Expression der CRFR-Gene in Antwort auf Stress und Lernen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Georg August Universität zu Göttingen

> vorgelegt von Farahnaz Sananbenesi aus Kermanshah/Iran

> > Göttingen 2003

D7 Referent: Prof. Dr. Hans Joachim Fritz Korreferent: Prof. Dr. Rüdiger Hardeland Tag der mündlichen Prüfung:07.05.2003

Für meinen geliebten Vater

der in Gedanken immer bei mir war und mir die Kraft gab auch schwere Zeiten zu überstehen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Gedächtniskonsolidierung	1
1.2	Pawlowsche Konditionierung: Furchtkonditionierung	3
1.3	Der Hippokampus: septo-hippokampales System	8
1.4	Molekulare Mechanismen der Gedächtniskonsolidierung	12
1.4.1	Der mitogenaktivierte Proteinkinase-Signalweg (MAP-Kinase Signalweg)	15
1.5	Modulation der Gedächtniskonsolidierung durch Stress	18
1.6	Das CRF System	19
1.7	Funktion der CRF Rezeptoren	21
1.8	Zielsetzung der Arbeit	23
2	Material und Methoden	26
2.1	Material	26
2.1.1	Bakterienstamm	26
2.1.2	Plasmide	26
2.1.2.1	PCR®II Vektor	26
2.1.2.2	pBluescript II® Vektor	27
2.1.3	DNA/RNA Längenstandards	29
2.1.4	Chemikalien	29
2.1.5	Enzyme, Antikörper und Peptide	31
2.1.6	Sonstige Materialien und Geräte	32
2.1.7	Nährmedien	34
2.1.8	Lösungen und Puffer	34
2.1.9	Versuchstiere	35
2.2	Methoden	36
2.2.1	Immobilisationsstress	36
2.2.2	Entnahme von Hirngewebe	36
2.2.3	Kultivierung und Lagerung von E. coli	36
2.2.4	Transformation von E. coli	36
2.2.5	Isolierung von PolyA+RNA aus Hirngewebe	37
2.2.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	38
2.2.7	Fällung von Nukleinsäuren mit Ethanol	39
2.2.8	Agarose-Gelelektrophorese	40
2.2.9	cDNA Synthese	41
2.2.10	Aufreinigung von DNA	41
2.2.11	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	42
2.2.12	Plasmidisolierung (Mini/Midi-Präparation)	43
2.2.13	Ligation doppelsträngiger DNA	43
2.2.14	Polymerase Kettenreaktion; PCR	44

2.2.15	Durchführung einer semiquantitativen PCR	46
2.2.16	Sequenzierung von DNA	47
2.2.17	Auftrennen von RNA in einem Formaldehydgel	48
2.2.18	Herstellung von mit Digoxigenin-UTP markierten cRNA Sonden	49
2.2.19	In situ Hybridisierung	51
2.2.20	Isolierung von Proteinen aus Hirngewebe	52
2.2.21	Isolierung von nativen Proteinen aus Hirngewebe	52
2.2.22	Isolierung von Kernproteinen aus Hirngewebe	53
2.2.23	Vermessung von Proteinen	54
2.2.24	Immunopräzipitation von Proteinen	54
2.2.25	Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
2.2.26	Proteintransfer auf PVDF Membranen	56
2.2.27	Immunologische Detektion von Proteinen auf PVDF-Membranen	57
	(Western Blot; Immunoblot)	
2.2.28	Quantifizierung von Western Blots	58
2.2.29	Immunohistochemische Analyse von Proteinen	59
2.2.29.1	Perfusion	59
2.2.29.2	Hirnschnitte	60
2.2.29.3	Immunodetektion	60
2.2.29.4	Immunohistochemische Co-immunodetektion (Doppelfärbung)	61
2.2.29.5	Mikroskopie	62
2.2.30	Verhaltensexperimente	63
2.2.30.1	Kontextabhängige Furchtkonditionierung	63
2.2.30.2	Tonabhängige Furchtkonditionierung	64
2.2.31	Injektion von Lösungen in den Hippokampus	65
2.2.32	Statistische Analyse	66
3	Ergebnisse	67
3.1	Der hippokampale MAP Kinase Weg wird durch Furchtkonditionierung aktiviert	67
3.2	Hippokampale Lokalisation von pErk-1/2 und pElk-1 nach	71
	kontextabhängiger Furchtkonditionierung	
3.3	Hippokampale Interaktion von pErk-1/2 und pElk-1	74
3.4	Produktion und Lokalisation des pErk-1/2 Substrats pp90Rsk-1 nach	78
	Furchtkonditionierung	
3.5	Hippokampale PKA vermittelt die Furchtkonditionierung und die	81
	Aufregulation von pElk-1, pErk-1/2 und pp90Rsk-1	
3.6	Septaler CRFR2 inhibiert die Furchtkonditionierung in C57BL6J Mäusen	84
3.7	Produktion von pErk-1/2 und pp90Rsk-1 im Hippokampus von CRFR2	85
	knock out Mäusen	
3.8	Einfluss von septalem CRFR2 auf den hippokampalen pErk-1/2, pElk-1 und pp90Rk-1 Gehalt	87

3.9	Septaler CRFR2 inhibiert den hippokampalen MAP Kinase Weg in Balb/c	89
	Mäusen	
3.10	Aktivierung des hippokampale MAP Kinase Weg nach	92
	Fuchtkonditionierung und stress-verbesserter Furchtkonditionierung in	
-	Balb/c Mäusen	
3.11	Hippokampale pMek-1/2 vermittelt stress-verbesserte	95
	Furchtkonditionierung	
3.12	Einfluss von Proteinkinase A auf den hippokampalen pErk-1/2 Gehalt in	99
	Balb/c Mäusen.	
3.13	Expression hippokampaler CRF Rezeptoren in Balb/c Mäusen nach	102
2.1.4	Immobilisatiosstress	107
3.14	Einfluss hippokampaler CRF Rezeptoren auf den pMek-1/2 und pErk-1/2	107
2.15	Genalt	100
5.15	Finfluge ouf die Eurobelvon die gewene von Delt /a Mäusen, reguliert	109
	indech deren stress vermittelte Verbesserung	
3 16	Pharmakologische Inhibition von hippokampalem CRER2 moduliert den	112
5.10	hippkampalen Gehalt von pMek-1/2 und pErk-1/2 nur nach stress-	112
	verbesserter Furchtkonditionierung	
3.17	Urocortin III moduliert die Furchtkonditionierung und den hippokampalen	115
0.17	pMek-1/2 und pErk-1/2 Gehalt	110
4	Diskussion	118
41	Kritische Betrachtung des Arbeitsansatzes	118
4.2	Der hippokampale MAP Kinase Signalweg wird in C57BL/6J Mäusen	119
	durch assoziatives Lernen reguliert	
4.3	Septaler CRFR2 reguliert assoziatives Lernen durch tonische Inhibierung	124
	des hippokampalen MAP Kinase Signal Wegs in C57BL/6J und Balb/c	
	Mäusen	
4.4	Hippokampaler CRFR2 reguliert stress-verbessertes assoziatives Lernen in	127
	Balb/c Mäusen und aktiviert den hippokampalen MAP Kinase Signalweg	
5	Zusammenfassung und Abschließende Betrachtung	135
6	Literatur	139
Danksagung		159
Lebenslauf		160

Abkürzungen

А	Adenin
Abb	Abbildung
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Zelsius
С	Cytosin
ca.	Zirka
cDNA	komplementäte (engl.: copy) DNA
CRF	Corticortopin releasing Faktor
db	Dezibel
DEPC	Diethyl Pyrocarbonat
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
ddNTP	Didesoxy-Nukleotide
dNTP	Desoxy-Nukleotide
ds	Doppelsträngig
DTT	D, L-Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
i.h.	Intrahippokampale Injektion
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
1	Liter
lacZ	lacZ Gen kodierend für die ß Galaktosidase
Μ	Molar
mM	Millimolar
mm	Millimeter
max	
	Maximal
mg	Maximal Milligramm
mg min	Maximal Milligramm Minute
mg min ml	Maximal Milligramm Minute Milliliter
mg min ml μg	Maximal Milligramm Minute Milliliter Mikrogram
mg min ml μg μl	Maximal Milligramm Minute Milliliter Mikrogram Mikroliter

OD	Optische Dichte
ori	Replikationsursprung (engl.: origin of replication)
p.A	Für die Analyse
PVN	paraventrikulärer Nukleus
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
S	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
S.F.	Standardfehler
SPL	Schalldruckpegel
SS	Einzelstrang
Т	Thymidin
TRIS	N, N, N´, N´- Tetramethylethylendiamin
U	Einheit für Enzymaktivität (Unit)
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehung pro Minute
V	Volt
VS	versus; gegen
v/w	Volumen pro Gewicht
v/v	Volumen pro Volumen
Vol	Volumen
X-Gal	Substrat der ß-Laktamase
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Die Gedächtniskonsolidierung

Das Gedächtnis ist eines der beachtenswertesten Phänomene in der Natur. Der Gedächtnisspeicher umfaßt z.B. den Wortschatz, das gesamte Faktenwissen, die Lebenserfahrungen, sowie alle erworbenen motorischen Fähigkeiten eines Menschen. Man kann das Gedächtnis grob in "Kurzzeitgedächtnis" und "Langzeitgedächtnis" differenzieren. Gründliche Untersuchungen am Menschen zeigten, dass das Kurzzeitgedächtnis sehr flüchtig ist und innerhalb von zehn Sekunden praktisch auf Null zusammenschrumpft. Außerdem verfügt das Kurzzeitgedächtnis nur über eine sehr begrenzte Aufnahmekapazität. Es kann bis zu ungefähr sieben Details einer völlig neuen Information, etwa eine Telefonnummer, fassen. Anders verhält es sich mit dem Langzeitgedächtnis. Durch wiederholte Präsentation eines Reizes kann eine entsprechende Information in das Langzeitgedächtnis gelangen, wo sie dann in der Regel das ganze Leben lang abrufbar ist. Beispiele sind z.B. das Erlernen einer Sprache oder komplizierter Bewegungsabläufe, wie z.B. das Klavierspielen. Ist die mit dem Reiz verbundene Information für den Organismus besonders wichtig, reicht aber unter Umständen eine einmalige Präsentation aus, um die Information im Langzeitgedächtnis zu speichern. Auch scheint die Aufnahmekapazität des Langzeitgedächtnisses prinzipiell kaum begrenzt zu sein.

Es ist offensichtlich, dass Lernen, Gedächtnis und Erinnerungsvermögen in engem Zusammenhang stehen. Im Allgemeinen wird das Lernen als eine durch Erfahrung bewirkte, adaptive Veränderung im Verhalten definiert (Thompson, 1994). Unter Lernen versteht man also die Speicherung von Informationen, einen Prozess der auch als Gedächtniskonsolidierung beschrieben wird. Ist die Information "gelernt", also im Gedächtnis gespeichert, kann diese bei Bedarf zur gezielten Verhaltenssteuerung abgerufen werden (Abb.1.1).



Abb.1.1 Schematische Darstellung der Gedächtniskonsolidierung.

Bestimmte Reize (schwarz) aus der Umwelt veranlassen den Organismus mit einem bestimmten Verhalten zu reagieren. Dabei gelangt die mit dem Reiz verbundene Information in das Kurzzeitgedächtnis und kann von dort unter Umständen in das Langzeitgedächtnis gelangen, von wo sie dann prinzipiell für immer abrufbar ist. Die Abspeicherung einer Information im Langzeitgedächtnis nennt man auch Gedächtniskonsolidierung. Wird nun derselbe oder ein ähnlicher Reiz (rot) vom Organismus erkannt, kann die Information im Langzeitgedächtnis durch Erinnern abgerufen werden, was zu einem veränderten Verhalten führen kann. In der Regel ist das veränderte Verhalten der Umwelt besser angepasst als zuvor, weshalb die Fähigkeit zur Gedächtniskonsolidierung einen enormen evolutiven Vorteil darstellt.

Bei fast allen Organismen sind solche adaptiven Verhaltensänderungen, d.h. Lernvorgänge bzw. Gedächtniskonsolidierung das ganze Leben lang möglich. Die einfachste Form von Lernen ist die Habituation, die Fähigkeit sich an einen wiederholt dargebotenen Reiz zu gewöhnen. Das äußert sich in der Abnahme einer Reaktion auf den dargebotenen Reiz. Habituation kommt von der Seeanemone bis zum Menschen vor. Seeanemonen krümmen z.B. ihre Tentakel nach mechanischer Reizung. Wird dieser Reiz mehrmals hintereinander mit gleicher Intensität präsentiert läßt die Reaktion nach (Dethier und Stellar, 1970). Der größte Teil der Lernvorgänge von einfachen Organismen bis hin zum Mensch zählt jedoch zum sogenannten assoziativen Lernen. Assoziatives Lernen bedeutet, dass Ereignisse, die dazu neigen zeitlich zusammenzutreffen, vom Gehirn miteinander verknüpft werden. Dieses zeitliche Zusammentreffen nennt man auch Kontinguität. Die Organismen lernen zwei Reize miteinander zu verknüpfen. Es gibt dabei klare biotische Zwänge, die gelernt werden müssen. Ratten oder Mäuse z.B. lernen sehr schnell sich in einem Labyrinth zu orientieren, um Futter zu finden oder aber eine Umgebung mit einer unangenehmen Erfahrung zu verbinden. Situationen also, die der normalen Umwelt entsprechen. Assoziatives Lernen ist demnach für alle Organismen ein wichtiges System, um ursächliche Zusammenhänge in deren Umwelt zu erkennen. Eine spannende Aufgabe der Neurowissenschaften ist es daher herauszufinden, wie assoziatives Lernen funktioniert, d.h. herauszufinden, wie es die Milliarden von Neuronen eines Gehirns schaffen, eine Information im Langzeitgedächtnis zu speichern. In den letzten Jahren haben vor allem Versuche mit Nagetieren dazu beigetragen einen kleinen Einblick in das Phänomen "Gedächtniskonsolidierung" zu gewähren.

1.2 Pawlowsche Konditionierung: Furchtkonditionierung

Mittlerweile sind ein Reihe von Tests etabliert, die dazu dienen Lernen in Mäusen quantitativ zu messen (Decker et al., 1990; Fanselow, 1998; Gerlai, 2001; Maren, 2001). Andererseits konnten in *in vitro* Systemen verschiedenen Mechanismen aufgeklärt werden, die für Lernen und Gedächtnis von Bedeutung sein könnten (Schmidt, 1995, Baudry, 1998). Um Lernvorgänge und Gedächtnis letztlich zu verstehen ist es allerdings unerlässlich verhaltens- und molekularbiologische Fragestellungen direkt miteinander zu verknüpfen. Hierfür eignet sich besonders die Furchtkonditionierung (Blanchard und Blanchard, 1969). Dabei handelt es sich um eine klassische assoziative Konditionierung bei der zwei Reize miteinander verknüpft werden. Solche Konditionierungen wurden erstmals von dem russischen Physiologen Ivan Pawlow beschrieben (Pawlow, 1903). Bei der Furchtkonditionierung von Mäusen, werden die Tiere zunächst trainiert, d.h. sie werden für eine bestimmte Zeit in eine für sie neue Umgebung (den

Kontext) gebracht. In der Regel besteht dieser Kontext aus einer Versuchsbox mit definierten Licht-, Geräusch- und Geruchsverhältnissen. Außerdem befindet sich in der Versuchsbox ein Metallgitter, über welches den Tieren ein elektrischer Fußschock verabreicht werden kann. Die Maus erhält dann zunächst die Möglichkeit den neuen Kontext zu erkunden (meist 180 s), wobei sie überaus aktiv ist und den gesamten Kontext untersucht. Anschließend erhält sie über das Fußgitter einen milden Elektroschock (in dieser Arbeit: 2 s, 0,7 mA) und wird dann zurück in ihren "Wohnkäfig" gebracht. Die Maus assoziiert nun den Kontext mit der unangenehmen Erfahrung des Elektroschocks. Die Furchtkonditionierung ist also ein typischer Prozess des assoziativen Lernens, wobei der Kontext den konditionierten, und der Elektroschock den unkonditionierten Reiz darstellt. Um den Lernerfolg der Maus quantitativ zu erfassen, wird 24 h später ein Gedächtnistest durchgeführt. Hierzu wird die Maus erneut in die Versuchsbox gesetzt. Sie zeigt nun ein vollkommen anderes Verhalten gegenüber dem Trainingstag. Sie bewegt sich kaum und verharrt meist bis auf Herzschlag und Atmung regungslos an einer Stelle. Dieses Verhalten wird als "Erstarren" (engl.: Freezing) bezeichnet. Es handelt sich dabei um ein natürliches Verhalten von Nagetieren, die Furcht zeigen. Das Erstarren wird während des Gedächtnistests gemessen und stellt ein Maß für assoziatives Lernen dar. Im Gedächtnistest werden die Tiere in der Regel für den gleichen Zeitraum in die Versuchsbox gesetzt, wie während des Trainings (180 s). Alle 10 s wird dabei von zwei Beobachtern, von denen einer nicht in das Experiment eingeweiht ist, das Verhalten der Maus bestimmt, d.h. es wird notiert, ob die Maus erstarrt oder nicht. Wichtig ist, dass die Maus nur dann während des Gedächtnistests erstarrt, wenn sie den Kontext mit dem Elektroschock assoziiert hat. Dieses konnte durch einfache Kontrollexperimente gezeigt werden (Milanovic et al., 1998), die im folgenden kurz erläutert werden sollen. Erhält die Maus während des Trainings keinen Elektroschock, zeigt sie während des Gedächtnistests auch kein Erstarren (Kontext-Gruppe). In einem weiteren Kontrollexperiment erhält die Maus den Elektroschock unmittelbar dann, wenn sie während des Trainings in den Kontext gesetzt wird, und kann diesen erst anschließend erkunden (SchockKontext-Gruppe). Tiere dieser Schock-Kontext Gruppe zeigen im Gedächtnistest ebenfalls kein Erstarren. Assoziatives Lernen findet nämlich nur dann statt, wenn der unkonditionierte Reiz nach dem konditionierten Reiz präsentiert wird. Für die Furchtkonditionierung gilt daher, dass eine Assoziation von Kontext und Elektroschock nur stattfindet, wenn der Kontext vor dem Elektroschock präsentiert wird und nicht umgekehrt. Typische Ergebnisse einer Furchtkonditionierung sind in Abb. 1.2.1 dargestellt.



Abb. 1.2.1 Furchtkonditionierung von Mäusen.

A. Mittels der Furchtkonditionierung kann assoziatives Lernen quantitativ gemessen werden. Hierzu wird die Maus während des Trainings (links) für 180 s in eine Versuchsbox gesetzt, die für sie einen neuen Kontext darstellt. Anschließend erhält sie für 2 s einen milden elektrischen Fußschock (ES). Die Maus lernt nun assoziativ, dass der Kontext die unangenehme Erfahrung des Fußschock beinhaltet, was als Gedächtniskonsolidierung bezeichnet wird. Wird die Maus 24 h später zum Gedächtnistest (rechts) erneut in den Kontext (180 s) gebracht, reagiert sie daher mit der aversiven Verhaltensweise des Erstarrens, einem angeborenen Verhalten von Nagetieren, die Furcht haben. Das Erstarren gilt als Maß für assoziatives Lernen und wird während des dreiminütigen Gedächtnistests alle 10 s von zwei Beobachtern gemessen. Hierbei wird notiert, ob die Maus in diesem Augenblick erstarrt oder nicht. Das Erstarren wird dann als Prozentwert in Form eines Balkendiagramms angegeben. Während die Maus im Training kein Erstarren zeigt, liegt das Erstarren einer Maus, die gelernt hat, typischerweise bei 50-60%, wobei dieser Wert für verschiedene Mausstämme unterschiedlich sein kann. Die Maus erstarrt nur dann im Gedächtnistest, wenn sie assoziativ gelernt hat, dass dem Kontext die unangenehme Erfahrung des Elektroschocks folgt. Kontrollexperimente werden durchgeführt, in dem die Maus während des Trainings keinen Fußschock (B) oder den Fußschock unmittelbar dann erhält, wenn sie in den Kontext gesetzt wird (C). Beide Experimente resultieren nicht in Erstarren während des Gedächtnistests. D. Fotografie einer für die Furchtkonditionierung verwendeten Versuchsbox, während des Trainings einer Maus des Zuchtstammes C57BL/6J.

Die bisher beschriebene Furchtkonditionierung wird auch als kontextabhängige

Furchtkonditionierung bezeichnet, da die Tiere den Kontext mit dem Elektroschock assoziieren. Daneben gibt es auch eine tonabhängige Furchtkonditionierung. Die tonabhängige Furchtkonditionierung ist zunächst der kontextabhängigen Furchtkonditionierung ähnlich, mit dem Unterschied, dass nach der dreiminütigen Erkundungsphase des für die Maus neuen Kontexts, nicht unmittelbar der Elektroschock folgt, sondern zunächst für 30 s ein Ton präsentiert wird. Die Maus assoziiert nun sowohl den Kontext, als auch den Ton mit der unangenehmen Erfahrung des Elektroschocks. Strenggenommen stellt die tonabhängige Furchtkonditionierung also lediglich eine Erweiterung der kontextabhängigen Furchtkonditionierung dar. Der Gedächtnistest der tonabhängigen Fuchtkonditionierung besteht allerdings daraus, die Maus in eine neue Versuchsbox zu setzten, die sich deutlich von der Trainingsbox unterscheidet. Diese Box stellt für die Maus einen neuen Kontext dar, den sie erkundet. Wird in diesem neuen Kontext nun der Ton präsentiert, zeigt die Maus die Verhaltensweise des Erstarrens, was bedeutet, dass der Ton mit dem Elektroschock assoziiert wurde (Abb. 1.2.2). Für den Verlauf der Arbeit ist wichtig festzuhalten, dass unterschiedliche Gehirnstrukturen die kontext- bzw. tonabhängige Furchtkonditionierung vermitteln (siehe hierzu auch 1.3). So ist der Hippokampus zwar für die kontext- nicht aber für die tonabhängige Furchtkonditionierung wichtig. Letztere wird durch die Amygdala, die wie der Hippokampus eine Struktur des limbischen Systems ist, reguliert (Kim und Fanselow, 1992; Fanselow und Ledoux, 1999).



Abb.1.2.2 Tonabhängige Furchtkonditionierung

Der Unterschied zur kontextabhängigen Furchtkonditionierung besteht darin, dass der Maus bei der tonabhängigen Furchtkonditionierung nach der Gelegenheit die Versuchsbox, d.h. den neuen Kontext (Kontext 1) für 180 s zu erkunden, zunächst ein Ton (30 s) präsentiert wird, bevor der elektrische Fußschock (ES) folgt. Die Maus assoziiert nun sowohl den Kontext, als auch den Ton mit der unangenehmen Erfahrung des Fußschocks. Zum Gedächtnistest wird die Maus für 360 s in einen für sie neuen Kontext gesetzt (Kontext 2), der sich deutlich von Kontext 1 unterscheidet. Sie kann diesen Kontext 2 zunächst für 180 s erkunden, wobei sie kein Erstarren zeigt. Wird nun für die restlichen 180 s der Ton präsentiert, zeigt die Maus das Erstarren, was als Maß für assoziatives Lernen gemessen werden kann.

Der große Vorteil der Furchtkonditionierung liegt in der Tatsache begründet, dass die Tiere mit nur einem Training einen signifikanten Lernerfolg zeigen. Nur so ist es möglich molekulare Mechanismen des Lernens reproduzierbar *in vivo* zu untersuchen. Zudem konnte in verschiedenen Arbeiten für die Furchtkonditionierung von Mäusen ein definiertes Zeitfenster beschrieben werden, in dem die Gedächtniskonsolidierung stattfindet. Demnach scheint die kritische Phase für ein erfolgreiches Erlernen der Furchtkonditionierung die Zeit der ersten 3 h nach dem Training zu sein (Kim und Fanselow, 1992; Stiedl et al., 2000; Fischer et al., 2002). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Furchtkonditionierung als Lernmodell ausgewählt, um molekularbiologische Fragestellungen zur Gedächtniskonsolidierung zu untersuchen. Häufig für kognitiven Verhaltensmodelle verwendete Mäuse sind Tiere des Zuchtstammes C57BL/6J. Einer Reihe von Arbeiten mit unterschiedliche Lernmodelle zeigten die im Vergleich zu Mäusen des Zuchtstammes Balb/c guten kognitive Fähigkeiten von C57BL/6J Mäusen (Francis et al., 1995, Bao et al., 1998). Es wurde dabei auch beobachtet, dass C57BL/6J Mäuse die Furchtkonditionierung deutlich besser lernen als Mäuse des Zuchtstammes Balb/c (Chen et al., 1996). Im Gegensatz zu C57BL/6J Mäusen zeigen Balb/c Mäuse aber eine deutliche Verbesserung der Furchtkonditionierung, wenn sie 3 h vor dem Training einem akuten Stress ausgesetzt wurden (Radulovic et al., 1999).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für die vorliegende Arbeit C57BL/6J Mäuse als Modellorganismus für die Furchtkonditionierung und Balb/c Mäuse als Modellorganismus für stressmodulierte Fuchtkonditionierung ausgewählt.

1.3 Der Hippokampus: septo-hippokampales System

Das Gehirn ist nicht nur eine Ansammlung von Neuronen, die miteinander zu einem weitverzweigten Netzwerk verknüpft sind. Vielmehr besteht es aus anatomisch und funktionell differenzierbaren Einheiten, wie z.B. dem Cortex oder dem Cerebellum. Vereinfacht stellt man sich den Aufbau des Gehirns so vor, dass eine bestimmte Hirnregion aus Interneuronen besteht, die eine durch zuleitende (afferente) Neuronen eingehende Information verarbeiten und über wegleitenden (efferente) Neuronen an eine andere Hirnregion weitergeben (Abb. 1.3.1).



Abb. 1.3.1 Schematische Darstellung des Aufbaus einer Hirnregion

Eine Information erreicht eine Hirnregion über afferente Fasern von Neuronen einer anderen Hirnregion. Innerhalb der Hirnregion sind Interneurone über zahlreiche Synapsen miteinander verschaltet, wodurch die Information verarbeitet und modifiziert werden kann. Über die efferenten Fasern eines Neurons dieser Region kann die Information dann an eine andere Hirnregion weitergegeben werden.

Eine solche Hirnregion ist auch der Hippokampus, der zu dem evolutiv sehr alten limbischen System gehört, welches vor allem an der Regulation von Emotionen und Lernvorgängen beteiligt ist. Seinen Namen verdankt der Hippokampus frühen Anatomen, die sich bei seiner Gestalt an Seepferdchen (Hippokampus) erinnert fühlten. Der erste Hinweis darauf, dass der Hippokampus an der Gedächtniskonsolidierung beim Menschen beteiligt ist, geht auf die klassischen Arbeiten von William Scoville und Brenda Milner zurück. Sie beschrieben den Fall eines Patienten, dem sie den Namen H.M. gegeben hatten. Dieser hatte sich aufgrund einer besonders starken Form der Epilepsie dazu entschlossen, den vollständigen Hippokampus chirurgisch entfernen zu lassen, da man herausgefunden hatte, dass unkontrollierte elektrische Entladungen des Hippokampus epileptische Anfälle auslösen können. Zwar verminderte dieser drastische Eingriff die Symptome der Epilepsie, führte aber auch zu anterogarden Amnesie. Der Patient H.M. konnte sich zwar an sein Leben vor der Operation erinnern, jedoch keine neuen Informationen mehr im

Langzeitgedächtnis abspeichern. Sein Kurzzeitgedächtnis war allerdings unbeeinträchtigt. So konnte er sich problemlos mit jemandem unterhalten, erkannte die Person aber nicht wieder, wenn sie für 5 min den Raum verließ und anschließend zurückkam, um das Gespräch fortzusetzen. Ebenso konnte er neue Eigenschaften wie z.B. das Lesen von Spiegelschrift problemlos erlernen. Sobald er allerdings die Übungen unterbrach und später zurückkehrte, mußte er wieder neu beginnen (Scoville und Millner, 1959). Durch Versuche an Nagetieren konnte dann gezeigt werden, dass der Hippokampus für eine Reihe von verschiedenen Lernmodellen essentiell ist (Castro et al., 1989; Marston et al., 1993; Shinjo et al., 1998; Luo et al., 2002). Ein Beispiel hierfür ist die unter 1.2 beschriebene Fuchtkonditionierung. Arbeiten von Michael Fanselow und Mitarbeitern zeigten erstmals, dass der Hippokampus für die kontextabhängige Furchtkonditionierung essentiell ist, für die tonabhängige Furchtkonditionierung jedoch nicht benötigt wird (Kim und Fanselow, 1992). Vielmehr fand man heraus, dass die tonabhängige Furchtkonditionierung durch die Amygdala, einem kleinen Kern, der ebenfalls zum limbischen System gehört, vermittelt wird (Fanselow und Ledoux, 1999). Anatomisch wird der Hippokampus grob in drei Regionen unterteilt: den Fascia dentata (DG, engl.: dentate gyrus) und die Regionen CA1 und CA3.

Eingehende Informationen erhält der Hippokampus vor allem über den DG und die CA3 Region vom Septum, mit dem es über einen dicken Faserstrang, die sogenannte Fornix-Verbindung verknüpft ist. Septum und Hippokampus werden daher oftmals auch als septo-hippokampales System beschrieben. Eine Reihe von Arbeiten weisen darauf hin, dass ein funktionierender Informationsaustausch zwischen Septum und Hippokampus essentiell für die kontextabhängige Furchtkonditionierung ist (Vouimba et al., 1998; Desmedt et al., 1999; Fischer et al., 2002). Auch bestimmte Cortex- und weitere Regionen senden Nervenendigungen in den DG. Die Informationen verlassen den Hippokampus vor allem über die CA3 Region in Richtung Septum. Die CA1 Region entsendet dagegen efferente Fasern in verschiedene Strukturen des Cortex. Intrahippokampal ist der DG über die sogenannten Moosfasern auf die CA3 Region verschaltet, welche wiederum über Fasern, die man als "Schaffer Kollaterale" bezeichnet, auf die CA1 Region projiziert (siehe Franklin und Paxinos (1997): The Rat Nervous System, 2nd Edition, Academic Press; Abb. 1.3.2).



Abb. 1.3.2 Anatomischer Aufbau des Hippokampus von Mäusen.

A. Der Aufbau des Hippokampus einer Maus entspricht im wesentlichen dem des Menschen. Der Hippokamus ist eine telencephale Struktur die zum limbischen System gezählt wird. Er besteht aus drei Regionen, dem Fascia dentata (DG) der über die Moosfaser (mf) in die Region CA3 projiziert, welche über die Fasern der sogenannten "Schaffer Kollateralen" (sk) in die Region CA1 projiziert. **B.** Frontaler Hirnschnitt des Hippokampus einer Maus (Zuchtstamm C57BL/6J) der mit einem Antikörper gegen die Acetycholinesterase gefärbt wurde. **C.** Stark vereinfachte, schematische Darstellung des Hippokampus. Der DG erhält über afferente Fasern vom Septum, Cortex und anderen Regionen Informationen, die über die mf an die CA3 Region weitergeleitet werden. Die CA3 Region projiziert über die sk in die CA1 Region, von wo efferente Fasern in Regionen des Cortex ziehen. Außerdem erhält die CA3 Region über die Fornixverbindung direkten Input vom Septum, wobei diese Verbindung bilateral ist. Abbkürzungen: DG, Fascia dentata; fx, Fornix-Verbindung; mf, Moosfasern; sk, Schaffer Kollaterale; V, mit Lymphe gefülltes Gehirnventrikel.

1.4 Molekulare Mechanismen der Gedächtniskonsolidierung

Karl Lashley war es der Anfang des letzten Jahrhunderts die Suche nach den Spuren des Langzeitgedächtnis einleitete. Als er seine Laufbahn beendete mußte er allerdings folgenden pessimistischen Schluß ziehen: "Alle Ergebnisse sprechen dafür, dass Lernen und Gedächtnis einfach nicht möglich ist, die Praxis zeigt allerdings, dass sie gelegentlich vorkommen" (Lashley, 1950). Glücklicherweise sollte sich seine Aussage nicht bewahrheiten.

Schon 1949 hatten der kanadische Psychologe D. Hebb und sein polnischer Kollege J. Konorski vorgeschlagen, das Lernen und Gedächtnis mit Änderungen der Verschaltungen von Nervenzellen einhergehen müsste (Hebb, 1949). Heute weiß man, dass die von Hebb postulierte Hypothese prinzipiell richtig war. Lernen führt tatsächlich zu einer Veränderung des Neurons, die sowohl das Transkriptom, bzw. das Proteom betreffen, aber auch morphologischer oder elektrophysiologischer Natur sein kann. So wurde in einer Reihe von Arbeiten für verschiedene Lernmodelle inklusive der Furchtkonditionierung gezeigt, dass die Gedächtniskonsolidierung durch Inhibitoren der *de novo* mRNA oder Proteinsynthese gehemmt werden konnte (Flexner et al., 1963; Agranoff, 1967; Davis und Squire, 1984; Rose, 1995). Eine weitere wichtige Entdeckung war die sogenannte Langzeitpotenzierung (LTP).

Neuronen codieren und übermitteln Informationen in Form von elektrischen Impulsen. Diese entstehen infolge eines dynamischen Membranpotentials, welches sich bei den Neuronen der meisten Säuger im Ruhezustand bei -112 mV befindet, jedoch durch die Einwirkung verschalteter Neuronen rasch depolarisiert werden kann, so dass ein sogenanntes Aktionspotential entsteht. Erreicht ein solches Aktionspotential die Axonendigung des Neurons, werden letztlich Neurotransmitter in den synaptischen Spalt freigesetzt, welche an der postsynaptischen Zelle an entsprechenden Rezeptoren, meist Ionenkanäle binden, die sich daraufhin öffnen und Ionen in die Zelle strömen lassen und so eine Umpolarisierung der postsynaptischen Membran bewirken. Auf diese Weise kann eine Information von einem Neuron zu einen anderen gelangen (Zigmond et al., 1999). Dabei kann die Information jedoch modifiziert werden. Eine solche Modifizierung stellt die von Bliss und Lømo entdeckte LTP dar (Bliss und Lømo, 1973). Die Forscher stimulierten hippokampale Neuronen der CA3 Region mit Testreizen und zeichneten den elektrischen Output der CA1 Zellen auf (siehe auch 1.2 und Abb. 1.2). Reizten sie die CA3 Zelle kurzzeitig sehr stark (100 Reize/s = 100 Hertz), antwortete das CA1 Neuron danach auf denselben Testreiz deutlich stärker als zuvor. Diese verstärkte Antwort hielt dabei mehrere Stunden an, was man als LTP bezeichnet. In jüngster Zeit stellte man zudem fest, dass morphologische Veränderungen der Neuronen infolge von LTP oder Lernvorgängen auftreten können. Dabei entstehen, ausgehend von den Dendriten (feine Zellfortsätze des Neurons, an denen es Synapsen mit den Axonendigungen zuführender Neuronen ausbildet) sogenannte postsynaptische Dornen (engl.: dendritic spines), die mit zuführenden Neuronen neue Synapsen ausbilden (Rossum und Hanisch, 1999; Hatada et al., 2000). Es ist zu vermuten, dass für die morphologischen Veränderungen der Neuronen ein dynamisches Zytoskelett verantwortlich ist. Die Fähigkeit eines Neurons, seine Genregulation, als auch seine elektrophysiologischen und morphologischen Eigenschaften in Antwort auf Gedächtniskonsolidierung zu verändern, beschreibt man allgemein als "Synaptische Plastizität". Da die de novo Proteinsynthese für alle oben angeführten Aspekte der synaptischen Plastizität essentiell ist, begann in der Folge die Suche nach den entsprechenden molekularen Signalwegen, d.h. den Genen bzw. Proteinen, die für Gedächtniskonsolidierung unentbehrlich sind. In den letzten Jahren konnten einige Proteine entdeckt werden, die z.B. für die Furchtkonditionierung von Mäusen wichtig sind. Zunächst fand man, dass die Aktivierung bestimmter postsynaptischer Ionenkanäle für den Lernerfolg wichtig ist (Contractor und Heinemann, 2002). Aber auch eine Reihe von metabotropen Rezeptoren, die nicht unmittelbar als Ionenkanal wirken, sondern intrazelluläre Signalwege anschalten und Lernen vermitteln wurden entdeckt (DeBlasi et al., 2001; McGaugh, 2002). Das Wissen um die Komponenten dieser intrazellulären Signalwege ist allerdings noch sehr lückenhaft. So konnte für viele Formen des Lernens die Bedeutung der Proteinkinase A (PKA) Aktivität gezeigt werden (Roberson und Sweatt, 1996; Bourtchouladze et al., 1998). Proteinkinase A kann wiederum den Transkriptionsfaktor Creb (engl.: *cAMP response element binding factor*) phosphorylieren, welcher ebenfalls für Gedächtniskonsolidierung, u.a. die Furchtkonditionierung unerlässlich ist (Kaang et al., 1993; Alberini et al., 1999). Für andere Proteine konnte eine Beteiligung an der Gedächtniskonsolidierung zwar nachgewiesen werden, wobei jedoch noch weitgehend unklar ist, welchen Teil der Signalkette sie darstellen (Fischer et al., 2002, Wong et al., 2002). Somit wird deutlich, dass trotz intensiver Forschung der letzten Jahre, die Aufklärung der intrazellulären Signalwege, die letztlich Gedächtniskonsolidierung vermitteln, nach wie vor eine der wichtigsten, aber auch schwierigsten Aufgaben der Neurobiologie ist.



Abb. 1.4. Stark vereinfachte, schematisierte Darstellung der molekularen Ereignisse während der Gedächtniskonsolidierung.

Die vom präsynaptischen Neuron freigesetzten Neurotransmitter werden von Ionenkanälen der postsynaptischen Zelle erkannt und lösen dort einen elektrischen Impuls aus, indem nun Ionen (I+) in die postsynaptische Zelle strömen können und die Membran depolarisieren. Die Neurotransmitter können auch an metabotrope Rezeptoren binden, die intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren. So werden letztlich Proteinkinasen aktiviert, die u.a. Transkriptionsfaktoren aktivieren, die zu einer veränderten Genexpression (verändertes Transkriptom) führen, was in einem veränderten Proteom resultiert. So können z.B. mehr Ionenkanäle oder metabotrope Rezeptoren produziert werden, was letztlich auch zu einer Änderung der elektrophysiologischen Eigenschaften des postsynaptischen Neurons führt. Gleichzeitig können die Proteinkinasen direkt oder durch die geschilderte Veränderung des Proteoms die Zellmorphologie beeinflussen, so dass neue synaptische Verbindungen hergestellt werden

1.4.1 Der mitogenaktivierte Proteinkinase-Signalweg (MAP-Kinase Signalweg)

Extrazelluläre Signale, wie z.B. Neurotransmitter werden, in der Regel durch Membranrezeptoren registriert und über Kaskaden gekoppelter Reaktionen ins Zellinnere weitergeleitet. Die Signalübertragung kann zum einen mit Hilfe von niedermolekularen Botenstoffen, den sogenannten sekundären Botenstoffen (engl.: second messenger) oder durch Protein-Protein Wechselwirkungen erfolgen. Das dabei am weitesten verbreitete Prinzip intrazelluläre Signale zu erzeugen und weiterzugeben ist die Phosphorylierung von Aminosäureseitenketten in Zielproteinen durch Proteinkinasen. Man kann die Proteinkinasen nach ihrem Substrat in die großen Gruppen der Serin/Threonin (Ser/Thr)-spezifischen und Thyrosin (Tyr)-spezifischen Kinasen unterteilen. Daneben gibt es auch noch Kinasen, die spezifisch Histidin, Aspartat oder Glutamat phosphorylieren können. Bei der Untersuchung von Wachstums- und Differenzierungsprozessen fand man erstmals das Prinzip der sequentiell hintereinander geschalteten Proteinkinasen, die ein von Membranrezeptoren erkanntes Signal aus dem Zytoplasma in den Zellkern weiterleiten können. Aufgrund der Regulierbarkeit durch extrazelluläre, wachstumsfördernde (mitogene) Signale, nannte man diesen Weg den MAP Kinase Weg (mitogen aktiverter Proteinkinase Weg; Davis, 1993). Die beteiligten Proteinkinasen nennt man dabei MAP Kinasen oder Erk (extrazellulär regulierte Kinasen). Im MAP Kinase Weg sind meist 3 Proteinkinasen hintereinandergeschaltet. Am Ende stehen die MAP/Erk Kinasen, die entweder Transkriptionsfaktoren oder andere Kinasen phosphorylieren. Die MAP/Erk Kinasen werden meist durch die vorgeschalteten MAP Kinasen Kinasen (MAPKK) die auch als Mek bezeichnet werden phosphoryliert. Die Mek ist wiederum das Substrat von vorgeschalteten Kinasen, den MAP Kinasen Kinasen Kinasen (MAPKKK), die auch Mek Kinasen genannt werden. Dabei ist die Position der einzelnen Kinasen im Signalweg durch ihre Substratspezifität festgelegt. Während die MEK Kinasen Ser/Thr spezifische Kinasen sind, die z.B. durch membranassoziierte GTPasen aktiviert werden können, stellt die nachgeschaltete Mek eine Besonderheit dar, da sie eine doppelte Substratspezifität aufweist und die nachgeschaltete MAP/Erk Kinase sowohl an einem Serin, als auch an einem Tyrosin phosphoryliert. Daher enthalten alle bisher bekannten MAP/Erk Kinasen eine Ser/Thr-X-Tyr (S/TXY)-Sequenz, deren Phosphorylierung durch die Mek essentiell für die Weiterleitung des Signals ist (Abb. 1.4.1).



