

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Humanbiologie

Genetische Analyse der Bedeutung von $Ca_v1.2$ Kalziumkanälen für
synaptische Plastizität und Angstlernen im Mausmodell

Carl Johannes Christel

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigte Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. J. Bauer

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. M. Schemann

2. Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann

Die Dissertation wurde am 24.09.2008 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 26.11.2008 angenommen.

INHALT

1. EINLEITUNG	5
1.1. Homöostatische Plastizität und Hebbsches Prinzip	5
1.1.1. Transmembranäre Kalziumströme als mögliche Signalgeber homöostatischer Plastizität	6
1.1.2. Plastizität und Metaplastizität neuronaler Verbindungen	8
1.2. Mechanismen der Angstkonditionierung	11
1.2.1. Anatomie der Amygdala	11
1.2.2. Quantifizierung LA-abhängigen Lernens durch auditorische Angstkonditionierung	12
1.2.3. L-Typ Kalziumkanal abhängiges LTP im Hippokampus	13
1.2.4. L-Typ Kalziumkanäle und LTP in der LA.....	14
1.3. Gewebsexpression und Funktionen des L- Typ Kalziumkanals Ca_v1.2	15
1.3.1. Gewebsverteilung	15
1.3.2. Pharmakologische Beeinflussung von Ca _v 1.2.....	15
1.3.3. Knockout des für Ca _v 1.2-codierenden Gens in Mäusen	16
1.3.3.1. Totaler Knockout (Nullmutante) von CACNA1C	17
1.3.3.2. Konditionaler CACNA1C Knockout	17
1.4. Zielsetzung der Arbeit	20
2. MATERIAL UND METHODEN	21
2.1. Versuchstiere	21
2.1.1. Zucht der Nestin-Cre Mauslinie	21
2.1.1.1. CACNA1C Mäuse.....	21
2.1.1.2. Nestin-Cre Mäuse.....	22
2.1.2. Zuchtschemata.....	22
2.2. Elektrophysiologische Methoden	23
2.2.1. Vorbereitung der Messpipetten	23
2.2.2. Präparation koronarer Gehirnschnitte	23
2.2.3. Perfusion und Fixation der Präparate in der Messapparatur	24

2.2.4. Verstärker und Software.....	24
2.2.5. Elektrophysiologische Grundcharakterisierung pyramidaler Neurone in der LA.....	24
2.2.5.1. Lösungen und Pharmaka	25
2.2.5.2. Messprotokoll.....	25
2.2.6. Messung von I_{Ba} in pyramidalen Neuronen der LA.....	25
2.2.6.1. Lösungen und Pharmaka	25
2.2.6.2. Messprotokoll.....	26
2.2.7. LTP Induktion in der LA.....	26
2.2.7.1. Lösungen und Pharmaka	26
2.2.7.2. Induktion von EPSPs in pyramidalen Neuronen der LA	26
2.2.7.3. Verwendung eines Tetanus Protokolls.....	27
2.2.8. Messung der durch AMPAR-vermittelten postsynaptischen Ströme in Neuronen der LA.....	28
2.2.8.1. Lösungen und Pharmaka	29
2.2.8.2. Einstellung der präsynaptischen Stimulation zur Auslösung von EPSCs in pyramidalen Neuronen der LA.....	29
2.2.8.3. Messprotokoll.....	29
2.3. Ethologische Methoden.....	30
2.3.1. Intracerebroventrikuläre (ICV) Injektion.....	30
2.3.2. Auditorischer Angstlernversuch.....	30
2.4. Molekularbiologische Methoden.....	32
2.4.1. Genotypisierung der Mauslinien	32
2.4.1.1. Isolation genomischer DNA.....	32
2.4.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	32
2.5. Proteinbiochemische Methoden	33
2.5.1. Proteintrennung und –detektion	33
2.5.1.1. Probengewinnung.....	34
2.5.1.2. Bestimmung der Proteinkonzentration.....	34
2.5.1.3. Gelelektrophorese.....	35
2.5.1.4. Elektrophoretogramm.....	36
2.5.1.5. Western Blot (Immundetektion).....	37
2.6. Histologische Methoden	39

2.6.1. Anfertigung von Gefrierschnitten	39
2.6.2. Golgi-Cox Färbung	39
2.6.3. Scholl Analyse, Bestimmung der Dendritenordnung und Anzahl der Spines	39
2.6.4 <i>In-situ</i> Hybridisierung von Ca _v 1.2 und Ca _v 1.3 mRNA	40
2.6.4.1 Herstellung der RNA-Sonden	42
2.6.4.2 Standardprotokoll für die in-situ Hybridisierung	43
2.7. Statistik.....	44
3. ERGEBNISSE	45
3.1. Die Induktion Hebbscher LTP an thalamo-amydalären Synapsen hängt von L-Typ Kalziumkanälen ab	45
3.1.1. Grundcharakterisierung pyramidalen Neurone der LA	45
3.1.2. LTP Induktion mit einem Tetanus-Protokoll	47
3.2. Nachweis des gehirnspezifischen CACNA1C-Knockout	48
3.2.1. Histologische und Immunologische Untersuchung der Ca _v 1.2 ^{NesCre} Tiere	48
3.2.2. Elektrophysiologischer Nachweis des <i>CACNA1C</i> Knockout in pyramidalen Neuronen der LA.....	51
3.3. Akute Hemmung von Ca_v1.2 Kalziumkanälen unterdrückt auditorische Angstkonditionierung, chronische Deletion nicht	52
3.4. Homöostatischer Ausgleich des Verlustes von Ca_v1.2 durch DHP insensitive Formen Hebbscher Plastizität	54
3.5. Der Verlust von Ca_v1.2 führt in thalamo-amydalären Synapsen zu einer metaplastischen Umformung Hebbscher LTP in ein von AMPAR abhängiges System .	56
3.4.Hochregulation von GluR1 in der LA der Ca_v1.2^{NesCre} Tiere	58
3.4.1. Nachweis erhöhter Expression von GluR1 Untereinheiten in der LA der Ca _v 1.2 ^{NesCre} Tiere	58
3.4.2. Elektrophysiologischer Nachweis der verstärkten Expression von GluR1 monomeren in pyramidalen Neuronen der LA.....	59

4. DISKUSSION	62
4.1. Die chronische Inaktivierung des Ca_v1.2 Kalziumkanals leitet in pyramidalen Neuronen der LA einen metaplastischen Prozess ein, welcher zur Ausbildung Hebbischer Plastizität in Abhängigkeit Kalzium permeabler AMPAR führt	62
4.2. Akute pharmakologische Inhibition von Ca_v1.2 unterdrückt Hebbische Plastizität der thalamo-amygdalären Synapse sowie assoziatives Lernen in der auditorischen Angstkonditionierung	65
4.3. Ausblick.....	69
5. SYNOPSIS	71
6. ANHANG.....	73
6.1. Für die Genotypisierung verwendete Oligonukleotide	73
6.2. Oligonukleotidsequenzen.....	73
6.3. Primäre Antikörper	73
6.4. Sekundäre Antikörper	73
7. ABKÜRZUNGEN	73
8. LITERATURVERZEICHNIS	75

1. Einleitung

1.1. Homöostatische Plastizität und Hebbsches Prinzip

Im Laufe der letzten Jahre wurde klar, dass homöostatische Plastizität zusätzlich zu den besser charakterisierten, nach dem Hebbschem Prinzip funktionierenden plastischen Effekten (z.B. *long-term potentiation*, LTP oder *long-term depression*, LTD) in der aktivitätsabhängigen Regulierung synaptischer Transmission von entscheidender Bedeutung ist (Davis and Bezprozvanny, 2001; Turrigiano, 2007).

Durch kompensatorische Rückkopplungsmechanismen (*feedback*) wirken plastisch-homöostatische Effekte stabilisierend auf die Regelgröße (den *Output*) eines Neurons oder neurologischer Schaltkreise in Antwort auf die Erregbarkeit der Zelle beeinflussende Störungen, und können so die ursprüngliche Führungsgröße (*set point*) des System wiederherstellen (Davis and Bezprozvanny, 2001).

Das Musterbeispiel für die homöostatische Regulation neuronaler Aktivität im Zentralnervensystem (ZNS) ist der kompensatorisch gesteigerte Einbau postsynaptischer Rezeptoren als Antwort auf chronische Inaktivität in neuronalen Zellkulturen, ein Effekt, der als *quantal scaling* bezeichnet wird (Turrigiano, 2007). Solche homöostatische Regulation zellulärer Aktivität konnte bereits experimentell in zentralnervösen Systemen von Vertebraten (Desai et al., 1999; Brickley et al., 2001; Marder and Prinz, 2003; Misonou et al., 2004) sowie Invertebraten (Sandrock et al., 1997; Davis and Bezprozvanny, 2001) experimentell nachgewiesen werden.

Die Grundvoraussetzung für die Aktivierung und Steuerung homöostatischer Signalwege ist die Wahrnehmung und Bewertung der Aktivität des beteiligten Neurons (z.B. der Frequenz von Aktionspotentialen) sowie deren Integration über die Zeit. Des weiteren müssen homeostatisch regulierte Neuronen berechnete Aktivitätszustände mit einer vorgegebenen Führungsgröße in Relation setzen können und über zeitlich sinnvoll greifende regulatorische Mechanismen verfügen, welche die Differenz von Soll- und Ist-Wert minimieren (Davis and Bezprozvanny, 2001). Dabei stellt sich die Frage, wie ein Neuron Aktivitätszustände wahrnehmen und diese Information in ein Rückkopplungssignal umwandeln kann. Bis dato gibt es nur wenige Hinweise auf mögliche Mechanismen, die der homöostatischen Plastizität zugrunde liegen könnten, und es ist nicht geklärt, ob Neuronen des Vertebraten-ZNS *in vivo* dazu in der Lage sind, den Verlust wichtiger integraler Komponenten elektrischer Aktivität durch kompensatorische Effekte auszugleichen.

1.1.1. Transmembranäre Kalziumströme als mögliche Signalgeber homöostatischer Plastizität

Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration liegen einer Vielzahl physiologischer Prozesse zu Grunde (Berridge, 2004). Sie bewirken unter anderem die elektromechanische Kopplung bei der Muskelkontraktion, führen zu Synthese und Sekretion von Neurotransmittern und Hormonen, regulieren die Expression von Genen und steuern eine Vielzahl von Enzymaktivitäten. Ein wesentlicher Teil des Kalziumeinstroms in Neuronen erfolgt über spannungsabhängige Kalziumkanäle, deren Öffnungsstimulus die Depolarisation der Zellmembran ist. Spannungsabhängige Kalziumkanäle in der Plasmamembran ermöglichen einen feinkontrollierten Einstrom von Kalziumionen in die Zelle und sind daher wesentlich an der Kontrolle der intrazellulären Kalziumkonzentration beteiligt.

Es ist bekannt, dass intrazelluläre Kalziumsignale die essentielle Komponente bei der Induktion Hebbscher LTP darstellen (Nicoll and Malenka, 1995; Chittajallu et al., 1998).

Aufgrund der hohen Sensibilität der Aktivität von Neuronen auf intrazelluläre Kalziumsignale und der feinen Regulierbarkeit des Kalziumeinstromes über spannungsabhängige Kalziumkanäle wäre es durchaus denkbar, dass Kalzium auch für die homöostatische Kontrolle neuronaler Aktivität eine entscheidende Rolle spielt (Davis and Bezprozvanny, 2001; Goldberg and Yuste, 2005).

Die Kernfragen bei der Charakterisierung einer potentiellen Rolle von Kalzium bei der homöostatischen Plastizität sind: a) die Quelle des intrazellulären Kalziums, welches zu homöostatischen Prozessen im Neuron beiträgt, und b) ob die Signalwege homöostatischer Plastizität und Hebbsche Plastizität getrennt sind oder überlappen. Die für Homöostase nötigen Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration könnten über verschiedene Mechanismen reguliert werden. Zum Beispiel könnte hier der Kalziumeinstrom durch NMDA-Rezeptoren (Sutton et al., 2006) oder verschiedene präsynaptische Kalziumkanäle (Piedras-Renteria et al., 2004; Frank et al., 2006) eine Rolle spielen. Neuere Studien weisen darauf hin, dass postsynaptische, spannungsgesteuerte L-Typ Kalziumkanäle ($Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$) an der homöostatischen Anpassung an neuronale Inaktivität beteiligt sind (Thiagarajan et al., 2005; Thiagarajan et al., 2007). Hier wurde gezeigt, dass die Hemmung

neuronaler Aktivität in Kulturen hippocampaler Neuronen eine verstärkte Expression von AMPA Rezeptor (AMPA) GluR1 Monomeren als homöostatische Gegenregulation auslöst. Interessanterweise konnte dieser Effekt der homöostatischen Regulation des postsynaptischen Neurons durch die Anwendung spezifischer L-Typ Kalziumkanal-Antagonisten imitiert werden. Da allerdings neuronale Verschaltungen und Aktivitätslevel innerhalb künstlicher Neuronenkulturen nicht zwingend physiologische Eigenschaften widerspiegeln, lassen sich anhand dieser *in vitro* gewonnenen Daten nur Näherungen über die *in vivo* herrschenden Verhältnisse machen.

In einer anderen Studie konnte durch kombinierte Untersuchungen *in vivo* und *in vitro* demonstriert werden, dass die genetische Deletion (Knockout) von $Ca_v1.3$ Kanälen, welche als essentiell wichtig für die Rythmizität dopaminergener Neuronen der *substantia nigra* gelten, zu metaplastischen Veränderungen führt, welche den Verlust von $Ca_v1.3$ ausgleichen können. Dabei schaltet der Mechanismus der Rhythmusgeneration auf ein von HCN Kanälen abhängiges System um (Chan et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Rolle von $Ca_v1.2$ für das Zusammenspiel von Hebbischer synaptischer Plastizität und homöostatischer Metaplastizität innerhalb der lateralen Amygdala (LA) auf elektrophysiologischer Basis *in vitro* untersucht und anschliessend auf verhaltensbiologischer Ebene mittels klassischer Konditionierung (auditory fear conditioning) überprüft werden.

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass

- (I) die akute pharmakologische Inhibierung von $Ca_v1.2$ L-Typ Kalziumkanälen zu einer Auslöschung thalamo-amygdalär induzierter LTP sowie zur Beeinträchtigung angstmotivierter, auditorischer Lernleistung im Verhaltensversuch führt, und,
- (II) chronische Elimination von $Ca_v1.2$ zu metaplastischen Veränderungen der LTP innerhalb der LA führt. Diese schaltet von einer $Ca_v1.2$ kontrollierten, und damit DHP sensitiven Form in eine von DHP unbeeinflussbare, AMPAR determinierte Form. Durch diese metaplastische Transformation der Mechanismen der LTP bleibt die Lernleistung im Angstlernversuch trotz des genetischen Verlustes von $Ca_v1.2$ erhalten.

1.1.2. Plastizität und Metaplastizität neuronaler Verbindungen

Die der LTP zugrundeliegenden Mechanismen stehen seit vielen Jahren im Fokus neurowissenschaftlicher Forschung (Bliss and Lomo, 1973; Brown et al., 1988). Man versteht unter LTP eine dauerhafte Verstärkung der Aktivität einer Synapse durch Modifikation entweder der postsynaptischen Antwort auf präsynaptische Reize oder durch Veränderung der präsynaptischen Transmitterausschüttung (Bliss and Collingridge, 1993; Roberts and Glanzman, 2003). Schon 1949 postulierte D.O. Hebb: „Wenn ein Axon der Zelle A [...] Zelle B erregt und wiederholt und dauerhaft zur Erzeugung von Aktionspotenzialen in Zelle B beiträgt, so resultiert dies in Wachstumsprozessen oder metabolischen Veränderungen in einer oder in beiden Zellen, die bewirken, dass die Effizienz von Zelle A in Bezug auf die Erzeugung eines Aktionspotenzials in B größer wird.“

LTP als Form von Hebbscher Plastizität ist eine elektrophysiologisch und biochemisch gut zu untersuchende Erklärung assoziativer Informationsverarbeitung innerhalb neuronaler Systeme. LTP ist ein vielschichtiger Prozess, dem in verschiedenen Bereichen des ZNS und auch der Peripherie verschiedenste Mechanismen zu Grunde liegen (Clugnet and LeDoux, 1990; Rogan and LeDoux, 1995; Rotenberg et al., 1996; Nguyen and Kandel, 1997; Son et al., 1998; Lu et al., 1999; Winder et al., 1999; Yaniv et al., 2000).

Allerdings können durch das Prinzip der Hebbschen Plastizität nicht alle Formen assoziativ neuronaler Informationsverarbeitung erklärt werden. Ein, wie das Hebbsche Prinzip, allein auf Korrelation von prä- und postsynaptischer Aktivität basierendes Assoziationsprinzip wäre nicht in der Lage die weitgreifenden morphologischen und elektrischen Veränderungen, die mit assoziativen Lernprozessen einhergehen, zu erklären. So würde, zum Beispiel, ohne weitere regulierende Prozesse die durch LTP induzierte, verstärkte Reizbarkeit der Postsynapse nicht nur die synaptische Informationsübertragung, sondern auch weitere LTP-Ereignisse innerhalb dieser Synapse begünstigen. Diese positive Rückkopplung hätte eine ständige Steigerung der Aktivität des postsynaptischen Neurons zur Folge (Turrigiano and Nelson, 2000).

Ausserdem besitzen Neuronen des ZNS immer mehr als nur eine synaptische Verbindung. Die erhöhte Reizbarkeit des Neurons durch sich selbst verstärkende LTP würde zu einer globalen Stärkung anderer, ursprünglich schwacher synaptischer Verbindung innerhalb des Neurons führen. Die Ausbreitung der zunächst lokal

begrenzten Rückkopplung im ganzen Systems würde zur Induktion unspezifischer LTP innerhalb dieser schwachen Synapsen führen, und letztendlich käme es auch hier zu einer verstärkenden Rückkopplung des ursprünglichen Signals. Ohne weitere Kontrollmechanismen würde das Neuron demnach völlig überstimuliert, was auf Dauer einen vollständigen Informationsverlust innerhalb der Zellverbindung zur Folge hätte.

Analog dazu könnte eine unkontrollierte Ausbreitung von LTD innerhalb eines neuronalen Netzwerks auf Dauer zu einem völlige Aktivitätsverlust dieses Systems führen, da sich hemmende Effekte gegenseitig verstärken würden. Damit das Aktivitätsniveau innerhalb eines Neurons in physiologisch sinnvollen Bahnen verlaufen kann, benötigen Neuronen also die Fähigkeit, ihr Aktivitätsniveau homöostatisch zu kontrollieren.

Ende der 90er Jahre wurde erstmals versucht, experimentell homöostatische Regulationsmechanismen des Aktivitätsniveaus innerhalb hippokampaler Neuronenkulturen (Turrigiano et al., 1998) nachzuweisen. Es konnte gezeigt werden, dass Synapsen innerhalb dieser Neuronenkulturen auf längere Inaktivitätsperioden (ausgelöst durch Zugabe von Tetrodotoxin, TTX, einem Natriumkanal-Antagonisten der synaptische Aktivität inhibiert) mit einer Verstärkung der Amplitude ihrer erregenden postsynaptischen Miniatur-Ströme (*miniature excitatory postsynaptic currents*, mEPSC) reagieren, also mit einer Steigerung ihrer generellen Erregbarkeit (Abbildung 1). Dies geschah ohne Änderung der präsynaptischen Transmitterfreisetzung und ohne Veränderung der Synapsenzahl. Statt dessen lag der Erhöhung der mEPSC-Amplitude eine verstärkte Expression von AMPAR in der postsynaptischen Membran zugrunde. Solche Prozesse, welche durch Regulation der Expression membranständiger Ionenkanäle stabilisierend auf die Feuerrate von Neuronen einwirken, werden als *quantal* oder *synaptic scaling* bezeichnet. Diese homöostatischen Prozesse können der drohenden Aktivitätssättigung durch sich selbst verstärkende LTP Phänomene oder aber analog, dem kompletten Verlust neuronaler Aktivität durch positiv gekoppeltes LTD, entgegenwirken.

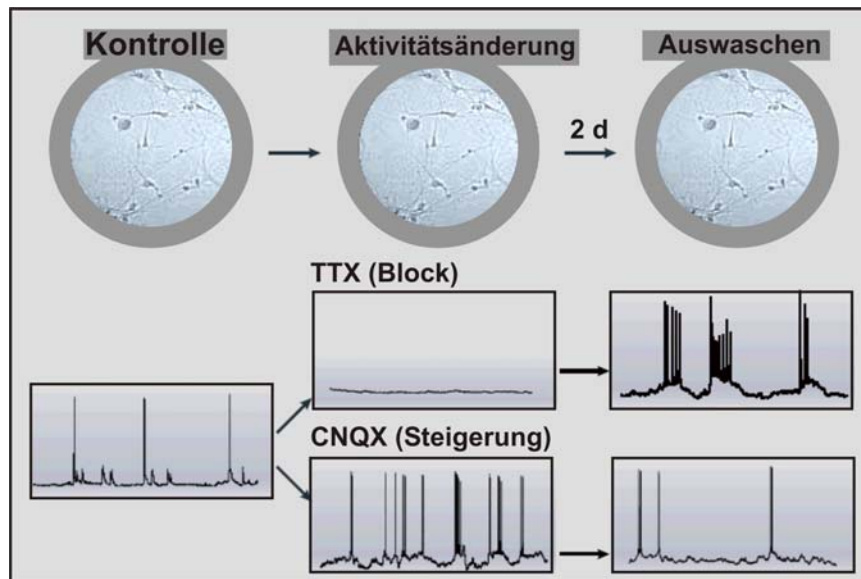


Abbildung 1: Homöostatische Plastizität

Neuronen in Kultur weisen unter Kontrollbedingungen einen basalen Aktivitätszustand auf (Kontrolle). Durch pharmakologische Behandlung lässt sich diese Grundaktivität beeinflussen. Mittels TTX wird die Aktivität inhibiert, durch die Verwendung des AMPAR Agonisten CNQX erhöht. Verändert man den Aktivitätszustand der Neuronenkultur über 2 Tage, so zeigt sich nach Auswaschen des Agonisten bzw. Antagonisten, dass die basale Aktivität des Neurons verändert ist. Wurde synaptische Aktivität geblockt, so ist die basale Aktivität nun höher als unter unbeeinflussten Kontrollbedingungen. Wurde die Aktivität gesteigert, so sinkt die basale Aktivität unter die der Kontrollgruppe (Turrigiano und Nelson 2000).

Synaptic scaling stellt nicht die einzige Möglichkeit der homöostatischen Kontrolle LTP induzierter Veränderungen dar. Schon 1996 etablierten Abraham und Bear (Abraham and Bear, 1996) eine weitere Spielart neuronaler Plastizität. Im Versuch reizten sie Populationen von hippokampalen Neuronen der CA1 Region mit mehreren aufeinanderfolgenden, kurzen Stimuli (30 Hz, 150 ms), 30 Minuten bevor Sie diese mittels eines etablierten LTP Induktionsprotokolls stimulierten. Anders als Kontrollzellen waren die vorstimulierten Neuronen nicht in der Lage, LTP auszulösen. Während des Versuchs änderte sich die Grunderregbarkeit der Zellen nicht. Die Änderung der „Grundregeln“ für LTP Induktion, welche sich nicht auf die basale Aktivität der Zellen auswirkt, sondern auf den Mechanismus plastischer Effekte selbst (eine „Plastizität plastischer Effekte“ also) nannten sie, dementsprechend, Metaplastizität. Mittlerweile konnten mehrere Belege für metaplastische Effekte gefunden werden (Frey and Morris, 1998; Schweighofer and Arbib, 1998; Moody et al., 1999; Bortolotto and Collingridge, 2000; Goussakov et al., 2000). Über metaplastische Mechanismen erhält das postsynaptische Neuron einen größeren Spielraum bei der Regulation plastischer Informationsverarbeitung, der über die einfachen bidirektionalen Möglichkeiten des synaptic scaling hinausgeht.

1.2. Mechanismen der Angstkonditionierung

1.2.1. Anatomie der Amygdala

Eine der bedeutsamsten Hirnstrukturen für auditorische Angstkonditionierung und das Angst-Gedächtnis ist der sogenannte Mandelkern (*Corpus amygdaloideum*; kurz: die Amygdala), ein Komplex aus ungefähr 12 Einzelkernen, der tief im Temporallappen liegt und dem limbischen System zugeordnet wird. Die Amygdala ist das Zentrum für emotionales Lernen und vor allem für die Bildung und Speicherung des Angst-Gedächtnisses verantwortlich (Maren and Fanselow, 1996; LeDoux, 1998). Afferente sensorische Reize aus Thalamus und Cortex projizieren weitestgehend in die LA, welche als zentrale Schaltstelle weitere Verbindungen in alle anderen Bereiche der Amygdala schafft (LeDoux, 2000) (Abbildung 2).

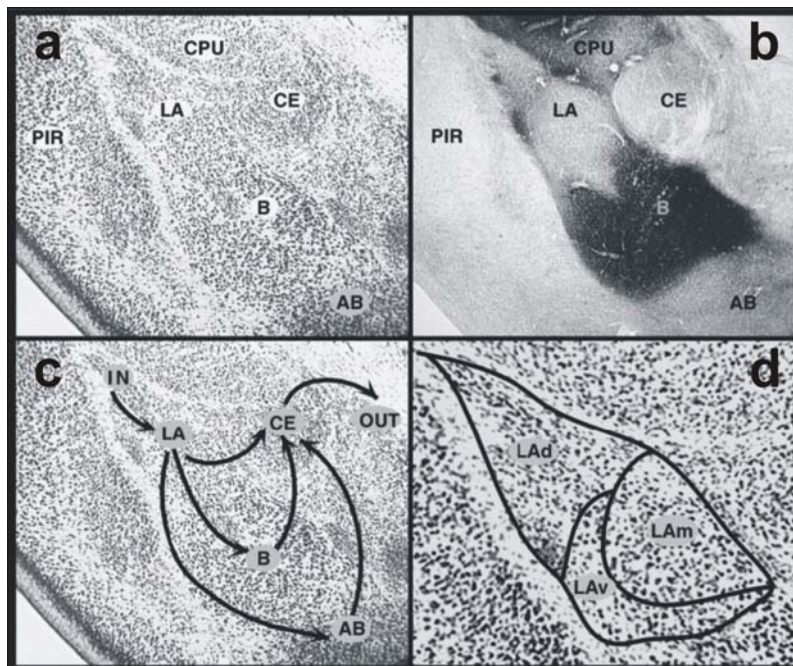


Abbildung 2: Kernregionen der Amygdala und Ihre Signalwege

Dargestellt sind die für die auditorische Angstkonditionierung wichtigen Bereiche: lateraler (LA), basaler (B), akzessorisch basaler (AB) und zentraler (CE) Kern. Es werden Nissl- (a) und Acetylcholinesterasefärbung (b) gezeigt. Die Hauptsignalwege sind in (c) skizziert. Die in (d) vergrößert dargestellte LA kann in weitere Subkerne unterteilt werden (LAd-dorsaler Kern der LA; LAV-ventraler Kern der LA; Lam-medialer Kern der LA). CPU-Putaneum; PIR-Piriformer Cortex

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

Einfache akustische Stimuli können sowohl über den thalamischen als auch den kortikalen Signalweg in die LA verschaltet werden (Romanski und LeDoux, 1992). Da kortikale Signalwege, anders als thalamische Afferenzen, über den Umweg zwischengeschalteter Hirnbereiche Information leiten, kann davon ausgegangen

werden, dass plastische Effekte in der Amygdala primär über den schnelleren thalamischen Input kontrolliert werden (Quirk et al., 1995; Quirk et al., 1997). Dieser Bereich bildet somit die anatomische Basis für die sogenannte auditorische Angstkonditionierung (*fear conditioning*), einen etablierten Verhaltensversuch, der klassischem Konditionieren nach Pavlov (1972) entspricht.

Bei diesem Verhaltensversuch wird ein bedingter Stimulus (*conditioned stimulus*; CS), z.B. ein Ton, mit einem unbedingten Stimulus (*unconditioned stimulus*; US; z.B.: Schmerz, hier: Stromschock) zeitlich gepaart. Diese zeitliche Koinzidenz von US und CS führt zu einer Konditionierung des Versuchstieres auf den CS, der nun mit dem aversiven US assoziiert wird. Dies hat Auswirkungen auf das Verhalten eines Tieres welches nach gelungener Konditionierung auf den CS mit typischer Angstreaktion reagiert.

