

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Die Rolle des L-Typ Kalziumkanals $Ca_v1.2$ für die hippocampale Langzeitpotenzierung

Sabine Kurzeder

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

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

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Th. Kleppisch
2. Univ.- Prof. Dr. A. Konnerth

Die Dissertation wurde am 26.02.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 27.05.2009 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Verzeichnis der Abkürzungen	S.4
2. Einleitung	S.6
2.1 Synaptische Plastizität und ihre mögliche Bedeutung für Lernen und Gedächtnis	S.6
2.2 Allgemeine Eigenschaften und Expressionsmechanismen von LTP	S.12
2.3 Molekulare Mechanismen	S.17
2.4 Die Rolle spannungsabhängiger L-Typ Kalziumkanäle für LTP	S.20
2.5 Zielsetzung und Aufgabenstellung	S.25
3. Material und Methoden	S.26
3.1 Versuchstiere	S.26
3.2 Präparation des Hippocampus und Versuchsanordnung zur Ableitung der fEPSPs	S.27
3.3 Zur Erfassung der Daten verwendete Stimulationsprotokolle	S.29
3.4 Pharmakologische Untersuchungen	S.31
3.5 Auswertung der erfassten Daten	S.31
4. Ergebnisse	S.33
4.1 Basischarakteristika der synaptischen Übertragung	S.33
4.2 LTP nach Applikation des Kaliumkanalblockers Tetraethylammoniumchlorid	S.36
4.2.1 TEA-LTP in Mäusen der Altersgruppe 8-12 Wochen	S.36
4.2.2 TEA-LTP unter Isradipin in Mäusen der Altersgruppe 8-12 Wochen	S.39
4.2.3 TEA-LTP in Mäusen der Altersgruppe 20-40 Wochen	S.42
4.3 L-LTP nach tetanischer Theta-Burst-Stimulierung	S.45
4.3.1 L-LTP nach Applikation eines starken Theta-Bursts in Mäusen der Altersgruppe 20-40 Wochen	S.45
4.3.2 L-LTP nach zweifacher Theta-Burst-Stimulation in Mäusen der Altersgruppe 8-12 Wochen unter Isradipin	S.48
5. Diskussion	S.51
6. Zusammenfassung	S.58
7. Literaturverzeichnis	S.61

8. Dankvermerk

S.71

9. Erklärung

S.72

1. Verzeichnis der Abkürzungen

ACSF	- 'artificial cerebrospinal fluid'
AMPA	- α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure-Rezeptoren
AP5	-D,L-2-Amino-5-Phosphonovalerat
Ca ⁺⁺	-Kalziumionen
CA	-Cornu ammonis
CaMK	-Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase
cAMP	- 'cyclic adenosine monophosphate'
Ca _v 1.2 ^{HCKO}	-Mauslinie mit Hippocampus (bzw. Vorderhirn)-spezifischem Knockout des Ca _v 1.2-Gens
Cre	- 'cyclisation recombination'
CRE	- 'cAMP response element'
CREB	- 'cAMP response element binding protein'
DHP	-Dihydropyridin
D-LTP	-dekrementale LTP
EPSP	-exzitatorisches postsynaptisches Potential
EPSC	-exzitatorischer postsynaptischer Strom ('current')
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERK	- 'extracellular signal-regulated kinase'
HVA	- 'high voltage activated'
IOR	- 'input output relation'
IP ₃	-Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPI	-Interpulsintervall
ISI	-Interstimulusintervall
K ⁺	-Kaliumionen
L1,L2	-eine bzw. zwei loxP Seiten
loxP	-DNS-Substrat der Cre-Rekombinase (locus of crossing over of P1)
L-LTP	-langanhaltende LTP
LTP	-Langzeitpotenzierung ('long-term potentiation')
LVA	- 'low voltage activated'
Mg ⁺⁺	-Magnesiumionen
mGluR	-metabotrope Glutamatrezeptoren

MSK	- 'mitogen and stress-activated kinase'
Na ⁺	-Natriumionen
NEX	-neuronal 'helix-loop-helix' Protein
NMDAR	-N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren
PKA	-Proteinkinase A
PLC	-Phospholipase C
PPF	- 'paired pulse facilitation'
RSK	- 'ribosomal protein S6 kinase'
SEM	- 'standard error of the mean'
TEA	-Tetraethylammoniumchlorid
TBS	-Theta-Burst-Stimulation
VDCC	- 'voltage-dependent calcium channel'

2. Einleitung

2.1 Synaptische Plastizität und ihre mögliche Bedeutung für Lernen und Gedächtnis

Der kanadische Psychologe Donald Hebb formulierte 1949 eine Hypothese zur synaptischen Plastizität, laut der Gedächtnisinhalte in Form einer Verstärkung der synaptischen Übertragung gespeichert werden: 'Wenn ein Axon des Neurons A das Neuron B erregt und wiederholt oder anhaltend das Feuern, d.h. die überschwellige Erregung von Neuron B erwirkt, so wird die Effizienz von Neuron A für die Erregung von Neuron B durch einen Wachstumsprozeß oder eine Stoffwechseländerung in beiden oder einem der beiden Neurone erhöht' (Sinnes- und Neurophysiologie, Schmidt & Schaible 2002). Allgemein wird seither mit zunehmender Evidenz postuliert, dass synaptische Plastizität den kognitiven Funktionen von Lernen und Gedächtnis zugrunde liegt. Jener hat man indessen ein breites Spektrum an neuronalen Prozessen zugeordnet, deren gemeinsamer Nenner eine aktivitätsinduzierte Änderung der synaptischen Effizienz ist. Es reicht von flüchtigen funktionellen Phänomenen, wie beispielsweise der 'paired pulse facilitation' (s. unten) bis hin zu persistierenden Vorgängen, die mit morphologischen Modifikationen wie z.B. Bildung oder Verlust von synaptischen Strukturen einhergehen können (Engert & Bonhoeffer 1999, Shinoda et al. 2005). Die beiden am besten charakterisierten Formen darunter, Langzeitpotenzierung (LTP) und Langzeitdepression (LTD), definiert man als langanhaltende, aktivitätsinduzierte Veränderungen der synaptischen Stärke. Diese können als Zu- (LTP) bzw. Abnahme (LTD) des Anstiegs/der Amplitude von exzitatorischen postsynaptischen Potentialen (EPSPs) oder Strömen (EPSCs) gemessen werden. Aufgrund ihrer Eigenschaft, dass sie durch eine nur kurze Phase synaptischer Aktivität induziert werden können, dabei jedoch lange persistieren, betrachtet man diese beiden Formen weitläufig als potentiell zelluläres Modell für Lernen und Gedächtnis (Malinow und Malenka 2002). Mittlerweile hat sich auch herausgestellt, dass LTP die grundlegenden Forderungen des Hebb'schen Postulates erfüllt, wenn auch die dafür notwendige Erregung des postsynaptischen Neurons nicht mit Aktionspotentialen einhergehen muss (Linden 1999).

Einen ersten elektrophysiologischen Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Lernen und synaptischer Plastizität fanden 1970 Eric Kandel und Harold

Pinsker. Ihnen gelang es nachzuweisen, dass erlernte Modifikationen des Kiemenkontraktionsreflexes bei *Aplysia* mit Veränderungen der Amplituden von EPSPs und der Frequenzen damit assoziierter Aktionspotentiale in den beteiligten Motorneuronen einhergehen (Kandel et al. 1970). Bei jenen Lernprozessen handelte es sich um Sensitisierung und Habituation, die dem prozeduralen bzw. nichtdeklarativen Gedächtnis zugeteilt werden (s. Abbildung 1). Dieses umfasst Lernmechanismen für Fähigkeiten der Wahrnehmung und Motorik, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie ohne Mitwirkung des Bewusstseins durch Verhaltensmodifikationen zum Ausdruck kommen (Kandel 2001; Sinnes- und Neurophysiologie, Schmidt & Schaible 2002).

Nur wenig später, 1973, entdeckten Tim Bliss und Terje Lømo das Phänomen der Langzeitpotenzierung im Hippocampus anaesthetisierter Kaninchen (Bliss and Lømo 1973): durch Messung einer ansteigenden Amplitude von Körnerzell-EPSPs nach elektrischer Stimulation von Tractus perforans-Fasern konnte erstmals eine anhaltende Erhöhung der synaptischen Übertragung als Antwort auf eine elektrisch induzierte neuronale Aktivität erfasst werden. Da der Hippocampus als zentrale Struktur des medialen Temporallappensystems ein morphologisches Korrelat des deklarativen Gedächtnissystems darstellt (s. nächster Absatz sowie Abbildung 1), deutete auch dieser Nachweis auf eine mögliche Assoziation von Gedächtnis und Plastizität hin.

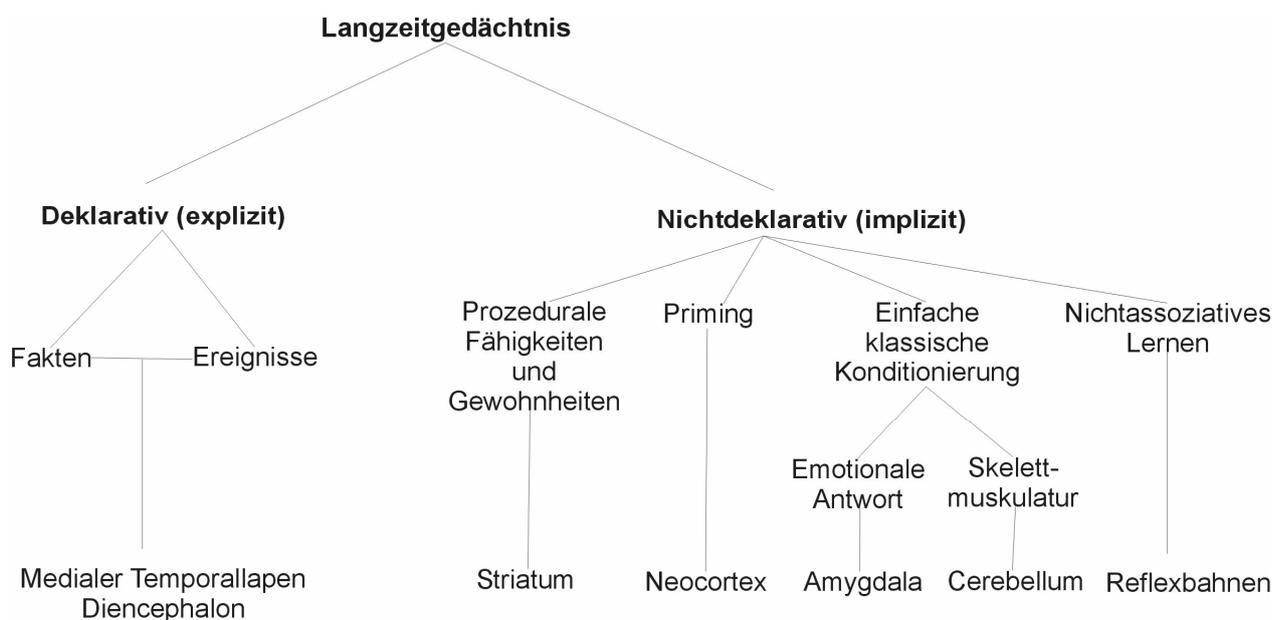


Abbildung 1: Taxonomisches Schema zum Langzeitgedächtnis von Säugetieren. Dargestellt ist die Assoziation von unterschiedlichen Gedächtnisfunktionen mit bestimmten Hirnstrukturen (Milner et al. 1998).

Die Existenz des deklarativen Gedächtnissystems, dem die bewusste Wiedergabe von Fakten und Ereignissen zugeschrieben wird, war bereits in den fünfziger Jahren von Brenda Milner bei der Untersuchung von Epilepsiepatienten entdeckt worden. Ihr bekanntester Patient war Henry M., dessen nicht behandelbare epileptische Anfälle durch die Entfernung eines großen, medialen Bereichs beider Temporallappen einschließlich des Hippocampus reduziert wurden (Neurowissenschaften, Kandel et al. 1996). Nach der Operation litt H.M. an einem selektiven Verlust deklarativer Gedächtnisfunktionen, der sich als anterograde Amnesie manifestierte. Dabei war sein Erinnerungsvermögen für Ereignisse und Daten von vor seiner Operation vollkommen intakt geblieben. Neu aufgenommene Informationen konnte er hingegen nur mehr für Sekunden im Kurzzeitgedächtnis speichern, jedoch nicht in das Tage bis Jahrzehnte anhaltende Langzeitgedächtnis übertragen. Interessanterweise waren bei H.M. und ähnlichen Patienten prozedurale Gedächtnisleistungen dagegen integer, so dass sie u.a. neue motorische Fähigkeiten normal erlernen konnten. Diese Diskrepanz setzte eine spezifische Funktion des medialen Temporallappensystems für das deklarative Langzeitgedächtnis voraus.

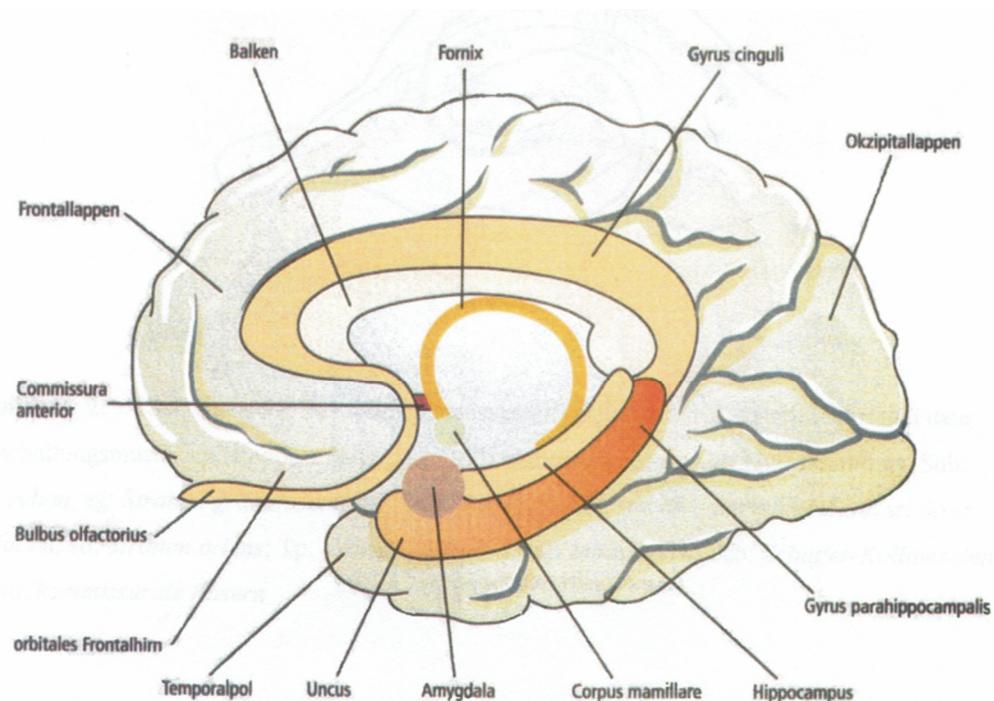


Abbildung 2: Schematische Darstellung (Medianansicht) des limbischen Systems, dem die Hippocampus-Formation zugeteilt wird, beim Menschen. Die dazugehörigen Gehirnstrukturen sind farbig hervorgehoben.

Diese bilateral angelegte Hirnstruktur umfasst den Hippocampus und assoziierte entorhinale, perirhinale und parahippokampale Kortexareale. Welche einzelnen anatomischen Strukturen dieser Region dabei von essentieller Bedeutung für das Langzeitgedächtnis sind und somit diesem System zugeordnet werden, wurde erst in den 80er Jahren an Tiermodellen näher geklärt (Squire & Zola-Morgan 1991). Der Fall eines weiteren Amnesiepatienten R.B. (Zola-Morgan & Squire 1986) zeigte zudem die herausragende Bedeutung des Hippocampus selbst. Nach einer globalen Ischämie litt auch dieser Patient an einer anterograden Amnesie ohne weitere kognitive Einschränkungen. Nach seinem Tod erbrachte die histologische Untersuchung seines Gehirns eine umschriebene bilaterale Läsion der hippocampalen CA1 Region.

Die Hippocampus-Formation umfasst dabei per Definition den Hippocampus proprius, auch Cornu ammonis genannt (CA-Felder 1-3), den Gyrus dentatus, das Subiculum und den entorhinalen Cortex. Sie wird dem limbischen System (s. Abb. 2) zugeordnet. Als ein phylogenetisch älterer Teil des Cortex besteht sie im Gegensatz zum sechsschichtigen Neocortex aus nur drei Zellschichten. Diese sind im Hippocampus zu Lamellen organisiert, welche transversal zu seiner longitudinalen Ausdehnungsrichtung verlaufen. Daher befinden sich alle wesentlichen synaptischen Verschaltungen des Hippocampus innerhalb einer transversalen Schnittebene (s. Abbildung 3).

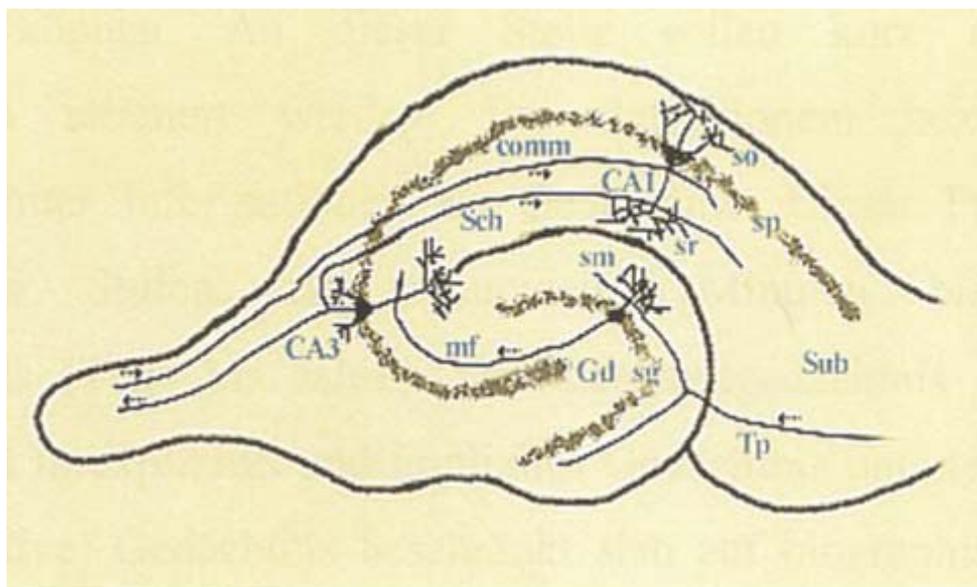


Abbildung 3: Schematische Darstellung (transversaler Schnitt) zur Zytoarchitektur und dem Verschaltungsmuster im Hippocampus. CA1/CA3: Cornu ammonis; comm: commissurale Fasern; Gd: Gyrus dentatus; mf: Moosfasern; Sch: Schaffer-Kollateralen; sg: Stratum granulosum; sm: Stratum moleculare; so: Stratum oriens; sp: Stratum pyramidale; sr: Stratum radiatum; Sub: Subiculum; Tp: Tractus perforans.

Der prominenteste Zelltyp im Hippocampus sind Pyramidenzellen, deren Somata das Stratum pyramidale bilden. Dieses verläuft als C-förmig gekrümmtes Band von der CA1- zur CA3 Region und mündet im Hilus gyri dentati. Diesem sitzt als ebenfalls C-förmig gebogene Kappe das aus Körnerzellen bestehende Zellband des Gyrus dentatus (Stratum granulosum) auf (Anatomie des Menschen, Waldeyer 2003). Deren Dendriten bilden das Stratum moleculare. Die Dendriten der bipolaren Pyramidenzellen ragen apikal ins Stratum radiatum, basal ins Stratum oriens. Wichtige Afferenzen gelangen in den Hippocampus aus dem entorhinalen Cortex, der septalen-hippocampalen Fornixbahn, sowie aus dem kontralateralen Hippocampus. Die Area entorhinalis stellt dabei die Hauptumschaltstelle polysensorischer isokortikaler Informationen für den Hippokampus dar. Sie integriert optische, olfaktorische, auditorische und polymodal assoziative Informationen und leitet diese über einen gebündelten Fasertrakt, den Tractus perforans, in den Gyrus dentatus weiter. Diese erste exzitatorische Bahn des sogenannten 'trisynaptic pathway' projiziert dort im Stratum moleculare auf Körnerzellendriten. Die Axone der Körnerzellen, auch Moosfasern genannt, bilden die zweite exzitatorische Bahn. Jene verschaltet auf den apikalen Dendriten von Pyramidenzellen der CA3 Region. Deren Axone verzweigen sich im Stratum oriens und bilden überwiegend die als 'Schaffer-Kollateralen' bezeichnete dritte exzitatorische Bahn des Hippokampus. Nach Kreuzung der Pyramidenzellschicht verlaufen sie als Faserbündel im Stratum radiatum zur CA1 Region ('Schaffer-collateral pathway') und münden dort auf den apikalen Dendriten der Pyramidenzellen. Die anderen Axonkollateralen bilden Synapsen in der CA3 Region oder verlaufen zur CA1 Region des kontralateralen Hippocampus ('commissural pathway').

Eine kurze hochfrequente, elektrische Stimulation eines der drei Faserbündel dieses Schaltkreises kann in den jeweils nachgeschalteten Hippocampusneuronen Langzeitpotenzierung induzieren. Diese kann in vitro an Hirngewebsschnitten über mehrere Stunden, in vivo sogar über Tage und Wochen nachgewiesen werden (Kandel 2001). Darüberhinaus tritt sie jedoch auch ausserhalb des Hippocampus in anderen Hirnstrukturen auf. Ob ihr Auftreten folglich mit der hippocampusabhängigen Übertragung von Gedächtnisinhalten in einen Modus der Langzeitspeicherung verknüpft ist, bleibt dabei vorerst eine Spekulation. Denn ihre postulierte Bedeutung konnte in diesem Zusammenhang bislang noch nicht nachgewiesen werden. Nichtsdestoweniger existiert mittlerweile eine Myriade an experimentellen Hinweisen auf eine mögliche Rolle der LTP für bestimmte Formen von deklarativem Langzeitgedächtnis. Zu diesen zählt insbesondere das räumliche Lernvermögen. So beschrieben John O'Keefe und John

Dostrovsky bereits in den 70er Jahren die Existenz von sogenannten 'Platzzellen' im Hippocampus (O'Keefe & Dostrovsky 1971, Leutgeb et al. 2005). Sie entdeckten, dass der Aufenthalt von sich frei bewegenden Versuchstieren an unterschiedlichen Orten jeweils mit einer erhöhten Aktivität bestimmter Pyramidenzellen korrelierte. Demzufolge werden bekannte Umgebungen im Hippocampus von jeweils spezifischen Platzzell-Ensembles als eine Art 'kognitive Landkarte' repräsentiert. Auch neue Umgebungen werden innerhalb von Minuten derartig abgespeichert. Falls ein Versuchstier dann derjenigen Umwelt erneut ausgesetzt wird, kann selbst nach mehrtägiger Latenz dasselbe Muster intrahippocampaler Aktivität gemessen werden (O'Keefe & Dostrovsky 1971, Kandel 2001). Unter NMDA-Rezeptorblockade hielten Pyramidenzellen ihre neue Platzfeldrepräsentation dagegen nur weniger als 24 Stunden aufrecht (Kentros et al. 1998). Dies lässt vermuten, dass NMDA-Rezeptor-abhängige LTP an der langfristigen Stabilisierung dieser Platzfelder beteiligt sein könnte. Darüberhinaus fand Richard Morris auch auf der Verhaltensebene Indizien für eine Beteiligung von NMDAR-LTP bei der Ausprägung von räumlichem Gedächtnis. In seiner klassischen 'watermaze'-Anordnung wurde für Ratten das Wiederfinden einer versteckten Plattform nach intraventrikulärer Infusion des NMDAR-Antagonisten AP5 (2-Amino-5-Phosphonopentanoinsäure), in LTP-blockierender Dosierung, unmöglich (Morris et al. 1986). Auch Mäuse mit fehlenden α - und δ -Isoformen des Transkriptionsfaktors CREB (s. Kap. 1.3) erwiesen sich bei dieser Aufgabe als beeinträchtigt (Bourtchuladze et al. 1994). In Hippocampusschnitten letzterer konnte nur kurzfristiges LTP, das innerhalb von 90 Minuten wieder zum Ausgangspunkt zurückging, induziert werden. Auch Verhaltensversuche mit den in dieser Arbeit vorgestellten Mäusen weisen auf eine ähnliche Rolle der L-Typ Ca^{2+} -Kanal-abhängigen LTP hin (Moosmang et al. 2005)(s. Kap. 2). Diese Mäuse zeigen bei zwei verschiedenen hippocampusabhängigen Navigationsaufgaben, unter anderem einem diskriminatorischen 'watermaze', bei dem zwischen einer stabilen und einer sinkenden Plattform unterschieden werden muss, einen schlechteren Lernerfolg. Darüberhinaus finden sich in der Literatur auch Indizien für eine Beteiligung der LTP an episodischen Gedächtnisfunktionen (Day et al. 2003).

