tieren, deren Dihydropyridin-sensitive Bindestelle im $Ca_v1.2$ Kanal deletiert wurde, wurde nach Gabe von Nifedipin die Extinktion nach *fear conditioning* gemessen. Dabei zeigte sich ebenfalls, dass der $Ca_v1.2$ Calciumkanal wichtig für eine normale Extinktion ist, während der Verlust des $Ca_v1.3$ Kanals keine Rolle spielt (Busquet et al., 2008). In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal demonstriert, dass tatsächlich geringere Konzentrationen des $Ca_v1.2$ Calciumkanals verantwortlich sind für eine Veränderung in der Extinktion und eine Erhöhung des *Freezing*-Verhaltens. Durch das mutierte IQ-Motiv ist die Konzentration des $Ca_v1.2$ Proteins in der Membran geringer, was zu einer veränderten *Freezing*-Reaktion in Mäusen im *fear conditioning* führt.

Zusammenfassend zeigten KI Tiere eine erhöhte Ängstlichkeit in neuen Umgebungen, eine höhere Ängstlichkeit im *fear conditioning*, ein verändertes *Stress-Coping* im TST und FST und eine niedrigere *Startle*-Antwort auf hohe Stimulusintensitäten. All diese Ergebnisse sind auf die geringere Konzentration des $Ca_v1.2$ Proteins in der Membran zurückzuführen, welche

durch die I1624E Mutation zustande kommt. Möglicherweise sind diese KI Tiere ein Modell, um die Pathophysiologie von Angst in neuropsychiatrischen Krankheiten zu erforschen, bei denen das *Cacna1c* Gen involviert ist.

4.4 Elektrophysiologische Messungen

IQ-Motive von Proteinen sind die Konsensusbindungssequenzen für Calmodulin (Rhoads and Friedberg, 1997). Speziell das IQ-Motiv des $Ca_v1.2$ Kanals ist wichtig für die Inaktivierung des Kanals (Zuhlke and Reuter, 1998). Durch Mutation des Isoleucins zu Glutamat sinkt die Bindungswahrscheinlichkeit des Calmodulins an das IQ-Motiv *in vitro* deutlich und es kommt weder zu CDI noch zu CDF (Zuhlke et al., 1999; Zuhlke et al., 2000; Lee et al., 2006). Beim Timothy Syndrom sind ebenfalls Mutationen (G406R oder G402S) in der α_{1C} -Untereinheit des Kanals für den Verlust der VDI verantwortlich (Splawski et al., 2004; Feldman et al., 2005; Splawski et al., 2005). In Kardiomyozyten aus herzspezifischen I1624E *knock-in-Tieren* wurde der Calciumeinstrom, sowie die Inaktivierung und Fazilitierung des Kanals gemessen. Die Fazilitierung von Calciumströmen ist abhängig von Calmodulin und CamKII (Zuhlke et al., 1999; Hudmon et al., 2005; Lee et al., 2006; Bers and Grandi, 2009; Blaich et al., 2010; Xu et al., 2010). Dabei zeigte sich, dass in herzspezifischen *knock-in-Tieren* mit der I1624E Mutation eine durch CaM/CamKII vermittelte Fazilitierung nicht mehr vorhanden ist, während der Kanal in einen Phänotyp transformiert wird, der die Eigenschaften eines inaktivierten Kanals rekapituliert (Poomvanicha et al., 2011). In den für diese Arbeit verwendeten gehirnspezifischen *knock-in-Tieren* sind bis jetzt noch keine elektrophysiologischen Daten mit entsprechend hoher Anzahl für beide Gruppen vorhanden. Preliminäre Daten zeigen allerdings ähnliche Ergebnisse. Es ist davon auszugehen, dass die I1624E Mutation im Gehirn ähnliche Effekte hervorruft wie bei den herzspezifischen *knock-in-Tieren*. Eine fehlende Fazilitierung könnte auf die geringere Affinität, CaM zu binden, zurückzuführen zu sein. Durch die nicht mehr vorhandene Bindung erfolgt auch keine Aktivierung von CaMKII mehr. CaMKII ist einer der Hauptmodulatoren für die I_{Ca} -Aktivität. Eine Inhibition von CaMKII durch inhibitorische Peptide oder Blocker wie KN-93 verlängert den Effekt der Inaktivierung (Yuan and Bers, 1994; Guo and Duff, 2006), verschiebt die Inaktivierungskurve in negativere Spannungsbereiche (Yuan and Bers, 1994; Li et al., 1997) und reduziert die Fazilitierung von I_{Ca} (Xiao et al., 1994; Guo and Duff, 2006; Blaich et al., 2010). Außerdem zeigten CaMKII δ *knock-out-Tiere* ebenfalls eine verlangsamte Rückkehr nach Inaktivierung und eine reduzierte Fazilitierung von I_{Ca} (Xu et al., 2010). In den herzspezifischen I1624E *knock-in-Tieren* wurden dieselben Effekte gefunden. Deshalb ist davon auszugehen, dass die I1624E Mutation aufgrund der nicht mehr vorhandenen Bindung von Calmodulin am IQ-Motiv eine Aktivierung der CaMKII verhindert. Allerdings

könnte sich auch die Konformation des C-Terminus aufgrund der Mutation so verändern, dass sich alleine dadurch die Affinität zu CaMKII verändert.

4.5 Untersuchung der Neurotransmitterausschüttung

Verschiedene Typen von VDCCs unterstützen die Neurotransmitterausschüttung in Synapsen (Reuter, 1996; Catterall, 2000). L-Typ Calciumkanäle spielen eine sehr kleine bzw. keine Rolle bei der basalen Neurotransmitterausschüttung (Kamiya et al., 1988; Edmonds et al., 1990; Takahashi and Momiyama, 1993; Wheeler et al., 1994; Dunlap et al., 1995; Reuter, 1995; Seoane et al., 2009). Ausnahmen sind bestimmte Zelltypen wie in der Retina oder die Cochlea-Haarzellen des Innenohrs (Schmitz and Witkovsky, 1997; Zhang et al., 1999). Allerdings sind L-Typ Calciumkanäle sehr wichtig für die präsynaptische Plastizität (Magee and Johnston, 1997; Jensen and Mody, 2001; Shinnick-Gallagher et al., 2003; Zakharenko et al., 2003; Seoane et al., 2009). Des Weiteren spielen L-Typ VGCCs eine Schlüsselrolle bei der selektiven dopaminergen Neurodegeneration in der *Substantia nigra pars compacta* bei Morbus Parkinson (Chan et al., 2007; Putzier et al., 2009; Chan et al., 2010). Der Ca_v1.3-Calciumkanal ist verantwortlich für die *Pacemaker*-Funktion von dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra pars compacta* (Chan et al., 2007). Welche genaue Rolle der Ca_v1.2 Kanal spielt, ist noch nicht endgültig geklärt. Allerdings wurde gezeigt, dass auch der Ca_v1.2 Calciumkanal mit Morbus Parkinson assoziiert ist (Wang et al., 2012). In dieser Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen der Konzentration der Ca_v1.2 Calciumkanäle in der Zellmembran und der Neurotransmitterausschüttung festgestellt werden. Die gehirnspezifischen I1624E *knock-in*-Tiere und die Kontrollen zeigten in den Basalkonzentrationen von Norepinephrin, Serotonin, dessen Abbauprodukt 5-Hydroxyindolylessigsäure (5HIAA) und Dopamin und dessen Abbauprodukten 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC) und Homovanillinsäure (HVA) keine signifikanten Unterschiede. Auch nach Stressinduktion war ein signifikanter Unterschied nur in der Ausschüttung von Serotonin vorhanden, wobei der hohe Anstieg von Serotonin nach Stress bei KI Tieren sehr schnell wieder auf Basalniveau abfiel. Das serotonerge System wird mit psychiatrischen Krankheiten in Verbindung gebracht (Schildkraut, 1965; Mendels and Frazer, 1975; Vawter et al., 2000). Eine geringere Serotoninkonzentration ist ein Symptom bei Depression (Heninger et al., 1984). Die KI Tiere zeigten ein anti-depressiv-ähnliches Verhalten und könnten daher auch eine veränderte Serotoninkonzentration aufweisen.