1.2.2. Quantifizierung LA-abhängigen Lernens durch auditorische Angstkonditionierung

Eine bei vielen Tieren übliche Reaktion auf plötzliche Angstzustände ist es, unvermittelt in der Bewegung zu erstarren (Blanchard et al., 2003). Bei der auditorischen Angstkonditionierung mit Mäusen wird dieses Verhalten (freezing) quantitativ als Maßstab für die erfolgte Assoziation von CS und US verwendet (Abbildung 3). Dabei werden die Tiere in einer ihnen unbekanntem Box untergebracht. Den Versuchstieren können über ein Drahtgitter am Boden Stromschläge verabreicht werden. Im ersten Teil des Versuches (Konditionierungsphase) wird dem Tier der CS gepaart mit dem US präsentiert. Im zweiten Teil des Versuches (Testphase) wird das Tier derselben Umgebung ein zweites Mal ausgesetzt (kontextuelles Lernen) oder dem Tier in veränderter Umgebung der konditionierte Ton (CS) erneut vorgespielt (Stimulus gekoppeltes Lernen) (Tang et al., 2003). Während neuronale Aktivität in der Amygdala das Korrelat der Stimulusgekoppelten Konditionierung ist, hängt das kontextuelle Lernen weitgehend vom Hippokampus ab. Über Quantifizierung des freezing der Versuchstiere lassen sich daher je nach Versuchsdesign Aussagen über hippokampale oder amygdaläre Komponenten des Angstlernverhaltens machen.

In der vorliegenden Arbeit wurde auf die von der Amygdala abhängigen Elemente des auditorischen Angstlernversuch und die Bedeutung von $Ca_v1.2$ für dieses Systems eingegangen.

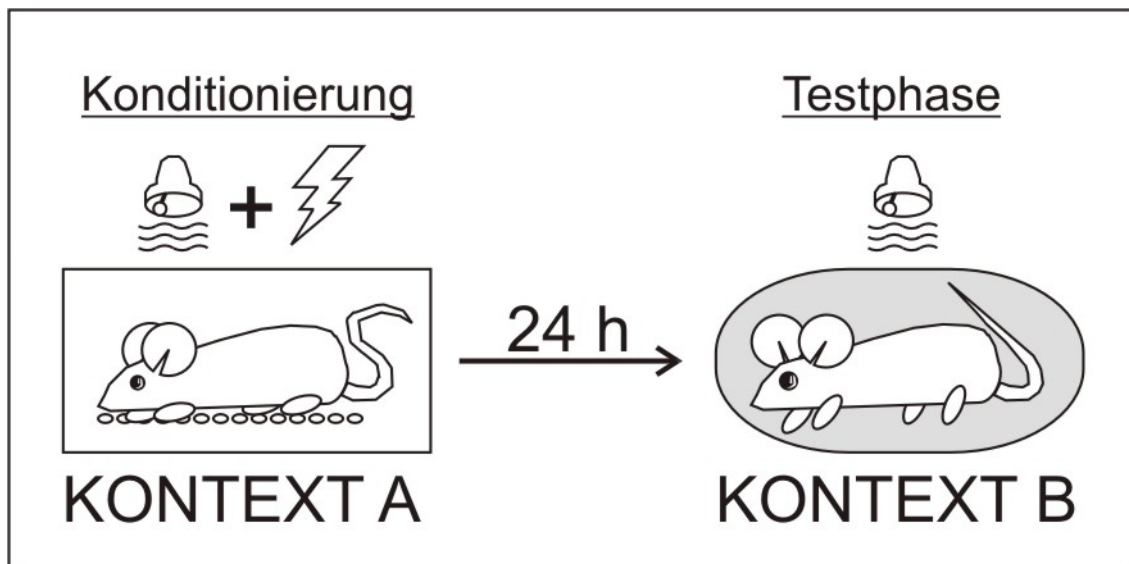


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Amygdala-abhängigen auditorischen Angstkonditionierung.

Dem Versuchstier werden in einem definierten Kontext A ein Ton (CS) zusammen mit einem Stromschlag (US) präsentiert. 24h nach der Konditionierung wird der Ton dem Versuchstier in veränderter Umgebung (Kontext B) erneut präsentiert. Das Tier reagiert mit typischem Angstverhalten (freezing), welches quantitativ festgehalten werden kann.

1.2.3. L-Typ Kalziumkanal abhängiges LTP im Hippokampus

Hebbsche Plastizität synaptischer Verbindungen wird allgemein als elektrophysiologisches Korrelat der Gedächtnisbildung angesehen. In hippokampalen Neuronen konnte erstmals die Verstärkung erregender postsynaptischer Potenziale (EPSP) nach hochfrequenter präsynaptischer Reizung festgestellt werden, die sogenannte Langzeitpotenzierung (LTP) (Bliss and Lomo, 1973). Plastische Veränderungen nach Hebbschen Prinzip können sich als eine solche aktivitätsabhängige, andauernde Verstärkung synaptischer Übertragung (LTP) oder aber spiegelbildlich als langanhaltende Verminderung synaptischer Informationsvermittlung (Langzeitdepression, LTD) manifestieren (Bear and Abraham, 1996). Diese Prozesse sind in Synapsen des ZNS weit verbreitet und sind in vielen neuronalen Systemen gut charakterisiert (Clugnet and LeDoux, 1990; Rogan and LeDoux, 1995; Rotenberg et al., 1996; Nguyen and Kandel, 1997; Son et al., 1998; Lu et al., 1999; Winder et al., 1999; Yaniv et al., 2000).

Es gilt allgemein als erwiesen, dass ein Anstieg der postsynaptischen intrazellulären Kalziumkonzentration für die Induktion der LTP an den Synapsen der CA1 Region und für die Aktivierung der für Lernprozesse wichtigen ERK-Signaltransduktionskaskade in Neuronen der CA1 Region des Hippokampus notwendig ist (Bito et al., 1996; Patterson et al., 2001). Erhöhungen der

postsynaptischen Kalziumkonzentration liegt in dieser Region hauptsächlich der Einstrom von Kalzium über NMDA Rezeptoren (NMDAR) zugrunde (Kovalchuk et al., 2000; Sabatini and Svoboda, 2000). Obwohl der Kalziumstrom über L-Typ Kalziumkanäle lediglich einen kleinen Anteil des postsynaptischen Kalziumtransienten zu bilden scheint, ist der von L-Typ Kalziumkanälen unterhaltene Kalziumeinstrom spezifisch dazu in der Lage, die Transkription kalziumabhängiger Gene, z.B. *Zif/268* und *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), auszulösen. Diese Gene spielen eine wichtige Rolle für das Lernen und adaptive Prozesse im ZNS (Murphy et al., 1991; West et al., 2001).

Es wurde gezeigt, dass der Kalziumstrom über L-Typ Kanäle eine langanhaltende Phosphorylierung des für Lernprozesse wichtigen Transkriptionsfaktors CREB, eine Expression CRE-abhängiger Gene in den Neuronen des Hippokampus und eine Induktion NMDAR-unabhängiger LTP bewirken (Impey et al., 1996; Dolmetsch et al., 2001; Moosmang et al., 2005). Eine genetische Deletion des $Ca_v1.3$ kodierenden *CACNA1D* Gens führte zu keinen offensichtlichen Defekten der LTP im Hippokampus (Clark et al., 2003).

1.2.4. L-Typ Kalziumkanäle und LTP in der LA

In der Amygdala scheinen die neurophysiologischen Prozesse, die Lernen und Gedächtnis zu Grunde liegen, ähnlich zu sein wie im Hippokampus. Es ist gut gezeigt, dass LTP in der LA die molekulare Basis der auditorischen Angstkonditionierung darstellt – Störungen der LTP in der LA beeinträchtigen stets auch auditorische Angstkonditionierung (Bauer et al., 2001; Bauer et al., 2002; Tsvetkov et al., 2002)

Durch einen Anstieg der Kalziumkonzentration kommt es in der Amygdala ebenfalls zu einer Aktivierung verschiedener Kalzium-abhängiger Signalkaskaden, die für die Generierung von Kurz- als auch Langzeitgedächtnis eine wichtige Rolle spielen (Schafe et al., 2000; Schafe and LeDoux, 2000). Bei diesen Prozessen ist auch CREB erneut beteiligt (Josselyn et al., 2001).

In der Amygdala lassen sich zwei Subtypen des L-Typ Kalziumkanals nachweisen, $Ca_v1.2$ und $Ca_v1.3$. Diese werden hauptsächlich in Pyramidenzellen exprimiert, $Ca_v1.2$ deutlich stärker als $Ca_v1.3$ (Hell et al., 1993; Davare et al., 2001; Sinnegger-Brauns et al., 2004; Pinard et al., 2005; Hetzenauer et al., 2006).

Ca_v1.2 ist nicht nur im Soma der Neuronen von Hippokampus und Amygdala lokalisiert, sondern auch im Dendritenbaum (Hell et al., 1993; Obermair et al., 2004; Pinard et al., 2005).

Die primäre Afferenz in die Amygdala verläuft über pyramidale Neurone der LA (s. 1.2.1.). Die wichtigsten Afferenzen verlaufen über thalamische Nervenfasern über die *capsula interna* und verschalten in die LA. Des Weiteren wird die LA über die *capsula externa* durch kortikale Bereiche innerviert (LeDoux, 2007). Es konnten von NMDAR abhängige LTP und LTD in kortikal-amygdalären Synapsen nachgewiesen werden (Chapman et al., 1990; Huang and Kandel, 1998). Anders steht es um die LTP Induktion über thalamische Eingänge. Hier ist zwar ebenfalls der Einstrom extrazellulären Kalziums nötig, dieses gelangt jedoch nicht über NMDAR in die Zelle, sondern hauptsächlich über L-Typ Kalziumkanäle (Weisskopf et al., 1999). Es existieren also innerhalb der LA sowohl von L-Typ Kalziumkanälen abhängige als auch unabhängige Mechanismen für die Ausbildung von LTP.

1.3. Gewebsexpression und Funktionen des L- Typ Kalziumkanals Ca_v1.2

1.3.1. Gewebsverteilung

Die Familie der L-Typ Kalziumkanäle setzt sich aus vier Isoformen zusammen, Ca_v1.1 bis Ca_v1.4 (Hofmann et al., 1999; Lacinova et al., 2000). Die Expression von Ca_v1.1 konnte über Klonierungsexperimente bisher nur in Skelettmuskulatur sicher nachgewiesen werden. Ca_v1.2 wird im Herzen (Bohn et al., 2000), in glatter Muskulatur (Moosmang et al., 2003), Pankreas (Schulla et al., 2003), der Nebenniere und dem Gehirn (Hell et al., 1993) exprimiert. Ca_v1.3 wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert, dabei jedoch in eindeutig niedrigeren Mengen als der dominanter Ca_v1.2 Kalziumkanal (Hell et al., 1993). Geringe Proteinexpression von Ca_v1.3 findet sich auch in den Ovarien, Nieren, dem Pankreas und in der Cochlea. Auch konnte Ca_v1.3 in cardialem Gewebe (Wyatt et al., 1997) einschließlich des Sinusknotens (Bohn et al., 2000) nachgewiesen werden. Ca_v1.4-Expression konnte bis dato ausschließlich in der Retina festgestellt werden (Baumann et al., 2004; Hoda et al., 2006).

1.3.2. Pharmakologische Beeinflussung von Ca_v1.2

Die meisten Befunde über die Funktion von L-Typ Kalziumkanälen wurden in Untersuchungen an Zellkulturen und isolierten Gewebepreparaten mit Hilfe diverser

L-Typ Antagonisten und Agonisten gemacht (Hofmann et al., 1999; Striessnig, 1999). Wenig ist allerdings über die Bedeutung von L-Typ Kalziumkanälen *in vivo* bekannt, also in der Entwicklung und physiologischen Funktion des ganzen Organismus. Die Analyse zellulärer Funktionen von L-Typ Kalziumkanälen ist aus mehreren Gründen nicht einfach. Höhere Konzentrationen von Kalziumkanal-Antagonisten beeinflussen den kardialen- oder glattmuskulären $Ca_v1.2$ Kanal. Dadurch verringern sie die kardiale Inotropie, den Blutdruck und die Gewebperfusions, so dass Untersuchungen am lebenden Tier bestenfalls schwer zu interpretieren sind und ein großes Fehlerpotential aufweisen. Obwohl L-Typ-Kalziumkanal-Antagonisten im allgemeinen als relativ spezifisch angesehen werden, haben sie viele unerwünschte, zusätzliche Wirkungen. Zum Beispiel können bestimmte L-Typ-Kalziumkanal-Antagonisten die Freisetzung von „endothelium-derived hyperpolarizing factor“ (EDHF) (Fisslthaler et al., 2000) aus dem Gefäßendothel auslösen, die Bildung des Vasokonstriktors Endothelin-1 in Endothelzellen vermindern (Yakubu and Leffler, 2002) und die synaptische Übertragung unabhängig von ihrer Wirkung auf L-Typ Kalziumkanäle beeinflussen, ein Effekt, der typisch für das DHP Nifedipin ist, aber andere DHPs nicht betrifft (Hirasawa and Pittman, 2003). Berücksichtigt man diese Effekte, wird klar, dass die Verwendung von L-Typ-Kalziumkanal-Antagonisten die Ergebnisse sowohl von *in vivo* wie auch *in vitro* Experimenten beeinflusst. Die Existenz mehrerer Isoformen des L-Typs, deren Expressionsmuster im Gewebe überlappen, erschweren zusätzlich die Unterscheidung, welcher Subtyp für die pharmakologischen Effekte verantwortlich ist. Dies gilt besonders für $Ca_v1.2$ and $Ca_v1.3$, die wie oben beschrieben, in ihrer Gewebsexpression weitgehend überlappen (Ludwig et al., 1997; Moosmang et al., 2005).

1.3.3. Knockout des für $Ca_v1.2$ -codierenden Gens in Mäusen

Für den $Ca_v1.2$ Kanal kodiert das Gen *CACNA1C* (Ertel et al., 2000). Das Gen umfasst ca. 150 kb und besteht bei der Maus aus 50 Exonen die in großem Umfang alternativ gespleißt werden (Liao et al., 2005; Moosmang et al., 2005).

Die Erzeugung transgener Tiere durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES Zellen) hat der Wissenschaft ein wichtiges Werkzeug zur Beurteilung der Funktion einzelner Gene geliefert (Jaenisch, 1988; Capecchi, 1989). Der Vorteil einer solchen Technik liegt auf der Hand, betrachtet man die alternativen Möglichkeiten. Im Gegensatz zur Verwendung von agonistisch oder antagonistisch wirksamen Pharmaka, kann man im transgenen Tiermodell direkter

auf die Auswirkungen einer ausbleibenden Funktion des jeweiligen Gens bzw. Proteins geschlossen werden. Falsch zugeordnete Wirkungen aufgrund unbekannter sekundärer Rezeptoren eines Pharmakons können ausgeschlossen werden.

Probleme können jedoch durch das konventionelle Abschalten eines Gens (Nullmutante) entstehen. Dabei kommt es in allen Zellen des Tieres während der prä- und postnatalen Entwicklung zum Verlust der Genfunktion. Ein solcher zeitlich und strukturell „globaler“ Gen-Knockout kann zu embryonalem Tod oder Mausmutanten mit schweren Defekten und stark eingeschränkter Lebensfähigkeit führen. Insbesondere kann die zeit- und zelltypspezifische Funktion eines Gens an konventionellen Nullmutanten nicht analysiert werden.

1.3.3.1. Totaler Knockout (Nullmutante) von CACNA1C

Um die physiologischen Funktionen des $Ca_v1.2$ Kalziumkanals aufzuklären, wurde eine konventionelle Knockout-Mauslinie etabliert (Seisenberger et al., 2000). Dies wurde durch Insertion einer Neomycin-Resistenz-Kassette in Exon 3 des *CACNA1C* Gens erreicht, so dass der Leserahmen für den $Ca_v1.2$ Kalziumkanal unterbrochen wurde und es daher nicht mehr zur Bildung eines funktionsfähigen Kalziumkanals kommen konnte.

Die Deletion des Gens für den $Ca_v1.2$ -Kalziumkanal führte zum Absterben der Embryonen um Tag 14,5 p.c. und zeigte damit, dass dieser Kanal für die weitere Entwicklung der Embryonen essentiell ist.

1.3.3.2. Konditionaler CACNA1C Knockout

Die embryonale Lethalität des konventionellen Knockout des $Ca_v1.2$ -Kalziumkanals verhindern natürlich die Untersuchung adulter Knockout-Tiere. Daher musste ein Weg gefunden werden, eine zeit- und gewebespezifische Knockout-Mauslinie zu etablieren. Dies konnte unter der Verwendung des Cre/loxP-Rekombinationssystems erreicht werden.

Das Cre/loxP-Rekombinationssystem erweist sich als sehr nützlich, um gezielte genetische Veränderungen in ES-Zellen und in Somazellen der Maus zu bewirken (Betz et al., 1996; Rajewsky et al., 1996). Dazu werden die klassischen Methoden zur Modifikation von Genen mit Rekombinationssystemen kombiniert, die darauf beruhen, dass Rekombinasen einen Austausch zwischen zwei kurzen DNA-Erkennungssequenzen katalysieren.

Die Cre (*cyclization recombination*)-Rekombinase ist ein 38 kDa Protein des Bakteriophagen P1. Cre vermittelt die Rekombination zwischen zwei 34 bp langen loxP (*locus of crossing over of P1*) Erkennungssequenzen. Dazu benötigt die Rekombinase keinen Cofaktor. Abhängig von der Orientierung der loxP-Sequenzen zueinander und dem Ort ihrer Integration kann man durch Cre-vermittelte Rekombination eine Inversion, Excision/Integration oder Translokation von DNA erzeugen. Das Cre/loxP-Rekombinationssystem bietet damit eine große Bandbreite an Variationen wie das Genom modifiziert werden kann. Um Veränderungen des Genoms *in vivo* durchzuführen, wurde bisher meist das Herausschneiden von loxP-flankierten („gefloxten“) DNA-Segmenten verwendet, z.B. um Gene durch Cre-vermittelte Excision gefloxter Exons zu inaktivieren (Metzger and Feil, 1999; Nagy, 2000). loxP-Erkennungssequenzen werden entweder gezielt über homologe Rekombination in das Chromosom der ES-Zellen eingeführt oder zufällig über ein konventionelles Transgen, um dann durch Expression von Cre eine Rekombination zu verursachen.

Rekombination zwischen loxP-Sequenzen kann man in ES-Zellen (Gu et al., 1993) oder in befruchteten Eizellen (Araki et al., 1995) über transiente Cre Expression genauso wie in Cre-transgenen Mäusen (Lakso et al., 1992; Orban et al., 1992) herbeiführen. Nach Einkreuzung von sog. Cre *deleter* Mäusen, die Cre in einem frühen Entwicklungsstadium und/oder in Keimzellen exprimieren, kann die rekombinierte DNA über die Keimbahn weitergegeben werden. Cre deleter Mäuse werden in erster Linie verwendet, um gefloخته Markergene zu entfernen oder Nullmutanten zu erzeugen (Rajewsky et al., 1996). Um eine konditionale Mutagenese im Genom der Maus zu erreichen, kann die Expression von Cre über gewebespezifische Promotoren sowie Liganden abhängige Cre Rekombinasen angesteuert werden.

Im Genom der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mäuse wurde die Expression von Cre über den *rat nestin* (Nestin) Promotor angesteuert. Die für Cre codierende Sequenz wurde dabei zwischen den eigentlichen Nestin Promotor und einer die Expressions verstärkende Enhancer- Sequenz sowie der Polyadenylationsdomäne hGH poly (A) („human growth polyadenylation signal“) eingebettet (Tronche et al., 1999) (Abbildung 4).

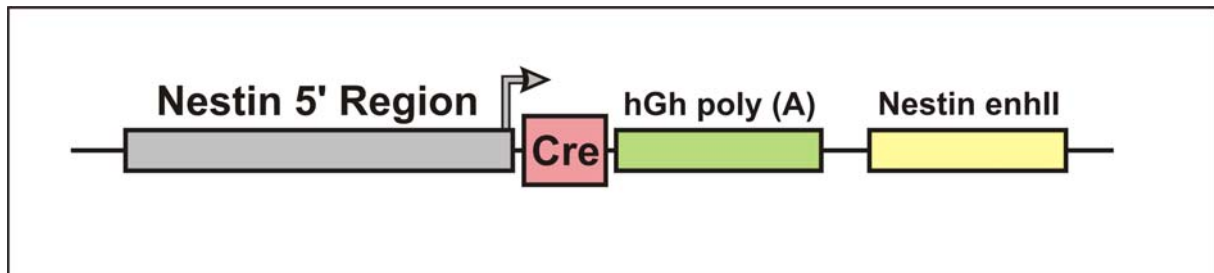


Abbildung 4: Struktur des Nestin-Cre Transgens.

Die Cre Rekombinase steht unter Kontrolle des Nestin Promoters und dessen gehirnspezifischer Enhancersequenz (Nestin enhII). hGh poly (A) = human growth hormone Polyadenylationsdomäne.

Das geflochte CACNA1C Gen war wie folgt aufgebaut: Eine geflochte Neo-TK-Kassete wurde zwischen Exon 13 und 14 der für $Ca_v1.2$ codierenden Sequenz integriert. Eine dritte loxP Sequenz wurde zwischen Exon 15 und 16 inseriert (Abbildung 5, 2.1.1.1.). Über homologe Rekombination war der so konstruierte Vektor in das Genom der Maus eingeschleust worden (Seisenberger et al., 2000).

Es konnte gezeigt werden, dass in der frühen Entwicklung neuronaler Vorläuferzellen Nestin in diesen Zellen exprimiert wird (Zimmerman et al., 1994). Aus diesen Nestin exprimierenden Vorläuferzellen entstehen sowohl Neuronen als auch Astrozyten des gesamten ZNS des adulten Tieres. Da in diesen Vorläuferzellen in der hier verwendeten Nestin-Cre transgenen Maus Cre-Rekombination stattfindet, kann man also davon ausgehen, dass im gesamten ZNS des adulten Tieres das geflochte Gen rekombiniert wurde.

Ein Problem bei der Erzeugung transgener Mauslinien unter Verwendung des Cre/loxP-Systems ist, dass Cre auch zu unerwünschten Zeitpunkten in der Entwicklung der Maus oder in nicht angezieltem Gewebe (ektopisch) exprimiert werden kann. Wenn Cre bereits in den Stamm- oder Vorläuferzellen der frühen Embryonalentwicklung ektopisch aktiv ist, kann die DNA in den meisten Zellen des adulten Tieres rekombiniert sein.

Die Analyse des Phänotyps eines mit dem Cre/loxP System erzeugten Tieres ist auch erschwert, wenn die Rekombination nur in einem Teil der Zellen eines bestimmten Gewebes stattfindet. Es ist daher von größter Wichtigkeit, bei der Erzeugung solcher Mauslinien zu überprüfen, ob außer dem eigentlichen Zielgewebe auch noch andere Strukturen betroffen sind. Nestin wird, außer in neuronalem Gewebe, auch in der Skelettmuskulatur exprimiert. Da $Ca_v1.2$ in diesem Gewebe keine Rolle spielt, kann Nestin als ein sehr gut geeigneter Promotor für den gehirnspezifischen Knockout von CACNA1C angesehen werden.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des L-Typ Kalziumkanal $Ca_v1.2$ bei der auditorische Angstkonditionierung zu untersuchen.

Hierzu wurden vor allem elektrophysiologische Methoden, kombiniert mit auditorischen Angstkonditionierungsversuchen angewandt, und versucht die Ergebnisse dieser verschiedenen Tests zu korrelieren. Wert wurde auch auf den Vergleich des akuten Funktionsverlustes von $Ca_v1.2$ durch pharmakologische Inhibierung mit Effekten der gehirnspezifisch chronischen Deletion für $Ca_v1.2$ codierenden Gens *CACNA1C* im Mausmodell gelegt.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

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

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

2.1.1. Zucht der Nestin-Cre Mauslinie

2.1.1.1. *CACNA1C* Mäuse

In dieser Arbeit konnten zwei bereits existierende, für den gehirnspezifischen Knockout von *CACNA1C* geeignete, transgene Mauslinien verwendet werden. In diesen lagen zwei unterschiedliche transgene *CACNA1C* ($Ca_v1.2$) Allele vor (L1 und L2 Allel; Abbildung 5). Das L2 Allel („gefloxtes“ Allel) besitzt zwei, die Exone 14 und 15 des *CACNA1C* Gens flankierende *loxP*-Sequenzen, die für einen wichtigen Teil der ionenleitenden Pore des $Ca_v1.2$ Kanals kodieren. Dieses Allel kann trotz der beiden *loxP*-Sequenzen vor Rekombination für ein funktionsfähiges $Ca_v1.2$ Protein kodieren.

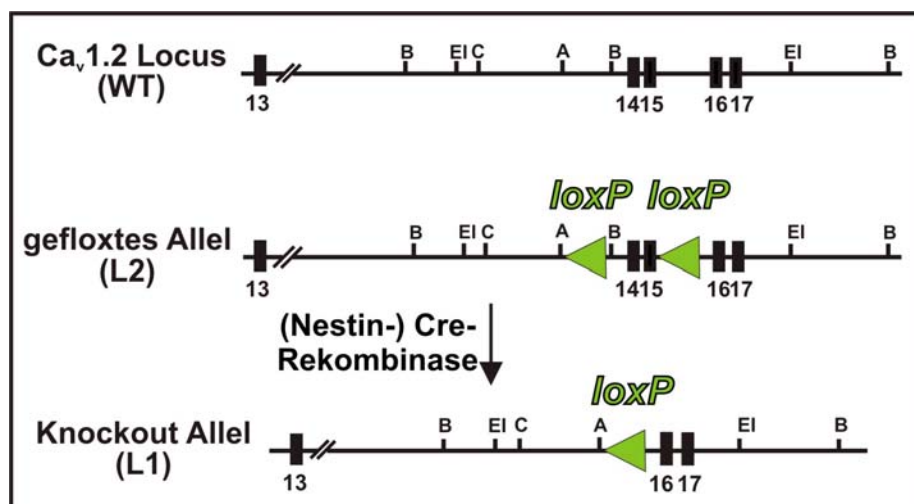


Abbildung 5: Schematische Darstellung der mutierten *CACNA1C* Allele. Dargestellt sind das Wildtyp (WT), das Knockout (L1) und das konditionale *CACNA1C* Allel (L2). Die Zahlen entsprechen den Exonnummern. Durch Expression der Cre-Rekombinase (im Beispiel in Abhängigkeit des Nestin Promotors) kommt es zur Deletion der Exone 14 und 15. Die Restriktionsstellen entsprechen A, Acc65I; B, BamHI; C, ClaI; EI, EcoRI.

Durch Cre-vermittelte Rekombination werden im L1 Allel die Exone 14 und 15 entfernt. Zusätzlich zu der Deletion der beiden Exone kommt es zu einem falschen Spleißen von Exon 13 auf ein 5` von Exon 16 gelegenes Intron und dadurch zur Erzeugung eines vorzeitigen Stopcodons im Exon 16 (*loss of function* Allel).

2.1.1.2. Nestin-Cre Mäuse

Die Expression von Cre steht in diesen Tieren unter der Kontrolle des Nestin-Promotors (Abbildung 4). Nestin wird in den Vorläuferzellen aller Neuronen und Astrozyten sowie in der Skelettmuskulatur exprimiert. Da $Ca_v1.2$ für die Funktion der Skelettmuskulatur keine Rolle spielt, ist Nestin ein ausgezeichneter Promotor, um $Ca_v1.2$ mit Hilfe der Cre-Rekombinase im gesamten Gehirn auszuschalten.

2.1.2. Zuchtschemata

Die Tiere wurden unter einem 12h/12h Licht/Dunkelzyklus gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter *ad libitum*. Die Nachkommen aus einer Verpaarung wurden im Alter von 7-14 Tagen durch PCR Analyse von DNA genotypisiert, die durch Biopsie der Schwanzspitze gewonnen wurde. Die Tiere wurden im Alter von 4 Wochen von den Müttern abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt.