2.2 Allgemeine Eigenschaften und Expressionsmechanismen von LTP

In der CA1 Region des Hippocampus zeichnet sich LTP durch drei grundlegende Eigenschaften aus: Kooperativität, Assoziativität und Inputspezifität (Bliss & Collingridge 1993). Kooperativität fordert die Aktivierung einer minimalen Anzahl afferenter Fasern im Sinne einer Intensitätsschwelle, die für die Induktion der LTP überschritten werden muss. Schwache Tetani, die nur wenige afferente Fasern aktivieren, führen eventuell zu kurzdauernden Formen synaptischer Plastizität, jedoch nicht zu LTP. Das zweite Merkmal, Assoziativität, besagt, dass ein schwacher Input nur dann verstärkt wird, wenn er in Assoziation mit einem starken Input im gleichen Bereich eines Dendriten eintrifft. Schließlich beschreibt die Inputspezifität, dass Synapsen, deren Inputs nicht innerhalb eines bestimmten Zeitfensters mit dem starken Reiz auftreten, nicht potenziert werden. Diese Charakteristika spiegeln sich auch in der Induktionsregel für LTP, dass eine Synapse nur dann potenziert wird, wenn deren präsynaptische Aktivierung mit einer ausreichend hohen Depolarisation der Postsynapse zusammentrifft, wider (Kandel, Schwartz & Jessell, Neurowissenschaften, 1995). Deren Forderung wurde bereits in der Hebbischen Hypothese zum Ausdruck gebracht. Eine mechanistische Begründung ihrer Existenz findet man auf der Ebene der beteiligten Rezeptoren (s. unten).

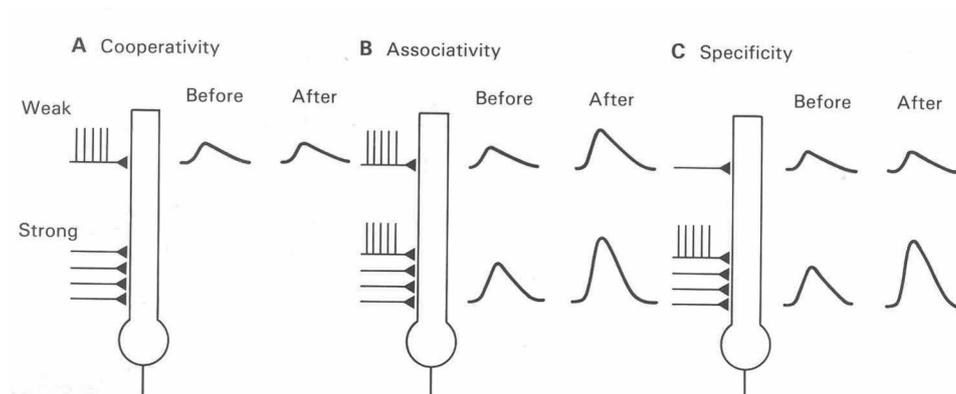


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Eigenschaften von LTP in der CA1 Region: Kooperativität (A), Assoziativität (B) und Inputspezifität (C). Gezeigt ist eine einzelne Pyramidenzelle, die schwache und starke Eingangssignale aus zwei unterschiedlichen Faserbündeln der Schaffer-Kollateralen erhält (Kandel et al., 1996).

Eine unabdingbare Voraussetzung für die Induktion von LTP in der hippocampalen CA1 Region ist eine massive Erhöhung der zytosolischen Ca^{++} -Konzentration im postsynaptischen Neuron (Raymond & Redman 2002, Bliss & Collingridge 1993, Malenka & Nicoll 1999). Sie ergibt sich u.a. aus Studien, die zeigen, dass postsynaptische intrazelluläre Injektion des Ca^{2+} -Chelators EGTA die Ausbildung von LTP verhindert (Lynch et al. 1983), während eine photolytische Freisetzung komplexierter Ca^{2+} -Ionen in der Postsynapse LTP induzieren kann (Malenka et al. 1992). Ausgelöst wird dieser Anstieg der Ionenkonzentration durch einen Ca^{++} -Einstrom über ionotrope Glutamatrezeptoren, sogenannte N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA)-Rezeptoren. Jene fungieren dabei im Sinne der oben genannten Induktionsregel als Koinzidenzdetektoren. Ihre Ca^{++} -leitenden Membrankanäle werden spannungsabhängig von extrazellulären Mg^{2+} -Ionen blockiert. Aus diesem Grund wird beim Ruhepotential die glutamaterge synaptische Übertragung der Schaffer-kollateralen in der CA1 Region von α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazolpropionsäure-Rezeptoren (AMPA-Rezeptoren) dominiert. Diese sind für Ca^{++} -Ionen undurchlässig. Erst wenn das postsynaptische Neuron stark depolarisiert wird, z.B. durch Aktionspotentiale mehrerer Afferenzen, lösen sich die Mg^{2+} -Ionen und die Blockade der NMDA-Rezeptoren wird aufgehoben. Dies führt bei gleichzeitiger präsynaptischer Glutamatausschüttung zum Einstrom von Ca^{2++} -Ionen.

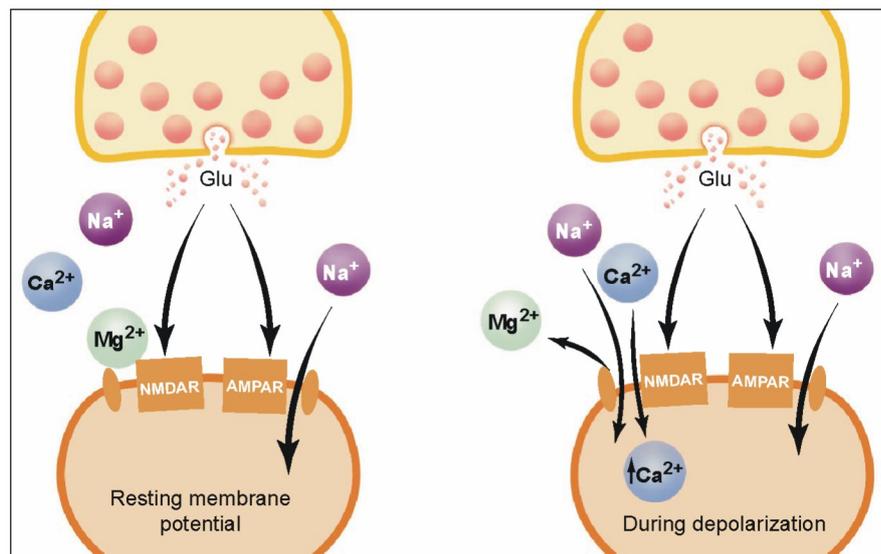


Abbildung 5: Modell der LTP-Induktion. Im Rahmen von synaptischer Aktivität aus der Präsynapse freigesetztes Glutamat (Glu) bindet an postsynaptische AMPAR und NMDAR. Letztere sind jedoch während normaler synaptischer Transmission durch einen spannungsabhängigen Mg^{++} -Block verschlossen. Erst nach Depolarisation der postsynaptischen Pyramidenzelle wird ein Einstrom von Na^{+} und Ca^{++} in den entsprechenden denritischen Dornfortsatz und somit ein Anstieg der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration als Auslösemechanismus für LTP ermöglicht (Malenka and Nicoll, 1999).

Ein der LTP gegenläufiger Prozess in der Regulation synaptischer Aktivierbarkeit, die LTD, ist weniger vollständig charakterisiert. Es existieren zwei grundlegend verschiedene Formen, hetero- und homosynaptisches LTD. Letztere kann in der CA1 Region durch niederfrequente Stimulation (0,5 - 5 Hz) induziert werden. Entsprechende Stimulationsprotokolle wurden erstmals 1992 beschrieben (Dudek & Bear 1992, Mulkey & Malenka 1992). Homosynaptisches LTD ist inputspezifisch, da es nur an den entsprechend aktivierten Synapsen auftritt. Ähnlich wie bei LTP gilt auch hier in den meisten Regionen ein postsynaptischer Ca^{2+} -Einstrom durch NMDA-Rezeptoren als kritischer Auslöser. Rosel Mulkey und Robert Malenka zeigten dass sowohl intrazelluläre Injektion des Ca^{2+} -Chelators BAPTA in die Postsynapse als auch eine Blockade postsynaptischer NMDAR durch AP5 LTD verhinderten (Mulkey & Malenka 1992).

Neben der Frage der beteiligten Rezeptoren stand auch der Entstehungsort von LTP lange im Mittelpunkt des Interesses. Die seit über zwei Jahrzehnten bestehende Kontroverse bezüglich eines prä- oder postsynaptischen Expressionsmechanismus kann noch immer nicht als endgültig abgeschlossen betrachtet werden. Eine mögliche präsynaptische Expression wird dabei vorrangig mit einer Erhöhung der Transmitterfreisetzung assoziiert, ein postsynaptischer Mechanismus hingegen mit einer gesteigerten Sensitivität gegenüber Glutamat (Bliss & Collingridge 1993, Nicoll & Malenka 1999). Diese könnte durch eine Erhöhung der Affinität, Anzahl, Öffnungswahrscheinlichkeit oder Ionenleitfähigkeit von postsynaptischen Rezeptoren hervorgerufen werden.

Für eine präsynaptische Lokalisation spricht vor allem der Nachweis, dass unter LTP, entsprechend einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der Transmitterfreisetzung (P_f), die Rate an 'synaptic failures', d.h. Aktionspotentiale, welche keine postsynaptische Antwort zur Folge haben, abnimmt (Bolshakov & Siegelbaum 1995, Stevens & Wang 1994). Jedoch ergaben experimentelle Ansätze, die potentiell erhöhte Glutamatfreisetzung zu erfassen, überwiegend negative Ergebnisse (Nicoll & Malenka 1999). Ein Beispiel ist die indirekte Bestimmung der Glutamatfreisetzung durch Messung von Strömen des von ihr hervorgerufenen elektrogenen Transports in Gliazellen. Jene waren nach LTP nicht erhöht (Nicoll & Malenka 1999).

Experimente zur Aufklärung postsynaptischer Mechanismen der LTP-Induktion ergaben mehr positive Anhaltspunkte. Ein Beispiel ist die Bestimmung von Miniatur-EPSCs (mEPSCs). Diese werden durch eine spontane Exozytose einzelner präsynaptischer Vesikel ausgelöst. Nach Induktion von LTP leiteten zwei Autoren eine erhöhte Amplitude der mEPSCs ab (Manabe et al. 1992, Wyllie et al. 1994). Aufgrund des konstanten

Transmittergehalts der Vesikel deutet eine derartige Differenz auf eine postsynaptische Veränderung hin. Allerdings existieren auch konträre Befunde, nach denen die 'quantal size' unter LTP gleich bleiben soll (Stevens & Wang 1994, Bolshakov & Siegelbaum 1996). Ein eindeutigeres Ergebnis erbrachte hingegen die Einführung einer konstitutiv aktiven Form der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Kinase II (CaMKinase II), der eine entscheidende Rolle für LTP zugeordnet wird (s.u.), in das postsynaptische Neuron (Nicoll & Malenka 1999). Denn daraufhin konnte dort eine Zunahme der EPSCs abgeleitet werden.

Eine mögliche Lösung des Disputs stellt das mittlerweile fundierte Modell der 'silent synapses' dar. Dieses bringt die Abnahme synaptischer 'failures' mit dem Vorliegen eines postsynaptischen Mechanismus in Einklang. Es basiert auf der Annahme einer Existenz reiner NMDAR-Synapsen, welche beim Auftreten von LTP durch Einbau von AMPA-Rezeptoren in funktionelle Synapsen umwandelt werden. Sowohl elektrophysiologische als auch immunzytochemische Studien sprechen für deren Vorkommen (Nicoll & Malenka 1999, Nusser et al. 1998). So konnten beispielsweise nach LTP-Induktion AMPA-EPSCs an Synapsen, die ursprünglich nur NMDAR-EPSCs aufwiesen, abgeleitet werden. Als einen denkbaren Mechanismus für diese 'AMPAfizierung' stellt man sich einen Prozess ähnlich der Exozytose präsynaptischer Vesikel vor (Malinow & Malenka 2002, Lledo et al. 1998). Befunde von mehreren Autoren stützen diese Annahme (Hayashi et al. 2000, Heynen et al. 2000, Shi et al. 1999). Dazu zählt z.B. eine 'two-photon'-mikroskopische Studie, die mittels GFP-markierten GluR1-Untereinheiten deren zelluläre Verteilung vor und nach LTP in Hippocampuschnitten untersucht (Shi et al. 1999). Denn insbesondere AMPAR, die als Untereinheit GluR1 enthalten, stehen für diese Rekrutierung zur Debatte (Hayashi et al. 2000, Passafaro et al. 2001). Im Gegenzug führt LTD offenbar zu einer Internalisierung von postsynaptischen AMPA-Rezeptoren analog zur Endozytose (Luscher et al. 1999, Malinow & Malenka 2002). Dies wird beispielsweise durch eine immunzytochemische Untersuchung gestützt, die für LTD eine Abnahme der nachweisbaren Proportion an AMPAR-enthaltenden Synapsen zeigt (Carroll et al. 1999).

Allgemein wird indessen aufgrund der vielen experimentellen Evidenzen für das Modell der 'silent synapses', für die klassische NMDAR-abhängige LTP in der CA1 Region eine primär postsynaptische Induktion akzeptiert. Dennoch kann ein Beitrag von präsynaptischen Expressionsmechanismen, insbesondere für andere LTP-Formen, nicht ausgeschlossen werden. Stanislav Zakharenko wies beispielsweise für zwei L-Typ

VDCC-abhängige LTP-Formen (s.u.), anhand der Messung der präsynaptischen vesikulären Freisetzung eines fluoreszierenden Farbstoffs, eine gesteigerte Transmitterausschüttung nach (Zakharenko et al. 2001).

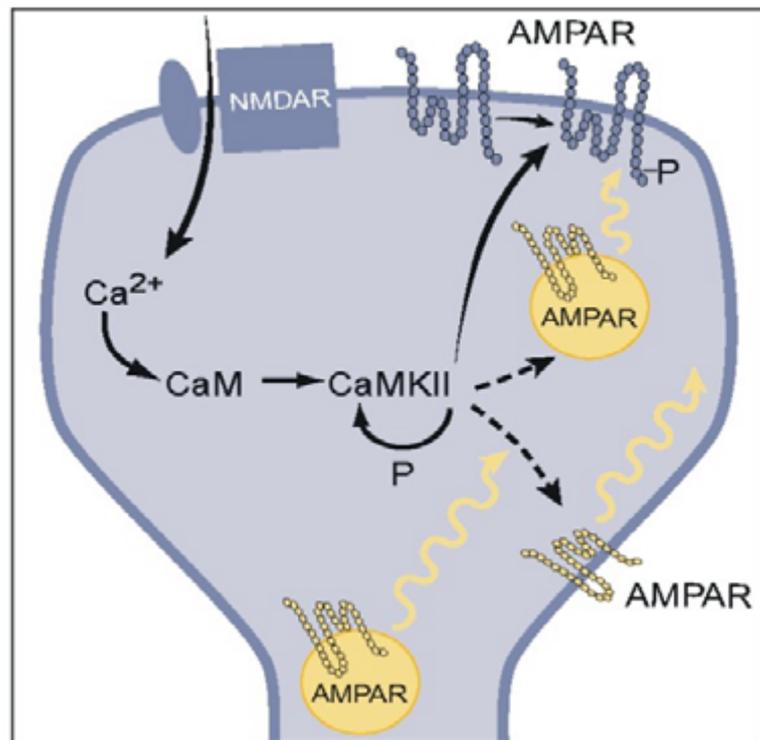


Abbildung 6: Modell zur Rolle der AMPAR für die LTP-Expression. Ein Anstieg der $[Ca^{++}]_i$ innerhalb des dendritischen Spines führt zur Bindung an Calmodulin (CaM), welches im Gefolge die Ca^{++} /Calmodulin-abhängige Kinase CaMKII aktiviert. Diese Proteinkinase phosphoryliert in der Plasmamembran lokalisierte AMPAR und erhöht dadurch ihre Ionenleitfähigkeit (s. Kap. 1.3). Desweiteren wird postuliert, dass sie Einfluss auf die subsynaptische Lokalisation der AMPAR nimmt und die Anzahl jener in der synaptischen Plasmamembran erhöht (Malenka and Nicoll, 1999).

2.3 Molekulare Mechanismen

Zur Entstehung von LTP können mehrere unterschiedliche Signalkaskaden führen, an denen die Beteiligung einer Vielzahl von Kinasen nachgewiesen wurde (Malenka & Bear 2004). Als auslösendes Ereignis für deren Aktivierung wird allgemein die bereits erwähnte massive Erhöhung der intrazellulären $[Ca^{++}]$ betrachtet. Für NMDAR-abhängige LTP scheint dabei insbesondere die Funktion der Ca^{++} /Calmodulin-Kinase II (CaMKII) eine wichtige Rolle zu spielen (Malinow et al. 1989, Silva et al. 1992, Lisman et al. 2002, Malenka & Bear 2004). Sie wird aktiviert durch Ca^{2+} -Calmodulin, ein als Kalziumsensor fungierendes Protein, welches u.a. ihre Fähigkeit zur Autophosphorylierung induziert. Diese hält ihre Aktivität aufrecht, auch wenn die $[Ca^{++}]_i$ wieder auf ein basales Niveau zurückgeht. Während LTP wird nachweislich eine entsprechende CaMKII-Phosphorylierungsstelle der AMPAR-Untereinheit GluR1, Ser-831, phosphoryliert (Barria et al. 1997). Jene Modifikation soll zu einer erhöhten AMPAR-Leitfähigkeit führen (Derkach et al. 1999), welche bereits mit LTP assoziiert wurde (Benke et al. 1998). Die Funktion anderer beteiligter Kinasen ist erst weniger genau aufgeklärt. Ein Beispiel ist die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA), welche ebenso die AMPAR-Untereinheit GluR1 an Serin-845 phosphoryliert. Ihre katalytische Untereinheit wird durch cAMP freigesetzt. Dessen Produktion wird von Adenylatzyklen katalysiert, welche auch teilweise durch Ca^{2+} -Calmodulin aktiviert werden. Einer Studie zufolge könnte die PKA durch Phosphorylierung des Proteins Inhibitor-1 die Aktivität einer Serin-Threonin-Phosphatase (PP1) begrenzen und damit die CaMKII-Autophosphorylierung fördern (Blitzer et al. 1998). Von der Aktivität dieser beiden Kinasen wird angenommen, dass sie durch Modifikation bereits bestehender Proteine eine frühe bzw. dekrementale Form von LTP (D-LTP) induziert. Diese kurzanhaltende Phase von LTP kann in der Regel bereits durch einzelne hochfrequente Stimuli induziert werden und hält nicht länger als 1-3 Stunden an (Impey et al. 1996).

Im Gegensatz dazu soll eine geringfügigere Erhöhung der $[Ca^{++}]_i$ dagegen durch Aktivierung von Proteinphosphatasen LTD induzieren (Bear & Abraham 1996). Lisman postulierte folgendes Modell für die Phosphatasekaskade, die an deren Entstehung beteiligt sein soll: Ca^{2+} -Calmodulin aktiviert die Proteinphosphatase PP2b (Calcineurin), welche folglich durch Dephosphorylierung eines Proteins I1 (Inhibitor 1) die Serin-Threonin-Phosphatase PP1 aktiviert. Deren Beitrag zur Induktion von LTD liegt laut dem Autor in der Dephosphorylierung der Ca^{2+} /Calmodulin-Kinase II (CaMKII) (Lisman

1989). Experimentelle Versuche mit Phosphatase-Inhibitoren haben dieses Modell inzwischen größtenteils bestätigt (Mulkey et al. 1993, Mulkey et al. 1994, Jouvenceau et al. 2003). Beispielsweise blockierten Inhibitoren von Calcineurin bzw. von PP1 und PP2a die AMPAR-Internalisierung nach Aktivierung von NMDA-Rezeptoren (Ehlers et al. 2000).

Für die Aufrechterhaltung von LTP bzw. ihren Übergang in eine langanhaltende Form, wird hingegen u.a. der CaMKIV, der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) sowie ebenfalls der Proteinkinase A (PKA) eine Bedeutung zugesprochen. Diese sogenannte späte Phase von LTP, auch L-LTP genannt, wird erst durch wiederholte hochfrequente Reizsalven ausgelöst und benötigt im Unterschied zur D-LTP Gentranskription und De-novo-Proteinsynthese (Kandel 2001, Malenka & Bear 2004, Impey et al. 1996). Da diese Bedingung auch für die Ausbildung von Langzeitgedächtnis zutrifft, kommt speziell L-LTP als dessen potentiell zelluläres Äquivalent in Frage (Malenka & Nicoll 1999). Alle drei dieser Kinasen aktivieren den Transkriptionsfaktor CREB ('cAMP response element binding' Protein) u.a. durch Phosphorylierung an Serin 133. Dieser vermittelt in Abhängigkeit von cAMP und Ca^{2+} die durch den Enhancer CRE ('cAMP response element') regulierte Genexpression. Dazu ist ferner die Phosphorylierung eines Cofaktors, CBP ('CREB binding protein') an Ser-301 durch CaMKIV notwendig (Impey et al. 2002). Unter der Steuerung von CRE befinden sich u.a. die 'immediate early genes' c-fos und zif/268, die ihrerseits Transkriptionsfaktoren darstellen, neurotrophe Substanzen (z.B. BDNF), strukturelle Proteine, wie beispielsweise Adhäsionsmoleküle, und Proteinkinasen (z.B. die Proteinkinase M ζ oder die α -Untereinheit der CaMKII) (Deisseroth et al. 1996, Calabresi et al. 2000, Hernandez et al. 2003, Kingsbury et al. 2007). Allgemein gilt die Funktion von CREB als essentiell für die Stabilität von LTP und die Konsolidierung von Langzeitgedächtnis (Matynia et al. 2002). Es gilt als belegt, dass nur Stimulationsprotokolle, die L-LTP auslösen, mit CRE-vermittelter Genexpression einhergehen. Interessanterweise führt auch D-LTP zu einer Phosphorylierung von CREB an Ser-133, jedoch bleibt diese anders als bei L-LTP kürzer bestehen und mündet nicht in eine Gentranskription (Impey et al. 1996).

