

**Untersuchungen zur Proteinbiosynthese bei  
hippokampusabhängigen Lernprozessen  
der Maus**

**Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
an der Fakultät für Biologie,  
Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Angefertigt am Max-Planck-Institut für Psychiatrie**

**von**

**Klaus Wanisch**

**München, 2006**

**Betreuung der Arbeit:** Dr. Carsten T. Wotjak

**1. Gutachter:** Prof. Dr. Rainer Landgraf

**2. Gutachter:** Prof. Dr. Gerd Schuller

**Eingereicht am 21. Dezember 2006**

**Mündliche Prüfung am 21. Mai 2007**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Menschlicher Geist und Gedächtnis aus historischer Sicht .....	1
1.2 Die Bedeutung von Tiermodellen für die Gedächtnisforschung .....	3
1.3 Gegenwärtiges Modell zu Lernvorgängen und zugrunde liegende Mechanismen .....	6
1.3.1 Psychologische und anatomische Aspekte .....	6
1.3.2 Zelluläre Korrelate .....	9
1.3.3 Molekulare Mechanismen .....	11
1.4 Strategien zur Untersuchung lernassoziierter Moleküle .....	13
1.5 Der Hippokampus als Modellregion zur Untersuchung lernrelevanter Veränderungen .....	15
1.6 Untersuchung von Lernprozessen am Modell der Furchtkonditionierung bei Mäusen .....	19
1.7 Aufgabenstellung .....	21
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>22</b>
2.1 Tiere und Haltungsbedingungen .....	22
2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial .....	22
2.2.1 Chemikalien und Pharmaka .....	22
2.2.2 Antikörper, Enzyme und Feinchemikalien .....	24
2.2.3 Verbrauchsmaterial .....	25
2.2.4 Allgemeine Geräte .....	25

2.3 Lerntests. . . . .	26
2.3.1 Konditionierungssetup. . . . .	26
2.3.2 Tonkonditionierung und -gedächtnis. . . . .	28
2.3.3 Kontextkonditionierung und -gedächtnis. . . . .	28
2.3.4 Verhaltensausswertung. . . . .	29
2.4 Pharmakologische Verhaltensexperimente mit intrazerebralen Injektionen. . . . .	30
2.4.1 Implantieren von Führungskanülen. . . . .	30
2.4.2 Zerebral injizierte Substanzen. . . . .	31
2.4.3 Durchführung von intrazerebralen Injektionen. . . . .	31
2.4.4 Histologische Verifizierung der Injektionsstelle. . . . .	32
2.5 Untersuchungen zur Induktion von <i>Immediate early genes</i> . . . . .	33
2.5.1 <i>In situ</i> -Hybridisierung. . . . .	33
2.5.1.1 Herstellung und Vorbereitung der Gehirnschnitte. . . . .	33
2.5.1.2 Herstellung der Hybridisierungs sonden. . . . .	34
2.5.1.3 Durchführung der Hybridisierung. . . . .	35
2.5.1.4 Auswertung. . . . .	35
2.5.2 Immunhistochemie. . . . .	36
2.5.2.1 Vorbereitung und Weiterbehandlung der Gehirne. . . . .	36
2.5.2.2 Immunhistochemischer Nachweises von c-Fos. . . . .	36
2.5.2.3 Auswertung. . . . .	37
2.6 Funktionelle Untersuchungen zur Proteinbiosynthese. . . . .	37
2.6.1 Durchführung der Markierung mit [ <sup>35</sup> S]-Methionin/Cystein. . . . .	37
2.6.2 Proteinsyntheseabhängigkeit der Inkorporation von [ <sup>35</sup> S]-Met/Cys. . . . .	37
2.6.3 Prozessieren von Hirnschnitten und Gewebeproben. . . . .	38
2.6.4 Densitometrische Auswertung von Gehirnschnitten. . . . .	38
2.6.5 Messung der Radioaktivität im Gewebe. . . . .	40
2.6.5.1 Gesamtgewebe. . . . .	40
2.6.5.2 Proteinfraction. . . . .	40
2.7 Zweidimensionale Gelelektrophorese. . . . .	40
2.7.1 Standardprotokoll. . . . .	40
2.7.1.1 Hippokampusentnahme und Gewebeaufschluss. . . . .	40
2.7.1.2 Proteinauftrennung. . . . .	41
2.7.1.3 Färbung und Auswertung. . . . .	42
2.7.2 Protokoll für [ <sup>35</sup> S]-markierte Proteine. . . . .	43
2.7.2.1 Gewebeentnahme und -aufschluss. . . . .	43
2.7.2.2 Proteinauftrennung und <i>-blotting</i> . . . . .	44
2.7.2.3 Autoradiographie und Auswertung. . . . .	44
2.8 Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse. . . . .	45

<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>46</b>
3.1 Vorüberlegungen zur Auswahl der Verhaltenstests. ....	46
3.2 Charakterisierung von <i>trace</i> -Konditionierung hinsichtlich der Anwendung für die Untersuchung lernassoziierter Moleküle. ....	46
3.2.1 Optimierung hinsichtlich Mausstamm und Testprotokoll. ....	46
3.2.2 Pharmakologische Blockierung der NMDA-Rezeptoren. ....	48
3.2.3 Hemmung der Transkription. ....	49
3.2.4 Hemmung der Translation. ....	50
3.2.5 Induktion der <i>Immediate early genes zif268, c-fos</i> und <i>bdnf</i> . ....	52
3.3 Charakterisierung von kontextueller Konditionierung hinsichtlich der Anwendung für die Untersuchung lernassoziierter Moleküle. ....	53
3.3.1 Wahl des geeigneten Mausstammes. ....	53
3.3.2 Stimulusmodalitäten bei kontextuellem Gedächtnis. ....	54
3.3.3 Pharmakologische Blockierung der NMDA-Rezeptoren. ....	55
3.3.4 Hemmung der Transkription. ....	56
3.3.5 Hemmung der Translation. ....	57
3.3.6 Induktion des <i>Immediate early genes c-Fos</i> . ....	58
3.4 Autoradiographische Visualisierung von lerninduzierter Proteinbiosynthese. . .	60
3.4.1 Verteilungskinetik von [ <sup>35</sup> S]-Met/Cys nach systemischer Gabe. ....	60
3.4.2 Langzeitentwicklung der Inkorporation von [ <sup>35</sup> S]-Met/Cys. ....	62
3.4.3 Einbau von [ <sup>35</sup> S]-Met/Cys bei systemischer Translationshemmung. . .	63
3.4.4 Anisomycinwirkung bei intrahippokampaler Injektion. ....	65
3.4.5 Funktionelle Neuroanatomie durch [ <sup>35</sup> S]-Met/Cys-Markierung. ....	66
3.4.6 Einfluss von kontextueller Konditionierung auf die Translation. ....	67
3.4.7 Einfluss der Konditionierung auf die Synchronität der Translation. . . .	71
3.5 Lernbedingte Veränderungen der Proteinexpression. ....	74
3.5.1 Versuch 1: <i>Trace</i> -Konditionierung - Standardprotokoll. ....	74
3.5.2 Versuch 2: Kontextuelle Konditionierung - Markierung der Proteine mit [ <sup>35</sup> S]-Met/Cys. ....	76
3.5.3 Versuch 3: Kontextuelle Konditionierung - Markierung der Proteine aus CA1 mit [ <sup>35</sup> S]-Met/Cys. ....	77

<b>4. Diskussion.</b> .....	<b>81</b>
4.1 Zugrunde liegende Konzeption der Arbeit. ....	81
4.1.1 Der dorsale Hippokampus als Modellregion für Gedächtnisforschung. ....	82
4.1.2 Auswahl geeigneter Verhaltenstests. ....	83
4.1.2.1 <i>Trace</i> -Furchtkonditionierung. ....	84
4.1.2.2 Kontextuelle Furchtkonditionierung. ....	85
4.1.3 <i>Immediate early genes</i> als Indikatoren für neuronale Aktivierung. ....	88
4.2 Funktionelle Darstellung von Proteinbiosyntheseaktivität im Gehirn. ....	90
4.2.1 Metabolismus von Aminosäuren im Gehirn nach systemischer Administration. ....	91
4.2.2 Technische und methodische Aspekte zur Quantifizierung der Proteinsynthese. ....	93
4.2.3 Funktionelle Proteinbiosynthese bei kontextueller Furchtkonditionierung. ....	94
4.2.4 Zusammenfassende Bewertung der funktionellen Proteinbiosynthese. ....	95
4.3 Lernbedingte Veränderungen der Genexpression. ....	96
4.3.1 Möglichkeiten und Grenzen der zweidimensionalen Gelelektrophorese. ....	96
4.3.2 Verbesserungen hinsichtlich Sensitivität und <i>signal-to-noise ratio</i> . ....	98
4.3.3 Zusammenfassende Beurteilung der Versuche mit zweidimensionaler Gelelektrophorese. ....	99
4.4 Kritische Betrachtung zur Rolle der Proteinbiosynthese bei Lernprozessen. ...	100
4.5 Alternative Modelle zur Bildung von Langzeitgedächtnis. ....	102
4.6 Die andere Seite der Gene – Unterschiede im Transkriptom. ....	103
4.7 Schlussbemerkungen und Ausblick. ....	104
<b>5. Zusammenfassung.</b> .....	<b>106</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.</b> .....	<b>108</b>
<b>Danksagung.</b> .....	<b>125</b>
<b>Lebenslauf.</b> .....	<b>127</b>
<b>Erklärung.</b> .....	<b>128</b>

# Abkürzungsverzeichnis

## Im Text verwendete Kurzschreibweisen:

Die Kurzschreibweisen von Chemikalien sind im Abschnitt Material und Methoden (2.2) zu finden.

Abkürzung	Erklärung
Abb.	Abbildung
aHPC	anteriorer Hippokampus
AK	assoziative Kommissur
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
<i>BDNF</i>	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BL/6J	C57BL/6JOlaHsd (Mausstamm)
BL/6N	C57BL/6NCrl (Mausstamm)
BLA	basolateraler Amygdalakomplex
BOLD	<i>blood oxygen level dependent</i> (vom Blutsauerstoffgehalt abhängig)
[ <sup>14</sup> C]	Kohlenstoff (radioaktives Isotop, relative Atommasse=14)
CA1 oder CA3	<i>Cornu ammonis</i> 1 oder 3; Subregionen des Hippokampus
CA1d	CA1 dorsaler Teil
CA1v	CA1 ventraler Teil
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CaMKII (oder IV)	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (oder IV)
cAMP	<i>cyclic AMP</i> (zyklisches Adenosinmonophosphat)
cc	<i>Corpus callosum</i>
CCD	<i>charge-coupled device</i> ; Technisches Prinzip bei Kameras
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CE	zentrale Amygdala
<i>c-Fos</i>	<i>Murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>
ci	<i>Capsula interna</i>
CRE	<i>CREB responsive element</i>
CREB	<i>cAMP responsive-element binding protein</i>
CS	<i>conditioned stimulus</i> (konditionierter Stimulus)
Cys	Cystein
d.h.	das heißt
DG	<i>Gyrus dentatus</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
EK	entorhinaler Kortex
E-LTP	<i>early LTP</i> (frühe Phase der Langzeitpotenzierung)
<i>et al.</i>	und andere
F-Aktin	filamentöses Aktin
fMRI	<i>functional MRI</i> (funktionelle Magnetresonanz Bildgebung)
GABA	<i><math>\gamma</math>-aminobutyric acid</i> ( $\gamma$ -Aminobutyrat)
G-Aktin	globuläres Aktin
GTP	Guanosintriphosphat
[ <sup>3</sup> H]	Wasserstoff (radioaktives Isotop, relative Atommasse=3); Tritium
H.M.	Initialen eines Patienten (mit Bedeutung für die Hirnforschung)
HPA-Achse	<i>Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis</i> (Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse)
IEF	<i>isoelectric focussing</i> (Isoelektrische Fokussierung)
IEGs	<i>Immediate early genes</i>

Abkürzung (Fortsetzung)	Erklärung
IgG	Immunglobulin G
i.p.	intraperitoneal
Jh.	Jahrhundert
LA	laterale Amygdala
L-LTP	<i>late</i> LTP (späte Phase der Langzeitpotenzierung)
LTD	<i>long-term depression</i> (Langzeitdepotenzierung)
LTP	<i>long-term potentiation</i> (Langzeitpotenzierung)
M	Molekulargewicht
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)
MEMRI	<i>manganese enhanced MRI</i> (mit Mangan verstärkte Magnetresonanz Bildgebung)
Met	Methionin
MF	<i>mossy fibers</i> (Moosfasern)
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
MRI	<i>magnetic resonance imaging</i> (Magnetresonanz Bildgebung)
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
n	Stichprobengröße
N	Anzahl
n.Chr.	nach Christus
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Saline)
PFA	Paraformaldehyd
pHPC	posteriorer Hippokampus
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PP	<i>perforant path</i> ( <i>Tractus perforans</i> )
PP1 oder PP2A	Proteinphosphatase 1 oder 2A
PVDF-Membran	Polyvinylidendifluorid-Membran
PVN	<i>Nucleus paraventricularis</i>
QTL	<i>quantitative trait loci</i>
S	<i>Subikulum</i>
[ <sup>35</sup> S]	Schwefel (radioaktives Isotop, relative Atommasse=35)
s.c.	subkutan
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SK	Schaffer-Kollateralen
sog.	sogenannt
SSC	<i>sodium chloride sodium citric acid</i> (Saline-Natrium-Citrat-Puffer)
Tab.	Tabelle
TCA	<i>trichloroacetic acid</i> (Trichloressigsäure)
to	<i>Tractus opticus</i>
t <sub>x</sub>	Zeitpunkt x
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
US	<i>unconditioned stimulus</i> (unkonditionierter Stimulus)
v.a.	vor allem
v.Chr.	vor Christus
vgl.	vergleiche
vs.	<i>versus</i>
z.B.	zum Beispiel
Zif268	Zinkfinger Transkriptionsfaktor 268 (auch: <i>Egr-1</i> , <i>Krox-24</i> , <i>NGFI-A</i> )

**Maßeinheiten:**

Symbol	Einheit	Messgröße
°C	Grad Celsius	Temperatur
A	Ampere	Stromstärke
Ci	Curie	Radioaktivität
cpm	<i>counts per minute</i>	Radioaktivität
Da	Dalton	Molekulargewicht
dB	Dezibel	Lautstärke
g	Gramm	Masse
G	<i>gauge</i>	Durchmesser
h	Stunden	Zeit
Hz	Hertz	Frequenz
l	Liter	Volumen
m	Meter	Länge
M	molar (Mol/Liter)	Stoffkonzentration
min	Minuten	Zeit
mol	Mol	Stoffmenge
pH	---	$-\log_{10}$ der Konzentration von $H^+$
s	Sekunden	Zeit
U	<i>units</i> (Einheiten)	Enzymaktivität
Upm	---	Umdrehungen pro Minute
V	Volt	Stromspannung

**Präfixe für Vielfaches der Maßeinheiten:**

Abkürzung	Präfix	Faktor
k	Kilo-	$10^3$
c	Centi-	$10^{-2}$
m	Milli-	$10^{-3}$
$\mu$	Mikro-	$10^{-6}$
n	Nano-	$10^{-9}$
p	Pico-	$10^{-12}$

## 1. Einleitung

### 1.1 Menschlicher Geist und Gedächtnis aus historischer Sicht

Die Erkenntnis, dass das Gehirn das materielle Substrat der menschlichen Psyche darstellt, ist aus heutiger Sicht selbstverständlich. Der menschliche Geist mit seinen kognitiven und emotionalen Fähigkeiten ist einer unmittelbaren Beobachtung jedoch nicht zugänglich, was in der Vergangenheit zu unterschiedlichen und sich oft verändernden Auffassungen über sein Wesen führte, die dem damaligen Wissensstand und Weltbild entsprachen.

Bereits um 500 v.Chr. führte Alkmäon von Kroton aus Griechenland die Sektion eines Auges bei einem Tier durch und erkannte, dass davon ausgehende Bahnen zum Gehirn ziehen. Aber auch die anderen Sinnesorgane des Kopfes hatten Verbindungen zum Gehirn, weshalb er es für das Zentrum der Sinneswahrnehmung und des Denkens hielt. Auch Hippokrates (460 - 377 v.Chr.) war von der Bedeutung des Gehirns für den menschlichen Körper überzeugt (Kulenbeck, 1957; Uttal, 2001).

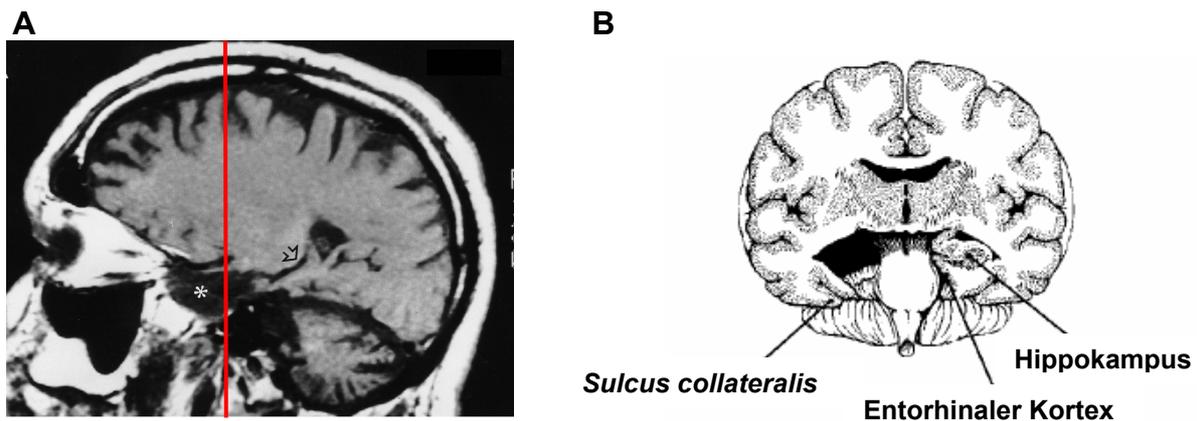
Durch die Einflüsse von Platons (427 - 347 v.Chr.) dreiteiligem Modell der menschlichen Seele (Verstand, Leidenschaft und niedere Triebe) verlor das Gehirn an Stellenwert. Aristoteles (384 - 322 v.Chr.) vermutete den Sitz der Seele im Herz, da das Hirn blutlos sei (Brazier, 1960). Diese Ansichten waren über mehrere Jahrhunderte lang vorherrschend, obwohl es durchaus Gegenstimmen gab, z.B. von dem römischen Arzt Claudius Galenus (ca. 129 - 199 n.Chr.). Dieser führte bei Tieren Rückenmarksdurchtrennungen durch und beobachtete die lähmenden Auswirkungen, was ihn von der Bedeutung des Gehirns als zentralem Organ der Wahrnehmung überzeugte. Aus Untersuchungen an den Hirnventrikeln entwickelte er die Theorie des „*spiritus animalis*“ (Seelengeist), der von diesen Hohlräumen des Gehirns ausgehend durch die Nervenstränge in den Körper fließe (Uttal, 2001).

Erst im 17. und 18. Jahrhundert wurden wieder verstärkt Untersuchungen der Hirnanatomie durchgeführt. Ein entscheidender Anstoß zur Erforschung der Hirnfunktionen wurde schließlich durch Franz Joseph Gall (1758 - 1828) gegeben, der zusammen mit Joseph Spurzheim die Lokalisationslehre entwickelte und als Begründer der Phrenologie galt, die jedoch als wissenschaftliche Theorie nie ganz unumstritten war (Deneke, 1985). Die beiden wesentlichen Annahmen dieser Theorie

besagen, dass der menschliche Geist aus mehreren voneinander unterscheidbaren geistigen Fähigkeiten besteht und diese jeweils einer bestimmten Region des Gehirns zuzuordnen sind. Dabei bildeten vor allem anatomische *post mortem* Untersuchungen von Gehirnen psychisch auffälliger Menschen oder von Straftätern die Grundlage für die Einteilung in sog. „Gehirnorgane“. Zu den kuriossten der anfänglich 27 gefundenen Funktionalitäten des Gehirns gehörten z.B. der Diebsinn, der Raufsinn und der Mordsinn oder das Organ des philosophischen Scharfsinns und das Organ der Ruhmsucht und der Eitelkeit. Gall postulierte darüber hinaus, dass sich anhand der Schädelform, die in engem Zusammenhang mit der Form des Gehirns stünde, der Charakter einer Person vorhersagen lasse (Uttal, 2001). Die Phrenologie schaffte es aber aufgrund mangelnder wissenschaftlicher Basis nicht, sich durchzusetzen, obwohl sie immerhin die Lokalisation von Hirnfunktionen richtigerweise vorwegnahm. Eine zu Galls Lokalisationslehre gegenläufige Theorie hatte zum Inhalt, dass das Gedächtnis diffus im gesamten Gehirn verteilt ist. Ein wichtiger Vertreter dieser Richtung war Karl Lashley (1890 – 1958). Bei Experimenten mit Ratten, denen er systematisch bestimmte Hirnareale lädierte, stellte er fest, dass es die Größe der Hirnläsionen ist und nicht ihre Lokalisation, mit der die Orientierungsfähigkeit der Tiere in einem Testlabyrinth zusammenhängt. Er folgerte daraus, dass das Lernen von der Gehirnmasse, in der das Gedächtnis verteilt wird, abhängt („*mass action*“) (Lashley, 1950). Es stellte sich jedoch später heraus, dass die Ratten verschiedene Reize (u.a. visuelle, olfaktorische und taktile Reize) aufnehmen und zur Orientierung benutzen können, so dass die durchgeführten Teilläsionen nur zu partiellen Orientierungsbeeinträchtigungen führten (Uttal, 2001).

Mitte der 50er Jahre des 20. Jahrhunderts gab dann eine klinische Fallstudie den entscheidenden Impuls, der die heute allgemein akzeptierte Organisation des Gehirns in aufgabenabhängige Zentren untermauerte. Ein Patient (H.M.) mit einer besonderen Form des Gedächtnisverlustes konnte sich neue Fakten oder Ereignisse in seinem Leben nicht mehr merken, obwohl er sich an Ereignisse, die mehrere Jahre zurücklagen, normal erinnern konnte (anterograde Amnesie). Die Ursache dafür war, dass ihm bilaterale Teile des medialen Temporallappens entfernt werden mußten, da er an schwerer Epilepsie erkrankt war. Das entfernte Hirnareal, das den Auslöseherd für seine epileptischen Anfälle enthielt, schloss einen großen Anteil der Hippokampusformation mit ein (Abbildung 1-1).

Diese Operation brachte zwar die Heilung von den Anfällen, jedoch hatte sie den vorher nicht absehbaren Gedächtnisverlust zur Folge (Scoville & Milner, 1957). Die behandelnden Ärzte, der Chirurg William Scoville und die Psychologin Brenda Milner, untersuchten diesen Fall sehr eingehend, was neben den Erkenntnissen über die Funktionsweise des menschlichen Gedächtnisses auch einen richtungsweisenden Einfluss auf die zukünftige Gedächtnisforschung brachte.



**Abb. 1-1: Ausmaß der Hirnläsion von Patient H.M.:** (A) MRI-Darstellung (T1-gewichtet) der linken Hemisphäre im Parasagittalschnitt. Die Stelle der Läsion ist mit ( \* ) gekennzeichnet, der Pfeil zeigt den noch verbliebenen Rest des Hippokampus. (B) Schematische Darstellung der Läsion im Koronarschnitt auf Höhe der roten Markierung in A. Die linke Seite entspricht der Situation bei H.M., die rechte Seite stellt die ursprünglich intakte Situation dar. (Modifiziert nach Corkin *et al.*, 1997)

Bei den Untersuchungen stellte sich heraus, dass trotz der Beeinträchtigung des Langzeitgedächtnisses noch ein rudimentäres Kurzzeitgedächtnis vorhanden war. Außerdem war H.M. noch in der Lage, motorische Abläufe zu erlernen. Bei *mirror drawing*, einer Aufgabe, bei der man eine Figur nachzeichnen muss und dabei die Bewegung der Hand nur im Spiegel nachvollziehen kann, zeigte er innerhalb von drei Tagen eine täglich zunehmende Geschicklichkeit (Milner *et al.*, 1998). Aber er konnte sich nicht mehr daran erinnern, diese Aufgabe schon jemals gemacht zu haben. Dies war ein wichtiger Hinweis darauf, dass im Gehirn für verschiedene Aufgaben unabhängige Lernprozesse stattfinden können (auch simultan). An diesem Beispiel wird deutlich, dass motorisches Training und sich daran erinnern (episodisches Gedächtnis) zwei unabhängige Prozesse sind. Hierbei sind jeweils andere Hirnareale involviert, wie an der unterschiedlichen Beeinträchtigung durch die Läsion gesehen werden konnte.

## 1.2 Die Bedeutung von Tiermodellen für die Gedächtnisforschung

Die Untersuchungen der Lern- und Gedächtnisfähigkeit bei H.M. und vielen anderen Patienten, denen aufgrund ihrer epileptischen Anfälle ein Teil des Gehirns entfernt werden musste, waren sehr aufschlussreich für die Entdeckung paralleler Speicherprozesse im Gehirn. Gleichzeitig begann man in einer Vielzahl von Studien die Gedächtnisbildung an verschiedenen Tieren zu untersuchen, v.a. an Ratten, Affen und Kaninchen. Wesentliche Beiträge zu den Untersuchungsmethoden sind den Vertretern des *behaviorism* (u.a. Pavlov und Skinner) zu verdanken, die den im Verhalten objektiv messbaren Anteil in den Vordergrund stellten (Milner *et al.*, 1998). Ab den 1980er Jahren untersuchte man verstärkt das Langzeitgedächtnis, das über Tage und Monate hin anhielt. Für die Bildung von Langzeitgedächtnis hat sich der Begriff Konsolidierung eingebürgert (lateinisch *consolidare*: festigen, stark machen), den man v.a. auf Müller und Pilzecker (1900) zurückführt. In der Tat aber wurde der Begriff schon viel früher in diesen Zusammenhang gebracht, denn der römische Rhetoriker Quintilian (1. Jh. v.Chr.) sprach bereits von einer „sonderbaren Sache... dass die Länge einer Nacht zur Stärkung der Erinnerung führt“ (Dudai, 2004). In der heutigen Verwendung bezieht sich der Begriff Konsolidierung einerseits auf die intrazellulären Vorgänge, die gleichzeitig mit dem Beginn des Lernereignisses auftreten und insbesondere nach dem gegenwärtigen Lernmodell durch die Neusynthese von Proteinen charakterisiert sind. Diese Prozesse dauern bis zu mehreren Stunden nach dem Lernereignis an und werden als synaptische Konsolidierung bezeichnet (Debiec *et al.*, 2002; Dudai, 2002a). Andererseits gibt es den Begriff der systemischen Konsolidierung, wodurch beschrieben wird, dass neue Nervenverbindungen innerhalb einer oder zwischen verschiedenen Hirnregionen, abhängig von den Modalitäten der Lernsituation, gebildet werden (Frankland *et al.*, 2004). Dies wurde dadurch deutlich, dass Läsionen des Hippokampus, die einige Wochen nach einem initial hippokampusabhängigen Lernereignis durchgeführt wurden, keinen Einfluss mehr auf das Aufrufen des Gelernten hatten (Kim & Fanselow, 1992).

Die Untersuchung der Gedächtnisbildung erfordert den Einsatz von Tieren, da es nicht möglich ist, die komplexe Struktur eines Gehirns *in vitro* nachzustellen. Man geht davon aus, dass innerhalb der Säugetiere ein gemeinsam zugrunde liegendes Prinzip existiert, das somit auch auf den Menschen übertragbar ist (Bucan *et al.*,

2002). Die Wahl des Tieres hängt auch entscheidend von der jeweiligen Fragestellung ab. Wenn es um Fragen der Kommunikation zwischen Hirnregionen geht, insbesondere in Verbindung mit höher entwickelter Kognition und Lernleistung, eignet sich am besten ein dem Menschen nahes Tiermodell, wie z.B. der Affe. Ein sehr breites Feld in der Gedächtnisforschung befasst sich mit sehr ursprünglichen Prozessen wie z.B. dem Furchtgedächtnis, das unter psychiatrischem Aspekt eine Rolle bei der Entstehung von Angsterkrankungen, Phobien und bei der Traumata-entwicklung spielen kann (Sullivan *et al.*, 1999). Es ist auf stammesgeschichtlich ältere Hirnregionen zurückzuführen, weshalb sich auch insbesondere Nagetiere wie Ratten und Mäuse für diese Fragestellungen eignen. Ratten wurden lange Zeit gegenüber Mäusen bevorzugt, da sie aufgrund ihrer basalen Emotionalität für bestimmte Verhaltenstests wie operantes Konditionieren besser geeignet sind. Ihr größeres Gehirn ist außerdem für lokale Eingriffe besser zugänglich. Dennoch ist man gerade in jüngerer Zeit dazu übergegangen, das Furchtgedächtnis an Mäusen zu untersuchen, da gentechnische Methoden wie das Herstellen von *knock-out*- oder transgenen Tieren immer mehr an Bedeutung gewinnen. Bei Ratten ist es bisher nur in Ausnahmefällen gelungen, das Genom gentechnisch zu verändern.

Wie entscheidend genetische Faktoren für das Verhalten sind, kann man daran erkennen, dass die verschiedenen Inzucht- und Auszucht-Mausstämme ein eigenes Verhaltensrepertoire besitzen. Das bezieht sich zum einen auf Aspekte der Grundemotionalität (wie Ängstlichkeit oder Explorationsverhalten), zum anderen aber auch auf sensorische Leistungen, die sehr unterschiedlich sein können. Es ist z.B. bekannt, dass bei bestimmten Mausstämmen ein altersbedingtes auditorisches Defizit sehr ausgeprägt ist (Crawley *et al.*, 1997).

Obwohl die oben beschriebenen Inzuchtmäuse genetisch identisch sind, zeigen sich auch innerhalb eines Stammes Unterschiede in der Lernleistung. Daran erkennt man, dass neben der Genetik auch Umwelteinflüsse und individuelle Erfahrungen für das Verhalten eine große Rolle spielen müssen, wodurch jedes Tier bereits von Geburt an unterschiedlich beeinflusst wurde. Untersuchungen zu diesem Thema konnten zeigen, dass Tiere, die in einer abwechslungsreichen Umgebung (*enrichment*) aufgezogen wurden, besser lernen als solche, die nur auf Einstreu gehalten wurden und dadurch wenig sensorische Stimuli aufnehmen konnten (van Praag *et al.*, 2000). Die Art und Weise, wie das Muttertier sich um die Nachkommen kümmert, kann deren Empfänglichkeit bzw. Resistenz gegenüber Stress mit-

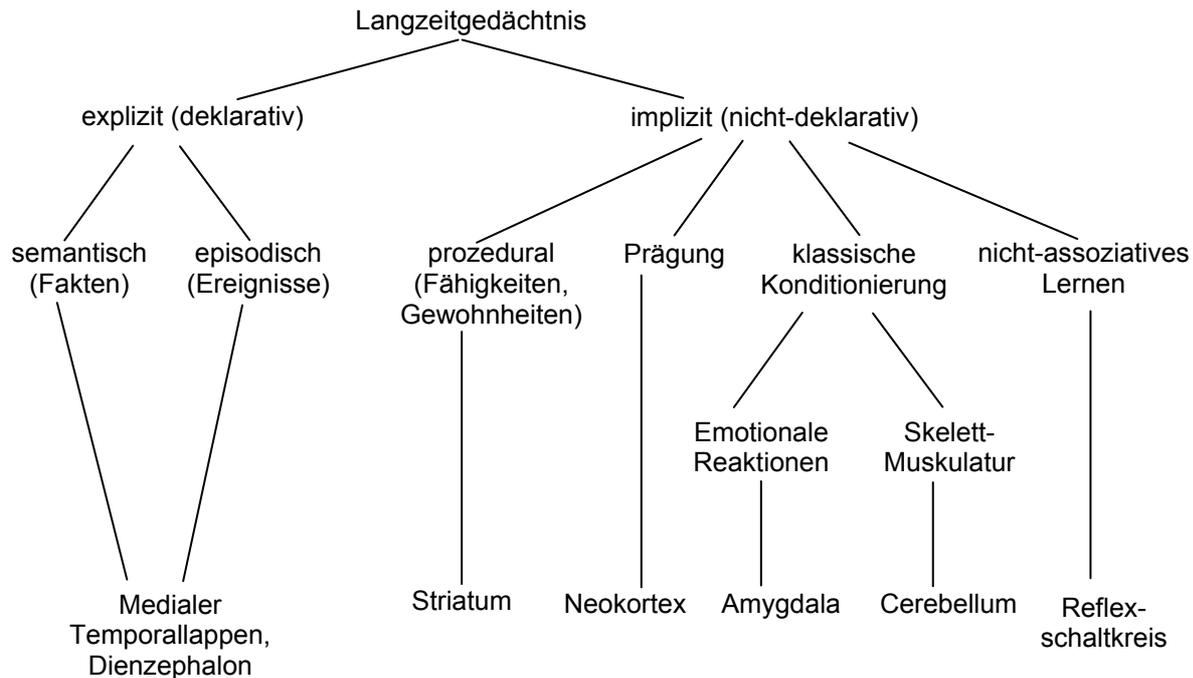
bestimmen (Meaney, 2001). Und gerade Stress hat sowohl in der Lernsituation, als auch beim Aufrufen des Gedächtnisses einen großen Einfluss aus (McGaugh & Roozendaal, 2002). Dies konnte z.B. bei amygdalaabhängigen Lernaufgaben, wie die Furchtkonditionierung, dadurch nachgewiesen werden, dass das Lernen durch lokale Injektion des Stresshormons Noradrenalin verstärkt bzw. durch dessen  $\beta$ -adrenergen Antagonisten abgeschwächt wird (Liang *et al.*, 1986; Liang *et al.*, 1990).

### **1.3 Gegenwärtiges Modell zu Lernvorgängen und zugrunde liegende Mechanismen**

Die Literatur zu den verschiedenen Aspekten des Lernens ist zu umfangreich, um an dieser Stelle vollständig reflektiert zu werden. Es folgt deshalb eine komprimierte Darstellung der bisherigen Erkenntnisse zum Thema Lernen aus drei verschiedenen Blickwinkeln. Aus psychologischer und anatomischer Sicht werden inhaltliche und zeitliche Aspekte der Gedächtnisbildung aufgezeigt unter Einbeziehung der beteiligten Hirnstrukturen (Milner *et al.*, 1998). Auf zellulärer Ebene sind lernbedingte Veränderungen der neuronalen Kommunikation und Signalweiterleitung Gegenstand der Betrachtung (Martin & Morris, 2002). Die Erkenntnisse über die am Lernprozess beteiligten Proteine werden in den molekularen Mechanismen der Gedächtnisbildung zusammengefasst (Izquierdo & Medina, 1997).

#### **1.3.1 Psychologische und anatomische Aspekte**

Der jeder Gedächtnisform zugrunde liegende Lernprozess umfasst neben der stimulusspezifischen Aktivierung auch eine Veränderung in der Verschaltung der beteiligten Hirnregionen. Bei Betrachtung der verschiedenen Lerninhalte lassen sich im Wesentlichen zwei kategorische Gruppen von Gedächtnisarten beschreiben (Milner *et al.*, 1998): Das explizite (deklarative) Gedächtnis umfasst Lerninhalte wie Fakten und Ereignisse, auch autobiographischer Natur. Daneben gibt es das implizite Gedächtnis (nicht-deklarativ), wozu auch Formen des nicht-assoziativen Lernens (u.a. das Erlernen motorischer Fähigkeiten) gehören. Abhängig von den sensorischen Modalitäten, die in die jeweilige Lernsituation miteinbezogen sind, werden unterschiedliche Hirnregionen aktiviert (Abbildung 1-2).



**Abb. 1-2: Formen des Gedächtnisses:** Die beiden Hauptgedächtniskategorien, explizites und implizites Lernen, beziehen, je nach aktivierter sensorischer Modalität, unterschiedliche Hirnregionen ein. (Modifiziert nach Milner *et al.*, 1998)

Unter dem Begriff Gedächtnis versteht man das Andauern dieser Veränderung über die Zeit, bis es zu einem späteren Zeitpunkt wieder abgerufen wird. Neben einer kategorischen Klassifizierung wird Gedächtnis auch nach seiner zeitlichen Dauer beschrieben. Während das Kurzzeitgedächtnis in der tierexperimentellen Forschung einen Zeitraum von wenigen Sekunden bis etwa ein bis drei Stunden umfasst, erstreckt sich das Langzeitgedächtnis von einigen wenigen Stunden bis hin zu lebenslanger Dauer (McGaugh, 1966; McGaugh, 2000; Davis & Squire, 1984). Die Phasen, die ein Gedächtnisinhalt vom Lernen bis hin zum Vergessen durchlaufen kann, werden in einer Lernkurve zusammengefasst (Abbildung 1-3). Stimuli, die vom sensorischen Apparat des Individuums aufgenommen werden, sind in einem sensorischen Speicher für einige Sekunden erhalten. Während dieser Zeit findet in einem Lernvorgang die Assoziation mit anderen Reizen und/oder inneren Zuständen des Individuums statt (Akquisition). Ein Teil der Information wird anschließend im Kurzzeitgedächtnis gehalten, das eine begrenzte Speicherfähigkeit besitzt und durch andere Ereignisse und amnestischen Einwirkungen wie Elektroschocks und Anästhesie störfähig ist (Dudel *et al.*, 1996). Die Bildung von Langzeitgedächtnis ist von der Stärke und der Bedeutung der Stimuli abhängig und kann, wie zuvor erwähnt, auch in andere Hirnregionen übertragen werden (systemische Konso-



### 1.3.2 Zelluläre Korrelate

Bei der Betrachtung von Gedächtnisbildung auf zellulärer Ebene ist entscheidend, wie sich die Kommunikation der Neuronen, die miteinander über Synapsen in Kontakt stehen, verändert. Der kanadische Psychologe Donald Hebb (1904 – 1985) schlug 1949 dazu eine bis heute Bestand haltende Hypothese vor (Hebb, 1949): Ganz allgemein werden durch das Lernen zwei zuvor getrennte Elemente oder Ereignisse zusammengeführt, also im wörtlichen Sinne miteinander in Assoziation gebracht. Nach Hebb entsteht eine Assoziation im Gehirn dann, wenn ein Neuron A an ein benachbartes (nahestehendes) Neuron B wiederholt Aktionspotenziale sendet. Dadurch finden in Neuron A oder B intrazelluläre Veränderungen statt („Plastizität“), infolge deren die Erregungsschwelle von Neuron B für Neuron A erniedrigt wird. Bei diesem Vorgang handelt es sich um eine zellkontaktspezifische (synapsenbezogene) Verstärkung der Signalübertragung zwischen zwei Neuronen (Sejnowski, 1999).

Diese Hypothese wurde 1973 durch eine Entdeckung von Terje Løvmø und Tim Bliss untermauert (Bliss & Løvmø, 1973). Die beiden Wissenschaftler untersuchten Feldpotentiale im Hippokampus, die dort ausgelöst werden, wenn afferente Bahnen mit Testpuls elektrisch stimuliert werden. Als sie nun eine kurze hochfrequente Stimulation an der afferenten Bahn zum Hippokampus durchführten und danach den Testpuls erneut verabreichten, stellten sie eine Verstärkung (Potenzierung) des durch den Testpuls verursachten Feldpotentials im Hippokampus fest. Wegen der Dauerhaftigkeit der Verstärkung wurde dieses Phänomen als Langzeitpotenzierung (*long-term potentiation*, LTP) bezeichnet. Damit die Potenzierung über mehrere Stunden und Tage (*late* LTP, L-LTP) hinweg anhalten kann, ist die Neusynthese von Proteinen notwendig. Bei gleichzeitiger Hemmung der Translation hält die Verstärkung nur maximal wenige Stunden an (*early* LTP, E-LTP) und fällt dann wieder ab (Frey *et al.*, 1989, 1993; Nguyen *et al.*, 1994). Ein paralleles Phänomen ist auch beim Lernen zu finden, denn im Gegensatz zum Kurzzeitgedächtnis ist die Bildung von Langzeitgedächtnis von *de novo* Proteinbiosynthese abhängig. E-LTP wird ebenso wie das Kurzzeitgedächtnis auf eine transiente Veränderung vorhandener Moleküle zurückgeführt, hauptsächlich mittels posttranslationaler Modifikation von Enzymen, Rezeptoren und Ionenkanälen (Martin & Morris, 2002).

Da trotz vielversprechender Befunde der endgültige Beweis dafür, dass LTP die zelluläre Grundlage des Lernens darstellt, noch nicht erbracht wurde, bezeichnet

man LTP richtigerweise als ein Korrelat des Lernvorgangs auf zellulärer Ebene. Aber in der Tat gibt es viele Hinweise dafür, dass ein enger Zusammenhang bestehen muss (Barnes *et al.*, 1994; Dragoi *et al.*, 2003; Gruart *et al.*, 2006). Bei der Untersuchung von Feldpotentials in der Amygdala bei Mäusen konnte man nach auditorischer Furchtkonditionierung eine Erhöhung des durch den Konditionierungston verursachten Feldpotentials feststellen (Rogan *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 2001). Bei weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass für die Induktion von LTP mehrere Signale zeitgleich auf ein Neuron treffen müssen, um ein ausreichendes Erregungsniveau zu erreichen. Dieses Prinzip der Kooperativität findet seine lernrelevante Entsprechung in der Tatsache, dass beim Lernen neue Assoziationen zwischen Elementen geknüpft werden, die ein signifikantes Maß an Bedeutung haben. Auf Ebene der synaptischen Kommunikation über aktive Rezeptoren gibt es Gemeinsamkeiten, von denen die Abhängigkeit vom NMDA-Rezeptor von besonderer Bedeutung ist (Kim *et al.*, 1991, 1992; Shimizu *et al.*, 2000; Tsien *et al.*, 1996). Hierbei handelt es sich um einen ligandengesteuerten Ionenkanal. Wenn er geöffnet wird, strömen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Zelle, wodurch weitere Vorgänge in der intrazellulären Signalkaskade initiiert werden. Damit  $\text{Ca}^{2+}$  einströmen kann, müssen zwei Bedingungen erfüllt werden: 1. Da die zentrale Pore des Rezeptors im Ruhezustand von einem  $\text{Mg}^{2+}$ -Ion blockiert ist, muss das rezeptortragende Neuron schon ein Erregungsniveau erreicht haben, das zum Entfernen des  $\text{Mg}^{2+}$  führt (z.B. durch ein anderes Neuron, das zeitgleich Signale auf das Neuron sendet). 2. Es muss Glutamat an den Rezeptor binden, um den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zu initiieren. Aufgrund dieser Eigenschaft gilt der NMDA-Rezeptor auch als molekularer Koinzidenz-Detektor, da zwei Ereignisse zur gleichen Zeit stattfinden müssen, um den Rezeptor zu aktivieren (Bliss & Collingridge, 1993).

Als Erweiterung des von Hebb formulierten und von Løvmø und Bliss untermauerten Aspekts der Assoziativität wurden kürzlich mit den Begriffen Metaplastizität und homöostatische Plastizität Änderungen in der synaptischen Aktivität höherer Ordnung beschrieben, die die Feinabstimmung eines zellulären Verbandes beinhalten. Durch diese Mechanismen wird eine Überaktivierung des beteiligten neuronalen Netzwerks verhindert, wenn die synaptische Übertragung bei einzelnen Neuronen verstärkt wird (Tompa & Friedrich, 1998; Turrigiano *et al.*, 1998; Burrone *et al.*, 2002). In diesem Zusammenhang könnten Prozesse eine Rolle spielen, die synapsenspezifisch zu einer langfristigen Abschwächung der interzellulären

Kommunikation führen. Möglicherweise könnte dafür das Phänomen der Langzeitdepotenzierung LTD (*long-term depression*) eine Rolle spielen, das wie LTP ebenfalls von  $\text{Ca}^{2+}$  und NMDA-Rezeptoren abhängig ist (Lynch *et al.*, 1977, Dudek & Bear, 1992; Cummings *et al.*, 1996).

Man geht davon aus, dass die Verstärkung der synaptischen Übertragung auch morphologisch sichtbare Folgen hat. Das wird daran deutlich, dass nach Induktion von LTP die Anzahl der Dornfortsätzen (*spines*; kleine Ausbuchtungen der Zytoplasmamembran) an postsynaptischen Dendriten erhöht ist, an denen sich möglicherweise neue Synapsen ausbilden können (Engert & Bonhoeffer, 1999; Yuste & Bonhoeffer, 2001). Auch bei Lernvorgängen wurde dies beobachtet (Moser *et al.*, 1994; Leuner *et al.*, 2003).

Es wird auch diskutiert, ob Neurogenese im *Gyrus dentatus* für hippocampusabhängige Lernvorgänge eine Rolle spielt, doch die Aussagen hierzu sind nicht eindeutig (Shors *et al.*, 2001, 2002; Pham *et al.*, 2005) und sind vermutlich abhängig von differenzierteren Aspekten des jeweiligen Lerntests. In diesem Zusammenhang muss man jedoch beachten, dass Neurogenese auch mit anderen Faktoren wie Stress und Aufzuchtbedingungen in Verbindung gebracht wird (Gould *et al.*, 1997; Kempermann *et al.*, 1997; Tanapat *et al.*, 2001).

### 1.3.3 Molekulare Mechanismen

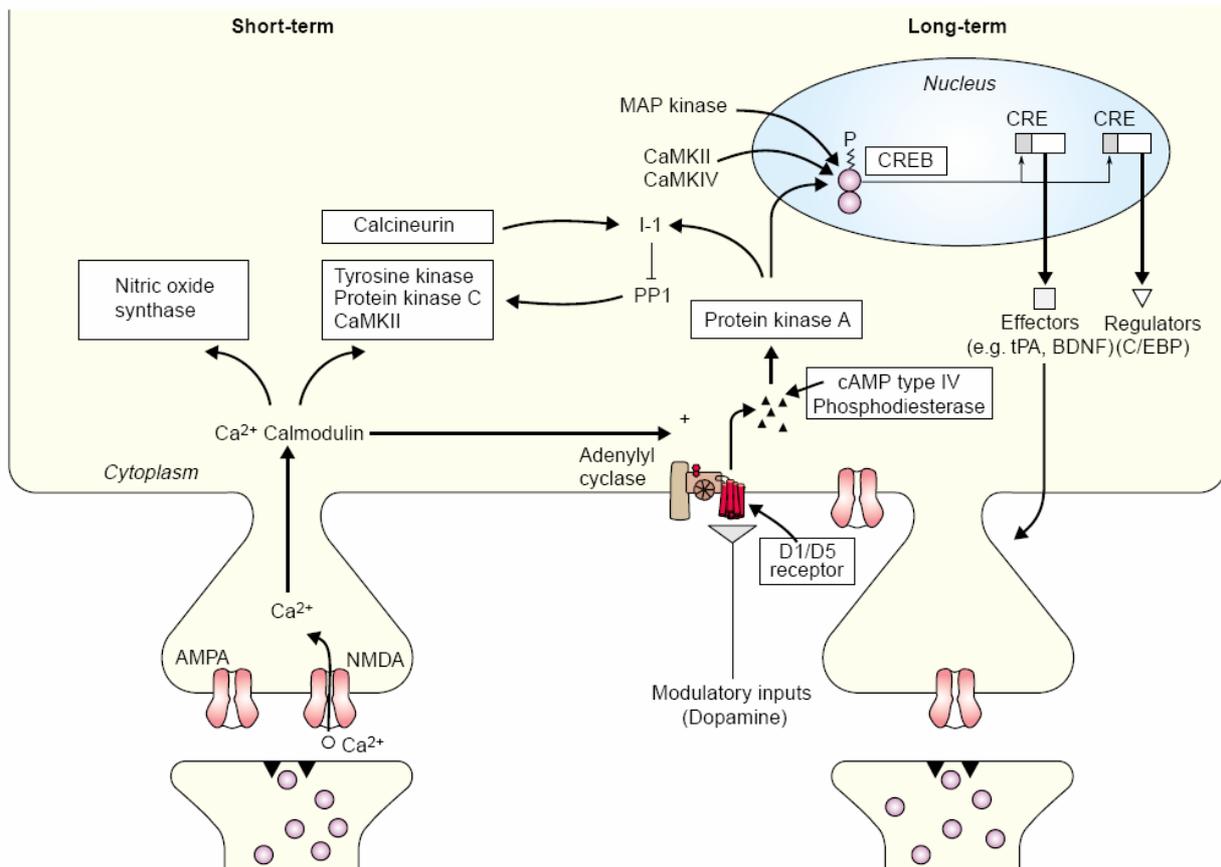
Das gegenwärtige Modell der molekularen Prozesse, die zur Bildung von Langzeitgedächtnis führen, wurde insbesondere durch Lernexperimente an *Drosophila* (*Drosophila melanogaster*; Dubnau *et al.*, 2003), Sensitivierungsexperimente an der Meeresschnecke *Aplysia* (*Aplysia californica*; Kandel, 2001) und aus LTP-Untersuchungen am Hippokampus bei Mäusen (*Mus musculus*; Abel *et al.*, 1997) gewonnen. Die mit dem Lernereignis verbundene Aktivierung von NMDA-Rezeptoren und der dadurch vermittelte Anstieg an intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  steht am Beginn einer Signalkette (Lynch *et al.*, 1983; Malenka *et al.*, 1992), die zunächst zur Aktivierung, Autophosphorylierung und damit zur konstitutiven Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) führt. Parallel dazu kommt es zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und von Calcineurin. Außerdem wird die Adenylatzyklase durch  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin und möglicherweise noch von anderen

modulierenden Inputs auf das Neuron zur Bildung von cAMP angeregt, das die Proteinkinase A (PKA) aktiviert (Malinow *et al.*, 1989; Frey *et al.*, 1993; Huang & Kandel, 1994; Abel *et al.*, 1997). PKA und CaMKII aktivieren schließlich durch Phosphorylierung den Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP responsive-element binding protein*) (Sheng *et al.*, 1990; Frey *et al.*, 1993), der dadurch die Transkription von Genen mit der CRE-Sequenz (*CREB responsive element*) im Promotorbereich aktiviert (Impey *et al.*, 1996). Daneben kann CREB auch von anderen Kinasen (MAPK, CamKIV) aktiviert werden (Deisseroth *et al.*, 1996; Xing *et al.*, 1996). Die dadurch induzierten Gene unterteilt man in frühe Gene (*Immediate early genes*, IEGs), die überwiegend Transkriptionsfaktoren darstellen, und späte Gene, die am synaptischen Umbau beteiligt sein sollen (Abbildung 1-4).