Abb. 1.4.1 Der MAP Kinase Signalweg: Schematische Darstellung

Membranrezeptoren (MR) erkennen extrazelluläre Signale und aktivieren über zentrale Schaltstellen, wie z.B. membranassoziierte GTPasen, letztlich die Mek Kinase. Die Mek Kinase phophoryliert daraufhin die nachgeschaltete Mek meist an zwei Serin-Resten (S). Die Mek ist eine Besonderheit, da sie sowohl Serin/Threonin, als auch Tyrosinreste (Y) der MAP/Erk Kinase phosphorylieren kann. Die MAP/Erk Kinase phosphoryliert dann weitere Kinasen bzw. Proteine, wie z.B. das mikrotubuli assoziierte Protein 2, die ribosomale S6 Kinase 1 (Rsk-1) oder Transkriptionsfaktoren wie z.B. Elk-1.

Für alle drei Komponenten des MAP Kinase Wegs sind mittlerweile verschiedene Subtypen beschrieben worden, die jeweils für die Transduktion unterschiedlicher Signale verantwortlich sind und auch verschiedene Expressionsmuster aufweisen. So konnten die MAP Kinasen Erk-1/2 als die vorwiegend in Neuronen lokalisierte Form nachgewiesen werden (Sweatt, 2001), wobei Erk-1 und Erk-2 Isoformen darstellen. Ebenfalls aus Neuronen konnten die Isoformen Mek-1/2 isoliert werden. Die Spezifität der verschiedenen MAP Kinase Signalwege zeigt sich u.a. daran, dass die neuronalen Mek-1/2 zwar Erk-1/2 phosphorylieren können, jedoch nicht MAP Kinasen anderer Signalwege, wie z.B. die Erk5 oder JNK1/2 Kinasen (Adams und Sweatt, 2002; Johnson und Lapadat, 2002). Erk-1/2 selbst phosphorylieren Serine oder Threonine die vor einem Prolin lokalisiert sind. Substrate der Erk-1/2 sind z.B. der Transkriptionsfaktor Elk-1 (Hipskind et al., 1991) oder die ribosomale S6 Kinase (Rsk; Chen et al., 1992), die wiederum den Transkriptionsfaktor Creb (engl.: cAMP response element binding factor) phosphorylieren kann (Frodin und Gammeloft, 1999). Weitere Substrate von Erk-1/2 sind Proteine, welche das Zytoskelett modifizieren können, wie das mikrotubuli-assoziierte Protein-2 (MAP-2; Ray und Sturgill, 1988). Der Vorteil von seriell hintereinander geschalteten Proteinkinasen ist zum einen die schnelle Amplifikation oder Abschwächung eines extrazellulären Signals und zum anderen die Möglichkeit verschiedene Signale zu integrieren, was dadurch erreicht wird, dass die einzelnen Kinasen der MAP-Kaskade mit andern Signalwegen interagieren können. So konnte z.B. für die PKA (Proteinkinase A) in vitro gezeigt werden, dass diese Erk-1/2 sowohl aktivieren, als auch indirekt hemmen kann (Stork und Schmitt, 2002).

Erste Hinweise darauf, dass der neuronale MAP Kinase Weg eine Funktion während der Gedächtniskonsolidierung zukommen könnte, stammen aus Arbeiten, die *in vitro* zeigten, dass die LTP (Langzeitpotenzierung, siehe auch 1.3) unter bestimmten Umständen von der Erk-1/2 Aktivität abhängig ist (English et al., 1997). In anschließenden Arbeiten konnte dann nachgewiesen werden, dass die tonabhängige Furchtkonditionierung von Ratten, die durch die Amygdala (ein wichtiger Teil des limbischen Systems) vermittelt wird, durch Inhibition der Erk-1/2 Aktivität signifikant verschlechtert wird. Gleichzeitig führt die tonabhängigen Furchtkonditionierung zu einer verstärkten Phosphorylierung von Erk-1/2 in der Amygdala (Schafe et al., 2000). Dagegen ist bisher unklar, ob der MAP Kinase Weg in die kontextabhängige Furchtkonditionierung von Mäusen, welche durch den Hippokampus vermittelt wird, involviert ist.

1.5 Modulation der Gedächtniskonsolidierung durch Stress

Alle lebenden Systeme sind der Umwelt gegenüber offen und somit auch störanfällig für Veränderungen dieser Umwelt. Deshalb verfügen Organismen über ein komplexes System, um auch bei veränderlichen Bedingungen ein inneres Gleichgewicht, die sogenannte Homöostase aufrecht zu erhalten. Dabei ist die Herausforderung an den Organismus als Stressor und dessen Antwort darauf als Stress definiert. Konsequenterweise führt Stress also zu einer Reihe körperlicher Veränderungen. Dieses wurde schon Anfang des letzten Jahrhunderts von dem Physiologen Walter B. Cannon beschrieben. Er hatte beobachtet, das emotionale Reize wie Hunger, Angst, Schmerz oder Wut bei Mensch und Tier zu verminderter Magen- und Darmtätigkeit führten. Im Gegensatz dazu waren Blutdruck, die Leistungsfähigkeit von Herzund Skelettmuskeln, der Blutzucker, sowie Atem und Herzschlagfrequenz deutlich erhöht (Cannon, 1923). Stress kann gleichzeitig zu einer Reihe von Verhaltensänderungen führen, die sowohl bei Mensch, als auch bei Tieren zu beobachten sind. Hierbei sind insbesondere die stressvermittelten Veränderungen kognitiver Eigenschaften von Interesse, da chronischer Stress beim Menschen zu schweren Krankheiten wie psychogener Amnesie führen kann (Markowitsch, 2001). Anderseits kann Stress auch eine positive Wirkung auf die kognitiven Leistungen des Organismus haben. Hierbei ist es allerdings notwendig zwischen chronischem und akutem Stress zu unterscheiden. Chronischer Stress, bei dem der Organismus über einen langen Zeitraum immer wieder bestimmten Stressoren ausgesetzt ist, wirkt sich fast immer negativ aus. Im Unterschied dazu wird der Organismus bei akutem Stress, dem Stressor nur für einen kurzen Zeitraum ausgesetzt. Sowohl für den Menschen (Shalev, 2002), als auch für die Maus (Shors et al., 1992; Radulovic et al., 1999) konnte gezeigt werden, dass akuter Stress zu einer Verbesserung der Gedächtniskonsolidierung führen kann. So konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass Mäuse des Zuchtstammes Balb/c die Furchtkonditionierung (siehe 1.3) deutlich besser lernen, wenn sie 3 h vor dem Training für 1 h mittels Immobilisation gestresst wurden (Radulovic et al., 1999; Fischer et al., 2002). Immobilisationsstress bedeutet dabei, dass die Tiere für 1 h daran gehindert wurden sich frei zu bewegen. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass ein stressvermittelte Verbesserung der Furchtkonditionierung bei Mäusen des häufig verwendeten Zuchtstammes C57BL/6J nicht beobachtet wurde (Radulovic, Jelena, persönliche Mitteilung), weshalb in der vorliegenden Arbeit Experimente zur stressmodulierten Gedächtniskonsolidierung an Balb/c Mäusen durchgeführt wurden.

1.6 Das CRF System

Ob eine Situation von einem Organismus als Stress erkannt wird oder nicht interpretiert letztlich das Gehirn und sendet dann entsprechende Signale an den übrigen Körper. Ein zentraler Mechanismus ist dabei die Aktivierung der Hypothalamus-Hypophyse-Nebennierenrinde (HHN)- Achse, an dessen Anfang der Corticotropin freisetzende Faktor (CRF; engl.: *corticotropin releasing factor*) steht. Erkennt das Gehirn einen Reiz als Stress wird vom paraventrikulären Nukleus des Hypothalamus CRF in ein portales Blutgefäßsystem freigesetzt und gelangt so zur Adenohypophyse (Cummings et al., 1983; Swanson et al., 1983). Dort stimuliert es die Freisetzung des adrenocorticotrophen Hormons (ACTH), welches über die Blutbahn zur Nebenniere gelangt und diese dazu veranlasst Glucocorticoide freizusetzen. Beim Menschen handelt es sich dabei hauptsächlich um Cortisol und bei Nagetieren um Corticosteron. Die Glucocorticoide binden hauptsächlich an Kernrezeptoren, die sowohl aktivierend, als auch inhibierend auf die Transkription einwirken können. Als Reaktion wird der Metabolismus aktiviert, d.h. es kommt u.a. zu einer Verstärkung der Gluconeogenese, der Lipolyse, der Proteolyse und der Insulinresistenz (Holsboer, 1999; Abb. 1.6).



Abb. 1.6 Schematische Darstellung der HHN Achse

Die Aktivierung der HHN Achse gilt als sicheres Merkmal, dass ein Organismus Stress empfindet. Der Hypothalamus sezerniert dann CRF, welches über ein portales Blutgefäßsystem zur Adenohypophyse gelangt, die anders als die Neurohypophyse nicht mehr zum Gehirn gezählt wird. Die Adenohypophyse gibt als Antwort auf das CRF Signal ACTH in das Gefäßsystem ab, welches u.a. den Cortex der Nebennierenrinde dazu veranlasst Glucocorticoide freizusetzten, welche auf eine Reihe von Stoffwechselvorgänge einwirken und den Körper so in einen Alarmzustand versetzen.

Neben der Funktion als Teil der HHN Achse wirkt CRF aber auch als Neuropeptid und moduliert kognitive Fähigkeiten. So konnte z.B. gezeigt werden, dass CRF die kognitiven Leistungen von Versuchstieren sowohl positiv, als auch negativ beeinflussen kann (Koob und Bloom, 1985; Liang und Lee, 1988; Behan et al., 1995; Heinrichs et al., 1997; Radulovic et al., 1999).

1.7 Funktion der CRF Rezeptoren

CRF ist ein 41- Aminosäuren langes Peptid (Spiess et al, 1981; Vale et al. 1981) und konnte bereits in einer Reihe von Organismen, inklusive Mensch (Jingami et al., 1985) und Maus (Seaholtz et al., 1991) identifiziert werden, wobei das CRF aus Maus und Mensch identisch ist. Mittlerweile konnten dem CRF verwandte Peptide wie das Urocortin (Vaughan et al., 1995), Urocortin II (Reyes et al., 2001) und Urocortin III (Lewis et al., 2001) isoliert werden, die zusammen mit CRF eine Peptidfamilie darstellen. CRF vermittelt seine biologische Aktivität, indem es an Membranrezeptoren bindet. Man kennt bisher zwei verschieden Subtypen von CRF Rezeptoren (CRFR), CRFR1 (Chang et al., 1993; Chen et al., 1993; Vita et al., 1993; Dautzenberg et al., 1997) und CRFR2 (Kishimoto et al., 1995; Lovenberg et al., 1995; Perrin et al., 1995; Dautzenberg et al., 1997), wobei CRFR2 in zwei Spleißvarianten vorkommt. Dabei ist aber nur CRFR2 α im Gehirn exprimiert, wogegen CRFR2 β in den peripheren Organen zu finden ist (Valdenaire at al., 1997). Für den Menschen konnte zusätzlich eine dritte Spleißform des CRFR2 beschrieben werden, der CRFR2 γ , der ebenfalls ausschließlich peripher lokalisiert ist (Kishimoto et al., 1995; Stenzel et al., 1995; Sperle et al., 1997). Interessanterweise zeigen die beiden CRF Rezeptoren eine spezifische Ligandenaffinität. So ist CRFR1 sehr affin für CRF, bindet Urocortin II und Urocortin III aber nur schwach (Eckart et al., 1999; Reyes et al., 2001; Lewis et al., 2001; Reul und Holsboer, 2002). CRFR2 zeigt dagegen eine etwas geringere Affinität für CRF, wobei Urocortin II und Urocortin III als spezifische Agonisten von CRFR2 identifiziert werden konnten. In einer Reihe von Arbeiten konnte gezeigt werden, dass CRFR1 und CRFR2 teilweise ein überlappendes, meist aber ein unterschiedliches Expressionsmuster im Gehirn aufweisen. So konnten sowohl CRFR1 und CRFR2 z.B. in den hippokampalen Feldern CA1, CA3 und im Gyrus dentats nachgewiesen werden. Im lateralen Septum findet sich dagegen hauptsächlich CRFR2 (Lovenberg et al., 1995; Van Pett et al., 2000). Interessanterweise konnten Radulovic et al. kürzlich zeigen, dass hippokampaler CRFR1 für die stressverbesserte Furchtkonditionierung in Balb/c Mäusen verantwortlich ist, wogegen septaler CRFR2 die Furchtkonditionierung tonisch inhibiert (Radulovic et al., 1999; Radulovic et al., 2000; Abb. 1.7).



Abb.1.7 Die CRF Rezeptoren modulieren die Gedächtniskonsolidierung

Die stress-vermittelte physiologische Aktivierung bzw. die pharmakologische Aktivierung des hippokampalen CRFR1 durch Agonisten führt zu einer deutlichen Verbesserung der Furchtkonditionierung. Dagegen vermittelt der septale CRFR2 eine tonische Verschlechterung der Furchtkonditionierung, was durch die Tatsache gezeigt wurde, dass intraseptal injizierte CRFR2 Antagonisten die Furchtkonditionierung deutlich verbesserten. Über die Komponenten der Signalwege, die durch die CRF Rezeptoren aktiviert wurden, ist bisher kaum etwas bekannt.

CRF Rezeptoren sind G_s-Protein gekoppelte Serpentinrezeptoren und können die Adenylatzyklase aktivieren, was zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration führt (Chang et al., 1993; Perrin et al., 1993, Vita et al., 1993; Kishimoto et al., 1995; Lovenberg et al., 1995; Stenzel et al., 1995). Kürzliche Arbeiten weisen darauf hin, dass die CRF Rezeptoren in Abhängigkeit von externen Reizen auch an G_a oder G_i-Proteine gekoppelt sein können (Blank et al., 2003). Bezüglich der Komponenten der anschließenden intrazellulären Signalübertragung ist bisher allerdings kaum etwas bekannt. Dagegen zeigen eine Reihe von Arbeiten, dass die Expression der CRF Rezeptoren durch bestimmte Umweltreize reguliert werden kann. So konnte z.B. in Antwort auf verschiedene Arten von akutem und chronischem Stress eine Aufregulation von CRFR1 im paraventrikulären Nukleus des Hypothalamus bzw. im Cortex beobachtet werden (Luo et al, 1994; Rivest et al., 1995; Giardino et al., 1996; Iredale et al., 1996; Makino et al., 1997; Van Pett et al., 2000). Für CRFR2 konnte u.a. gezeigt werden, dass die Verabreichung von Glucocoticoiden, den Rezeptor-Gehalt im ventromedialen Hypothalamus erhöht (Makino et al., 1997). Zusammenfassend ist zu sagen, dass CRFR1 und CRFR2 die Gedächtniskonsolidierung modulieren können, wobei deren hippokampales Expressionsmuster in Antwort auf Gedächtniskonsolidierung und Stress und deren Kopplung an intrazelluläre Signalwege noch weitgehend unverstanden ist.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Doktorarbeit war es die Rolle des MAP Kinase Signalweges, der CRF Rezeptoren und deren Interaktionen während der Gedächtniskonsolidierung und stress-verbesserter Gedächtniskonsolidierung zu untersuchen. Diesbezüglich sollte der Versuch im Vordergrund stehen, verhaltensbiologische Ergebnisse auf molekularer Ebene zu verstehen. Als Modell für assoziatives Lernen wurde die kontextabhängie Furchtkonditionierung gewählt. Für diese Form von assoziativem Lernen ist insbesondere ein funktioneller Hippokampus essentiell (Kim und Fanselow, 1992; siehe auch 1.2).

Zunächst sollte mittels immunohistochemischer Proteindetektion überprüft werden, ob der hippokampale MAP Kinase Signalweg (Erk-1/2, Elk-1 und p90Rsk-1) durch kontextabhängige Furchtkonditionierung aktiviert wird. Außerdem sollte die Lokalisation und Interaktion von Erk-1/2, Elk-1 und p90Rsk-1 während der Gedächtniskonsolidierung untersucht werden. Der MAP Kinaseweg wurde gewählt, da kürzliche Veröffentlichungen eine hippokampale Funktion dieses Weges während der Furchtkonditionierung vermuten ließen. So konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von Erk-1/2 in der Amygdala durch die tonabhängige Furchtkonditionierung induziert wird (Schafe et al., 2000). Außerdem wurde beschrieben, dass die Induzierung hippokampaler Langzeitpotenzierung (LTP) *in vitro* den pErk-1/2 Gehalt aufreguliert (English und Sweatt, 1996) und diese Aufregulation vermutlich für die Ausbildung von LTP wichtig ist (English und Sweatt, 1997). Die Untersuchungen sollten in C57BL/6J Mäusen durchgeführt werden, da dieser Mausstamm unabhängig von Stress ein deutlich besseres Lernvermögen aufweist als Balb/c Mäuse (Francis et al., 1995, Chen et al., 1996; Bao et al., 1998; Heyser et al., 1999) und allgemein als Modellorganismus für Furchtkonditionierung verwendet wird.

Für Balb/c Mäuse wurde gezeigt, dass CRFR2 im lateralen Septum in Abwesenheit von Stress die kontextabhängige Furchtkonditionierung tonisch inhibiert (Radulovic et al.,1999). Daher sollte untersucht werden, ob dieses auch für C57BL/6J Mäuse gilt. Außerdem sollte die Hypothese überprüft werden, ob septaler CRFR2 die Furchtkonditionierung durch eine inhibitorische Wirkung auf den hippokampalen MAP Kinase Weg ausübt. Hierbei sollte die Produktion der entsprechenden Proteine sowohl in CRFR2 *knock out* Mäusen, als auch nach pharmakologischer Inhibition von septalem CRFR2 untersucht werden. Unser Labor konnte zeigen, dass Balb/c Mäuse, im Gegensatz zu C57BL/6J Mäusen nach akutem Stress die Furchtkonditionierung signifikant besser erlernen. In dieser Arbeit sollte daher überprüft werden, ob der hippokampale MAP Kinase Weg für stress-verbessertes Lernen wichtig ist. Dazu sollte die Produktion und Funktion der entsprechenden Proteine während stressverbesserter Furchtkonditionierung analysiert werden. Außerdem sollte die Expression der hippokampalen CRF Rezeptoren in Abhängigkeit von Immobilisationsstress mittels *in situ* Hybridisierung untersucht werden. Da *in vitro* in CHO (*chinese ovary hamster*) Zellen gezeigt werden konnte, dass die Aktivierung von heterolog exprimierten CRF Rezeptoren zur Aktivierung von Erk-1/2 führen kann (Rossant et al., 1999), sollte analysiert werden, ob hippokampale CRF Rezeptoren während stress-verbesserter Furchtkonditionierung an den MAP Kinase Signalweg gekoppelt sind.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstamm

E. coli One Shot[™] INVαF[°] (Invitrogen) [endA1, recA1, hsdR17(r^{-k}m^{+k}), supE44, λ-, thi-1, gyrA, relA1, \$\$0 lacZΔM15Δ (lacZYA-argF), deoR⁺,F[°]]

2.1.2 Plasmide

2.1.2.1 PCR®II Vektor

Für die Klonierung von PCR-Produkten wurde der Vektor pCR®II aus dem *TA Cloning Kit* (Invitrogen) verwendet. pCR®II ist ein 3932 langer linearisierter Vektor mit zwei 3`-Didesoxythymin-Überhängen. PCR-Produkte (PCR, Polymerase-Ketten-Reaktion; Mullis & Fallona, 1987, Saiki et al., 1988), welche durch die matrizenunabhängige Aktivität der Taq-Polymerase am 3`-Ende des Duplex-Moleküls einzelne Deoxyadenosin-Reste tragen, können daher direkt mit dem Vektor ligiert werden. Es entsteht so ein zirkuläres DNA-Molekül mit zwei Nicks an den Insertionsstellen, welches direkt zur Transformation in *E.coli* eingesetzt werden kann. Die zwei dT-Überhänge des Vektors befinden sich innerhalb des Mehrfachklonierungsbereiches. Dieser codiert 18 potentielle Restriktionsschnittstellen und wird von den Promotoren SP6 und T7, sowie von einer Bindungsstelle der M13-*reverse* und M13-*forward* Primer flankiert. Um eine Identifikation von rekombinanten Plasmiden zu erleichtern, trägt der Vektor ein *lac*Z Gen unter der Kontrolle eines *lac* Promotors (P*lac*). Die Integration eines Inserts führt zu einem defekten *lac*Z Gen und somit zum Verlust der Fähigkeit des Abbaus von X-Gal durch α -Komplementation der β -Galaktosidase in den ϕ 80 *lac*Z Δ qM15 kompetenten Zellen. Blaue Kolonien verfügen also über ein funktionelles *lac*Z Gen und tragen daher kein Insert, wogegen weiße Kolonien ein Plasmid mit integriertem Insert tragen (Marchuk et al., 1991).

Der Vektor trägt zusätzlich eine Kanamycin- und Ampicillinresistenz sowie den pUC ori Replikationsursprung, der die Replikation des Vektors in *E.coli* ermöglicht.



Abb.2.1.2.1 Schematische Darstellung des pCR®II Plasmids (nach dem Invitrogen Handbuch). Dieser Vektor wurde für die Klonierung von PCR Produkten verwendet. Für weitere Erklärungen siehe Text. pUCori, Replikationsursprung für die Replikation in E.coli; Ampicillin, Ampicillinresistenz codierendes β -Laktamase Gen; lacZ, β -Galaktosidase Gen; Kanamycin, Kanamycinresistenz codierendes nptII Gen, f1 ori, Replikationsursprung des f1 Phagen.

2.1.2.2 pBluescript II® Vektor

Für die Subklonierung von DNA Fragmenten und die anschließende Herstellung von cRNA Sonden wurde der pBluescript SK (+) Vektor (Stratagene) verwendet. Die Abkürzung SK steht für die Schnittstelle der Restriktionsenzyme Sac I und Kpn I. Diese flankieren einen Mehrfachklonierungsbereich in dem sich die Schnittstellen für 21 weitere Restriktionsenzyme befinden. Der Mehrfachklonierungsbereich befindet sich innerhalb eines *lac*Z Gens, was nach erfolgter Klonierung die Identifikation von rekombinanten Plasmiden erleichtert (siehe 2.1.2.1). Der Mehrfachklonierungsbereich wird von den Promotoren T3 und T7 flankiert, die zur *in vitro* Synthese von cRNA verwendet werden können. Die Abkürzung (+) steht für einen f1 ori (Replikationsursprung des f1 Phagen), der als Startpunkt für die replikative Synthese von ssDNA dient. Der Vektor trägt zusätzlich eine Ampicillinresistenz sowie den ColE1 Replikationsursprung, der die Replikation des Vektors in *E.coli* ermöglicht.





Handbuch)

Der Vektor wurde für die Subklonierung von DNA Fragmenten und anschließender Synthese von cRNA verwendet. ColE1, Replikationsursprung für die Replikation in *E.coli*; MCS, Mehrfachklonierungsbereich; Ampicillin, Ampicillinresistenz codierendes β -Laktamase Gen; lacZ, β -Galaktosidase Gen; f1(+) origin, Replikationsursprung des f1 Phagen.
2.1.3 DNA/RNA Längenstandards

1-KB-Leiter (Gibco BRL, Eggerstein; D)

φX174 DNA/Hae III Fragmente (Gibco BRL, Eggerstein; D)

0,24 - 9,4 KB-RNA-Leiter (Gibco BRL, Eggerstein; D)

2.1.4 Chemikalien

- Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung Ultra Pure ProtogelTM (National Diagnostics, Atlanta, USA)
- ATP (Sigma, Deisenhofen, D)
- Agarose (Gibco BRL, Eggerstein; D)
- Alkylphenylpolyethylenglykol (Triton[®] X-100, TX-100, Pierce Rockford, USA)
- Ampicillin (Natriumsalz) (Biomol, Hamburg, D)
- Ammoniumpersulfat (APS; BioRad, München, D)
- Bacto-Agar (Difco, Dreireich, D)
- Bacto-Trypton (Difco, Dreireich, D)
- β-Mercaptoethanol (Fluka, Buchs, CH)
- Bromphenolblau (Pierce, Rockford, USA)
- 5´-Bromo-4-Chloro-3-indolyl–β–D-galaktosid (X-Gal; Biomol, Hamburg, D)
- 3,3'-Diaminobenzidine Tablet Sets (DAB, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D)
- Dimethylsulfoxid (DMSO; Fluka, Neu-Ulm, D)
- Dithiothreitol (DTT; Serva, Heidelberg, D)
- dNTP-Mix (Gibco BRL, Eggerstein, D)
- Ethanol (Riedel de Haen, Seelze, D)
- Ethidiumbromid (Gibco BRL, Eggerstein, D)
- Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (EDTA; Serva, Heidelberg, D)
- Färbelösung-Konzentrat, Protein Assay (BioRad, München, D)

Formamid (Fluka, Neu-Ulm, D)

Gelatine, (Merck, Darmstadt, D)

Glycerin (Biomol, Hamburg, D)

Hefe-Extrakt (Difco, Dreireich, D)

I-Block[™] (Tropix, Bedford, USA)

Natriumazid (Merck, Darmstadt, D)

Natriumdodecylsulfat (SDS; BioRad, München, D)

Natriumethylmercurithiosalicylsäure (Thimerosal, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D)

NP-40, wässrige Lösung 10 % (w/v) (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D)

Paraformaldehyd (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D)

Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF, Merck, Darmstadt, D)

Phenol, TE-gesättigt (Gibco BRL, Eggerstein, D)

Polyoxyethylen-Sorbitan Monolaurat (Tween® 20, BioRad, München, D)

Ponceau S (Merck, Darmstadt, D)

Rinderserumalbumin (BSA, Pierce, Rockford, USA)

Rp-cAMPS (Adenosin 3', 5'- cyclic Phosphorothiolate; Calbiochem, Frankfurt, D)

SDS-PAGE Proteinstandard (BioRad, München, D)

N, N, N', N'-Tetramethyl-ethyldiamine (TEMED, Serva, Heidelberg, D)

Tribromethanol (Sigma, Deisenhofen, D)

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS; Sigma, Deisenhofen, D)

Ultra-Pure Protogel (Kimberly Research; Atlanta, GE, USA)

uO126 (Mek Inhibitor; Madison, WI, USA)

Alle nicht aufgeführten Chemikalien stammen von der Firma Merck (Darmstadt, D)

2.1.5 Enzyme, Antikörper und Peptide

Antisauvagine-30 (in der Abteilung synthetisiert)

Alkaline Phosphatase konjugierter Ziege Anti-Kaninchen Antikörper (Tropix, Bedford, MA,

- USA)
- Alkaline Phosphatase konjugierter Ziege Anti-Maus Antikörper (Tropix, Bedford, MA, USA)
- Anti-Digoxigenin AP Fab Fragment (Gibco BRL, Eggerstein, D)
- Anti-Aktin Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D)
- Anti-Elk-1 Antikörper I-20 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D)
- Anti-Elk-1 Fusionsprotein, (Elk-1307-428 fusioniert an GST, Cell Signalling)
- Anti-Erk-1/2 Antikörper, K23 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D)
- Anti-Mek-1/2 Antikörper, 12-B (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D)
- Anti-pCreb Antikörper (Ser-133, Calbiochem, Darmstadt, D)
- Anti-pElk-1 Antikörper, B4 (Ser-383; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D)
- Anti-pErk-1/2 Antikörper (Thr-183/Tyr-185; Sigma, Deisenhofen, D)
- Anti-pMek-1/2 Antikörper (Ser-217/221, Cell Signalling)
- Anti-PKA RII Antikörper (Ser-96, Cell Signalling)
- Anti-p90Rsk-1 Antikörper, C21 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D)
- Anti-pp90Rsk-1 Antikörper (Thr-360/Ser-364; Cell Signalling, Frankfurt, D)
- 50 x Advantage cDNA Polymerase-Mix (Clontech, Palo Alto, CA, USA)
- Astressin (in der Abteilung synthetisiert)
- Eco RI Restriktionsenzym (MBI Fermentas, Vilnuis, Lit)
- Eco RV Restriktionsenzym (MBI Fermentas, Vilnuis, Lit)
- RibonukleaseH (5U/µl; MBI Fermentas, Vilnuis, Lit)
- Ribonuklease-Inhibitor (20 U/µl; MBI Fermentas, Vilnuis, Lit)
- Superscript II Reverse Transkriptase (Gibco BRL, Eggerstein, D)
- Spe I Restriktionsenzym (MBI Fermentas, Vilnuis, Lit)
- T3 RNA Polymerase (Gibco BRL, Eggerstein, D)

T4-DNA-Ligase (400 U/µl; New England Biolabs, GB)

T7 RNA Polymerase (Gibco BRL, Eggerstein, D)

Urocortin III (in der Abteilung synthetisiert)

2.1.6 Sonstige Materialien und Geräte

Adolf Kühne AG, CH: Lab-Therm-Schüttelinkubator

- Anilam, Jamestown, NY, USA: Stereotaxiegerät für Gehirnoperationen; Elektronische
- Koordinationseinheit "System E1" für die Digitale Positionierung des Stereotaxiegeräts
- Applied Biosystems, Weierstadt, D: DNA-Sequenzierer 373 A, DNA Synthesizer 392A, ABI
- PRISMTM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit
- Bachhofer, Tübingen, D: Transilluminator, Filter 302 nm
- Beckmann, München, D: Tischkühlzentrifuge GPR und GS6R
- Becton/Dickinson Labware, NJ, USA: Falcon-Röhrchen 50 ml
- Bender & Hobein AG, Zürich, CH: Vortex Genie2
- Biometra, Göttingen, D: PCR-Cycler Gradient
- BioRad, München, D: Power Supply 3000 V
- Conrad Elektronik, Hirschau, D: Breitbandlautsprecher KT-25-DT
- Cybertech, Berlin, D: CCD-Kamera mit angeschlossener CS-1 Kontrolleinheit; Win Cam 2.2

Analysesoftware

- Fuji, Aichi, J: BAS Reader II (BAS2000 Fujix Bio-Image Analyzer)
- Gilson, Villiers-le-Bel, F: Pipetten
- Greiner, Nürtingen, D: 15 ml Röhrchen
- Helma, Mülheim, Baden, D: Quarzküvetten
- Heraeus Instruments, Hanau, D: Backschrank Kelvitron F6120, -80°C Kühltruhe,
- Tischzentrifuge Biofuge pico
- H + P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, D: Varioklav-Dampfsterilisator 500
- IKA Staufen, D: Magnetrührer Combimag RCO

- Invitrogen, Leek, NL: TA CloningTM Kit
- Konica, Salzgitter, D: Röntgenfilmentwickler QX-70
- Leica Instruments GmbH, Nußloch, D: Kryostat CM 3050 Mikrotom
- Memmert GmbH & Co KG, Schwabach, D: Trockenschrank Modell 800
- Messgeräte-Werk Lauda, Lauda, D: M3 Lauda Wasserbad, GW Lauda RC6-Kühlwasserbad
- Metabion, Martinsried, D: Primer
- Millipore, Bedford, USA: Milli-Q-Wassersystem
- Milteny Biotech, Bergisch Gladbach, D: Protein A- und Protein G Microbeads, µMACS
- Säulen, mRNA Isolierungs Kit
- Perkin Elmer, Rockville, USA: Gene Amp PCR-System 2400
- Phase GmbH, Lübeck, D: Semi Dry Blotter PEGASUS Modell S
- Pharmacia/LKB, Freiburg, D: Gene Quant II-Spektral-Photometer
- Plastic One, Roanake, USA: Mikrokanülen
- Qiagen, Hildesheim, D: Qiagen-Plasmid-Kit, PCR-Purification Kit, QAIEX II
- Gel Extraction Kit
- Hoffmann LaRoche, Basel, CH: DIG RNA Labeling Kit (Sp6/T7)
- Sartorius, Göttingen, D: Feinwaagen
- Savant, NY, USA: Vakuum-Zentrifuge
- Scanbur, Koege, DK: Laminar Flow Cabinet Scantainer
- Schleicher & Schuell, Dassel, D: Rundfilter, Einmalfiltrationsgeräte
- Schütt, Hofheim, D: pH-Meter CG840, Elektrode N1042A
- Sorvall, Bad Nauheim, D: Zentrifuge RC-5B, RC-5C, Rotoren SS34, GSA
- Stratagene, CA, USA: pBluescript II SK (+) Vektor
- Tropix, MA, USA: CDP-Star, Nitroblock II, Blocking Reagent, 2. Antikörper
- TSE, Bad Homburg, D: Analysesystem 303410 für Furchtkoditionierung
- Vector, CA, USA: Vectastain®ABC Kit, Ziegenserum
- Whatman, Mainstone, GB: Filterpapier 3 MM

2.1.7 Nährmedien

Die Nährmedien wurden jeweils 20 min bei 120°C und 1 atm autoklaviert. Antibiotika wurden den flüssigen Medien jeweils kurz vor Gebrauch und den festen Medien direkt nach dem Autoklavieren zugefügt. Ampicillin wurde in einer Endkonzentration von 100 µg/ml eingesetzt. Zum Nachweis der β-Galaktosidase-Aktivität von Transformanten wurden LB-Amp-Platten vor dem Ausplattieren der Zellen mit 50 µl X-Gal-Lösung (100 mg/ml in DMSO) ausgestrichen. Die Platten wurden anschließend 15 min mit halbgeöffnetem Deckel im Brutschrank bei 37°C inkubiert, um das DMSO zu verdampfen.

LB-Medium: 0.5% Hefe-Extrakt, 1% NaCl, 1% Trypton

2.1.8 Lösungen und Puffer

Es werden an dieser Stelle nur die Lösungen und Puffer angegeben, die für mehrere Experimente verwendet wurden. Weitere Angaben über Lösungen und Puffer befinden sich jeweils am Ende der entsprechenden Abschnitte des Methodenteils.

Artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF): 10 mM D-Glukose, 2,4 mM MgSO₄, 2,5 mM CaCl₂, 124 mM NaCl, 3,3 mM KCl, 1,2 mM KH₂PO₄, 26,4 mM NaHCO₃ Ampicillin-Stammlösung: 100 mg/ml Ampicillin (Na-Salz) in H₂O, sterilfiltriert EDTA-Stammlösung: 0,5 M Stammlösung, pH 8.0 mit 10 N NaOH einstellen β-Mercaptoethanol: 5 M Stammlösung NaCl-Lösung: 5 M Stammlösung in DEPC behandeltem Wasser NaOH: 10 N Stammlösung 5x PBS-Puffer: 231 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, 85 mM NaH₂PO₄ x H₂O, 342 mM NaCl, pH 7,3-7,4; autoklavieren 20x SSC-Puffer: 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0, autoklavieren
50 x TBE-Puffer: 890 mM Tris-Base, 890 mM Borsäure, 25 mM EDTA
TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 bzw. pH 8,5
Tris/HCl: 1 M Stammlösung mit HCl auf pH 7,5 einstellen; autoklavieren

2.1.9 Versuchstiere

Die Experimente wurden mit männlichen, 9 Wochen alten Mäusen des Zuchtstammes Balb/c (Charles River Laboratorium, Sulzfeld, D) oder C57BL/6J (Centre D'Elevage, Nantes, F) durchgeführt. Die Mäuse wurden einzeln mit freiem Zugang zu Nahrung und Wasser in Standart-Macrolon-Käfigen ("Wohnkäfig": 2: 22 cm x 16 cm x 13 cm, Länge x Breite x Höhe) gehalten, welche sich in schallgeschützen, temperatur- und feuchtigkeitskontrollierten Containern (Scantainer) befanden (Raumtemperatur 22 +/- 1°C); Luftfeuchtigkeit 55 +/- 10 %). Die Container waren in lichtgeschützten Schränken untergebracht, in denen ein künstlicher Tag-Nacht-Zyklus (12 h/12 h) aufrecht erhalten wurde (Beginn der Tagperiode 7.00 Uhr). Die Schränke befanden sich im selben Raum, indem sich das Furchtkonditionierungssystem befand, um die Exposition zu einer neuen Umgebung beim Transport gering zu halten. Nach der Lieferung wurden die Tiere mindestens 5 Tage unter konstanten Bedingungen gehalten, bevor mit den Experimenten begonnen wurde. Alle Versuche fanden in der Tagperiode statt.

Die Versuchsbedingungen entsprachen den Richtlinien der Gesellschaft für Labortierwissenschaft Deutschland. Die Versuche sind durch die Bezirksregierung Braunschweig unter der Nummer 604.42502/02-02.97 genehmigt worden.

2.2 Methoden

2.2.1 Immobilisationsstress

Die Tiere wurden aus ihrem Käfig entnommen und kurz mit Isofluran (Forene®) betäubt. Anschließend wurden die Extremitäten mittels Heftpflastern auf einem Tisch fixiert (Smith et al., 1995). Nach einer Stunde wurden die Tiere befreit und zurück in ihren Wohnkäfig gesetzt, welcher wieder in den Scantainer gestellt wurde.

2.2.2 Entnahme von Hirngewebe

Die Entnahme des Hirngewebes wurde auf einer sterilen Metallplatte durchgeführt, die von der Unterseite her durch Trockeneis gekühlt wurde. Dieses diente dazu die Aktivität von endogenen RNasen und Proteasen zu minimieren. Die Tiere wurden durch Genickbruch getötet. Anschließend wurde die Hirnschale geöffnet, das Hirn entnommen und mit einer sterilen Pinzette der Hippokampus präpariert.

2.2.3 Kultivierung und Lagerung von E. coli

Die Bakterien wurden in LB/Amp-Medium angezogen und bei 37°C bei 200-225 Upm geschüttelt (Lab-Therm-Schüttelinkubator).

2.2.4 Transformation von E. coli

Die Transformation erfolgte in modifizierter Form nach Sambrook et al. (1989). Unter sterilen Bedingungen wurden 50 µl *One Shot*TM*INV* α *F*[^] kompetente Zellen aus dem *TA Cloning*TM*Kit* (Invitrogen) langsam auf Eis aufgetaut, vorsichtig zuerst mit 2 µl 0,5 M β-Mercaptoethanol und dann mit 2 µl Ligationsansatz vermischt und dann 30 min auf Eis inkubiert. Danach erhielten die Zellen für 30 s einen Hitzeschock in einem 42°C Wasserbad und wurden im Anschluß daran für 2 min wieder auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurde der Transformationsansatz zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz für 1 h bei 225 Upm geschüttelt (37°C). Pro Ansatz wurden jeweils 50 µl und 200 µl Zellen auf LB-Amp-X-Gal-Platten ausgestrichen und für 18 h bei 37°C inkubiert. Die Farbentwicklung der Kolonien erfolgte anschließend für 3 h bei 4°C im Kühlschrank. Danach konnten weiße Transformanten selektiert werden.

2.2.5 Isolierung von PolyA+RNA aus Hirngewebe

Das verwendete Prinzip zur Isolierung von PolyA+RNA beruht auf der quantitativen Bindung der PolyA+RNA an magnetisch aktive Oligo(dT)Microbeads, wozu der µMACS mRNA Isolation Kit der Firma Milteny (Milteny, D) verwendet wurde. Nach der Bindung der PolyA+RNA an die Oligo(dT)Microbeads wird die Lösung auf eine in einem magnetischen Feld befindliche Säule gegeben, so dass die Oligo(dT)Microbeads in der Säule verbleiben, andere RNA-Spezien und DNA aber durch Waschen entfernt werden können. Unter niedrigen Salz-Bedingungen wird die reine mRNA anschließend von der Säule eluiert. Je 60 mg Gewebe wurden in einem durch flüssigen Stickstoff gekühlten Mörser zu einem feinen Gewebepulver zerrieben und anschließend mit einem sterilen, ebenfalls mit flüssigem Stickstoff gekühlten Spatel in ein 4 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 2ml Lysis/Binding-Puffer versetzt. Die Gewebesuspension wurde durch auf- und abziehen mittels einer sterilen Einwegspritze und einer 21 Gauge-Nadel homogenisiert und anschließend 3 min gevortext. Danach wurde die Gewebesuspension auf eine Clear-Lysate-Säule gegeben und 3 min zentrifugiert (13000 x g), um Zellreste zu entfernen und somit die Viskosität der Suspension zu verringern. Anschließend wurden 50 µl einer Oligo(dT)Microbead-Lösung durch auf- und abpipettieren in die Gewebesuspension eingemischt. Zuvor wurde eine µMACS-Säule in

einem Magnetfeld plaziert und mit 100µl Lysis/Binding-Puffer äquilibriert. Danach wurde die Oligo(dT)Microbeads enthaltende Gewebesuspension auf die Säule gegeben und 2 x mit 200 µl Lysis/Binding-Puffer gewaschen. Diesen Waschschritten folgten zwei weitere mit je 100 µl Wasch-Puffer. Anschließend wurde die Säule 2 x mit 25 µl DNAseA Lösung gewaschen und je 10 min bei 37°C inkubiert. Nach 4 Waschschritten mit je 100 µl Wasch-Puffer wurde die mRNA mit 120 µl Elutions-Puffer von der Säule gewaschen und anschließend die Konzentration des Eluats photometrisch vermessen. Um die mRNA für die nachfolgende cDNA-Synthese einzusetzen, wurden jeweils zwei Elutate des gleichen Gewebetyps vereinigt und mit 10 µl Glykol-Carrier-Lösung und 600 µl Ethanol bei -80°C präzipitiert. Die Proben wurden anschließend 30 min bei 15000 x g in einer Kühlzentrifuge (4°C) zentrifugiert und in einem geeigneten Volumen DEPC-Wasser aufgenommen.

DEPC-Wasser: 200 µl Diethyl-Pyrocarbonat (Sigma, Deisenhofen) in 1 L Millipore-Wasser über Nacht verdampft und anschließend autoklaviert. Lysis/Binding-Puffer: Hochsalz-Puffer, der 1% SDS enthält . DNAseA Lösung: Tris/HCl Puffer, pH 7,2, DNAseA (2 U) Elutions-Puffer: RNAse-freies Wasser mit 1 mM EDTA Oligo(dT)Microbeads: Super-parmagnetische MACS-Microbeads, an die ein (dT)24-Oligo gekoppelt ist. Der Aufbewahrungspuffer enthält 0,1% SDS. Wasch-Puffer: Niedrigsalz-Puffer, der NaCl, Tris-HCl und EDTA enthält

2.2.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Da Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum bei 260 nm zeigen, konnte die Konzentration einer Probe photometrisch bestimmt werden, da nach dem Lambert-Beerschen Gesetz die Absorption einer Lösung der Konzentration der gelösten Substanz proportional ist. Für die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration gelten hierbei folgende Entsprechungen.