Für alle Versuche, bei denen Knockout-Tiere verwendet wurden, wurden Wurfgeschwister der jeweiligen Knockout-Tiere als Kontrollen verwendet. Für elektrophysiologische Untersuchungen wurden Tiere im Alter von 17-24 Tagen verwendet. Für alle weiteren Versuche wurden 8-15 Wochen alte Tiere verwendet. In rein pharmakologischen Experimenten ohne Knockout-Gruppe wurden C57Bl/6N Tiere verwendet (der gleiche genetische Hintergrund, auf den die transgenen Tiere zurückgezüchtet waren). Die Zuchtstrategie für den gehirnspezifischen Knockout von *CACNA1C* ist in Abbildung 6 skizziert.

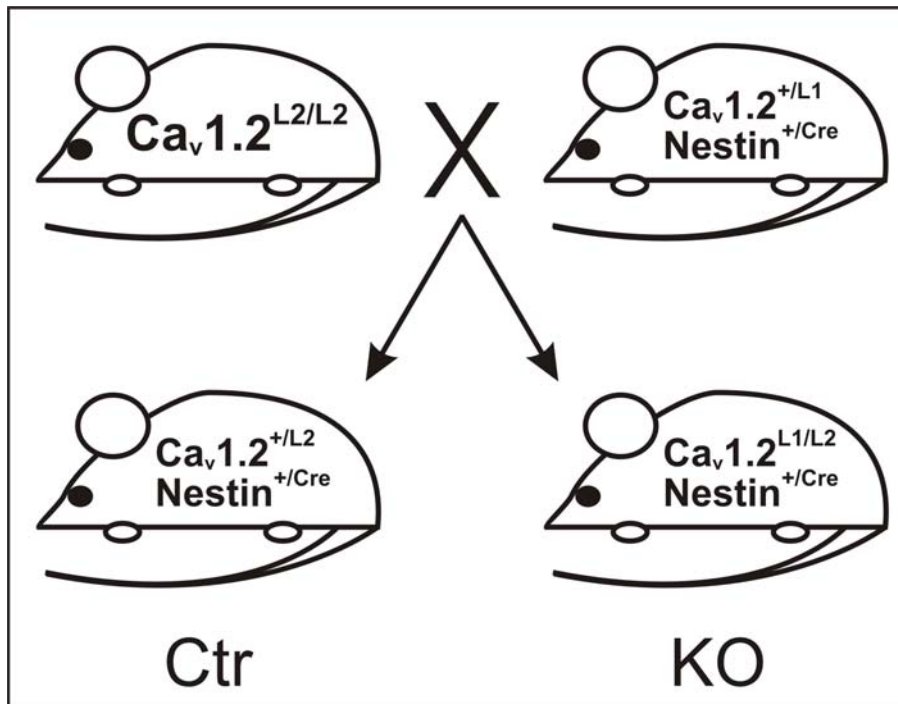


Abbildung 6: Konditionale Inaktivierung des *CACNA1C* Gens im gesamten Nervensystem.

Um die transgene Mauslinie mit der Inaktivierung des *CACNA1C* ($Ca_v1.2$) Gens in allen Gehirnregionen zu erzeugen, wurden $Ca_v1.2^{+/L1}$ $Nestin-Cre^{+/Cre}$ Mäuse (heterozygot für das L1 Allel und für das *Nestin-Cre* Allel) mit $Ca_v1.2^{L2/L2}$ Tieren verpaart (Mäuse, die homozygot für das L2 Allel sind), um $Ca_v1.2^{L1/L2}$ $Nestin-Cre^{+/Cre}$ (KO-Tiere) und $Ca_v1.2^{+/L2}$ $Nestin-Cre^{+/Cre}$ Tiere (Ctr-Tiere) zu erhalten. Als genetischer Hintergrund dieser Tiere diente der C57Bl/6N Stamm. Beide transgenen Linien waren lebensfähig und zeigten keine offensichtlichen Auffälligkeiten.

2.2. Elektrophysiologische Methoden

Bei sämtlichen elektrophysiologischen Untersuchungen in dieser Arbeit wurde die *patch clamp* (Membranflechklemme)–Technik in der *whole cell* (Ganzzell)–Konfiguration verwendet (Cahalan and Neher, 1992).

2.2.1. Vorbereitung der Messpipetten

Pipetten wurden aus Borosilicatglas (Biochemical Instruments, Aussendurchmesser 1,5 mm, Innendurchmesser 1,17 mm, Länge 100 mm) in einem Pipetten-Puller der Firma DMZ-Universal gezogen. Der Puller wurde so programmiert, dass Pipetten mit einem elektrischen Widerstand von 3-7 M Ω entstanden. Alle Pipettenlösungen wurden durch einen 0,2 μ M Filter (Renner GmbH) in die Pipetten gefüllt.

2.2.2. Präparation koronarer Gehirnschnitte

Die Mäuse wurden mit Diethylether anästhetisiert und dekapitiert. Das Gehirn wurde entnommen und in eisgekühlte artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit (ACSF)

überführt. Die ACSF enthielt (in mM): 10 Glucose, 124 NaCl, 3 KCl, 26 NaHCO₃, 1,25 KH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgSO₄*7H₂O (pH7,4), begast wurde mit Carbogen (95 % O₂/ 5 % CO₂). Im Falle der Messung von Bariumströmen in pyramidalen Neuronen der LA enthielt die ACSF: 10 Glucose, 124 NaCl, 3 KCl, 26 NaHCO₃, 1,25 KH₂PO₄, 2 BaCl*2H₂O, 1 MgCl₂*6H₂O, 20 TEA-Cl, 5 4-AP (pH7,4). An einem Vibratom der Firma Microm GmbH (Walldorf, Germany) wurden 350 µm dicke, die LA beinhaltende, koronare Gehirnschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden danach mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur in mit Carbogen (95 % O₂/ 5 % CO₂) begaster ACSF inkubiert.

2.2.3. Perfusion und Fixation der Präparate in der Messapparatur

Kurz vor der Messung wurden die Schnitte in eine mit Carbogen begaste, ACSF gefüllte Submersionskammer überführt. Die Schnitte wurden mit Hilfe eines Halters aus dünnem Golddraht fixiert. Die Submersionskammer wurde unter ein abgeschirmtes, aufrecht stehendes Mikroskop (BX50WI; Olympus, Hamburg, Deutschland) gestellt und die Schnitte mit begaster ACSF superfundiert (1 ml/min). Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur in einem klimatisierten Raum durchgeführt (22 °C).

2.2.4. Verstärker und Software

Alle Aufzeichnungen wurden mit einem HEKA EPC 9 (HEKA, Lambrecht/Pfalz, Germany) Verstärker erhoben. Die Daten wurden mit der dazugehörigen Software Pulse (HEKA, Lambrecht/Pfalz, Germany) aufgenommen. Die Aufzeichnungen erfolgten im *whole-cell* Modus. Signale wurden mit 4 kHz digitalisiert und 2 kHz gefiltert.

2.2.5. Elektrophysiologische Grundcharakterisierung pyramidalen Neurone in der LA

LTP Messungen in der LA erfolgten durch patch clamp pyramidalen Neuronen dieses Hirnbereiches. Dieser Zelltyp wurde vor dem Anlegen der Membranklemme morphologisch identifiziert. Anders als Interneurone weisen pyramidale Neurone eine Besonderheit in der Feuerrate Ihrer Aktionspotentiale (AP) auf. Die Abstände zwischen einzelnen AP bei überschreiten der AP-Schwelle vergrößern sich zunehmend von AP zu AP. Man spricht hierbei von einer *frequency adaptation* (Faber et al., 2001). Um zu bestätigen, dass die durch morphologische

Unterscheidung getroffene Auswahl der Neuronen den richtigen Zelltyp traf, wurde zusätzlich die frequency adaption dieser Zellen bestimmt. Aus den erhaltenen Aufnahmen wurden zusätzlich das Ruhepotential, die AP-Schwelle, die Latenzzeit des ersten AP sowie die Eingangswiderstand (*input resistance*) der Zellen berechnet.

2.2.5.1. Lösungen und Pharmaka

Die Badlösung enthielt (in mM): 10 Glucose, 124 NaCl, 3 KCl, 26 NaHCO₃, 1,25 KH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgSO₄*7H₂O (pH 7,4), begast wurde mit Carbogen (95 % O₂/ 5 % CO₂). Die Messpipetten enthielten (in mM): 130 K-gluconate, 0,6 EGTA, 5 KCl, 2 MgCl*6H₂O, 10 HEPES, 2 Mg-ATP, 0,3 Na₃-GTP (pH 7,3).

2.2.5.2. Messprotokoll

Die Zellen wurden unter *current-clamp* (Stromklemme) Bedingungen bei 0 pA gehalten. Alle Zellen, deren Ruhepotential dabei mehr als 3 Minuten lang unter –59 mV lag, wurden verworfen. Die Messung erfolgte, indem den Neuronen 800 ms andauernde Strominjektionen in 10 pA Schritten von aufsteigender Reihenfolge (–20 bis 80 pA), verabreicht wurden (Intervall 10 s). Die erste Spannungsantwort, welche mindestens 3 AP aufwies, wurde für die Berechnung aller weiteren in Tabelle 1 dargestellten Parameter herangezogen.

2.2.6. Messung von I_{Ba} in pyramidalen Neuronen der LA

L-Typ Kalzium Kanäle besitzen eine vergleichbar gute Leitfähigkeit für Barium wie für Kalzium (Armstrong and Neyton, 1991). Um sicherzugehen, dass die Verwendung des Nestin-Cre Promotors zu einem Knockout von *CACNA1C* in der LA führt, wurden pyramidale Neurone der LA auf den DHP-sensitiven Anteil ihrer, über Kalziumkanäle vermittelten, Bariumströme I_{Ba} getestet.

2.2.6.1. Lösungen und Pharmaka

Die Badlösung enthielt (in mM): 10 Glucose, 124 NaCl, 3 KCl, 26 NaHCO₃, 1,25 KH₂PO₄, 2 BaCl*2H₂O, 1 MgCl₂*6H₂O, 20 TEA-Cl, 5 4-AP (pH 7,4).), begast wurde mit Carbogen (95 % O₂/ 5 % CO₂). Messpipetten enthielten (in mM): 120 Cs-Methansulfonat, 10 EGTA, 5 Mg-ATP, 0,5 Na₃-GTP, 20 HEPES, 0,5 CaCl₂, 10 NaCl (pH 7,3 mit CsOH).

Während der Messungen wurde der Badlösung 1 µM TTX zugegeben.

2.2.6.2. Messprotokoll

Pyramidale Neurone der LA wurden im *voltage-clamp* (Spannungsklemme) Modus bei -60 mV geklemmt und alle 30 s auf -5 mV depolarisiert. Nach 10 Minuten wurde langsam ($1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) mit $20 \text{ } \mu\text{M}$ Isradipin superfundiert. Die maximale Amplitude des resultierenden Einwärtsstroms I_{Ba} wurde zur Auswertung herangezogen.

2.2.7. LTP Induktion in der LA

In der vorliegenden Arbeit kam ein Tetanus-LTP Induktionsprotokoll zur Anwendung. Dabei wurden EPSPs in pyramidalen Neuronen der LA durch hochfrequente präsynaptische Reizung des Thalamischen Input in die LA ausgelöst (s. 2.2.7.2.) und mit einer postsynaptischen Strominjektion koinzidiert.

2.2.7.1. Lösungen und Pharmaka

Die Badlösung enthielt (in mM): 10 Glucose, 124 NaCl, 3 KCl, 26 NaHCO₃, 1,25 KH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgSO₄·7H₂O (pH 7,4), begast wurde mit Carbogen (95 % O₂/ 5 % CO₂). Die Messpipetten enthielten (in mM): 130 K-gluconate, 0,6 EGTA, 5 KCl, 2 MgCl₂·6H₂O, 10 HEPES, 2 Mg-ATP, 0,3 Na₃-GTP (pH 7,3).

Der jeweiligen Messreihe entsprechend wurden entweder kein Pharmakon, $10 \text{ } \mu\text{M}$ Isradipin (Roche), $10 \text{ } \mu\text{M}$ Ifenprodil (Tocris), $10 \text{ } \mu\text{M}$ Philanthotoxin (SIGMA) oder eine Kombination aus Ifenprodil und Isradipin (jeweils $10 \text{ } \mu\text{M}$) der Badlösung zugegeben. Die Pharmaka waren in Stocklösungen (10 mM) in 100% Ethanol gelöst.

2.2.7.2. Induktion von EPSPs in pyramidalen Neuronen der LA

Zur Induktion erregender postsynaptischer Potentiale (EPSP) in pyramidalen Neuronen der LA wurden diese im whole-cell patch unter current clamp Bedingungen bei 0 pA gehalten. Die Zellen wurden mittels einer konzentrischen Wolframelektrode (World Precision Instruments, Sarasota, Florida USA) präsynaptisch gereizt. Dabei wurde die Reizelektrode so platziert, dass sie Axone des thalamo-amygdalären Signalwegs stimulierte (Abbildung 7).

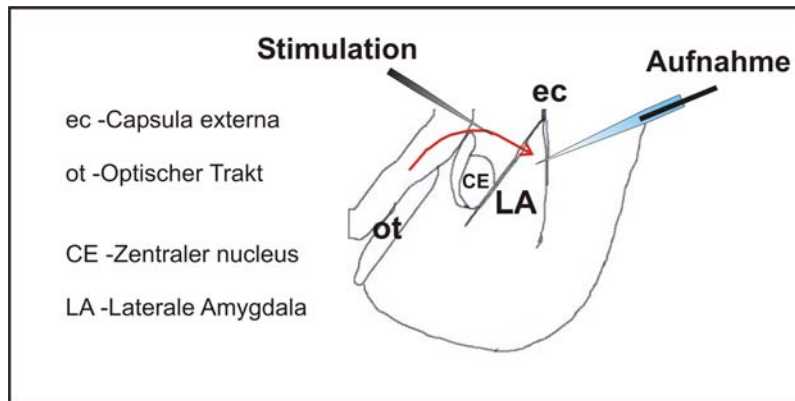


Abbildung 7: Schematische Darstellung der präsynaptischen Reizung pyramidalen Neuronen der lateralen Amygdala (LA).

Die Stimulationsnadel wurde so platziert, dass afferente Fasern aus dem Thalamus (roter Pfeil) gereizt wurden. CE, Zentraler nucleus; ec, capsula externa; ot, tractus opticus.

Die Reizdauer betrug in allen Versuchen 150 μ s. Als Maß der Stärke der synaptischen Verbindung wurde die maximale Steigung des ausgelösten EPSP (*EPSP slope*; 3 ms Zeitfenster) bestimmt. In LTP Experimenten wurde die präsynaptische Reizung so eingestellt, dass vor LTP-Induktion 30 % - 50 % des maximalen EPSP slope ausgelöst werden konnte. Die Neuronen wurden in Intervallen von 15 s präsynaptisch stimuliert. Um einen Grundlinienwert von 100 % (Basis) EPSP slope zu erhalten, wurden die Werte während der letzten 5 Minuten vor LTP Induktion gemittelt und normalisiert.

2.2.7.3. Verwendung eines Tetanus Protokolls

Die präsynaptische Reizung erfolgt im Tetanus-Protokoll anhand hochfrequenter (z.B. 100 Hz) Stimuli (Tetanus). Kombiniert wurde diese hochfrequente präsynaptische Stimulation in der vorliegenden Arbeit mit einer leichten, anhaltenden Depolarisation der Postsynapse durch depolarisierende Strominjektionen.

Zellen der LA wurden 100 ms lang mit einer Frequenz von 100 Hz präsynaptisch gereizt. Zeitgleich erhielt die Postsynapse eine depolarisierende Strominjektion, deren Intensität anhand der vorangehenden Charakterisierung (s.o.) so gewählt wurde, dass sie die Zelle bis nahe der Schwelle der Auslösung von APs depolarisierte (Abbildung 8). Die Kombination von präsynaptischem Tetanus und postsynaptischer Strominjektion wurde in Intervallen von 10 s insgesamt 10 mal wiederholt (Abbildung 8). Im Anschluss wurden den Zellen 30 Minuten lang in 15 s Intervallen Testpulse appliziert, um den Verlauf der zeitlichen Änderung des EPSP slope zu dokumentieren.

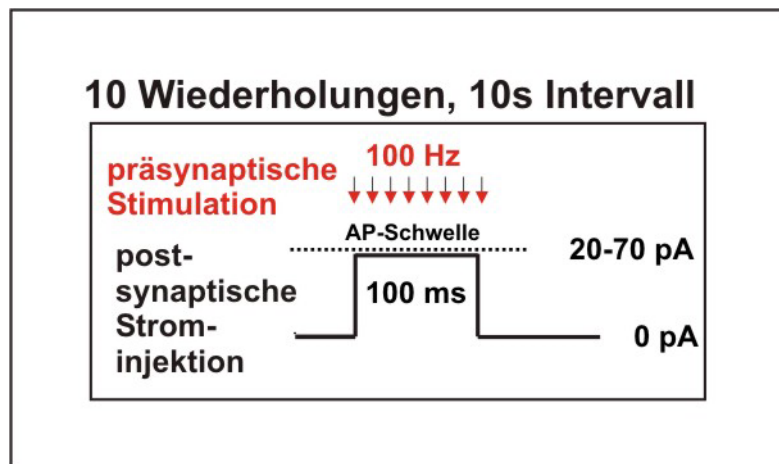


Abbildung 8: *Tetanus* LTP-Induktionsprotokoll: Zellen wurden präsynaptisch 100 ms mit einem 100 Hz Tetanus gereizt. Gleichzeitig wurde postsynaptisch Strom injiziert. Es wurde gerade soviel Strom injiziert um die Zelle nahe zur Schwelle der Auslösung von APs depolarisiert. Die Kombination präsynaptisch tetanischer Reizung und postsynaptischer Depolarisation wurde in Abständen von 10 s 10 mal wiederholt.

2.2.8. Messung der durch AMPAR-vermittelten postsynaptischen Ströme in Neuronen der LA

AMPAR (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure-Rezeptoren) sind aus verschiedenen Kombinationen von GluR (ionotropischer Glutamatrezeptor) Untereinheiten zusammengesetzt. In Pyramidenzellen des zentralen Nervensystems beinhalten diese Heteromere meist GluR2 Untereinheiten, während in Interneuronen hauptsächlich GluR2 freie AMPAR vorkommen (Isaac et al., 2007). AMPAR ohne GluR2 weisen gegenüber GluR2 haltigen AMPAR eine veränderte Ionenleitfähigkeit aufgrund einer spannungsabhängigen Blockade durch Polyamine bei positiven Membranpotentialen auf (Bowie and Mayer, 1995; Plant et al., 2006). Aus dem Verhältnis der Amplituden der AMPAR-vermittelten erregenden postsynaptischen Ströme bei positiven und negativen Haltepotentialen kann ein Rektifizierungsindex für die postsynaptischen AMPAR berechnet werden. Dies erfolgte nach der Formel:

$$\text{Rektifizierungsindex} = (\text{Amplitude bei } -70 \text{ mV}) / (\text{Amplitude bei } +40 \text{ mV})$$

Dieser Index kann zur Bestimmung der relativen Häufigkeit von GluR2 haltigen AMPAR in der Membran der Postsynapse herangezogen werden. Je mehr GluR2 freie AMPAR in der Membran exprimiert werden, desto stärker wirkt sich der

spannungsabhängige Block des Ionenkanals bei positiven Haltepotentialen (+40 mV) auf die Stromamplitude aus und der Rektifizierungsindex wird dementsprechend größer. Da EPSCs sowohl von NMDAR wie AMPAR-vermittelten Ionenströmen getragen werden, wurden bei der Bestimmung des Rektifizierungsindex NMDAR inhibiert.

2.2.8.1. Lösungen und Pharmaka

Die Badlösung enthielt (in mM): 10 Glucose, 124 NaCl, 3 KCl, 26 NaHCO₃, 1,25 KH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgSO₄*7H₂O (pH 7,4), begast wurde mit Carbogen (95 % O₂/ 5 % CO₂). Die Messpipetten enthielten (in mM): 135 Cs-Methansulfonat, 0,5 EGTA, 4 Mg-ATP, 0,3 Na₃-GTP, 10 HEPES, 8 NaCl, 0,3 QX314, 0,1 Spermintetrahydrochlorid (pH 7,3). Während der Messungen wurden der Badlösung 50 µM Picrotoxin sowie 100 µM APV (2-Amino-5-phosphonovaleriansäure) zugegeben.

2.2.8.2. Einstellung der präsynaptischen Stimulation zur Auslösung von EPSCs in pyramidalen Neuronen der LA

Zur Induktion von EPSCs (*excitatory postsynaptic currents* - erregend postsynaptische Ströme) wurden pyramidale Neurone der LA im voltage-clamp Modus bei -70 mV gehalten. Die Reizung erfolgte wie oben (2.2.7.2.) zur Induktion der EPSPs beschrieben. Zur Bestimmung der mindest-notwendigen präsynaptischen Reizung zur Auslösung einer maximalen EPSCs Amplitude wurde die präsynaptische Stimulation schrittweise verstärkt (~25-150 nA) bis keine weitere Steigerung der Stromamplitude erreicht wurde.

2.2.8.3. Messprotokoll

Im Experiment zur Bestimmung der AMPAR Rektifizierung wurden die Zellen präsynaptisch maximal stimuliert. Zellen wurden im whole cell patch unter voltage-clamp Bedingungen alternierend bei bei -70 mV und +40 mV gehalten. 10 s nach Wechsel des Haltepotentials wurde präsynaptisch gereizt, die maximale Amplitude der Stromantwort der Zelle auf den einzelnen präsynaptischen Stimulus wurde aufgezeichnet. Ergebnisse von jeweils 5 Stimuli des gleichen Haltepotentials wurden pro Zelle zusammengefasst und gemittelt.

2.3. Ethologische Methoden

Die ethologischen Versuche wurden von Dr. N. Langwieser und Dr. C. Wotjak am Max-Planck Institut für Psychiatrie, München durchgeführt und freundlicherweise zur Verwendung in dieser Arbeit zur Verfügung gestellt.

2.3.1. Intracerebroventrikuläre (ICV) Injektion

Die Tiere wurden mit Isoflouran (Inhalationsnarkose, 1% in O₂) anästhetisiert. Anschließend wurden die Mäuse mittels Ohrdornen in einem Stereotakten (TSE) fixiert. Es wurde mit einem Skalpell ein Schnitt längs der *sutura sagittalis* des Schädels gemacht und der Skalp zur Seite gelegt. Das Bregma wurde mit 3 % H₂O₂ sichtbar gemacht und eine Führungskanüle (8 mm lang, 23G Kanülen, Braun) darauf ausgerichtet. In die Schädeldecke wurden mit einem Zahnarztbohrer zwei Löcher (Das erste für die Injektionskanüle, das zweite für die Anbringung einer stabilisierenden Schraube) gebohrt und ausgeweitet. Mit dem stereotaktischen Apparat wurde die Stahlkanüle in den lateralen Ventrikel geschoben (Stereotaktischer Atlas Paxinos und Watson 1992, 0,3 mm posterior zu Bregma, 1 mm lateral von der Mittellinie, 1,2 mm unter der Schädeldecke) und mit Dentalzement an der Schädeldecke fixiert. Anschließend wurde der Skalp um die Führungskanüle herum vernäht.

Die Tiere erholten sich schnell von der Operation und konnten 1 Woche später in Versuchen verwendet werden. Nach Beendigung der Verhaltensexperimente wurden die Tiere mit einer Überdosis von Isoflouran getötet. Unter dem Lichtmikroskop wurde die korrekte Lage der Kanülen im lateralen Ventrikel bestätigt.

Isradipin wurde in 100 % Ethanol gelöst und als 2 µl Bolus über die intracerebroventrikuläre Kanüle in Endkonzentrationen von 1, 10 oder 100 µM (in 1 % Ethanol in H₂O) je nach Fragestellung 30 Minuten vor Versuchsbeginn oder aber direkt nach der Konditionierung der Tiere auf den Ton injiziert.

2.3.2. Auditorischer Angstlernversuch

Eine robuste Lernform, die spezifisch von der Funktion der Amygdala abhängt, kann durch Assoziation von einem konditionierten (*conditioned stimulus*; CS) und einem unkonditionierten Reiz (*unconditioned stimulus*; US) im auditorischen Angstlernversuch hervorgerufen werden (Stiedl and Spiess, 1997; Stiedl et al., 1999). Dabei wird der CS (Sinus-Ton, 9 kHz, 80 dB) dem Tier mit einem US (schwacher

Stromschlag – „Fußschock“, 0,7 mA) in einer definierten Umgebung (Kontext A) korterminierend präsentiert. Im Anschluss daran kann untersucht werden, ob die Tiere auf die Präsentation des CS alleine in einer veränderten Umgebung (Kontext B) mit typischen Angstreaktionen (totale Bewegungslosigkeit, *freezing*) reagieren, was für eine erlernte Assoziation von CS und US spricht (vergleiche Abbildung 3) (Davis, 1997; Fendt and Fanselow, 1999; LeDoux, 2000).

In vorliegenden Versuch bestand zusätzlich die Möglichkeit, den Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten des Experiments ICV Pharmaka zu verabreichen um damit ihr Lernverhalten zu beeinflussen.

Die Versuche wurden in einer Konditionierungskammer (MED Associates; USA) durchgeführt, das *freezing* Verhalten der Mäuse per Videoüberwachung aufgenommen und im Anschluss manuell verblindet mit Hilfe des Softwareprogramms *Winrat* (Max-Planck Institut für Psychiatrie, München) ausgewertet.

Der Versuchsablauf war wie folgt aufgebaut:

Tag 1 – Konditionierung:

Kontext A (Licht 2,5; Metallgitterboden, Kubuskäfig; Reinigung mit Ethanol)

Konditionierungsparameter:

- 180 s Pause (Präkonditionierung)
- 28 s Ton
- 2 s Ton + Fußschock
- 30 s Pause
-

Tag 2 – Test:

Kontext B (Licht 5,0; Bodeneinstreu, Zylinderbox; Reinigung mit 1% Essigsäure)

- 180 s Pause
- 180 s Ton
- 60 s Pause

2.4. Molekularbiologische Methoden

2.4.1. Genotypisierung der Mauslinien

2.4.1.1. Isolation genomischer DNA

Biopsiematerial aus der Schwanzspitze (s. 2.1.2.) wurde über Nacht bei 55 °C in 750 µl Lysepuffer (In mM: 100 Tris 5 EDTA, 0,2 % SDS, 200 NaCl, 1 mg Proteinase K) verdaut.

2.4.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Unter der Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) wird ein *in vitro* Verfahren zur gezielten Amplifikation von definierten Nukleinsäuresequenzen (Saiki et al., 1985; Mullis and Faloona, 1987) verstanden. Die DNA-Matrize wird zunächst durch Hitzedenaturierung (94 °C) in ihre beiden Einzelstränge aufgeschmolzen. An die so entstandenen Einzelstränge können nun spezifische Oligonukleotid-Primer binden, die einen Startpunkt für die DNA-Synthese durch eine DNA-Polymerase festlegen. Für die Reaktion können zwei Primer in großem molaren Überschuss verwendet werden, die sich zum einen an den kodierenden Strang (*forward* Primer) zum anderen an den nicht-kodierenden Strang (*reverse* Primer) der zu amplifizierenden DNA anlagern (*Primer Annealing*, 56 °C). Ausgehend von diesen beiden kurzen doppelsträngigen Bereichen wird der jeweils fehlende, komplementäre Einzelstrang in 5'→3'-Richtung synthetisiert (Elongation, 72 °C). Nach erneuter Denaturierung der DNA und dem *Primer-Annealing* erfolgt erneut eine Elongation durch die hitzestabile DNA-Polymerase. Mit jedem Zyklus kommt es im Idealfall zu einer Verdoppelung der DNA und damit in einer Kettenreaktion zu einer exponentiellen, selektiven Anreicherung der durch die Primer flankierten DNA-Sequenz. Theoretisch entstehen bei n Zyklen 2^{n-1} amplifizierte Moleküle.