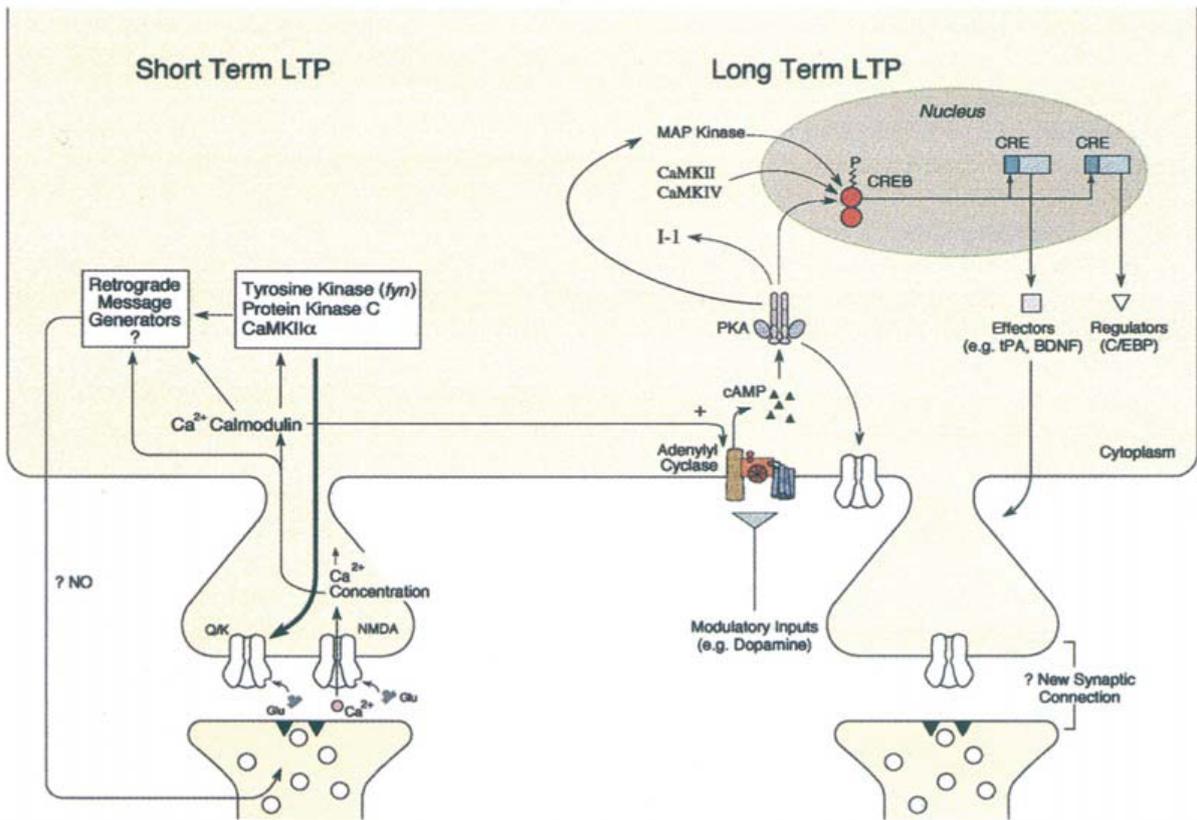


Abbildung 7: Modell zur Induktion dekrementaler LTP (hier "Short Term LTP") und langanhaltender LTP (hier "Long Term LTP"). Die D-LTP ist abhängig von Proteinmodifikationen durch verschiedene Kinasen, während die L-LTP auf CRE-gesteuerter Transkription und de-novo Proteinsynthese beruht (Milner et al., 1998).

2.4 Die Rolle spannungsabhängiger L-Typ Ca^{2+} -Kanäle für LTP

Neben dem oben beschriebenen Prototyp des NMDAR-getragenen Anstiegs der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration, wird die LTP je nach Induktionsmodus auch von Ca^{++} -Strömen anderer Herkunft ausgelöst. Dazu zählen u.a. der Ca^{++} -Einstrom aus intrazellulären Speichern via Ryanodin- oder IP_3 -Rezeptoren, sowie jener über TRP ('transient receptor potential')- oder CNG ('cyclic nucleotide gated')-Kanäle (Raymond & Redman 2006, Topolnik et al. 2006, Zufall et al. 1997). Die grösste Bedeutung unter diesen wird jedoch, neben den NMDAR, den spannungsabhängigen, Dihydropyridin-sensitiven, L-Typ Ca^{2+} -Kanälen, auch 'l-type voltage dependent calcium channels' (VDCCs) genannt, zugesprochen. Deren Beteiligung wurde an unterschiedlichen LTP-Formen, erstmalig von Grover & Teyler 1990, mittels ihrer pharmakologischen Blockade nachgewiesen (Aniksztejn & Ben-Ari 1991, Huber et al. 1995, Hanse & Gustafsson 1994, Huang & Malenka 1993, Morgan & Teyler 2001).

Allgemein erfordert die Induktion einer VDCC-abhängigen LTP (vdccLTP) einen weitaus stärkeren Tetanus (mehrfach 100 Hz oder 200 Hz) als NMDAR-abhängige LTP, welche bereits ab Frequenzen oberhalb von 25 Hz auftritt. Ausserdem müssen eine ausreichend hohe Reizstärke und lange Stimulationsdauer vorliegen. Diese Bedingungen liegen mitunter in der hohen und anhaltenden Depolarisation, die für eine Aktivierung von VDCCs notwendig ist, begründet (> -10 mV) (Morgan & Teyler 1999). Derart hohe Reizfrequenzen führen laut Grover und Teyler (1990) zu einer Fusion der evozierten EPSPs gemäß einer postsynaptischen Dauerdepolarisation. Darüberhinaus könnte für die Aktivierung von VDCCs auch eine überschwellige Stimulation des postsynaptischen Neurons von Bedeutung sein. Dies steht im Zusammenhang mit der Lokalisation der L-Typ Ca^{++} -Kanäle am Soma und den proximalen Dendriten der Pyramidenzellen (Westenbroek et al. 1990, Hell et al. 1993). Denn laut Takagi (2000) führt die durch elektrische Stimulation hervorgerufene synaptische Aktivität nur im Zusammenhang mit postsynaptischen Aktionspotentialen, welche antidrom vom Axonhügel bis in die Dendritenbäume fortgeleitet werden ('backpropagating'), zu einer Aktivierung dort gelegener VDCCs. Ein Auftreten von antidromen ' Na^+ -spikes' in Dendriten hippocampaler Pyramidenzellen wurde bereits von Jaffe et al. (1992) nachgewiesen. In diesem Fall würde der hohen geforderten Reizintensität auch eine Induktion von postsynaptischen Aktionspotentialsalven zugrunde liegen.

Aufgrund ihrer langen Persistenz nach derartigen elektrischen Stimulationsprotokollen wurde die vdccLTP vorrangig mit dem Auftreten von langanhaltender L-LTP assoziiert (Grover & Teyler 1994). Damit im Einklang stehen Studien, die den L-Typ VDCCs gegenüber den NMDARs für L-LTP eine deutliche Vormachtsstellung einräumen (Impey et al. 1996, Hanse & Gustafsson 1995). Denen zufolge wird L-LTP durch das Dihydropyridin Isradipin drastisch reduziert, jedoch nicht durch den NMDAR-Blocker AP5. Bestätigt wird dieser Zusammenhang durch den Nachweis, dass die Funktion von L-Typ Ca^{++} -Kanälen ausschlaggebend für eine anhaltende Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB an Ser-133 und die damit assoziierte CRE-regulierte Genexpression ist (s. Kap. 1.3; Dolmetsch et al. 2001, Impey et al. 1996, Hardingham 1999). Manipulationen des Ca^{2+} -Einstroms von L-Typ VDCCs (z.B. dessen Blockade durch Isradipin) oder eine genetische Mutation einer Ca^{2+} -Calmodulin bindenden Sequenz ihrer α_1 -Untereinheit, reduzieren beispielsweise die CRE-gesteuerte Genexpression erheblich (Dolmetsch et al. 2001). Auf molekularer Ebene wird dieser Mechanismus der Genregulation von Kinasen der MAPK/ERK-Kaskade, welchen in mehreren Studien eine elementare Rolle für die Induktion der vdccLTP nachgewiesen wurde, unterstützt (s. Kap. 5, S. 57 für ihren Signaltransduktionsweg; Kanterewicz et al. 2000, Wu et al. 2001, Dolmetsch et al. 2001).

Neben der elektrisch induzierten vdccLTP, wurde 1991 von Aniksztejn und Ben-Ari auch eine chemisch hervorgerufene VDCC-abhängige Potenzierung in der CA1 Region entdeckt. Sie evozierten diese LTP durch eine 10-minütige Badapplikation des K^+ -Kanalblockers Tetraethylammonium (TEA, 25 mM) (Aniksztejn & Ben-Ari 1991). Intrazelluläre Messungen im Rahmen ihrer Arbeit zeigen, dass dabei hervorgerufene EPSPs und Aktionspotentiale mit einem Auftreten von ' Ca^{2+} spikes' verbunden sind. Durch eine Applikation des Dihydropyridins Flunarizin, welche die Induktion von TEA-LTP verhindert, klären die Autoren schließlich deren Herkunft auf und weisen eine wesentliche Beteiligung von L-Typ VDCC an dieser Potenzierung nach. Desweiteren brachten die Messungen zum Vorschein, dass die Hemmung des gleichrichtenden K^+ -Ausstroms durch TEA nur eine moderate Membrandepolarisation von ~ 6 mV hervorruft. Diese führt vermutlich über eine verstärkte Glutamatfreisetzung und damit einhergehende AMPAR-vermittelte Depolarisation zu einer Aktivierung von L-Typ VDCCs. Denn neben Flunarizin inhibiert auch der AMPAR-Antagonist CNQX (6-Cyano-7-Nitroquinoxalin-3,3-Dion) die durch TEA induzierte LTP weitestgehend (Aniksztejn & Ben-Ari 1991).

Darüberhinaus erwähnenswert ist ausserdem, dass sich L-Typ Kalziumströme in hippocampalen Pyramidenzellen durch eine ausgeprägte Altersabhängigkeit auszeichnen. Denn intrazelluläre Messungen stellen eine Zunahme mit wachsendem Alter fest (Campbell et al., 1996; Thibault & Landfield, 1996; Blalok et al., 1999). Die Autoren Thibault & Landfield führen diesen Umstand auf eine Erhöhung der Kalziumkanaldichte zurück. Interessanterweise spiegelt sich dies möglicherweise auch in ihrem Beitrag zur LTP wider. Eine Studie, die jeweils die NMDAR- und L-Typ VDCC-abhängige Komponente von LTP zwischen 2 und 24 Monate alten Ratten vergleicht, verzeichnet eine Erhöhung der vdccLTP parallel zu einer Abnahme der nmdaLTP in den älteren Tieren (Shankar et al. 1998).

Die hier beschriebenen L-Typ VDCCs gehören zur Gruppe der 'high voltage activated' (HVA)-Kalziumkanäle. Diese werden im Unterschied zu den 'low voltage activated' (LVA)-Kanälen, den sogenannten T-Typ Ca^{2+} -Kanälen, erst bei stärkerer Depolarisation aktiviert und anschließend nur langsam, spannungsabhängig inaktiviert (Catterall 1995, Ertel et al. 2000). Ihre Klassifizierung als deren Untergruppe vom L-Typ beruht auf ihrer pharmakologischen Eigenschaft, dass sie durch die Ca^{2+} -Kanalantagonisten Dihydropyridine (DHP), Phenylalkylamine und Benzothiazepine inhibiert werden. Allgemein sind HVA-VDCCs durch einen heterooligomeren Aufbau aus vier Untereinheiten, bestehend aus fünf Proteinen, gekennzeichnet (s. Abbildung 8). Das zentrale Element stellt dabei die porenbildende α_1 -Untereinheit dar. Sie besteht aus vier homologen Domänen, die jeweils aus 6 transmembranösen Segmenten (S1-S6), nämlich 5 α -Helices und einem amphiphatischem Segment, zusammengesetzt sind. Die amphiphatischen Segmente (S4), sind für die Funktion des Spannungssensors verantwortlich. Jeweils zwischen den Segmenten S5 und S6 gelegene Proteinschleifen, die ein weiteres kurzes α -helikales Segment enthalten, bilden die innere Struktur der Kanalpore und bestimmen die Ionenselektivität des jeweiligen VDCC-Subtyps. Dabei trägt je Domäne ein Glutaminsäurerest zur Bildung einer Ca^{++} -Bindungsstelle bei. Auch die Bindungsstellen für Ca^{2+} -Kanalantagonisten, die meisten regulierenden 'second messengers' und Toxine befinden sich auf dieser Untereinheit. Den anderen Untereinheiten ($\alpha_2\delta$, β und γ), werden modulatorische Funktionen zugeschrieben (Hofmann et al. 1999, Catterall 1995).

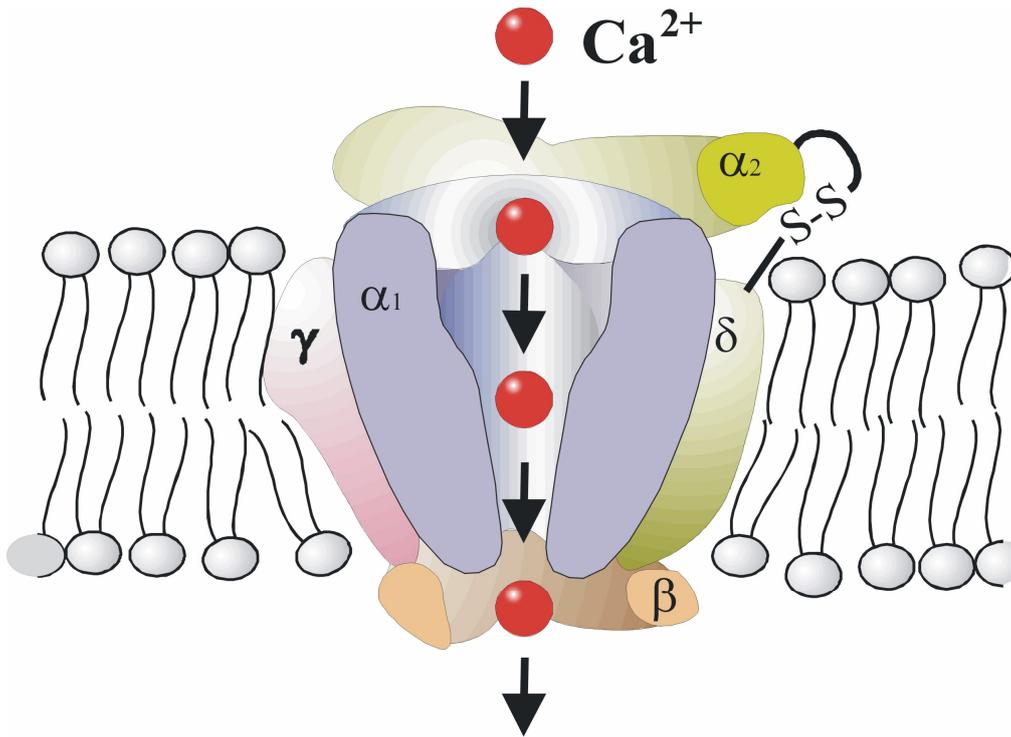


Abbildung 8: Schematischer Aufbau von 'high voltage activated' (HVA)-Kalziumkanälen.

Die heute gebräuchliche Nomenklatur der VDCCs basiert auf ihren jeweils unterschiedlichen α_1 -Untereinheiten, die nach genetischer Sequenzhomologie zu Genfamilien eingeteilt werden können. Eine derartige Untergruppe repräsentieren die L-Typ Ca^{++} -Kanäle, welche als Ca_v1 -Familie bezeichnet wird. Sie enthält die Subtypen $\text{Ca}_v1.1$ - $\text{Ca}_v1.4$, die den α_1 -Untereinheiten S, C, D und F entsprechen. Die bereits ältere Nomenklatur letzterer ($\alpha_1\text{S}$, $\alpha_1\text{A-I}$) spiegelt dabei die chronologische Reihenfolge ihrer Entdeckung wider, wobei die als erstes identifizierte Skelettmuskelisoform $\alpha_1\text{S}$ eine Ausnahme darstellt.

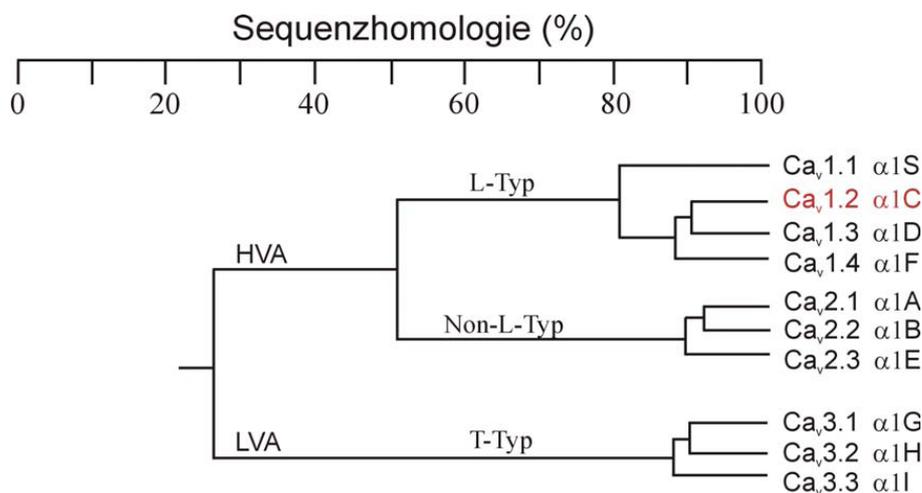


Abbildung 9: Phylogenetischer Vergleich der unterschiedlichen Kalziumkanal-Genfamilien. Der von uns untersuchte Ca_v1.2 Kanal ist in rot hervorgehoben.

L-Typ VDCCs finden sich in glatten, quergestreiften und kardialen Muskelzellen, in endokrinen Drüsenzellen, Neuronen und darüberhinaus noch in anderen Zelltypen (Hofmann et al. 1999). Ihre Funktionen umfassen daher ein breitgestreutes Spektrum von unterschiedlichen Prozessen: u.a. die Erregungsbildung am Herzen, die Kopplung von Erregung und Kontraktion am Skelettmuskel sowie die Steuerung der Hormonsekretion in endokrinen Zellen. Ihre Bedeutung im ZNS ist dagegen noch nicht umfassend geklärt. Sie führen dort unter anderem zur Aktivierung Ca²⁺-aktivierter K⁺-Kanäle. An der Neurotransmittersekretion sind L-Typ VDCCs unbeteiligt, diese wird bekanntlich durch VDCCs vom N- und P/Q-Typ getragen.

In hippocampalen Pyramidenzellen werden im wesentlichen zwei der vier Isoformen des L-Typ Ca⁺⁺-Kanals, Ca_v1.2- und Ca_v1.3, exprimiert. Dabei überwiegt der Ca_v1.2-Subtyp mit einem Anteil von zirka 70%, wie eine immunzytochemische Studie von Hell et al. (1993) zeigt. Dieses Verteilungsmuster könnte eventuell auch ihre Bedeutung für die hippocampale synaptische Plastizität widerspiegeln. Denn Ca_v1.3α1-Knockoutmäuse weisen weder in ihrer NMDAR-abhängigen noch NMDAR-unabhängigen LTP eine Beeinträchtigung auf (Clark et al. 2003). Bislang gab es jedoch keine Möglichkeit, die spezifische Funktion des Ca_v1.2 Ca⁺⁺-Kanals für die Induktion von LTP zu charakterisieren, da selektive Inhibitoren für die einzelnen L-Typ VDCC-Subtypen nicht zur Verfügung stehen. Darüberhinaus erschwerend ist in diesem Zusammenhang, dass pharmakologische Untersuchungen in vivo kaum in der Lage wären, neuronale Effekte von nicht auszuschließenden kardialen oder vasogenen Effekten zu unterscheiden.

2.5 Zielsetzung und Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es daher, die spezifische Rolle des $\text{Ca}_v1.2$ L-Typ Kalziumkanals für die hippocampale LTP erstmals an einer Mauslinie mit einer selektiv auf das Vorderhirn beschränkten Inaktivierung des $\text{Ca}_v1.2$ -Gens ($\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$) zu charakterisieren. Jene war mit Hilfe eines CRE/loxP Rekombinationssystems am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU München generiert worden (s. Kap. 2.1, Specht 2000). Anhand der Auswirkung des gewebespezifischen Funktionsverlustes dieser L-Typ Ca^{++} -Kanalisoform sollte ihr Beitrag an verschiedenen Formen von NMDAR-unabhängiger LTP in der hippocampalen CA1 Region aufgeklärt und auch gegenüber dem des $\text{Ca}_v1.3$ -Subtyps abgegrenzt werden. Zu diesem Zweck sollte nach einer Applikation von elektrischen bzw. chemischen Stimulationsprotokollen, die eine Beteiligung von L-Typ VDCCs fördern, jeweils die Ausprägung der dadurch induzierten LTP zwischen Hippocampuschnitten von Kontroll- und $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäusen verglichen werden. Die LTP sollte dabei durch eine extrazelluläre Ableitung von exzitatorischen postsynaptischen Feldpotentialen (fEPSPs) in der CA1 Region der Hippocampuschnitte erfasst werden (s. Kap. 2.2).

Im Rahmen einer ersten Serie von Experimenten wurde die LTP zunächst mit dem Kaliumkanalblocker Tetraethylammoniumchlorid (TEA) induziert (TEA-LTP). Um neben der vergleichenden Analyse zwischen den Genotypen eine mögliche Altersabhängigkeit der L-Typ VDCC-Komponente zu erfassen, wurde jeweils eine Messreihe an Kontroll- und $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäusen in der Altersgruppe von 8-12 Wochen und von 20-40 Wochen durchgeführt. Als Gegenprüfung wurde darüberhinaus TEA-LTP unter L-Typ Ca^{2+} -Kanalblockade mittels Isradipin an Kontrollmäusen der jüngeren Altersgruppe untersucht. Anschließend wurde in einer zweiten Reihe von Messungen die Ausprägung von L-LTP nach einer starken Thetaburst-Stimulation von Schaffer-kollateralen analysiert. Diese wurde an Mäusen beider Genotypen in der Altersgruppe von 20-40 Wochen untersucht. Als Kontrolle dienten dabei wiederum Messungen an Wildtypmäusen in der Altersgruppe von 8-12 Wochen unter Blockade der L-Typ VDCC-Komponente mittels Isradipin.

3. Material und Methoden

Um eine mögliche subjektive Bewertung der Befunde auszuschließen, wurden alle hier vorgestellten Versuche blind durchgeführt und analysiert, d.h. ohne Kenntnis des Genotyps der Versuchstiere durch den Experimentator.

3.1 Versuchstiere

Die hier verwendeten Mäuse entstammten dem Tierbestand des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München.

