INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

Vorgelegt von

Derya Robert Shimshek
aus Hamburg

GluR-B: die wichtigste AMPA-Rezeptor-Untereinheit in der Maus

Gutachter: Prof. Dr. Peter H. Seeburg

Prof. Dr. Klaus Unsicker

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbst verfaßt und mich dabei keiner anderen Mittel als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Des Weiteren erkläre ich, daß ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt oder die Dissertation in dieser oder einer anderen Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Heidelberg, 4. Juni 2003

Derya Robert Shimshek

Meinen Eltern gewidmet

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Peter H. Seeburg für die freundliche Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit sowie die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

Dr. Rolf Sprengel danke ich für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit, seine wertvollen Ideen und Anregungen sowie den Freiraum, den er mir in der experimentellen Ausarbeitung dieses Projekts gewährt hat.

Dr. Daniel J. Spergel danke ich für die Zusammenarbeit im Rahmen des GnRH-Projektes. Er führte sämtliche elektrophysiologischen Ableitungen an GnRH-Neuronen durch.

Annette Herold danke ich für ihre experimentellen und menschlichen Unterstützungen.

Juliana Kern danke ich für die großartige Unterstützung bei den Analysen der Schwanzbiopsien.

Thorsten Bus danke ich für seine unermüdliche Hilfe.

Dr. Heinz Krestel danke ich für seine Zusammenarbeit am Epilepsie-Projekt.

Andreas Schäfer und Christiane Zacher danke ich für ihre große Hilfe bei dieser Arbeit.

Rita Pfeffer, Fabia Nano, Axel Erharth, Tina Miucci, Andrea Genthner danke ich für die Hilfe bei der Aufzucht und Organisation der Mäuse.

Dr. Volker Mack und Martina Lang danke ich für die experimentelle Unterstützung bei der Arbeit.

Prof. Dr. Klaus Unsicker danke ich sehr für die Begutachtung meiner Arbeit.

Allen meiner Kollegen danke ich für die freundliche Zusammenarbeit und Unterstüzung.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Beteiligung der L-α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure-Rezeptor (AMPAR)-Untereinheit GluR-B bei Epilepsien, Lernprozessen und Sozialverhalten dokumentiert. Dazu wurden Mäuse mit vorderhirnspezifischer Expression Q/R-uneditierter GluR-B-Untereinheiten und Mäuse ohne GluR-B-Untereinheit im Vorderhirn oder in GnRH-Neuronen untersucht; beides erhöht die Zahl Ca^{2+}-permeabler AMPA-Rezeptoren in entsprechenden neuronalen Populationen.

Die generelle Expression Q/R-uneditierter GluR-B-Untereinheiten (GluR-B(Q)) verursacht epileptische Anfälle mit frühem postnatalen Tod. Durch eine auf das Vorderhirn eingeschränkte GluR-B(Q)-Expression überleben 40 % der betroffenen Mäuse, die weiterhin an spontanen, epileptischen Attacken leiden, welche letztendlich den Tod der Tiere hervorrufen. In Cortex, Amygdala und Hippocampus spontan epileptischer Tiere tritt Astrozytose auf, die im Hippocampus von einer Abnahme Somatostatin- und Parvalbumin-positiver Interneurone begleitet wird. Zusätzlich ist eine erhöhte Neurogenese in der subgranulären Zone des Hippocampus sowie eine Umorganisation der Moosfaserprojektionen in die innere Molekularschicht des Gyrus dentatus zu beobachten. Somit gleichen die anatomischen Veränderungen denen der Temporallappenepilepsie und Mäuse mit Vorderhirn-spezifischer GluR-B(Q)-Expression eignen sich als genetisches Modell für dieses Krankheitsbild. Im Gegensatz zur GluR-B(Q)-induzierten Epilepsie führt ein Vorderhirn-spezifischer GluR-B-Verlust nur zu erhöhtem Angstverhalten, verminderter Motorkoordination, gesteigerter Lokomotion und beeinträchtigter Angstkonditionierung. In Gedächtnistests lernen zwar die Mäuse in kürzerer Zeit zwei Gerüche zu unterscheiden, vergessen diese Unterscheidung allerdings schneller als Kontrolltiere. Wird die funktionelle Deletion des GluR-B-Gens weiter auf hypothalamische Neurone, einschließlich der GnRH-Neurone, eingeschränkt, so ist eine Beeinträchtigung des Sozialverhaltens der Männchen zu beobachten; diese sind verpaarungsunwillig und verteidigen ihre Käfige nicht gegen Eindringlingen, was nicht auf eine veränderte pulsatile GnRH-Freisetzung, sondern wahrscheinlich auf eine gestörte Pheromon-Signalweitergabe zurückzuführen ist.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, daß GluR-B-haltige AMPA-Rezeptoren bei der Ausbildung zahlreicher Gehirnfunktionen beteiligt sind. Durch eingeschränkten GluR-B-Verlust in bestimmten Gehirnregionen lies sich eine direkte Beteiligung von GluR-B in Lern- und Sozial-Verhalten aufzeigen, während die Expression uneditierter GluR-B-Untereinheiten die essentielle Funktion der Editierung zur Aufrechterhaltung ausgeglichener Gehirnaktivität unterstreicht.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung _____ *1*

1.1 Übersicht _____ **1**

1.1.1 Glutamat-gesteuerte Ionenkanäle _____ 2

1.1.2 Modulation synaptischer Erregungsleitung durch AMPAR und NMDAR _____ 3

1.2 Thema der Arbeit _____ **5**

1.2.1 GluR-B: Die wichtigste Untereinheit der AMPAR _____ 5

1.2.2 Neurotoxizität und Epilepsie _____ 6

1.2.3 Olfaktorisches Lernen und olfaktorisches Gedächtnis von Nagern _____ 8

1.2.4 Sexual Verhalten und Fertilität von Nagern _____ 10

1.3 Ziel der Arbeit _____ **11**

2. Ergebnisse _____ *12*

2.1 Regulierte Expression der Cre-Rekombinase im Gehirn der Maus _____ **12**

2.2 Regulierte Expression uneditierter GluR-B(Q)-Untereinheiten im Vorderhirn transgener Mäuse zur Induktion von Epilepsie _____ **15**

2.2.1 Cre-regulierte konditionale Expression von GluR-B(Q) im Gehirn _____ 15

2.2.2 Expression von GluR-B(Q) im Vorderhirn adulter Mäuse führt zu spontanen epileptischen Anfällen _____ 17

2.3 Histologische und biochemische Charakterisierungen von adulten GluR-B(Q)-exprimierenden Mäusen _____ **18**

2.3.1 GluR-B(Q)-Expression führt zu reaktiver Astrozytose in verschiedenen Hirnregionen, aber zur keinem offensichtlichen Verlust pyramidaler Neuronen im Hippocampus _____ 19

2.3.2 Die Untereinheiten GluR-B und NR2A sind reduziert, wohingegen GluR-A und NR1 in adulten GluR-B(Q) Mäusen unverändert sind _____ 21

2.3.3 Verlust von Interneuronen im Hippocampus adulter, epileptischer Mäuse _____ 22

2.3.4 Auftreten umorganisierter Moosfaserprojektionen der Körnerzellen in die innere Molekularschicht des Hippocampus (“mossy fiber sprouting”) in adulten GluR-B(Q)-exprimierenden Mäusen _____ 24

2.3.5 Die Neurogenese in der subgranulären Zellschicht des Hippocampus ist in adulten GluR-B(Q)-exprimierenden Mäuse erhöht _____ 25

2.4 Ausschalten der GluR-B-Untereinheit im Vorderhirn der Maus _____ **28**

2.5 Verhaltensveränderungen bei GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$-Mäusen _____ **29**

2.5.1 Die Vorderhirn-spezifische GluR-B-Deletion führte zu gestörten angstbezogenen Verhaltensweisen im Hell/Dunkel-Test _____ 29

2.5.2 GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$-Mäuse zeigten eine verminderte motorische Koordination im beschleunigten Rotarod-Test _____ 30

2.5.3 Die horizontale Aktivität bzw. die Erkundung einer neuen Umgebung im Offenen-Feld-Test ist bei GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$-Mäusen erhöht 31

2.5.4 Der Vorderhirn-spezifische GluR-B Verlust führt zu einer verminderten Gedächtnisbildung bei passiver Konditionierung 31

2.5.5 Schnelleres und präziseres Unterscheiden verschiedener Geruchsstoffe der GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$-Mäuse im Geruchs-Test 33

2.5.7 Die Effizienz des Erinnerungsvermögens deklarativer Geruchsstoffe ist abhängig von der verbliebenen Menge an GluR-B-Untereinheiten im Gehirn konditionaler GluR-B-Mutanten 36

2.6 Sexualverhalten und GnRH-Sekretion von GluR-B$^{\Delta Hypothalamus}$-Mäusen 38

2.6.1 GluR-B wird in hypothalamischen Neuronen und GnRH-Neuronen exprimiert 38

2.6.2 Männliche GluR-B$^{\Delta Hypothalamus}$-Mäuse zeigten kein verändertes GnRH-Sekretionsprofil 40

2.6.3 Männliche Mäuse mit GluR-B-Verlust in hypothalamischen Zellen und GnRH-Neuronen sind beeinträchtigt in ihrem Paarungs- und Aggressions-Verhalten 41

3. Diskussion 43

3.1 Cre-vermittelte Genmodifikationen in Mäusen 43

3.2 Vorderhirn-spezifische GluR-B(Q)-Expression 43

3.2.1 GluR-B(Q)-Expression bei adulten Mäusen induziert Epilepsie 43

3.2.2 Pyramidenzellen im Hippocampus adulter Mäuse bleiben durch GluR-B(Q)-Expression unverändert 44

3.2.3 GluR-B(Q)-Expression löst reaktive Astrozytose aus 45

3.2.4 GluR-B(Q)-Expression führt zu “Mossy Fiber Sprouting” 46

3.2.5 Die hippokampalen Interneurone sind bei adulten GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen reduziert 47

3.2.6 GluR-B(Q)-Expression führt zu einer erhöhten Neurogenese im Hippocampus 48

3.3 Vorderhirn-spezifische GluR-B-Deletion 49

3.3.1 Der vorderhirnspezifische GluR-B-Verlust führt zu Verhaltensänderungen im Rotarod, offenen Feld, Hell/Dunkel-Test und in der Angstkonditionierung 49

3.3.2 GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$-Mäuse zeigen verbesserte Geruchsdiskriminierung, aber vermindertes Erinnerungsvermögen erlernter Gerüche 50

3.4 Hypothalmaus-spezifische GluR-B-Deletion 51

3.4.1 GluR-B$^{\Delta Hypothalamus}$-Mäuse haben ein unverändertes GnRH-Sekretionsprofil 52

3.4.2 Fehlender Verpaarungswillen und fehlende Aggression charakterisieren männliche GluR-B$^{\Delta Hypothalamus}$-Mäuse 52

3.5 Zusammenfassung 53

4. Material und Methoden 54

4.1 Methoden 54

4.1.1 Genotypisierung der mutantan Mauslinien mittels PCR 54

4.1.2 Isolierung hochmolekularer genomischer DNA 55
4.1.3 Southern Blot 55
4.1.4 Radioaktive Markierung von Sonden und Hybridisierung von Nitrocellulose-Membranen 56
4.1.5 Gesamt-RNA Isolation 56
4.1.6 RT-PCR 56
4.1.7 cDNA-Sequenzierung 57
4.1.8 Protein-Präparation aus Hirngewebe und Proteinkonzentrationsbestimmung 57
4.1.9 Western Blot 57
4.1.10 Anfertigung von Vibratom-Gewebeschnitten des Mausgehirns 58
4.1.11 Anfertigung von Kryostat-Gewebeschnitten des Mausgehirns 58
4.1.12 Anfertigung von Parafin-Gewebeschnitten des Mausgehirns 58
4.1.13 Vorbehandlung von Kryostat- und Vibratom-Gehirnschnitten zur Antigen-Freilegung 59
4.1.14 Immunhistochemische Untersuchungen und Immunfluoreszenz-Markierungen/Doppelmarkierungen von Vibratom- und Kryostat-Gewebeschnitten 59
4.1.15 Timm-Färbung von Kryostat-Schnitten 61
4.1.16 X-Gal Färbung von Vibratom-Gehirnschnitten 61
4.1.17 Hämatoxylin/Eosin- (H/E) von Parafin-Schnitten und Nissl-Färbung von Kryostat-Schnitten 61
4.1.18 Konfokale Mikroskopie 62
4.1.19 BrdU-Applikation 62
4.1.20 Radio-Immuno-Assay 62
4.1.21 Präparation akuter Gehirnschnitte 63
4.1.22 GnRH-Sekretions-Experiment 63
4.1 23 Elektrophysiologische Ableitungen 63
4.1.24 EEG-Aufnahmen von der Maus 64

4.2 Material 65

4.2.1 Mauslinien 65
4.2.2 Sequenzen verwendeter Oligonukleotide (5'-3') 65
4.2.3 Verwendete Antikörper und deren Verdünnungen 66

5. Abkürzungen 67

6. Literaturverzeichnis 70

7. Publikationen 83

1. Einleitung

1.1 Übersicht

Das Gehirn ist ein Netzwerk aus mehr als hundert Milliarden Nervenzellen, die zu Systemen verbunden sind, die die Wahrnehmung der Umwelt ermöglichen, die Aufmerksamkeit fixieren und die Handlungen steuern. Das Zentralenervensystem (ZNS) der Vertebraten hat zwei verschiedene Zelltypen: Nervenzellen und 40-50mal mehr Gliazellen. Die Nervenzellen und deren Fasern übernehmen die Speicherung, Verarbeitung und Weiterleitung von Erregungen bzw. Informationen, während Gliazellen unter anderem als Stützelement dienen und für die Myelinausbildung (elektrisch isolierende Hülle) und die Herstellung der Blut-Hirn-Schranke zuständig sind. Durch zelluläre Kontakte zwischen den Nervenzellen werden schnelle Signalübertragungen, entweder elektrisch über „gap-junctions", im Sinne eines direkten Austauschs von Ionen zwischen Nervenzellen oder chemisch über Neurotransmitter an speziellen Strukturen der Nervenzellen, den Synapsen, ermöglicht. Ankommende Aktionspotentiale bewirken an chemischen Präsynapsen einen Ca^{2+}-Einstrom, der eine Neurotransmitter-Ausschüttung in den synaptischen Spalt hervorruft. Bindung von Neurotransmittern an Rezeptoren in der Postsynapse lösen Potentiale aus, die entweder inhibitorisch, meistens über einen Einstrom von Cl^--Ionen oder exzitatorisch, größtenteils über Na^+-Ionen-Einstrom und Membranpolarisierung, wirken können. Obwohl eine Signalübertragung an chemischen Synapsen mit einer zeitlichen Verzögerung von 0,3 ms stattfindet, besitzen sie den entscheidenden Vorteil, Signale verstärken und abschwächen zu können. Da postynaptische Zellen inhibitorische und exzitatorische Informationen von multiplen präsynaptischen Nervenendigungen empfangen, hängt die Erzeugung eines Aktionspotentials von der räumlichen und zeitlichen Integration solcher Signale ab. Die wichtigsten Neurotransmitter, die an der chemischen Reizweiterleitung beteiligt sind, sind die exzitatorisch wirkende Aminosäure L-Glutamat (Dingledine et al., 1999) und die inhibitorische □-Aminobuttersäure (GABA). Die langsame chemische Reizübertragung erfolgt über eine Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (metabotrop) (Nakanishi, 1992), die wiederum eine intrazelluläre "second messenger" Kaskade auslösen (Fagni et al., 2000). Die schnellere und direkte Form der chemischen Übertragung durch den Neurotransmitter Glutamat wird von ionotropen Glutamat-Rezeptoren, die Bestandteil eines Ionenkanals sind, vermittelt. Die funktionelle Modulation solcher glutamatergen Systeme spielt eine we-

sentliche Rolle bei verschiedenen komplexen Prozessen wie der sensorischen Signalübertragung (Cardozo et al., 1991), den Lernvorgängen (Maren & Baudry, 1995) und der Gedächtnisbildung (Asztely & Gustafsson, 1996).

1.1.1 Glutamat-gesteuerte Ionenkanäle

Die ionotropen Glutamat-Rezeptoren sind liganden-gesteuerte, kationen-selektive Ionenkanäle, die für Na^+-, K^+- und teilweise auch für Ca^{2+}-Ionen permeabel sind (Dingldine et al., 1999). Bei Säugetieren wurden 18 verschiedene Glutamat-Rezeptor-Untereinheiten identifiziert, die entsprechend ihrer Sequenzhomologie und pharmakologischen Eigenschaften in L-□-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure- (AMPA), Kainat- und N-methyl-D-Aspartat- (NMDA) Rezeptoren eingeteilt sind (Dingledine et al., 1999). Eine vierte Familie von Delta-Rezeptoren ist in der Aminosäuresequnez zu 15-25 % mit Glutamat-Rezeptoren verwandt (Sprengel et al., 2001).

Diese Sequenzhomologie - und in einigen Fällen auch eine ähnliche Gen-Struktur (Suchanek et. al., 1995) - deuten auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung der ionotropen Glutamat-Rezeptoren hin. Wie bei anderen ionotropen Rezeptoren, die durch Bindung von Acetylcholin (ACh), GABA oder Glyzin aktiviert werden, verfügen auch die ionotropen Glutamat-Rezeptoren über vier membranständige Domänen. Im Gegensatz dazu besitzen Glutamat-Rezeptoren jedoch nur drei transmembranständige Regionen (M1, M3, und M4) und eine Membranschleife (M2), die an der Bildung der Kanalpore beteiligt ist (Abb.1) und die Ionenselektivität des Rezeptors bestimmt (Hollmann et al., 1994; Kuner et al., 1996).

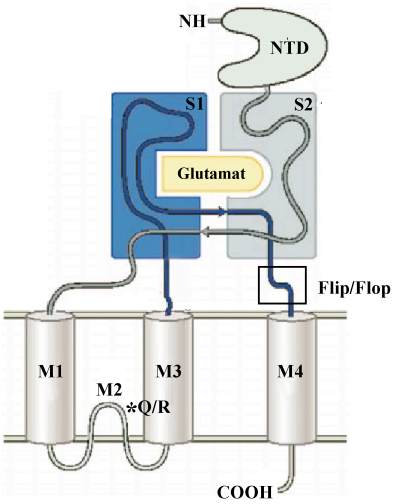

Abb.1: Funktionelle Domänen von Glutamat-Rezeptor-Untereinheiten. Zwischen der Membrandomäne M1 und dem extrazellulären N-Terminus liegt die S1-Domäne, die zusammen mit der Domäne S2, bestehend aus der extrazellulären Schleife zwischen der Transmembrandomäne M3 und M4, die Glutamatbindungsstelle bildet. Die Membranschleife M2 bildet die Kanalpore und beinhaltet die Q/R-Stelle. Die Domäne für die Flip/Flop-Isoform liegt in der extrazellulären Schleife vor der M4-Domäne, die mit einem intrazellulären C-Terminus endet (geändert nach Sun et al., 2002).

Ionotrope Glutamat-Rezeptoren bestehen aus einem langen extrazelluären N-Terminus, der essentiell für die korrekte Assemblierung von Rezeptor Komplexen ist (Ayalon & Stern-Bach 2001) und zusammen mit dem Segment zwischen M3 und M4 (S2) die Glutamatbindungsstelle bildet. Der C-Terminus ist intrazellulär lokalisiert und interagiert mit einer Reihe von Proteinen in der postsynaptischen Spezialisierungsregion, die gerichteten Transport und Lokalisation von Glutamat-Rezeptoren regulieren (Sheng & Sala, 2001; Tomita et al., 2001). Des Weiteren können Phosphorylierungen am C-Terminus Veränderungen der Rezeptoreigenschaft bewirken (Greengard et al., 1991).
AMPA- und Kainat-Rezeptoren weisen eine schnelle Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik (Trussel & Fischbach, 1989) sowie eine in der Regel niedrige Durchlässigkeit für Ca^{2+}-Ionen auf (Jonas & Burnashev, 1995). Eine Ausnahme der Ca^{2+}-Durchlässigkeit bilden AMPA-Rezeptor (AMPAR)-Komplexe in Interneuronen von Hippocampus und Kleinhirn sowie in Bergmann-Glia-Zellen (Wenthold et al., 1996; Liu & Cull-Candy, 2000; Geiger et al, 1995). NMDA-Rezeptoren (NMDAR) besitzen eine langsamere Kinetik mit verzögerter, spannungsabhängiger und langanhaltender Öffnung des Ionenkanals (Lester et al, 1990). Sie vermitteln einen relativ hohen Einstrom von Ca^{2+}-Ionen (MacDermott et al, 1986) und benötigen Glyzin als Koaktivator (Johnson & Ascher, 1987; Mayer & Westbrook, 1987; Ascher & Nowak, 1988; Monaghan et al, 1989).

1.1.2 Modulation synaptischer Erregungsleitung durch AMPAR und NMDAR

Das Zusammenspiel von AMPAR und NMDAR stellt eine grundlegende Komponente aktivitätsabhängiger, synaptischer Modulation dar (Abb. 2). In den meisten erregenden Synapsen des ZNS sind AMPAR und NMDAR kolokalisiert. Die Freisetzung von L-Glutamat in den synaptischen Spalt und die darauf folgende Glutamatbindung an der Postsynapse aktiviert schnelle AMPAR, die durch Na^{+}-Ioneneinstrom und K^{+}-Ionenausstrom die postsynaptische Membran depolarisieren. Beim Ruhepotential von -65mV bleiben NMDAR trotz Glutamat- und Glyzin-Bindung geschlossen, da deren Kanalpore von Mg^{2+}-Ionen blockiert wird. Erst die Membrandepolarisation führt zu einer Auflösung der spannungsabhängigen Magnesiumblockade und öffnet die langsameren NMDAR, die deshalb als Koinzidenz-Detektoren prä- und postsynaptischer Aktivität fungieren können (Abb. 2) (Mayer & Wesbrook, 1987; Stern et al., 1992; Bliss & Collingridge, 1993). Die Öffnung der NMDAR führt zum Einstrom von Na^{+}- und Ca^{2+}-Ionen sowie zum Ausstrom von K^{+}-Ionen, wodurch eine weitere Depolarisation der Membran bewirkt wird. Auch führt der durch den NMDAR

vermittelten Ioneneinstrom zu einem lokalen Anstieg der Ca^{2+}-Konzentration in der Postsynapse, wodurch es zur Aktivierung Ca^{2+}-abhängiger "second messenger"-Signalkaskaden kommt (Bading & Greenberg, 1991; Bading et al., 1993). Dieser Prozeß gilt als Grundlage für eine aktivitätsabhängige synaptische Modulation (Bliss & Collingridge, 1993).