Beide Tiergruppen zeigten nach der Stresssituation denselben Konzentrationsanstieg und -abfall der übrigen Neurotransmitter im selben Zeitraum. Daraus lässt sich schließen, dass der Ca_v1.2 Kanal keine oder nur eine geringe Rolle bei der präsynaptischen Neurotransmitterausschüttung spielt und die I/E Mutation und die daraus resultierende

verringerte Konzentration des Proteins in der Zellmembran nicht wichtig für eine normale Neurotransmitterausschüttung sind. Dies wird auch durch die Lokalisation des Ca_v1.2 Kanals widerspiegelt. Hauptsächlich wird dieser in den Zellkörpern und proximalen Dendriten gefunden (Westenbroek et al., 1995; Day et al., 1997), nicht aber präsynaptisch, während N- und P/Q-Typ-Calciumkanäle dort lokalisiert sind. Allerdings gibt es darüber hinaus auch Hinweise, dass der Ca_v1.2 Kanal in Axonen und präsynaptisch lokalisiert ist (Tippens et al., 2008).

4.6 Ausblick

Mit Hilfe der in dieser Arbeit verwendeten konditionalen *Cacna1c* KI Tiere war es erstmals möglich, die Wichtigkeit des IQ-Motivs im Gehirn *in vivo* zu demonstrieren. Eine weitergehende Untersuchung der gehirnspezifischen I1624E *knock-in*-Mauslinie ist notwendig, um kontroverse Hypothesen zur Rolle des L-Typ Ca_v1.2 Calciumkanals in Physiologie und Pathophysiologie zu klären.

Auf biochemischer Ebene wurde eine stark reduzierte Konzentration des Ca_v1.2 Kanals in der Membran nachgewiesen. Künftige Versuche werden sich mit den Signalwegen befassen, die durch die Aktivierung des Calciumkanals und durch die Interaktion von CaM an das IQ-Motiv aktiviert werden. Dadurch können mögliche veränderte Signalkaskaden gefunden werden, die auch für das modulierte Verhalten in den KI Tieren eine Rolle spielen können.

Auf Verhaltensebene konnte ein verändertes Angstverhalten und ein verändertes Verhalten in Tests für depressionsähnliches Verhalten gezeigt werden. Wichtig ist in diesem Fall, dass weitere Calciumkanalblocker, wie Isradipin oder Nifedipin, an Wildtyp-Mäusen getestet werden, um den Effekt, der in gehirnspezifischen *knock-in*- und *knock-out*-Tieren zu sehen ist, nachbilden zu können und so nochmals eine spezifische Assoziation des *Cacna1c* Gens mit Depression und bipolarer Störung zu zeigen.

Vielleicht kann man mit Hilfe dieser Ergebnisse die Erforschung der Calciumkanalblocker als medikamentöse Behandlung bei psychischen Störungen weiter vorantreiben. Weitere Experimente mit den *knock-in*-Tieren könnten hierbei eine wichtige Rolle spielen, um Mechanismen, die mit dem Ca_v1.2 Calciumkanal zusammenhängen, aufzuklären und neue Möglichkeiten zur Behandlung von psychischen Störungen zu finden.

Mittels aktuell durchgeführter, elektrophysiologischer Messungen an primären, hippocampalen Neuronen sollen mögliche Veränderungen in der CDI und der CDF aufgedeckt werden, um die physikalischen Eigenschaften der I1624E Mutation besser nachvollziehen zu können. Dabei wird sich auch zeigen, ob sich die Ergebnisse der Elektrophysiologie im Gehirn und im Herzen gleichen. Mittels dieser Ergebnisse wird es

Diskussion

vermutlich auch möglich sein, den frühen embryonalen Tod der homozygoten $Ca_v1.2^{EQ/EQ}$ Tiere komplett aufzuklären.

Diese neuen Erkenntnisse zur Funktion des $Ca_v1.2$ L-Typ Calciumkanals auf neuronaler und pathophysiologischer Ebene demonstrieren eindrucksvoll, dass eine weitere, detaillierte Untersuchung der gehirnspezifischen I1624E *knock-in*-Mauslinie noch einige wichtige, auch möglicherweise überraschende Funktionen der Kanäle in Physiologie und Pathophysiologie offenbaren wird.

5 Anhang

Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	Biostep
Agar	Oxoid
Agarose LE	Biozym
Ampicillin	Sigma
Ammoniumacetat	Roth
Aquatex Mounting Medium	Vector
BCA Protein Assay, Pierce	Thermo Fisher
Borsäure	Roth
Bromophenolblau	Roth
BSA (Bovines Serum Albumin)	Roth
Calciumchlorid	Roth
Calmodulin Sepharose 4B	GE Healthcare
Calpain Inhibitor I	Roche
Calpain Inhibitor II	Roche
Chrom-Natrium-Sulfat	Merck
Cresylviolett	Merck
Deoxycholat	Sigma
DEPC	Roth
Dextrose	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
DMSO	Roth
DTT (Dithiothreitol)	Sigma
ECL	Perkin Elmer
Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Roth
Ethylenglykol-Tetraessigsäure (EGTA)	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Ficoll Typ 400	Sigma
Gelatine	Fluka
Glukose	Roth
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Hyaluronidase	Sigma
Hefeextrakt	Oxoid
Hepes	Roth
Isoamylacetat	Roth
Isofluran	Abbott
Isopropanol	Roth
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
kb-Leiter (DNA Molecular Weight Marker X)	Roche
Lysozym	Roche
M2-Medium	Sigma
Magnesiumchlorid	Sigma
Magnesiumsulfat	Merck
Methanol	Roth
Mercaptoethanol (β ME)	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Roth

Anhang

Natriumdodecylsulfat	Roth
Natriumacetat	Roth
Paraformaldehyd	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
Phenol-Chloroform	Roth
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Roth
PMSF	Fluka
Polyacrylamid (PAGE)	Roth
Precision Plus Protein Standard	Biorad
Proteinase K	Roche
RNaseA	Roche
Rotiphorese®Gel 40 (29:1)	Roth
Sukrose	Roth
Tetrazyklin	Sigma
Toluol	Roth
TrisBase	Roth
TrisHCl	Roth
Trizol	Invitrogen
TritonX-100	Sigma
Trypton	Roth
Tween 20	Roth
Vectamount Permanent Mounting Medium	Vectorlabs
(±) Verapamil Hydrochlorid	Sigma
Xylencyanol	Sigma
Xylol	Roth

Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Agarosegelkammer	MWG Biotech
Akkupipettierhilfe Rota-Filter	Roth
Analysenwaage APX-60	Denver Instrument
Bakterienschüttler Certomat®R/H	B. Braun
BioPhotometer plus	Eppendorf
Brutschrank Binder CB 53	Binder
Cryotom	Leica CM 1900
Curix 60 Filmentwickler	AGFA
Dark/light Box	MPI für Psychiatrie, AG Wotjak
Discrimination Chamber	MPI für Psychiatrie, AG Wotjak
Elevated Plus Maze	MPI für Psychiatrie, AG Wotjak
Fear conditioning box	MED Associates
Geldokumentation Felix 1050	Biostep
GenePulser	Biorad
HPLC-Pumpe	SunFlow100
Inkubator	Memmert
Inkubator (CO₂)	Binder
Mikroskop Axiovert 135	Zeiss
Mikroskop Stemi 2000	Zeiss
Mikrotom HM340	Microm
MiniProtean3Cell Gelkammer	Biorad
Nanodrop®Spectrophotometer ND-1000	Peqlab,
Open Field Box	TruScan; Coulbourn Instruments
PCR Geräte Unoll/T1 Thermocycler	Biometra
Pipetten (10, 20, 200, 1000 µl)	Gilson
pH-Messgerät pH211	Hanna Instruments

