

2. Eigene Untersuchungen

2.1 Arbeitsmaterialien und Geräte

2.1.1 Chemikalien

-Antikörper: pCREB, New England Biolabs, Beverley, MA

pMAP-Kinase, New England Biolabs, Beverley, MA

CREB, New England Biolabs, Beverley, MA

-Aminocapronsäure

-Biotin, Fa. Pierce, USA

-Biotinyliertes Anti-Kaninchen-IgG (H+L) Fa.Camon, Wiesbaden

-Borax, Fa. Sigma, Deisenhofen

-Bromphenolblau, Fa. Merck, Darmstadt

-Calciumchlorid, Fa.Sigma, Deisenhofen

-Chloralhydrat, Fa. Fluka, Neu-Ulm

-Cy3 markiertes Streptavidin („Fluorolink Streptavidin Cy3“), Fa. Amersham, Braunschweig

-D-Glucose, Fa. Sigma, Deisenhofen

-DPX Einschlußmittel für die Histologie, Fa.Fluka, Neu-Ulm

-EDTA, Fa. Merck, Darmstadt

-Elite-ABC, Peroxidase-Kit, Fa. Camon, Wiesbaden

-Ethanol, absolut oder vergällt, Zentralapotheke des Universitätsklinikums Magdeburg

-Glycerin, Fa. ICN, Neu-Ulm

- Kaliumchlorid z.A. Fa. Merck, Darmstadt
- Kaliumhydrogencarbonat z.A. Fa. Merck, Darmstadt
- MK 801, Fa.Sigma, Deisenhofen
- Magnesiumchlorid z.A. Fa.Merck, Darmstadt
- Magnesiumsulfat z.A. Fa.Merck, Darmstadt
- Methanol, Fa. Merck, Darmstadt
- Natriumchlorid z.A. Fa. Merck, Darmstadt
- Natriumdodecylsulfat, Fa. Roth, Nürnberg
- Natriumhydrogencarbonat z.A. Fa. Merck, Darmstadt
- Natriumhydrogenphosphat Fa. Merck, Darmstadt
- Pentobarbital, Nembutal
- Paraformaldehyd, Fa. Merck, Darmstadt
- Pikrinsäure mit Wasser angefeuchtet, Fa. Fluka, Neu-Ulm
- Polyurethanumhüllte Stahlelektroden (Durchmesser :125 micrometer) Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Magdeburg, Medizinische Fakultät
- Rattenserum, Fa. Camon, Wiesbaden
- Sucrose, reinst, Fa. Biomedicals, USA

-Sulfonamidpuder

-Thimerosal, Fa. Serva, Heidelberg

-Tris, Fa. Serva, Heidelberg

-Triton X-100, Fluka, Neu-Ulm

-Tween 20, Fa. Merck, Darmstadt

-Tyramin, Fa. Sigma, Deisenhofen

-Wasserstoffperoxid 5%, Zentralapotheke des Universitätsklinikums Magdeburg

-Ziegenserum Normal Goat Serum (NGS) , Fa. Gibco, Eggenstein

2.1.2 Lösungen

Anodenpuffer

besteht aus:

3,03 g TRIS

200 ml Methanol

Die Substanzen werden eingewogen, in 80 ml Aqua bidest gelöst und mit Aqua bidest ad 1000 ml aufgefüllt.

Artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF)

besteht aus:

14,4 g NaCl

0,72 g KCl

0,55 g CaCl₂

0,64 g MgSO₄

0,32 g KH₂PO₄

4,30 g NaHCO₃

3,60 g D-Glucose

Die Substanzen werden in 2000 ml Aqua bidest gelöst. Anschließend wird das Nährmedium bei 6°C gelagert.

Biotin-Thyramin-Lösung

besteht aus:

-50 mM Borat-Puffer (1,05 g Borax auf 100 ml Wasser) pH 8, wird auf 50°C erhitzt . Anschließend wird die Lösung für 1 h in einem Ultraschallbad inkubiert.

-50 mg Biotin werden in 20 ml Borat-Puffer gelöst

-15,6 mg Thyramin-Lösung und Borat-Puffer werden über Nacht bei Raumtemperatur in

einem Reaktionsgefäß (50 ml) geschwenkt, nach 12-16 h wird steril gefiltert und dann aliquotiert. Die hergestellte Biotin-Tyramin-Lösung wird bei 4°C gelagert.

Kathodenpuffer

besteht aus:

5,25 g Aminocaprinsäure

0,1 g SDS

200 ml Methanol

Die Substanzen werden eingewogen und ad 1000 ml mit Aqua bidest aufgefüllt.