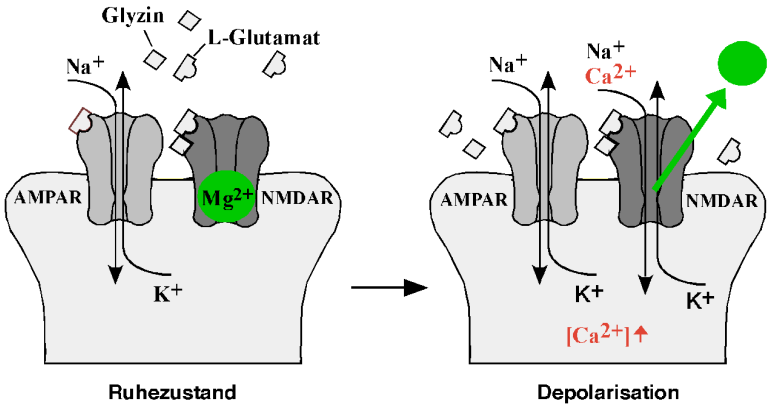

Abb. 2: Koinzidenz-Detektion durch den NMDAR. Modell des funktionellen Prinzips einer glutamatergen Synapse mit kolokalisierten AMPAR und NMDAR in der postsynaptischen Membran im Ruhezustand und nach Membrandepolarisation (Depolarisation). Bei einem Ruhepotential von -65mV ist der NMDAR durch Mg^{2+}-Ionen blockiert. Bei ausreichender Glutamat-Ausschüttung führt eine AMPAR-Aktivierung zur Depolarisation der postsynaptischen Membran und anschließender Aufhebung der NMDAR-Blockade durch das Verlassen des Mg^{2+}-Ions aus der Kanalpore. Glutamat und Glyzin können nun den Ioneneinstrom durch den NMDAR auslösen.

Das bestuntersuchte experimentelle Modell für die Modulation synaptischer Effizienz ist die NMDAR-abhängige Langzeitpotenzierung (LTP) der synaptischen Transmission. Diese aktivitätsabhängige Änderung der synaptischen Effizienz als Mechanismus zur Speicherung neuronaler Information könnte bestimmten Formen des Lernens und der Erinnerung zugrunde liegen. Studien ergaben, daß repetitive Aktivierung erregender Synapsen im Hippocampus, einer für Lernen und Erinnerung wichtigen Gehirnregion, zu einer anhaltenden Steigerung synaptischer Effizienz führt (Bliss & Lomo, 1973). Über die möglichen Mechanismen zur Etablierung von LTP gibt es unterschiedliche Annahmen. Diskutiert wird die Veränderung der präsynaptischen Transmitterfreisetzung (Engert et al., 1999), der Anzahl synaptischer Verbindungen (Choi et al., 2000) oder der postsynaptischen Rezeptorantwort (Shi et al., 1999; Zhu et al., 2000; Hayashi et al., 2000). Letzteres wird auf eine verstärkte postsynaptische AMPAR-Antwort nach Glutamat-Stimulation zurückgeführt bedingt durch Phosphorylierung der AMPAR (Song & Huganir, 2002; Barria et al., 1997a; Lee et al.,

1998) oder Transport von AMPAR in die Synapse (Shi et al., 1999; Zhu et al., 2000; Hayashi et al., 2000).

1.2 Thema der Arbeit

1.2.1 GluR-B: Die wichtigste Untereinheit der AMPAR

Im ZNS von Säugetieren werden schnelle, synaptische Erregungsleitungen vornehmlich von AMPAR vermittelt. Die vermutlich tetramere Struktur von AMPAR (Mano & Teichberg, 1998; Rosenmund et al, 1998) kann von vier verschiedenen Untereinheiten gebildet werden: GluR-A bis -D (Keinänen et al., 1990) bzw. GluR1 bis 4 (Boulter et al., 1990). Jede dieser Untereinheiten kommt in zwei alternativ gespleißten Formen mit unterschiedlichen Desensitisierungs-Kinetiken vor, die mit "Flop" und "Flip" bezeichnet werden. Die Flip-Isoform wird in allen Entwicklungsstadien exprimiert, während die Expressionshöhe der Flop-Isoform im Laufe der Entwicklung des Gehirns zunimmt (Monyer et al., 1991). In *in vitro*-Studien an heterologen Zellkultursystemen konnte gezeigt werden, daß AMPAR-Untereinheiten sowohl homooligomere als auch mit anderen AMPAR-Untereinheiten heterooligomere Kanäle bilden können (Keinänen et al., 1990; Sommer et al., 1990). Die Rezeptor-Assemblierung erfolgt vermutlich über die Zwischenstufe von Dimeren, die sich zu symmetrischen Tetrameren verbinden (Ayalon & Stern-Bach, 2001; Mansour et al., 2001).

Durch eine Inkorporation der GluR-B-Untereinheit in den AMPAR-Komplex wird die Einzellkanal-Leitfähigkeit reduziert und die Duchlässigkeit für Mg^{2+}- und Ca^{2+}-Ionen nahezu vollständig aufgehoben (Hume et al., 1991; Hollmann et al., 1991; Verdoorn et al., 1991; Dingledine et al., 1999). Diese Impermeabilität von bivalenten Ionen wird durch die Aminosäure Arginin (R) an Position 587 (R587) in der Kanalpore der Membranschleife M2 bestimmt, die sogenannte Q/R-Stelle (Abb. 1). Im Gegensatz zu GluR-B besitzen die anderen Rezeptor-Untereinheiten an dieser Position die Aminosäure Glutamin (Q), die eine Ca^{2+}-Permeabilität zulässt. Interessanterweise ist R587 der GluR-B-Untereinheit nicht auf dem Genom codiert, sondern wird durch einen der seltenen, bekannten Fälle von RNA-Editierung eingeführt (Sommer et al., 1991). Hierbei ensteht durch hydrolytische Desaminierung am Purinring des Adenosins in der Codon-Sequenz von Glutamin ein Inosin, das von den RNA-abhängigen RNA-Polymerasen wie Guanosin gelesen wird. Dies führt zu einer Veränderung des Codons von Glutamin (CAG) zu Arginin (CGG) in der RNA. Diese

Editierung wird durch doppel-strängige, RNA-bindende Adenosin-Desaminasen (ADAR) durchgeführt; sie findet im Zellkern statt und geht dem RNA-Spleißen voraus. ADAR erkennen das zu editierende Adenosin als Teil einer dsRNA-Struktur, die zwischen der Editierungsstelle und dessen komplementären Sequenz (ECS) gebildet wird (Higuchi et al., 1993). Die ECS folgt dem proximalen Teil des Introns, der eine Haarnadelstruktur ausbildet. Sie ist exakt komplementär zu der exonischen Sequenz mit dem uneditierten CAG-Codon. Somit können Zellen durch die Expression der dominanten GluR-B-Untereinheit die Ca^{2+}-Permeabilität ihrer AMPAR kontrollieren (Burnashev et al., 1992; Jonas et al., 1994). Die meisten Neuronen, die an der direkten Erregungsweiterleitung beteiligt sind, exprimieren Ca^{2+}-impermeable AMPAR, wohingegen inhibitorische Interneurone Ca^{2+}-permeable AMPAR besitzen.

Durch Untersuchungen an genetisch-veränderten Mäusen konnte gezeigt werden, daß die AMPAR-Untereinheit GluR-B eine essentielle Rolle in der Entwicklung und Funktion des Gehirns einimmt. Mäuse mit einem Inaktivierten GluR-B-Gen zeigten starke phänotypische Ausprägungen, wie reduzierte Körpergröße und Gewicht, erhöhte Sterblichkeit, geringere Motorkoordination und explorative Aktivität, sowie eine erhöhte Langzeit-Potentzierung an Schaffer-Kollateral/CA1-Synapsen und erhöhte Ca^{2+}-Permeabilität in Pyramidalzellen des Hippocampus (Jia et al., 1996; Gerlai et al., 1998). Die Ca^{2+}-Undurchlässigkeit der GluR-B Untereinheit kann durch eine Punktmutation an der Q/R-Stelle in der Kanalpore aufgehoben werden. Eine ubiquitäre neonatale Expression dieser Punktmutation in der Maus löst epileptische Anfälle aus, die zum frühen Tod führen (Brusa et al., 1996; Feldmayer et al., 1999).

Diese Befunde zeigen, daß die Untereinheit GluR-B in der Regulation der Ca^{2+}-Permeabilität und der normalen Gehirnfunktionen eine entscheidene Rolle spielt. Durch spezifisches Ausschalten und Modifizieren der GluR-B Untereinheit in bestimmten Bereichen des Gehirns sind zusätzlich wichtige Einblicke in die Funktionsweisen dieser AMPAR-Untereinheit im Gehirn zu erwarten. Dabei wurden verstärkt Untersuchungen in den Bereichen Epilepsie/Neurotoxizität, olfaktorisches Lernen/Gedächtnis und sexual Verhalten/Reproduktion unternommen.

1.2.2 Neurotoxizität und Epilepsie

Epilepsien beruhen auf Störungen in der neuronalen Erregbarkeit des ZNS. Das Gleichgewicht der Kommunikation zwischen den Neuronen wird durch ein Zusammenspiel exzita-

torischer und inhibitorischer Systeme aufrechterhalten. Eine erhöhte Exzitation stört ebenso wie eine verringerte Inhibition dieses Gleichgewicht und kann epileptische Anfälle auslösen. Wie bereits beschrieben, sind Liganden-gesteuerte Ionenkanäle für die Reizweiterleitung zwischen Neuronen verantwortlich. Ionenkanal-Fehlfunktionen, hervorgerufen durch Mutationen, können sich somit direkt auf die Erregbarkeit des Gehirns auswirken und Epilepsien hervorrufen. Zu diesen sogennanten "Kanalopathien" gehören Mutationen in den neuronalen nicotinischen Acetylcholin- (Steinlein et al., 1995), $GABA_A$-Rezeptoren (Wallace et al., 2001), Kalium- (Singh et al., 1998; Lerche et al., 1999) und Natrium-Kanälen (Kearney et al., 2001). Eine Punktmutation an der Q/R-Stelle in der Kanalpore der GluR-B-Untereinheit, die zur Ca^{2+}-Permeabilität dieser Untereinheit führt, löst neonatal epileptische Anfälle mit Todesursache bei der Maus aus (Brusa et al., 1996; Feldmayer et al., 1999). Anhand von Studien an Ratten und Mäusen, mit Pilocarpin- und Kainat-induziertem Status epilepticuse wurde postuliert, daß ein erhöhter Ca^{2+}-Einstrom zu neurodegenerativen Schädigungen des Gehirns beiträgt (Choi, 1990; Dingledine et al, 1990; Siesjo, 1989; Siesjo et al., 1989). Eine Störung der Ca^{2+}-Homöostase in Neuronen kann zur Überaktivierung Ca^{2+}-abhängiger Prozesse, wie Aktivierung von Enzymen (z.B. Proteasen, Lipasen, Endonucleasen) und andere metabolische Mechanismen führen, die direkt oder indirekt über toxische Reaktionsprodukte den Zelltod auslösen (Sattler & Tamiyanski, 2000).

Die "GluR-B-Hypothese" (Pollard et al., 1993; Friedman et al., 1994; 1997) besagt, das eine erhöhte spezifische Reizung bzw. neuronale Beschädigung zu einer Verminderten GluR-B Expression und dementsprechend zu Formationen von Ca^{2+}-permeablen AMPARs führt. Somit hätten endogene Glutamat-Konzentrationen eine toxische Wirkung (Rotman & Olney, 1986; Sattler & Tamiyanski, 2000). Bei jungen Ratten, die empfindlich gegenüber spontanen Anfällen, aber resistent gegenüber Kainat-induzierten Hirnschädigungen waren (Sanchez et al., 2001; Friedman et al., 1997; Holmes & Thompson, 1988), beobachtete man nach Kainat-Applikation eine konstante hippokampale GluR-B-Expression, die verantwortlich für das Überleben der Neuronen sein könnte (Friedman et al., 1997). Bei älteren Tieren aber führt Satus epilepticus zu einer Deregulation von GluR-B in pyramidalen Neuronen und zum Zelltod hippokampaler Neuronen (Grooms et al., 2000). Somit hätte die Formation Ca^{2+}-permeabler AMPAR eine Schlüsselrolle bei neurodegenerativen Mechanismen inne.

1.2.3 Olfaktorisches Lernen und olfaktorisches Gedächtnis von Nagern

Zahlreiche Untersuchungen zeigen, daß Körnerzellen des Bulbus olfactorius GluR-B exprimieren (Sassoe-Pognetto & Ottersen, 2000; Jardemark et al., 1997; Petralia & Wenthold, 1992; Wenthold, 1992) und AMPAR sowie NMDAR an der Neurotransmission im Bulbus olfactorius beteiligt sind (Isaacson & Strowbridge, 1998; Schoppa & Westbrook, 2002; Schoppa et al., 1998; Isaacson, 1999; Sassoe-Pognetto & Ottersen, 2000). Somit könnte eine Veränderung der AMPAR-bedingten Neurotransmission durch eine GluR-B-Deletion im Bulbus olfactorius Auswirkungen auf die Reizweiterleitung und/oder Verarbeitung von Geruchsinformationen haben.

Das Riech- oder olfaktorische System ermöglicht den Organsimen die Erkennung und Diskriminierung tausender luftlöslicher, chemischer Substanzen. Zwei olfaktorische Systeme sind fast bei allen Tieren ausgebildet. Das erste, das allgemeine olfaktorische System, ist der Umweltsensor, der den Tieren ermöglicht Nahrung zu finden und Territorien zu markieren. Das zweite, das vomeronasale System, ist auf die Erkennung von speziesspezifischen olfaktorischen Geschlechts-Signalen, den Pheromonen, spezialisiert, die Informationen wie Empfänglichkeit und Verfügbarkeit, aber auch soziale Verhaltensweisen, wie bspw. Aggression und Zitzensaugen, beinhalten.

Das Riech-Epithel enthält einige Millionen olfaktorisch-sensorische Neurone (OSN), die eine Lebensspanne von Wochen bis Monaten haben und im adulten Leben durch Proliferation von Stammzellen ständig erneuert werden. Im Säugetiergenom wurden ungefähr 1000 Gene, eine für das Riech-System spezifischen großen Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) in den OSN (Buck & Axel, 1991; Mombaerts, 1999a, b), die für Geruchsrezeptoren kodieren, entdeckt.

Die OSN sind bipolare Neurone mit zur Gewebsoberfläche reichenden Dendriten, die dort 20-30 feine Zilien ausbilden, und zum Bulbus olfactorius projezierenden Axone. Verschiedene molekular-genetische Studien an transgenen Mäusen ergaben, daß alle Neuronen, die den gleichen Rezeptor exprimieren unabhängig ihrer Lokalisation auf einen oder wenige Glomeruli im Bulbus olfactorius projezieren. Es existieren ungefähr 1800 sphärische Glomeruli im Bulbus olfactorius. Sie bestehen aus den Axonen der OSN und den Dendriten von Mitralzellen, die sich dort zu neuronalen Verknüpfungen verbinden (Abb. 3A). Die ankommende Information von den OSN wird von Mitralzellaxonen, modifiziert durch inhibitorische Körnerzellen, über den lateralen olfaktorischen Trakt zu verschiedenen höheren Gehirnregionen, wie dem piriformen Cortex, der Amygdala und dem entorhinalen Cortex

und letztendlich dem Neocortex weitergeleitet (Abb. 3B). Diese reziproke Inhibition von Mitralzellen durch Körnerzellen ist anscheinend AMPAR- und NMDAR-abhängig (Isaacson & Strowbridge, 1998; Schoppa et al., 1998; Sassoe-Pognetto & Ottersen, 2000). Zusätzliche Regulationsfunktionen im Bulbus olfactorius übernehmen die Periglomerular- und "tufted"-Zellen (für eine Übersicht: Firestein, 2001; Mombaerts, 2001). Die Information der Pheromone vom vomeronasalen System wiederum wird über den akzessorischen Bulbus olfactorius und der Amygdala weitergegeben und endet im Hypothalamus (Rodriguez, 2003).

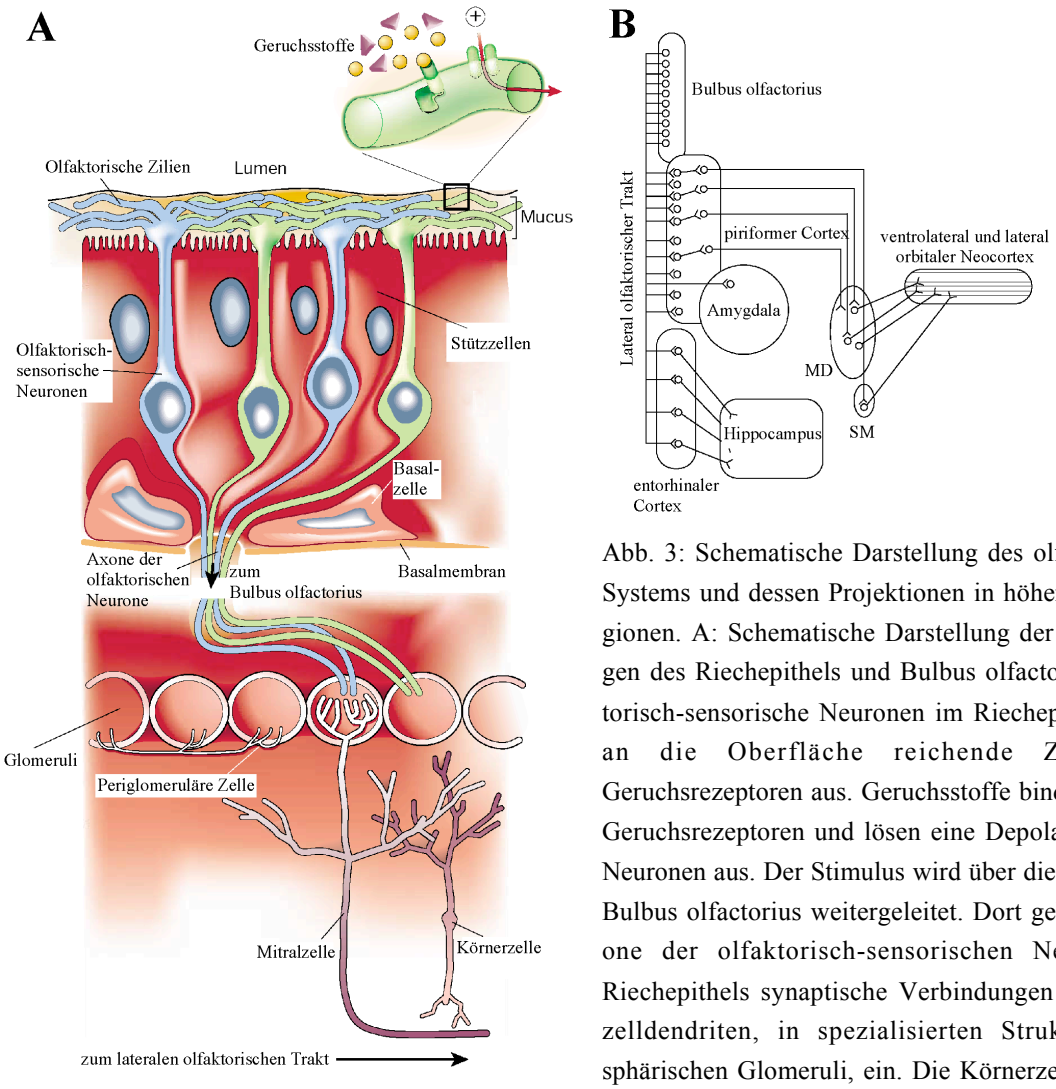

Abb. 3: Schematische Darstellung des olfaktorischen Systems und dessen Projektionen in höhere Gehirnregionen. A: Schematische Darstellung der Verbindungen des Riechepithels und Bulbus olfactorius. Olfaktorisch-sensorische Neuronen im Riechepithel bilden an die Oberfläche reichende Zilien mit Geruchsrezeptoren aus. Geruchsstoffe binden an diese Geruchsrezeptoren und lösen eine Depolarisation der Neuronen aus. Der Stimulus wird über die Axone zum Bulbus olfactorius weitergeleitet. Dort gehen die Axone der olfaktorisch-sensorischen Neurone des Riechepithels synaptische Verbindungen mit Mitralzelldendriten, in spezialisierten Strukturen, den sphärischen Glomeruli, ein. Die Körnerzellen, synaptisch mit Mitralzellen verbunden, nehmen inhibitorische Funktionen ein. B: Schematische Darstellung der Mitralzell-Projektionen in höhere Gehirnregionen. Mitralzellaxone projizieren über den lateralen olfaktorischen Trakt auf den entorhinalen Cortex, die Amygdala und den piriformen Cortex. Diese wiederum stehen in Verbindung mit anderen Hirnregionen, wie z.B. dem Hippocampus, den mediodorsalen (MD) und submedialen (SM) thalamischen Nucleii und dem orbitalen Cortex (Abb. 4A: entnommen aus Firestein, 2001 und modifiziert; Abb. 4B: entnommen aus Slotnick, 2001 und modifiziert).

1.2.4 Sexual Verhalten und Fertilität von Nagern

Eine wichtige Rolle in der sexuellen Entwicklung und Fortpflanzung spielen die Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)-Neurone. Sie stellen eine kleine Gruppe (ungefähr 800 GnRH-Neurone) verstreuter neurosekretorischer Zellen im Hypothalamus dar, und zwar hauptsächlich in der Area praeoptica (APO), im diagonalen Band von Broca (Bandaletta diagonalis, DBB) sowie in den Nuclei septales (Ronnekleiv et al., 1989; Silverman et al., 1994; Sagrillo et al., 1996), die das Decapeptid GnRH synthetisieren (Lopez et al., 1998) (Abb. 4). Die GnRH-Neurone entstammen dem Epithel der olfaktorischen Plakode, einer Struktur außerhalb der Gehirnanlage. Während der späten Embryogenese wandern die GnRH-Neurone, untereinander synaptisch verbunden, von der Nasenanlage in den Hypothalamus durch das nasale Septum entlang der terminalen und vomeronasalen Äste des Nervus olfactorius in das sich entwickelnde Großhirn (Schwanzel-Fukuda und Pfaff, 1989, Wray et al., 1989, Schwanzel-Fukuda et al., 1992, Wray und Hoffman, 1986; Wu et al., 1997). Das Decapeptid GnRH dient als übergeordnete Regulationsinstanz für die hormonelle Achse zur Steuerung der Gonadenfunktion. Mit den Anfängen der Pubertät von Nagern wird von den Axonenden der GnRH-Neuronen im Rythmus von ungefähr 30 min GnRH in die Portalvene der Eminentia mediana (EM; Levine und Ramirez, 1982; Hayes und Crowly, Jr., 1998; Rasmussen, 1993) und in das Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT) (Sagrillo et al., 1996; Yen, 1991; Bloom, 1991) entlassen. Diese pulsatile Sekretion, die vielfältigen Einflüssen durch Afferenzen an den GnRH-Neuronen unterliegt, ist für den Erhalt der Fortpflanzungsfähigkeit essentiell (Sagrillo et al., 1996; Yen, 1991; Bloom, 1991).

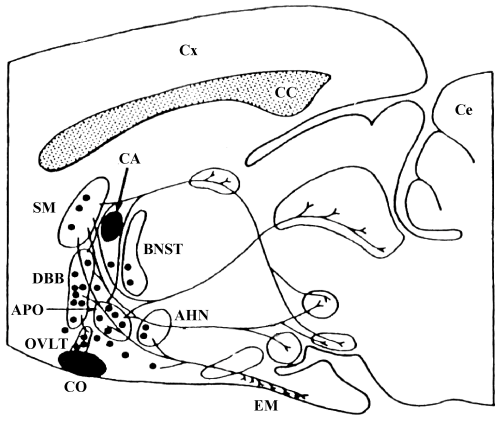

Abb.4: Vereinfachte schematische Darstellung eines Parasagittalschnittes der Ratte, welche die Verteilung der GnRH-Perikaryen, die wichtigsten Projektionen zur Eminentia mediana (EM) und zum Organum vasculum laminae terminales (OVLT) illustriert. CO: Chiasma opticum; APO: Area preoptica; DBB: Diagonales Band von Broca; NHA: Nucleus hypothalamicus anterior; BNST: Regio nuclei striati terminalis; AC: Commissura anterior; SM: Septum Medialis; CC: Corpus callosum; Ce: Cerebellum; Cx: Cortex; (entnommen aus: Sagrillo et al., 1996).