Anhang

Potter Typ RM4	Janke Kunkel KG
Rotator	Neolab
Semi-dry Blotter Multiphor II	Pharmacia LKB
Spannungsquelle bei Elektroelution	Dessaga
Standard Powerpack P 25	Biometra
Spannungsquelle	
Stereotakt	MPI für Psychiatrie, AG Wotjak
Sterilbank LaminAir HB 2448	Heraeus
Taumelmischer	Neolab
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifuge	Eppendorf
Titertek Multiscan MCC/340	Friedrich Bartolomey
Ultraturrax Polytron PT 1200	Kinematica AG
Ultrazentrifuge	Beckmann
Vakuumpipette	Bachofer
Vibratom	Leica
Vevo 770 Ultraschallgerät	Visual Sonics
Vortex-Mischer	Neolab
Überkopfschüttler Rotator	Neolab
Wasserbäder	Köttermann, Haake

Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Cryovial	Nunc
EP-Küvetten Klonieren	Peqlab
Falkon 15 ml	Corning
Falkon 50 ml	TPP
Führungskanüle MAB 4.15.IC	Microbiotech
Glasplättchen	Menzel
Hyperfilm ECL	GE
Immobilon-P (PVDF-Membran)	Millipore
Mikrodialyse-Sonde MAB 4.15.3.Cu	Microbiotech
Objektträger	Menzel
Parafilm	Roth
Pasteurpipetten	Roth
Petrischalen 3 cm	Nunc
Petrischalen 10 cm	Corning
Pipettenspitzen gestopft (20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Gilson
Pipettenspitzen nicht gestopft (20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt
Stripetten	Corning
Wellplatten (6)	Corning
Whatman 3 MM	Schleicher und Schüll

Anhang

Verwendete Oligonukleotide

Primer	Sequenz in 5'-3'Richtung	Verwendung
TK 140	ATC CGA AAA GAA AAC GTT GA	Genotypisierung der Cre-Rekombinase unter Nestin-Promotor
TK 142	ATC CAG GTT ACG GAT ATA GT	
VI4	TGG CCC CTA AGC AAT GA	Genotypisierung des <i>Cacna1c</i> Gens (VI4 + VI10 WT oder L2 Allel; VI8 + VI10 L1 Allel)
VI8	AGG GGT GTT CAG AGC AA	
VI10	CCC CAG CCA ATA GAA TGC CAA	
EQfor	TCC AGT TGG CTA CTC TCA AG	Genotypisierung der EQ-Mutation im <i>Cacna1c</i> Gen
EQrev	TGC TTG TTC CTG TCT GTA CA	
HPRT_{for}	GTA ATG ATC AGT CAA CGG GGG AC	Kontroll-PCR zur Quantifizierung
HPRT_{rev}	CCA GCA AGC TTG CAA CCT TAA CCA	Kontroll-PCR zur Quantifizierung
VS9	CTG AAA CAC AGT GAG GAG AGA CT	Quantifizierung des <i>Cacna1c</i> -Gens
VS18	TCC TAC TGA ATG TGT TCT TGG CCA	Quantifizierung des <i>Cacna1c</i> -Gens

Verwendete Antikörper

Bezeichnung und Ursprung	Protein	Verdünnung	Bezugsquelle/Referenz
Anti-Ca_v1.2, rabbit	Ca _v 1.2	1:250	Prof. F. Hofmann, TU München
Anti-β1-Adrenorezeptor, rabbit	β1-Adrenorezeptor	1:200	Sigma
Anti- Ca_v1.3, rabbit	Cav1.3	1:200	Millipore
Anti-MAPK (p44/42), rabbit	MAPK, Ladekontrolle	1:1000	Cell Signaling Technology™
GAR HRP, goat	Sekundärer Antikörper	1:50 000	Dianova
Anti-BrdU, rat	BrdU	1:500	Abcam
Anti-Ki67, rabbit	Ki67	1:200	Novacastra Laboratories
GARat-Fitc, goat	Sekundärer Antikörper	1:250	Jackson Laboratory
GAR-Alexa488	Sekundärer Antikörper	1:200	Jackson Laboratory

Verwendete Polymerasen

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung
Taq DNA Polymerase	GenScript	Genotypisierung der Mauszucht
SuperScript® II Reverse Transcriptase	Invitrogen	Umschreiben RNA in cDNS

6 Literaturverzeichnis

- Abrahams BS, Geschwind DH (2008) Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nat Rev Genet* 9:341-355.
- Aniksztejn L, Ben-Ari Y (1991) Novel form of long-term potentiation produced by a K⁺ channel blocker in the hippocampus. *Nature* 349:67-69.
- Aszalos A, Thompson K, Yin JJ, Ross DD (1999) Combinations of P-glycoprotein blockers, verapamil, PSC833, and cremophor act differently on the multidrug resistance associated protein (MRP) and on P-glycoprotein (Pgp). *Anticancer Res* 19:1053-1064.
- 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.
- Bader PL, Faizi M, Kim LH, Owen SF, Tadross MR, Alfa RW, Bett GC, Tsien RW, Rasmusson RL, Shamloo M (2011) Mouse model of Timothy syndrome recapitulates triad of autistic traits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:15432-15437.
- Bauer EP, Schafer 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.
- Bers DM (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415:198-205.
- Bers DM, Grandi E (2009) Calcium/calmodulin-dependent kinase II regulation of cardiac ion channels. *J Cardiovasc Pharmacol* 54:180-187.
- Bidzinski A, Jankowska E, Pucilowski O (1990) Antidepressant-like action of nifedipine, verapamil and hemicholinium-3 injected into the anterior hypothalamus in the rat forced swim test. *Pharmacol Biochem Behav* 36:795-798.
- 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, Qin N, Olcese R, Tareilus E, Platano D, Costantin J, Stefani E (1998) Structures and functions of calcium channel beta subunits. *J Bioenerg Biomembr* 30:357-375.
- Bito H, Deisseroth K, Tsien RW (1996) CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca²⁺- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell* 87:1203-1214.
- Blaich A, Welling A, Fischer S, Wegener JW, Kostner K, Hofmann F, Moosmang S (2010) Facilitation of murine cardiac L-type Ca_v1.2 channel is modulated by calmodulin kinase II-dependent phosphorylation of S1512 and S1570. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:10285-10289.
- Blaich A, Pahlavan S, Tian Q, Oberhofer M, Poomvanicha M, Lenhardt P, Domes K, Wegener JW, Moosmang S, Ruppenthal S, Scholz A, Lipp P, Hofmann F (2012) Mutation of the CaM-binding motif IQ of the L-type Cav1.2 Ca²⁺ channel to EQ induces dilated cardiomyopathy and death. *J Biol Chem*.
- Blanchard DC, Blanchard RJ (1988) Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Rev Psychol* 39:43-68.
- 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.
- Bootman MD, Berridge MJ (1995) The elemental principles of calcium signaling. *Cell* 83:675-678.
- Bourtchuladze R, Frenquelli B, Blendy J, Cioffi D, Schutz G, Silva AJ (1994) Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* 79:59-68.