Phosphate-buffered saline (PBS 10 x) für Immunhistochemie

besteht aus:

-80 g NaCl

-29 g Na₂HPO₄ x H₂O

-2g KCl

-2g KH₂PO₄

Die Substanzen werden in 80 ml Aqua bidest gelöst, der pH-Wert mit NaOH auf 7,4 eingestellt, mit Aqua bidest auf 1000 ml aufgefüllt und kurz vor Gebrauch autoklaviert.

Phosphate-buffered saline (PBS 10 x) für Elektrophorese

besteht aus:

160 g NaCl

4 g KCl

15,2 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

4 g KH_2PO_4

Die Substanzen werden in 80 ml Aqua bidest gelöst, auf 2000 ml mit Aqua bidest aufgefüllt und kurz vor Gebrauch autoklaviert.

Probenpuffer (SDS)

besteht aus:

1 g SDS

3 mg EDTA

10 mg Bromphenolblau

20 ml Glycerin

2,5 ml 0,5 M TRIS

1 ml DTT

Die Substanzen werden eingewogen und ad 1000 ml mit Aqua bidest aufgefüllt. Der pH-Wert wird anschließend auf 6,8 eingestellt.

Sucrose Lösung

besteht aus:

0,1 M Phosphatpuffer: Lösung A: 27,6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ auf 1000 ml Aqua bidest ; Lösung B: 35,63 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ auf 1000 ml Aqua bidest

280 ml Lösung A und 720 ml Lösung B werden vereinigt, 300g Sucrose dazugegeben und mit Aqua bidest auf 2000 ml eingestellt

Tris/ phosphate-buffered saline (TPBS 15 x)

besteht aus:

7,5 g Thimerosal

18,16 g TRIS

135 g NaCl

0,2 M Phosphatpuffer:

132,8 ml Lösung A: 27,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ auf 1000 ml Aqua bidest

566,7 ml Lösung B: 35,63 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ auf 1000 ml Aqua bidest.

Die Substanzen werden in 800 ml Aqua bidest gelöst, der pH auf 7,4 mit 10 M HCl ein-

gestellt und auf 1000 ml aufgefüllt.

Tyrode`sche Lösung

besteht aus:

19 g NaCl

0,4 g KCl

0,2 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$

0,1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

2 g Glucose

2g NaHCO_3

Die Substanzen werden in 2000 ml Aqua bidest gelöst.

Fixierlösung nach Zamboni

besteht aus:

-2000 ml Aqua bidest

-Pikrinsäure

-350 ml gesättigte Pikrinsäure

-80 g Paraformaldehyd

-Phosphatpuffer (6,62 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ und 44,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)

Zur Herstellung einer gesättigten Pikrinsäure-Lösung werden 2000 ml Aqua bidest erhitzt und soviel Pikrinsäure dazugegeben, bis die Lösung gesättigt ist. Diese Lösung erkaltet über Nacht, wird anschließend zweimal filtriert und vor Licht geschützt aufbewahrt. 350 ml gesättigte Pikrinsäure und 80 g Paraformaldehyd werden in einer 500 ml Flasche auf 60°C erhitzt. Dann wird tropfenweise NaOH-Lösung dazugegeben bis das Paraformaldehyd gelöst ist. Das Gemisch wird anschließend in eine 2000 ml Flasche filtriert und mit Phosphatpuffer (6,62 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ und 44,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ gelöst in 2000 ml Aqua bidest) aufgefüllt.

2.1.3 Geräte

-Abzugstisch; Variolab Mobilen, Q 10; Fa. Waldner

-„Isolated Pulse Stimulator“ (AM Systems, Modell 2100)

-Stereotaktisches Instrument David Kopf , Tujunga, CA

-Drucker („ Digital image printer“), Fujix Pictography 300, Fa. Fuji Photo Film, Japan

-Durchlichtmikroskope IM 35 und MC 80, Fa. Zeiss

-Digital/Analog Wandler CED 1401, Cambridge Electronic Design

-Gilsonpipetten, Fa Abimed

-Interface-Verstärker, Fa. Musycs

-Konfokales Laser Scan Mikroskop; Leica TCS NT, Fa. Leica

-Gefrierschnittmikrotom „Kryocut“ `Jung CM 3000 `Fa. Leica

-Meßkammer, Eigenkonstruktion des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie
(.S.31-35)

-Millipore Anlage, `Milli-Q-Plus `Fa. Millipor

-pH- Meter; 761 Calimac, Fa. Windaus

-Photoimager Fuji Film BAS-5000, Fa. Fuji Photo Film

-Präzisionswaage, Sartorius

-Reizgenerator, A-M-Systems, Modell 2100

-Vortex MS 1 Minishaker, Fa, Roth

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

-Deckgläser, 24x 60 mm, aus Glas, Fa. Sigma

-Pipettenspitzen, Comfortips, verschiedene Größen, unsteril Fa. Eppendorf-Netheler-
Hinz