Dieses molekulare Modell, das sich auf die Erkenntnisse aus LTP-Untersuchungen stützt, weist auch Gemeinsamkeiten mit den Prozessen bei Lernvorgängen auf. In pharmakologischen Experimenten konnte z.B. die Rolle von NMDA-Rezeptoren (Miserendino *et al.*, 1990) sowie die Abhängigkeit von Proteinbiosynthese, von PKA und MAPK bei Furchtkonditionierung nachgewiesen werden (Schafe *et al.*, 1999).

Das Modell sollte jedoch nicht zu stark verallgemeinert werden, da es wohl multifaktoriell bedingte Abwandlungen gibt. Es wurde z.B. gezeigt, dass es sich, je nachdem, in welcher Subregion des Hippokampus LTP induziert wurde (CA1 oder CA3), nicht immer nur um postsynaptische Prozesse handelt, sondern, dass im Falle von LTP an CA3, auch präsynaptische Vorgänge eine wichtige Rolle spielen (Harris & Cotman, 1986; Maeda *et al.*, 1997; Mellor & Nicoll, 2001; Mellor *et al.*, 2002). Es gibt auch spezifisch für die Subregionen, in denen LTP induziert wird, Unterschiede im Profil der transkribierten IEGs. Hierbei macht es auch einen Unterschied, ob das Tier im wachen oder narkotisierten Zustand ist (French *et al.*, 2001).

Neben den in diesem Modell beschriebenen Molekülen gibt es noch viele andere, deren Beteiligung bei Lernvorgängen beschrieben wurde. Dazu gehören Proteine der extrazellulären Matrix, wie z.B. NCAM (*neural cell adhesion molecule*) und Tenascin-C (Schachner, 1997), oder das Ubiquitin-Proteasom-System (Lopez-Salon *et al.*, 2001; Hegde & DiAntonio, 2001), das für den intrazellulären Proteinabbau eine wichtige Rolle spielt und die Stabilität von Proteinen beeinflusst. Insgesamt wurden weit über 100 Moleküle identifiziert, die in die Bildung von LTP miteinbezogen sind (Sanes & Lichtman, 1999).



**Abb. 1-4.: Molekulare Ereignisse bei der Entstehung von E-LTP (Short-term) und L-LTP (Long-term):** Nach Aktivierung der NMDA-Rezeptoren strömt  $Ca^{2+}$  in die Zelle ein, das an Calmodulin bindet und zur Aktivierung verschiedener Kinasen führt (u.a. Proteinkinase C;  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II, CaMKII). L-LTP entsteht, wenn die durch  $Ca^{2+}$ /Calmodulin und andere modulierende Inputs aktivierte Adenylyl cyclase cAMP bildet. Dieses aktiviert die Proteinkinase A, welche zusammen mit CamKII, CamKIV, MAP-Kinasen den Transkriptionsfaktor CREB (cAMP responsive-element binding protein) aktiviert. CREB führt dann zur Induktion CRE-regulierter Gene (CREB responsive element), die die synaptische Konsolidierung vollziehen. Ähnliche Prozesse sind auch bei der Gedächtniskonsolidierung beschrieben. (Aus Abel & Lattal, 2001)

#### 1.4 Strategien zur Untersuchung lernassoziierter Moleküle

Es gibt mittlerweile eine große Anzahl von Molekülen, denen eine essentielle Bedeutung für die Bildung von Langzeitgedächtnis zugeschrieben wird. Dies wurde in zahlreichen Studien mittels pharmakologischer Inaktivierung von Rezeptoren, Kinasen und anderer Zielmoleküle untersucht (McGaugh & Izquierdo, 2000). Da aber die Spezifität vieler Substanzen nicht ausreichend ist und es oft zu Wechselwirkung mit anderen zellulären Proteinen kommen kann, sind gerade in jüngerer Zeit *knock-out*- und transgene Tiere von besonderem Interesse, um die Funktion eines bestimmten Proteins zu untersuchen. Jedoch kann das Ausschalten eines Gens auf

genomischer Ebene zu ganz allgemeinen entwicklungsbedingten Beeinträchtigungen führen oder aber zur Kompensation dieser Deletion und damit zu falschen Aussagen. Deshalb ist man bestrebt, sowohl den Zeitpunkt, als auch die Hirnregionen oder die Zelltypen, in denen die Deletion stattfindet, zu begrenzen (Mansuy *et al.*, 2000; Winder & Schramm, 2001).

Mittlerweile stehen auch andere gentechnische Methoden zur Verfügung, mit denen die Funktion eines Gens auf postgenomischer (mRNA) Ebene untersucht werden kann und die einen großen Vorteil bezüglich der zeitlichen und räumlichen Eingrenzung der Geninaktivierung haben. Hierzu gehört die Injektion von *antisense* Oligonukleotiden. Es konnte z.B. ein bei Mäusen altersbedingtes Defizit bei der hippokampusabhängigen *trace*-Furchtkonditionierung durch Injektion von *antisense*-RNA, die zur Herunterregulierung des SK3-Kanals (*small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel*) führte, ausgeglichen werden (Blank *et al.*, 2003).

Man kennt bisher jedoch überwiegend Proteine, die zu Beginn der Konsolidierung eine Rolle spielen. Diese sind zum Zeitpunkt des Lernens bereits in der Zelle vorhanden sind und werden nach dem gegenwärtigen Modell posttranslational modifiziert oder ihre Aktivität wird durch eine Veränderung ihrer subzellulären Lokalisation beeinflusst. Man geht davon aus, dass erst zu einem späteren Zeitpunkt andere Gene aktiviert werden, die den synaptischen Umbau und die Verstärkung der Übertragung bewirken. Um das Lernmodell in dieser Form aufrechtzuerhalten wäre es deshalb wichtig, ein klares Bild über die späten molekularen Prozesse des Lernens zu gewinnen. Damit verbunden ist die Notwendigkeit, diejenigen Proteine bzw. Gene zu identifizieren, deren Expression lernabhängig reguliert wird. Um diese Fragestellung zu bearbeiten, sind Untersuchungen auf genomischer Ebene, mRNA-Ebene und auf Ebene der Proteine in Betracht ziehen.

Genomische Analysen haben zum Ziel, Gene zu identifizieren, die für die Ausbildung eines bestimmten Phänotyps verantwortlich sind (z.B. gutes Lernverhalten bei einem bestimmten Test). Durch Verpaarung von Inzuchtmausstämmen, die sich im untersuchten Phänotyp unterscheiden, lassen sich aus den Analysen der Nachkommen bezüglich Genom und Phänotyp Rückschlüsse auf die vererbten und beteiligten Gensequenzen ziehen. Diese Vorgehensweise bezeichnet man auch als *QTL mapping (quantitative trait loci)*. QTL bezeichnet hierbei Gene (*loci*) mit zwei oder mehr Allelen, die bezüglich eines Merkmals (*trait*) mit quantitativ (*quantitative*) messbarer Veränderung der Ausprägung eine Rolle spielen. Den zentralen Punkt bei

diesem Verfahren bilden mathematisch gestützte Annahmen und Modelle bezüglich der Vererbung des Phänotyps (Flint *et al.*, 2003; Flaherty *et al.*, 2005).

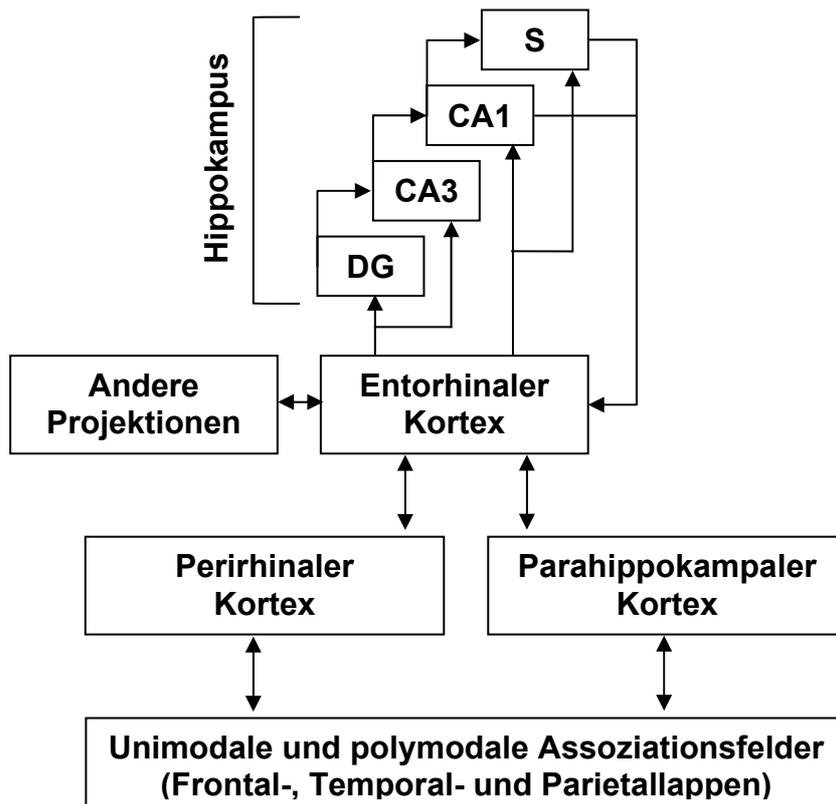
Die Untersuchung von mRNA, die im großen Ansatz v.a. mit *microarrays* durchgeführt wird, erfordert Kenntnis über die am Lerntest beteiligten Hirnregion(en), aus denen mRNA gewonnen wird. Sie hat den Vorteil, dass nur relativ wenig Ausgangsmaterial nötig ist, da mRNA amplifiziert werden kann. Neuere Versuche gehen dazu über, das Transkriptom einer einzelnen Zelle zu analysieren. Jedoch spiegelt eine differenzielle Regulation von mRNA nicht die tatsächliche Regulation auf der Ebene der Proteine wider, denen die entscheidende Rolle bei der Ausübung der biologischen Funktion zukommt (Luo & Geschwind, 2001; Nisenbaum, 2002). Wenn man auch noch berücksichtigt, dass die Unterschiede zwischen relativer mRNA- und Proteinexpression um das 20- bis 30-fache voneinander abweichen können (Gygi *et al.*, 1999b), so sind Untersuchungen der mRNA-Expression allein nicht ausreichend, um Aussagen zu treffen.

Der unmittelbarste Bezug zur biologischen Relevanz wäre aus Untersuchungen der Proteinexpression einer am Lerntest beteiligten Hirnregion abzuleiten. Um das Proteom darzustellen gibt es mittlerweile ein stetig wachsendes Methodenspektrum. Dazu gehören z.B. die zweidimensionale Gelelektrophorese und die Tandem-Massenspektrometrie. Die Anwendung dieser Verfahren wird aber durch ihre intermediäre Sensitivität der Proteindetektion und die biophysikalische Diversität der Proteine eingeschränkt. Anders als bei der mRNA- und Transkriptomanalyse können Proteine nicht amplifiziert werden. Aus diesem Grund hat die relativ große Menge an Untersuchungsmaterial weniger Spezifität (Freeman & Hemby, 2004). Jedoch besteht bei diesen Verfahren auch die Möglichkeit, diese Einschränkungen durch methodische Veränderungen zu verbessern (Naaby-Hansen *et al.*, 2001).

### **1.5 Der Hippokampus als Modellregion zur Untersuchung lernrelevanter Veränderungen**

Bereits vor über hundert Jahren vermutete man aufgrund von klinischen Fallstudien, dass der Hippokampus bei der Gedächtnisbildung eine zentrale Stellung einnimmt (von Bechterew, 1900). Angeregt durch die eingangs dargestellte Fallstudie H.M. (Scoville & Milner, 1957) entdeckte man an Tiermodellen, zunächst am Affen (Mishkin *et al.*, 1982; Squire & Zolan-Morgan, 1991), dass Informationen aus den

sensorischen Systemen im Hippokampus konvergieren. Afferente Bahnen aus den Sinnesorganen erreichen zunächst subkortikale Regionen und sensorische Kortexareale. Von dort gelangen Signale über den Assoziationskortex in den entorhinalen Kortex und weiter in den Hippokampus. In den entorhinalen Kortex gehen außerdem noch weitere Verbindungen aus der Amygdala, dem orbitofrontalen, zingulären und insulären Kortex ein (Abbildung 1-5).

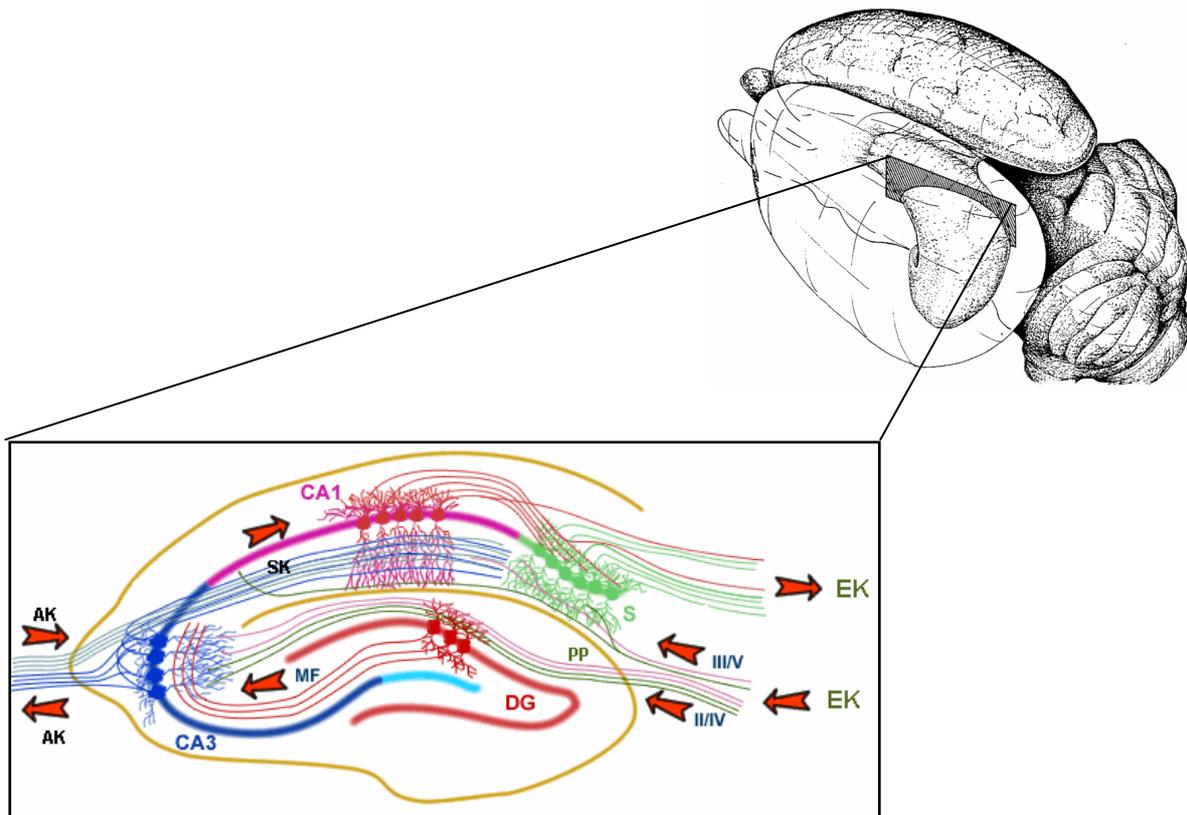


**Abb. 1-5: Neuronale Verbindungen zum Hippokampus.**

Der entorhinale Kortex, der Signale aus kortikalen Assoziationsfeldern bezieht, ist die Haupteingangsstation für die afferenten Bahnen, die in den Hippokampus führen. Nach Verschaltung über den *Gyrus dentatus* (DG) und die Subregionen CA3 und CA1 werden die Informationen über das *Subikulum* (S) wieder in den entorhinalen Kortex und weiter in den Neokortex geleitet.

(Modifiziert nach Squire *et al.*, 2004)

Für die Einheit aus entorhinalem Kortex und Hippokampus wurde auch die Bezeichnung Hippokampusformation eingebürgert (Milner *et al.*, 1998). Innerhalb des Hippokampus läuft die Hauptbahn der Verschaltung durch einen sequentiellen Schaltkreis über die Subregionen *Gyrus dentatus* (DG), CA3, CA1, um über *Subikulum* und den entorhinalen Kortex wieder in den Neokortex geleitet zu werden. Die Bezeichnung der Subregionen resultiert aus der Ähnlichkeit der Hippokampusanatomie mit einer Schnecke (*Cornu ammonis*, CA) (Abbildung 1-6). Durch diese Art der Signalweiterleitung und Informationsverarbeitung nimmt der Hippokampus vermutlich die Rolle eines Koordinators ein, der verschiedene sensorische Informationen zusammenbringt und in Beziehung zueinander setzt, besonders unter zeitlichem und räumlichem Aspekt (Wallenstein *et al.*, 1998; Eichenbaum *et al.*, 1999).



**Abb. 1-6: Neuronale Verschaltung innerhalb des Hippokampus.** Der sequentielle Hauptschaltkreis geht vom entorhinalen Kortex (EK) über den *Tractus perforans* (*perforant path*, PP) zum *Gyrus dentatus* (DG). Moosfasern (*mossy fibers*, MF) verbinden den DG mit der CA3 Region und die Schaffer-Kollaterale (SK) projizieren zur CA1 Region. Von hier gehen die Informationen direkt oder nach Zwischenschaltung über das *Subikulum* (S) zum EK zurück. Der EK hat aber auch direkte Projektionen zu CA3 und CA1. Neben der Hauptbahn gibt es noch einige weitere Nebenverbindungen, z.B. gehen von CA3 über die assoziative Kommissur (AK) Verbindungen zur kontralateralen CA1-Region ab bzw. gelangen von der kontralateralen CA3-Region zu CA1. Es gibt auch direkte kortikale Projektionen: Layer III und V projizieren auf das *Subikulum*, Layer II und IV auf den DG. (Oberer und unterer Teil der Abbildung modifiziert nach: <http://www.neuroscience.bham.ac.uk/neurophysiology/research/hippocampus.htm> bzw. <http://www.bris.ac.uk/Depts/Synaptic/info/pathway/hippocampal.htm>).

Für die räumliche Orientierung bildet der Hippokampus eine sog. kognitive Landkarte („*cognitive map*“) der Umgebung aus. Eine besondere Funktion kommt hierbei den *place cells* zu (O’Keefe & Dostrovsky, 1971; Best *et al.*, 2001). Diese Zellen sind über die ganze Ausdehnung des Hippokampus zu finden. Aus Ableitungsexperimenten wurde deutlich, dass ein bestimmtes Ensemble dieser Zellen in Abhängigkeit von der Position des Tieres im Raum eine gesteigerte Aktivität zeigt. Wenn das Tier seine Position im Raum verändert, zeigt eine andere Gruppe von *place cells* Aktivität. So bildet sich im Hippokampus ein raumabhängiges Aktivitätsmuster aus. Um bei Nagetieren hippokampusabhängiges Lernen, das neben räumlicher Orientierung auch andere deklarative Gedächtnisinhalte umfasst, zu untersuchen, haben sich eine Reihe von Verhaltenstests etabliert (Tabelle 1-1).

Verhaltenstest	Kurzbeschreibung	Referenzen
<b>Räumliches Lernen</b> <i>(Morris water maze;</i> <i>Barnes maze; T-maze)</i>	Die Tiere lernen, sich räumliche Parameter ihrer Umgebung einzuprägen, entweder um eine Belohnung (Futter) zu bekommen, oder um aus einer aversiven Situation zu entkommen (Wasser).	Silva <i>et al.</i> , 1998 Gerlai, 2001
<b>Wiedererkennungsgedächtnis</b> <i>(object recognition; social recognition)</i>	Dem Test liegt zugrunde, dass Tiere bei neuen Stimuli (Objekte, Gerüche, Artgenossen) eine erhöhte Explorationsdauer zeigen als bei bereits bekannten. Ein Stimulus gilt demnach als wiedererkannt, wenn das Tier den schon einmal gezeigten Gegenstand weniger exploriert als einen gleichzeitig präsentierten neuartigen Stimulus.	Steckler <i>et al.</i> , 1998a,b,c
<b>Klassische (Pawlowsche) Konditionierung</b>	Bei diesem Test wird eine Assoziation zwischen einem ursprünglich neutralen Stimulus (CS) und einem Strafreiz (oder auch Belohnung) (US) antrainiert. Wenn es sich hierbei um einen polymodalen CS (kontextuelle Konditionierung) handelt oder nach dem CS die Gabe des US zeitlich verzögert wird ( <i>trace</i> -Konditionierung), ist dieser Test zusätzlich vom Hippokampus abhängig.	LeDoux, 2000 McEchron, 1998
<b>Operante Konditionierung</b>	Die Tiere eignen sich neue Verhaltensmuster an, um Stimuli häufiger (bei positiven) bzw. weniger häufig (bei negativen) zu empfangen. Im Gegensatz zur klassischen Konditionierung (Stimulus-Stimulus-Assoziation) beruht die operante Konditionierung auf eine Verhalten-Stimulus-Assoziation.	Steckler, 2001
<b>Meideverhalten (passiv)</b> <i>(step-down avoidance;</i> <i>step-through avoidance)</i> -Sonderform der operanten Konditionierung-	Die Tiere erlernen, ein bestimmtes Verhalten zu vermeiden; dies geschieht durch Verabreichung eines elektrischen Strafreizes, wenn sie das Verhalten erstmalig zeigen (z.B. lernen sie, ein bestimmtes räumliches Kompartiment zu meiden).	Izquierdo & Medina, 1997

**Tab. 1-1: Übersicht der häufig verwendeten Tests für hippocampusabhängiges Lernen.**  
 (Modifiziert nach Sousa *et al.*, 2006)

## 1.6 Untersuchung von Lernprozessen am Modell der Furchtkonditionierung bei Mäusen

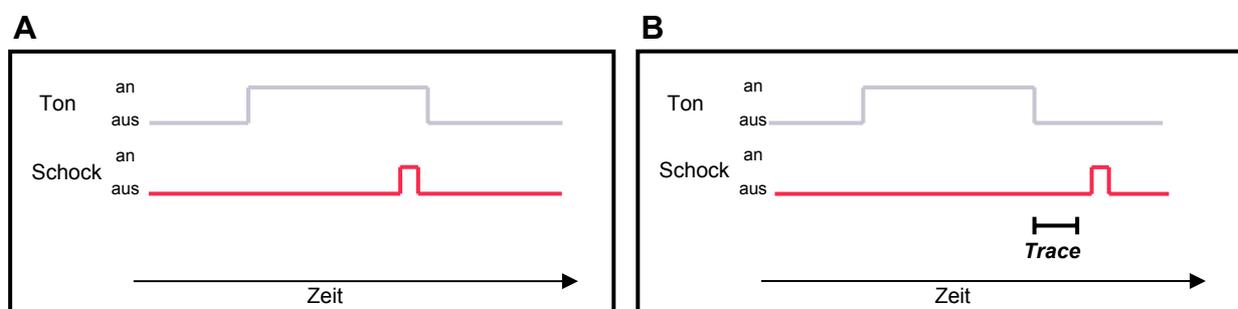
Die Furchtkonditionierung, die bei sehr vielen Tieren, vor allem aber bei Mäusen und Ratten, zur Untersuchung gedächtnisrelevanter Veränderungen im Gehirn angewendet wird, geht auf den russischen Physiologen Iwan Petrowitsch Pawlow (1849 – 1936) zurück (Pavlov, 1927). In der heutzutage verwendeten Form der klassischen Konditionierung wird ein unimodaler neutraler Reiz (Ton, Licht oder Geruch) mit einem Bestrafungsreiz (elektrischer Schlag; *unconditioned stimulus*, US) zeitgleich (Prinzip der Kontinguität) präsentiert und vom Tier miteinander in Assoziation gebracht, so dass zu einem späteren Zeitpunkt der ursprünglich neutrale Reiz (der dadurch zum *conditioned stimulus* wird, CS) eine Furchtantwort auslöst, die die Erwartung des Bestrafungsreizes widerspiegelt. Alternativ zu einem unimodalen Reiz kann die Konditionierung auch auf die räumliche Umgebung (Kontext) stattfinden, die durch die Vielfalt der Reize einen polymodalen Stimulus darstellt.

Bei der Untersuchung der Gedächtnisbildung werden oft Substanzen eingesetzt oder Verfahren angewandt, die den Lernprozess beeinträchtigen. Als Maß dafür, wie stark die Assoziation zwischen CS und US geknüpft wurde, können verschiedene physiologische und verhaltensrelevante Parameter bei Maus und Ratte untersucht werden, wenn das Tier dem CS wieder ausgesetzt wird. Diese werden als Furchtantwort zusammengefasst. Neben den autonomen Körperreaktionen wie eine erhöhte Herzrate (LeDoux *et al.*, 1990), Hypoalgesie (Helmstetter, 1992) oder die Ausschüttung von Kortikosteron (Goldstein *et al.*, 1996) lassen sich auch eine Reihe von Verhaltensänderungen beobachten. Hierzu zählt die erhöhte Schreckreaktion (Reflexverstärkung) auf ein akustisches Signal, das gleichzeitig mit dem CS präsentiert wird (*acoustic startle response*; Campeau & Davis, 1995). Besonders charakteristisch ist die Bewegungsstarre (*freezing*), in die Mäuse und Ratten verfallen, wenn sie dem CS wieder ausgesetzt werden (Fanselow & Bolles, 1979). Die Furchtantwort ist kein neu antrainiertes Verhalten, sondern Teil des angeborenen Verhaltensrepertoires des Tieres.

Für die Furchtkonditionierung spielt die Amygdala eine bedeutende Rolle, wie durch Versuche an Ratten mit einer Amygdala-Läsion belegt wurde (Campeau & Davis, 1995; LeDoux *et al.*, 1990). Sie ist Teil des limbischen Systems und kann in wenigstens zwei große Areale unterteilt werden: der basolaterale Komplex (BLA), der sich aus lateraler, basolateraler und basomedialer Amygdala zusammensetzt, und

die zentrale Amygdala (CE), bestehend aus einem lateralen und einem medialen Teil (Maren, 1999). Während die zentrale Amygdala eine Rolle bei der Ausprägung der Furchtantwort einnimmt und Bahnen zu den dafür verantwortlichen Regionen zentrales Höhlengrau, lateraler Hypothalamus und paraventriculärer Nucleus führen (Kapp *et al.*, 1982; Davis, 1992), finden die sensorischen Informationen über CS und US Eingang in die BLA (Romanski *et al.*, 1993). Obwohl LTP-ähnliche Veränderungen und Proteinbiosyntheseabhängigkeit in der Amygdala nach Furchtkonditionierung bestätigt wurden (McKernan *et al.*, 1997; Rogan *et al.*, 1997; Schafe & LeDoux, 2000; Maren *et al.*, 2003), ist es nicht erwiesen, dass die Amygdala der Ort des Langzeitgedächtnisses ist. Es gibt auch Hinweise, dass die Amygdala die Gedächtnisbildung in anderen Hirnregionen lediglich moduliert (Cahill *et al.*, 1999; Mc Gaugh, 2000). Darauf deutet hin, dass die pharmakologische Inaktivierung der Amygdala mit dem GABA<sub>A</sub>-Rezeptor Agonisten Muscimol sich nur dann negativ auf die Ausbildung des Furchtgedächtnisses auswirkt, wenn sie zum Zeitpunkt des Lernens stattfindet. Eine Inaktivierung der Amygdala unmittelbar nach dem Lernereignis hat keinen Einfluss auf die Bildung von Furchtgedächtnis, also in dem Zeitraum, in dem Konsolidierungsprozesse stattfinden würden, wenn die Amygdala Speicherort für das Furchtgedächtnis wäre (Wilensky *et al.*, 1999).

Für bestimmte Formen der Furchtkonditionierung scheint zusätzlich der Hippokampus eine Rolle zu spielen. Neben der klassischen Form der auditorischen Furchtkonditionierung, bei der Ton und Fußschock überlappend und koterminierend präsentiert werden (*delay*-Konditionierung) gibt es eine Form, bei der der Fußschock erst nach einer kurzen Verzögerung (0.5 – 30 s) verabreicht wird (*trace*-Konditionierung) (Abbildung 1-7).



**Abb. 1-7: Formen der auditorischen Furchtkonditionierung:** (A) Bei *delay*-Konditionierung werden Ton und Fußschock überlappend und koterminierend präsentiert. (B) Bei *trace*-Konditionierung ist zwischen dem Ende des Tons und dem Fußschock ein Zeitintervall von etwa 0.5 – 30 s.

Aus Experimenten mit Ratten, denen vor der Konditionierung der Hippokampus lädiert wurde, weiß man, dass für die *trace*-Konditionierung der Hippokampus notwendig ist, nicht aber für das klassische *delay*-Protokoll (McEchron *et al.*, 1998). Läsionsstudien an Ratten zeigten außerdem, dass auch die kontextuelle Konditionierung vom Hippokampus abhängig ist (Kim & Fanselow, 1992; Phillips & LeDoux, 1992).

## 1.7 Aufgabenstellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die Rolle der Proteinbiosynthese für hippokampusabhängige Lernaufgaben bei Mäusen charakterisiert und gedächtnisrelevante Proteine identifiziert werden. Zunächst mussten hierzu hippokampusabhängige Lerntests etabliert und planabhängig modifiziert werden. Die Validierung dieser Tests beinhaltete den pharmakologischen Nachweis der Abhängigkeit von Proteinbiosynthese sowie den Nachweis von Genaktivierung (IEGs) bzw. die Quantifizierung der Translationsaktivität. Anschließend sollte ein Weg gefunden werden, um die Einschränkungen der Proteomanalyse hinsichtlich Sensitivität und Spezifität zu verbessern. Dazu war es erforderlich, eine Strategie zu entwickeln, die auf der radioaktiven Markierung von im Zuge der Gedächtnisbildung neu synthetisierten Proteinen basiert. Derartig markierte Proteine sollten schlussendlich mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Tiere und Haltungsbedingungen

Für die Experimente wurden männliche Mäuse der Stämme C57BL/6JOlaHsd (kurz BL/6J; N=285; Harlan Winkelmann, Borchern), C57BL/6NCrl (kurz BL/6N; N=214; Charles River, Sulzfeld) und CD1 (N=20; Charles River, Sulzfeld) verwendet. Unmittelbar nach der Anlieferung (Alter 6–8 Wochen) wurden sie vereinzelt und in Standardkäfigen (Makrolon<sup>®</sup> Typ II) gehalten. Wasser und Futter (Altroumin 1314, Altroumin, Lage-Lippe) standen nach Bedarf zur Verfügung. Die Haltung erfolgte bei einem umgekehrten 12/12-Stunden Hell-/Dunkel-Rhythmus (Licht an um 20 Uhr) unter Standardbedingungen (Temperatur 22±2°C, Luftfeuchtigkeit 55±5%). Bevor die Tiere für einen Versuch eingesetzt wurden, hatten sie eine Eingewöhnungsphase von 14 Tagen. Die Experimente wurden eine Stunde nach Beginn der Dunkelphase ab 9 Uhr durchgeführt, wenn nicht anders angegeben. Während der experimentellen Phase wurden die Tiere im Versuchsraum gehalten und waren durch einen licht- und schalldichten Vorhang vor äußeren Störfaktoren geschützt.

### 2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

#### 2.2.1 Chemikalien und Pharmaka

Chemikalien	Hersteller
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bis-acrylamid (30%; 37.5:1)	BioRad, Hercules, USA
Agarose ( <i>low melting</i> )	BioRad, Hercules, USA
Amanitin	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumsulfat	VWR, Darmstadt
Anisomycin	Sigma, Deisenhofen
AP5 (DL-2-Amino-5-phosphonovalerinsäure)	Sigma, Deisenhofen
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Roth, Karlsruhe
Biolyte <sup>®</sup> pH3-10	BioRad, Hercules, USA
Braunoderm <sup>®</sup>	Braun-Melsungen, Melsungen
Bromphenolblau	VWR, Darmstadt
BSA ( <i>bovine serum albumin</i> )	Sigma, Deisenhofen
Chaps	BioRad, Hercules, USA
Chloroform (RNase frei)	VWR, Darmstadt

Chemikalien (Fortsetzung 1)	Hersteller
Coomassie Blau G250	Sigma, Deisenhofen
Coomassie Blau R250	VWR, Darmstadt
DAB (Diaminobenzidin)	Sigma, Deisenhofen
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Roth, Karlsruhe
Dextransulfat	Sigma, Deisenhofen
DTT (Dithiothreitol)	VWR, Darmstadt
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Sigma, Deisenhofen
Einbettmedium	Medite, Burgdorf
Essigsäure	VWR, Darmstadt
Essigsäureanhydrid	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	VWR, Darmstadt
Ficoll 400	Sigma, Deisenhofen
Formamid	VWR, Darmstadt
Glycerol	Sigma, Deisenhofen
Glycin	VWR, Darmstadt
HCl (Salzsäure; 1 M und konzentriert)	VWR, Darmstadt
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid, 30%)	VWR, Darmstadt
Imidazol	Sigma, Deisenhofen
Isoamylacetat	Sigma, Deisenhofen
Isofluran (Forene <sup>®</sup> )	Abbott GmbH, Wiesbaden
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
KCl (Kaliumchlorid)	VWR, Darmstadt
Ketamin (Ketaminhydrochlorid, 10%)	Essex Tierarznei, München
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Kalium-di-Hydrogenphosphat)	VWR, Darmstadt
Kresylviolett	Sigma, Deisenhofen
Meloxicam (Metakam <sup>®</sup> )	Boehringer Ingelheim, Ingelheim
Methanol	VWR, Darmstadt
2-Methylbutan	Roth, Karlsruhe
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	VWR, Darmstadt
Natriumborhydrid (NaBH <sub>4</sub> )	VWR, Darmstadt
Na <sub>3</sub> -Citrat	VWR, Darmstadt
NaCl (Natriumchlorid)	VWR, Darmstadt
NaCl-Lösung (0.9%)	Berlin-Chemie AG, Berlin
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (di-Natriumhydrogenphosphat)	VWR, Darmstadt
NaOH (Natronlauge; 1 M)	VWR, Darmstadt
Nickel-Ammoniumsulfat	Sigma, Deisenhofen
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Phenylhydrazin	VWR, Darmstadt
Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe
Polyvinylpyrrolidon (PVP 40)	Sigma, Deisenhofen
Ringerlösung	Delta-Select, Pfullingen
Rompun <sup>®</sup> (Xylazinhydrochlorid)	Bayer, Leverkusen
Roti <sup>®</sup> -Histokit	Roth, Karlsruhe
Roti <sup>®</sup> -Histol	Roth, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
Steriles Wasser (Ampuwa)	Fresenius
Sucrose	VWR, Darmstadt
Szintillationsflüssigkeit (Lumasafe <sup>™</sup> )	Lumac, Groningen, Niederlande
TCA (Trichloressigsäure)	VWR, Darmstadt

Chemikalien (Fortsetzung 2)	Hersteller
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma, Deisenhofen
TGS-Laufpuffer, 10x (Tris, Glycin, SDS)	BioRad, Hercules, USA
Thimerosal	Sigma, Deisenhofen
Thiourea	Sigma, Deisenhofen
Triethanolamin	Roth, Karlsruhe
Tris (Trishydroxymethyl-aminoethan)	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Urea	BioRad, Hercules, USA

Die Qualität aller verwendeten Chemikalien war p.A. oder *high purity grade*.

### 2.2.2 Antikörper, Enzyme und Feinchemikalien

Antikörper	Hersteller
Primär: Anti c-Fos (sc-42); polyklonal aus <i>rabbit</i>	Santa Cruz, Californien, USA
Sekundär: Anti <i>rabbit</i> -IgG (Biotin konjugiert); aus <i>goat</i>	Vector Lab., Burlingame, USA

Enzyme	Hersteller
DNase I (RNase-frei)	Roche, Mannheim
RNase A	Roche, Mannheim
T3-RNA-Polymerase (mit 10x Transkriptionspuffer)	Roche, Mannheim
T7-RNA-Polymerase (mit 10x Transkriptionspuffer)	Roche, Mannheim

Feinchemikalien / Standards	Hersteller
Heringssperma-DNA	Roche, Mannheim
<i>Normal goat serum</i>	Vector Lab., Burlingame, USA
Pepstatin	Sigma, Deisenhofen
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	Fluka Biochemica, Buchs, Schweiz
Proteaseinhibitor <i>complete</i> <sup>™</sup> (EDTA-frei)	Roche, Mannheim
Proteinstandard <i>PageRuler</i> <sup>™</sup> <i>prestained</i>	Fermentas, St.-Leon Rot
Proteinstandard <i>Precision plus (All Blue)</i>	BioRad, Hercules, USA
Ribonukleotide (rATP, rCTP, rGTP, je 10 µM)	Roche, Mannheim
RNasin	Promega, Mannheim
tRNA	Roche, Mannheim

Radioaktivität	Hersteller
Redivue <sup>™</sup> ProMix ( <sup>35</sup> S]-Met/Cys; >1000 Ci/mmol)	Amersham, Freiburg
[α- <sup>35</sup> S]-UTP (1250 Ci/mmol)	NEN, Boston, USA

## 2.2.3 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Aluminiumfolie	Roth, Karlsruhe
Deckgläser (für Histologie)	Fisher Scientific, Schwerte
Einmal-Pasteurpipetten	Copan Innovations, Limerick, Irland
Einwegspritzen (Omnifix)	Braun-Melsungen, Melsungen
Elite Vectastain <sup>®</sup> ABC kit	Vector Lab., Burlingame, USA
Eppendorf Reaktionsgefäße (1.5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Falcon <sup>®</sup> Reaktionsgefäße (15 und 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Faltenfilter	Schleicher & Schüll, Dassel
Färbeschalen für SDS-Gele	BioRad, Hercules, USA
Filterpapier (3MM)	Whatman, Meldstone, England
Injektionskanülen (23G, 25G)	Braun-Melsungen, Melsungen
IPG-strips Ready strip <sup>™</sup> pH4-7 (17 cm und 11 cm)	BioRad, Hercules, USA
Kanülendraht (30 G)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Nucleotide removal kit	Qiagen, Hilden
Objektträgerkästen, -mappen	Roth, Karlsruhe
Operationsnahtmaterial	Ethicon, Norderstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Plastikdosen	Roth, Karlsruhe
PlusOne sample grinding kit	Amersham, Freiburg
PVDF-Membran Immobilon P	Millipore, Eschborn
Röntgenfilme (Biomax MR)	Kodak, New Haven, USA
Schalen für IPG-strips	BioRad, Hercules, USA
SuperFrost <sup>®</sup> Plus Objektträger	Menzel, Braunschweig
Szintillationsgefäße (2 und 3 ml)	Peske, Ainding (Lieferant)
Tris-Glycin Gradientengele Criterion <sup>™</sup> (8-16%)	BioRad, Hercules, USA
Trockeneis	TKD, München
Tygon <sup>®</sup> -Schlauch	Norton, Ohio, USA
Uhrmacherschrauben (FE Nr. 31)	Schwartzmann, Morteau, Frankreich
Videokassetten	Fujifilm, Kleve
Zahnzement (Dual Cement)	Ivoclar, Schaan, Liechtenstein

## 2.2.4 Allgemeine Geräte

Geräte und sonstige Utensilien	Hersteller
Blotting Apparatur (Criterion <sup>™</sup> )	BioRad, Hercules, USA
CCD Kamera (90D) für Autoradiographie	Sony, Japan
Dodeca <sup>™</sup> cells (Protean <sup>®</sup> Plus und Criterion <sup>™</sup> )	BioRad, Hercules, USA
Entwicklermaschine (XP2000)	3M, St.-Paul, USA
Filmkassetten für Autoradiographie	Dr. Goos-Suprema, Heidelberg
Gelscanner (GS-800 <sup>™</sup> )	BioRad, Hercules, USA
Gewebestanzer (0.5, 1.0, 2.0 mm Durchmesser)	FST, Heidelberg

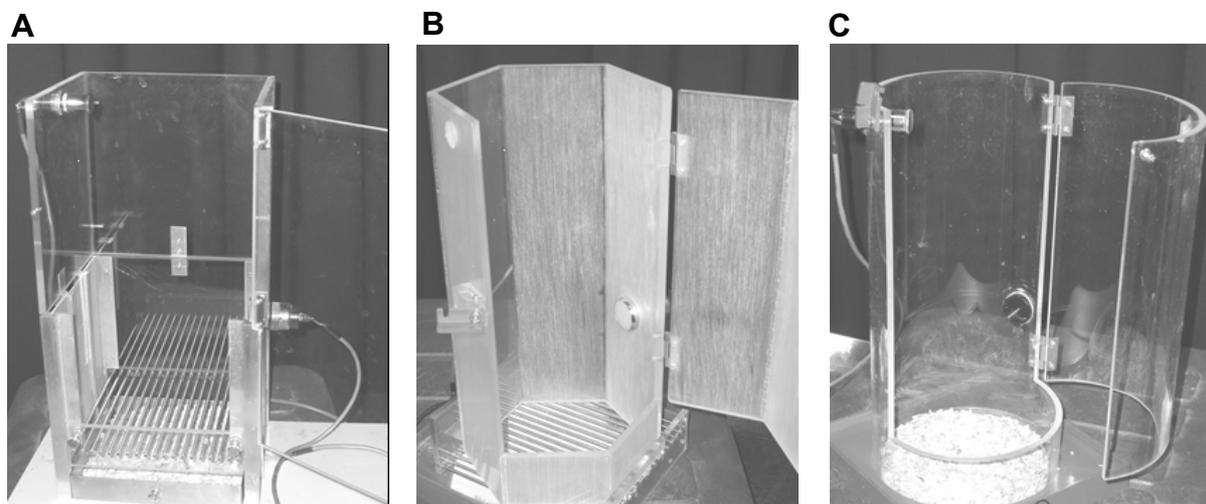
Geräte und sonstige Utensilien (Fortsetzung)	Hersteller
Heizblock (Thermomixer)	Eppendorf, Hamburg
Heizdecke mit Temperaturregelung	Harvard, Kent, England
Isoelektrische Fokussierung (Protean <sup>®</sup> IEF cell)	BioRad, Hercules, USA
Inkubationsofen (400 HY)	Bachhofer, Reutlingen
Isoflurananlage (Vapor 19)	Drägerwerk AG, Lübeck
Kaltlichtquelle	Krüss, Hamburg
Kryostat (HM 560)	Microm, Walldorf
Leuchtschirm	Kaiser, Buchen
Lichtmikroskop (Axioplan 2)	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikroliterspritze (10 µl)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Operationsbesteck (Pinzetten, Scheren u.a.)	FST, Heidelberg
Perfusionspumpe	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
pH-Meter pH 538	WTW, Weilheim
Power supply (portable Stromquelle)	BioRad, Hercules, USA
Phosphorimagersystem BAS 3000	Fuji, Tokyo, Japan
Pipetten	Gilson, Middleton, USA
Reinstwasseranlage (Purelabultra)	Vivendi water, Siershalm
Schüttler	Edmund Bühler, Hechingen
Sonikator	IUL-Instruments, Königswinter
Stereotakt	TSE-Systems, Heidelberg
Szintillationsmessgerät	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Teflonhomogenisator	Neolab <sup>®</sup> , Heidelberg
Tischzentrifugen	Heraeus, Hanau
Videorecorder	Panasonic, Hamburg
Vortex MS1 <i>Minishaker</i>	IKA Labortechnik, Staufen
Zahnarztbohrer	KaVo, Leitkirch (Allgäu)

## 2.3 Lerntests

### 2.3.1 Konditionierungssetup

Die Konditionierung erfolgte mit dem System der Firma MED Associates (St. Albans, VT, USA), das über ein Interface (DIG 715) und Schaltflächen (SG 215) mit der mitgelieferten Software (MED-PC, Windows v1.17) von einem Computer aus gesteuert wurde. Die Konditionierungskammer (ENV-307A) mit quadratischer Grundfläche ist mit Hauslicht (0.6 Lux, ENV-215M), verlängerten Seitenwänden und Bodengitter (ENV-407) ausgestattet. Daran ist eine Stromquelle angeschlossen (*shocker/scrambler*; ENV-414), die über das Bodengitter einen *scrambled* Schock abgibt. Vor jedem Durchgang wurde die Kammer mit Ethanol (70%) gereinigt

(Abbildung 2-1A). Beim Testen des Tongedächtnisses wurde ein durchsichtiger Zylinder aus Plexiglas mit runder Grundfläche verwendet, dessen Boden mit Einstreu bedeckt und mit Hauslicht beleuchtet wurde (0.3 Lux, ENV-215M). Vor jedem Durchgang wurde der Testzylinder mit Essigsäure (1%) gereinigt (Abbildung 2-1C). Im Falle der auditorischen Furchtkonditionierung wurde der Ton mit einem Ton-Stimulus-Generator (ANL-926) erzeugt und über Lautsprecher (DTW 110 NG, Visaton, Haan), die über der Konditionierungskammer bzw. dem Testzylinder angebracht wurden, abgegeben. Zum Test auf partielles kontextuelles Gedächtnis wurde das Bodengitter aus der Konditionierungskammer an einem sechseckigen Plexiglaszylinder (Hexagon) befestigt. Die Beleuchtung wurde durch ein stärkeres Stimuluslicht erzeugt (12 Lux, ENV-221M) und die Reinigung zwischen den Durchgängen erfolgte mit Wasser/Bananenaroma (Isoamylacetat in Wasser, Verdünnung 1:2000) (Abbildung 2-1B). Es wurden maximal zwei Konditionierungskammern bzw. vier Testzylinder gleichzeitig in Betrieb genommen. Zur Abschirmung gegenüber störenden Außenreizen waren diese in schalldichten Isolationsboxen (ENV-018M), die zusätzlich mit Schallisolierschäum (Conrad Electronics, Hirschau) ausgekleidet waren, aufgestellt.



**Abb. 2-1: Konditionierungssetup.** (A) Konditionierungskammer, in der auch das kontextuelle Gedächtnis untersucht wurde. (B) Test auf partielles kontextuelles Gedächtnis im Hexagon mit Gitter am Boden. (C) Zylinder mit Einstreu am Boden zum Testen des Tongedächtnisses.

Alle Testungen wurden mit CCD-Kameras (Conrad Electronics), die an der hinteren Wand der Isolationsboxen befestigt waren, auf Video aufgezeichnet und das Verhalten der Tiere *offline* ausgewertet.

### 2.3.2 Tonkonditionierung und -gedächtnis

Für die Tonkonditionierung wurden zwei Protokolle verwendet, *trace*- und *delay*-Konditionierung. Beide bestanden in der Regel aus insgesamt fünf Ton-Schock-Paarungen, wobei der Ton (9 kHz, 80 dB) jeweils 20 s dauerte und mit einem Fußschock (je 1 s, 0.7 mA) gepaart wurde. Während bei *delay*-Konditionierung der Fußschock innerhalb der letzten Sekunde des Tons verabreicht wurde, war bei *trace*-Konditionierung eine zeitliche Lücke zwischen Tonende und Fußschock. Sie betrug entweder 5, 15 oder 60 s und ist jeweils angegeben. Sobald sich die Maus in der Konditionierungskammer (Abbildung 2-1A) befand, wurde das Hauslicht eingeschaltet und damit die Lernprozedur gestartet. Nach 180 s wurde der erste Ton gegeben. Die anderen folgten in variablen Abständen von 120, 210, 170 und 160 s, um bei der Maus keine zusätzlichen Assoziationen bezüglich der Regelmäßigkeit der Stimulusintervalle zu bewirken. Bei manchen in dieser Arbeit verwendeten Protokollen wurden weniger als 5 Paarungen verwendet. Hier galt dieselbe zeitliche Staffelung bis zum Erreichen der entsprechenden Anzahl an Paarungen. In allen Fällen wurde die Maus 60 s nach dem letzten Fußschock wieder in den Heimkäfig gesetzt.

Das Tongedächtnis wurde im Zylinder (Abbildung 2-1C) getestet, der sich insbesondere in Form, Material und Geruch vom Konditionierungskontext unterschied, um nur das Gedächtnis für den konditionierten Ton zu erfassen. Die Maus wurde in den Zylinder gesetzt und das Hauslicht angeschaltet. Nach 180 s wurde der zu Konditionierung verwendete Ton für 60 s angeschaltet. Weitere 60 s später wurde die Maus wieder zurück in den Heimkäfig gesetzt.

### 2.3.3 Kontextkonditionierung und -gedächtnis

Für die kontextuelle *foreground*-Konditionierung wurden entweder ein oder drei Fußschocks verwendet. Beim Ein-Schock-Protokoll wurde das Hauslicht der Konditionierungskammer angeschaltet, sobald die Maus in der Konditionierungskammer war. Nach 180 s wurde ein Fußschock (2 s, 0.7 mA) verabreicht und 60 s später wurde die Maus wieder zurück in den Heimkäfig gesetzt. Im Drei-Schock-Protokoll wurden die Fußschocks (je 1 s, 0.7 mA) 180 s, 220 s, und 340 s nach

Beginn der Konditionierung gegeben. Die Maus wurde 60 s nach dem letzten Schock wieder in den Heimkäfig gesetzt.