Die Extinktion der Probe wurde außerdem bei 280 nm gemessen, da hier das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt. Der Quotient $OD_{260/280}$ gibt daher den Grad der Verunreinigung der Probe durch Proteine an. Reine Nukleotidsäure-Lösungen sollen daher einen Quotient $OD_{260/280}$ von über 1,6 aufweisen, wenn es sich um DNA und von 2,0, wenn es sich um RNA handelte. Alle photometrischen Messungen wurden in einer Quarzküvette (Helma, Schichtdicke = 1 cm) gegen die entsprechenden Trägerflüssigkeit als Referenzwert durchgeführt.

2.2.7 Fällung von Nukleinsäuren mit Ethanol

Die Fällung von DNA oder RNA mit Ethanol dient der Konzentrierung von Nukleinsäure-Lösungen. Bei dieser Methode wird die Konzentration monovalenter Kationen stark erhöht und so die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäure neutralisiert. Durch Zugabe von Ethanol wird das Lösungsmittel H₂O entzogen und die Nukleinsäure ausgefällt. DNA wurde mit 1/2 Vol. 4 M NH₄Ac oder 1/10 Vol. NaCl und 2,5 Vol. kaltem Ethanol versetzt und anschließend 10-30 min bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA abzentrifugiert (30 min, 15000 x g, bei 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das DNA Sediment mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, um verbliebene Salze zu entfernen. Es folgte eine weitere Zentrifugation (10 min, 15000 x g, 4°C), wonach der Überstand sorgfältig entfernt und das DNA-Sediment anschließend 5 min bei 37°C getrocknet wurde, um restliches Ethanol zu verdampfen. Die gereinigte DNA wurde dann in einem geeigneten Volumen H₂0 oder TE-Puffer aufgenommen und bei -20°C gelagert. RNA wurde mit 1/6 Vol. 2 M Natriumacetat und 1/20 Vol. Glykogen (2mg/ml) gemischt, mit 2,5 Vol. eiskaltem Ethanol (abs.) versetzt und bei -80°C präzipitiert. Anschließend wurde die RNA dann abzentrifugiert (30 min, 15000 x g, 4°C) und der Überstand sorgfältig abgenommen. Das RNA-Sediment wurde mit 70 % Ethanol überschichtet und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das RNA-Sediment 5-10 min bei RT getrocknet und anschließend in einem geeigneten Volumen DEPC-H₂O aufgenommen.

2.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Diese Art der Gelelektrophorese wurde zur analytischen und präperativen Auftrennung von DNA-Fragmenten angewendet. Es wurden Agarosegele unterschiedlicher Größe und Konzentration (0,8%-2%) eingesetzt, wobei kurze DNA-Fragmente in hochprozentigen und lange in niederprozentigen Gelen aufgetrennt wurden. Die Agarose wurde in 1 x TBE-Puffer (50-100 ml) in einer Mikrowelle aufgekocht und anschließend mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Nach dem Abkühlen auf 50°C wurde die Agaroselösung in eine Flachbettgelapperatur mit einem darüber hängenden Taschenformer der erforderlichen Größe gegossen. Nach der Verfestigung des Gels konnte der Kamm vorsichtig herausgelöst und das Gel in eine mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt werden. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen an Gelbeladungspuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die anschließende Auftrennung der DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe erfolgte bei einer Feldstärke von 15-20 Volt/cm. Anschließend wurden die DNA-Banden auf einem UV-Leuchttisch (Transilluminator, Filter 302 nm; Bachhofer, Tübingen, D) sichtbar gemacht und mit einer CCD-Kamera mit angeschlossener CS-1 Kontrolleinheit (Cybertech, Berlin, D) dokumentiert.

Ethidiumbromid-Stammlösung: 10 mg/ml in H₂O lichtgeschüzt bei 4°C

2.2.9 cDNA Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte, um die Information der mRNA in die stabilere Form einer DNA zu überführen (Sambrook et al., 1989).

PolyA+RNA (2 µg) wurden mit 1 µl cDNA Synthese Primer versetzt und mit DEPC-H₂0 auf ein Volumen von 5 µl gebracht. Die Probe wurde 2 min bei 70°C inkubiert um mögliche Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Danach wurden 2 µl 5 x Erststrang-Puffer, 1 µl dNTP-Mix, 1 µl DEPC-Wasser und 1 µl Reverse Transkriptase (Superscript II, GibcoBRL) zu der Probe pipettiert und diese anschließend für 1,5 h in einem Umluft-Wärmeschrank inkubiert, womit die Synthese des cDNA Erststranges abgeschlossen war. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8) gestoppt. Anschließend konnte die cDNA durch den QIAEX II aufgereinigt und bei Bedarf abschließend mit Ethanol gefällt werden.

2.2.10 Aufreinigung von DNA

DNA wurden mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit oder des QIAEX II Kit (Qiagen, Hildesheim) über eine Silika-Matrix aufgereinigt . Durch Verwendung dieser Methoden konnte die DNA sowohl von Salzen und Enzymen, als auch von DNA-Fragmenten (< 100 bp) getrennt werden. Für die Aufreinigung durch den QIAquick PCR Purification Kit wurde die zu reinigende Probe mit 5 Volumen an PB-Puffer verdünnt und anschließend auf eine QIAqick Spin-Säule gegeben. DNA-Fragmente (> 100bp) binden dabei an eine Silika-Membran, wobei Enzyme und Salze durch abzentrifugieren und einen anschließenden Waschschritt mit 0,75 ml PE-Puffer entfernt werden. Zur Elution der DNA von der Säule wurden 50 µl Elutions-Puffer auf die Silika-Membran pipettiert und die Säule zentrifugiert (1 min, 13000 x g, RT). Bei Verwendung des QIAEX II Kits wurde die aufzureinigende DNA mit 3 Volumen QX1-Puffer verdünnt und anschließend mit 10 µl QIAEX II-Lösung vermischt. Die QIAEXII-Lösung stellt eine Silika-Matrix dar, die DNA-Fragmente (> 100 bp) binden kann. Um eine optimale Bindung der DNA an die Matrix zu ermöglichen, wurde der Ansatz 10 min bei RT inkubiert und alle 2 min geschüttelt. Danach wurde die Suspension zentrifugiert (30 sec., 13000 x g, RT) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 0,5 ml PE-Puffer resuspendiert und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde noch einmal wiederholt und das Pellet anschließend 10-15 min bei RT getrocknet. Die Elution der DNA erfolgte durch Zugabe von 20 µl Elutionspuffer und einer folgenden 10 minütigen Inkubation bei RT, wobei die Suspension alle 2 min geschüttelt wurde. Die Suspension wurde dann zentrifugiert (30 s, 13000 x g, RT) und der Überstand mit der DNA abgenommen. Die Elution wurde in gleicher Weise wiederholt und die Eluate vereinigt.

Elutions-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8,5

2.2.11 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen vom Typ II wurden benutzt, um DNA an definierten Stellen zu schneiden. Die Enzyme wurden in glyzerinhaltigem Puffer bei -20°C gelagert. Plasmide wurden mit 5 U Enzym pro μ g DNA für 2 h bei 37°C inkubiert. Das Volumen des Restriktionsansatzes betrug zwischen 20 und 300 μ l, wobei darauf geachtet wurde, dass die Konzentration des Glyzerins aus dem Enzymlagerungspuffer unter 5 % (v/v) lag, um eine optimale Aktivität der Enzyme zu gewährleisten. Es wurden die empfohlenen und mitgelieferten Puffer für die Reaktionen verwendet. Sofern vorgeschlagen, wurde auch acetyliertes BSA in einer Endkonzentration von 100 μ g/ μ l zugesetzt. Die Wahl des geeigneten Puffers ist wichtig, da Salz- und pH-Bedingungen kritisch für die Enzymaktivität sind.

Die Reaktion wurde anschließend auf einem Agarosegel kontrolliert.

2.2.12 Plasmidisolierung (Mini/Midi-Präparation)

Die Mini-Präparation erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen SDS-Lyse (Birnboim & Doly, 1979) und Aufreinigung der DNA durch eine Silika-Membran unter Verwendung des Mini-Präp-Kits der Firma Qiagen (Hildesheim, D). In dem ersten Schritt erfolgt die alkalische Lyse von 2 ml Übernachtkultur. Die freigesetzte Plasmid-DNA wird dann unter Hochsalz-Bedingungen an eine Silika-Membran im Zentrifugenröhrchen gebunden und nach zwei Waschschritten mit PB- bzw. PE-Puffer unter Niedrigsalz-Bedingungen eluiert. Die Ausbeute liegt bei den verwendeten Bakterienstämmen bei ca. 20 µg Plasmid-DNA. Die so gewonnene DNA ist qualitativ für den Verdau mit Restriktionsenzymen, für Transformationen, Ligationen und Sequenzierreaktionen geeignet. Um größere Mengen an Plasmid DNA zu gewinnen wurde unter Verwendung des Midi-Präp Kits der Firma Qiagen (Hildesheim, D) eine Midi-Präparation durchgeführt. Hierbei erfolgte zunächst eine alkalische Lyse von 25-50 ml Übernachtkultur. Die anschließende Aufreinigung der Plasmid DNA erfolgte allerdings über einen Ionenaustauscher (Qiagen Tip 100 Säule).

2.2.13 Ligation doppelsträngiger DNA

Doppelsträngige DNA Fragmente wurden in den PCR®II Vektor aus dem *TA Cloning*TM*Kit* (Invitrogen) oder den pBluescript II Vektor (Stratagen) ligiert. Hierbei wurde ein molares Vektor:Insert Verhältnis von 1:1 bis 1:3 gewählt. Die Ligation erfolgte in Ligations-Puffer, wobei jeweils 50 ng des Vektors und 4 U T₄-DNA-Ligase eingesetzt wurden. Der Reaktionsansatz besaß ein Gesamtvolumen von 10 µl und wurde bei 14°C über Nacht inkubiert. Das entstehende zirkuläre Produkt konnte direkt zur Transformation kompetenter *E. coli* verwendet werden.

Ligasepuffer: 50 mM tris-HCl, 10 mM MgCl2, 10 mM DTT, 1 mm ATP, 25 µg/ml BSA, pH 7.8

2.2.14 Polymerase Kettenreaktion; PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR; Mullis & Fallona, 1987; Saiki et al., 1988) dient der enzymatischen in vitro Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente. Die Reaktion besteht aus aufeinanderfolgenden Amplifikationszyklen, die jeweils durch drei Phasen unterschiedlicher Temperatur charakterisiert sind. In der ersten Phase, der Denaturierungsphase, wird eine doppelsträngige DNA-Matrize bei einer Temperatur von 94 - 95°C in eine von Sekundärstrukturen freie Einzelstrang-DNA überführt. In der zweiten Phase, der Anlagerungsphase (annealing), wird die Temperatur auf 50 - 68°C abgesenkt. Dadurch können sich spezifische Oligodesoxynukleotide (Primer), die jeweils in entgegengesetzter Orientierung die Zielregion in einer Duplex-DNA flankieren, an die komplementäre Zielregion der denaturierten Matrizen-DNA anlagern. In der Extensionsphase werden dann die Oligodesoxynukleotide durch eine thermostabile DNA-Polymerase bei 68°C bzw. 72°C in 5´→3´-Richtung komplementär zur Zielregion verlängert. In den aufeinanderfolgenden Amplifikationszyklen kommt es damit zur exponentiellen Anreicherung der durch die beiden Primer flankierten Ziel-DNA-Sequenz. Um optimale Anlagerungsbedingungen für beide Primer zu schaffen und damit eine spezifische Amplifikation zu gewährleisten, durften sich die eingesetzten Oligodesoxynukleotide nur wenig in Länge und GC-Gehalt voneinander unterscheiden (Wu et al., 1991). Zusätzlich sollten komplementäre Sequenzen innerhalb der Oligodesoxynukleotide vermieden werden, um die Ausbildung von Sekundärstrukturen (Dimere) zu unterdrücken. Für die Synthese der PCR-Produkte wurden Tag-Polymerasen verschiedener Hersteller (Qiagen, GibcoBRL, Clontech) und die jeweils mitgelieferten Puffer verwendet. Die PCR-Reaktionen wurden in 0,2 ml-Reaktionsgefäßen in 20-100 µl-Ansätzen durchgeführt. Für ein Gesamtvolumen von 30 µl wurden die einzelnen Komponenten in folgendem Verhältnis eingesetzt:

Primer (up) (10 μ M):	1 μl
Primer (low) (10 µM)	1 μl
10 x Puffer	3 µl
dNTP-Mix (10 mM)	0,5 μl
Taq-Polymerase	0,5 - 1 μl
zu amplifiziernde DNA	20-100 ng in 2 µl
H ₂ O Endvolumen	Bis auf ein Endvolumen von 30 µl auffüllen

Für alle PCR-Reaktionen wurde ein *hot start* durchgeführt, d.h. dass eine Reaktionskomponente physikalisch und funktional von den anderen Komponenten getrennt ist, bis der erste Amplifikationszyklus beginnt. Auf diese Weise konnte die Bildung unspezifischer PCR-Produkte vor dem Beginn der Reaktionszyklen verhindert werden. Diese können durch die Verlängerung falsch angelagerter oder durch Sekundärstrukturen verzerrter Primer entstehen. Hierzu wurden die PCR-Ansätze erst in die PCR-Maschine gestellt, wenn diese während einer Phase vor dem erstem Amplifikationszyklus 94°C erreicht hatte. Für die Reaktionen wurden PCR-Geräte von Perkin-Elmer (GeneAmp 2400) und Biometra (T*Gradient*) verwendet, die mit einem beheizbaren Deckel ausgestattet sind. Es wurde wahlweise der Heizdeckel oder Mineralöl als Verdunstungsschutz gewählt.

Sollte das PCR Produkt für eine anschließende Klonierung mittels eines T/A-Klonierungs-Systems eingesetzt werden, wurde der Ansatz nach dem letzten Zyklus für 10 min bei 72°C inkubiert. Durch die matrizenunabhängige Aktivität der *Taq*-Polymerase am 3´-Ende des Duplex-Moleküls, werden hierbei einzelne Deoxyadenosin-Reste angefügt. Das PCR-Produkt konnte daher direkt für eine Ligationsreaktion in einen Vektor mit dT-Überhängen eingesetzt werden.

Sofern sie nicht zur Verfügung standen, wurden als Primer Oligodesoxynukleotide von 18-25 Nukleotiden Länge gewählt, die mit dem Programm OLIGO 4.0 entworfen wurden. Bei der Erstellung der Primer wurde darauf geachtet, dass die Primer wenig Möglichkeiten zur Sekundärstrukturausbildung hatten und der G/C-Gehalt über 50% lag.

Primer	Sequenz
GAPDH 3'	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA -3'
GAPDH 5′	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC -3'
FS1 (CRFR1 3')	5'-CAGTGCAATGCCTCCGTGGACCTCA -3'
FS2 (CRFR1 5´)	5'-TGTGGAAGCTGACTCTGGTGGGGGA -3'
FS5 (CRFR2α 3')	5'- GGCCGAAGAGCTGCTCCTGGA -3'
FS6 (CRFR2α 5 ⁻)	5'-CCACCAGGGCCACCAGGGAAA -3'
FS7 (CRFR2α 3´)	5´-GTCTGCTTGATGCTGTGG - 3´
FS8 (CRFR2α 5´)	5´-GCTTAGAGTCGACATGGA -3´
T7 Primer	5´-TAATACGACTCACTATAGGG -3´
M13 Forward	5'-GTAAAACGACGGCCAGT -3'
M13 Reverse Primer	5'-CAGGAAACAGCTATGAC -3'
cDNA-Synthese Primer	5'-TTTTGTACAAGCTT(30) - N1 - N -3'

Tab. 2.1: Verwendete Primer

2.2.15 Durchführung einer semiquantitativen PCR

Durch semiquantitative PCR können Konzentrationsunterschiede eines PCR-Fragmentes in verschiedenen Reaktionsansätzen bestimmt werden. Der Vergleich von PCR-Produkten ist möglich, wenn die Amplifikationskurven der entsprechenden PCR Reaktionen sich in der linearen Phase befinden (Köhler, 1995). Die Identifikation von gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Fragmenten im linearen Bereich erfolgte über Intensitätsbestimmung der Banden bei jeweils gleichen Zyklenzahlen. Konzentrationsunterschieden der PCR-Fragmente wiesen dabei auf Mengenunterschiede eines bestimmten Ausgangsproduktes hin. Die Auswertung und Intensitätsbestimmung gelelektrophoretisch aufgetrennter PCR-Fragmente erfolgte mit dem Programm WINCAM 2.2. Zur Kontrolle wurde für jede semiquantitative PCR Reaktion gleichzeitig eine PCR Reaktion zur Amplifikation des Gens für GAPDH (Glyzerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) durchgeführt. Das GAPDH Gen codiert ein essentielles Enzym der Glykolyse. Solche Gene nennt man "Haushaltsgene", da Ihre Expression unabhängig von äußeren Einflüssen nahezu konstant ist. Die semiquantitative PCR Reaktion wurden jedoch stets nur als einleitendes Experiment angewandt.

2.2.16 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode mit Didesoxynukleotiden (Sanger et al., 1977). Bei dieser Methode werden DNA-Sequenzen ermittelt, indem man Fragmente durch kontrollierte Unterbrechung der enzymatischen Reaktion erzeugt. Die zu sequenzierenden DNA-Stränge werden hierbei in Verbindung mit spezifischen Primern für die Polymerasereaktion verwendet. Dabei werden neben Desoxynukleotiden (dNTP's) gleichzeitig auch vier fluoreszenzmarkierte 2'-3'-Didesoxynukleotide (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) eingesetzt. Die vier ddNTP's sind mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die eine spezifische Basenerkennung erlauben. Beim Einbau eines der vier ddNTP's in den synthetisierten DNA-Strang, wird die Kettenverlängerung aufgrund der fehlenden 3´-OH-Gruppe der Ribose gestoppt. Da dNTPs und ddNTPs statistisch mit gleicher Wahrscheinlichkeit verteilt und eingebaut werden, entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge. Diese können in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt werden. Für die Sequenzanalyse wurde ein 373A-Sequenzier-Gerät (Applied Biosystems) und für die jeweilige PCR-Reaktion das ABI *PRISMTM* Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) verwendet. Der Sequenziermix enthält dNTPs, fluoreszenzmarkierte ddNTPs, Tris/HCl (pH 9,0), MgCl₂ und die thermostabile Ampli*Taq* DNA Polymerase. Die Ampli*Taq* DNA Polymerase ist eine modifizierte Taq-DNA-Polymerase ohne 5'-3'-Exonuklease-Aktivität, die nur geringfügig zwischen dNTP's und ddNTP's unterscheiden kann. Der dNTP-Mix enthält zudem dITP statt dGTP, um die Ausbildung von Sekundärstrukturen innerhalb der synthetisierten Einzelstränge zu unterdrücken. Für die PCR-Reaktion wurden jeweils 200-500 ng doppelsträngige Plasmid-DNA, 3,2 pMol des Sequenzierprimers und 4 µl *Terminator Ready Reaction-Mix* eingesetzt und mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Die Sequenzierreaktion fand in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen statt:

5 min	95°C		
30 Zyklen:			
Denaturieru	ngsphase:	30 s	95°C
Anlagerungs	sphase:	10 s	50-55°C
Extensionspl	hase:	4 min	60°

Die Proben wurden anschließend in einem Polyacrylamid-Gel (4%) mittels des 373A-Sequenzier-Gerät (Applied Biosystems) eletrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit den Programmen von Applied Biosystems ausgewertet.

2.2.17 Auftrennen von RNA in einem Formaldehydgel

Ein Formaldehyd-haltiges Gel gewährt bei der Elektrophorese von RNA die Auftrennung der RNA unter denaturierenden Bedingungen. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte in Anlehnung an Sambrook et al. (1989).

Vor der Elektrophorese wurden Gelkammer und Taschenformer mit 3% H_2O_2 gespült und anschließend mit Ethanol (abs.) getrocknet. Zur Herstellung eines 1 % Formaldehyd-Agarose-Geles wurden 1 g Agarose mit 88 ml DEPC-H₂O aufgekocht, auf 60°C abgekühlt und dann mit 10 ml 10 x MOPS und 1,8 ml 37% Formaldehyd versetzt. Anschließend wurde das Gel in die vorbereitete Apparatur gegossen. Die gewünschte Menge an RNA wurde dann auf ein Volumen von 4,5 μ l gebracht, mit 10 μ l Formamid, 2 μ l 10 x MOPS-Puffer und 3,5 μ l 37 % Formaldehyd gemischt, 15 min bei 65°C inkubiert, um Sekundärstrukturen aufzulösen und bis zum Auftragen auf Eis aufbewahrt. Analog wurde mit 2 μ l der 0.24 - 9.5 KB-RNA-Leiter (1 μ g/ μ l) verfahren. Die Proben wurden dann umgehend auf das Gel aufgetragen, wobei zuvor noch 2 μ l Probenbeladungspuffer zugegeben wurde. Die Elektrophorese wurde für ca. 2 h in 1 x MOPS-Puffer bei 100 V (10-15 V/cm) durchgeführt.

Den Proben wurde nach der Hitzeinkubation bei 65°C noch 2 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugesetzt, so dass die RNA-Banden unter UV-Licht detektiert werden konnten.

10x MOPS-Puffer: 0,2 M MOPS (3-(N-Morpholin)propansulfonsäure), 80 mM NaAcetat; in DEPC-H₂O aufnehmen und mit 10 N NaOH auf pH 7 einstellen, anschließend 10 mM EDTA zufügen und mit DEPC-H₂O auf entsprechendes Volumen auffüllen. Lauf-Puffer: 1x Mops-Puffer

2.2.18 Herstellung von mit Digoxigenin-UTP markierten cRNA Sonden

Für die *in situ* Hybridisierung wurden DIG markierte, einzelsträngige RNA-Proben hergestellt. Die *in vitro* Transkription und gleichzeitige Markierung der Proben mit DIG-UTP erfolgte mit einem "DIG RNA Markierungs-Kit" (Hoffmann La Roche, CH). Als "Ausgangs-DNA" wurden jeweils in den pBluescript II® (Stratagene) Vektor klonierte cDNA Sequenzen des *CRFR1* und *CRFR2* verwendet. Durch Ansequenzierung wurde zunächst die Orientierung der entsprechenden cDNA's im Vektor bestimmt. Hierbei wurde unterschieden, ob das 5′ Ende des codogenen oder komplementären Stranges der "Ausgangs-DNA" unterhalb vom Promotor des *lacZ* Gens vorlag. Im ersten Fall konnte unter Verwendung der T3 Polymerase die Sinn-Strang (engl.: *sense*) und unter Verwendung der T7 Polymerase die Anti-Sinn-Strang (engl.:*antisense*) hergestellt werden. Das Plasmid wurde zunächst mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert, so dass die *in vitro* Transkription jeweils nach der Schnittstelle abbricht, weshalb man auch von "run off" Transkription spricht. Hierbei war zu beachten, dass das verwendete Restriktionsenzym nicht innerhalb der "Ausgangs-DNA" schneidet. In dieser Arbeit wurden die kompletten cDNA Sequenzen von *CRFR1* und *CRFR2* α als "Ausgangs-DNA" verwendet. Der Vektor wurde mit den Restriktionsendonukleasen Eco RV oder Spe I geschnitten. Durch *in vitro* Transkription konnte dann mittels der T3 und T7 RNA Polymerase die entsprechenden *sense* und *antisense* Sonden synthetisiert werden.

Ein Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

μg gereinigte, linearisierte "Ausgangs DNA"
 μl 10 x NTP Mix (mit DIG markiertem UTP)
 μl RNase Inhibitor
 μl RNA Polymerase (T7 oder T3)

Der Ansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl DNaseI zugegeben und die Inkubation für weitere 15 min bei 37°C fortgesetzt. Die Reaktion wurde durch 2 µl 0.2 M EDTA (pH 8) gestoppt. Durch eine limitierte alkaline Hydrolyse wurden die Sonden dann auf eine Länge von ca. 200 bp eingestellt. Hierzu wurde der Reaktionsansatz mit DEPC-H₂O auf ein Volumen von 100 µl gebracht und mit 100 µl 0.2 N NaOH vermischt und auf Eis inkubiert. Die Inkubationszeit richtete sich nach der Länge der Sonde und wurde nach folgender Formel berechnet:

 $t(min) = L_{s}-L_{E}/K \ge L_{s} \ge L_{E}$

wobei gilt: L_s = Ausgangslänge der Sonde in KB; L_E = Angestrebte Länge der hydrolysierten Sonde in kB (200 kB); K = 0,1101 kB/min.

Die Qualität des vollständigen und des hydrolisierten Transkripts wurde durch Elektrophorese in einem Formaldehyd-Agarosegel analysiert. Anschließend wurde die cRNA gefällt und in DEPC Wasser resuspendiert.

2.2.19 In situ Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung ermöglicht es spezifische RNA Moleküle in fixiertem Gewebe zu detektieren.

Nach Beendigung des jeweiligen Versuchs wurde die Tiere durch Genickbruch getötet. Das Gehirn wurde entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Mit einem Mikrotom wurden die Hirne anschließend bei -20°C in 10 µM dünne Scheiben geschnitten, welche auf einem sterilen Objektträger aufgenommen wurden. Die Objektträger wurden 5 min in 4% Paraformaldehyd inkubiert und danach 3 x mit PBS Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte 5 min mit 0,1 M Triethanolamin (TEA) gewaschen und für 15 min mit 0,1 M TEA/0.5 % Aceticanhydrid inkubiert.

Die Prä-Hybridisierung erfolgte durch eine vierstündige Inkubation der Objektträger in Hybridisierungspuffer. Hierzu wurden die Objektträger zusammen mit einem in Formaldehyd/5xSSC (1:1) getränktem Filterpapier in eine Petrischale gelegt, 150 µl Hybridisierungspuffer auf die Schnitte gegeben und die Objektträger anschließend mit sterilem Parafilm abgedeckt. Die Petrischale wurde verschlossen und mit Parafilm abgedichtet. Zur Hybridisierung wurde die antisense- bzw. sense-Sonde in Hybridisierungspuffer verdünnt (1:20-1:100) und analog zur Prä-Hybridisierung auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation wurde für 16-18 h bei 48°C (*CRFR2*) bzw. 50° (*CRFR1*) durchgeführt. Anschließend wurden die Objektträger 30 min bei 37°C mit RNaseA (50µg/ml) behandelt und danach jeweils 10 min in 2 x SSC (RT) und 0,2 x SSC (58°C) gewaschen und schließlich für 1h mit Block-Puffer inkubiert. Danach wurde der mit einer alkalinen Phosphatase konjugierte Anti-DIG Antikörper 1:2000 in Block-Puffer verdünnt und für 1 h zu den Schnitten gegeben. Abschließend wurden die Objektträger mehrmals mit Entwicklungspuffer gewaschen und danach für 6-16 h lichtgeschützt mit 5-bromo-4-chloro-3indolyl-phosphate/Nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT) - Lösung inkubiert, bis ein ausreichendes Signal zu beobachten war. Für die Quantifizierung der Signale wurde zunächst

die optimale Entwicklungszeit bestimmt und die Intensität der Signale anschließend mit einem NIH-image Analyse System bestimmt.

Hybridisierungspuffer: 50% Formamid, 2% Blocking Reagenz (Boehringer Mannheim),
0.02% SDS, 0.1 % Sarcosyl/1x SSC
TEA: 1M Stammlösung (pH 8)
RNase Puffer: 10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 500 mM NaCl (pH 8)
Block-Puffer: 0,1 M Maleinsäure, 1% *Blocking Reagent* (Boehringer Mannheim)
Entwicklungspuffer: 100 mM Tris HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl2
BCIP/NBT: 225 μl NBT (100 mg/ml), 175 μl BCIP (50 mg/ml) in 50 ml Entwicklungspuffer

2.2.20 Isolierung von Proteinen aus Hirngewebe

Der isolierte Hippokampus jeweils einer Maus wurde in 400 µl Extraktions-Puffer aufgenommen und mit einer Schere zu feinen Gewebestücken zerkleinert. Die Gewebesuspension wurde 5 min bei 98°C inkubiert und anschließend 10 min zentrifugiert (4°C; 10000 x g). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und stellte den Proteinextrakt dar.

Extraktionspuffer: 125 mM Tris HCl (pH 6,8) 3% SDS, 5% β-Mercaptoethanol

2.2.21 Isolierung von nativen Proteinen aus Hirngewebe

Native Proteine wurden isoliert, wenn in weiterführenden Experimenten Immunopräzipitationen durchgeführt oder Kinaseaktivitäten gemessen werden sollten. Hierzu wurde der Hippokampus je einer Maus in 400 µl RIPA (engl.: *radioimmunoprecipitation*)-Puffer aufgenommen, mit einer Schere zu feinen Gewebestücken zerkleinert, 15 min bei 4°C inkubiert und anschließend zentrifugiert (14000 x g). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und stellte den Proteinextrakt dar.

RIPA-Puffer: Tris HCl 50 mM (pH 7,4), 1% NP-40, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA; unmittelbar vor Gebrauch wurden 1 mM PMSF, 1mM Na_3VO_4 und 1mM NaF zugesetzt, um endogene Proteasen und Phosphatasen zu inhibieren.

2.2.22 Isolierung von Kernproteinen aus Hirngewebe

Die Isolierung von Kernproteinen erfolgte nach dem Prinzip von Dignam et al. (1989). Aus insgesamt 5 Mäusen wurde der Hippokampus isoliert, in 1,5 ml Puffer A aufgenommen und mit einem Rotations-Homogenisator zerkleinert. Anschließend wurden 4,5 ml Puffer A zugesetzt und das Lysat für 10 min zentrifugiert (4°C, 2300 x g). Der Überstand wurde verworfen, dass Sediment in 5 ml Puffer A/ 40µl NP 40 resuspendiert und erneut für 10 min zentrifugiert (4°C, 2300 x g). Der Überstand wurde abgenommen und stellte den zytoplasmatischen Proteinextrakt dar. Das Sediment wurde in 50 µl Puffer B gelöst und mit einem Hand-Homogenisator behandelt. Der Homogenisator wurde mit 70 µl Puffer B ausgespült und die insgesamt 120 µl Lysat in ein neues Reaktionsgefäß überführt, welches 1 h auf Eis (alle 20 min wurde das Lysat kurz gevortext) inkubiert wurde. Abschließend wurde das Lysat 15 min zentrifugiert (4°C, 13000 x g) und der Überstand, der den nuklearen Proteinextrakt darstellte, in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Puffer A: 10 mM HEPES, 10 mM KCl, 100 µM EDTA, 100 µM EGTA, 1 mM DTT, 50 µM PMSF

Puffer B: 150 µM HEPES, 0,4 M NaCl, 100 µM EDTA, 100 µM EGTA, 50 µM PMSF Die Puffer wurden unmittelbar vor Gebrauch aus entsprechenden Stammlösungen angesetzt und auf eine pH Wert von 7,9 eingestellt.

2.2.23 Vermessung von Proteinen

Der Proteingehalt der Extrakte wurde durch einen Bradfordtest ermittelt. Dieser Test basiert auf der Beobachtung, dass das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliant Blue G-250 in saurer Lösung von 465 nm auf 595 nm steigt, wenn der Farbstoff an Proteine bindet (Bradford, 1976).

Jeweils 1 µl eines jeden Extrakts wurde auf 800 µl mit Wasser aufgefüllt. Nach Zugabe von 200 µl Färbelösung wurde die Lösung gut gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Als Leerwert wurden 800 µl Wasser entsprechend behandelt. Die Proben wurden bei 595 nm gegen den Leerwert gemessen.

Der Proteingehalt wurde anhand einer Eichgeraden ermittelt, die mit BSA im Bereich von 0,5 µg bis 8 µg Protein pro Ansatz erstellt wurde.

2.2.24 Immunopräzipitation von Proteinen

Durch Immunopräzipitation wurden Proteine mittels spezifischer Antikörper aus hippokampalen Proteinlysaten isoliert. Hierzu wurden 0,1 - 0,5 mg Gesamtprotein mit 2 µg des entsprechenden Antikörpers vermischt und für 1 h bei 4°C in einem Überkopfroller inkubiert. Anschließend wurden 50 µl magnetisch markierte ProteinA oder ProteinG Microbeads (Milteny Biotec) zugegeben. ProteinA Microbeads wurden verwendet, wenn es sich bei dem für die Immunopräzipitation benutzten Antikörper um einen Mausantikörper handelte. ProteinG Microbeads wurden dagegen verwendet, wenn der entsprechende Antikörper im Kaninchen hergestellt wurde. Das Gemisch wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend auf eine µMacs Säule (Milteny Biotec, D) gegeben, die sich in einem starken Magnetfeld befand und zuvor mit 100 µl Lysispuffer äquilibriert wurde. Die Säule wurde 3 x mit Lysispuffer und 4 x mit Waschpuffer gewaschen. Die immunopräzipitierten Proteine konnten jetzt entweder mit 50 µl Elutionspuffer (95°C) von der Säule eluiert werden oder direkt für einen Kinase Assay verwendet werden. Waschpuffer: 1M NaCl, 50mM Mops, 15% ETOH, pH 7 Elutionspuffer: 10 mM, Tris-HCl, 1% SDS Lysispuffer: 200 mM NaOH, 1% SDS

2.2.25 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zu analytischen Zwecken wurden Proteine in denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen ihrer Größe nach aufgetrennt. Dieses ist möglich, da das negativ geladene SDS die denaturierten Proteine bindet und diese im elektrischen Feld daher zur Kathode wandern. Ein eventuell vorhandener Ladungsunterschied wird dabei durch die stöchiometrische Bindung des SDS ausgeglichen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine wurde in diskontinuierlichen SDS-Gelen, bestehend aus einem oberen Sammelgel (pH 6,8) und einem unteren Trenngel (pH 8,8) erzielt. Zunächst wurden die Glasplatten gereinigt und getrocknet, Teflonabstandshalter seitlich eingefügt und dann in die Halterung eingespannt. Erst wurde das Trenngel hergestellt, zwischen die Glasplatten gegossen und zur Erzielung einer ebenen Polymerisationskante mit 0,1 % iger SDS-Lösung überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das 0,1% ige SDS entfernt. Dann wurde das Sammelgel über das Trenngel gegossen und ein Kamm geeigneter Taschengröße eingefügt, der nach der Polymerisation wieder entfernt wurde. Das Gel wurde nun in die Elektrophoresekammer eingespannt und die Pufferreservoirs mit Elektrodenpuffer gefüllt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte zunächst bei 60 V. Sobald die Proteine in das Trenngel eingedrungen waren, wurde eine Spannung von 120 V angelegt. Es wurden sowohl 10 %, als auch 12 % Gele verwendet.

2 Sammelgele		
30 % Acrylamid-Lösung (ml)	1,3	
Tris/SDS-Puffer, pH 6,8 (ml)	2,5	
$H_2O(ml)$	6,1	
10 % SDS Lösung (µl)	100	
APS (µl)	50	
TEMED (µl)	10	

2 Trenngele	10 %	12 %
30 % Acrylamid-Lösung (ml)	6,66	8
Tris/SDS-Puffer, pH 8,8 (ml)	5	5
$H_2O(ml)$	4,7	13,4
10 % SDS Lösung (µl)	200	200
APS (µl)	100	100
TEMED (µl)	10	10

2.2.26 Proteintransfer auf PVDF Membranen

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine mit Antikörpern zu detektieren, mußten die Proteine zuerst aus dem Gel mittels Elektrotransfer auf eine proteinbindende Membran übertragen werden. Dazu wurde eine Semi-Dry-Blotkammer und Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen mit einer Porengröße von 0,45 µm verwendet.

Zuerst wurden drei Filterpapiere (9,7 cm x 6,7 cm) in Kathodenpuffer B gewaschen und auf die Kathode der Apparatur gelegt. Dann wurde das in Kathodenpuffer B getränkte Gel, eine mit Anodenpuffer AI getränkte PVDF-Membran und drei in Anodenpuffer AI gewaschene Filterpapiere daraufgelegt. Den Abschluß bildeten drei in Anodenpuffer AII gewaschene Filterpapiere. Damit die stark hydrophobe PVDF-Membran benetzt werden konnte, mußte sie vorher 30 s in Methanol inkubiert werden.

Über den Stapel wurde die Anodenplatte gelegt. Der Transfer erfolgte bei konstantem Strom von 100 mA pro Gel (~2 mA/cm²) und maximal 25 V bei 4 °C über einen Zeitraum von 2,5 h.

Anodenpuffer A I: 30 mM Tris Base, 20 % (v/v) Methanol (pH 10,5) Anodenpuffer A II: 300 mM Tris Base, 20 % (v/v) Methanol (pH 10,5) Kathodenpuffer B: 25 mM Tris Base, 40 mM Amino-n-Capronat, 20 % (v/v) Methanol, pH9,4

2.2.27 Immunologische Detektion von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot; Immunoblot)

Die Proteine wurden mittels spezifischer Antikörper auf der PVDF-Membran detektiert. Dazu wurde das Chemilumineszenssystem von Tropix (Tropix, USA) verwendet. Alle Inkubationen wurden bei Raumtemperatur (RT) auf dem Schüttler durchgeführt. Für die Inkubationen mit der Antikörperlösung, dem Nitroblock II, sowie dem Substrat wurde die Membran in eine Polyethylenfolie eingeschweißt. Bei der Verwendung größerer Volumina der Lösungen (ca. 40 ml) wurden die Schritte in einer Plastikschale (11 cm x 11 cm x 5 cm, Länge x Breite x Höhe) durchgeführt. Die angegebenen Volumina beziehen sich jeweils auf eine Membran.

Um die Positionen der Markerbanden festzustellen wurde die PVDF-Membran zunächst 10 min mit Ponceau S-Färbelösung inkubiert und anschließend mit 5 % (v/v) Essigsäure entfärbt, bis sich die Banden deutlich vom Hintergrund abhoben. Dadurch wurden alle Proteine, die sich auf der Membran befanden sichtbar gemacht. Die Membran wurde photokopiert und die Kopie zur Bestimmung der Molekulargewichte verwendet. Zudem konnte man abschätzen, ob in jeder Spur die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde. Die mit Ponceau S gefärbten Membranen wurden zweimal für jeweils 5 min mit PBS-Puffer gewaschen, um restliches Methanol zu entfernen. Nach einer einstündigen Inkubation in Blockierungspuffer, die zur Absättigung aller freien Bindungsstellen der Membran erforderlich war, wurde die Membran für eine weitere Stunde mit 5 ml einer geeigneten Verdünnung des ersten Antikörpers in 1:1 (v/v) Wasch-/Blockierungspuffer inkubiert und anschließend zweimal 10 min in Blockierungspuffer gewaschen. Dann wurde der zweite Antikörper, der gegen den ersten gerichtet und an alkalische Phosphatase gekoppelt war, 1:10000 in 1:1 (v/v) Wasch-/Blockierungspuffer verdünnt und 1h mit der Membran inkubiert. Nach 3 Waschschritten in Blockierungspuffer für jeweils 10 min und 2 x 5 min in Assaypuffer wurde die Membran für 5 min in 5 ml Nitroblock II-Lösung inkubiert. Nach dem Waschen der Membran für 2 x 5 min mit Assaypuffer erfolgte die Inkubation in 5 ml CDP-StarTM-Substrat-Lösung. Die Membran wurde mit Papierhaushaltstüchern getrocknet und die Signale durch Exposition auf einem Röntgenfilm detektiert.

Assaypuffer: 0,1 M Diethanolamin, 1 mM MgCl₂ (pH 10,0); sterilfiltrieren Blockierungspuffer: 0,2 % (w/v) I-Block, 0,1 % (v/v) Tween 20, 20 % (v/v) 5x PBS CDP-StarTM-Substrat-Lösung: 0.1 % (v/v) CDP-StarTM in Assaypuffer Nitroblock II-Lösung: 2,5 % (v/v) Nitroblock II in Assaypuffer 5x PBS-Puffer: 231 mM Na₂HPO₄ · 2 H₂O, 85 mM NaH₂PO₄ · H₂O, 342 mM NaCl, (pH 7,3 – 7,4); autoklavieren; Zugabe von 0,5 % (w/v) Natriumazid. Ponceau S-Färbelösung: 0,2 % (w/v) Ponceau S in 1 % (v/v) Essigsäure Waschpuffer: 0,1 % (v/v) Tween 20, in 1x PBS, sterilfiltrieren

2.2.28 Quantifizierung von Western Blots

Um die Signale der mittels Western Blot detektierte Protein statistisch auszuwerten, wurden die entsprechenden Röntgenfilme gescannt und anschließend densiometrisch quantifiziert.

Hierfür wurde das Programm WinCam 2.2 (Cybertech, Berlin) verwendet. Dabei wurden nur Signale solcher Western Blots verwendet, bei denen die Ponceau-Färbung der PVDF Membran ergeben hatte, dass in jeder Spur tatsächlich gleiche Mengen an Gesamtprotein vorhanden waren. Sollte der Gehalt von Phosphoproteinen analysiert werden, wurde als zusätzliche Kontrolle der Gehalt an entsprechend unphosphoryliertem Protein untersucht. In manchen Fällen wurde statt dessen auch der Gehalt an Aktin analysiert.

2.2.29 Immunohistochemische Analyse von Proteinen

2.2.29.1 Perfusion

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden die Mäuse nach Beendigung des jeweiligen Experiments mit 0,5 ml Avertin (intraperitoneal) narkotisiert. Sobald die narkotische Wirkung eingetreten war, wurde der Thorax bis zum Herz geöffnet und der linke Ventrikel zur Einleitung der Perfusionslösungen und das rechte Atrium zum Auslauf eingeschnitten. Nachdem die Perfusionskanüle eingeführt war, wurden über eine Peristaltikpumpe zuerst ca. 50 ml PB-Puffer (4°C) zum Auswaschen des Blutes und anschließend ca. 100 ml Paraformaldehyd (PFA)-Lösung (4°C) zur Fixierung des Gewebes appliziert. Dann wurden die Tiere dekaptiert und das Gehirn entnommen. Zur Postfixierung wurden die Gehirne in jeweils 20 ml PFA-Lösung für 48 h bei 4°C inkubiert. Danach folgten jeweils 24 h andauernde Inkubationen in 10 %, 20 % und 30 % (w/v) Saccharoselösungen. Avertin: 1,4 % (w/v) Tribromethanol, 1,4 % Amylalkohol in Wasser gut schütteln; Lagerung im Dunkeln bei 4 °C.