-Objektträger, Glas Super Frost und Super Frost Plus, Fa. Menzel

-Reaktionsgefäße, 1,5 und 2 ml ,Eppendorf-Netheler-Hinz

-Zentrifugenröhrchen, aus Polypropylen 15 ml und 50 ml, Fa. Greiner

2.2 Methoden

a) *in vitro*

2.2.1 Die Ableitung evozierter Feldpotentiale mit Hilfe der *in vitro* Technik

Zum Nachweis der Auslösung von Langzeitpotenzierung in genau definierten Hirnstrukturen wurde die Methode der Ableitung evozierter Feldpotentiale an Hippocampuschnitten gewählt. Evozierte Feldpotentiale entstehen bei der Auslösung transmembranaler Ladungsverschiebungen durch die, in den neuronalen Membranen liegenden, Ionenkanäle. Die auftretenden Ladungsverschiebungen, sowohl durch die Membran als auch im Inneren des Neurons, führen im extrazellulären Raum aufgrund der Ausgleichsbestrebungen der Ionen untereinander, zu Ausgleichsströmen. Da der Extrazellulärraum einen gewissen Widerstand aufweist, kommt es zu einem Spannungsabfall, der anschließend als Feldpotential gemessen werden kann. Dieses gemessene Feldpotential steht in einem quantitativen Verhältnis zu den auslösenden transmembranalen Strömen. Dadurch bietet sich die Möglichkeit, aus den Feldpotentialen auf die, bei einer synaptischen Aktivierung ablaufenden, postsynaptischen Membranprozesse zu schließen ohne intrazellulär ableiten zu müssen. Die bei einer Positionierung einer Ableitelektrode im Stratum radiatum (apikale Dendritenbäume der CA1-Pyramidenzellen) erhaltenen Feldpotentiale bestehen dabei aus einer nach einem biphasischen Reizartefakt mit einer Latenz im Millisekundenbereich auftretenden negativen Potentialkomponente, dem fEPSP. Der bei einer überschwelligem Reizung auftretende Pop-Spike, der das extrazelluläre Korrelat der Entladung der aktivierten Neurone einer Neuronenpopulation charakterisiert, wurde bei den vorliegenden Untersuchungen als zusätzlicher Indikator genutzt, um den Aktivitätsstatus der synaptischen Übertragung zu charakterisieren. Nach Auslösung einer LTP durch hochfrequente Reizung afferenter Fasern vergrößern sich die Komponenten des Feldpotentials. Das kann unterschiedliche Ursachen haben. Die Vergrößerung der "slope function" (Steilheit) des fEPSP ist dabei zum großen Teil das Korrelat von Veränderungen der postsynaptischen Rezeptoren und Ionenkanäle. Eine Vergrößerung des Pop-Spikes reflektiert die Zunahme an Aktionspotentialen in der abgeleiteten Neuronenpopulation. Das kann bedeuten, dass sich die Anzahl der auf ei-

nem Testreiz reagierenden Neurone vergrößert, aber auch, dass eine gleichbleibende Neuronenpopulation den Testreiz mit mehr Entladungen beantwortet.

2.2.2 Herstellung der Hippocampusschnitte

Die Untersuchungen wurden an männlichen Ratten des Stammes [Shoe: Wist] vorgenommen. Alle durchgeführten Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium Dessau unter dem Aktenzeichen: 43.2-42502/2-219/Ä2 genehmigt. Die Ratten waren zum Zeitpunkt der Präparation sieben Wochen alt und wogen ca. 220-240g / Tier. Mit einem stumpfen Schlag einer Metallstange im Halswirbelsäulenbereich der Ratte wurde ein stumpfes Trauma gesetzt und die Tiere durch diesen Schlag betäubt. Anschließend wurden die Ratten mit einer Schere dekapitiert. Nach Eröffnung der Schädeldecke entlang der Sagittalnaht von dorsal nach ventral, wurde der obere Schädelknochen entfernt, die Dura durchtrennt und das Gehirn entnommen. Anschließend wurde das Gehirn in eine mit Carbogen (95 % O₂/ 5%CO₂)-gesättigte und 4°C gekühlte Nährlösung überführt. Mit einem Skalpell wurde entlang der Fissura longitudinalis ein Einschnitt vorgenommen, um die rechte bzw. linke Hirnrinde umzuklappen. Dadurch wurden die entsprechenden Hippocampi sichtbar, welche dann nach Durchtrennung der beiden Kommissuren mit Hilfe eines kleinen Spatels herausgeschält wurden. Ein so freigelegter Hippocampus wurde anschließend auf einen Kühlblock (-20°C) mit Filterpapier überführt und die überschüssige Flüssigkeit mit Filterpapier abgesaugt. Der auf den Kühlblock liegende Hippocampus wurde mit Hilfe eines Gewebeschneiders (tissue chopper) in 400 µm dicke Hippocampusschnitte geschnitten. Die Schnittrichtung wurde so gewählt, dass die laminare Struktur des Hippocampus erhalten blieb. Die einzelnen Hippocampischnitte wurden mit Hilfe eines weichen Pinsels vorsichtig von der Klinge des Gewebeschneiders abgenommen und in eine vorbereitete Schnittkammer überführt. Die Präparationsprozedur von Beginn der Dekapitation bis hin zur Überführung in die vorbereitete Schnittkammer durfte nicht länger als 5 min dauern. In der Regel konnte eine zweiminütige Präparationszeit gewährleistet werden. Die verwendete Schnittmeßkammer stellt eine Eigenkonstruktion des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie dar und wird detailliert im Ergebnisteil der Arbeit vorgestellt.