Von der EM wird das GnRH-Peptid über das Blut durch die hypothalamisch-hypophysären Portalgefäße in die Adenohypophyse transportiert und kontrolliert dort über die Aktivierung von GnRH-Rezeptoren die Ausschüttung des follikelstimulierenden Hormons (FSH) und des luteinisierenden Hormons (LH) (Sagrillo et al., 1996; Yen, 1991; Bloom, 1991), die ihrerseits über den Blutkreislauf auf Hoden bzw. Ovarien und Gebärmutterepithel einwirken und so die sexuelle Reproduktion steuern.

In einer autosomal rezessiven Mutation des GnRH-Gens kommt es in der hypogonadalen (hpg) Maus zu einem Ausfall der GnRH-Ausschüttung in der Hypophyse und zu einem Unterbleiben der Entwicklung von Testes und Ovarien (Mason et al., 1986a). Durch Gentherapie, Zugabe des intakten GnRH-Gens, konnte dieser Phänotyp aufgehoben werden (Mason et al., 1986b).

In-situ-Hybridisierungen (van der Pol et al., 1994) und immunzytochemische Analysen (Petralia & Wenthold, 1992) zeigten eine breite Verteilung der AMPAR-Untereinheiten GluR-A und GluR-B in hypothalamischen Regionen von Nagern, wobei elektrophysiologische Untersuchungen AMPAR-vermittelte Ströme in GnRH-Neuronen zeigten (Spergel et al., 1999; Kuehl-Kovarik et al., 2002). Weitere Studien zeigten, daß die pulsatile Neuropeptid-Sekretion der GnRH-Neurone intrinsische Eigenschaften hat und abhängig ist vom Ca^{2+}-Einstrom (Krsmanovic et al., 1992; Rasmussen, 1993). Es wird vermutet, daß Glutamat und dessen Rezeptoren an der GnRH-Sekretion beteiligt sind, da Glutamat-abhängige, AMPAR-vermittelte, Ca^{2+}-modulierte GnRH-Ausschüttungen beobachtet wurden (Spergel et al., 1994; Gore et al., 1996).

1.3 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit hat die Beteiligung der AMPAR-Untereinheit GluR-B in der von AMPAR vermittelten Reizweiterleitung in adulten Gehirnen der Maus bei der Ausbildung korrekter Gehirnfunktion, Aufrechterhaltung der Homöostase von Gehirnaktivitäten, Etablierung von Gedächtnis- und sozialem Verhalten und verschiedener Lernformen zum Gegenstand. Untersucht wurden Mäuse mit Ca^{2+}-permeablen AMPAR im Vorderhirn der Maus durch gehirnspezifische Deletion der GluR-B-Untereinheit und Expression uneditierter GluR-B(Q).

2. Ergebnisse

2.1 Regulierte Expression der Cre-Rekombinase im Gehirn der Maus

Für zeitlich und räumlich begrenzte Gen-Deletionen und -Modifikationen, wurde das Cre-loxP-System verwendet (Sauer und Henderson, 1988; 1989; Akagi et al., 1997; Sauer, 1998). Mittels spezifischer Promotoren wurde die Cre-Rekombinase (Cre) in verschiedenen Zellpopulationen des Gehirns exprimiert. Diese Spezifität der Cre-Expression wurde durch αCamKII-Promoter- und GnRH-Promoter-Fragmente bewerkstelligt. Verschiedene transgene Mauslinien ($Tg^{sCam.Cre2}$, $Tg^{sCam.Cre3}$ und $Tg^{Cam.Cre4}$ [Tg^{Cre4}]: Mantamadiotis et al., 2002) mit unterschiedlichen αCamKII-Promoterlängen, 8000 bp bzw. 400 bp, wurden generiert. Die $Tg^{sCam.Cre2}$- und $Tg^{sCam.Cre3}$-Linien exprimieren Cre unter der Kontrolle eines 400 bp langen αCamKII-Promoterfragments, während die Tg^{Cre4}-Linie ein 8000 bp langes αCamKII-Promoterfragment besitzt (Mantamadiotis et al., 2002). Die Mauslinie $Tg^{GnRH.iCre}$ (Tg^{GniCre}) exprimiert Cre unter der Kontrolle des 3500 bp langen GnRH-Promoterfragments (Shimshek et. al, 2002).

Zur Untersuchung der Cre-Expression und -Aktivität von diesen vier Mauslinien wurden Cre-Indikator-Mäuse, die das β-Galaktosidase Gen und eine vorgeschaltete, loxP-flankierte Transkriptionsstop-Kassette im Rosa26-Lokus besitzen ($Rosa26^{R26R}$: Soriano et al, 1999), benutzt. Bei Cre-Aktivität wird die Stop-Kassette entfernt und das β-Galaktosidase-Gen exprimiert. Durch eine X-Gal-Färbung und eine histologische Untersuchung mit gegen Cre gerichtetem Antikörper war eine Bestimmung der Cre-Expression und -Aktivität möglich.

Bei adulten Mäusen der Linien $Tg^{sCam.Cre2}$, $Tg^{sCam.Cre3}$ und Tg^{Cre4} wurden unterschiedliche Expressionsmuster beobachtet (Abb. 1A). Die $Tg^{sCam.Cre2}$- und Tg^{Cre4}-Linien zeigten eine auf das Vorderhirn beschränkte Cre-Aktivität; im Hirnstamm wurde jeweils keine beobachtet. Trotz Cre-Aktivität konnte kein Cre-Protein bei der $Tg^{sCam.Cre2}$-Linie festgestellt werden, wohingegen bei der $Tg^{sCam.Cre3}$-Linie eine Cre-Aktivität sowohl im Vorderhirn als auch im Hirnstamm nachgewiesen werden konnte. In Mitral- und Körnerzellen des Bulbus olfactorius von Tg^{Cre4}-Mäusen trat eine starke Cre-Expression und -Aktivität auf (Abb. 1B).

In adulten Mäusen der Linie $Tg^{GniCre}/Rosa26^{R26R}$ wurden Cre-Aktivitäten im Hypothalamus, speziell dem diagonalen Band von Broca (DBB), Area preoptica (APO), Septum medialis (SM), Septum lateralis (SL) und Regio nuclei striati terminalis (RNST) (Shimshek et al.,

2002), aber auch in der Amygdala detektiert. Eine Cre-Expression im Bulbus olfactorius konnte nicht festgestellt werden.

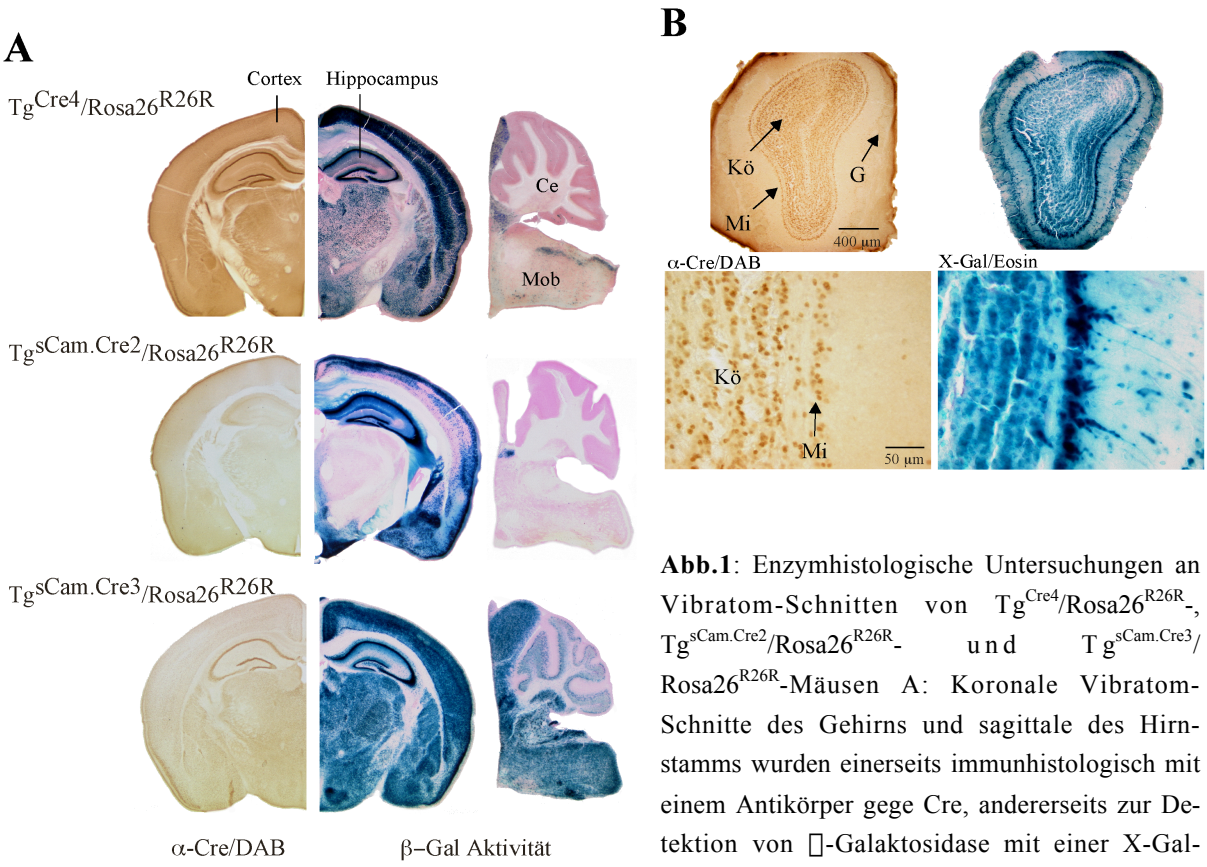

Abb.1: Enzymhistologische Untersuchungen an Vibratom-Schnitten von $Tg^{Cre4}/Rosa26^{R26R}$-, $Tg^{sCam.Cre2}/Rosa26^{R26R}$- und $Tg^{sCam.Cre3}/Rosa26^{R26R}$-Mäusen A: Koronale Vibratom-Schnitte des Gehirns und sagittale des Hirnstamms wurden einerseits immunhistologisch mit einem Antikörper gege Cre, andererseits zur Detektion von β-Galaktosidase mit einer X-Gal-Färbelösung behandelt. B: Koronale Vibratom-Schnitte des Bulbus olfactorius von $Tg^{Cre4}/Rosa26^{R26R}$-Mäusen wurden behandelt wie in A. Ce: Cerebellum; Mob: Medulla oblongata; Kö: Körnerzellschicht; Mi; Mitralzellschicht; G: Glomeruli

Bei Analysen mehrerer $Tg^{Cre4}/Rosa26^{R26R}$-Mäuse wurden in verschiedenen Mäusen unterschiedliche Cre-Expressionsmuster festgestellt (Abb. 2A). In einigen Mäusen begann die Cre-Expression ab dem postnatalen (P) Tag 12 und namm dann während der Entwicklung zu, während in anderen eine frühzeitigere Cre-Expression vor P12 eintrat. Durch Rückkreuzungen der Geschwister war es nicht möglich, eine Aufspaltung der Expressionsmuster herbeizuführen. In Southernblots von genomischer DNA aus 20 Tg^{Cre4}-Mäusen wurden die Transgenintegration mit Sonden gegen den αCamKII-Promoter analysiert (Abb. 2B). Die genomische DNA wurde hierfür mit dem Restriktionsenzym BglII verdaut. Es wurden zwei Sonden eingesetzt. Die eine 320 bp lange "copy"-Sonde, die intern, zwischen zwei BglII-Schnittstellen liegt, detektiert die Kopienanzahl des Transgens; die Wildtyp-Bande ist 2283 bp groß, während die Cre4 noch eine zusätzliche Bande des Transgens bei 1988 bp

hat. Eine semi-quantitative Auswertung ergab eine Anzahl von ungefähr vier Transgenen (Abb. 2C). Die andere (320 bp lange Sonde "integ") liegt 5'-aufwärts der letzten 5'-gelegenen BglII-Schnittstelle und gibt das Integrationsmuster wie auch die Anzahl der Integrationskopien der Tg^{Cre4}-Linie wieder. Im Wildtyp ist eine Bande bei 4500 bp zu sehen. Tg^{Cre4}-Mäuse mit verschiedenen Expressionsmustern zeigten weder Unterschiede in der Transgenintegration noch im Integrationsmuster des Transgens; zusätzlich zum Wildtyp wurden noch vier weitere Banden bei 7000 bp, 5000 bp, 3000 bp und 2000 bp detektiert (Abb. 2C), was wiederum auf eine 4-fache Integration des Transgens hindeutet.

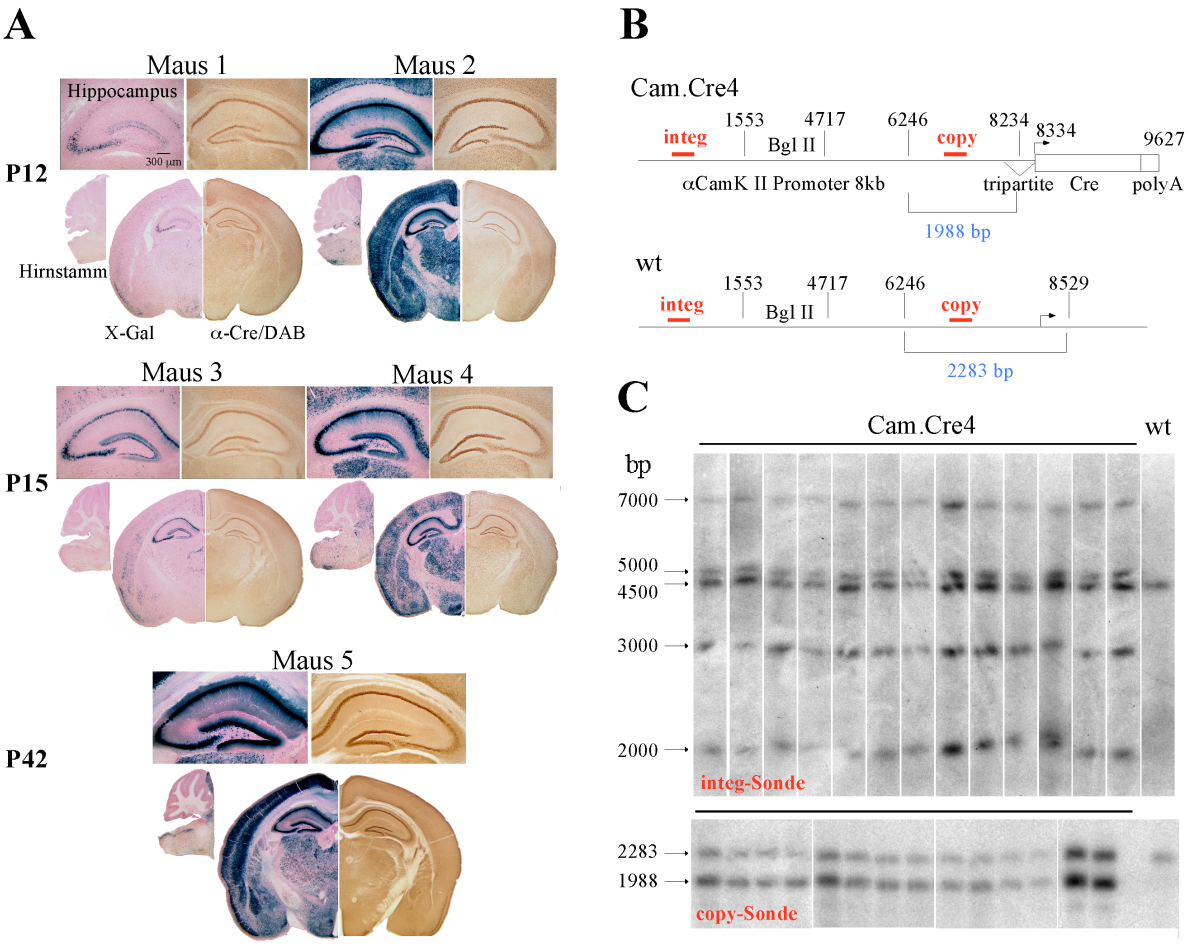

Abb. 2: Srategie und Analyse der Cre-Expressionsmuster von Tg^{Cre4}-Mäusen. A: Histologische Untersuchungen koronaler Vibratom-Schnitte von Tg^{Cre4}/$Rosa26^{R26R}$-Mäusen (Maus 1-5) der Altersstufen P12, P15 und P42 mittels Cre-Antikörper und X-Gal-Färbungen. B: Schematische Darstellung des αCamKII-Promoters bei Tg^{Cre4}- und Wildtyp-Mäusen. Bei der Tg^{Cre4}-Linie steht Cre unter der Kontrolle des 8000 bp langen αCamKII-Promoterfragments. BglII-Schnittstellen mit vertikalen Strichen sowie Basenpaarposition und die 320 bp langen "copy"- und "integ"-Sonden sind angegeben. C: Southerblot-Analyse genomischer DNA verdaut mit BglII von Tg^{Cre4}- und Wildtyp-Mäusen mit den Sonden "integ" und "copy". Der Wildtyp zeigt bei der "integ"-Sonde eine Bande bei 4500 bp, während bei der Tg^{Cre4}-Linie noch zusätzliche Banden bei 7000 bp, 5000 bp, 3000 bp und 2000 bp des Transgens auftreten. Bei der "copy"-Sonde zeigt der Wildtyp eine Band bei 2283 bp, während bei der Tg^{Cre4}-Linie das Transgen bei 1998 bp läuft.

2.2 Regulierte Expression uneditierter GluR-B(Q)-Untereinheiten im Vorderhirn transgener Mäuse zur Induktion von Epilepsie

2.2.1 Cre-regulierte konditionale Expression von GluR-B(Q) im Gehirn

Eine generelle Expression uneditierter GluR-B(Q)-Untereinheiten in der Maus löst neonatal epileptische Anfälle aus und führt zum Tod (Brusa et al., 1995; Feldmayer et al., 1999). Durch eine Gehirn-spezifische Expression von GluR-B(Q) sollte eine Überwindung der neonatalen, Epilepsie-anfälligen Phase und somit eine Analyse der Auswirkungen Ca^{2+}-permeabler AMPAR im adulten Gehirn der Maus möglich werden.

In der GluR-B^{neo}-Maus ist in einem GluR-B-Allel das für die Editierung der Q/R-Stelle wichtige ECS-Element im Intron 11 gegen ein mit loxP-Sequenzen flankiertes neo/TK-Gen ausgetauscht (Brusa et al., 1995). Die neo/TK-Kassette bewirkt eine partielle Ruhigstellung des GluR-B^{neo}-Allels, während das Wildtyp-Allel normal exprimiert und editiert wird. Wird Cre exprimiert, erkennt diese die loxP-Elemente, und die neo/TK-Kassette wird deletiert. Das GluR-B^{neo}-Allel - nun ohne neo/TK (GluR-$B^{\Delta ECS}$) - wird aktiviert und GluR-B wird von diesem in der uneditierten GluR-B(Q) Form exprimiert (Abb. 3).

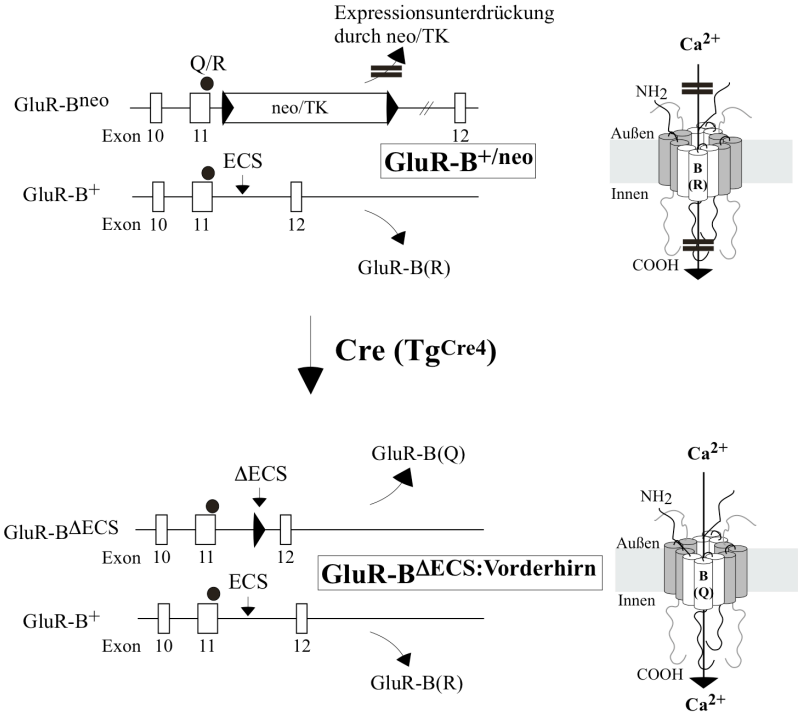

Abb.3: Schematische Darstellung der Generierung Ca^{2+}-permeabler AMPAR. Im GluR-B^{neo}-Allel wurde die ECS-Stelle durch eine loxP-flankierte neo/TK-Kassette substituiert. Die neo/TK-Kasstte bewirkt eine Expressionsunterdrückung dieses Allels. Es werden überwiegend Ca^{2+}-undurchlässige AMPAR exprimiert. Durch Cre-Aktivität wird die neo/TK-Kassette deletiert und uneditierte GluR-B(Q)-Untereinheiten werden exprimiert, was zur Formation Ca^{2+}-permeabler AMPAR führt.

Zur Deletion der neo/TK-Kassette in Prinzipalzellen des Vorderhirns wurde die Mauslinie Tg^{Cre4} herangezogen ($GluR\text{-}B^{+/\Delta ECS}/Tg^{Cre4}$ wird weiterhin bezeichnet als $GluR\text{-}B^{\Delta ECS:Vorderhirn}$). Die neo/TK-Deletion und der damit verbundene Expressionsanstieg uneditierter GluR-B(Q)-Untereinheiten kann über die GluR-B-mRNA beobachtet werden. Die Desaminierung des Adenosins im Glutamin (Q)-kodierenden Kodon CAG zum Guanosin-Analog Inosin geschiet auf der Ebene der prä-mRNA. Diese Nukleotiddifferenz bzw. der prozentuale Anteil uneditierter mRNA kann durch Generierung von cDNA aus der Gesamt-RNA und anschließender Sequenzierung quantitativ erfaßt werden. Hierfür wurden im Sequenzierungshistogramm die entsprechenden Intensitäten der Fluoreszenzsignale bestimmt. Die Sequenz des uneditierten Kodons CAG - kodiert für Glutamin (Q) - entspricht die der $GluR\text{-}B^{\Delta ECS}$-cDNA, die des editierten Kodons CGG - kodiert für Arginin (R) - der Wildtyp-cDNA. Gemessen wurden jeweils die Intensitäten des mittleren Nukleotids im Kodon (% uneditierte GluR-B mRNA bzw. (Intensität [C**A**G]/Intensitäten [C**A**G]+[C**G**G])*100 ± SEM, n=Anzahl der Mäuse) (Abb. 4). Dabei war ein Anstieg von uneditierten GluR-B(Q)-mRNA von 13 %±2,4 (n=5) bei P15 auf 24 %±1,3 (n=9) bei P45 im Vorderhirn und von 16 %±2,3 (n=5) auf 25% ±1,1 (n=9) im Hippocampus zu beobachten. Im Hirnstamm war kein Anstieg, lediglich eine, durch inkomplettes Ruhigstellen des GluR-B-Allels durch die neo/TK-Kassette verursachte restliche Expression uneditierter GluR-B(Q)-RNA von 8 %±2 (n=5) bei P15 bis 7 %±1,2 (n=9) bei P45 zu detektieren.