PB-Puffer: 25 mM NaH₂PO₄ · H₂O, 75 mM Na₂HPO₄ · 2 H₂O, pH 7,4
PFA-Lösung: 4 % (w/v) Paraformaldehyd in PB-Puffer, pH 7,4
10 % (w/v) Saccharoselösung: 10 % (w/v) Saccharose in PB-Puffer
20 % (w/v) Saccharoselösung: 20 % (w/v) Saccharose in PB-Puffer

30 % (w/v) Saccharoselösung: 30 % (w/v) Saccharose in PB-Puffer

2.2.29.2 Hirnschnitte

Um die Gehirne zu schneiden, wurden diese in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und mit Einbettmedium überschichtet. Mit einem Mikrotom wurden 50 µm dicke Frontalschnitte angefertigt, die in Lagerungs-Puffer gesammelt wurden. Unter diesen Bedingungen konnten die Hirnschnitte mehrere Wochen bei 4 °C gelagert werden.

Lagerungs-Puffer: 0,01 M PBS, 2,7 mM KCl und 137 mM NaCl, 0,4 µg/ml Methiolat (pH 7,4)

2.2.29.3 Immunodetektion

Durch histochemische Immunofärbung konnten spezifische Proteine in fixiertem Gewebe detektiert werden. Hierbei erkennt ein Antikörper spezifisch das Zielprotein und wird dann durch einen zweiten Antikörper erkannt. Durch das ABC-System (Vector, CA, USA; engl.: *avidin-biotin complex*) erfolgte dabei eine starke Signalverstärkung. Diese Verstärkung beruht darauf, dass der zweite Antikörper biotinyliert ist und mit hoher Affinität von Avidin gebunden wird. Avidin bindet gleichzeitig an eine ebenfalls biotinylierte Peroxidase, welches letztlich ein Substrat zu einen sichtbaren Farbstoff oxidiert.

Alle Schritte wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei Raumtemperatur (RT) auf dem Schüttler in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen durchgeführt. Eine Vertiefung enthielt 3 bis 6 Schnitte und wurde mit 0,5 -1 ml der jeweiligen Lösung aufgefüllt. Zuerst wurden die Schnitte in PBS-Puffer gewaschen. Dann wurden die Schnitte 15 min in 1 % (v/v) H_2O_2 in Methanol inkubiert, 2 x 10 min TBS-Puffer gewaschen, um das Gewebe zu permeabilisieren, und schließlich 2-6 h mit Sättigungspuffer inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verringern. Dann wurden die Schnitte mit einer geeigneten Verdünnung des 1. Antikörpers 24-72 h bei 4 °C inkubiert, anschließend 3 x 10 min mit Waschpuffer gewaschen und 1 h mit dem biotinylierten 2. Antikörper bei RT inkubiert. Zum Schluß wurden die Schnitte 1 h mit dem ABC-Komplex inkubiert, 3 mal mit PBS-Puffer gewaschen und dann mit Diaminobenzidine (DAB)-Lösung gefärbt, bis ein guter Farbkontrast zum Hintergrund sichtbar wurde. Die Farbreaktion wurde durch zweimaliges Waschen in PBS-Puffer gestoppt.

Sättigungspuffer: 5 % (v/v) Ziegenserum, 0,3 % TX-100 in 0,01 M PBS

TBS-Puffer: 0,2 % (w/v) TX-100 in 0,01 PBS

AK-Lösung: 0,5 % (v/v) 2. Antikörper (biotinylierter Ziegen-anti-Kaninchen-Antikörper; biotinylierter Ziegen-anti-Maus-Antikörper) in Sättigungspuffer

ABC-Komplex (Vector Kit): 1 % (v/v) Avidinlösung, 1 % (v/v) Biotinylierte Meerrettich Peroxidase Lösung in TBS Puffer

DAB-Lösung: 0,07 % (w/v) 3,3´-Diaminobenzidin, 0,2 % (w/v) Urea, 0,06 M Tris Waschpuffer: 1 % (v/v) Ziegenserum in TBS

2.2.29.4 Immunohistochemische Co-immunodetektion (Doppelfärbung)

Mittels der Doppelfärbung konnten zwei verschiedene Proteine im selben Hirnschnitt immunologisch detektiert werden. Hierzu wurde das TSA[™]Fluorescence System der Firma NEN[™] Life Science verwendet. Das System beruht auf den unterschiedlichen Anregungsund Emissions-Eigenschaften der beiden Fluorophore Tetramethylrhodamin und Fluorescein.

Fluorophor	Anregung	Emission
Tetramethylrhodamin	550 nm	570 nm (rot)
Fluorescein	494 nm	517 nm (grün-gelb)

Die Detektion wird durch die Tatsache ermöglicht, das die Fluorophore von der Peroxidase oxidiert werden und die Schnitte anschließend mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert werden können. Zunächst wurden die Schnitte wie unter 2.2.29.3 beschrieben behandelt und nach der Inkubation mit dem ABC Komplex 3 x mit PBS-Puffer gewaschen und 10 min mit Tetramethylrhodamin (1:50 in PBS) inkubiert. Für alle folgenden Schritte wurde die Zellkulturplatte in Alufolie verpackt um den Lichteinfall zu minimieren. Die Schnitte wurden nun erneut in PBS-Puffer gewaschen, 15 min in 1 % (v/v) H₂O₂ in Methanol inkubiert, 2 x 10 min TBS-Puffer gewaschen und schließlich 2-6 h mit Sättigungspuffer inkubiert. Dann wurden die Schnitte mit einer geeigneten Verdünnung des 1. Antikörpers für das 2. zu detektierende Protein 24-72 h bei 4 °C inkubiert, anschließend 3 x 10 min mit Waschpuffer gewaschen und 2 h mit dem 2. Antikörper (1:25) bei RT inkubiert. Dieser 2. Antikörper (Sigma, Deisenhofen, D) war nicht biotinyliert, sondern direkt mit einer Peroxidase gekoppelt, um Wechselwirkungen mit dem in der ersten Färbung verwendeten ABC-Komplex zu vermeiden. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte 10 min mit Fluorescein (1:50 in PBS) inkubiert, anschließend erneut 3 x mit PBS gewaschen, auf Objekträger aufgezogen und für die Mikroskopie in Vectashield® (Vector) Aufziehmedium eingebettet.

2.2.29.5 Mikroskopie

Die Schnitte wurden zum Betrachten unter dem Mikroskop auf Objektträger transferiert. Dazu wurden sie erst in eine Petrischale mit Aufziehmedium gelegt und mit einem Pinsel auf die Objektträger gebracht. Bevor sie mit einem Deckglas versehen werden konnten, mußten die Schnitte mit Ethanol in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe (50 %, 70 %, 95 % und 2 mal 100 %) für jeweils 1 min dehydriert werden. Dann wurden sie 2 mal für jeweils 1 min in 100 % Xylol getaucht und mit einem nicht-wässrigen Eindeckmedium die Deckgläser auf dem Objektträger befestigt. Nach 24 h waren sie getrocknet und konnten unter dem Mikroskop betrachtet werden. Das Mikroskop war mit einer Kamera ausgestattet, welche die Daten zu einem Computer transferierte, wo die Bilder bearbeitet werden konnten. Für die Betrachtung von fluoreszierenden Gewebeschnitten wurden diese nach dem Aufziehen auf Objektträger in Vectashield® (Vector) Aufziehmedium eingebettet und mittels eines dreifachen Bandpass Filters (Appligene) unter dem Mikroskop betrachtet.

Aufziehmedium: 0,1 % (w/v) Gelatine, 10 % (v/v) Ethanol

2.2.30 Verhaltensexperimente

Die Verhaltensexperimente wurden mit einem computerunterstützten Furchtkonditionierungssystem der Firma TSE (Bad Homburg, D) ausgeführt. Dabei wurden die Mäuse in eine Plexiglaskammer (Trainingskammer: 35 cm x 20 cm x 20 cm, Länge x Breite x Höhe) gesetzt, deren Boden aus einem Gitter rostfreien Stahls (Durchmesser der Stäbe 4 mm, Abstand 9 mm) bestand. Das Gitter war mit einer Steuereinheit verbunden, die elektrischen Strom definierter Intensität (0,7 mA) und Dauer (2 s) erzeugte. Die Plexiglaskammer und das Gitter wurden vor jedem Versuch mit 70 % igem Ethanol gewaschen, um den Geruch der Mäuse aus vorangegangenen Experimenten zu neutralisieren. Die Kammer befand sich in einem Plastikgehäuse an dessen Decke sich eine Lampe (12 V) und ein Lautsprecher (Hintergrundrauschen 60 dB SPL) befanden. Ein Computer, der die Steuereinheit kontrollierte, diente zur Eingabe der Versuchsstruktur.

2.2.30.1 Kontextabhängige Furchtkonditionierung

Zur kontextabhängigen Furchtkonditionierung wurden die Mäuse jeweils 180 s lang in die Trainingskammer (Kontext) gesetzt und hatten somit die Gelegenheit diese neue Umgebung zu entdecken. Darauf folgte direkt ein 2 s dauernder elektrischer Fußschock (S) mit der Intensität von 0,7 mA. Danach wurden die Mäuse zurück in ihren Käfig gesetzt. Der Gedächtnistest wurde 24 h später durchgeführt, indem die Tiere erneut für 180 s in die Trainingsbox gesetzt wurden.

Als Maß für konditionierte Furcht wurde während dieses Zeitintervalls alle 10 s (18 mal in 180 s) dokumentiert, ob die Tiere erstarren. Erstarren ist als das Fehlen jeder Bewegung außer Atmung und Herzschlag definiert. Es ist ein angeborenes Verhalten, welches Mäuse zeigen, wenn sie Furcht haben. Die Messungen wurden von zwei geschulten Beobachtern durchgeführt, von denen einer nicht in das jeweilige Experiment eingeweiht war. Die Erstarrung, als Maß für Gedächtniskonsolidierung, wurde in der Auswertung als Prozentwert in Bezug auf alle 18 Beobachtungen während des Gedächtnistest angegeben. In vielen in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten, wurde kein Gedächtnistest durchgeführt. Statt dessen wurden zu bestimmten Zeitpunkten nach dem Training hippokampale Proteinlysate hergestellt.

Außerdem wurden in manchen Experimenten zusätzlich zu naiven Tieren folgende Kontrollgruppen eingeführt, die kein assoziatives Lernen zeigten.

Kontext-Gruppe: Die Tiere erkunden zwar für 180 s die Versuchsbox, erhalten jedoch keinen Elektroschock).

Schock-Kontext Gruppe: Die Tiere erhalten den Elektroschock unmittelbar dann, wenn sie in die Versuchsbox gesetzt wurden und können diese erst dann für 180 s erkunden (siehe auch 1.2).

2.2.30.2 Tonabhängige Furchtkonditionierung

Für das Training der tonabhängigen Furchtkonditionierung wurden die Tiere, wie bei der kontextabhängigen Furchtkonditionierung, jeweils 180 s lang in die Trainingskammer (Kontext) gesetzt. Dananch folgte zunächst für 30 s ein Ton (10 kHz, 75 dB SPL) und direkt im Anschluß ein 2 s dauernder elektrischer Fußschock mit der Intensität von 0,7 mA. Um das tonabhängige, assoziative Lernen zu analysieren wurden die Tiere 24 h später für den Gedächtnistest in eine für sie unbekannte Versuchsbox (neuer Kontext; Plexiglaskammer: 35
cm x 20 cm x 20 cm, Länge x Breite x Höhe) gebracht, die sich von der Trainingskammer u.a. durch das Fehlen des Bodengitters und den Geruch (die Box wurde mit 1% Essigsäure statt Ethanol, ausgewischt) unterschied. Nachdem die Tiere diesen neuen Kontext für 180 s erkundet hatten, wurde für weitere 180 s der Ton präsentiert. Als Maß für konditionierte Furcht wurde während der gesamten 360 s alle 10 s dokumentiert, ob die Tiere erstarren (siehe auch 1.2).

2.2.31 Injektion von Lösungen in den Hippokampus

Mittels speziell angefertigter Mikrokanülen konnten Lösungen, wie Inhibitoren von Proteinkinasen oder CRF Rezeptor Antagonisten direkt in den Hippokampus injiziert werden. Aufgrund der extremen Feinheit der Kanülen ist die Schädigung für das Gewebe minimal, so dass es problemlos möglich ist, Lösungen intrahippokampal zu injizieren, anschließend einen intakten Hippokampus zu präparieren und Proteinlysate herzustellen.

Die Tiere wurden zunächst durch die intraperitoneale Injektion von 0,5 ml Avertin anästhesiert und anschließend in einer sterotaktischen Apparatur (Anilam, USA) fixiert, mit der es möglich war, die Mikrokanülen gezielt in den dorsalen Hippokampus einzuführen. Dabei wurde eine elektronische Koordinationseinheit (Anilam, USA) und ein spezieller Bohrer eingesetzt. Die Kanülen wurden anschließend mit Zahnarztzement am Schädel fixiert. Folgende Koordinaten wurden verwendet:

Posterior zum Bregma: -1,5 mm

Lateral: ±1 mm

Tiefe: 2 mm

Zwischen dem Zeitpunkt der Operation und den anschließenden Experimenten lagen jeweils mindestens 5 Tage. Alle Injektionen erfolgten während die Tiere kurzzeitig mit dem Inhalationsbetäubungsmittel Isofluran betäubt waren. Das in den Hippokampus injizierte Volumen betrug unabhängig von der gelösten Substanz immer 0,5 µl. Die Injektion erfolgte bilateral mit einem elektronisch kontrollierten Injektor über einen Zeitraum von 15 s. Um die korrekte Position der Mikrokanüle festzustellen, wurden die Tiere nach abgeschlossenen verhaltensbiologischen Experimenten mit dem Farbstoff Methylenblau injiziert, anschließend das Gehirn mit einem Mikrotom geschnitten und anhand der Färbung die genaue Position der Mikrokanüle festgestellt. Für die statistische Datenanalyse der Verhaltensexperimente wurden nur solche Tiere verwendet, die korrekt plazierte Mikrokanülen aufwiesen (Abb.2.2.31).



Abb. 2.2.31 Intrahippokampale Injektion mittels Mikrokanülen

A. Schematische Darstellung der Position einer in den Hippokampus von Mäusen eingeführten Mikrokanüle. **B.** Frontalschnitt durch einen Maushippokampus. Das Tier wurde mittels einer intrahippokampalen Mikrokanüle mit Methylenblau injiziert. Die Kanüle wurde unmittelbar danach entfernt und mit einem Mikrotom Hirnschnitte von 50 μm Dicke hergestellt. CA1, hippokampales Feld CA1; CA3, hippokampales Feld CA3; DG, Gyrus dentatus.

2.2.32 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der Daten erfolgte durch Varianzanalyse (ANOVA; engl.: <u>An</u>alyses <u>of va</u>riance) unter Verwendung des Statistikprogramms Statview 4.51. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler (S.F.) angegeben. Als *post hoc*-Test zur Bestimmung der Signifikanzen wurde der Student's t-Test verwendet. Teilweise wurde nachfolgend der Scheffe's Test verwendet. Dabei gibt der Student's t-Test an, wie die Mittelwerte zweier Proben sich im Verhältnis zur Standardabweichung unterscheiden. Die Ergebnisse sind als t-Verteilung angeben. Anders als im t-Test, der die Mittelwerte der Proben nur paarweise vergleicht, konnten durch den Scheffe's Test mehrere Gruppen miteinander verglichen werden. Der Scheffe Test nutzt dabei die F-Verteilung. Als signifikant wurden Daten gewertet, bei denen für die Irrtumswahrscheinlichkeit (p), p < 0,05 galt.

3. Ergebnisse

3.1 Der hippokampale MAP Kinase Weg wird durch Furchtkonditionierung aktiviert

Um zu überprüfen, ob assoziatives Lernen Einfluss auf Komponenten eines hippokampalen MAP Kinase Wegs hat, wurden C57BL/6J Mäuse (5/Gruppe) mittels kontextabhängiger Furchtkonditionierung trainiert (Kontex-Schock Gruppe) und der hippokampale pErk-1/2 und pElk-1 Gehalt 0,5, 1, 3 und 24 h nach dem Training mittels immunohistochemischer Färbung analysiert. Kontrollgruppen bestanden aus naiven Tieren (die Mäuse wurden direkt aus dem "Wohnkäfig" entnommen und die Hippokampi für die immunohistochemische Färbung präpariert), und Tieren, die während des Trainings keinen Schock erhielten (Kontext-Gruppe) oder den Schock unmittelbar dann erhielten, wenn sie in die Versuchsbox gesetzt wurden (Schock-Kontext Gruppe). Es war dabei wichtig festzustellen, dass nur in der Kontext-Schock Gruppe assoziatives Lernen stattfindet (Abb. 3.1.1 A; siehe auch 1.2). Es konnte eine reiz-, zeit- und lokalisationsabhängige Zunahme der Erk-1/2 und Elk-1 Phosphorylierung beobachtet werden, wobei pErk-1/2 und pElk-1 zum Zeitpunkt 0,5 h nach dem Training gleichzeitig aufreguliert waren (Abb. 3.1.1B, Abb.3.1.2).



Abb. 3.1.1 Hippokampale Erk-1/2 und Elk-1 Phosphorylierung 30 min nach

kontextabhängiger Furchtkonditionierung.

A. C57BL/6J Mäuse (9/Gruppe) wurden durch kontextabhängige Furchtkonditionierung trainiert (Kontext-Schock Gruppe) und das Erstarren als Maß für assoziatives Lernen 24 h später im Gedächtnistest analysiert. Tiere der Kontext-Schock Gruppe zeigten im Gedächtnistest deutliches Erstarren (67%), wogegen Tiere der Kontrollgruppen, die entweder nicht trainiert (naive) waren oder während des Trainings keinen elektrischen Fußschock (Kontext-Gruppe) bzw. den Fußschock unmittelbar dann erhielten, wenn sie in die Versuchsbox gesetzt wurden (Schock-Kontext Gruppe), im Gedächtnistest kein Erstarren zeigten. Diese Ergebnisse zeigen, dass assoziatives Lernen nur in der Kontext-Schock Gruppe stattfindet. **B.** Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der hippokampalen Gewebeschnitte von naiven Mäusen bzw. von Mäusen 0,5 h nach der Kontext-, Schock-Kontext oder Kontext-Schock Exposition (je 5/Gruppe), die mit spezifischen Antikörpern für pErk-1/2 oder pElk-1 gefärbt wurden. Es konnte eine stimulus- und zeit-spezifische Zunahme der Erk-1/2 und Elk-1 Phosphorylierung beobachtet werden. Für die CA3 Region und den DG konnte eine gleichzeitige Aufregulation von pErk-1/2 und pElk-1 nur in der Kontext-Schock Gruppe zum Zeitpunkt 0,5 h nach dem Training beobachtet werden, was darauf hindeutet, das diese gleichzeitige Aufregulation spezifisch für assoziatives Lernen sein könnte. CA3, Hippokampales Feld CA3; CA1, hippokampales Feld CA1; DG, Gyrus dentatus; schwarze Pfeile: zytoplasmatische Färbung neuronaler Fasern; weiße Pfeile: Färbung von Zellkernen.

In der hippokampalen CA3 Region war der pErk-1/2 und pElk-1 Gehalt im Vergleich zu naiven Tieren 0,5 nach dem Training in der Kontext-Schock Gruppe signifikant erhöht. Die Proteine erscheinen dabei nach der immunohistochemischen Färbung bräunlich (siehe auch 2.2.29). Dagegen war zu diesem Zeitpunkt in der Kontext Gruppe nur pElk-1 und in der Schock-Kontext Gruppe nur pErk-1/2 aufreguliert. In der Kontext und Schock-Kontext Gruppe wurde auch 1 h nach dem Training eine Aufregulation von pErk-1/2, nicht aber von pElk-1 beobachtet (Abb. 3.1.2.A).

In der CA1 Region konnte für pElk1 in keiner experimentellen Gruppe eine signifikante Aufregulation beobachtet werden. Dagegen war der pErk-1/2 Gehalt im Vergleich zu naiven Mäusen zum Zeitpunkt 0,5 h nach dem Training in allen Gruppen signifikant erhöht. In der Kontext-Schock und Kontext Gruppe konnte auch 1 h nach dem Training eine signifikante Aufregulation von pErk-1/2 beobachtet werden (Abb. 3.1.2 B).

Im Gyrus dentatus (DG) war der pErk-1/2 Gehalt im Vergleich zu naiven Mäusen zum Zeitpunkt 0,5 h nach dem Training in allen experimentellen Gruppen signifikant erhöht, der pElk-1 Gehalt aber nur in der Kontext-Schock Gruppe (Abb. 3.1.2 C).



Abb. 3.1.2. Quantifizierung und statistische Auswertung des pErk-1/2 und pElk-1 Gehalts in den hippokampalen Feldern CA1, CA3 und im Gyrus dentatus (DG) von naiven Mäusen und Mäusen der entsprechenden Versuchsgruppen.

Von C57BL/6J Mäusen (5/Gruppe) wurden 0,5 h, 1, 3 und 24 h nach der Kontext-, Schock-Kontext oder Kontext-Schock Exposition Gehirnschnitte hergestellt, die mit spezifischen Antikörpern für pErk-1/2 oder pElk-1 gefärbt wurden. Die für pErk-1/2 und pElk-1 mittels Immunohistochemie gefärbten hippokampalen Gehirnschnitte wurden densiometrisch quantifiziert und statistisch ausgewertet. Dabei ergaben sich für den Gehalt von pErk-1/2 und pElk-1 in den hippokampalen Feldern CA3 (**A**), CA1 (**B**) und im Gyrus dentatus (**C**) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Kontext-Schock , Schock-Kontext und Kontext Exposition folgende statistisch signifikante Unterschiede: *P < 0,05 , **P < 0,01 und ***P < 0,001 vs. naive. *P < 0,05, **P < 0,01 und ***P < 0,001 vs. naive. *P < 0,05, **P < 0,01 und ***P < 0,001 vs. Kontext-Schock. Eine gleichzeitige Aufregulation von pErk-1/2 und pElk-1 konnte nur in CA1 und DG der Kontext-Schock Gruppe zum Zeitpunkt 0,5 nach dem Training beobachtet werden.

Um sicherzustellen, dass die Änderungen im pErk-1/2 und pElk-1 spezifisch für den Hippokampus waren, wurde der pErk-1/2 und pElk-1 Gehalt im Striatum, einem Gehirngebiet, das ebenfalls für assoziatives Lernen relevant ist (Nestler, 2002), analysiert. Es konnten dabei weder für pErk-1/2 ($F_{7,35}$ = 0,799; P = 0,558) noch für pElk-1 ($F_{7,35}$ = 0,982, P = 0,785) signifikante Unterschiede beobachtet werden, was darauf hinwies, dass Furchtkonditionierung, bzw. die Kontroll-Paradigmen nicht zu einer generellen, sondern einer für den Hippokampus spezifischen Aktivierung von pErk-1/2 und pElk-1 führten. Interessanterweise wurde nur in der Kontext-Schock Gruppe zum Zeitpunkt 0,5 h nach dem Training eine gleichzeitige Aufregulation von pErk-1/2 und pElk-1 beobachtet, was darauf hindeutet, dass diese gleichzeitige Aufregulation spezifisch für assoziatives Lernen sein könnte. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurden C57BL/6J Mäuse mittels kontextabhängiger Furchtkonditionierung trainiert (Kontext-Schock Gruppe) und 0,5 h nach dem Training hippokampale Proteinlysate hergestellt. Zur Kontrolle dienten naive Tiere. Anschließend wurde der pErk-1/2 und pElk-1 Gehalt mittels Immunoblot analysiert. Zur Kontrolle wurde in den gleichen Lysaten mittels Immunoblot der Gehalt an unphosphoryliertem Erk-1/2 bzw. Elk-1 bestimmt (Abb.3.1.3).



Abb. 3.1.3. Furchtkonditionierung resultiert in verstärkter hippokampaler Produktion von pErk-1/2 und pElk-1.

A. Repräsentative Immunoblots für pErk-1/2 (links) und Erk-1/2 (rechts) in hippokampalen Lysaten von Mäusen (5/Gruppe), die 0,5 h nach dem Training der kontextabhängigen Furchtkonditionierung (Kontext-Schock) hergestellt wurden. Als Kontrolle dienten Lysate naiver Tiere (naive). Es wurden jeweils Doppelproben aufgetragen. **B.** Repräsentative Immunoblots für pElk-1 (links) und Elk-1 (rechts) in hippokampalen Lysaten von Mäusen, die 0,5 h nach dem Training der kontextabhängigen Furchtkonditionierung (Kontext-Schock) hergestellt wurden. Als Kontrolle dienten Lysate naiver Tiere (naive). Es wurden jeweils Doppelproben aufgetragen.

Während Furchtkonditionierung (Kontext-Schock) zu einem Anstieg des pErk-1/2 und pElk-1 Gehalts führte, blieb der Proteingehalt von unphosphoryliertem Erk-1/2 bzw. Elk-1 unverändert.

Es zeigte sich, dass sowohl der pErk-1/2 (P < 0.05), als auch der pElk-1 (P < 0.005) Gehalt 0,5 h nach dem Training der Furchtkonditionierung signifikant höher war als in naiven Tieren, wogegen für die unphosphorylierten Proteine kein Unterschied zu beobachten war.

Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass die gleichzeitige Phosphorylierung von Erk-1/2 und Elk-1 im Hippokampus von C57BL/6J Mäusen spezifisch für assoziatives Lernen ist.

3.2 Hippokampale Lokalisation von pErk-1/2 und pElk-1 nach kontextabhängiger Furchtkonditionierung

Interessanterweise zeigten die unter 3.1 beschriebenen Ergebnisse, dass die hippokampalen pErk-1/2 und pElk-1 Proteine hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert waren (siehe auch Abb. 3.1.1 B). Aufgrund bisheriger Literatur war diese Lokalisation unerwartet, insbesondere in Anbetracht der Tatsache, dass für pElk-1 bisher nur eine Funktion als Transkriptionsfaktor nachgewiesen werden konnte (Hipskind et al., 1991; Adams und Sweatt, 2002). Daher sollte die Lokalisation von pErk-1/2 und pElk-1 im Folgenden eingehender untersucht werden. Hippokampale Gehirnschnitte von C57BL/6J Mäusen, die 0,5 h nach dem Training der Furchtkonditionierung (Kontext-Schock Gruppe) hergestellt und entweder mittels immunohistochemischer Detektion für pErk-1/2 oder pElk-1 gefärbt wurden, wurden mittels Mikroskopie bei hoher Vergrößerung untersucht. Als Kontrolle dienten entsprechende Schnitte naiver Tiere. Es zeigte sich, dass pErk-1/2 in der CA3 Region in den Kernen der Pyramidenzellen und in den Moosfasern, d.h. im Kern und auch zytoplasmatisch lokalisiert war. Dagegen fand sich pElk-1 ausschließlich in den Moosfasern (Abb. 3.2.1).



Abb.3.2.1 Zelluläre Lokalisation von pErk-1/2 und pElk-1 in der hippokampalen CA3

Region.

Repräsentative, hoch vergrößerte Aufnahmen der hippokampalen CA3 Region von Hirnschnitten, die mittels immunohistochemischer Analyse für pErk-1/2 oder pElk-1 gefärbt wurden. Die Hirnschnitte stammen von naiven C57BL/6J Mäusen und Mäusen die mittels kontextabhängiger Furchtkonditionierung trainiert und 0,5 h später präpariert wurden (Kontext-Schock Gruppe). In Einklang mit den unter 3.2 beschriebenen Ergebnissen ist eine deutliche Aufregulation von pErk-1/2 und pElk-1 in der Kontext-Schock Gruppe zu beobachten. Während pErk-1/2 sowohl in den Zellkernen der Pyramidenzellen und den Moosfaser zu finden ist, beschränkt sich die Lokalisation von pElk-1 ausschließlich auf die Moosfasern. CA3, hippokampalaes Feld CA3; schwarze Pfeile: Moosfasern; weiße Pfeile: Zellkerne der Pyramidenzellen.

Um die zytoplasmatische Lokalisation von pErk-1/2 und pElk-1 zu verifizieren, wurden Hirnschnitte von C57BL/6J Mäusen des zuvor beschriebenen Experimentes durch hoch vergrößernde Mikroskopie eingehender untersucht. Dabei wurde die Lokalisation von pErk-1/2 und pElk-1 in der hippokampalen CA3 Region und dem zentralen Kern der Amygdala (CeA) verglichen. In Einklang mit vorherigen Arbeiten konnte sowohl pErk-1/2, als auch pElk-1 in den Zellkernen der Amygdala beobachtet werden, wogegen in der hippokampalen CA3 Region eine zytoplasmatische Lokalisation zu finden war (Abb. 3.2.2). Hirnschnitte des selben Experiments wurden anschließend verwendet um eine immunohistochemische Immunofluoreszenz-Doppelfärbung mit Antikörpern für pErk-1/2 bzw. pElk-1 und dem in Hippokampus und Amygdala ausschließlich im Kern produzierten Transkriptionsfaktor pCreb (cAMP Antwort Element Bindeprotein; Alberini et al., 1999) durchzuführen. Es zeigte sich, dass pCreb, pErk-1/2 und pElk-1 in der Amygdala im Kern lokalisiert waren. Während pCreb auch in der CA3 Region des Hippokampus im Zellkern zu finden war, zeigte sich im deutlichen Kontrast dazu die zytoplasmatische Lokalisation von pErk-1/2 bzw. pElk-1 in dieser Region (Abb. 3.2.2).



Abb. 3.2.2 Vergleich der zellulären Lokalisation von pErk-1/2, pElk-1 und pCreb in der hippokampalen CA3 Region und der Amygdala.

Es wurden Hirnschnitte von C57BL/6J Mäusen verwendet, die 0,5 h nach dem Training der Furchtkonditionierung hergestellt wurden. **A.** Links: Repräsentative hoch vergrößerte Aufnahmen, welche die Lokalisation von pErk-1/2 in der hippokampalen CA3 Region (CA3) und im zentralen Nukleus der Amygdala (CeA) zeigen. Während pErk-1/2 im CeA im Zellkern lokalisiert ist, kann in der CA3 Region eine zytoplasmatische Färbung beobachtet werden. Rechts: Repräsentaive Aufnahmen der CA3 Region und der CeA von Hirnschnitten, die mittels Immunofluoreszenz-Doppelfärbung gleichzeitig für pErk-1/2 (grün) und pCreb (rot) gefärbt wurden. In der CA3 Region ist das im Zellkern lokalisierte rot gefärbte pCreb, deutlich von den grün gefärbten pErk-1/2 in den Moosfasern zu unterscheiden, wogegen sich im CeA sowohl pErk-1/2 (grün) als auch pCreb (rot) im Zellkern befinden. **B.** Links: Repräsentative hoch vergrößerte Aufnahmen, welche die Lokalisation von pElk-1 in der CA3 Region und CeA zeigen. Während pElk-1 im CeA im Zellkern lokalisiert ist, kann in der CA3 Region eine ausschließlich zytoplasmatische Färbung beobachtet werden. Rechts: Repräsentaive Aufnahmen der CA3 Region und CeA von Hirnschnitten, die mittels Immunofuoreszenz-Doppelfärbung gleichzeitig für pElk-1 (grün) und pCreb (rot) gefärbt wurden. In der CA3 Region ist das im Zellkern lokalisierte rot gefärbte pCreb, deutlich von grün gefärbtem pElk-1 in den Moosfasern zu unterscheiden, wogegen sich im CeA sowohl pElk-1(grün) als auch pCreb (rot) im Zellkern befinden.

In einem weiteren Experiment wurden C57BL/6J Mäuse mittels Furchtkonditionierung trainiert (3/Gruppe), 0,5 h nach dem Training die Hippokampi isoliert und sowohl zytoplasmatische, als auch Proteinlysate der Zellkerne hergestellt. Anschließend wurden mittels Immunoblot der pErk-1/2 und pElk-1 Gehalt in den entsprechenden Lysaten analysiert. In Einklang mit den zuvor beschriebenen Daten war pErk-1/2 sowohl in Kern-, als auch in zytoplasmatischen Lysaten nachzuweisen. Dagegen konnte ein Signal für pElk-1 nur in zytoplasmatischen Lysaten beobachtet werden. Daher wurde ebenfalls der Gehalt an unphosphoryliertem Elk-1 mittels Immunoblot untersucht. Im Gegensatz zu pElk-1 konnte Elk-1 sowohl in Kernlysaten, als auch in zytoplasmatischen Proteinlysaten nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte zusätzlich zu dem normalen 63 kDa großen Elk-1 Protein auch das Signal für eine bereits beschriebene kleinere (43kDa) Form des Elk-1 Proteins (Vanhhoutte et al., 2001) beobachtet werden (Abb. 3.2.3).



Abb.3.2.3 Vergleich der Lokalisation von pErk-1/2 und pElk-1 in hippokampalen Kernproteinlysaten und zytoplasmatischen Lysaten mittels Immunoblot.

Repräsentative Immunoblots für pErk-1/2 (links), pElk-1(mitte) und Elk-1 (rechts) in hippokampalen Lysaten (je 30 µg) von Kernproteinen (n) oder zytoplasmatischen Proteinen (c) die 0,5 h nach dem Training der kontextabhängigen Furchtkonditionierung hergestellt wurden. Ein Signal für pErk-1/2 konnte in beiden Lysaten beobachtet werden, wogegen pElk-1 nur in zytoplasmatischen Lysaten nachzuweisen war. Im Gegensatz dazu konnte Elk-1 in Kernlysaten und zytoplasmatischen Lysaten detektiert werden. Neben dem normalen Elk-1 (63 kDa) konnte eine kürzere Elk-1 Variante (43 kDa) beobachtet werden.

Diese Ergebnisse demonstrierten, dass pErk-1/2 während der Gedächtniskonsolidierung im Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert war. Dagegen war pElk-1 ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert, wogegen Elk-1 im Kern und im Zytoplasma nachgewiesen wurde.

3.3 Hippokampale Interaktion von pErk-1/2 und pElk-1

Die unter 3.2 beschriebene ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation von pElk-1 ließ vermuten, dass dessen Aufgabe nicht in der unmittelbaren Transkriptionsaktivierung von Zielgenen lag. Daher sollte in den folgenden Experimenten die hippokampale Interaktion von pElk-1 und pErk-1/2 während der Gedächtniskonsolidierung untersucht werden. Für alle nachfolgend beschriebenen Experimente wurden hippokampale Proteinlysate bzw. Gehirnschnitte von C57BL/6J Mäusen verwendet, die jeweils 0,5 h nach dem Training der

kontextabhängigen Furchtkonditionierung hergestellt wurden. Zunächst wurden Gehirnschnitte mittels immunohistochemischer Doppelfluoreszenzfärbung gleichzeitig für pErk-1/2 (grün) und pElk-1 (rot) gefärbt. Es zeigte sich, dass pErk-1/2 und pElk-1 in den Moosfasern der CA3 Region co-lokalisiert sind (Abb. 3.3.1 A).



Abb. 3.3.1 Hippokampale Co-lokalisation und Interaktion von pErk-1/2 und pElk-1.

A. Repräsentative Ergebnisse der immunohistochemischen Doppelfluoreszenzfärbung für pErk-1/2 (grün) und pElk-1 (rot). Hippokampale Gewebeschnitte von C57BL/6J Mäusen, die mittels kontextabhängiger
Furchtkonditionierung trainiert wurden, wurden und 0,5 h später präpariert. Durch gleichzeitige Anregung der verwendeten Fluorophore konnte die Co-lokalisation von pErk-1/2 und pElk-1 (gelb) in den Moosfaser der CA3
Region gezeigt werden. B. C57BL/6J Mäuse wurden mittels kontextabhängiger Furchtkonditionierung trainiert und 0,5 h nach dem Training wurden native hippokampale Zelllysate hergestellt. Anschließend wurde pErk-1/2 aus dem Lysat immunopräzipitiert (IP:pErk-1/2). Dargestellt sind repräsentative Immunoblots für pErk-1/2 und pElk-1 in pErk-1/2 Immunopräzipitaten. In pErk-1/2 Immunopräzipitaten konnte sowohl ein Signal für pErk-1/2, als auch für pElk-1 beobachtet werden. IgG, Immunoglobulin

Um eine mögliche Interaktion von pErk-1/2 und pElk-1 zu untersuchen, wurde pErk-1/2 aus nativen, hippokampalen Proteinlysaten immunopräzipitiert. Das Immunopräzipitat wurde anschließend mittels Immunoblot auf das Vorhandensein von pErk-1/2 und pElk-1 hin untersucht, wobei sowohl ein Signal für pErk-1/2, als auch für pElk-1 detektiert werden konnte (Abb. 3.3.1 B). Diese Ergebnisse zeigten, dass pErk-1/2 und pElk-1 während der Gedächtniskonsolidierung miteinander interagieren können. Anschließend sollte analysiert werden, ob hippokampales pErk-1/2 Elk-1 phosphorylieren kann. Hierzu wurde pErk-1/2 aus hippokampalen, nativen Proteinlysaten immunopräzipitiert, die 0,5 h nach Furchtkonditionierung hergestellt wurden. Das Immunopräzipitat (IP:pErk-1/2) blieb an eine Säule gebunden. Auf die Säule wurde anschließend in Kinasepuffer (mit ATP) gelöstes Elk-1

Fusionsprotein (Elk1₃₀₇₋₄₂₈ fusioniert an die Gluthationtransferase) gegeben und das entsprechende Eluat anschließend mittels Immunoblot auf das Vorhandensein von Elk-1 und pElk-1 hin analysiert. Es wurde beobachtet, dass in Gegenwart des pErk-1/2 Immunopräzipitat Elk-1 zu pElk-1 phosphoryliert wird. In entsprechenden Kontroll-Lysaten, bei denen für die Immunopräzipitation ein unspezifischer Anti-Maus-Antikörper (IP:IgG) oder kein Antikörper (Elk-1) verwendet wurde, fand sich dagegen kein phosphoryliertes Elk-1. In allen Proben konnten gleiche Mengen von unphosphoryliertem Elk-1 beobachtet werden, was die Spezifität der Phosphorylierungs-Reaktion zeigte. Diese Resultate demonstrierten, dass hippokamples pErk-1/2 Elk-1 phosphorylieren kann (Abb.3.3.2).



Abb. 3.3.2 Hippokampales pErk-1/2 phosphoryliert Elk-1 in vitro.

Repräsentative Immunoblots: C57BL/6J Mäuse wurden furchtkonditioniert und 0,5 h später wurden native, hippokampale Proteinlysate hergestellt. Bahn 1: Aus den Proteinlysaten (50µg) wurde pErk-1/2 immunopräzipitiert, wobei das Immunopräzipitat (IP:pErk-1/2) an eine Säule gebunden blieb. Auf die Säule wurde anschließend in Kinasepuffer (mit ATP) gelöstes Elk-1 Fusionsprotein gegeben und das entsprechende Eluat anschließend mittels Immunoblot auf das Vorhandensein von Elk-1 und pElk-1 hin analysiert. Bahn 2: Zur Kontrolle wurden das Proteinlysat wie oben beschrieben (Bahn 1) behandelt, wobei statt einem Anti-pErk-1/2 Antikörper ein Anti-Maus Antikörper verwendet wurde. Bahn 3: Das Experiment wurde wie oben beschrieben (Bahn 1) durchgeführt, wobei jedoch anstatt des Immunopräzipitats hippokampales Proteinlysat (50µg) auf die Säule gegeben wurde.

Um zu überprüfen, ob Elk-1 umgekehrt Einfluss auf die Phosphorylierung von Erk-1/2 hat, wurden native, hippokampale Proteinlysate mit verschiedenen Konzentrationen des Elk-1 Fusionsproteins (800 ng- 16 µg/ml) inkubiert und anschließend mittels Immunoblot der pErk-1/2 Gehalt analysiert. Hierfür wurden die Lysate von 8 individuellen Mäusen untersucht. Die Signale der entsprechenden Immunoblots wurden anschließend densiometrisch quantifiziert und statistisch ausgewertet. Es konnte beobachtet werden, dass im Vergleich zu Lysaten, die ohne Elk-1 Fusionsprotein inkubiert wurden, Elk-1 den durchschnittlichen pErk-1/2 Gehalt signifikant erhöht ($F_{4, 36} = 4,45$, P < 0,05, Abb. 3.3.3 A, B). Dabei war die optimale Elk1 Konzentration, die in einem gesteigerten pErk-1/2 Gehalt resultierte individuell unterschiedlich. Wurden die Lysate zur Kontrolle anstatt mit dem Elk-1 Fusionsprotein mit entsprechenden Konzentrationen der Gluthationtransferase inkubiert konnte kein Unterschied bezüglich des pErk-1/2 Gehalts beobachtet werden.