- 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.
- Broekkamp CL, Rijk HW, Joly-Gelouin D, Lloyd KL (1986) Major tranquilizers can be distinguished from minor tranquilizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. *Eur J Pharmacol* 126:223-229.
- Bunemann M, Gerhardstein BL, Gao T, Hosey MM (1999) Functional regulation of L-type calcium channels via protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta(2) subunit. *J Biol Chem* 274:33851-33854.
- Burnette WN (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112:195-203.
- Busquet P, Hetzenauer A, Sinnegger-Brauns MJ, Striessnig J, Singewald N (2008) Role of L-type Ca²⁺ channel isoforms in the extinction of conditioned fear. *Learn Mem* 15:378-386.
- Busquet P, Nguyen NK, Schmid E, Tanimoto N, Seeliger MW, Ben-Yosef T, Mizuno F, Akopian A, Striessnig J, Singewald N (2010) CaV1.3 L-type Ca²⁺ channels modulate depression-like behaviour in mice independent of deaf phenotype. *Int J Neuropsychopharmacol* 13:499-513.
- 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.
- Carey M, Lisberger S (2002) Embarrassed, but not depressed: eye opening lessons for cerebellar learning. *Neuron* 35:223-226.
- Catterall WA (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:521-555.
- Chan CS, Gertler TS, Surmeier DJ (2010) A molecular basis for the increased vulnerability of substantia nigra dopamine neurons in aging and Parkinson's disease. *Mov Disord* 25 Suppl 1:S63-70.
- Chan CS, Guzman JN, Ilijic E, Mercer JN, Rick C, Tkatch T, Meredith GE, Surmeier DJ (2007) 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature* 447:1081-1086.
- 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.
- Clapham DE (2007) Calcium signaling. *Cell* 131:1047-1058.
- 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 Ca²⁺ channels. *Neuroscience* 120:435-442.
- Cohen C, Perrault G, Sanger DJ (1997) Assessment of the antidepressant-like effects of L-type voltage-dependent channel modulators. *Behav Pharmacol* 8:629-638.
- Crawley JN, Chen T, Puri A, Washburn R, Sullivan TL, Hill JM, Young NB, Nadler JJ, Moy SS, Young LJ, Caldwell HK, Young WS (2007) Social approach behaviors in oxytocin knockout mice: comparison of two independent lines tested in different laboratory environments. *Neuropeptides* 41:145-163.
- 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 Ca²⁺ channel gene family. *Circ Res* 83:103-109.

- Dao DT, Mahon PB, Cai X, Kovacsics CE, Blackwell RA, Arad M, Shi J, Zandi PP, O'Donnell P, Knowles JA, Weissman MM, Coryell W, Scheftner WA, Lawson WB, Levinson DF, Thompson SM, Potash JB, Gould TD (2010) Mood disorder susceptibility gene CACNA1C modifies mood-related behaviors in mice and interacts with sex to influence behavior in mice and diagnosis in humans. *Biol Psychiatry* 68:801-810.
- 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 Ca²⁺ channel Cav1.2. *Science* 293:98-101.
- Davis M (1992) The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu Rev Neurosci* 15:353-375.
- Day NC, Wood SJ, Ince PG, Volsen SG, Smith W, Slater CR, Shaw PJ (1997) Differential localization of voltage-dependent calcium channel alpha1 subunits at the human and rat neuromuscular junction. *J Neurosci* 17:6226-6235.
- De Jongh KS, Warner C, Colvin AA, Catterall WA (1991) Characterization of the two size forms of the alpha 1 subunit of skeletal muscle L-type calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10778-10782.
- De Jongh KS, Murphy BJ, Colvin AA, Hell JW, Takahashi M, Catterall WA (1996) Specific phosphorylation of a site in the full-length form of the alpha 1 subunit of the cardiac L-type calcium channel by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Biochemistry* 35:10392-10402.
- 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.
- 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.
- Dolphin AC (2003) Beta subunits of voltage-gated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 35:599-620.
- Domes K, Ding J, Lemke T, Blaich A, Wegener JW, Brandmayr J, Moosmang S, Hofmann F (2011) Truncation of murine CaV1.2 at Asp-1904 results in heart failure after birth. *J Biol Chem* 286:33863-33871.
- Dubel SJ, Starr TV, Hell J, Ahlijanian 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.
- Dunlap K, Luebke JI, Turner TJ (1995) Exocytotic Ca²⁺ channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci* 18:89-98.
- Dzhura I, Wu Y, Colbran RJ, Balsler JR, Anderson ME (2000) Calmodulin kinase determines calcium-dependent facilitation of L-type calcium channels. *Nat Cell Biol* 2:173-177.
- Edmonds B, Klein M, Dale N, Kandel ER (1990) Contributions of two types of calcium channels to synaptic transmission and plasticity. *Science* 250:1142-1147.
- Egashira N, Okuno R, Abe M, Matsushita M, Mishima K, Iwasaki K, Oishi R, Nishimura R, Matsumoto Y, Fujiwara M (2008) Calcium-channel antagonists inhibit marble-burying behavior in mice. *J Pharmacol Sci* 108:140-143.
- 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.
- Erickson GR, Alexopoulos LG, Guilak F (2001) Hyper-osmotic stress induces volume change and calcium transients in chondrocytes by transmembrane, phospholipid, and G-protein pathways. *J Biomech* 34:1527-1535.
- Erickson GR, Northrup DL, Guilak F (2003) Hypo-osmotic stress induces calcium-dependent actin reorganization in articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 11:187-197.

- Erxleben C, Liao Y, Gentile S, Chin D, Gomez-Alegria C, Mori Y, Birnbaumer L, Armstrong DL (2006) Cyclosporin and Timothy syndrome increase mode 2 gating of CaV1.2 calcium channels through aberrant phosphorylation of S6 helices. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:3932-3937.
- Fallon JL, Halling DB, Hamilton SL, Quijcho FA (2005) Structure of calmodulin bound to the hydrophobic IQ domain of the cardiac Ca(v)1.2 calcium channel. *Structure* 13:1881-1886.
- 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.
- Feldman DS, Carnes CA, Abraham WT, Bristow MR (2005) Mechanisms of disease: beta-adrenergic receptors--alterations in signal transduction and pharmacogenomics in heart failure. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2:475-483.
- Fendt M, Fanselow MS (1999) The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev* 23:743-760.
- Feng ZP, Hamid J, Doering C, Jarvis SE, Bosey GM, Bourinet E, Snutch TP, Zamponi GW (2001) Amino acid residues outside of the pore region contribute to N-type calcium channel permeation. *J Biol Chem* 276:5726-5730.
- Ferreira MA, O'Donovan MC, Meng YA, Jones IR, Ruderfer DM, Jones L, Fan J, Kirov G, Perlis RH, Green EK, Smoller JW, Grozeva D, Stone J, Nikolov I, Chambert K, Hamshere ML, Nimgaonkar VL, Moskvina V, Thase ME, Caesar S, Sachs GS, Franklin J, Gordon-Smith K, Ardlie KG, Gabriel SB, Fraser C, Blumenstiel B, Defelice M, Breen G, Gill M, Morris DW, Elkin A, Muir WJ, McGhee KA, Williamson R, MacIntyre DJ, MacLean AW, St CD, Robinson M, Van Beck M, Pereira AC, Kandaswamy R, McQuillin A, Collier DA, Bass NJ, Young AH, Lawrence J, Ferrier IN, Anjorin A, Farmer A, Curtis D, Scolnick EM, McGuffin P, Daly MJ, Corvin AP, Holmans PA, Blackwood DH, Gurling HM, Owen MJ, Purcell SM, Sklar P, Craddock N (2008) Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder. *Nat Genet* 40:1056-1058.
- Findlay I (2002) Voltage- and cation-dependent inactivation of L-type Ca²⁺ channel currents in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 541:731-740.
- Fuller MD, Emrick MA, Sadilek M, Scheuer T, Catterall WA (2010) Molecular mechanism of calcium channel regulation in the fight-or-flight response. *Sci Signal* 3:ra70.
- Gao T, Chien AJ, Hosey MM (1999) Complexes of the alpha1C and beta subunits generate the necessary signal for membrane targeting of class C L-type calcium channels. *J Biol Chem* 274:2137-2144.
- Gao T, Bunemann M, Gerhardstein BL, Ma H, Hosey MM (2000) Role of the C terminus of the alpha 1C (CaV1.2) subunit in membrane targeting of cardiac L-type calcium channels. *J Biol Chem* 275:25436-25444.
- Gao T, Cuadra AE, Ma H, Bunemann M, Gerhardstein BL, Cheng T, Eick RT, Hosey MM (2001) C-terminal fragments of the alpha 1C (CaV1.2) subunit associate with and regulate L-type calcium channels containing C-terminal-truncated alpha 1C subunits. *J Biol Chem* 276:21089-21097.
- 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.
- 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)1.2 encodes a transcription factor. *Cell* 127:591-606.
- Green EK, Grozeva D, Jones I, Jones L, Kirov G, Caesar S, Gordon-Smith K, Fraser C, Forty L, Russell E, Hamshere ML, Moskvina V, Nikolov I, Farmer A, McGuffin P, Holmans PA, Owen MJ, O'Donovan MC, Craddock N (2010) The bipolar disorder risk allele at CACNA1C also confers risk of recurrent major depression and of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 15:1016-1022.
- Grover LM, Teyler TJ (1990) Two components of long-term potentiation induced by different patterns of afferent activation. *Nature* 347:477-479.
- Guo J, Duff HJ (2006) Calmodulin kinase II accelerates L-type Ca²⁺ current recovery from inactivation and compensates for the direct inhibitory effect of [Ca²⁺]_i in rat ventricular myocytes. *J Physiol* 574:509-518.