Die kontextuelle *background*-Konditionierung fand parallel zu den in 2.2.2 beschriebenen auditorischen Konditionierungsformen (*delay* und *trace*) statt. Es kam auch ein Protokoll mit nur einer Ton-Schock-Paarung zur Verwendung. Hierzu wurde 180 s nach Beginn des Protokolls ein Ton (20 s, 9 kHz, 80 dB) gespielt. In den letzten beiden Sekunden des Tons wurde ein Fußschock (2 s, 0.7 mA) verabreicht und nach 60 s wurde die Maus wieder zurück in den Heimkäfig gesetzt.

Um das Kontextgedächtnis zu testen, wurde die Maus erneut für 180 s in die Konditionierungskammer gesetzt und das Verhalten auf Video aufgezeichnet. In den Experimenten, bei denen auch das Tongedächtnis (im Zylinder) mit untersucht wurde, war mindestens ein Zeitraum von zwei bis drei Stunden zwischen den einzelnen Tests. Das partielle Kontextgedächtnis wurde im Hexagon mit dem Bodengitter der Konditionierungskammer getestet (Abbildung 2-1B). Als die Maus in das Hexagon gesetzt wurde, begann die Testzeit und das Stimuluslicht wurde eingeschaltet. Nach 180 s endete die Testzeit und die Maus wurde zurück in den Heimkäfig gesetzt.

### 2.3.4 Verhaltensauswertung

Das Furchtgedächtnis der Maus wurde am *freezing*-Verhalten bei erneuter Präsentation des konditionierten Stimulus (Ton bzw. Kontext) gemessen. Die visuelle Auswertung erfolgte *offline* ohne Wissen um die Gruppenzugehörigkeit. Als *freezing* wurde gewertet, wenn die Maus völlig bewegungslos war. Davon ausgenommen waren lediglich die mit der Atmung zusammenhängenden Bewegungen. Die Auswertung wurde mit *Eventlog* Software (Robert Hendersen, 1986) mitprotokolliert und mit *WinRat* Software (Dr. Barthelmes, MPI für Psychiatrie, München) formatiert. Die Darstellung der *freezing*-Werte wurde auf den Beobachtungszeitraum (60 s oder 180 s) normalisiert und in % der Beobachtungsdauer angegeben.

## 2.4 Pharmakologische Verhaltensexperimente mit intrazerebralen Injektionen

Bei einigen Experimenten wurden den Tieren verschiedene Substanzen um den Zeitpunkt des Lernereignisses lokal in den dorsalen Hippokampus injiziert. Dazu wurden an der Schädeldecke der Maus operativ dauerhaft verbleibende Führungskanülen (bilateral) angebracht, durch die dann gezielt eine Injektionskanülen eingeführt und die jeweilige Substanz verabreicht werden konnte. Unter Verwendung des Gehirnatlasses (Paxinos & Franklin, 2001) wurden nach histologisch verifizierten Testoperationen folgende Koordinaten (auf Bregma bezogen) für die Position der Injektionsstelle (CA1-Subregion) festgelegt: rostro-caudal -1.9 mm, lateral  $\pm 1.2$  mm, dorso-ventral +2.0 mm.

### 2.4.1 Implantieren von Führungskanülen

Die gesamte Operation wurde unter Konstanthaltung der Körpertemperatur (36°C) mittels einer rückgekoppelten Heizdecke und unter visueller Kontrolle der Atemfrequenz durchgeführt. Die Betäubung erfolgte entweder als Inhalationsnarkose mit Isofluran oder als eine kombinierte Injektionsnarkose mit einem Gemisch aus Ketamin und Rompun® (2.0% bzw. 0.5% in 0.9%iger NaCl-Lösung; 10 µl/g Körpergewicht i.p.). Der Kopf der betäubten Maus wurde in einem Stereotakt eingespannt und die Kopfhaut mit einem Skalpell rostro-caudal eröffnet, um die Schädeldecke (*Ossa frontalia* und *parietalia*) freizulegen. Die horizontale Position der Führungskanülen wurde unter Zuhilfenahme des Koordinatensystems am Stereotakt auf der Schädeldecke markiert und mit einem Zahnarztbohrer aufgebohrt. Als Führungskanülen wurden 8 mm lange Teilstücke aus 23G-Injektionskanülen verwendet, deren unteres Ende 1 mm oberhalb der Zielregion im Gehirn platziert wurde. Die bilateral eingeführten Kanülen wurden mit einem lichthärtenden Zahnzement fixiert (Abbildung 2-2A). Zusätzliche Verankerung wurde durch zwei im Schädelknochen, in der Nähe der beiden Führungskanülen eingebrachten Uhrmacherschrauben gewährleistet, die einen stabilen Kontakt zwischen Schädel und Zahnzement begünstigen. Nach dem Aushärten des Zahnzements (10 min pro Seite) wurde die Kopfhaut an zwei Stellen durch je einen einfachen chirurgischen Knoten wieder zusammengenäht und die Operationsstelle mit Braunoderm® desinfiziert. Postoperative Maßnahmen umfassten

eine einmalige Analgesie mit Meloxicam (0.5 mg/kg Körpergewicht in 0.9%iger NaCl-Lösung, s.c.-Injektion), tägliche Wundkontrolle und gegebenenfalls desinfizierende Behandlung mit Braunoderm®. Die Tiere hatten vor den Experimenten eine Karenzzeit von 10 bis 14 Tagen.

#### **2.4.2 Zerebral injizierte Substanzen**

Anisomycin wurde durch Zugabe von wenigen µl HCl (1 M) gelöst und mit dem gleichen Volumen NaOH (1 M) neutralisiert. Das gelöste Anisomycin wurde mit NaCl-Lösung (0.9%) bzw. Ringerlösung bis zur Endkonzentration von 125 µg/µl aufgefüllt und hierbei auf einen pH-Wert von 7.0-7.2 eingestellt. Für die Injektionen bei der Kontrollgruppe wurde NaCl-Lösung (0.9%) bzw. Ringerlösung verwendet.

Zu 1 mg Amanitin wurde 1 ml steriles Wasser hinzugegeben. Weitere Verdünnungen zu 5 ng/µl und 50 pg/µl wurden mit Ringerlösung durchgeführt. Bei der Kontrollgruppe wurde Ringerlösung appliziert.

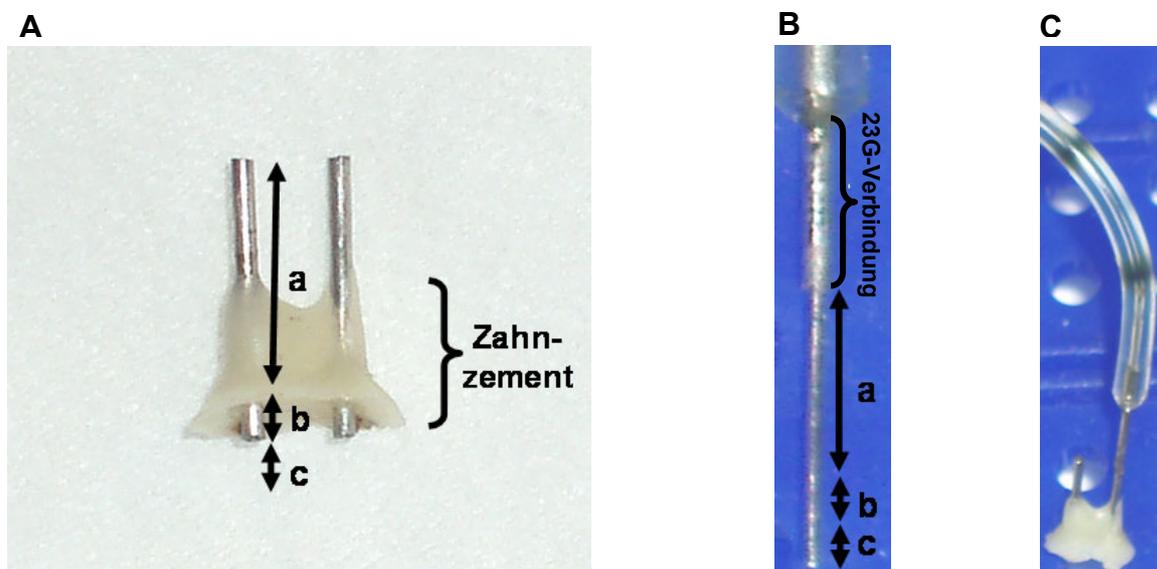
AP5 wurde in Ringerlösung gelöst und zu einer Endkonzentration von 2 µg/µl bzw. 1 µg/µl gebracht. Als Kontrolle wurde Ringerlösung verwendet.

#### **2.4.3 Durchführung von intrazerebralen Injektionen**

Der Zeitpunkt, zu dem eine Injektion durchgeführt wurde, variierte von 15 min vor dem Lernereignis bis hin zu 60 min nach dem Lernen und ist im Ergebnisteil jeweils angegeben. Grundsätzlich wurde die Injektionsprozedur unter einer leichten Isofluran-Narkose durchgeführt. Im Ergebnisteil ist explizit erwähnt, wenn diese aus Gründen des Interferierens mit dem Lernen weggelassen wurde. In diesem Fall erfolgte die Ruhigstellung des Kopfes der Maus durch einen geübten Griff im Nacken-/Schulterbereich.

Die zu untersuchende Substanz wurde über eine 30G-Injektionskanüle (Länge 9 mm) injiziert. Diese dringt nach dem Durchführen durch die implantierte Führungskanüle 1 mm über diese hinaus ins hippokampale Gewebe ein. Die Injektionskanüle ist fest mit einem kalibrierten Tygon® Schlauch (innerer Durchmesser 0.19 mm) verbunden, in dem sich die gelöste Substanz befindet (Abbildung 2-2B,C). Am anderen Ende des

Schlauchs wurde eine mit Wasser gefüllte Mikroliterspritze angebracht, mit der die Substanz dosiert verabreicht wurde. Zusätzlich wurde eine Luftblase im Schlauch erzeugt, die als Grenzschicht zwischen der gelösten Substanz am Injektionskanülenende des Schlauches und dem Wasser am Mikroliterspritzenende diente. Außerdem konnte durch die Bewegung der Luftblase die Geschwindigkeit der Injektion verfolgt werden. Für jede Seite betrug das Injektionsvolumen  $0.5 \mu\text{l}$  und wurde über einen Zeitraum von 45–60 s eingebracht. Um ein Zurückfließen der Substanz zu vermeiden wurde die Kanüle erst 1 min nach Ende der Injektion wieder herausgenommen. Die Maus wachte ein bis zwei Minuten nach der Behandlung wieder in ihrem Käfig auf.



**Abb. 2-2: Utensilien für intrazerebrale Injektionen.** (A) Die beiden Führungskanülen (23G) wurden mit Zahnzement am Schädelknochen fixiert. Ihre Gesamtlänge von 8 mm teilt sich auf in einen Teil, der über dem Schädel herausragt (a) und einen Teil, der durch die Schädeldecke in das Gehirn eindringt (b). Das untere Ende liegt 1 mm (c) über dem Injektionsareal. (B) Die Injektionskanüle (30G) hat eine Länge von 9 mm (a+b+c) und ragt 1 mm (c) aus der Führungskanüle hervor. An der Injektionskanüle ist über ein Verbindungsstück (23G) ein durchsichtiger Schlauch befestigt, der am oberen Bildrand zu erkennen ist. (C) Wenn die Injektionskanüle in die Führungskanüle gesteckt ist, lässt sich am kalibrierten Schlauch die Injektion verfolgen.

#### 2.4.4 Histologische Verifizierung der Injektionsstelle

Nach Abschluss aller Verhaltenstests musste die genaue Position der Injektion lokalisiert werden. Dazu wurden die Mäuse mit Ketamin/Rompun® (2%/0.5% in 0.9%iger NaCl-Lösung;  $10 \mu\text{l/g}$  Körpergewicht i.p.) betäubt und, wie unter 2.3.2

beschrieben, wurden 0.5 µl Kresylviolett (0.5% in H<sub>2</sub>O) bilateral durch die Führungskanülen injiziert. Nach 15 min wurden die Gehirne entnommen, auf Trockeneis mit 2-Methylbutan eingefroren und von diesen am Kryostat (Innentemperatur -18°C) Gefrierschnitte (Schnittdicke 20 µm) hergestellt, um die Lokalisation der Kresylviolett-Injektion festzustellen. Zur Beurteilung der zellulären Situation wurden die Schnitte im Anschluss daran mit Kresylviolett gefärbt. Hierzu wurden die Objektträger nacheinander in folgenden Lösungen getaucht: 2 min Kresylviolett (0.5% in H<sub>2</sub>O), 30 s Ethanol (70%), 30 s Ethanol (96%), 5 min Isopropanol, 10 min Roti<sup>®</sup>-Histol. Schließlich wurden die Objektträger mit ein paar Tropfen Roti<sup>®</sup>-Histokit beträufelt und mit Deckgläsern verschlossen. Tiere, bei denen die Injektionsstelle nicht beidseitig innerhalb des dorsalen Hippokampus lag, wurden ausgeschlossen.

## **2.5 Untersuchungen zur Induktion von *Immediate early genes***

### **2.5.1 *In situ*-Hybridisierung**

#### **2.5.1.1 Herstellung und Vorbereitung der Gehirnschnitte**

Die Hirnpräparation fand 20 min nach Ende des Lerntests (*trace-* bzw. *delay-*Konditionierung) statt. Nach zervikaler Dislokation unter Isofluran-Narkose wurde den Tieren das Gehirn entnommen, mit 2-Methylbutan auf Trockeneis eingefroren und in Aluminiumfolie gewickelt bei -80°C aufbewahrt. Mit einem Kryostat (Innentemperatur -18°C) wurden von den Gehirnen 14 µm dicke Schnitte hergestellt, auf Objektträger gebracht und nach kurzem Trocknen auf einer Wärmeplatte (37°C) bei -80°C bis zur weiteren Verwendung zwischengelagert.

Zur Vorbereitung für die Hybridisierung wurden die Objektträger mit den Gehirnschnitten 30 min bei Raumtemperatur aufgetaut, mit 4%igem Paraformaldehyd in PBS (136.8 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10.2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH7.4) auf Eis 10 min fixiert, drei mal je 5 Minuten mit PBS gewaschen und 10 min in 0.25 M Essigsäureanhydrid (in 0.1 M Triethanolamin-HCl, pH8.0) zur Azetylierung inkubiert. Danach wurden die Schnitte zweimal in 2xSSC (0.3 M NaCl, 30 mM Na<sub>3</sub>-Citrat, pH7.4) gewaschen und mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (60%, 75%, 95% und 100%; je 1 min) dehydriert. Nach einer 5minütigen Chloroformbehandlung, bei der

die Lipide entzogen wurden, erfolgte ein abschließendes Waschen der Schnitte in Ethanol (100%, 95%; je 1 min). Die Schnitte wurden an einem staubfreien Platz luftgetrocknet und waren dann zur Hybridisierung verwendbar.

### 2.5.1.2 Herstellung der Hybridisierungssonden

Die Herstellung der Hybridisierungssonden erfolgte durch *in vitro*-Transkription der linearisierten Plasmid-DNA, in der die cDNA-Sequenz des untersuchten Gens enthalten war. Für die hier durchgeführten Experimente wurden die cDNA-Sequenzen für die IEGs *zif268* (IMAGE clone 1532857; Invitrogen, Karlsruhe), *c-fos* (IMAGE clone 2647069; Invitrogen, Karlsruhe) und *bdnf* (IMAGE clone 1397218; Invitrogen, Karlsruhe) verwendet, die in den Vektor pBluescript KS<sup>-</sup> (Stratagene, CA, USA) kloniert waren. Linearisiert wurden die Plasmide mit *EcoRI* (*zif268*, *c-fos*) bzw. *XhoI* (*bdnf*). Sie wurden von der AG Lutz (MPI für Psychiatrie, München) zur Verfügung gestellt. Die Spezifität der Sonden wurde durch ausbleibende Hybridisierung bei Testung der *sense*-Proben bestätigt (persönliche Mitteilung). Für die *in vitro*-Transkription der zur *In situ*-Hybridisierung verwendeten *antisense*-RNA mit T3-(*bdnf*) bzw. T7-Polymerase (*zif268*, *c-fos*) wurde für jede Sonde ein 90 µl-Ansatz hergestellt, der 3 h bei 37°C inkubiert wurde:

Transkriptionspuffer (10x)	9 µl
DTT (0,5 M)	3 µl
rATP/rCTP/rGTP (je 10 mM)	9 µl
[α-thio- <sup>35</sup> S]-UTP (1250 Ci/mmol)	30 µl
RNasin (40 U/µl)	3 µl
linearisierte Plasmid-DNA	x µl (4.5 µg)
T3- bzw. T7-Polymerase (20 U/µl)	<u>3 µl</u>
DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 90 µl

Nach der *in vitro*-Transkription wurden 6 µl DNase I (RNase-frei) zugegeben, um die Plasmid-DNA zu verdauen (15 min bei 37°C). Schließlich wurde die RNA mit *Nucleotide removal kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt und in 80 µl sterilem DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Aktivität dieser Sonde wurde mit Szintillationsmessung bestimmt, indem 1 µl der radioaktiv markierten RNA mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit in einem Szintillationsmessgerät gemessen wurde.

### 2.5.1.3 Durchführung der Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurde die Sonde mit Hybridisierungspuffer so verdünnt, dass die Aktivität der dabei gebildeten Hybridisierungsmischung 70'000 cpm/µl betrug. Der Hybridisierungspuffer setzte sich zusammen aus 50% Formamid, 20 mM Tris-HCl (pH8.0), 0.3 M NaCl, 5 mM EDTA (pH8.0), 10% Dextransulfat, 0.02% Ficoll 400, 0.02% Polyvinylpyrrolidon PVP 40 (MW 40'000), 0.02% BSA, 0.5 mg/ml tRNA, 0.2 mg/ml Heringssperma-DNA und 200 mM DTT. Die staubfrei getrockneten Objektträger wurden mit 90 µl dieser Hybridisierungsmischung, die kurz vor ihrer Verwendung 2 min bei 90 °C aufgeköcht wurde, überschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt. Die so behandelten Objektträger wurden in einer Plastikdose, deren Boden zum Feuchthalten mit einer Lösung (50% Formamid in 2xSSC) bedeckt war, ü.N. (über Nacht) bei 64°C inkubiert. Nach dem Entfernen der Deckgläser wurde das Waschen der Objektträger wie folgt durchgeführt: Viermal je 5 min in 4xSSC (0.6 M NaCl, 60 mM Na<sub>3</sub>-Citrat, pH7.4), 30 min bei 37°C in NTE (0.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH8.0, 5 mM EDTA) mit RNaseA (20 µg/ml), zweimal je 5 min in 2xSSC (mit 1 mM DTT), 10 min in 1xSSC (mit 1 mM DTT), 10 min in 0.5xSSC (mit 1 mM DTT), zweimal je 30 min bei 64°C in 0.1xSSC (mit 1 mM DTT) und zweimal je 10 min in 0.1xSSC. Abschließend wurden die Schnitte in einer ansteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 95% und zweimal 100%; je 5 min) dehydriert, luftgetrocknet und ü.N. in Filmkassetten einem Röntgenfilm exponiert.

### 2.5.1.4 Auswertung

Die zu untersuchenden Regionen wurden vom entwickelten Röntgenfilm auf einem Leuchtschirm in möglichst hoher Vergrößerung (30-40 mm Objektivaufsätze) mit einer CCD-Kamera aufgenommen und die Schwärzung densitometrisch mit NIH Image Software (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/Default.html>) gemessen. Jede Region wurde bilateral an zwei aufeinander folgenden Schnitten untersucht. Bei jedem Tier wurde für die untersuchte Region ein Mittelwert aus Einzelmessungen gebildet, die an *Corpus callosum* normalisiert wurden.

## 2.5.2 Immunhistochemie

### 2.5.2.1 Vorbereitung und Weiterbehandlung der Gehirne

Die Tiere wurden 90 min nach dem Lerntest mit Ketamin/Rompun<sup>®</sup> (2%/0.5% in 0.9%iger NaCl-Lösung; 10 µl/g Körpergewicht i.p.) narkotisiert und etwa 15 min später, als die Maus keine Reflexe mehr zeigte, transkardial perfundiert. Hierzu wurde der Thorax geöffnet und in die linke Herzkammer eine stumpfe Kanüle eingeführt, über die unter Verwendung einer Perfusionspumpe zunächst PBS und dann Paraformaldehyd (PFA; 4% in PBS) durch das Gefäßsystem gespült wurde (6 ml/min; insgesamt 15 min). Die Nachfixierung der entnommenen Hirne erfolgte 20 h in PFA (4% in PBS). Die Gehirne wurden anschließend in Sucrose-PBS-Lösungen (6 h in 0.5 M Sucrose/PBS und 40 h in 1 M Sucrose/PBS) eingelegt, in 2-Methylbutan auf Trockeneis eingefroren und in Aluminiumfolie gewickelt bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Von den Gehirnen wurden am Kryostat (Innentemperatur -18°C) *free floating* Schnitte (Schnittdicke 25 µm) angefertigt, diese mit Natriumborhydrid (1%ig; 15 min) vorbehandelt und in PBS gewaschen.

### 2.5.2.2 Immunhistochemischer Nachweises von c-Fos

Die vorbehandelten Schnitte wurden in einer Lösung aus 10% *Normal goat serum* (NGS), 0.3% Triton X-100 und 0.05% Phenylhydrazin 30 min vorinkubiert. Der primäre Antikörper (*rabbit*), der das aminoternale Epitop von c-Fos erkennt, wurde in 10% NGS, 0.3% Triton X-100, 0.1% Natriumazid und 0.01% Thimerosal verdünnt und 36 h bei 6°C mit den Schnitten inkubiert. Die Schnitte wurden 1 h in PBS und 1 h in PBS mit 0.2% BSA (PBS-A) gewaschen und dann mit dem sekundären Antikörper (*goat-anti-rabbit*, Biotin-konjugiert), der 1:2000 in PBS-A verdünnt wurde, 24 h bei 6°C inkubiert. Die Schnitte wurden erneut 1 h in PBS und 1 h in PBS-A gewaschen und anschließend 6 h mit ABC-Komplex (aus Vectastain<sup>®</sup> ABC Kit) behandelt. Nach anschließendem Waschen (s.o.) wurde die Peroxidase-Aktivität mit einer DAB/Nickel-Farbreaktion sichtbar gemacht. Dazu wurden die Schnitte 3 min in einer

Lösung aus 1.4 mM DAB, 10 mM Imidazol, 3.3 mM Nickel-Ammoniumsulfat, und 0.013% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 50 mM Tris-HCl pH7.5 inkubiert.

### **2.5.2.3 Auswertung**

Die Auswertung von Hippokampus (CA1) und basolateraler Amygdala erfolgte durch Zählen der c-Fos-positiven Zellen unter dem Lichtmikroskop. Für jedes Tier wurde der Mittelwert aus drei bilateral untersuchten Schnitten gebildet.

## **2.6 Funktionelle Untersuchungen zur Proteinbiosynthese**

### **2.6.1 Durchführung der Markierung mit [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein**

Redivue™ ProMix ([<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein; Gesamtaktivität 2.5 mCi, spezifische Aktivität >1000 Ci/mmol) wurde in 8-10 ml NaCl-Lösung (0.9%) verdünnt und die Aktivität bestimmt, indem 10 µl der Lösung mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit in einem Szintillationsmessgerät gemessen wurden. Unter leichter Isofluran-Narkose erhielten die Mäuse eine Injektion (i.p.) mit einer Dosis von 2.0-2.8 µCi/10 µl/g Körpergewicht.

### **2.6.2 Proteinsyntheseabhängigkeit der Inkorporation von [<sup>35</sup>S]-Met/Cys**

Die Markierung mit [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein innerhalb einer Stunde wurde zu unterschiedlichen Zeiten nach systemischer Anisomycingabe untersucht. Anisomycin wurde hierzu in NaCl-Lösung (0.9%) aufgenommen, durch Zugabe von HCl (1 M) gelöst und mit NaOH (1 M) auf pH7.0-7.2 gebracht. Die Anisomycininjektion erfolgte i.p. mit einer Dosis von 150 µg/10 µl/g Körpergewicht.

Die intrahippokampale Injektion von Anisomycin wurde wie unter 2.4 beschrieben durchgeführt.

### 2.6.3 Prozessieren von Hirnschnitten und Gewebeproben

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Injektion von [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein (je nach Experiment 15 min bis sieben Tage) wurden nach zervikaler Dislokation unter Isofluran-Narkose die Gehirne entnommen, auf Trockeneis mit 2-Methylbutan eingefroren, in Aluminiumfolie eingewickelt und bei -80°C zwischengelagert.

#### *Hirnschnitte:*

Von den Gehirnen wurden am Kryostat (Innentemperatur -18°C) Gefrierschnitte (Schnittdicke 18 µm) angefertigt, auf Objektträger gebracht und nach kurzem Trocknen auf einer Wärmeplatte (37°C) bei Raumtemperatur zwischengelagert. Die Schnitte wurden über einen Zeitraum von 1 bis 3 Tage in einer Filmkassette einem Röntgenfilm exponiert.

Bedarfsabhängig wurden die Gehirnschnitte anschließend einer dreistufigen Waschung unterzogen (Wasser, 70% Ethanol, 95% Ethanol; je 2 min), luftgetrocknet und erneut einem Röntgenfilm exponiert. Schließlich wurden die Schnitte mit Kresylviolett gefärbt (siehe 2.4.4), um die Regionen für die densitometrische Auswertung zu lokalisieren.

#### *Gewebeproben:*

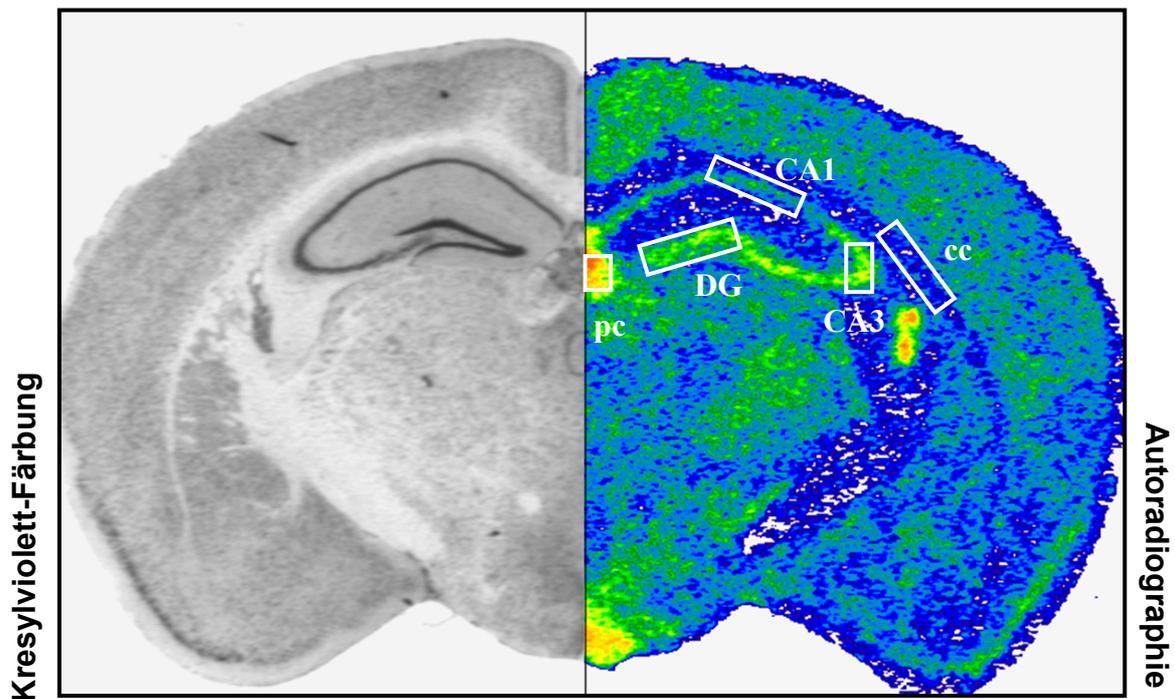
Nach dem Schneiden der Gehirne wurde aus diesen mit einem Gewebestanzter (innerer Durchmesser 1 oder 2 mm) Probenmaterial entnommen (je nach Experiment 3-15 mg), gewogen und in Eppendorf Reaktionsgefäßen bei -80°C zwischengelagert. Die genaue Lokalisation ist im Ergebnisteil angegeben.

### 2.6.4 Densitometrische Auswertung von Gehirnschnitten

Die zu untersuchenden Regionen wurden vom entwickelten Röntgenfilm in möglichst hoher Vergrößerung (30-45 mm Objektivaußsätze) mit einer CCD-Kamera aufgenommen und die Schwärzung der Hirnregionen mit NIH Image Software (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/Default.html>) gemessen. Jede Region wurde bilateral an zwei aufeinander folgenden Schnitten untersucht. Die Identität der Strukturen wurde während der Auswertung durch direkten Abgleich mit den gefärbten

(Kresylviolett) Schnitten gewährleistet. Bei jedem Tier wurde für die untersuchte Region ein Mittelwert aus Einzelmessungen gebildet.

Die Regionen, die für die Untersuchungen zur Verteilungskinetik der radioaktiven Aminosäuren und zum Einfluss von Proteinbiosynthese Aktivität (3.4.1 bis 3.4.5) ausgewählt wurden, sind in Abbildung 2-3 zusammengefasst.



**Abb. 2-3: Lokalisation der ausgewerteten Hirnregionen.** Koronaler Schnitt bei Bregma -1.9 mm nach Färbung mit Kresylviolett (li) bzw. Autoradiographie mit Pseudo-Kolorierung (re). Ausgewertet wurden die hippocampalen Subregionen (CA1, CA3, DG), *Corpus callosum* (cc) und *Plexus choroideus* des dorsalen Anteils des 3. Ventrikels.

Die Hirnregionen, die für die funktionellen Untersuchungen zur kontextuellen Konditionierung (3.4.6-3.4.7) ausgewertet wurden, sind aufgrund des Bezugs zu den Ergebnissen im Ergebnisteil dargestellt. Bei diesen densitometrischen Messungen wurde eine Normalisierung an *Corpus callosum* (für Hippokampus), *Capsula interna* (für Amygdala) und *Tractus opticus* (für *Nucleus paraventricularis*) durchgeführt.

## 2.6.5 Messung der Radioaktivität im Gewebe

### 2.6.5.1 Gesamtgewebe

Die Gewebeproben wurden mit 30 µl Aufschlusspuffer (0.1 M Tris-HCl pH7, 1% SDS, 0.1 M NaCl; Proteaseinhibitor *complete*<sup>™</sup>, eine Tablette pro 10 ml) unter Verwendung eines Teflonhomogenisators in Suspension gebracht und in 3 ml Szintillationsflüssigkeit im Szintillationsmessgerät gemessen.

### 2.6.5.2 Proteinfraction

Zur Fällung der Proteine mit Trichloressigsäure (TCA) wurden die Gewebeproben in 400 µl Aufschlusspuffer (s.o.) aufgenommen und mit Ultraschall (15 *pulses*) sonifiziert. Von dem Homogenisat wurden 100 µl abgenommen und unter Zugabe von 25 µl TCA (100%ig) 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (14'000 Upm, 10 min) wurde das Pellet zweimal mit je 200 µl eiskaltem Aceton (100%) gewaschen, dazwischen jeweils zentrifugiert (14'000 Upm, 5 min), schließlich luftgetrocknet, quantitativ in 3 ml Szintillationsflüssigkeit überführt und die Radioaktivität im Szintillationsmessgerät bestimmt.

## 2.7 Zweidimensionale Gelelektrophorese

### 2.7.1 Standardprotokoll

#### 2.7.1.1 Hippokampusentnahme und Gewebeaufschluss

Die Hippokampusentnahme fand 24 h nach dem Lerntest (*trace-* bzw. *delay-*Konditionierung) statt. Dazu wurden die Tiere unter Isofluran-Narkose zervikal disloziert und das entnommene Gehirn auf eine mit Eis gekühlte Metallplatte gelegt. Nach Abtrennung von *Cerebellum* und dem in Relation zum *Chiasma opticum* anterior gelegenen Teil des Gehirns wurde der Hippokampus stumpf aus dem

verbliebenen Teil herauspräpariert, gewogen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C zwischengelagert.

Zur Extraktion der Proteine wurde ein Lysepuffer verwendet, der sich wie folgt zusammensetzte: 7 M Urea, 2 M Thiourea, 2% Chaps, 0.2% Biolyte® pH3-10 und 0.1 M DTT. Kurz vor Verwendung wurden noch Proteaseinhibitoren *complete*<sup>™</sup> (eine Tablette pro 10 ml), Pepstatin (1 µM) und PMSF (10 µM) zugesetzt. Zu jeder Gewebeprobe wurden 200 µl Lysepuffer gegeben und das Gewebe unter Verwendung von *Plus one Sample grinding kit* homogenisiert. Nach Zentrifugation (14'000 Upm, 10 min) wurde der Überstand mit den extrahierten Proteinen abgenommen und aus dem verbliebenen Sediment wiederholt mit 100 µl Lysepuffer Protein extrahiert (14'000 Upm, 10 min). Die beiden Fraktionen wurden vereinigt und das Volumen bestimmt. Das einer Menge von 10 mg Gewebe entsprechende Volumen wurde abgenommen, mit Lysepuffer auf 320 µl aufgefüllt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation (14'000 Upm, 10 min) waren die Proben für die Proteinauftrennung verwendbar.

### **2.7.1.2 Proteinauftrennung**

#### *Erste Dimension:*

Die Auftrennung der Proteine nach dem isoelektrischen Punkt erfolgte unter Verwendung von IPG-*strips* (Gelstreifen, Länge 17 cm, pH 4-7), von denen 12 simultan prozessiert werden konnten. Der in 2.7.1.1 hergestellte Proteinextrakt wurde in den *focussing tray* der isoelektrischen Fokussierapparatur (Protean® IEF cell) vorgelegt und die IPG-*strips* mit der Gelseite nach unten darauf gelegt, so dass die Enden der Strips mit den Elektrodendrähten Kontakt hatten. Die Proteinlösung wurde zunächst 2 h durch passive Rehydrierung in die IPG-*strips* aufgenommen. Um ein Austrocknen der Strips zu vermeiden, wurden sie mit Mineralöl überschichtet und dann 12 h durch aktive Rehydrierung (50 V) weiter mit der Proteinlösung vollgesogen. Um für die nachfolgende Auftrennung einen ausreichenden Stromfluss im Gelstreifen zu gewährleisten, wurde auf die Kontaktflächen zwischen Elektrode und Gel ein kleines mit H<sub>2</sub>O getränktes Filterstück gelegt. Die Auftrennung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben durch ein vierstufiges Protokoll mit dynamischer Regelung der angelegten Spannung bei 20°C unter Limitierung des Strom-

flusses auf 50  $\mu\text{A}/\text{strip}$  (15 min Vorfokussierung bei 250 V, 2 h linearer Spannungsgradient (*rapid*) von 250 V auf 10'000 V, Auftrennungsphase bei 10'000 V mit insgesamt 40'000 Vh, Fokuserhaltungsphase bei 50 V). Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden die IPG-*strips* entweder ü.N. bei  $-80^\circ\text{C}$  zwischengelagert oder direkt im Anschluss weiterbearbeitet.

### *Zweite Dimension:*

Vor der Trennung in der zweiten Dimension erfolgte eine chemische Reduktion der Proteine mit anschließender Alkylierung. Dazu wurden die IPG-*strips* unmittelbar vor dem Einsetzen in die SDS-Gele der zweiten Dimension 10 min mit 2% DTT in Äquilibriumspuffer (50 mM Tris-HCl pH8.8, 6 M Urea, 2% SDS, 20% Glycerol) inkubiert und anschließend 20 min mit 2.5% Iodacetamid in Äquilibriumspuffer. Jeder einzelne IPG-*strip* war hierbei mit etwa 6 ml der entsprechenden Lösung bedeckt. Diese beiden Schritte wurden unter leichtem Schütteln durchgeführt.

Die Trennung der Proteine nach dem Molekulargewicht erfolgte in SDS-Polyacrylamidgelen (Größe: 20.0 x 20.5 cm; Herstellung nach BioRad, Protean<sup>®</sup> Plus Handbuch) unter Verwendung eines diskontinuierlichen Tris-Glycin-Puffersystems. Die Polyacrylamidkonzentration des Trenngels (pH8.8) war 12%, die des Sammelgels (pH6.8) 5%. Parallel konnten 12 Gele hergestellt und prozessiert werden (BioRad Protean<sup>®</sup> Plus, *dodeca*<sup>™</sup> cell system). Die IPG-*strips* wurden nach der Äquilibriumierung kurz mit TGS-Laufpuffer benetzt und auf das Sammelgel gesetzt. Zum Fixieren des IPG-*strips* wurde verflüssigte ( $60^\circ\text{C}$ ) *low melting*-Agarose (0.5% in TGS-Laufpuffer mit etwas Bromphenolblau) darübergegossen, die nach dem Erkalten aushärtete. Als Referenz wurde der BioRad Proteinstandard aufgetragen. Alle Gele wurden in die mit TGS-Laufpuffer gefüllte Protean<sup>®</sup> Plus *dodeca*<sup>™</sup> cell überführt und zunächst 1 h bei 50 V, dann etwa 8 h bei 200 V aufgetrennt, bis die Lauffront etwa 1 cm vor Erreichen des Gelendes war.

### **2.7.1.3 Färbung und Auswertung**

Für die nachfolgenden Färbeschritte war jedes SDS-Gel einzeln in einer etwa 400 ml fassenden Färbeschale. Zuerst wurden die Gele ü.N. in Fixierlösung (30% Ethanol, 2% Phosphorsäure) inkubiert. Dann wurden sie eine Stunde in 250 ml Färbelösung

(17% Ammoniumsulfat, 2% Phosphorsäure, 35% Methanol) vorinkubiert und die Proteine dann nach Zugabe von 250 mg Coomassie Blau G250 drei Tage lang angefärbt. Anschließend wurden sie zweimal (1 h und 10 min vor dem Einscannen) in Wasser gespült und mit dem Gelscanner abgelichtet. Für die Auswertung mit PDQuest™ Software (BioRad) wurde die automatische Spoterkennung verwendet und hierbei wurden die Optionen (Hintergrundreduktion, Spoterkennung, Artefaktbehebung) so eingestellt, dass in dem untersuchten Bereich des Gels etwa 500 Proteinspots erfasst wurden.

### **2.7.2 Protokoll für [<sup>35</sup>S]-markierte Proteine**

Es wurden insgesamt zwei Versuche durchgeführt, bei denen radioaktiv markierte Proteine mit zweidimensionaler Gelelektrophorese dargestellt wurden. Beim ersten Ansatz betrug die Inkorporationszeit der radioaktiv markierten Aminosäuren ([<sup>35</sup>S]-Met/Cys) nach i.p.-Injektion insgesamt 6 h (1.7 µCi/10 µl/g Körpergewicht), beim zweiten 2 h (2.4 µCi/10 µl/g Körpergewicht).

Die zweidimensionale Auftrennung der Proteine wurde mit kleineren Gelen (Größe: 13.3 x 8.7 cm) durchgeführt (BioRad Criterion™, *dodeca™ cell* System).

#### **2.7.2.1 Gewebeentnahme und -aufschluss**

Beim ersten Ansatz wurde die Proteinexpression des gesamten Hippokampus untersucht (Präparation siehe 2.7.1.1). Es wurden die Hippokampi von drei Tieren vereinigt und daraus 10 mg Gewebe auf ein Gel geladen, um interindividuelle Schwankungen zu reduzieren bzw. zum Vergleich 10 mg aus hippokampalem Gewebe eines einzelnen Tieres.

Für den zweiten Ansatz wurde die CA1 Region des Hippokampus mit einem Gewebestänzer (Durchmesser 0.5 mm) aus dem gefrorenen Gehirn (prozessiert wie in 2.6.3) präpariert. Hier war es notwendig, die Gewebestücke von insgesamt fünf Tieren zu vereinigen, um die minimal erforderliche Gewebemenge (7 mg) zu erreichen, wodurch auch interindividuelle Schwankungen reduziert wurden.

Die Extraktion der Proteine erfolgte wie in 2.7.1.1 beschrieben. Die Proteine wurden beim ersten Ansatz mit 200 µl + 100 µl Lysepuffer extrahiert, beim zweiten Ansatz mit 150 µl + 75 µl. Das Volumen der vereinigten Extrakte wurde gemessen, die der erforderlichen Gewebemenge entsprechende Menge abgenommen und diese mit Lysepuffer auf 200 µl aufgefüllt.

### **2.7.2.2 Proteinauftrennung und -blotting**

Die zweidimensionale Gelelektrophorese wurde wie in 2.7.1.2 durchgeführt. Für die erste Dimension wurden jedoch kleinere IPG-*strips* (Länge 11 cm, pH4-7) verwendet, von denen 6 simultan prozessiert wurden. Die dynamische Regelung der Spannung war bedingt durch die kleinere Größe der IPG-*strips* modifiziert (15 min Vorfokussierung bei 250 V, 1 h linearer Spannungsgradient 250 V - 8'000 V, Auftrennungsphase bei 8'000 V mit 20'000 Vh, Fokuserhaltungsphase bei 50 V).

Die zweite Dimension erfolgte unter Verwendung von fertigen Tris-Glycin Gradientengelen (8-16%). Die Auftrennung wurde mit der Criterion™ *dodeca*™ *cell* 30 min bei 50 V und 4 h bei 100 V durchgeführt. Als Referenz wurde der Proteinstandard von Fermentas mit aufgetragen.

Nach der Auftrennung wurden die Gele auf PVDF-Membran geblottet. Da jeweils nur zwei Gele unter identischen Bedingungen transferiert werden konnten, wurden immer zwei Gele von unterschiedlichen Gruppen gleichzeitig geblottet. Hierzu wurde die Criterion™ *tank blotting* Apparatur (BioRad) verwendet. Die PVDF-Membranen wurden vor dem Blotten aktiviert (30 s Methanol, 2 min H<sub>2</sub>O) und dann anschließend mit den Gelen und Whatman Filterpapier 15 min in Transferpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 20% Methanol, pH8.3) inkubiert. Das Blotten erfolgte entsprechend den Herstellerangaben (BioRad, Criterion™ *tank blotting* Handbuch) bei 100 V (2 h) unter ausreichender Kühlung (Kühlakkus) des Systems.

### **2.7.2.3 Autoradiographie und Auswertung**

Zur Darstellung der radioaktiven Proteine wurde das *Phosphorimager*-System Fuji BAS 3000 verwendet. In einer Filmkassette wurden die *imaging*-Platten auf die

*blotting*-Membranen gelegt und nach einer Expositionszeit von 3 Tagen im BAS-*reader* eingelesen. Die Auswertung erfolgte visuell durch paarweisen Vergleich der Autoradiogramme jeweils simultan geblotteter Gele. Zum Abgleich wurden die Proteine auf der PVDF Membran mit Coomassie gefärbt (10% Essigsäure, 45% Methanol, 0.25% Coomassie-Blau R250) und nach Entfärben der Membran (10% Essigsäure, 30% Methanol) eingescannt.

## **2.8 Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse**

Die Ergebnisse sind, wenn nicht anders vermerkt, als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. Die statistische Auswertung umfasste Analysen mit t-Test bzw. *one-way* und *two-way* ANOVA mit jeweils angegebenem *post hoc* Test. Die Ergebnisse galten bei  $P < 0.05$  als statistisch signifikant. Zur Auswertung und Darstellung wurden die Programme Statistica, GraphPad Prism und Microsoft Office-Paket (Windows 98) verwendet. Die Schreibweise bei Dezimalbrüchen entspricht der britischen Darstellungsweise mit „.“ vor den Dezimalstellen.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Vorüberlegungen zur Auswahl der Verhaltenstests

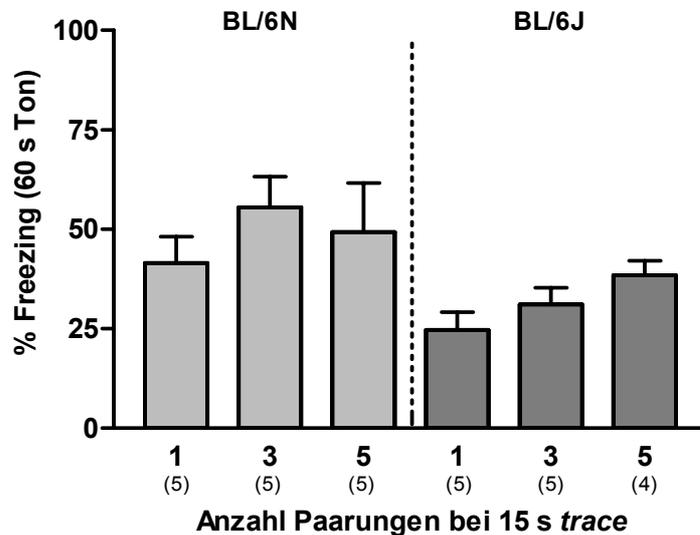
Um genauere Kenntnisse über den Konsolidierungsprozess zu gewinnen, ist es das Ziel der Arbeit, nach lernbedingten Veränderungen des Transkriptoms oder Proteoms zu suchen. Da der Hippokampus eine für pharmakologische Behandlungen gut zugängliche Region ist, über die bereits viele Kenntnisse vorliegen, wurden für dieses Ziel zwei hippokampusabhängige Formen der Furchtkonditionierung bei Mäusen gewählt. Für die Untersuchung molekularer Prozesse bei der Gedächtnisbildung ist es von Nutzen, den hierzu verwendeten Lerntests bestimmte Voraussetzungen aufzuerlegen. Hierzu gehört, dass das Lernereignis zu einer möglichst starken Verhaltensantwort führen soll, was auf einen ausgeprägten Konsolidierungsprozess schließen lässt. Diese Verhaltensantwort sollte beim Vergleich mehrerer Tiere ähnlich ausgeprägt sein, denn Unterschiede in der Stärke des Gedächtnisses führen vermutlich auch auf molekularer Ebene zu störenden Unterschieden. Da nach dem bisherigen Modell mit dem Lernen eine lange Kette von molekularen Vorgängen initiiert wird, soll das Lernereignis zeitlich möglichst eng begrenzt sein, um dadurch Teilprozesse der Gedächtniskonsolidierung zeitlich definierbar zu machen.

### 3.2 Charakterisierung von *trace*-Konditionierung hinsichtlich der Anwendung für die Untersuchung lernassoziierter Moleküle

#### 3.2.1 Optimierung hinsichtlich Mausstamm und Testprotokoll

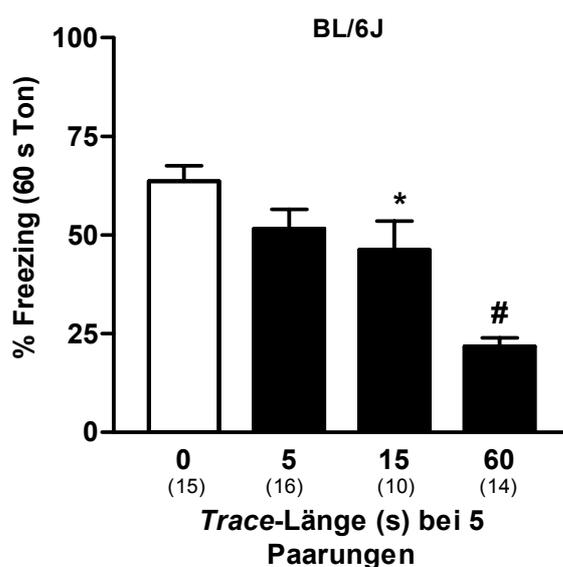
Die beiden Mausstämme C57BL/6JOlaHsd (BL/6J) und C57BL/6NCrl (BL/6N) wurden mit dem *trace*-Protokoll (15 s *trace*) konditioniert. Hierzu wurden entweder eine, drei oder fünf Ton-Schock-Paarungen verabreicht. Das Tongedächtnis wurde anhand des *freezing*-Verhaltens auf den Ton, der 24 h nach der Konditionierung im Testkontext (Zylinder) präsentiert wurde, gemessen. Beim Stamm BL/6N war zwar insgesamt ein stärkeres *freezing* als bei BL/6J zu erkennen [ $F_{1,23}=8.4$ ,  $P=0.008$ ; *two-way* ANOVA (Stamm, Ton-Schock-Paarungen)], jedoch zeigte der Stamm BL/6J bei 5 Paarungen

eine kleinere interindividuelle Variabilität (Standardabweichung vom Mittelwert) als BL/6N ( $P=0.001$ ; Levene-Test; Abbildung 3-1).



**Abb. 3-1: Einfluss von Mausstamm und Anzahl der Ton-Schock-Paarungen auf das Tongedächtnis.** Mit zunehmender Anzahl an Ton-Schock-Paarungen (1, 3, 5) nimmt die *freezing*-Antwort bei BL/6J zu (24.7%, 31.1%, 38.4%). BL/6N-Tiere zeigen insgesamt mehr *freezing* als BL/6J (41.5%, 55.5%, 49.3%). BL/6N haben bei 1, 3 und 5 Paarungen eine stärkere Standardabweichung als BL/6J (14.8, 17.2, 27.6 vs. 9.9, 9.3, 7.3). *Freezing* wurde auf den Beobachtungszeitraum (60 s) normalisiert. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe ist in Klammern angegeben.