Um zwischen Wildtyp-Allel, L1-Knockout und geflochten L2-Allelen im Genotyp der Nestin-Cre Tiere zu Unterscheiden wurden, anstelle eines Primerpaares drei Primer (Sequenzen siehe Anhang) verwendet, welche je nach Genotyp verschieden lange Fragmente erzeugen.

Die PCR wurde in einem *Thermo Cycler* der Firma Biometra (UNO Thermoblock; UNO II) durchgeführt. Als thermostabile DNA-Polymerase diente die Taq DNA-

Polymerase (5 U/μl) der Firma Promega. Als DNA Matrize wurden 1 μl der Verdaureaktion (s. 2.4.1.1.) verwendet.

Reaktionsansatz

Primer VI4 (10 pmol/μl)	1,25 μl
Primer VI8 (10 pmol/μl)	1,25 μl
Primer VI10 (10 pmol/μl)	1,25 μl
10 x PCR-Puffer (Promega)	2,5 μl
Taq Polymerase	0,25 μl
DNA	1 μl
H ₂ O	ad 25 μl

PCR-Programm

Phase	Initiale Denaturierung	Zyklus Nr. 1-35	Elongation
Denaturierung	94 °C, 1,5 min	94 °C, 30 s	
Annealing		56 °C, 1 min	
Polymerisation		72 °C, 1 min	
Elongation			72 °C, 10 min

2.5. Proteinbiochemische Methoden

2.5.1. Proteintrennung und –detektion

Die Auftrennung von Proteinen und Proteinkomplexen nach ihrer Größe im elektrischen Feld erfolgt mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Die meisten Proteine binden die Seife SDS (Natriumdodecylsulfat) zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen mit konstantem Ladungs zu Masse Verhältnis. Das Detergenz denaturiert die Proteine und dissoziiert Proteinkomplexe in ihre Untereinheiten.

Die Trennung im elektrischen Feld des Gels erfolgt anhand der Größe der SDS-Protein-Komplexe durch den Molekularsiebeffekt. Durch den Elektroblot werden anschliessend die im SDS-Gel getrennten Proteine auf eine proteinbindende Membran überführt. Anschliessend können die Proteine im Western Blot

immunologisch mit spezifischen Antikörpern identifiziert und durch einen gekoppelten Enzymassay sichtbar gemacht werden.

2.5.1.1. Probengewinnung

Aus koronaren Gehirnschnitten (2.2.2.) wurde die Amygdalae durch Verwendung einer Kanüle (MPI f. Psychiatrie, München) gestanzt. Das gewonnene Gewebe wurde in in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Zum Aufschluss wurde das Gewebe auf Trockeneis mit Mörser und Pistill zerkleinert, die Partikel in Eppendorf-Gefäße überführt und in 90 °C warmem 2% SDS/50 mM Tris (pH 7,4) gelöst (100 µl pro 10 mg Gewebe). Dieser Ansatz wurde 3 min gevortext, anschliessend für 10 min bei 95 °C gekocht und 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, um grobe Zelltrümmer abzutrennen. Abschließend wurde der Überstand, der die denaturierten Proteine enthält, in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bis zur Verwendung bei –80 °C gelagert.

2.5.1.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Es wurde eine spektrophotometrische Methode zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen (Lowry et al., 1951) verwendet. Dabei werden Metallionen in alkalischer Lösung durch Proteine reduziert. Aus zweiwertigen entstehen einwertige Kupferionen, die mit einem spezifischen Reagenz, der 2,2'-Bis(chinolin-4-carbonsäure) (BCA) einen violett gefärbten Komplex bilden. Die Extinktion dieses Komplexes kann bei 540 nm gemessen werden. Da die Intensität der Färbung von Reaktionszeit und Temperatur abhängt, muss parallel zu jeder Messreihe eine Eichkurve mit Lösungen bekannter Konzentration (0,5, 1, 2, 3, 4 µg BSA/50 µl H₂O) angefertigt werden.

Das bei Lagerung instabile BCA Reagenz (Pierce) wurde jeweils kurz vor Gebrauch nach Herstelleranweisungen angesetzt.

Nach Mischen der verdünnten Proteinlösungen (1:30 bis 1:500) mit dem BCA Reagenz wurde für 60 min bei 60 °C inkubiert und die Farbreaktion über einen ELISA-Reader (Titertek) ausgewertet. Anhand der Werte der Eichkurve ließ sich die gesuchte Proteinkonzentration berechnen.

2.5.1.3. Gelelektrophorese

SDS-Page Gele bestehen aus einer porösen Polyacrylamidmatrix. Durch die Änderung des Vernetzungsgrades von Acrylamid (AA) mit Bisacrylamid (BA) im Gel lassen sich die Trenneigenschaften des Gels variieren. Die Polymerisation des Gels erfolgt über eine radikalische Reaktion durch den Zusatz von Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalstarter und N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED) als Katalysator.

Das SDS-Polyacrylamidgelsystem besteht aus einem Trenngel (mit großer Porengröße) und Sammelgel (mit kleinerer Porengröße), wobei die Proteine erst das Sammelgel durchlaufen, in dem sie fokussiert und vorsortiert werden, um dann im Trenngel aufgetrennt zu werden.

Zur Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele wurden Gießvorrichtungen der Firma BioRad verwendet. Die Dicke der Gele betrug 0,75 mm, die Größe der Beladungstaschen 5 mm (10 Taschen pro Gel). Es wurden circa 4 ml des Trenngels in die Apparatur eingefüllt, mit Ethanol überschichtet und nach Abschluss der Polymerisation (circa 30 min) mit H₂O gewaschen. Nach Absaugen des Wassers wurde das Sammelgel über das Trenngel geschichtet.

Trenngel (10 %)

30 % AA/0,8 % BA (BioRad)	2,85 ml
1 M Tris/HCl, pH 8,8	1,8 ml
H ₂ O	3,7 ml
10 % SDS	83,5 µl
10 % APS (Sigma)	100 µl
TEMED (Sigma)	10 µl

Sammelgel (5 %)

30 % AA/0,8 % BA (BioRad)	415 µl
0,6 M Tris/HCl, pH 6,8	250 µl
H ₂ O	1,8 ml
10 % SDS	25 µl
10 % APS (Sigma)	25 µl
TEMED (Sigma)	5 µl

Die Proben wurden mit 6 x Auftragspuffer nach Laemmli verdünnt, 3 min bei 95 °C inkubiert, abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Als Proteingrößen-Standard diente der Precision Plus Protein™ Standard All Blue (BioRad). Die Elektrophorese wurde mit einer anliegenden Spannung von 50 V in Laufpuffer gestartet. Nachdem die Proteinfront das Trenngel erreichte, wurde die Spannung auf 80-100 V erhöht.

Auftragspuffer

200 mM Tris/HCl, pH 6,7
5 % SDS
200 mM DTT
0,04 % Bromphenolblau
40 % Glycerin

10 x Laufpuffer

250 mM Tris/HCl, pH 8,3
1,92 M Glycin (Roth)
1 % SDS

2.5.1.4. Elektroblot

Die Überführung auf eine proteinbindende Membran ermöglicht eine Identifizierung der nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine und macht sie für eine Immundetektion (s. 2.5.1.5.) zugänglich. Nach dem *Semi-Dry*-Verfahren werden die Proteine im elektrischen Feld vertikal auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon-P, Millipore) transferiert. Die elektrophoretisch aufgetrennten Proben wurden in einer Transfer-Apparatur der Firma Novablot auf die Membran übertragen. Die Blottingapparatur wurde wie folgt aufgebaut:

Anodenlösung I

36,3 g Tris-base
200 ml Methanol
1000 ml H ₂ O
pH 10,4

Anodenlösung II

3,03 Tris-Base
200 ml Methanol
1000 ml H ₂ O
pH 10,4

Kathodenlösung

5,2 g 6-Aminohexansäure
3,03 g Tris-Base
200 ml Methanol
1000 ml H ₂ O
pH 7,6

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

Filter (GB002, Schleicher & Schüll) und Membran wurden auf die Größe des SDS-Polyacrylamidgels zugeschnitten, der Blot luftblasenfrei aufgebaut und die Proteine 1 h bei konstanter Stromstärke von 0,8 mA/cm² auf die Membran transferiert.

2.5.1.5. Western Blot (Immundetektion)

Im Western Blot können Proteine mit spezifischen Antikörpern dekoriert und durch einen gekoppelten Enzymassay sichtbar gemacht werden.

Die Methode setzt die Auftrennung der Proteine im SDS-PAGE und Überführung auf eine (PVDF)-Membran voraus, und ermöglicht je nach Qualität des verwendeten Antikörpers eine sehr sensitive und spezifische Detektion eines Proteins.

Um unspezifische Bindungen des Antikörpers an die Membran zu minimieren, wurde diese nach dem Elektroblothen über Nacht bei 4 °C in 3 % Albumin aus Rinderblutserum (BSA)-Lösung blockiert. Am folgenden Tag wurde die Membran mit

spezifischen Antikörpern (primäre Antikörper; s. Tabelle im Anhang) für 2 h bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler inkubiert. Die Membran wurde anschließend gewaschen (3 x 10 min in 1 x TBST/1 % Milchpulver) und für weitere 2 h mit einem an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten anti-Immunglobulin-Antikörper (sekundärer Antikörper; s. Tabelle im Anhang) inkubiert.

10 x TBS

12,1 g Tris-Base
87,6 g NaCl
1000 ml H ₂ O
pH 8,2

TBST

1 x TBS mit 0,1 % Tween 20 mischen

Nach erneutem Waschen (3 x 10 min in 1 x TBST) wurde der Antigen-Antikörperkomplex durch eine Chemilumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht.

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

Hierfür wurde die Membran mit dem Chemilumineszenzreagenz der Firma NEN Life Science Products für 1 min inkubiert, die Membran in Klarsichtfolie eingewickelt und durch Auflegen eines Films (*Hyperfilm*, Amersham) detektiert. Die Belichtungszeiten variierten von 1 bis 30 min. Die Filme wurden zum Abschluss mit einer Entwicklermaschine der Firma Agfa (Curix 60) entwickelt.

Die in der Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper sind im Anhang in Tabelle 6.3. und 6.4. aufgeführt.

2.6. Histologische Methoden

Um die Morphologie verschiedener Regionen des zentralen Nervensystems untersuchen zu können, wurden verschiedene Präparations- und Färbetechniken eingesetzt.

2.6.1. Anfertigung von Gefrierschnitten

Die entnommenen Gehirne wurden schonend in 2-Methylbutan bei -20 °C langsam eingefroren und anschließend in einem Kryostaten (Leica) bei -20 °C 80-240 μm dick coronar geschnitten. Die Schnitte wurden auf Polylysin beschichtete Objektträger (Menzel) aufgebracht und bei -80 °C aufbewahrt.

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

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

2.6.2. Golgi-Cox Färbung

Um eine detaillierte Aussage über die Morphologie der untersuchten Gehirnregionen treffen zu können, wurde eine Golgi-Cox Färbung mit dem *FD Rapid GolgiStainTM Kit* der Firma FD NeuroTechnologies durchgeführt. Die Methode ermöglicht die Anfärbung von Neuronen und Gliazellen und es können sogar Veränderungen in neuronalen Dendriten und dendritischen Spines detektiert werden, sofern vorhanden. Das Kit basiert auf Methoden, die von Ramon-Moliner (1970) und Glaser und Van der Loos (1981) beschrieben wurden.

Alle benötigten Reagenzien und Lösungen waren im Kit bereitgestellt.

2.6.3. Scholl Analyse, Bestimmung der Dendritenordnung und Anzahl der Spines

Die Scholl Analyse wurde zur Untersuchung der Länge von Dendriten hippocampaler pyramidaler Neuronen angewendet. Dazu wurden Fotos der Golgi-gefärbten Gehirnschnitte bei 100-facher Vergrößerung angefertigt. Zur Scholl-Analyse werden vom Zellkörper eines Neurons aus konzentrische Ringe in Abständen von 20 μm

gezeichnet. Maß für die Länge der Dendriten ist die Anzahl der Schollringe, welche von den Dendriten des Neurons durchquert werden.

Vom Zellkörper ausgehend wurde jede Verästelung des Dendriten festgehalten um die Ordnung des Dendriten zu bestimmen. Nach der ersten Verästelung handelt es sich um Dendriten zweiter Ordnung, danach dritter Ordnung etc. Zusätzlich wurde die mittlere Anzahl der Spines pro Dendrit ermittelt.

2.6.4 *In-situ* Hybridisierung von Ca_v1.2 und Ca_v1.3 mRNA

Die *In-situ*-Hybridisierung wurde von Frau Dr. Nicole Langwieser durchgeführt und freundlicherweise für die Verwendung in dieser Arbeit freigestellt. Diese Methode wird angewendet, um *messenger* RNA (mRNA) direkt im Gewebe (*in situ*) nachzuweisen. Für die Lokalisation der Ca_v1.2 und Ca_v1.3 Untereinheiten im Schnitt wurden 200-300 bp lange DNA Sequenzen (Ca_v1.2: nt 2355-2628; Ca_v1.3: AS 777-858), die einem Abschnitt der zu untersuchenden mRNS entsprechen, in Transkriptionsvektoren (pAL und pCRII TOPO) kloniert. Nach Linearisierung der Plasmide (mit *Bam*HI bzw. *Asp*718) wird durch DNS-abhängige RNA-Polymerasen cRNA synthetisiert. Je nach Orientierung entsteht ein *antisense* Gegenstrang, der komplementär zur mRNA ist, oder ein *sense* Strang. Durch den Einbau von ³⁵S-UTP werden die RNASonden radioaktiv markiert. Nach Zugabe der radioaktiven Sonden auf vorbehandelte Gewebeschnitte (s. 2.4.19) bildet die *antisense* Sonde ein stabiles mRNS/cRNS-Hybrid aus. Durch die Zugabe von RNase A wird spezifisch einzelsträngige RNA abgebaut, das doppelsträngige Hybrid bleibt stabil. Durch Autoradiographie wird die Hybridisierung sichtbar gemacht.

10 x PBS		1 M Tris		0,5 M EDTA	
NaCl	80 g	Tris-Base (ICN)	121 g	Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O (Roth)	186,1 g
KCl	2 g	H ₂ O	ad 1000 ml	H ₂ O	ad 1000 ml
Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)	6,2 g	pH 7,5 bzw. 8,0		pH 8,0	
KH ₂ PO ₄	2 g				
H ₂ O pH 7,4	ad1000 ml				

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

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

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

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

2.6.4.1 Herstellung der RNA-Sonden

Für jede cRNA-Sonde wurden jeweils 20 µg der entsprechenden Plasmid-DNA mit *Bam*HI und *Asp*718 in 2 getrennten Ansätzen linearisiert, mittels Phenol/Chloroform-Extraktion gefällt, in 11 µl H₂O gelöst und bei -20°C gelagert. In der anschließenden *in vitro* Transkription synthetisieren die jeweiligen RNA-Polymerasen die *antisense* bzw. *sense* Sonden, die nun radioaktiv markiert sind. Nach Abschluss der *in vitro* Transkription wird durch Zugabe von DNase I (Roche) die DNA Matrize abgebaut, der Ansatz chromatographisch gereinigt (NickTM Column, Pharmacia) und aufgetrennt. Von den dadurch gesammelten Fraktionen 1-5 wurden jeweils 2 µl in ein Plastikgefäß überführt, 2 ml Szintillationsflüssigkeit (Roth) zugegeben und die Aktivität im Szintillationszähler vermessen. Die radioaktiv markierten Sonden sollten sich in Fraktion 2 befinden. Das notwendige Endvolumen des Hybridisierungspuffers wurde folgendermaßen berechnet:

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

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

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

2.6.4.2 Standardprotokoll für die *in-situ* Hybridisierung

Protokoll:

- Getrocknete, fixierte Gewebeschnitte (2.6.1.) wurden für 15 min mit 7 µg/µl Proteinase K (Roche) in 1 x Protease-Puffer vorbehandelt
- 10 min in 0,5 x SSC
- Azetylierung, um unspezifische Bindungen der Sonden zu vermeiden:
 - 3 min 0,1 M TEA (Triethylammoniumazetat)
 - 10 min in 0,25% Azetanhydrid-Lösung
- 2 x 2 min in 2 x SSC
- Dehydrierung der Schnitte:
 - je 5 min in 50%, 70%, 95%, 100% Ethanol
- 5 min lufttrocknen
- 30 min vakuumtrocknen

Prähybridisierung:

Die Objektträger (OT) wurden in eine dicht verschließbare Kammer waagrecht auf ein Gitter gelegt und die Schnitte mit je 70 µl 1 x Hybridisierungspuffer bedeckt. Um die Schnitte vor dem Austrocknen zu bewahren, wurde mittels Box-Puffer getränkten Papiertüchern ein feuchtes Milieu in der Kammer erzeugt.

Die Prähybridisierung erfolgte für 2-3 h bei 42°C in einem Ofen (Hybaid).

Hybridisierung:

Die Sonden wurden für 10 min bei 65°C erhitzt und zu den 1,2 ml Aliquots wurden 100 µl 1 M DTT zugegeben. Für die Hybridisierung wurden dann pro Schnitt 70 µl der *antisense* bzw. *sense* Sonde zu den bereits prähybridisierten Schnitten hinzugefügt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 55°C in einem Ofen (Hybaid). Am folgenden Tag wurden die OTs von unspezifisch gebundener Sonde befreit. Die folgenden Waschlösungen enthielten 1 mM DTT und 1 mM EDTA pH 8,0.

2 x 10 min 2 x SSC

30 min in 10 mg/ml RNase A in 1 x RNase A-Puffer

2 x 10 min 2 x SSC

2 x 1 h in 0,1 x SSC bei 60-70°C im Wasserbad

3 x 10 min 0,5 x SSC

Dehydrierung der Schnitte:

je 5 min in 50%, 70%, 95%, 100% Ethanol (+ je 2,3% Ammoniumazetat)

5 min lufttrocknen

30 min vakuumtrocknen

die trockenen OTs wurden auf einen Karton aufgeklebt und ein Film (Kodak BioMAX MR) aufgelegt. Nach 4-20 Tagen Exposition wurde der Film entwickelt

2.7. Statistik

Zur statistische Analyse wurden die Programme EXCEL2000 (Microsoft), Origin 7.5 (OriginLab Co., Northampton, MA, USA) und Prism 4 (Graph Pad Software Inc.) verwendet. In dieser Arbeit dargestellte Mittelwerte sind mit \pm Standardfehler (SEM) des Mittelwerts angegeben. Statistische Auswertungen wurden mittels ANOVA; Tukey *post hoc* Test, Wilcoxon signed rank Test und t-Tests durchgeführt, um Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu evaluieren. Der jeweilige zur statistischen Auswertung angewendete Test wird bei den Ergebnissen mit angegeben. Das gewählte Signifikanzniveau betrug $p < 0,05$.

3. Ergebnisse

3.1. Die Induktion Hebbscher LTP an thalamo-amydalären Synapsen hängt von L-Typ Kalziumkanälen ab

Die LTP pyramidalen Neuronen der LA ist die molekulare Basis für auditorische Angstkonditionierung und Gedächtnis (Schafe and LeDoux, 2000; Bauer et al., 2001; Bauer et al., 2002; Tsvetkov et al., 2002). Im ZNS werden zwei der vier bekannten L-Typ Kalziumkanäle, $Ca_v1.2$ und $Ca_v1.3$, exprimiert (Catterall, 2000; Striessnig et al., 2006). $Ca_v1.2$ wird in der LA dabei sehr viel stärker exprimiert als $Ca_v1.3$. Die in Abbildung 9 gezeigte In-situ Hybridisierung bestätigt diese Feststellung.

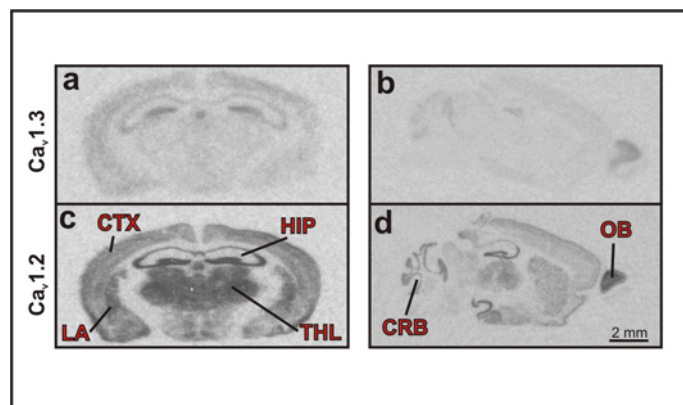


Abbildung 9: *In-situ* Hybridisierung auf den $Ca_v1.2$ und $Ca_v1.3$ Kalziumkanal. a) und c) zeigen frontale Schnitte durch das Mäusegehirn mit Expression der $Ca_v1.3$ (a) und der $Ca_v1.2$ (c) mRNA. b) und d) zeigen sagittale Schnitte durch das Mäusegehirn. Die Expression von $Ca_v1.2$ ist auf mRNA Ebene stärker als von $Ca_v1.3$. Besonders starke Expression von $Ca_v1.2$ ist im Bulbus (OB), Cerebellum (CRB), Thalamus (THL), Kortex (CTX), Hippocampus (HIP) und der lateralen Amygdala (LA) zu detektieren.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Bedeutung dieser Kalziumkanäle für die Induktion von LTP sowie für das Angstgedächtnis untersucht werden. Vor Beginn der LTP-Untersuchungen musste durch eine Grundcharakterisierung der Zellen festgestellt werden, ob diese durch die verschiedenen pharmakologischen oder genetischen Veränderungen in Ihren Grundeigenschaften verändert wurden.

3.1.1. Grundcharakterisierung pyramidalen Neurone der LA

Abbildung 10 zeigt die typische Spannungsantwort eines pyramidalen Neurons auf das in Kapitel 2.2.5. beschriebene Strominjektionsprotokoll. Aus den so gewonnenen Spannungskurven konnten das Ruhemembranpotential (RP), die Schwelle zur

Auslösung von APs, die Latenz des ersten AP, der Eingangswiderstand (*input resistance*, IR) des Neurons und die frequency adaptation der AP-Folge berechnet werden. Daten aus den verschiedenen, in der Arbeit beschriebenen pharmakologisch behandelten oder genetisch beeinflussten Schnitten sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (ANOVA, $p > 0,05$ *post hoc* Tukey) festgestellt werden. Daraus liess sich schlussfolgern, dass bei der synaptischen Plastizität und Lernverhalten beobachteten Unterschiede nicht auf eine Veränderung dieser Parameter zurückzuführen waren.

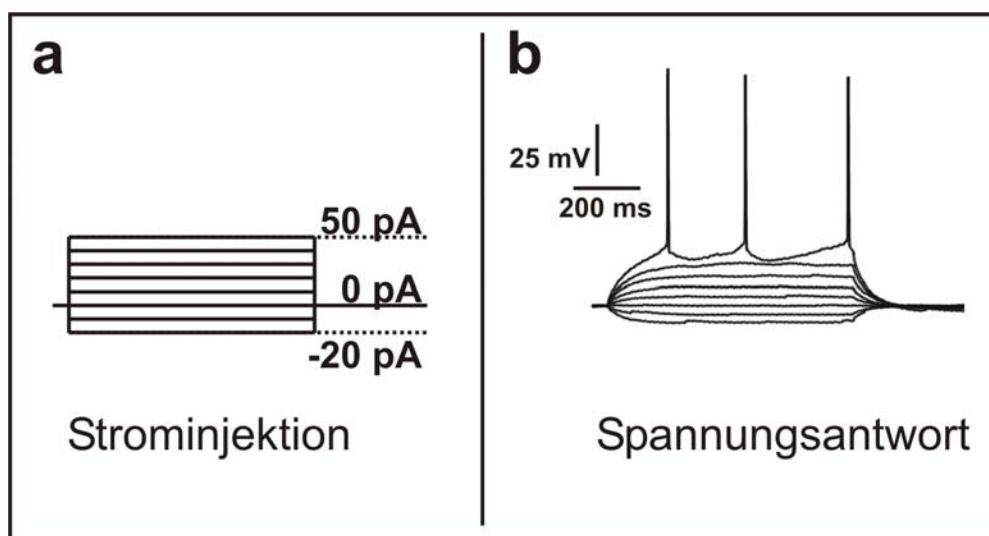


Abbildung 10: Elektrophysiologische Charakterisierung pyramidalen Neuronen.

a) Strominjektionsprotokoll zur Charakterisierung pyramidalen Neuronen der LA. Die Zellen wurden bei 0 pA in der current-clamp Konfiguration gehalten. Stufenweise wurden ansteigende Strominjektionen von -20 bis 50 pA im Abstand von 10 s appliziert. b) Typische Spannungsantwort des Neurons auf das links abgebildete Strominjektionsprotokoll. Bei Strominjektionen mit negativem Vorzeichen hyperpolarisiert die Zelle. Bei positiv gepolten Strominjektionen depolarisiert die Zelle. Nach Injektion eines Stroms von ca. 50 pA erreicht das Membranpotential die Schwelle zur Auslösung von AP, erkennbar an der schnellen De- und Repolarisierung des Membranpotentials.

Tabelle 1: Grundcharakterisierung pyramidalen Neuronen der LA

	Ctr (BI6)	Ctr (Nestin)	10 μ M Isra	KO
AP-Schwelle [mV]	-43,06 +/- 1,13	-42,98 +/- 1,12	-41,06 +/- 1,17	-43,30 +/- 0,54
Ruhemembranpotential [mV]	-63,80 +/- 1,36	-64,67 +/- 0,71	-64,00 +/- 1,14	-66,17 +/- 1,49
AP-Latenz [ms]	185,20 +/- 32,89	180,00 +/- 14,37	150,40 +/- 19,25	191,30 +/- 27,20
frequency adaptation	1,36 +/- 0,16	1,20 +/- 0,07	1,39 +/- 0,11	1,65 +/- 0,17
Input resistance [MOhm]	284,00 +/- 37,00	362,00 +/- 23,00	226,00 +/- 16,00	318,00 +/- 70,00

Auflistung der aus der Grundcharakterisierung ermittelten elektrophysiologischen Parameter pyramidalen Neurone der LA aus Schnitten von Kontrolltiere ohne (Ctr BI6; n=5) und mit Nestin vermittelter Cre Expression (Ctr Nestin; n=6), unter Beeinflussung durch 10 μ M Isradipin (10 μ M Isra; n=5) und aus $Ca_v1.2^{NesCre}$ (KO; n=6) Tieren. Keine Gruppe zeigte signifikante Unterschiede bezüglich der festgestellten Parameter (ANOVA, $p > 0,05$ *post hoc* Tukey).

3.1.2. LTP Induktion mit einem Tetanus-Protokoll

Nach abgeschlossener Grundcharakterisierung sollte die Abhängigkeit der LTP, also Hebbscher synaptischer Plastizität, in pyramidalen Neuronen der LA von der Funktion von $Ca_v1.2$ ermittelt werden.

Zur LTP Induktion, wurde präsynaptisch mit hoher Frequenz (100 Hz) gereizt und die Zelle postsynaptisch durch Strominjektionen bis kurz unter die Schwelle zur Ausbildung eines AP des Neurons depolarisiert (s. 2.2.7.3.). Dieses Protokoll erzeugte in Kontrollschnitten einen Anstieg des EPSP slope auf $151,1 \% \pm 9,8 \%$ (gemittelt über 30 Minuten nach LTP Induktion) des Grundlinienwertes (Abbildung 11). Diese LTP war dabei signifikant gegenüber dem Grundlinienwert von 100 % erhöht (Wilcoxon signed rank Test $p < 0,05$).

Durch Applikation von 10 μM des selektiven L-Typ Kalziumkanal-Antagonisten Isradipin wurde die Ausbildung von LTP vollständig verhindert. Die EPSP slope war dabei zur Kontrollgruppe signifikant verringert (ANOVA, $p < 0,001$ *post hoc* Tukey) und erreichte einen Wert von $110,3 \% \pm 8,9 \%$, der nicht signifikant unterschiedlich zum Grundlinienwert war (Wilcoxon signed rank Test, $p > 0,2$).