- Gurney AM, Charnet P, Pye JM, Nargeot J (1989) Augmentation of cardiac calcium current by flash photolysis of intracellular caged-Ca²⁺ molecules. *Nature* 341:65-68.
- Guy HR, Conti F (1990) Pursuing the structure and function of voltage-gated channels. *Trends Neurosci* 13:201-206.
- Halling DB, Aracena-Parks P, Hamilton SL (2006) Regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels by calmodulin. *Sci STKE* 2006:er1.
- 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.
- Heninger GR, Charney DS, Sternberg DE (1984) Serotonergic function in depression. Prolactin response to intravenous tryptophan in depressed patients and healthy subjects. *Arch Gen Psychiatry* 41:398-402.
- Hetzenauer A, Sinnegger-Brauns MJ, Striessnig J, Singewald N (2006) Brain activation pattern induced by stimulation of L-type Ca²⁺-channels: contribution of Ca(V)1.3 and Ca(V)1.2 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.
- Huang YY, Malenka RC (1993) Examination of TEA-induced synaptic enhancement in area CA1 of the hippocampus: the role of voltage-dependent Ca²⁺ 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.
- Hudmon A, Schulman H, Kim J, Maltez JM, Tsien RW, Pitt GS (2005) CaMKII tethers to L-type Ca²⁺ channels, establishing a local and dedicated integrator of Ca²⁺ signals for facilitation. *J Cell Biol* 171:537-547.
- Hulme JT, Yarov-Yarovoy V, Lin TW, Scheuer T, Catterall WA (2006) Autoinhibitory control of the CaV1.2 channel by its proteolytically processed distal C-terminal domain. *J Physiol* 576:87-102.
- 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.
- Jacob W, Yassouridis A, Marsicano G, Monory K, Lutz B, Wotjak CT (2009) Endocannabinoids render exploratory behaviour largely independent of the test aversiveness: role of glutamatergic transmission. *Genes Brain Behav* 8:685-698.
- Jensen K, Mody I (2001) L-type Ca²⁺ channel-mediated short-term plasticity of GABAergic synapses. *Nat Neurosci* 4:975-976.
- 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.
- Kamiya H, Sawada S, Yamamoto C (1988) Synthetic omega-conotoxin blocks synaptic transmission in the hippocampus in vitro. *Neurosci Lett* 91:84-88.
- Kamprath K, Wotjak CT (2004) Nonassociative learning processes determine expression and extinction of conditioned fear in mice. *Learn Mem* 11:770-786.
- Kandel ER (2001) The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294:1030-1038.

- Kempton MJ, Ruberto G, Vassos E, Tatarelli R, Girardi P, Collier D, Frangou S (2009) Effects of the CACNA1C risk allele for bipolar disorder on cerebral gray matter volume in healthy individuals. *Am J Psychiatry* 166:1413-1414.
- Kim J, Ghosh S, Nunziato DA, Pitt GS (2004a) Identification of the components controlling inactivation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Neuron* 41:745-754.
- Kim J, Ghosh S, Liu H, Tateyama M, Kass RS, Pitt GS (2004b) Calmodulin mediates Ca²⁺ sensitivity of sodium channels. *J Biol Chem* 279:45004-45012.
- Kim Y, Moon JS, Lee KS, Park SY, Cheong J, Kang HS, Lee HY, Kim HD (2004c) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin mediates the expression of iNOS through IKK and NF-kappaB activity in LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages and RAW 264.7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 314:695-703.
- Kollmar R, Fak J, Montgomery LG, Hudspeth AJ (1997) Hair cell-specific splicing of mRNA for the alpha1D subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels in the chicken's cochlea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14889-14893.
- 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.
- Krug A, Nieratschker V, Markov V, Krach S, Jansen A, Zerres K, Eggermann T, Stocker T, Shah NJ, Treutlein J, Muhleisen TW, Kircher T (2010) Effect of CACNA1C rs1006737 on neural correlates of verbal fluency in healthy individuals. *Neuroimage* 49:1831-1836.
- Lacinova L (2005) Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys* 24 Suppl 1:1-78.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Langwieser N, Christel CJ, Kleppisch T, Hofmann F, Wotjak CT, Moosmang S (2010) Homeostatic switch in hebbian plasticity and fear learning after sustained loss of Cav1.2 calcium channels. *J Neurosci* 30:8367-8375.
- 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.
- Lee A, Wong ST, Gallagher D, Li B, Storm DR, Scheuer T, Catterall WA (1999a) Ca²⁺/calmodulin binds to and modulates P/Q-type calcium channels. *Nature* 399:155-159.
- Lee A, Ra S, Britt J, Lee A, Moosmang S, Hofmann F, Pieper A, Rajadhyaksha A (2012) Forebrain elimination of CACNA1C mediates anxiety-like behavior in mice. *Molecular Psychiatry* 1-2.
- Lee JH, Daud AN, Cribbs LL, Lacerda AE, Pereverzev A, Klockner U, Schneider T, Perez-Reyes E (1999b) Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J Neurosci* 19:1912-1921.
- Lee TS, Karl R, Moosmang S, Lenhardt P, Klugbauer N, Hofmann F, Kleppisch T, Welling A (2006) Calmodulin kinase II is involved in voltage-dependent facilitation of the L-type Cav1.2 calcium channel: Identification of the phosphorylation sites. *J Biol Chem* 281:25560-25567.
- Letts VA, Felix R, Biddlecome GH, Arikath J, Mahaffey CL, Valenzuela A, Bartlett FS, 2nd, Mori Y, Campbell KP, Frankel WN (1998) The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca²⁺-channel gamma subunit. *Nat Genet* 19:340-347.
- Li L, Satoh H, Ginsburg KS, Bers DM (1997) The effect of Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II on cardiac excitation-contraction coupling in ferret ventricular myocytes. *J Physiol* 501 (Pt 1):17-31.
- Liu Y, Blackwood DH, Caesar S, de Geus EJ, Farmer A, Ferreira MA, Ferrier IN, Fraser C, Gordon-Smith K, Green EK, Grozeva D, Gurling HM, Hamshere ML, Heutink P, Holmans PA, Hoogendijk WJ, Hottenga JJ, Jones L, Jones IR, Kirov G, Lin D, McGuffin P, Moskvina V, Nolen WA, Perlis RH, Posthuma D, Scolnick EM, Smit AB, Smit JH, Smoller JW, St Clair D, van Dyck R, Verhage M, Willemsen G, Young AH, Zandbelt T, Boomsma DI, Craddock N, O'Donovan MC, Owen MJ, Penninx BW, Purcell S, Sklar P, Sullivan PF (2011) Meta-analysis of genome-wide association data of bipolar disorder and major depressive disorder. *Mol Psychiatry* 16:2-4.