A. Von 8 individuellen Mäusen (1-8) wurden 0,5 h nach dem Training der kontextabhängigen Furchtkonditionierung native, hippokampale Proteinlysate hergestellt und diese (15 μg/50μl) mit ansteigenden Konzentrationen des Elk-1 Fusionsproteins inkubiert. Anschließend wurde der pErk-1/2 Gehalt der Proben mittels Immunoblot bestimmt. Die Signale wurden densiometrisch quantifiziert und sind im prozentualen Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen (100%) dargestellt. Die Kontrollen bestanden aus Lysaten, die lediglich mit dem ATP-haltigen Inkubationspuffer (ohne Elk-1 Fusionsprotein) inkubiert wurden. In allen Tieren führte Elk-1 zu einem Anstieg des pErk-1/2 Gehalts, wobei die hierfür optimale Elk-1 Konzentrationen individuell unterschiedlich waren. **B.** Repäsentativer Immunblot der Maus Nr.6 des unter (A) beschriebenen Versuchs. **C.** Der Gehalt des pErk-1/2 Substrats pp90Rsk-1 wurde in den Proben des unter (A) beschriebenen Versuchs durch den Immunoblot analysiert. Der repräsentative Immunoblot der Maus Nr.1 zeigt, dass der Elk-1 vermittelte Anstieg des pErk-1/2 Gehalts gleichzeitig in erhöhtem Gehalt von pp90Rsk-1 resultiert. Um zu überprüfen, ob die Elk-1 vermittelte Aufregulation des pErk-1/2 Gehalts auch in erhöhter pErk-1/2 Aktivität resultiert, wurde der Einfluss von Elk-1 auf das pErk-1/2 Substrat p90Rsk-1 (siehe auch 1.4.1) untersucht. Hierzu wurden die oben beschriebenen Lysate, welche einen Elk-1 vermittelten erhöhten pErk-1/2 Gehalt aufwiesen (Abb. 3.3.3 A) mittels Immunoblot auf den Gehalt von pp90Rsk-1 hin untersucht. In allen Lysaten mit Elk-1 vermitteltem erhöhtem pErk-1/2 Gehalt konnte ebenfalls eine erhöhte pp90Rsk-1 Produktion detektiert werden (Abb.3.3.3 C). Dabei waren die durchschnittlichen pp90Rsk-1 Werte in mit Elk-1 inkubierten Lysaten signifikant höher, als die entsprechenden Kontrollproben ($F_{2,21}$ = 4,67, *P* < 0,05). In Proben, die zwar mit Elk-1 inkubiert wurden, aber keinen erhöhten pErk-1/2 Gehalt aufwiesen, konnte dagegen auch kein erhöhter pp90Rsk-1 Gehalt beobachtet werden. Zusammenfassend zeigen die hier beschriebenen Ergebnisse, dass hippokampales pErk-1/2 Elk-1 während der Gedächtniskonsolidierung phosphorylieren kann und anderseits Elk-1 den Gehalt von phoshoryliertem Erk-1/2 und dessen Substrat p90Rsk-1 erhöht.

3.4 Produktion und Lokalisation des pErk-1/2 Substrats pp90Rsk-1 nach Furchtkonditionierung

Um zu untersuchen, ob die unter 3.3 beschriebenen *in vitro* Interaktionen von Elk-1, Erk-1/2 und p90Rsk-1 auch *in vivo* von Bedeutung sind, wurde zunächst der pp90Rsk-1 Gehalt im Hippokampus von C57BL/6J Mäusen mittels immunohistochemischer Färbung untersucht. Die Tiere (5/Gruppe) wurden mittels Furchtkonditionierung trainiert (Kontext-Schock Gruppe) und 0,5 h nach dem Training hippokampale Gehirnschnitte hergestellt, da zu diesem Zeitpunkt eine gleichzeitige Aufregulation von pElk-1 und pErk-1/2 nachgewiesen werden konnte (siehe Abb.3.1.2). Als Kontrolle dienten naive Tiere und Tiere, die während des Trainings keinen Schock erhielten (Kontext-Gruppe) oder den Schock unmittelbar dann erhielten, wenn sie in die Versuchsbox gesetzt wurden (Schock-Kontext Gruppe). In der Kontext-Schock Gruppe konnte im Vergleich zu naiven Tieren (P < 0,001), Tieren der Kontext-Gruppe (P < 0,01) und Schock-Kontext Gruppe (P < 0,01) eine Aufregulation des pp90Rsk-1 Gehalts in den Regionen CA3 und im DG beobachtet werden (Abb.3.4.1 A, B, C). In der CA1 Region war im Vergleich zu naiven Tieren, der pp90Rsk-1 Gehalt ebenfalls erhöht (P < 0,05), allerdings weniger deutlich als in der CA3 Region und im DG, wobei auch kein Unterschied zu Tieren der Kontext- bzw. Schock-Kontext Gruppe zu beobachten war (Abb.3.4.1 D).



Abb. 3.4.1. Hippokampale pp90Rsk-1 Produktion nach Furchtkonditionierung.

A. Repräsentative Aufnahmen von Gehirnschnitten des Hippokampus (oben) und hoch vergrößerter Aufnahmen der CA3 Region (unten) nach immunohistochemischer Färbung für pp90Rsk-1. Die Schnitte stammen von C57BL/6J Mäuse (5/Gruppe) die durch kontextabhängige Furchtkonditionierung trainiert (Kontext-Schock Gruppe) und 0,5 h später getötet wurden. Entsprechende Kontrollen bestanden aus naiven Tieren, Tieren die keinen Schock erhielten (Kontext-Gruppe) oder den Schock unmittelbar dann erhielten, wenn sie in die Versuchsbox gesetzt wurden (Schock-Kontext-Gruppe). Anschließend wurden die entsprechenden Signale in der CA3 Region (**B**), dem DG (**C**) und der CA1 Region (**D**) densiometrisch quantifiziert und statistisch ausgewertet. Folgende statistische Unterschiede wurden beobachtet: **P* < 0,05 vs. naive, ****P* < 0,001 vs. naive, ^{##}*P* < 0,01 vs. Kontext-Schock. CA3, hippokampales Feld CA3; CA1, hippokampales Feld CA1; DG, Gyrus dentatus; schwarze Pfeile: zytoplasmatische Färbung der Moosfasern; weiße Pfeile: Färbung der Zellkerne.

Um die Aufregulation von pp90Rsk-1 zu bestätigen wurden C57BL/6J Mäuse mittels kontextabhängiger Furchtkonditionierung trainiert und 0,5 h später hippokampale

Proteinlysate hergestellt. Als Kontrolle dienten Lysate naiver Tiere. Anschließend wurde durch Immunoblot der pp90Rsk-1 und der Gehalt des unphosphorylierten p90Rsk-1 bestimmt. Die zuvor beschriebene (Abb.3.4.1) Aufregulation von pp90Rsk-1 konnte bestätigt werden und war nicht auf Änderungen des Proteingehalts zurückzuführen, da für nicht phosphoryliertes p90Rsk-1 kein Unterschied beobachtet wurde (Abb. 3.4.2 A). Interessanterweise hatten die immunohistochemischen Untersuchungen gezeigt, dass pp90Rsk-1 sowohl im Zellkern, als auch in den Moosfaser lokalisiert war, wobei die beobachtete Aufregulation in der CA3 Region hautpsächlich im Zellkern lokalisiert war (Abb.3.4.1 A, Kontext-Schock Gruppe). Daher sollte die Lokalisation von pp90Rsk-1 in Abhängigkeit von Furchtkonditionierung mittels Immunoblot untersucht werden. C57BL/6J Mäuse wurden trainiert und 15, 30 min nach dem Training hippokampale Kernproteine bzw. zytoplasmatische Proteine isoliert. Als Kontrolle dienten naive Tiere. Anschließend wurden die entsprechenden Lysate (20µg) auf einem SDS Gel aufgetrennt und pp90Rsk-1 mittels Immunoblot detektiert. In naiven Tieren war mehr pp90Rsk-1 im Zytoplasma zu finden als im Zellkern. Dreißig Minuten nach dem Training der Furchtkonditionierung hatte sich das Verhältnis allerdings signifikant in Richtung Zellkern verschoben ($F_{2,15} = 15,553, P < 0,05$; Abb.3.4.2 B, C).



Abb. 3.4.2 Die durch Furchtkonditionierung vermittelte Aufregulation von pp90Rsk-1 ist hauptsächlich im Zellkern lokalisiert.

A.Repräsentativer Immunoblot der im Vergleich zu naiven Tieren (naive) die Aufregulation von pp90Rsk-1 in C57BL/6J Mäusen (5/Gruppe) zum Zeitpunkt 0,5 h nach dem Training (Kontext-Schock) zeigt (oben), wobei der Proteingehalt an unphosphoryliertem p90Rsk-1 unverändert blieb (unten). Es wurden jeweils Doppelproben aufgetragen. **B.** Repräsentativer Immunoblot für pp90Rsk-1 in Kernproteinlysaten (n) und zytoplasmatischen Proteinlysaten (c) von naiven Mäusen (je 5/Gruppe) und Mäusen zu den Zeitpunkten 15 min bzw. 30 min nach dem Training der Furchtkonditionierung. Insgesamt wurden 20 µg Gesamtprotein aufgetragen. **C.** Die unter (B) beschriebenen Ergebnisse wurden für alle 5 Tiere einer Gruppe densiometrisch analysiert und statistisch ausgewertet. Dargestellt ist das Verhältnis von zytoplasmatischem und im Zellkern befindlichen pp90Rsk-1. Dabei gibt der Bezugspunkt 1, ein ausgeglichenes Verhältnis von pp90Rsk-1 im Zellkern und Zytoplasma an. Folgende statistische Unterschiede wurden beobachtet: *P < 0,05 vs. naive.

3.5 Hippokampale PKA vermittelt die Furchtkonditionierung und die Aufregulation von pElk-1, pErk-1/2 und pp90Rsk-1

Die bisherigen Ergebnisse deuteten darauf hin, dass hippokampale pErk-1/2, pElk-1 und pp90Rsk-1 Proteine für die kontextanhängige Furchtkonditionierung von C57BL/6J Mäusen wichtig sind. Es sollte daher überprüft werden, ob eine pharmakologische Inhibition dieses Weges die Furchtkonditionierung beeinflusst. Da vorherige Arbeiten zeigten, dass die hippokampale Inhibition des Erk-1/2 Aktivators Mek-1/2 durch den Mek-1/2 Antagonisten u0126 keinen Einfluss auf die Furchtkonditionierung von C57BL/6J Mäusen hat (Ahi et al., unveröffentlichte Arbeiten), wurde vermutet, dass hippokampale Erk-1/2 während der Furchtkonditionierung durch PKA aktiviert wird. Diese Vermutung gründete auf dem Befund, dass PKA in vitro Erk-1/2 phosphorylieren kann (Roberson et al, 1999; Rossant et al., 1999) und PKA für die Ausbildung von hippokampaler LTP und für die Furchtkonditionierung wichtig ist (Abel et al., 1998). Zunächst wurden C57BL/6J Mäuse (9/Gruppe) mit intrahippokampalen Mikrokanülen versehen und 15 min vor dem Training der kontextabhängigen Furchtkonditionierung mit dem PKA Inhibitor Rp-cAMPS (Adenosine 3', 5'-cyclic Monophosphorothioate, Rp-Isomer; 18µg/Tier) oder der entsprechenden Trägerflüssigkeit [Vehicle: in diesem Fall handelte es sich um artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF)] injiziert. Im 24 h später durchgeführten Gedächtnistest zeigten die mit Rp-cAMPS injizierten Tiere signifikant weniger Erstarren, als die entsprechende Vehicle-Gruppe (Abb.3.5 1).



Abb.3.5.1 Intrahippokampale Injektion des PKA Inhibitors Rp-cAMPS verschlechtert die kontextabhängige Furchtkonditionierung.

A. Übersichtsschema des Experiments. C57BL/6J Mäuse wurden mittels Mikrokanülen 15 min vor dem Training intrahippokampal mit Rp-cAMPS (18µg/Maus) oder der Trägerflüssigkeit (Vehicle) injiziert und das Erstarren 24 h später im Gedächtnistest analysiert. **B.** Im Gedächtnistest erstarren mit Rp-cAMPS injizierte Tiere signifikant weniger als Tiere der Vehicle-Gruppe. Statistische Unterschiede: ***P < 0,0001 vs. Vehicle.

Dieses Ergebnis zeigte, dass die hippokampale PKA Aktivität für die kontextabhängige Furchtkonditionierung wichtig ist. Um zu überprüfen, ob eine Inhibition der PKA während der Furchtkonditionierung Einfluss auf den hippokampalen pErk-1/2, pElk-1 und pp90Rsk-1 Gehalt hat, wurden weitere C57BL/6J Mäuse (5/Gruppe) intrahippokampal mit Mikrokanülen versehen. Fünfzehn Minuten vor dem Training wurde Rp-cAMPS (18µg/Tier) oder Vehicle injiziert und 15, 30 oder 60 min später hippokampale Proteinlysate hergestellt. Die Lysate wurden auf einem SDS Gel aufgetrennt und der jeweilige pElk-1, pErk-1/2 und pp90Rsk-1 Gehalt mittels Immunoblot bestimmt. Im Vergleich zu den Vehicle-Gruppen verminderte die Injektion von Rp-cAMPS den Gehalt von pElk-1, pErk-1/2 und pp90Rsk-1. Interessanterweise war der pElk-1 Gehalt zu den Zeitpunkten 15 min und 30 min nach dem Training der Furchtkonditionierung signifikant niedriger als in der entsprechenden Vehicle Gruppe. Dagegen war der pErk-1/2 Gehalt zum Zeitpunkt 60 min vermindert. Für pp90Rsk-1 konnte zu den Zeitpunkten 30 und 60 min signifikant niedrigere Werte als in den Vehicle-Gruppen beobachtet werden (Abb. 3.5.2).



Abb.3.5.2 Die intrahippokampale Injektion des PKA Inhibitor Rp-cAMPS vermindert den pElk-1, pErk-1/2 und pp90Rsk-1 Gehalt nach Furchtkonditionierung.

A. Repräsentative Immunoblots, welche den hippokampalen Proteingehalt von pElk-1, pErk-1/2 und pp90Rsk-1 15, 30 und 60 min nach dem Training der Furchtkonditionierung zeigen, wenn die Tiere (5/Gruppe) 15 min vor dem Training intrahippokampal mit dem PKA Inhibitor Rp-cAMPS (18µg/Tier) oder zur Kontrolle nur mit der Trägerflüssigkeit (Vehicle) injiziert wurden. Die hippokampalen Proteinlysate der jeweiligen Tiere wurden jeweils als Doppelprobe (je 30 µg) aufgetragen. **B**. Die Signale der entsprechenden unter (A) beschriebenen Immunoblots wurden für alle Tiere densiometrisch quantifiziert und statistisch ausgewertet. Die entsprechenden Werte der Vehicle-Gruppen wurden jeweils als 100% angenommen und der Proteingehalt in den mit Rp-cAMPS injizierten Tieren in Relation dazu dargestellt. Folgende statistische Unterschiede wurden beobachtet: ***P < 0,001 vs. Vehicle.

Zusammengefasst zeigten die bisherigen Ergebnisse erstmals, dass ein hippokampaler MAP Kinase Signalweg im Hippokampus von C57BL/6J Mäusen durch kontextabhängige Furchtkonditionierung induziert wurde. Dabei konnte pErk-1/2 Elk-1 phosphorylieren, wogegen Elk-1 umgekehrt den Gehalt an pErk-1/2 signifikant steigern konnte, was ebenfalls zu einer Aufregulation des pErk-1/2 Substrats pp90Rsk-1 führte. Die Inhibition der PKA blockierte die Furchtkonditionierung und die dadurch induzierte Aufregulation von pErk-1/2, pElk-1 und pp90Rsk-1, was darauf hindeutete, dass diese Aufregulation für assoziatives Lernen essentiell sein könnte.

3.6 Septaler CRFR2 inhibiert die Furchtkonditionierung in C57BL6J Mäusen

In Abwesenheit von Stress sind die hippokampalen CRF Rezeptoren nicht an der Gedächtniskonsolidierung beteiligt. Für Balb/c Mäuse konnte allerdings gezeigt werden, dass septaler CRFR2 die Furchtkonditionierung auch in Abwesenheit von Stress tonisch inhibiert (Radulovic et al., 1999; siehe auch 1.7). Daher sollte zunächst überprüft werden, ob ähnliches für C57BL/6J Mäuse gilt. Zunächst wurden C57BL/6J Mäuse (6/Gruppe) mit nicht funktionellem CRFR2 Gen (knock out Maus, -/-), entsprechend heterozygote (+/-) und Mäuse mit normalem CRFR2 Allel (+/+) mittels kontextabhängiger Furchtkonditionierung trainiert und das Erstarren 24 h später im Gedächtnistest bestimmt. In CRFR2 -/- Tieren konnte ein erhöhtes Erstarren beobachtet werden, was auf eine verbesserte Gedächtniskonsolidierung hinweist (Abb.3.6 A). Um zu klären, ob dieser Effekt auf das Fehlen von septalem CRFR2 zurückzuführen war, wurden C57BL/6J Mäusen Mikrokanülen in das laterale Septum eingeführt. Die Tiere wurden 15 min vor dem Training der kontextabhängigen Furchtkonditionierung mit dem spezifischen CRFR2 Antagonisten Antisauvagine-30 (Rühmann et al., 1998; 0,4 µg/Maus) oder mit der entsprechenden Trägerflüssigkeit (Vehicle; hier: 2 x aCSF/0,1 % CH₃COOH 1:1) injiziert. Nach 24 h wurde das Erstarren der Mäuse im Gedächtnistest analysiert. Mit Antisauvagine-30 injizierte Tiere zeigten signifikant mehr Erstarren, was auf eine verbesserte Gedächtniskonsolidierung hinweist (Abb. 3.6 B). Diese Ergebnisse zeigten, dass septaler CRFR2 die kontextabhängige Furchtkonditionierung in C57BL/6J Mäusen tonisch inhibiert.





A. C57BL/6J Mäuse (6/Gruppe) mit genetisch ausgeschaltetem *CRFR2* Gen (-/-), entsprechend heterozygote (+/-) Tiere und Mäuse mit normalem CRFR2 Allel (+/+) wurden mittels kontextabhängiger Furchtkonditionierung trainiert. Im 24 h später durchgeführten Gedächtnistest zeigten die *CRFR2* -/- Tiere signifikant mehr Erstarren als (+/-) oder (+/+) Tiere. **B**. C57BL/6J Mäuse (9/Gruppe)wurde 15 min vor dem Training der kontextabhängigen Furchtkonditionierung der CRFR2 Antagonist Antisauvagine-30 (Anti-Svg-30; 0,4 µg/Maus) in das laterale Septum injiziert. Zur Kontrolle wurden Tiere (9/Gruppe) mit Trägerflüssigkeit (Vehicle; 2 x aCSF/0,1 % CH₃COOH, 1:1) injiziert. Die mit Anti-Svg-30 injizierten Tiere zeigten im Gedächtnistest signifikant mehr Erstarren. Statistische Unterschiede: **P* < 0,05 vs. Vehicle, ^a*P* < 0,05 vs. Genotyp +/-.

3.7 Produktion von pErk-1/2 und pp90Rsk-1 im Hippokampus von CRFR2

knock out Mäusen

Vorherige Arbeiten hatte gezeigt, dass pharmakologische, elektrophysiologische oder anatomische Manipulationen des Septums, hippokampale Proteinproduktion (Taubenfeld et al., 2001; Fischer et al., 2002) und Erregbarkeit (Vouimba et al., 1998) modulieren können. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass die Aktivität von septalem CRFR2, den in dieser Arbeit beschriebenen hippokampalen MAP Kinase Weg inhibieren kann. In einleitenden Versuchen wurde zunächst mittels Immunoblot der hippokampale pErk-1/2 und pp90Rsk-1 Gehalt in CRFR2 *knock out* Mäusen analysiert. C57BL/6J Mäuse (3/Gruppe) mit nicht funktionellem *CRFR2* Gen (-/-), entsprechend heterozygote Tiere (+/-) und Tiere mit normalem *CRFR2* Allel (+/+) wurden mittels kontextabhängiger Furchtkonditionierung trainiert. Eine halbe Stunde später wurden hippokampale Proteinlysate hergestellt. Anschließend wurde der pErk-1/2 und pp90Rsk-1 Gehalt der Lysate mittels Immunoblot analysiert. Der pErk-1/2 Gehalt war in CRFR2 -/- Tieren signifikant höher als in Tieren der (+/+) Gruppe. Der pp90Rsk-1 Gehalt war in (-/-) Tieren signifikant höher als in Tieren der (+/-) und (+/+) Gruppen (Abb. 3.7). Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass CRFR2 einen inhibitorischen Einfluss auf den hippokampalen Gehalt von pErk-1/2 und pp90Rsk-1 ausübte.



Abb.3.7. Der pErk-1/2 und pp90Rsk-1 Gehalt ist während der Gedächtniskonsolidierung im Hippokampus von *CRFR2 knock out* Mäusen erhöht.

A. Immunoblotanalyse von pErk-1/2 (oben) und pp90Rsk-1 (unten) in hippokampalen Zelllysaten, die aus je 3 C57BL/6J Mäusen des jeweiligen *CRFR2* Genotyps stammten. Die Zelllysate wurden 0,5 h nach kontextabhängiger Furchtkonditionierung hergestellt. **B**. Die unter (A) gezeigten Signale der Immunoblots wurden densiometrisch quantifiziert und statistisch ausgewertet. Folgende statistische Unterschiede wurden beobachtet: **P* < 0,05 vs. (+/+), ***P* < 0,01 vs. (+/+), **P* < 0,05 vs. (+/-).

3.8 Einfluss von septalem CRFR2 auf den hippokampalen pErk-1/2, pElk-1 und pp90Rsk-1 Gehalt

Um zu überprüfen, ob septaler CRFR2 den hippokampalen MAP Kinase Weg während der Furchtkonditionierung beeinflussen kann, wurden Mikrokanülen in das laterale Septum von C57BL/6J Mäusen (5/Gruppe) eingeführt. Die Tiere wurden 15 min vor dem Training der kontextabhängigen Furchtkonditionierung intraseptal mit dem CRFR2 Antagonisten Antisauvagine-30 (0,4 µg/Maus) oder nur der Trägerflüssigkeit (Vehicle) injiziert. Eine halbe Stunde nach dem Training wurden hippokampale Hirnschnitte angefertigt. Diese wurden anschließend immunohistochemisch für pErk-1/2, pElk-1 und pp90Rsk-1 gefärbt. In mit Antisauvagine-30 injizierten Tieren war der hippokampale pErk-1/2 und pElk-1 Gehalt in den Regionen CA1, CA3 und im Gyrus dentatus (DG) signifikant höher als in der Vehicle-Gruppe. Der pp90Rsk-1 Gehalt war in mit Antisauvagine-30 injizierten Tieren in den Regionen CA3 und CA1 ebenfalls deutlich höher als in Tieren, die mit Vehicle injiziert wurden (Abb. 3.8).



Abb. 3.8 Hippokampaler pErk-1/2, pElk-1 und pp90Rsk-1 Gehalt nach pharmakologischer Inhibition des septalen CRFR2.

Repräsentative Aufnahmen hippokampaler Hirnschnitte von Mäusen, die 15 min vor dem Training der kontextabhängigen Furchtkonditionierung intraseptal mit Antisauvagine-30 (Anti-Svg-30) oder Trägerflüssigkeit (Vehicle) injiziert wurden. Die Gehirne wurden 0,5 h nach dem Training präpariert und anschließend immunohistochemisch für pErk-1/2 (A), pElk-1 (C) und pp90Rsk-1 (E) gefärbt. Dargestellt sind jeweils die hippokampalen Felder CA1, CA3 und der Gyrus dentatus (DG). Die unter (A, C, E) dargestellten Ergebnisse wurden densiometrisch quantifiziert und statistisch ausgewertet. Die entsprechenden Ergebnisse für pErk-1/2

(**B**), pElk-1 (**D**) und pp90Rsk-1 (**F**) sind als Balkendiagramm dargestellt. Folgenden statistische Unterschiede wurden beobachtet: *P < 0.05 vs.Vehicle

3.9 Septaler CRFR2 inhibiert den hippokampalen MAP Kinase Weg in Balb/c Mäusen

Für Balb/c Mäuse konnte durch pharmakologische Experimente nachgewiesen werden, dass der septale CRFR2 in Abwesenheit von Stress die Furchtkonditionierung tonisch inhibiert (Radulovic et al., 1999). Die unter 3.6 beschrieben Ergebnisse zeigten, dass dieses auch für C57BL/6J Mäuse gilt. Zudem konnte gezeigt werden, dass septaler CRFR2 den hippokampalen Proteingehalt von pErk-1/2, pElk-1 und pp90Rsk-1 in C57BL/6J Mäusen vermindert. Es wurde daher vermutet, dass septaler CRFR2 auch in Balb/c Mäusen inhibierend auf den hippokampalen MAP Kinase Weg einwirkt.

Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden Balb/c Mäusen (5/Gruppe) Mikrokanülen in das laterale Septum eingeführt. Die Tiere wurden 15 min vor dem Training der kontextabhängigen Furchtkonditionierung intraseptal mit dem CRFR2 Antagonisten Anisauvagine-30 (0,4 µg/Maus) oder zur Kontrolle mit Trägerflüssigkeit (Vehicle; aCSF/0,1 % CH₃COOH 1:1) injiziert. Hippokampale Gehirnschnitte wurden 1 h nach dem Training hergestellt und immunohistochemisch zur Identifizierung von pErk-1/2, pElk-1 und pp90Rsk-1 gefärbt. In mit Antisauvagine-30 injizierten Tieren war der pErk-1/2 und pp90Rsk-1 Gehalt in den hippokampalen Regionen CA1 und CA3 signifikant höher als in Tieren, die mit Vehicle injiziert waren. Für pElk-1 konnte dagegen ein solcher Unterschied nicht beobachtet werden (Abb. 3.9.1).





Repräsentative Aufnahmen von hippokampalen Hirnschnitten von Balb/c Mäusen, die 15 min vor dem Training der kontextabhängigen Furchtkonditionierung intraseptal mit Antisauvagine-30 (anti-Svg-30) oder Trägerflüssigkeit (Vehicle) injiziert wurden. Die Hirne wurden 0,5 h nach dem Training präpariert und anschließend immunohistochemisch zur Identifizierung von pErk-1/2 (**A**), pElk-1 (**C**) und pp90Rsk-1 (**E**) gefärbt. Dargestellt sind jeweils die hippokampalen Felder CA1, CA3 und der Gyrus dentatus (DG). Die unter (A, C, E) dargestellten Ergebnisse wurden densiometrisch quantifiziert und statistisch ausgewertet. Die entsprechenden Ergebnisse für pErk-1/2 (**B**), pElk-1 (**D**) und pp90Rsk-1 (**F**) sind als Balkendiagramm dargestellt. Folgende statistische Unterschiede wurden beobachtet: **P* < 0,05 vs.Vehicle

In einem weiteren Experiment wurden wiederum Mikrokanülen in das laterale Septum von Balb/c Mäusen eingeführt. Die Tiere wurden 15 min vor dem Training der kontextabhängigen Furchtkonditionierung mit Antisauvagine-30 (0,4 µg/Maus) oder Vehicle injiziert. Hippokampale Proteinlysate wurden 1 h später hergestellt. Der pp90Rsk-1 und pErk-1/2 Gehalt der Lysate wurde anschließend mittels Immunoblot bestimmt. In Einklang mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen (Abb.3.9.1) konnte in mit Antisauvagine-30 injizierten Tieren ein erhöhter, hippokampaler pp90Rsk-1 und pErk-1/2 Gehalt beobachtet werden (Abb.3.9.2).



Abb. 3.9.2 Septaler CRFR2 hat einen tonisch inhibierenden Einfluss auf den hippokampalen pp90Rsk-1 und pErk-1/2 Gehalt.

A. Repräsentativer Immunoblot für pp90Rsk-1 in 1 h nach dem Training der kontextabhängigen Furchtkonditionierung hergestellten hippokampalen Lysaten von Balb/c Mäusen, die intraseptal mit Vehicle oder Antisauvagine-30 (Anti-Svg-30) injiziert wurden. **B.** Die Signale aller Immunoblots von den unter (A) repräsentativ dargestellten Resultaten wurden densiometrisch quantifiziert und statistisch ausgewertet. **C.** Repräsentativer Immunoblot für pErk-1/2 in 1 h nach dem Training der kontextabhängigen Furchtkonditionierung hergestellten hippokampalen Lysaten von Balb/c Mäusen, die intraseptal mit Vehicle oder Anti-Svg-30 injiziert wurden. **D.** Die Signale aller Immunoblots von den unter (C) repräsentativ dargestellten Resultaten wurden densiometrisch quantifiziert und statistisch ausgewertet. Folgende statistische Unterschiede wurden beobachtet: **P* < 0,05 vs. Vehicle.

3.10 Aktivierung des hippokampalen MAP Kinase Wegs nach Furchtkonditionierung und stress-verbesserter Furchtkonditionierung in Balb/c Mäusen

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob Komponenten des hippokampalen MAP Kinase Signalwegs in Balb/c Mäusen durch Furchtkonditionierung bzw. stress-verbesserte Furchtkonditionierung aktiviert wurden. Dabei sollte der hippokampale Gehalt an pMek-1/2 und dessen Substrat pErk-1/2 analysiert werden. Außerdem sollte die Proteinproduktion der pErk-1/2 Substrate p90Rsk-1 und pElk-1 untersucht werden. Balb/c Mäuse (3/Gruppe) wurden mittels kontextabhängiger Furchtkonditionierung trainiert (FK-Gruppe). Weitere Mäuse wurden zunächst für 1 h immobilisiert und erst 3 h später trainiert (Stress/FK Gruppe). Aus allen Tieren wurden 1 h nach dem Training hippokampale Proteinlysate isoliert. Als Kontrolle dienten Lysate naiver Tiere. Anschließend wurde zunächst der pMek-1/2 und der pErk-1/2 Gehalt mittels Immunoblot analysiert. Für den pMek-1/2 Gehalt konnte kein signifikanter Unterschied zwischen naiven Tieren und Tieren der FK-Gruppe beobachtet werden. In den Lysaten von Tieren der Stress/FK Gruppe war der pMek-1/2 Gehalt allerdings im Vergleich zu naiven und Tieren der FK-Gruppe stark erhöht. Für pErk-1/2 konnte im Vergleich zu naiven Tieren in der FK-Gruppe eine signifikante Aufregulation beobachtet werden. In Lysaten von Tieren der Stress/FK Gruppe war der pErk-1/2 Gehalt sowohl im Vergleich zu naiven Tieren, als auch im Vergleich zu Tieren der FK Gruppe deutlich erhöht (Abb. 3.10.1).



Abb. 3.10.1 Hippokampale Phosphorylierung von Mek-1/2 und Erk-1/2 in Abhängigkeit von Furchtkonditionierung und stress-verbesserter Furchtkonditionierung.

A. Repräsentativer Immunoblot für pMek-1/2 in hippokampalen Proteinlysaten. Balb/c Mäuse (3/Gruppe) wurden mittels Furchtkonditionierung trainiert (FK). Eine weitere Gruppe wurde für eine Stunde immobilisiert und 3h später trainiert (Stress/FK). Die Lysate wurden jeweils 1h nach dem Training hergestellt. Als Kontrolle dienten Lysate naiver Tiere (naive). Die Proben sind jeweils als Doppelprobe aufgetragen. Zur Kontrolle wurde der Gehalt an unphosphoryliertem Mek 1/2 analysiert. **B.** Repräsentativer Immunoblot für pErk-1/2 in hippokampalen Proteinlysaten. Es wurden die gleichen Lysate wie für die unter (A) beschriebenen Resultate verwendet. Die Proben sind jeweils als Doppelprobe aufgetragen. Zur Kontrolle wurde auch der Gehalt an unphosphoryliertem Erk-1/2 analysiert. **C.** Die Signale aller Immunoblots der unter (A) repräsentativ dargestellten Ergebnisse wurden densiometrisch quantifiziert und statistisch ausgewertet. Dargestellt sind die Ergebnisse für pErk-1/2. Für Mek-1/2 wurde kein signifikanter Unterschied beobachtet. **D.** Die Signale aller Immunoblots der unter (C) repräsentativ dargestellten Ergebnisse wurden densiometrisch quantifiziert und statistisch ausgewertet. Dargestellt sind die Ergebnisse für pErk-1/2. Für Erk-1/2 wurde kein signifikanter Unterschied beobachtet. Folgende statistische Unterschied wurden beobachtet: **P* < 0,05 vs. naive, ^a*P* < 0,05 vs. FK.

Für pElk-1 wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den experimentellen Gruppen beobachtet. Dageggen war der pp90Rsk-1 Gehalt nach Furchtkonditionierung und stressverbesserter Furchtkonditionierung signifikant höher als in naiven Tieren. Die für pp90Rsk-1 beobachtete Aufregulation war nach stressverbesserter Furchtkonditionierung signifikant höher als in Abwesenheit von Stress (Abb. 3.10.2).



Abb. 3.10.2 Hippokample Phosphorylierung von pElk-1 und pp90Rsk-1 in Abhängigkeit von Furchtkonditionierung und stress-verbesserter Furchtkonditionierung.

A. Repräsentativer Immunoblot für pElk-1 in hippokampalen Proteinlysaten. Balb/c Mäuse (3/Gruppe) wurden mittels Furchtkonditionierung trainiert (FK). Eine weitere Gruppe wurde für eine Stunde immobilisiert und 3h später trainiert (Stress/FK). Die Lysate wurden jeweils 1h nach dem Training hergestellt. Als Kontrolle dienten Lysate naiver Tiere (naive). Die Lysate von jedem Tier wurden individuell als Probe aufgetragen. **B.** Die Signale aller Immunoblots der unter (A) repräsentativ dargestellten Ergebnisse wurden densiometrisch quantifiziert und statistisch ausgewertet. **C.** Repräsentativer Immunoblot für pp90Rsk-1 in hippokampalen Proteinlysaten. Es wurden die gleichen Lysate wie für die unter (A) beschrieben Resultate verwendet. Die Lysate von jedem Tier wurden individuell als Probe aufgetragen. Zur Kontrolle wurde auch der Gehalt an unphosphoryliertem p90Rsk-1 Gehalt analysiert. **D.** Die Signale aller Immunoblots der unter (C) repräsentativ dargestellten Ergebnisse wurden densiometrisch quantifiziert und statistisch ausgewertet. Dargestellt sind nur die Ergebnisse für pp90Rsk-1. Für p90Rsk-1 wurde kein signifikanter Unterschied beobachtet. Folgende statistische Unterschiede wurden beobachtet: **P* < 0,05 vs. naive, ^a*P* < 0,05 vs. FK.

Diese Ergebnisse zeigten, dass stress-verbesserte Furchtkonditionierung die Phosphorylierung von hippokampalem Mek-1/2 induziert. Die Phosphorylierung von pErk-1/2 und dessen Substrat pp90 Rsk-1 wurde dagegen auch durch Furchtkonditionierung in Abwesenheit von Stress induziert, durch Stress jedoch signifikant verstärkt. Dagegen konnte kein Einfluss auf den pElk-1 Gehalt beobachtet werden.

3.11 Hippokampale pMek-1/2 vermittelt stress-verbesserte Furchtkonditionierung

Die unter 3.10 beschriebenen Daten wiesen darauf hin, dass stress-verbesserte Furchtkonditionierung Mek-1/2 aktiviert, was in einer signifikanten Aufregulation des pErk1/2 und pp90Rsk-1 Gehalts resultiert. Daher wurde vermutet, dass der Mek-1/2 Inhibitor u0126 die stressverbesserte Furchtkonditionierung inhibieren würde. Um diese Annahme zu überprüfen wurden Balb/c Mäusen Mikrokanülen in den Hippokampus eingeführt. Die Tiere (9/Gruppe) wurden für 1 h immobilisiert und 3 h später mittels kontextabhängiger Furchtkonditionierung trainiert. Der Mek Inhibitor u0126 (1µg/Maus) oder Trägerflüssigkeit (Vehicle; hier aCSF/10%DMSO) wurde 15 min vor dem Training injiziert. Zur Kontrolle wurde eine weitere Gruppe 15 min vor dem Training intrahippokampal mit Vehicle injiziert, ohne jedoch zuvor immobilisiert worden zu sein. Der Gedächtnistest wurde 24 h später durchgeführt. In Einklang mit zuvor beschriebenen Daten (Radulovic et al., 1999, Fischer et al., 2002) zeigten mit Vehicle injizierte, gestresste Tiere signifikant mehr Erstarren, als entsprechend nicht-gestresste Tiere. In Tieren, die zwar gestresst, aber mit u0126 injiziert wurden konnte allerdings keine stress-verbesserte Zunahme des Erstarrens mehr beobachtet werden (Abb. 3.11.1 A). Diese Ergebnisse zeigten, dass die Mek-1/2 Aktivität für die stressverbesserte kontextabhängige Furchtkonditionierung essentiell ist. Um zu überprüfen, ob eine Mek-1/2 Aktivität auch für die kontextabhängige Furchtkonditionierung in Abwesenheit von Stress wichtig ist, wurden Balb/c Mäuse (9/Gruppe) 15 min vor dem Training der kontextabhängigen Furchtkonditionierung intrahippokampal mit u0126 (1µg/Maus) oder Trägerflüssigkeit (Vehicle; hier aCSF/10%DMSO) injiziert. Das Erstarren wurde 24 h später im Gedächtnistest analysiert. Mit u0126 injizierte Mäuse zeigten kein signifikant unterschiedliches Erstarren als mit Vehicle injizierte Tiere (Abb. 3.11.1B). Auch höhere Konzentrationen von u0126 (5µg/Maus) hatten keinen Effekt ($F_{1.14} = 0,0069, P = 0,7962$).



Abb.3.11.1 Der pMek-1/2 Inhibitor u0126 blockiert stress-verbesserte Furchtkonditionierung.

A. Links: Übersichtschema des Experiments. Mit intrahippokampalen Mikrokanülen versehene Balb/c Mäuse (9/Gruppe) wurden für eine Stunde immobilisiert und 3h später mittels Furchtkonditionierung trainiert. Fünfzehn Minuten vor dem Training wurden die Mäuse intrahippokampal mit Vehicle (Vehicle/Stress-FK) oder u0126 (1µg/Maus, u0126/Stress-FK) injiziert. Als Kontrolle wurden nicht-gestresste Tiere mit Vehicle injiziert und trainiert (vehicle/FK). Das Erstarren wurde 24h später im Gedächtnistest analysiert. **B**. Links: Übersichtschema des Experiments. Balb/c Mäuse (9/Gruppe) wurden 15 min vor dem Training intrahippokampal mit Vehicle (Vehicle/FK) oder u0126 (1µg/Maus; u0126/FK) injiziert und das Erstarren 24 h später im Gedächtnistest analysiert. Es wurden folgende statistische Unterschiede beobachtet: *P <0.001 vs. Vehicle/FK, ^aP < 0,05 vs. Vehicle/Stress-FK

Das physiologische Substrat von pMek-1/2 ist Erk-1/2 (Sweatt, 2001). Daher sollte im folgenden Experiment untersucht werden, ob die intrahippokampale Injektion von u0126 Einfluss auf die Phosphorylierung von hippokampalem Erk-1/2 hat. Balb/c Mäusen (4/Gruppe) wurden Mikrokanülen in den Hippokampus eingeführt. Die Tiere wurden für 1 h immobilisiert und 3 h später mittels kontextabhängiger Furchtkonditionierung trainiert. Fünfzehn Minuten vor dem Training wurden die Tiere intrahippokampal mit u0126 (1µg/Maus) oder Vehicle injiziert und 1 h nach dem Training hippokampale Proteinlysate hergestellt. Anschließend wurde mittels Immunoblot zunächst der Gehalt von pErk-1/2 bestimmt. Im Vergleich zu mit Vehicle injizierten Tieren war der pErk-1/2 Gehalt in mit u0126 injizierten Tieren signifikant vermindert (Abb. 3.11.2 A, B). In einem weiteren Experiment wurden Balb/c Mäuse (4/Gruppe) nicht immobilisiert, sondern direkt 15 min vor dem Training mit u0126 (1µg/Maus) oder Vehicle injiziert. Hippokampale Proteine wurden 1 h später isoliert und durch Immunoblot wurde der pErk-1/2 Gehalt bestimmt. Es konnte zwischen den mit u0126 und Vehicle injizierten Tieren kein signifikanter Unterschied beobachtet werden (3.11.2 C, D).



Abb.3.11.2 Hippokampale pMek-1/2 reguliert den pErk-1/2 Gehalt nur nach stressverbesserter Furchtkonditionierung.

A. Repräsentativer Immunoblot für pErk-1/2 in hippokampalen Lysaten aus Balb/c Mäusen (4/Gruppe) die für eine Stunde immobilisiert und 3h später mittels Furchtkonditionierung trainiert wurden (Stress-FK). Fünfzehn Minuten vor dem Training wurden die Tiere intrahippokampal entweder mit Vehicle oder u0126 (1µg/Maus) injiziert. Es wurden jeweils Doppelproben aufgetragen. Zur Kontrolle wurde auch der Gehalt an unphosphoryliertem Erk-1/2 analysiert. **B**. Die Signale aller Immunoblots der unter (A) repräsentativ dargestellten Ergebnisse wurden densiometrisch quantifiziert und statistisch ausgewertet. **C**. Repräsentativer Immunoblot für pErk-1/2 in hippokampalen Lysaten von Balb/c Mäusen (4/Gruppe), die mittels Furchtkonditionierung (FK) trainiert wurden. Fünfzehn Minuten vor dem Training wurden die Tiere intrahippokampal entweder mit Vehicle oder u0126 (1µg/Maus) injiziert. Zur Kontrolle wurde auch der Gehalt an unphosphoryliertem Erk-1/2 analysiert. **D**. Die Signale aller Immunoblots der unter (C) repräsentativ dargestellten Ergebnisse wurden densiometrisch quantifiziert und statistisch ausgewertet. Statistische Unterschiede: **P* <0,05 vs. vehicle/Stress-FK. Anschließend wurde der pp90Rsk-1 Gehalt der Lysate mittels Immunoblot analysiert. In Einklang mit den für pErk-1/2 beobachteten Ergebnissen, konnte auch für pp90Rsk-1 während Furchtkonditionierung in Abwesenheit von Stress kein signifikanter Unterschied zwischen mit Vehicle und u0126 injizierten Tieren detektiert werden. Dagegen war der pp90Rsk-1 Gehalt nach stress-verbesserter Furchtkonditionierung signifikant vermindert, wenn die Tiere mit u0125 injiziert wurden (Abb. 3.11.3).