In der Literatur finden sich viele Hinweise auf NMDAR-Abhängigkeit von LTP in der LA (Huang and Kandel, 1998; Weisskopf et al., 1999; Bauer et al., 2002). Als interne Kontrolle des hier verwendeten LTP Induktions- Protokolls wurde deshalb der selektive NR2B-NMDAR Antagonist Ifenprodil verwendet. Schnitte, welche mit 10 μM Ifenprodil behandelt wurden, wiesen ebenfalls eine vollständige Inhibition der LTP auf ($100,2 \% \pm 11,9 \%$, ANOVA, $p < 0,001$ *post hoc* Tukey und Wilcoxon signed rank Test zur Grundlinie $p > 0,5$ - Abbildung 11).

Somit konnte gezeigt werden, dass LTP Induktion in den pyramidalen Neuronen der LA kritisch von der Funktion von $Ca_v1.x$ L-Typ Kalziukanälen abhängt. Im Folgenden sollte im genetischen Modell geklärt werden, welcher $Ca_v1.x$ Subtyp, $Ca_v1.2$ oder $Ca_v1.3$, hierfür verantwortlich ist.

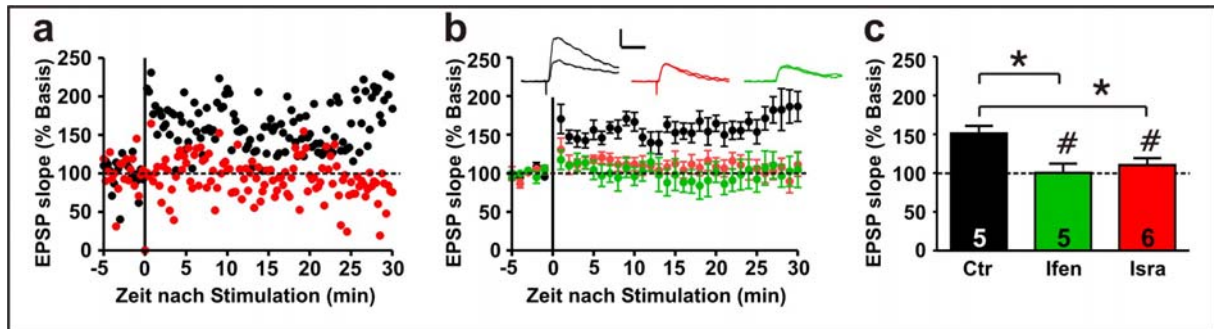


Abbildung 11: LTP Induktion in der LA mit einem Tetanus Protokoll.

a) Gezeigt sind die Verläufe der EPSP slopes aus zwei Beispielmessungen, *schwarz*-unter Kontrollbedingungen, *rot*- während der Superfusion mit 10 μ M Isradipin. Die Werte sind auf die jeweilige Grundlinie normalisiert. b) Statistische Analyse des Verlaufs der EPSP slope der einzelnen Messgruppen. Es wurden die Messwerte jeweils einer Minute zusammengefasst. Der Verlauf wurde über 30 Minuten verfolgt. *Schwarz*- Kontrollgruppe (n=5), *rot*- 10 μ M Isradipin (n=6), *grün*- 10 μ M Ifenprodil (n=5). Die Abbildungen über dem Graphen sind repräsentative EPSP Kurven aus den vier Gruppen vor und nach LTP Stimulation. Die Balken repräsentieren 5 mV (vertikal) und 50 ms (horizontal). c) Der LTP Mittelwert über 30 Minuten ist je nach pharmakologischer Behandlung im Balkendiagramm dargestellt. *Schwarz*- Kontrollgruppe (Ctr, n=5), *grün*- 10 μ M Ifenprodil (Ifen, n=5), *rot*- 10 μ M Isradipin (Isra, n=6). Der Wert der Kontrollgruppe ist signifikant unterschiedlich zu den anderen beiden Gruppen (*ANOVA, $p < 0,001$, *post hoc* Tukey). Die Isradipin-Gruppe und die Ifenprodil-Gruppe lagen auf Grundlinienniveau (# Wilcoxon signed rank test, $p > 0,2$).

3.2. Nachweis des gehirnspezifischen CACNA1C-Knockout

Im Gehirn werden zwei Vertreter der L-Typ Kalziumkanäle exprimiert, $Ca_v1.2$ und $Ca_v1.3$. Um diese funktionell im Versuch unterscheiden zu können wurde $Ca_v1.2$ genetisch gehirnspezifisch ausgeschaltet (s. 2.1.1.1.).

3.2.1. Histologische und Immunologische Untersuchung der $Ca_v1.2^{NesCre}$

Tiere

Mäuse mit globalem Knockout des *CACNA1C* Gens sterben *in utero* (Seisenberger et al., 2000). Aus diesem Grund wurden Tiere verwendet, welche die in Kapitel 2.1.1.1. erwähnten, geflochten Allele des *CACNA1C* Gens tragen. Um eine gehirnspezifischen Deletion von $Ca_v1.2$ zu erreichen, wurde die Cre-Expression in den Versuchstieren unter die Kontrolle des Nestin-Promotors (Tronche et al., 1999) gestellt. Diese $Ca_v1.2^{NesCre}$ Mäuse weisen eine normale Lebenserwartung und normales Körpergewicht auf. Die Gehirne der Mäuse zeigten keine offensichtlichen grob-morphologischen Defekte.

Um auszuschließen, dass mögliche Unterschiede im Verhalten von $Ca_v1.2^{NesCre}$ Mäusen auf einer Veränderung des Dendritenwachstums oder anderen zentralvervösten mikroanatomischen Abnormalitäten basieren, wurden die

Dendritenlänge, die Verästelung des Dendritenbaumes und die Dichte dendritischer Boutons (*Spines*) in einer Scholl-Analyse untersucht (Scholl, 1955) (Abbildung 12). Diese Untersuchungen wurden an pyramidalen Neuronen des Hippokampus durchgeführt, da dieser Hirnbereich einen weitaus geordneteren Aufbau als die LA besitzt. Es konnten in keinem der Vergleiche Unterschiede zwischen **Ca_v1.2^{NesCre}** Schnitten und Schnitten aus Wurfgeschwistern als Kontrollen festgestellt werden (t-Test, $p > 0,05$, $n = 10$).

Um die Effizienz des gehirnspezifischen Knockouts von Ca_v1.2 zu bestätigen, wurden Gewebeproben verschiedener Gehirnbereiche im Westernblot auf die Expression Ca_v1.2-Protein untersucht. In Proteinextrakten aus dem Hippokampus, Neokortex, Cerebellum, olfaktorischen Bulbus und der Amygdala von **Ca_v1.2^{NesCre}** Tieren konnte immunologisch kein Ca_v1.2 Protein nachgewiesen werden (Abbildung 12c).

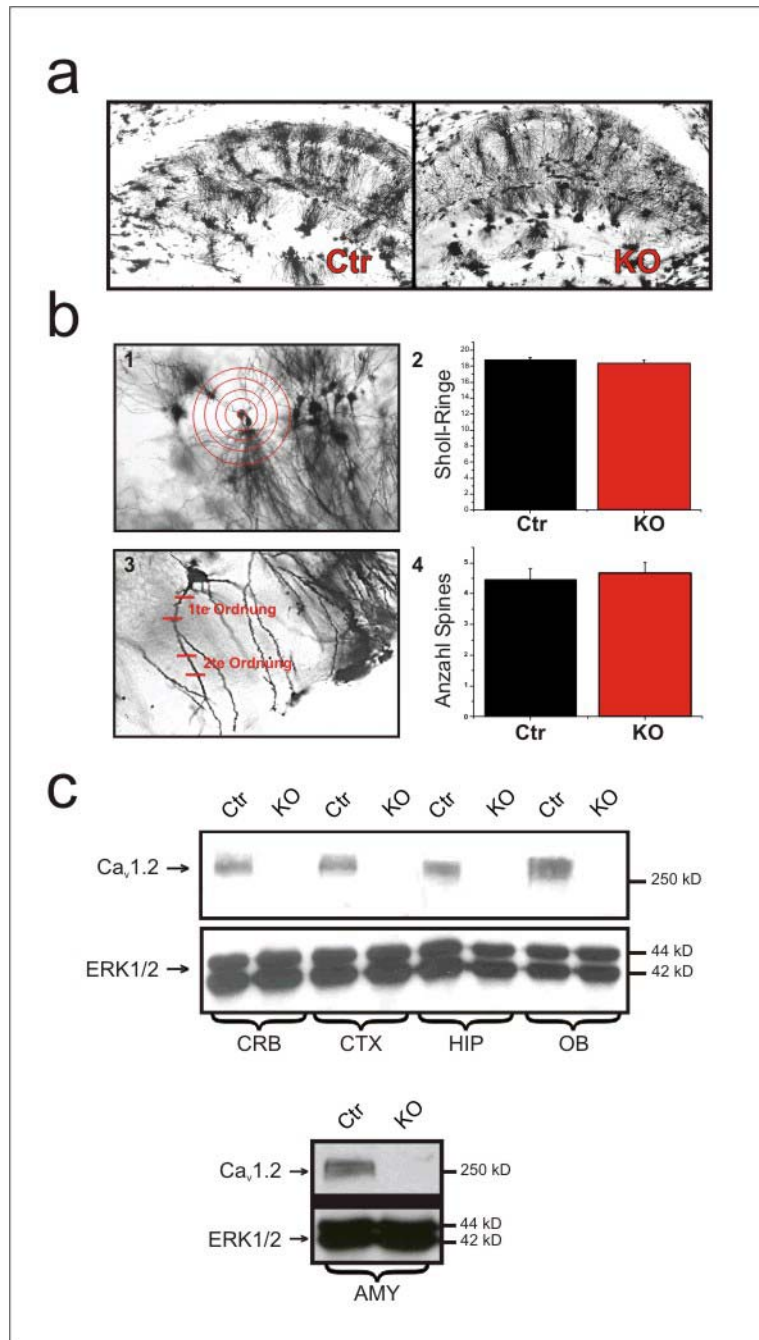


Abbildung 12: Mikronatomische Charakterisierung pyramidalen Neuronen.
 a) Golgifärbung der CA1 Region des Hippokampus von Kontrolltieren (Ctr) und $Ca_v1.2^{NesCre}$ Tieren (KO). b) (1) Beispiel für eine Sholl Analyse. Vom Zellkörper ausgehend werden konzentrische Ringe gezeichnet. Die Anzahl der von den Dendriten durchlaufenen Ringe ist in 2 angegeben. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolltieren (Ctr) und $Ca_v1.2^{NesCre}$ Tieren (KO) (t-Test, $p > 0,05$, $n = 10$). (3) Zählung der Verästelung der Dendriten in Kontrolltieren (Ctr) und $Ca_v1.2^{NesCre}$ Tieren (KO). Die Mittelwerte der Ordnung beider Gruppen war nicht signifikant unterschiedlich (t-Test, $p > 0,05$, $n = 10$). (4) Mittlere Anzahl der Spines der Dendriten in Kontrolltieren (Ctr) und $Ca_v1.2^{NesCre}$ Tieren (KO). Beiden Gruppen waren nicht signifikant unterschiedlich (t-Test, $p > 0,05$, $n = 10$). c) Westernblot Analyse für $Ca_v1.2$ in Gewebe aus verschiedenen Bereichen des Gehirns (CRB- Cerebellum; CTX- Kortex; HIP- Hippokampus; OB- olfaktorischer Bulbus; AMY- Amygdala) von Kontrolltieren (Ctr) und $Ca_v1.2^{NesCre}$ Tieren (KO). Als Ladekontrolle diente ERK1/2.

Ca_v1.3 Protein konnte mit kommerziell erhältlichen Antikörpern immunologisch im ZNS weder in Kontrollen noch in **Ca_v1.2^{NesCre}** Tieren nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Um den Knockout von Cav1.2 in den pyramidalen Neuronen der LA auch funktionell zu bestätigen, sollten im folgenden L-Typ Kalziumströme in der LA gemessen werden.

3.2.2. Elektrophysiologischer Nachweis des CACNA1C Knockout in pyramidalen Neuronen der LA

High-voltage aktivierte (HVA) Kalziumkanäle, zu denen auch die DHP-sensitiven L-Typ Kalziumkanäle gehören, besitzen eine ähnliche Leitfähigkeit für Barium wie für Kalzium (Armstrong and Neyton, 1991). Durch die Messung des Bariumstromes I_{Ba} werden, gegenüber der Verwendung von Kalzium als Ladungsträger, zeitlich stabilere Strommessungen möglich, da Barium nicht die Aktivität von L-Typ Kalziumkanälen verändert. In Neuronen werden neben den postsynaptischen Ca_v1.x Kanälen auch die für die präsynaptische Transmitterfreisetzung verantwortlichen Ca_v2.x Kanäle exprimiert (Trimmer and Rhodes, 2004). Bei whole-cell Messungen des I_{Ba} tragen all diese Kanäle zum Gesamtstrom bei.

Um L-Typ Ströme pharmakologisch aus dem Gesamtstrom zu isolieren, wurde die DHP sensitive Komponente des I_{Ba} in pyramidalen Neuronen gemessen (Abbildung 13). Da Ca_v1.3 eine erhöhte IC₅₀ für das DHP Isradipin im Vergleich zu Ca_v1.2 besitzt (Xu and Lipscombe, 2001), wurde in diesem Versuch eine an die IC₅₀ von Ca_v1.3 angepasste, hohe Dosis (20 μM) von Isradipin verwendet. Während in Schnitten aus Kontrolltieren die Superfusion mit Isradipin zu einer signifikanten Reduktion der maximalen I_{Ba} Amplitude führte (76 % ± 3 %), wiesen Gehirnschnitte von **Ca_v1.2^{NesCre}** Tieren keine DHP sensitive Komponente auf (103 % ± 4 %; signifikant unterschiedlich zur Ctr, t-Test, p<0,001; n=5).

Somit konnte gezeigt werden, dass der genetische Knockout von Cav1.2 zu einem vollständigen funktionellen Verlust von L-Typ Kalziumkanälen führt. Ausserdem legt dieses Ergebnis nahe, dass Ca_v1.3 Kanäle keinen Beitrag zu I_{Ca} in pyramidalen Neuronen der LA leisten. Dieses Ergebnis bestätigt Untersuchungen an Mäusemutanten, welche eine DHP-insensitive Form von Ca_v1.2 exprimieren (Hetzenauer et al., 2006).

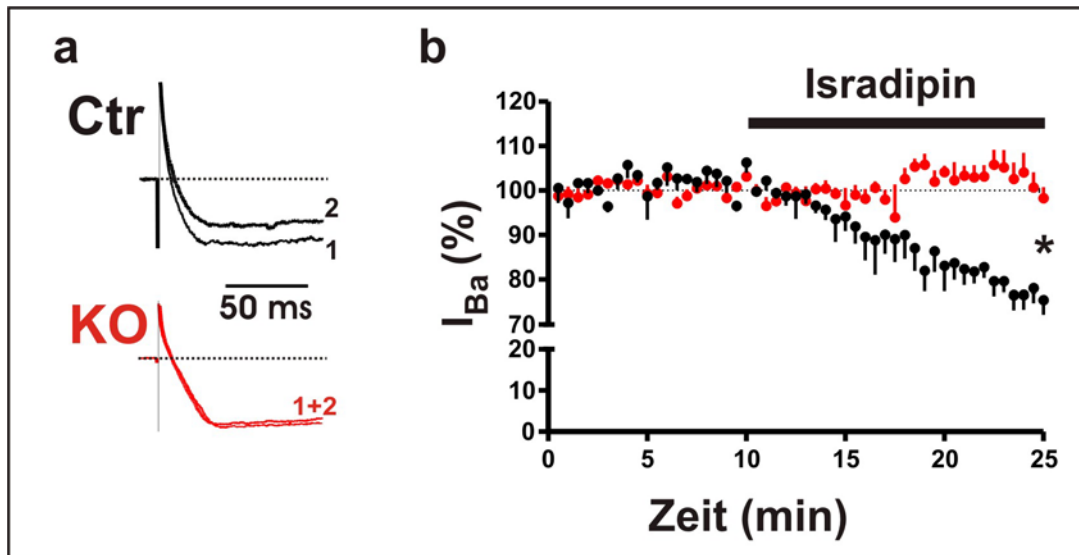


Abbildung 13: I_{Ba} in pyramidalen Neuronen der LA aus Kontrolltieren (Ctr) und $Ca_v1.2^{NesCre}$ Tieren (KO).

a) Normalisierte Beispielströme aus Zellen beider Genotypen vor (1) und während (2) Superfusion mit 20 μM Isradipin bei Depolarisation von -60 mV auf -5 mV. b) Auf die Basiswerte vor Behandlung gemittelter, zeitlicher Verlauf der maximalen Amplitude des I_{Ba} während (Balken) Behandlung mit 20 μM Isradipin. *Schwarz-* Schnitte aus Kontrolltieren (Ctr, $n=5$), *rot-* $Ca_v1.2^{NesCre}$ Präparate (KO, $n=5$). Statistisch verglichen wurden jeweils der Mittelwert der maximalen Amplitude beider Gruppen 15 min nach Beginn der Applikation mit Isradipin (*t-Test, $p<0,001$).

Durch die histologische, biochemische und elektrophysiologische Charakterisierung konnte gezeigt werden, dass $Ca_v1.2^{NesCre}$ Tiere ein geeignetes Modell sind, um den spezifischen Beitrag von $Ca_v1.2$ für die synaptische Plastizität und das Lernverhalten in der LA zu bestimmen. Im Folgenden sollte nun mittels auditorischer Angstkonditionierung der Beitrag von $Ca_v1.2$ zum Amygdala-abhängigen Lernen bestimmt werden.

3.3. Akute Hemmung von $Ca_v1.2$ Kalziumkanälen unterdrückt auditorische Angstkonditionierung, chronische Deletion nicht

Die Funktion von L-Typ Kalziumkanälen für die auditorische Angstkonditionierung wurde zunächst durch akute Hemmung von $Ca_v1.x$ durch Isradipin untersucht.

Es wurden den Tieren entweder 30 Minuten vor oder direkt nach Konditionierung im auditorischen Angstlernversuch (s. 2.3.) ICV 2 μl Bolusinjektionen von Isradipin in verschiedenen Konzentrationen (0, 10, 100 μM) verabreicht. Dabei konnte festgestellt werden, dass das DHP Isradipin dosisabhängig das Amygdala-abhängige Erlernen der Assoziation aus CS und US unterdrückte (Abbildung 14a). Durch eine vor der Konditionierung verabreichte hohe Dosis (100 μM ; $N=14$) des L-Typ Kalziumkanal-spezifischen Antagonisten wurde das freezing der Tiere signifikant

gegenüber der Kontrollgruppe (N=15) vermindert (ANOVA, $p < 0,01$ *post hoc* Newman Keuls). Injektionen niedrigerer Dosis (10 μM ; N=10) hatten keinen signifikanten Effekt auf das freezing-Verhalten gegenüber der Kontrollgruppe. Injektionen des DHP nach Konditionierung bewirkten keinerlei Beeinträchtigung des Lernverhaltens der Tiere (Abbildung 14b).

Die akute Inhibition von $\text{Ca}_v1.2$ (dem einzigen funktionell in der LA exprimierten L-Typ Kalziumkanal) führte demnach zum Verlust der Amygdala-abhängigen Konditionierung im auditorischen Angstlernversuch.

Um diese pharmakologisch erhobenen Ergebnisse im genetischen Versuchsansatz zu festigen, sollte die Beeinflussung der Angstkonditionierung durch den chronischen Verlust des für $\text{Ca}_v1.2$ kodierenden *CACNA1C* Gens untersucht werden.

Es musste dabei zuerst sichergestellt werden, dass **$\text{Ca}_v1.2^{\text{NesCre}}$** Mäuse, im Vergleich zur Kontrollgruppe, keine Veränderungen in ihrer Grundaktivität oder Schmerzwahrnehmung besitzen. Zur Quantifizierung der Schmerzwahrnehmung wurden Mäuse beider Versuchsgruppen Stromschlägen aufsteigender Intensität ausgesetzt. Als Zeichen der Schmerzwahrnehmung wurden Lautgebung sowie plötzliches Aufspringen gewertet. Zwischen den Gruppen konnte dabei keine signifikanter Unterschied bei der Schmerzschwelle festgestellt werden (0,34 mA vs. 0,38 mA, t-Test, $p > 0,7$, N=5).

Zur Bestimmung der Aktivitätsniveaus der Gruppen wurde mit Hilfe von Lichtschranken in der Konditionierungskammer (MED Associates; USA) der Zeitanteil bestimmt, in dem sich naive Tiere in dieser ihnen fremden Umgebung horizontal fortbewegen. Die Aktivität der **$\text{Ca}_v1.2^{\text{NesCre}}$** Versuchsgruppe belief sich auf $31,2 \% \pm 2,1 \%$ und unterschied sich dabei nicht signifikant von der Grundaktivität $28,2 \% \pm 2,1 \%$ der Kontrollgruppe (t-Test, $p > 0,05$, N=9).

Da die Versuchsgruppen sich nicht in ihrer Schmerzwahrnehmung und ihrer Grundaktivität unterschieden, konnten die **$\text{Ca}_v1.2^{\text{NesCre}}$** Tiere für die Untersuchung der Abhängigkeit der Angstkonditionierung von $\text{Ca}_v1.2$ herangezogen werden.

Das Ergebnis dieser Versuchsreihe, in der die Funktion von $\text{Ca}_v1.2$ chronisch inaktiviert war, schien zunächst den Versuchen mit akuter Inhibition von $\text{Ca}_v1.2$ zu widersprechen: Im auditorischen Angstlernversuch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen **$\text{Ca}_v1.2^{\text{NesCre}}$** Mäusen und der Kontrollgruppe in Ihrem freezing-Verhalten festgesellt werden (t-Test, $p > 0,05$, N=9; Abbildung 14c).

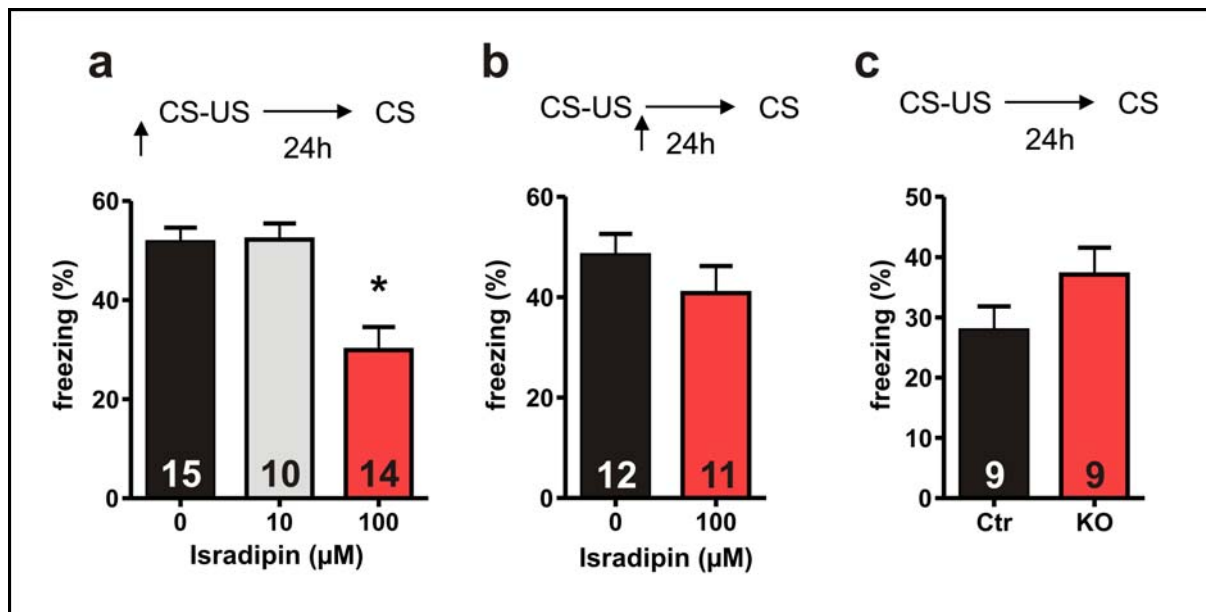


Abbildung 14: Auditorische Angstkonditionierung.

Mittlere *freezing* Zeiten während Gabe des konditionierten Stimulus (Ton, CS) ohne den unkonditionierten Stimulus (Stromschlag, US) 24 h nach auditorischer Angstkonditionierung durch Paarung von US und CS. a) Tieren, welchen 30 Minuten vor Konditionierung eine 2 µl Bolusinjektion von 100 µM Isradipin (rot, N=14) intracerebroventrikulär verabreicht wurde, zeigten signifikant weniger Angstverhalten (*freezing*) als Tiere, denen Isradipin in niedrigerer Verdünnung (grau- 10 µM, N=10; schwarz- 0 µM, N=15) verabreicht wurde (*ANOVA, $p < 0,01$ *post hoc* Newman Keuls). b) Durch Bolusinjektionen direkt nach Konditionierung konnte selbst durch hohe Konzentrationen von Isradipin keine signifikante Reduktion des erlernten Angstverhalten erreicht werden. (t-Test, $p < 0,3$) c) Das *freezing* Verhalten von $Ca_v1.2^{NesCre}$ (KO) Tieren unterschied sich nicht signifikant vom Verhalten der Kontrollgruppe (Ctr) 24 h nach Konditionierung (t-Test, $p > 0,05$).

Da solche Unterschiede zwischen pharmakologischer und genetischer Beeinflussung von Zielproteinen auf eine mögliche Beteiligung des Proteins an homöostatischen Effekten hinweist (Brickley et al., 2001; Davis and Bezprozvanny, 2001; Davis, 2006) mussten als nächstes mögliche homöostatische Veränderungen in $Ca_v1.2^{NesCre}$ Mäusen untersucht werden. Dazu sollte im nächsten Schritt überprüft werden, wie sich der chronische Verlust von $Ca_v1.2$ auf die Induktion Hebbscher Plastizität in der LA auswirkt.

3.4. Homöostatischer Ausgleich des Verlustes von $Ca_v1.2$ durch DHP insensitive Formen Hebbscher Plastizität

Die Untersuchungen auditorischer Angstkonditionierung in Abhängigkeit von $Ca_v1.2$ lieferten unterschiedliche Ergebnisse, je nachdem ob die Funktion des Kalziumkanals pharmakologisch (akut) oder genetisch (chronisch) unterdrückt wurde. Dies liess auf eine mögliche metaplastische Veränderung der Mechanismen von Amygdala-abhängigen Lernvorgängen schliessen. Deshalb mussten als nächster Schritt

Auswirkungen des gehirnspezifischen, chronischen Verlustes von Ca_v1.2 in der LA auf die LTP thalamo-amygdalärer Synapsen in **Ca_v1.2^{NesCre}** Mäusen festgestellt werden.

Durch LTP Induktion war in Schnitten beider Gruppen eine signifikante Erhöhung der EPSP slope im Vergleich zur Grundlinie möglich (Wilcoxon signed rank Test, Ctr: $p < 0,02$; KO: $p < 0,02$ - Abbildung 15c). Der Erhalt der LTP trotz des chronischen Verlustes von Ca_v1.2 lässt darauf schliessen, daß es in den **Ca_v1.2^{NesCre}** Neuronen zu einer kompensatorischen Umformung der LTP kommt. Dies konnte den Verlust der LTP nur teilweise kompensieren, da LTP in Schnitten aus **Ca_v1.2^{NesCre}** Mäusen signifikant gegenüber der Kontrollgruppe reduziert war (Ctr=153,6 % ± 16,1 %, KO=130,9 % ± 6,8 %, ANOVA, $p < 0,001$ *post hoc* Tukey).