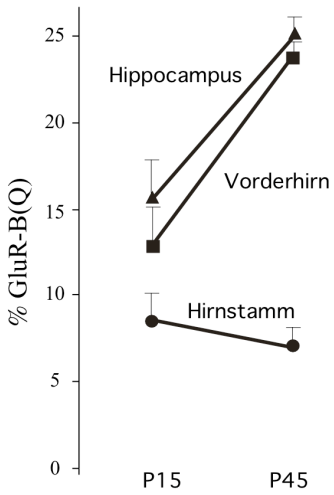

Abb. 4: Darstellung der Zunahme uneditierter GluR-B(Q)-Transkripte in verschiedenen Gehirnregionen von $GluR\text{-}B^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Abweichung (±SEM) vom Mittelwert.

2.2.2 Expression von GluR-B(Q) im Vorderhirn adulter Mäuse führt zu spontanen epileptischen Anfällen

GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäuse haben keinen offensichtlichen Phänotyp und zeigen keine Entwicklungsdefizite. Durch 24-stündige Videobeobachtungen und Elektroencephalogramm (EEG)-Aufnahmen (durchgeführt von Dr. H. Krestel, Max-Planck-Institut f. med. Forschung, Abt. Molekulare Neurobiologie, Heidelberg) konnten aber spontane, epileptische Anfälle in adulten GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 5A).

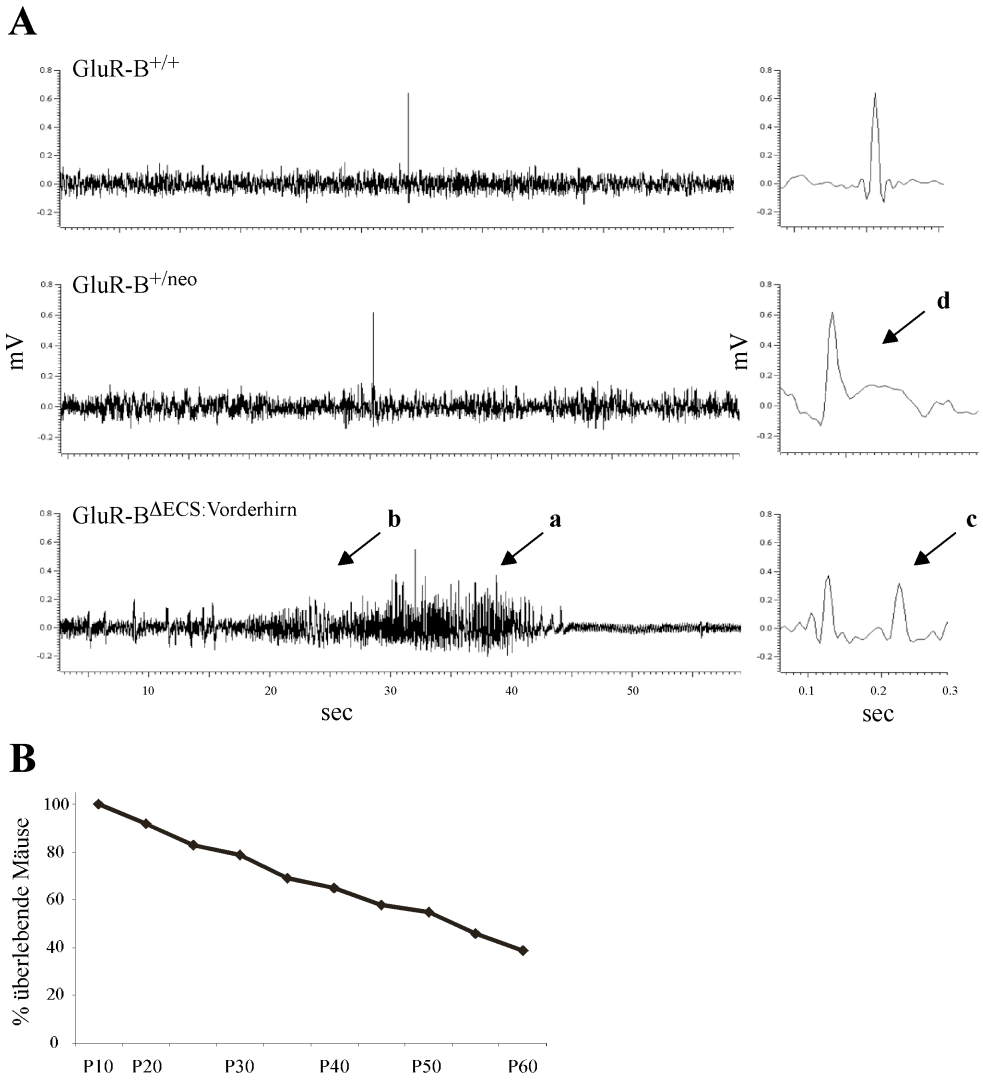

Abb. 5: EEG-Aufnahmen und Überlebenskurve von GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen. A: EEG-Aufnahmen von GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen zeigten tonisch-klonische Anfälle (a), die von myoklonischen Spikeserien angeführt werden (b). In einer Darstellung mit einer höheren Auflösung der Zeitachse sind "Poly-Spikes" (c) zu erkennen. Bei GluR-B$^{+/neo}$ Mäusen treten nur interiktale Spikemuster, wie "Spike-Wave" (d) auf, während bei GluR-B$^{+/+}$-Mäusen keine abnormalen EEG-Muster detektiert werden konnten. B: In einer Überlebenskurve wurde der prozentuale Anteil der überlebenden GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäuse dargestellt.

Videobeobachtungen von GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen zeigten komplex partielle, hypertonische Anfälle. Im EEG ließen sich verschiedene epileptische Merkmalsausprägungen beobachten. Neben den interiktalen EEG-Mustern wie "spikes" und "waves" oder "polyspikes" traten auch generalisierte tonisch-klonische Spikeserien auf, die von myoklonischen Anfallsmustern angeführt wurden. Bei GluR-B$^{neo/+}$-Mäusen traten nur interiktale EEG-Muster auf, und es waren niemals subklinische oder klinische Anfälle wie bei GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen zu erkennen.

Bei 20% der GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäuse traten frühzeitig epileptische Anfälle auf, die zum Tod führten, wobei 40% der Mäuse P60 überlebten (Abb. 5B).

Ein Hinweis auf eine generalisierte Neurodegeneration im Gehirn erbrachte der "tail suspension"-Test. GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäuse wurden in der Luft am Schwanz für 20-30 sec festgehalten, bis ein Klammern der Hinterpfoten zu beobachten war ("clasping"-Reflex). Die Kontrolmäuse GluR-B$^{+/neo}$ und GluR-B$^{+/+}$ hingegen streckten die Hinterpfoten von sich (Abb. 6).

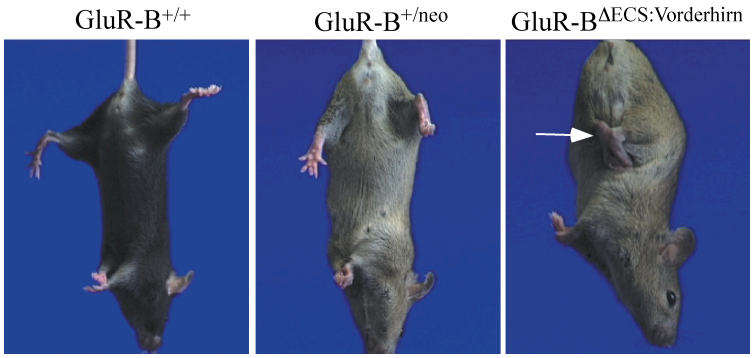

Abb. 6: Klammern der Hinterpfoten ("clasping"-Reflex) von GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen. Während GluR-B$^{+/+}$- und GluR-B$^{+/neo}$-Mäuse ihre Hinterpfoten von sich strecken, wenn man sie am Schwanz hochhebt ("tail suspension"), klammern GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäuse ihre Hinterpfoten (weißer Pfeil).

2.3 Histologische und biochemische Charakterisierungen von adulten GluR-B(Q)-exprimierenden Mäusen

Die Auswirkungen auf die Gehirnstruktur adulter (P>60) GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäuse durch die GluR-B(Q)-Expression und daraus resultierenden spontan epileptischen Anfällen wurden biochemisch und histologisch untersucht. Als Kontrollen dienten gleichaltrige GluR-B$^{+/neo}$-Mäuse und GluR-B$^{+/+}$-Geschwister.

2.3.1 GluR-B(Q)-Expression führt zu reaktiver Astrozytose in verschiedenen Hirnregionen, aber zur keinem offensichtlichen Verlust pyramidaler Neuronen im Hippocampus

Hirnschädigungen chemischer, mechanischer oder anderer Natur aktivieren Gliazellen und deren Expression des intrazellulären Intermediärfilaments Glial-fibrillär azidisches Protein (GFAP) (Reier und Houle, 1988; Norenberg, 1994). Somit wurden adulte spontan epileptische GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäuse nach Veränderungen ihrer Gehirnanatomie und Gliazellmorphologie analysiert.

Auf Vibratom- und Kryostat-Schnitten von adulten GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen (P>60) wurden in weiten Bereichen des Gehirns eine reaktive Gliose bzw. Astrozytose beobachtet (Abb. 7). Es ist bekannt, daß reaktive Astrozyten eine erhöhte Synthese von GFAP zeigen. Mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen GFAP wurden vermehrt GFAP-positive Zellen im Hippocampus spontan epileptischer Mäuse detektiert. Speziell in den Regionen CA1, CA3 wie auch dem Gyrus dentatus (GD) zeigten GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäuse eine erhöhte Reaktivität gegen GFAP als die Kontrollmäuse. Eine starke reaktive Astrozytose trat auch in cortikalen Regionen wie dem motorischen, somatosensorischen, und visuellen Cortex und in der Amygdala auf. Bei Kontrollmäusen GluR-B$^{+/+}$ und GluR-B$^{+/neo}$ sind hingegen nur wenige GFAP-positive Zellen in cortikalen Bereichen und in der Amygdala zu beobachten.

Die Zelldichte bzw. Zellzahl war bei GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen unverändert, denn Antikörperfärbungen gegen NeuN (ein nukleärer, neuronaler Transkriptionsfaktor) wiesen auf keine Reduktion hin (Abb. 7). Auch Hämatoxylin/Eosin (H/E)-Färbungen zeigten keine Unterschiede (Abb. 8). Bei dieser Färbung wird das Zell-Cytoplasma mit Eosin rosarot und der Nukleus bzw. die DNA mit Hämatoxylin lilablau angefärbt. So lassen sich apoptotische Zellen – granuläre Färbung des Zellkerns durch DNA-Fragmentierung – und Veränderungen in der Zelldichte auffinden. Bei H/E-gefärbten Parafin-Schnitten von GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen waren keine Veränderungen im Hippocampus zu erkennen (Abb. 8). In den CA1, CA3 und GD Regionen erwiesen sich die Zelldichte und Zellmorphologie als normal. Trotz reaktiver Gliosis und spontan auftretenden Epilepsien traten keine apoptotischen oder nekrotischen Zellen auf.

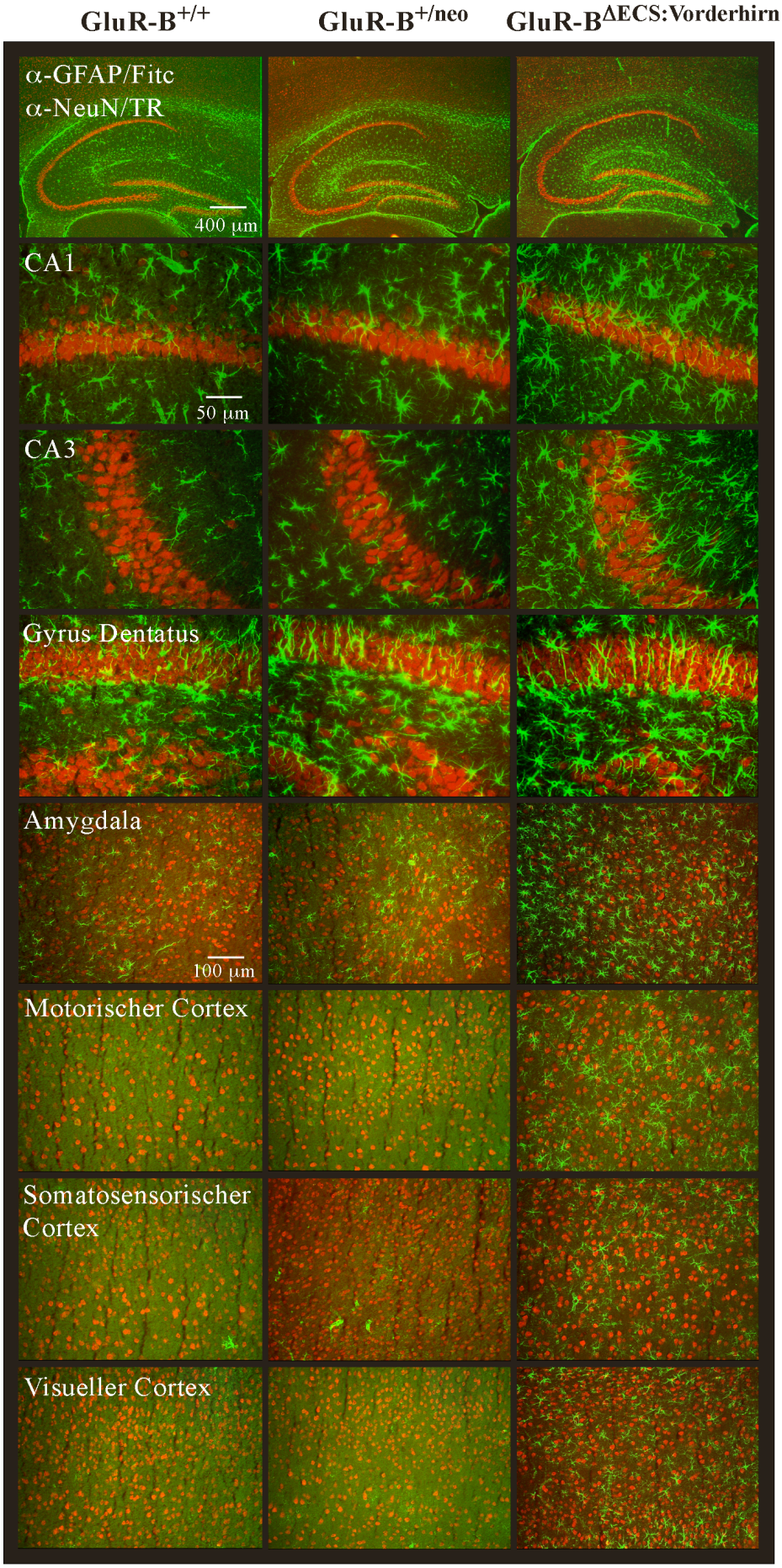

Abb.7: Immunfluoreszenz-Analyse von Gewebeschnitten mit Antikörper gegen GFAP (Fitc, grün) und NeuN (TexasRed, rot).

Gewebeschnittarten: Vibratom (Hippocampus) und Kryostat (Amygdala und Cortex)

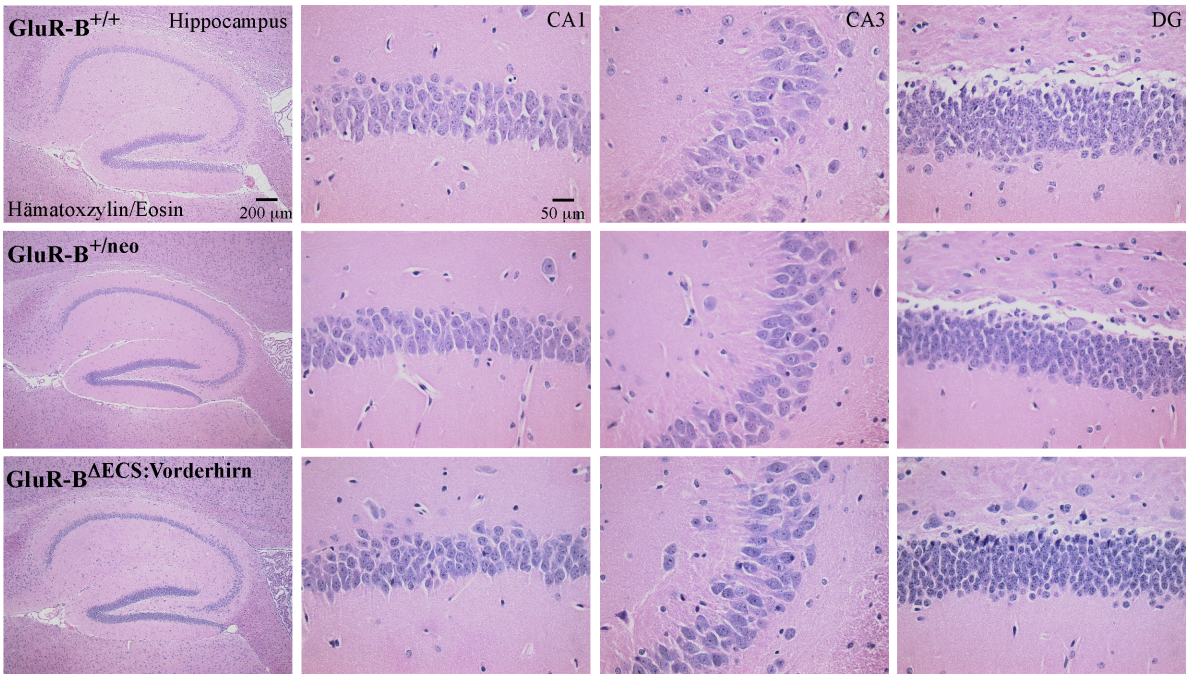

Abb.8: Histologische Untersuchung von Parafin-Schnitten von GluR-B$^{+/+}$-, GluR-B$^{+/neo}$- und GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen mittels Hämatoxylin/Eosin-Färbung.

2.3.2 Die Untereinheiten GluR-B und NR2A sind reduziert, wohingegen GluR-A und NR1 in adulten GluR-B(Q) Mäusen unverändert sind

In adulten Ratten wurde gezeigt, daß Status epilepticus eine Veränderung der AMPAR- und NMDAR-Untereinheiten im Hippocampus auslöst (Pollard et al., 1993; Friedman et al., 1994; Grooms et al., 2000; Mikuni et al., 2000, 1998; Mathern et al., 1998; Babb et al., 1996). Zur Analysen von veränderten Proteinmengen der AMPAR- und NMDAR-Untereinheiten im Hippocampus bei adulten GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-, GluR-B$^{+/neo}$- und GluR-B$^{+/+}$-Mäusen wurde Gesamtprotein aus Hippocampi in Immunoblots quantitativ untersucht (Abb. 9). Hierfür wurden Antikörper gegen GluR-A, GluR-B, NR1, NR2A und β-Actin (zur Normalisierung der Bandenintensitäten) eingesetzt. Eine Auswertung mit NIH Image der Immunoblots ergab bei GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen eine signifikante ($P<0,01$) Reduktion um 43 % von GluR-B (59 %±3; n=6) gegenüber GluR-B$^{+/+}$-Mäusen (103 %±6,9; n=5). GluR-B$^{+/neo}$-Mäuse (69 %±6,9; n=7) zeigten ebenfalls eine signifikante ($P<0,01$) Reduktion von 33 % gegenüber GluR-B$^{+/+}$-Kontrollen, das auf die partielle allelische Expressionsunterdrückung der noch vorhandenen neo/TK-Kassette zurückzuführen ist. Zwischen GluR-B$^{+/neo}$- und GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen aber wurde kein Unterschied ($P=0,22$) des GluR-B-

Proteingehalts detektiert. Die NR2A-Untereinheit war signifikant (P<0,01) bei GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$- (50 %±5,7; n=6) gegenüber den GluR-B$^{+/neo}$- (86 %±11,8; n=6) um 42 % und den GluR-B$^{+/+}$-Mäusen (100 %±9,3; n=4) um 50 % reduziert, wobei zwischen den GluR-B$^{+/neo}$- und GluR-B$^{+/+}$-Mäusen kein Unterschied zu erkennen war (P=0,43). Es wurden aber keine Unterschiede in der GluR-A- und NR1-Untereinheit bei GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$- (GluR-A: 102 %±5,6; n=6; NR1: 95 %±9,1; n=6), GluR-B$^{+/neo}$- (GluR-A: 107 %±5,1; n=7; NR1: 98 %±13,4; n=6) und GluR-B$^{+/+}$- Mäusen (GluR-A: 100 %±4,3; n=4; NR1: 101 %±5,9; n=5) beobachtet.

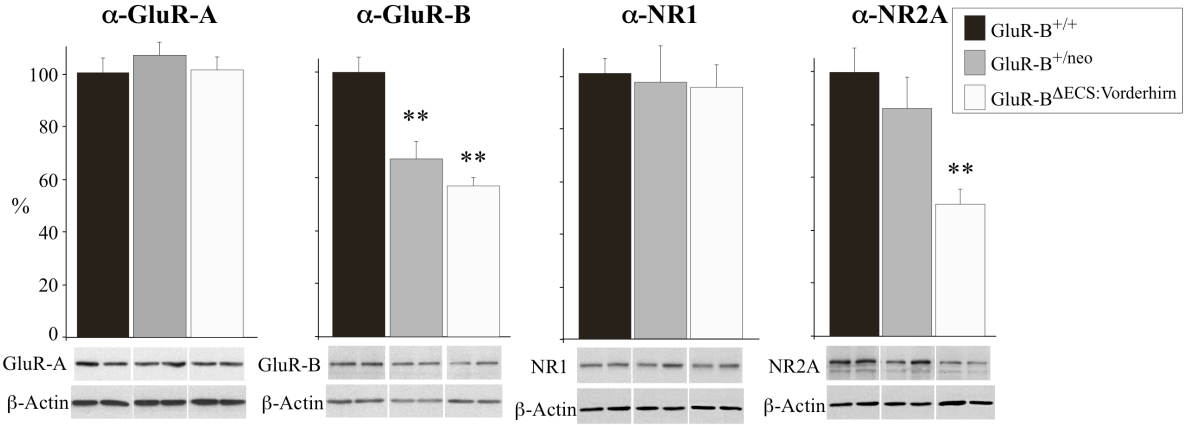

Abb. 9: Quantitative Immunoblotanalysen von Hippocampi adulter GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-, GluR-B$^{+/neo}$- und GluR-B$^{+/+}$-Mäuse. Gesamtprotein wurde aus dem Hippocampus isoliert und in Immunoblots mit Antikörpern gegen GluR-A, GluR-B, NR1, NR2A und β-Actin analysiert. Anschließend wurde mit NIH Image die Intensität der entsprechenden Banden quantitativ erfaßt und gegen β-actin normalisiert. Die Fehlerbalken repräsentieren die Abweichung (±SEM) vom Mittelwert. Die Sterne (**) geben die Signifikanz (P<0,01) zu GluR-B$^{+/+}$ an.