Abb. 3.11.3 Die pp90Rsk-1 Aufregulation nach stress-vermittelter Furchtkonditionierung wird durch Mek-1/2 Aktivität reguliert.

A. Repräsentativer Immunoblot für pp90Rsk-1 in hippokampalen Lysaten von Balb/c Mäusen (4/Gruppe) die mittels Furchtkonditionierung (FK) trainiert wurden. Fünfzehn Minuten vor dem Training wurden die Tiere intrahippokampal entweder mit Vehicle (Veh) oder uO126 (1µg/Maus) injiziert. Es wurden jeweils Doppelproben aufgetragen. **B**. Die Signale aller Immunoblots der unter (A) repräsentativ dargestellten Ergebnisse wurden densiometrisch quantifiziert und statistisch ausgewertet. **C**. Repräsentativer Immunoblot für pp90Rsk-1 in hippokampalen Lysaten aus Balb/c Mäusen (4/Gruppe), die für eine Stunde immobilisiert und 3h später mittels Furchtkonditionierung trainiert wurden (Stress/FK). Fünfzehn Minuten vor dem Training wurden die Tiere intrahippokampal entweder mit Vehicle oder u0126 (1µg/Maus) injiziert. Es wurden jeweils Doppelproben aufgetragen. Zur Kontrolle wurde auch der Gehalt an unphosphoryliertem p90Rsk-1 analysiert. **D**. Die Signale aller Immunoblots der unter (C) repräsentativ dargestellten Ergebnisse wurden densiometrisch quantifiziert und statistisch ausgewertet. Statistische Unterschiede: **P* <0,05 vs. Veh/Stress/FK.

Diese Ergebnisse zeigten, dass hippokampale Mek-1/2 Aktivität durch stress-verbesserte Furchtkonditionierung induziert wird und für diese essentiell ist. In Einklang damit war Mek-1/2 ausschließlich nach stress-verbesserter Furchtkonditionierung an der Aufregulation des pErk-1/2 und pp90Rsk-1 Gehalts beteiligt.

3.12 Einfluss von Proteinkinase A auf den hippokampalen pErk-1/2 Gehalt in Balb/c Mäusen.

Die unter 3.11 beschriebenen Ergebnisse zeigten, das hippokampale pMek-1/2 den pErk-1/2 Gehalt nur nach stress-verbesserter Furchtkonditionierung reguliert. Allerdings wurde eine signifikante Aufregulation des hippokampalen pErk-1/2 Gehalts auch in Antwort auf Furchtkonditionierung in Abwesenheit von Stress beobachtet (siehe Abb. 3.10.1). Es wurde daher vermutet, dass in diesem Fall eine andere Kinase als Mek-1/2 für die Aufregulation des pErk-1/2 Gehalts verantwortlich ist. Es konnte gezeigt werden, dass Proteinkinase A (PKA) in C57BL/6J Mäusen während der Furchtkonditionierung den pErk-1/2 Gehalt modulieren kann (siehe 3.5). PKA war somit ein geeigneter Kandidat.

Zunächst sollte daher untersucht werden, ob die kontextabhängige Furchtkondionierung von Balb/c Mäusen durch intrahippokampale Injektion des PKA Antagonisten Rp-cAMPS beeinflusst werden kann. Mit intrahippokampalen Mikrokanülen versehene Balb/c Mäuse (8/Gruppe) wurden 15 min vor dem Training der kontextabhängigen Furchtkonditionierung mit Rp-cAMPS (18µg/Maus) oder entsprechender Trägerflüssigkeit (Vehicle: hier aCSF) injiziert. Es zeigte sich, dass mit Rp-cAMPS injizierte Tiere signifikant weniger Erstarren im Gedächtnistest zeigen, als entsprechende mit Vehicle injizierte Tiere (Abb. 3.12.1A). Um zu überprüfen, ob die Inhibition der PKA Aktivität Einfluss auf den hippokampalen pErk-1/2 Gehalt hat, wurden Balb/c Mäuse (4/Gruppe) 15 min vor dem Training der kontextabhängigen Furchtkonditionierung mit Rp-cAMPS (18µg/Maus) oder Vehicle injiziert. Hippokampale Proteinlysate wurden 1 h nach dem Training hergestellt. Mittels Immunoblot wurde anschließend der pErk-1/2 Gehalt der Lysate untersucht. In mit RpcAMPS injizierten Tieren war im Vergleich zu mit Vehicle injizierten Tieren ein signifikant verminderter pErk-1/2 Gehalt zu beobachten (Abb. 3.12.1B).





A. Links: Übersichtschema des Experiments. Balb/c Mäuse (8/Gruppe) wurden 15 min vor dem Training intrahippokampal mit Trägerflüssigeit (Vehicle) oder Rp-cAMPS (18µg/Maus) injiziert. Rechts: Das Erstarren wurde 24 h später im Gedächtnistest analysiert **B**. Unten: Repräsentativer Immunoblot für pErk-1/2 in hippokampalen Lysaten aus Balb/c Mäusen (4/Gruppe), die 15 min vor dem Training der kontextabhängigen Furchtkonditionierung mit Vehicle oder Rp-cAMPS (18µg/Maus) injiziert wurden. Es wurden jeweils Doppelproben aufgetragen. Zur Kontrolle wurde auch der Gehalt an unphosphoryliertem Erk-1/2 analysiert. Oben: Die Signale der Immunoblots wurden densiometrisch quantifiziert und statistisch ausgewertet. Dargestellt sind nur die Ergebnisse für pErk-1/2. Für Erk-1/2 wurden keine statistischen Unterschiede beobachtet. Statistische Unterschiede: **P* < 0,05 vs. Vehicle.
In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die PKA Aktivität auch Einfluss auf die stress-verbesserte Furchtkonditionierung hatte.

Balb/c Mäuse (9/Gruppe) wurden mit intrahippokampalen Mikrokanülen versehen. Die Tiere wurden für 1 h immobilisiert und 3 h später mittels kontextabhängiger Furchtkonditionierung trainiert. Fünfzehn Minuten vor dem Training wurden die Mäuse entweder mit dem PKA Inhibitor Rp-cAMPS (18µg/Maus) oder der entsprechenden Trägerflüssigkeit (Vehicle; hier aCSF) injiziert. Als Kontrolle dienten mit Vehicle injizierte Tiere, die aber vor dem Training nicht immobilisiert wurden. Das Erstarren wurde 24 h später im Gedächtnistest analysiert. Immobilisierte Tiere, welche mit Vehicle injiziert wurden, zeigten signifikant mehr Erstarren, als entsprechend nicht-immobilisierte Tiere, was in Einklang mit vorherigen Arbeiten war (Radulovic et al., 1999; Fischer et al., 2002). Dieses stress-verbesserte Erstarren konnte in mit Rp-cAMPS injizierten Tieren jedoch nicht beobachtet werden (Abb. 3.13.2 A).

Um zu überprüfen, ob PKA nach stress-verbesserter Furchtkonditionierung zur Aufregulation von pErk-1/2 beiträgt, wurden Balb/c Mäuse zunächst für 1 h immobilisiert. Drei Stunden später wurden die Tiere mittels kontextabhängiger Furchtkonditionierung trainiert, jedoch 15 min vor dem Training mit Rp-CAMPS oder Vehicle injiziert. Eine Stunde nach dem Training wurden hippokampale Proteinlysate hergestellt. Anschließend wurde der pErk-1/2 Gehalt mittels Immunoblot analysiert. Der pErk-1/2 Gehalt war in mit Rp-CAMPS injizierten Tieren signifikant niedriger, als in der entsprechenden Vehicle Gruppe, was zeigte, dass PKA auch nach stress-verbesserter Furchtkonditionierung aktivierend auf den hippokampalen pErk-1/2 Gehalt einwirkte (Abb. 3.12.2 B).



Abb. 3.12.2 Einfluss des PKA Inhibitors Rp-cAMPS auf die stress-verbesserte

kontextabhängige Furchtkonditionierung und den hippokampalen pErk-1/2 Gehalt. A. Links: Übersichtschema des Experiments. Balb/c Mäuse (9/Gruppe) wurden für 1 h Immobilisationsstress (S) ausgesetzt und 3 h später mittels kontextabhängiger Furchtkonditionierung trainiert. Fünfzehn Minuten vor dem Training wurden die Tiere intrahippokampal mit Vehicle (S/Veh/FK) oder Rp-cAMPS (18µg/Maus, S/RpcAMPS/FK) injiziert. Zur Kontrolle dienten mit Vehicle injizierte Tiere, die jedoch zuvor nicht immobilisiert wurden (Veh/FK). Rechts: Das Erstarren wurde 24 h später im Gedächtnistest analysiert **B**. Unten: Repräsentativer Immunoblot für pErk-1/2 in hippokampalen Lysaten aus Balb/c Mäusen (5/Gruppe), die für 1 h immobilisiert und 3 h später trainiert wurden. Fünfzehn Minuten vor dem Training der kontextabhängigen Furchtkonditionierung wurden die Tiere mit Vehicle oder Rp-cAMPS (18µg/Maus) injiziert. Es wurden jeweils Doppelproben aufgetragen. Zur Kontrolle wurde auch der Gehalt an unphosphoryliertem Erk-1/2 analysiert. Oben: Die Signale der Immunoblots wurden densiometrisch quantifiziert und statistisch ausgewertet. .Dargestellt sind nur die Ergebnisse für pErk-1/2. Für Erk-1/2 wurden keine statistischen Unterschiede beobachtet. Statistische Unterschiede: *P < 0.05 vs. Vehicle, $^aP < 0.05$ vs. Stress/Vehicle/FK

3.13 Expression hippokampaler CRF Rezeptoren in Balb/c Mäusen nach

Immobilisationsstress

Im Gegensatz zu C57BL/6J Mäusen (Radulovic, Jelena, persönliche Mitteilung) zeigen Balb/c Mäuse eine verbesserte Furchtkonditionierung, wenn sie 3 h vor dem Training einem einstündigen Immobilisationsstress ausgesetzt werden (Radulovic et al., 1999). Dabei konnte gezeigt werden, dass hippokampaler CRFR1 für die stress-verbesserte Furchtkonditionierung in Balb/c Mäusen essentiell, jedoch keinen Einfluss auf die Furchtkonditionierung in Abwesenheit von Stress hatte. Es wurde daher vermutet, dass Stress Einfluss auf die Expression von hippokampalen CRF Rezeptoren haben könnte. In einleitenden Versuchen sollte zunächst das hippokampale Expressionsmuster von *CRFR1* in Abhängigkeit vom Immobilisationsstress in Balb/c Mäusen mittels semiquantitativer PCR bestimmt werden. Balb/c Mäuse (8/Gruppe) wurden für 1 h immobilisiert und zu den Zeitpunkten 0,5, 1,5, 3 und 24 h nach dem Ende der Immobilisierung wurden die Hippokampi isoliert. Als Kontrolle dienten Tiere, die nicht immobilisiert wurden (naive). Aus dem isolierten Hippokampusgewebe wurde anschließend mRNA isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Ausgehend von dieser cDNA wurde mittels semiquantitativer PCR die Expression des *CRFR1* Gens untersucht. Zur Kontrolle wurde für jede Reaktion parallel das Haushaltsgen *GAPDH* (Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) amplifiziert (PCR Programm: 1' 95°C, 30'' 65°C, 1,30' 72°C). Immobilisationsstress hatte keinen Einfluss auf die Expression von *GAPDH*. Dagegen konnte im Vergleich zu naiven Tieren in den Zeitpunkten 1,5 und 3 h nach Ende der Immobilisierung eine drei- bzw. vierfache Aufregulation von *CRFR1* beobachtet werden (Abb.3.13.1).



Abb. 3.13.1 Analyse hippokampaler *CRFR1* Expression zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer einstündigen Immobilisierung mittels semiquantitativer PCR.

A. Repräsentative Ergebnisse einer semiquantitativen PCR Reaktion. Rechts: Aus cDNAs (je 40 ng) die 0,5, 1,5, 3 und 24 h nach einem einstündigen Immobilisationsstress aus hippokampaler mRNA hergestellt wurden, konnte unter Verwendung von spezifischen Primern ein 808 bp großes *CRFR1* Fragment amplifiziert werden. Zum Vergleich wurde das *CRFR1* Fragment jedesmal auch aus der cDNA von naiven Mäusen amplifiziert. Links: Für jede PCR Reaktion wurde gleichzeitig eine Kontrolle mitgeführt, in der unter Verwendung von spezifischen Primern das Haushaltsgen *GAPDH* amplifiziert wurde. **B.** Die unter (A) gezeigten PCR Signale für *GAPDH* nach 25 Zyklen und für *CRFR1* nach 40 Zyklen wurden densiometrisch quantifiziert und graphisch dargestellt. Alle Werte wurden gegen die Signale von den entsprechenden naiven Tieren normalisiert und als Prozentwert dargestellt (naive = 100%).

Um die Ergebnisse der semiquantitativen PCR zu verifizieren, sollte die Expression von hippokampalem *CRFR1* in Abhängigkeit vom Immobilisationsstress durch *in situ* Hybridisierung untersucht werden. Balb/c Mäuse (3/Gruppe) wurden für 1 h immobilisiert. Gehirnschnitte wurden 0,5, 1,5, 3 und 24 h nach dem Ende der Immobilisierung hergestellt und mit einer *CRFR1* Sonde hybridisiert. Die Ergebnisse wurden anschließend quantifiziert (Key et al., 2001). Es zeigte sich, dass die Expression von *CRFR1* zu dem Zeitpunkt 3 h nach dem Ende der Immobilisierung signifikant höher war, als in naiven Tieren (Abb.3.13.2.A, B). Zur Kontrolle wurde auch die Expression von *CRFR1* im paraventrikulären Kern des Hypothalamus (PVN) analysiert, da in vorherigen Arbeiten für die Ratte eine starke Aufregulation von *CRFR1* in Antwort auf Immobilisationsstress beschrieben wurde (Luo et al., 1994; Makino et al., 1997; Rivest et al., 1995). In Einklang mit diesen Arbeiten konnte zu den Zeitpunkten 1,5 und 3 h nach dem Ende des Immobilisationsstress eine signifikante Erhöhung des *CRFR1* Signals beobachtet werden. Interessanterweise war der *CRFR1* Gehalt im PVN auch zum Zeitpunkt 24 h nach dem Ende der Immobilisierung noch deutlich höher als in naiven Mäusen (Abb. 3.13.2 C, D).



Abb. 3.13.2 Stress-induzierte Aufregulation von CRFR1 im Hippokampus und PVN.

A. Die Expression von hippokampalem *CRFR1* wurde 0,5, 1,5, 3 und 24 h nach Immobilisationsstress in naiven Mäusen (je 3/Gruppe) mittels *in situ* Hybridisierung bestimmt und anschließend in den Regionen CA1, CA3 und im Gyrus dentatus (DG) quantifiziert und statistisch ausgewertet. **B.** Repräsentative Bilder der unter (A) quantifizierten *in situ* Hybridisierung. Die Zahlen unter den Bildern kennzeichnen den Zeitpunkt nach dem Ende

des Immobilisationsstresses. **C.** Die Expression von*CRFR1* im paraventrikulären Kern des Hypothalamus (PVN) wurde nach Immobilisationsstress und in naiven Mäusen quantifiziert (je 3/Gruppe). **D.** Representative Bilder der unter (C) quantifizierten *in situ* Hybridisierung. Die Zahlen unter den Bildern kennzeichnen den Zeitpunkt nach dem Ende des Immobilisationsstresses. Statistische Unterschiede: **P*<0,05 vs. naive. Abkürzungen: CA1, hippokampales Feld CA3, DG, Gyrus dentatus, sense, Hybridisierung mit Sense-Sonde.

Diese Ergebnisse zeigten eine spezifische und transiente Aufregulation von hippokampalem *CRFR1* in Antwort auf einen einstündigen Immobilisationsstress in Balb/c Mäusen. Anschließend wurde auch die Expression von hippokampalem *CRFR2* in Balb/c Mäusen in Antwort auf Immobilisationsstress untersucht. Balb/c Mäuse (3/Gruppe) wurden für 1 h immobilisiert und 0,5, 3 und 24 h nach dem Ende der Immobilisierung hippokampale Gehirnschnitte für eine *in situ* Hybridisierung vorbereitet. Als Kontrolle dienten naive Tiere. Die Gehirnschnitte wurden mit einer CRFR2 Sonde hybridisiert, mikroskopisch analysiert und die Signale anschließend quantifiziert (Key et al., 2001). Es konnte eine signifikante Aufregulation von hippokampalem *CRFR2* zu dem Zeitpunkt 3 h nach dem Ende der Immobilisierung beobachtet werden (Abb. 3.13.3).





A. Die Expression von hippokampalem *CRFR2* wurde 0,5, 3 und 24 h nach einen einstündigen Immobilisationsstress und in naiven Mäusen (je 3/Gruppe) mittels *in situ* Hybridisierung bestimmt und anschließend in den Regionen CA1, CA3 und im Gyrus dentatus (DG) quantifiziert und statistisch ausgewertet. **B.** Repräsentative Bilder der unter (A) quantifizierten *in situ* Hybridisierung. Die Zahlen unter den Bildern kennzeichnen den Zeitpunkt nach dem Ende des Immobilisationsstresses. Statistische Unterschiede: **P*<0,05 vs. naive. Abkürzungen: CA1, hippokampales Feld CA1, CA3, hippokampales Feld CA3, DG, Gyrus dentatus, sense, Hybridisierung mit *Sense*-Sonde.

3.14 Einfluss hippokampaler CRF Rezeptoren auf den pMek-1/2 und pErk-1/2 Gehalt

Um zu überprüfen, ob hippokampaler CRFR1 Einfluss auf die Phosphorylierung von hippokampalem Mek-1/2 und Erk-1/2 hat, wurde zunächst die Wirkung des CRFR1/2 Antagonisten Astressin (Baram et al., 1996; Gulyas et al., 1995; Maecker et al., 1997) in Balb/c CRFR2 knock out Mäusen untersucht. Dieser Ansatz wurde gewählt, da bisher keine geeigneten, spezifischen Antagonisten für CRFR1 entwickelt werden konnten. Der CRFR1/2 Antagonist Astressin konnte in CRFR2 knock out Mäusen allerdings als spezifischer Antagonist für CRFR1 verwendet werden. Außerdem zeigen Balb/c CRFR2 (-/-) Mäuse im Vergleich zu entsprechenden Tieren mit normalem CRFR2 Allel eine signifikant verbesserte Furchtkonditionierung (siehe Abb. 3.6), wie sie auch nach Immobilisationsstress beobachtet wird (Radulovic et al., 1999; Fischer et al., 2002). Balb/c Mäusen (4/Gruppe) des CRFR2 Genotyps (-/-) und (+/+) wurden Mikrokanülen in den Hippokampus eingeführt. CRFR2 -/-Tiere wurden 15 min vor dem Training der kontextabhängigen Furchtkonditionierung intrahippokampal mit Astressin (0,4 µg/Maus) oder nur der Trägerflüssigkeit (Vehicle, hier: 2 x aCSF/0,1 % CH₃COOH 1:1) injiziert. Zur Kontrolle wurden Tiere des CRFR2 Genotyps (+/+) mit Vehicle injiziert und entsprechend trainiert. Von allen Tieren wurden 1 h nach dem Training hippokampale Lysate hergestellt und anschließend mittels Immunoblot der pMek-1/2 und pErk-1/2 Gehalt untersucht. Anders als erwartet war der pMek-1/2 und pErk-1/2 Gehalt in mit Astressin injizierten (-/-) Tieren im Vergleich zu den Vehicle injizierten (-/-) Tieren signifikant höher. Der Vergleich von mit Vehicle injizierten Tieren des Genotyps (+/+) und (-/-) ergab überraschenderweise, dass der hippokampale pMek-1/2 Gehalt in CRFR2 -/-Tieren signifikant vermindert ist (Abb.3.14).



Abb. 3.14 Einfluss von hippokampalem CRFR1 und CRFR2 auf den pMek-1/2 und pErk-1/2 Gehalt.

A. Repräsentativer Immunoblot für pErk-1/2 in 1 h nach dem Training der kontextabhängigen Furchtkonditionierung hergestellten hippokampalen Lysate von Balb/cMäusen des CRFR2 Genotyps (-/-) die 15 min vor dem Training intrahippokampal mit Astressin oder Vehicle injiziert wurden. Als zusätzliche Kontrolle dienten mit Vehicle injizierte Tiere des CRFR2 Genotyps (+/+). Die Lysate sind jeweils als Doppelprobe aufgetragen. **B**. Die Signale aller Immunoblots der unter (A) repräsentativ dargestellten Ergebnisse wurden densiometrisch quantifiziert und statistisch ausgewertet. **C**. Repräsentativer Immunoblot für pMek-1/2 in denselben Lysaten, die für die unter (A) beschriebenen Ergebnisse verwendet wurden. Die Lysate sind jeweils als Doppelprobe aufgetragen. **D**. Die Signale aller Immunoblots der unter (C) repräsentativ dargestellten Ergebnisse wurden densiometrisch quantifiziert und statistisch ausgewertet. Statistische Unterschiede: **P* < 0,05 vs. Vehicle (-/-), ^a*P* < 0,05 vs. Vehicle (+/+)

3.15 Pharmakologische Inhibition von hippokampalem CRFR2 hat keinen Einfluss auf die Furchtkonditionierung von Balb/c Mäusen, reguliert jedoch deren stress-vermittelte Verbesserung

Um zu überprüfen, ob hippokampaler CRFR2 die stress-verbesserte Furchtkonditionierung modulieren kann, wurden Balb/c Mäusen Mikrokanülen in den Hippokampus eingeführt. Die Tiere wurden zunächst für 1 h immobilisiert und erst 3 h später trainiert, wobei sie 15 min vor dem Training mit dem spezifischen CRFR2 Antagonisten Antisauvagine-30 oder der Trägerflüssigkeit (Vehicle; hier: 2 x aCSF/0,1M CH₃COOH 1:1) injiziert wurden. Als zusätzliche Kontrolle wurden Tiere verwendet, die 15 min vor dem Training intrahippokampal mit Vehicle injiziert wurden, ohne allerdings zuvor Immobilisationsstress ausgesetzt gewesen zu sein. In Einklang mit vorherigen Arbeiten (Radulovic et al., 1999; Fischer et al., 2002), zeigte sich, dass die mit Vehicle injizierten, gestressten Mäuse signifikant mehr Erstarren im Gedächtnistest zeigten, als mit Vehicle injizierte nicht gestresste Tiere. Interessanterweise war aber in gestressten, mit Antisauvagine-30 injizierten Tieren keine signifikante Erhöhung des Erstarrens mehr zu beobachten (Abb. 3.15.1 A). In einem weiteren Experiment wurden Balb/c Mäuse 15 min vor dem Training der kontextabhängigen Furchtkonditionierung mit dem spezifischen CRFR2 Antagonisten Antisauvagine-30 oder mit Vehicle injiziert. Diese Tiere wurden nicht vor dem Training durch Immobilisation gestresst. Im 24 h später durchgeführten Gedächtnistest konnte zwischen den mit Antisauvagine-30 und Vehicle injizierten Tieren kein signifikanter Unterschied bezüglich des Erstarrens beobachtet werden (Abb. 3.15.1 B).



Abb. 3.15.1 Hippokampaler CRFR2 vermittelt die stress-verbesserte kontextabhängige Furchtkonditionierung in Balb/c Mäusen.

A. Links: Übersichtschema des Experiments. Mit intrahippokampalen Mikrokanülen versehene Balb/c Mäuse (9/Gruppe) wurden mittels einer einstündigen Immobilisation gestresst, 3 h später mittels kontextabhängiger Furchtkonditionierung trainiert und 15 min vor dem Training mit Antisauvagine-30 (Stress/Antisauvagine-30) oder Vehicle (Stress/Vehicle) injiziert. Als zusätzliche Kontrolle dienten Tiere, die nicht immobilisiert und 15 min vor dem Training mit Vehicle injiziert wurden (kein Stress/Vehicle). Rechts: Das Erstarren wurde 24 h später im Gedächtnistest analysiert. **B**. Links: Übersichtschema des Experiments. Mit intrahippokampalen Mikrokanülen versehene Balb/c Mäuse (9/Gruppe) wurden 15 min vor dem Training der kontextabhängigen Furchtkonditionierung mit Antisauvagine-30 oder Vehicle injiziert und 24 h später das Erstarren im Gedächtnistest analysiert. Rechts: Es konnte kein signifikanter Gruppenunterschied bezüglich des Erstarrens im Gedächtnistest beobachtet werden. Es wurden folgende statisitische Unterschiede beobachtet: **P* <0,001 vs .Stress/Vehicle ^a*P* <0,05 vs. kein Stress/Vehicle.

In einem weiteren Experiment wurden Balb/c Mäuse mit intrahippokampalen Mikrokanülen versehen, zunächst für 1 h immobilisiert und 3 h später mittels tonabhängiger Furchtkonditionierung trainiert, wobei sie 15 min vor dem Training mit Antisauvagine-30 oder Vehicle injiziert wurden. Zusätzlich wurden Tiere verwendet, die 15 min vor dem Training der tonabhängigen Furchtkonditionierung intrahippokampal mit Vehicle injiziert wurden, ohne zuvor Immobilisationsstress ausgesetzt gewesen zu sein. In Einklang mit vorherigen Daten (Radulovic et al., 1999, Fischer et al. 2002) zeigten mit Vehicle injizierte immobilisierte Tiere signifikant mehr Erstarren im Gedächtnistest, als mit Vehicle injizierte nicht-immobilisierte Tiere. In Gegensatz zu der kontextabhängigen Furchtkonditionierung hatte die intrahippokampale Injektion von Antisauvagine-30 keinen Einfluss auf das stressvermittelte erhöhte Erstarren (Abb. 3.15.2). Diese Ergebnisse demonstrierten, dass hippokampaler CRFR2 spezifisch an der stress-verbesserten, kontextabhängigen Furchtkonditionierung von Balb/c Mäusen beteiligt ist.





Links: Übersichtschema des Experiments. Mit intrahippokampalen Mikrokanülen versehene Balb/c Mäuse (9/Gruppe) wurden mittels einer einstündigen Immobilisation gestresst, 3 h später mittels tonabhängiger Furchtkonditionierung trainiert und 15 min vor dem Training intrahippokampal mit Antisauvagine-30 (Stress/Antisauvagine-30) oder Vehicle (Stress/Vehicle) injiziert. Als zusätzliche Kontrolle dienten Tiere, die nicht immobilisiert und 15 min vor dem Training intrahippokampal mit Vehicle injiziert wurden. Rechts: Das Erstarren wurde 24 h später im Gedächtnistest analysiert. Es wurden folgende statisitische Gruppenunterschiede beobachtet: *P < 0,001 vs. kein Stress/Vehicle

3.16 Pharmakologische Inhibition von hippokampalem CRFR2 moduliert den hippokampalen Gehalt von pMek-1/2 und pErk-1/2 nur nach stress-verbesserter Furchtkonditionierung

Die vorherigen Ergebnisse zeigten eine neue Funktion von hippokampalem CRFR2 während der stress-verbesserten kontextabhängigen Furchtkonditionierung. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass hippokampaler CRFR2 für die unter 3.10 beschriebene stressvermittelte Aufregulation von pMek-1/2, pErk-1/2 und pp90Rsk-1 verantwortlich ist. Um diese Vermutung zu überpüfen, wurden Balb/c Mäuse für 1 h immobilisiert und 3 h später trainiert (Stress/FK). Die Tiere wurden 15 min vor dem Training intrahippokampal mit Antisauvagine-30 (0,4 µg/Maus) oder nur mit der entsprechenden Trägerflüssigkeit (Vehicle; hier: 2 x aCSF/0,1 % CH₃COOH 1:1) injiziert. Hippokampale Proteinlysate wurden jeweils 1 h nach dem Training hergestellt. Als Kontrolle dienten Tiere, die mit Vehicle injiziert, aber nicht trainiert wurden. Hippokampale Proteinlysate dieser Kontrollgruppe wurden 75 min nach der Injektion hergestellt. Mittels Immunoblot wurde anschließend der pMek-1/2, pErk1/2, pp90Rsk-1 und pElk-1 Gehalt der jeweiligen Lysate untersucht. Der Aktin Gehalt der Lysate diente als Kontrolle. In Einklang mit den unter 3.10 beschriebenen Daten waren der pMek-1/2, pErk1/2 und pp90Rsk-1 Gehalt in mit Vehicle-injizierten, durch stressverbesserte Furchtkonditionierung trainierten Tieren signifikant höher als in untrainierten Tieren, die ebenfalls mit Vehicle injiziert waren. Diese Aufregulation war in entsprechenden mit Antisauvagine-30 injizierten Tieren allerdings nicht zu beobachten (Abb. 3.16.1).



Abb. 3.16.1 Hippokampaler CRFR2 ist an der stressvermittelten Aufregulation des hippokampalen MAP Kinasewegs beteiligt.

A. Repräsentative Immunoblots für pMek-1/2, pErk-1/2, pp90Rsk-1 und pElk-1 in hippokampalen Lysaten von Balb/c Mäusen (4/Gruppe) die für eine Stunde immobilisiert und 3h später mittels Furchtkonditionierung trainiert wurden (Stress/FK). Fünfzehn Minuten vor dem Training wurden die Tiere intrahippokampal entweder mit Vehicle (Vehicle/Stress-FK) oder Antisauvagine-30 (Anti-Svg-30/Stress-FK) injiziert, Als Kontrolle dienten Mäuse, die zwar mit Vehicle injiziert aber nicht immobilisiert und trainiert wurden (vehicle). Es wurden jeweils Doppelproben aufgetragen. Zur Kontrolle wurde auch der Aktin-Gehalt analysiert. **B**. Die Signale aller Immunoblots der unter (A) repräsentativ dargestellten Ergebnisse wurden densiometrisch quantifiziert und statistisch ausgewertet. Statistische Unterschiede: *P < 0.05 vs. Vehicle/Stress/FK, $^aP < 0.05$ vs. Vehicle.

In einem weiteren Experiment wurden Balb/c Mäuse 15 min vor dem Training intrahippokampal mit Antisauvagine-30 (0,4 µg) oder Vehicle injiziert ohne zuvor immobilisiert zu werden. Hippokampale Proteinlysate wurden 1 h nach dem Training hergestellt. Mittels Immunoblot wurde anschließend zunächst der pMek-1/2, der pErk-1/2, der pp90Rsk-1 und der pElk-1 Gehalt in den jeweiligen Lysaten bestimmt. Der pMek-1/2 Gehalt war in Einklang mit zuvor beschriebenen Ergebnissen (siehe 3.11) in allen experimentelle Gruppen kaum zu detektieren. Es konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Der pErk-1/2 und pp90Rsk-1 Gehalt war in furchtkonditionierten, mit Vehicle injizierten Tieren signifikant höher als in entsprechend nicht-furchtkonditionierten Tieren. Diese nach Furchtkonditionierung beobachtete Aufregulation von pErk-1/2 und pp90Rsk-1 (siehe 3.10) war in mit Antisauvagine-30 injizierten Tieren allerdings nicht vermindert. Für pElk-1 konnten keine signifikanten Unterschiede in den jeweiligen Lysaten beobachtet werden (Abb. 3.16.2 A, B).

А



4



Abb. 3.16.2 Hippokampaler CRFR2 ist nicht an der Regulation des hippokampalen MAP Kinase Signalwegs in Abwesenheit von Stress beteiligt.

A. Repräsentativer Immunoblot für pMek-1/2, pErk-1/2, pp90Rsk-1 und pElk-1 in hippokampalen Lysaten von Balb/c Mäusen (4/Gruppe), die mittels Furchtkonditionierung (FK) trainiert wurden. Fünfzehn Minuten vor dem Training wurden die Tiere intrahippokampal entweder mit Vehicle (Vehicle/FK) oder Antisauvagine-30 (Anti-Svg-30/FK) injiziert. Es wurden jeweils Doppelproben aufgetragen. Zur Kontrolle wurde auch der Aktin-Gehalt analysiert. B. Die Signale aller Immunoblots der unter (A) repräsentativ dargestellten Ergebnisse wurden densiometrisch quantifiziert und statistisch ausgewertet. Statistische Unterschiede: *P <0,05 vs. vehicle/FK

Diese Daten zeigten, dass hippokampaler CRFR2 spezifisch nach stress-vermittelter Furchtkonditionierung an der Aufregulation von pMek-1/2, pErk-1/2 und pp90Rsk-1 beteiligt war.

3.17 Urocortin III moduliert die Furchtkonditionierung und den hippokampalen pMek-1/2 und pErk-1/2 Gehalt

Um den Einfluss von hippokampalem CRFR2 auf die Furchtkonditionierung und den hippokampalen MAP Kinase Weg zu verifizieren, wurden in den folgenden Experimenten der kürzlich identifizierte spezifische CRFR2 Agonist Urocortin III (Lewis et al., 2001) verwendet. Balb/c Mäusen (9/Gruppe) wurden Mikrokanülen in den Hippokampus eingeführt. Die Tiere wurden 15 min vor dem Training der kontextabhängigen Furchtkonditionierung intrahippokampal mit Urocortin III (0,4 µg/Maus) oder nur der Trägerflüssigkeit (Vehicle; hier: 2 x aCSF/0,1% CH₃COOH 1:1) injiziert. Das Erstarren wurde 24 h später im Gedächtnistest analysiert. Es konnte kein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen bezüglich des Erstarrens während des Gedächtnistests beobachtet werden (Abb. 3.17.1 A). Da andere Arbeiten gezeigt hatten, das Urocortin III nur dann das Verhalten von Mäusen im Erhöhten Plus Labyrinth Test (einem Test um generelle Angstzustände zu bestimmten) verändert, wenn es 4 h vor dem Test verabreicht wird (Reul und Holsboer, 2002), wurde das oben beschriebene Experiment wiederholt. Allerdings wurde Urocortin III (0,4 µg/Maus) oder Vehicle dieses mal 4 h vor dem Training injiziert. Im anschließenden Gedächtnistest zeigten mit Urocortin III injizierte Tiere signifikant mehr Erstarren als Tiere der Vehicle Gruppe (Abb. 3.17.1 B).



Abb 3.17.1 Einfluss intrahippokampaler Injektion von Urocortin III auf die kontextabhängige Furchtkonditionierung.

A. Links: Übersichtschema des Experiments. Mit intrahippokampalen Mikrokanülen versehene Balb/c Mäuse (9/Gruppe) wurden 15 min vor dem Training der kontextabhängigen Furchtkonditionierung intrahippokampal mit Urocortin III (0,4 µg/Maus) oder Vehicle injiziert. Rechts: Das Erstarren wurde 24 h später im Gedächtnistest analysiert. Es konnte kein signifikanter Gruppenunterschied beobachtet werden. **B**. Links: Übersichtschema des Experiments. Mit intrahippokampalen Mikrokanülen versehene Balb/c Mäuse (9/Gruppe) wurden intrahippokampal mit Urocortin III (0,5 µg/Maus) oder Vehicle injiziert und 4 h später mittels kontextabhängiger Furchtkonditionierung trainiert. Rechts:. Das Erstarren wurde 24 h später im Gedächtnistest analysiert. Es wurden folgende statisitische Unterschiede beobachtet: **P* <0.001 vs. Vehicle.

In einem weiteren Experiment wurden Balb/c Mäuse (9/Gruppe) 4 h vor dem Training der tonabhängigen Furchtkonditionierung intrahippokampal mit Urocortin III (0,4 µg/Maus) oder Vehicle injiziert. Das Erstarren wurde 24 h später im Gedächtnistest analysiert. Im Gegensatz zu der kontextabhängigen Furchtkonditionierung zeigten intrahippokampal mit Urocortin III oder Vehicle injizierte Tiere im Gedächtnistest der tonabhängigen Furchtkonditionierung keinen signifikanten Unterschied im Erstarren (Abb.3.17.2).



Abb.3.17.2 Einfluss der intrahippokampalen Injektion von Urocortin III auf die tonabhängige Furchtkonditionierung.

Links: Übersichtsthema des Experiments. Mit intrahippokampalen Mikrokanülen versehene Balb/c Mäuse (9/Gruppe) wurden intrahippokampal mit Urocortin III (0,5 µg/Maus) oder Vehicle injiziert und vier Stunden später mittels tonabhängiger Furchtkonditionierung trainiert. Rechts: Das Erstarren wurde 24 h später im Gedächtnistest analysiert. Es wurden keine statisitische Gruppenunterschiede beobachtet.

Anschließend sollte überprüft werden, ob Urocortin III einen Einfluss auf den hippokampalen pMek-1/2 und pErk-1/2 Gehalt hat. Balb/c Mäusen (3/Gruppe) wurden Mikrokanülen in den Hippokampus eingeführt. Den Tieren wurde 4 h vor der kontextabhängigen Furchtkonditionierung Urocortin III (0,4 µg/Maus) oder Vehicle injiziert. Hippokampale Proteinlysate wurden 1 h nach dem Training hergestellt. Als Kontrolle dienten Tiere die intrahippokampal mit Vehicle injiziert wurden und 5 h später direkt zur Herstellung von hippokampalen Proteinlysaten verwendet wurden. Mittels Immunoblot wurde anschließend der pMek-1/2 und der pErk-1/2 Gehalt der jeweiligen Lysate bestimmt. In mit Vehicle injizierten Tieren war der pErk-1/2, nicht aber der Mek-1/2 Gehalt signifikant höher als in entsprechend nicht-trainierten Tieren. Diese Resultate sind in Einklang mit zuvor beschriebenen Daten (siehe 3.10). Der pMek-1/2 und pErk1/2 Gehalt war in mit Urocortin III injizierten Tieren signifikant höher als in mit Vehicle injizierten Tieren. (Abb. 3.17.3).



Abb.3.17.3 Urocortin III beeinflusst den hippokampalen pMek-1/2 und pErk-1/2 Gehalt.

A. Repräsentativer Immunoblot für pErk-1/2 in hippokampalen Lysaten von Balb/c Mäusen (4/Gruppe), die 4 h vor dem Training der kontextabhängigen Furchtkonditioneirung intrahippokampal mit Vehicle (Vehicle /FK) oder Urocortin III (UcnIII/FK) injiziert wurden. Als Kontrolle wurden mit Vehicle injizierte, nicht trainierte (naive) Mäuse verwendet. **B**. Die Signale der unter (A) repräsentativ dargestellten Immunoblots wurden densiometrisch quantifiziert und statistisch ausgewertet. **C**. Repräsentativer Immunoblot für pMek-1/2 in denselben Lysaten die für das unter (A) beschriebene Experiment verwendet wurden. **D**. Die Signale der unter (C) beschriebenen Immunoblots wurden densiometrisch quantifiziert und statistisch ausgewertet. Statistisch ausgewertet. Statistische Unterschiede: **P* <0,05 vs.naive.

4. Diskussion

4.1 Kritische Betrachtung des Arbeitsansatzes

Um letztlich ein besseres Verständnis der hippokampalen CRF Rezeptoren während stressmodulierter Gedächtniskonsolidierung zu erlangen, war es notwendig intrazelluläre Signalwege aufzuklären, die durch die Aktivität der CRF Rezeptoren moduliert werden. Allerdings war nur wenig über die intrazellulären Signalwege des Hippokampus während der Gedächtniskonsolidierung bekannt. Daher mußten in einleitenden Arbeiten zunächst solche hippokampalen Signalwege charakterisiert werden. Insbesondere sollte dabei der hippokampale MAP Kinase Weg untersucht werden. Für diese Arbeiten wurden Mäuse des Zuchtstammes C57BL/6J als Modellorganismus gewählt. Diese Mäuse zeigen in Gegensatz zu Balb/c Mäusen keine stressverbesserte Furchtkonditionierung (Radulovic, Jelena, persönliche Mitteilung). Allerdings konnte in einer Reihe von unterschiedlichen Lernmodellen (Francis et al., 1995; Bao et al., 1998), inklusive der Furchtkonditionierung (Chen et al., 1996), gezeigt werden, dass C57BL/6J Mäuse signifikant besser lernen als Balb/c Mäuse. Tatsächlich zeigen C57BL/6J Mäuse im Gedächtnistest der kontextabhängigen Furchtkonditionierung genau so viel Erstarren, wie Balb/c Mäuse nach stress-verbesserter Furchtkonditionierung (Fischer, André, persönliche Mitteilung). Die Verwendung von C57BL/6J Mäusen in den einleitenden Experimenten zur Untersuchung des hippokampalen MAP Kinase Signalwegs während der Gedächtniskonsolidierung hatte dabei eine Reihe von Vorteilen. Ein maximaler Lernerfolg konnte in C57BL/6J Mäusen auch ohne vorherigen akuten Stress erzielt werden. Durch die daraus resultierende Zeitersparnis, konnten in kürzerer Zeit mehr Experimente durchgeführt werden. Zudem durfte angenommen werden, dass molekulare Unterschiede während der Gedächtniskonsolidierung umso deutlicher zu beobachten sind, je besser die Tiere lernen. In C57BL/6J Mäusen konnte daher der Einfluss von Gedächtniskonsolidierung auf den hippokampalen MAP Kinase Weg untersucht werden, ohne dass dieses System durch Stress moduliert wurde. Dieses war wichtig, da Stress auch Signalwege induziert, die nicht für kognitive Eigenschaften wichtig sind (Johnson und Lapadat, 2002). So war es möglich anschließend einen potentiellen Einfluss von stress-verbesserter Furchtkonditionierung auf Komponenten des MAP Kinase Wegs in Balb/c Mäusen zu untersuchen.