Um ausschliessen zu können, dass Ca_v1.3 den Verlust von Ca_v1.2 kompensiert und um sicherzugehen dass Ca_v1.2 in den Neuronen der LA tatsächlich vollständig ausgeschaltet wurde, wurden pyramidale Neuronen der LA aus **Ca_v1.2^{NesCre}** Schnitten mit Isradipin superfundiert das Tetanus-Induktionsprotokoll angewendet um LTP auszulösen. Im Unterschied zur Kontrollgruppe war LTP in der **Ca_v1.2^{NesCre}** Gruppe durch die Zugabe von Isradipin nicht auslösbar (Abbildung 15b und c). 10 µM des DHP verursachten in der Kontrollgruppe eine vollständige Inhibition der LTP (103,1 % ± 2,2 %, Wilcoxon signed rank Test zur Grundlinie, $p > 0,4$ - Abbildung 15c) während in Schnitten der **Ca_v1.2^{NesCre}** Tiere nach LTP Induktion immer noch eine signifikante Potenzierung der Steigung des EPSP auf 132,5 % ± 9,5 % (Wilcoxon signed rank Test zur Grundlinie, $p < 0,02$; ANOVA, $p < 0,001$ im Vergleich zur DHP-behandelten Kontrollgruppe, *post hoc* Tukey) zu beobachten war. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der LTP in **Ca_v1.2^{NesCre}** Schnitten mit Isradipin und **Ca_v1.2^{NesCre}** Schnitten ohne Isradipin (ANOVA, $p > 0,05$ *post hoc* Tukey). Dies bestätigt den Verdacht, dass chronischer Verlust von Ca_v1.2 zu einer homöostatischen Transformation der LTP-Mechanismen in pyramidalen Neuronen der LA führt, welche von einer DHP sensitiven Form in eine von DHP unbeeinflussbare Form wechseln.

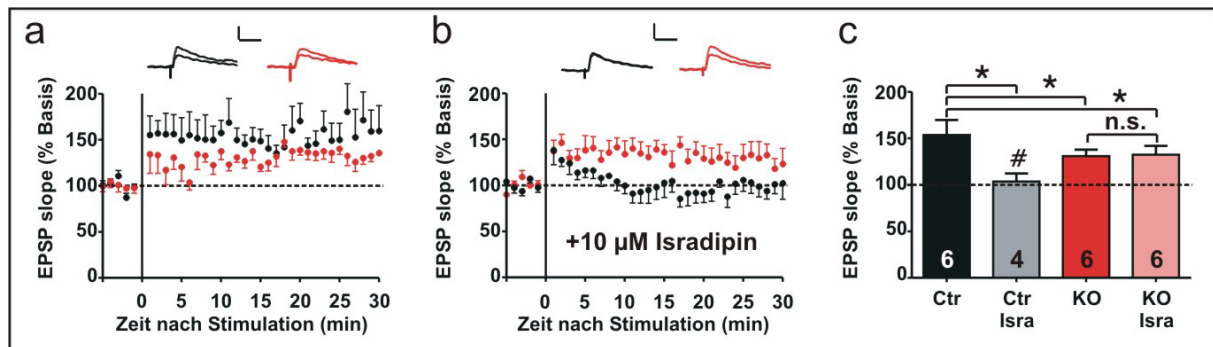


Abbildung 15: DHP insensitive LTP in $Ca_v1.2^{NesCre}$ Schnitten.

a) Zeitverlauf der minutenweise gemittelten Steigung des EPSP (EPSP slope) nach Anwendung des Teanus-Induktionsprotokolls in pyramidalen Neuronen der LA von Kontrolltieren (schwarz) und $Ca_v1.2^{NesCre}$ Tieren (rot). Die Abbildungen über dem Graphen sind repräsentative EPSP Kurven aus den beiden Gruppen vor und nach LTP Induktion. Der Maßstab repräsentiert 5 mV (vertikal) und 50 ms (horizontal). b) Zeitverlauf der minutenweise gemittelten initialen Steigung des EPSP (EPSP slope) nach Anwendung des Teanus-Induktionsprotokolls in pyramidalen Neuronen der LA von Kontrolltieren (schwarz) und $Ca_v1.2^{NesCre}$ Tieren (rot) während der Behandlung mit Isradipin ($10 \mu M$). Die Abbildungen über dem Graphen sind repräsentative EPSP Kurven aus den beiden Gruppen vor und nach LTP Induktion. Der Maßstab repräsentiert 5 mV (vertikal) und 50 ms (horizontal). c) Über 30 Minuten gemittelte Werte der LTP Kurven von Kontrolltieren (Ctr; schwarz, grau) und $Ca_v1.2^{NesCre}$ Tieren (KO; rot, rosa) ohne (schwarz, rot) und mit (Isra; grau, rosa) $10 \mu M$ Isradipin. *ANOVA, $p < 0,05$ post hoc Tukey, signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe. # Wilcoxon signed rank, $p > 0,4$, kein signifikanter Unterschied zur Basis. „n.s.“ ANOVA kein signifikanter Unterschied zwischen KO und KO mit $10 \mu M$ Isradipin.

Diese plastische Anpassung Hebbscher Plastizität an chronische Veränderungen der Kalziumleitfähigkeit der Postsynapse stellt eine Form der Metaplastizität dar. Der molekulare Mechanismus dieser metaplastischen Veränderung sollte im Folgenden weiter aufgeklärt werden.

3.5. Der Verlust von $Ca_v1.2$ führt in thalamo-amygdalären Synapsen zu einer metaplastischen Umformung Hebbscher LTP in ein von AMPAR abhängiges System

Kalzium ist ein essentiell wichtiges Signal für die Induktion Hebbscher LTP in prinzipalen Neuronen (entspricht den Pyramidenzellen) der LA (Nicoll and Malenka, 1995; Chittajallu et al., 1998). Da Neuronen der $Ca_v1.2^{NesCre}$ Tiere trotz Verlust des $Ca_v1.2$ Kalziumkanals weiterhin in der Lage sind, LTP zu bilden, muss Kalzium in den Knockout-Tieren auf eine neue Art und Weise in die Zellen gelangen.

Neue Untersuchungen legen nahe, dass die GluR1-Untereinheit von AMPA Rezeptoren eine wichtige Rolle im Amygdala-vermittelten Lernen spielt (Rumpel et al., 2005; Hu et al., 2007; Humeau et al., 2007). Außerdem wurde beschrieben, dass L-Typ Kalziumkanäle eine wichtige Funktion bei der Inaktivitätsadaptation in

kultivierten hippocampalen Nervenzellen einnehmen. Dies erfolgt durch Einbau GluR1 enthaltender AMPAR in die Postsynapse (Thiagarajan et al., 2005).

AMPAR in prinzipalen Neuronen des ZNS sind heteromere Kanalkomplexe die vorwiegend, in Kombination mit anderen Untereinheiten, die GluR2 Untereinheit enthalten (Wenthold et al., 1996; Greger et al., 2002). GluR2 freie AMPAR besitzen, im Gegensatz zu GluR2 enthaltenden Kanalkomplexen, eine gesteigerte Leitfähigkeit für Kalzium (Geiger et al., 1995).

Wir stellten die Hypothese auf, dass Kalziumeinstrom durch GluR1-haltige, GluR2 freie AMPAR der metaplastischen Umformung des LTP in **Ca_v1.2^{NesCre}**-Tieren zugrunde liegen könnte.

Um diese These zu überprüfen, wurden anhand des beschriebenen (2.2.7.3.) Tetanus- Protokolls LTP in **Ca_v1.2^{NesCre}** Schnitten sowie Kontrollen ausgelöst. Dabei wurde in der Versuchsreihe der für Kalzium leitende AMPAR spezifische (Washburn and Dingledine, 1996) Antagonist Phyllanthotoxin 433 (PhTX) der ACSF beigegeben. Es konnte gezeigt werden, daß PhTX in einer Konzentration von 10 µM LTP in pyramidalen Neuronen der LA von **Ca_v1.2^{NesCre}** vollständig inhibiert, während LTP in den Kontrollschnitten normal auslösbar war (Abbildung 16). Die Steigung der EPSP betrug in Kontrollen 148,3 % ± 1,6 % (Wilcoxon signed rank Test zur Grundlinie, p<0,05) des Wertes vor LTP Induktion. In PhTX behandelten **Ca_v1.2^{NesCre}** Schnitten wurde lediglich eine Potenzierung von 111,0 % ± 1,6 % erreicht, welche sich nicht signifikant zum Grundlinienwert (Wilcoxon signed rank Test, p>0,1) unterschied. Die LTP Werte der mit PhTX behandelten **Ca_v1.2^{NesCre}** Gruppe unterschieden sich dabei signifikant von der unbehandelten **Ca_v1.2^{NesCre}** Gruppe (ANOVA, p<0,001 *post hoc* Tukey).

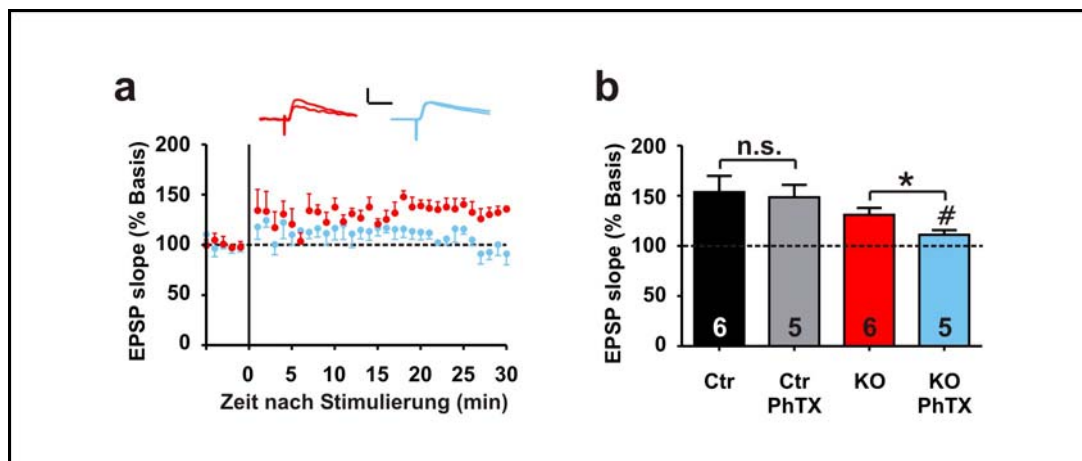


Abbildung 16: LTP in $Ca_v1.2^{NesCre}$ Schnitten lässt sich mit dem spezifischen Antagonisten Kalzium leitender AMPAR PhTX inhibieren.

a) Zeitverlauf der minutenweise gemittelten Steigung des EPSP (EPSP slope) nach Anwendung des Teanus-Induktionsprotokolls in pyramidalen Neuronen der LA von $Ca_v1.2^{NesCre}$ Tieren (rot) und $Ca_v1.2^{NesCre}$ Tieren während Behandlung mit 10 μ M Philantotoxin (hellblau). Die Abbildungen über dem Graphen sind repräsentative EPSP Kurven aus den beiden Gruppen vor und nach LTP Stimulation. Der Maßstab repräsentiert 5 mV (vertikal) und 50 ms (horizontal). b) Über 30 Minuten gemittelte Werte der LTP Kurven von Kontrollen (Ctr; schwarz, grau) und $Ca_v1.2^{NesCre}$ Schnitten (KO; rot, hellblau) ohne (schwarz, rot) und mit 10 μ M Isradipin (PhTX; grau, hellblau). *ANOVA, $p < 0,05$ post hoc Tukey - signifikanter Unterschied zwischen $Ca_v1.2^{NesCre}$ ohne und $Ca_v1.2^{NesCre}$ mit PhTX Behandlung. # $p > 0,05$ im Wilcoxon signed rank Test, kein signifikanter Unterschied zur Basis. „n.s.“, ANOVA, $p > 0,05$, Tukey post hoc, kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollschnitten ohne und Kontrollschnitten mit PhTX Behandlung.

Dieses Ergebnis legte nahe, dass der mit der Deletion von $CACNA1C$ verbundene metaplastische Effekt in pyramidalen Neuronen der LA mit der verstärkten Expression GluR2 freier, durch PhTX blockierbarer AMPAR zusammenhängt. Weitere Versuche sollten diese Vermutung untermauern.

3.4. Hochregulation von GluR1 in der LA der $Ca_v1.2^{NesCre}$ Tiere

3.4.1. Nachweis erhöhter Expression von GluR1 Untereinheiten in der LA der $Ca_v1.2^{NesCre}$ Tiere

Die gesteigerte Expression von GluR1 Untereinheiten fördert den Einbau Kalzium permeabler GluR1 Tetramere in die Zellmembran (Hollmann and Heinemann, 1994). Ausschlaggebend für die vermehrte Bildung dieser Kalzium leitenden GluR2 freien AMPAR ist dabei, dass die Expression von GluR2 Protein nicht im gleichen Maße ansteigt.

In Western Blot Analysen konnte in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Steigerung der Expression von GluR1-Protein in der Amygdala von $Ca_v1.2^{NesCre}$

Tieren um einen Faktor von $2,2 \pm 0,2$ im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Abbildung 17). Gleichzeitig hatte die genetische Veränderung in $\text{Ca}_v1.2^{\text{NesCre}}$ Tieren keinen Einfluss auf die Menge des exprimierten GluR2-Proteins (Faktor $1,0 \pm 0,02$, $n=9$; t-Test, $p>0,95$). Aufgrund dieser Befunde kann aus proteinbiochemischer Sicht von einem Anstieg der Expression von GluR1 Tetrameren in der LA der $\text{Ca}_v1.2^{\text{NesCre}}$ Tiere ausgegangen werden. Diese über den chronischen Verlust des $\text{Ca}_v1.2$ vermittelten Kalziumsignals ausgelöste, drastische Veränderung der Zusammensetzung von AMPA Rezeptoren in der Amygdala (analog zu den Daten aus den LTP Versuchen mit PhTX) stellt vermutlich die Grundlage für den zu beobachtenden, metaplastischen Effekt in den LTP- und Verhaltensversuchen dar.

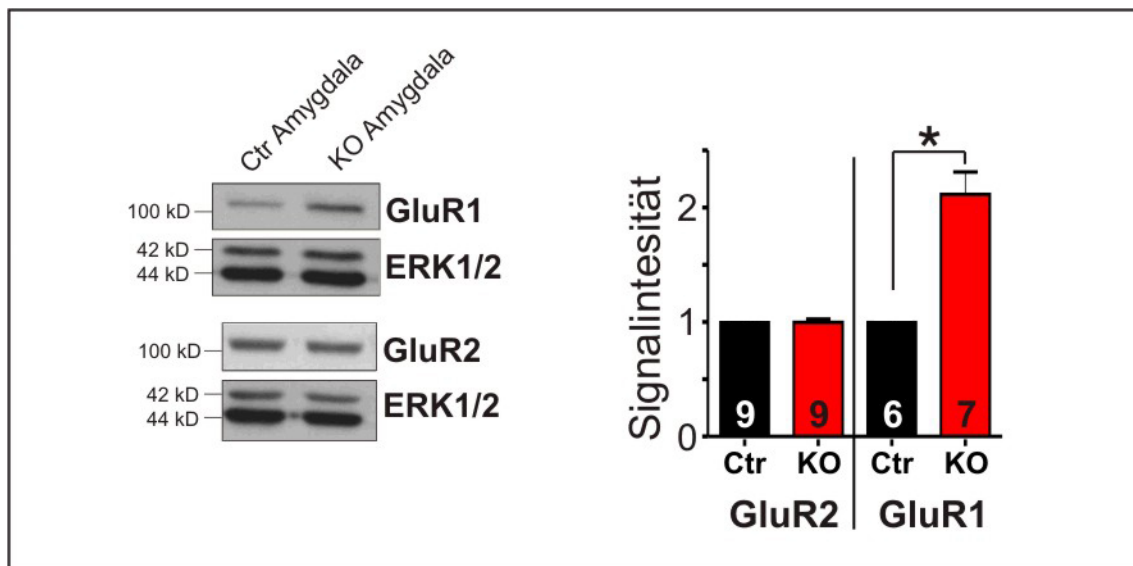


Abbildung 17: Gesteigerte Expression von GluR1-Protein in der LA von $\text{Ca}_v1.2^{\text{NesCre}}$ Tieren.

Vergleichende Westernblotanalyse von GluR1 und GluR2 Protein in Kontrolltieren (Ctr) und $\text{Ca}_v1.2^{\text{NesCre}}$ Tieren (KO). Während die relative Menge an GluR2 Protein in beiden Gruppen unverändert war, kam es zu einer Erhöhung des GluR1 Signals in der $\text{Ca}_v1.2^{\text{NesCre}}$ Gruppe (KO) auf das $2,2 \pm 0,2$ -fache der Kontrollgruppe (*t-Test, $p<0,001$).

3.4.2. Elektrophysiologischer Nachweis der verstärkten Expression von GluR1 monomeren in pyramidalen Neuronen der LA

Der Auswärtsstrom, der von GluR2 freien AMPAR getragen wird, ist bei positiven Membranpotentialen durch Polyamine wie Spermin spannungsabhängig blockierbar (Bowie and Mayer, 1995; Plant et al., 2006). Diese Eigenschaft kann man zur elektrophysiologischen Unterscheidung GluR2 haltiger und GluR2 freier AMPAR nutzen, indem man der Pipettenlösung Spermin zufügt. Als Vergleichswert für die Blockade des Ionenstroms bei positiven Haltepotenzialen misst man den Ionenstrom

zuerst bei negativem Haltepotential. Hier wirkt Spermin nicht blockierend. Aus dem Verhältnis der Amplituden der AMPAR-vermittelten erregenden postsynaptischen Ströme bei positiven und negativen Haltepotentialen wird der Rektifizierungsindex für die postsynaptischen AMPAR berechnet.

$$\text{Rektifizierungsindex} = (\text{Amplitude bei } -70 \text{ mV}) / (\text{Amplitude bei } +40 \text{ mV})$$

Dieser Index kann zur Bestimmung der relativen Häufigkeit von GluR2 haltigen AMPAR in der Membran der Postsynapse herangezogen werden. Je mehr GluR2 freie AMPAR in der Membran exprimiert werden, desto stärker wirkt sich der spannungsabhängige Block des Ionenkanals bei positiven Haltepotentialen (+40 mV) auf die Stromamplitude aus und der Rektifizierungsindex wird dementsprechend größer. Da EPSCs sowohl von NMDAR wie AMPAR-vermittelten Ionenströmen getragen werden, wurden bei der Bestimmung des Rektifizierungsindex NMDAR inhibiert.

Durch die Ermittlung Rektifizierungsindex konnte der Bestandteil GluR2 haltiger AMPAR in pyramidalen Neuronen von **Ca_v1.2^{NesCre}** Tiere mit denen der Kontrollgruppe verglichen werden. Es fiel auf, dass der AMPAR vermittelte Einstrom positiver Ionen in **Ca_v1.2^{NesCre}** Zellen bei negativem Haltepotential gegenüber Kontrollzellen vergrößert war, während der Ausstrom positiver Ionen bei positiven Haltpotentialen in beiden Genotypen vergleichbar war (Abbildung 18a). Der Rektifizierungsindex lag somit in Neuronen der **Ca_v1.2^{NesCre}** Tiere bei $3,0 \pm 0,3$ (n=8) und war damit signifikant höher als in der Kontrollgruppe mit einem Rektifizierungsindex von $2,2 \pm 0,1$ (n=7, t-Test, p<0,05).

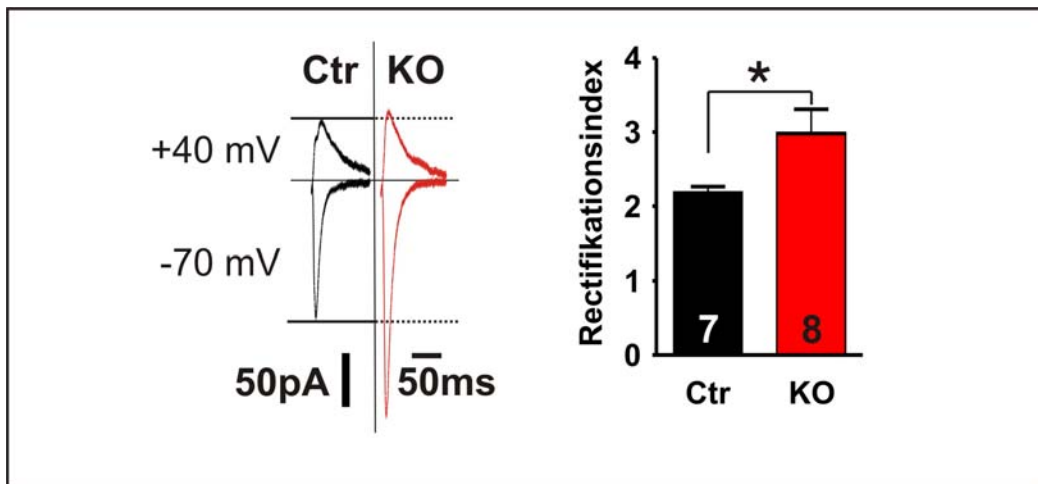


Abbildung 18: Erhöhte Stromdichte GluR2 freier AMPAR in der LA von $Ca_v1.2^{NesCre}$ Mäusen

a) Gemittelte, AMPAR vermittelte Ionenströme in pyramidalen Neuronen der LA von Kontrolltieren (*schwarz*, n=7) und $Ca_v1.2^{NesCre}$ Tieren (*rot*, n=8), induziert durch präsynaptische Reizung bei Haltpotentialen von +40 und -70 mV. b) Die daraus resultierenden gemittelten Rektifizierungsindizes (s. 2.2.8.) in pyramidalen Neuronen der LA unterscheiden sich signifikant zwischen Kontrolltieren (*schwarz*, n=7) und $Ca_v1.2^{NesCre}$ Tieren (*rot*, n=8; *t-Test, $p < 0,05$).

Aufgrund dieser Daten kann auf einen vermehrten Einbau GluR2 freier und somit Kalzium permeabler AMPAR in die Postsynapse der $Ca_v1.2^{NesCre}$ Tiere geschlossen werden. Dies bestätigt die Ergebnisse der LTP Versuche mit PhTX und der Westernblotanalysen von $Ca_v1.2^{NesCre}$ Mäusen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass pyramidale Neuronen der LA von $Ca_v1.2^{NesCre}$ Tieren den Verlust der Kalziumleitfähigkeit und den damit verbundenen Verlust der LTP-Bildung durch den Einbau GluR2 freier AMPAR ausgleichen.

4. Diskussion

4.1. Die chronische Inaktivierung des Ca_v1.2 Kalziumkanals leitet in pyramidalen Neuronen der LA einen metaplastischen Prozess ein, welcher zur Ausbildung Hebbscher Plastizität in Abhängigkeit Kalzium permeabler AMPAR führt

Homöostatische Regulationsmechanismen integrieren die Signale sämtlicher auf das Neuron verschaltender Synapsen und regulieren so global die synaptische Transmission (Turrigiano and Nelson, 2000). Durch ihren global integrierenden Charakter unterscheidet homöostatische Plastizität sich von anderen, Input-spezifisch plastischen Phänomenen der Zelle wie Hebbscher Plastizität (in Form von LTP oder LTD).

Homöostatische Plastizität tritt unter bestimmten Versuchsbedingungen in Erscheinung: z.B. kann sie *in vitro* durch die Inhibition neuronaler Aktivität (Turrigiano and Nelson, 2000, 2004) oder aber *in vivo* durch Deprivation sensorischer Einflüsse ausgelöst werden (Desai et al., 2002; Goel et al., 2006). Mehrere Studien konnten zeigen, dass GluR2 freie AMPAR bei homöostatischen Prozessen eine wichtige Rolle spielen (Ju et al., 2004; Thiagarajan et al., 2005; Sutton et al., 2006). Diese Arbeiten belegen, dass während homöostatisch-plastischer Vorgänge GluR2 freie AMPAR vermehrt in die postsynaptische Membran der Zelle eingebaut werden.

Wie aber kann ein Neuron zur Auslösung homöostatischer Plastizität synaptische Signale integrieren bzw. seinen Aktivitätszustand messen? Der intrazelluläre Kalziumspiegel steht in enger Verbindung mit dem Aktivitätsniveau einer Zelle und könnte somit auch für die Regulation homöostatischer Plastizität eine wichtige Rolle spielen (Davis and Bezprozvanny, 2001; Goldberg and Yuste, 2005). Die Frage nach der Quelle des dafür nötigen Kalziums (intrazelluläre Speicher? Ionenkanäle?) ist jedoch noch ungeklärt. Ebenso unklar ist, ob bestimmte Schlüsselmoleküle, z.B. Ionenkanäle, bei den Signaltransduktionskaskaden homöostatischer und Hebbscher Plastizität gemeinsam eine Rolle spielen, oder ob beide Prozesse getrennt voneinander ablaufen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ca_v1.2 vermittelte Kalziumströme ein wichtiger Signalgeber für homöostatische Effekte in Neuronen der LA sind. Um diesen Rückschluss ziehen zu können, musste zuerst ausgeschlossen

werden, dass der gehirnspezifische Knockout des $Ca_v1.2$ kodierenden *CACNA1C* Gens zu Veränderungen in der Struktur pyramidalen Neuronen führt (Abbildung 12) und auch die Grundparameter pyramidalen Neuronen (Tabelle 1) signifikant verändert.

Es konnte beobachtet werden, dass der genetische Verlust von $Ca_v1.2$ zu einer metaplastischen Veränderung der AMPAR Zusammensetzung in prinzipalen Neuronen, d.h. in Pyramidenzellen, der LA führt (3.4.1. und 3.4.2.). Dieses Umschalten der AMPAR Zusammensetzung ließ sich durch die verstärkte Proteinexpression von GluR1 in der Amygdala und die damit verbundene Erhöhung des Rektifizierungsindex als Zeichen für erhöhte Expression GluR2 freier, Kalzium permeabler AMPAR in die Zellmembran (Abbildung 17 und 18) nachweisen. Kalziumeinstrom in prinzipale Neuronen erfolgt vorwiegend über NMDAR und spannungsabhängige Kalziumkanäle (Rodrigues et al., 2004). Kalziumeinstrom über AMPAR spielt eine geringere Rolle, da AMPAR prinzipaler Neuronen meist aus GluR2 haltigen Heteromeren bestehen (Wenthold et al., 1996; Greger et al., 2002). Dabei bewirkt die GluR2 Untereinheit des Heteromers, dass der AMPAR für Kalziumionen undurchlässig wird (Jonas et al., 1994; Bowie and Mayer, 1995).

Prinzipiell können GluR2 freie AMPAR aber durchaus an Hebbischer synaptischer Plastizität beteiligt sein. So wurde z.B. gezeigt, dass durch genetische Veränderung bzw. Knockout der GluR2 Untereinheit von Kalzium permeablen AMPAR getragenes LTP im Schaffer-Kollateral-pathway auftritt (Brusa et al., 1995; Feldmeyer et al., 1999).

In $Ca_v1.2^{NesCre}$ Tieren geht ein Kalziumeinstromsignalweg verloren, welcher entscheidend wichtig für die Ausbildung von LTP in der LA ist (4.2.). Wie kann die Zelle nun homöostatisch den Ausfall dieses Signalwegs kompensieren? Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Verschiebung der Expression von GluR2 Heteromeren zu GluR2 freien AMPAR, Kalzium-leitenden Rezeptoren, kann als metaplastische Antwort auf den Verlust von $Ca_v1.2$ gedeutet werden. Sie bietet der Zelle eine alternative Möglichkeit zur kalziumvermittelten Induktion von LTP (Abbildung 16).

In der Literatur finden sich weitere Hinweise auf von Kalzium-permeablen AMPAR-abhängige LTP Formen im ZNS. So können in Interneuronen (die generell eine niedrige Grundexpression von GluR2 aufweisen) AMPAR vermittelte Formen von LTP unter physiologischen Bedingungen nachgewiesen werden (Mahanty and Sah,

1998; Laezza et al., 1999). In einem ausgezeichnet beschriebenen Beispiel wurde gezeigt, dass Kalziumeinstrom durch GluR2 freie AMPAR während starker neuronaler Aktivität zum Einbau GluR2 haltiger AMPAR in die Postsynapse führt (Liu and Cull-Candy, 2000; Gardner et al., 2005; Liu and Cull-Candy, 2005). Diese neue Form synaptischer Plastizität wurde erst jüngst charakterisiert und spielt vor allem in den Afferenzen der Parallelfasern auf die Stellatumzellen des Cerebellum eine große Rolle. Möglicherweise stellen für Kalzium durchlässige AMPAR aber auch in NMDAR abhängigen LTP Formen der hippocampalen Synapsen der CA1 Region einen entscheidenden Faktor für die LTP Induktion dar. So wurde postuliert, dass es nach LTP Induktion zu einer transienten, ca. 25 Minuten dauernden Steigerung der Anzahl membranständiger, Kalzium durchlässiger AMPAR kommt (Plant et al., 2006). Diese Versuche sind allerdings umstritten und konnten von unabhängigen Arbeitsgruppen nicht reproduziert werden (Adesnik and Nicoll, 2007; Gray et al., 2007).