2.2.3 Milieubedingungen

Nach der Präparation wurden die Hippocampuschnitte unverzüglich in die Meßkammer verbracht, in welcher sie unter konstanten Bedingungen inkubiert wurden. Dies ist notwendig, um über einen längeren Zeitraum Feldpotentiale unter physiologischen Bedingungen ableiten zu können. Ein wichtiger Faktor ist die Zusammensetzung des künstlichen Nährmediums, das stets unmittelbar vor Versuchsbeginn hergestellt und nach Abschluß jedes Versuches verworfen wurde. Bei den durchgeführten Untersuchungen wurde die Methode des Oberflächenschnitts angewandt. Beim Oberflächenschnitt befinden sich die Schnitte auf der Schnittablage und werden vom Nährmedium gerade soweit umspült, dass sich ein Flüssigkeitsfilm über dem Schnitt ausbildet. Die notwendige Befeuchtung und die O₂-Zufuhr werden dadurch erreicht, dass kontinuierlich wassergesättigtes und angewärmtes Carbogengas über die Schnitte geleitet wird. Weil die Schnitte von einem feinen Film des Nährmediums umgeben sind, ist ein Verrutschen nicht möglich. Der dünne Flüssigkeitsfilm erlaubt ebenfalls einen ausreichenden Gasaustausch zwischen der Kammeratmosphäre und dem Hippocampuschnitt. Die Sättigung des Nährmediums mit Carbogen erfolgte mit Überdruck (1 atm) durch eine entsprechende Vorratsflasche. Die Zuflußrate des Nährmediums betrug 1 ml/min. Um eine Austrocknung der Schnitte zu verhindern, wurde nach dem Abschluß jeder Tetanisierung die Schnittabdeckung aufgelegt.

2.2.4 Elektrodenmaterial und Messung der fokalen Potentiale

Für die Untersuchungen wurden zwei Arten von Elektroden benutzt. Zum einen monopolare Reizelektroden, die aus lackiertem Edelstahl gefertigt wurden und mit denen lokal die Schaffer-Kollateralen an den spezifischen Eingängen zu den Pyramidenzellen der CA1-Region stimuliert wurden, und zum anderen Glaselektroden für die Ableitung monosynaptischer Feldpotentiale aus dem Stratum radiatum der CA1-Region. Für die elektrische Stimulation der Schaffer-Kollateralen wurde über einen computergesteuerten Digital/Analog Wandler (CED 1401) ein Reizgenerator (A-M-Systems, Modell 2100) an-

gesteuert, welcher aus einem monophasischen Impuls (5 V/ 0,1 ms) einen biphasischen Reizstrom (je eine positive und eine negative Phase) von wahlweise 25-70 μ A mit einer Impulsbreite von 0,1 ms/Phase erzeugte. Die elektrische Stimulation hippocampaler CA1-Neuronen nach entsprechender Ansteuerung des Reizgenerators wurde mit Hilfe eines eigens dafür entwickelten Programmes durchgeführt. Die Glaselektroden für die Ableitung monosynaptischer Feldpotentiale bestanden aus Borosilikatglas mit Filament und hatten einen Spitzendurchmesser von 3-20 μ m. Gefüllt wurden sie mit physiologischer Nährlösung (ACSF) unmittelbar vor Beginn jeden Versuchs. Abgeleitet wurde das Exzitatorische Postsynaptische Feldpotential (EPSP). Die Messung der Feldpotentiale erfolgte gegenüber einer Referenzelektrode (Silber/Silberchlorid). Die Biosignale wurden mit Hilfe eines Gleichspannungsverstärkers verstärkt (4 Channel Differential Amplifier). Die so gewonnenen Signale wurden in einen Analog/Digitalwandler geleitet, um sie anschließend rechnergestützt auswerten zu können. Die Messung der zwischen 2 Markern gekennzeichneten Steilheit des fEPSP, die so bezeichnete "slope function" (mV/ms) des fEPSP nach Mittelung von 4 Einzelpotentialen, erfolgte ebenfalls mit dem am Institut für Neurobiologie Magdeburg entwickelten Programm.