4.2 Der hippokampale MAP Kinase Signalweg wird in C57BL/6J Mäusen durch assoziatives Lernen reguliert

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Proteine des MAP Kinase Signalwegs pErk-1/2 und pElk-1 nach dem Training der kontextabhängigen Furchtkonditionierung im Hippokampus von C57BL/6J Mäusen aufreguliert waren. Eine Aufregulation von pErk-1/2 konnte zu den Zeitpunkten 0,5 bzw. 1h und für pElk-1 0,5 h nach den jeweiligen Versuchen beobachtet werden. In Einklang damit sind Arbeiten, in denen eine pErk-1/2 und pElk-1 Aufregulation nach visueller Stimulation (Kaminska, et al., 1999) oder nach dem Training instrumenteller Lernmodelle wie dem "Passiven Vermeidungstest" (Cammarota et al., 2000) und dem "Geschmacksvermeidungstest" (Berman et al., 1998) gezeigt werden konnte. Im Gegensatz zu der Furchtkonditionierung können die Tiere in instrumentellen Lernmodellen durch Ihr Verhalten Einfluss auf den Versuchsablauf nehmen. Vergleicht man die Zeitkurven der Erk-1/2 und Elk-1 Phosphorylierung in diesen experimentellen Ansätzen, ergibt sich hierfür ein dynamisches Zeitfenster von 5 min bis 2 h. Außerdem zeigen diese Daten, dass die zeitliche Aufregulation von pErk-1/2 und pElk-1 von dem jeweiligen Stimulus abhängig ist. In Einklang damit wurde in dieser Arbeit auch in den Kontrollgruppen der kontextabhängigen Furchtkonditionierung in denen kein assoziatives Lernen stattfindet, d.h. in der Kontext und der Schock-Kontext Gruppe (siehe auch 1.3), eine Aufregulation von pErk-1/2 und pElk-1 beobachtet. Es konnte daher angenommen werden, dass die Aufregulation von pErk-1/2 1 h nach Schock-Kontext und Kontext Präsentation auf die Informationsverarbeitung des visuellen Stimulus, den der neue Kontext darstellte, zurückzuführen war (Kaminska, et al., 1999) und nicht assoziatives Lernen repräsentierte. Interessanterweise konnte eine gleichzeitige Aufregulation von pErk-1/2 und pElk-1 nur 0,5 h nach assoziativem Lernen (Kontext-Schock Präsentation) in den hippokampalen Regionen CA3 und im Gyrus dentatus (DG) beobachtet werden. Diese Ergebnisse wiesen auf eine spezifische Funktion von pErk-1/2 und pElk-1 während der Furchtkonditionierung hin. In Einklang damit sind Arbeiten, in denen gezeigt wurde, dass die Aktivierung von Erk-1/2 in vitro für die Ausbildung hippokampaler Langzeitpotenzierung (LTP; Atkins et al., 1998) und in der Amygdala für die tonabhängige Furchtkonditionierung wichtig ist (Schafe et al., 2000). Interessanterweise konnte kürzlich

gezeigt werden, dass Mäuse mit deletiertem Erk-1 Gen keine Verschlechterung beim Lernen der Furchtkonditionierung aufweisen (Selcher et al., 2001). Allerdings darf vermutet werden, dass der Verlust des funktionellen Erk-1 Gens im Laufe der Embryonalentwicklung durch das verbleibende Erk-2 Isoenzym oder durch andere Kinasen kompensiert werden kann. Für pElk-1 wurde bisher nur eine Funktion als Transkriptionsfaktor beschrieben, wobei pElk-1 zusammen mit dem Serum-Antwort-Element (SRE) Bindefaktor einen ternären Komplex bildet und an das SRE entsprechender Promotoren bindet (Hipskind et al., 1991). Dass pElk-1 im Hippokampus nur im Zytoplasma, aber nicht in den Zellkernen nachgewiesen werden konnte, war somit unerwartet und überraschend. Unphosphoryliertes Elk-1 und pErk-1/2 konnte dagegen sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma nachgewiesen werden, was in Einklang mit vorherigen Arbeiten steht (Sgambato et al., 1998). In dieser Arbeit konnte in den Kernen und im Zytoplasma hippokampaler Zellen ebenfalls eine kürzere Form des Elk-1 Proteins beobachtet werden. Für dieses kurze Elk-1 Protein konnte gezeigt werden, dass hohe Konzentrationen im Zellkern eine Translokalisation von pElk-1 aus dem Zytoplasma in den Kern verhindern können (Vanhoutte et al.2001). In dem Morris-Wasser Labyrinth Test, bei dem Mäuse lernen sich räumlich zu orientieren (Brandeis et al., 1989; Gerlai, 2001), wurde pErk-1/2 nach mehrmaligem Training, aber nicht nach einmaligem Training, im Zellkern beobachtet (Blum et al., 1999). Es kann daher vermutet werden, dass die in dieser Arbeit verwendete Furchtkonditionierung (einmaliges Training) keinen ausreichenden Stimulus darstellt, um eine Translokalisation von pErk-1/2 und pElk-1 in den Zellkern zu induzieren. So kann erklärt werden, dass in vitro in Antwort auf sechs aufeinanderfolgende Stimulationen des Hippokampus mit hochfrequenten, starken elektrischen Reizen eine Kernlokalisation von pElk-1 im Gyrus dentatus beobachtet wurde (Davis et al., 2000). Die in dieser Arbeit beobachtete zytoplasmatische Lokalisation von pErk-1/2 und pElk-1 war allerdings spezifisch für den Hippokampus, da in der Amygdala in Einklang mit vorherigen Arbeiten (Schafe et al., 2000) eine ausschließliche Lokalisation im Zellkern beobachtet werden konnte. Diese Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass pElk-1 neben der bisher bekannten Funktion der Genexpression, während assoziativem Lernen im Hippokampus alternative Aufgaben hat. Diese Vermutung wurde durch in vitro Kinasetests mit hippokampalen Zelllysaten bestätigt, die neben der etablierten Phosphorylierung von Elk-1 durch pErk-1/2 (Zinck et al., 1995) zeigten, dass

umgekehrt Elk-1 den Gehalt an pErk-1/2 erhöhen kann. Diese Beobachtung stimmt mit früheren Arbeiten überein, die in vitro zeigten, dass rekombinantes Elk-1 und ein verkürztes Elk-1 Fusionsprotein (Elk-1(305-428)/Gluthationstransferase) die Aktivierung und Autophosphorylierung von tyrosinphosphoryliertem Erk-1/2 signifikant erhöhen können (Rao und Reddy, 1993, 1994). Da Elk-1 und das Elk-1 Fusionsprotein keine Kinaseaktivität aufweisen (Rao und Reddy, 1993, 1994), kann angenommen werden, dass Elk-1 durch Assoziation mit pErk-1/2 eine Konformationsänderung bewirkt und dadurch möglicherweise dessen Autophosphorylierung verstärkt. In Einklang damit konnte durch immunohistochemische Doppelimmunofluoreszenzfärbung und Co-Immunopräzipitation gezeigt werden, dass pElk-1 und pErk-1/2 0,5 h nach dem Training der Furchtkonditionierung im Hippokampus colokalisiert und miteinander assoziert sind. Ob für die aktivierende Wirkung des Elk-1 Fusionsproteins auf den pErk-1/2 Gehalt letztlich eine vorherige Phosphorylierung notwendig ist, bleibt noch zu klären. Die beobachtete Variabilität der verwendeten hippokampalen Lysate bezüglich der Konzentration, bei welcher Elk-1 aktivierend auf den pErk-1/2 Gehalt einwirkt, hängt möglicherweise davon ab, wieviel tyrosinphosphoryliertes Erk-1/2 vorliegt. So konnte gezeigt werden, dass nur tyrosinphosporyliertes Erk-1/2 mit Elk-1 assoziieren kann (Rao und Reddy, 1994). Zusätzlich zu der Elk-1 vermittelten Aufregulation von pErk-1/2, war in mit Elk-1 behandelten hippokampalen Lysaten auch der Gehalt des pErk-1/2 Substrats pp90Rsk-1 signifikant erhöht. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass pElk-1 im Hippokampus einen verstärkenden Rückkopplungsmechanismus bezüglich des pErk-1/2 Gehalts darstellt. Dabei wird Elk-1 nach der Phosphorylierung durch pErk-1/2 nicht in den Zellkern transportiert, sondern verstärkt durch Assoziation den pErk-1/2 Gehalt, was zu erhöhter Phosphorylierung von p90Rsk-1 und dessen Translokation in den Zellkern führte. In Einklang damit konnte parallel zu der Aufregulation von pErk-1/2 und pElk-1 0,5 h nach assoziativem Lernen für pp90Rsk-1 ein signifikanter Anstieg in den Zellkernen der hippokampalen CA3 Region beobachtet werden. Ein direkter Einfluss von Elk-1 auf die Genexpression konnte allerdings nicht vollkommen ausgeschlossen werden, da unphosphoryliertes Elk-1 im Zellkern und im Zytoplasma zu finden war. Auch Elk-1 kann nämlich als Transkriptionsfaktor wirken, wenn auch schwächer als pElk-1 (Rao und Reddy, 1993). Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass die durch SRE-vermittelte Transkription des früh-exprimierten Gens cFOS nach der

kontextabhängigen Furchtkonditionierung (Radulovic et al., 1999) auch unabhängig von Elk-1 erfolgen kann (Miranti et al., 1995). Auffällig ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass Mäuse, die nur den Kontrollparadigmen der Furchtkonditionierung, d.h. dem Kontext oder dem Schock-Kontext ausgesetzt waren, zwar einen transient erhöhten pErk-1/2 Gehalt in der CA3 Region und in Gyrus dentatus zeigten, was jedoch nicht in erhöhtem pp90Rsk-1 Gehalt resultierte. Vielmehr war der pp90Rsk-1 Gehalt dann am stärksten erhöht, wenn pErk-1/2 und pElk-1 gemeinsam aufreguliert waren. Diese Ergebnisse zeigten auch, dass die erhöhte Phosphorylierung von pErk-1/2 nicht unmittelbar mit erhöhter Phosphorylierung von p90Rsk-1 korrelieren muss. In Einklang mit dieser Beobachtung sind Daten, die zeigen, dass visuelle Stimulation zu einer lang-anhaltenden Aufregulation von pErk-1/2 im visuellen Cortex führt, wobei pElk-1 in derselben Hirnregion nur transient für 5 min aufreguliert ist (Kaminska et al., 1999). Es darf daher vermutet werden, dass möglicherweise andere Inhibitoren als Phosphatasen eine zeitliche und substratspezifische Regulation der pErk-1/2 Aktivität kontrollieren.

Vorherige Arbeiten zeigten, dass eine pharmakologische Inhibition der Erk-1/2 Kinase Mek-1/2 keinen Einfluss auf die Furchtkonditionierung und den hippokampalen pErk-1/2 Gehalt von C57BL/6J Mäusen hat (Ahi et al., unveröffentlichte Beobachtung). Es konnte allerdings in Einklang mit veröffentlichten Daten (Boutchouladze et al., 1998) gezeigt werden, dass die pharmakologische Inhibition der Proteinkinase A (PKA) die kontextabhängige Furcht-konditionierung verschlechterte. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von PKA in vermindertem pErk-1/2, pElk-1 und pp90Rsk-1 Gehalt resultierte. Konsistent dazu sind Arbeiten, die während der *in vitro* induzierten LTP eine PKA vermittelte Phosphorylierung von Erk-1/2 zeigten (Roberson et al., 1999). Interessanterweise war pElk-1 noch vor pErk-1/2 herunterreguliert, was darauf hinweist, dass pElk-1 im Signalweg oberhalb von pErk-1/2 lokalisiert sein kann. Weiterhin konnten ein verminderter pp90Rsk-1 Gehalt nur dann beobachtet werden, wenn der pErk-1/2 oder pElk-1 Gehalt vermindert war, was die Funktion dieser Proteine bei der Phosphorylierung von p90Rsk-1 bestätigte.

Bisher sind keine selektiven Inhibitoren für pErk-1/2, pElk-1 oder pp90Rsk-1 bzw. Mäuse mit entsprechend induzierbaren Gendeletionen entwickelt worden. Daher bleibt der Nachweis, dass der hippokampale MAP Kinase Weg für die kontextabhängige Furchtkonditionierung von C57BL/6J Mäusen essentiell ist indirekt. Die spezifische Funktion von pErk-1/2 und dessen Substraten während der Furchtkonditionierung ist daher noch nicht endgültig geklärt, sondern muß in der Zukunft durch weitere pharmakologische und molekularbiologische Experimente untersucht werden. Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse jedoch erstmals, dass der hippokampale MAP Kinase Signalweg durch die kontextabhängige Furchtkonditionierung reguliert wird. Dabei konnte pErk-1/2 die Phosphorylierung von Elk-1 vermitteln und umgekehrt Elk-1 positiv auf den pErk-1/2 Gehalt einwirken. Diese bisher unbekannte Interaktion ist möglicherweise für die gleichzeitige Aufregulation von pErk-1/2 und pElk-1 in den Moosfasern und pp90Rsk-1 in den Zellkernen der hippokampalen CA3 Region und im Gyrus dentatus während assoziativem Lernen von Bedeutung. Die Tatsache, dass hippokampale PKA sowohl für die Gedächtniskonsolidierung, als auch für die Aufregulation von pErk-1/2, pElk-1 und pp90Rsk-1 wichtig war, wies ebenfalls darauf hin, dass dieser Signalweg essentiell für die kontextabhängige Furchtkonditionierung ist. Wie genau PKA dabei in die Aktivierung des MAP Kinase Wegs involviert ist, bleibt ebenfalls noch zu klären (Abb. 4.2). Mit der Identifizierung des hippokampalen MAP Kinase Wegs als potentiellen Regulator der kontextabhängigen Furchtkonditionierung stand nun ein experimentelles System zur Verfügung, um in vivo den Einfluss der CRF Rezeptoren auf intrazelluläre Signalwege während Furchtkonditionierung und der stress-verbesserten Furchtkonditionierung von Balb/c Mäusen eingehender zu untersuchen.



Furchtkonditionierung

Hippokampale Pyramidenzelle

Abb. 4.2 Der hippokampale MAP Kinase Weg wird durch Furchtkonditionierung aktiviert

Kontextabhängige Furchtkonditionierung führt zur gleichzeitigen Phosphorylierung von zytoplasmatischem Erk-1/2 und Elk-1. Dabei kann Erk-1/2 Elk-1 phosphorylieren und Elk-1 umgekehrt verstärkend auf den pErk-1/2 Gehalt einwirken. Als Folge wird das Erk-1/2 Substrat p90Rsk-1 phosphoryliert und in der Kern transportiert. Die PKA Aktivität, welche wichtig für assoziatives Lernen ist, wirkt dabei aktivierend auf Erk-1/2, Elk-1 und p90Rsk-1 ein. Ob PKA dabei direkt (rote Pfeile) oder indirekt auf den MAP Kinase Weg Einfluss nimmt, müssen zukünftige Experimente zeigen.

4.3 Septaler CRFR2 reguliert assoziatives Lernen durch tonische Inhibierung des hippokampalen MAP Kinase Signal Wegs in C57BL/6J und Balb/c Mäusen

Vorherige Arbeiten an Balb/c Mäusen hatten gezeigt, dass CRFR2 im lateralen Septum auch in Abwesenheit von Stress die Furchtkonditionierung tonisch inhibiert (Radulovic et al., 1999). In Einklang damit konnte gezeigt werden, dass C57BL/6J Mäuse mit nicht funktionellem CRFR2 Gen (CRFR2 knock out) eine signifikant verbesserte Furchtkonditionierung zeigten. Außerdem verbesserte die Injektion des spezifischen CRFR2 Antagonisten Antisauvagine-30 (Rühmann et al., 1998) in das laterale Septum von C57BL/6J Mäusen die Furchtkonditionierung. Es wurde somit geschlossen, dass septaler CRFR2 assoziatives Lernen auch in C57BL/6J Mäusen tonisch inhibiert. Interessanterweise war der hippokampale Gehalt an pErk-1/2 und pp90Rsk-1 in CRFR2 knock out Mäusen während der Gedächtniskonsolidierung signifikant erhöht. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass septaler CRFR2 den tonisch inhibierenden Effekt auf die Furchtkonditionierung durch Inhibition des hippokampalen MAP Kinase Wegs vermittelt. Hierbei war jedoch zu beachten, dass CRFR2 nicht nur im Septum sondern auch in anderen Hirnregionen lokalisiert ist (Van Pett et al., 2000). Es war daher nicht möglich, die in CRFR2 knock out Mäusen erzielten Ergebnisse als spezifisch für das Fehlen von septalem CRFR2 anzunehmen. Allerdings führte die pharmakologische Inhibition von septalem CRFR2 während der Gedächtniskonsolidierung durch intraseptale Injektion von Antisauvagine-30 zu einem verminderten pErk-1/2, pp90Rsk-1 und pElk-1 Gehalt in den hippokampalen Regionen CA1, CA3 und im Gyrus dentatus. Diese Ergebnisse zeigten erstmals, dass septaler CRFR2 funktionell mit dem hippokampalen MAP Kinase Weg verknüpft war. Außerdem sind diese Resultate in Einklang mit Arbeiten, die eine enge funktionelle Verknüpfung von Septum und Hippokampus während der kontextabhängigen Furchtkonditionierung demonstrierten. So zeigten Experimente, dass eine Läsion der Fornix Verbindung, jenes massive Faserbündel, welches Septum und Hippokampus miteinander verbindet (siehe auch 1.3), eine Verschlechterung des assoziativen Lernens in Ratten zur Folge hatte (Taubenfeld, 1999). Weiterhin wurde beobachtet, dass nach einer solcher Läsion Transkriptionsfaktoren wie pCreb und C/EBPß in Antwort auf das Training der Furchtkonditionierung nicht mehr im Hippokampus aufreguliert wurden (Taubenfeld, 2001). Ferner konnte für die septohippokampale Kinaseaktivität der cyclinabhängigen Kinase (Cdk) 5 kürzlich gezeigt werden, dass diese für die Gedächtniskonsolidierung wichtig ist (Fischer et al., 2002). Dabei scheint eine funktionelle Verknüpfung zwischen der Cdk5 Aktivität im Septum und Hippokampus zu bestehen (Fischer et al., 2003). Es darf daher spekuliert werden, dass für die inhibitorische Wirkung von septalem CRFR2 die vorwiegend cholinergen septo-hippokampalen Projektionen

auf GABAerge hippokampale Interneuronen verantwortlich sind, da GABA (γ-

Aminobutteräure) einer der wichtigsten hemmenden Neurotransmitter des zentralen Nervensystems ist (Gaiarsa et al., 2002). In Einklang mit dieser Vermutung konnte gezeigt werden, dass die intrahippokampale Injektion von GABA Agonisten die Furchtkonditionierung von Mäusen verschlechtert (Bast et al., 2001), wohingegen GABA Antagonisten das Lernen verbessern (Messier et al., 1999). In diesem Zusammenhang ist auch zu erwähnen, dass die Ausbildung hippokampaler Plateaupotentiale (Fraser und MacVicar, 1996) nur bei Aktivierung von Acetylcholinrezeptoren und gleichzeitiger Inhibition von hippokampale GABA Rezeptoren oder Ser/Thr Phosphatasen möglich ist (Fraser et al., 2001). Es kann demnach spekuliert werden, dass hippokampale GABA-Rezeptoren Ser/Thr Phosphatasen aktivieren, die möglicherweise Komponenten des MAP Kinase Wegs dephosphorylieren. Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Protein Phosphatase 1 inhibitorisch auf die Gedächtniskonsolidierung einwirken kann (Gedoux et al., 2002). Die Untersuchung der genauen Mechanismen, mittels denen septaler CRFR2 die Phosphorylierung hippokampaler Proteinkinasen moduliert ist dabei eine spannende Aufgabe für zukünftige Experimente. In Einklang mit der inhibitorischen Wirkung von septalem CRFR2 auf den hippokampalen MAP Kinase Weg in C57BL/6J Mäusen konnte auch für Balb/c Mäuse gezeigt werden, dass die intraseptale Injektion des CRFR2 Antagonisten Antisauvagine-30 zu einem erhöhten hippokampalen pErk-1/2 und pp90Rsk-1 Gehalt führte. Allerdings wurde in Balb/c Mäusen kein Einfluss auf den pElk-1 Gehalt beobachtet. Dieser Befund legt die Vermutung nahe, dass septaler CRFR2 in Balb/c Mäusen spezifisch die Aktivierung von Erk-1/2 und dessen Substrat p90Rsk-1 inhibiert. In Einklang damit sind Arbeiten, in denen gezeigt wurde, dass Erk-1/2 stimulusabhängig verschiedene Substrate phosphorylieren kann (Frodin und Gameldoft, 1999; Roberson et al., 1999). Außerdem konnte im weiteren Verlauf dieser Arbeit für Balb/c Mäuse gezeigt werden, dass pErk-1/2 und pp90Rsk-1 aber nicht pElk-1 in Abhängigkeit von stressverbesserte Furchtkonditionierung aufreguliert wurden (siehe auch 4.4). Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass septaler CRFR2 assoziatives Lernen in C57BL/6J Mäusen tonisch inhibiert. Somit konnten vorherige, an Balb/c Mäusen durchgeführte Ergebnisse (Radulovic et al., 1999) bestätigt werden. Die Inhibition von septalem CRFR2

resultierte dabei in erhöhtem hippokampalen pErk-1/2, pp90Rsk-1 und pElk-1 Gehalt. Es konnte somit angenommen werden, dass septaler CRFR2 die Furchtkonditionierung u.a. durch Hemmung des hippokampalen MAP Kinase Wegs inhibiert. In Einklang damit konnte auch für Balb/c Mäuse gezeigt werden, dass septaler CRFR2 inhibierend auf den hippokampalen pErk-1/2 und pp90Rsk-1 Gehalt einwirkte (Abb. 4.3).



Abb. 4.3. Septaler CRFR2 inhibiert assoziatives Lernen und den hippokampalen MAP Kinase

Signalweg

Die Aktivität von septalem CRFR2 hat einen tonisch inhibierenden Einfluss auf die kontextabhängige Furchtkonditionierung. Gleichzeitig blockiert septaler CRFR2 tonisch die durch Furchtkonditionierung induzierte Aktivierung des hippokampalen MAP Kinase Signalwegs. Ob PKA dabei direkt oder indirekt (gestrichelte Pfeile) auf den MAP Kinase Weg Einfluss nimmt müssen zukünftige Experimente zeigen. *Der Einfluss von septalem CRFR2 auf den hippokampalen pElk-1 Gehalt konnte nur in C57BL/6J Mäusen beobachtet werden.

4.4 Hippokampaler CRFR2 reguliert stress-verbessertes assoziatives Lernen in Balb/c Mäusen und aktiviert den hippokampalen MAP Kinase Signalweg.

Vorangegangene Arbeiten zeigten, dass hippokampaler CRFR1 für die stress-verbesserte Furchtkonditionierung von Balb/c Mäusen wichtig ist (Radulovic et al., 1999; Radulovic et al., 2000). In dieser Arbeit konnte durch semiquantitative PCR und *in situ* Hybridisierung gezeigt werden, dass hippokampaler *CRFR1* in Antwort auf Immobilisationsstress transient aufreguliert

wurde. Dabei war die Aufregulation 3 h nach dem Ende der Immobilisierung in den hippokampalen Feldern CA1, CA3 und im Gyrus dentatus zu beobachten. Die Aufregulation war transient, da 24 h nach dem Ende der Immobilisierung kein Unterschied mehr zu naiven Tieren beobachtet werden konnte. Eine Aufregulation von hippokampalem CRFR1 ist bisher nur in einer Arbeit beschrieben worden. Hierbei wurden Ratten für 10 Tage chronischem Stress ausgesetzt, der aus der täglichen Präsentation von jeweils verschiedenen Stressoren bestand (Iredale et al., 1996). Eine in dieser Arbeit beobachtete transiente Aufregulation von CRFR1 in Antwort auf verschiedene akute Stressoren ist in Einklang mit vorherigen Arbeiten. Diese zeigten, dass akuter Immobilisationsstress (Luo et al., 1994, Rivest et al., 1995) oder intraperitonatale Injektion von Alkohol (Lee und Rivier, 1997) 1,5 bis 4h später in erhöhter *CRFR1* Expression im paraventikulären Kern des Hypothalamus (PVN) von Ratten resultiert. Dabei war 24 h nach dem Ende der Immobiliserung keine Aufregulation mehr zu beobachten. In dieser Arbeit wurde in Balb/c Mäusen ebenfalls eine Aufregulation von CRFR1 im paraventrikulären Kern des Hypothalamus beobachtet, wobei diese jedoch nicht transient war, sondern auch noch 24 h nach dem Ende der Immobilisierung beobachtet werden konnte. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Balb/c Mäuse nur dann eine stressverbesserte Furchtkonditionierung zeigten, wenn das Training 3 h nach dem Ende der Immobilisierung stattfindet. Wurden die Tiere unmittelbar, 1 oder 2 h nach dem Ende der Immobilisierung trainiert, konnte kein verbessertes assoziatives Lernen beobachtet werden (Radulovic et al., 1999). Die Tatsache, dass hippokampaler *CRFR1* erst 3 h nach dem Ende der Immobilisierung signifikant aufreguliert war, ließ daher vermuten, dass dieser erhöhte CRFR1 Gehalt, wesentlich an der Regulation des stress-verbesserten Lernens beteiligt ist. In Einklang damit zeigten vorherige Arbeiten, dass ein einstündiger Immobilisationsstress zur Aufregulation von Genen im septo-hippokampalen System führt, die an der Regulation des stress-verbesserten Lernens beteiligt sind (Fischer et al., 2002). Interessanterweise war der hippokampale pErk-1/2 und pp90Rsk-1 Gehalt nach stress-verbesserter Furchtkonditionierung signifikant stärker aufreguliert, als nach Furchtkonditionierung in Abwesenheit von Stress. Die klassische Aktivatorkinase von Erk-1/2, die Mek-1/2 (Davis, 1995) war sogar ausschließlich nach stressverbesserter Furchtkonditionierung aufreguliert. Diese Ergebnisse zeigten, dass pMek-1/2, pErk-1/2 und pp90Rsk-1 in Balb/c Mäusen durch stress-verbessertes assoziatives Lernen

reguliert werden. In Einklang damit konnte in dieser Arbeit für C57BL/6J Mäuse gezeigt werden, dass der hippokampale pErk-1/2 und pp90Rsk-1 Gehalt spezifisch durch assoziatives Lernen aufreguliert wurde (siehe 4.3). Interessanterweise hatte weder Fuchtkonditionierung, noch deren stress-vermittelte Verbesserung Einfluss auf den Gehalt des Erk-1/2 Substrats pElk-1, was darauf hindeutete, dass Elk-1 in Balb/c Mäusen nicht durch pErk-1/2 reguliert wird. Diese Daten sind in Einklang mit vorherigen Arbeiten, die auf eine Funktion des hippokampalen MAP Kinase Signalwegs während assoziativen Lernens hinwiesen (English et al., 1996, 1997; Schafe et al., 2000) und deuteten auf eine spezifische Funktion von Mek-1/2 während der stress-verbesserten Furchtkonditionierung von Balb/c Mäusen hin. In Einklang damit konnte gezeigt werden, dass die intrahippokampale Injektion des Mek-1/2 Inhibitors u0126 die stressverbesserte Furchtkonditionierung blockierte, jedoch keinen Einfluss auf die Furchtkonditionierung in Abwesenheit von Stress hatte. Dieses Ergebnis wird durch kürzliche Arbeiten unterstützt, in denen die Mek-1/2 Aktivität in Mäusen mit einem in der hippokampalen CA1 Region exprimierten CRE (cAMP Response Element)-Reporter Gen wichtig für die Furchtkonditionierung war (Athos et al., 2002). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die intrahippokampale Injektion des Mek-1/2 Inhibitors u0126 nur nach stress-modulierter Furchtkonditionierung den hippokampalen pErk-1/2 und pp90Rsk-1 Gehalt verminderte. Die Injektion von u0126 hatte dagegen keinen Einfluss auf den pErk-1/2 und pp90Rsk-1 Gehalt, wenn die Mäuse ohne vorherigen Immobilisationsstress mittels Furchtkonditionierung trainiert wurden. Vor diesem Hintergrund können auch vorherige Resultate (Ahi et al, unveröffentlichte Daten) erklärt werden, in denen die Inhibition der hippokampalen Mek-1/2 Aktivität in C57BL/6J Mäusen keinen Einfluss auf die Furchtkonditionierung hatte, da in C57BL/6J Mäusen keine stress-verbesserte Furchtkonditionierung zu beobachten ist (Radulovic, Jelena, persönliche Mitteilung).

In Anbetracht der bisherigen Ergebnisse wurde angenommen, dass der hippokampale CRFR1 nach stress-modulierter Furchtkonditionierung Einfluss auf den hippokampalen pMek-1/2 und/oder pErk-1/2 Gehalt haben könnte. In Einklang mit diese Sichtweise waren Arbeiten, die zeigten, dass heterolog in CHO-Zellen exprimierter CRFR1 oder CRFR2 jeweils aktivierend auf den pErk-1/2 Gehalt einwirken kann (Rossant et al., 1999). Es wurde vermutet, dass eine Inhibition des hippokampalen CRFR1 in vermindertem hippokampalen pMek-1/2 und pErk-1/2 Kerken kann (Rossant et al., 1999).

Gehalt resultiert. Da bisher kein geeigneter, spezifischer Antagonist für CRFR1 entwickelt werden konnte, wurde der CRFR1/2 Antagonist Astressin während der Gedächtniskonsolidierung intrahippokampal in CRFR2 knock out Mäuse injiziert. Die CRFR2 knock out Mäuse konnten unter anderem deshalb verwendet werden, da sie eine verbesserte Furchtkonditionierung aufwiesen (siehe Abb. 3.7), wie sie auch nach Stress beobachtet wurde (Radulovic et al., 1999, Fischer et al., 2002) und Astressin in diesem Fall als spezifischer Antagonist für CRFR1 verwendet werden konnte. Anders als erwartet deuteten die Resultate jedoch darauf hin, dass hippokampaler CRFR1 keinen aktivierenden Effekt auf pMek-1/2 und pErk-1/2 ausübte. Vielmehr zeigten die Ergebnisse, dass intrahippokampal mit Astressin injizierte CRFR2 knock out Mäuse einen erhöhten pErk-1/2 und pMek-1/2 Gehalt aufwiesen. Dieser Befund wies darauf hin, dass hippokampaler CRFR1 inhibierend auf den MAP Kinase Weg einwirken könnte. Allerdings ist es auch möglich, dass hippokampaler CRFR1 in CRFR2 knock out Mäusen die inhibitorische Funktion von septalem CRFR2 (siehe auch 4.3) kompensatorisch übernommen hat. Diese Frage wird zu klären sein, sobald spezifische Antagonisten für CRFR1 entwickelt wurden. Überraschender war allerdings das Ergebnis, dass in CRFR2 (-/-) Mäusen im Gegensatz zu entsprechenden homozygoten (+/+) Tieren ein signifikant verminderter pMek-1/2 Gehalt beobachtet wurde, was auf eine aktivierende Funktion von hippokampalem CRFR2 hinwies. Dieses Resultat war unerwartet und spannend, da bisher keine physiologische Funktion von hippokampalem CRFR2 beschrieben wurde, obwohl die hippokampale Expression von CRFR2 gezeigt werden konnte (Van Pett et al., 2000). Die physiologische Funktion von CRFR2 wurde bisher vor allem mit der Regulation von allgemeinen Angstzuständen durch den septalen CRFR2 in Verbindung gebracht (Kishimoto et al., 2000; Bale et al., 2000; Pelleymounter et al., 2002). Interessanterweise konnte mittels in situ Hybridisierungauch für hippokampalen CRFR2 3 h nach dem Ende der Immobilsierung eine Aufregulation in den hippokampalen Feldern CA1, CA3 und in Gyrus dentatus beobachtet werden. In Einklang damit sind Arbeiten, die eine dynamische Expression von CRFR2 in Antwort auf systemische Injektion von Glucocorticoiden in ventromedialen Kern des Hypothalamus zeigten (Makino et al., 1998).

Durch die intrahippokampale Injektion des spezifischen CRFR2 Antagonisten Antisauvagine-30 konnte die stress-verbesserte Furchtkonditionierung blockiert werden. Interessanter weise hatte

die intrahippokampale Injektion von Antisauvagine-30 jedoch keinen Einfluss auf Furchtkonditionierung in Abwesenheit von Stress. Außerdem konnte gezeigt werden, dass intrahippokampal injiziertes Antisauvagine-30 keinen Einfluss auf die stress-verbesserte tonabhängige Furchtkonditionierung hatte, was die Spezifität des Antisauvagin-30 Effekts für kontextabhängiges assoziatives Lernen bestätigte. In Einklang damit konnte gezeigt werden, dass hippokampaler CRFR2 ausschließlich nach stressverbesserter Furchtkonditionierung den hippokampalen MAP Kinase Weg reguliert. Dieses Feststellung resultierte aus der Beobachtung, dass intrahippokampal injiziertes Antisauvagine-30 die durch stress-modulierte Furchtkonditionierung vermittelte hippokampale Aufregulation von pMek-1/2, pErk-1/2 und pp90Rsk-1 blockierte, jedoch keinen Einfluss auf den pErk-1/2 Gehalt nach der Furchtkonditionierung in Abwesenheit von Stress hatte. Diese Daten zeigten erstmals *in vivo*, dass CRFR2 an den MAP Kinase Signalweg gekoppelt sein kann. Bisher konnte nur in einer Arbeit *in vitro* gezeigt werden, dass in CHO Zellen überexprimierter CRFR1 und CRFR2 nach Stimulation mit Sauvagine jeweils die Erk-1/2 Phosphorylierung induzieren (Rossant et al., 1999).

Um die neue Funktion von hippokampalem CRFR2 während der stress-verbesserten Furchtkonditionierung zu verifizieren, wurde der kürzlich identifizierte, spezifische CRFR2 Agonist Urocortin III (Lewis et al., 2001) verwendet. Es wurde beobachtet, dass die intrahippokample Injektion von Urocortin III die kontextabhängige Furchtkonditionierung signifikant verbesserte. Allerdings nur wenn Urocortin III 4 h vor dem Training injiziert wurde, nicht aber wenn die Injektion unmittelbar vor dem Training stattfand. Die intrahippokampale Injektion von Urocortin III 4 h vor dem Training hatte keinen Einfluss auf die tonabhängige Furchtkonditionierung und belegte somit die Spezifität des Urocortin III Effekts für kontextabhägiges assoziatives Lernen. In Einklang damit hat die Injektion von Urocortin II (Valdez et al., 2001) oder Urocortin III (Reul und Holsboer, 2002) in die lateralen Gehirnventrikel eine Verminderung des generellen Angstzustandes von Mäusen zur Folge. Allerdings ebenfalls nur dann, wenn die Injektionen jeweils 4 h vor dem verwendeten Test, in diesem Fall dem erhöhten Plus Labyrinth Test, durchgeführt wurden. Injektionen zu einem früheren Zeitpunkt vor dem Test erwiesen sich dagegen als wirkungslos. Über die physiologische Funktion von Urocortin III ist bisher nur wenig bekannt. Es kann daher nur spekuliert werden, warum Urocortin III nur dann die Furchtkonditionierung verbessert, wenn es 4 h vor dem Tranining injiziert wurde. Dieses Zeitfenster von 4 h zeigt allerdings eine auffällige Parallele zu dem Zeitfenster, welches notwendig ist, damit Balb/c Mäuse eine stressverbesserte Gedächtniskonsolidierung zeigen (4 h vom Anfang der Immobilisierung bis zum Training der Furchtkonditionierung). In Anbetracht der Tatsache, dass hippokampaler CRFR2 3 h nach dem Ende einer einstündigen Immobilisierung (d.h. 4 h nach dem Beginn der Immobilisierung) aufreguliert war, darf spekuliert werden, dass die Urocortin III vermittelte Aktivierung von hippokampalem CRFR2 dessen eigene Aufregulation induziert. Ein solche Auto-Regulation von Hormonrezeptoren ist für andere Systeme beschrieben worden. So induziert z.B. Östrogen durch Aktivierung des Östrogenrezeptors letztlich dessen Aufregulation (Ulisse und Tata, 1994; Prins und Birch, 1997). Es wäre dann zu vermuten, dass sich die Kopplung von hippokampalem CRFR2 an intrazelluläre Signalwege während der Furchtkonditionierung von nicht-gestressten Tieren und Tieren die zuvor für 1 h immobilisiert wurden unterscheidet. In Einklang damit führte hippokampaler CRFR2 nur nach stressverbesserter Furchtkonditionierung zur Aktivierung von pMek-1/2, pErk-1/2 und pp90Rsk-1. Übereinstimmend mit dieser Sichtweise ist der Befund, dass 4 h vor dem Training intrahippokampal injiziertes Urocortin III die Furchtkonditionierung verbesserte und gleichzeitig die Aufregulation der hippokampalen pMek-1/2 und pErk-1/2 Proteine vermittelte. Somit konnte ein neuer hippokampaler Signalweg entdeckt werden, bei dem während der stress-vermittelten Furchtkonditionierung hippokampaler CRFR2 zur Aktivierung von Mek-1/2 führt, was in erhöhtem pErk-1/2 und pp90Rsk-1 Gehalt resultierte. Da sowohl die Inhibition von CRFR2, als auch von Mek-1/2 spezifisch das Erstarren im Gedächtnistest der stressverbesserten Furchtkonditionierung verschlechterte, konnte erstmals direkt gezeigt werden, dass dieser Signalweg essentiell für stress-verbessertes assoziatives Lernen ist. Allerdings wurde pErk-1/2 auch während der Furchtkonditionierung in Abwesenheit von Stress

Aherdnigs wurde pErk-1/2 auch wahrend der Furchkondutionnerung in Abwesenheit von Stress aktiviert, was jedoch unabhängig von der Aktivität von CRFR2 und Mek-1/2 war. So konnte gezeigt werden, dass weder die intrahippokampale Injektion von Antisauvagine-30, noch von u0126 Einfluss auf die Furchtkonditionierung in Abwesenheit von Stress hatte. In Einklang mit vorherigen Arbeiten (Bourtchouladze et al., 1998) und den in dieser Arbeit für C57BL/6J Mäuse beschriebenen Daten (siehe 4.3) konnte für Balb/c Mäuse gezeigt werden, dass die intrahippokampale Injektion des PKA Inhibitors Rp-cAMPS die Furchtkonditionierung von Balb/c Mäusen signifikant verschlechterte. Gleichzeitig resultierte die Inhibition der PKA in einem verminderten hippokampalen pErk-1/2 Gehalt während der Gedächtniskonsolidierung. Diese Daten zeigten, dass pErk-1/2 während der Furchtkonditionierung in Abwesenheit von Stress durch PKA aktiviert wird. Dabei bleibt noch zu untersuchen, welches Signal letztlich zu der PKA vermittelten Aktivierung von Erk1/2 während der Furchtkonditionierung führt. Eine Reihe von Neurotransmitter-Rezeptoren kommen hierfür in Frage. So konnte für Dopaminrezeptoren, muscarine und nicotine Acetylcholinrezeptoren, metabotrope Glutamatrezeptoren, sowie für NMDA (N-metyhl-D-Aspartat) und Serotoninrezeptroren eine aktivierende Kopplung an die PKA Aktivität gezeigt werden (Pullarkat et al., 1998; Della et al, 1999; Dineley et al., 2001).

Interessanterweise war die PKA Aktivität auch für die stress-verbesserte Furchtkonditionierung von Balb/c Mäusen wichtig. So inhibierte die intrahippokampale Injektion von Rp-cAMPS auch das stress-verbesserte Erstarren von Balb/c Mäusen im Gedächtnistest der kontextabhängigen Furchtkonditionierung. In Einklang damit resultierte die intrahippokampale Injektion von Rp-cAMPS auch in signifikant vermindertem pErk-1/2 Gehalt. Somit konnte gezeigt werden, dass PKA und Mek-1/2 gleichzeitig die stress-verbesserte Furchtkonditionierung und die damit verbundenen Aufregulation des hippokampalen pErk-1/2 Gehalts vermitteln.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass hippokampaler CRFR2 das stressverbesserte, assoziative Lernen in Balb/c Mäusen regulierte. Dabei wurde hippokampaler CRFR2 durch einen einstündigen Immobilisationsstress transient aufreguliert und aktivierte den hippokampalen MAP-Kinase Weg via Mek-1/2, was letztlich zu einer verstärkten Aufregulation von pErk-1/2 und dessen Substrat pp90Rsk-1 führte. Während der Furchtkonditionierung in Abwesenheit von Stress wurde der hippokamale pErk-1/2 Gehalt durch PKA reguliert. Interessanterweise war PKA auch an der Aufreguation des pErk-1/2 Gehalts nach stressverbesserter Furchtkonditionierung beteiligt und wirkte dabei synergistisch mit der durch CRFR2 aktivierten Mek-1/2 (siehe Abb. 4.4). Wie genau hippokampaler CRFR2 dabei zur verstärkten Phosporylierung von Mek-1/2 führt ist eine spannende Frage für zukünftige Experimente. Es darf hierbei vermutet werden, dass G-Proteine, die an den zytoplasmatischen Teil von CRFR2 gekoppelt sind, GTPasen wie das Ras Protein aktivieren. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit einem im Hippokampus überexprimierten *RAS* Gen, einen signifikant erhöhten pMek-1/2 Gehalt und eine verbesserte Furchtkonditionierung aufweisen (Silva, Alcino Jose; persönliche Mitteilung).



Abb.4.4 Schematische Darstellung des hippokampalen MAP Kinase Signalwegs während der Furchtkonditionierung und deren stress-vermittelte Verbesserung in Balb/c Mäusen.

Rechts: Ein einstündiger Immobilisationsstress führt zu einer Aufregulation von hippokampalem CRFR2. Dieser aktiviert dann in Antwort auf die kontextabhängige Furchtkonditionierung Mek-1/2, was zu erhöhter Erk-1/2 Phosphorylierung führt und für die Ausbildung der stress-verbesserten Gedächtniskonsolidierung essentiell ist. In Einklang damit führt stress-vermittelte Furchtkonditionierung zu einem signifikant erhöhten pp90Rsk-1 Gehalt. Links: Furchtkonditionierung in Abwesenheit von Stress resultiert in PKA vermittelter Aufregulation von pErk-1/2. PKA wirkt während der Furchtkonditionierung und deren Verbesserung durch Stress aktivierend auf den MAP Kinaseweg ein. Ob PKA dabei direkt oder indirekt auf den pErk-1/2 und pp90Rsk-1 Einfluss nimmt müssen zukünftige Experimente zeigen.