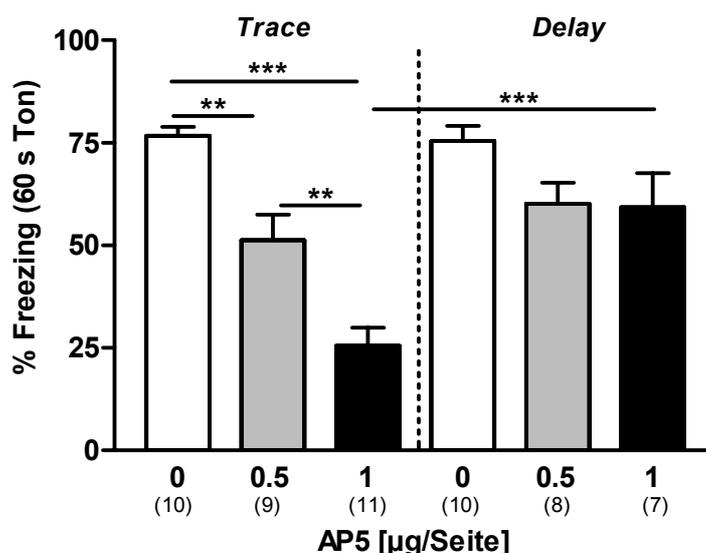
Deshalb wurde für die folgenden Experimente der Stamm BL/6J ausgewählt und hierbei die Anzahl der Ton-Schock-Paarungen wegen der stärksten *freezing*-Antwort auf fünf festgelegt. Im nächsten Schritt sollte nun unter diesen Bedingungen untersucht werden, wie sich die Länge des *trace*-Intervalls auf die Gedächtnisbildung auswirkt. Es wurden *trace*-Längen von 5, 15 und 60 s verwendet. Als Kontrolle wurde auch eine Gruppe mit dem *delay*-Protokoll (*trace*-Länge 0 s) konditioniert, bei der Ton und Fußschock koterminierend präsentiert wurden. Das Tongedächtnis wurde 24 h nach der Konditionierung im Testkontext (Zylinder) untersucht. Hierbei zeigte sich eine Abhängigkeit des *freezings* von der Länge des *trace*-Intervalls (*one-way ANOVA*,  $F_{3,54} = 15.6$ ,  $P < 0.0001$ ). Im Gegensatz zur 5 s *trace*-Länge war bei 15 s *trace* das *freezing* im Vergleich zu *delay* (0 s *trace*) vermindert ( $P < 0.001$ ). Im Hinblick darauf, das *delay*-Protokoll als Kontrolle für *trace*-Konditionierung zu verwenden, ist deshalb das *trace*-Intervall von 5 s besser geeignet als das mit 15 s. Das Tongedächtnis war beim 60 s *trace*-Intervall am geringsten und unterschied sich sowohl von *delay* ( $P < 0.001$ ), als auch von 5 s- ( $P < 0.001$ ) und 15 s *trace* ( $P < 0.01$ ) (Abbildung 3-2).



**Abb. 3-2: Einfluss der *trace*-Länge bei 5 Ton-Schock-Paarungen auf das Tongedächtnis von BL/6J. (A)** Mit zunehmender *trace*-Länge (0 s = *delay*, 5 s, 15 s, 60 s) nimmt die *freezing*-Antwort bei BL/6J ab. *Freezing* wurde auf den Beobachtungszeitraum (60 s) normalisiert. \*  $P < 0.05$  vs. 0 s *trace*; #  $P < 0.001$  vs. 0 s *trace* und 5 s *trace*,  $P < 0.001$  vs. 15 s *trace* (*one-way* ANOVA mit Newman-Keuls *post hoc* Test). Die Anzahl der Tiere pro Gruppe ist in Klammern angegeben.

### 3.2.2 Pharmakologische Blockierung der NMDA-Rezeptoren

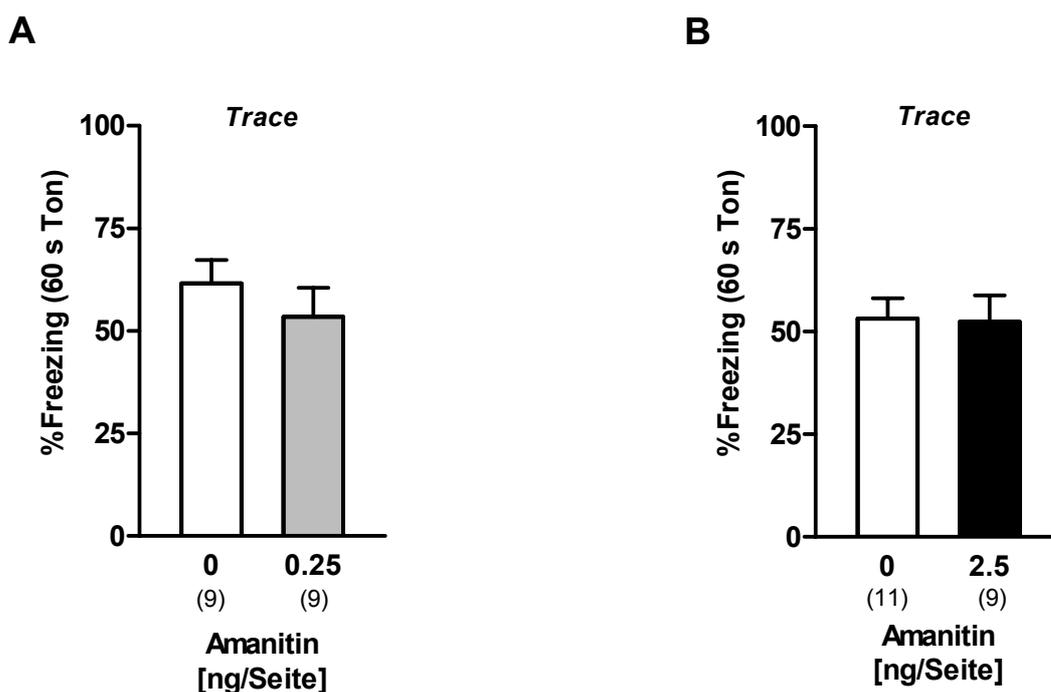
Für die Bildung von Langzeitgedächtnis spielen NMDA-Rezeptoren eine entscheidende Rolle. Um deren Einfluss bei *trace*-Konditionierung zu untersuchen, wurde der NMDA-Rezeptor-Antagonist AP5 (DL-2-Amino-5-Phosphonovalerinsäure) lokal in den dorsalen Hippokampus injiziert. Dazu wurden den BL/6J-Mäusen 10-14 Tage vor dem Experiment operativ Führungskanülen implantiert, durch die dann 15 min vor dem Lernereignis AP5 in die CA1-Region des Hippokampus appliziert wurde. Die *trace*-Konditionierung wurde mit 5 Ton-Schock-Paarungen und einem *trace*-Intervall von 5 s durchgeführt. Eine Kontrollgruppe wurde mit dem *delay*-Protokoll konditioniert. Eine Auswertung des Tongedächtnisses 24 h nach Konditionierung mit *two-way* ANOVA (Konditionierungsprotokoll, AP5-Dosis) ergab signifikante Effekte für Protokoll ( $F_{1,49}=11.4$ ,  $P=0.001$ ) und Dosis ( $F_{2,49}=24.0$ ,  $P<0.0001$ ), sowie eine signifikante Protokoll/Dosis-Interaktion ( $F_{2,49}=6.6$ ,  $P=0.003$ ). Durch Newman-Keuls *post hoc* Test zeigte sich, dass das Tongedächtnis bei *trace*-Konditionierung mit zunehmender AP5-Dosierung abnimmt. Bei der *delay*-Konditionierung war dagegen keine signifikante dosisabhängige Gedächtnisabnahme feststellbar ( $F_{2,22}=2.9$ ,  $P=0.075$ ) (Abbildung 3-3).



**Abb. 3-3: Einfluss des NMDA-Rezeptorantagonisten AP5 auf die Bildung des Tongedächtnisses nach *trace*- bzw. *delay*-Konditionierung (5 s *trace*-Länge) bei BL/6J-Mäusen.** 15 min vor der Konditionierung wurden bilateral entweder *vehicle* (0 µg), 0.5 µg oder 1.0 µg AP5 in einem Volumen von 0.5 µl pro Seite injiziert. Das Tongedächtnis wurde einen Tag nach der Konditionierung im Testkontext (Zylinder) untersucht. *Two-way* ANOVA mit Newman-Keuls *post hoc* Test zeigte signifikante dosisabhängige Unterschiede im *freezing* nach *trace*-, nicht aber nach *delay*-Konditionierung. Bei einer AP5-Dosis von 1 µg/Seite unterschied sich *trace*-signifikant von *delay*-Konditionierung. *Freezing* wurde auf den Beobachtungszeitraum (60 s) normalisiert. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe ist in Klammern angegeben. \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

### 3.2.3 Hemmung der Transkription

Nach dem gegenwärtigen Modell ist die Bildung von Langzeitgedächtnis abhängig von der Transkription. Um dies für die *trace*-Konditionierung (5 s *trace*; 5 Ton-Schock-Paarungen) zu überprüfen, wurde den Tieren vor dem Lernereignis der Transkriptionsblocker Amanitin lokal in den dorsalen Hippokampus injiziert. Wie im vorhergehenden Experiment mit AP5 wurden dazu die Tiere mit Führungskanülen ausgestattet, durch die dann Amanitin 15 min vor dem Lernen bilateral in die CA1 Region des Hippokampus eingebracht wurde. In zwei unabhängigen Experimenten wurden entweder 0.25 ng/Seite oder 2.5 ng/Seite injiziert. Als Kontrolle wurde jeweils *vehicle* (0 ng/Seite) injiziert. Bei der Testung des Tongedächtnisses an Tag 1 nach der Konditionierung im Testkontext (Zylinder) zeigten alle Gruppen tonabhängiges *freezing*. Es konnte in keinem Fall eine Beeinträchtigung durch die Amanitinbehandlung festgestellt werden (jeweils  $P > 0.05$ ; ungepaarter t-Test) (Abbildung 3-4).

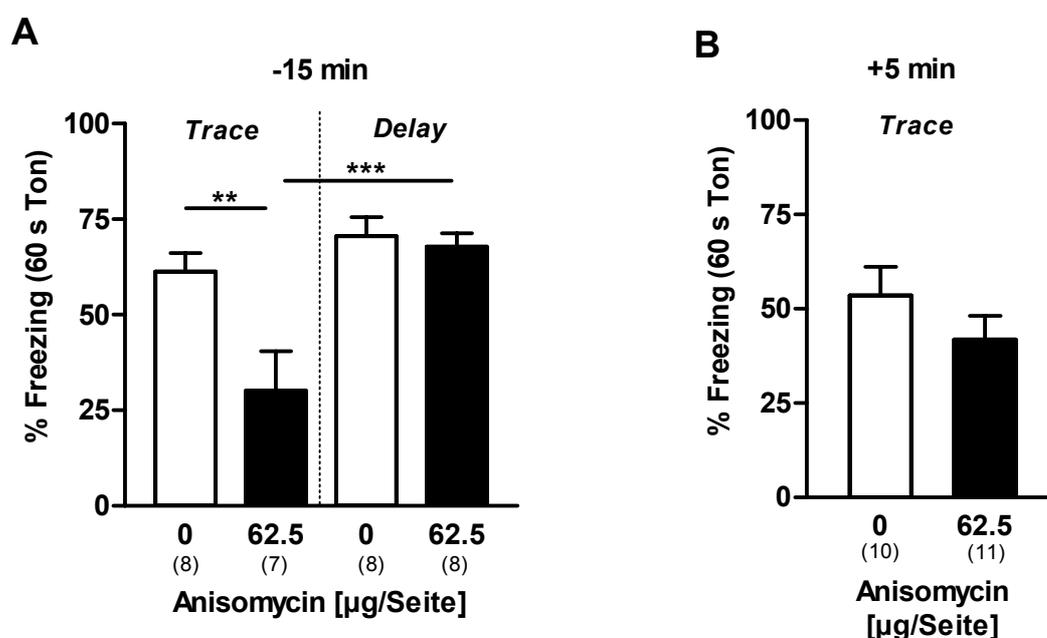


**Abb. 3-4: Einfluss des Transkriptionsblockers Amanitin auf die Bildung des Tongedächtnisses nach *trace*-Konditionierung (5 s *trace*) bei BL/6J-Mäusen.** 15 min vor der Konditionierung wurden bilateral *vehicle* (0 ng) oder 0.25 ng Amanitin (**A**) bzw. *vehicle* (0 ng) oder 2.5 ng Amanitin (**B**) in einem Volumen von 0.5  $\mu$ l pro Seite injiziert. Das Tongedächtnis wurde einen Tag nach der Konditionierung im Testkontext (Zylinder) untersucht. Es zeigte sich kein behandlungsabhängiger Unterschied im Ton-*freezing* nach *trace*-Konditionierung. (0.25 ng:  $P=0.19$ ; 2.5 ng:  $P=0.46$ ; jeweils ungepaarter t-Test, einseitige Fragestellung). *Freezing* wurde auf den Beobachtungszeitraum (60 s) normalisiert. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe ist in Klammern angegeben.

### 3.2.4 Hemmung der Translation

Zur Untersuchung der Rolle der Proteinbiosynthese bei *trace*-Konditionierung wurde die translationshemmende Substanz Anisomycin verwendet. Wie in den beiden vorangehenden Experimenten erhielten BL/6J-Mäusen über chronisch implantierte Führungskanülen Anisomycin (62.5  $\mu$ g/Seite) oder als Kontrolle *vehicle* (0  $\mu$ g/Seite) 15 min vor der Konditionierung bilateral in die CA1 Region des Hippokampus. Neben der Gruppe mit *trace*-Konditionierung (5 s *trace*; 5 Ton-Schock-Paarungen) wurde auch eine Kontrollgruppe mit dem *delay*-Protokoll konditioniert. Die Auswertung des Tongedächtnisses an Tag 1 nach der Konditionierung zeigte bei der *trace*-Gruppe eine starke Beeinträchtigung durch die Anisomycininjektion. Dies war nicht der Fall bei *delay*-Konditionierung. Die Auswertung mit *two-way* ANOVA (Konditionierungsprotokoll, Anisomycindosis) und Newman-Keuls *post hoc* Test zeigte signifikante

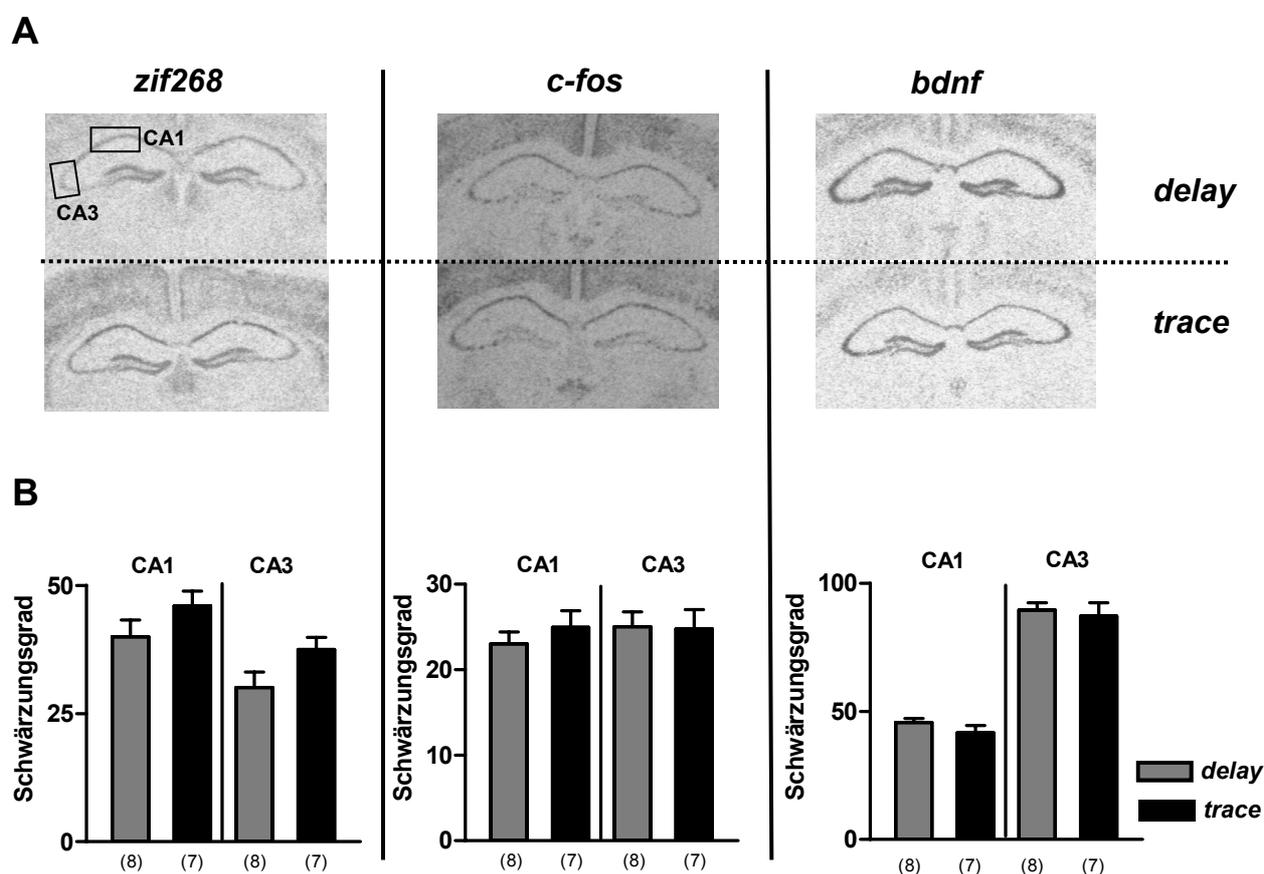
Effekte von Konditionierungsprotokoll ( $F_{1,27}=14.6$ ,  $P<0.0001$ ), Anisomycindosis ( $F_{1,27}=7.7$ ,  $P=0.01$ ), sowie von Protokoll/Dosis-Interaktion ( $F_{1,27}=5.4$ ,  $P=0.028$ ) (Abbildung 3-5A). In einem zweiten Experiment wurde Anisomycin erst unmittelbar (+5 min) nach der Konditionierung verabreicht. Hierbei konnte jedoch nur eine schwache Beeinträchtigung des Tongedächtnisses gefunden werden (53.6% vs. 41.9% *freezing*), die statistisch nicht signifikant war ( $P=0.12$ ; ungepaarter t-Test, einseitige Fragestellung). Das deutet darauf hin, dass zu diesem Zeitpunkt die Translationsprozesse für die Konsolidierung bereits abgeschlossen waren und dass die Möglichkeit der Anisomycinwirkung auf die Akquisition (bei -15 min) nicht ausgeräumt werden kann. (Abbildung 3-5B).



**Abb. 3-5: Einfluss des Translationshemmers Anisomycin auf die Bildung des Tongedächtnisses nach *trace*- bzw. *delay*-Konditionierung (5 s *trace*-Länge) bei BL/6J-Mäusen. (A) 15 min vor der Konditionierung wurden bilateral entweder *vehicle* (0  $\mu\text{g}$ ), oder 62.5  $\mu\text{g}$  Anisomycin in einem Volumen von 0.5  $\mu\text{l}$  pro Seite injiziert. Das Tongedächtnis wurde einen Tag nach der Konditionierung in einem neuen Kontext (Zylinder) untersucht. *Two-way* ANOVA (Konditionierungsprotokoll, Anisomycindosis) mit Newman-Keuls *post hoc* Test zeigte signifikante dosisabhängige Unterschiede im *freezing* nach *trace*-, nicht aber nach *delay*-Konditionierung. (B) Anisomycingabe 5 min nach *trace*-Konditionierung hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Tongedächtnis. *Freezing* wurde auf den Beobachtungszeitraum (60 s) normalisiert. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe ist in Klammern angegeben. \*\*  $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ .**

### 3.2.5 Induktion der *Immediate early genes* *zif268*, *c-fos* und *bdnf*

Die mit einem Lernereignis einhergehende synaptische Plastizität ist u.a. charakterisiert durch die Aktivierung von *Immediate early genes* (IEGs). In diesem Experiment sollte mittels *In situ*-Hybridisierung untersucht werden, ob drei dieser Gene (*zif268*, *c-fos* und *bdnf*) nach *trace*-Konditionierung im Hippokampus verstärkt transkribiert werden. Als Kontrolle wurde eine Gruppe von Tieren mit dem *delay*-Protokoll konditioniert. Die Gehirne wurden 20 min nach der Konditionierung entnommen und von diesen Gefrierschnitte angefertigt, auf denen die mRNA von den ausgewählten IEGs mit radioaktiv markierten Sonden autoradiographisch auf einem Röntgenfilm dargestellt und densitometrisch quantifiziert wurde (Abbildung 3-6).



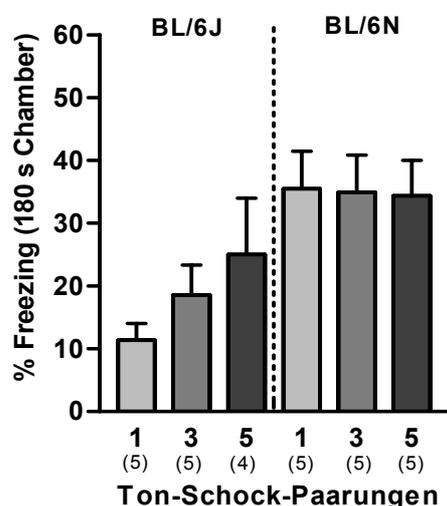
**Abb. 3-6: Induktion der *Immediate early genes* *zif268*, *c-fos* und *bdnf* 20 min nach *trace*- bzw. *delay*-Konditionierung bei BL/6J-Mäusen. (A) Beispiel-Autoradiogramme der Gefrierschnitte mit radioaktiv markierter mRNA der ausgewählten IEGs. Es wurden die Bereiche für die densitometrische Auswertung gekennzeichnet (Subregionen CA1 und CA3) (B) Transkripte der untersuchten IEGs waren sowohl nach *delay*-, als auch nach *trace*-Konditionierung nachweisbar. Es gab aber zwar keine statistisch signifikanten Unterschiede, jedoch lässt sich für *zif268* eine Tendenz zur verstärkten Transkription nach *trace*-Konditionierung erkennen, sowohl in CA1 ( $P=0.19$ ), als auch in CA3 ( $P=0.08$ ; jeweils ungepaarter *t*-Test). Die Messung der Schwärzungsgrade wurde auf *Corpus callosum* normalisiert. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe ist in Klammern angegeben.**

Die gemessenen Schwärzungsgrade wurden zur Korrektur von Unterschieden zwischen den einzelnen Schnitten jeweils auf den Schwärzungsgrad von *Corpus callosum* normalisiert, da dieser Bereich keine behandlungsbedingten Veränderungen erwarten lässt. Bei keinem der drei untersuchten IEGs war ein statistisch signifikanter Einfluss des Konditionierungsprotokolls zu erkennen. Es wurde lediglich ein Trend zur Verstärkung der Transkription nach *trace*- im Vergleich zu *delay*-Konditionierung von *zif268* in CA1 ( $P=0.19$ ) und CA3 ( $P=0.08$ ; jeweils ungepaarter t-Test) festgestellt.

### 3.3 Charakterisierung von kontextueller Konditionierung hinsichtlich der Anwendung für die Untersuchung lernassoziierter Moleküle

#### 3.3.1 Wahl des geeigneten Mausstammes

Die beiden Mausstämme BL/6J und BL/6N wurden hinsichtlich der Ausbildung von kontextuellem Gedächtnis verglichen, das bei auditorischer Furchtkonditionierung parallel zum Tongedächtnis ausgebildet wird. Deshalb wurden die im Abschnitt 3.1.1 zur *trace*-Konditionierung (15 s *trace*) verwendeten Mäuse neben dem Tongedächtnis auch auf ihr kontextuelles Gedächtnis hin untersucht. Dazu wurden sie an Tag 1 nach der Konditionierung (3 Stunden nach dem Test auf Tongedächtnis) erneut in den Konditionierungskontext (*chamber*) gesetzt und ihr *freezing*-Verhalten über einen Zeitraum von 3 min analysiert (Abbildung 3-7). Dabei zeigten BL/6N-Mäuse bei allen Paarungen stärkeres *freezing* als BL/6J ( $F_{5,28}= 3.22$ ,  $P=0.024$ ; *one-way* ANOVA mit Bonferroni's Mehrfachvergleich).

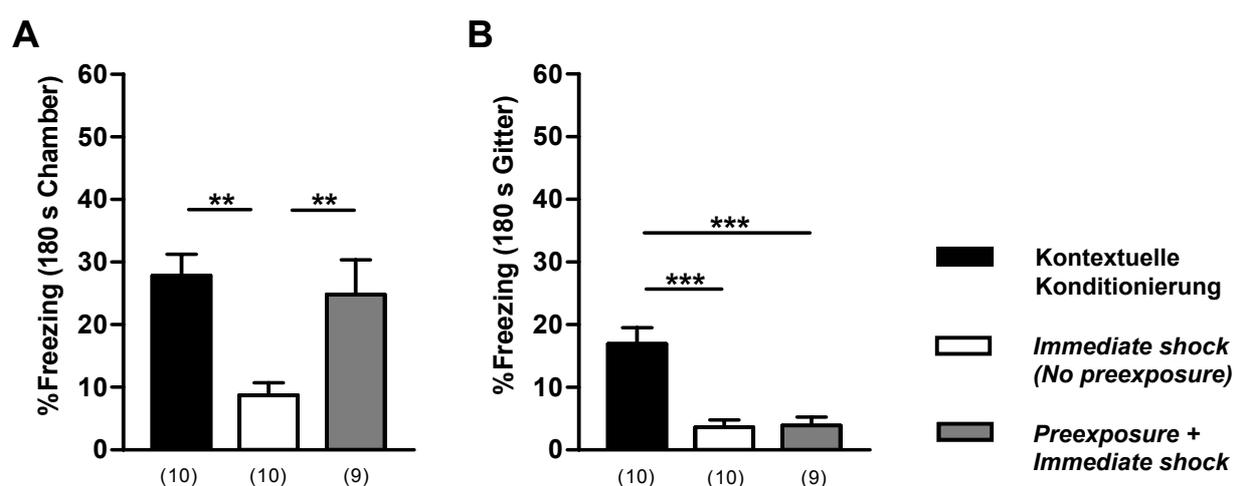


**Abb. 3-7: Kontextuelles Gedächtnis 24 h nach *trace*-Konditionierung (15 s *trace*) bei BL/6J und BL/6N.** Während BL/6N-Mäuse bereits nach einer Ton-Schock-Paarung eine starke *freezing*-Antwort zeigen, die auch mit fünf Paarungen nicht erhöht wurde, zeigen BL/6J-Mäusen erst mit fünf Ton-Schock-Paarungen ein vergleichbares *freezing*. *Freezing* wurde auf den Beobachtungszeitraum (180 s) normalisiert. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe ist in Klammern angegeben.

### 3.3.2 Stimulusmodalitäten bei kontextuellem Gedächtnis

Einem gegenwärtigen Modell zufolge resultiert das kontextuelle Gedächtnis aus einer konjunktiven Repräsentation der Umgebung, die mit dem Strafreiz verknüpft wird. Bei dieser Art des Lernens dominiert die Bedeutung der Gesamtheit der Umgebung gegenüber der Bedeutung von Einzelbestandteilen. Um zu überprüfen, inwieweit dieser Mechanismus auch unter den Bedingungen in dieser Arbeit wiederzufinden ist, wurde das *Immediate shock*-Paradigma untersucht. Hierzu erhielten die Mäuse (BL/6N) bei einer der drei Versuchsgruppen einen Fußschock 5 s nachdem sie in den Konditionierungskontext (*chamber*) gesetzt wurden. Eine andere Gruppe wurde 24 h vor der Verabreichung des *Immediate shock*'s für 10 min in den Kontext ohne Verabreichung eines Strafreiz gesetzt (*preexposure*), währenddessen sie eine Repräsentation des Kontextes aufbauten. Die dritte Gruppe wurde mit dem herkömmlichen Protokoll kontextuell konditioniert (ein Schock nach 180 s). Am Tag nach der Konditionierung bzw. nach *Immediate shock* wurde das kontextuelle Gedächtnis in der *chamber* untersucht (Abbildung 3-8A). Dabei zeigte die *Immediate shock*-Gruppe nur nach *preexposure* eine dem konventionellen Protokoll vergleichbare *freezing*-Antwort. *Immediate shock* alleine führte zu einer schwachen Furchtantwort auf den Kontext.

Um zu untersuchen, inwieweit bei diesen Protokollen Einzelverknüpfungen gebildet werden, wurden die Tiere am Tag 7 nach der Konditionierung bzw. nach *Immediate*

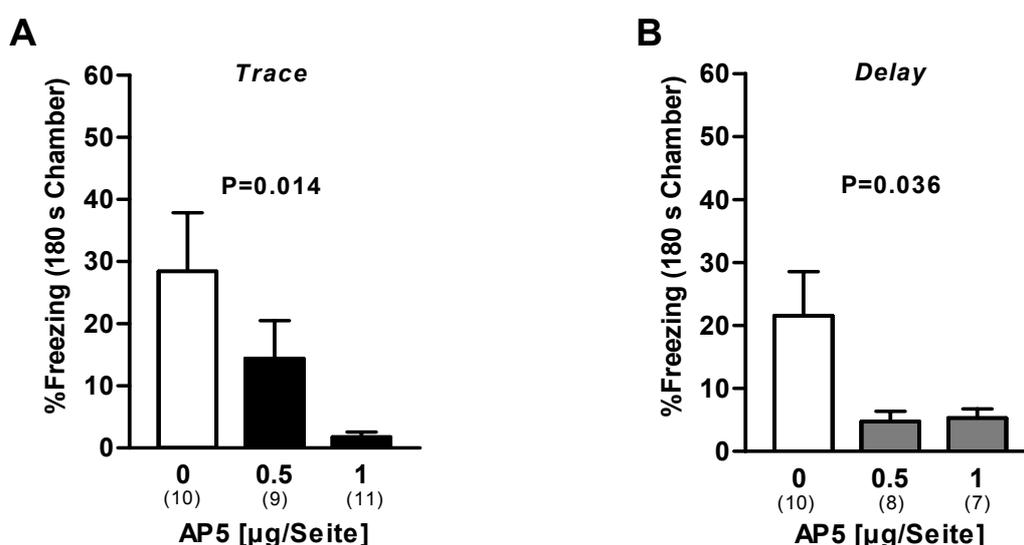


**Abb. 3-8: Stellenwert von konjunktiver Repräsentation (A) und Einzelbestandteilen (B) des Kontexts beim Furchtgedächtnis.** One-way ANOVA mit Newman-Keuls *post hoc* Test zeigte sowohl für die *chamber* ( $F_{2,28}=6.70$ ;  $P=0.0045$ ) als auch für das Gitter ( $F_{2,28}=18.35$ ;  $P<0.001$ ) einen signifikanten Einfluss des verwendeten Protokolls. *Freezing* wurde auf den Beobachtungszeitraum (180 s) normalisiert. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe ist in Klammern angegeben. \*\*  $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ .

*shock* auf das Gitter, einem prägnanten Einzelbestandteil aus der Konditionierungskammer, gesetzt und ihr *freezing*-Verhalten analysiert (Abbildung 3-8B). Dabei zeigten die Tiere nur nach dem konventionellen Protokoll ausgeprägtes *freezing*.

### 3.3.3 Pharmakologische Blockierung der NMDA-Rezeptoren

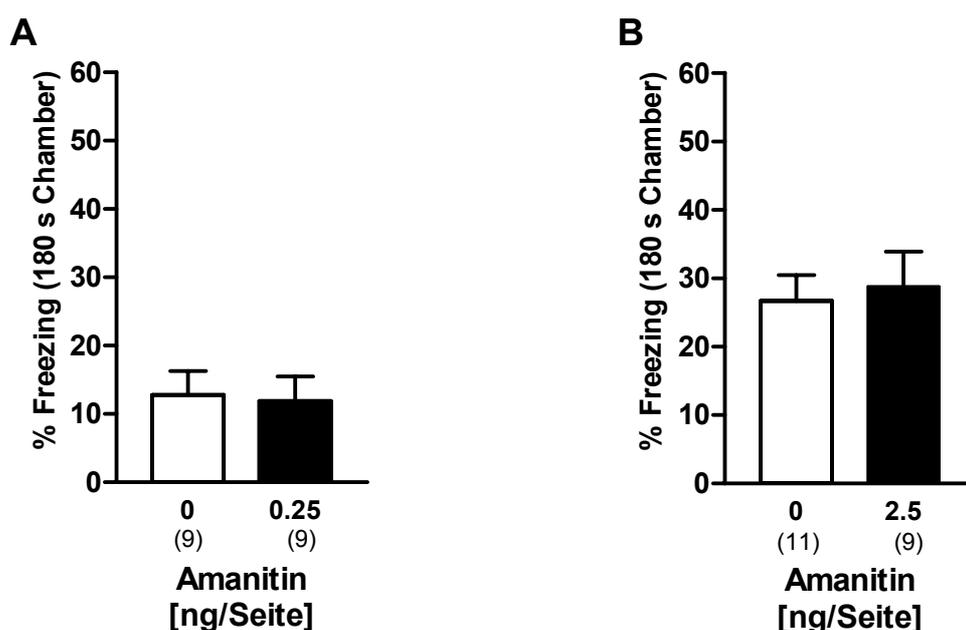
Um die Bedeutung hippocampaler NMDA-Rezeptoren bei der Bildung von kontextuellem Gedächtnis zu untersuchen, wurde der NMDA-Rezeptor-Antagonist AP5 15 min vor dem Lernen in den Hippokampus injiziert. Hierzu wurden die Mäuse (BL/6J) aus dem Experiment 3.2.2 weiter untersucht, denen vor *trace*- (5 s *trace*) bzw. *delay*-Konditionierung bilateral entweder 0, 0.5 oder 1  $\mu\text{g}$  AP5 in einem Volumen von 0.5  $\mu\text{l}$  pro Seite in den Hippokampus injiziert wurde (vgl. Abbildung 3-3). Zum Testen des Kontextgedächtnisses wurden sie einen Tag nach der Konditionierung wieder in den Konditionierungskontext (*chamber*) gesetzt und das *freezing* über einen Zeitraum von 3 min analysiert (Abbildung 3-9). Hierbei zeigte sich sowohl bei *delay*-, als auch bei *trace*-Konditionierung eine AP5-abhängige Reduktion in der *freezing*-Antwort auf den Kontext (*trace*:  $F_{2,28}=5.03$ ,  $P=0.014$ ; *delay*:  $F_{2,24}=3.87$ ,  $P=0.036$ ; jeweils Gesamteffekt aus *one-way* ANOVA).



**Abb. 3-9: Einfluss des NMDA-Rezeptorantagonisten AP5 auf die Bildung von kontextuellem Gedächtnis bei BL/6J.** Sowohl bei *trace*- (A), als auch bei *delay*-Konditionierung (B) ist eine AP5-abhängige Reduktion der *freezing*-Antwort bei Reexposition im Konditionierungskontext festzustellen. *One-way* ANOVA zeigte in beiden Fällen einen signifikanten Gesamteffekt. *Freezing* wurde auf den Beobachtungszeitraum (180 s) normalisiert. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe ist in Klammern angegeben.

### 3.3.4 Hemmung der Transkription

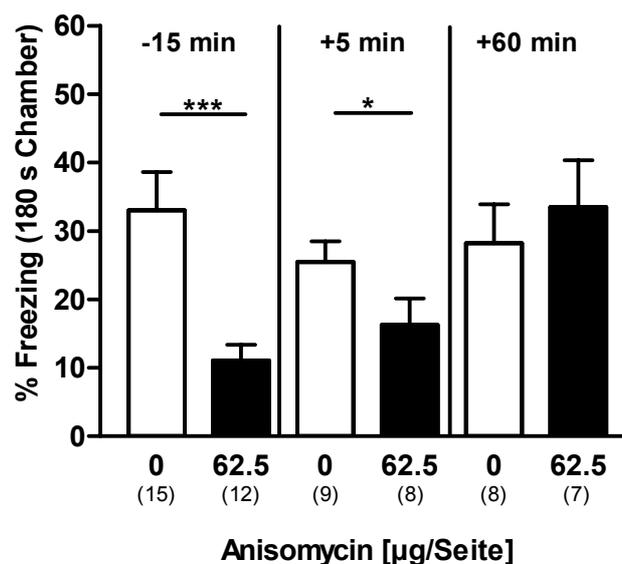
Die Beantwortung der Frage, ob die Transkription für die Ausbildung von kontextuellem Gedächtnis notwendig ist, wurde durch pharmakologische Behandlung mit Amanitin, einem Hemmstoff der Transkription, untersucht. Hierzu wurden die Mäuse (BL/6J) aus 3.2.3, die während der *trace*-Konditionierung auch kontextuelles Gedächtnis ausbildeten, 2 h nach dem Test auf Tongedächtnis in die *chamber* gesetzt, um *freezing* auf den Konditionierungskontext zu untersuchen. Die Mäuse erhielten 15 min vor *trace*-Konditionierung (5 Ton-Schock-Paarungen, 5 s *trace*) eine Injektion von Amanitin mit 0.25 ng/0.5 µl/Seite bzw. 2.5 ng/0.5 µl/Seite bilateral in den dorsalen Hippokampus. Dies wurde in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Es konnte aber bei keiner Dosis eine Reduktion der *freezing*-Antwort auf den Kontext festgestellt werden (jeweils  $P > 0.05$ ; ungepaarter t-Test) (Abbildung 3-10).



**Abb. 3-10: Einfluss des Transkriptionsblockers Amanitin auf das kontextuelle Gedächtnis 24 h nach *trace*-Konditionierung bei BL/6J-Mäusen.** 15 min vor der Konditionierung wurden bilateral *vehicle* (0 ng) oder 0.25 ng Amanitin (**A**) bzw. *vehicle* (0 ng) oder 2.5 ng Amanitin (**B**) in einem Volumen von 0.5 µl pro Seite injiziert. Das kontextuelle Gedächtnis wurde einen Tag nach der Konditionierung im Konditionierungskontext (*chamber*) untersucht (2 h nach dem Test auf das Tongedächtnis). Es zeigte sich kein behandlungsabhängiger Unterschied. (0.25 ng:  $P=0.43$ ; 2.5 ng:  $P=0.37$ ; jeweils ungepaarter t-Test, einseitige Fragestellung). *Freezing* wurde auf den Beobachtungszeitraum (60 s) normalisiert. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe ist in Klammern angegeben.

### 3.3.5 Hemmung der Translation

In diesem Experiment sollte überprüft werden, welche Rolle die Proteinbiosynthese im Hippokampus für die Bildung von kontextuellem Gedächtnis spielt. Dabei sollte auch der Frage nachgegangen werden, über welchen Zeitraum sich die Phase der Proteinbiosynthese erstreckt. Dazu wurde die translationshemmende Substanz Anisomycin (62.5 µg/Seite) oder als Kontrolle *vehicle* (0 µg/Seite) mit einem Volumen von jeweils 0.5 µl über chronisch implantierte Führungskanülen bilateral in die CA1-Region des Hippokampus injiziert. Die Injektion erfolgte entweder 15 min vor bzw. 5 min oder 60 min nach dem Lernereignis und wurde ohne Narkose durchgeführt. Es wurde der Mausstamm BL/6N verwendet. Die Konditionierung erfolgte mit einem Protokoll, bei dem ein Ton mit dem Schock gepaart wurde und der Kontext hierbei im Hintergrund stand (*background*-Konditionierung). Das Gedächtnis wurde 24 h danach getestet, indem das *freezing* der Mäuse über einen Zeitraum von 3 min im Konditionierungskontext gemessen wurde (Abbildung 3-11). Hierbei zeigte sich, dass die Injektion von Anisomycin 15 min vor der Konditionierung das Gedächtnis verminderte ( $t=3.90$ ,  $P=0.0003$ ), ebenso wie die Injektion 5 min nach dem Lernen ( $t=1.92$ ,  $P=0.038$ ). Anisomycingabe 60 min nach der Konditionierung hatte keinen Einfluss auf die Gedächtnisbildung ( $P=0.28$ ; jeweils ungepaarter t-Test, einseitige Fragestellung).

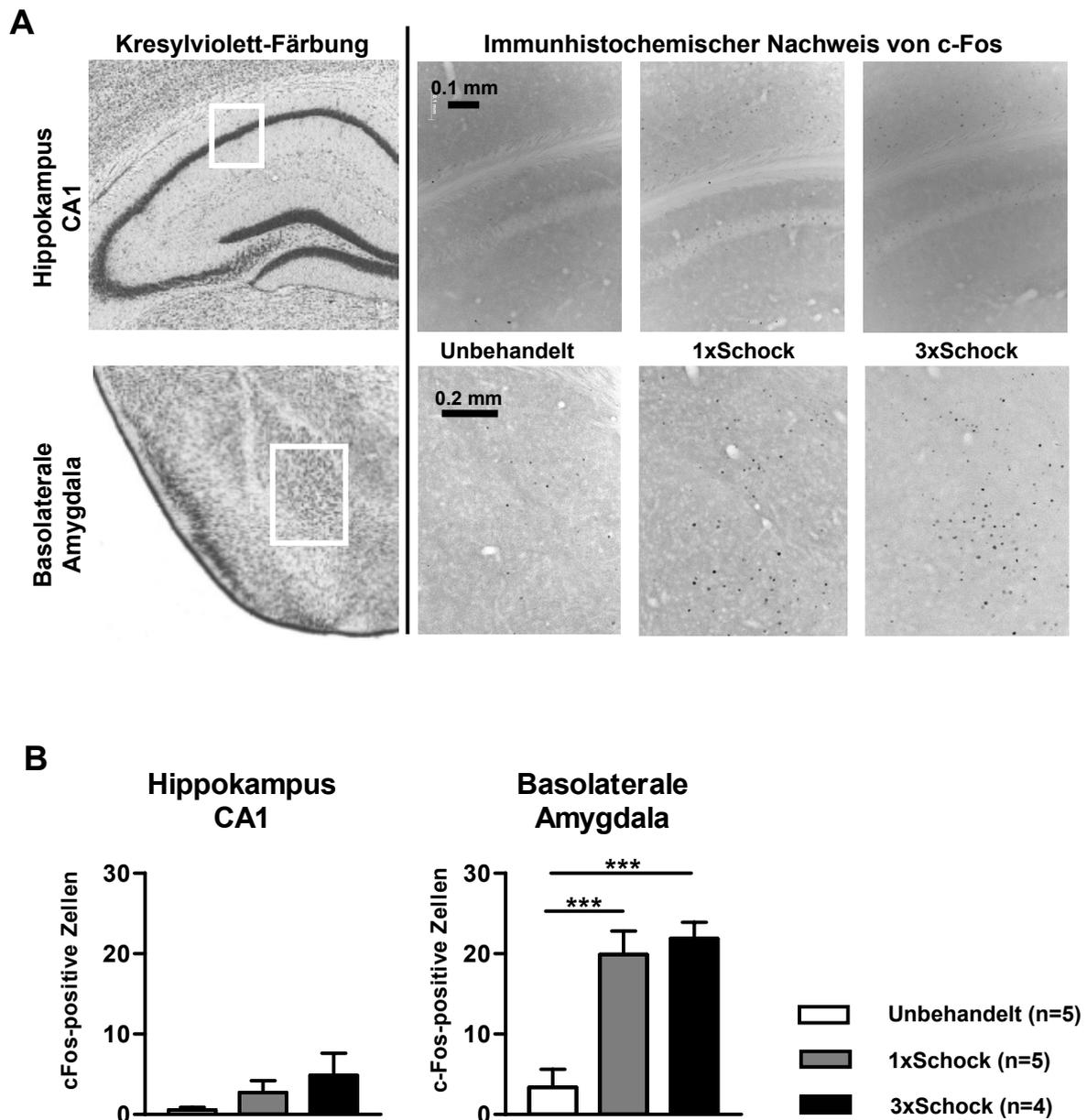


**Abb. 3-11: Einfluss der Translationshemmung durch Anisomycin auf die Konsolidierung von kontextuellem Gedächtnis bei BL/6N.** Intrahippokampale Injektion von Anisomycin zu verschiedenen Zeitpunkten um das Lernereignis (15 min vorher, bzw. 5 oder 60 min danach) zeigte nach 24 h eine signifikante Beeinträchtigung des kontextuellen Gedächtnisses bei -15 min und +5 min; bei +60 min war kein Einfluss mehr feststellbar. *Freezing* wurde auf den Beobachtungszeitraum (180 s) normalisiert. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe ist in Klammern angegeben.

### 3.3.6 Induktion des *Immediate early genes* c-Fos

Die Induktion von *Immediate early genes* (IEGs), insbesondere von c-Fos, gilt als Indikator für neuronale Aktivierung in bestimmten Hirnregionen als Reaktion auf verschiedene pharmakologische und verhaltensrelevante Stimulationen. Um zu untersuchen, wie sich die kontextuelle Konditionierung auf die c-Fos Expression auswirkt, wurden Mäuse (BL/6N) mit ein einem oder drei Schocks kontextuell konditioniert (*foreground*). Die in anderen Experimenten dieser Arbeit verwendete *background*-Konditionierung würde hier mehrere Tonpräsentationen erfordern, was zu nicht vorhersagbaren und interindividuell unterschiedlichen Einflüssen führen könnte, insbesondere für die Vorhersagekraft des Kontexts in Relation zu der des Tons beim Furchtgedächtnis. Die Expression des c-Fos Proteins wurde in der hippocampalen Subregion CA1 und in der basolateralen Amygdala untersucht, da es in der Literatur viele Hinweise für die Beteiligung dieser Regionen gibt. Die Durchführung dieses Experiments erfolgte in der Hellphase (inaktive Phase des zirkadianen Rhythmus einer Maus), da die Tiere unter diesen Bedingungen eine geringere Basalexpression von c-Fos zeigen. Für die Auswertung wurden c-Fos-positive Zellen, die an ihrer bräunlichen-dunklen Färbung zu erkennen waren, unter dem Lichtmikroskop ausgezählt (Abbildung 3-11A).

In CA1 war die Expression bei unbehandelten Tieren, die direkt aus dem Heimkäfig kamen, sehr niedrig (durchschnittlich 0.5 c-Fos-positive Zellen pro Seite auf einem 25 µm Gehirnschnitt). Die Konditionierung mit einem Schock (2.7 Zellen) oder drei Schocks (4.8 Zellen) zeigte keinen Einfluss ( $P=0.24$ ) auf die c-Fos Expression nach 90 min (Abbildung 3-11B). Die basale Expression bei den unbehandelten Tieren war auch in der basolateralen Amygdala sehr gering (durchschnittlich 3.4 c-Fos-positive Zellen). Durch die kontextuelle Konditionierung konnte eine statistisch hochsignifikante Zunahme von c-Fos-positiven Zellen gezeigt werden. Dabei machte es keinen Unterschied, ob ein Schock (19.9 Zellen;  $P<0.001$ ) oder drei Schocks (21.8 Zellen;  $P<0.001$ ) verabreicht wurden ( $F_{2,13}=16.8$ ;  $P=0.0004$ ; jeweils *one-way* ANOVA mit Newman-Keuls *post hoc* Test).



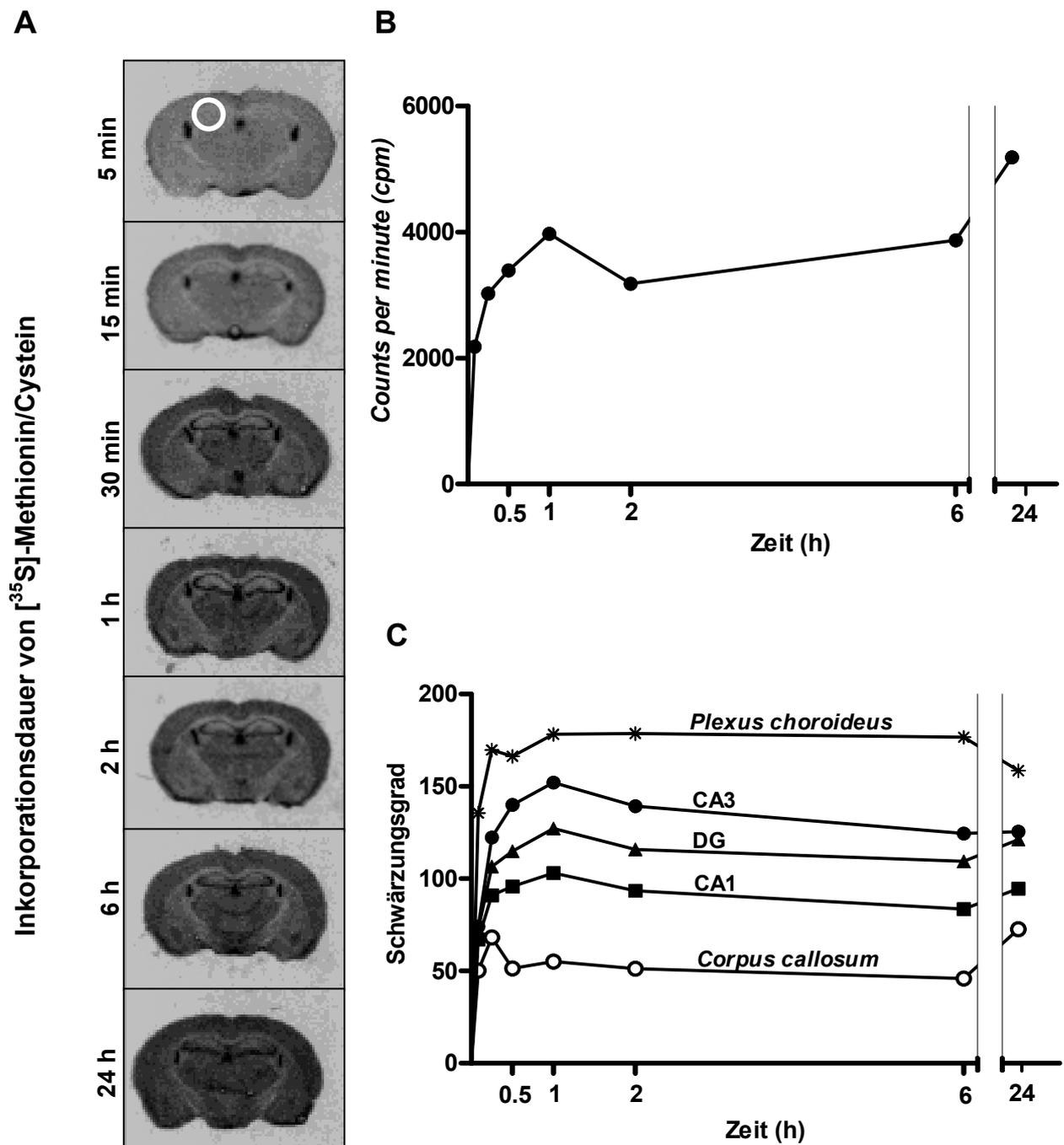
**Abb. 3-11: Immunhistochemische Untersuchung zur Induktion des *Immediate early genes* c-Fos in CA1 und basolateraler Amygdala 90 min nach kontextueller Konditionierung mit einem oder drei Schocks bei BL/6N-Mäusen. (A) Beispiele von immunhistochemisch gefärbten Schnitten, die c-Fos-positive Reaktion zeigten. Die Gehirnschnitte nach Färbung mit Kresylviolett geben die genaue Lokalisation der ausgewerteten Regionen an (aus Paxinos & Franklin, 2001). (B) In CA1 war die c-Fos Expression insgesamt sehr niedrig und es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede. Jedoch lässt sich in der basolateralen Amygdala ein deutlicher Einfluss durch die Konditionierung erkennen ( $P=0.0004$ , jeweils *one-way* ANOVA mit Newman-Keuls *post hoc* Test). Für jede Region wurden c-Fos-positive Zellen auf einem Schnitt (25 µm) gezählt. Die Anzahl der Tiere (n) pro Gruppe ist in Klammern angegeben. \*\*\* $P<0.001$**

### 3.4 Autoradiographische Visualisierung von lerninduzierter Proteinbiosynthese

Dadurch, dass sich Proteine durch den Einbau radioaktiver Aminosäuren markieren lassen, wäre es möglich, diejenigen Proteine, die ab dem Zeitpunkt der Verfügbarkeit radioaktiver Aminosäuren synthetisiert werden, getrennt von bereits vorhandenen Proteinen zu erfassen. Unter dieser Annahme sollte versucht werden, lernrelevante Prozesse der Proteinbiosynthese autoradiographisch darzustellen und quantitativ auszuwerten. Dies beinhaltete zunächst Voruntersuchungen zur Anreicherung radioaktiver Aminosäuren im Gehirn nach systemischer Verabreichung. Es war dann zu zeigen, dass die gemessene Radioaktivität tatsächlich auch mit Translationsereignissen verbunden ist. Schließlich sollte untersucht werden, ob kontextuelle Konditionierung in quantitativer Hinsicht auf die Translation in ausgewählten Hirnregionen einen Einfluss ausübt.