Aufgrund der Letalität von $Ca_v1.2$ -Total-Knockout-Mäusen ($Ca_v1.2^{-/-}$), die u.a. auf der Funktion von L-Typ VDCCs für das Erregungsleitungssystem des Herzens beruht, wurden Mäuse mit einer Vorderhirn-spezifischen Deletion des $Ca_v1.2$ -Gens eingesetzt. Diese wurden mit Hilfe der konditionalen Geninaktivierung, unter Verwendung des Cre/loxP Rekombinationssystems generiert (Specht 2000). Die Cre Rekombinase (cyclisation recombination), ein 38 kDa Protein, katalysiert die Exzision von 'geflochten' Gensequenzen, welche von zwei gleichgerichteten loxP-Rekombinationssequenzen flankiert werden. In den hier verwendeten Mäusen wird der für Exon 14 und 15 kodierende Abschnitt des $Ca_v1.2$ -Gens von zwei gleichgerichteten loxP-Rekombinationssequenzen flankiert. Mäuse mit einem 'geflochten' $Ca_v1.2$ Allel (L2) wurden mit sogenannten NEX-Cre-Mäusen verpaart. In diesen wurde das für das neuronale helix-loop-helix Protein (NEX) kodierende Gen durch das Cre Rekombinase-Gen ersetzt (knock-in: $NEX^{+/Cre}$). Die Transkription des Cre Rekombinase-Gens steht dabei unter Kontrolle des NEX-Promotors. Es ist deshalb zu erwarten, dass die Cre Rekombinase in Mäusen mit dem knock-in Cre Gen das gleiche Expressionsmuster wie NEX, welches nur im ZNS vorkommt, aufweist. Dementsprechend wurde in LacZ-Reporter Mäusen ein weitgehend auf Hippocampus und Cortex beschränktes Rekombinationsmuster beobachtet (s. Abbildung 9) (Schwab et al. 2000). In den Nachkommen aus der Kreuzung der Mäuse mit einem 'geflochten' $Ca_v1.2$ Allel (L2) und den NEX-Cre-Mäusen ist das $Ca_v1.2$ -Gen (das L2 Allel) durch Exzision in die inaktivierte Form (L1) überführt. Mäuse vom Genotyp L1/+ wurden mit NEX-Cre-Mäusen verpaart. Durch Verpaarung der dabei entstandenen Nachkommen des Genotyps +/L1 $NEX^{+/Cre}$ mit den für das 'geflochte' Gen homozygoten Mäusen (Genotyp: L2/L2) erhält man

entsprechend den Mendelschen Regeln die in den Versuchen verwendeten Kontrollen (Genotyp: +/L2 NEX^{+/Cre}) bzw. Ca_v1.2^{HCKO} Mäuse (Genotyp: L1/L2 NEX^{+/Cre}). Die Genotypisierung erfolgte durch Analyse aus dem Schwanz isolierter genomischer DNA.

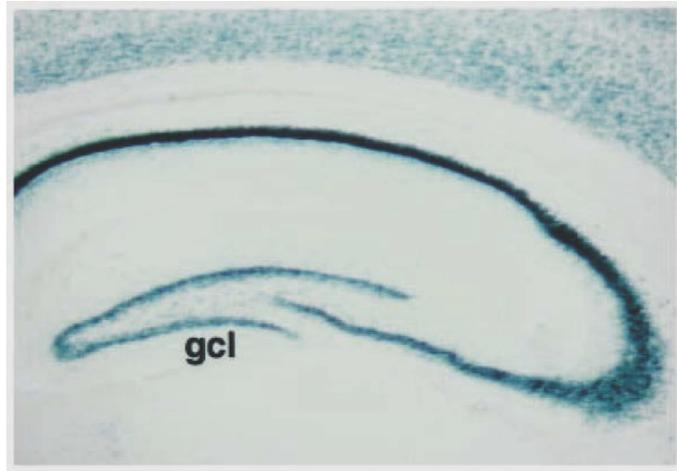


Abbildung 10: Expression eines 'lacZ' Reporter-Gens im Hippocampus. Das 'lacZ'-Gen liegt stromabwärts eines „geflochten“ Stop-Codons. Dies wird in der CA1-CA3 Region und im Gyrus dentatus durch die eingefügte Cre-Rekombinase extrahiert, welche unter der Kontrolle des NEX-Promoters in sog. 'primary neurons', einschließlich Pyramidenzellen, exprimiert wird (Schwab et al., 2000). gcl = granule cell layer (Stratum granulosum).

3.2 Präparation des Hippocampus und Versuchsanordnung zur Ableitung von extrazellulären Feldpotentialen (fEPSPs)

Die Versuchstiere wurden mit Ethylether betäubt und dekapitiert. Nach Öffnung der Schädeldecke wurde das Gehirn aus dem Schädel ausgelöst und in eisgekühlter, mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begaster artifizieller Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF, in mM: NaCl 124, KCl 3, KH₂PO₄ 1.25, Mg₂SO₄ 2, CaCl₂ 2, NaHCO₃ 26, Glucose 10) aufbewahrt. Die beiden Hirnhemisphären wurden entlang der Fissura longitudinalis durchtrennt, die jeweiligen Hippocampusstrukturen herauspräpariert und mittels eines sogenannten 'Egg-Slicers' 400 µm dicke, transversale Schnittpräparate angefertigt. Diese wurden mit einem Pinsel separiert und in eine mit begaster ACSF gefüllte Aufbewahrungskammer überführt. Dort wurden die Hippocampuschnitte für mindestens 90 Minuten bei Raumtemperatur aufbewahrt, bevor sie in die ebenfalls mit begaster ACSF durchspülte, 'submerged' Messkammer (Gahwiler & Bauer, 1975) eingebracht wurden. Die perfundierende ACSF wurde in letzterer mit Hilfe eines Temperaturkontrollsystems

(Luigs-Neumann, Ratingen, Deutschland, <http://www.luigs-neumann.com/contact.phtml>) über einen Heizdraht kontinuierlich auf 30° gehalten. Dies diente der Gewährleistung von konstanten, möglichst physiologischen Bedingungen, zumal die Temperatur Einfluss auf die Größe und Latenz der elektrophysiologischen Signale hat (Moser et al. 1993). Die Schnitte wurden bei den Messungen durch Metallringe auf dem Boden der Ableitkammer fixiert.

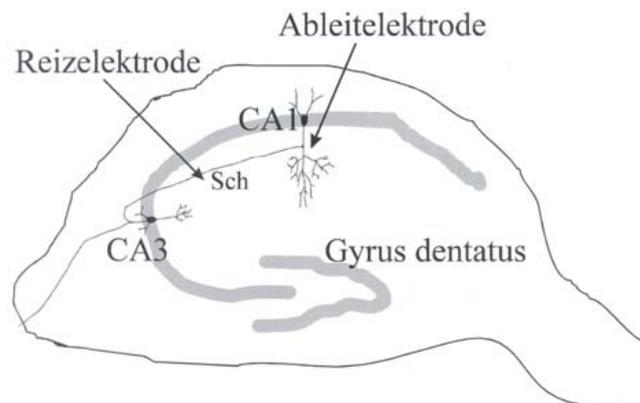


Abbildung 11: Schematische Darstellung zur Versuchsanordnung im Hippocampuspräparat. Die Reizelektrode wird an den Schaffer-Kollateralen (Sch) positioniert. Mit der Ableitelektrode werden die fEPSPs im Bereich der apikalen Dendriten der CA1-Pyramidenzellen aufgezeichnet.

Die exzitatorischen postsynaptischen Potentiale wurden extrazellulär als Feldpotentiale (fEPSPs) erfasst. Für die Stimulation der Schaffer-Kollateralen wurden monopolare Wolfram-Elektroden (TM33B01, WPI, <http://www.wpiinc.com/>) mit einem Widerstand von ~0,1 M Ω verwandt. Diese wurden in der CA3 Region des Hippocampus positioniert um die Schaffer-Kollateralen, welche die CA1 Pyramidenzellen des Hippocampus innervieren, zu stimulieren (s. Abbildung 11). Die Stimulation erfolgte ebenso wie die Datenaufzeichnung mit Hilfe der Pulse Software (Firma HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland; <http://www.heka.com/>). Durch entsprechende Protokolle wurde ein Stimulus-Isolator mit Strom-konstanter Reizausgabe getriggert. Die Stimulusintensität wurde dabei jeweils nach Aufnahme einer Reizintensitätskurve (Input-Output-Relation) so gewählt, dass sie zwischen 40-60 % der maximal möglichen Reizantwort (maximale fEPSP-Amplitude) auslöste (s. Abbildung 12). Man geht davon aus, dass in diesem Bereich die höchste Potenzierung erreicht werden kann. Denn bei Reizintensitäten, die über 70% der maximalen Reizantwort auslösen, nähern sich abgeleitete fEPSPs einem Sättigungswert.

Als Ableitelektroden wurden Glaspipetten (Borosilikatglas, Clark Instruments) mit einem horizontalen Puller (Flaming Brown P97; Firma Sutter Instruments, Novato, USA, <http://www.sutter.com/>) ausgezogen. Diese wurden mit ACSF gefüllt (Widerstand von 4-8 M Ω), mittels eines Elektrodenhalters in einen Mikromanipulator eingespannt und in der apikal gelegenen, dendritischen Zone von hippocampalen CA1-Pyramidenzellen (Stratum radiatum) positioniert (s. Abbildung 11).

Dort aufgenommene fEPSPs wurden mittels eines AxoClamp 2B Verstärkers (Firma Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, USA, <http://www.moleculardevices.com/>) erfasst, 1 kHz Tiefpass-gefiltert und Computer-gestützt mit Hilfe der Pulse Software (Firma HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland, <http://www.heka.com/>) und eines ITC-16 Interfaces digitalisiert.

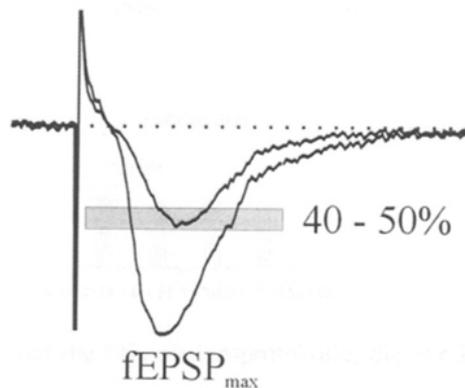


Abbildung 12: Schematische Darstellung zur Festlegung der Reizintensität. Diese wurde so gewählt, dass sie 40-50% (s. grau unterlegter Bereich) des maximalen fEPSPs auslöst.

3.3 Zur Erfassung der Daten verwendete Stimulationsprotokolle

Zu Beginn jedes Versuches wurde routinemäßig über einen Zeitraum von etwa 10-30 Minuten eine sogenannte 'Baseline' aufgezeichnet, d.h. es wurden fEPSPs zur Kontrolle der Basalaktivität der synaptischen Transmission gemessen. Falls diese einen stabilen Verlauf aufwies, wurde anschließend das jeweilige Stimulationsprotokoll, bzw. der Kaliumkanalblocker TEA, zur Induktion von LTP bzw. LTD appliziert. Sowohl während der Aufzeichnung der Grundlinie als auch nach Applikation des jeweiligen Stimulationsprotokolls wurden Schaffer-Kollaterale für die Auslösung der fEPSPs im Abstand von 15 s (0,06 Hz) mit einer Reizdauer von 150 μ s und gleichbleibender Intensität (s. oben) stimuliert.

Für die elektrische Induktion von L-LTP wurden zwei verschiedene Protokolle einer Theta-Burst-Stimulierung (TBS) eingesetzt:

1. Eine Theta-Burst-Stimulierung (TBS), entsprechend 4 Bursts, bestehend aus je 4 Pulsen einer Reizdauer von 200 μ s bei einer Frequenz von 100 Hz. Das Interburstintervall betrug dabei 200 ms (Messung von L-LTP ohne Isradipin; s. Abbildung 13).
2. Zwei im Abstand von 15 Minuten applizierte TBS mit einer Reizdauer von 100 μ s (Messung von L-LTP unter Isradipin).



Abbildung 13: Dargestellt ist das einfache Theta-Burst-Stimulationsprotokoll: es besteht aus 4 x 4 Pulsen von jeweils 200 μ s Dauer, entsprechend einer Frequenz von jeweils 100 Hz, und Pausen von 200 ms zwischen den einzelnen Bursts.

Hierbei handelt es sich um eine gängige, effektive Variante der Hochfrequenzstimulation für die Induktion von vdcLTP: Serien einzelner, hochfrequenter Tetani werden in Phasen, die dem physiologischen hippocampalen Aktivitätsmuster (3-7 Hz Oszillation) entsprechen, appliziert. Dieses Reizmuster stellt eine Annäherung, an die in lebenden Mäusen im Zusammenhang mit Lernen beobachteten Aktionspotentialsalven, welche im Rhythmus dieser Grundaktivität auftreten, dar (Morgan & Teyler 2001).

In diesen beiden Messreihen betrug die Reizdauer während der Baseline und nach Tetanus jeweils 100 μ s. Für die einmalige Theta-Burst-Stimulation wurde die Dauer eines einzelnen Reizes auf 200 μ s erhöht, was einer massiven Verstärkung der Reizstärke entspricht. Ausserdem wurde bei der zweifachen Theta-Burst-Stimulation unter Isradipin die Reizintensität während Theta-Burst-Applikation von \sim 50 μ A auf 150 μ A erhöht. Dies sollte in den postsynaptischen Pyramidenzellen zu einem 'Burst'-artigen Auftreten von Aktionspotentialen führen (Morgan & Teyler 1999), welches durch eine Ableitung von sog. 'population spikes'¹ in der Pyramidenzellschicht der CA1 Region verifiziert werden konnte. Denn es wird von mehreren Autoren davon ausgegangen, dass postsynaptisches

¹ Aktionspotentialsequenzen von einzelnen Zellpopulationen

Feuern von Aktionspotentialen, evn. durch seine antidrome Fortleitung in Dendritenbäume, mit einer anhaltenden Depolarisation einhergeht, die eine Aktivierung von VDCCs und somit eine Induktion von VDCC-abhängiger LTP fördert (s. Kapitel 1.4; Morgan & Teyler 1999, Grover & Teyler 1990, Takagi 2000).

Zur Untersuchung von TEA-LTP wurden die Hippocampusschnitte in der Messkammer für 10 Minuten mit einer modifizierten ACSF, die den K^+ -Kanallocker Tetraethylammoniumchlorid (TEA) in 25 mM Konzentration enthielt, superfundiert (Aniksztejn & Ben-Ari, 1991).

3.4 Pharmakologische Untersuchungen

Im Rahmen der Untersuchungen zur TEA-LTP wurde als Gegenprobe eine Messreihe mit Kontrollmäusen in der Altersgruppe von 8-12 Wochen unter dem L-Typ Ca^{2+} -Kanallocker Isradipin durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte nach Aufzeichnen der Basalaktivität 10-15 Minuten vor Einwaschen von TEA mit Isradipin-haltiger ACSF (2,5 μ M) behandelt. Bei gleichbleibender synaptischer Transmission wurden die Schnitte anschließend für 10 Minuten mit TEA behandelt. Isradipin war auch während dieser Phase und weitere 10-15 Minuten nach dem Auswaschen von TEA in der Perfusionslösung vorhanden.

Auch zur L-LTP wurde eine Versuchsreihe an Kontrolltieren unter VDCC-Blockade mittels Isradipin gemacht. Auch hierbei wurde nach Ableitung der Grundlinie ACSF mit Isradipin (2,5 mM) über 10-15 Minuten eingewaschen. Nach Applikation der TBS wurde die Substanz ebenfalls nach 10-15 Minuten wieder ausgewaschen.

3.5 Auswertung der erfassten Daten

Zum besseren Verständnis der Auswertung soll an dieser Stelle kurz die Form des extrazellulären Signals (fEPSP) erläutert werden (s. Abbildung 14). Ein typisches fEPSP besteht aus drei Teilen: dem Stimulusartefakt, dem sogenannten 'fiber volley' und dem eigentlichen EPSP. Der Stimulusartefakt stellt eine kurze biphasische Welle unmittelbar nach Reizung dar. Darauf folgt das 'fiber volley' in Form einer kleinen, negativ orientierten Welle. Sie ist vermutlich ein Ausdruck der Aktivität (Aktionspotentiale)

afferenter präsynaptischer Fasern. Daran schließt sich das EPSP als Ausdruck postsynaptischer Erregungsabläufe und damit der eigentlichen synaptischen Transmission an. fEPSPs können anhand ihrer Amplitude, der Time-to-peak und der Anstiegssteilheit charakterisiert werden. Der Anstieg der fEPSPs reflektiert die Ladungsverschiebungen über die postsynaptische Membran, welche durch die postsynaptischen Ströme (EPSCs) der AMPAR und NMDAR verursacht werden. Da die Größe der Potentialverschiebung dabei mit der Stärke der synaptischen Übertragung korreliert, zieht man allgemein die Anstiegssteilheit des fEPSPs zur Erfassung der Stärke der synaptischen Übertragung heran. Zur Bestimmung des maximalen Anstiegs wurde das Minimum der ersten Ableitung (dV/dt) des fEPSPs in einem initialen Fenster ermittelt. Vier aufeinanderfolgende fEPSPs entsprechen einer Minute. Deshalb wurden immer 4 Werte gemittelt als ein Punkt dargestellt. Zur Veranschaulichung der Darstellung wurde der Mittelwert des fEPSP-Anstiegs während der Baseline ermittelt, und alle Werte (vor und nach Tetanus bzw. TEA) in Prozent bezogen auf diesen dargestellt. Die LTP bzw. LTD wurde als die prozentuale Erhöhung bzw. Abnahme des fEPSP-Anstiegs während der letzten 5 Minuten der jeweiligen Aufzeichnung erfasst.

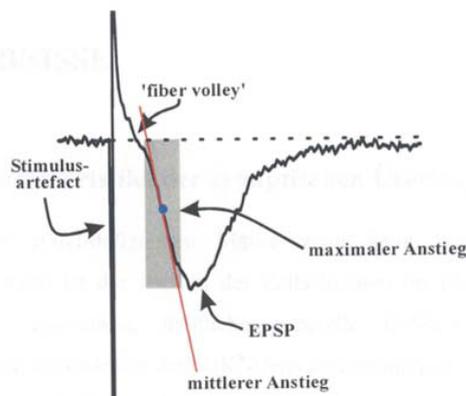


Abbildung 14: Schematische Darstellung eines typischen fEPSPs. Das zur Analyse verwendete initiale Zeitfenster ist grau unterlegt. Die rote Gerade beschreibt den mittleren Anstieg des fEPSPs der Amplitude in diesem Segment. Der Punkt des maximalen Anstiegs ist blau gekennzeichnet.

4. Ergebnisse

4.1 Basischarakteristika der synaptischen Übertragung

Das Gehirn der $Ca_v1.2$ -defizienten Mäuse weist keine groben anatomischen Anomalien auf, der Aufbau der Zellschichten im Hippocampus ist normal. Auch der Gyrus dentatus ist trotz des Vorliegens eines $NEX^{+/Cre}$ -Genotyps ohne sichtbare Deformationen deutlich erkennbar (im Gegensatz zu $NEX^{-/-} * BETA2/NeuroD^{-/-}$ -Doppelmutanten, s. Schwab et al. 2000). Dennoch ist es notwendig, mögliche generelle Defekte der synaptischen Übertragung durch die Deletion des $Ca_v1.2$ -Gens auszuschließen. Ein wichtiger Basisparameter der synaptischen Aktivität ist die sogenannte 'Input-Output-Relation'. Dabei handelt es sich um das Verhältnis der Stärke eines präsynaptischen Reizes (Input) in μA zu der korrespondierenden postsynaptischen Antwort (Output), quantifiziert anhand der Anstiegsteilheit des induzierten fEPSPs. Dieser Parameter wurde vor jeder einzelnen Messung erfasst, um die Integrität des jeweiligen Hippocampuschnitts sicherzustellen. Dabei zeigte sich, dass die 'Input-Output-Relation' von $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäusen mit derjenigen von Kontrolltieren übereinstimmte (s. Abbildung 15). Denn über den gesamten Bereich der untersuchten Reizstärke (10-100 μA) fanden sich keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen.

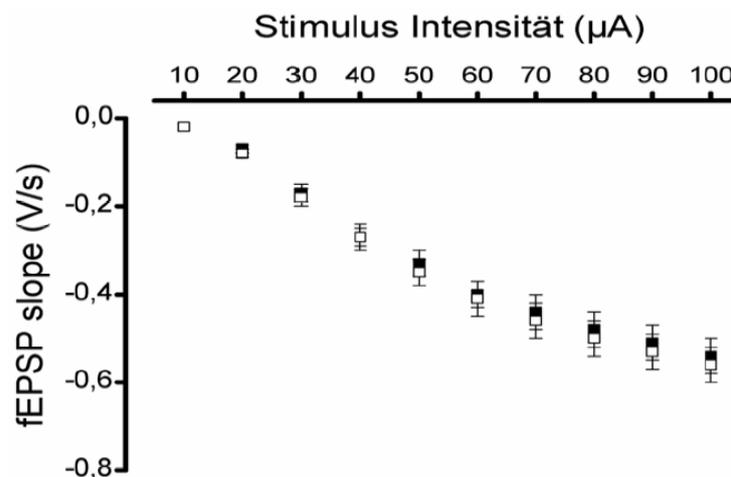


Abbildung 15: 'Input-Output-Relation' (IOR) von $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäusen (n=22; 9 Tiere) und Kontrollmäusen (n=17; 9 Tiere der Altersgruppen 8-12 und 20-40 Wochen). Die Punkte repräsentieren den Mittelwert \pm SEM für Kontroll- (■) bzw. $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse (□).



Abbildung 16: 'Input-Output-Relation' von Kontroll- (■) und $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäusen (□). Dargestellt sind repräsentative Ableitungen von fEPSPs.

Ein weiterer bedeutender Kontrollparameter ist die 'Paired Pulse Facilitation' (PPF), die sehr wahrscheinlich die präsynaptische Funktion beschreibt. Diese kann anhand zweier, gepaarter identischer Reize überprüft werden. Falls letztere in einem kurzen zeitlichen Abstand von 25-425 ms aufeinanderfolgen, kommt es zur Verstärkung der zweiten synaptischen Antwort. Die PPF stellt dabei das Maß der Verstärkung dar, d.h. den Quotient aus dem Anstieg der zweiten Reizantwort und dem Anstieg der ersten Reizantwort (s. Abbildung 17 und 18). Auch in diesem Parameter stimmten die beiden Genotypen überein.

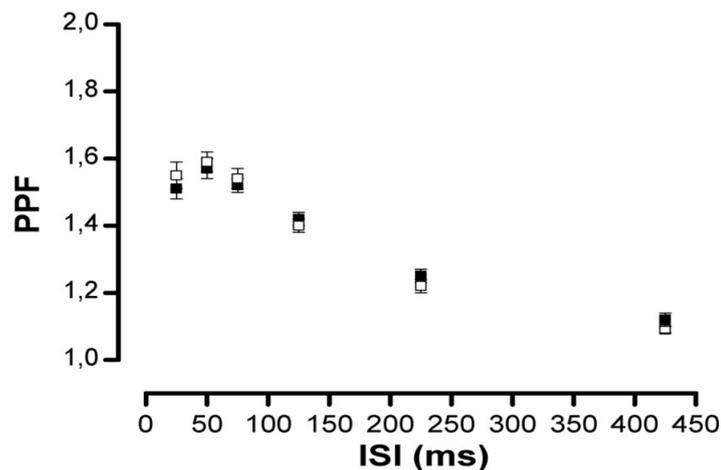


Abbildung 17: 'Paired pulse facilitation' von $Ca_v1.2^{HCKO}$ - (n=50; 27 Tiere) und Kontrollmäusen (n=54; 29 Tiere) in der Altersgruppe 8-12 und 20-40 Wochen. Die Punkte repräsentieren den Mittelwert \pm SEM für Kontroll- (■) bzw. $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse (□). Die Interstimulusintervalle (ISI) zwischen den Pulspaaren betragen 25, 50, 75, 125, 225 und 425 ms.