In diesem Zusammenhang ist das wichtigste Ergebnis dieser Doktorarbeit, dass eine glutamaterge, NMDAR abhängige, exzitatorische Synapse einer Pyramidenzelle (am Beispiel der thalamo-amygdalären Synapse) durch homöostatisch plastische Regulationsmechanismen so umgewandelt werden kann, dass der Kalziumeinstrom durch AMPAR erfolgt. Bei dieser Veränderung handelt es sich um eine durch den Verlust von $Ca_v1.2$ neu erworbene Fähigkeit, da unter ‚Normalbedingungen‘ PhTX keine Auswirkungen auf die Induktion von LTP hat (Abbildung 16).

Die Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit werfen die Frage auf, wie der Verlust $Ca_v1.2$ abhängiger Kalziumsignale die gesteigerte Expression von GluR1 und die damit verbundene, verstärkte Insertion Kalzium leitender AMPAR in die Postsynapse steuert. Es ist bekannt, dass Aktivierung von $Ca_v1.2$ Kalziumkanälen der Postsynapse zu einer verstärkten Genexpression führt (West et al., 2001; Moosmang et al., 2005). Durch den $Ca_v1.2$ -vermittelten Anstieg der Kalziumkonzentration kommt es zu einer Aktivierung verschiedener Signalkaskaden, die für die Generierung von Kurzzeit- als auch Langzeitgedächtnis eine wichtige Rolle spielen (Schafe et al., 2000; Schafe and LeDoux, 2000). Ein möglicher Kandidat für das Zusammenspiel $Ca_v1.2$ vermittelter Kalziumsignale und der Regulation von GluR1 wäre hierbei das *immediate early gene* Arg3.1/Arc. Arg3.1/Arc kontrolliert die Zusammensetzung membranständiger AMPAR durch die Beeinflussung ihrer Endocytose (Shepherd et al., 2006). Eine Überexpression von Arg3.1/Arc resultiert in einer starken Hemmung der Expression von GluR1 AMPAR, während der Knockout von Arg3.1/Arc zu einer

starken Erhöhung der Expression membranständiger GluR1 AMPAR führt. Interessanterweise unterdrückt die Anwendung von L-Typ Kalziumkanalblockern die aktivitätsabhängige Synthese von Arg3.1/Arc mRNA in PC12 Zellen (Waltereit et al., 2001). Die Vermutung liegt somit nahe, dass $Ca_v1.2$ *in vivo* über die Regulation von Arg3.1/Arc Einfluss auf die AMPAR Zusammensetzung in pyramidalen Neuronen der LA nimmt.

Diese Hypothese müsste über weiterführende Experimente geklärt werden.

4.2. Akute pharmakologische Inhibition von $Ca_v1.2$ unterdrückt Hebbsche Plastizität der thalamo-amygdalären Synapse sowie assoziatives Lernen in der auditorischen Angstkonditionierung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob sich akute pharmakologische Unterdrückung der Funktion von $Ca_v1.2$ auf die Ausbildung von LTP in der LA und auf von der Amygdala gesteuertes Lernen im Verhaltensversuch auswirkt.

Die Bedeutung spannungsgesteuerter Kalziumkanäle für Lernen und Gedächtnis wird in der Literatur sehr kontrovers diskutiert. So werden L-Typ Kalziumkanal-Antagonisten verschiedenste Effekte auf Lernverhaltensversuche zugeschrieben. Es wurde berichtet, dass L-Typ Kalziumkanal Blocker Lernleistungen verbessern können wie z.B. in der Aquisition des konditionierten Lidschlussreflex in Kaninchen (Deyo et al., 1989), dass L-Typ Antagonisten keinerlei Wirkung auf das angstmotivierte Erlernen der Umgebungsparameter bei Mäusen haben (Cain et al., 2002) und dass L-Typ Blocker inhibierend auf die Gedächtnisbildung in der auditorischen Angstkonditionierung von Ratten wirken (Bauer et al., 2002).

Die Untersuchung der Funktion von L-Typ Kanälen für das Lernverhalten mit Hilfe von Blockern wird dadurch erschwert, dass systemische Gabe von L-Typ Antagonisten durch periphere Effekte zu anderen Ergebnissen im angstmotivierten Verhaltenstest führt, als ICV Injektionen (Busquet et al., 2008; Waltereit et al., 2008). Auch bei Verwendung transgener Tiermodelle können unterschiedliche Ergebnisse entstehen, welche vordergründig widersprüchlich erscheinen. Der durch die Verwendung des gehirnspezifischen Nex-Cre Promotors gesteuerte, genetische Verlust von $Ca_v1.2$ führte zur Reduktion hippokampal abhängiger, räumlicher Gedächtnisbildung (Moosmang et al., 2005). Dagegen konnte kein Effekt auf kontextuelle (also Hippokampus-abhängige) Angstkonditionierung nach genetischer

Deletion von $Ca_v1.2$ durch Verwendung eines CamKII-Cre Promotors festgestellt werden (McKinney et al., 2008).

Während die Rolle von $Ca_v1.2$ im Verhaltensexperiment größtenteils ungeklärt bleibt, gibt es eine Vielzahl von überzeugenden Arbeiten, welche DHP sensitiven Kanälen eine herausragende Rolle bei der Steuerung lernbezogener, neuronaler Signalkaskaden wie z.B. dem CREB- oder NFAT-Signalweg bescheinigen (West et al., 2001; Moosmang et al., 2005; Oliveria et al., 2007). Zusätzlich gestützt werden diese Ergebnisse durch elektrophysiologische Untersuchungen, welche die Notwendigkeit spannungsabhängiger L-Typ Kalziumkanäle für die Induktion Hebscher Plastizität an glutamatergen Synapsen belegen (Grover and Teyler, 1990; Morgan and Teyler, 1999; Weisskopf et al., 1999; Moosmang et al., 2005).

Diese Diskrepanz zwischen den eindeutigen Ergebnissen aus Biochemie und Elektrophysiologie und den widersprüchlichen Ergebnissen aus Verhaltensversuchen könnte durch die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Einflussnahme von $Ca_v1.2$ auf metaplastische Regulationsmechanismen im ZNS erklärt werden. Je nach Beeinflussung von $Ca_v1.2$ könnten sich metaplastische Ereignisse verschieden stark auf die Gedächtnisbildung einwirken und andere plastische Effekte maskieren. Vor allem Verhaltensversuche, die durch die Komplexität der ihnen zugrundeliegenden (schwer *in vivo* beobachtbaren) zentralnervösen Vorgänge eine starke Fehlerstreuung aufweisen, könnten durch metaplastische Regulationsmechanismen stärker beeinträchtigt werden als die isolierte Betrachtung einzelner Hirnbereiche oder synaptischer Verknüpfungen in der Neuronenkultur.

Durch Kombination akuter und chronischer Beeinflussung des $Ca_v1.2$ Kalziumkanals sowie die Anwendung mehrerer komplementärer Untersuchungsmethoden (Elektrophysiologie, Verhalten, Biochemie, Anatomie) konnte in der vorliegenden Arbeit die Rolle dieses Ionenkanals in der LA aus verschiedenen Blickwinkeln beleuchtet werden. Die folgende Aufzählung der wichtigsten Ergebnisse lässt den Schluss zu, dass in Mäusen die LTP der thalamo-amygdalären Synapsen sowie auditorische Angstkonditionierung von $Ca_v1.2$ Kalziumkanälen abhängig sind:

- (I) ICV Injektion des DHP Isradipin führte zu einem dosisabhängigen Block der Aquisition Amygdala-abhängigen Lernens im auditorischen Angstkonditionierungstest, ohne die Konsolidierung zu beeinträchtigen (Abbildung 14).

- (II) Isradipin blockiert die LTP der thalamo-amygdalären Synapse pyramidalen Neuronen der LA (Abbildungen 11). Angstkonditionierung und LTP sind damit abhängig von einem Vertreter der DHP sensitiven spannungsgesteuerten Kalziumkanäle, $Ca_v1.x$.
- (III) Pyramidale Neurone der LA von $Ca_v1.2^{NesCre}$ Mäusen besitzen keinen durch Isradipin blockierbaren (und damit $Ca_v1.x$ vermittelten) Bariumstrom (Abbildung 13). Demnach kann eine Beteiligung von $Ca_v1.3$ am Kalziumsignal der Zellen ausgeschlossen werden. $Ca_v1.3$ Protein konnte in der LA weder in $Ca_v1.2^{NesCre}$ Tieren noch in genetisch unmodifizierten Kontrolltieren nachgewiesen werden (nicht gezeigt).
- (IV) Die Beobachtung, dass pyramidale Neuronen der $Ca_v1.2^{NesCre}$ Tiere zur Ausbildung DHP resistenter LTP der thalamo-amygdalären Synapse in der Lage sind, bestätigt ausserdem die Vermutung, dass $Ca_v1.3$ Kalziumkanäle keinen Beitrag zur synaptischen Plastizität im thalamo-amygdalären Signalweg leisten.

Es kommt durch den Knockout von *CACNA1C* zu metaplastischen Veränderungen im Neuron, welche zur Etablierung einer neuen Form von LTP führen. Diese DHP resistente Form der LTP in den pyramidalen Neuronen der LA von $Ca_v1.2^{NesCre}$ Tieren bestätigt, dass die Wirkung von Isradipin in Kontrolltieren tatsächlich auf die Inhibierung von $Ca_v1.2$ und nicht auf unspezifische Nebeneffekte (z.B. Beeinflussung anderer Signaltransduktionskaskaden) zurückzuführen ist.

Durch die elektrophysiologische Grundcharakterisierung pyramidalen Neuronen der LA der verschiedenen Versuchsgruppen (3.1.1.) und der Dendritenmorphologie (3.2.1.) der $Ca_v1.2^{NesCre}$ Tiere konnten keine Unterschiede festgestellt werden und somit mögliche Fehlerquellen in der Interpretation der Ergebnisse der LTP- und Verhaltenstests ausgeschlossen werden.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann somit folgendes Modell konstruiert werden:

Hebbsche Plastizität der thalamo-amygdalären synaptischen Verbindungen ist abhängig von Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration. Diese wird durch die Funktion des spannungsgesteuerten L-Typ Kalziumkanal $Ca_v1.2$ und glutamaterger NMDA Rezeptoren reguliert. Sind beide Ionenkanäle funktionsfähig und leiten Kalzium in die Zelle, kommt es durch Weiterleitung des Signals in den Zellkern zur Expression bestimmter, lernrelevanter Gene. Das führt zur Stärkung der

synaptischen Verbindung, was sowohl elektrophysiologisch (LTP) als auch im Verhaltensexperiment (auditorische Konditionierung, *freezing*) beobachtbare Effekte mit sich zieht.

Gleichzeitig unterdrückt intrazelluläres Kalzium durch noch nicht genauer bekannte inhibitorische Faktoren (IF; Arg3.1/Arc als ein möglicher Kandidat) den Einbau von GluR1 Monomeren oder anderen, GluR2 freien AMPAR.

Wird einer der beiden, Kalzium leitenden Ionenkanäle in seiner Funktion akut gehemmt (in Abbildung 19 Block von $Ca_v1.2$ durch Isradipin), so genügt das resultierende Kalziumsignal nicht mehr, um entweder LTP in der Synapse oder aber Gedächtnis im Lernversuch ausbilden zu können.

Akute Inaktivierung von $Ca_v1.2$ hat also im vorliegenden System eine inhibierende Wirkung auf Hebbsche Plastizität.

Anders verhält es sich bei dem chronischen Verlust von $Ca_v1.2$. Dieser bewirkt eine gesteigerte Expression von GluR1 in der Zelle, vermutlich durch verminderte Expression der intrazellulären IF. Die verstärkte Expression von GluR1 bewirkt einen verstärkten Einbau von Kalzium leitenden, GluR2 freien AMPAR in die Zellmembran. Dadurch erhöht sich aktivitätsabhängig die Kalziumleitfähigkeit der Membran, was letztendlich dazu führt, dass die Zelle trotz des Verlustes von $Ca_v1.2$ wieder in der Lage ist, LTP auszulösen. Es handelt sich also um eine Veränderung der ‚Grundregeln‘ für die Ausbildung von LTP. Chronische Inaktivierung von $Ca_v1.2$ führt somit zu einer metaplastischen Veränderung der postsynaptischen LTP.

Abbildung 19 zeigt die resultierende Schlussfolgerung aus den Ergebnissen (pharmakologisch) akuter und (genetisch) chronischer Inaktivierung der Funktion von $Ca_v1.2$ in pyramidalen Neuronen der LA.

$Ca_v1.2$ erwies sich als ein wichtiges Element der zeitlichen Integration der intrazellulären Kalziumkonzentration. Durch die vorliegende Arbeit konnte damit gezeigt werden, dass in der LA die Signalwege für Hebbsche und homöostatische Plastizität auf Ebene des L-Typ Kalziumkanals $Ca_v1.2$ konvergieren.

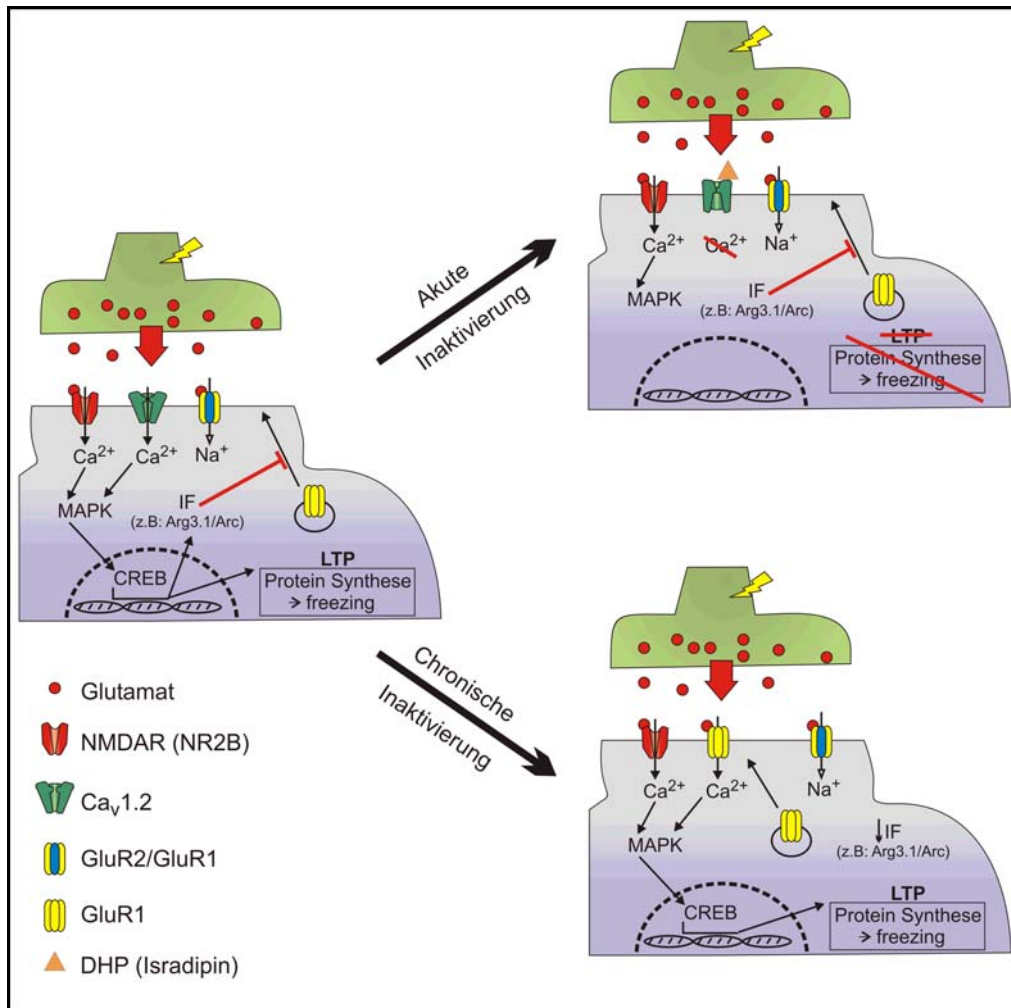


Abbildung 19: Modell der Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen der vorliegenden Doktorarbeit.
Grün – Präsynapse. Lila – Postsynapse. Roter Pfeil – Glutamatausschüttung.

4.3. Ausblick

Der nächste logische Schritt der Untersuchung metaplastischer Veränderungen in der LA als Reaktion auf die genetische Beeinflussung von $Ca_v1.2$ wäre, die elektrophysiologischen und biochemischen Hinweise auf die verstärkte synaptische Expression GluR2 freier AMPAR durch vergleichende Verhaltensversuche zu bestätigen. Dies wäre theoretisch analog zu den hier vorgestellten Verhaltensversuchen über ICV Injektion GluR1 spezifischer Blocker in $Ca_v1.2^{NesCre}$ Tiere möglich. Leider stehen geeignete Blocker für *in vivo* Behandlungen bis *dato* nicht zur Verfügung, was diesen sehr einfachen und geradlinigen Ansatz nicht realisierbar macht. Eine mögliche Lösung des Problems wäre der gewebsspezifische Knockout von GluR1 mit Hilfe lentiviraler Manipulation.

In der vorliegenden Arbeit konnte der Hinweis auf eine Beteiligung von $Ca_v1.2$ an der chronischen Regulation homöostatischer Plastizität im ZNS erbracht werden. Bereits 1995 wurde auf positiv nootropische Effekte bestimmter DHP's bei der Behandlung von Demenzerkrankungen hingewiesen (Fritze and Walden, 1995). Dass $Ca_v1.2$ an synaptischer Plastizität und Gedächtnisbildung beteiligt ist, spricht gegen diesen Befund. Der in dieser Arbeit beschriebene metaplastische Effekt in Antwort auf chronische Unterdrückung von $Ca_v1.2$ lässt eine alternative Interpretation der Befunde zu, nämlich dass es bei der chronischen Behandlung mit L-Typ Antagonisten zu einer metaplastischen Umschaltung im Gehirn kommt, welche den pathologischen Veränderungen entgegenwirkt. Dementsprechend verspricht die chronische pharmakologische Behandlung mit $Ca_v1.2$ Antagonisten möglicherweise neue Ansätze in der Behandlung Gedächtnis-bezogener Erkrankungen wie z.B. Demenz. Die Erforschung der von $Ca_v1.2$ abhängigen, homöostatischen Regulationsmechanismen könnte somit zu neuen Formen der Therapie von Gedächtniserkrankungen führen.

5. Synopsis

Verschiedenste Formen neuronaler Plastizität kontrollieren die synaptische Informationsübertragung. Neben der assoziativen, Input-spezifischen Hebbischen Plastizität (wie LTP und LTD) steuern globale, homöostatische und metaplastische Effekte die Kopplung von Prä- und Postsynapse. Vermittelt werden sowohl Hebbische wie auch homöostatische Formen der Plastizität durch Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration, die ein wichtiges Signal für die Integration neuronaler Erregungszustände sind. L-Typ Kalziumkanäle werden durch neuronale Aktivität geöffnet, messen also den Erregungszustand des Neurons und können deshalb an der Kontrolle plastischer Effekte beteiligt sein.

Aus der Familie der L-Typ Kalziumkanäle werden im Gehirn vor allem $Ca_v1.2$ und $Ca_v1.3$ exprimiert, $Ca_v1.3$ wesentlich schwächer.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle des L-Typ Kalziumkanals $Ca_v1.2$ für die Bildung thalamo-amygdalärer Hebbischer LTP und auditorischer Angstkonditionierung im Mausmodell untersucht werden. Dabei wurden elektrophysiologische und verhaltensbiologische Versuche angewendet.

Akute Inhibition von $Ca_v1.2$ durch das DHP Isradipin blockierte vollständig die Ausbildung von LTP an thalamo-amygdalären Synapsen der LA. Parallel dazu zeigten Mäuse eine reduzierte Lernleistung im auditorischen Angstkonditionierungstest, wenn sie vor Konditionierung eine ICV Injektion mit Isradipin erhielten. Diese Befunde machen deutlich, dass $Ca_v1.2$ für Amygdala-abhängiges Lernen von expliziter Bedeutung ist.

$Ca_v1.2^{NesCre}$ Tiere, welche eine chronische Inaktivierung von $Ca_v1.2$ durch gehirnspezifische Deletion des *CACNA1C* Gens besitzen, konnten überraschenderweise in der auditorischen Angstkonditionierung normal konditioniert werden. Parallel konnte in Gehirnschnitten dieser **$Ca_v1.2^{NesCre}$** Mäuse thalamo-amygdaläre LTP ausgelöst werden. Diese LTP unterschied sich im Vergleich zu den Kontrolltieren darin, daß sie nicht durch Isradipin blockierbar war.

Pyramidale Neuronen der LA von **$Ca_v1.2^{NesCre}$** Tieren keine DHP sensitiven Ionenströme mehr auf. Der gehirnspezifische Knockout von *CACNA1C* konnte somit einerseits elektrophysiologisch bestätigt und zusätzlich eine Beteiligung von $Ca_v1.3$ ausgeschlossen werden. Diese Befunde deuteten darauf hin, dass in den Neuronen der Knockout-Tiere eine alternative Einstromquelle für Kalzium entstand.

Durch die Anwendung von PhTX, einem Antagonisten von Kalzium-leitenden AMPAR, konnte die LTP in **Ca_v1.2^{NesCre}**, nicht aber in Kontrollschnitten inhibiert werden. Zusätzlich konnte in pyramidalen Neuronen der **Ca_v1.2^{NesCre}** Tiere eine Erhöhung des AMPAR Rektifizierungsindex und der GluR1 Expression nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse zeigten, dass durch die chronische Inaktivierung von Ca_v1.2 der Mechanismus zur Induktion von LTP in der thalamo-amygdalären Synapse metaplastisch grundlegend verändert wird, indem das Neuron mit einer verstärkten Expression Kalzium-leitender, GluR2 freier AMPAR reagiert. Somit konnte in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden, daß Ca_v1.2 in pyramidalen Neuronen der LA sowohl für Hebb'sche Plastizität (in Form von LTP) als auch für metaplastische Effekte von Bedeutung ist und somit einen Punkt in der Signaltransduktion dieser beiden Prozesse darstellt, an dem sie konvergieren.

6. Anhang

6.1. Für die Genotypisierung verwendete Oligonukleotide

Mauslinie	Primer	Detektiertes Allel	Größe des Amplifikats
Ca _v 1.2	VI4+VI10	WT	415 bp
	VI4+VI10	L2	500 bp
	VI8+VI10	L1	281 bp
Nestin-Cre	TK140+TK142	tg	630 bp

6.2. Oligonukleotidsequenzen

Primer	Gen	Sequenz in 5'-3'-Richtung
TK140	Cre f	ATCCGAAAAGAAAACGTTGA
TK142	Cre r	ATCCAGGTTACGGATATAGT
VI4	CACNA1C	TGGCCCCTAAGCAATGA
VI8	CACNA1C	AGGGGTGTTTCAGAGCAA
VI10	CACNA1C	CCCCAGCCAATAGAATGCCAA

6.3. Primäre Antikörper

Primärer AK	Herkunft	Verdünnung	Referenz
Ca _v 1.2	polyklonal, Kaninchen	1:250	Institut für Pharmakologie, TUM
p44/42 MAP Kinase (Erk1/Erk2)	polyklonal, Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
GluR1	polyklonal, Kaninchen	1:100	Calbiochem
GluR2	polyklonal, Kaninchen	1:1000	Alomone labs

6.4. Sekundäre Antikörper

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

7. Abkürzungen

AMPAR	α-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-Isoxazol Rezeptor
A	Ampere
ACSF	artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit
AP	Aktionspotential
APS	Ammoniumpersulfat
APV	2-Amino-5-Phosphonovalerat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCA	2,2'-Bis(chinolin-4-carbonsäure)
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin

°C	Celsius
CA1	Cornu ammonis Region 1
Ca ²⁺	Kalziumionen
CACNA1C	für Ca _v 1.2 kodierendes gen
CamKII	Ca ²⁺ -Calmodulin Proteinkinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ca _v 1.2 ^{NesCre}	Mäuse mit Nestin-Cre vermitteltem Ca _v 1.2-Knockout
Ca _v 1.x	porenbildende Untereinheit des L-Typ Kalziumkanals Subtyp 1.x
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dione
Cre	cyclization recombination
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element-binding protein
CS	Konditionierter Stimulus
Ctrl	Kontrolle
D	Dalton
DAG	Diacylglycerol
dB	Dezibel
DHP	Dihydropyridin
D-LTP	decremental LTP
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EPSC	excitatory postsynaptic current
EPSP	excitatory postsynaptic potential
ERK	extracellular signal-regulated kinase
ES Zellen	Embryonale Stammzellen
gefloxt	loxP-flankiert
GluRx	Glutamat Rezeptor Subtyp x
h	Stunde(n)
HCN	hyperpolarisation activated cyclic nucleotide gated
HVA	high voltage activated
Hz	Hertz (s ⁻¹)
IBa	Bariumstrom
ICV	intracerebroventrikulär
IF	inhibierender Faktor
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
kb	Kilobase
kHz	kilo-Hertz (10 ³ *s ⁻¹)
KO	Knockout
L1	Knockout-Allel
L2	gefloxtes Allel
LA	laterale Amygdala
L-LTP	long-lasting LTP
lox	loxP-flankiert
loxP	locus of cross over of P1
LTD	long term depression
LTP	long term potentiation
L-Typ	long-lasting-typ
M	Mega (10 ⁶) bzw. molar
m	Milli (10 ⁻³) bzw. Meter
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
mEPSC	miniature excitatory postsynaptic current
mEPSP	miniature excitatory postsynaptic potential
min	Minute(n)
ml	Milliliter
n	Nano (10 ⁻⁹)
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NMDA	N-Metyl-D-Aspartat
NMDAR	NMDA-Rezeptor

OD	optische Dichte
p	Piko (10^{-12})
p.c.	post coitus
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PhTX	Philantotoxin 433
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
RNase	RNS spaltendes Enzym
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler
TBST	Tris-NaCl-Tween20 Puffer
TEA	Tetraethylammonium
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	a,a,a-Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
TTX	Tetrodotoxin
U	Unit, Einheit
ÜN	über Nacht
US	Unkonditionierter Stimulus
UV	Ultraviolett
V	Volt
Ω	Ohm
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

8. Literaturverzeichnis

- Abraham WC, Bear MF (1996) Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 19:126-130.
- Adesnik H, Nicoll RA (2007) Conservation of glutamate receptor 2-containing AMPA receptors during long-term potentiation. *J Neurosci* 27:4598-4602.
- Araki K, Araki M, Miyazaki J, Vassalli P (1995) Site-specific recombination of a transgene in fertilized eggs by transient expression of Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:160-164.
- Armstrong CM, Neyton J (1991) Ion permeation through calcium channels. A one-site model. *Ann N Y Acad Sci* 635:18-25.
- Bauer EP, LeDoux JE, Nader K (2001) Fear conditioning and LTP in the lateral amygdala are sensitive to the same stimulus contingencies. *Nat Neurosci* 4:687-688.
- Bauer EP, Schafe GE, LeDoux JE (2002) NMDA receptors and L-type voltage-gated calcium channels contribute to long-term potentiation and different components of fear memory formation in the lateral amygdala. *J Neurosci* 22:5239-5249.