#### 3.4.1 Verteilungskinetik von [<sup>35</sup>S]-Met/Cys nach systemischer Gabe

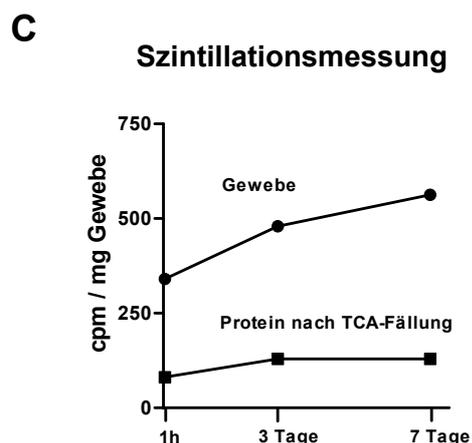
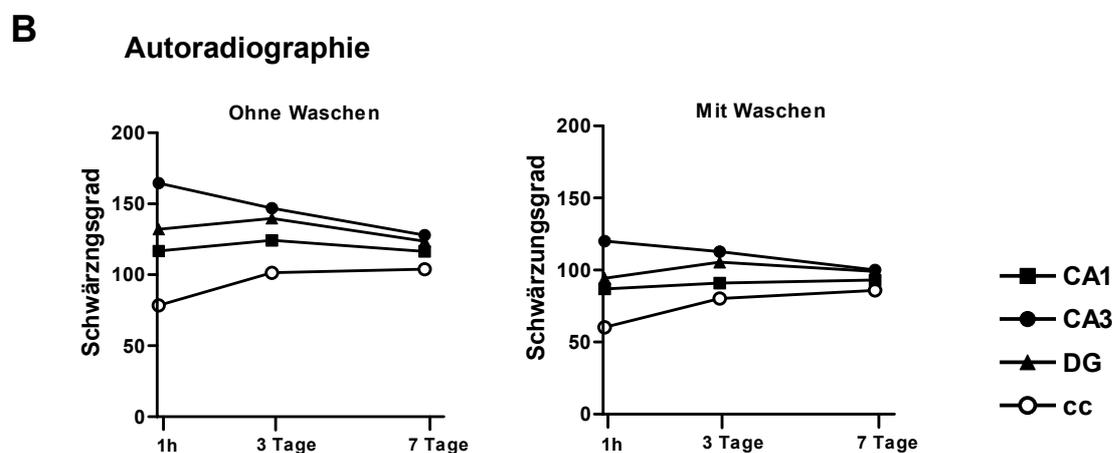
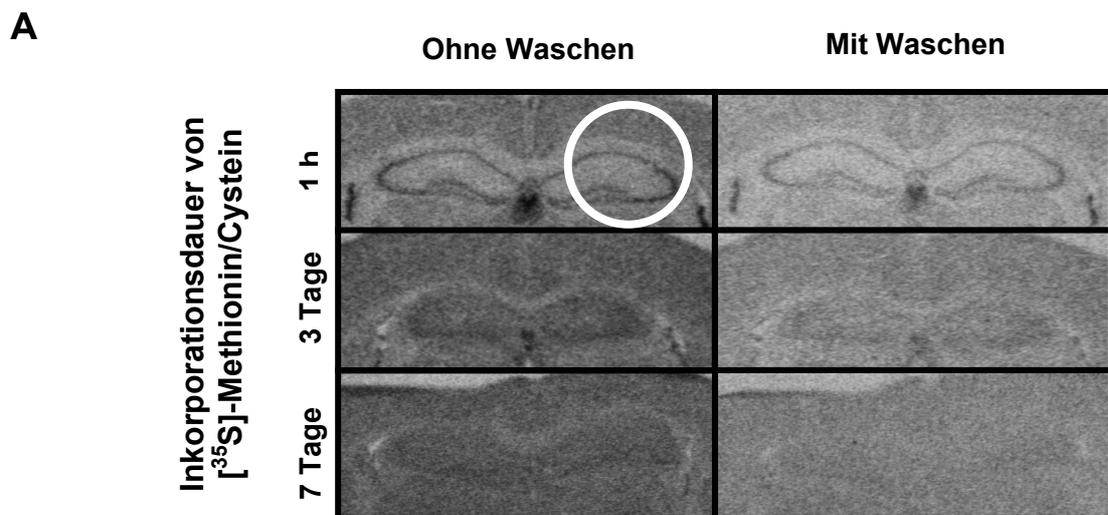
Für die Messung der Anreicherung radioaktiver Aminosäuren im Gehirn nach systemischer Gabe wurden CD1-Mäuse verwendet. Diese erhielten eine intra-peritoneale (i.p.) Injektion mit einem Gemisch der radioaktiven Aminosäuren [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein (Met/Cys) in einer Dosis von 2.8 µCi/g Körpergewicht. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Injektion (5 min bis 24 h) wurden die Gehirne entnommen und auf den Gehalt an Radioaktivität hin untersucht. Bei der Untersuchung von gestanztem Hirngewebe (3 mm<sup>3</sup>) mit Szintillationsmessung zeigte sich eine rasche Anreicherung der Radioaktivität, die nach etwa 60 min einen Sättigungswert erreichte (Abbildung 3-12B). Parallel dazu wurden von den entnommenen Gehirnen koronale Gefrierschnitte (18 µm) angefertigt. Diese wurden einem Röntgenfilm exponiert und die durch die Radioaktivität bedingte Schwärzung densitometrisch quantifiziert. Dabei wurden sowohl die hippokampalen Subregionen CA1, CA3 und DG untersucht, als auch als Kontrollregionen mit maximalem bzw. minimalem Einbau der *Plexus choroideus* (dorsaler Teil des 3. Ventrikels) bzw. das *Corpus callosum*. Alle Regionen zeigten einen ähnlichen Verlauf in der Einbaurate, jedoch mit unterschiedlichem Sättigungsniveau (Abbildung 3-12A,C).



**Abb. 3-12: Verteilung der radioaktiven Aminosäuren [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein nach systemischer Administration.** CD1-Mäusen wurde ein Gemisch der radioaktiven Aminosäuren [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein i.p. verabreicht. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Injektion (5 min bis 24 h) wurde in den Gehirnen der Gehalt an Radioaktivität untersucht. **(A)** Beispiel-Autoradiogramme von koronalen Gefrierschnitten im Bereich des dorsalen Hippokampus. **(B)** Aus dem in (A) markierten Bereich wurde Hirngewebe gestanzt (3 mm<sup>3</sup>) und die darin enthaltene Radioaktivität durch Szintillationsmessung quantifiziert. Dabei zeigte sich eine starke Zunahme der Radioaktivität innerhalb von 60 min. **(C)** Bei der densitometrischen Analyse der hippocampalen Subregionen aus den Autoradiogrammen der Gehirnschnitte ergab sich ein ähnlich steiler Anstieg der Radioaktivität, wobei die Subregionen auf unterschiedlichem Niveau eine Sättigung zeigten. Als Regionen mit maximaler bzw. minimaler Einbauraten wurden der *Plexus choroideus* (aus dem dorsalen Teil des 3. Ventrikels) und das *Corpus callosum* gemessen. Die aufgetragenen Messwerte in (B) und (C) stellen Mittelwerte dar (n=2-3 Tiere pro Zeitpunkt).

### 3.4.2 Langzeitentwicklung der Inkorporation von [<sup>35</sup>S]-Met/Cys

Daraus, wie sich radioaktive Aminosäuren über einen längeren Beobachtungszeitraum hin in zellulär verschiedenartigen Hirnarealen verteilen, lassen sich Hinweise über die metabolischen Prozesse ableiten, denen die Aminosäuren unterliegen und die bei ihrer experimentellen Untersuchung mit erfasst werden. Hierzu wurden BL/6J Mäuse mit [<sup>35</sup>S]-Met/Cys (2.6 µCi/g Körpergewicht) i.p. injiziert und die Gehirne zu unterschiedlichen Zeitpunkten danach (1 h, 3 Tage und 7 Tage) untersucht.



**Abb. 3-13: Langzeitentwicklung der Inkorporation von [<sup>35</sup>S]-Met/Cys.** (A) Beispiel-Autoradiogramme von Gefrierschnitten (18µm) der hippocampalen Region. (B) Autoradiographische Auswertung der unbehandelten bzw. gewaschenen Schnitte. Neben *Corpus callosum* (cc) als axonreiche Hirnregion wurden die hippocampalen Subregionen CA1, CA3 und DG ausgewertet. (C) Szintillationsmessung von Gewebe und Gewebe nach TCA-Fällung, das aus dem in (A) markierten Bereich gestanzt wurde (n=2-3 Tiere pro Zeitpunkt).

Auf den Autoradiogrammen der Hirnschnitte lässt sich mit zunehmender Inkorporationsdauer eine diffusere Verteilung der von [<sup>35</sup>S]-Met/Cys stammenden radioaktiven Signale erkennen (Abbildung 3-13A). Die densitometrische Auswertung zeigte, dass die Radioaktivität beim Vergleich von zellsomareichen Arealen (CA1, CA3 und DG) und einer axonreichen Region (cc) nach 7 Tagen auf einem Niveau einpendeln (Abbildung 3-13B). Dabei machte es keinen Unterschied, ob die Schnitte einer Waschprozedur unterzogen wurden, um evtl. freie Aminosäuren zu entfernen. Ein Vergleich der absoluten Werte (ohne Waschen *versus* mit Waschen) ist aufgrund des zeitlichen Aufeinanderfolgens der Autoradiographie nicht möglich. Die Szintillationsmessung von gestanztem Gewebe zeigte noch bis 7 Tage nach Injektion eine Zunahme an radioaktiven Aminosäuren. Die Messung der mit TCA-Fällung aus dem Gewebe isolierten Proteine zeigte ab dem dritten Tag nach der Injektion ein konstantes Niveau im Gehalt an Radioaktivität (Abbildung 3-13C).

### **3.4.3 Einbau von [<sup>35</sup>S]-Met/Cys bei systemischer Translationshemmung**

Mäusen (BL/6J) wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der systemischen (i.p.) Anisomycininjektion (0.5 bis 6 h) ein Gemisch der radioaktiven Aminosäuren [<sup>35</sup>S]-Met/Cys (2.5 µCi/g Körpergewicht) i.p. verabreicht. Eine Stunde danach wurden die Gehirne auf den Gehalt an Radioaktivität hin untersucht (Abbildung 3-14A).

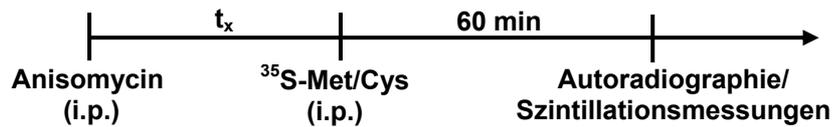
Die Kontrollgruppe erhielt nur die Injektion der Radioaktivität. Dabei wurden sowohl von unbehandelten Hirnschnitten (ohne Waschen), als auch von gewaschenen Hirnschnitten (Wasser/Ethanol) Autoradiogramme erstellt (Abbildung 3-14B) und densitometrisch ausgewertet (Abbildung 3-14C).

Auf den ungewaschenen Schnitten zeigte das *Corpus callosum* 0.5 h nach Anisomycingabe eine leichte Erhöhung des [<sup>35</sup>S]-Met/Cys-Gehalts (117%, verglichen zur Kontrollgruppe mit 100%). Auf den Autoradiogrammen der gewaschenen Schnitte sank die [<sup>35</sup>S]-Met/Cys Anreicherung auf 33% des Kontrollniveaus ab. 6 h nach Anisomycininjektion reicherte sich [<sup>35</sup>S]-Met/Cys mit oder ohne Waschen wieder wie bei der Kontrollgruppe an.

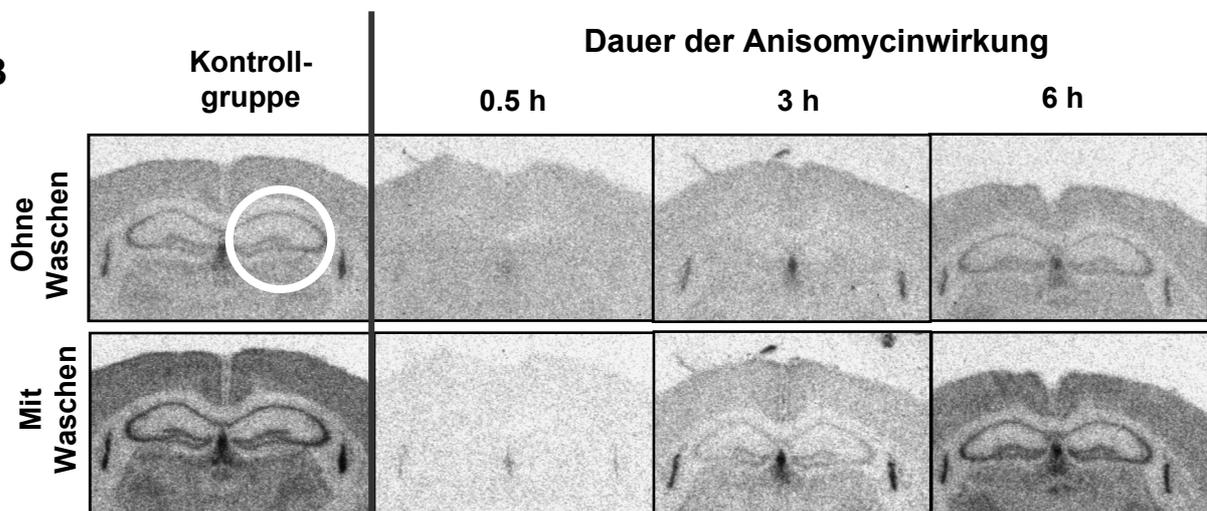
Die Szintillationsmessung von Gewebe zeigte 0.5 h nach Anisomycingabe ebenso eine Erhöhung des Gehalts an Radioaktivität (129% verglichen mit der Kontrollgruppe). Bis zum Ende des Beobachtungszeitraums von 6 h nach Anisomycin-

injektion blieb der Gehalt an [ $^{35}\text{S}$ ]-Met/Cys mit 85% etwas unterhalb des Kontrollniveaus. Die Proteine aus dem Gewebe nach TCA-Fällung zeigten 0.5 h nach Anisomycingabe einen stark verminderten Einbau von [ $^{35}\text{S}$ ]-Met/Cys (15% des Kontrollniveaus), der nach 6 h wieder den Ausgangswert erreichte.

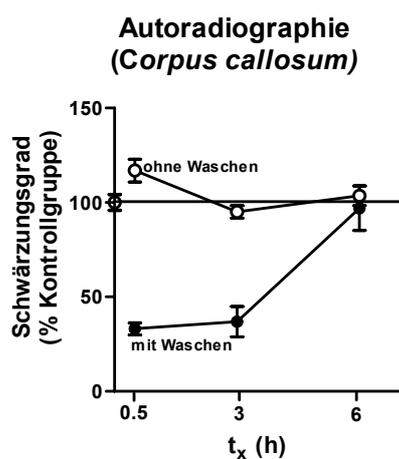
A



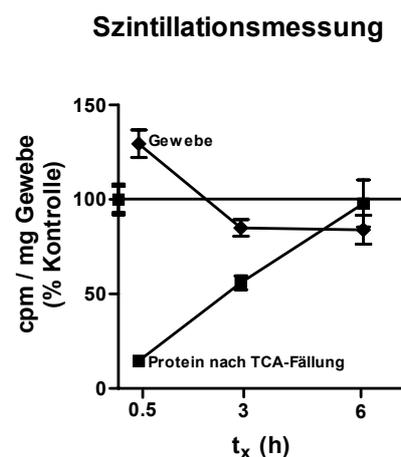
B



C



D

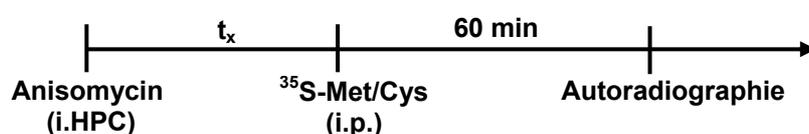


**Abb. 3-14: Anisomycin wirkt nach i.p.-Injektion hemmend auf den Einbau von [ $^{35}\text{S}$ ]-Methionin/Cystein in Protein. (A) Experimentelle Durchführung (B) Beispiel-Autoradiogramme (C) Autoradiographische Auswertung von *Corpus callosum* als Kontrollregion (D) Szintillationsmessung von Gewebe und Protein aus Gewebe nach TCA-Fällung, das aus dem in (B) markierten Bereich gestanzt wurde (n=6 Tiere pro Zeitpunkt).**

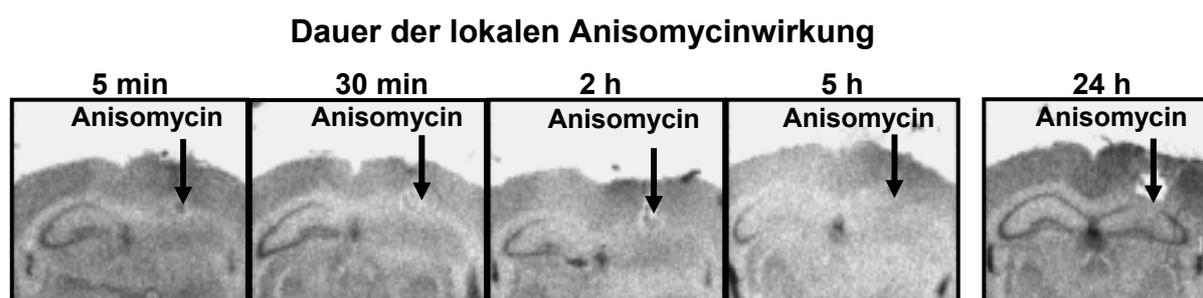
### 3.4.4 Anisomycinwirkung bei intrahippokampaler Injektion

Ein weiterer Aspekt, der beleuchtet werden sollte, ist die Wirkungsdauer von Anisomycin bei lokaler Injektion, wie sie in vorangegangenen Experimenten zum Einsatz kam. Dazu wurde, in Anlehnung an die pharmakologischen Verhaltensexperimente, Anisomycin unilateral in den Hippokampus von BL/6N-Mäusen über chronisch implantierte Führungskanülen injiziert (62.5 µg/0.5 µl/Seite). Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Anisomycingabe (5 min, 30 min, 2 h, 5 h, 24 h) wurde den Tieren [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein (2.0 µCi/g Körpergewicht) verabreicht, und eine Stunde danach wurden die Gehirne entnommen. Die von diesen angefertigten Gefrierschnitte wurden autoradiographisch untersucht (Abbildung 3-15). Schon bei einem Zeitraum von 5 min zwischen Anisomycin- und [<sup>35</sup>S]-Injektion war die translationshemmende Wirkung daran zu erkennen, dass um die Injektionsstelle in der Pyramidalzellschicht des Hippokampus die Anreicherung an Radioaktivität viel schwächer war als auf der kontralateralen Seite, die keine Injektion erhielt.

**A**



**B**



**Abb. 3-15: Einbau der radioaktiven Aminosäuren [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein nach systemischer Administration unter dem Einfluss von unilateraler Anisomycininjektion in den Hippokampus. (A)** Experimentelle Durchführung: BL/6N-Mäusen wurde ein Gemisch der radioaktiven Aminosäuren [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein i.p. verabreicht. Unter dem Einfluss von Anisomycin, das zuvor unilateral in den Hippokampus injiziert wurde und unterschiedlich lange ( $t_x=5$  min bis 24 h) auf das Injektionsareal einwirken konnte, wurde die Anreicherung der Radioaktivität auf Gefrierschnitten untersucht. **(B)** Beispiel-Autoradiogramme der Gehirnschnitte zeigten bereits nach 5 min die translationshemmende Wirkung von Anisomycin, die durch fehlenden Einbau radioaktiver Aminosäuren in die Pyramidalzellen um das Injektionsareal charakterisiert ist. Nach 24 h ist die Wirkung von Anisomycin nicht mehr erkennbar (n=2-4 Tiere pro Zeitpunkt).

Diese Wirkung hielt über den beobachteten Zeitraum von 5 h an. Teilweise erfolgte die Diffusion von Anisomycin auch in den Hippokampus auf der nicht injizierten Seite. Die translationshemmende Wirkung war 24 h nach Anisomycininjektion nicht mehr sichtbar.

### **3.4.5 Funktionelle Neuroanatomie durch [<sup>35</sup>S]-Met/Cys-Markierung**

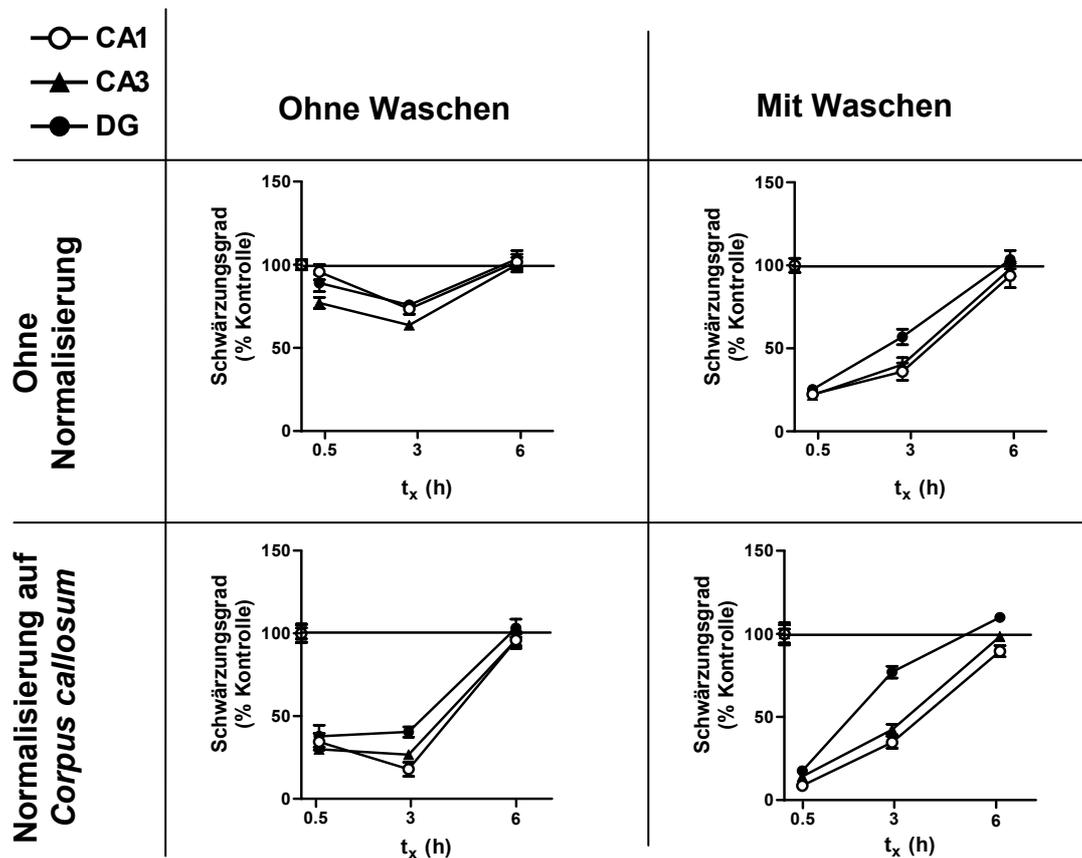
Im Hinblick darauf, über den Einbau von [<sup>35</sup>S]-Met/Cys Aussagen bezüglich funktioneller anatomischer Aspekte treffen zu können, die die tatsächliche Proteinbiosynthese widerspiegeln, sind geeignete Bedingungen zu finden, die insbesondere die Einflüsse der freien Aminosäuren auf die Messungen reduzieren. Von den bereits im Abschnitt 3.4.3 verwendeten Hirnschnitten wurden für diese Fragestellung diejenigen hippocampalen Subregionen ausgewertet (vgl. Abbildung 3-14B), die für die Untersuchung hippocampusabhängiger Gedächtnisprozesse von Interesse sind. Hierzu wurde untersucht, ob das Waschen der Hirnschnitte einen Einfluss auf die autoradiographische Schwärzung hat. Bei der Auswertung ohne Normalisierung wurde deutlich, dass durch das Waschen der Schwärzungsgrad bei 0.5 h und 3 h nach Anisomycininjektion stark vermindert wurde (Abbildung 3-16).

Das Waschen der Schnitte hatte keinen Einfluss auf den Schwärzungsgrad bei [<sup>35</sup>S]-Met/Cys-Injektion 6 h nach Anisomycingabe. Alle Subregionen des Hippokampus erreichten hier wieder das Schwärzungsniveau der Kontrollgruppe.

Die Normalisierung an *Corpus callosum* soll insbesondere technisch bedingte Schwankungen der Schnittdicke und Unterschiede bei der Injektion ausgleichen. Bei der Gruppe ohne Waschen zeigte sich 6 h nach Anisomycin kein Einfluss durch das Normalisieren, da alle Subregionen wieder das Kontrollniveau erreichten. Bei 0.5 h und 3 h vermindert die Normalisierung die gemessenen Schwärzungsgrad auf ähnliche Art und Weise, wie es durch das Waschen der Schnitte erzielt wurde.

Um die [<sup>35</sup>S]-Met/Cys-Markierung für quantitative Aspekte der Translationsaktivität heranzuziehen ist das Waschen der Schnitte nicht erforderlich, da hierbei keine Anreicherung freier Aminosäuren stattfindet, wie sie durch die mit Anisomycin einhergehende starke Verminderung der Proteinbiosyntheseaktivität verursacht wird. Obwohl aus diesem Experiment keine Notwendigkeit für die Normalisierung an *Corpus callosum* deutlich wurde, wird sie für folgende Experimente angewendet, da technisch

bedingte Schwankungen der Schnittdicke und der [ $^{35}$ S]-Met/Cys-Markierung auftreten könnten.



**Abb. 3-16:** Vergleich der densitometrischen Auswertung von hippokampalen Subregionen CA1, CA3 und DG nach Anisomycingabe (vgl. Abb. 3-14B) bei unterschiedlicher Prozessierung. Auswirkungen von der Behandlung der Hirnschnitte (mit Waschen versus ohne Waschen) und Normalisierung der Werte auf *Corpus callosum* (n=6 Tiere pro Zeitpunkt).

### 3.4.6 Einfluss von kontextueller Konditionierung auf die Translation

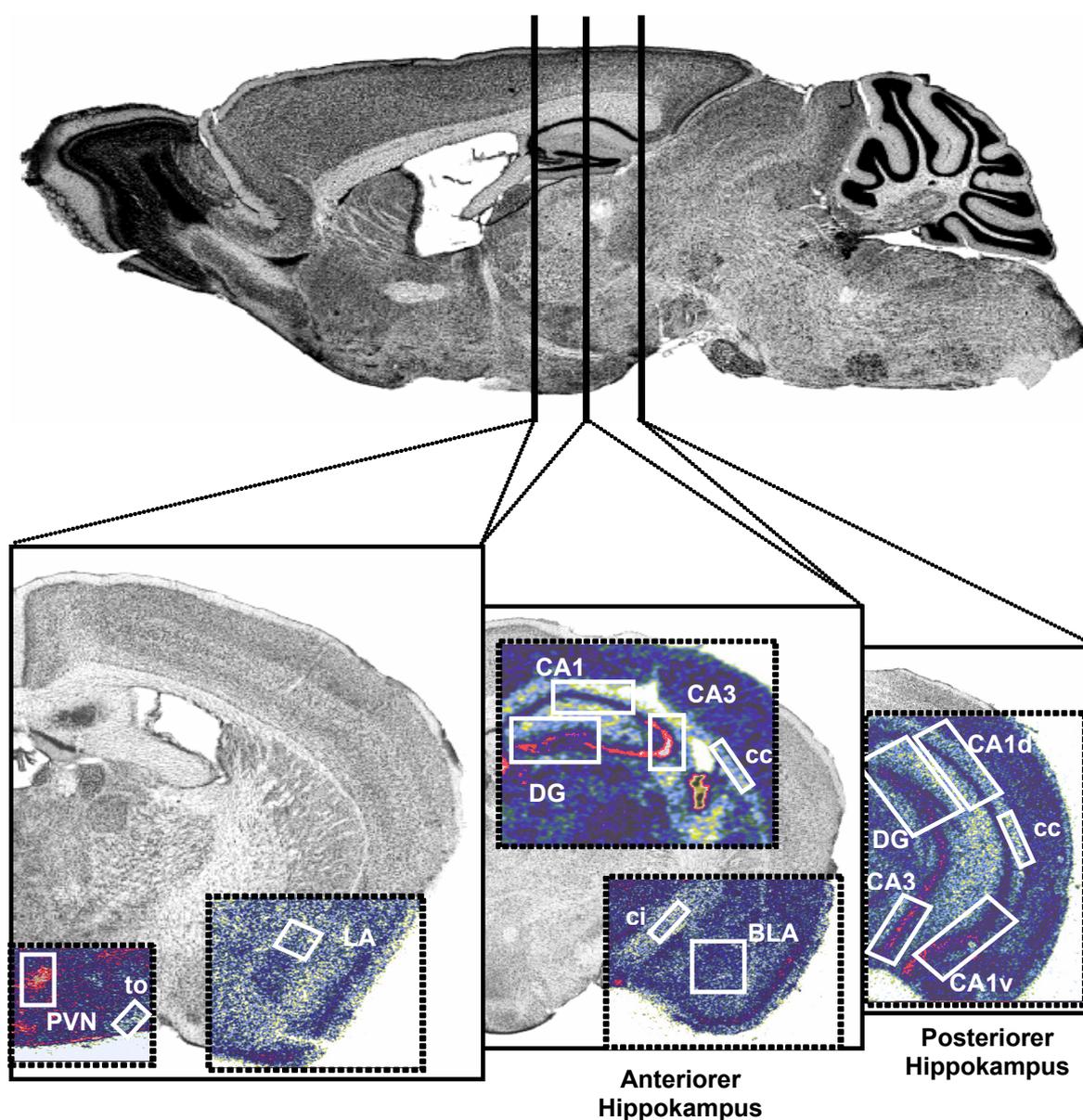
In vorangegangenen Experimenten konnte die Proteinbiosyntheseabhängigkeit für die kontextuelle Konditionierung nachgewiesen werden. Dieser Befund sollte nun durch Quantifizieren der durch das Lernen neu gebildeten Proteine erweitert werden. Neben dem bisher behandelten dorsalen Hippokampus mit den anterioren Subregionen CA1, CA3 und DG sollten auch andere wichtige Hirnstrukturen in die Untersuchung mit einbezogen werden, die in Zusammenhang mit der Ausbildung von kontextuellem

Furchtgedächtnis stehen könnten. Dazu gehören die posterioren hippocampalen Subregionen CA1d (CA1 dorsal), CA1v (CA1 ventral), CA3 und DG. Daneben wurden auch der *Nucleus paraventricularis* (PVN) und Teile der Amygdala untersucht (lateraler bzw. basolateraler Kern, LA bzw. BLA). Zur Quantifizierung der Proteinbiosynthese wurde der Einbau der Aminosäuren [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein, die den BL/6N-Mäusen mit einer Dosis von 2.0 µCi /g Körpergewicht 15 min vor der Konditionierung i.p. injiziert wurden, in die jeweilige Region gemessen (Abbildung 3-17).



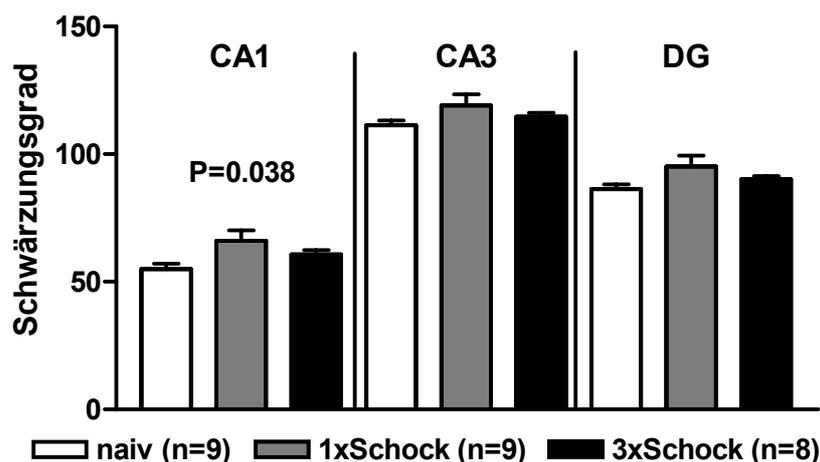
**Abb. 3-17: Experimentelle Durchführung der funktionellen Untersuchungen zur Proteinbiosyntheseaktivität nach kontextueller Konditionierung:** BL/6N-Mäusen wurde 15 min vor der kontextuellen Konditionierung ein Gemisch der radioaktiven Aminosäuren [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein i.p. verabreicht. Zur Konditionierung (*foreground*) wurden entweder ein oder drei Schocks verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt nur die Injektion der Radioaktivität. (Anzahl der Tiere n=9 pro Gruppe).

Neben der Konditionierung, bei der den Mäusen ein einziger Schock verabreicht wird, wurde auch ein stärkeres Protokoll mit drei Schocks verwendet, was zu einer stärkeren *freezing*-Antwort auf den Kontext führt (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der höheren Anzahl an Fußschocks wurde die kontextuelle *foreground*-Konditionierung durchgeführt, um zu vermeiden, dass durch wiederholte Tongabe, wie sie bei *background*-Konditionierung erforderlich wäre, die Vorhersagekraft des Kontexts im Verhältnis zu der des Tons schwächer wird. Als Kontrolle wurde eine Gruppe von Tieren mitgeführt, die nur die Injektion der Radioaktivität bekamen (*naiv*). In allen Gruppen wurden die Gehirne 120 min nach Injektion der Radioaktivität entnommen, von diesen koronale Gefrierschnitte angefertigt und deren Autoradiogramme densitometrisch ausgewertet (Abbildung 3-18). Die Messwerte für den anterioren und posterioren Hippokampus wurden auf das *Corpus callosum* normalisiert. Für PVN und Amygdala erfolgte die Normalisierung auf *Tractus opticus* bzw. *Capsula interna*. Um die Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der c-Fos Immunhistochemie (3.3.6) zu gewährleisten, wurde das Experiment in der Hellphase (d.h. in der Ruhephase der Tiere) durchgeführt.



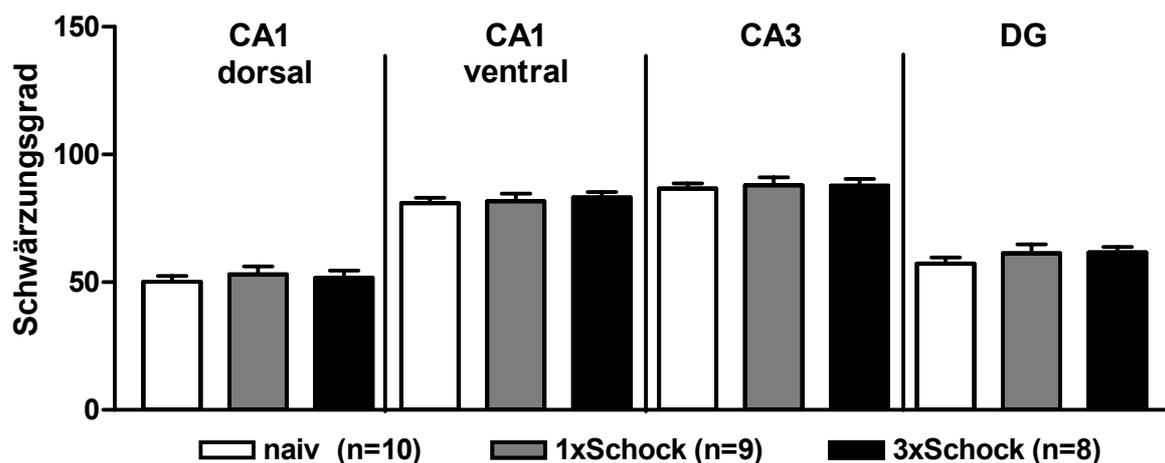
**Abb. 3-18:** Hirnregionen, die zur Untersuchung des Einbaus der radioaktiven Aminosäuren [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein nach kontextueller Furchtkonditionierung ausgewählt wurden. Gehirnschnitte nach Kresylviolett-Färbung (Paxinos & Franklin, 2001) wurden mit Beispiel-Autoradiogrammen überlagert. Abkürzungen: BLA (basolaterale Amygdala), CA1d (CA1 dorsaler Teil), CA1v (CA1 ventraler Teil), cc (*Corpus callosum*), ci (*Capsula interna*), DG (*Gyrus dentatus*), LA (laterale Amygdala), PVN (*Nucleus paraventricularis*), to (*Tractus opticus*).

Die Auswertung des anterioren Hippokampus ergab eine signifikante Erhöhung des Einbaus an [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein nach Furchtkonditionierung für die Subregion CA1 ( $F_{2,25}=3.8$ ,  $P=0.038$ ). Eine nicht signifikante Tendenz zur Erhöhung war in CA3 ( $P=0.20$ ) und DG ( $P=0.10$ ; jeweils Gesamteffekt aus *one-way ANOVA*) erkennbar (Abbildung 3-19).



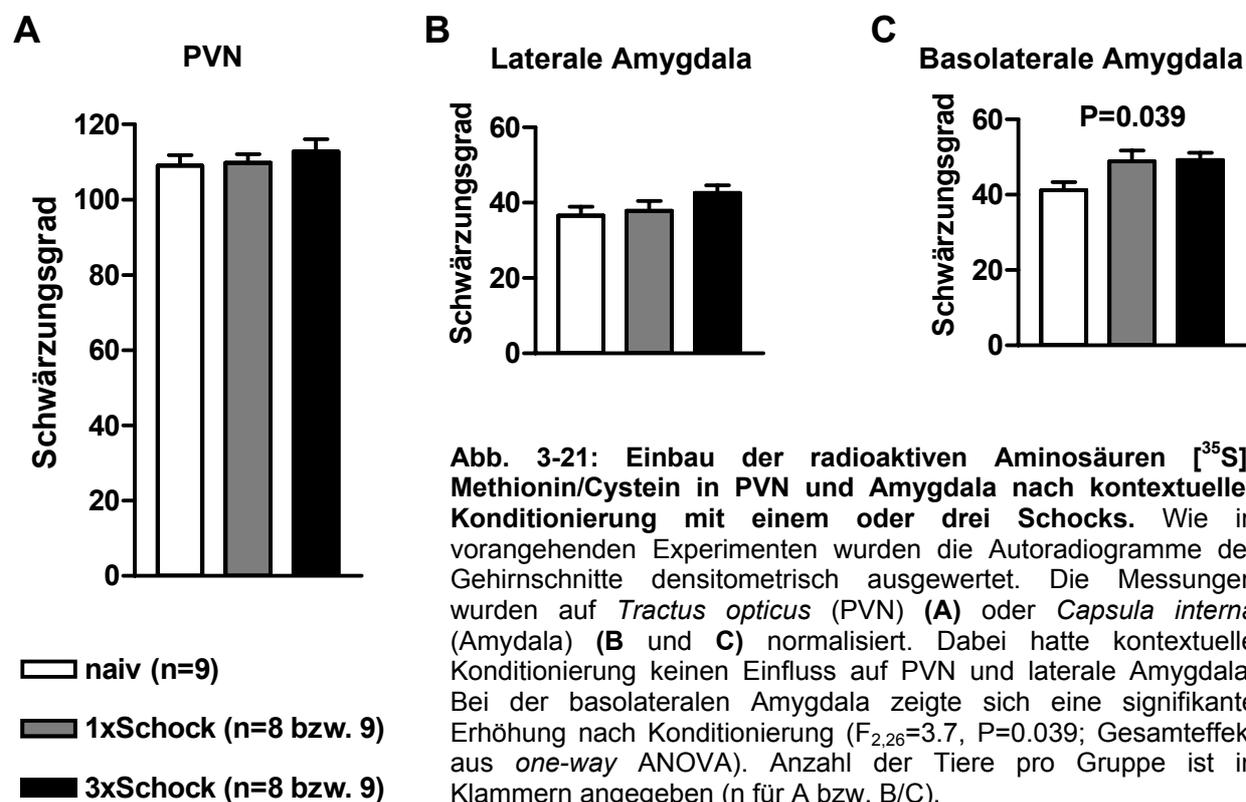
**Abb. 3-19: Einbau der radioaktiven Aminosäuren [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein in den anterioren Hippokampus nach kontextueller Konditionierung mit einem oder drei Schocks.** BL/6N-Mäusen wurde ein Gemisch der radioaktiven Aminosäuren [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein i.p. verabreicht. Nach 15 min wurden sie kontextuell konditioniert. Von den entnommenen Gehirnen (120 min nach [<sup>35</sup>S]-Injektion; vgl. Abb. 3-17) wurden von diesen Gefrierschnitte angefertigt und deren Autoradiogramme densitometrisch ausgewertet. Die Messungen wurden auf das *Corpus callosum* normalisiert. Dabei zeigte sich nur in der CA1 Region eine signifikante Erhöhung des [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein-Einbaus ( $F_{2,25}=3.8$ ,  $P=0.038$ ; Gesamteffekt aus *one-way* ANOVA) verglichen mit naiven Tieren, die nur die Injektion bekamen (naiv). Die Anzahl der Tiere n pro Gruppe ist in Klammern angegeben.

Desweiteren wurde der posteriore Hippokampus analysiert. Hier hatte die kontextuelle Konditionierung keinen Einfluss auf den Einbau der radioaktiven Aminosäuren (Abbildung 3-20).



**Abb. 3-20: Einbau der radioaktiven Aminosäuren [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein in den posterioren Hippokampus nach kontextueller Konditionierung mit einem oder drei Schocks.** BL/6N-Mäusen wurde ein Gemisch der radioaktiven Aminosäuren [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein i.p. verabreicht. 15 min später wurden sie kontextuell konditioniert oder blieben unbehandelt (naiv). Nach Gehirnentnahme (120 min nach [<sup>35</sup>S]-Injektion; vgl. Abb. 3-17) wurden von diesen Gefrierschnitte angefertigt und deren Autoradiogramme densitometrisch ausgewertet. Die Messungen wurden auf das *Corpus callosum* normalisiert. Dabei zeigte sich in keiner der untersuchten Subregionen ein Einfluss der kontextuellen Konditionierung. Die Anzahl der Tiere n pro Gruppe ist in Klammern angegeben.

Bei PVN ( $P=0.62$ ) und lateraler Amygdala ( $P=0.18$ ) war ebenfalls kein Einfluss durch kontextuelle Konditionierung zu erkennen. Die basolaterale Amygdala dagegen zeigte eine signifikante Erhöhung des Einbaus an [ $^{35}\text{S}$ ]-Methionin/Cystein ( $F_{2,26}=3.7$ ,  $P=0.039$ ; jeweils Gesamteffekt aus *one-way* ANOVA) nach Konditionierung (Abbildung 3-21).



### 3.4.7 Einfluss der Konditionierung auf die Synchronität der Translation

Hintergrund für diese Fragestellung ist die Tatsache, dass mehrere Hirnareale gleichzeitig für die Verarbeitung von bestimmten Aufgaben miteinbezogen sind. Es sollte untersucht werden, ob die kontextuelle Furchtkonditionierung dazu führt, dass bei der Betrachtung zweier Hirnregionen diese simultan mit gesteigerter oder auch mit verminderter Translationsaktivität reagieren. Dazu wurden die Einbauraten in die jeweiligen betrachteten Hirnregionen aller Tiere einer Behandlungsgruppe (naiv, 1xSchock und 3xSchock) durch Korrelationen zwischen den Regionen in Beziehung gesetzt. Eine Synchronität dieser Art gäbe Hinweise auf die Beteiligung der entsprechenden Hirnregionen an dem angewendeten Verhaltenstest. Tabelle 3-1 gibt die Wechselbeziehungen zwischen den untersuchten Regionen an (vgl. Abbildung 3-18).