2.2.5 Reizparameter *in vitro*

Die Hippocampusschnitte wurden für 120 min in physiologischer ACSF-Lösung inkubiert, um eine Adaptation an die experimentellen Bedingungen zu gewährleisten. Danach wurde eine Reizelektrode im Stratum radiatum positioniert. Die genaue Position wurde zunächst unter Sichtkontrolle mit Hilfe eines Stereomikroskopes bestimmt. Die Tetanisierungsparameter zur Auslösung von LTP für den Hippocampusschnitt wurden wie folgt gewählt:

Tetanisierungsfrequenz:	100 Hz
Tetanisierungsdauer:	1000 ms
Impulsbreite:	0,2 ms pro Polarität
Anzahl der Tetanisierungen:	3 x im Abstand von 2 min

2.2.6 Westernblotting

Mit einem scharfen Skalpell wurde die benötigte Region ausgestanzt und in kochenden SDS-Probenpuffer verbracht. Für jeden untersuchten Zeitpunkt wurden drei ausgestanzte CA1-Regionen in 200 µl kochenden SDS-Probenpuffer gegeben, anschließend für 5 min weitergekocht, mit 10.000 g für 10 min zentrifugiert und bei -70°C gefriergelagert. Zur Aufarbeitung der Proben wurden die eingefrorenen Lysate aus dem Gefrierschrank entnommen, um sie zunächst für 5 min bei 90°C zu inkubieren. Nach Zugabe von jeweils 100 µl Probenpuffer und Bestimmung des Proteingehaltes, wurden jeweils gleiche Mengen von ca. 50 µg entsprechend einer Menge von 100 µl Probenprotein von jedem Lysat in der SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese eingesetzt. Dazu wurden die Proben in die Geltaschen verbracht. Anschließend wurde über Nacht die Elektrophorese mit 7 bis 10 mA gestartet. Am nächsten Morgen wurde der Transfer auf Membranen vorbereitet. Dazu wurden zunächst die Filterpapiere und die verwendete Nitrozellulosemembran auf die entsprechende Größe zugeschnitten. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran für 30 min im Anodenpuffer inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Gele aus der Elektrophoresekammer entnommen und für 2 bis 5 min im Anodenpuffer inkubiert. Beim Transfer „blotting“ wurde besonders sorgfältig darauf geachtet, dass jegliche Luftblasenentstehung unterblieb. Zunächst wurden drei Lagen Filterpapier, die zuvor in Anodenpuffer gelegt worden waren, in die Blottingkammer verbracht. Dann wurde die Nitrozellulosemembran aufgelegt. Schließlich wurde das Gel, welches kurz zuvor in den Anodenpuffer gelegt worden war, aufgebracht. Nun schließen sich sechs Lagen Filterpapier an, die ebenfalls mit Anodenpuffer getränkt worden waren, und neun Lagen Filterpapier, die in Kathodenpuffer getränkt waren. Anschließend wurde das Gerät geschlossen und eine Spannung von 0,85 mA/cm² für 2 h angelegt. Danach wurde die Nitrozellulosemembran entnommen und für 2 h in eine 5% ige Magermilchpulverlösung in PBS eingelegt. Anschließend wurde für 30 min in PBS gewaschen. Danach wurde der Primärantikörper gegen pCREB in einer Verdünnung von 1:5000 über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran für 30 min in PBS gewaschen. Anschließend wurde der biotinylierte Sekundärantikörper Ziege-Anti-Kaninchen für 2 h zugesetzt. Dann wurde erneut für 30 min mit PBS gewaschen. Danach wurde die Membran für 1 h

mit ABC-Elite-Lösung inkubiert. Daran schloß sich die Detektion mit Chemilumineszenz an.