2.3.3 Verlust von Interneuronen im Hippocampus adulter, epileptischer Mäuse

Die Aktivität der Prinzipalzellen wird über inhibitorische Signale von Interneuronen moduliert (Freund und Buzsaki, 1996). Darum werden chemische Substanzen, die zu einer Erhöhung oder Reduktion GABAerger Inhibition führen, als Anti-Epileptika bzw. als Pro-Konvulsive Drogen im Menschen oder experimentellen Tiermodellen eingesetzt. In verschiedenen Epilepsiemodellen wurden selektive Verluste von Interneuronen, Parvalbumin (Parv)- und Somatostatin (Sst)-positive Zellen im Gehirn von Mäusen beobachtet (Silva et al., 2002; Cossart et al., 2001).

Zur Untersuchung der Interneuronen im Hippocampus spontan epileptischer

GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäuse wurden auf Vibratom-Schnitten Parv- und Sst-positive Zellen histologisch angefärbt und quantitativ ausgewertet (Abb. 10).

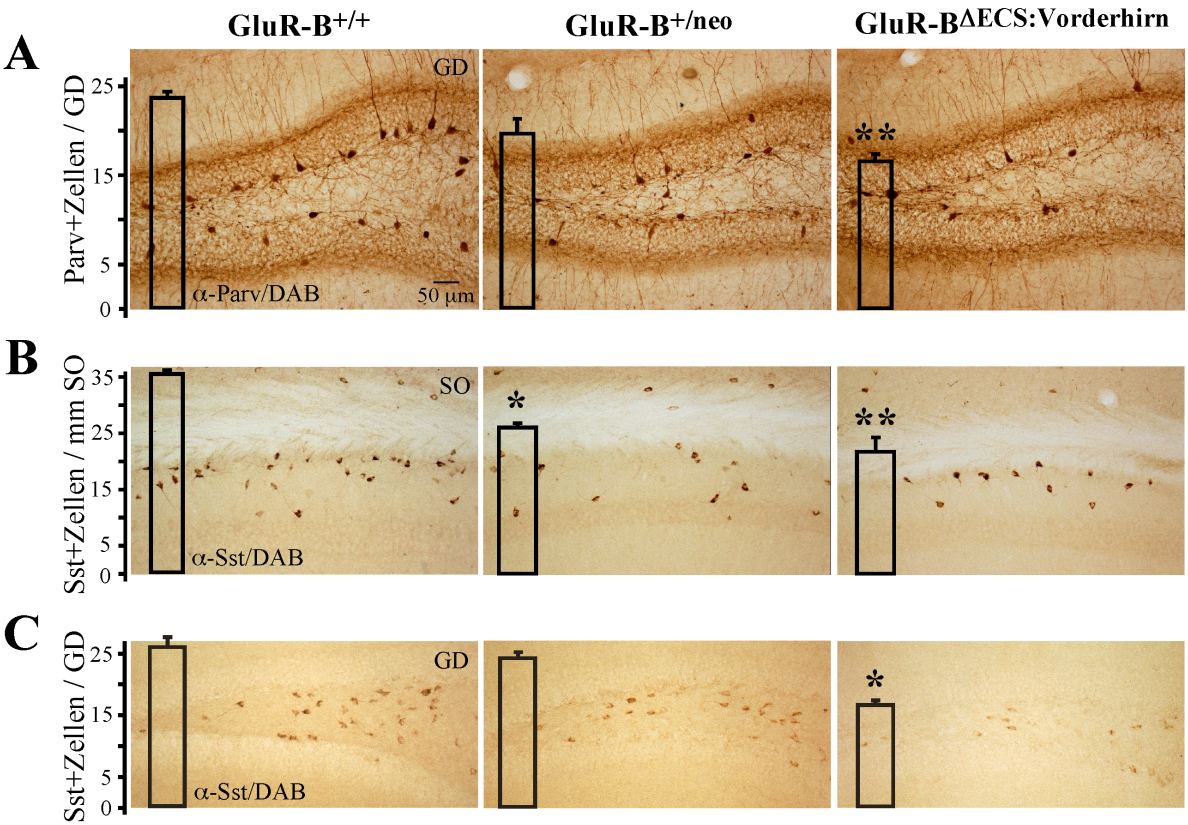

Abb.10: Immunhistologische und quantitative Untersuchungen von hippokampalen Interneuronen von Vibratom-Schnitten. A: Parv-positive Zellen im GD. B: Sst-positive Zellen im SO. C: Sst-positive Zellen im Hilus. Die Bardiagramme zeigen die jeweilige Anzahl der Parv- bzw. Sst-positiven Zellen in den jeweiligen Hippocampus-Regionen an. Die Fehlerbalken repräsentieren die Abweichung (±SEM) vom Mittelwert. Die Sterne (*) bzw. (**) geben die Signifikanzen (P<0,05) bzw. (P<0,01) zu GluR-B$^{+/+}$-Mäusen an. Sst: Somatostatin, Parv: Parvalbumin, GD: Gyrus dentatus, SO: Stratum oriens

Eine Analyse der Anzahl Parv-positiver Zellen (Anzahl±SEM, n=Anzahl der Mäuse) im GD (Abb. 10A) von GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen (16±0.8, n=5) zeigte eine signifikante Reduktion von 33% (P<0.01) gegenüber GluR-B$^{+/+}$-Mäusen (24±0.9, n=4) und eine leichte Abnahme von 20% (P=0.064) gegenüber GluR-B$^{+/neo}$-Mäusen (20±1.7, n=4). Ein signifikanter (P=0,055) Unterschied der Zahl Parv-positiven Zellen im GD zwischen GluR-B$^{+/neo}$- und GluR-B$^{+/+}$-Mäusen zeigte sich nicht.

Die Anzahl Sst-postiver Zellen im Stratum oriens (SO) und im Hilus von GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen erwiesen sich ebenfalls als signifikant reduziert. Im einzelnen konnte eine verminderte Anzahl Sst-positiver Zellen im SO (Abb. 10B) von 35% (P<0.01)

bei GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$- (22±1.7, n=3) gegenüber GluR-B$^{+/+}$- (34±1.4, n=3) und von 19% (P<0.05) gegenüber GluR-B$^{+/neo}$- Mäusen (27±0.9, n=3) nachgewiesen werden. Auch GluR-B$^{+/neo}$- zeigten gegenüber GluR-B$^{+/+}$-Mäuse eine signifikante (P<0,05) Abnahme Sst-positiver Zellen im SO.

Die Anzahl Sst-positiver Zellen im Hilus (Abb. 10C) war bei GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen (18±0.3, n=3) gegenüber GluR-B$^{+/+}$- (28±2.2, n=3) um 36% (P<0.01) und gegenüber GluR-B$^{+/neo}$-Mäusen (26±1.2) um 31% (P<0.05) vermindert. Ein signifikanter (P=0.62) Unterschied Sst-positiver Zellen im GD von GluR-B$^{+/neo}$- gegenüber GluR-B$^{+/+}$-Mäusen war nicht zu beobachten.

2.3.4 Auftreten umorganisierter Moosfaserprojektionen der Körnerzellen in die innere Molekularschicht des Hippocampus ("mossy fiber sprouting") in adulten GluR-B(Q)-exprimierenden Mäusen

Die hippokampalen Körnerzellen des GD projizieren mit ihren Axonen (Moosfasern) auf die Pyramidalzellen der CA3-Region und etablieren einen exzitatorischen Eingang. Die axonale Projektion geschieht entweder direkt oder indirekt über inhibitorische Neurone im Hilus. Nach epileptogenen Schäden reorganisiern die Körnerzellen ihre Axone neu und etablieren axonale, rückläufige Verbindungen mit Neuronen in der Körnerzellschicht und Dendriten der inneren Molekularschicht. Diese regionale Abweichung der axonalen Projektionen der Körnerzellen, "mossy fiber sprouting" genannt, können durch eine TIMM-Färbung sichtbar gemacht werden (Abb. 11). Durch i.p.-Injektion von Selenit wird präsynaptisches Zn^{2+} als Zinkselenit präzipitiert. Dieses Präzipitat kann in Kryostat-Schnitten von Gehirnen durch Silbernitrat schwarz gefärbt und quantitativ als TIMM-Index (granuläre Partikel/mm GD±SEM, n=Anzahl der Mäuse) erfaßt werden.

Adulte GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäuse zeigten einen 3-fachen, signifikanten Anstieg (P<0.01) reorganisierter Körnerzellaxone in die innere Molekularschicht, gefolgt von GluR-B$^{+/neo}$-Mäusen (271±23, n=4) mit einem 2-fachen, signifikanten (P<0.01) im Vergleich zu Kontrollmäusen GluR-B$^{+/+}$ (124±12, n=4).

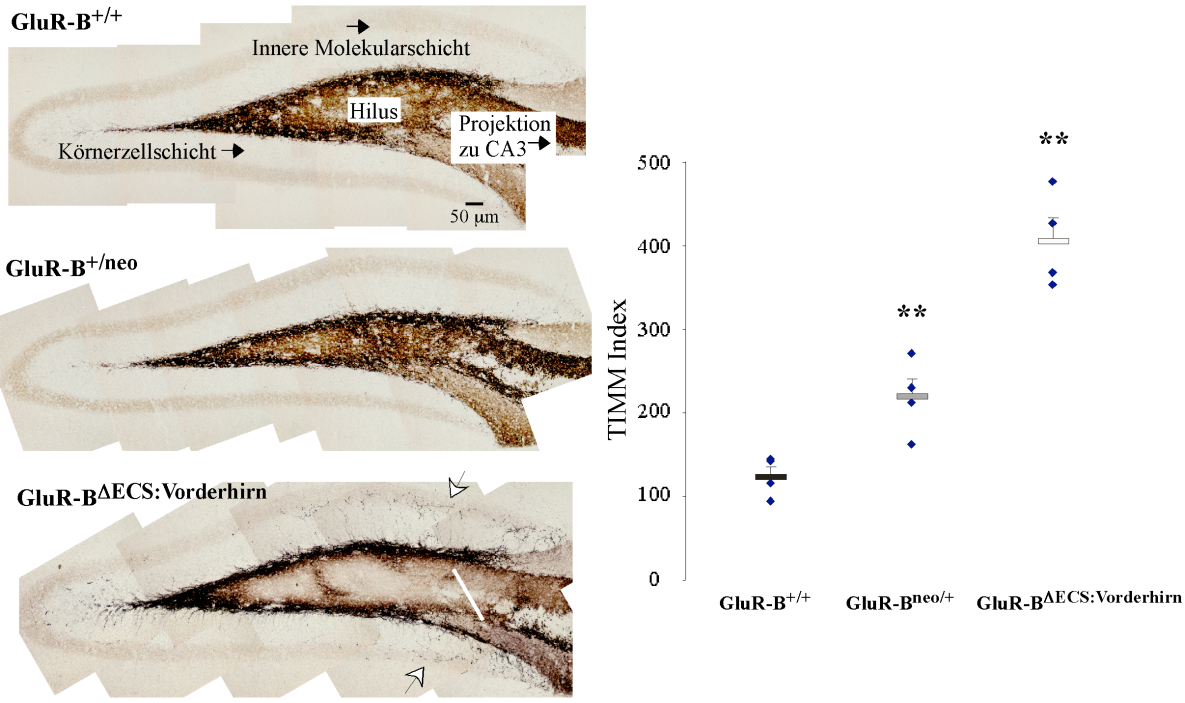

Abb. 11: Histologische Untersuchung der hippokampalen Moosfasern mittels Timm-Färbung und Ermittlung des Timm-Index. Bei GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen wurde eine stärkere Färbung in der inneren Molekularschicht detektiert (Pfeile mit offenen Pfeilköpfen). Der Timm-Index gibt die Anzahl der Körnerungen der inneren Molekularschicht pro mm GD an (Anzahl der granulären Partikel/mm GD). Die Fehlerbalken repräsentieren die Abweichung (±SEM) vom Mittelwert. Die Sterne (**) geben die Signifikanz (P<0,01) an.

2.3.5 Die Neurogenese in der subgranulären Zellschicht des Hippocampus ist in adulten GluR-B(Q)-exprimierenden Mäuse erhöht

Proliferation von Gehirnzellen findet in der subgranulären Zone im Hippocampus und in den subventrikulären Zonen des Vorderhirns statt (Gage, 2002; Doetsch et al., 1999; Johansson et al., 1999; Seri et al., 2001; Kornack & Rakic, 2001). Die dortigen Stammzellen sind auch im adulten Organismus zur Proliferation fähig. Ihre "Nachkommen" können sich zu Neuronen (Neurogenese) oder Gliazellen (Gliagenese) differenzieren. Die Proliferation der Stammzellen kann durch eine Inkorporation des Thymidinanalogs Bromodeoxyuridin (BrdU) und anschließendem Antikörper-Färbung nachgewiesen werden.

Für quantitative Analysen wurden von adulten Mäusegehirnen nach einer einwöchigen oralen und intraperitonealen (i.p.) BrdU-Applikation Kryostat-Schnitte angefertigt und immunhistologisch mit einem BrdU-Antikörper und einer Gegenfärbung mit Thionin behandelt (Abb. 12A). Anschließend erfolgte die Auszählung BrdU-positiver Zellen in der subgranulären Zone des Hippocampus (Anzahl± SEM, n=Anzahl der Mäuse).

GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$- (14±1.3, n=4) und GluR-B$^{+/neo}$-Mäuse (14±1.6, n=4) wiesen nach einer einwöchigen BrdU-Behandlung (Abb. 12A) eine 2-fach erhöhte Zahl BrdU-positiver Zellen im subgranulären Bereich des Hippocampus gegenüber GluR-B$^{+/+}$-Mäusen (7±0.7, n=4) auf; Signifikanz ($P<0.01$).

Nach einer zweiwöchigen oralen Zugabe von BrdU wurde an Vibratom-Schnitten eine Fluoreszenz-Doppelfärbung mit Antikörpern gegen BrdU (TexasRed, rot) und NeuN, einem neuronalem Marker (Fitc, grün), durchgeführt und mit einem konfokalen Mikroskop analysiert (Abb. 12B). Bei GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen ließen sich BrdU-positive Zellen in der subgranulären Zone wie auch in der Körnerzellschicht erkennen (Abb. 12B); im Gegensatz zu GluR-B$^{+/+}$- und GluR-B$^{+/neo}$-Mäusen, bei denen die BrdU-positiven Zellen auf die subgranulären Zone beschränkt waren. Die höhere Auflösung zeigt eine Kolokalisation des neuronalen Markers NeuN und BrdU bei GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen in der Körnerzellschicht (Abb. 12B).

Zur quantitativen Identifizierung (Anzahl±SEM, n=Anzahl der Mäuse) neuronaler Vorläuferzellen wurden zwei verschiedene Antikörper, α-Ki67 und α-TUC-4, verwendet. Ki67 ist ein postmitotischer Marker neuronaler Vorläuferzellen, wobei aber TUC-4 (TOAD 64) nicht spezifisch für proliferierende Neuronen sein soll, sondern vielmehr auch Astrozyten und/oder Oligodendrozyten erkennt (Rakic, 2002). Die Auswertung immunhistologisch behandelter Kryostat-Schnitte von GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen zeigte in der subgranulären Zone doppelt soviele Ki67-positive Zellen (32±5.8, n=3) als bei GluR-B$^{+/+}$-Mäusen (16±1.5, n=3) (Abb. 12C). Diese Erhöhung erwies sich als signifikant ($P<0.05$). GluR-B$^{+/neo}$-Mäuse (21±2.1, n=3) zeigten hingegen nur eine 1.3-fach erhöhte, aber immer noch signifikante ($P<0.05$) Ki67-positive Zellzahl als GluR-B$^{+/+}$-Mäuse. Der TUC-4-Antikörper zeigte in Vibratom-Schnitten von GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen an der subgranulären Zone eine starke Immunreaktion (Abb. 12D), wohingegen keine Veränderung Tuc4-positiver Zellen bei GluR-B$^{+/+}$- und GluR-B$^{+/neo}$-Mäusen zu erkennen war.

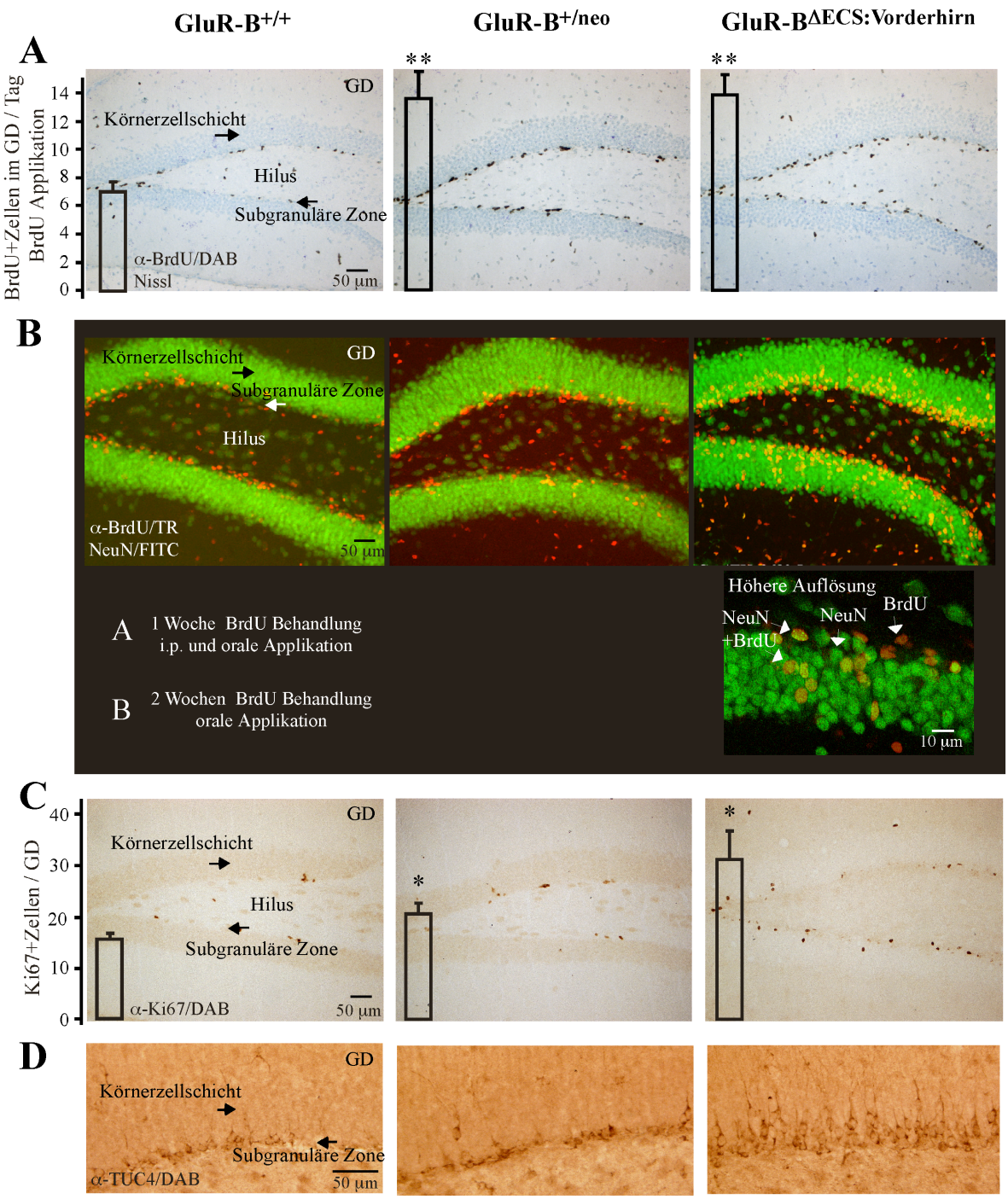

Abb. 12: Immunhistologische Untersuchungen der Zellproliferation im Hippocampus. A: Nach einer einwöchigen BrdU-Behandlung (i.p. und oral) wurde das in die DNA inkorporierte BrdU mittels Antikörper-Reaktion und DAB-Färbung in Kryostat-Schnitten detektiert und mit einer Nissl-Färbung gegengefärbt. Die quantitative Erfaßung der BrdU-positiven Zellen (BrdU-positive Zellen im GD/Tag BrdU-Applikation) ist in Bardiagrammen angezeigt. B: Nach einer zweiwöchigen oralen BrdU-Behandlung wurde BrdU in Vibratom-Schnitten mittels Fluoreszenz-Antikörper (BrdU: TexasRed, rot) detektiert. NeuN wurde mit einem Fitc-gekoppelten Sekundärantikörper (grün) detektiert. In der höheren Auflösung ist eine Kolokalisation von BrdU und NeuN bei GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen zu erkennen (weiße Pfeile). C: In Kryostat-Schnitten wurden postmitotische Neuronen im subgranulären Bereich des GD mittels einem Antikörper gegen Ki67 und einer DAB-Färbung detektiert. Die quantitative Auswertung Ki67-positiver Neuronen sind in einem Bardiagramm

dargestellt. D: Mithilfe des Tuc4-Antikörpers und einer DAB-Färbung wurden proliferierende Zellen im subgranulären Zone im Hippocampus in Vibratom-Schnitten detektiert. Die Fehlerbalken repräsentieren die Abweichung (±SEM) vom Mittelwert. Die Sterne (*) bzw (**) geben die Signifikanzen (P<0,05) bzw. (P<0,01) zu GluR-$B^{+/+}$ an. GD: Gyrus dentatus

2.4 Ausschalten der GluR-B-Untereinheit im Vorderhirn der Maus

Für eine Untersuchung der Funktion der AMPAR-Untereinheit GluR-B im adulten Gehirn der Maus wurde das Cre-loxP-System eingesetzt. In GluR-B^{2lox}-Mäusen ist im GluR-B-Gen Exon11 mit homologer Rekombination durch ein loxP-flankiertes Exon11 ausgetauscht worden (V. Mack, Dissertation, 2002). Dieses Allel wird im homozygoten Zustand (GluR-$B^{2lox/2lox}$) normal exprimiert. Durch Kreuzung mit Cre-exprimierenden Mäusen (Tg^{Cre4} bzw. Tg^{GniCre}) ist ein spezifisches Ausschalten des GluR-B^{2lox}-Allels möglich (GluR-$B^{2lox/2lox}$/Tg^{Cre4} wird weiterhin als GluR-$B^{\Delta Vorderhirn}$ und GluR-$B^{2lox/2lox}$/Tg^{GniCre} als GluR-$B^{\Delta Hypothalamus}$ bezeichnet). Die Deletion der GluR-B^{2lox}-Allele bei GluR-$B^{\Delta Vorderhirn}$-Mäusen schlägt sich in einer GluR-B-Abnahme in immunhistochemischen Untersuchungen nieder (siehe Abb. 20). Das Cerebellum, wo auch keine Cre-Expression detektiert wurde (siehe Abb. 1), zeigte keine Veränderung in der GluR-B-Expression (Abb. 13B). Im Bulbus olfactorius ist eine Reduktion der GluR-B-Untereinheit in Mitral- und Körnerzellen zu erkennen (Abb. 13A). Bei GluR-$B^{\Delta Hypothalamus}$-Mäusen hingegen ist eine Abnahme von GluR-B im Hypothalamus zu sehen, während andere Gehirnregionen, wie z.B. der Cortex nicht betroffen sind (siehe Abb. 21C, Abb. 21D und das jeweilige Bild-im-Bild).