- 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 (1997) A synaptically controlled, associative signal for Hebbian plasticity in hippocampal neurons. *Science* 275:209-213.
- Maier LS, Bers DM (2002) Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol* 34:919-939.
- Marban E, Tsien RW (1982) Effects of nystatin-mediated intracellular ion substitution on membrane currents in calf purkinje fibres. *J Physiol* 329:569-587.
- Maren S (1996) Synaptic transmission and plasticity in the amygdala. An emerging physiology of fear conditioning circuits. *Mol Neurobiol* 13:1-22.
- Marks ML, Trippel DL, Keating MT (1995a) Long QT syndrome associated with syndactyly identified in females. *Am J Cardiol* 76:744-745.
- Marks ML, Whisler SL, Clericuzio C, Keating M (1995b) A new form of long QT syndrome associated with syndactyly. *J Am Coll Cardiol* 25:59-64.
- McKinney BC, Murphy GG (2006) The L-Type voltage-gated calcium channel Cav1.3 mediates consolidation, but not extinction, of contextually conditioned fear in mice. *Learn Mem* 13:584-589.
- McKinney BC, Sze W, White JA, Murphy GG (2008) L-type voltage-gated calcium channels in conditioned fear: a genetic and pharmacological analysis. *Learn Mem* 15:326-334.
- McRory JE, Hamid J, Doering CJ, Garcia E, Parker R, Hamming K, Chen L, Hildebrand M, Beedle AM, Feldcamp L, Zamponi GW, Snutch TP (2004) The CACNA1F gene encodes an L-type calcium channel with unique biophysical properties and tissue distribution. *J Neurosci* 24:1707-1718.
- Mendels J, Frazer A (1975) Reduced central serotonergic activity in mania: implications for the relationship between depression and mania. *Br J Psychiatry* 126:241-248.
- Michelsen K, Yuan H, Schwappach B (2005) Hide and run. Arginine-based endoplasmic-reticulum-sorting motifs in the assembly of heteromultimeric membrane proteins. *EMBO Rep* 6:717-722.
- 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 Ca²⁺ channels in NMDA receptor-independent synaptic plasticity and spatial memory. *J Neurosci* 25:9883-9892.
- 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, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297:681-683.
- Moskvina V, Craddock N, Holmans P, Nikolov I, Pahwa JS, Green E, Owen MJ, O'Donovan MC (2009) Gene-wide analyses of genome-wide association data sets: evidence for multiple common risk alleles for schizophrenia and bipolar disorder and for overlap in genetic risk. *Mol Psychiatry* 14:252-260.

- Mouton J, Feltz A, Maulet Y (2001) Interactions of calmodulin with two peptides derived from the c-terminal cytoplasmic domain of the Ca(v)1.2 Ca²⁺ channel provide evidence for a molecular switch involved in Ca²⁺-induced inactivation. *J Biol Chem* 276:22359-22367.
- 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, Baraban JM (1991a) L-type voltage-sensitive calcium channels mediate synaptic activation of immediate early genes. *Neuron* 7:625-635.
- Murphy TH, Worley PF, Nakabeppu Y, Christy B, Gastel J, Baraban JM (1991b) Synaptic regulation of immediate early gene expression in primary cultures of cortical neurons. *J Neurochem* 57:1862-1872.
- Myers KM, Davis M (2007) Mechanisms of fear extinction. *Mol Psychiatry* 12:120-150.
- Nagy A (2000) Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26:99-109.
- 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.
- Noble S, Shimoni Y (1981a) The calcium and frequency dependence of the slow inward current 'staircase' in frog atrium. *J Physiol* 310:57-75.
- Noble S, Shimoni Y (1981b) Voltage-dependent potentiation of the slow inward current in frog atrium. *J Physiol* 310:77-95.
- Nyegaard M, Demontis D, Foldager L, Hedemand A, Flint TJ, Sorensen KM, Andersen PS, Nordentoft M, Werge T, Pedersen CB, Hougaard DM, Mortensen PB, Mors O, Borglum AD (2010) CACNA1C (rs1006737) is associated with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 15:119-121.
- Obermair GJ, Szabo Z, Bourinet E, Flucher BE (2004) Differential targeting of the L-type Ca²⁺ channel alpha 1C (CaV1.2) to synaptic and extrasynaptic compartments in hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 19:2109-2122.
- Overstreet DH, Pucilowski O, Rezvani AH, Janowsky DS (1995) Administration of antidepressants, diazepam and psychomotor stimulants further confirms the utility of Flinders Sensitive Line rats as an animal model of depression. *Psychopharmacology (Berl)* 121:27-37.
- Pate P, Mochca-Morales J, Wu Y, Zhang JZ, Rodney GG, Serysheva, II, Williams BY, Anderson ME, Hamilton SL (2000) Determinants for calmodulin binding on voltage-dependent Ca²⁺ channels. *J Biol Chem* 275:39786-39792.
- Patterson JF (1987) Treatment of acute mania with verapamil. *J Clin Psychopharmacol* 7:206-207.
- Pavlov I, Anrep G (1927) Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. Oxford University Press: Humphrey Milford.
- Paylor R, Tracy R, Wehner J, Rudy JW (1994) DBA/2 and C57BL/6 mice differ in contextual fear but not auditory fear conditioning. *Behav Neurosci* 108:810-817.
- Pellow S, P. C, SE. F (1985) Are the anxiogenic effects of yohimbine mediated by its action at benzodiazepine receptors? *Neurosci Lett* Mar 22;55(1):5-9.
- 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, Kim HS, Lacerda AE, Horne W, Wei XY, Rampe D, Campbell KP, Brown AM, Birnbaumer L (1989) Induction of calcium currents by the expression of the alpha 1-subunit of the dihydropyridine receptor from skeletal muscle. *Nature* 340:233-236.
- 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.
- Peterson BZ, DeMaria CD, Adelman JP, Yue DT (1999) Calmodulin is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺ - dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron* 22:549-558.
- 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.
- Pitt GS, Zuhlke RD, Hudmon A, Schulman H, Reuter H, Tsien RW (2001) Molecular basis of calmodulin tethering and Ca²⁺-dependent inactivation of L-type Ca²⁺ channels. *J Biol Chem* 276:30794-30802.