- Baumann L, Gerstner A, Zong X, Biel M, Wahl-Schott C (2004) Functional characterization of the L-type Ca²⁺ channel Cav1.4 α 1 from mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:708-713.
- Bear MF, Abraham WC (1996) Long-term depression in hippocampus. *Annu Rev Neurosci* 19:437-462.
- Berridge MJ (2004) Calcium signal transduction and cellular control mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1742:3-7.
- Betz UA, Vosshenrich CA, Rajewsky K, Muller W (1996) Bypass of lethality with mosaic mice generated by Cre-loxP-mediated recombination. *Curr Biol* 6:1307-1316.
- Bito H, Deisseroth K, Tsien RW (1996) CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca²⁺- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell* 87:1203-1214.
- Blanchard DC, Griebel G, Blanchard RJ (2003) The Mouse Defense Test Battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Eur J Pharmacol* 463:97-116.
- Bliss TV, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:331-356.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
- Bohn G, Moosmang S, Conrad H, Ludwig A, Hofmann F, Klugbauer N (2000) Expression of T- and L-type calcium channel mRNA in murine sinoatrial node. *FEBS Lett* 481:73-76.
- Bortolotto ZA, Collingridge GL (2000) A role for protein kinase C in a form of metaplasticity that regulates the induction of long-term potentiation at CA1 synapses of the adult rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 12:4055-4062.
- Bowie D, Mayer ML (1995) Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block. *Neuron* 15:453-462.
- Brickley SG, Revilla V, Cull-Candy SG, Wisden W, Farrant M (2001) Adaptive regulation of neuronal excitability by a voltage-independent potassium conductance. *Nature* 409:88-92.
- Brown TH, Chapman PF, Kairiss EW, Keenan CL (1988) Long-term synaptic potentiation. *Science* 242:724-728.
- Brusa R, Zimmermann F, Koh DS, Feldmeyer D, Gass P, Seeburg PH, Sprengel R (1995) Early-onset epilepsy and postnatal lethality associated with an editing-deficient GluR-B allele in mice. *Science* 270:1677-1680.

- Busquet P, Hetzenauer A, Sinnegger-Brauns MJ, Striessnig J, Singewald N (2008) Role of L-type Ca²⁺ channel isoforms in the extinction of conditioned fear. *Learn Mem* 15:378-386.
- Cahalan M, Neher E (1992) Patch clamp techniques: an overview. *Methods Enzymol* 207:3-14.
- Cain CK, Blouin AM, Barad M (2002) L-type voltage-gated calcium channels are required for extinction, but not for acquisition or expression, of conditional fear in mice. *J Neurosci* 22:9113-9121.
- Capecchi MR (1989) The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet* 5:70-76.
- Catterall WA (2000) From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26:13-25.
- Chan CS, Guzman JN, Ilijic E, Mercer JN, Rick C, Tkatch T, Meredith GE, Surmeier DJ (2007) 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature* 447:1081-1086.
- Chapman PF, Kairiss EW, Keenan CL, Brown TH (1990) Long-term synaptic potentiation in the amygdala. *Synapse* 6:271-278.
- Chittajallu R, Alford S, Collingridge GL (1998) Ca²⁺ and synaptic plasticity. *Cell Calcium* 24:377-385.
- Clark NC, Nagano N, Kuenzi FM, Jarolimek W, Huber I, Walter D, Wietzorrek G, Boyce S, Kullmann DM, Striessnig J, Seabrook GR (2003) Neurological phenotype and synaptic function in mice lacking the CaV1.3 alpha subunit of neuronal L-type voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Neuroscience* 120:435-442.
- Clugnet MC, LeDoux JE (1990) Synaptic plasticity in fear conditioning circuits: induction of LTP in the lateral nucleus of the amygdala by stimulation of the medial geniculate body. *J Neurosci* 10:2818-2824.
- Davare MA, Avdonin V, Hall DD, Peden EM, Burette A, Weinberg RJ, Horne MC, Hoshi T, Hell JW (2001) A beta2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca²⁺ channel Cav1.2. *Science* 293:98-101.
- Davis GW (2006) Homeostatic control of neural activity: from phenomenology to molecular design. *Annu Rev Neurosci* 29:307-323.
- Davis GW, Bezprozvanny I (2001) Maintaining the stability of neural function: a homeostatic hypothesis. *Annu Rev Physiol* 63:847-869.
- Davis M (1997) Neurobiology of fear responses: the role of the amygdala. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 9:382-402.
- Desai NS, Rutherford LC, Turrigiano GG (1999) Plasticity in the intrinsic excitability of cortical pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 2:515-520.

- Desai NS, Cudmore RH, Nelson SB, Turrigiano GG (2002) Critical periods for experience-dependent synaptic scaling in visual cortex. *Nat Neurosci* 5:783-789.
- Deyo RA, Straube KT, Disterhoft JF (1989) Nimodipine facilitates associative learning in aging rabbits. *Science* 243:809-811.
- Dolmetsch RE, Pajvani U, Fife K, Spotts JM, Greenberg ME (2001) Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science* 294:333-339.
- Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA (2000) Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25:533-535.
- Faber ES, Callister RJ, Sah P (2001) Morphological and electrophysiological properties of principal neurons in the rat lateral amygdala in vitro. *J Neurophysiol* 85:714-723.
- Feldmeyer D, Kask K, Brusa R, Kornau HC, Kolhekar R, Rozov A, Burnashev N, Jensen V, Hvalby O, Sprengel R, Seeburg PH (1999) Neurological dysfunctions in mice expressing different levels of the Q/R site-unedited AMPAR subunit GluR-B. *Nat Neurosci* 2:57-64.
- Fendt M, Fanselow MS (1999) The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev* 23:743-760.
- Fisslthaler B, Hinsch N, Chataigneau T, Popp R, Kiss L, Busse R, Fleming I (2000) Nifedipine increases cytochrome P4502C expression and endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in coronary arteries. *Hypertension* 36:270-275.
- Frank CA, Kennedy MJ, Goold CP, Marek KW, Davis GW (2006) Mechanisms underlying the rapid induction and sustained expression of synaptic homeostasis. *Neuron* 52:663-677.
- Frey U, Morris RG (1998) Synaptic tagging: implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Trends Neurosci* 21:181-188.
- Fritze J, Walden J (1995) Clinical findings with nimodipine in dementia: test of the calcium hypothesis. *J Neural Transm Suppl* 46:439-453.
- Gardner SM, Takamiya K, Xia J, Suh JG, Johnson R, Yu S, Huganir RL (2005) Calcium-permeable AMPA receptor plasticity is mediated by subunit-specific interactions with PICK1 and NSF. *Neuron* 45:903-915.
- Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P, Monyer H (1995) Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* 15:193-204.

- Goel A, Jiang B, Xu LW, Song L, Kirkwood A, Lee HK (2006) Cross-modal regulation of synaptic AMPA receptors in primary sensory cortices by visual experience. *Nat Neurosci* 9:1001-1003.
- Goldberg JH, Yuste R (2005) Space matters: local and global dendritic Ca²⁺ compartmentalization in cortical interneurons. *Trends Neurosci* 28:158-167.
- Goussakov IV, Fink K, Elger CE, Beck H (2000) Metaplasticity of mossy fiber synaptic transmission involves altered release probability. *J Neurosci* 20:3434-3441.
- Gray EE, Fink AE, Sarinana J, Vissel B, O'Dell TJ (2007) Long-term potentiation in the hippocampal CA1 region does not require insertion and activation of GluR2-lacking AMPA receptors. *J Neurophysiol* 98:2488-2492.
- Greger IH, Khatri L, Ziff EB (2002) RNA editing at arg607 controls AMPA receptor exit from the endoplasmic reticulum. *Neuron* 34:759-772.
- Grover LM, Teyler TJ (1990) Two components of long-term potentiation induced by different patterns of afferent activation. *Nature* 347:477-479.
- Gu H, Zou YR, Rajewsky K (1993) Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* 73:1155-1164.
- Hell JW, Westenbroek RE, Warner C, Ahljianian MK, Prystay W, Gilbert MM, Snutch TP, Catterall WA (1993) Identification and differential subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel alpha 1 subunits. *J Cell Biol* 123:949-962.
- Hetzenauer A, Sinnegger-Brauns MJ, Striessnig J, Singewald N (2006) Brain activation pattern induced by stimulation of L-type Ca²⁺-channels: contribution of Ca(V)1.3 and Ca(V)1.2 isoforms. *Neuroscience* 139:1005-1015.
- Hirasawa M, Pittman QJ (2003) Nifedipine facilitates neurotransmitter release independently of calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6139-6144.
- Hoda JC, Zaghetto F, Singh A, Koschak A, Striessnig J (2006) Effects of congenital stationary night blindness type 2 mutations R508Q and L1364H on Cav1.4 L-type Ca²⁺ channel function and expression. *J Neurochem* 96:1648-1658.
- Hofmann F, Lacinova L, Klugbauer N (1999) Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 139:33-87.
- Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31-108.
- Hu H, Real E, Takamiya K, Kang MG, Ledoux J, Huganir RL, Malinow R (2007) Emotion enhances learning via norepinephrine regulation of AMPA-receptor trafficking. *Cell* 131:160-173.
- Huang YY, Kandel ER (1998) Postsynaptic induction and PKA-dependent expression of LTP in the lateral amygdala. *Neuron* 21:169-178.

- Humeau Y, Reisel D, Johnson AW, Borchardt T, Jensen V, Gebhardt C, Bosch V, Gass P, Bannerman DM, Good MA, Hvalby O, Sprengel R, Luthi A (2007) A pathway-specific function for different AMPA receptor subunits in amygdala long-term potentiation and fear conditioning. *J Neurosci* 27:10947-10956.
- Impey S, Mark M, Villacres EC, Poser S, Chavkin C, Storm DR (1996) Induction of CRE-mediated gene expression by stimuli that generate long-lasting LTP in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 16:973-982.
- Isaac JT, Ashby M, McBain CJ (2007) The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron* 54:859-871.
- Jaenisch R (1988) Transgenic animals. *Science* 240:1468-1474.
- Jonas P, Racca C, Sakmann B, Seeburg PH, Monyer H (1994) Differences in Ca²⁺ permeability of AMPA-type glutamate receptor channels in neocortical neurons caused by differential GluR-B subunit expression. *Neuron* 12:1281-1289.
- Josselyn SA, Shi C, Carlezon WA, Jr., Neve RL, Nestler EJ, Davis M (2001) Long-term memory is facilitated by cAMP response element-binding protein overexpression in the amygdala. *J Neurosci* 21:2404-2412.
- Ju W, Morishita W, Tsui J, Gaietta G, Deerinck TJ, Adams SR, Garner CC, Tsien RY, Ellisman MH, Malenka RC (2004) Activity-dependent regulation of dendritic synthesis and trafficking of AMPA receptors. *Nat Neurosci* 7:244-253.
- Kovalchuk Y, Eilers J, Lisman J, Konnerth A (2000) NMDA receptor-mediated subthreshold Ca²⁺ signals in spines of hippocampal neurons. *J Neurosci* 20:1791-1799.
- Lacinova L, Klugbauer N, Hofmann F (2000) Low voltage activated calcium channels: from genes to function. *Gen Physiol Biophys* 19:121-136.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Laezza F, Doherty JJ, Dingledine R (1999) Long-term depression in hippocampal interneurons: joint requirement for pre- and postsynaptic events. *Science* 285:1411-1414.
- Lakso M, Sauer B, Mosinger B, Jr., Lee EJ, Manning RW, Yu SH, Mulder KL, Westphal H (1992) Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6232-6236.
- LeDoux J (1998) Fear and the brain: where have we been, and where are we going? *Biol Psychiatry* 44:1229-1238.
- LeDoux J (2007) The amygdala. *Curr Biol* 17:R868-874.
- LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23:155-184.

- Liao P, Yong TF, Liang MC, Yue DT, Soong TW (2005) Splicing for alternative structures of Cav1.2 Ca²⁺ channels in cardiac and smooth muscles. *Cardiovasc Res* 68:197-203.
- Liu SJ, Cull-Candy SG (2005) Subunit interaction with PICK and GRIP controls Ca²⁺ permeability of AMPARs at cerebellar synapses. *Nat Neurosci* 8:768-775.
- Liu SQ, Cull-Candy SG (2000) Synaptic activity at calcium-permeable AMPA receptors induces a switch in receptor subtype. *Nature* 405:454-458.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Lu YF, Kandel ER, Hawkins RD (1999) Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. *J Neurosci* 19:10250-10261.
- Ludwig A, Flockerzi V, Hofmann F (1997) Regional expression and cellular localization of the alpha1 and beta subunit of high voltage-activated calcium channels in rat brain. *J Neurosci* 17:1339-1349.
- Mahanty NK, Sah P (1998) Calcium-permeable AMPA receptors mediate long-term potentiation in interneurons in the amygdala. *Nature* 394:683-687.
- Marder E, Prinz AA (2003) Current compensation in neuronal homeostasis. *Neuron* 37:2-4.
- Maren S, Fanselow MS (1996) The amygdala and fear conditioning: has the nut been cracked? *Neuron* 16:237-240.
- McKinney BC, Sze W, White JA, Murphy GG (2008) L-type voltage-gated calcium channels in conditioned fear: a genetic and pharmacological analysis. *Learn Mem* 15:326-334.
- Metzger D, Feil R (1999) Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curr Opin Biotechnol* 10:470-476.
- Misonou H, Mohapatra DP, Park EW, Leung V, Zhen D, Misonou K, Anderson AE, Trimmer JS (2004) Regulation of ion channel localization and phosphorylation by neuronal activity. *Nat Neurosci* 7:711-718.
- Moody TD, Carlisle HJ, O'Dell TJ (1999) A nitric oxide-independent and beta-adrenergic receptor-sensitive form of metaplasticity limits theta-frequency stimulation-induced LTP in the hippocampal CA1 region. *Learn Mem* 6:619-633.
- Moosmang S, Schulla V, Welling A, Feil R, Feil S, Wegener JW, Hofmann F, Klugbauer N (2003) Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. *Embo J* 22:6027-6034.
- Moosmang S, Haider N, Klugbauer N, Adelsberger H, Langwieser N, Muller J, Stiess M, Marais E, Schulla V, Lacinova L, Goebbels S, Nave KA, Storm DR, Hofmann F, Kleppisch T (2005) Role of hippocampal Cav1.2 Ca²⁺ channels in

- NMDA receptor-independent synaptic plasticity and spatial memory. *J Neurosci* 25:9883-9892.
- Morgan SL, Teyler TJ (1999) VDCCs and NMDARs underlie two forms of LTP in CA1 hippocampus in vivo. *J Neurophysiol* 82:736-740.
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350.
- Murphy TH, Worley PF, Nakabeppu Y, Christy B, Gastel J, Baraban JM (1991) Synaptic regulation of immediate early gene expression in primary cultures of cortical neurons. *J Neurochem* 57:1862-1872.
- Nagy A (2000) Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26:99-109.
- Nguyen PV, Kandel ER (1997) Brief theta-burst stimulation induces a transcription-dependent late phase of LTP requiring cAMP in area CA1 of the mouse hippocampus. *Learn Mem* 4:230-243.
- Nicoll RA, Malenka RC (1995) Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 377:115-118.
- Obermair GJ, Szabo Z, Bourinet E, Flucher BE (2004) Differential targeting of the L-type Ca²⁺ channel alpha 1C (CaV1.2) to synaptic and extrasynaptic compartments in hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 19:2109-2122.
- Oliveria SF, Dell'Acqua ML, Sather WA (2007) AKAP79/150 anchoring of calcineurin controls neuronal L-type Ca²⁺ channel activity and nuclear signaling. *Neuron* 55:261-275.
- Orban PC, Chui D, Marth JD (1992) Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6861-6865.
- Patterson SL, Pittenger C, Morozov A, Martin KC, Scanlin H, Drake C, Kandel ER (2001) Some forms of cAMP-mediated long-lasting potentiation are associated with release of BDNF and nuclear translocation of phospho-MAP kinase. *Neuron* 32:123-140.
- Piedras-Renteria ES, Pyle JL, Diehn M, Glickfeld LL, Harata NC, Cao Y, Kavalali ET, Brown PO, Tsien RW (2004) Presynaptic homeostasis at CNS nerve terminals compensates for lack of a key Ca²⁺ entry pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3609-3614.
- Pinard CR, Mascagni F, McDonald AJ (2005) Neuronal localization of Ca(v)1.2 L-type calcium channels in the rat basolateral amygdala. *Brain Res* 1064:52-55.
- Plant K, Pelkey KA, Bortolotto ZA, Morita D, Terashima A, McBain CJ, Collingridge GL, Isaac JT (2006) Transient incorporation of native GluR2-lacking AMPA receptors during hippocampal long-term potentiation. *Nat Neurosci* 9:602-604.

- Quirk GJ, Repa C, LeDoux JE (1995) Fear conditioning enhances short-latency auditory responses of lateral amygdala neurons: parallel recordings in the freely behaving rat. *Neuron* 15:1029-1039.
- Quirk GJ, Armony JL, LeDoux JE (1997) Fear conditioning enhances different temporal components of tone-evoked spike trains in auditory cortex and lateral amygdala. *Neuron* 19:613-624.
- Rajewsky K, Gu H, Kuhn R, Betz UA, Muller W, Roes J, Schwenk F (1996) Conditional gene targeting. *J Clin Invest* 98:600-603.
- Roberts AC, Glanzman DL (2003) Learning in Aplysia: looking at synaptic plasticity from both sides. *Trends Neurosci* 26:662-670.
- Rodrigues SM, Schafe GE, LeDoux JE (2004) Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala. *Neuron* 44:75-91.
- Rogan MT, LeDoux JE (1995) LTP is accompanied by commensurate enhancement of auditory-evoked responses in a fear conditioning circuit. *Neuron* 15:127-136.
- Rotenberg A, Mayford M, Hawkins RD, Kandel ER, Muller RU (1996) Mice expressing activated CaMKII lack low frequency LTP and do not form stable place cells in the CA1 region of the hippocampus. *Cell* 87:1351-1361.
- Rumpel S, LeDoux J, Zador A, Malinow R (2005) Postsynaptic receptor trafficking underlying a form of associative learning. *Science* 308:83-88.
- Sabatini BL, Svoboda K (2000) Analysis of calcium channels in single spines using optical fluctuation analysis. *Nature* 408:589-593.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.
- Sandrock AW, Jr., Dryer SE, Rosen KM, Gozani SN, Kramer R, Theill LE, Fischbach GD (1997) Maintenance of acetylcholine receptor number by neuregulins at the neuromuscular junction in vivo. *Science* 276:599-603.
- Schafe GE, LeDoux JE (2000) Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. *J Neurosci* 20:RC96.
- Schafe GE, Atkins CM, Swank MW, Bauer EP, Sweatt JD, LeDoux JE (2000) Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning. *J Neurosci* 20:8177-8187.
- Schulla V, Renstrom E, Feil R, Feil S, Franklin I, Gjinovci A, Jing XJ, Laux D, Lundquist I, Magnuson MA, Obermuller S, Olofsson CS, Salehi A, Wendt A, Klugbauer N, Wollheim CB, Rorsman P, Hofmann F (2003) Impaired insulin secretion and glucose tolerance in beta cell-selective Ca(v)1.2 Ca²⁺ channel null mice. *Embo J* 22:3844-3854.

- Schweighofer N, Arbib MA (1998) A model of cerebellar metaplasticity. *Learn Mem* 4:421-428.
- Seisenberger C, Specht V, Welling A, Platzer J, Pfeifer A, Kuhbandner S, Striessnig J, Klugbauer N, Feil R, Hofmann F (2000) Functional embryonic cardiomyocytes after disruption of the L-type alpha1C (Cav1.2) calcium channel gene in the mouse. *J Biol Chem* 275:39193-39199.
- Shepherd JD, Rumbaugh G, Wu J, Chowdhury S, Plath N, Kuhl D, Huganir RL, Worley PF (2006) Arc/Arg3.1 mediates homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors. *Neuron* 52:475-484.
- Sinnegger-Brauns MJ, Hetzenauer A, Huber IG, Renstrom E, Wietzorrek G, Berjukov S, Cavalli M, Walter D, Koschak A, Waldschutz R, Hering S, Bova S, Rorsman P, Pongs O, Singewald N, Striessnig JJ (2004) Isoform-specific regulation of mood behavior and pancreatic beta cell and cardiovascular function by L-type Ca²⁺ channels. *J Clin Invest* 113:1430-1439.
- Son H, Lu YF, Zhuo M, Arancio O, Kandel ER, Hawkins RD (1998) The specific role of cGMP in hippocampal LTP. *Learn Mem* 5:231-245.
- Stiedl O, Spiess J (1997) Effect of tone-dependent fear conditioning on heart rate and behavior of C57BL/6N mice. *Behav Neurosci* 111:703-711.
- Stiedl O, Radulovic J, Lohmann R, Birkenfeld K, Palve M, Kammermeier J, Sananbenesi F, Spiess J (1999) Strain and substrain differences in context- and tone-dependent fear conditioning of inbred mice. *Behav Brain Res* 104:1-12.
- Striessnig J (1999) Pharmacology, structure and function of cardiac L-type Ca²⁺ channels. *Cell Physiol Biochem* 9:242-269.
- Striessnig J, Koschak A, Sinnegger-Brauns MJ, Hetzenauer A, Nguyen NK, Busquet P, Pelster G, Singewald N (2006) Role of voltage-gated L-type Ca²⁺ channel isoforms for brain function. *Biochem Soc Trans* 34:903-909.
- Sutton MA, Ito HT, Cressy P, Kempf C, Woo JC, Schuman EM (2006) Miniature neurotransmission stabilizes synaptic function via tonic suppression of local dendritic protein synthesis. *Cell* 125:785-799.
- Tang J, Wagner S, Schachner M, Dityatev A, Wotjak CT (2003) Potentiation of amygdaloid and hippocampal auditory-evoked potentials in a discriminatory fear-conditioning task in mice as a function of tone pattern and context. *Eur J Neurosci* 18:639-650.
- Thiagarajan TC, Lindskog M, Tsien RW (2005) Adaptation to synaptic inactivity in hippocampal neurons. *Neuron* 47:725-737.
- Thiagarajan TC, Lindskog M, Malgaroli A, Tsien RW (2007) LTP and adaptation to inactivity: overlapping mechanisms and implications for metaplasticity. *Neuropharmacology* 52:156-175.

- Trimmer JS, Rhodes KJ (2004) Localization of voltage-gated ion channels in mammalian brain. *Annu Rev Physiol* 66:477-519.
- Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, Bock R, Klein R, Schutz G (1999) Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet* 23:99-103.
- Tsvetkov E, Carlezon WA, Benes FM, Kandel ER, Bolshakov VY (2002) Fear conditioning occludes LTP-induced presynaptic enhancement of synaptic transmission in the cortical pathway to the lateral amygdala. *Neuron* 34:289-300.
- Turrigiano G (2007) Homeostatic signaling: the positive side of negative feedback. *Curr Opin Neurobiol* 17:318-324.
- Turrigiano GG, Nelson SB (2000) Hebb and homeostasis in neuronal plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 10:358-364.
- Turrigiano GG, Nelson SB (2004) Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat Rev Neurosci* 5:97-107.
- Turrigiano GG, Leslie KR, Desai NS, Rutherford LC, Nelson SB (1998) Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature* 391:892-896.
- Waltereit R, Mannhardt S, Nescholta S, Maser-Gluth C, Bartsch D (2008) Selective and protracted effect of nifedipine on fear memory extinction correlates with induced stress response. *Learn Mem* 15:348-356.
- Waltereit R, Dammermann B, Wulff P, Scafidi J, Staubli U, Kauselmann G, Bundman M, Kuhl D (2001) Arg3.1/Arc mRNA induction by Ca²⁺ and cAMP requires protein kinase A and mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase activation. *J Neurosci* 21:5484-5493.
- Washburn MS, Dingledine R (1996) Block of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors by polyamines and polyamine toxins. *J Pharmacol Exp Ther* 278:669-678.
- Weisskopf MG, Bauer EP, LeDoux JE (1999) L-type voltage-gated calcium channels mediate NMDA-independent associative long-term potentiation at thalamic input synapses to the amygdala. *J Neurosci* 19:10512-10519.
- Wenthold RJ, Petralia RS, Blahos J, II, Niedzielski AS (1996) Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J Neurosci* 16:1982-1989.
- West AE, Chen WG, Dalva MB, Dolmetsch RE, Kornhauser JM, Shaywitz AJ, Takasu MA, Tao X, Greenberg ME (2001) Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11024-11031.
- Winder DG, Martin KC, Muzzio IA, Rohrer D, Chruscinski A, Kobilka B, Kandel ER (1999) ERK plays a regulatory role in induction of LTP by theta frequency

- stimulation and its modulation by beta-adrenergic receptors. *Neuron* 24:715-726.
- Wyatt CN, Campbell V, Brodbeck J, Brice NL, Page KM, Berrow NS, Brickley K, Terracciano CM, Naqvi RU, MacLeod KT, Dolphin AC (1997) Voltage-dependent binding and calcium channel current inhibition by an anti-alpha 1D subunit antibody in rat dorsal root ganglion neurones and guinea-pig myocytes. *J Physiol* 502 (Pt 2):307-319.
- Xu W, Lipscombe D (2001) Neuronal Ca(V)1.3alpha(1) L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines. *J Neurosci* 21:5944-5951.
- Yakubu MA, Leffler CW (2002) L-type voltage-dependent Ca²⁺ channels in cerebral microvascular endothelial cells and ET-1 biosynthesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C1687-1695.
- Yaniv D, Schafe GE, LeDoux JE, Richter-Levin G (2000) Perirhinal cortex and thalamic stimulation induces LTP in different areas of the amygdala. *Ann N Y Acad Sci* 911:474-476.
- Zimmerman L, Parr B, Lendahl U, Cunningham M, McKay R, Gavin B, Mann J, Vassileva G, McMahon A (1994) Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron* 12:11-24.

Eigene Veröffentlichungen:

Abstracts:

Christel C, Langwieser N, Wotjak C, Kleppisch T, Hofmann F, Moosmang S (2007)
Involvement of Cav1.2 in the process of fear memory formation in the mouse.
Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 375, 189

Paul C, Weinmeister P, Christel C, Moosmang S, Feil R, Hofmann F, Kleppisch T
(2007) cGMP-dependent kinase I supports formation of associative fear
memory and long-term potentiation in the lateral amygdala. Naunyn-
Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 375, 167

Christel C, Langwieser N, Wotjak C, Kleppisch T, Hofmann F, Moosmang S (2007)
Involvement of Cav1.2 in the process of fear memory formation in the mouse.
Interact PhD symposium 2007, B107

Submitted papers:

"Homeostatic switch of the mechanism of Hebbian plasticity and fear learning after
sustained loss of Cav1.2 calcium channels" by Nicole Langwieser*, Carl Christel*,
Thomas Kleppisch, Franz Hofmann, Carsten Wotjak, and Sven Moosmang; *equally
contributed

"Unchanged beta-adrenergic stimulation of cardiac L-type calcium channels in
Cav1.2 phosphorylation site S1928A mutant mice" by Toni Lemke, Andrea Welling,
Carl Johannes Christel, Anne Blaich, Dominik Bernhard, Peter Lenhardt, Franz
Hofmann and Sven Moosmang

Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. Sven Moosmang, welcher mir als direkter Betreuer meiner Arbeit zu jeder Zeit mit Rat und Hilfe zur Seite stand und meine wissenschaftliches Wachstum stets förderte.

Ebenfalls herzlichen Dank an Herrn Prof. Hofmann für die Aufnahme in sein Institut und das damit verbundene Vertrauen das er in mich setzte.

Des weiteren danke ich Prof. Schemann vom Lehrstuhl für Humanbiologie des Wissenschaftszentrum Weihenstephan für die Betreuung meiner Arbeit als Vertreter des WZW.

Nicole Haider möchte ich ganz herzlichen Dank aussprechen für die wundervolle Zusammenarbeit im Labor und für die Unterstützung dieser Arbeit.

Angelika Baumgartner danke ich für Ihre Hilfe bei vielen molekularbiologischen Arbeiten und Ihre stete Hilfsbereitschaft.

Thomas Kleppisch danke ich von Herzen für die praktische Ausbildung in Patch-clamp und seiner ganzen AG danke ich für die vielen Stunden die ich im in Ihrem Patchlabor verbringen konnte.

Ebenso herzlichen Dank an Dr. Wotjak vom Max-Planck-Institut, München für unsere Zusammenarbeit und Seine unterstützende Beratung.

Peter, Dominik, Lior, Steffi, Toni, Julia und Katrin sowie der gesamten Belegschaft des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie danke ich für eine spannende, aufregende Zeit, für wundervolle Stunden innerhalb und ausserhalb der Arbeitszeiten und viel Spass am Arbeitsplatz.

Zuletzt möchte ich mich zutiefst bei meiner Familie bedanken, meinen Eltern Eva-Maria und Bernard Henry Christel und meinen Schwestern Julie und Clarissa, für all die Unterstützung die Sie mir in diesen Jahren zuteil kommen haben lassen.