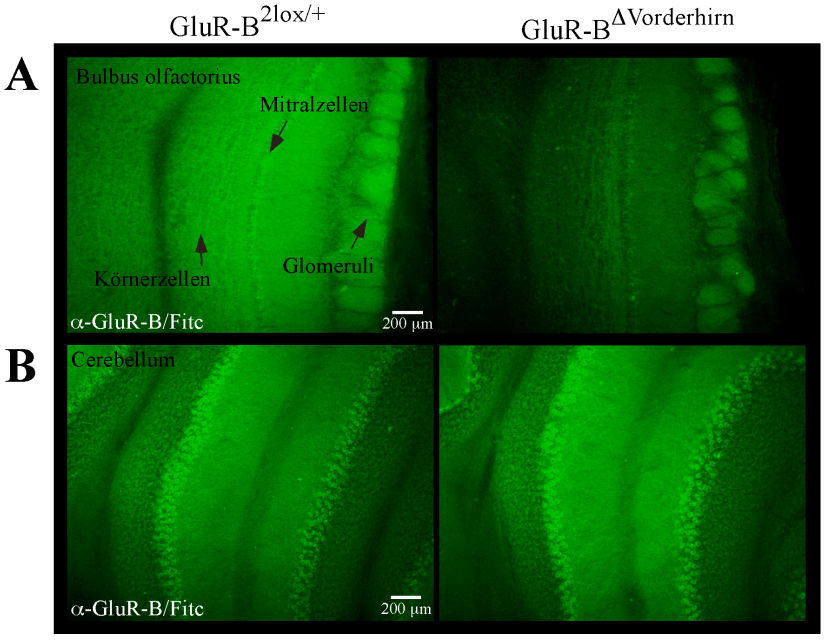

Abb. 13: Immunfluoreszenz-Analyse an Vibratom-Schnitten von GluR-$B^{2lox/+}$- und GluR-$B^{\Delta Vorderhirn}$-Mäusen mit einem Antikörper gegen GluR-B und einem Fitc-gekoppelten 2. Antikörper (grün). A: Bulbus olfactorius, B: Cerebellum

2.5 Verhaltensveränderungen bei GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$-Mäusen

2.5.1 Die Vorderhirn-spezifische GluR-B-Deletion führte zu gestörten angstbezogenen Verhaltensweisen im Hell/Dunkel-Test

Der Hell/Dunkel-Test wurde zur Untersuchung von angstbezogenen Verhaltensweisen eingesetzt. Das Explorieren einer neuen Umgebung und das Vermeiden aversiver Umgebungen stellen natürliche Verahltensmuster der Maus dar. Im Hell/Dunkel-Test konfligieren diese miteinander, indem die Maus sich entscheiden kann, ob sie das dunkle, angenehm sichere Kompartiment verläßt, in das sie zu Anfang gesetzt worden ist oder durch eine Öffnung in das helle, aversive Kompartiment wechselt.

Die folgenden Testreihen wurden am ZI (Mannheim, Deutschland) von C. Zacher durchgeführt. Es wurde die Zeit bis zum ersten Austritt aus dem dunklem Kompartiment (sec±SEM), die Zahl der Austritte ins helle Kompartiment (Anzahl±SEM) und die verbrachte Zeit indemselben (sec±SEM) gemessen (Abb. 14).

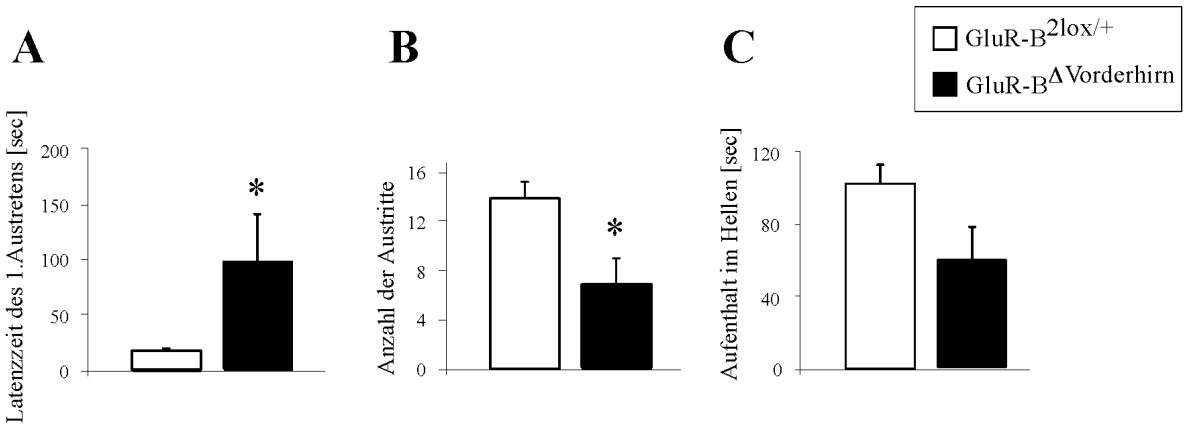

Abb. 14: Verhalten im Hell-Dunkel-Test von GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$- und GluR-B$^{2lox/+}$-Mäusen. A: Latenzzeit (sec) des 1. Austrittes aus dem dunklem Kompartiment. B: Anzahl der Austritte bzw. Wechsel zwischen hellem und dunklem Kompartiment. C: Aufenthaltsdauer (sec) im hellen Kompartiment. Die Fehlerbalken repräsentieren die Abweichung (±SEM) vom Mittelwert. Der Stern (*) gibt die Signifikanz (P<0,05) an.

Die GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$-Mäuse (197±42, n=6) zeigten eine signifikant (P<0.05) verzögerte Latenzzeit des ersten Austritts aus dem dunklem Kompartiment und eine signifikant (P<0.05) geringere Anzahl an Hell/Dunkel-Wechsel (7±2, n=6) als die Kontrollmäuse GluR-B$^{2lox/+}$ (Latenzzeit des 1. Austrittes: 17±3, n=6, Anzahl der Austritte: 14±1.5, n=6).

Auch ließ sich eine Präferenz zum Verbleib im dunklen Kompartiments von GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$-Mäusen beobachten; die verbrachte Zeit im erhellten Kompartiment bei GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$-Mäusen (59±19, n=6) war im Vergleich zu GluR-B$^{2lox/+}$-Mäusen (103±10, n=6) um 43% mit geringer Signifikanz (P=0.05) erniedrigt.

2.5.2 GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$-Mäuse zeigten eine verminderte motorische Koordination im beschleunigten Rotarod-Test

Zur Erfassung der Motorkoordination und Körperbalance, unabhängig von Muskelkraft und Ausdauer, dient der Rotarod-Test. Der Rotarod besteht aus einem sich drehenden, 3 cm dicken Zylinder. Um nicht herunterzufallen, muß die Maus sich kontinuierlich vorwärtsbewegen. Im beschleunigtem Rotarod erhöht sich innerhlab von 5 min die Umlaufgeschwindigkeit von 4 Upm auf 40 Upm. Nach einer einmaligen Trainingsphase wurden 6 GluR-B$^{2lox/+}$-Kontrollmäuse und 5 GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$-Mäuse in einer Versuchsdurchführung auf ihre motorische Koordination hin (Latenzzeit [sec] des Herunterfallens±SEM, n=Anzahl der Mäuse) überprüft (Abb. 15). Es konnte eine Beeinträchtigung der Motorkoordination in GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$-Mäusen nachgewiesen werden. GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$-Mäuse (37.2 sec±10, n=6) fallen signifikant (P<0.05) schneller vom rotierenden Zylinder als die Kontrollmäuse (156 sec±37, n=6).

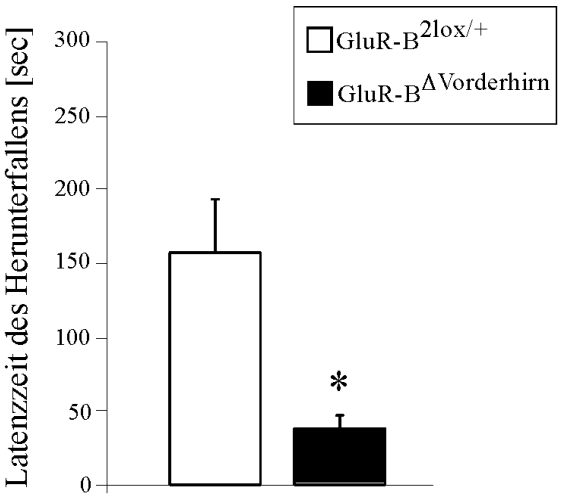

Abb. 15: Motorkoordination auf dem beschleunigten Rotarod von GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$- und GluR-B$^{2lox/+}$-Mäusen. Es wurde die Latenzzeit (sec) des Herunterfallens vom Rotarod gemessen. Die maximale Gesamtdauer betrug 300 sec. Die Fehlerbalken repräsentieren die Abweichung (±SEM) vom Mittelwert. Der Stern (*) gibt die Signifikanz (P<0,05) an

2.5.3 Die horizontale Aktivität bzw. die Erkundung einer neuen Umgebung im Offenen-Feld-Test ist bei GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$-Mäusen erhöht

Das standadisierte Maß für motorisches Verhalten der Maus ist die spontane Aktivität im offenem Feld. Hiefür wird die horizontale Bewegung (Gesamtwegstrecke und Bewegungsmuster) einer Maus innerhalb von 5 min in einer abgegrenzten, 1 m^2 großen Fläche bestimmt (Abb. 16).

In einer Versuchsdurchführung wurden 12 Kontrollmäuse GluR-B$^{2lox/+}$ und 11 GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$-Mäuse im Offenen-Feld auf ihre horizontale Aktivität (cm±SEM) analysiert. GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$-Mäuse (3480 cm±180) wiesen eine 1,4-fache, signifikant (P<0.01) erhöhte horizontale Bewegung als die Kontrollmäuse (2512 cm±96) auf. Es wurde aber kein Unterschied im Bewegungsmuster zwischen Mutanten und Kontrollen beobachtet: beide Gruppen bevorzugten die Randpartien, wobei die mittleren Bereiche des offenen Feldes auch genutzt wurden.

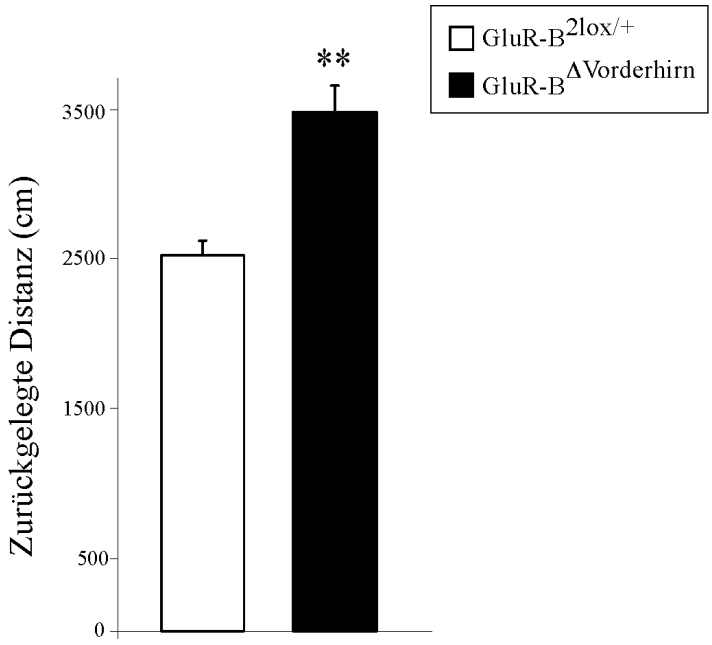

Abb. 16: Verhalten im offenen Feld von GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$- und GluR-B$^{2lox/+}$-Mäusen. Es wurde die zurückgelgte Distanz (cm) während der 5-minütigen Testdauer gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Abweichung (±SEM) vom Mittelwert. Die Sterne (**) geben die Signifikanz (P<0,01) an.

2.5.4 Der Vorderhirn-spezifische GluR-B Verlust führt zu einer verminderten Gedächtnisbildung bei passiver Konditionierung

Durch ein klassisches Konditionierungsmodell, auch als Pavlovsches Modell bekannt, können implizite, assoziative Gedächtnisformen untersucht werden. Die Verknüpfung zweier Reize, deren Speicherung und Wiederherstellung sind Formen implizitem Erinnerungsver-

mögens. In Konditionierungsexperimenten erlernen Tiere zwischen einem konditionierten (Ton, Licht, Raum) und einem assoziierten unkonditionierten Stimulus (Fußelektroschock) eine Verbindung herzuerstellen, ein Gedächtnis auszubilden und letzendlich auf den konditionierten Stimulus mit einer Verhaltensänderung zu antworten. Für eine Untersuchung der Beteiligung von GluR-B in angstbezogenem Lernen und Gedächtnis wurden GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$-Mäuse in kontextbezogenen Angstkonditionierungs-Experimenten analysiert (Passiv-Vermeiden-Test). Der kontextbezogene Stimulus bestand aus dem Übergang von einem hellen, kleinen, aversiven in ein großes, dunkles Kompartiment. Nach kompletten Eintritt der Maus in das dunkle Kompartiment wurde als unkonditionierter, gepaarter Stimulus ein milder Fußschock appliziert. In diesem Test wurde die Latenzzeit des Eintrittes mit allen vier Pfoten der Maus in das dunkle Kompartiment vor Applikation und 1 h, 24 h und 48 h nach der Applikation des aversiven Reizes gemessen (sec±SEM) (Abb. 17). Der Versuchsaufbau besteht aus einem dunklem Kompartiment (400 cm^2), in dem der Fußschock (0,9 mA für 1 sec) appliziert wird und einer davorliegenden, hellen Platform (10 cm^2).

Es wurden 17 konditionale GluR-B-Mutanten und 21 Geschwister-Kontrollmäuse GluR-B$^{2lox/+}$ für diesen Test verwendet. Vor dem aversiven Schock gingen die Mäuse beider Gruppen schnell (innerhalb weniger Sekunden) in das bevorzugte dunkle Kompartiment. Nach Applikation eines Fußschockes und einer Wartedauer von 10 sec zur Assoziationsausbildung wurden die Mäuse in ihren Heimkäfig zurückgesetzt und nach 1 h, 24 h und 48 h erneut analysiert. Nach einem Eintreten wird ein erneuter Stromstoß gegeben. Eine Stunde nach dem ersten Fußschock hatten die Kontrollmäuse (81 sec±17) bereits ein Erinnerungsvermögen für den aversiven Stimulus ausgebildet, wohingegen die Mutanten (29 sec±14) eine signifikant ($P<0.05$) beeinträchtigte Gedächtnisbildung aufzeigten. Nach 24 h verbesserte sich das angstbezogene Gedächtnis von GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$-Mäusen (77 sec±20) und sie waren nur noch leicht signifikant ($P=0.06$) schlechter als Kontrollmäuse (126 sec±17). Nach 48 h wurde kein Unterschied ($P=0.5$) in den Latenzzeiten der Eintritte von GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$-Mäusen (143 sec±23) und der Kontrollgruppe (120 sec±23) mehr detektiert.

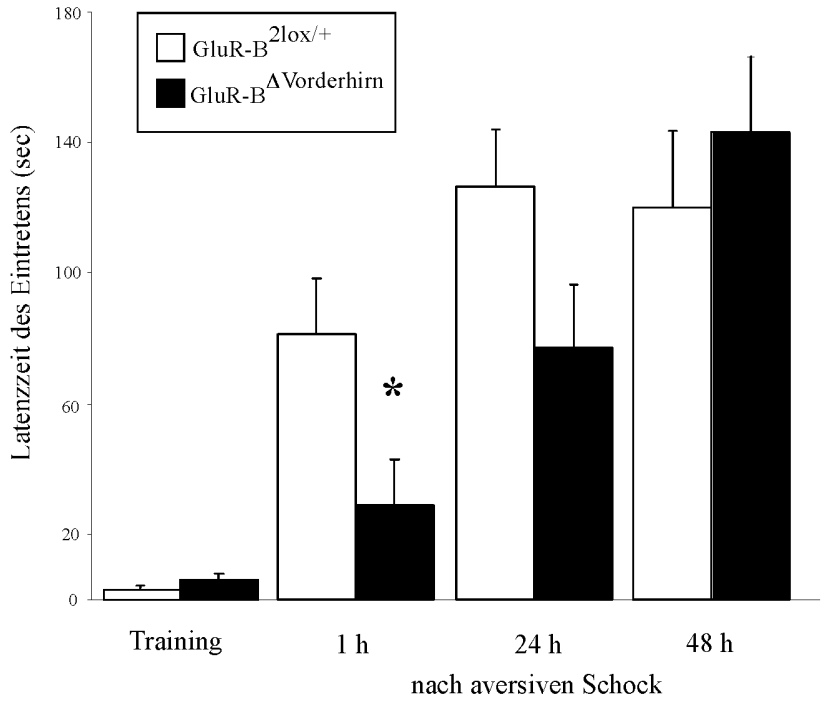

Abb. 17: Verhalten im Passiv-Vermeiden-Test von GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$- und GluR-B$^{2lox/+}$-Mäusen. Es wurde die Latenzzeit (sec) des Eintretens ins dunkle Kompartiment 1 h, 24h und 48 h nach Erhalt des aversiven Fußschocks gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Abweichung (±SEM) vom Mittelwert. Der Stern (*) gibt die Signifikanz ($P<0,05$) an.

2.5.5 Schnelleres und präziseres Unterscheiden verschiedener Geruchsstoffe der GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$-Mäuse im Geruchs-Test

Der Geruchssinn der Maus nimmt eine dominante Position in der Wahrnehmung ihrer Umwelt ein. Die richtige Unterscheidung verschiedener Geruchspaare in einem olfaktorischen Test wird als Maß für korrektes Erlernen und Gedächtnisbildung herangezogen. In einem olfaktorischem Test, durchgeführt von Andreas Schäfer (Prof. Dr. B. Sakmann, MPI f. med. Forschung,, Abt. Zellphysiologie) wurde eine Maus, die über Nacht unter Wasserentzug stand, in einem sogenannten Olfaktometer (Abb.18) (Bodyak & Slotnick, 1999) trainiert, zwischen zwei Gerüchen zu unterscheiden.

Steckt die Maus ihren Kopf in den Geruchskasten mit der Wasserflasche, durchbricht sie eine Lichtschranke (Pfeil 1) und es wird ihr ein Geruch präsentiert (Pfeil 2). Beim Angebot des einen Geruches, dem positiven Stimulus (S+), wurde das Lecken (Pfeil 3) an der Wasserflasche mit ein paar Wassertropfen (Pfeil 4) belohnt und als korrekte Handlung notiert. Wurde aber der zweite Geruch präsentiert, der negative Stimulus (S-), so wurde ein Lecken nicht belohnt und als unkorrekte Entscheidung notiert. Leckte die Maus nicht und zog ihren Kopf gleich zurück, wurde das wiederum auch als korrekte Entscheidung festgehalten. Durch mehrfaches Trainieren in 200 Versuchsdurchführungen pro Tag (100 Ver-

suchsdurchführungen in einem Block) mit zwei Geruchspaaren konnte eine Lernkurve angelegt werden, die das Ansteigen der korrekten Entscheidungen über die Anzahl der Versuchsdurchführungen beschreibt (korrektes Erlernen [%]±SEM, n=Anzahl der Mäuse).

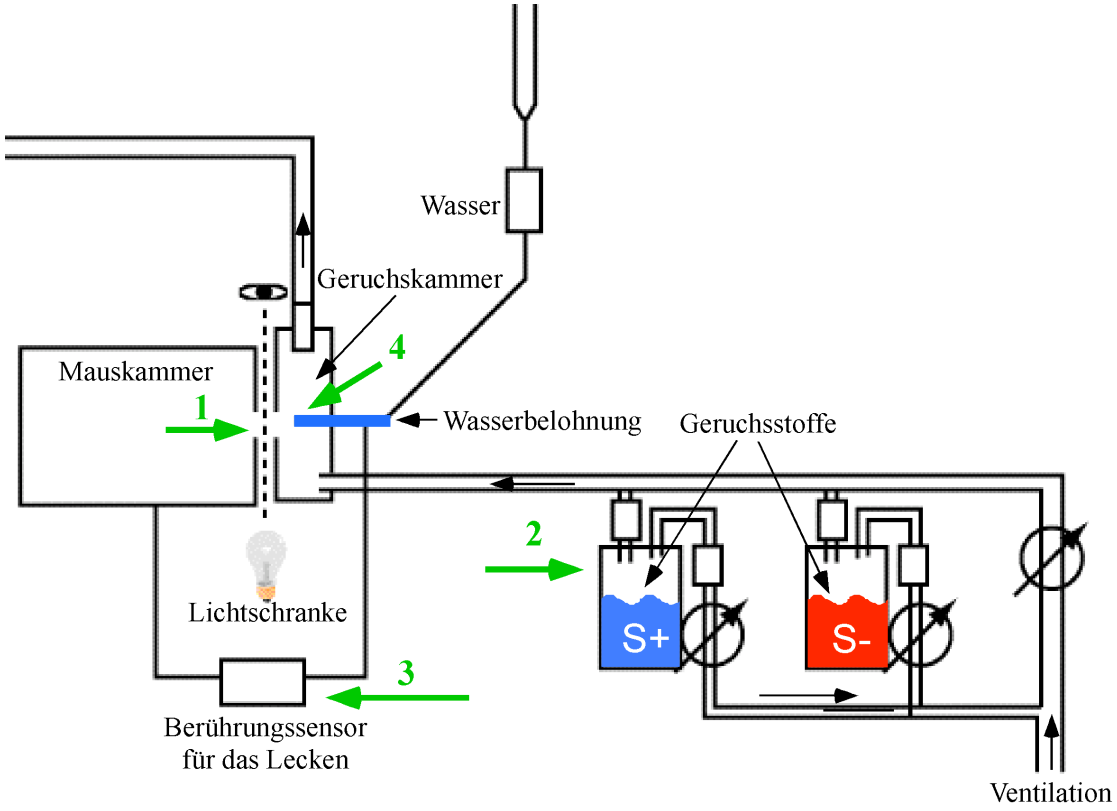

Abb. 18: Versuchsanordung des olfaktorischen Tests (Olfaktometer). Die nummerierten Pfeile geben den chronologischen Ablauf der Versuchsdurchführung an. In blauer Farbe ist der Geruchsstoff für den positiven (S+), in roter Farbe, den für den negativen Simulus (S-) angegeben.

Im Ofaktometer zeigten GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$-Mäuse gegenüber GluR-B$^{2lox/+}$-Kontrollmäusen einen deutlichen Unterschied in den Raten der richtigen Entscheidungen zwischen verschiedenen Geruchspaaren. Im Erlernen eines einfachen bzw. unähnlichen Geruchpaares (Amylacetat gegen Ethylbutyrat, Abb. 19A) waren GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$- (93 %±4, n=9) in den letzten 100 Versuchsdurchführungen signifikant ($P<0.01$) besser als GluR-B$^{2lox/+}$-Mäuse (84 %±6, n=9).

Zur Beschreibung des Lernverhaltens während des Versuchs wurde für die Lernkurve eines Individuums eine lineare Trendkurve berechnet. Dabei wurde der Anfangswert der Trendkurve auf den gemittelten Anfangswert aller Lernkurven (d.h. der ersten 100 Versuchsdurchführungen) fixiert. Somit ist die Steigung der Trendkurve der einzig variable Pa-

rameter und demnach die Steigung dieser Trendkurve ein Maß für den Zuwachs der Lernfähigkeit für ein Geruchspaar pro 100 Versuchsdurchführungen (Lernindex: Steigung der Lernkurve bzw. Zuwachs an Lernfähigkeit [in Prozentpunkte]/100 Versuchsdurchführungen±SEM, n=Anzahl der Mäuse).