**A**

<i>naiv</i>	PVN	BLA	aHPC, CA1	aHPC, CA3	aHPC, DG	pHPC, Ca1d	pHPC, CA1v	pHPC, CA3	pHPC, DG
PVN									
BLA	0.10								
aHPC, CA1	0.15	0.22							
aHPC, CA3	0.38	0.04	<b>0.72</b>						
aHPC, DG	0.39	0.11	<b>0.61</b>	<b>0.54</b>					
pHPC, Ca1d	0.00	0.16	0.09	0.00	0.03				
pHPC, CA1v	0.00	0.09	0.00	0.03	0.07	0.25			
pHPC, CA3	0.01	0.00	0.00	0.00	0.14	0.34	<b>0.41</b>		
pHPC, DG	0.02	0.13	0.01	0.09	0.24	<b>0.79</b>	0.35	0.35	
LA	0.40	0.32	0.18	0.28	0.13	0.00	0.00	0.04	0.00

**B**

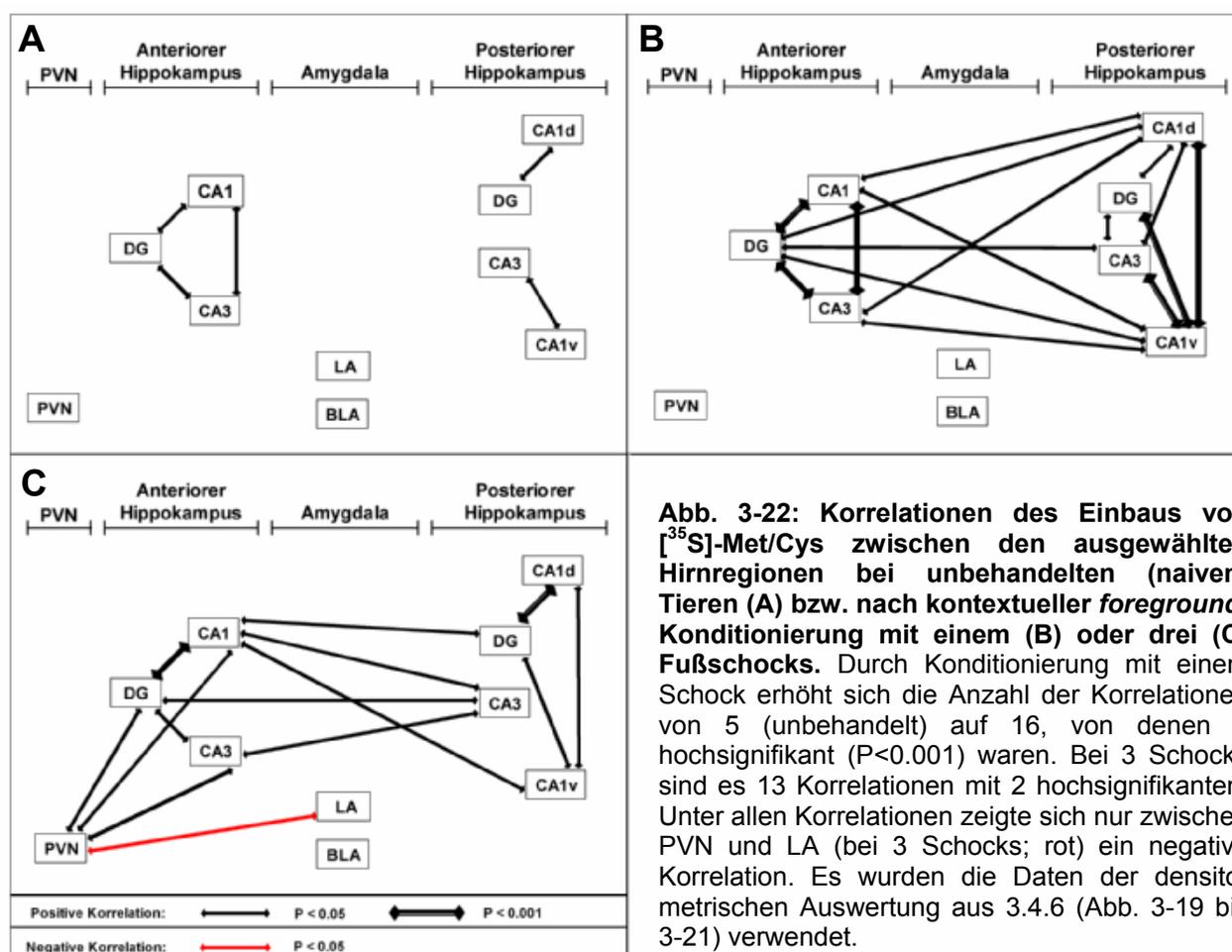
<i>1xSchock</i>	PVN	BLA	aHPC, CA1	aHPC, CA3	aHPC, DG	pHPC, Ca1d	pHPC, CA1v	pHPC, CA3	pHPC, DG
PVN									
BLA	0.02								
aHPC, CA1	0.28	0.10							
aHPC, CA3	0.13	0.09	<b>0.88</b>						
aHPC, DG	0.18	0.09	<b>0.96</b>	<b>0.90</b>					
pHPC, Ca1d	0.02	0.33	<b>0.64</b>	<b>0.53</b>	<b>0.63</b>				
pHPC, CA1v	0.00	0.34	<b>0.59</b>	<b>0.51</b>	<b>0.61</b>	<b>0.93</b>			
pHPC, CA3	0.00	0.32	0.41	0.43	<b>0.45</b>	<b>0.79</b>	<b>0.88</b>		
pHPC, DG	0.01	0.43	0.35	0.28	0.41	<b>0.67</b>	<b>0.82</b>	<b>0.74</b>	
LA	0.17	0.23	0.12	0.08	0.10	0.03	0.01	0.02	0.05

**C**

<i>3xSchock</i>	PVN	BLA	aHPC, CA1	aHPC, CA3	aHPC, DG	pHPC, Ca1d	pHPC, CA1v	pHPC, CA3	pHPC, DG
PVN									
BLA	0.00								
aHPC, CA1	<b>0.57</b>	0.00							
aHPC, CA3	<b>0.57</b>	0.01	0.48						
aHPC, DG	<b>0.72</b>	0.00	<b>0.94</b>	<b>0.61</b>					
pHPC, Ca1d	0.11	0.00	0.45	0.29	0.41				
pHPC, CA1v	0.14	0.05	<b>0.59</b>	0.37	0.47	<b>0.60</b>			
pHPC, CA3	0.50	0.06	<b>0.66</b>	<b>0.71</b>	<b>0.74</b>	0.31	0.26		
pHPC, DG	0.10	0.01	<b>0.57</b>	0.25	0.43	<b>0.88</b>	<b>0.75</b>	0.30	
LA	<b>0.61</b>	0.08	0.06	0.33	0.17	0.03	0.01	0.14	0.04

Tab. 3-1: Synchronität des Einbaus von [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein in ausgewählte Hirnregionen von unbehandelten Tieren (*naiv*, A) bzw. nach kontextueller Konditionierung mit einem (B) oder drei Schocks (C). Die Korrelation zwischen zwei Hirnregionen ist als  $r^2$  angegeben. Die fettgedruckten Werte weisen auf eine signifikante Korrelation ( $P < 0.05$ ; unterstrichen:  $P < 0.001$ ) hin. Durch Konditionierung mit einem Schock erhöht sich die Anzahl der synchronen Übereinstimmungen von 5 (unbehandelt) auf 16, bei 3 Schocks auf 13. Unter allen Korrelationen zeigte sich nur zwischen PVN und LA (bei 3 Schocks; grau unterlegt) eine negative Korrelation. Es wurden die Daten der densitometrischen Auswertung aus 3.4.6 (Abb. 3-19 bis Abb. 3-21) verwendet.

Ohne Konditionierung zeigt sich nur in 3 Fällen innerhalb des anterioren Hippokampus bzw. in 2 Fällen innerhalb der posterioren Subregionen eine signifikante Korrelation. Nach Konditionierung mit einem Schock erhöht sich die Anzahl der Korrelation zwischen anterioren und posterioren hippocampalen Subregionen auf 16. Ähnliche Auswirkungen hat die Verwendung von drei Schocks, die zu insgesamt 13 Fällen einer Korrelation zwischen den untersuchten Hirnregionen führt. Während die Synchronität unter den hippocampalen Subregionen nicht so ausgeprägt ist wie beim Ein-Schock-Protokoll, zeigt der PVN Korrelationen mit den anterioren Subregionen des Hippokampus. Im Gegensatz zu den bisher erwähnten Korrelationen, denen eine synchrone Veränderung der Einbaurrate in die jeweiligen Hirnregionen zugrunde liegt, findet sich bei der Konditionierung mit drei Schocks eine gegnläufige Veränderung der relativen Einbaurrate zwischen PVN und lateraler Amygdala, die in einer negativen Korrelation von  $r^2=0.61$  ( $P=0.02$ ) deutlich wird. Abbildung 3-22 veranschaulicht die Wechselbeziehungen der untersuchten Regionen, die auf der Basis von korrelativer Proteinbiosyntheseaktivität als Netzwerk dargestellt wurden.



**Abb. 3-22: Korrelationen des Einbaus von [ $^{35}$ S]-Met/Cys zwischen den ausgewählten Hirnregionen bei unbedingten (naiven) Tieren (A) bzw. nach kontextueller foreground-Konditionierung mit einem (B) oder drei (C) Fußschocks.** Durch Konditionierung mit einem Schock erhöht sich die Anzahl der Korrelationen von 5 (unbehandelt) auf 16, von denen 6 hochsignifikant ( $P < 0.001$ ) waren. Bei 3 Schocks sind es 13 Korrelationen mit 2 hochsignifikanten. Unter allen Korrelationen zeigte sich nur zwischen PVN und LA (bei 3 Schocks; rot) ein negative Korrelation. Es wurden die Daten der densitometrischen Auswertung aus 3.4.6 (Abb. 3-19 bis 3-21) verwendet.

### 3.5 Lernbedingte Veränderungen der Proteinexpression

Gegenstand dieser Versuchsreihe war es, Proteine zu identifizieren, die infolge eines Lernereignisses neu gebildet oder andersartig exprimiert werden. Hierzu wurde zunächst ein Standardprotokoll der zweidimensionalen Gelelektrophorese verwendet (Versuch Nr.1), das weiteren planabhängigen Modifikationen unterzogen wurde (Tabelle 3-2), um es insbesondere hinsichtlich der Sensitivität der Proteindetektion und der *signal to noise-ratio* zu verbessern.

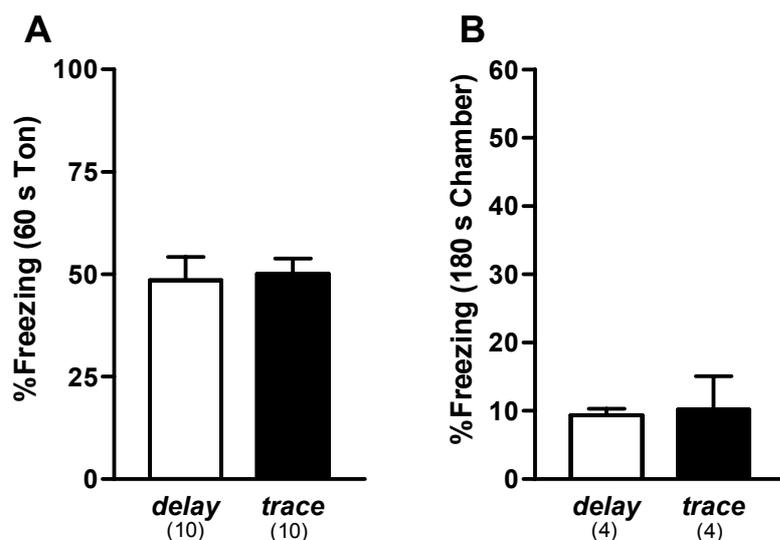
Versuch Nr.	Verhaltenstest	Zeitpunkt nach dem Lernen	Hirnregion	Darstellung der Proteine
1	<i>Trace</i> -Konditionierung (mit <i>background</i> Kontextlernen)	24 h	Gesamter Hippokampus	Kolloidales Coomassie
2	Kontextuelle Konditionierung ( <i>foreground</i> )	5 h	Gesamter Hippokampus	<sup>35</sup> S-Markierung von neu synthetisierten Proteinen
3	Kontextuelle Konditionierung ( <i>foreground</i> )	1 h 45 min	CA1-Subregion des dorsalen Hippokampus	<sup>35</sup> S-Markierung von neu synthetisierten Proteinen

Tab. 3-2: Übersicht über die 3 Versuche zur Identifikation lerninduzierter Proteine

#### 3.5.1 Versuch 1: *Trace*-Konditionierung - Standardprotokoll

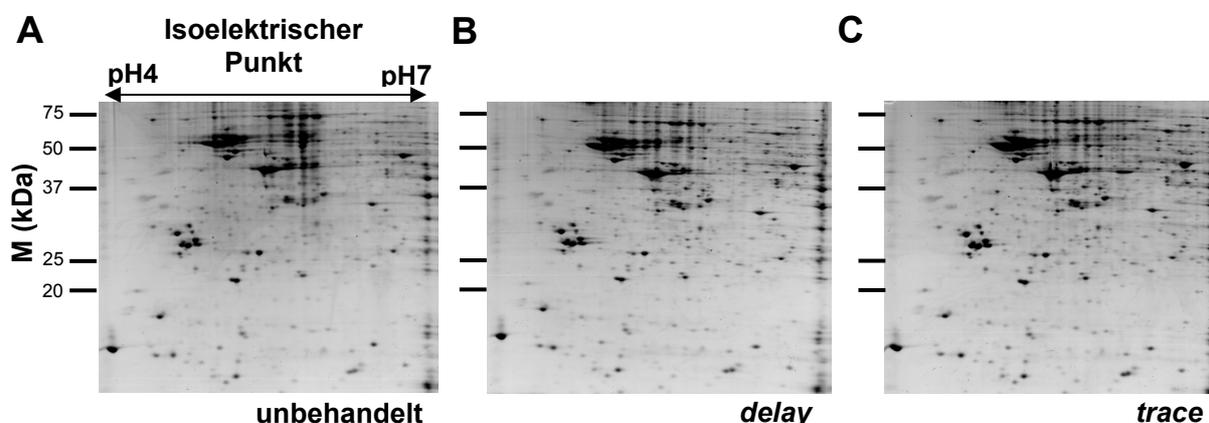
Den verwendeten Mäusen (BL/6J) wurde der Hippokampus 24 h nach *trace*- bzw. *delay*-Konditionierung bilateral entnommen und dessen Proteine zweidimensional (isoelektrische Fokussierung zwischen pH4 und pH7) aufgetrennt. Es wurde 3 Gruppen untersucht: Unbehandelte Tiere, *delay*-Konditionierung und *trace*-Konditionierung. Pro Gruppe wurden vier SDS-Gele erstellt, wobei pro Gel die Proteine aus 11 mg hippokampalen Gewebes einer einzelnen Maus dargestellt wurden. Unmittelbar vor der Hippokampusentnahme wurden die Tiere auf ihr Tongedächtnis getestet (Abbildung 3-23A), um mögliche Unterschiede im

Proteinmuster nicht auf unterschiedlich starkes Tongedächtnis zurückzuführen, sondern auf die *trace-delay*-Modalität (hippokampusabhängig – hippocampusunabhängig). Bei einer parallel mitgeführten Gruppe wurde auch das kontextuelle Gedächtnis untersucht (Abbildung 3-23B). Das kontextuelle Gedächtnis war bei beiden Gruppen gleich stark ausgeprägt und insgesamt sehr schwach, so dass der Hippokampus bei der *trace*-Gruppe überwiegend zur Ausbildung des Tongedächtnisses beigetragen hat.



**Abb. 3-23: Gedächtnisbildung für Ton (A) und Kontext (B):** Die Gruppen *delay*- und *trace*-Konditionierung unterschieden sich an Tag 1 nicht im Tongedächtnis. Das Kontextgedächtnis war bei einer parallel mitgeführten Gruppe nicht unterschiedlich. Anzahl der Tiere pro Gruppe ist in Klammern angegeben,

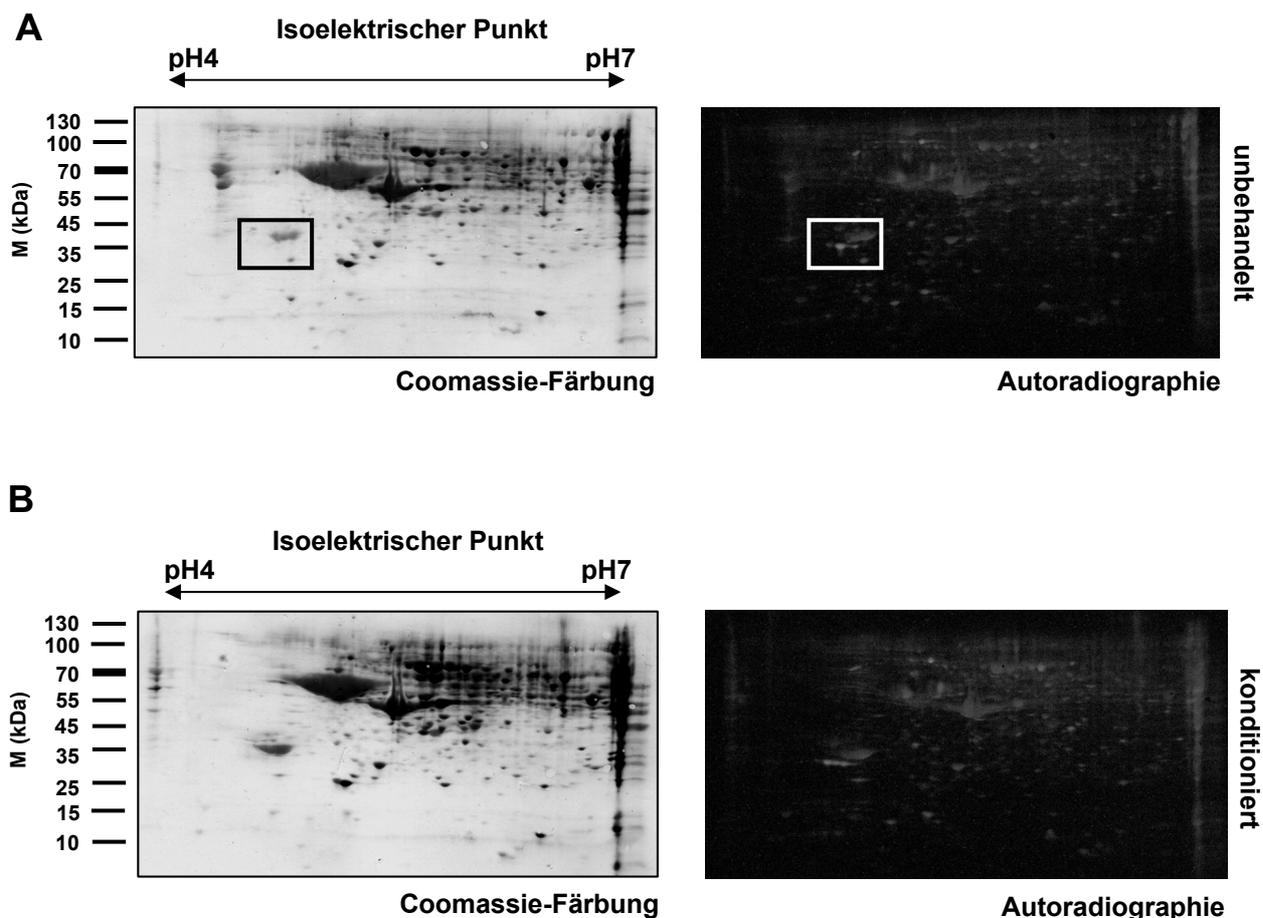
Die aufgetrennten Proteine wurden mit kolloidalem Coomassie-Blau angefärbt und mit PDQuest™ Software ausgewertet. Für die Auswertung wurden sowohl qualitative (neu synthetisierte Proteine), als auch quantitative (stärker oder schwächer exprimierte Proteine) untersucht. Innerhalb der drei Verhaltensgruppen konnten jedoch keine systematischen Unterschiede in der Proteinexpression festgestellt werden (Abbildung 3-24).



**Abb. 3-24: Zweidimensionale Gelelektrophorese hippocampaler Proteine von unbehandelten (A), *delay*- (B) und *trace*- (C) konditionierten Mäusen.** Die Proteine wurden mit kolloidalem Coomassie-Blau angefärbt. Es war kein verhaltensrelevanter Einfluss auf die Proteinexpression festzustellen.

### 3.5.2 Versuch 2: Kontextuelle Konditionierung - Markierung der Proteine mit [<sup>35</sup>S]-Met/Cys

Bei diesem Versuch wurde die kontextuelle *foreground*-Konditionierung mit drei Fußschocks als Verhaltenstest verwendet, um eine mögliche Interferenz mit der mehrfachen Tongabe, die bei *background*-Konditionierung notwendig wäre, auszuschließen. Die Durchführung erfolgte in der Hellphase (d.h. in der Ruhephase der Tiere), da somit die Voraussetzung für die Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen zur c-Fos Expression gegeben war (3.3.6). Die Proteinexpression sollte zwischen konditionierten und unbehandelten (naiven) Tieren (BL/6N) verglichen werden. Um die Sensitivität der Proteindarstellung zu erhöhen und um den Hintergrund der basalen Proteinbiosynthese zu verringern, wurde den Mäusen vor dem Lerntest [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein injiziert, wodurch Proteine, die ab diesem Zeitpunkt synthetisiert werden, radioaktiv markiert werden und dadurch selektiv darstellbar sind. In Anlehnung an die Abschnitte 3.3.5 und 3.4.4, in denen gezeigt wurde, dass durch intrahippokampale Injektion von Anisomycin (Hemmung der Proteinbiosynthese für wenigstens 5 h) unmittelbar nach kontextueller Konditionierung kein Gedächtnis ausgebildet wird, wurde die Proteinexpression 5 h nach dem Lernereignis untersucht. Bei konditionierten und unbehandelten Tieren war die gesamte Inkorporationszeit einheitlich 6 h. Pro Gruppe wurden 2 SDS-Gele mit je 10 mg hippokampalem Gewebe von 3 Mäusen pro SDS-Gel angefertigt. Durch das Untersuchen von gepooltem Gewebe sollten v.a. basale Unterschiede zwischen den einzelnen Mäusen ausgeglichen werden, die nicht im Zusammenhang mit dem Lernen stehen. Es wurde aber auch noch für jede Gruppe je ein SDS-Gel mit 10 mg hippokampalem Gewebe von einer einzelnen Maus untersucht. Die Proteine wurden von den SDS-Gelen auf *blotting*-Membranen übertragen und die davon abgebildeten Autoradiogramme visuell ausgewertet. Ein Vergleich mit den Coomassie gefärbten Membranen zeigte deutlich die Steigerung der Sensitivität, wodurch nun Proteine sichtbar wurden, die durch Coomassie-Färbung nicht erkennbar waren (Abbildung 3-25). Bei der Untersuchung lernrelevanter Veränderungen standen v.a. neu synthetisierte Protein im Vordergrund des Interesses, die aber nicht gefunden werden konnten. Obwohl vereinzelt Proteine quantitative Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten, mangelte es diesen an Konsistenz beim Vergleich aller Autoradiogramme. Die Autoradiogramme und die mit Coomassie gefärbten *blotting*-Membranen mit ungepooltem Gewebe zeigten keine erkennbaren Unterschiede zu denen mit gepooltem Gewebe.

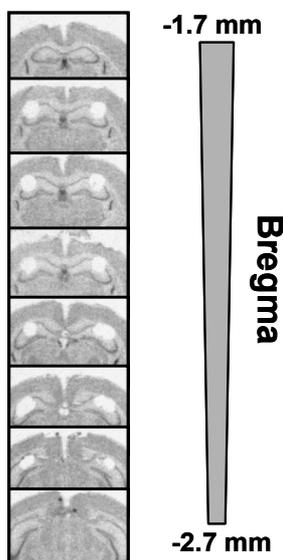


**Abb. 3-25: Zweidimensionale Gelelektrophorese hippocampaler Proteine von unbehandelten (A) und kontextuell konditionierten (B) Mäusen.** Die Proteine wurden nach dem *blotting* der SDS-Gele autoradiographisch dargestellt. Parallel dazu wurden die *blotting*-Membranen mit Coomassie gefärbt. Trotz einer Erhöhung der Sensitivität (siehe z.B. Markierung in A) und einer Reduktion der Menge an basal exprimierten Proteinen war kein systematischer verhaltensrelevanter Einfluss auf die Proteinexpression festzustellen.

### 3.5.3 Versuch 3: Kontextuelle Konditionierung - Markierung der Proteine aus CA1 mit [<sup>35</sup>S]-Met/Cys

Wie in 3.4.7 gezeigt werden konnte, führte die kontextuelle Konditionierung mit einem Schock zu einer stärkeren Interaktion der Subregionen des dorsalen Hippokampus. Deshalb wurde zu diesem Experiment das Ein-Schock-Protokoll mit dem Kontext im *foreground* verwendet und wurde in der Ruhephase der Tiere (BL/6N) durchgeführt, um die unmittelbare Vergleichbarkeit mit den Untersuchungen zur c-Fos Expression zu gewährleisten (3.3.6). Da bei einer Inkorporationszeit von 6 h für [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein in 3.5.2 noch relativ viele Proteine markiert waren, wurde diese für

die beiden in diesem Versuch untersuchten Gruppen (konditioniert und unbehandelt) auf insgesamt 2 h reduziert. Für die Konditionierungsgruppe wurde ein Zeitraum von 1 h 45 min nach dem Lernen gewählt, in dem neu gebildete Proteine markiert werden. Der gewählte Zeitraum orientierte sich an der von der Proteinsynthese abhängigen Phase von etwa einer Stunde nach kontextueller Konditionierung (3.3.5) und an der in diesem Zeitraum nachgewiesenen erhöhten Rate der Proteinbiosynthese (3.4.6). Es wurde nur die CA1 Region des dorsalen Hippokampus untersucht, die aus dem gefrorenen Gehirn gestanzt wurden (Abbildung 3-26). Die Grundlage für diese Eingrenzung bildete die in 3.4.6 nachgewiesene Steigerung der Proteinsynthese in der CA1 Region nach kontextueller Konditionierung.



**Abb. 3-26: Lokalisation der für die Untersuchung entnommenen Gewebeproben aus der CA1 Subregion des Hippokampus.** Mit einem Gewebestanzler (Durchmesser 0.5 mm) wurde aus dem gefrorenen Gehirn die CA1 Region des dorsalen Hippokampus herauspräpariert. Zum Nachweis der korrekten Lokalisation wurden vom Beginn des Stanzens (-1.7 mm Bregma) bis hin zum Ende (-2.7 mm) die Gehirnschnitte aufgenommen und autoradiographisch untersucht.

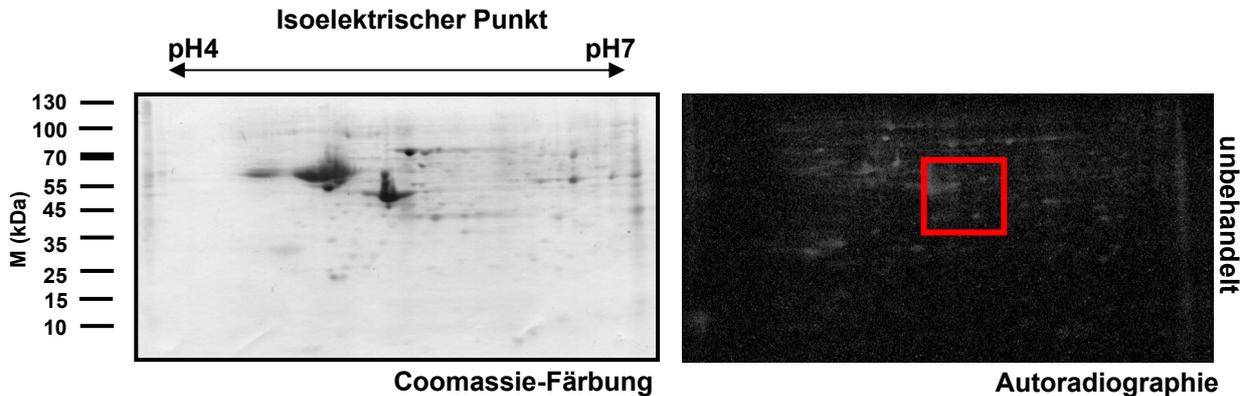
Es wurden insgesamt drei Gele pro Gruppe erstellt. Auf jedes Gel wurden 7 mg aus Gewebeproben aufgetragen, die aus 5 Tieren gepoolt wurden (Abbildung 3-27).

Da im Vergleich zu 3.5.2 weniger Protein für die Auftrennung zur Verfügung stand (Protein aus 7 mg Gewebe anstelle von 10 mg) ist auch die Coomassie-Färbung der Proteine auf den *blotting*-Membranen etwas schwächer. Die autoradiographische Darstellung der Proteine deckte dennoch einen großen Bereich des untersuchten Spektrums an Proteinen hinsichtlich des Molekulargewichts und des isoelektrischen Punktes ab und war erwartungsgemäß etwas geringer ausgeprägt als in 3.5.2.

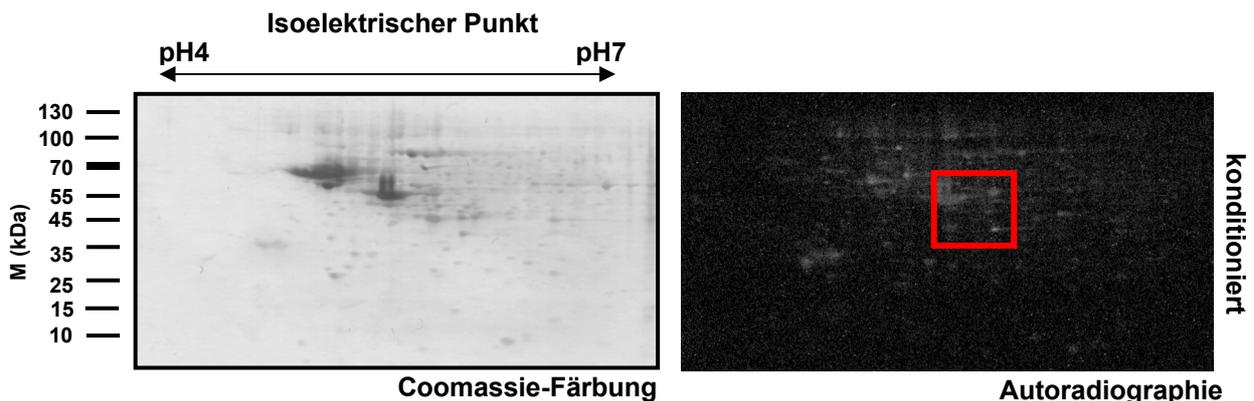
Die visuelle Auswertung der Autoradiogramme ließ auch hier keine deutlichen Unterschiede in der Proteinexpression zwischen konditionierten und unbehandelten

Tieren erkennen. Es war kein Protein zu finden, das nur in der Lerngruppe exprimiert wird. Quantitative Unterschiede bei einzelnen Proteinspots setzten sich beim Vergleich aller Gele nicht konsistent und gruppenspezifisch fort.

**A**

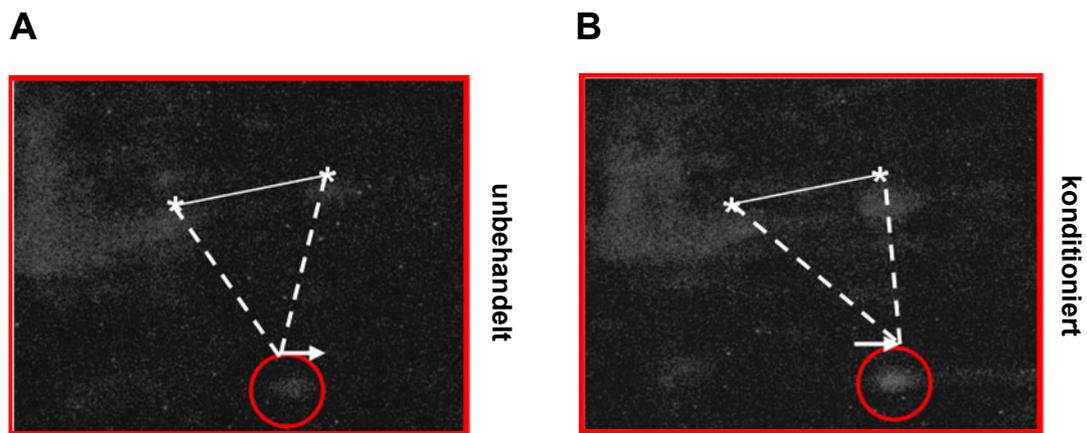


**B**



**Abb. 3-27: Zweidimensionale Gelelektrophorese von Proteinen der CA1 Subregion des Hippokampus aus unbehandelten (A) und kontextuell konditionierten (B) Mäusen.** Die Proteine wurden nach dem *blotting* der SDS-Gele autoradiographisch dargestellt. Parallel dazu wurden die *blotting*-Membranen mit Coomassie gefärbt. Der rot markierte Bereich enthält ein Protein, das nach Konditionierung eine Veränderung des isoelektrischen Punktes aufweist.

Es war allerdings ein Protein zu erkennen, das eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes in Richtung basischer pH-Wert zeigte. Dies spiegelt die Modifikation eines Proteins wider, das sowohl bei unbehandelten, als auch bei konditionierten Tieren vermutlich mit großem *turnover* gebildet wird (Markierungszeit war nur 2 h). Die Modifikation lässt einen Verlust an negativer bzw. eine Zunahme an positiver Nettoladung des Proteins vermuten (Abbildung 3-28). Dieser Unterschied zeigte sich konsequent beim Vergleich aller Gele, auch in retrospektiver Betrachtung der Gele



**Abb. 3-28: Zweidimensionale Gelelektrophorese von Proteinen der CA1 Subregion des Hippokampus aus unbehandelten (A) und kontextuell konditionierten (B) Mäusen.** Vergrößerte Darstellung des in Abb. 3-27 markierten Ausschnitts. Das markierte Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 35-45 kDa ist in seinem isoelektrischen Punkt in Richtung basischer pH verschoben.

aus 3.5.2. Hier war dieser Befund jedoch aufgrund der Limitiertheit visueller Auswertung und der höheren Anzahl der Proteinspots nicht eindeutig.

Aus der Beurteilung der Position im Gel lässt sich weiter vermuten, dass dieses Protein in etwa ein Molekulargewicht von 35 bis 45 kDa hat und sich der isoelektrische Punkt in etwa um pH5.5 bis pH6.5 bewegt. Für die Identifizierung des Proteins mit Massenspektrometrie sind weiter Experimente notwendig, die in Nachfolgestudien stattfinden werden.

## 4. Diskussion

### 4.1 Zugrunde liegende Konzeption der Arbeit

Es ist mittlerweile zum festen Grundsatz der Neurobiologie geworden, dass Langzeitgedächtnis nicht ohne Proteinsynthese möglich ist. Eine extreme Position in den 1960er Jahren ging sogar von einer rein chemischen Natur (z.B. RNA oder Protein) des Gedächtnisses aus (Ungar, 1973/74). Im gegenwärtigen Modell nimmt sie die Rolle eines Teilprozesses ein, der zum strukturellen Umbau von Neuronen notwendig ist. Aber hierbei sind auch andere Prozesse wie posttranslationale Modifikationen und Lokalisation von Rezeptoren von entscheidender Bedeutung. So gibt es mittlerweile auch extreme Positionen, die in der Proteinbiosynthese keine notwendige Voraussetzung zum Lernen sehen und alternative Modelle vorschlagen (Routtenberg & Rekart, 2005). Diese Kontroverse ist mitunter dadurch bedingt, dass es bisher nicht möglich war, die lerninduzierte Expression eines bestimmten Proteins zu zeigen und Kausalität nachzuweisen. Sich dieser Aufgabe zu stellen, erforderte zunächst einige Überlegungen hinsichtlich einer hierzu geeigneten Hirnregion und geeigneter Verhaltenstests bei Mäusen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte diese Fragestellung durch Untersuchungen am Hippokampus bearbeitet werden, da er für die Gedächtnisbildung offenbar eine wichtige Funktion hat, wie in zahlreichen Studien zu hippokampusabhängigen Lernprozessen belegt wird. Es wurden zwei Lerntests (*trace*-Furchtkonditionierung und kontextuelle Konditionierung) etabliert und planabhängig modifiziert, mit dem Ziel, lernbedingte Veränderungen der Proteinbiosynthese darzustellen. Diese Zusammenhänge wurden mittels Markierung von neusynthetisierten Proteinen mit radioaktiven Aminosäuren untersucht. Dies führte zu einem zur Aufklärung anatomisch-funktioneller Zusammenhänge, wobei die quantitativen Aspekte der Proteinsynthese im Vordergrund standen. Zum anderen wurden Versuche unternommen, um mit zweidimensionaler Gelelektrophorese diejenigen Proteine nachzuweisen, deren Expression lernabhängig verändert wurde. Durch Verbesserung dieses Verfahrens hinsichtlich der Sensitivität konnte ein Protein gefunden werden, dessen Nettoladung lernabhängig verändert war und vermutlich auf eine posttranslationale Modifikation zurückzuführen ist.

#### 4.1.1 Der dorsale Hippokampus als Modellregion für Gedächtnisforschung

Bereits im Frühstadium der Alzheimerschen Erkrankung zeigen die betroffenen Patienten große Lücken im deklarativen Gedächtnis, was besonders im Vergessen von erst kürzlich zurückliegenden Ereignissen und Episoden ihres Lebens auffällt. Viele haben auch Schwierigkeiten bei der räumlichen Orientierung. An dieser Erkrankung, deren Pathobiochemie insbesondere im Hippokampus nachzuweisen ist, lässt sich seine zentrale Rolle bei vielen Lernprozessen abschätzen (von Linstow-Roloff & Platt, 1999). In tierexperimentellen Untersuchungen zum Gedächtnis steht der Hippokampus oft im Zentrum, da er in anatomischen und funktionellen Aspekten dem menschlichen Hippokampus sehr ähnlich ist (Kesner & Hopkins, 2006). Die Hinweise, dass verschiedene Rezeptoren und Proteine der Signaltransduktion eine Rolle bei der Gedächtnisbildung spielen, wurden größtenteils aus Untersuchungen des Hippokampus gewonnen. Es gibt daneben aber auch zahlreiche elektro-physiologische Untersuchungen, die die lernbedingten Veränderungen der neuronalen Aktivität belegen. So fand man heraus, dass den *place cells*, die diffus im ganzen Hippokampus verteilt sind, eine wichtige Funktion bei der räumlichen Orientierung zukommt (O'Keefe & Dostrovsky, 1971; Muller *et al.*, 1996). Diese zeigen eine von der Umgebung abhängige Aktivität sowohl bezüglich der Lokalisation des Individuums in einer spezifischen Umgebung, als auch auf bestimmte Charakteristiken, die verschiedene Umgebungen gemeinsam haben. Diese Abbildung der Umgebung auf neuronaler Ebene, die jedoch nicht topographisch ist, stützt sich zum einen auf bereits angelegte Erregbarkeit dieser *place cells*. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass *place cells* eine umgebungsspezifische Aktivität erst im Laufe mehrerer Expositionen erwerben (Wills *et al.*, 2005).

Als Modellregion ist der Hippokampus insbesondere deshalb auch geeignet, da sich durch die Induzierbarkeit von LTP in der CA1-Region, die vielfach *in vitro* und *in vivo* untersucht wurde und mit Lernvorgängen viele Gemeinsamkeiten aufweist (Suzuki *et al.*, 1996), mögliche neue Befunde zu den molekularen Prozessen des Lernens überprüfen lassen.

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit war abzuwägen, welcher Teil des Hippokampus bezüglich seiner septo-temporalen (alternativ dorso-ventralen) Ausdehnung von Bedeutung ist. Denn während die Signalweiterleitung innerhalb des

Hippokampus über den trisynaptischen Schaltkreis DG-CA3-CA1 entlang seiner gesamten septo-temporale Ausdehnung erhalten bleibt, gibt es Unterschiede in den afferenten Bahnen, die aus den kortikalen und subkortikalen Regionen über den entorhinalen Kortex in den DG des Hippokampus gelangen (Moser & Moser, 1998; Bannerman *et al.*, 2004). So finden die sensorischen Informationen des Neokortex Eingang in den septalen Teil des Hippokampus (etwa zwei Drittel seiner Länge, beginnend vom dorsalen Ende). Die Verbindungen mit der Amygdala sind je nach Kern unterschiedlich. So hält die laterale Amygdala eine Verbindung über den entorhinalen Kortex zur septalen (dorsalen) Hälfte des Hippokampus, während mediale und zentrale Amygdala über den entorhinalen Kortex mit dem temporalen (ventralen) Teil des Hippokampus verbunden sind. Außerdem ist der ventrale Hippokampus mit zentralen Bereichen der HPA-Achse verbunden, wie z.B. dem Hypothalamus, der an der Angst und Stress Regulation beteiligt ist (Jacobson & Sapolsky, 1991; Witter, 1986). Von diesen Befunden ausgehend wurde im Rahmen dieser Arbeit der dorsale Hippokampus in den Mittelpunkt des Interesses gestellt, da hier aufgrund seiner Konnektivität die assoziativen Anteile eines Lernvorgangs eher zu erwarten sind und stressbedingte Veränderungen, die eher in den ventralen Teil einfließen, wohl eine untergeordnete Rolle spielen.

#### **4.1.2 Auswahl geeigneter Verhaltenstests**

Die für Mäuse zur Verfügung stehenden Lerntests unterscheiden sich beträchtlich hinsichtlich der Dauer und der Anzahl der zum Lernerfolg notwendigen Wiederholungen. Tests zum räumlichen Lernen, wie z. B. *Morris water maze* und *radial arm maze* erfordern das Orientieren und zielgerichtete Fortbewegen im Raum. Ein durchschnittliches Protokoll dauert mehrere Tage und beinhaltet mehrere Trainingseinheiten pro Tag. Über diesen langen Zeitraum stellt sich der Lerneffekt beim Vergleich mehrerer Tiere oft unterschiedlich schnell ein und es kann zu störenden Einflüssen mit parallelen Prozessen wie Gedächtnisaufrufen, Extinktion, Rekonsolidierung und anderen kommen (Dudai & Eisenberg, 2004). Dadurch werden molekulare Prozesse in nicht vorhersagbarer Weise initiiert und wären deshalb schwer interpretierbar.

Eine weitere Gruppe von Tests (operante Konditionierung) führt zum Erlernen einer Verhaltensantwort des Tieres in der Testsituation, um eine Belohnung zu bekommen oder um einem Strafreiz zu entgehen (z.B. aktives Meideverhalten, *active avoidance*). Auch hier sind mehrere Trainingseinheiten notwendig, was für die Fragestellung ungünstig ist. Bei der passiven Form des Meideverhaltens (*passive avoidance*) lernt die Maus, ein bestimmtes Verhalten nicht auszuführen (z.B. in ein bestimmtes Kompartiment der Versuchsanordnung gehen), das sonst einen Strafreiz zur Folge hätte. Passives Meideverhalten wird zwar in einer einzigen Lerneinheit entwickelt und das Erlernete entspricht im Wesentlichen dem bei der kontextuellen Konditionierung, ist aber zusätzlich von der Motivation der Tiere beim Training abhängig.

Von der Trainingsdauer ebenfalls geeignet erschien die auditorische *trace*-Furchtkonditionierung, einer im Gegensatz zur auditorischen *delay*-Konditionierung hippokampusabhängige Form.

#### **4.1.2.1 Trace-Furchtkonditionierung**

Die Besonderheit bei der *trace*-Furchtkonditionierung liegt in der zeitlichen Lücke zwischen Tonende und Fußschock. Das erfordert im Gegensatz zur *delay*-Furchtkonditionierung, bei der Tonende und Fußschock überlappen, den Hippokampus (McEchron *et al.*, 1998). Mit *delay* als Kontrollgruppe hätte man hier sehr geeignete Versuchsbedingungen, um molekulare Veränderungen nach *trace*-Konditionierung auf die Tonassoziation bei zeitlicher Versetzung zu untersuchen, da zwischen den beiden Versionen außer dem Zeitintervall zwischen Ton und Schock kein Unterschied bezüglich Anzahl und Art der Stimuli besteht.

In Abbildung 3-3 konnte gezeigt werden, dass die *trace*-Konditionierung im Gegensatz zur *delay*-Konditionierung von NMDA Rezeptoren des dorsalen Hippokampus abhängig ist. Die Blockade der NMDA-Rezeptoren durch lokale Injektion von AP5 in den Hippokampus verringerte dosisabhängig die Ausbildung des Tongedächtnisses bei *trace*-, nicht aber bei *delay*-Konditionierung. Dieser Befund lieferte einen Hinweis auf assoziative Veränderungen nach *trace*-Konditionierung, da den NMDA-Rezeptoren (molekulare Koinzidenzdetektoren) aufgrund ihrer Funktionsweise eine Bedeutung bei der Verknüpfung von Prozessen zukommt. Die

Abhängigkeit von der Proteinbiosynthese konnte gezeigt werden, wenn Anisomycin kurz vor dem Lernen (proaktiv) in den Hippokampus injiziert wurde (Abbildung 3-5). Jedoch hatte die Anisomycininjektion unmittelbar nach dem Lernen (retroaktiv) keinen signifikanten Einfluss auf das Tongedächtnis bei *trace*-Furchtkonditionierung, was vermutlich an der Länge des Protokolls (5 Ton-Schock-Paarungen in ca. 18 min) lag. Obwohl immerhin eine Tendenz erkennbar war, ließ sich die Anisomycinwirkung nicht eindeutig auf Konsolidierungsprozesse eingrenzen und mögliche Einflüsse auf die Akquisition bleiben diskutierbar.

Über die genaue Funktion, die der Hippokampus bei der *trace*-Konditionierung einnimmt, besteht noch Unklarheit. Während frühere Meinungen davon ausgingen, dass der Hippokampus in dem tonfreien Intervall vor dem Schock die Repräsentation des Tons aufrecht erhält (Solomon *et al.*, 1986), gibt es Hinweise, die auf die höhere Schwierigkeit beim Erlernen von *trace* im Vergleich zum normalen *delay*-Protokoll hindeuten (Beylin *et al.*, 2001) und deshalb vom Hippokampus abhängt. Er würde demzufolge mit dem Ton ein zeitliches Intervall verknüpfen, nach dem der Strafreiz zu erwarten ist.

#### **4.1.2.2 Kontextuelle Furchtkonditionierung**

Tiere können auf eine Umgebung (Kontext), die sich aus vielen einzelnen Bestandteilen (polymodaler Stimulus) zusammensetzt, ein Furchtgedächtnis ausbilden (Kim & Fanselow, 1992; Fanselow *et al.*, 1994). Dies kann entweder durch *foreground*-Konditionierung geschehen, bei der nach einigen Minuten Explorationszeit an die Konditionierungskammer ein Fußschock verabreicht wird, oder durch *background*-Konditionierung, die parallel zur Konditionierung auf einen unimodalen Stimulus (z.B. einen Ton) stattfindet (Fanselow, 1980). Es ist bisher noch nicht vollständig geklärt, welche Rolle der Hippokampus bei der kontextuellen Konditionierung einnimmt, insbesondere gibt es widersprüchliche Ergebnisse zum Einfluss von *foreground*- und *background*-Konditionierung. Während Läsionen protokollabhängige Effekte vermuten lassen (Phillips & LeDoux, 1994), führen pharmakologische Experimente eher zu der Annahme, dass kein Unterschied zwischen *background* und *foreground* besteht (Young *et al.*, 1994; Stiedl *et al.*, 2000; Bast *et al.*, 2003). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass bei den Läsionsstudien

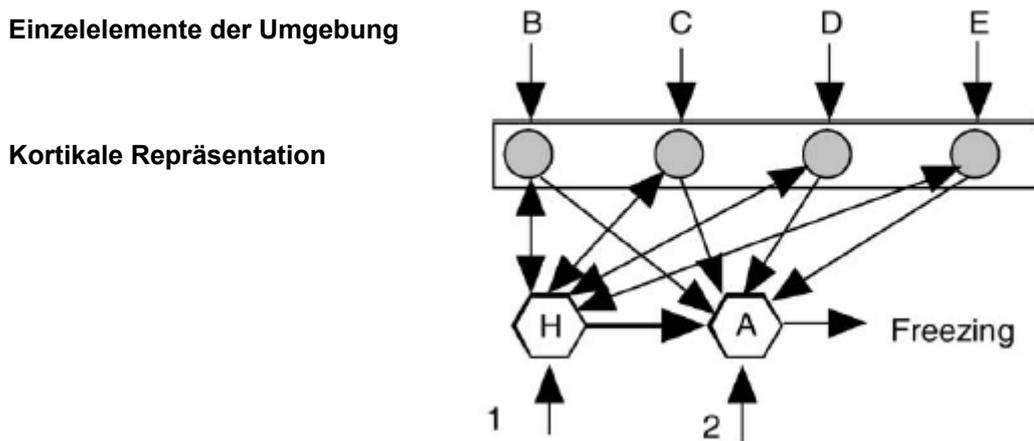
möglicherweise auch Nervenbahnen zerstört wurden, die lediglich durch den Hippokampus hindurch führen, so dass Rückschlüsse auf die Beteiligung des Hippokampus nicht unmittelbar gegeben sind. Deshalb wurden für die vorliegende Arbeit, unter Bezug auf die pharmakologischen Experimente, beide Formen verwendet. In Abhängigkeit von der jeweiligen Fragestellung war hierbei entscheidend, ob parallel das Tongedächtnis untersucht werden sollte (*background*) oder ob durch die Tongabe (insbesondere durch die wiederholte) eine störende Auswirkung auf das Kontextgedächtnis zu erwarten gewesen wäre (*foreground*).

Über die Bedeutung der dorso-ventralen Unterscheidung besteht ebenfalls Uneinigkeit. So weisen Läsionsstudien auf eine Bedeutung des ventralen Hippokampus hin (Richmond *et al.*, 1999). Jedoch sind hier methodische Einschränkungen zu beachten, zum einen bezüglich der lokalen Begrenzbarkeit einer Läsion des ventralen Hippokampus (v.a. die Amygdala ist oft miteinbezogen), und zum anderen bezüglich der Auswirkungen auf das Basalverhalten der Tiere, das durch motorische Hyperaktivität charakterisiert ist und das Auswerten von *freezing* als Verhaltensparameter erschwert (Good & Honey, 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde der dorsale Hippokampus untersucht, da er aufgrund seiner Verbindung mit den sensorischen kortikalen Arealen eine geeignete Zielregion für assoziative Veränderungen ist, wie zahlreiche Studien über die Auswirkungen von Läsionen des dorsalen Hippokampus belegen. Wenn sie innerhalb von 28 Tagen nach der Konditionierung (retrograd) durchgeführt werden, wird das kontextuelle Gedächtnis zerstört (Kim & Fanselow, 1992; Frankland *et al.*, 1998). Wird die Läsion vor der Konditionierung (anterograd) durchgeführt, sind die Effekte auf das Lernen abhängig von der Art der Läsion. Während Tiere nach elektrolytischer Läsion kein kontextuelles Gedächtnis (Phillips & LeDoux, 1992; Kim *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1996) oder ein abgeschwächtes (Frankland *et al.*, 1998) ausbilden können, so haben excitotoxisch durchgeführte Läsionen kaum einen Effekt auf kontextuelles Gedächtnis (Maren *et al.*, 1997). Zudem konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung eines stärkeren Protokolls (drei Schocks statt ein Schock) dieses Defizit bei anterograder excitotoxischer Läsion wieder aufgehoben wird (Wiltgen *et al.*, 2006).