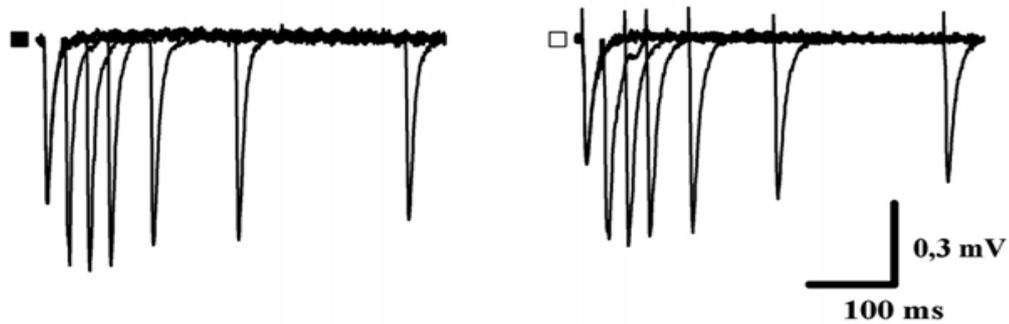


Abbildung 18: 'Paired pulse facilitation' von Kontroll- (■) und $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäusen (□). Dargestellt sind repräsentative Ableitungen von fEPSPs.

Die experimentellen Befunde zeigen, dass es hinsichtlich der PPF keine Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäusen existieren (s. Abbildung 17). Bei keinem der Interstimulusintervalle (ISI) (25, 50, 75, 125, 225 und 425 ms) wurde eine Differenz zwischen den Genotypen festgestellt. Die maximale PPF trat beim ISI von 50 ms auf. Sie beträgt für die Kontrolle $1,57 \pm 0,03$ (n=54, 29 Tiere) und für die $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse $1,59 \pm 0,03$ (n=50, 27 Tiere). Beim kürzesten ISI von 25 ms war die Potenzierung etwas geringer. Mit zunehmenden ISI nahm die PPF in beiden Versuchsgruppen gleichmäßig ab. Die PPF-Experimente wurden vor jedem LTP-Experiment durchgeführt. Die dargestellte Kurve ist aus Versuchen aller Serien zusammengestellt (gepoolt). Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass sich die grundlegenden Charakteristika der synaptischen Transmission in den $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäusen normal verhalten.

4.2 LTP nach Applikation des Kaliumkanalblockers Tetraethylammoniumchlorid (TEA)

4.2.1 TEA-LTP in Mäusen der Altersgruppe 8-12 Wochen

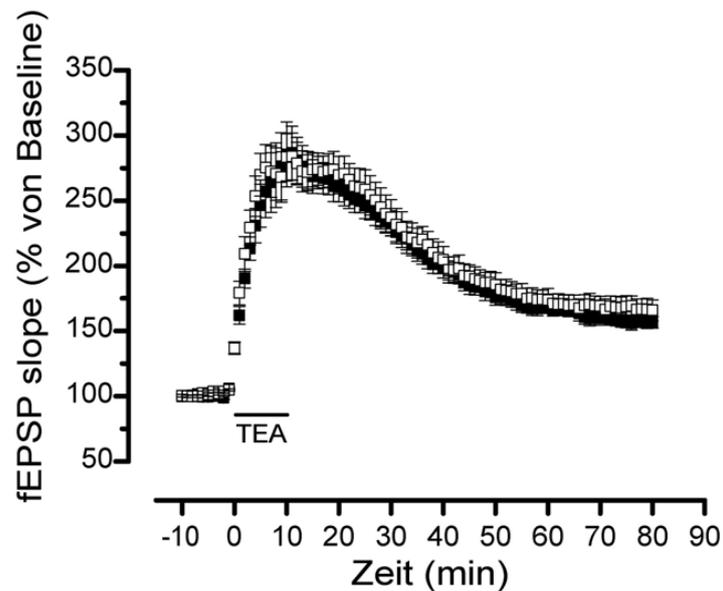


Abbildung 19: TEA-LTP von $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse und Kontrollen in der Altersgruppe von 8-12 Wochen. Die Punkte repräsentieren den Mittelwert \pm SEM für Kontroll- (■) bzw. $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse (□). Kontrolle (n=19; 6 Tiere); $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse (n=12; 4 Tiere).



Abbildung 20: TEA-LTP von Kontroll- (■) und $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäusen (□). Dargestellt sind repräsentative Ableitungen von fEPSPs.

In der ersten Versuchsreihe wurde die durch den Kaliumkanalblocker Tetraethylammoniumchlorid induzierte LTP (TEA-LTP) an Hippokampusschnitten von Mäusen beider Genotypen in der Altersgruppe 8-12 Wochen untersucht. Wie von Aniksztejn & Ben-Ari beschrieben, wurde diese durch eine 10 minütige Badapplikation von TEA in 25 mM Konzentration ausgelöst (Aniksztejn & Ben-Ari 1991). Dabei führte TEA bei beiden Genotypen zu einer anhaltenden, ausgeprägten Potenzierung. Gegen Ende der Einwaschphase erreichte der fEPSP-Anstieg bereits ein Maximum von ca. 270% und ging danach über eine etwa 15 minütige Plateauphase in einem für TEA typischen Verlauf deutlich zurück, um schließlich ein erneutes Plateau zu erreichen (s. Abbildung 19). 75 Minuten nach TEA-Applikation betrug die Potenzierung $157,3 \pm 4,8$ % (n=19, 6 Tiere) bei den Kontrolltieren und $167,3 \pm 8,2$ % bei den $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäusen (n=12, 4 Tiere). Dieses Ergebnis ist nicht mit einem signifikantem Unterschied zwischen den beiden Genotypen vereinbar. Auch in der Input-Output-Relation, die für jeden Schnitt jeweils vor und nach der LTP-Induktion aufgezeichnet wurde, findet sich kein signifikanter Unterschied (s. Abbildung 21). Die Kurve zeigt für jede Reizintensität im Bereich von 30-100 μA den gemessenen fEPSP-Anstieg, jeweils vor TEA-Applikation und gegen Ende der Messung (prä- und post-LTP) dargestellt im Verhältnis zur maximalen Steigung vor der Potenzierung (=100%).

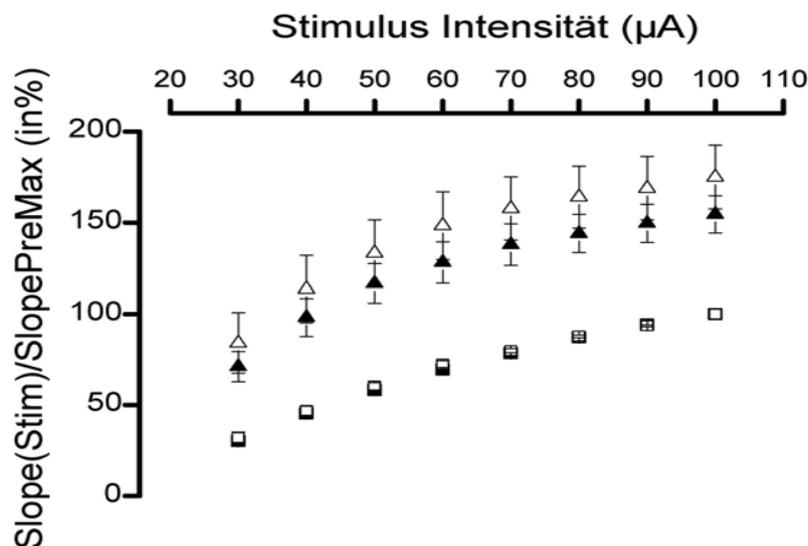


Abbildung 21: 'Input-Output-Relation' für TEA-LTP von $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäusen und Kontrollen in der Altersgruppe von 8-12 Wochen. Die Punkte repräsentieren den Mittelwert \pm SEM für Kontroll- (prä-LTP: ■, post-LTP: ▲) bzw. $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse (prä-LTP: □, post-LTP: △). Kontrolle (n=18; 6 Tiere); $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse (n=9; 4 Tiere).

Auch die durch TEA induzierte Potenzierung bestätigt dieses Ergebnis über das gesamte Spektrum der Reizintensitäten. Dabei ist der fEPSP-Anstieg nach LTP-Induktion (post-LTP) immer relativ zur jeweiligen fEPSP-Steigung vor der Potenzierung in der entsprechenden Reizstärke (=100%) dargestellt (s. Abbildung 22). Ein weiterer Aspekt, den diese Kurve zum Ausdruck bringt, ist die erhebliche Abnahme der Potenzierung mit zunehmender Stimulationsintensität (s. oben). Um eine möglichst hohe Potenzierung zu erreichen, wurden die Messungen grundsätzlich mit Reizstärken zwischen 40-80 μA durchgeführt.

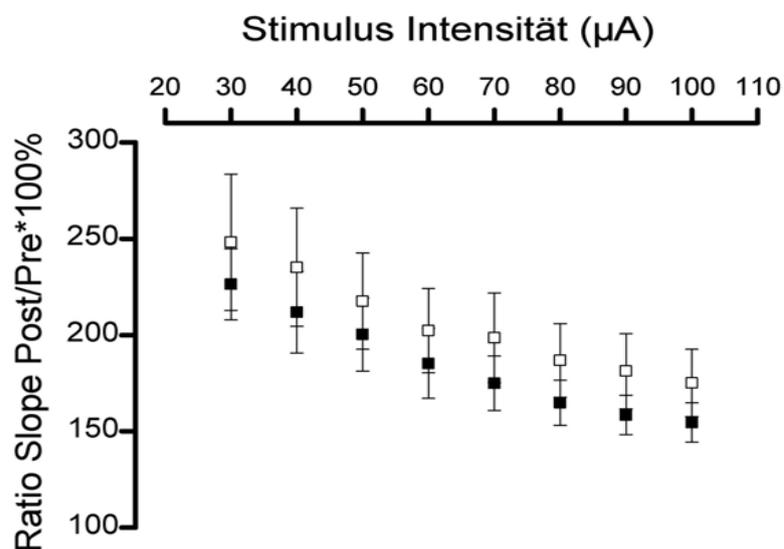


Abbildung 22: Potenzierung bei verschiedenen Stimulationsintensitäten für $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ - und Kontrollmäuse in der Altersgruppe von 8-12 Wochen. Die Punkte repräsentieren den Mittelwert \pm SEM für Kontroll- (■) bzw. $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäuse (□). Kontrolle (n=18; 6 Tiere); $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäuse (n=9; 4 Tiere).

4.2.2 TEA-LTP unter Isradipin in Mäusen der Altersgruppe 8-12 Wochen

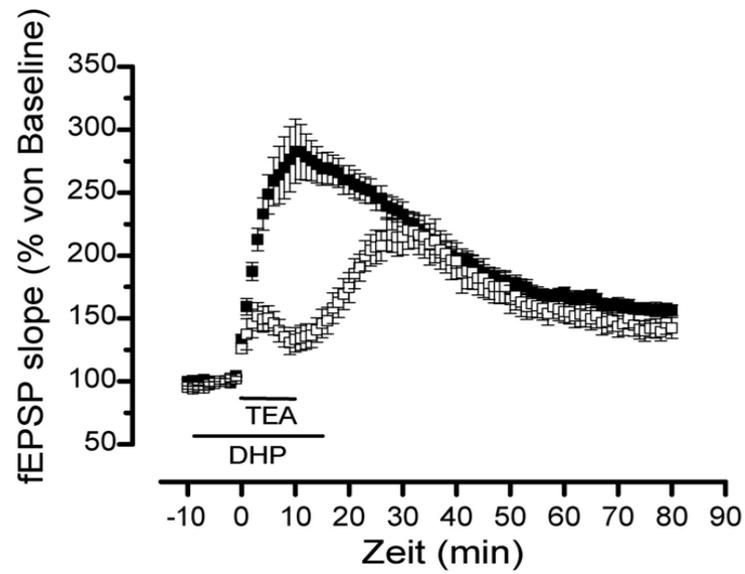


Abbildung 23: TEA-LTP von Kontrollmäusen mit und ohne das Dihydropyridin (DHP) Isradipin in der Altersgruppe von 8-12 Wochen. Die Punkte repräsentieren den Mittelwert \pm SEM für native (■) bzw. DHP-behandelte Präparate von Kontrollen (□). Kontrolle (n=19; 6 Tiere); DHP-behandelt (n=12; 5 Tiere).



Abbildung 24: TEA-LTP von Kontrollmäusen ohne (■) und mit dem DHP Isradipin (□). Dargestellt sind repräsentative Ableitungen von fEPSPs.

Um den Beitrag der L-Typ VDCCs unter diesen Bedingungen direkt nachzuweisen, wurde als nächstes der Einfluss des Dihydropyridins Isradipin (2,5 μ M) auf TEA-LTP in Kontrolltieren der Altersgruppe 8-12 Wochen untersucht. Ursprünglich beschrieben Aniksztejn & Ben-Ari für Isradipin eine starke, fast sogar komplette Reduktion der Potenzierung unter TEA (Aniksztejn & Ben-Ari 1991). Gleichzeitig diente diese Messreihe damit auch dem Ausschluss einer unzureichenden Deletion des $Ca_v1.2$ -Gens als Ursache für das Fehlen eines wesentlichen Unterschieds zwischen den beiden Genotypen in dieser Altersgruppe.

Im Vergleich zu den unbehandelten Hippocampuschnitten von Kontrolltieren, bewirkte Isradipin in den ersten 30 Minuten ab TEA-Applikation eine starke Verringerung der LTP. Danach glich sich der Verlauf jedoch an die Kurve der nativen Gruppe an. 75 Minuten nach Auswaschen von TEA fand sich nur noch eine leichte Reduktion unter Isradipin, die jedoch nicht signifikant war (s. Abbildung 23). Zu dem Zeitpunkt betrug die TEA-LTP der DHP-behandelten Gruppe $142,0 \pm 7,9$ % im Vergleich zu $157,0 \pm 4,9$ % in der unbehandelten Kontrolle. Auch die entsprechenden Kurven der IOR und Potenzierung bestätigen dieses Ergebnis über das gesamte Spektrum unterschiedlicher Reizintensitäten (s. Abbildungen 25 und 26).

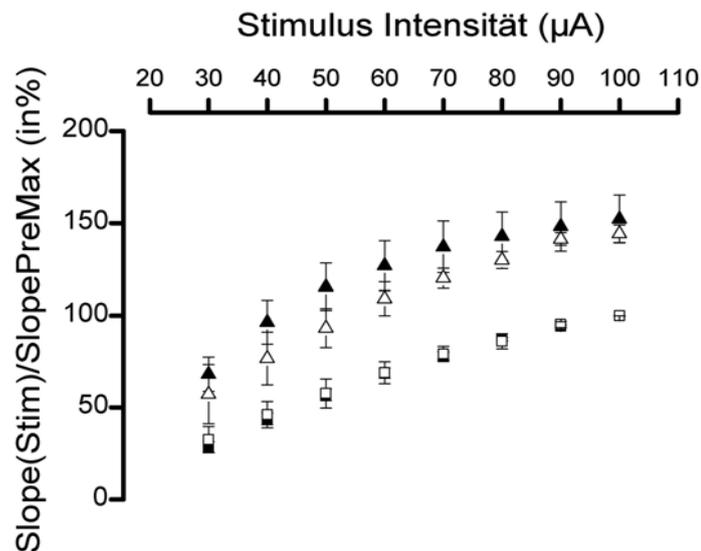


Abbildung 25: 'Input-Output-Relation' für TEA-LTP von Kontrollen ohne und mit dem DHP Isradipin in der Altersgruppe von 8-12 Wochen. Die Punkte repräsentieren den Mittelwert \pm SEM für native Kontroll- (prä-LTP: ■, post-LTP: ▲) bzw. DHP-behandelte Präparate (prä-LTP: □, post-LTP: △). Kontrolle (n=18; 6 Tiere); DHP-behandelt (n=5; 3 Tiere).

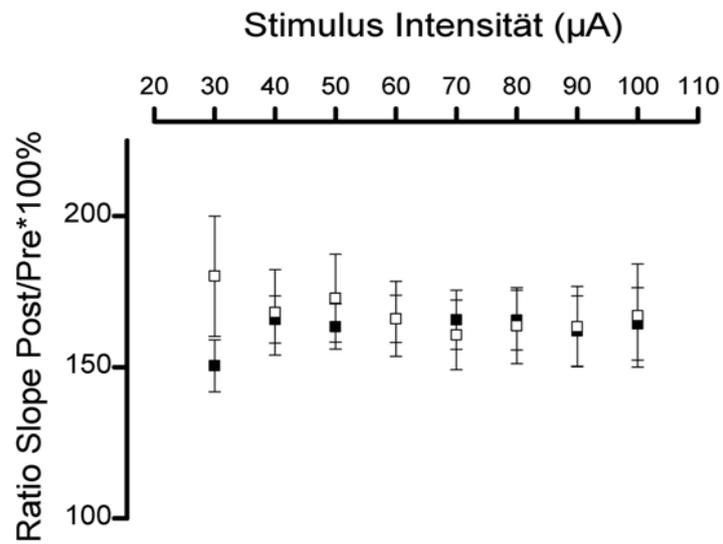


Abbildung 26: Potenzierung bei verschiedenen Stimulationsintensitäten für TEA-LTP von Kontrollen ohne und mit dem DHP Isradipin in der Altersgruppe von 8-12 Wochen. Die Punkte repräsentieren den Mittelwert \pm SEM für native Kontroll- (■) bzw. DHP-behandelte Präparate (□). Kontrolle (n=18; 6 Tiere); DHP-behandelt (n=5; 3 Tiere).

4.2.3 TEA-LTP in Mäusen der Altersgruppe 20-40 Wochen

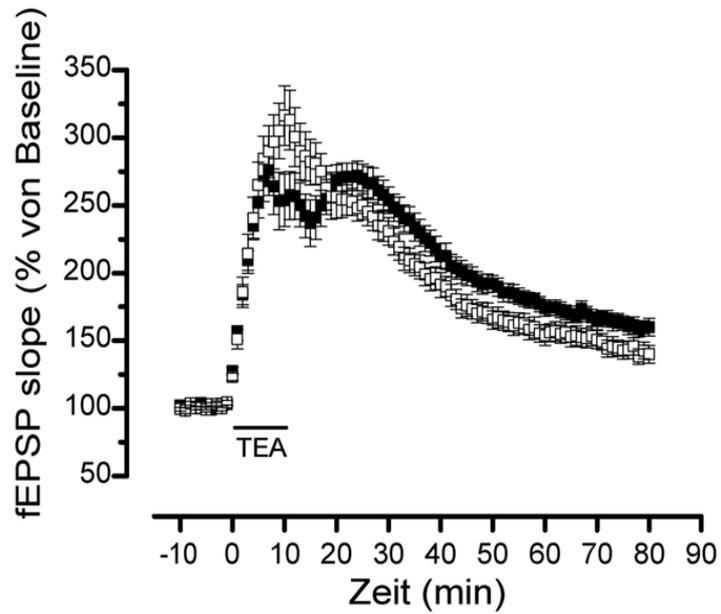


Abbildung 27: TEA-LTP von $Ca_v1.2^{HCKO}$ - (□) und Kontrollmäusen (■) in der Altersgruppe von 20-40 Wochen. Die Punkte repräsentieren den Mittelwert \pm SEM. Kontrolle (n=16; 9 Tiere); $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse (n=13; 8 Tiere).

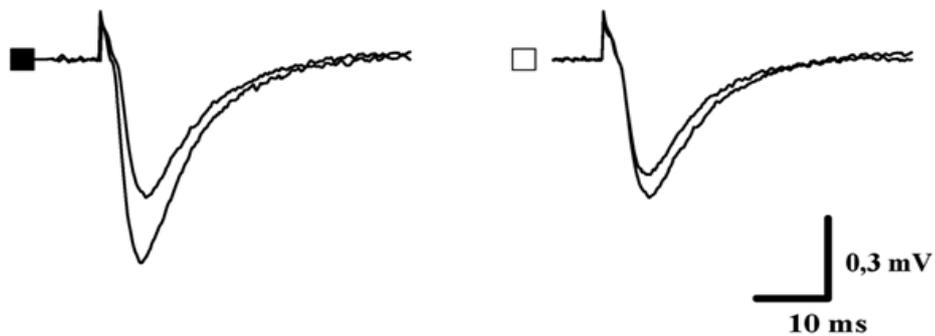


Abbildung 28: TEA-LTP von $Ca_v1.2^{HCKO}$ - (□) und Kontrollmäusen (■). Dargestellt sind repräsentative Ableitungen von fEPSPs.

In der Literatur existieren mehrere Studien, die auf eine zunehmende Bedeutung der L-Typ VDCCs für LTP mit steigendem Alter hinweisen (Campbell et al. 1996, Shankar et al. 1998, Thibault et al. 2001). Zur Untersuchung einer möglichen Altersabhängigkeit wurde daher in einer nächsten Serie TEA-LTP in Hippocampuschnitten beider Genotypen in der Altersgruppe 20-40 Wochen analysiert. Im Gegensatz zu den Untersuchungen in der Altersgruppe von 8-12 Wochen, ließ sich hier 75 Minuten nach Einwaschen von TEA ein deutlicher Unterschied zwischen den Kontroll- und den $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Tieren feststellen. Die TEA-LTP betrug zu diesem Zeitpunkt $163,0 \pm 5,3$ % ($n=16$, 9 Tiere) für die Kontrolle und $142,7 \pm 6,4$ % ($n=13$, 8 Tiere) für die $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse (s. Abbildung 27). Diese erhebliche Reduktion bei letzteren entsprach knapp einem Drittel der Potenzierung bei den Kontrolltieren und erwies sich als signifikant ($p < 0,05$; ermittelt durch t-Test).

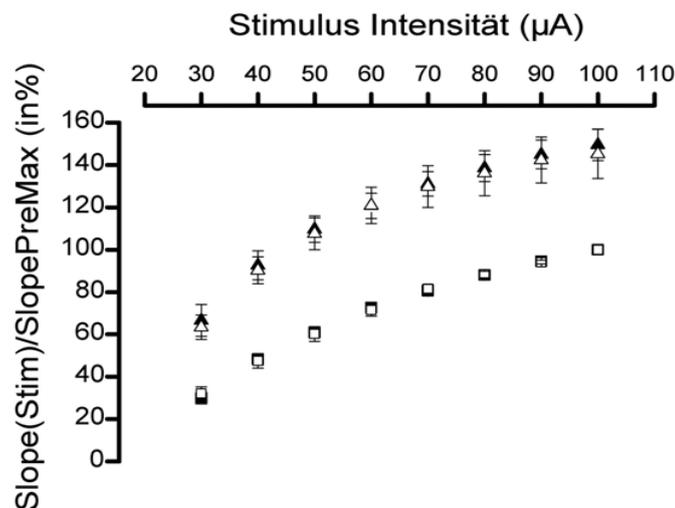


Abbildung 29: 'Input-Output-Relation' für TEA-LTP von $Ca_v1.2^{HCKO}$ - und Kontrollmäusen in der Altersgruppe von 20-40 Wochen. Die Punkte repräsentieren den Mittelwert \pm SEM für Kontroll- (prä-LTP: ■, post-LTP: ▲) bzw. $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse (prä-LTP: □, post-LTP: △). Kontrolle ($n=16$; 8 Tiere); $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse ($n=15$; 7 Tiere).