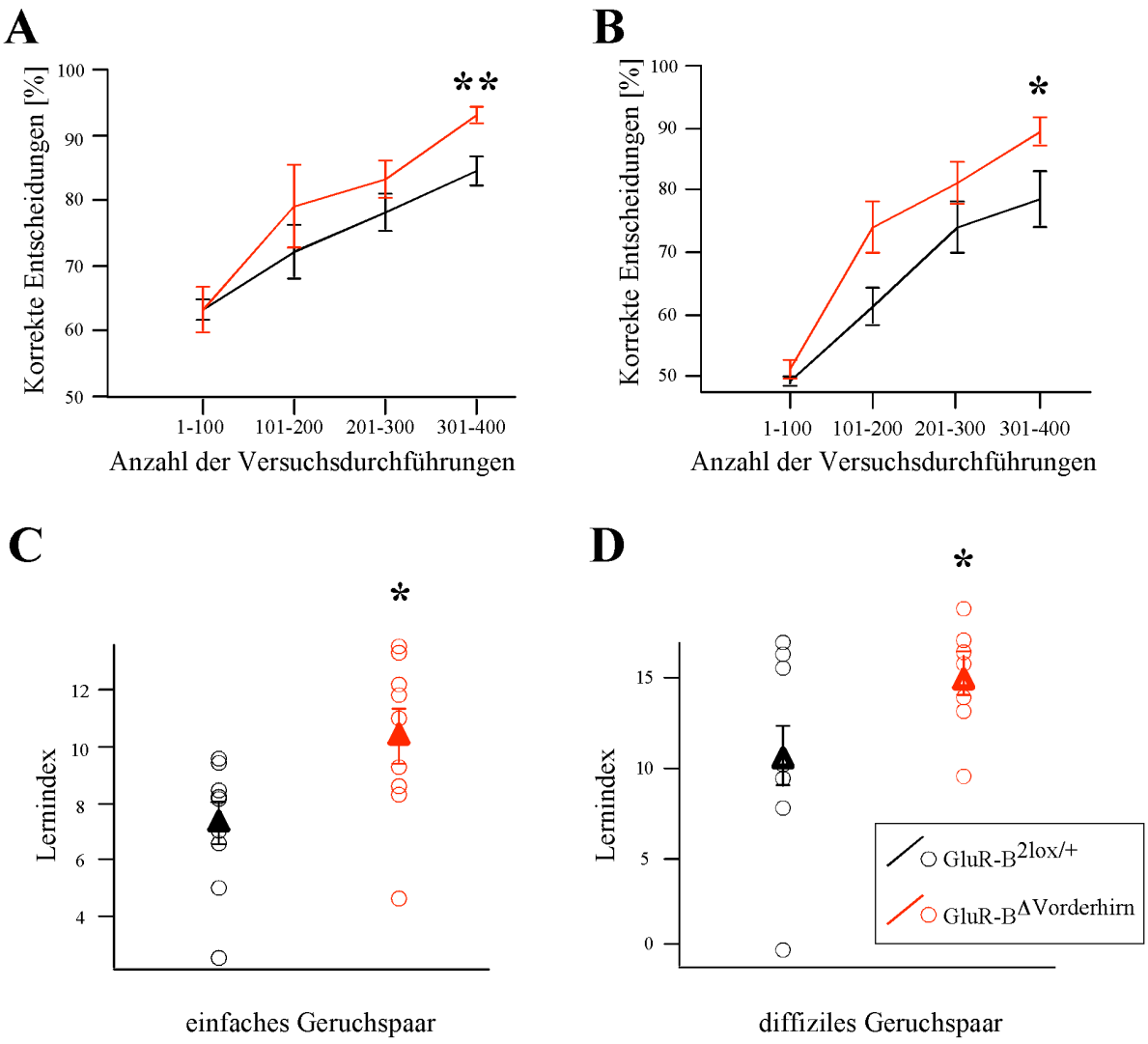

Abb. 19: Lernkurven und deren Steigungen für Geruchspaare im Olfaktometer von GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$- und GluR-B$^{2lox/+}$-Mäusen. A: Korrekte Entscheidungen (%) in vier Blöcken mit je 100 Versuchsdurchführungen bei Präsentation des einfachen Geruchspaares Amylacetat und Ethylbutyrat. B: Korrekte Entscheidungen (%) in vier Blöcken mit je 100 Versuchsdurchführungen bei Präsentation des diffizilen Geruchspaares (40/60- und 60/40-Mischungen von Cineol und Eugenol). C: Individuelle Verteilung der Lernindices (Zunahme der korrekten Entscheidungen [in Prozentpunkten] bzw. Trendgeraden-Steigungen der Lernkurven /100 Versuchsdurchführungen) für das einfache Geruchspaar. D: Individuelle Verteilung der Lernindices (Zunahme der korrekten Entscheidungen [in Prozentpunkten] bzw. Trendgeraden-Steigungen der Lernkurven /100 Versuchsdurchführungen) für das diffizile Geruchspaar. Die Fehlerbalken repräsentieren die Abweichung (±SEM) vom Mittelwert. Die Sterne (*) bzw. (**) geben die Signifikanzen (P<0,05) bzw. (P<0,01) an.

Es zeigte sich, daß GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$- (10.3±2.9, n=9) eine signifikant (P<0.05) bessere Lernfähigkeit (bzw. eine stärkere Steigung) in der Diskriminierung des einfachen Geruchspaares als GluR-B$^{2lox/+}$-Mäuse (7.3±2.3, n=9) besitzen (Abb. 19C).

Im Erlernen eines diffizilen bzw. ähnlichen Geruchpaares (40/60- gegen 60/40- Mischungen von Cineol und Eugenol) (Abb. 19B) zeigte sich ein ähnliches Bild. In den letzten 100 Versuchdurchführungen waren GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$-Mäuse (91 %±7, n=9) signifikant (P<0.05) besser im Erlernen des diffizilen Geruchpaares als GluR-B$^{2lox/+}$-Mäuse (80 %±15, n=9). Auch die gemittelte Trendkurven-Steigung der Lernkurven individueller GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$-Mäuse (15±3, n=9) zeigte ein signifikant (P<0.05) höhere Lernfähigkeit als GluR-B$^{2lox/+}$-Mäuse (11±5, n=9) (Abb. 19D).

2.5.7 Die Effizienz des Erinnerungsvermögens deklarativer Geruchsstoffe ist abhängig von der verbliebenen Menge an GluR-B-Untereinheiten im Gehirn konditionaler GluR-B-Mutanten

Zur Erfassung des Erinnerungsvermögens wurden den Mäusen im Olfaktometer innerhalb einer Trainingsphase eines dritten Geruchspaares (Pelargonsäure gegen Valeronsäure) erneut das bekannte Geruchspaar Ethylbutyrat und Amylacetat unbelohnt dargeboten und die korrekten Entscheidungen festgehalten (korrekte Entscheidungen bzw. korrekte Erinnerung [%]±SEM, n=Anzahl der Mäuse) (Abb. 20A). Es konnte gezeigt werden, daß GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$-Mäuse (69 %±16, n=9) in ihrem Erinnerungsvermögen signifikant (P<0,05) gestört, wohingegen GluR-B$^{2lox/+}$-Mäuse nicht beeinträchtigt waren (86 %±8, n=9). Analysiert man die individuelle Verteilung des korrekten Erinnerungsvermögens bzw. der korrekten Entscheidungen von GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$-Mäusen ist eine Aufspaltung zu beobachten. Es existieren Mäuse, die keine, eine leichte und eine starke Beeinträchtigungen in ihrem Erinnerungsvermögen aufwiesen.

Immunfluoreszenz-Analysen von Vibratom-Schnitten mit einem GluR-B-Antikörper von verschiedenen Mäusen mit unterschiedlichen Erinnerungsvermögen zeigten einen deutlichen Unterschied in der Fluoreszenzintensität von GluR-B in den Hirnregionen, die im olfaktorischen Dedächtnis eine wichtige Rolle spielen. Mäuse mit einer schlechten Leistung im Gedächtnistest wiesen eine verminderte GluR-B-Immunfluoreszenz im entorhinalen Cortex, in der Amygdala, im Hippocampus und im olfaktorischen Cortex auf, während bei Mäusen mit besserem Erinnerungsvermögen mehr GluR-B detektiert wurde (Abb. 20B).

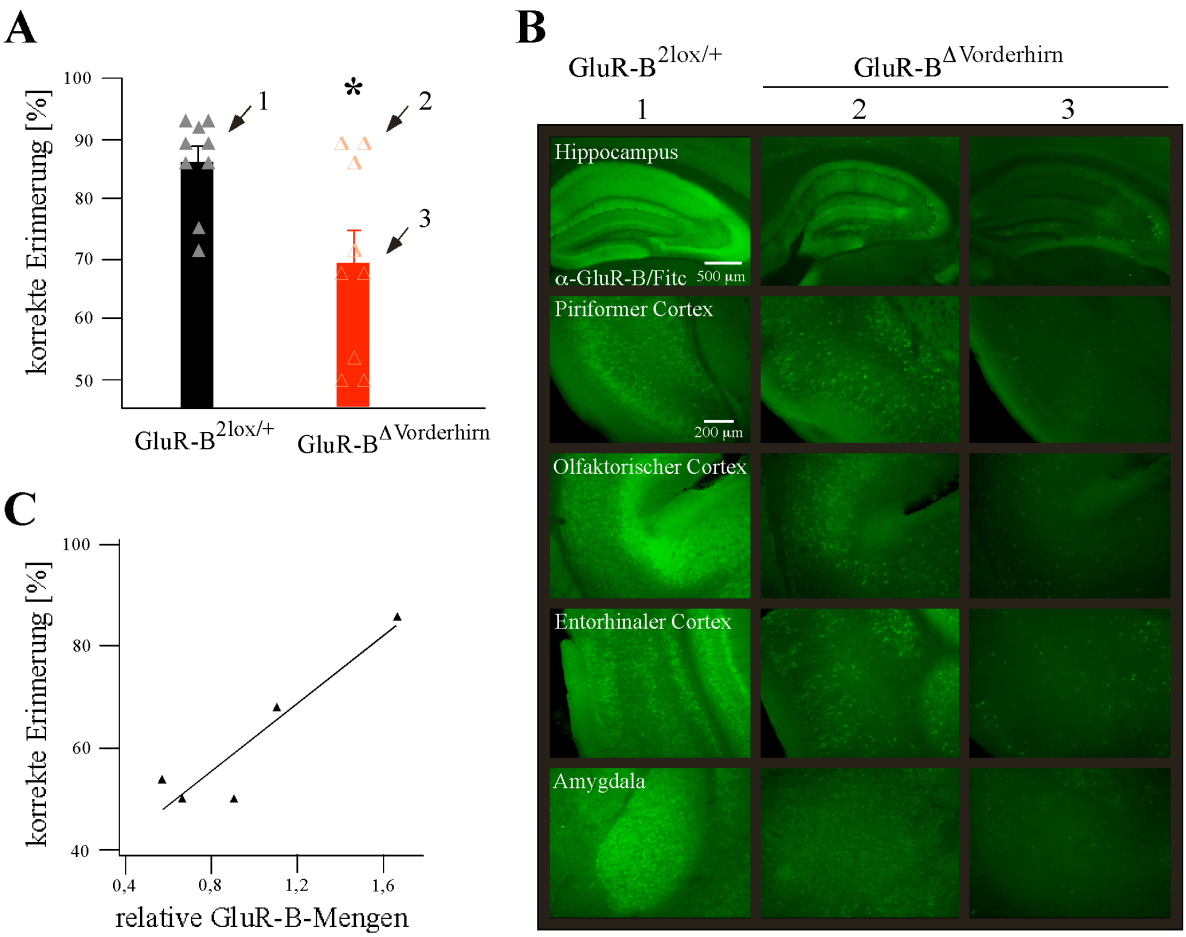

Abb. 20: Korrelation zwischen Erinnerungsvermögen im Olfaktometer und GluR-B-Menge in bestimmten Gehirnbereichen von GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$-Mäusen. A: Erinnerungsvermögen (%) für ein bekanntes Geruchspaar (Amylacetat und Ethylbutyrat) im Olfaktometer. Dreiecke kennzeichnen individuelle GluR-B$^{2lox/+}$- (schwarze Dreiecke) und GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$-Mäusen (rote Dreiecke). Die schwarzen Pfeile und Ziffern geben die Mäuse an, die für weitere Immunfluoreszenz-Untersuchungen verwendet wurden. B: Immunfluoreszenz-Untersuchungen gegen GluR-B an Vibratom-Schnitten von Individuen mit bekanntem Erinnerungsvermögen im Olfaktometer (α-GluR-B/Fitc, grün). C: Korrelationsgraph zwischen Erinnerungsvermögen bzw. Korrekter Erinnerung (%) im Olfaktometer und verbliebener GluR-B-Menge im Hippocampus (Lineaeität: R=0,94; Signifikanz: P<0,05). Zur Quantifikation der GluR-B-Mengen wurden Proteine aus Hippocampus-Gewebe isoliert und in Immunoblots mit einem GluR-B-Antikörper detektiert. Angegeben sind die relativen Mengen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Abweichung (±SEM) vom Mittelwert. Die Sterne (*) geben die Signifikanz (P<0,05) an.

Zur Ermittlung einer Korrelationskurve wurden quantitative Immunoblots verschiedener GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$-Individuen mit den jeweiligen korrekten Erinnerungen (%) korreliert (Abb. 20C). In Immunoblots von Hippocampi und Bulbus olfactorii GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$-Mäuse wurden die relativ verbliebene Menge an GluR-B quantitativ erfaßt, in einem Graph gegen das Erinnerungsvermögen aufgetragen und eine Trendkurve ermittelt. Diese Trendkurve

(hier von Immunoblots hippokampaler Ptoteine) wies eine hohe Linearität auf (R=0,94) und erbrachte eine signifikante (P<0,05) Korrelation zwischen verbliebener GluR-B-Menge und gemessenen Erinnerungsvermögen im Olfaktometer.

2.6 Sexualverhalten und GnRH-Sekretion von GluR-B$^{\Delta Hypothalamus}$-Mäusen

Die hypothalamischen, neurosekretorischen GnRH-Neurone und ihre pulsatile, Ca^{2+}-vermittelte Ausschüttung des Decapeptids GnRH nehmen eine Schlüsselrolle in der sexuellen Entwicklung und Fortpflanzung ein. Eine Veränderung der AMPAR-vermittelten Signaltransduktion bzw. Ca^{2+}-Permeabilität durch GluR-B-Verlust in GnRH-Neuronen und anderen hypothalamischen Neuronen (GluR-B$^{2lox/2lox}$/Tg^{GniCre} bzw. GluR-B$^{\Delta Hypothalamus}$) könnte Hinweise auf deren pulsatilen Eigenschaften erbringen.

2.6.1 GluR-B wird in hypothalamischen Neuronen und GnRH-Neuronen exprimiert

Für eine Untersuchung der GluR-B-Expression in GnRH-Neuronen wurden elektrophysiologische (durchgeführt von Dr. Daniel J. Spergel, MPI f. med. Forschung, Abt. Molekulare Neurobiologie) und immunhistologische Analysen unternommen. Studien ergaben geringe AMPAR-vermittelte Ströme in elektrophysiologischen Analysen der GnRH-Neurone (Spergel et al., 1999). Die Anwesenheit der GluR-B-Untereinheit kann durch Aufnahme einer AMPAR-vermittelten Strom/Spannungskurve ermittelt werden (Burnashev et al., 1992).

Für die folgenden elektrophysiologischen Studien wurden Tg$^{GnRH.hGFP2}$-Mäuse verwendet, die spezifisch GFP unter der Kontrolle des zuvor erwähnten 3500 bp GnRH-Promoterfragments in GnRH-Neuronen exprimieren (Spergel et al., 1999). Eine Glutamat-Applikation an akuten Schnitten von Tg$^{GnRH.hGFP2}$-Mäusen zeigte eine lineare Relation der Strom/Spannungskurve, was auf eine Beteiligung der GluR-B-Untereinheit in AMPA-vermittelter Ströme schließen läßt (Abb. 21E). Auch immunhistologische Kolokalisations-Analysen mit Antikörpern gegen GnRH (TexasRed, rot) und GluR-B (Fitc, grün) an Vibratom-Schnitten zeigten eine sehr schwache GluR-B-Färbung in GnRH-Neuronen (Abb. 21B) in konfokalen Mikroskopieaufnahmen. Tg^{GniCre}-Mäuse wiesen in der zweiten Population der hypothalamischen Neuronen im SM und SL eine starke, mit Cre (TexasRed, rot) kolokalisierte Expression von GluR-B (Fitc, grün) auf (Abb. 21A). Zur Untersuchung der erfolgten GluR-B-Deletion im Hypothalamus von GluR-B$^{\Delta Hypothalamus}$-Mäusen wurden

Vibratom-Schnitte mit einem Antikörper gegen GluR-B und mit einer anschließenden DAB-Färbung behandelt.

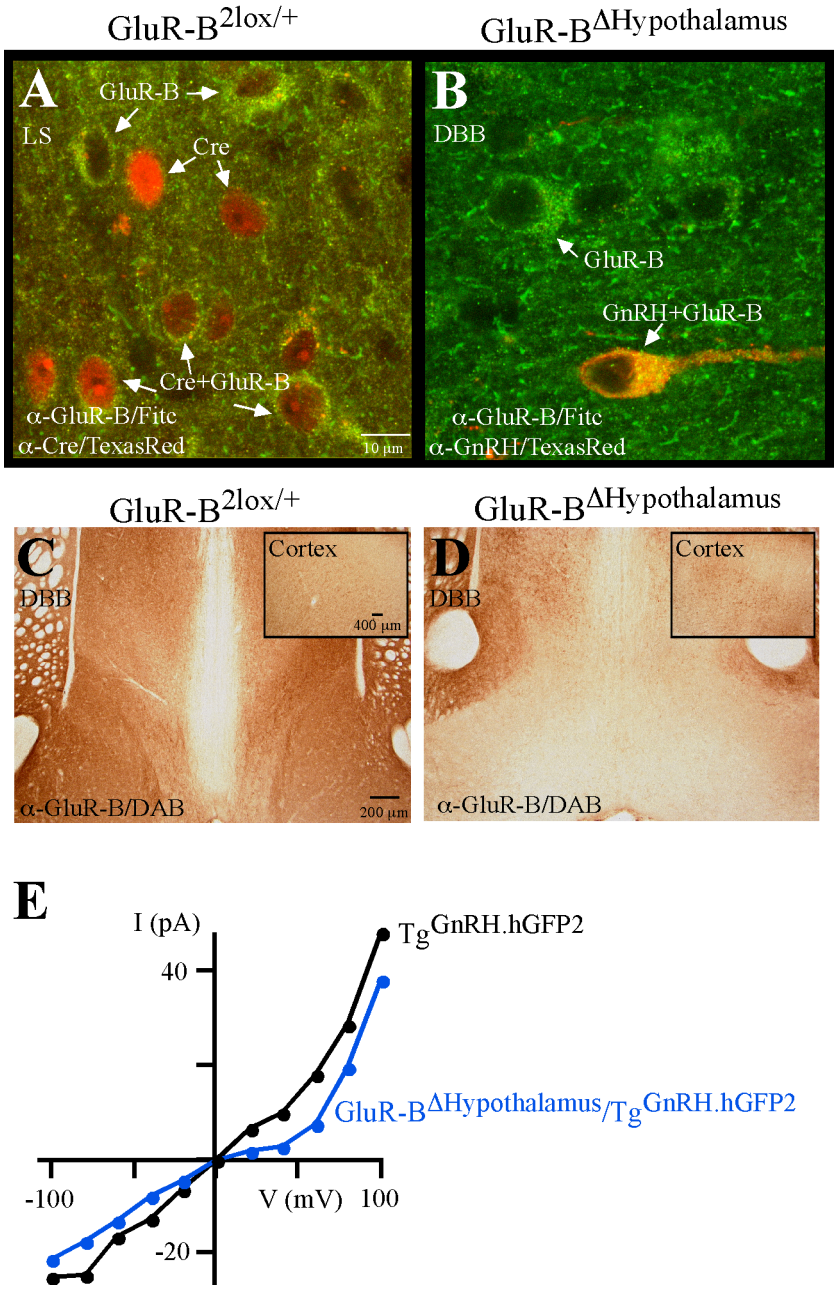

Abb. 21: Immunhistologische und elektrophysiologische Analysen zur Bestimmung der GluR-B- Expression bzw. -Deletion in GnRH-Neuronen und hypothalamischen Neuronen. A: Konfokale Aufnahme von fluoreszenzhistologischen Kolokalisationsuntersuchungen an Vibratom-Gewebeschnitten im L von Tg^{GniCre}-Mäusen mit Antikörpern gegen Cre bzw. GluR-B mit Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern TexasRed (rot) bzw. Fitc (grün). B: Konfokale Aufnahme von fluoreszenzhistologischen Kolokalisationsuntersuchungen an Vibratom-Gewebeschnitten im DBB von Tg^{GniCre}-Mäusen mit Antikörpern gegen GnRH bzw. GluR-B mit Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern TexasRed (rot) bzw. Fitc (grün). C: Immunhistologische Analysen an Vibratom-Gewebeschnitten von GluR-$B^{2lox/+}$-Mäusen mit einem Antikörper gegen GluR-B und einer Färbung mit DAB. Das Bild-im-Bild zeigt einen Cortexbereich. D: Immunhistologische Analysen an Vibra-

tom-Gewebeschnitten von GluR-B$^{\Delta Hypothalamus}$-Mäusen mit einem Antikörper gegen GluR-B und einer Färbung mit DAB. Das Bild-im-Bild zeigt einen Cortexbereich. E: AMPAR-vermittelte Strom/Spannungskurve nach Glutamat-Applikation von GluR-B$^{2lox/2lox}$/Tg$^{GnRH.hGFP2}$- (schwarz) und GluR-B$^{\Delta Hypothalamus}$/Tg$^{GnRH.hGFP2}$-Mäusen (blau) in GnRH-Neuronen mit gemessener Stromstärke I (nA) bei verschiedenen Haltepotentialen V (mV).

Auch in elektrophysiologischen Untersuchungen mit Glutamat-Applikation bei akuten Schnitten von GluR-B$^{\Delta Hypothalamus}$/Tg$^{GnRH.hGFP2}$-Mäusen wurde eine Rektifizierung der Strom/Spannungskurve bei positiven Haltespannungen in GnRH-Neuronen beobachtet (blau) (Abb. 21E), was ein Hinweis auf den Wegfall der GluR-B-Untereinheit ist (Bunashev et al., 1992), während GluR-B$^{2lox/+}$/Tg$^{GnRH.hGFP2}$-Mäuse eine lineare Strom/Spannungskurve zeigten (schwarz) (Abb. 21E).

2.6.2 Männliche GluR-B$^{\Delta Hypothalamus}$-Mäuse zeigten kein verändertes GnRH-Sekretionsprofil

Von männlichen GluR-B$^{\Delta Hypothalamus}$ Mäusen (Alter: 4-13 Monate) wurden GnRH-Sekretions-Profile bestimmt. Hiefür wurden akute Schnitte angefertigt und in einer Sekretionskammer plaziert. Es wurde mit einer Normal-Ringer-Lösung eine Perifusion der Schnitte im 37°C-Wasserbad durchgeführt und alle 15 min Fraktionen gesammelt. Zur Kontrolle der Schnittqualität erfolgte am Ende der basalen Sekretion eine Induktion maximaler GnRH-Ausschüttung durch Stimulation mit einer 37,5 mM K^+-Lösung. Anschließend erfolgte eine Detektion der GnRH-Mengen in den Fraktionen durch eine Radio-Immuno-Analyse mit Duplikat-Messungen mit einem Antikörper gegen GnRH (R1245). Auftragung der GnRH-Menge über die Zeit ergab einen Graph, der die pulsatile GnRH-Ausschüttung wiederspiegelte (Abb. 22).