- 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.
- Poling A, Cleary J, Monaghan M (1981) Burying by rats in response to aversive and nonaversive stimuli. *J Exp Anal Behav* 35:31-44.
- Poomvanicha M, Wegener JW, Blaich A, Fischer S, Domes K, Moosmang S, Hofmann F (2011) Facilitation and Ca²⁺-dependent inactivation are modified by mutation of the Ca(v)1.2 channel IQ motif. *J Biol Chem* 286:26702-26707.
- Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M (1978) Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 47:379-391.
- Pragnell M, De Waard M, Mori Y, Tanabe T, Snutch TP, Campbell KP (1994) Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit. *Nature* 368:67-70.
- Putzier I, Kullmann PH, Horn JP, Levitan ES (2009) Cav1.3 channel voltage dependence, not Ca²⁺ selectivity, drives pacemaker activity and amplifies bursts in nigral dopamine neurons. *J Neurosci* 29:15414-15419.
- Rajewsky K, Gu H, Kuhn R, Betz UA, Muller W, Roes J, Schwenk F (1996) Conditional gene targeting. *J Clin Invest* 98:600-603.
- Reichenbach H, Meister EM, Theile H (1992) [The heart-hand syndrome. A new variant of disorders of heart conduction and syndactylia including osseous changes in hands and feet]. *Kinderarztl Prax* 60:54-56.
- Reuter H (1995) Measurements of exocytosis from single presynaptic nerve terminals reveal heterogeneous inhibition by Ca(2+)-channel blockers. *Neuron* 14:773-779.
- Reuter H (1996) Diversity and function of presynaptic calcium channels in the brain. *Curr Opin Neurobiol* 6:331-337.
- Rhoads AR, Friedberg F (1997) Sequence motifs for calmodulin recognition. *Faseb J* 11:331-340.
- Roussos P, Giakoumaki SG, Georgakopoulos A, Robakis NK, Bitsios P (2011) The CACNA1C and ANK3 risk alleles impact on affective personality traits and startle reactivity but not on cognition or gating in healthy males. *Bipolar Disord* 13:250-259.
- Sabatini BL, Svoboda K (2000) Analysis of calcium channels in single spines using optical fluctuation analysis. *Nature* 408:589-593.
- 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.
- Schildkraut JJ (1965) The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* 122:509-522.
- Schmitz Y, Witkovsky P (1997) Dependence of photoreceptor glutamate release on a dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Neuroscience* 78:1209-1216.
- Schulla V, Renstrom E, Feil R, Feil S, Franklin I, Gjinovci A, Jing XJ, Laux D, Lundquist I, Magnuson MA, Obermuller S, Olofsson CS, Salehi A, Wendt A, Klugbauer N, Wollheim CB, Rorsman P, Hofmann F (2003) Impaired insulin secretion and glucose tolerance in beta cell-selective Ca(v)1.2 Ca²⁺ channel null mice. *EMBO J* 22:3844-3854.
- 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.

- Seoane A, Massey PV, Keen H, Bashir ZI, Brown MW (2009) L-type voltage-dependent calcium channel antagonists impair perirhinal long-term recognition memory and plasticity processes. *J Neurosci* 29:9534-9544.
- Shi J, Potash JB, Knowles JA, Weissman MM, Coryell W, Scheftner WA, Lawson WB, DePaulo JR, Jr., Gejman PV, Sanders AR, Johnson JK, Adams P, Chaudhury S, Jancic D, Evgrafov O, Zvinyatskovskiy A, Ertman N, Gladis M, Neimanas K, Goodell M, Hale N, Ney N, Verma R, Mirel D, Holmans P, Levinson DF (2011) Genome-wide association study of recurrent early-onset major depressive disorder. *Mol Psychiatry* 16:193-201.
- 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.
- Shistik E, Ivanina T, Puri T, Hosey M, Dascal N (1995) Ca²⁺ current enhancement by alpha 2/delta and beta subunits in *Xenopus* oocytes: contribution of changes in channel gating and alpha 1 protein level. *J Physiol* 489 (Pt 1):55-62.
- Sholl DA (1955) The organization of the visual cortex in the cat. *J Anat* 89:33-46.
- Sinnesger-Brauns MJ, Huber IG, Koschak A, Wild C, Obermair GJ, Einzinger U, Hoda JC, Sartori SB, Striessnig J (2009) Expression and 1,4-dihydropyridine-binding properties of brain L-type calcium channel isoforms. *Mol Pharmacol* 75:407-414.
- 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 Ca²⁺ channels. *J Clin Invest* 113:1430-1439.
- Sklar P, Smoller JW, Fan J, Ferreira MA, Perlis RH, Chambert K, Nimgaonkar VL, McQueen MB, Faraone SV, Kirby A, de Bakker PI, Ogdie MN, Thase ME, Sachs GS, Todd-Brown K, Gabriel SB, Sougnez C, Gates C, Blumenstiel B, Defelice M, Ardlie KG, Franklin J, Muir WJ, McGhee KA, MacIntyre DJ, McLean A, VanBeck M, McQuillin A, Bass NJ, Robinson M, Lawrence J, Anjorin A, Curtis D, Scolnick EM, Daly MJ, Blackwood DH, Gurling HM, Purcell SM (2008) Whole-genome association study of bipolar disorder. *Mol Psychiatry* 13:558-569.
- Smit-Rigter LA, Wadman WJ, van Hooft JA (2010) Impaired Social Behavior in 5-HT(3A) Receptor Knockout Mice. *Front Behav Neurosci* 4:169.
- 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.
- Splawski I, Timothy KW, Decher N, Kumar P, Sachse FB, Beggs AH, Sanguinetti MC, Keating MT (2005) Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8089-8096; discussion 8086-8088.
- 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)_{1.2} calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* 119:19-31.
- 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.
- Steiner MA, Marsicano G, Nestler EJ, Holsboer F, Lutz B, Wotjak CT (2008) Antidepressant-like behavioral effects of impaired cannabinoid receptor type 1 signaling coincide with exaggerated corticosterone secretion in mice. *Psychoneuroendocrinology* 33:54-67.
- Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P (1985) The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 85:367-370.
- Strekalova T, Steinbusch HW (2010) Measuring behavior in mice with chronic stress depression paradigm. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34:348-361.

- Striessnig J (1999) Pharmacology, structure and function of cardiac L-type Ca²⁺ channels. *Cell Physiol Biochem* 9:242-269.
- Striessnig J, Koschak A, Sinnegger-Brauns MJ, Hetzenauer A, Nguyen NK, Busquet P, Pelster G, Singewald N (2006) Role of voltage-gated L-type Ca²⁺ channel isoforms for brain function. *Biochem Soc Trans* 34:903-909.
- 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.
- Sullivan PF, de Geus EJ, Willemsen G, James MR, Smit JH, Zandbelt T, Arolt V, Baune BT, Blackwood D, Cichon S, Coventry WL, Domschke K, Farmer A, Fava M, Gordon SD, He Q, Heath AC, Heutink P, Holsboer F, Hoogendijk WJ, Hottenga JJ, Hu Y, Kohli M, Lin D, Lucae S, Macintyre DJ, Maier W, McGhee KA, McGuffin P, Montgomery GW, Muir WJ, Nolen WA, Nothen MM, Perlis RH, Pirilo K, Posthuma D, Rietschel M, Rizzu P, Schosser A, Smit AB, Smoller JW, Tzeng JY, van Dyck R, Verhage M, Zitman FG, Martin NG, Wray NR, Boomsma DI, Penninx BW (2009) Genome-wide association for major depressive disorder: a possible role for the presynaptic protein piccolo. *Mol Psychiatry* 14:359-375.
- Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S (2004) Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci* 24:4787-4795.
- Takahashi T, Momiyama A (1993) Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature* 366:156-158.
- 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.
- Thomas GM, Huganir RL (2004) MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5:173-183.
- Tippens AL, Lee A (2007) Caldendrin, a neuron-specific modulator of Cav1.2 (L-type) Ca²⁺ channels. *J Biol Chem* 282:8464-8473.
- Tippens AL, Pare JF, Langwieser N, Moosmang S, Milner TA, Smith Y, Lee A (2008) Ultrastructural evidence for pre- and postsynaptic localization of Cav1.2 L-type Ca²⁺ channels in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 506:569-583.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354.
- 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.
- Van Petegem F, Minor DL, Jr. (2006) The structural biology of voltage-gated calcium channel function and regulation. *Biochem Soc Trans* 34:887-893.
- Van Petegem F, Chatelain FC, Minor DL, Jr. (2005) Insights into voltage-gated calcium channel regulation from the structure of the Cav1.2 IQ domain-Ca²⁺/calmodulin complex. *Nat Struct Mol Biol* 12:1108-1115.
- Vawter MP, Freed WJ, Kleinman JE (2000) Neuropathology of bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 48:486-504.
- Walton SA, Berk M, Brook S (1996) Superiority of lithium over verapamil in mania: a randomized, controlled, single-blind trial. *J Clin Psychiatry* 57:543-546.
- Wang HG, George MS, Kim J, Wang C, Pitt GS (2007) Ca²⁺/calmodulin regulates trafficking of Ca_v1.2 Ca²⁺ channels in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 27:9086-9093.
- Wang R, Ma Z, Wang J, Xie J (2012) L-type Cav1.2 calcium channel is involved in 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in rats. *Neurotox Res* 21:266-270.
- Weissgerber P, Held B, Bloch W, Kaestner L, Chien KR, Fleischmann BK, Lipp P, Flockerzi V, Freichel M (2006) Reduced cardiac L-type Ca²⁺ current in Ca_vβ2^{-/-} embryos impairs cardiac