Dies legt nahe, dass neben dem Hippokampus auch ein anderes System zum Lernen des Kontextes verwendet werden kann. Die Unterschiede zwischen retrograder und anterograder Läsion lassen außerdem vermuten, dass der

Hippokampus, wenn er bei der Konditionierung vorhanden ist, das Abspeichern der Information durch das alternative System inhibiert (Rudy *et al.*, 2004). Dieser Mechanismus findet durch pharmakologische Experimente Unterstützung, die zwar die Plastizität des Hippokampus, die zum Abspeichern des Gelernten notwendig ist, inhibieren, nicht aber seine Fähigkeit, einen hemmenden Einfluss auf andere Regionen auszuüben (Matus-Amat *et al.*, 2004). Das bedeutet, dass kontextuelle Furchtkonditionierung auch ohne Hippokampus möglich ist, dieser aber normalerweise eine tragende Rolle hierbei einnimmt. Einige Experimente, die versuchen, die Rolle des Hippokampus näher zu charakterisieren, legen nahe, dass der Hippokampus eine konjunktive Repräsentation der Umgebung erstellt, die sich aus verschiedenen Parametern ihrer einzelnen Bestandteile (bezüglich Farbe, Form, Geruch u.v.a.) zusammensetzt (Nadel *et al.*, 1985; Rudy & Sutherland, 1989). Dieser Hypothese liegt das Phänomen des *“Immediate shock deficit“* zugrunde. Es beschreibt, dass Mäuse/Ratten, wenn sie den Fußschock verabreicht bekommen, unmittelbar nachdem sie in die Konditionierungskammer gesetzt werden, kein Furchtgedächtnis für diese Umgebung ausbilden, da die Tiere keine Zeit hatten, eine neuronale Repräsentation des Kontexts aufzubauen. Konnten die Mäuse aber zu einem früheren Zeitpunkt (üblicherweise 24 h vorher) die Konditionierungskammer explorieren, bilden sie ein mit dem Standardprotokoll vergleichbares Furchtgedächtnis aus. Bei normaler Konditionierung besteht eine kompetitive Wechselbeziehung zwischen dem Hippokampus, der die Umgebung als konjunktive Repräsentation darstellt, und noch näher zu definierenden Arealen im Kortex (O’Reilly & Rudy, 2000), die die einzelnen Bestandteile des Kontexts mit dem Fußschock verknüpfen. In diesem Fall aber dominiert der Hippokampus und inhibiert die Einzelverknüpfungen (Abbildung 4-1; Rudy *et al.*, 2004). Wie in Abbildung 3-8 zu sehen ist, konnte das *Immediate shock deficit* reproduziert werden. Nur diejenigen Tiere, die 24 h vor dem *Immediate shock* die Konditionierungskammer exploriert hatten, zeigten eine dem Standardprotokoll vergleichbare *freezing*-Antwort auf den Konditionierungskontext. Bei einem Test auf partielles Gedächtnis an Tag 7, bei dem allein das Gitter der Konditionierungskammer in einer sonst neuen Umgebung präsentiert wurde, zeigten, im Gegensatz zu Tieren mit *preexposure*, nur die Tiere mit dem Standardprotokoll eine Furchtantwort auf das Gitter. Das deutet darauf hin, dass beim Standardprotokoll sehr wohl auch die Verknüpfung mit den einzelnen Bestandteilen des Kontextes stattfinden kann, bei *Immediate shock* aber nur die

konjunktive Repräsentation des Kontexts, die 24 h zuvor erworben wurde, mit dem Schock verknüpft wird. In diesem Zusammenhang von Bedeutung sind Hinweise aus der Literatur, die dem dorsalen Hippokampus hauptsächlich für die Kontext-Diskrimination eine wichtige Funktion zusprechen (Frankland *et al.*, 1998, Balogh *et al.*, 2002).



**Abb. 4-1: Modell zur Rolle des Hippokampus bei kontextueller Konditionierung.** Die kortikalen Repräsentationen der Einzelbestandteile einer Umgebung (B-E) werden im Hippokampus (H) zusammengeführt (konjunktive Repräsentation, 1) und durch den Schock werden die assoziativen Verbindungen mit zwischen Amygdala (A) und Hippokampus verstärkt. Daneben kann die Amygdala auch Einzelverknüpfungen mit den Elementen herstellen (2), die aber beim Vorhandensein des Hippokampus eine untergeordnete Rolle spielen. (Aus Rudy *et al.*, 2004)

Unter diesen Aspekten stand der dorsale Hippokampus im Vordergrund bei den Untersuchungen dieser Arbeit. Durch lokale Infusion von Anisomycin in den dorsalen Hippokampus zu unterschiedlichen Zeitpunkten um das Lernereignis wurde der Einfluss der Proteinbiosynthese auf die kontextuelle Konditionierung gezeigt (Abbildung 3-11). Sowohl anterograd (15 min vorher) als auch retrograd (5 min nachher) konnte das kontextuelle Gedächtnis beeinträchtigt werden. Durch die retrograde Wirkung können mögliche Einflüsse von Anisomycin auf die Akquisition ausgeräumt werden. So ist davon auszugehen, dass tatsächlich Protein-Neusynthese Voraussetzung für das Kontextgedächtnis ist, die aber spätestens 60 min nach Konditionierung abgeschlossen ist. Von manchen Autoren wurde nach einigen Stunden (ca. 3-4 h) eine weitere proteinbiosyntheseabhängige Phase festgestellt (Grecksch *et al.*, 1980; Freeman *et al.*, 1995, Chew *et al.*, 1996, Bourtoodaze *et al.*, 1998; Quevedo *et al.*, 1999). Dies ist hier aber unwahrscheinlich, da die Anisomycininjektion 60 min nach Konditionierung keinen

Einfluss mehr auf das Kontextgedächtnis hat und nach den autoradiographischen Untersuchungen zur Anisomycinwirkung diese mindestens 5 h nach intrahippokampaler Injektion anhält (vgl. Abbildung 3-15). Es ist nicht davon auszugehen, dass bei der Anisomycininjektion auch der ventrale Hippokampus beeinflusst wurde, da der Diffusionsbereich von Anisomycin wenigstens innerhalb von 120 min auf den dorsalen Teil des Hippokampus beschränkt blieb.

#### 4.1.3 *Immediate early genes* als Indikatoren für neuronale Aktivierung

Die Induktion von *Immediate early genes* (IEGs) in bestimmten Hirnregionen ist für eine breites Spektrum an Stimulationen beschrieben, das von einfachen sensorischen Stimulationen über emotionale Prozesse und Lernvorgänge bis hin zu noxischen Einflüssen wie Nervendurchtrennung und Krampfanfällen reicht (Übersicht in Herdegen & Leah, 1998). C-Fos bildet zusammen mit anderen Proteinen der c-Jun-Gruppe den AP-1 (*activator protein-1*) Transkriptionsfaktor und führt zur Transkription bestimmter Gene, wie z.B. Tyrosin-Hydroxylase sowie verschiedener Rezeptoren und Kanäle. Der Transkriptionsfaktor Zif268 induziert u.a. Gene wie Thymidinkinase, Synaptophysin I+II und Synapsin. BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) führt nach Sezernierung und Bindung an extrazelluläre Rezeptoren zu verschiedenen Aktivierungsvorgängen innerhalb der Zelle (Übersicht in Yamada *et al.*, 2002).

Bei der Untersuchung der mRNA-Expression dieser ausgewählten IEGs im Hippokampus zeigte sich nach *trace*-Konditionierung nur eine Tendenz zur erhöhten Transkription von *zif268* in CA1 und CA3 im Vergleich zu *delay*-Konditionierung (Abbildung 3-6). Im Widerspruch zu diesen Befunden steht eine Studie, die die Proteinexpression von c-Fos und Zif268 nach *trace*-Konditionierung untersuchte (Weitemier & Ryabinin, 2004). Hier ergab sich sowohl in CA3, als auch im DG eine erhöhte c-Fos Expression bei *delay* im Vergleich zu *trace*. Dagegen war Zif268 in keiner der untersuchten Regionen protokollabhängig reguliert. Wenn man nun aber im Vergleich der beiden Konditionierungsprotokolle die Rolle des Hippokampus betrachtet, die bei *trace*, nicht aber bei *delay* beschrieben ist, würde die erhöhte Expression der IEGs nach *delay*-Konditionierung das gegenteilige Bild vermuten lassen.

Im Widerspruch zur Literatur (Milanovic *et al.*, 1998) stehen auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der c-Fos Expression im Hippokampus nach kontextueller Konditionierung, die unter den eigenen Versuchsbedingungen nicht gezeigt werden konnte (Abbildung 3-11). Sie würden eher dafür sprechen, dass der Hippokampus keine Rolle bei der kontextuellen Konditionierung spielt, während in der Amygdala eine deutliche c-Fos Expression nachweisbar war, was ihre bereits beschriebene Rolle bei der kontextuellen Konditionierung untermauert (Campeau *et al.*, 1991; Radulovic *et al.*, 1998).

Die Untersuchung von IEGs lieferte keine klare Aussage bezüglich der Beteiligung des Hippokampus an den verwendeten Lerntests. Es gibt auch innerhalb der Literatur Widersprüche zu bestehenden Konzepten hinsichtlich einer Korrelation zwischen IEGs und Beteiligung einer Hirnregion. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass andere Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielen, die bei den jeweiligen Untersuchungen nicht mit erfasst wurden (Singewald, 2006). Es wäre denkbar, dass es kein einheitliches Aktivierungsschema von IEGs gibt und dass dieses auch regionenspezifisch unterschiedlich sein kann (French *et al.*, 2001). Aufgrund der nicht nachweisbaren Induktion von IEGs wurde im weiteren Verlauf der Untersuchungen nach einem alternativen Verfahren gesucht, das Hinweise auf die Beteiligung einer Hirnregion geben könnte.

#### **4.2 Funktionelle Darstellung von Proteinbiosyntheseaktivität im Gehirn**

In Abhängigkeit von der gerade ausgeübten Funktion ist die Aktivität in bestimmten Hirnarealen bezüglich Metabolismus bzw. Feldpotentialen erhöht und lässt auf die Beteiligung dieser Hirnregion schließen. Es besteht ein großer Bedarf, die Rolle einer Hirnregion für bestimmte Aufgaben zu untersuchen, um die Zusammenhänge eines aufgabenspezifischen Netzwerks zu verstehen. Zur Bestimmung der Aktivität einer Hirnregion können verschiedene Parameter herangezogen werden. Für die Untersuchungen am Menschen hat die funktionelle Magnetresonanztomographie (fMRI), bei der Veränderungen im Sauerstoffgehalt des Blutes gemessen werden (BOLD, *blood oxygen level dependent*), große Anwendung erfahren (Gotoh *et al.*, 2001; Mintun *et al.*, 2001). Hierbei wird eine Erhöhung des sauerstoffabhängigen Metabolismus in einer Hirnregion gemessen, was einen indirekten Schluss auf die

Beteiligung dieser Hirnregion zulässt. Im Tierexperiment ist der Einsatz der Magnetresonanz Bildgebung allerdings durch die zumindest bei Nagern notwendige Anästhesie der Tiere nur schwer durchführbar. Alternativ dazu wurden Untersuchungen mit radioaktiv markierten Glucosederivaten (2-Deoxyglucose oder Fluorodeoxyglucose) durchgeführt, bei denen der Energieverbrauch einer Hirnregion an der Aufnahme von Zucker gemessen wird (Gonzalez-Lima, 1992). Obwohl der Energieverbrauch einer Hirnregion sehr stark mit der funktionellen Aktivität korreliert (Sokoloff, 1992), sind Verfahren wünschenswert, die spezifischere Aussagen über die Aktivität besonders in Bezug auf Langzeitveränderungen einer Hirnregion zulassen. Hierzu befinden sich einige Strategien in Entwicklung, die dieses Ziel verfolgen. Es lassen sich im Tierexperiment z.B. mit Mangan aufgrund seiner guten Kontrasteigenschaften in der Magnetresonanz Bildgebung (MEMRI) kalzium-abhängige Prozesse visualisieren, die insbesondere nach Aktivierung von NMDA-Rezeptoren als ein intrazelluläres Signal mit synaptischer Plastizität assoziiert sind (Pautler *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 2004). Ein weiterer möglicher Indikator für langfristige strukturelle Änderungen im Gehirn wäre die regionenspezifische Darstellung von funktionsbezogener Dynamik der Proteinbiosyntheserate.

#### **4.2.1 Metabolismus von Aminosäuren im Gehirn nach systemischer Administration**

Bereits in den 1960er und 1970er Jahren wurden Untersuchungen zur Verteilung von Aminosäuren im Gehirn unternommen. Im Vordergrund standen dabei z.B. Einflüsse durch die Entwicklung einer Toleranz gegenüber Drogen wie Kokain (Clouet *et al.*, 1967; Cox & Osman, 1970) und die Auswirkungen von Hypoxie, Ischämie u.a. (Blomstrand, 1970; Albrecht & Smialek, 1975). Daneben wurde auch die Wirkungsdauer verschiedener Substanzen untersucht, die die zerebrale Proteinbiosynthese hemmen, wie z.B. Anisomycin und Cycloheximid (Flood *et al.*, 1973; Squire *et al.*, 1976).

Die hierzu verwendeten radioaktiven Aminosäuren waren v.a. [<sup>3</sup>H]- oder [<sup>14</sup>C]-markiertes Valin und Leucin. Die metabolische Prozessierung nach Applikation dieser Aminosäuren führt aber rasch zu vielen anderen radioaktiv markierten Molekülen, wie z.B. Glutamat (Roberts & Morelos, 1965) oder zu Verlusten an Radioaktivität, wenn man dies durch Markierung an [<sup>14</sup>C]<sub>1</sub> zu umgehen versuchte, da

dieser Kohlenstoff bei Metabolisierung als  $^{14}\text{CO}_2$  abgegeben wird. Die Markierung mit  $^3\text{H}$  hat außerdem noch den Nachteil, dass dieses schnell durch Protonenaustausch an Wasser weitergegeben wird, was das ohnehin relativ schwache autoradiographische Signal von  $^3\text{H}$  noch unschärfer macht (Banker & Cotman, 1971).

Für diese Arbeit wurde deshalb ein Gemisch aus den Aminosäuren Methionin und Cystein gewählt, die mit  $^{35}\text{S}$  markiert wurden. Mehr als 95% aller Proteine in der SwissProt-Datenbank tragen zumindest eine der beiden Aminosäuren. Neben dem kostengünstigeren Aspekt hat  $^{35}\text{S}$ -Met/Cys aufgrund seiner kürzeren Halbwertszeit (87 Tage verglichen mit 12.4 Jahren bei  $^3\text{H}$  und 5730 Jahren bei  $^{14}\text{C}$ ) auch einen Vorteil in der praktischen Anwendung bezüglich Abfall und Kontaminationsproblematik.

Während in der Literatur die Aminosäuren intravenös verabreicht wurden, was gerade aber bei Mäusen aufgrund ihrer kleinen Venen zu Komplikationen und nicht vorhersagbaren Unterschieden bei der Injektion führen kann, wurde hier eine systemische (i.p.) Applikation durchgeführt, da diese zeitlich und technisch weniger aufwendig ist. Mögliche interindividuelle Unterschiede durch diese Applikationsform waren nicht feststellbar, wie die homogene Datenverteilung innerhalb einer Gruppe zeigte.

Nach Injektion reicherten sich die Aminosäuren rasch im Gehirn an und erreichten nach einer Stunde ein stabiles Niveau, wie mit autoradiographischer Auswertung von Gefrierschnitten und mit Szintillationsmessung von Gewebeproben gezeigt werden konnte (Abbildung 3-12). Es wurden klare Hinweise dafür gefunden, dass selbst zu diesem frühen Zeitpunkt die Aminosäuren schon in Protein eingebaut werden. Dies wurde durch Szintillationsmessung von Proteinen nach TCA-Fällung (Trichloressigsäure) aus dem Gewebe ebenso deutlich wie durch autoradiographische Untersuchung der Langzeitentwicklung der Inkorporation (Abbildung 3-13). Während hier nach einer Stunde zunächst überwiegend zellsomareiche Areale des Hippokampus eine Schwärzung zeigen, wird diese im Laufe von 7 Tagen diffuser und bezieht zunehmend faserreiche Gebiete wie das *Corpus callosum* mit ein. Das könnte damit zusammenhängen, dass in den Fasern überwiegend Rezeptoren und Proteine des Zytoskeletts zu finden sind, die eine längere Halbwertszeit aufweisen (mehrere Tage) und somit erst zu einem späteren Zeitpunkt radioaktiv markierte Proteine dorthin transportiert werden.

Unter dem Einfluss der proteinsynthesehemmenden Wirkung von Anisomycin (Abbildung 3-14) konnte deutlich gesehen werden, dass die Aminosäuren in dem beobachteten Zeitraum von einer Stunde nicht mehr in Protein eingebaut werden, da der Gehalt an Radioaktivität in den Proteinen aus der TCA-Fällung von Gewebe sehr stark vermindert war (15% des Kontrollniveaus). Mit nachlassender Wirkung von Anisomycin nahm die Radioaktivität der Proteine wieder zu und erreichte nach 6 h wieder das Kontrollniveau. Wie der Vergleich der Autoradiogramme von gewaschenen und ungewaschenen Hirnschnitten ergab, konnten die überschüssigen freien Aminosäuren, die nicht in Protein eingebaut wurden, durch Waschen der Hirnschnitte entfernt werden.

Das Phänomen, dass 0.5 h nach der Injektion von Anisomycin verstärkt Aminosäuren in das Gehirn gelangen (129% des Kontrollwertes bei Szintillationsmessung von Gewebe), wurde bereits früher beschrieben (Rainbow *et al.*, 1980) und hängt wohl mit kompensatorischen Mechanismen zusammen, mit denen der Organismus der unterbunden Proteinsynthese begegnet.

#### **4.2.2 Technische und methodische Aspekte zur Quantifizierung der Proteinsynthese**

Um quantitative Aspekte der Proteinbiosynthese zu erfassen, wurde ein Inkorporationszeitraum von 2 h gewählt, da zu diesem Zeitpunkt bereits die radioaktiven Aminosäuren in neu gebildete Proteine eingebaut werden. Der steile Anstieg der Anreicherungsphase ist zu diesem Zeitpunkt bereits vorbei (vgl. Abbildung 3-12), so dass interindividuelle Schwankungen gering sein sollten. Ein längerer Zeitraum könnte dagegen zu einer Überlagerung der zu untersuchenden Effekte mit anderen Ereignissen führen, die ebenfalls die Proteinbiosynthese beeinflussen, wie z.B. Stress der Tiere, zirkadiane Schwankungen des basalen Metabolismus u.a..

Das Ereignis, dessen Einfluss auf die Proteinbiosynthese untersucht werden sollte, fand 15 min nach Applikation der Aminosäuren statt. Der gewählte Zeitpunkt war noch vor dem Erreichen des stabilen Anreicherungs-niveaus, um zu vermeiden, dass möglicherweise Effekte aufgrund des Sättigungsniveaus nicht erfasst werden.

Das Entfernen der freien Aminosäuren durch Waschen der Hirnschnitte ist für eine quantitative Auswertung nicht notwendig, da der Einfluss des Waschens nur unter

Anisomycinwirkung gesehen werden konnte. Jedoch wurden die Messungen auf das *Corpus callosum* als Kontrollregion normalisiert, um mögliche technisch bedingte Unterschiede in der Dicke der Hirnschnitte und in der radioaktiven Markierung auszugleichen.

Neben dem quantitativen Aspekt der Proteinbiosynthese, mit dem eine einzelne Hirnregion auf ein Ereignis reagiert, ist es auch möglich, die Wechselbeziehungen von mehreren Hirnregionen zu beleuchten, da ein synchrones Verhalten einen Hinweis auf eine gemeinsame Beteiligung geben kann. Dieses Verfahren fand bereits bei verschiedenen metabolisch-funktionellen Untersuchungen zur Verarbeitung kognitiver Aufgaben (Horwitz *et al.*, 2005) und Krankheitsbildern (Horwitz *et al.*, 1978) beim Menschen ebenso Anwendung, wie bei Studien zur auditorischen Konditionierung (McIntosh & Gonzalez-Lima, 1994) und Extinktionsverhalten bei Ratten (Nair & Gonzalez-Lima, 1999).

#### **4.2.3 Funktionelle Proteinbiosynthese bei kontextueller Furchtkonditionierung**

Die kontextuelle Furchtkonditionierung wird oft mit einer höheren Anzahl von Fußschocks durchgeführt, was sich in einer stärkeren *freezing* Antwort der Tiere auf den Kontext widerspiegelt. In dieser Arbeit wurde die kontextuelle Konditionierung mit einem oder drei Schocks durchgeführt und die Proteinbiosynthese unter den gewählten Bedingungen quantitativ untersucht. Nach Konditionierung mit einem oder drei Schocks wurde eine Erhöhung des [<sup>35</sup>S]-Met/Cys-Einbaus in der CA1 Region des dorsalen Hippokampus und in der basolateralen Amygdala gefunden. Diese Erhöhung der Proteinbiosyntheserate ist in Übereinstimmung mit der hemmenden Wirkung der Anisomycininjektion auf die kontextuelle Konditionierung, die im dorsalen Hippokampus und in der Amygdala gefunden wurde (vgl. Abbildung 3-11; Schafe & LeDoux, 2000). Außerdem wurde gezeigt, dass durch kontextuelle Konditionierung CREB induziert wird und damit die Transkription CRE-abhängiger Gene stattfinden kann (Impey *et al.*, 1998).

Bivariate Korrelationsanalysen zeigten eine deutliche Zunahme an Korrelationen innerhalb des Hippokampus nach Konditionierung. Dies unterstützt noch mehr die Rolle des Hippokampus bei der kontextuellen Konditionierung, da synchrones Verhalten von Hirnregionen eine gemeinsame Aktivierung vermuten lässt (Horwitz *et*

*al.*, 1992). Beim stärkeren Protokoll mit drei Fußschocks zeigten sich zusätzlich noch Korrelationen zwischen PVN und dorsalen Subregionen des Hippokampus. Da die höhere Anzahl an Fußschocks schmerzhafter ist und damit erhöhten Stress der Tiere mit sich bringt, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass der PVN bei der Konditionierung auch eine Rolle spielt und Stress bedingte Einflüsse in die Konsolidierung mit einfließen lässt.

#### **4.2.4 Zusammenfassende Bewertung der funktionellen Proteinbiosynthese**

In den Ergebnissen, die mit dieser relativ einfach durchzuführenden Methode erzielt wurden, spiegeln sich die Veränderungen der Proteinbiosynthese wider und es ließen sich u.a. auch bereits bekannte Zusammenhänge aus Experimenten mit Anisomycin bestätigen. Da hier die Proteinbiosyntheserate gemessen wird, kann vermutet werden, dass es hier nicht nur um eine vorübergehende Aktivierung geht, wie sie z.B. bei der 2-Deoxyglucose-Methode gefunden wird, sondern dass es sich hier auch um eine längerfristige Umstrukturierung im zellulären Apparat handelt. Für die 2-Deoxyglucose-Methode sind darüber hinaus sehr starke Stimuli notwendig, um Effekte zu messen. Bei der funktionellen Proteinbiosynthese konnte ein Effekt von einem nur wenige Minuten dauerndem Test gemessen werden, während bei der 2-Deoxyglucose-Methode z.B. ein Ton wiederholt über eine Stunden gegeben werden musste, um einen Einfluss zu zeigen (Barrett *et al.*, 2003), was vermutlich auch Effekte jenseits der zu untersuchenden Ton-Schock-Assoziation mit sich brachte. Gegenüber Untersuchungen mit 2-Deoxyglucose liefert die funktionelle Proteinbiosynthese mit [<sup>35</sup>S]-Met/Cys innerhalb kürzerer Expositionszeit (1-2 Tage gegenüber 1-2 Wochen) schneller und dadurch auch schärfere autoradiographische Abbildungen der Gehirnschnitte.

Auf dem Gebiet der neurobiologischen und psychiatrischen Forschung sind viele Anwendungen dieser Methode vorstellbar, um Hinweise über die Beteiligung einer Hirnregion bei einer bestimmten Funktion zu erhalten. Stress- und angstbezogene Verhaltenstests scheinen hierbei ebenso interessant zu sein wie die Auswirkung von psychoaktiven Substanzen und Pharmaka.

### 4.3 Lernbedingte Veränderungen der Genexpression

Der zunehmend größeren Anzahl an Molekülen, deren Beteiligung an der Gedächtnisbildung diskutiert wird, steht ein großer Bedarf an Integration dieser einzelnen Befunde gegenüber. Um die Bedeutung eines einzelnen Moleküls im Zusammenhang mit den anderen zu verstehen, ist es notwendig, die verschiedenen Einzelbefunde in einem einzelnen Ansatz erfassen zu können und simultan die lernbedingte Regulation vieler Gene zu beobachten. Hierfür haben sich v.a. aus technischen Gründen Strategien etabliert, die Veränderungen der mRNA-Expression untersuchen. Hierzu gehören mRNA *differential display* (Liang & Pardee, 1992), *serial analysis of gene expression* (SAGE; Velculescu *et al.*, 1995), *subtractive hybridization* (Sagerstrom *et al.*, 1997) und DNA-*microarrays* (Draghici *et al.*, 2006). Obwohl nach dem bisherigen Modell für die Bildung von Langzeitgedächtnis die Transkription Voraussetzung ist, konnte in dieser Arbeit durch Hemmung der Transkription weder auf *trace*-, noch auf kontextuelle Konditionierung ein Einfluss auf das Lernen festgestellt werden. Die Dosis des hierzu verwendeten Transkriptionsblockers Amanitin richtete sich nach der in der Literatur validierten Größenordnung (Igaz *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu deuten die Befunde aus pharmakologischen Experimenten mit Anisomycin und die quantitative Auswertung der [<sup>35</sup>S]-Met/Cys-Inkorporation nach kontextueller Konditionierung darauf hin, dass Neusynthese von Proteinen für das Lernen tatsächlich eine Rolle spielt. Aus diesem Grund wurde eine Proteom-fokussierende Analyse der Genexpression angestellt. Das grundsätzliche Vorgehen besteht, darin, ein komplexes Proteingemisch in singuläre Proteine aufzutrennen, diese zu quantifizieren und unterschiedlich regulierte Proteine mit Massenspektrometrie zu identifizieren.

#### 4.3.1 Möglichkeiten und Grenzen der zweidimensionalen Gelelektrophorese

Untersuchungen des Proteoms haben gegenüber Untersuchungen des Transkriptoms den Vorteil, dass sie die tatsächliche Relevanz eines Gens widerspiegeln, denn Proteine sind die Träger der biologischen Funktion (Anderson & Seilhamer, 1997). Es kann außerdem zwischen verschiedenen Isoformen eines Proteins unterschieden werden (*splice*-Varianten) und posttranslationale

Modifikationen werden bei diesem Verfahren erkannt. Standardmäßig werden hierzu die Proteine aus der zu untersuchenden Probe isoliert und mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese zuerst nach ihrem isoelektrischen Punkt getrennt, was durch Anlegen einer Spannung in einem Gelstreifen mit pH-Gradient erfolgt. Anschließend erfolgt die Auftrennung der vorsortierten Proteine nach dem Molekulargewicht in einem SDS-Polyacrylamidgel. In diesem werden die Proteine durch Anfärbung mit kolloidalem Coomassie-Blau (alternativ mit Silber bzw. fluoreszierenden Farbstoffen) visualisiert und quantifiziert. Mit diesem Verfahren wurden schon zahlreiche Proteomprofile aus Organen und zellulären Organellen erstellt, insbesondere bei zerebralem Probenmaterial murinen und humanen Ursprungs. Bei einigen Studien standen auch funktionelle Aspekte wie altersbezogene Veränderungen und die Auswirkung von pathologischen Situationen wie Schlaganfall, Alzheimer oder Schizophrenie im Mittelpunkt (Übersicht in Choudhary & Grant, 2004).

Für den ersten Versuch, lernbedingte Veränderungen der Proteinexpression im Hippokampus darzustellen, wurde *trace*-Konditionierung gewählt, da neben dem Tongedächtnis in der *trace*-Gruppe auch kontextuelles Gedächtnis (bei *trace* und *delay*) gebildet wird. So wären die stärksten Unterschiede zwischen *trace* und der unbehandelten Gruppe zu erwarten gewesen, während sich der Einfluss auf die Proteinexpression durch das Tongedächtnis beim Vergleich von *trace* und *delay* abgezeichnet hätte. Die Auswertung mit der Analyse-Software PDQuest™ ergab keine behandlungsbedingten Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Unter der Annahme, dass beim Lernen tatsächlich neue Proteine gebildet werden, waren insbesondere methodische und technische Einschränkungen dieses Verfahrens zu überdenken.

Aufgrund der Erfordernisse für die Auftrennung der Proteine nach dem isoelektrischen Punkt ist der Einsatz von Detergenzien für die Extraktion der Proteine aus dem Gewebe limitiert, was zum Nachteil für die Löslichkeit von Membran gebundenen Proteinen ist. So stellen die zytoplasmatischen Proteine mit etwa 59% den größten Anteil der mit dem verwendeten Extraktionsverfahren untersuchten Proteine dar, während Zytoskelettproteine etwa 14% und Membran gebundene Proteine etwa 4% ausmachen (Pollak *et al.*, 2006). Die Auswahl des pH-Bereichs pH4-7 für die elektrische Fokussierung resultierte aus einem Kompromiss zwischen einerseits möglichst vielen auftrennbaren Proteinen (großer pH-Bereich günstig, z.B.

pH3-10) und andererseits der Trennschärfe (kleiner pH-Bereich günstig, z.B. pH5-6). Der Zuwachs an einbezogenen Proteinen im Bereich pH7-10 stand für die durchgeführten Experimente nicht im Verhältnis zum Verlust an der Trennschärfe (vgl. Abb.1c aus Pollak et al., 2006). Unter diesen Bedingungen sollten auch bereits bekannte lernassoziierte Moleküle wie Erk1/2, CaMKII $\alpha$ , PP1, PP2A, 14-3-3 Proteine, Calmodulin, Proteine der Ubiquitinkaskade u.a. visualisierbar sein (Pollak et al., 2006; Winder & Sweatt, 2001, Simsek-Duran et al., 2004; Izquierdo et al., 2006). Während die o.g. methodische Einschränkung akzeptierbar erschien, standen besonders die Kriterien der Sensitivität bzw. der *signal-to-noise ratio* zur Diskussion. Die Sensitivität der Färbung mit kolloidalem Coomassie reicht für etwa 5 ng Protein je Spot auf dem Gel. Die Auswertung mit PDQuest™ ergab je nach Konfiguration der Auswertungsparameter sogar mehr als 1000 erkennbare Spots pro Gel. Da es sich hierbei zum großen Teil um Stoffwechsellzyme handelt (Pollak et al., 2006), die keinen direkten Zusammenhang mit Prozessen neuronaler Plastizität vermuten lassen, war es ein Ziel, diesen Hintergrund an basalen Proteinen zu reduzieren, um dadurch den Anteil der Proteine, die in zeitlicher Nähe zum Lernereignis gebildet werden, zu verstärken. Daneben sollte es durch eine Erhöhung der Sensitivität wahrscheinlicher sein, die vermutlich geringen Veränderungen zu visualisieren, da wohl nur eine kleine Subpopulation von Neuronen im Hippokampus in den Konsolidierungsprozess einbezogen ist und lernrelevante Änderungen der Proteinexpression zeigen könnten.

#### 4.3.2 Verbesserungen hinsichtlich Sensitivität und *signal-to-noise ratio*

Radioaktiv markierte Proteine lassen sich getrennt von den bereits vorhanden untersuchen. Dies sollte v.a. zur Reduktion des starken Hintergrunds an basalen Proteinen führen, die mit Coomassie-Färbung mit erfasst werden und das Identifizieren von lernrelevanten Proteinen erschweren. Durch Doppelmarkierung mit [<sup>35</sup>S]-Met/Cys können etwa 95% der Proteine in SwissProt DataBase radioaktiv markiert werden. Beim zweiten Versuch zur Untersuchung von lernbedingten Veränderungen zur Proteinexpression wurde die zeitlich kürzere kontextuelle Konditionierung der *trace*-Konditionierung vorgezogen. Dabei wurde das zeitliche Fenster für die Markierung neu synthetisierter Proteine auf insgesamt 6 h begrenzt,

davon 5 h nach kontextueller Konditionierung, was der Wirkungsdauer von Anisomycin nach lokaler Injektion entsprach (vgl. Abbildung 3-15). Es konnte gezeigt werden, dass mit diesem Verfahren Proteine sichtbar wurden, die mit Coomassie-Färbung nicht erkennbar sind. Jedoch waren trotz des relativ kurzen Zeitraums der Markierung immer noch sehr viele Proteine sichtbar. Die Auswertung erfolgte visuell, da Dateiformate für Phosphorimaging und PDQuest™ nicht kompatibel waren. Es gab zwar keine qualitativen Unterschiede derart, dass beim Lernen ein bestimmtes Protein neu gebildet wird, jedoch schien der isoelektrische Punkt bei einem Protein in basischer Richtung verschoben zu sein.

Beim dritten Versuch wurde ein kleineres zeitliches Fenster für die Inkorporation von [<sup>35</sup>S]-Met/Cys gewählt (insgesamt 2 h, davon 1 h 45 min nach dem Lernen). Dies entsprach dem zeitlichen Rahmen der beeinträchtigenden Wirkung von Anisomycin auf die kontextuelle Konditionierung von etwa einer Stunde (vgl. Abbildung 3-11). Desweiteren wurde aufgrund der Ergebnisse der funktionellen Proteinbiosynthese nur die dorsale CA1-Region des Hippokampus untersucht, da hier die Hauptunterschiede zu vermuten waren (vgl. Abbildung 3-19). Durch die kürzere Markierungszeit waren nun insgesamt deutlich weniger Proteine sichtbar. Hier konnte eindeutig die lerninduzierte Verschiebung des isoelektrischen Punkts eines Proteins in Richtung basischer pH nachgewiesen werden, was auch in Retrospektive bereits beim ersten Versuch gefunden wurde. Diese Verschiebung spiegelt vermutlich eine posttranslationale Modifikation wider, die mit einer Zunahme der positiven Ladung bzw. einer Abnahme der negativen Ladung des Proteins verbunden ist (z.B. eine Dephosphorylierung). Um das Protein und die genaue Art der Modifikation zu identifizieren, müssen weitere Experimente folgen, da die Proteinmenge sehr gering ist und die radioaktive Markierung mit konventioneller Massenspektrometrie interferiert.

#### **4.3.3 Zusammenfassende Beurteilung der Versuche mit zweidimensionaler Gelelektrophorese**

Durch die vielfältigen physikalischen Eigenschaften der Proteine ist es bisher noch nicht möglich, ihre Gesamtheit unter einer einheitlichen Versuchsbedingung zu analysieren. Größe, Ladung und insbesondere Hydrophobizität der Proteine erfordern eine Beschränkung auf eine bestimmte Gruppe von Proteinen. In dem hier

untersuchten Bereich des Proteoms, der sich überwiegend aus zytosolischen und zytoskelettassoziierten Proteinen mit einem isoelektrischen Punkt zwischen pH4 und pH7 zusammensetzte, konnte kein Protein gefunden werden, dessen Expression nach einem Lernereignis verändert wurde. Dadurch, dass viele membranständige Proteine nicht erfasst werden können, sollte ein anderes Trennverfahren in Erwägung gezogen werden. Erste Ansätze hierzu gibt es mit gelfreien Trennmethode, bei denen die komplexen Proteingemische nach Peptidfragmentierung über Kationenaustauschchromatographie in Kombination mit *reverse phase* Chromatographie (*multidimensional liquid chromatography*) aufgetrennt und mit Massenspektrometrie analysiert werden (Washburn *et al.*, 2001; Florens *et al.*, 2002). Jedoch ist dieses Verfahren erst für weniger komplexe Zusammenhänge wie das Erstellen von Proteomprofilen einfacherer Organismen (z.B. Hefe oder *Plasmodium falciparum*) erprobt, so dass eine Anwendung für funktionelle Aspekte erst zu einem späteren Zeitpunkt sinnvoll erscheint. Auch Kombinationen von Affinitätschromatographie und Massenspektrometrie, bei der die Proteine aus komplexen Proben nach strukturellen Charakteristiken wie Phosphorylierung oder Glycosylierung getrennt werden, sind in Entwicklung (Mann & Jensen, 2003). Auch hier bleibt das Problem der Sensitivität bestehen, das durch die Verwendung von *Isotope Coded Affinity Tags* (ICATs; Markierung mit schweren Isotopen) verbessert werden kann (Gygi *et al.*, 1999a).

#### **4.4 Kritische Betrachtung zur Rolle der Proteinbiosynthese bei Lernprozessen**

Die Induktion von *Immediate early genes* wird im Allgemeinen als Marker für neuronale Aktivierung verwendet, da diese zur Induktion von weiteren Genen beitragen. Besonders gut ist die Expression von c-Fos im Hippokampus nach kontextueller Konditionierung charakterisiert (Milanovic *et al.*, 1998). Unter den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Protokollen konnte jedoch im Hippokampus keine c-Fos Protein nachgewiesen werden. Das war zwar aufgrund der Literatur nicht vorherzusehen, deckt sich aber mit den eigenen Ergebnissen aus pharmkologischen Experimenten mit Anisomycin, das, wenn es eine Stunde nach der Konditionierung verabreicht wurde, keine Wirkung auf das Lernen zeigt. Da somit eine späte proteinsyntheseabhängige Phase der Konsolidierung nicht stattfindet, wie sie in

einigen Studien beschrieben wird (Grecksch *et al.*, 1980; Bourchouldaze *et al.*, 1998), ist auch c-Fos als Induktor für eine spätere Proteinbiosynthesephase nicht unbedingt naheliegend.

Es war aber sehr unerwartet, dass es trotz methodischer Verbesserungen in dem fokussierten Spektrum der Proteine keine einzige Veränderung in der Expression eines spezifischen Proteins gab, dessen Bildung den amnestischen Effekt von Anisomycin innerhalb der einen Stunde nach der Konditionierung erklären könnte.

Es bleibt zwar noch abzuwarten, ob sich in Bereichen des Proteoms, die hier nicht berücksichtigt wurden (insbesondere membranständige Proteine), quantitative oder qualitative Veränderungen zeigen lassen, jedoch ist an dieser Stelle eine kritischere Betrachtung des Zusammenhangs zwischen Proteinsynthese und Lernen angebracht, da die Kausalität nach wie vor noch nicht überzeugend dargelegt werden konnte (Routtenberg & Rekart, 2005). Es gibt zwar viele Hinweise dafür, aber ebenso sind alternative Erklärungen möglich. Die Ergebnisse zur funktionellen Dynamik der Proteinbiosynthese in der vorliegenden Arbeit lassen ebenfalls keine Aussage bezüglich einer kausalen Notwendigkeit der Proteinbiosynthese für das kontextuelle Lernen zu und könnten ebenso ein Nebeneffekt sein.

Gegenüber Experimenten mit Anisomycin sind einige Einwände hinsichtlich der Nebenwirkungen auf andere zelluläre Prozesse berechtigt. So ist bekannt, dass Anisomycin auch die Katecholaminsynthese inhibiert (Flexner *et al.*, 1975), die MAP-Kinase p38 aktiviert (Ogawa *et al.*, 2004) und die posttranslationalen Modifikationen von lernassoziierten Molekülen wie CREB (Bebin *et al.*, 2003), Elk-1 (Cano *et al.*, 1994) u.a. verändert. Alternative Substanzen, die ebenfalls die Proteinbiosynthese hemmen (z.B. Puromycin oder Cycloheximid), zeigen ein ähnliches Spektrum an Nebenwirkungen. So könnten die Einflüsse dieser Substanzen auf das Lernen auch mit Einschränkung (Squire *et al.*, 1974; Freedman *et al.*, 1982) über diese Mechanismen erklärt werden.

Die Rolle der Proteinbiosynthese beim Lernen wird darüber hinaus auch dadurch in Frage gestellt, dass durch gleichzeitige Gabe von Proteinsynthesehemmern und zerebral exzitatorischen Substanzen wie z.B. Lysin-Vasopressin (Judge & Quartermain, 1982b) oder Nikotin (Flood *et al.*, 1978) die Gedächtnisbildung nicht beeinträchtigt ist, ohne dass durch die exzitatorischen Substanzen die Hemmung der Proteinbiosynthese aufgehoben würde. Es gibt zudem auch Berichte darüber, dass Langzeitgedächtnis trotz Hemmung der Proteinbiosynthese gebildet werden kann

(Flexner *et al.*, 1966; Dunn *et al.*, 1977; Rainbow *et al.*, 1980) und dass die pharmakologische Behandlung mit Proteinsynthesehemmern *per se* zur Induktion von mRNA der IEGs führen kann, die als Indikator für lernbedingte zelluläre Reorganisation herangezogen wird (Mahadevan & Edwards, 1991; Hughes *et al.*, 1997).

Somit ist die Rolle der Proteinbiosynthese bei der Bildung von Langzeitgedächtnis nicht eindeutig zu beantworten was vor allem an dem Mangel an einer spezifisch wirkenden Substanz liegt. Oder anders gesagt, dass pharmakologische Experimente mit Hemmstoffen der Proteinbiosynthese, obwohl sie unzählige Male und in vielen Variationen durchgeführt und publiziert wurden (eine Stichwortsuche bei PubMed lieferte mehr als 500 Referenzen), alleine nicht geeignet sind, um Aussagen über Proteinbiosynthese zu treffen, da hier zu viele Wirkungen auf einmal stattfinden, was sich insbesondere bei Cycloheximid auch im sichtbar hypomotorischen Verhalten der Tiere bemerkbar macht (Squire *et al.*, 1970). Dies konnte auch bei den pharmakologischen Experimenten mit Anisomycin in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden.

So lange die Frage der Proteinbiosynthese nicht eindeutig geklärt ist, sollten andere Modelle für die Bildung von Langzeitgedächtnis nicht aus dem Blickwinkel verschwinden, auch wenn sie in der Literatur momentan eine untergeordnete Rolle spielen.

#### **4.5 Alternative Modelle zur Bildung von Langzeitgedächtnis**

Es gibt Modelle für die Bildung von Langzeitgedächtnis, die in der Proteinbiosynthese keine notwendige Voraussetzung sehen (Roberson & Sweatt, 1999; Dudai, 2002b; Routtenberg *et al.*, 2005). Sie stützen sich v.a. auf Einflüsse durch posttranslationale Modifikationen vorhandener Protein, insbesondere der Proteinkinasen CaMKII (Frankland *et al.*, 2001; Lisman *et al.*, 2002) und PKC (Keranen *et al.*, 1997), die aufgrund ihrer autokatalytischen Natur eine autonome und lang andauernde Wirkung haben (Grunbaum & Muller, 1998). Zelluläres Ziel dieser Kinasen könnten Rezeptormoleküle sein, deren Aktivität und Funktion sie durch Phosphorylierungen lernabhängig beeinflussen.

Dabei könnte es auch von Bedeutung sein, dass bestimmte Moleküle in Abhängigkeit vom Kompartiment der Zelle, in dem sie sich befinden, eine lernbedingte Funktion ausüben. So wird berichtet, dass LTP die Translokation der PKC vom Zytosol zur Zellmembran induziert, wodurch ihre Funktion bei der Phosphorylierung von ebenfalls membranständigen Rezeptoren verstärkt werden könnte (Akers *et al.*, 1986). Eine Veränderung der zellulären Lokalisation wurde auch für die AMPA-Rezeptoren beschrieben, die nach Induktion von LTP NMDA-Rezeptor abhängig in die synaptische Membran inseriert werden und so stumme Synapsen (*silent synapses*) in signalgebende Synapsen umwandeln können (Shi *et al.*, 1999).

Das vornehmlich aus F-Aktin bestehende Zytoskelett ist maßgeblich an der Ausbildung von Synapsen beteiligt. Durch Rho GTPasen und Aktin-bindende Proteine wie Cofilin, Profilin u.a. wird die Bildung von F-Aktin reguliert, die in der Polymerisation von bereits vorhandenem G-Aktin besteht und somit unmittelbar keine Proteinbiosynthese vorausgehen muss (Fukazawa *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2004).

#### **4.6 Die andere Seite der Gene – Unterschiede im Transkriptom**

Es gibt zunehmend mehr Studien, die unter Verwendung von *microarrays* nach lernbedingten Unterschieden des Transkriptoms suchen. So wurden 24 h nach der ersten Phase der *trace eyeblink*-Konditionierung 7 Gene gefunden, die aber alle mit Ausnahme des Wachstumshormons *growth hormone*, herunterreguliert waren (Donahue *et al.*, 2002) und dem Postulat einer lernbedingt erhöhten Transkription entgegenstehen.

Beim passiven Meideverhalten (*passive avoidance*) waren je nach Kontrollgruppe 46 bzw. 60 Gene im gesamten Hippokampus unterschiedlich transkribiert (D'Agata & Cavallaro, 2003). Den Proteinen kommt überwiegend eine Funktion bei der Regulation der Transkription, der Signaltransduktion und bei der Bildung des Zytoskeletts zu. Aus den mitgeführten Kontrollgruppen wurde jedoch auch deutlich, dass nicht nur die assoziativen Anteile während des Lernvorgangs Veränderungen bewirkt, sondern auch der mit dem Lernen verbundene Stress einen Einfluss auf die Genexpression hat.

In einer weiteren Veröffentlichung wurde die mRNA-Expression nach kontextueller Konditionierung getrennt voneinander in den hippokampalen Subregionen CA1 und

DG untersucht (Levenson *et al.*, 2004). Dabei wurden in CA1 38 und in DG 31 unterschiedlich regulierte Gene entdeckt, die entweder 1, 2, 4 oder 6 h nach Konditionierung eine signifikante Regulation zeigten. Es waren u.a. Transkriptionsfaktoren (*c-fos*, *zif268*), Signalmoleküle (*calmodulin-like 4*), Transportproteine (*transthyretin*) und metabolische Enzyme (*prostaglandin D2 synthase*) beteiligt. Die Expression der meisten Gene war nur zu einem Zeitpunkt signifikant verschieden von der Kontrollgruppe. Auffallend war auch, dass nur eine geringe Überlappung in der lerninduzierten Genregulation zwischen CA1 und DG war. Diese Unterschiede zwischen den Subregionen des Hippokampus wurden jedoch auch im nicht aktivierten Zustand beschrieben (Zhao *et al.*, 2001), und weisen noch mehr auf ihre unterschiedliche Funktion hin und die Notwendigkeit der separaten Analyse bei der Untersuchung von molekularen Prozessen.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Studien erkennen, dass lerninduzierte Veränderungen sich auf eine große Vielzahl von Molekülen (mRNA und möglicherweise auch Protein) aus unterschiedlichen funktionellen Klassen auswirken. Es bleibt offen, ob gerade bei höher entwickelten Tieren, wie den hier untersuchten Mäusen, ein verallgemeinerbarer Prozess auf molekularer Ebene existiert, der durch Lernvorgänge initiiert wird, oder ob es letztendlich verschiedene Prozesse sind, die in ihrem Zusammenspiel dann erst Gedächtnis ausmachen (Sanes & Lichtman, 1999). Hinweise aus der Literatur deuten eher auf letzteres hin. Denn *microarray*-Untersuchungen der basalen mRNA Expression einzelner Zellen der CA1 Region haben gezeigt, dass es selbst innerhalb einer begrenzten Hirnregion starke Unterschiede zwischen einzelnen Zellen gibt (Kamme *et al.*, 2003). Welche Hirnregionen jeweils aktivierungsspezifisch mit einbezogen sind und welche molekulare Veränderungen dort stattfinden, ist zudem auch vom untersuchten Mausstamm abhängig (Sandberg *et al.*, 2000).

#### **4.7 Schlussbemerkungen und Ausblick**

Gerade die Berichte über lernassoziierte Veränderungen auf mRNA-Ebene vermitteln, dass Lernprozesse auf molekularer Ebene sich aus einer Vielzahl von Veränderungen zusammensetzen, die in ihrer Gesamtheit erst zur Gedächtnisbildung führen. Das „Wie“ des Lernvorgangs und ob es sich hierbei um einen

verallgemeinerbaren Prozess handelt ist durch diese Untersuchungen nicht klarer geworden, da auch insbesondere die biologische Relevanz einer veränderten Expression von mRNA fraglich ist. Der charakteristische Ansatz der vorliegenden Arbeit lag darin, die molekularen Prozesse, die mit Lernen verbunden sind, auf der Ebene der Proteine zu untersuchen und somit wenigstens die biologisch relevanten Veränderungen aus der großen Menge an Veränderungen zu erfassen. Es wurden aber schon bei der Charakterisierung der Verhaltenstests Unterschiede zur Literatur festgestellt. Dies betraf im Besonderen das Fehlen einer späten Phase der Proteinbiosynthese und die nicht nachweisbare Induktion von *Immediate early genes* im Hippokampus. Neben Unterschieden in der Tierart bzw. der Mausstämme könnten auch umweltbedingte Einflüsse die molekularen Prozesse des Lernens beeinflusst haben. So weiß man, dass sich Stress in der frühen Phase der Entwicklung negativ auf das Lernen auswirkt. Dagegen können Faktoren wie eine abwechslungsreiche Umgebung zu besserem Lernen führen. Es wäre denkbar, dass den Unterschieden im Lernverhalten auch ein Unterschied in zellulären und molekularen Prozessen zugrunde liegt. Da es sich in dieser Arbeit um Tiere aus kommerziellen Zuchten handelte, sind solche Mechanismen durchaus denkbar. Denn unter Berücksichtigung der o.g. Zusammenhänge lassen die Vorerfahrungen der Tiere eher eine schlechte Lernleistung vermuten. Dafür sprechen auch die *freezing*-Werte bei der kontextuellen Furchtkonditionierung, die oft unterhalb der in der Literatur berichteten Ergebnisse liegen. In Zukunft könnte man diesem Problem durch kontrollierte und stressfreie Aufzucht unter *enrichment*-Bedingungen begegnen.

Unter den Bedingungen dieser Arbeit ist die Amygdala in Relation zum Hippokampus wohl stärker in die Ausbildung des Furchtgedächtnisses einbezogen (Richter-Levin, 2004) da hier sowohl eine erhöhte c-Fos Produktion, als auch eine Erhöhung der Proteinbiosyntheserate gefunden wurde. Es wäre deshalb sinnvoll, als nächstes diese Region hinsichtlich Änderungen der Genexpression näher zu untersuchen, da im Zusammenhang mit den Ergebnissen zum Hippokampus auch die Funktionsweise des am Furchtgedächtnis beteiligten Netzwerks verständlicher werden könnte.

## 5. Zusammenfassung

Innerhalb des letzten Jahrhunderts intensiver Gedächtnisforschung ist es noch nicht gelungen, ein vollständiges und allgemein gültiges Modell für die Bildung von Langzeitgedächtnis zu entwickeln. Einige neuronale Moleküle, insbesondere Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren, scheinen hierbei in bestimmten Hirnregionen, deren Einbeziehung vom Lerntest abhängig ist, eine essentielle Bedeutung zu haben. Welche Rolle die lerninduzierte Neu-Expression von Genen (Transkription bzw. Translation) einnimmt, die als Teilprozesse der Konsolidierung postuliert werden, ist nach wie vor nicht eindeutig geklärt. Die Bedeutung dieser Teilprozesse wurde in dieser Arbeit bei Mäusen unter Verwendung von zwei hippocampusabhängigen Lerntests (auditorische *trace*-Konditionierung und kontextuelle Konditionierung) näher untersucht. Die drei hierbei im Vordergrund stehenden Aspekte waren die pharmakologische Validierung der Lerntests, der regionenspezifische Nachweis neuronaler Aktivierung und Untersuchungen zur Expression lernspezifischer Gene.