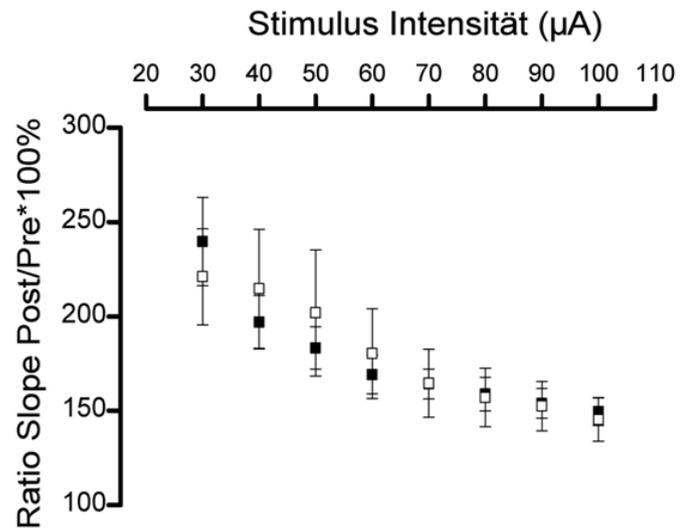


Abbildung 30: Potenzierung bei verschiedenen Stimulationsintensitäten für TEA-LTP von Ca_v1.2^{HCKO}- und Kontrollmäusen in der Altersgruppe von 20-40 Wochen. Die Punkte repräsentieren den Mittelwert ± SEM für Kontrollen (■) bzw. Ca_v1.2^{HCKO}-Mäuse (□). Kontrolle (n=16; 8 Tiere); Ca_v1.2^{HCKO}-Mäuse (n=15; 7 Tiere).

4.3 L-LTP nach tetanischer Theta-Burst-Stimulierung

4.3.1 L-LTP nach Applikation eines starken Theta-Bursts in Mäusen der Altersgruppe 20-40 Wochen

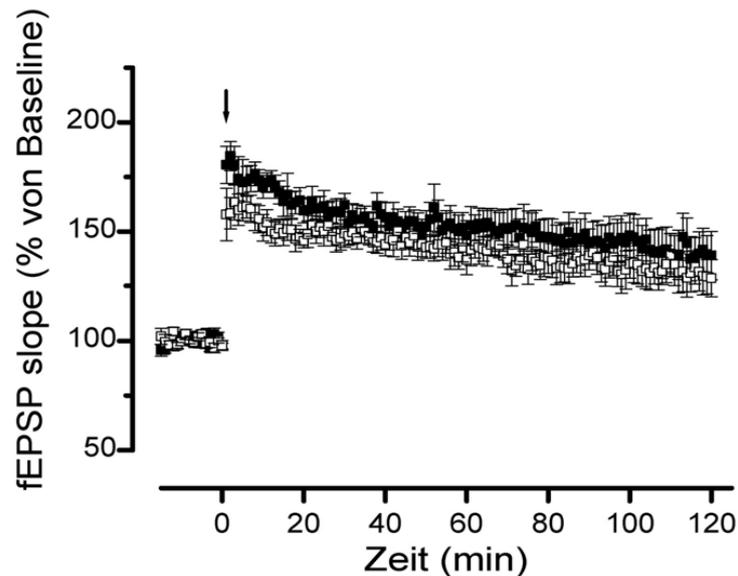


Abbildung 31: Durch starke Theta-Burst-Stimulation (TBS) induzierte LTP von $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäusen und Kontrollen in der Altersgruppe von 20-40 Wochen. Zum Zeitpunkt 0 wurde einmalig eine starke TBS (\downarrow) mit einer Pulsdauer von 200 μ s appliziert. Die Punkte repräsentieren den Mittelwert \pm SEM für Kontroll- (\blacksquare) bzw. $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse (\square). Kontrolle (n=8; 5 Tiere); $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse (n=9; 6 Tiere).

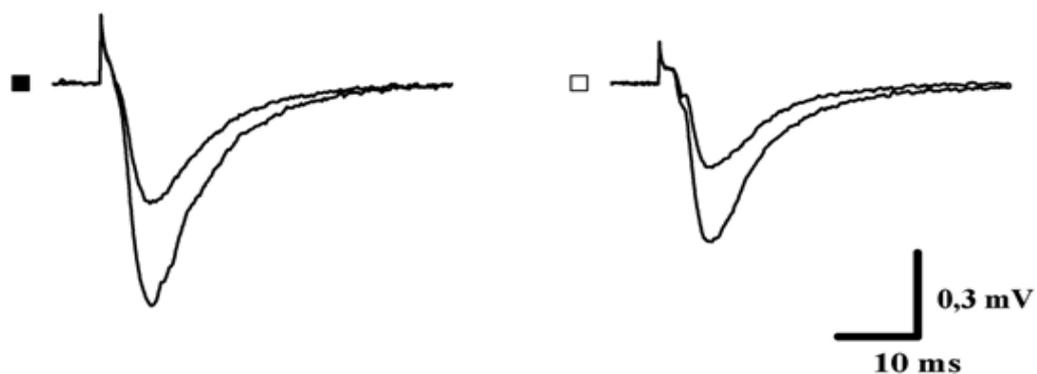


Abbildung 32: Durch starke TBS induzierte LTP von Kontroll- (\blacksquare) und $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäusen (\square). Dargestellt sind repräsentative Ableitungen von fEPSPs.

Eine Vielzahl von Studien misst den L-Typ VDCCs eine entscheidende Funktion an der Ausprägung von L-LTP bei (s. Einleitung). Aus diesem Grund wurde in der nächsten Versuchsreihe die beginnende L-LTP nach tetanischer Stimulation in Mäusen der Altersgruppe 20-40 Wochen zwischen den Genotypen verglichen. Dazu wurde zunächst ein einmaliger starker Theta-Burst-Stimulus (s. Material und Methoden, Kapitel 2.3) appliziert. Die Dauer der einzelnen Messungen wurde auf 120 Minuten verlängert. Dabei zeigten sowohl $Ca_v1.2^{HCKO}$ - als auch Kontrollmäuse eine ausgeprägte Potenzierung, die annähernd parallel verlaufend mit konstantem Gradient abnahm (s. Abbildung 31). Nach 2 Stunden betrug die L-LTP in der Kontrollgruppe $139,3 \pm 9,7$ % ($n = 8$, 5 Tiere) und in der $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Gruppe $130,6 \pm 8,4$ % ($n = 9$, 6 Tiere). Diese Differenz macht deutlich, dass unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen die L-LTP in den $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäusen zwar reduziert war, jedoch nicht in einem signifikantem Ausmaß im Vergleich zu den Kontrolltieren. Dieses Ergebnis wird auch von den entsprechenden IOR-Kurven beider Gruppen widerspiegelt, die sich auch für keine Reizstärke des Spektrums von 40-150 μA signifikant unterscheiden (s. Abbildung 33). Weiterhin bestätigt dies auch die Kurve der Potenzierung (s. Abbildung 34).

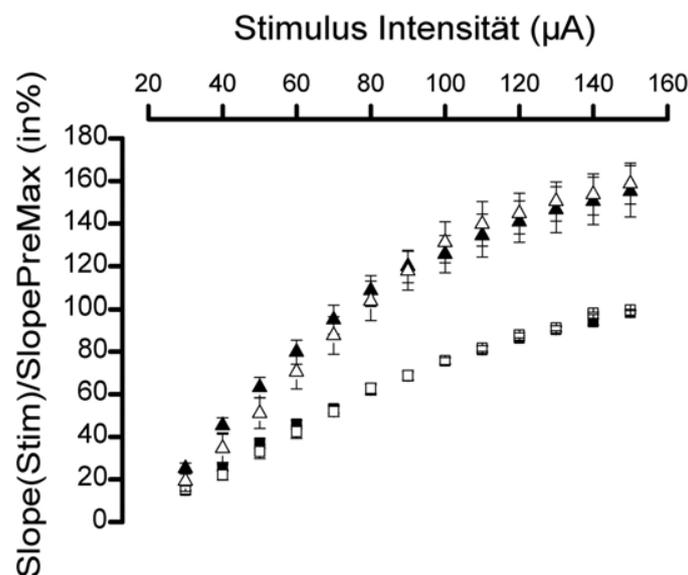


Abbildung 33: 'Input-Output-Relation' für die TBS-induzierte LTP von $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäusen und Kontrollen in der Altersgruppe von 20-40 Wochen. Die Punkte repräsentieren den Mittelwert \pm SEM für Kontroll- (prä-LTP: ■, post-LTP: ▲) bzw. $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse (prä-LTP: □, post-LTP: Δ). Kontrolle ($n=13$; 6 Tiere); $Ca_v1.2^{HCKO}$ -Mäuse ($n=12$; 7 Tiere).

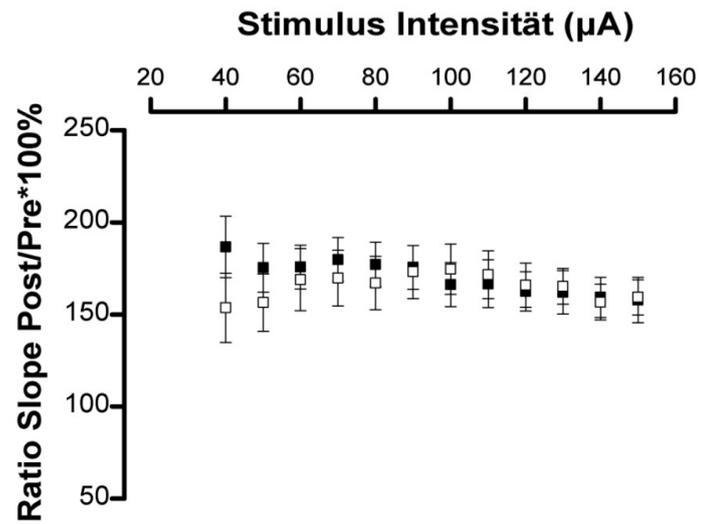


Abbildung 34: Potenzierung bei verschiedenen Stimulationsintensitäten für TBS-induzierte LTP von Ca_v1.2^{HCKO}-Mäusen und Kontrollen in der Altersgruppe von 20-40 Wochen. Die Punkte repräsentieren den Mittelwert ± SEM für Kontroll- (■) bzw. Ca_v1.2^{HCKO}-Mäuse (□). Kontrolle (n=13; 6 Tiere); Ca_v1.2^{HCKO}-Mäuse (n=12; 7 Tiere).

4.3.2 L-LTP nach zweifacher Theta-Burst-Stimulation in Mäusen der Altersgruppe 8-12 Wochen unter Isradipin

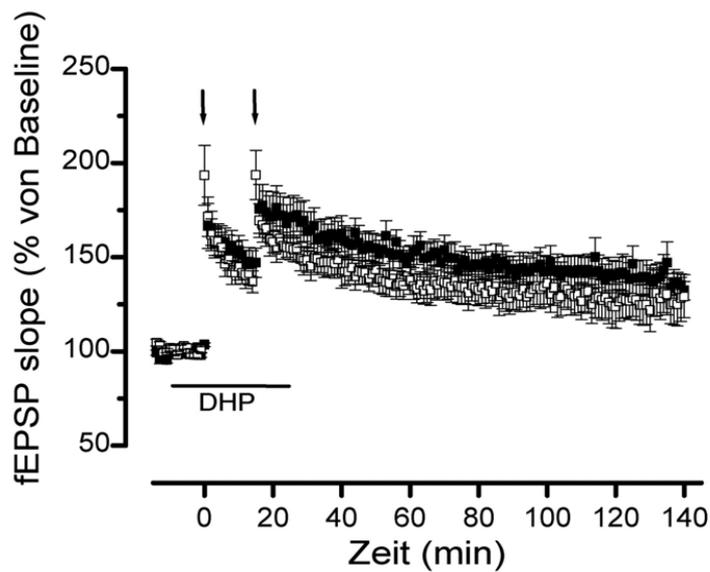


Abbildung 35: Durch zwei starke Theta-Burst-Stimuli (TBS) induzierte LTP von Kontrollmäusen in der Altersgruppe von 8-12 Wochen ohne und unter Anwesenheit des Dihydropyridins Isradipin. Zum Zeitpunkt 0 und nach 15 Minuten wurden jeweils ein starker TBS (\downarrow) mit einer Pulsdauer von 100 μ s und einer Stimulationsintensität von 150 μ A appliziert. Die Punkte repräsentieren den Mittelwert \pm SEM für native Kontroll- (\blacksquare) bzw. DHP-behandelte Kontrollschnitte (\square). Kontrolle (n=10; 5 Tiere); DHP-behandelt (n=10; 6 Tiere).

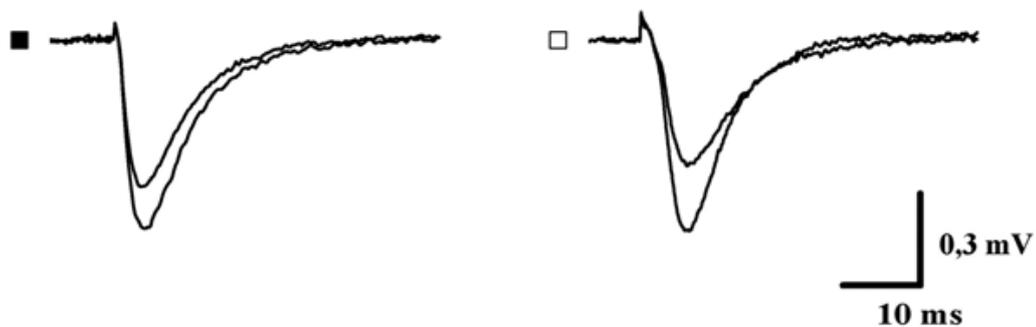


Abbildung 36: Durch zwei starke TBS induzierte LTP von nativen Kontrollschnitten (\blacksquare) und mit Applikation von Isradipin (\square). Dargestellt sind repräsentative Ableitungen von fEPSPs.

In der zweiten Versuchsreihe sollte die Ausprägung der L-LTP in Kontrollmäusen unter Anwesenheit von Isradipin (2,5 μM) untersucht werden. Damit sollte auch für die L-LTP ein mögliches Vorhandensein einer L-Typ VDCC-abhängigen Komponente unter den hier vorliegenden Bedingungen in Kontrollmäusen aufgedeckt bzw. ausgeschlossen werden. Für diese Messreihe wurden zwei Theta-Burst-Stimuli im Abstand von 15 Minuten (s. Kapitel 2.3) appliziert. Dabei wurde während der Theta-Bursts die Reizstärke ausserdem auf $\sim 150 \mu\text{A}$ erhöht, um ein Auftreten von 'population spikes' und somit eine L-Typ VDCC-Aktivierung zusätzlich zu fördern (s. Kapitel 2.3; Morgan & Teyler 1999). Auch hier wiesen beide Versuchsgruppen eine deutliche Potenzierung auf, mit annähernd parallelem, kontinuierlich abnehmendem Verlauf (s. Abbildung 35). Nach 2 Stunden betrug der maximale Anstieg der fEPSPs in der Kontrolle $139,2 \pm 8,0 \%$ ($n = 10$, 5 Tiere) und unter Isradipin $124,6 \pm 11,2 \%$ ($n = 10$, 6 Tiere). Diese manifeste Reduktion der L-LTP unter Isradipin deutet zwar auf einen relevanten Anteil der L-Typ VDCCs an der L-LTP hin, der beobachtete Unterschied war jedoch auch hier nicht signifikant. Auch die IOR- und Potenzierungskurven zeigen über den gesamten Querschnitt der Reizstärke keine signifikante Differenz zwischen den Versuchsgruppen (s. Abbildungen 37 und 38).

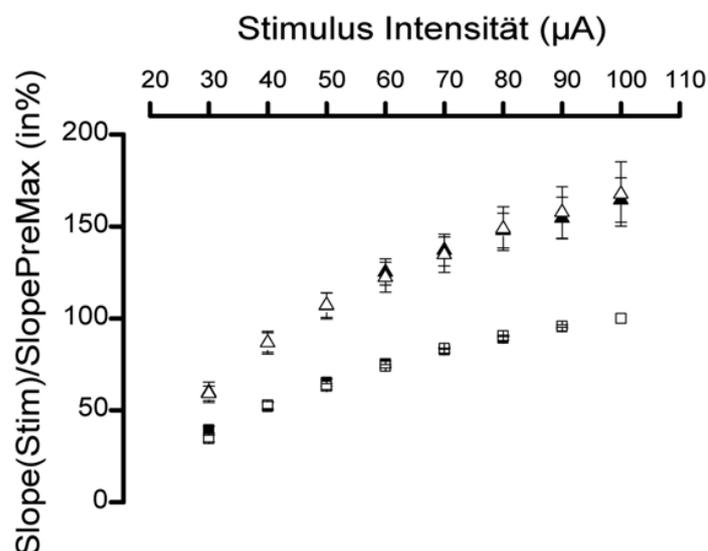


Abbildung 37: 'Input-Output-Relation' für TBS-induzierte LTP von nativen Kontrollschnitten und unter Anwesenheit von Isradipin in der Altersgruppe 8-12 Wochen. Die Punkte repräsentieren den Mittelwert \pm SEM für unbehandelte Kontroll- (prä-LTP: ■, post-LTP: ▲) bzw. DHP-behandelte Schnitte (prä-LTP: □, post-LTP: △). Kontrolle ($n=10$; 5 Tiere); DHP-behandelt ($n=10$; 6 Tiere).

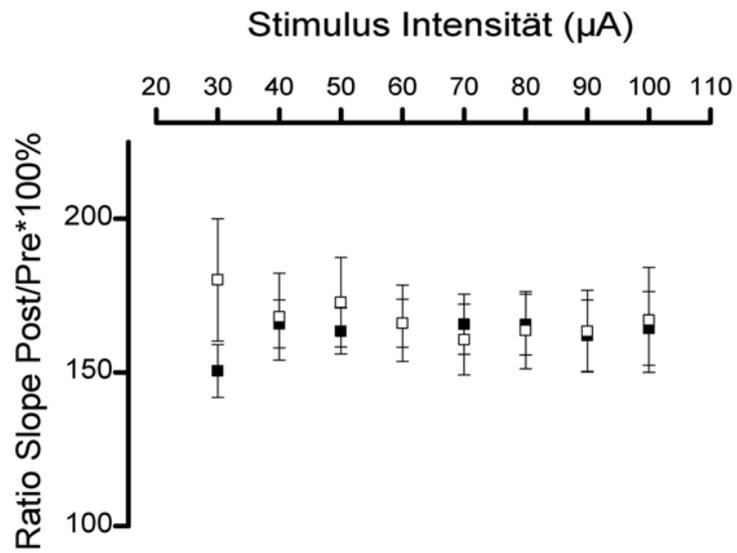


Abbildung 38: Potenzierung bei verschiedenen Stimulationsintensitäten für TBS-induzierte LTP von Kontrollmäusen in der Altersgruppe von 8-12 Wochen ohne und mit Applikation von Isradipin. Die Punkte repräsentieren den Mittelwert \pm SEM für native Kontroll- (■) bzw. DHP-behandelte Schnitte (□). Kontrolle (n=10; 5 Tiere); DHP-behandelt (n=10; 6 Tiere).

5. Diskussion

Seit Ende der 40er Jahre wird mit zunehmender Evidenz postuliert, dass synaptische Plastizität, als Korrelat neuronaler Informationsspeicherung, den kognitiven Funktionen von Lernen und Gedächtnis zugrunde liegt. Unter den verschiedenen Prototypen dieses Phänomens wird dabei die LTP aufgrund ihrer Eigenschaften als neuronaler Mechanismus für die Entstehung von Langzeitgedächtnis erwogen (s. Kapitel 1.1). Auch eine überwiegende Anzahl an Studien, die das Lernverhalten von Mäusen mit defizitärer LTP untersucht, stützt indessen diese Assoziation. Verschiedenen Formen von hippocampaler LTP wird darin eine elementare Rolle für das deklarative Gedächtnis, insbesondere das räumliche Lernen, zugewiesen (Morris et al. 1986, Bourtchuladze et al. 1994, Pastalkova et al. 2006, Balschun et al. 1999). Aber auch das Fehlen einer konditionierten Angstreaktion, die auf der Ausprägung eines impliziten Gedächtnissubtyps beruht, wird beispielsweise mit der Inhibition von LTP in der lateralen Amygdala in Zusammenhang gebracht (Blair et al. 2001, Nader et al. 2000).

Eine unabdingbare Voraussetzung für das Auftreten von LTP in der hippocampalen CA1 Region ist eine massive Erhöhung der zytosolischen Ca^{++} -Konzentration im postsynaptischen Neuron (Raymond & Redman 2002, Bliss & Collingridge 1993, Malenka & Nicoll 1999, Lynch 2004). Je nach Induktionsmodus tragen zu diesem Signal unterschiedliche Ca^{++} -Quellen, die mit spezifischen Effektormechanismen assoziiert sind und teilweise in unterschiedliche LTP-Formen münden, bei (Raymond & Redman 2006). Die grösste Bedeutung wird dabei den NMDA-Rezeptoren und den spannungsabhängigen L-Typ Kalziumkanälen (L-Typ VDCCs) zugesprochen. Während NMDA-Rezeptoren mitunter zu mehreren LTP-Formen unterschiedlicher Persistenz beitragen, werden L-Typ VDCCs vorrangig mit dem Auftreten von langanhaltender, de-novo-Proteinsynthese abhängiger LTP (L-LTP) assoziiert (Grover & Teyler 1994, Impey et al. 1996). Desweiteren erwähnenswert ist der Ca^{++} -Einstrom aus intrazellulären Speichern via Ryanodin- oder IP_3 -Rezeptoren, sowie über TRP ('transient receptor potential')- und CNG ('cyclic nucleotide gated')-Kanäle, deren Funktion jedoch noch näher erforscht werden muss (Raymond & Redman 2006, Topolnik et al. 2006, Zufall et al. 1997).

In hippocampalen Pyramidenzellen werden im wesentlichen zwei von insgesamt vier Isoformen des L-Typ Ca^{++} -Kanals, $Ca_v1.2$ und $Ca_v1.3$, exprimiert. Wie eine Studie von Hell et al. (1993) zeigt, überwiegen dabei $Ca_v1.2$ VDCCs mit einem Anteil von bis zu 75%. Dieses Verteilungsmuster spiegelt eventuell auch ihre Bedeutung für die synaptische

Plastizität wider. Denn $\text{Ca}_v1.3\alpha1$ -Knockoutmäuse weisen weder in NMDAR-abhängiger noch NMDAR-unabhängiger LTP eine Beeinträchtigung auf (Clark et al. 2003). Bislang gab es jedoch keine Möglichkeit, die spezifische Funktion des $\text{Ca}_v1.2 \text{Ca}^{++}$ -Kanals für die Induktion von LTP zu charakterisieren, da Inhibitoren einzelner Rezeptorsubtypen nicht zur Verfügung stehen. Darüberhinaus erschwerend ist in diesem Zusammenhang, dass pharmakologische Untersuchungen in vivo kaum in der Lage wären, neuronale Auswirkungen von nicht auszuschließenden kardialen oder vasogenen Effekten zu unterscheiden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb die individuelle Rolle des $\text{Ca}_v1.2 \text{Ca}^{++}$ -Kanals für die hippocampale LTP erstmals an einer Mauslinie mit einem vorderhirnspezifischem Verlust des $\text{Ca}_v1.2$ -Gens ($\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$) untersucht. Jene war mit Hilfe eines CRE/loxP Rekombinationssystems am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU München generiert worden (s. Specht 2000). Die Gendelektion dieser Mäuse erstreckt sich nur auf 'primary neurons' des Hippocampus und Neocortex, zu denen auch Pyramidenzellen zählen (s. Schwab et al. 2000). Ausschließlich in jenen wird das Zelldifferenzierungsprotein NEX, in dessen Gen eine Cre Rekombinase knock-in Sequenz eingefügt wurde, exprimiert. Folglich katalysiert letztere die Exzision eines von zwei loxP-Rekombinationssequenzen flankierten Abschnitts des $\text{Ca}_v1.2$ -Gens, welches dadurch seine Funktion verliert.