2.2.7 Immunhistochemie

Nach unterschiedlichen Zeitpunkten zwischen 5 bis 240 min nach der Tetanisierung, wurden jeweils Gruppen von drei Hippocampuschnitten mit einem feinen Pinsel aus der Meßkammer entnommen und in eine Fixierlösung gegeben, welche 4 % Paraformaldehyd und 0,2 % Pikrinsäure in 0,1 M Phosphat Puffer pH 6,9 enthielt, gegeben. Die entnommenen Hippocampuschnitte wurden über Nacht bei 4°C in Zamboni-Lösung fixiert und anschließend für 2 d in 10 %iger Sucroselösung inkubiert. Anschließend wurden die Hirne mit dem Gefriermikrotom in 30 µm dicke Schnitte geschnitten. Die Schnitte wurden in TPBS aufgefangen und über einen Zeitraum von 10 min gespült. Danach wurden die Schnitte für 30 min in 50 % Ethanol inkubiert. Anschließend wurden sie dreimal mit TPBS mit 0,3 % Triton X-100 und 1% Ziegenserum gespült. Nach einem erneuten Reinigungsschritt mit TPBS, welches wieder zusätzlich 0,3 % Triton-X 100 und 1% Ziegenserum enthielt, wurden die Hippocampuschnitte für 1 h in TPBS mit 0,3 % Triton-X 100 und 3% Ziegenserum inkubiert. Nach der Entnahme der Schnitte aus der „blocking solution“ wurde der Antikörper pCREB in einer Verdünnung von 1:5000, beziehungsweise 1:1000 eingesetzt und die Hippocampuschnitte zwischen 48-96 h inkubiert. Um den Primärantikörper zu detektieren, wurde anschließend die Biotinamplifizierung durchgeführt. Dazu wurde ein biotinylierter Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper für 1-2 h zugesetzt. Daran schloß sich ein Reinigungsschritt mit TPBS + 0,3 % Triton X-100 an. Daraufhin wurden die Schnitte für 60 min in ABC-Elite-Lösung inkubiert. Diese enthielt 25 µl von Reagenz A und 25 µl von Reagenz B in 10 ml TPBS + 0,3% Triton X-100. Anschließend wurden die Schnitte für weitere 20 min in Biotin-Tyramin-Lösung verbracht, welche 10 µl H₂O₂ (5%) in 10 ml TPBS + 0,3 % Triton X-100 enthielt. Nach einem letzten Reinigungsschritt mit TPBS + 0,3 % Triton X-100 folgte der letzte Inkubationsschritt in Streptavidin-Cyanine 3.18 (Cy 3) (Rockland Gilbertsville, PA 1:200 in TPBS + 0,3 % Triton X-100) über Nacht bei 4°C. Nach Beendigung der Färbung wurden die Hippocampuschnitte auf gelatinebeschichtete Objektträger verbracht,

über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und mit DPX eingebettet.

2.2.8 Auswertung der Ergebnisse

Die Auswertung der Hippocampusschnitte erfolgte mit einem konfokalen Lasermikroskop (Leica TCS-NT). Cy 3 wurde mit der Wellenlänge von 561 nm sichtbar gemacht. Die Bilder wurden mit einem 16-fachen Öl-Immersionsobjektiv mit Zoom 1 aufgenommen und mit einem Drucker (Fuji Pictography 3000) mit einer Auflösung von 400 dpi ausgedruckt.

b) *in vivo*

2.2.9 Versuchsvorbereitung

Für die *in vivo* Untersuchungen wurden 8 Wochen alte Wistaratten verwendet. Die Versuchstiere wurden vor dem operativen Eingriff unter kontrollierten Laborhaltungsbedingungen, im vollklimatisierten Stall bei einer Stalltemperatur von $20 \pm 2^\circ\text{C}$ und einem Lichtregime von 12 h Licht, 12 h Dunkelheit und einer Luftfeuchtigkeit von 55 % gehalten. Die Käfige waren mit Nippeltränken und Trockenfütterung ad libitum ausgestattet. Nach dem operativen Eingriff wurden die Tiere in Einzelboxen aus Plexiglas gehalten. Futter und Wasser standen ad libitum zur Verfügung.

2.2.10 Implantation der Reizelektroden

Bei den vorgenommenen operativen Eingriffen an Versuchstieren wurden die ethischen Grundsätze der Deutschen Gesellschaft für die Nutzung von Versuchstieren eingehalten. Um das monosynaptisch-evozierte Feldpotential im Gyrus dentatus nach einer Stimulation des Tractus perforans aufzunehmen, wurden den Tieren bipolare Stimulationselektroden in den ipsilateralen Tractus perforans und eine monopolare Aufnahmeelektrode in das dorsale Blatt des ipsilateralen Gyrus dentatus implantiert. Die Elektro-