Kürzliche Arbeiten wiesen darauf hin, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der quantitativen Produktion eines Proteins und den kognitiven Eigenschaften des Organismus bestehen könnte (Enard et al., 2002). Vor diesem Hintergrund darf spekuliert werden, dass die stress-verstärkte Aufregulation von CRFR2 und pMek-1/2 und die daraus resultierende Erhöhung des pErk1/2 und pp90Rsk-1 Gehalts ein entscheidender Mechanismus für stressverbessertes Lernen ist.

5. Zusammenfassung und abschließende Betrachtung

Assoziatives Lernen ist einer der fundamentalsten Mechanismen der Gedächtniskonsolidierung. Organismen, wie Mäuse und Menschen, lernen dabei zwei Reize miteinander zu verknüpfen. Eine sehr effektive Methode assoziatives Lernen von Mäusen quantitativ zu messen ist die kontextabhängige Furchtkonditionierung. Hierfür ist insbesondere der Hippokampus, eine Gehirnstruktur des limbischen Systems, wichtig. Bestimmte Formen von assoziativem Lernen von Mäusen können durch akuten Stress verbessert werden. An der Antwort eines Organismus auf Stress ist insbesondere das CRF (engl.; *corticotropin releasing factor*) System beteiligt. CRF ist ein Neurohormon, dass seine biologische Aktivität durch die Bindung an zwei Serpentin-Rezeptoren vermittelt. Welche intrazellulären Signalwege des Hippokampus durch Furchtkonditionierung und deren stressvermittelten Verbesserung aktiviert werden, war bisher weitgehend unklar. Ebenso war nicht bekannt welche Funktion CRF Rezeptoren dabei haben.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass der hippokampale MAP (Mitogen aktivierte Proteinkinase) Kinase Signalweg (Erk-1/2, Elk-1, pp90Rsk-1) durch assoziatives Lernen aktiviert wird. Dabei war die Aufregulation von pErk-1/2 hauptsächlich und die von pElk-1 ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert. In den Moosfasern der hippokampalen CA3 Region waren pErk-1/2 und pElk-1 colokalisiert und miteinander assoziiert. Da Elk-1 vor allem als Transkriptionsfaktor beschrieben wurde, war dieser Befund unerwartet und überraschend. Es konnte gezeigt werden, dass pErk-1/2 Elk-1 während der Gedächtniskonsolidierung phosphoryliert. Umgekehrt konnte in C57BL/6J Mäusen auch beobachtet werden, dass Elk-1 verstärkend auf den pErk-1/2 Gehalt einwirkte und somit eine Rückkopplungsschleife für die Aufregulation von pErk-1/2 darstellte. Dass die verstärkende Wirkung von Elk-1 auf den pErk1/2 Gehalt auch physiologisch von Bedeutung sein könnte, zeigte der Befund, dass eine hippokampale Aufregulation und Kerntranslokalisation für das pErk1/2 Substrat pp90Rsk-1 nur dann beobachtet wurde, wenn pErk-1/2 und pElk-1 gleichzeitig aufreguliert waren. Die Inhibition von hippokampaler Proteinkinase A (PKA)

Seite 136

führte zu einer Verschlechterung der Furchtkonditionierung und verminderte gleichzeitig den hippokampalen pErk-1/2, pElk-1 und pp90Rsk-1 Gehalt, was darauf hinwies, dass die Aufregulation dieser Proteine wichtig für die durch den Hippokampus vermittelte Furchtkonditionierung war.

Es konnte gezeigt werden, dass septaler CRFR2 die Furchtkonditionierung von C57BL/6J Mäusen tonisch inhibiert, da die intraseptale Injektion des spezifischen CRFR2 Antagonisten Antisauvagine-30 in das laterale Septum, dass Erstarren im Gedächtnistest der kontextabhängigen Furchtkonditionierung signifikant erhöhte. Diese Daten bestätigten vorherige Untersuchungen an Balb/c Mäusen. Gleichzeitig konnte demonstriert werden, dass septaler CRFR2 die Aufregulation von hippokampalem pErk1/2, pElk-1 und pp90Rsk-1 in C57BL/6J Mäusen verhinderte. Diese Schlußfolgerung resultierte aus der Beobachtung, dass CRFR2 knock out Mäuse einen signifikant höheren hippokampalen pErk-1/2 und pp90Rsk-1 Gehalt aufwiesen als Tiere mit normalem CRFR2 Allel. Außerdem führte die intraseptale Injektion von Antisauvagine-30 zu einer signifikant erhöhten Aufregulation von hippokampalem pErk-1/2, pElk-1 und pp90Rsk-1 während der Gedächtniskonsolidierung. Auch für Balb/c Mäuse konnte der inhibitorische Einfluss von septalem CRFR2 auf den hippokampalen MAP Kinase Weg beobachtet werden. Allerdings führte die intraseptale Injektion von Antisauvagine-30 zu einem signifikant erhöhtem, hippokampalen pErk-1/2 und pp90Rsk-1, aber nicht pElk-1 Gehalt. Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass septaler CRFR2 in zwei Mausstämmen die Gedächtniskonsolidierung tonisch inhibiert und dabei einen hemmenden Effekt auf den hippokampalen MAP Kinase Weg ausübt.

Aus vorherigen Arbeiten war bekannt, dass Balb/c Mäuse die kontextabhängige Furchtkonditionierung 3 h nach einem einstündigen Immobilisationsstress signifikant besser erlernen. Es konnte gezeigt werden, dass der hippokampale pErk1/2 und pp90Rsk-1 Gehalt nach stressverbesserter Furchtkonditionierung signifikant stärker aufreguliert wurde, als nach Furchtkonditionierung in Abwesenheit von Stress. Interessanterweise wurde die Erk-1/2 Aktivatorkinase pMek-1/2 sogar nur nach stress-verbesserter Furchtkonditionierung aufreguliert. In Einklang damit konnte die Inhibition der hippokampalen Mek1/2 Aktivität nur
die stress-verbesserte Furchtkonditionierung blockieren. Übereinstimmend mit dieser Beobachtung resultierte die Inhibition von hippokampaler Mek1/2 auch nur nach stressverbesserter Furchtkonditionierung in signifikant vermindertem pErk1/2 und pp90Rsk-1 Gehalt. Nach Furchtkonditionierung in Abwesenheit von Stress wurde pErk-1/2 durch die Aktivität der PKA aufreguliert. Interessanterweise war die PKA auch für die stressverbesserte Furchtkonditionierung wichtig, d.h. nach stress-verbesserter Furchtkonditionierung vermittelten PKA und pMek-1/2 die verstärkte Aufregulation von pErk-1/2.

Mittels semiquantitativer PCR und *in situ* Hybridisierung wurde eine kurzzeitige Aufregulation des hippokampalen CRFR1 Gens in Abhängigkeit von Stress beobachtet. Dabei resultierte eine einstündige, stressvolle Immobilisierung von Balb/c Mäusen in einem signifikanten Anstieg der CRFR1 mRNA zu dem Zeitpunkt 3 h nach dem Ende der Immobilisierung. Interessanterweise war auch hippokampaler CRFR2 zu dem Zeitpunkt 3 h nach dem Ende der Immobilisierung aufreguliert.

Es zeigte sich, dass hippokampaler CRFR2 für stress-verbesserte Furchtkonditionierung und verstärkte Aktivierung des MAP Kinase Signalwegs via Mek1/2 verantwortlich war. So blockierte die intrahippokampale Injektion von Antisauvagine-30 spezifisch die stressverbesserte Furchtkonditionierung. Gleichzeitig inhibierte Antisauvagine-30 die durch stress-verbesserte Furchtkonditionierung verstärkte Aufregulation von pMek-1/2, pErk-1/2 und pp90Rsk-1. Dieselbe Konzentration von Antisauvagine-30 hatte dagegen keinen Einfluss auf die Furchtkonditionierung und den Proteingehalt von pMek-1/2, pErk-1/2 und pp90Rsk-1 in Abwesenheit von Stress.

In Einklang mit diesen Beobachtungen führte die intrahippokampale Injektion des kürzlich identifizierten spezifischen CRFR2 Agonisten Urocortin III (Lewis et al., 2001) zu einer signifikanten Verbesserung der Furchtkonditionierung von Balb/c Mäusen. Gleichzeitig resultierte die intrahippokampale Injektion von Urocortin III in einem erhöhten hippokampalen pMek-1/2 und pErk-1/2 Gehalt während der Gedächtniskonsolidierung. Abschließend ist zu sagen, dass durch die Kombination von verhaltens- und molekularbiologischen *in vivo* Methoden erstmals ein komplexes System von intrazellulären Proteinkinasen beschrieben wurde, das an die Aktivität eines CRF Rezeptors gekoppelt war. Wichtig ist dabei festzustellen, dass septaler und hippokampaler CRFR2 gegensätzliche Aufgaben während des Gedächtniskonsolidierung hat und dabei jeweils charakteristisch auf den MAP Kinaseweg einwirkt.

Da das CRF-System und die Ausbildung aversiver Gedächtnisinhalte wesentlich an der Entstehung von pathologischen Zuständen, wie dem Posttraumatischen Stress Syndrom beteiligt sind (Bremner et al., 1997; Newport und Nemeroff, 2000; Yehuda ,2001), ist eine Aufklärung der molekularen Signalwege essentiell, um physiologische von pathologischen Zuständen zu unterscheiden. Vor diesem Hintergrund wird es interessant sein, den in dieser Arbeit beschriebenen durch CRFR2 aktivierten Signalweg unter pathologischen Bedingungen zu analysieren, um so neue, potentielle Ziele für therapeutische Eingriffe zu identifizieren.

6. Literatur

Abel T, Martin KC, Bartsch D, Kandel E (1998) Memory suppressor genes: Inhibitory constraints on the storage of long-term memory. Science 279:338-341

Adams JP, Sweatt JD (2002) Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. Annu Rev Pharmacol Toxicol 42: 135-163

Agranoff BW (1967) Agents that block memory. The Neuroscience: A study Program (Herausgeber, Quarton GC, Melnechuk T, Schmitt FO, New York: Rockefeller University Press.

Alberini CM (1999) Genes to remember. J Exp Biol 21: 2887-2891

Athos J, Impey S, Pineda VV, Chen X, Storm DR (2002) Hippocampal CRE-mediated gene expression is required for contextual memory formation. Nat Neurosci 11: 1119-1120

Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD(1998) The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. Nat Neurosci 7: 602-609

Bale TL, Picetti R, Contarino A, Koob GF, Vale WW, Lee KF (2000) Mice deficient for both corticotropin-releasing factor receptor 1 (CRFR1) and CRFR2 have an impaired stress response and display sexually dichotomous anxiety-like behavior. J Neurosci 1:193-199

Bao S, Chen L, Thompson R F (1998) Classical eyeblink conditioning in two strains of mice: conditioned responses, sensitization, and spontaneous eyeblinks. Behavioral Neuroscience 112: 714-718.

Baram TZ, Koutsoukos Y, Schultz L, Rivier J (1996) The effect of 'Astressin', a novel antagonist of corticotropin releasing hormone (CRH), on CRH-induced seizures in the infant rat: comparison with two other antagonists. Mol Psychiatry 3: 223-226

Bast T, Zhang WN, Feldon J (2001) The ventral hippocampus and fear conditioning in rats. Different anterograde amnesias of fear after tetrodotoxin inactivation and infusion of the GABA(A) agonist muscimol. Exp Brain Res 139:39-52

Baudry M (1998) Synaptic plasticity and learning and memory: 15 years of progress. Neurobiol Learn Mem. 1-2: 113-118

Behan DP, Heinrichs SC, Troncoso JC, Liu XJ, Kawas CH, Ling N, De Souza EB (1995) Displacement of corticotropin releasing factor from its binding protein as a possible treatment for Alzheimer's disease. Nature 378:284-7

Berman DE, Hazvi S, Rosenblum K, Seger R, Dudai Y. (1998) Specific and differential activation of mitogen-activated protein kinase cascades by unfamiliar taste in the insular cortex of the behaving rat. J Neurosci 18:10037-10044

Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 6:1513-1523

Blanchard, RJ & Blanchard, DC (1969). J. Comp. Physiol. Psychol. 67, 370-375

Blank T, Nijholt I, Grammatopoulos DK, Randeva HS, Hillhouse EW, Spiess J (2003). Corticotropin-releasing factor receptors couple to multiple G-proteins to activate diverse intracellular signaling pathways in mouse hippocampus: role in neuronal excitability and associative learning. J Neurosci ; 23:700-707

Bliss TV, Lømo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. J Physiol 2: 331-356

Blum S, Moore AN, Adams F, Dash PK (1999) A mitogen-activated protein kinase cascade in the CA1/CA2 subfield of the dorsal hippocampus is essential for long-term spatial memory. J Neurosci 9: 3535-3544

Bourtchouladze R, Abel T, Berman N, Gordon R, Lapidus K, 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 4-5: 365-374

Brandeis R, Brandys Y, Yehuda S (1989) The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning. Int J Neurosci 1-2: 29-69

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgramm quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem 268;22663-22671

Bremner JD, Licinio J, Darnell A, Krystal JH, Owens MJ, Southwick SM, Nemeroff CB, Charney DS (1997). Elevated CSF corticotropin-releasing factor concentrations in posttraumatic stress disorder. Am J Psychiatry 5:624-629 Cammarota M, Bevilaqua LR, Ardenghi P, Paratcha G, Levi de Stein M, Izquierdo I, Medina JH. (2000) Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. Brain Res Mol Brain Res 76:36-46

Cannon, WB (1923) Bodily changes in pain, hunger, fear and rage; an account of recent researches into the function of emotional excitement. McGrath Pub. Co, 2nd edition.

Castro CA, Silbert LH, McNaughton BL, Barnes CA (1989) Recovery of spatial learning deficits after decay of electrically induced synaptic enhancement in the hippocampus. Nature 342: 545-548

Chang CP, Pearse RV, O'Connell S, Rosenfeld MG (1993) Identification of a seven transmembrane helix receptor for corticotropin releasing factor and sauvagine in mammalian brain. Neuron 11: 1187-1195

Chen C, Kim JJ, Thompson RF, Tonegawa S (1996) Hippocampal lesions impair contextual fear conditioning in two strains of mice. Behavioral Neurosci. 110: 1177-1180.

Chen R, Lewis KA, Perrin MH, Vale WW (1993) Expression cloning of a human corticotropin-releasing factor receptor. Proc Natl Acad Sci USA 90: 8967-8971

Chen RH, Sarnecki C, Blenis J (1992) Nuclear localization and regulation of erk- and rskencoded protein kinases. Mol Cell Biol 3: 915-927

Contractor A, Heinemann SF (2002) Glutamate receptor trafficking in synaptic plasticity. Sci STKE 2002 156: RE14

Cummings S, Elde R, Ells J, Lindall A (1983) Corticotropin-releasing factor immunoreactivity is wildly distributed within the central nervous system of the rat. J N J Neurosci 3: 543-554

Dautzenberg FM, Dietrich K, Palchaudhuri MR, Speiss J (1997) Identification of two corticotropin-releasing factor receptors from Xenopus leavis with high ligand selectivity:unusual pharmacolog of type 1 receptor. J Neurochem 69:1640-1649

Davis HP, Squire LR (1984) Protein synthesis and memory: a review. Psychol. Bull. 96: 518-559

Davis RJ (1993) The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. J Biol Chem 20: 14553-14556

Davis RJ (1995) Transcriptional regulation by MAP kinases. Mol Reprod Dev 4: 459-467

Davis S, Vanhoutte P, Pages C, Caboche J, Laroche S (2000) The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. J Neurosci 12:4563-4572

DeBlasi A, Conn PJ, Pin J, Nicoletti F (2001) Molecular determinants of metabotropic glutamate receptor signaling. Trends Pharmacol Sci 3: 114-120

Decker MW, Gill TM, McGaugh JL. (1990) Concurrent muscarinic and beta-adrenergic blockade in rats impairs place-learning in a water maze and retention of inhibitory avoidance. Brain Res 1:81-85 Della Rocca GJ, Mukhin YV, Garnovskaya MN, Daaka Y, Clark GJ, Luttrell LM, Lefkowitz RJ, Raymond JR (1999) Serotonin 5-HT1A receptor-mediated Erk activation requires calcium/calmodulin-dependent receptor endocytosis. J Biol Chem 274: 4749-4753

Desmedt A, Garcia R, Jaffard R (1999) Vasopressin in the lateral septum promotes elemental conditioning to the detriment of contextual fear conditioning in mice. Eur J Neurosci 11: 3913-3921

Dethier VG, Stallar, E (1970) Animal behavior. 3rd edition.Prentince Hall, inc, Englewood Cliffs, New Jersy

Dignam JD, Martin PL, Shastry BS, Roeder RG (1983) Eukaryotic gene transcription with purified components. Methods Enzymol 101:582-598

Dineley KT, Weeber EJ, Atkins C, Adams JP, Anderson AE, Sweatt JD (2001) Leitmotifs in the biochemistry of LTP induction: amplification, integration and coordination. J Neurochem 77: 961-971

Eckart K, Radulovic J, Radulovic M, Jahn O, Blank T, Stiedl O, Spiess J (1999) Actions of CRF and its analogs. Curr Med Chem 11: 1035-1053

Enard W, Khaitovich P, Klose J, Zollner S, Heissig F, Giavalisco P, Nieselt-Struwe K, Muchmore E, Varki A, Ravid R, Doxiadis, GM, Bontrop RE, Paabo S (2002) Intra- and interspecific variation in primate gene expression patterns. Science 296: 340-343

English JD, Sweatt JD(1996) Activation of p42 mitogen-activated protein kinase in hippocampal long term potentiation. J Biol Chem ;271(40):24329-24332

English JD, Sweatt JD (1997) A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation. J Biol Chem 272:19103-19206

Fanselow MS (1998) Pavlovian conditioning, negative feedback, and blocking: mechanisms that regulate association formation. Neuron 4: 625-627

Fanselow MS, LeDoux JE (1999) Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. Neuron 2:229-232

Fischer A, Sananbenesi F, Schrick C, Spiess J, Radulovic J. (2002) Cyclin-dependent kinase 5 is required for associative learning. J Neurosci 9:3700-3707

Fischer A, Sananbenesi F, Schrick C, Spiess J, Radulovic J. (2003) Regulation of contextual fear conditioning by baseline and inducible septo-hippocampalcyclin-dependet kinase 5. Neuropharmacology , im Druck

Flexner JB, Flexner LB, Stellar E (1963) Memory in mice is affected by intracerebral puromycin. Science 141: 567-569

Francis DD, Zaharia MD, Shanks N, Anisman H, (1995) Stress-induced disturbances in Morris water-maze performance: interstrain variability. Physiology and Behavior 58: 57-65.

Franklin KBJ, Paxinos, G (1997) The mouse brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic.

Fraser DD, MacVicar BA (1996) Cholinergic-dependent plateau potential in hippocampal CA1 pyramidal neurons. J Neurosci 13:4113-4128 Fraser DD, Doll D, MacVicar BA (2001) Serine/threonine protein phosphatases and synaptic inhibition regulate the expression of cholinergic-dependent plateau potentials. J Neurophysiol 3: 1197-1205

Frodin M, Gammeltoft S (1999) Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. Mol Cell Endocrinol 151: 65-77

Gaiarsa JL, Caillard O, Ben-Ari Y (2002) Long-term plasticity at GABAergic and glycinergic synapses: mechanisms and functional significance. Trends Neurosci 11: 564-570

Genoux D, Haditsch U, Knobloch M, Michalon A, Storm D, Mansuy IM (2002) Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. Nature 6901: 970-975

Gerlai R. (2001) Behavioral tests of hippocampal function: simple paradigms complex problems. Behav Brain Res 1-2: 269-277

Giardino L, Puglisi-Allegra S, Ceccatelli S (1996) CRH-R1 mRNA expression in two strains of inbred mice and its regulation after repeated restraint stress. Brain Res Mol Brain Res 40: 310-314

Gulyas J, Rivier C, Perrin M, Koerber SC, Sutton S, Corrigan A, Lahrichi SL, Craig AG, Vale W, Rivier J (1995) Potent, structurally constrained agonists and competitive antagonists of corticotropin-releasing factor. Proc Natl Acad Sci U S A 23:10575-1579

Hatada Y, Wu F, Sun ZY, Schacher S, Goldberg DJ (2000) Presynaptic morphological changes associated with long-term synaptic facilitation are triggered by actin polymerization at preexisting varicositis. J Neurosci 20: RC82.

Hebb DO (1949) The organization of behaviour. John Wiley&Sons

Heinrichs SC, Vale EA, Lapsansky J, Behan DP, McClure LV, Ling N, De Souza EB, Schulteis G (1997) Enhancement of performance in multiple learning tasks by corticotropinreleasing factor-binding protein ligand inhibitors. Peptides 18:711-716

Heyser CJ, McDonald JS, Polis IY, Gold LH (1999) Strain distribution of mice in discriminated Y-maze avoidance learning: genetic and procedural differences. Behavioral Neuroscience 113: 91-102.

Hipskind RA, Rao VN, Mueller CG, Reddy ES, Nordheim A (1991) Ets-related protein Elk-1 is homologous to the c-fos regulatory factor p62TCF. Nature 1991 354: 531-534

Holsboer (1999) Streß-Angst-Depression: Die neue Psychopharnakologie Max Ülanck Forschung, Sonderheft zur 50. Hauptversammlung.

Iredale PA, Terwilliger R, Widnell KL, Nestler EJ, Duman RS (1996) Differential regulation of corticotropin-releasing factor1 receptor expression by stress and agonist treatments in brain and cultured cells. Mol Pharmacol 50: 1103-1110

Jingami H, Minzuno N, Takahashi H, Shibahara S, Furutani Y, Imura H, and Numa S (1985) Cloning and sequence analysis of cDNA for rat corticotropin-releasing factor precursor. FEBS Lett 191:63-66

Kaang BK, Kandel ER, Grant SG (1993) Activation of cAMP-responsive genes by stimuli that produce long-term facilitation in Aplysia sensory neurons. Neuron 3: 427-435

Kaminska B, Kaczmarek L, Zangenehpour S, Chaudhuri A. (1999) Rapid phosphorylation of Elk-1 transcription factor and activation of MAP kinase signal transduction pathways in response to visual stimulation. Mol Cell Neurosci 6: 405-414 Key M, Wirick B, Cool D, Morris M (2001) Quantitative in situ hybridization for peptide mRNAs in mouse brain. Brain Res Brain Res Protoc 8: 8-15

Kim JJ, Fanselow MS (1992) Modality-specific retrograde-amnesia of fear. Science 256: 675-677

Kishimoto T, Pearse RV, Lin CR, Rosenfeld MG (1995) A sauvagine/corticotropin-releasing factor receptor expressed in heart and skeletal muscle. Proc Natl Acad Sci USA 92: 1108-1112

Kishimoto T, Radulovic J, Radulovic M, Lin CR, Schrick C, Hooshmand F, Hermanson O, Rosenfeld MG, Spiess J (2000) Deletion of crhr2 reveals an anxiolytic role for corticotropinreleasing hormone receptor-2. Nat Genet 24:415-419

Köhler T (1995) General aspects and chances of nucleic acid quantitation by PCR. In: Köhler T, Laßner D, Rost AK, Thamm B, Pustowoit B, Remke H. Quantitation of mRNA by polymerase chain reaction. Nonradioactive PCR methods. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.

Koob GF, Bloom FE (1985) Corticotropin-releasing factor and behavior. Fed Proc 44:259-263

Johnson GL, Lapadat R (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. Science 298:1911-1912

Lashley, K (1950) In search of the engram. Soc. Exp. Biol 4:454-482.

Lee S, Rivier C (1997) Alcohol increases the expression of type 1, but not type 2 alpha corticotropin-releasing factor (CRF) receptor ribonucleic acid in the rat hypothalamus. Brain Res Mol Brain Res 52: 78-89

Lewis K, Li C, Perrin MH, Blount A, Kunitake K, Donaldson C, Vaughan J, Reyes TM, Gulyas J, Fischer W, Bilezikjian L, Rivier J, Sawchenko PE, Vale WW (2001) Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 2001 98:7570-7575

Liang KC, Lee EH (1988) Intra-amygdala injections of corticotropin releasing factor facilitate inhibitory avoidance learning and reduce exploratory behavior in rats. Psychopharmacology (Berl) 96:232-236

Lovenberg TW, Liaw CW, Grigoriadis DE, Clevenger W, Chalmers DT, de Souza EB, Oltersdorf T (1995) Cloning and charaterization of a functionally distincy corticotropinreleasing factor recepor subtype from rat brain. Proc Natl Acad Sci US 92: 836-840

Luo X, Kiss A, Makara G, Lolait SJ, Aguilera G (1994) Stress-specific regulation of corticotropin releasing hormone receptor expression in the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. J Neuroendocrinol 6: 689-696

Luo Y, Long JM, Lu C, Chan SL, Spangler EL, Mascarucci P, Raz A, Longo DL, Mattson MP, Ingram DK, Weng NP (2002) A link between maze learning and hippocampal expression of neuroleukin and its receptor gp78. J Neurochem 2002 2: 354-361

Maecker H, Desai A, Dash R, Rivier J, Vale W, Sapolsky R (1997) Astressin, a novel and potent CRF antagonist, is neuroprotective in the hippocampus when administered after a seizure. Brain Res 744:166-170

Makino S, Takemura T, Asaba K, Nishiyama M, Takao T, Hashimoto K (1997) Differential regulation of type-1 and type-2alpha corticotropin-releasing hormone receptor mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. Brain Res Mol Brain Res 47: 170-176

Makino S, Asaba K, Takao T, Hashimoto K (1997) Type 2 corticotropin-releasing hormone receptor mRNA expression in the heart in hypertensive rats. Life Sci 6: 515-523

Marchuk D, Drumm M, Saulino A, Collins FS (1991) Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. Nucleic Acids Res 19:1154

Maren S (2001) Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. Annu Rev Neurosci 24: 897-931

Markowitsch HJ (2001) Lernen, Angst und Streß: Molekulare Verknüpfungen. In Körper, Seele, Trauma. Biologie, Klinik und Praxis. Herausgeber: Streeck-Fischer A, Sachsse U, Özkan I. Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen

Marston HM, Everitt BJ, Robbins TW (1993) Comparative effects of excitotoxic lesions of the hippocampus and septum/diagonal band on conditional visual discrimination and spatial learning. Neuropsychologia 10: 1099-1118

McGaugh JL (2002) Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. Trends Neurosci 9: 456

Messier C, Wall PM, Ethier K (1999) Contribution of cholinergic and gabaergic functions to memory processes in BALB/cANnCrlBR mice. Brain Res 2: 583-592

Milanovic S, Radulovic J, Laban O, Stiedl O, Spiess J (1998) Production of the Fos protein after contextual fear conditioning of C57BL/6N mice. Brain Res 784:37-47

Miranti CK, Ginty DD, Huang G, Chatila T, Greenberg ME (1995) Calcium activates serum response factor-dependent transcription by a Ras- and Elk-1-independent mechanism that involves a Ca2+/calmodulin-dependent kinase. Mol Cell Biol 7: 3672-3684

Mullis KB, Faloona F.A (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed-chain reaction. Meth. Enzymol 155: 335-350.

Nestler EJ (2002) Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. Neurobiol Learn Mem 3: 637-647

Newport DJ, Nemeroff CB (2000). Neurobiology of posttraumatic stress disorder. Curr Opin Neurobiol 2:211-218

Pawlow, J. P. (1903). Experimental psychology and the psycho-pathology of animals. Bull. of the Imperial Medical Acad, 7.

Pelleymounter MA, Joppa M, Ling N, Foster AC (2002) Pharmacological evidence supporting a role for central corticotropin-releasing factor(2) receptors in behavioral, but not endocrine, response to environmental stress. J Pharmacol Exp Ther 320: 145-152

Perrin MH, Donaldson CJ, Chen R, Lewis KA, Vale WW(1993) Cloning and functional expression of a rat brain corticotropin releasing factor (CRF) receptor. Endocrinology 133:3058-3061

Perrin M, Donaldson C, Chen R Blount A, Berggren T, Bilezikjian L, Sawchenko P, Vale W (1995) Identification of a second corticotropin-releasing factor receptor gene and charaterization of a cDNA expressed in heart. Proc Natl Acad Sci USA 92: 2969-2973

Prins GS, Birch L (1997) Neonatal estrogen exposure up-regulates estrogen receptor expression in the developing and adult rat prostate. Endocrinology 138: 1801-1809

Pullarkat SR, Mysels DJ, Tan M, Cowen DS (1998) Coupling of serotonin 5-HT1B receptors to activation of mitogen-activated protein kinase (ERK-2) and p70 S6 kinase signaling systems. J Neurochem 71: 1059-1067

Radulovic J, Rühmann A, Liepold T, Spiess J (1999) Modulation of learning and anxiety by corticotropin-releasing factor (CRF) and stress: differential roles of CRF receptors 1 and 2. J Neurosci 12:5016-5025.

Radulovic J, Fischer A, Katerkamp U, Spiess J (2000) Role of regional neurotransmitter receptors in corticotropin-releasing factor (CRF)-mediated modulation of fear conditioning. Neuropharmacology 4:707-710

Rao VN, Reddy ES (1993) Elk-1 proteins are phosphoproteins and activators of mitogenactivated protein kinase. Cancer Res 15: 3449-3454

Rao VN, Reddy ES (1994) elk-1 proteins interact with MAP kinases. Oncogene 7:1855-1860

Ray LB, Sturgill TW (1988) Characterization of insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase. Rapid isolation and stabilization of a novel serine/threonine kinase from 3T3-L1 cells. J Biol Chem 263: 12721-12727

Reul JM, Holsboer F (2002) Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. Curr Opin Pharmacol 1: 23-33

Reyes TM, Lewis K, Perrin MH, Kunitake KS, Vaughan J, Arias CA, Hogenesch JB, Gulyas J, Rivier J, Vale WW, Sawchenko PE (2001) Urocortin II: a member of the corticotropinreleasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 98:2843-2848

Rivest S, Laflamme N, Nappi RE (1995) Immune challenge and immobilization stress induce transcription of the gene encoding the CRF receptor in selective nuclei of the rat hypothalamus. J Neurosci 4: 2680-2695

Roberson ED, Sweatt JD (1996) Transient activation of cyclic AMP-dependent protein kinase during hippocampal long-term potentiation. J Biol Chem 48: 30436-30441

Roberson ED, English JD, Adams JP, Selcher JC, Kondratick C, Sweatt JD (1999) The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus. J Neurosci 11: 4337-4348

Rose SPR (1995) memory formation: its molecular and cell biology. Eur. Rev. 3: 243-256

Rossant CJ, Pinnock RD, Hughes J, Hall MD, McNulty S (1999) Corticotropin-releasing factor type 1 and type 2alpha receptors regulate phosphorylation of calcium/cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein and activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase. Endocrinology 4: 1525-1536

Rossum D, Hanisch UK (1999) Cytoskeletal dynamics in dendritic spines: direct modulation by glutamate receptors? Trends Neurosci 7: 290-295 Rühmann A, Bonk I, Lin CR, Rosenfeld MG, Spiess J (1998) Structural requirements for peptidic antagonists of the corticotropin-releasing factor receptor (CRFR): development of CRFR2beta-selective antisauvagine-30. Proc Natl Acad Sci U S A 26: 15264-15269

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning – a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd Edition

Sanger F Nicklen S, Soulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. PNAS 74: 5463-5467

Schafe GE, Atkins CM, Swank MW, Bauer EP, Sweatt JD, LeDoux JE (2000) Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning. J Neurosci 21: 8177-8187

Schmidt R (1995) Cell-adhesion molecules in memory formation. Behav Brain Res. 1-2: 65-72.

Scoville WB, Milner B (1959) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. J Neuropsychiatry Clin Neurosci 2000 (classical article) 1: 103-113

Seaholtz AF, Bourbais FJ, Harnden CE, Camper SA (1991) Nucleotid sequence and expression of the mouse corticotropin-releasing hormone gene. Mol Cell Neurosci 2: 266-273

Selcher JC, Nekrasova T, Paylor R, Landreth GE, Sweatt JD (2001) Mice lacking the ERK1 isoform of MAP kinase are unimpaired in emotional learning. Learn Mem 1: 11-19

Sgambato V, Pages C, Rogard M, Besson MJ, Caboche J (1998) Extracellular signalregulated kinase (ERK) controls immediate early gene induction on corticostriatal stimulation. J Neurosci 21: 8814-8825

Shalev AY (2002) Acute stress reactions in adults. Biol Psychiatry 51: 532-543

Shinjo H, Ueki A, Miwa C, Morita Y (1998) Effect of entorhinal cortex lesion on hippocampal cholinergic system in rat in operant learning task as studied by in vivo brain microdialysis. J Neurol Sci 1:13-18

Shors TJ, Weiss C, Thompson RF (1992) Stress-induced facilitation of classical conditioning. Science 257: 537-539

Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM (1995) Effects of stress on neurotrophic factor expression in the rat brain. Ann N Y Acad Sci 29;771:234-239

Sperle K, Chen A, Kostich W, Largent BL (1997) CRH-2(: a novel CRHR2 isoform found in human brain. Proc Neurosci Abstr 23, Part 2:1765

Spiess J, Rivier J, Rivier C, Vale WW (1981) Primary structure of corticotropin- releasing factor from ovine hypothallamus. Proc Natl Acad Sci USA 78:6517-6521

Stenzel P, Kesterson R, Yeung W, Cone RD, Rittenberg MB, Stenzel-Poore MP (1995) Identification of a novel murine receptor for corticotropin-releasing hormone expressed in the heart. Mol Endocrinol 5: 637-645 Stiedl O, Birkenfeld K, Palve M, Spiess J. (2000) Impairment of conditioned contextual fear of C57BL/6J mice by intracerebral injections of the NMDA receptor antagonist APV. Behav Brain Res 2: 157-168

Stork PJS and Schmitt JM (2002) Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. Trends Cell Biol 6: 258-266..

Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale W (1983) Organization of ovine corticotropinreleasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. Neuroendocrinology 136: 1097-1102

Sweatt JD (2001) The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. J Neurochem 1: 1-10

Taubenfeld SM, Wiig KA, Bear MF, Alberini CM (1999) A molecular correlate of memory and amnesia in the hippocampus. Nat Neurosci 4: 309-310

Taubenfeld SM, Wiig KA, Monti B, Dolan B, Pollonini G, Alberini CM (2001) Fornixdependent induction of hippocampal CCAAT enhancer-binding protein [beta] and [delta] Colocalizes with phosphorylated cAMP response element-binding protein and accompanies long-term memory consolidation. Journal of Neuroscience 1: 84-91.

Thompson, R F (1994) Das Gehirn. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford Ulisse S, Tata JR (1994) Thyroid hormone and glucocorticoid independently regulate the expression of estrogen receptor in male Xenopus liver cells. Mol Cell Endocrinol 105:45-53

Valdenaire O, Giller T, Breu V, Gottowik J, Kilpatrick G (1997) A new functional isoform of the human CRF2 receptor for corticotropin-releasing factor. Biochim Biophys Acta 1352:129-132

Valdez GR, Inoue K, Koob GF, Rivier J, Vale WW, Zorrilla EP (2001) Human urocortin II: effects of a novel, selective CRF-R2 receptor agonist on anxiety and motor activation in rats. Abstract 320.13 of the31st Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2001November 10–15, San Diego.

Vale WW, Spiess J, Rivier C, Rivier J (1981) Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and β -endorphin. Science 213:1349-1397

Vanhoutte P, Nissen JL, Brugg B, Gaspera BD, Besson MJ, Hipskind RA, Caboche J (2001) Opposing roles of Elk-1 and its brain-specific isoform, short Elk-1, in nerve growth factorinduced PC12 differentiation. J Biol Chem 276: 5189-5196

Van Pett K, Viau V, Bittencourt JC, Chan RK, Li HY, Arias C, Prins GS, Perrin M, Vale W, Sawchenko PE. (2000) Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. J Comp Neurol 428:191-212

Vaughan J, Donaldson C, Bittercourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, Chan R, Turnbull AV, Lovejoy D, Rivier C, Rivier J, Sawchenko PE, Vale WW (1995) Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotopin-releasing factor (CRF). Nature 378: 287-292

Vita N, Laurent P, Leford S, Chlon P, Lelias JM, Kaghad M, Le Fur G, Caput D, Ferara P (1993) Primary struture and functional expression of mouse pituitary and human brain corticotropin-releasing factor recptors. FEBS Lett 335:1-5

Vouimba RM, Garcia R, Jaffard R (1998) Opposite effects of lateral septal LTP and lateral septal lesions on contextual fear conditioning in mice. Behav Neurosci 4: 875-884

Wong RW, Setou M, Teng J, Takei Y, Hirokawa N (2002) Overexpression of motor protein KIF17 enhances spatial and working memory in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A 22: 14500-14505

Yehuda R (2001). Biology of posttraumatic stress disorder. J Clin Psychiatry ;62 Suppl 17:41-46

Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR (1999) Fundamental Neuroscience. Academic Press, San Diego, USA

Zinck R, Cahill MA, Kracht M, Sachsenmaier C, Hipskind RA, Nordheim A (1995) Protein synthesis inhibitors reveal differential regulation of mitogen-activated protein kinase and stress-activated protein kinase pathways that converge on Elk-1. Mol Cell Biol 9: 4930-4938

Danksagung

Mein Dank gilt all denen, die diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Das sind insbesondere Herr Prof. Dr. Hans Joachim Fritz und Herr Prof. Dr. Rüdiger Hardeland, die diese Arbeit extern betreuten. Insbesondere möchte ich Herrn Hans Joachim Fritz für seine stete Diskussionsbereitschaft und Anteilnahme danken.

Herrn Prof. Dr. Dr. Joachim Spiess möchte ich ganz herzlich für die Überlassung dieses interessanten Themas danken. Außerdem danke ich ihm für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Abteilung anfertigen zu können.

Meiner Betreuerin Frau Dr. Dr. Jelena Radulovic gilt mein besonderer Dank. Ihre Anleitung und die Art und Weise, wie sie komplexe wissenschaftliche Inhalte zu vermitteln mochte, trug wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Ein großes Danke auch an André und Stefan, dafür, dass sie mich stets zu motivieren wußten und immer hilfreich zur Seite standen.

Chris, Marko, Cedo, Oliver, Olaf, Lars, Bernd, Thomas Zeyda und Poldi danke ich für Ihre stete Hilfsbereitschaft im Labor. Farahnaz, Almuth und Svea für Ihre Hilfe in allen bürokratischen Problemen. Min-Yong und Ilga für die gute Atmosphäre in unserem Büro. Lothar und Harry für Ihre kompetente Hilfe wenn mal wieder der Computer abgestürzt war.

Ein herzliches Dankeschön auch an alle meine Freude und meine Familie.

Lebenslauf

Name:	Sananbenesi
Vorname:	Farahnaz
Geburtsdatum:	10.06.1970
Geburtsort:	Kermanshah/Iran
1975-1980:	Besuch der Volksschule in Kermanshah
1980- 1983:	Besuch der Aufbauschule in Kermanshah
1983-1988 :	Besuch der Oberschule "Vahdat" Abteilung "Experimentelle
	Wissenschaften" in Teheran
1988 -1989:	Studium der Physik an der freien Hochschule in Teheran. Das
	Studium mußte aus politischen und familiären Gründen abgebrochen
	werden.
1993 - 1994:	Absolvierung des Studienkollegs in Hannover, um das iranische
	Abitur anerkennen zu lassen
1994:	Beginn des Studiums der Biologie Dipl. an der Georg-August-
	Universität in Göttingen.
1996:	Vordiplom mit der Gesamtnote "Sehr Gut" bestanden
1996 - 1999:	Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft in der Abteilung
	Molekulare Neuroendokrinologie am Max Planck Institut für
	Experimentelle Medizin in Göttingen.
1998-2000:	Stipendiatin der Friedrich Ebert Stiftung
1999:	Mündliche Diplomhauptprüfung mit der Gesamtnote "Sehr Gut"
	bestanden
1999:	Beginn der Diplomarbeit im Zellbiologischen Labor der
	Universitäts-Frauenklinik
2000:	Beginn der Doktorarbeit am "Max Planck Institut für Experimentelle
	Medizin" in Göttingen in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Radulovic.
	Titel: "Expression der CRFR-Gene in Antwort auf Stress und
	Lernen".

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Stiedl O, Radulovic J, Lohmann R, Birkenfeld K, Palve M, Kammermeier J, Sananbenesi F, Spiess J. Strain and substrain differences in context- and tone-dependent fear conditioning of inbred mice. *Behav Brain Res.*, 1999

Fischer A, **Sananbenesi F**, Schrick C, Spiess J, Radulovic J. Cyclin-dependent kinase 5 is required for associative learning. *Journal of Neuroscience* 9: 3700-3707, 2002

Sananbenesi F, Fischer A, Schrick C, Spiess, J, Radulovic J. Phosphorylation of hippocampal Erk-1/2, Elk-1 and p90-Rsk-1 during contextual fear conditioning: Interactions between Erk-1/2 and Elk-1. *Molecular and Cellular Neuroscience* 21, 463-476, 2002

Fischer A, **Sananbenesi F**, Schrick C, Spiess J, Radulovic J. Regulation of contextual fear conditioning by baseline and inducible septo-hippocampalcyclin-dependent kinase 5. "Im Druck" *Neuropharmacology*

Fischer A, **Sananbenesi F**, Schrick C, Spiess J, Radulovic J. Logic rules in the hippocampus: A basis for persistence and reduction of conditioned fear. Zur Veröffentlichung eingereicht bei *Neuron*, korrigierte Version eingereicht (2003)

Sananbenesi F, Fischer A, Schrick C, Spiess J, Radulovic J. Hippocampal CRF receptor 2 mediates stress-enhanced associative learning by activating the MAP kinase pathway. Zur Veröffentlichung eingereicht bei *Nature Neuroscience*

Wissenschaftliche Tagungen

2001 30th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, USA 2002 3rd Symposium on the molecular basis of learning and memory, Berlin, D 2002 31th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Orlando, USA