Die pharmakologische Validierung der beiden Tests zeigte, dass durch lokale Gabe der translationshemmenden Substanz Anisomycin in den dorsalen Hippokampus zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach dem Lernereignis das Gedächtnis beeinträchtigt ist. Die proteinsyntheseabhängige Phase ist bei der kontextuellen Konditionierung spätestens nach einer Stunde abgeschlossen. Demgegenüber hatte die Hemmung der Transkription mit Amanitin auf keinen der beiden Tests Einfluss auf die Gedächtnisbildung.

Die neuronale Aktivierung, die anhand der Induktion ausgewählter *Immediate early genes* (IEGs) im Hippokampus untersucht wurde, sollte indirekt Hinweise auf Genexpression liefern. Die IEGs waren im Gegensatz zur Literatur bei *trace*-Konditionierung schwach induziert (*zif268* mRNA in CA1 und CA3) bzw. bei kontextueller Konditionierung nicht nachweisbar (c-Fos Protein in CA1). Um alternativ dazu die neuronale Aktivierung bezüglich einer erhöhten Proteinbiosyntheserate zu untersuchen, wurde eine Methode etabliert und validiert, die den Einbau der [<sup>35</sup>S]-markierten Aminosäuren Methionin und Cystein in neu synthetisierte Proteine regionenspezifisch darstellt (funktionelle Proteinbiosynthese). Hierbei zeigte sich in der Subregion CA1 des dorsalen Hippokampus eine erhöhte Proteinbiosynthese-

aktivität nach kontextueller Konditionierung. Ein besonderer Vorteil der Methode besteht darin, dass mit Hilfe der Autoradiogramme funktionelle Netzwerke aufgezeigt werden können, indem Korrelationen in der Proteinbiosyntheseaktivität zwischen verschiedenen Hirnregionen auf deren funktionelle Einheit im Zusammenhang mit dem Lerntest verweisen. Unserer Erkenntnis nach ist das einer der ersten Befunde, womit bei Mäusen erfolgreich lernbedingte Veränderungen der Proteinbiosynthese unter Wahrung neuroanatomischer Auflösung dargestellt werden konnten.

Die Untersuchungen zur lerninduzierten Expression spezifischer Gene erfolgten auf Ebene der Proteine, da bei der pharmakologischen Validierung der Lerntests nicht gezeigt werden konnte, dass Transkriptionsprozesse für die Gedächtnisbildung essentiell sind. Ausgehend von einem Standardprotokoll der zweidimensionalen Gelelektrophorese wurden unter Verwendung der radioaktiven Markierung von Proteinen mit [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein Verbesserungen dieses Verfahrens hinsichtlich Sensitivität und *signal-to-noise ratio* erzielt. Mit dem verbesserten Verfahren konnte ein Protein gefunden werden, das nach kontextueller Konditionierung im Vergleich zu unbehandelten Tieren eine Veränderung der Nettoladung (Verschiebung des isoelektrischen Punktes) aufweist, was auf einen Unterschied in der posttranslationalen Modifikation schließen lässt. Quantitative Unterschiede wurden nicht gefunden. Dies ließe sich damit erklären, dass die Verfahren zur Proteinextraktion vor allem zytosolische Proteine berücksichtigen, membranständige Proteine jedoch weitgehend vernachlässigen.

Zusammengefasst wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Algorithmus etabliert, der sich auf vielfältige Art und Weise für Fragestellungen zur Charakterisierung lern- bzw. stressinduzierter Proteine unter Berücksichtigung neuroanatomischer Aspekte anwenden lässt.

Berücksichtigt man, dass Anisomycin neben der Proteinsynthesehemmung auch andere zelluläre Prozesse beeinflusst, so fällt die vorliegende Arbeit kein abschließendes Urteil über die Rolle der Proteinbiosynthese bei hippokampus-abhängigen Lernprozessen. Dies kann zu einem erheblichen Teil an der nicht-topographischen Anatomie des Hippokampus liegen, so dass zukünftige Studien sich auf eng umrissene Hirnareale konzentrieren sollten.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abel T, Nguyen PV, Barad M, Deuel TA, Kandel ER, and Bourtchouladze R (1997) Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell* **88**:615-626.
- Abel T and Lattal KM (2001) Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr.Opin.Neurobiol.* **11**:180-187.
- Ahissar M, Ahissar E, Bergman H, and Vaadia E (1992) Encoding of sound-source location and movement: activity of single neurons and interactions between adjacent neurons in the monkey auditory cortex. *J.Neurophysiol.* **67**:203-215.
- Akers RF, Lovinger DM, Colley PA, Linden DJ, and Routtenberg A (1986) Translocation of protein kinase C activity may mediate hippocampal long-term potentiation. *Science* **231**:587-589.
- Albrecht J and Smialek M (1975) Effect of hypoxia, ischemia and carbon monoxide intoxication on in vivo protein synthesis in neuron and glia cell enriched fractions from rat brain. *Acta Neuropathol.(Berl)* **31**:257-262.
- Anderson L and Seilhamer J (1997) A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* **18**:533-537.
- Balogh SA, Radcliffe RA, Logue SF, and Wehner JM (2002) Contextual and cued fear conditioning in C57BL/6J and DBA/2J mice: context discrimination and the effects of retention interval. *Behav.Neurosci.* **116**:947-957.
- Banker G and Cotman CW (1971) Characteristics of different amino acids as protein precursors in mouse brain: advantages of certain carboxyl-labeled amino acids. *Arch.Biochem.Biophys.* **142**:565-573.
- Bannerman DM, Rawlins JN, McHugh SB, Deacon RM, Yee BK, Bast T, Zhang WN, Pothuizen HH, and Feldon J (2004) Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neurosci.Biobehav.Rev.* **28**:273-283.
- Barnes CA, Jung MW, McNaughton BL, Korol DL, Andreasson K, and Worley PF (1994) LTP saturation and spatial learning disruption: effects of task variables and saturation levels. *J.Neurosci.* **14**:5793-5806.
- Barrett D, Shumake J, Jones D, and Gonzalez-Lima F (2003) Metabolic mapping of mouse brain activity after extinction of a conditioned emotional response. *J.Neurosci.* **23**:5740-5749.
- Bast T, Zhang WN, and Feldon J (2003) Dorsal hippocampus and classical fear conditioning to tone and context in rats: effects of local NMDA-receptor blockade and stimulation. *Hippocampus* **13**:657-675.
- Bebien M, Salinas S, Becamel C, Richard V, Linares L, and Hipskind RA (2003) Immediate-early gene induction by the stresses anisomycin and arsenite in human

osteosarcoma cells involves MAPK cascade signaling to Elk-1, CREB and SRF. *Oncogene* **22**:1836-1847.

Best PJ, White AM, and Minai A (2001) Spatial processing in the brain: the activity of hippocampal place cells. *Annu.Rev.Neurosci.* **24**:459-486.

Beylin AV, Gandhi CC, Wood GE, Talk AC, Matzel LD, and Shors TJ (2001) The role of the hippocampus in trace conditioning: temporal discontinuity or task difficulty? *Neurobiol.Learn.Mem.* **76**:447-461.

Blank T, Nijholt I, Kye MJ, Radulovic J, and Spiess J (2003) Small-conductance, Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel SK3 generates age-related memory and LTP deficits. *Nat.Neurosci.* **6**:911-912.

Bliss TV and Løvmø 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 and Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**:31-39.

Blomstrand C (1970) Effect of hypoxia on protein metabolism in neuron- and neuroglia cell-enriched fractions from rabbit brain. *Exp.Neurol.* **29**:175-188.

Bourtchouladze R, Abel T, Berman N, Gordon R, Lapidus K, and Kandel ER (1998) Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learn.Mem.* **5**:365-374.

Bouton ME, Nelson JB, and Rosas JM (1999) Stimulus generalization, context change, and forgetting. *Psychol.Bull.* **125**:171-186.

Brazier MM (1960). The historical development of neurophysiology. In: Handbook of physiology, Sect. 1, Bd1 (Ed. Field,J,, Magoun, HW, Hall, VE). Baltimore: Williams & Wilkins

Bucan M and Abel T (2002) The mouse: genetics meets behaviour. *Nat.Rev.Genet.* **3**:114-123.

Burrone J, O'Byrne M, and Murthy VN (2002) Multiple forms of synaptic plasticity triggered by selective suppression of activity in individual neurons. *Nature* **420**:414-418.

Cahill L, Weinberger NM, Roozendaal B, and McGaugh JL (1999) Is the amygdala a locus of "conditioned fear"? Some questions and caveats. *Neuron* **23**:227-228.

Campeau S, Hayward MD, Hope BT, Rosen JB, Nestler EJ, and Davis M (1991) Induction of the c-fos proto-oncogene in rat amygdala during unconditioned and conditioned fear. *Brain Res.* **565**:349-352.

Campeau S and Davis M (1995) Involvement of the central nucleus and basolateral complex of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli. *J.Neurosci.* **15**:2301-2311.

- Cano E, Hazzalin CA, and Mahadevan LC (1994) Anisomycin-activated protein kinases p45 and p55 but not mitogen-activated protein kinases ERK-1 and -2 are implicated in the induction of c-fos and c-jun. *Mol.Cell Biol.* **14**:7352-7362.
- Chen C, Kim JJ, Thompson RF, and Tonegawa S (1996) Hippocampal lesions impair contextual fear conditioning in two strains of mice. *Behav.Neurosci.* **110**:1177-1180.
- Chew SJ, Vicario DS, and Nottebohm F (1996) Quantal duration of auditory memories. *Science* **274**:1909-1914.
- Choudhary J and Grant SG (2004) Proteomics in postgenomic neuroscience: the end of the beginning. *Nat.Neurosci.* **7**:440-445.
- Clouet DH and Ratner M (1967) The effect of the administration of morphine on the incorporation of [<sup>14</sup>C]leucine into the proteins of rat brain in vivo. *Brain Res.* **4**:33-43.
- Corkin S, Amaral DG, Gonzalez RG, Johnson KA, and Hyman BT (1997) H. M.'s medial temporal lobe lesion: findings from magnetic resonance imaging. *J.Neurosci.* **17**:3964-3979.
- Cox BM and Osman OH (1970) Inhibition of the development of tolerance to morphine in rats by drugs which inhibit ribonucleic acid or protein synthesis. *Br.J.Pharmacol.* **38**:157-170.
- Crawley JN, Belknap JK, Collins A, Crabbe JC, Frankel W, Henderson N, Hitzemann RJ, Maxson SC, Miner LL, Silva AJ, Wehner JM, Wynshaw-Boris A, and Paylor R (1997) Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology (Berl)* **132**:107-124.
- Cummings JA, Mulkey RM, Nicoll RA, and Malenka RC (1996) Ca<sup>2+</sup> signaling requirements for long-term depression in the hippocampus. *Neuron* **16**:825-833.
- D'Agata V and Cavallaro S (2003) Hippocampal gene expression profiles in passive avoidance conditioning. *Eur.J.Neurosci.* **18**:2835-2841.
- Davis HP and Squire LR (1984) Protein synthesis and memory: a review. *Psychol.Bull.* **96**:518-559.
- Davis M (1992) The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu.Rev.Neurosci.* **15**:353-375.
- Davis M and Myers KM (2002) The role of glutamate and gamma-aminobutyric acid in fear extinction: clinical implications for exposure therapy. *Biol.Psychiatry* **52**:998-1007.
- Debiec J, Ledoux JE, and Nader K (2002) Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron* **36**:527-538.
- Deneke, VJF (1985). Die Phrenologie als publizistisches Ereignis: Galls Schädellehre in der Tagespublizistik des 19. Jahrhunderts. *Medizinhist J.* **20**(1-2):83-108.

- Deisseroth K, Bito H, and Tsien RW (1996) Signaling from synapse to nucleus: postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity. *Neuron* **16**:89-101.
- Draghici S, Khatri P, Eklund AC, and Szallasi Z (2006) Reliability and reproducibility issues in DNA microarray measurements. *Trends Genet.* **22**:101-109.
- Donahue CP, Jensen RV, Ochiishi T, Eisenstein I, Zhao M, Shors T, and Kosik KS (2002) Transcriptional profiling reveals regulated genes in the hippocampus during memory formation. *Hippocampus* **12**:821-833.
- Dragoi G, Harris KD, and Buzsaki G (2003) Place representation within hippocampal networks is modified by long-term potentiation. *Neuron* **39**:843-853.
- Dubnau J, Chiang AS, and Tully T (2003) Neural substrates of memory: from synapse to system. *J.Neurobiol.* **54**:238-253.
- Dudai, Y (2002). Memory from A to Z. Keywords, Concepts and Beyond. Oxford: Oxford Univ.Press
- Dudai Y (2002) Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Curr.Opin.Neurobiol.* **12**:211-216.
- Dudai Y (2004) The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu.Rev.Psychol.* **55**:51-86.
- Dudai Y and Eisenberg M (2004) Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron* **44**:93-100.
- Dudek SM and Bear MF (1992) Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**:4363-4367.
- Dudel, J, Menzel, R, Schmitt, RF (1996) Neurowissenschaften. Heidelberg: Springer
- Dunn AJ, Gray HE, and Iuvone PM (1977) Protein synthesis and amnesia: studies with emetine and pactamycin. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **6**:1-4.
- Eichenbaum H, Dudchenko P, Wood E, Shapiro M, and Tanila H (1999) The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or a memory space? *Neuron* **23**:209-226.
- Emptage NJ and Carew TJ (1993) Long-term synaptic facilitation in the absence of short-term facilitation in Aplysia neurons. *Science* **262**:253-256.
- Engert F and Bonhoeffer T (1999) Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* **399**:66-70.
- Falls WA, Miserendino MJ, and Davis M (1992) Extinction of fear-potentiated startle: blockade by infusion of an NMDA antagonist into the amygdala. *J.Neurosci.* **12**:854-863.

- Fanselow MS and Bolles RC (1979) Naloxone and shock-elicited freezing in the rat. *J.Comp Physiol Psychol.* **93**:736-744.
- Fanselow MS (1980) Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlov.J.Biol.Sci.* **15**:177-182.
- Fanselow MS, Kim JJ, Yipp J, and De Oca B (1994) Differential effects of the N-methyl-D-aspartate antagonist DL-2-amino-5-phosphonovalerate on acquisition of fear of auditory and contextual cues. *Behav.Neurosci.* **108**:235-240.
- Fischer A, Sananbenesi F, Schrick C, Spiess J, and Radulovic J (2004) Distinct roles of hippocampal de novo protein synthesis and actin rearrangement in extinction of contextual fear. *J.Neurosci.* **24** :1962-1966.
- Flaherty L, Herron B, and Symula D (2005) Genomics of the future: identification of quantitative trait loci in the mouse. *Genome Res.* **15**:1741-1745.
- Flexner LB and Flexner JB (1966) Effect of acetoxycycloheximide and of an acetoxycycloheximide-puromycin mixture on cerebral protein synthesis and memory in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **55**:369-374.
- Flexner LB and Goodman RH (1975) Studies on memory: inhibitors of protein synthesis also inhibit catecholamine synthesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **72**:4660-4663.
- Flint J (2003) Analysis of quantitative trait loci that influence animal behavior. *J.Neurobiol.* **54**:46-77.
- Flood JF, Rosenzweig MR, Bennett EL, and Orme AE (1973) The influence of duration of protein synthesis inhibition on memory. *Physiol Behav.* **10**:555-562.
- Flood JF, Bennett EL, Orme AE, Rosenzweig MR, and Jarvik ME (1978) Memory: modification of anisomycin-induced amnesia by stimulants and depressants. *Science* **199**:324-326.
- Florens L, Washburn MP, Raine JD, Anthony RM, Grainger M, Haynes JD, Moch JK, Muster N, Sacci JB, Tabb DL, Witney AA, Wolters D, Wu Y, Gardner MJ, Holder AA, Sinden RE, Yates JR, and Carucci DJ (2002) A proteomic view of the Plasmodium falciparum life cycle. *Nature* **419**:520-526.
- Frankland PW, Cestari V, Filipkowski RK, McDonald RJ, and Silva AJ (1998) The dorsal hippocampus is essential for context discrimination but not for contextual conditioning. *Behav.Neurosci.* **112**:863-874.
- Frankland PW, O'Brien C, Ohno M, Kirkwood A, and Silva AJ (2001) Alpha-CaMKII-dependent plasticity in the cortex is required for permanent memory. *Nature* **411**:309-313.
- Frankland PW, Josselyn SA, Anagnostaras SG, Kogan JH, Takahashi E, and Silva AJ (2004) Consolidation of CS and US representations in associative fear conditioning. *Hippocampus* **14**:557-569.

- Freedman LS, Judge ME, and Quartermain D (1982) Effects of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor, on mouse brain catecholamine biochemistry. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **17**:187-191.
- Freeman FM, Rose SP, and Scholey AB (1995) Two time windows of anisomycin-induced amnesia for passive avoidance training in the day-old chick. *Neurobiol.Learn.Mem.* **63**:291-295.
- Freeman WM and Hemby SE (2004) Proteomics for protein expression profiling in neuroscience. *Neurochem.Res.* **29**:1065-1081.
- French PJ, O'Connor V, Jones MW, Davis S, Errington ML, Voss K, Truchet B, Wotjak C, Stean T, Doyere V, Maroun M, Laroche S, and Bliss TV (2001) Subfield-specific immediate early gene expression associated with hippocampal long-term potentiation in vivo. *Eur.J.Neurosci.* **13**:968-976.
- French PJ, O'Connor V, Voss K, Stean T, Hunt SP, and Bliss TV (2001) Seizure-induced gene expression in area CA1 of the mouse hippocampus. *Eur.J.Neurosci.* **14**:2037-2041.
- Frey U, Krug M, Brodemann R, Reymann K, and Matthies H (1989) Long-term potentiation induced in dendrites separated from rat's CA1 pyramidal somata does not establish a late phase. *Neurosci.Lett.* **97** :135-139.
- Frey U, Huang YY, and Kandel ER (1993) Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science* **260**:1661-1664.
- Fukazawa Y, Saitoh Y, Ozawa F, Ohta Y, Mizuno K, and Inokuchi K (2003) Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. *Neuron* **38**:447-460.
- Gerlai R (2001) Behavioral tests of hippocampal function: simple paradigms complex problems. *Behav.Brain Res.* **125**:269-277.
- Goldstein LE, Rasmusson AM, Bunney BS, and Roth RH (1996) Role of the amygdala in the coordination of behavioral, neuroendocrine, and prefrontal cortical monoamine responses to psychological stress in the rat. *J.Neurosci.* **16**:4787-4798.
- Gonzalez-Lima F (1992) Brain imaging of auditory learning functions in rats: studies with fluorodeoxyguucose autoradiography and cytochrome oxidase histochemistry. In: *Advances in metabolic mapping techniques for brain imaging of behavioural and learning functions* (Ed. Gonzalez-Lima F, Finkenstadt TH, Scheich H) Boston: Kluwer Academic
- Good M and Honey RC (1997) Dissociable effects of selective lesions to hippocampal subsystems on exploratory behavior, contextual learning, and spatial learning. *Behav.Neurosci.* **111**:487-493.
- Gotoh J, Kuang TY, Nakao Y, Cohen DM, Melzer P, Itoh Y, Pak H, Pettigrew K, and Sokoloff L (2001) Regional differences in mechanisms of cerebral circulatory response to neuronal activation. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **280**:H821-H829.

- Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, and Fuchs E (1997) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J.Neurosci.* **17** :2492-2498.
- Grecksch G and Matthies H (1980) Two sensitive periods for the amnesic effect of anisomycin. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **12**:663-665.
- Gruart A, Munoz MD, and Delgado-Garcia JM (2006) Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. *J.Neurosci.* **26**:1077-1087.
- Grunbaum L and Muller U (1998) Induction of a specific olfactory memory leads to a long-lasting activation of protein kinase C in the antennal lobe of the honeybee. *J.Neurosci.* **18**:4384-4392.
- Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, and Aebersold R (1999a) Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat.Biotechnol.* **17**:994-999.
- Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, and Aebersold R (1999b) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol.Cell Biol.* **19**:1720-1730.
- Harris EW and Cotman CW (1986) Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by N-methyl D-aspartate antagonists. *Neurosci.Lett.* **70**:132-137.
- Hebb, DO (1949) *The Organization of Behavior*. New York: Wiley.
- Hegde AN and DiAntonio A (2002) Ubiquitin and the synapse. *Nat.Rev.Neurosci.* **3**:854-861.
- Helmstetter FJ (1992) The amygdala is essential for the expression of conditional hypoalgesia. *Behav.Neurosci.* **106**:518-528.
- Herdegen T and Leah JD (1998) Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res.Brain Res.Rev.* **28**:370-490.
- Horwitz B, Grady CL, Schlageter NL, Duara R, and Rapoport SI (1987) Intercorrelations of regional cerebral glucose metabolic rates in Alzheimer's disease. *Brain Res.* **407**:294-306.
- Horwitz B, Soncrat TT, Haxby JV (1992) Covariance analysis of functional interactions in the brain using metabolic and blood flow data. In: *Advances in metabolic mapping techniques for brain imaging of behavioural and learning functions* (Ed. Gonzalez-Lima F, Finkenstadt TH, Scheich H) Boston: Kluwer Academic
- Horwitz B, Warner B, Fitzer J, Tagamets MA, Husain FT, and Long TW (2005) Investigating the neural basis for functional and effective connectivity. Application to fMRI. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **360**:1093-1108.

- Huang YY and Kandel ER (1994) Recruitment of long-lasting and protein kinase A-dependent long-term potentiation in the CA1 region of hippocampus requires repeated tetanization. *Learn.Mem.* **1**:74-82.
- Hughes PE, Alexi T, and Dragunow M (1997) Cycloheximide phase-shifts, but does not prevent, de novo Krox-24 protein expression. *Neuroreport* **8**:3263-3266.
- Igaz LM, Vianna MR, Medina JH, and Izquierdo I (2002) Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *J.Neurosci.* **22**:6781-6789.
- Impey S, Mark M, Villacres EC, Poser S, Chavkin C, and Storm DR (1996) Induction of CRE-mediated gene expression by stimuli that generate long-lasting LTP in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* **16**:973-982.
- Impey S, Smith DM, Obrietan K, Donahue R, Wade C, and Storm DR (1998) Stimulation of cAMP response element (CRE)-mediated transcription during contextual learning. *Nat.Neurosci.* **1**:595-601.
- Izquierdo I and Medina JH (1997) Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol.Learn.Mem.* **68**:285-316.
- Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, and Cammarota M (2006) Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci.* **29**:496-505.
- Jacobson L and Sapolsky R (1991) The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr.Rev.* **12**:118-134.
- Judge ME and Quartermain D (1982a) Characteristics of retrograde amnesia following reactivation of memory in mice. *Physiol Behav.* **28**:585-590.
- Judge ME and Quartermain D (1982b) Alleviation of anisomycin-induced amnesia by pre-test treatment with lysine- vasopressin. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **16**:463-466.
- Kamme F, Salunga R, Yu J, Tran DT, Zhu J, Luo L, Bittner A, Guo HQ, Miller N, Wan J, and Erlander M (2003) Single-cell microarray analysis in hippocampus CA1: demonstration and validation of cellular heterogeneity. *J.Neurosci.* **23**:3607-3615.
- Kandel ER (2001) The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* **294**:1030-1038.
- Kapp BS, Gallagher M, Underwood MD, McNall CL, and Whitehorn D (1982) Cardiovascular responses elicited by electrical stimulation of the amygdala central nucleus in the rabbit. *Brain Res.* **234**:251-262.
- Kempermann G, Kuhn HG, and Gage FH (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* **386**:493-495.
- Keranen LM and Newton AC (1997) Ca<sup>2+</sup> differentially regulates conventional protein kinase Cs' membrane interaction and activation. *J.Biol.Chem.* **272**:25959-25967.

- Kesner RP and Hopkins RO (2006) Mnemonic functions of the hippocampus: a comparison between animals and humans. *Biol.Psychol.* **73**:3-18.
- Kim JJ, DeCola JP, Landeira-Fernandez J, and Fanselow MS (1991) N-methyl-D-aspartate receptor antagonist APV blocks acquisition but not expression of fear conditioning. *Behav.Neurosci.* **105**:126-133.
- Kim JJ, Fanselow MS, DeCola JP, and Landeira-Fernandez J (1992) Selective impairment of long-term but not short-term conditional fear by the N-methyl-D-aspartate antagonist APV. *Behav.Neurosci.* **106**:591-596.
- Kim JJ and Fanselow MS (1992) Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* **256**:675-677.
- Kim JJ, Rison RA, and Fanselow MS (1993) Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short- and long-term contextual fear. *Behav.Neurosci.* **107**:1093-1098.
- Kulenbeck, H (1957). Brain and consciousness. Basel: Karger
- Lashley KS (1950) In Search of the Engram. *Symposia of the Society for Experimental Biology* **4**:454-482.
- Ledoux JE, Cicchetti P, Xagoraris A, and Romanski LM (1990) The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J.Neurosci.* **10**:1062-1069.
- Ledoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu.Rev.Neurosci.* **23**:155-184.
- Leuner B, Faldueto J, and Shors TJ (2003) Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *J.Neurosci.* **23**:659-665.
- Levenson JM, Choi S, Lee SY, Cao YA, Ahn HJ, Worley KC, Pizzi M, Liou HC, and Sweatt JD (2004) A bioinformatics analysis of memory consolidation reveals involvement of the transcription factor c-rel. *J.Neurosci.* **24**:3933-3943.
- Liang KC, Juler RG, and McGaugh JL (1986) Modulating effects of posttraining epinephrine on memory: involvement of the amygdala noradrenergic system. *Brain Res.* **368**:125-133.
- Liang KC, McGaugh JL, and Yao HY (1990) Involvement of amygdala pathways in the influence of post-training intra-amygdala norepinephrine and peripheral epinephrine on memory storage. *Brain Res.* **508**:225-233.
- Liang P and Pardee AB (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**:967-971.
- Lisman J, Schulman H, and Cline H (2002) The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat.Rev.Neurosci.* **3**:175-190.
- Lopez-Salon M, Alonso M, Vianna MR, Viola H, Mello e Souza, Izquierdo I, Pasquini JM, and Medina JH (2001) The ubiquitin-proteasome cascade is required for mammalian long-term memory formation. *Eur.J.Neurosci.* **14**:1820-1826.

- Luo Z and Geschwind DH (2001) Microarray applications in neuroscience. *Neurobiol.Dis.* **8**:183-193.
- Lynch G, Kessler M, Halpain S, and Baudry M (1983) Biochemical effects of high-frequency synaptic activity studied with in vitro slices. *Fed.Proc.* **42**:2886-2890.
- Lynch GS, Dunwiddie T, and Gribkoff V (1977) Heterosynaptic depression: a postsynaptic correlate of long-term potentiation. *Nature* **266**:737-739.
- Maeda T, Kaneko S, Akaike A, and Satoh M (1997) Direct evidence for increase in excitatory amino acids release during mossy fiber LTP in rat hippocampal slices as revealed by the patch sensor methods. *Neurosci.Lett.* **224**:103-106.
- Mahadevan LC and Edwards DR (1991) Signalling and superinduction. *Nature* **349**:747-748.
- Malenka RC, Lancaster B, and Zucker RS (1992) Temporal limits on the rise in postsynaptic calcium required for the induction of long-term potentiation. *Neuron* **9**:121-128.
- Malinow R, Schulman H, and Tsien RW (1989) Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* **245**:862-866.
- Mann M and Jensen ON (2003) Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat.Biotechnol.* **21**:255-261.
- Mansuy IM and Suter U (2000) Mouse genetics in cell biology. *Exp.Physiol* **85**:661-679.
- Maren S, Aharonov G, and Fanselow MS (1997) Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behav.Brain Res.* **88**:261-274.
- Maren S (1999) Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory. *Trends Neurosci.* **22**:561-567.
- Maren S, Ferrario CR, Corcoran KA, Desmond TJ, and Frey KA (2003) Protein synthesis in the amygdala, but not the auditory thalamus, is required for consolidation of Pavlovian fear conditioning in rats. *Eur.J.Neurosci.* **18**:3080-3088.
- Martin SJ and Morris RG (2002) New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus* **12**:609-636.
- Matus-Amat P, Higgins EA, Barrientos RM, and Rudy JW (2004) The role of the dorsal hippocampus in the acquisition and retrieval of context memory representations. *J.Neurosci.* **24**:2431-2439.
- McEchron MD, Bouwmeester H, Tseng W, Weiss C, and Disterhoft JF (1998) Hippocampectomy disrupts auditory trace fear conditioning and contextual fear conditioning in the rat. *Hippocampus* **8**:638-646.
- McGaugh JL (1966) Time-dependent processes in memory storage. *Science* **153**:1351-1358.

- McGaugh JL (2000) Memory--a century of consolidation. *Science* **287**:248-251.
- McGaugh JL and Izquierdo I (2000) The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. *Trends Pharmacol.Sci.* **21**:208-210.
- McGaugh JL and Roozendaal B (2002) Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Curr.Opin.Neurobiol.* **12**:205-210.
- McIntosh AR and Gonzalez-Lima F (1994) Network interactions among limbic cortices, basal forebrain, and cerebellum differentiate a tone conditioned as a Pavlovian excitator or inhibitor: fluorodeoxyglucose mapping and covariance structural modeling. *J.Neurophysiol.* **72**:1717-1733.
- McKernan MG and Shinnick-Gallagher P (1997) Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro. *Nature* **390**:607-611.
- Meaney MJ (2001) Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annual Review of Neuroscience* **24**:1161-1192.
- Mellor J and Nicoll RA (2001) Hippocampal mossy fiber LTP is independent of postsynaptic calcium. *Nat.Neurosci.* **4**:125-126.
- Mellor J, Nicoll RA, and Schmitz D (2002) Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by presynaptic lh channels. *Science* **295**:143-147.
- Milanovic S, Radulovic J, Laban O, Stiedl O, Henn F, and Spiess J (1998) Production of the Fos protein after contextual fear conditioning of C57BL/6N mice. *Brain Res.* **784**:37-47.
- Milner B, Squire LR, and Kandel ER (1998) Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* **20**:445-468.
- Mintun MA, Lundstrom BN, Snyder AZ, Vlassenko AG, Shulman GL, and Raichle ME (2001) Blood flow and oxygen delivery to human brain during functional activity: theoretical modeling and experimental data. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**:6859-6864.
- Misanin JR, Miller RR, and Lewis DJ (1968) Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science* **160**:554-555.
- Miserendino MJ, Sananes CB, Melia KR, and Davis M (1990) Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Nature* **345**:716-718.
- Mishkin M (1982) A memory system in the monkey. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **298**:83-95.
- Moser MB, Trommald M, and Andersen P (1994) An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**:12673-12675.

- Moser MB and Moser EI (1998) Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* **8**:608-619.
- Muller GE, Pilzecker A. 1900. Experimentelle Beitrage zur Lehre von Gedächtnis. *Z. Psychol.* 1:1–300
- Muller RU, Stead M, and Pach J (1996) The hippocampus as a cognitive graph. *J.Gen.Physiol* **107**:663-694.
- Naaby-Hansen S, Waterfield MD, and Cramer R (2001) Proteomics--post-genomic cartography to understand gene function. *Trends Pharmacol.Sci.* **22**:376-384.
- Nadel L, Willner J, Kurz EM. Cognitive maps and environmental context. In: Context and learning (Eds. Balsam P, Tomie A) Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum and Associates; 1985. p. 385–406.
- Nader K (2003) Memory traces unbound. *Trends Neurosci.* **26**:65-72.
- Nair HP and Gonzalez-Lima F (1999) Extinction of behavior in infant rats: development of functional coupling between septal, hippocampal, and ventral tegmental regions. *J.Neurosci.* **19**:8646-8655.
- Nguyen PV, Abel T, and Kandel ER (1994) Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science* **265**:1104-1107.
- Nisenbaum LK (2002) The ultimate chip shot: can microarray technology deliver for neuroscience? *Genes Brain Behav.* **1**:27-34.
- O'Keefe J and Dostrovsky J (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* **34**:171-175.
- O'Reilly RC and Rudy JW (2000) Computational principles of learning in the neocortex and hippocampus. *Hippocampus* **10**:389-397.
- Ogawa T, Hayashi T, Kyoizumi S, Kusunoki Y, Nakachi K, MacPhee DG, Trosko JE, Kataoka K, and Yorioka N (2004) Anisomycin downregulates gap-junctional intercellular communication via the p38 MAP-kinase pathway. *J.Cell Sci.* **117**:2087-2096.
- Pautler RG, Silva AC, and Koretsky AP (1998) In vivo neuronal tract tracing using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Magn Reson.Med.* **40**:740-748.
- Pavlov, IP (1927) *Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex.* London: Oxford Univ. Press
- Paxinos G and Franklin KBJ (2001) *The mouse brain in stereotaxic coordinates.* London: Academic Press
- Pham K, McEwen BS, Ledoux JE, and Nader K (2005) Fear learning transiently impairs hippocampal cell proliferation. *Neuroscience* **130**:17-24.

- Phillips RG and Ledoux JE (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav. Neurosci.* **106**:274-285.
- Phillips RG and Ledoux JE (1994) Lesions of the dorsal hippocampal formation interfere with background but not foreground contextual fear conditioning. *Learn. Mem.* **1**:34-44.
- Pollak DD, John J, Hoeger H, and Lubec G (2006) An integrated map of the murine hippocampal proteome based upon five mouse strains. *Electrophoresis* **27**:2787-2798.
- Quevedo J, Vianna MR, Roesler R, de Paris F, Izquierdo I, and Rose SP (1999) Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learn. Mem.* **6**:600-607.
- Radulovic J, Kammermeier J, and Spiess J (1998) Relationship between fos production and classical fear conditioning: effects of novelty, latent inhibition, and unconditioned stimulus preexposure. *J. Neurosci.* **18**:7452-7461.
- Rainbow TC, Hoffman PL, and Flexner LB (1980) Studies of memory: a reevaluation in mice of the effects of inhibitors on the rate of synthesis of cerebral proteins as related to amnesia. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **12**:79-84.
- Richmond MA, Yee BK, Pouzet B, Veenman L, Rawlins JN, Feldon J, and Bannerman DM (1999) Dissociating context and space within the hippocampus: effects of complete, dorsal, and ventral excitotoxic hippocampal lesions on conditioned freezing and spatial learning. *Behav. Neurosci.* **113**:1189-1203.
- Richter-Levin G (2004) The amygdala, the hippocampus and emotional modulation of memory. *The Neuroscientist* **10**:31-39
- Roberson ED and Sweatt JD (1999) A biochemical blueprint for long-term memory. *Learn. Mem.* **6**:381-388.
- Roberts S and Morelos BS (1965) Regulation of cerebral metabolism of amino acids. IV. Influence of amino acid levels on leucine uptake, utilization and incorporation into protein in vivo. *J. Neurochem.* **12**:373-387.
- Rogan MT, Staubli UV, and Ledoux JE (1997) Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature* **390**:604-607.
- Romanski LM, Clugnet MC, Bordi F, and Ledoux JE (1993) Somatosensory and auditory convergence in the lateral nucleus of the amygdala. *Behav. Neurosci.* **107**:444-450.
- Routtenberg A and Rekart JL (2005) Post-translational protein modification as the substrate for long-lasting memory. *Trends Neurosci.* **28**:12-19.
- Rudy JW and Sutherland RJ (1989) The hippocampal formation is necessary for rats to learn and remember configural discriminations. *Behav. Brain Res.* **34**:97-109.

- Rudy JW, Huff NC, and Matus-Amat P (2004) Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. *Neurosci.Biobehav.Rev.* **28**:675-685.
- Sagerstrom CG, Sun BI, and Sive HL (1997) Subtractive cloning: past, present, and future. *Annu.Rev.Biochem.* **66**:751-783.
- Sandberg R, Yasuda R, Pankratz DG, Carter TA, Del Rio JA, Wodicka L, Mayford M, Lockhart DJ, and Barlow C (2000) Regional and strain-specific gene expression mapping in the adult mouse brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**:11038-11043.
- Sanes JR and Lichtman JW (1999) Can molecules explain long-term potentiation? *Nat.Neurosci.* **2**:597-604.
- Schachner M (1997) Neural recognition molecules and synaptic plasticity. *Curr.Opin.Cell Biol.* **9**:627-634.
- Schafe GE, Nadel NV, Sullivan GM, Harris A, and Ledoux JE (1999) Memory consolidation for contextual and auditory fear conditioning is dependent on protein synthesis, PKA, and MAP kinase. *Learn.Mem.* **6**:97-110.
- Schafe GE and Ledoux JE (2000) Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. *J.Neurosci.* **20**:RC96.
- Scoville WB and Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* **20**:11-21.
- Sejnowski TJ (1999) The book of Hebb. *Neuron* **24**:773-776.
- Sheng M, McFadden G, and Greenberg ME (1990) Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* **4**:571-582.
- Shi SH, Hayashi Y, Petralia RS, Zaman SH, Wenthold RJ, Svoboda K, and Malinow R (1999) Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science* **284**:1811-1816.
- Shimizu E, Tang YP, Rampon C, and Tsien JZ (2000) NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science* **290**:1170-1174.
- Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, and Gould E (2001) Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* **410**:372-376.
- Shors TJ, Townsend DA, Zhao M, Kozorovitskiy Y, and Gould E (2002) Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus* **12**:578-584.
- Silva AJ, Giese KP, Fedorov NB, Frankland PW, and Kogan JH (1998) Molecular, cellular, and neuroanatomical substrates of place learning. *Neurobiol.Learn.Mem.* **70**:44-61.

- Simsek-Duran F, Linden DJ, and Lonart G (2004) Adapter protein 14-3-3 is required for a presynaptic form of LTP in the cerebellum. *Nat.Neurosci.* **7**:1296-1298.
- Singewald N (2006) Altered brain activity processing in high-anxiety rodents revealed by challenge paradigms and functional mapping. *Neurosci.Biobehav.Rev.*
- Solomon PR, Vander Schaaf ER, Thompson RF, and Weisz DJ (1986) Hippocampus and trace conditioning of the rabbit's classically conditioned nictitating membrane response. *Behav.Neurosci.* **100**:729-744.
- Sokoloff L (1992) Imaging techniques in studies of neuronal functions. In: Advances in metabolic mapping techniques for brain imaging of behavioural and learning functions (Ed. Gonzalez-Lima F, Finkenstadt TH, Scheich H) Boston: Kluwer Academic
- Sousa N, Almeida OF, and Wotjak CT (2006) A hitchhiker's guide to behavioral analysis in laboratory rodents. *Genes Brain Behav.* **5 Suppl 2**:5-24.
- Squire L, Geller A, Jarvik, ME (1970) Habituation and activity as affected by cycloheximide. *Commun.Behav.Biol.* **5**: 249-254
- Squire LR, Kuczenski R, and Barondes SH (1974) Tyrosine hydroxylase inhibition by cycloheximide and anisomycin is not responsible for their amnesic effect. *Brain Res.* **82**:241-248.
- Squire LR and Barondes SH (1976) Amnesic effect of cycloheximide not due to depletion of a constitutive brain protein with short half-life. *Brain Res.* **103**:183-189.
- Squire LR, Stark CE, and Clark RE (2004) The medial temporal lobe. *Annu.Rev.Neurosci.* **27**:279-306.
- Squire LR and Zola-Morgan S (1991) The medial temporal lobe memory system. *Science* **253**:1380-1386.
- Steckler T (2001) Using signal detection methods for analysis of operant performance in mice. *Behav.Brain Res.* **125**:237-248.
- Steckler T, Drinkenburg WH, Sahgal A, and Aggleton JP (1998a) Recognition memory in rats--I. Concepts and classification. *Prog.Neurobiol.* **54**:289-311.
- Steckler T, Drinkenburg WH, Sahgal A, and Aggleton JP (1998b) Recognition memory in rats--II. Neuroanatomical substrates. *Prog.Neurobiol.* **54**:313-332.
- Steckler T, Sahgal A, Aggleton JP, and Drinkenburg WH (1998c) Recognition memory in rats--III. Neurochemical substrates. *Prog.Neurobiol.* **54**:333-348.
- Stiedl O, Birkenfeld K, Palve M, and Spiess J (2000) Impairment of conditioned contextual fear of C57BL/6J mice by intracerebral injections of the NMDA receptor antagonist APV. *Behav.Brain Res.* **116**:157-168.
- Sullivan GM, Coplan JD, Kent JM, and Gorman JM (1999) The noradrenergic system in pathological anxiety: a focus on panic with relevance to generalized anxiety and phobias. *Biol.Psychiatry* **46**:1205-1218.

Suzuki T (1996) Messengers from the synapses to the nucleus (MSNs) that establish late phase of long-term potentiation (LTP) and long-term memory. *Neurosci.Res.* **25**:1-6.

Tanapat P, Hastings NB, Rydel TA, Galea LA, and Gould E (2001) Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. *J.Comp Neurol.* **437**:496-504.

Tang J, Wotjak CT, Wagner S, Williams G, Schachner M, and Dityatev A (2001) Potentiated amygdaloid auditory-evoked potentials and freezing behavior after fear conditioning in mice. *Brain Res.* **919**:232-241.

Tomba P and Friedrich P (1998) Synaptic metaplasticity and the local charge effect in postsynaptic densities. *Trends Neurosci.* **21**:97-102.

Tsien JZ, Huerta PT, and Tonegawa S (1996) The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* **87**:1327-1338.

Turrigiano GG, Leslie KR, Desai NS, Rutherford LC, and Nelson SB (1998) Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature* **391**:892-896.

Ungar, G (1973/74) Der molekulare Code des Gedächtnisses. In: Mannheimer Forum 73/74. Ein Panorama der Wissenschaften (Ed. Ditfurth H.) Mannheim: Mannheimer Morgen GmbH

Uttal, WR (2001). The new phrenology: the limits of localizing cognitive processes in the brain, Sect. 1. Cambridge, KA: The MIT Press

van Praag H, Kempermann G, and Gage FH (2000) Neural consequences of environmental enrichment. *Nat.Rev.Neurosci.* **1**:191-198.

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, and Kinzler KW (1995) Serial analysis of gene expression. *Science* **270**:484-487.

Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM, Walz R, Medina JH, and Izquierdo I (2000) Short- and long-term memory: differential involvement of neurotransmitter systems and signal transduction cascades. *An.Acad.Bras.Cienc.* **72**:353-364.

von Bechterew, W (1900) Demonstration eines Gehirns mit Zerstörung der vorderen und inneren Teile. *Neurologisch.Zentralbl.* **19**, 990-991

von Linstow-Roloff E and Platt B (1999) Biochemical dysfunction and memory loss: the case of Alzheimer's dementia. *Cell Mol.Life Sci.* **55**:601-616.

Wallenstein GV, Eichenbaum H, and Hasselmo ME (1998) The hippocampus as an associator of discontinuous events. *Trends Neurosci.* **21**:317-323.

Washburn MP, Wolters D, and Yates JR, III (2001) Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat.Biotechnol.* **19**:242-247.

- Watanabe T, Radulovic J, Spiess J, Natt O, Boretius S, Frahm J, and Michaelis T (2004) In vivo 3D MRI staining of the mouse hippocampal system using intracerebral injection of MnCl<sub>2</sub>. *Neuroimage*. **22**:860-867.
- Weitemier AZ and Ryabinin AE (2004) Subregion-specific differences in hippocampal activity between Delay and Trace fear conditioning: an immunohistochemical analysis. *Brain Res*. **995**:55-65.
- Wilensky AE, Schafe GE, and Ledoux JE (1999) Functional inactivation of the amygdala before but not after auditory fear conditioning prevents memory formation. *J.Neurosci*. **19**:RC48.
- Wills TJ, Lever C, Cacucci F, Burgess N, and O'Keefe J (2005) Attractor dynamics in the hippocampal representation of the local environment. *Science* **308**:873-876.
- Wiltgen BJ, Sanders MJ, Anagnostaras SG, Sage JR, and Fanselow MS (2006) Context fear learning in the absence of the hippocampus. *J.Neurosci*. **26**:5484-5491.
- Winder DG and Schramm NL (2001) Plasticity and behavior: new genetic techniques to address multiple forms and functions. *Physiol Behav*. **73**:763-780.
- Winder DG and Sweatt JD (2001) Roles of serine/threonine phosphatases in hippocampal synaptic plasticity. *Nat.Rev.Neurosci*. **2**:461-474.
- Witter MP (1986) A survey of the anatomy of the hippocampal formation, with emphasis on the septotemporal organization of its intrinsic and extrinsic connections. *Adv.Exp.Med.Biol*. **203**:67-82.
- Wotjak CT (2005) Learning and memory. *Handb.Exp.Pharmacol*. 1-34.
- Xing J, Ginty DD, and Greenberg ME (1996) Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* **273**:959-963.
- Yamada K, Mizuno M, and Nabeshima T (2002) Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. *Life Sci*. **70**:735-744.
- Young SL, Bohenek DL, and Fanselow MS (1994) NMDA processes mediate anterograde amnesia of contextual fear conditioning induced by hippocampal damage: immunization against amnesia by context preexposure. *Behav.Neurosci*. **108**:19-29.
- Yuste R and Bonhoeffer T (2001) Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu.Rev.Neurosci*. **24**:1071-1089.
- Zhao X, Lein ES, He A, Smith SC, Aston C, and Gage FH (2001) Transcriptional profiling reveals strict boundaries between hippocampal subregions. *J.Comp Neurol*. **441**:187-196.

## Danksagung

Prof. Florian Holsboer danke ich dafür, dass ich dieses interessante Projekt am Max-Planck-Institut für Psychiatrie bearbeiten konnte.

Dr. Carsten Wotjak hat das Projekt angeleitet. Seine Begeisterung an Diskussionen, seine Aufgeschlossenheit gegenüber unkonventionellen Wegen und seine große Unterstützung waren ein fruchtbarer Boden für die Entwicklung eines Doktoranden. Dafür und für alles, was ich in dieser Zeit gelernt habe, danke ich ihm vielmals.

Prof. Rainer Landgraf und Prof. Gerd Schuller haben freundlicherweise die Begutachtung dieser Arbeit übernommen, wofür ich danken möchte.

Prof. Chris Turck war für die Proteomics-Experimente ein kompetenter und verlässlicher Kooperations- und Ansprechpartner. Dafür herzlichen Dank. Auch an seine hilfsbereiten Mitarbeiterinnen Dr. Archana Jacob und Isabel Birg.

Ein großer Dank geht an Dr. Mario Engelmann und Rita Murau (Universität Magdeburg), die die c-Fos Immunhistochemie in die Hand genommen haben.

Vielen Dank an Dr. Jianrong Tang für seine Vorarbeiten zur *trace*-Konditionierung. Vielen Dank an Dr. Heike Blaudzun (AG Lutz), die mir bei der *In situ*-Hybridisierung behilflich war. Vielen Dank auch an Dr. Theo Rein für die Gespräche und Anregungen zu den *Western Blots* (die aber noch eine Weile „inkubieren“ müssen).

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die Aufgeschlossenheit und das gute Klima - besonders bedanken möchte ich mich bei meinen geschätzten Büro-Kolleginnen: Ursula Habersetzer und Martina Reents (für ihre Kollegialität und Unterstützung), Sabine Heitzer (zu der Zeit, als sie ihr

Praktikum machte, war sie auch wegen ihrer engagierten Mithilfe sehr geschätzt), Dr. Konny Kamprath (sie lüftete so manche Geheimnisse, die die Neurobiologie gerade zu Beginn meiner Arbeit in sich barg) und Ania Mederer (sie hat nicht nur große Teile der experimentellen Arbeit geschultert, sondern gegebenenfalls auch mich, wenn mich mal wieder unerwartete Ergebnisse ins Wanken brachten. Herzlichen Dank dafür!).

Vor dem Wanken bewahrt haben mich außerdem meine lieben Freunde: Corinna, David, Eva und Christian, Martin, Sabrina. Und L.S.. Danke, dass ihr da wart...

Dass ich meinen Weg bis zur Abgabe dieser Arbeit gehen konnte, verdanke ich aber ganz besonders meinen Eltern, die mich zu allen Zeiten sehr unterstützt und gefördert haben.

## **Lebenslauf**

---

### **Kontakt:**

Klaus Wanisch  
Max-Planck-Institut für Psychiatrie - AG Wotjak  
Kraepelinstraße 2  
80804 München

Telefon (Büro): +49-89-30622-604  
E-Mail (privat): klaus.wanisch@gmx.de

### **Persönliche Daten:**

Geburtsdatum: 23. Oktober 1976  
Geburtsort: Straubing  
Nationalität: deutsch

### **Ausbildung:**

1982-1995 Grundschule und Gymnasium (St.-Michaels-Gymnasium, Metten).

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1996-2002 Studium der Biologie (Universität Regensburg)

Hauptfach: Medizinische Mikrobiologie

Nebenfächer: Biochemie, Organische Chemie

Thema der Diplomarbeit: „Untersuchungen zum Einfluss von rekombinanten p6\*-Varianten auf die Aktivität der HIV-1 Protease *in vitro*“.

Abschluss: Dipl. biol.

2002-2006 Doktorarbeit (Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München)

Thema der Doktorarbeit: „Untersuchungen zur Proteinbiosynthese bei hippocampusabhängigen Lernprozessen der Maus“.

### **Veröffentlichung (Teil aus der vorliegenden Doktorarbeit):**

Wanisch K, Tang J, Mederer A & Wotjak CTW (2005) Trace fear conditioning depends on NMDA receptor activation and protein synthesis within the dorsal hippocampus of mice. *Behav. Brain Res.*, **157**, 63-69

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben. Es wurden nur die ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel verwendet, die an entsprechender Stelle angegeben sind.

Weiterhin erkläre ich, dass ich nicht anderweitig ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen. Die vorliegende Arbeit liegt weder ganz noch in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vor.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Klaus Wanisch