- development and contraction with secondary defects in vascular maturation. *Circ Res* 99:749-757.
- 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.
- Wessa M, Linke J, Witt SH, Nieratschker V, Esslinger C, Kirsch P, Grimm O, Hennerici MG, Gass A, King AV, Rietschel M (2010) The CACNA1C risk variant for bipolar disorder influences limbic activity. *Mol Psychiatry* 15:1126-1127.
- 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.
- Westenbroek RE, Ahljianian MK, Catterall WA (1990) Clustering of L-type Ca²⁺ channels at the base of major dendrites in hippocampal pyramidal neurons. *Nature* 347:281-284.
- Westenbroek RE, Sakurai T, Elliott EM, Hell JW, Starr TV, Snutch TP, Catterall WA (1995) Immunochemical identification and subcellular distribution of the alpha 1A subunits of brain calcium channels. *J Neurosci* 15:6403-6418.
- Wheeler DB, Randall A, Tsien RW (1994) Roles of N-type and Q-type Ca²⁺ channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* 264:107-111.
- 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.
- Wisner KL, Peindl KS, Perel JM, Hanusa BH, Piontek CM, Baab S (2002) Verapamil treatment for women with bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 51:745-752.
- Wood ER, Dudchenko PA, Eichenbaum H (1999) The global record of memory in hippocampal neuronal activity. *Nature* 397:613-616.
- 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.
- Wu Y, Kimbrough JT, Colbran RJ, Anderson ME (2004) Calmodulin kinase is functionally targeted to the action potential plateau for regulation of L-type Ca²⁺ current in rabbit cardiomyocytes. *J Physiol* 554:145-155.
- Xiao RP, Cheng H, Lederer WJ, Suzuki T, Lakatta EG (1994) Dual regulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activity by membrane voltage and by calcium influx. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9659-9663.
- Xu L, Lai D, Cheng J, Lim HJ, Keskanokwong T, Backs J, Olson EN, Wang Y (2010) Alterations of L-type calcium current and cardiac function in CaMKII δ knockout mice. *Circ Res* 107:398-407.
- Xu M, Welling A, Papparisto S, Hofmann F, Klugbauer N (2003) Enhanced expression of L-type Cav1.3 calcium channels in murine embryonic hearts from Cav1.2-deficient mice. *J Biol Chem* 278:40837-40841.
- Yaari Y, Hamon B, Lux HD (1987) Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons. *Science* 235:680-682.
- Yuan W, Bers DM (1994) Ca-dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca-calmodulin-dependent protein kinase. *Am J Physiol* 267:H982-993.
- 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 SY, Robertson D, Yates G, Everett A (1999) Role of L-type Ca(2+) channels in transmitter release from mammalian inner hair cells I. Gross sound-evoked potentials. *J Neurophysiol* 82:3307-3315.

Literaturverzeichnis

- 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.
- Zuhlke RD, Reuter H (1998) Ca²⁺-sensitive inactivation of L-type Ca²⁺ channels depends on multiple cytoplasmic amino acid sequences of the alpha1C subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3287-3294.
- Zuhlke RD, Pitt GS, Tsien RW, Reuter H (2000) Ca²⁺-sensitive inactivation and facilitation of L-type Ca²⁺ channels both depend on specific amino acid residues in a consensus calmodulin-binding motif in the(alpha)1C subunit. *J Biol Chem* 275:21121-21129.
- Zuhlke RD, Pitt GS, Deisseroth K, Tsien RW, Reuter H (1999) Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* 399:159-162.

V. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Sven Moosmang bedanken, dass er mir die Möglichkeit eröffnete, am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU München zu promovieren. Dank seiner Unterstützung und seinem offenen Ohr für alle Probleme gab er mir die Möglichkeit, mein Projekt voranzutreiben und alle Versuche gut durchzuführen.

Vielen Dank auch an Herrn Harald Luksch, dass er sich so unkompliziert und schnell bereit erklärte, mein offizieller Doktorvater zu sein und mir die Möglichkeit eröffnete, am Lehrstuhl für Zoologie zu promovieren. Vielen Dank für Ihre Hilfe!

Vielen Dank auch an Herrn Heinrich Meyer, der mir ebenfalls die Möglichkeit gab, am WZW zu promovieren und leider kurz vor Ende meiner Promotion plötzlich verstarb.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an Herrn Franz Hofmann, da er mir in meinen letzten Monaten so großzügig Asyl in seinen Räumen bot, mich auch bei allen bürokratischen Hürden unterstützte und meine Prüfung übernehmen wird.

Auch bei Herrn Carsten Wotjak möchte ich mich herzlich bedanken für all die guten Ratschläge, die Chance, Verhaltensbiologie zu erlernen und einem allzeit offenen Ohr. Lieber Carsten, danke auch für alle hilfreichen Diskussionen und Denkanstöße für meine zukünftige berufliche Laufbahn!

Christoph, vielen Dank, dass du dich meiner so gut angenommen hast und mich in die Welt der Verhaltensversuche eingeführt hast. Ohne deine unheimliche Geduld und Unterstützung hätten viele Versuche nicht so gut funktioniert!

Danke auch an die anderen Mitglieder der AG Wotjak, die mir bei den vielen unterschiedlichen Versuchen mit Rat und Tat zur Seite standen. Elmira, Steffi, Kathrin, Christoph, Bene, Anna, Sebastian, Caitlin und Yi-Chun, es war sehr schön, bei euch zu arbeiten und euch Löcher in den Bauch fragen zu dürfen!

Auch bei der Arbeitsgruppe von Herrn Lie am Helmholtzzentrum München möchte ich mich herzlich bedanken: Danke Kathrin und Katharina für den interessanten Einblick in die Neurogenese der Maus.

Ein besonders großes Dankeschön geht an Julia und Katrin:

Danke Katrin, dass du mich als gute Seele für alles immer wieder aufgebaut hast, wenn ich nicht mehr wollte, und mich immer bestärkt hast, weiterzumachen. Danke auch für die leckeren Mittagspausen und die Beruhigung vor Vorträgen.

Danke Julia, dass du mich immer mitgezogen hast, und immer Zeit gehabt hast, dich mit mir zu treffen und mir Hilfestellung zu geben. Danke für die witzige, tolle Zeit und die Hilfe bei anstrengenden OPs und die leckeren Kuchen!

Ohne euch beide wäre meine Zeit am Institut nur halb so gut gewesen!

Zuletzt möchte ich mich noch bei den Menschen bedanken, die mir am allernächsten stehen: meinen Eltern, meiner Schwester Verena und meinem Freund Matthias. Ich bin wirklich froh, dass ihr mich so toll unterstützt habt und mir die manchmal doch nicht ganz leichte Zeit meiner Promotion erleichtert habt. Danke, dass ihr immer für mich da seid!