den wurden aus polyurethanummantelten Stahldraht mit einem Durchmesser von 125 μm hergestellt. Für diesen Eingriff wurden die Tiere in eine tiefe Narkose gelegt (Pentobarbital 40 mg/ kg i.p.) und in einem stereotaktischen Instrument von der Fa. David Kopf (Tujunga, CA) mit Lambda 1 mm unter dem Bregma eingespannt. An den Koordinaten AP -2,8 mm, lat. 1,8 mm and AP-6.8 mm, lat. 4,1 mm wurden mit einem Dentalbohrer Löcher in die Schädeldecke gebohrt. Die Lokalisation der Bohrlöcher wurde mit Hilfe des Rattenhirnatlas von Paxinos und Watson (1997) bestimmt. Unter elektrophysiologischer Kontrolle wurden die Elektroden plziert. Zu diesem Zweck wurde die bipolare Reiz- und die monopolare Ableitelektrode mit einem Stimulator und einem Verstärker verbunden und in das Gehirn eingeführt. Nach jedem Schritt wurde das evozierte Feldpotential abgeleitet und auf einem Oszillographen dargestellt. Die Elektroden wurden so lange positioniert bis ein optimales Feldpotential registriert werden konnte. Silberdrähte, die an Miniaturschrauben angelötet sind und im Nasalknochen plziert wurden, dienen als Erdungs- und Referenzelektrode. Alle Elektrodendrähte wurden durch die Bohrungen eines 5-poligen und eines 2-poligen flexiblen Kunststoffsockels geführt und zusammen mit diesem, mit Hilfe von Zahnzement (Duracyl, Prag), auf dem Schädelknochen fixiert. Die Wunden wurden nach dem Eingriff mit Sulfonamidpuder bestäubt. Die Tiere erhielten nach dem operativen Eingriff eine Erholungszeit von 10 d, bevor weitere Experimente angeschlossen wurden.

2.2.11 Die Ableitung evozierter Feldpotentiale *in vivo*

Für elektrophysiologische Aufnahmen wurden die Tiere über ein abgeschirmtes Kabel mit einem Stimulator (Modell 2100 A-M System) und einem AC-Verstärker (Frequenzbereich 2 Hz-10 kHz) verbunden. Die Ankopplung erfolgte über einen Drehkontaktkumulator (Swivel) eigener Konstruktion. Dadurch war die Beweglichkeit des Tieres in der Box nicht beeinträchtigt. Eine Interfaceeinheit mit einem Personal-Computer verbunden, durch Software kontrolliert (imc Meßsysteme, Berlin), wurde genutzt, um elektrische Impulse auszulösen. Um evozierte synaptische Potentiale hervorzurufen, wurden acht biphasische Rechteckimpulse mit einer Zeitdauer von 100 μs pro Halbwelle und einer Frequenz von 0,2 Hz erzeugt. Die Feldpotentiale wurden mit einer Auflösung von 100 μs

digitalisiert aufgezeichnet und auf der Festplatte abgespeichert. Die „slope function“ des fEPSP und die Amplitude des Pop-Spikes wurde automatisch aus dem 400 μ s Segment des steilsten Anstiegs des fEPSP und aus der „peak“ zu „peak“ Differenz ermittelt. Langzeitpotenzierung wurde durch die Stimulation des ipsilateralen Tractus perforans mit 20 Impulsgruppen erzeugt. Jede Gruppe umfaßte 15 Pulse, die die gleiche Zeitdauer aufwiesen wie der Testpuls. Die Frequenz innerhalb jeder Impulsgruppe wurde mit 200 Hz für Hochfrequenzstimulation (HFS) oder 0,2 Hz für Niedrigfrequenzstimulation (LFS) bei einem Abstand von 5 s zwischen jeder Gruppe eingestellt. Das Vorliegen von LTP wurde durch die Aufzeichnung von Testpotentialen zu entsprechenden Zeitpunkten dokumentiert. Die Tiere wurden 2 min, 5 min, 30 min, 1 h, 2 h, 6 h und 24 h nach der Tetanisierung aus der Box entnommen, mit einer Chloralhydratnarkose sediert und unverzüglich perfundiert. Für jeden Zeitpunkt wurden Gruppen von 3-6 Tieren analysiert. Eine Gruppe von Tieren wurde mit MK 801 (0,3 mg/kg i.p.) 15 min vor der Tetanisierung behandelt und anschließend ebenfalls transcordial perfundiert.

2.2.12 Reizparameter

Nach dem operativen Eingriff und der sich anschließenden Erholungszeit wurden die Tiere über eine Kabelverbindung mit dem Verstärker verbunden. Die Tetanisierungsparameter zur Auslösung von LTP waren durch folgende Werte gekennzeichnet.

Reizfrequenz: 200 Hz

Impulsrate: 300 ms

Impulsbreite: 0,1 ms / Polarität

Anzahl der Tetanisierungen: 20 Tetanisierungen alle 5 s

Zur Auslösung von LFS wurden folgende Parameter gewählt.