Der Erfolg dieser Geninaktivierung konnte durch Messungen von Ca^{++} -Kanalströmen in hippocampalen Pyramidenzellen bestätigt werden: $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäuse zeigten dabei eine im Vergleich zu Kontrolltieren > 80 %-ige Reduktion von DHP-sensitiven Strömen (Moosmang et al. 2005). Es wurde auch ausgeschlossen, dass $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäuse generelle Defekte in der basalen synaptischen Transmission aufweisen (s. Kapitel 3.1) oder sich in ihren anatomischen Strukturen, einschließlich des Hippocampus, von den Kontrolltieren unterscheiden.

Um die funktionelle Rolle des $\text{Ca}_v1.2 \text{Ca}^{++}$ -Kanals bestmöglich untersuchen zu können, wurden für diese Arbeit Stimulationsprotokolle, die zu einer hohen VDCC-abhängigen Potenzierung führen, ausgewählt. Zuerst wurde LTP chemisch durch Applikation des K^+ -Kanalblockers Tetraethylammonium (TEA) (s. Kapitel 1.4), anschließend tetanisch durch eine Theta-Burst-Stimulierung mit einer Frequenz von 100 Hz ausgelöst (s. Kapitel 2.3). Allgemein erfordert die Aktivierung von L-Typ Ca^{++} -Kanälen eine Stimulierung von hoher Frequenz und ausreichender Reizstärke, welche zu einer starken und anhaltenden Depolarisation (>10 mV) im entsprechenden postsynaptischen Neuron führt (Grover & Teyler 1990). Laut Takagi (2000) wird diese Voraussetzung erfüllt, indem

postsynaptische Na^+ -Aktionspotentiale antidrom vom Initialsegment des Axons bis in Dendriten fortgeleitet werden ('backpropagating') und dortige L-Typ VDCCs erfassen. Um daher das Auftreten von Aktionspotentialen in den Pyramidenzellen der CA1 Region zu fördern, wurde die Reizintensität während der zweifachen TBS-Applikation (in der zweiten Messreihe zur L-LTP) auf $150 \mu\text{A}$ gegenüber der Aufzeichnung der Baseline bei $\sim 50 \mu\text{A}$ erhöht (s. Morgan & Teyler 1999). Dabei konnte mittels fEPSP-Messungen eine Generierung von 'population spikes'² in der Pyramidenzellschicht nachgewiesen werden. Als erstes sollte in dieser Arbeit der spezifische Beitrag des $\text{Ca}_v1.2 \text{ Ca}^{++}$ -Kanals zur TEA-LTP in der CA1 Region untersucht werden. Ausgehend von der Annahme, dass die durch TEA induzierte LTP hauptsächlich auf einem Ca^{++} -Einstrom durch L-Typ VDCCs beruht (Aniksztejn & Ben-Ari 1991, Huang & Malenka 1993), sollte ihre Ausprägung in den $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäusen deutlich verringert sein. In der Altersgruppe von 8-12 Wochen zeigten Knockoutmäuse jedoch keine Beeinträchtigung. Da dieses Ergebnis einen L-Typ VDCC-Anteil in Frage stellt, wurde eine weitere Messreihe an Kontrolltieren unter deren Blockade durch Isradipin durchgeführt. Obwohl die TEA-LTP dadurch initial stark reduziert wurde, unterschied sie sich nach 75 Minuten nur noch geringfügig von der unbehandelten Kontrollgruppe. Schließlich wurde eine dritte Versuchsreihe an Mäusen der Altersgruppe 20-40 Wochen durchgeführt, um einer möglichen Altersabhängigkeit der Funktion von L-Typ VDCCs (s. Kapitel 1.4) Rechnung zu tragen. Denn in der Literatur finden sich Hinweise, dass die L-Typ VDCC-Dichte in CA1 Neuronen mit zunehmendem Alter ansteigt (Blalock et al. 1999, Thibault & Landfield 1996), was sich möglicherweise auch auf ihren Beitrag zur TEA-LTP auswirken könnte. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese war TEA-LTP hier im Gegensatz zu den jüngeren Tieren in der $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Gruppe bei Versuchsende um etwa ein Drittel signifikant reduziert.

Diese Ergebnisse sprechen gegen eine Beteiligung von $\text{Ca}_v1.2$ -Kanälen an TEA-LTP unter unseren Bedingungen in der Altersgruppe von 8-12 Wochen. Das Fehlen einer signifikanten Reduktion durch Isradipin zeigt ausserdem, dass eine grössere VDCC-abhängige Komponente durch den geringen, noch erhaltenen L-Typ VDCC-Reststrom in $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäusen (s. oben) sehr unwarscheinlich ist. Unsere Befunde widersprechen damit offensichtlich Studien, die unter L-Typ Ca^{++} -Kanalantagonisten eine vollständige Blockade der TEA-LTP vorfinden und damit den VDCCs eine unikale Rolle für TEA-LTP zuweisen (Aniksztejn & Ben-Ari 1991, Huang & Malenka 1993). Im Gegensatz dazu wiesen jedoch andere Arbeitsgruppen ohne Bezugnahme auf das Alter eine wesentliche

² Aktionspotentialsequenzen von einzelnen Zellpopulationen

NMDAR-abhängige Komponente von TEA-LTP nach (z.B. Huber et al. 1995, Hanse & Gustafsson 1994). Letztgenannte Autoren beschreiben darüberhinaus auch ein Ausbleiben der Potenzierung der initialen Steigung durch TEA unter NMDAR-Blockade. Im Vergleich zu den älteren Mäusen lässt sich daraus ableiten, dass in dieser Altersgruppe VDCCs für TEA-LTP wahrscheinlich nur eine marginale Rolle spielen und andere Ca^{++} -Quellen, wie NMDAR oder intrazelluläre Speicher von weitaus grösserer Bedeutung sind. Dennoch bestätigt unsere Messreihe an Mäusen der Altersgruppe 20-40 Wochen eine elementare Rolle der VDCCs für TEA-LTP. Sie zeigt erstmals, dass es sich dabei um die spezifische Funktion von $Ca_v1.2$ -Kanälen handelt. Darüberhinaus weist sie nach, dass diese unter den vorliegenden Bedingungen nicht durch $Ca_v1.3$ -Kanäle ersetzt werden kann. Im Kontext mit der Studie von Clark et al. (2003), die in $Ca_v1.3\alpha_1$ -Knockoutmäusen keine Verminderung der NMDAR-unabhängigen LTP feststellt, lässt sich dieses Ergebnis auch als eine funktionelle Vorrangstellung der $Ca_v1.2$ -Isoform in der Induktion von LTP interpretieren. Ausserdem belegt die erhebliche Beteiligung von $Ca_v1.2$ -Kanälen in dieser Altersgruppe eine massive Erhöhung der VDCC-abhängigen Komponente mit in diesem Rahmen fortschreitendem Alter. Damit weisen unsere Befunde auch zum ersten Mal eine Altersabhängigkeit der Induktion von TEA-LTP nach. Dies stellt eine Parallele dar zu Studien, die für die tetanische LTP einen mit steigendem Alter zunehmenden Beitrag von VDCCs nachweisen (z.B. Shankar et al. 1998). Begründet liegt dieser Zusammenhang möglicherweise in der bereits erwähnten geringeren neuronalen L-Typ VDCC-Dichte bei jungen Tieren (Thibault & Landfield 1996, Blalock et al. 1999, Campbell et al. 1996). Diese könnte auch für das Fehlen einer VDCC-Komponente in der Altersgruppe von 8-12 Wochen mitverantwortlich gewesen sein. Denn die identischen Versuchsbedingungen bei den älteren und jüngeren Mäusen deuten darauf hin, dass altersbedingte Unterschiede die Hauptursache dafür waren. Dennoch wurde der Ca^{++} -Einstrom auch bei den älteren Tieren von anderen $[Ca^{++}]_i$ -regulierenden Elementen dominiert. Welchen Einfluss dabei in den Versuchsbedingungen gelegene Einflussfaktoren auf den L-Typ VDCC-abhängigen Anteil an den Potenzierungsprozessen hatten, ist bis dato nicht bekannt.

Anschließend sollte der Beitrag von $Ca_v1.2$ -VDCCs zu tetanischer L-LTP untersucht werden. Für die Induktion der LTP wurden dabei zwei verschiedene Protokolle starker Thetaburststimulierung á 100 Hz eingesetzt (s. Kap. 2.3). Wiederholte tetanische Stimulation bei dieser Frequenz wurde in der Literatur mit einem Auftreten von L-LTP assoziiert (Huang & Kandel 1994). Da L-Typ VDCCs für diese laut einer Vielzahl von Studien von essentieller Bedeutung sind (z.B. Grover & Teyler 1994, Impey et al. 1996),

sollte ihr Ausmaß in $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäusen erheblich eingeschränkt sein. In einer ersten Serie von Experimenten wurde daher eine einfache TBS in der Altersgruppe von 20-40 Wochen zwischen den Genotypen verglichen. Dabei wiesen $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäuse nur eine leichte Verringerung der L-LTP auf, die nicht signifikant war. Anschließend wurde eine zweimalige TBS an Kontrollmäusen der Altersgruppe 8-12 Wochen unter L-Typ Ca^{++} -Kanalblockade mittels Isradipin analysiert. Hier zeichnete sich eine etwas deutlichere Reduktion der L-LTP um circa 30% ab, die sich im t-Test jedoch ebenfalls als nicht signifikant erwies. Daraus ist zu schließen, dass diese Bedingungen nicht zu einer ausreichend hohen $\text{Ca}_v1.2$ -abhängigen Potenzierung geführt haben, um einen Unterschied zwischen den Genotypen manifest werden zu lassen. Die Altersdifferenz der Mäuse in den beiden Versuchsreihen hatte hier keinen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis. Es ist jedoch denkbar, dass das gewählte Zeitfenster für den Nachweis einer L-Typ VDCC-Komponente nicht optimal war. Denn es besteht die Möglichkeit, dass diese erst im weiteren Verlauf ein grösseres Ausmaß erreicht hätte. Dafür sprechen Messungen von Jochen Müller (persönliche Kommunikation) welche bei einer Versuchsdauer von 4 Stunden einen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen nachweisen konnten. Letztlich ist auch nicht ganz auszuschließen, dass die TBS-Stimuli zu schwach für eine maximale VDCC-abhängige Potenzierung gewesen sein könnten. Jedoch spricht der Nachweis von 'population spikes' für die zweifache Thetaburststimulierung in der Pyramidenzellschicht dafür, dass zumindest in dieser Messreihe die notwendige Voraussetzung für eine L-Typ Ca^{++} -Kanalaktivierung (s. oben) erfüllt war. Auch die dabei durch Isradipin hervorgerufene deutliche Reduktion der L-LTP zeigt, dass ein, obgleich nicht signifikant hoher, so jedoch immerhin beachtlicher VDCC-Anteil vorhanden war. Ob eine mehrfache Wiederholung der TBS-Sequenzen letzteren unter den gegebenen Bedingungen noch erhöhen kann, sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Zusammengefasst bestätigen unsere Ergebnisse eine maßgebliche Beteiligung von L-Typ VDCCs an der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten TEA-LTP und tetanisch induzierten L-LTP. Sie konnten darüberhinaus erstmals nachweisen, dass diese im wesentlichen auf der spezifischen Funktion des $\text{Ca}_v1.2$ -Isotyps beruht. Trotz des bedeutenden Anteils von $\text{Ca}_v1.2$ -VDCCs überwogen jedoch meist andere Kalziumquellen an der Induktion der Potenzierung. Überdies fehlten bei der Ausprägung von TEA-LTP in der jüngeren Altersgruppe Unterschiede zwischen den beiden Genotypen völlig. Umso überraschender ist daher ihre signifikante Reduktion in der Gruppe der älteren Mäuse im Alter von 20-40

Wochen. Dieser Gegensatz zeigt erstmals eine Altersabhängigkeit des Beitrags von L-Typ Ca^{++} -Kanälen an der durch TEA induzierten LTP, welche auch im Einklang mit Studien steht, die auf eine mit steigendem Alter zunehmende L-Typ VDCC-Dichte in Neuronen der hippocampalen CA1 Region hinweisen (Thibault & Landfield 1996, Blalock et al. 1999).

Unter den molekularen Mechanismen, die die Beteiligung von $\text{Ca}_v1.2$ an diesen beiden LTP-Formen vermitteln, scheinen Kinasen der MAPK/ERK-Kaskade von herausragender Bedeutung zu sein. In Analogie zur Funktion von L-Typ Ca^{++} -Kanälen ist ihre Aktivität ausschlaggebend für die Induktion einer anhaltenden Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB an Ser133, welche eine Voraussetzung für die CRE-abhängige Genexpression darstellt (Kanterewicz et al. 2000, Wu et al. 2001, Moosmang et al. 2005, Dolmetsch et al. 2001).

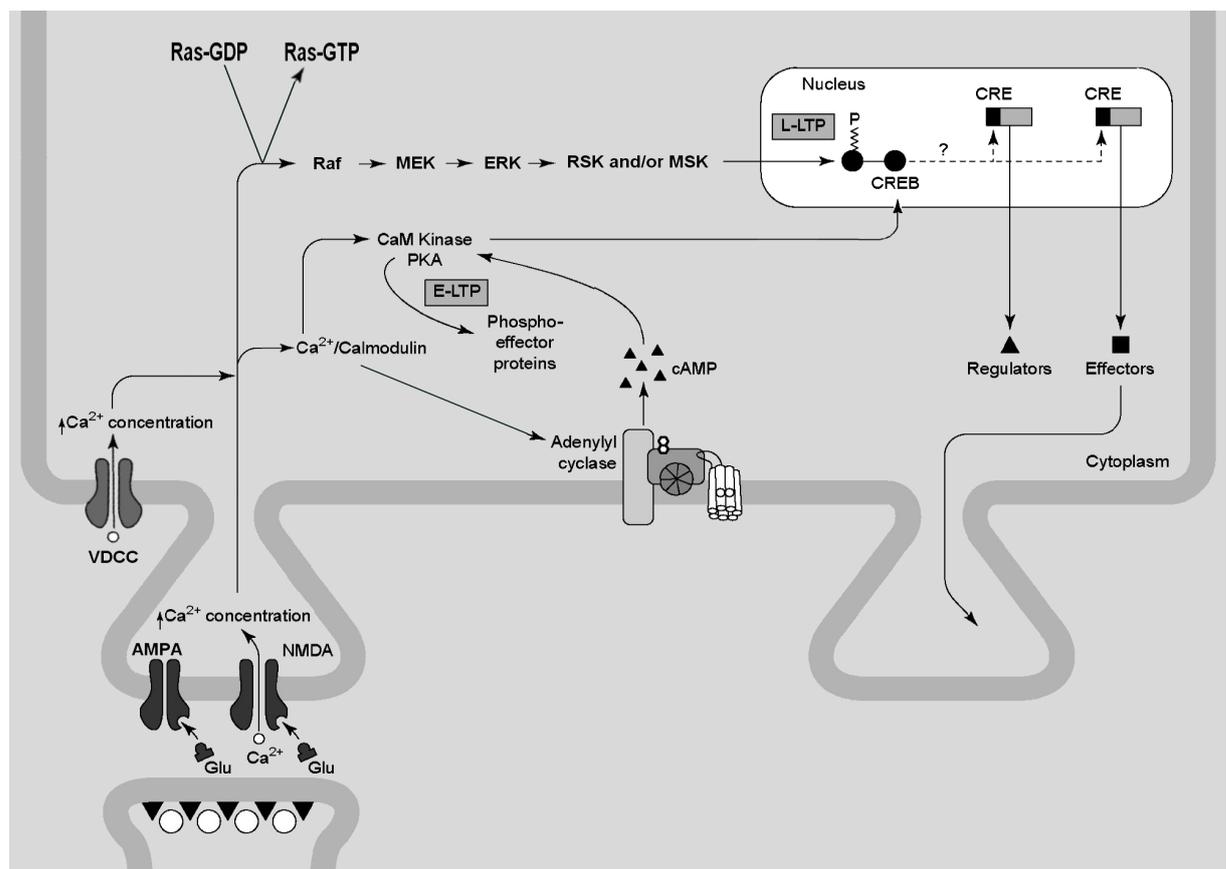


Abbildung 39: Molekulare Mechanismen der LTP-Induktion, modifiziert nach Mayford & Kandel 1999. Die dekrementale LTP (hier als E-LTP bezeichnet) erfordert eine Aktivierung von Proteinkinasen, wie z.B. Ca^{++} /Calmodulin-abhängigen Kinasen, welche bereits existierende Proteine phosphorylieren (s. Kap. 2.3). Die langanhaltende L-LTP erfordert darüberhinaus CRE-gesteuerte Transkription und Translation. In diesem Zusammenhang wurde v.a. den MAPK/ERK-Kinasen eine elementare Rolle für die L-Typ VDCC-abhängige LTP zugewiesen.

Ihr Signaltransduktionsweg wurde wie folgt beschrieben (Thomas & Huganir 2004): Ca^{++} -Einstrom durch L-Typ VDCCs - Anstieg der aktiven, GTP-gebundenen Form des G-Proteins Ras - Aktivierung der Proteinkinase Raf - Phosphorylierung der MAPK/ERK-Kinase (Mek) - Phosphorylierung der Serin-/Threoninkinasen ERK1 und ERK2 ('extracellular signal-regulated kinase') - Phosphorylierung von RSK ('ribosomal protein S6 kinase')- bzw. MSK ('mitogen and stress-activated kinase')-Kinasen - prolongierte Phosphorylierung von CREB an Ser133 - CRE ('cAMP-response-element')-regulierte Gentranskription. Wichtige Gene, die möglicherweise in diesem Zusammenhang exprimiert werden umfassen Transkriptionsfaktoren (z.B. zif 268), neurotrophe Substanzen (z.B. BDNF), strukturelle Proteine, zu denen auch Adhäsionsmoleküle zählen, Proteinkinasen (z.B. trkB oder Proteinkinase M ζ) sowie weitere Enzyme (wie beispielsweise t-PA) (Calabresi et al. 2000, Hernandez et al. 2003, Kingsbury et al. 2007).

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es die funktionelle Rolle des L-Typ $\text{Ca}_v1.2$ Kalziumkanals für die hippocampale, NMDAR-unabhängige LTP erstmals an einer Mauslinie mit einer selektiv auf das Vorderhirn beschränkten Inaktivierung des $\text{Ca}_v1.2$ -Gens ($\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$) zu charakterisieren. Bislang galt diese L-Typ Ca^{++} -Kanalisoform, neben dem Subtyp $\text{Ca}_v1.3$, als die in hippocampalen Pyramidenzellen überwiegend exprimierte (Hell et al. 1993). Ihr spezifischer Beitrag zur synaptischen Plastizität in der hippocampalen CA1 Region entbehrte jedoch jeder näheren Aufklärung. Zu diesem Zweck wurde nach einer Applikation von chemischen bzw. elektrischen Stimulationsprotokollen, die eine Beteiligung von L-Typ VDCCs fördern, die Ausprägung der dadurch induzierten LTP jeweils in Hippocampuschnitten von Kontroll- und $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäusen vergleichend analysiert. Die Geninaktivierung letzterer war vorab mit Hilfe eines Cre/loxP Rekombinationssystems erzielt worden. Sie beschränkte sich im wesentlichen auf sogenannte 'primary neurons', einschließlich Pyramidenzellen, in Hippocampus und Neocortex (s. Schwab et al. 2000). Denn selektiv in jenen wird das Zelldifferenzierungsprotein NEX, in dessen Gen eine Cre-Rekombinase knock-in Sequenz eingefügt wurde, exprimiert (s. Kapitel 2.1).

Die Ausprägung der LTP wurde dabei anhand des Anstiegs der minimalen Steigung von jeweils in der hippocampalen CA1 Region gemessenen fEPSPs zu einem festgelegten Zeitpunkt nach Anwendung des entsprechenden Stimulationsprotokolls ermittelt. Anschließend wurde sie in Relation zu der jeweils zu Beginn gemessenen basalen fEPSP-Steigung (sog. 'Baseline') dargestellt. Währenddessen wurde auch ausgeschlossen, dass $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäuse generelle Defekte in der synaptischen Übertragung aufweisen. Es fanden sich keine Unterschiede zwischen Kontroll- und $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Tieren in den aus allen Experimenten zur LTP gepoolten Kurven der 'Paired Pulse Facilitation' und 'Input-Output-Relation'. Diese beiden Kontrollparameter für die synaptische Aktivität wurden jedes Mal vor LTP-Induktion erhoben.

Zuerst wurde im Rahmen dieser Arbeit die spezifische Funktion des $\text{Ca}_v1.2$ Ca^{++} -Kanals für die durch den K^+ -Kanalblocker TEA induzierte LTP untersucht. Dabei zeigten $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäuse in der Altersgruppe 8-12 Wochen keine Beeinträchtigung im Vergleich zur Kontrolle. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu Studien, die unter L-Typ Ca^{++} -Kanalantagonisten eine vollständige Blockade der TEA-LTP vorfinden und damit den VDCCs eine unikale Rolle für TEA-LTP zuschreiben (Aniksztejn & Ben-Ari

1991, Huang & Malenka 1993). Jedoch führte auch das Dihydropyridin Isradipin (2,5 μM) in Kontrollmäusen dieser Altersgruppe nur zu einer transienten Reduktion der Potenzierung. 75 Minuten nach Auswaschen von TEA war die Ausprägung von LTP in dessen Anwesenheit nur geringfügig, aber nicht signifikant reduziert. Dies bestätigt, dass unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen für diese Altersgruppe nur von einer marginalen L-Typ VDCC-Beteiligung an TEA-LTP ausgegangen werden kann. Ausserdem wird dadurch auch eine grössere VDCC-Komponente durch den geringen, noch erhaltenen L-Typ VDCC-Reststrom in $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäusen ausgeschlossen (s. Kap. 4). Daraus kann man schließen, dass der Beitrag anderer Ca^{2+} -Quellen, wie beispielsweise NMDAR oder intrazelluläre Speicher in dieser Altersgruppe für TEA-LTP im Vordergrund steht. Insbesondere für NMDAR finden sich in der Literatur viele Belege für einen variierenden, jedoch wesentlichen Anteil an TEA-LTP (z.B. Huber et al. 1995, Hanse & Gustafsson 1994).

Im Gegensatz dazu manifestierte sich in Mäusen der Altersgruppe 20-40 Wochen eine signifikante Reduktion der TEA-LTP um circa ein Drittel in der $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Gruppe. Dieses Ergebnis spricht für eine maßgebliche Beteiligung von L-Typ VDCCs in diesem Alter. Es zeigt darüberhinaus erstmals, dass es sich dabei um die spezifische Funktion von $\text{Ca}_v1.2$ -Kanälen handelt und weist nach, dass diese unter den vorliegenden Bedingungen nicht durch $\text{Ca}_v1.3 \text{ Ca}^{++}$ -Kanäle ersetzt werden kann. Im Hinblick auf die jüngeren Tiere bringt dieser Befund ausserdem eine eindruckliche Zunahme der L-Typ VDCC-abhängigen Komponente von TEA-LTP mit in diesem Rahmen fortschreitendem Alter zum Ausdruck. Damit zeigen unsere Ergebnisse erstmals eine deutliche Altersabhängigkeit in der Induktion von TEA-LTP auf. Diese stellt eine Parallele zu der mit steigendem Alter zunehmenden Bedeutung von L-Typ VDCCs für die tetanische LTP dar, die von mehreren Autoren beobachtet wurde (Thibault et al. 2001, Shankar et al. 1998, Campbell et al. 1996). Allgemein bestätigen diese Ergebnisse den postulierten wichtigen Beitrag der $\text{Ca}_v1.2$ -VDCCs für TEA-LTP, deren Ausmaß jedoch vom Alter der Tiere sowie weiteren noch zu erforschenden Einflussfaktoren abhängt.

Anschließend wurde der Beitrag des $\text{Ca}_v1.2 \text{ Ca}^{++}$ -Kanals zur tetanischen L-LTP nach Theta-Burst-Stimulation untersucht. In Mäusen beider Genotypen der Altersgruppe 20-40 Wochen wurde zu diesem Zweck ein einfacher, starker Theta-Burst-Stimulus á 100 Hz appliziert. Dabei fand sich in den $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäusen nach 2 Stunden nur eine leichte Reduktion im Vergleich zur Kontrolle, die nicht signifikant war. Dagegen führte Isradipin in Kontrollmäusen der Altersgruppe 8-12 Wochen zu einer beachtlichen Verringerung der

L-LTP um ca. 30%, welche sich jedoch ebenfalls als nicht signifikant herausstellte. Dabei war ein zweifacher Theta-Burst-Stimulus im Abstand von 15 Minuten eingesetzt worden. Für dieses Stimulationsprotokoll war ein Auftreten von 'population spikes' in der Pyramidenzellschicht erfasst und damit die Induktion einer anhaltenden postsynaptischen Depolarisation nachgewiesen worden (s. Kapitel 2.3 'Zur Erfassung der Daten verwendete Stimulationsprotokolle'). Dennoch lässt sich daraus folgern, dass die vorliegenden Bedingungen nicht zu einer ausreichend hohen Beteiligung der L-Typ VDCCs an L-LTP geführt haben, um einen Unterschied zwischen den Genotypen nachzuweisen. So ist es beispielsweise denkbar, dass das gewählte Zeitfenster nicht optimal für den Nachweis einer VDCC-abhängigen Komponente war und diese erst im weiteren Verlauf der L-LTP ein signifikantes Ausmaß erreicht. Letztlich ist auch nicht ganz auszuschliessen, dass die TBS-Stimulation nicht stark genug für eine maximale VDCC-abhängige Potenzierung war. Jedoch zeigte der Nachweis von 'population spikes' für die zweifache TBS, dass die Voraussetzung der Dauerdepolarisation für die Aktivierung von L-Typ Ca^{++} -Kanälen erfüllt war. Auch die Befunde im Rahmen jenes Stimulationsprotokolls deuten zumindest auf einen beachtenswerten L-Typ VDCC-Anteil an der vorliegenden L-LTP hin, wenn auch andere $[\text{Ca}^{++}]_i$ -regulierende Elemente bei ihrer Expression deutlich überwogen. Schlussfolgernd bestätigen diese Ergebnisse eine maßgebliche Beteiligung von L-Typ VDCCs an der Induktion der analysierten TEA-LTP und tetanischen L-LTP in der hippocampalen CA1 Region. Darüberhinaus konnten sie erstmals nachweisen, dass diese im wesentlichen auf der spezifischen Funktion des $\text{Ca}_v1.2$ -Isotyps beruht. Trotz des bedeutenden Anteils von $\text{Ca}_v1.2$ -VDCCs überwogen jedoch meist andere Kalziumquellen an der Ausprägung der LTP. Überdies fehlten bei der TEA-LTP in der jüngeren Altersgruppe Unterschiede zwischen den beiden Genotypen vollständig. Umso überraschender ist daher ihre erhebliche, signifikante Reduktion in der Gruppe der $\text{Ca}_v1.2^{\text{HCKO}}$ -Mäuse im Alter von 20-40 Wochen. Dieser Gegensatz zeigt erstmals eine Altersabhängigkeit des Beitrags von L-Typ VDCCs an der durch TEA induzierten LTP, welche auch im Einklang mit Studien steht, die auf eine mit steigendem Alter zunehmende L-Typ Ca^{++} -Kanaldichte in Neuronen der hippocampalen CA1 Region hinweisen (Thibault & Landfield 1996, Blalock et al. 1999).

7. Literaturverzeichnis

Aniksztejn, L. and Y. Ben-Ari (1990). "NMDA-independent form of long-term potentiation produced by tetraethylammonium in the hippocampal CA1 region." *Eur J Pharmacol* 181:157-158.

Aniksztejn, L. and Y. Ben-ari (1991). "Novel form of long-term potentiation produced by a K⁺ channel blocker in the hippocampus." *Nature* 349: 67-69.

Barria, A., D. Muller, V. Derkach, L. C. Griffith and T. R. Soderling (1997). "Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation." *Science* 276: 2042-2045.

Bear, M. F. and W. C. Abraham (1996). "Long-term depression in hippocampus." *Annu Rev Neurosci* 19:437-462.

Benke, T. A., A. Lüthi, J. T. Isaac and G. L. Collingridge (1998). "Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity." *Nature* 393: 793-797.

Blair, H. T., G. E. Schafe, E. P. Bauer, S. M. Rodrigues and J. E. LeDoux (2001). "Synaptic plasticity in the lateral amygdala: a cellular hypothesis of fear conditioning." *Learn Mem* 8: 229-242.

Blalock, E. M., N. M. Porter and P. W. Landfield (1999). "Decreased G-protein-mediated regulation and shift in calcium channel types with age in hippocampal cultures." *J Neurosci* 19: 8674-8684.

Bliss, T. V. and G. L. Collingridge (1993). "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus." *Nature* 361: 31-39.

Bliss, T. V. and T. Lømo (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.

Blitzer, R. D., J. H. Connor, G. P. Brown, T. Wong, S. Shenolikar, R. Iyengar and E. M. Landau (1998). "Gating of CaMKII by cAMP-regulated protein phosphatase activity during LTP." *Science* 280: 1940-1942.

Borroni, A. M., H. Fichtenholtz, B. L. Woodside and T. J. Teyler (2000). "Role of voltage-dependent calcium channel long-term potentiation and NMDA LTP in spatial memory." *J Neurosci* 20: 9272-9276.

Bortolotto, Z. A., S. M. Fitzjohn and G. L. Collingridge (1999). "Roles of metabotropic glutamate receptors in LTP and LTD in the hippocampus." *Curr Opin Neurobiol* 9: 299-304.

Bourtchuladze, R., B. Frenguelli, J. Blendy, D. Cioffi, G. Schutz and A. J. Silva (1994). "Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein." *Cell* 79: 59-68.

Calabresi, P., M. Napolitano, D. Centonze, G. A. Marfia, P. Gubellini, M. A. Teule, N. Berretta, G. Bernardi, L. Frati, M. Tolu and A. Gulino (2000). "Tissue plasminogen activator controls multiple forms of synaptic plasticity and memory." *Eur J Neurosci* 12: 1002-1012.

Campbell, L. W., S. Y. Hao, O. Thibault, E. M. Blalock and P. W. Landfield (1996). "Aging changes in voltage-gated calcium currents in hippocampal CA1 neurons." *J Neurosci* 16: 6286-6295.

Catterall, W. A., E. Perez-Reyes, T. P. Snutch and J. Striessnig (2005). "International Union of pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels." *Pharmacol Rev* 57: 411-425.

Cavus, I. and T. Teyler (1996). "Two forms of long-term potentiation in area CA1 activate different signal transduction cascades." *J Neurophysiol* 76: 3038-3047.

Citri, A. and R. C. Malenka (2008). "Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms." *Neuropsychopharmacology* 33: 18-41.

Clark, N. C., N. Nagano, F. M. Kuenzi, W. Jarolimek, I. Huber, D. Walter, G. Wietzorrek, S. Boyce, D. M. Kullmann, J. Striessnig and G. R. Seabrook (2003). "Neurological phenotype and synaptic function in mice lacking the Ca_v1.3 alpha subunit of neuronal L-type voltage dependent Ca⁺⁺ channels." *Neuroscience* 120: 435-442.

Day, M., R. Langston and R. G. Morris (2003). "Glutamate-receptor-mediated encoding and retrieval of paired-associate learning." *Nature* 424: 205-209.

Deisseroth, K., H. Bito and R. W. Tsien (1996). "Signaling from synapse to nucleus: postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity." *Neuron* 16: 89-101.

Deisseroth, K., E. K. Heist and R. W. Tsien (1998). "Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons." *Nature* 392: 198-202.

Derkach, V., A. Barria and T. R. Soderling (1999). " Ca^{++} /calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors." *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 3269-3274.

Dolmetsch, R. E., U. Pajvani, K. Fife, J. M. Spotts and M. E. Greenberg (2001). "Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway." *Science* 294: 333-339.

Ehlers, M. D. (2000). "Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting." *Neuron* 28: 511-525.

Engert, F. and T. Bonhoeffer (1999). "Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity." *Nature* 399: 66-70.

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

Foster, T. C., K. M. Sharrow, J. R. Masse, C. M. Norris and A. Kumar (2001). "Calcineurin links Ca^{++} dysregulation with brain aging." *J Neurosci* 21: 4066-4073.

Gahwiler, B. H. and W. Bauer (1975). "Design of a temperature controlled microchamber for electrophysiological experiments in vitro." *Experientia* 31: 868-869.

Grover, L. M. and T. J. Teyler (1990). "Two components of long-term potentiation induced by different patterns of afferent activation." *Nature* 347: 477-479.

Hanse, E. and B. Gustafsson (1994). "TEA elicits two distinct potentiations of synaptic transmission in the CA1 region of the hippocampal slice." *J Neurosci* 14: 5028-5034.

Hardingham, G. E., F. J. Arnold and H. Bading (2001). "Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity." *Nat Neurosci* 4:261-267.

Hardingham, G. E., F.J. Arnold and H. Bading (2001). "A calcium microdomain near NMDA receptors: on switch for ERK-dependent synapse-to-nucleus communication." *Nat Neurosci* 4: 565-566.

Hardingham, G. E., S. Chawla, F. H. Cruzalegui and H. Bading (1999). "Control of recruitment and transcription-activating function of CBP determines gene regulation by NMDA receptors and L-type calcium channels." *Neuron* 22: 789-798.

Hardingham, G. E., S. Chawla, C. M. Johnson and H. Bading (1997). "Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression." *Nature* 385: 260-265.

Hell, J. W., R. E. Westenbroek, C. Warner, M. K. Ahlijanian, W. Prystay, M.M. Gilbert, T. P. Snutch and W. A. Catterall (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.

Hernandez, A. I., N. Blace, J. F. Crary, P. A. Serrano, M. Leitges, J. M. Libien, G. Weinstein, A. Tcherapanov and T. C. Sacktor (2003). "Protein kinase M ζ synthesis from a brain mRNA encoding an independent protein kinase C ζ catalytic domain." *J Biol Chem* 278: 40305-40316.

Hofmann, F., L. Lacinová and N. Klugbauer (1999). "Voltage-dependent calcium channels: from structure to function." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 139: 33-82.

Hrabetova, S., P. Serrano, N. Blace, H. W. Tse, D. A. Skifter, D. E. Jane, D. T. Monaghan and T. C. Sacktor (2000). "Distinct NMDA receptor subpopulations contribute to long-term potentiation and long-term depression induction." *J Neurosci* 20: RC81 (1-6).

Huang, Y. Y. and E. R. Kandel (1994). "Recruitment of long-lasting and protein kinase A-dependent long-term potentiation in the CA1 region of the hippocampus requires repeated tetanization." *Learn Mem* 1: 74-82.

Huang, Y. Y. and R. C. Malenka (1993). "Examination of TEA-induced synaptic enhancement in area CA1 of the hippocampus: the role of voltage-dependent Ca⁺⁺ channels in the induction of LTP." *J Neurosci* 13: 568-576.

- Huber, K. M., M. D. Mauk and P. T. Kelly (1995). "Distinct LTP induction mechanisms: contribution of NMDA receptors and voltage-dependent calcium channels." *J Neurophysiol* 73: 270-279.
- Impey, S., M. Mark, E. C. Villacres, S. Poser, C. Chavkin and D. R. Storm (1996). "Induction of CRE-mediated gene expression by stimuli that generate long-lasting LTP in area CA1 of the hippocampus." *Neuron* 16: 973-982.
- Jaffe, D. B., D. Johnston, N. Lasser-Ross, J. E. Lisman, H. Miyakawa and W. N. Ross (1992). "The spread of Na⁺ spikes determines the pattern of dendritic Ca⁺⁺ entry into hippocampal neurons." *Nature* 357: 244-246.
- Jouveneau, A., J. M. Billard, U. Haditsch, I. M. Mansuy and P. Dutar (2003). "Different phosphatase-dependent mechanisms mediate long-term depression and depotentiation of long-term potentiation in mouse hippocampal CA1 area." *Eur J Neurosci* 18: 1279-1285.
- Kandel, E. R. (2001). "The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses." *Science* 294: 1030-1038.
- Kandel, E. R., J. H. Schwartz und T. M. Jessel (1996). „Neurowissenschaften. Eine Einführung.“ 1. Auflage Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Kanterewicz, B. I., N. N. Urban, D. B. McMahon, E. D. Norman, L. J. Giffen, M. F. Favata, P. A. Scherle, J. M. Trzaskos, G. Barrionuevo and E. Klann (2000). "The extracellular signal-related kinase cascade is required for NMDA receptor-independent LTP in area CA1 but not area CA3 of the hippocampus." *J Neurosci* 20: 3057-3066.
- Kentros, C., E. Hargreaves, R. D. Hawkins, E. R. Kandel, M. Shapiro and R. V. Muller (1998). "Abolition of long-term stability of new hippocampal place cell maps by NMDA receptor blockade." *Science* 280: 2121-2126.
- Kingsbury, T. J. and B. K. Krueger (2007). "Ca⁺⁺, CREB and krüppel: a novel KLF7-binding element conserved in mouse and human TRKB promoters is required for CREB-dependent transcription." *Mol Cell Neurosci* 35: 447-455.
- Kullmann, D. M. and S. A. Siegelbaum (1995). "The site of expression of NMDA receptor-dependent LTP: new fuel for an old fire." *Neuron* 15: 997-1002.

Kupfermann, I., V. Castellucci, H. Pinsker and E. R. Kandel (1970). "Neuronal correlates of habituation and dishabituation of the gill-withdrawal reflex in aplysia." *Science* 167: 1743-1745.

Leutgeb, S., J. K. Leutgeb, M. B. Moser and E. I. Moser (2005). "Place cells, spatial maps and the population code for memory." *Curr Opin Neurobiol* 15: 738-746.

Linden, D. J. (1999). "The return of the spike: postsynaptic action potentials and the induction of LTP and LTD." *Neuron* 22: 661-666.

Lisman, J. (2003). "Long-term potentiation: outstanding questions and attempted synthesis." *Phil Trans R Soc Lond* 358: 829-842.

Lonze, B. E. and D. D. Ginty (2002). "Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system." *Neuron* 35: 605-623.

Lynch, M. A. (2004). "Long-term potentiation and memory." *Physiol Rev* 84: 87-136.

Lynch, G., J. Larson, S. Kelso, G. Barrionuevo and F. Schottler (1983). "Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation." *Nature* 305:719-721.

Malenka, R. C. (1991). "The role of postsynaptic calcium in the induction of long-term potentiation." *Mol Neurobiol* 5: 289-295.

Malenka, R. C. and M. F. Bear (2004). "LTP and LTD: an embarrassment of riches." *Neuron* 44: 5-21.

Malenka, R. C. and R. A. Nicoll (1999). "Long-term potentiation – a decade of progress?" *Science* 285: 1870-1874.

Malinow, R. and R. C. Malenka (2002). "AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity." *Annu Rev Neurosci* 25: 103-126.

Malleret, G., U. Haditsch, D. Genoux, M. W. Jones, T. V. P. Bliss, A. M. Vanhose, C. Weitlauf, E. R. Kandel, D. G. Winder and I. M. Mansuy (2001). "Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin." *Cell* 104: 675-686.

Matynia, A., S. A. Kushner and A. J. Silva (2002). "Genetic approaches to molecular and cellular cognition: a focus on LTP and learning and memory." *Annu Rev Genet* 36: 687-720.

Mayford, M. and E. R. Kandel (1999). "Genetic approaches to memory storage." *Trends Genet* 15: 463-470.

Mermelstein, P. G., H. Bitó, K. Deisseroth and R. W. Tsien (2000). "Critical dependence of cAMP response element-binding protein phosphorylation on L-type calcium channels supports a selective response to EPSPs in preference to action potentials." *J Neurosci* 20: 266-273.

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

Mishkin, M. and T. Appenzeller (1987). "The anatomy of memory." *Sci Am* 256: 80-89.

Morgan, S. L. and T. J. Teyler (1999). "VDCCs and NMDARs underlie two forms of LTP in CA1 hippocampus in vivo." *J Neurophysiol* 82: 736-740.

Morgan, S. L. and T. J. Teyler (2001). "Electrical stimuli patterned after the theta-rhythm induce multiple forms of LTP." *J Neurophysiol* 86: 1289-1296.

Morris, R. G. (2003). "Long-term potentiation and memory." *Phil Trans R Soc Lond* 358: 643-647.

Morris, R. G. (1989). "Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5." *J Neurosci* 9: 3040-3057.

Morris, R. G., P. Garrud, J. N. Rawlins and J. O'Keefe (1982). "Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions." *Nature* 297: 681-683.

Morris, R. G., E. Anderson, G. S. Lynch and M. Baudry (1986). "Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5." *Nature* 319: 774-776.

- Mulkey, R. M., S. Endo, S. Shenolikar and R. C. Malenka (1994). "Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression." *Nature* 369: 486-488.
- Mulkey, R. M., C. E. Herron and R. C. Malenka (1993). "An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression." *Science* 261: 1051-1055.
- Mulkey, R. M. and R. C. Malenka (1992). "Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus." *Neuron* 9: 967-975.
- Murphy, T. H., P. F. Worley and J. M. Baraban (1991). "L-type voltage-sensitive calcium channels mediate synaptic activation of immediate early genes." *Neuron* 7: 625-635.
- Nicoll, R. A. and R. C. Malenka (1999). "Expression mechanisms underlying NMDA receptor-dependent long-term potentiation." *Ann N Y Acad Sci* 868: 515-525.
- O'Keefe, J. and J. Dostrovsky (1971). "The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely moving rat." *Brain Res* 34: 171-175.
- Platzer, J., J. Engel, A. Schrott-Fischer, K. Stephan, S. Bova, H. Chen, H. Zheng and J. Striessnig (2000). "Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca⁺⁺ channels." *Cell* 102: 89-97.
- Raymond, C. R. and S. J. Redman (2002). "Different calcium sources are narrowly tuned to the induction of different forms of LTP." *J Neurophysiol* 88: 249-255.
- Raymond, C. R. and S. J. Redman (2006). "Spatial segregation of neuronal calcium signals encodes different forms of LTP in rat hippocampus." *J Physiol* 570: 97-111.
- Schmidt, R. and H. G. Schaible (2002). "Neuro- und Sinnesphysiologie." Springer-Lehrbuch Verlag.
- Schwab, M. H., A. Bartholomae, B. Heimrich, D. Feldmeyer, S. Druffel-Augustin, S. Goebbels, F. J. Naya, S. Zhao, M. Frotscher, M. J. Tsai and K. A. Nave (2000). "Neuronal basic helix-loop-helix proteins (NEX and BETA2/Neuro D) regulate terminal granule cell differentiation in the hippocampus." *J Neurosci* 20: 3714-3724.

Scoville, W. B. and B. Milner (2000). "Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. 1957." *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 12: 103-113.

Shankar, S., T. J. Teyler and N. Robbins (1998). "Aging differentially alters forms of long-term potentiation in rat hippocampal area CA1." *J Neurophysiol* 79: 334-341.

Shinoda, Y., Y. Kamikubo, Y. Egashira, K. Tominaga-Yoshino and A. Ogura (2005). "Repetition of mGluR-dependent LTD causes slowly developing persistent reduction in synaptic strength accompanied by synapse elimination." *Brain Res* 1042: 99-107.

Song, D., X. Xie, Z. Wang and T. W. Berger (2001). "Differential effect of TEA on long-term synaptic modification in hippocampal CA1 and dentate gyrus in vitro." *Neurobiol Learn Mem* 76: 375-387.

Specht, V. (2000). Genetische Modifikation des $\alpha 1C$ L-Typ Kalziumkanals der Maus mit Hilfe des Cre/loxP Rekombinationssystems. München, Dissertation für die Fakultät für Chemie der Technischen Universität München.

Squire, L. R. and S. Zola-Morgan (1991). "The medial temporal lobe memory system." *Science* 253: 1380-1386.

Stevens, C. F., S. Tonegawa and Y. Wang (1994). "The role of calcium-calmodulin kinase II in three forms of synaptic plasticity." *Curr Biol* 4: 687-693.

Stevens, C. F. and Y. Wang (1994). "Changes in reliability of synaptic function as a mechanism for plasticity." *Nature* 371: 704-707.

Takagi, H. (2000). "Roles of ion channels in EPSP integration at neuronal dendrites." *Neurosci Res* 37: 167-171.

Thews, G., E. Mutschler and P. Vaupel (1999). "Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen." 5. Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.

Thibault, O., R. Hadley and P. W. Landfield (2001). "Elevated postsynaptic $[Ca^{++}]_i$ and L-type calcium channel activity in aged hippocampal neurons: relationship to impaired synaptic plasticity." *J Neurosci* 21: 9744-9756.

Thibault, O. and P. W. Landfield (1996). "Increase in single L-type calcium channels in hippocampal neurons during aging." *Science* 272: 1017-1020.

Thomas, G. M. and R. L. Huganir (2004). "MAPK cascade signalling and synaptic plasticity." *Nat Rev Neurosci* 5: 173-183.

Waldeyer, A. und A. Mayet (1993). „Anatomie des Menschen“. 16. Auflage Berlin, New York: Walter de Gruyter.

West, A. E., W. G. Chen, M. B. Dalva, R. E. Dolmetsch, J. M. Kornhauser, A. J. Shaywitz, M. A. Takasu, X. Tao and M. E. Greenberg (2001). "Calcium regulation of neuronal gene expression." *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 11024-11031.

Westenbroek, R. E., M. K. Ahljianian and W. A. Catterall (1990). "Clustering of L-type Ca^{++} channels at the base of major dendrites in hippocampal pyramidal neurons." *Nature* 347: 281-284.

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

Wu, G. Y., K. Deisseroth and R. W. Tsien (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 USA* 98: 2808-2813.

Zakharenko, S. S., L. Zablow and S. A. Siegelbaum (2001). "Visualization of changes in presynaptic function during long-term synaptic plasticity." *Nat Neurosci* 4: 711-717.

Zola-Morgan, S. and L. R. Squire (1993). "Neuroanatomy of memory." *Annu Rev Neurosci* 16: 547-563.

Zola-Morgan, S., L. R. Squire and D. G. Amaral (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.

8. Dankvermerk

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn apl. Prof. Thomas Kleppisch, der die praktische Durchführung der Experimente und das Schreiben mit kontinuierlicher Unterstützung betreute, bedanken. Seine Hilfsbereitschaft und Geduld gingen dabei weit über den üblichen Rahmen hinaus.

Ausserdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Franz Hofmann, der mir damals die Möglichkeit gab, an seinem Institut eine Doktorarbeit zu schreiben, bedanken.

Auch meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen für ihre Hilfe.

9. Erklärung

Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

Die Rolle des L-Typ Kalziumkanals $Ca_v1.2$ für die hippocampale Langzeitpotenzierung

im Institut für Pharmakologie und Toxikologie

unter der Anleitung und Betreuung durch Herrn apl. Prof. Thomas Kleppisch ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

- (x) Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.
- () Die vollständige Dissertation wurde in veröffentlicht. Die Fakultät für hat der Vorveröffentlichung zugestimmt.
- (x) Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.
- () Ich habe bereits am bei der Fakultät für der Hochschule unter Vorlage einer Dissertation mit dem Thema die Zulassung zur Promotion beantragt mit dem Ergebnis:

Die Promotionsordnung der Technischen Universität München ist mir bekannt.

Göttingen, den 14.02.09

Sabine Kurzeder