Tetanisierungsfrequenz: 0,2 Hz

Impulsrate:	300 ms
Impulsbreite:	0,1 ms/ Polarität
Anzahl der Tetanisierungen	20 Tetanisierungen alle 5 s

2.2.13 Perfusion

Nachdem die Tiere aus der Plexiglasbox entnommen wurden, erfolgte in unterschiedlichen Zeitabständen nach Beendigung der elektrischen Stimulation die Sedation mit einer Chloralhydratnarkose. Anschließend wurde mit einer chirurgischen Schere zunächst der Brustkorb geöffnet, um das Herz freizupräparieren. Dann wurde mit einem gezielten Schnitt durch alle Herzschichten zunächst die rechte Kammerwand geöffnet. Unmittelbar im Anschluß an diesem Eingriff wurde in gleicher Weise die Öffnung der linken Herzkammer vorgenommen. Dann wurde unter Sichtkontrolle zügig eine Knopfkanüle in die Aorta vorgeschoben und vorsichtig mit Gefäßklemmen in der Aorta fixiert. Anschließend wurden die Ratten transcordial mit einer 50 ml Spritze und ca. 150 ml Tyrode'scher Lösung von Hand perfundiert und anschließend mit 100 ml Zamboni-Lösung fixiert. Weitere 150 ml der Zamboni-Lösung wurde mittels einer Tropfvorrichtung über einen Zeitraum von 30 min langsam perfundiert. Nun wurde nach Durchtrennung der oberen Schädelknochen entlang der Sagittalnaht von dorsal nach ventral die Dura durchtrennt und das Gehirn vorsichtig aus dem Schädel entnommen, für 2 h in Zamboni-Lösung nachfixiert und über Nacht in 30 % iger Sucrose-Lösung bei Kühlschranktemperatur inkubiert.

2.2.14 Immunhistochemie

Am nächsten Tag wurde das Gehirn mit einem Gefriermikrotom geschnitten. Das Rattenhirn wurde dazu mittels Einbettmedium auf den Präpariertisch bei -20°C im „Kryocut“ aufgefroren. Es wurden Coronarschnitte angefertigt. Die erforderliche Schnittdicke wur-

de mit 40 µm festgelegt. Die Gewebeschnitte wurden während des Schneidens in Petrischalen, die mit TPBS gefüllt waren, aufgefangen und konnten darin für einige Tage aufbewahrt werden. Die frei beweglichen Schnitte wurden in TPBS (10 mM Tris, 10 mM Phosphatpuffer, 137 mM NaCl, 0,05 % Thimerosal, pH 7, 4) gereinigt, anschließend für 30 min in Methanol gelagert, dann in 3 % NGS, in TPBS mit 0,3 % Triton-X 100, für 1h inkubiert, danach mit pCREB, CREB beziehungsweise pMAP Antikörper (New England Biolabs Beverley, MA) in einer Verdünnung von 1:1000 für 96 h inkubiert. Um die Detektion des Primärantikörpers zu verbessern, wurde die Biotinamplifizierung gewählt. Dazu wird ein biotinylierter Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (Vector, Burlingame CA; 1:1000 in TPBS, welches 0,3 % Triton X-100 und 1 % normales Ziegenserum enthält) für 1-2 h zugesetzt. Daran schloß sich ein Reinigungsschritt mit TPBS + 0,3 % Triton X-100 an. Nun wurden die Schnitte für 45 min in ABC-Elite-Lösung inkubiert. Diese enthielt 25 µl von Reagenz A und 25 µl von Reagenz B in 10 ml TPBS + 0,3 % Triton X-100. Anschließend wurden die Schnitte für 20 min in Biotin-Tyramin-Lösung (BT Lösung wurde hergestellt wie beschrieben bei Adams 1992) gebracht, welche 10 µl H₂O₂ 5 % in 10 ml TPBS + 0,3 % Triton X-100 enthielt. Nach einem letzten Reinigungsschritt mit TPBS + 0,3% Triton X-100 folgte der letzte Inkubationsschritt mit Streptavidin-Cyanin 3.18 (Cy3) (Amersham, Braunschweig; 1:00 in TPBS und 0,3 % Triton X-100) über Nacht bei 4°C. Nach Beendigung der Färbung wurden die Schnitte auf gelatinebeschichtete Objektträger verbracht, über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und mit DPX-Einbettmedium eingebettet.

2.2.15 Auswertung der Ergebnisse

Die Auswertung der Hippocampuschnitte erfolgte mit einem konfokalen Lasermikroskop (Leica TCS-NT). Cy 3 wurde mit der Wellenlänge von 561 nm sichtbar gemacht. Die Bilder wurden mit einem 2,5 Objektiv mit Zoom 1 aufgenommen und mit einem Farbdrucker (Fuji Pictography 3000) mit einer Auflösung von 400 dpi ausgedruckt.