Es wurde kein Unterschied im Sekretionsprofil zwischen männlichen GluR-B$^{\Delta Hypothalamus}$-Mäuse und der Kontrollgruppe (GluR-B$^{2lox/+}$) beobachtet. Mit Hilfe des Cluster-Programmes wurden die auftretenden GnRH-Pulse im Sekretionsgraphen ermittelt. Es konnten keine Veränderungen in der Puls-Amplitude (Δpg/ml; ±SEM; n=Anzahl der Mäuse) (P=0,32) bzw. in der Puls-Frequenz (Pulse/Stunde; ±SEM; n=Anzahl der Mäuse) (P=0,54) bei GluR-B$^{\Delta Hypothalamus}$-Mäusen (2,03±0,36; n=7 bzw. 0,21±0,08; n=7) im Vergleich zu Kontroll-Geschwistermäuse GluR-B$^{2lox/+}$ (1,42±0,01; n=4 bzw. 0,15±0,08, n=4) ermittelt werden.

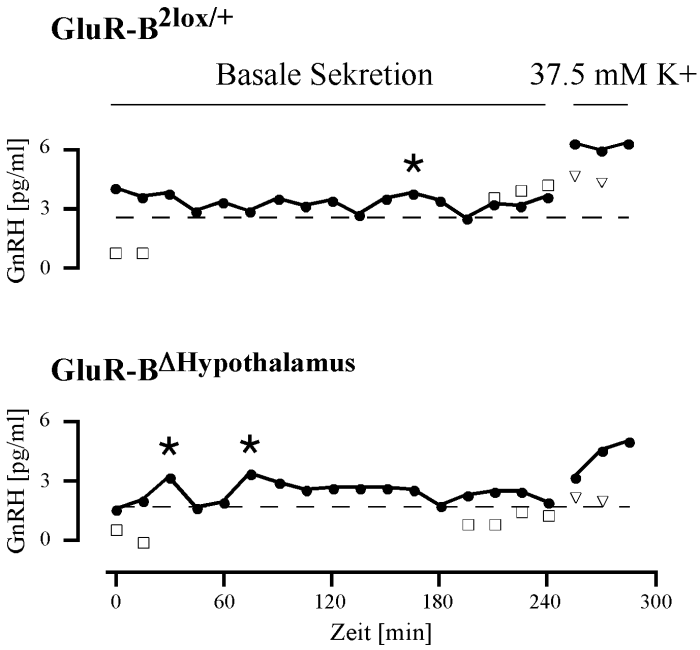

Abb. 22: GnRH-Sekretionsprofil von GluR-$B^{2lox/+}$- und GluR-$B^{\Delta Hypothalamus}$- Mäusen. An akuten Schnitten (600 µm) wurde die basale GnRH-Sekretion und die durch 37,5 mM K^+-induzierte, maximale GnRH-Ausschüttung in einer Radio-Immuno-Untersuchung in 15 min Schritten bestimmt (GnRH (pg/ml)). Die gestrichelte Linie gibt die Detektionsgrenze an. Geschlossene Kreise: Fraktionen (alle 15 min) der Sekretionslösung; Offene Rechtecke: Kontrolllösung ohne GnRH; Offene Dreiecke: 37,5 mM K^+-Kontrolllösung ohne GnRH. Die Sterne (*) geben die detektierten GnRH-Pulsamplituden an.

2.6.3 Männliche Mäuse mit GluR-B-Verlust in hypothalamischen Zellen und GnRH-Neuronen sind beeinträchtigt in ihrem Paarungs- und Aggressions-Verhalten

Die AMPAR-Untereinheit GluR-B ist wahrscheinlich an der Reproduktion bei Mäusen beteiligt, da männliche Mäuse mit einem kompletten Verlust der GluR-B-Untereinheit in ihrem Paarungsverhalten und ihrem sexual Verhalten stark beeinträchtigt sind; die Fertilität weiblicher GluR-B-"knockout"-Mäuse muss noch bestimmt werden. Verpaarungen zur Fertilitätskontrolle von 12 männlichen hypothalamisch-spezifischen GluR-B-defizienten Mäusen mit Wildtyp-Weibchen zeigten eine deutliche Beeinträchtigungen; keines der Wildtyp-Weibchen wurde geschwängert. Weibliche GluR-$B^{\Delta Hypothalamus}$-Mäuse hingegen zeigten keine Beeinträchtigung ihrer Fertilität, da bei allen 10 Weibchen Schwangerschaften auftraten. Genauere Untersuchungen sechs männlicher GluR-$B^{\Delta Hypothalamus}$-Mäuse mittels 24-stündiger Videobeobachtung zeigten eine Unterlassung des sexual Verhaltens gegenüber Wildtyp-Weibchen; es unterblieb das Besteigen des Weibchens (Abb. 23D), wohingegen aber das ano-genitale Beschnuppern erfolgte (Abb. 23C).

Gegenüber männlichen Wildtyp-Eindringlingen zeigten GluR-B-defiziente Mäuse keinerlei Aggressivität (n=9) (Abb. 23E). Während die Wildtyp-Männchen ihr Revier verteidigten und das andere Männchen als Eindringling angriffen, verhielten sich GluR-$B^{\Delta Hypothalamus}$-

Mäuse ruhig und friedfertig. Zur Erfaßung lokomotorischer Beeinträchtigungen wurde der Offene-Feld-Test angewendet (Abb. 23A). Hiefür wird die horizontale Bewegung (Gesamtwegstrecke (cm±SEM, n=Anzahl der Mäuse) und Bewegungsmuster) einer Maus innerhalb von 5 min in einer abgegrenzten, $1m^2$ großen Fläche bestimmt. Es konnte kein Unterschied in der horizontalen Bewegungs-strecke und -muster von GluR-$B^{\Delta Hypothalamus}$-Mäusen (1735 cm±169, n=6) im Vergleich zu GluR-$B^{2lox/+}$ (1735 cm±143; n=6) beobachtet werden. Zur Untersuchung der Muskelstärke wurde ein Test, bei dem die Vorderpfoten-Griffstärke in [N] von Mäusen analysiert, verwendet (Abb. 23B). Nachdem die Maus mit ihren Vorderpfoten einen Metalgriff umklammert hat, wurde sie solange am Schwanz gezogen bis sie losläßt. Eine Muskelschwäche konnte bei GluR-$B^{\Delta Hypothalamus}$- (1,5 N±0,1; n=6) im Vergleich zu GluR-$B^{2lox/+}$-Mäusen (1,7 N±0,2; n=6) nicht beobachtet werden.

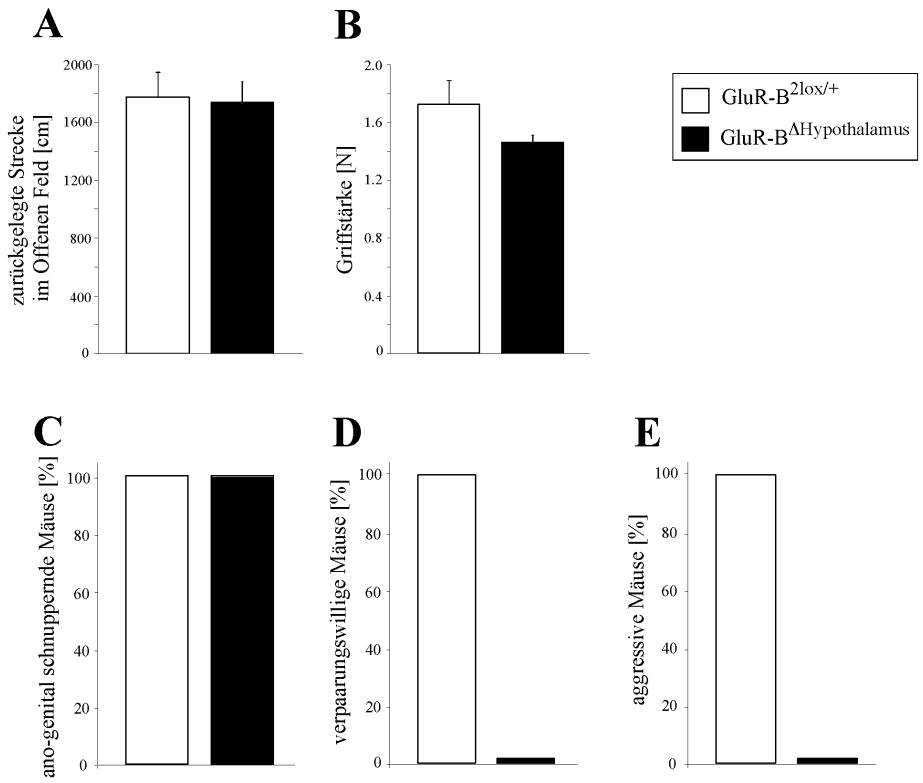

Abb. 23: Untersuchungen der lokomotorischen Aktivität, der Muskelstärke, des Sexual- und Aggressionsverhaltens von GluR-$B^{2lox/+}$- und GluR-$B^{\Delta Hypothalamus}$-Mäusen. A: Bestimmung der lokomotorischen Aktivität [cm] im Offenen-Feld-Test. B: Bestimmung der Vorderpfoten-Griffstärke [N]. C: Bestimmung der Mauszahl (%) in einer 24-stündigen Videobeobachtung, die ein ano-genitales Beschnuppern an Wildtyp-Weibchen durchführten. D: Bestimmung Mauszahl (%) in einer 24-stündigen Videobeobachtung, die ein Besteigen des Wildtyp-Weibchens zeigten. E: Bestimmung der Mauszahl (%) in einem 5-minütigen Eindringlingstest, die ein aggressives Verhalten wie Schwanzzittern, Beißen und Kämpfen gegenüber dem Eindringling bzw. dem Fremdling zeigten.

3. Diskussion

In dieser Studie wurde die Beteiligung der AMPAR-Untereinheit GluR-B bei Lernprozessen, Sexualverhalten und Epilepsien dokumentiert. Dazu wurden Mäuse mit Vorderhirn-spezifischer Expression uneditierter GluR-B(Q)-Untereinheiten und Mäuse ohne GluR-B-Untereinheit im Vorderhirn oder in GnRH-Neuronen untersucht.

3.1 Cre-vermittelte Genmodifikationen in Mäusen

Es wurden verschiedene transgene Mauslinien untersucht, die Cre mittels unterschiedlicher CamKII-Promoter-Fragmente ($Tg^{sCam.Cre2}$, $Tg^{sCam.Cre3}$ [400 bp] und $Tg^{Cam.Cre4}$ [Tg^{Cre4}, 8 kbp]: Mantamadiotis et al., 2002) und eines 3.5 kbp GnRH-Promoterfragments exprimieren (Tg^{GniCre} bzw. $Tg^{GnRH.iCre}$: Shimshek et. al, 2002). Die Cre-Aktivität wurde mit der Cre-Indikatorlinie R26R ($Rosa26^{R26R}$: Soriano, et al., 1999) nachgewiesen. Die $Tg^{sCam.Cre2}$-Linie zeigte trotz fehlendem Cre-Protein im adulten Tier Cre-Aktivität im Hippocampus, Cortex und der Amygdala, was durch Cre-Expression während der Gehirnentwicklung erklärt werden könnte. Bei der $Tg^{sCam.Cre3}$-Linie war hingegen eine starke Cre-Expression im ganzen Gehirn, inklusive des Hirnstamms, und bei den Mäusen der Tg^{Cre4}-Linie eine vorderhirnspezifische Cre-Expression und -Aktivität zu beobachten. Allerdings wurden bei der Analyse zahlreicher Tiere der Tg^{Cre4}-Linie zwei bis drei unterschiedliche Cre-Expressionsmuster nachgewiesen. Diese konnten nicht durch Instabilität des Transgens erklärt werden, denn alle Tiere hatten nachweislich das gleiche Integrationsmuster des Cam.Cre4-Transgens. Auch war eine biologische Selektion der einzelnen Cre-Expressionsmuster nicht möglich, da nach Verpaarung definierter Tg^{Cre4}-Sublinien bei den Nachkommen immer wieder die zwei bis drei bekannten Expressionsmuster auftraten. Somit ist die individuell unterschiedliche Ausprägung des Transgens der Tg^{Cre4}-Linie mit großer Wahrscheinlichkeit in einer epigenetischen Regulation des Transgens zu suchen.

3.2 Vorderhirn-spezifische GluR-B(Q)-Expression

3.2.1 GluR-B(Q)-Expression bei adulten Mäusen induziert Epilepsie

Es ist bekannt, daß ubiquitäre GluR-B(Q)-Expression bei jungen Mäusen zu epileptischen Anfällen mit Todesfolge zwischen P20 und P30 führt (Brusa et al., 1995; Feldmeyer et al., 1999). Mittles der Tg^{Cre4}-Linie konnte die GluR-B(Q)-Expression von GluR-$B^{+/neo}$-Mäusen

auf vorderhirnspezifische Regionen begrenzt werden (GluR-$B^{+/\Delta ECS}/Tg^{Cre4}$ wird als GluR-$B^{\Delta ECS:Vorderhirn}$ bezeichnet), wodurch neonatal tödliche, epileptische Anfälle verhindert und adulte Mäuse mit chronischer Epilepsie generiert wurden. Etwa 40 % der GluR-$B^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäuse überlebten P60, während die restlichen vorher auf Grund spontan epileptischer Anfälle starben. Diese Aufspaltung ist auf das Cre-Expressionsmuster der Cre4-Linie zurückzuführen; eine frühe Cre-Expression führte zu frühzeitigen epileptischen Anfällen und zum Tod, während eine spätere Cre-Expression das Überleben der Tiere gewährleistete. Aber auch in den ausgewachsenen Tieren wurde in Video- und EEG-Beobachtungen klinische und subklinische epileptische Anfälle und interiktale, myoklonische und tonisch-klonische EEG-Muster nachgewiesen, die auf eine Temporallappenepilepsie der GluR-$B^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäuse schließen lassen. Eine Rolle der uneditierten GluR-B-Untereinheit in der humanen Epilepsie ist umstritten. Bisher wurden im Hippocampus epileptischer Patienten, mit Ausnahme zweier junger Patienten (Grigorenko et al., 1998), keine uneditierten GluR-B-Transkripte gefunden (Kortenbruck et al., 2001).
Die Ergebnisse weisen auf eine direkte Beteiligung von GluR-B(Q) bei der Ausprägung der Epilepsie im GluR-B(Q)-Mausmodell hin. Durch die späte GluR-B(Q)-Expression können entwicklungsbedingte Einflüße derselben als Ursache der neonatalen Epilepsie ausgeschlossen werden.

3.2.2 Pyramidenzellen im Hippocampus adulter Mäuse bleiben durch GluR-B(Q)-Expression unverändert

In der GluR-B(Q)-vermittelten neonatalen Epilepsie war es nicht möglich morphologische Auswirkungen der GluR-B(Q)-Expression bzw. der Epilepsie im Detail zu analysieren. Eine grobe Analyse wies nicht auf anatomische Veränderungen des Gehirns und hippokampaler Neurone hin und die H/E-positiven Zellen in der CA3-Region wurden als Folgeerscheinungen der Epilepsie bewertet. Auch Experimente mit jungen Ratten, die auf Kainat-Injektionen sehr empfindlich mit Status epilepticus reagieren, zeigten fast keine hippokampalen Zellschädigungen (Holmes and Thomson, 1988; Friedman et al., 1997). Gleichfalls wurde keine anfallsbedingte GluR-B-Reduktion im Hippocampus junger Kainat-induzierter Ratten beobachtet (Friedman et al., 1997). Bei adulten, spontan epileptischen GluR-$B^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen wurde ebenfalls kein Zelltod und Verlust von Pyramidalneuronen im Hippocampus in H/E- und Nissl-Färbungen beobachtet, obwohl eine Reduktion des GluR-B-Proteins im Hippocampus vorlag. Im Gegensatz dazu wurde bei Kainat-behandelten,

adulten Ratten mit Status epilepticus Zelltod im Hippocampus beschrieben, dem eine Reduktion der GluR-B-mRNA (Pollard et al., 1993; Friedman et al., 1994) und der GluR-B-Untereinheit (Grooms et al., 2000; Friedman et al., 1998) in CA1- und CA3-Pyramidalzellen voranging, die zu einem Anstieg Ca^{2+}-permeabler AMPAR führen sollte. Ebenso zeigten "knockdown"-Experimente mit GluR-B-Gegenstrang-Oligonukleotiden eine verzögerte Neurodegeneration von pyramidalen CA1- und CA3-Neuronen (Oguro et al., 1999). Allerdings konnten die Analysen der adulten spontan epileptischen GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäuse diesen Zusammenhang zwischen dem Auftreten Ca^{2+}-permeabler AMPAR und deren Toxizität auf Pyramidalneuronen des Hippocampus nicht bestätigen, obwohl zusätlich zu einer Expression uneditierter GluR-B(Q)-Untereinheiten (25 % auf RNA-Ebene) eine Reduktion der GluR-B-Untereinheit im Hippocampus (43 % auf Protein-Ebene) bei GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen auftrat.

3.2.3 GluR-B(Q)-Expression löst reaktive Astrozytose aus

Obwohl bei GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen keine Neurotoxizität nachweisbar war, konnte bei den Tieren eine starke reaktive Gliose im Hippocampus, Cortex und in der Amygdala aufgezeigt werden. Besonders in cortikalen Regionen wurden bei GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen vermehrt GFAP-positive Zellen beobachtet. Dies wirkt sich auch phänotypisch, ähnlich den Mausmodellen mit Neurodegenerationen und Gliose, durch die Ausbildung eines "Klammer-Reflexes" - ein atypisches Klammern der Hinterpfoten - aus. Da Astrozyten extrazelluläre Ionen-Konzentrationen, Neurotransmitter und pH-Werte zur Aufrechterhaltung der neuronalen Erregbarkeit regulieren (Montgomery, 1994; Lux et al., 1986; Walz, 1989; Newman, 1984; Ballanyi et al., 1987) und eine Störung ihrer Funktion zu einer Akkumulation von extrazellulären K^+-Ionen und damit zu einer erhöhten neuronalen Exzitation führt (Lux et al., 1986; Ballanyi et al., 1987; Janigro et al., 1997), könnte das vermehrte Auftreten GFAP-positiver Zellen im Gehirn von adulten GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen mit einem Anstieg extrazellulärer K^+-Ionen bedingt durch die erhöhte neuronale Erregung in Zusammenhang stehen. Der erhöhten K^+-Ionen-Konzentration im extrazellulären Raum von GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen, hervorgerufen durch die neuronale Übererregbarkeit und epileptischen Entladungen, wird scheinbar durch einen Anstieg von Gliazellen entgegengewirkt.

3.2.4 GluR-B(Q)-Expression führt zu "Mossy Fiber Sprouting"

Die Übererregbarkeit adulter, epileptischer GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäuse macht sich auch durch eine dreifach erhöhte axonale Innervierung der inneren Molekurarschicht des GD ("Mossy Fiber Sprouting") bemerkbar. Diese Umorganisierung der Axone von Körnerzellen in die innere Molekularschicht des GD ist auch für Patienten mit Temporallappenepilepsie charakteristisch (Mathern et al., 1996; Franck et al., 1995), und war bei Ratten und Mäusen mit Kainat-induziertem Status epilepticus und chronischen, epilpetischen Anfällen zu beobachten (Buckmaster & Dudek, 1997a; b; Zhang et al., 2002; Buckmaster et al., 2002; Gorter et al., 2001; Wenzel et al., 2000). Normalerweise projizieren die Axone der Körnerzellen des GD auf die CA3-Region und auf Zellen im Hilus und etablieren dort synaptische Verbindungen mit exzitatorischen bzw. inhibitorischen Neuronen. Das Auftreten aberranter Körnerzellaxone könnte mit eliminierten synaptischen Verknüpfungen im Hilus, Umorganisation der Axone und Etablierung neuer Zellkontakte in der Körnerzellschicht oder der inneren Molekularenschicht erklärt werden, da extensive Zellverluste im Hilus des Hippocampus in Korellation zum Umfang des "Mossy Fiber Sproutings" stehen (Ben-Ari, 1985; Babb et al., 1991; Buckmaster & Dudek, 1997; Gorter et al., 2001). Unklar ist allerdings, ob das "Mossy Fiber Sprouting" zu einer verstärkten Exzitation oder Inhibition führt. Einerseits ergaben Studien, daß axonal reorganisierte Moosfasern mit inhibitorischen Interneuronen in Kontakt treten (Sloviter, 1992; Kotti et al., 1997) und somit eine rückläufige Inhibition der Körnerzellen verstärken, andererseits könnten die umorganisierten Moosfaseraxone synaptische Verbindungen mit Körnerzellen im GD eingehen (Frotscher & Zimmer, 1983; Babb et al., 1991; Okazaki et al., 1995; Wenzel et al., 2000) und somit ein rückläufig exzitatorisches Netzwerk bilden, daß durch positive Rückkopplungen zwischen Körnerzellen epileptische Aktivitäten generieren kann (Buckmaster et al., 2002; Wuarin & Dudek, 2001; Buckmaster et al., 2002). Zusätzlich wurde gezeigt, daß synaptische Zn^{2+}-Ausschüttungen von umorganisierten Moosfaserendigungen $GABA_A$-abhängige Inhibition in der Körnerzellschicht und der inneren Molekularenschicht blockieren (Buhl et al., 1996; Shumate et al., 1998), und durch aberrante Moosfasern die NMDAR- und AMPAR-Niveaus erhöht sind (Mikuni et al., 2000, 1998; Mathern et al., 1998; Babb et al., 1996). Letzteres wurde bei GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen nicht bestätigt. In Immunoblots hippokampaler Gesamtproteine war die NMDAR-Untereinheit NR2A um 50% und die AMPAR-Untereinheit GluR-B um 40% reduziert und die Untereinheiten GluR-A und NR1 unverändert. Eine verminderte Expression funktioneller NMDAR würde hier einem erhöhten Ca^{2+}-Einstrom

in Pyramidalneuronen und somit einer gesteigerten Exzitation entgegenwirken. Dies müßte in weiteren zellulären, elektrophysiologischen Analysen hippokampaler AMPA- und NMDA-Rezeptoren verifiziert werden. Auch bleibt ungeklärt, ob das Auftreten umorganisierter Moosfaseraxone durch die Expression der uneditierten GluR-B(Q)-Untereinheit bedingt ist oder durch epileptische Entladungen hervorgerufen wird. Allerdings scheint es wahrscheinlich, daß die aberranten Moosfaserendigungen letztendlich die Übererregbarkeit der Pyramidenzellen des Hippocampus bei GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen fördern und so zu epileptischen Aktivitäten des Gehirns beitragen.

3.2.5 Die hippokampalen Interneurone sind bei adulten GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen reduziert

Die auf das Vorderhirn beschränkte Expression uneditierter GluR-B-Untereinheiten in Prinzipalneuronen geht mit einem Verlust von Interneuronen einher. Die Analyse adulter, epileptischer GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäuse ergab eine Reduktion Parv-positiver Interneurone im DG (um 33%) und Sst-positiver Interneurone im Hilus (um 36%) und SO (um 33%). Dies deckt sich mit Befunden humaner und tierexperimenteller Temporallappenepilepsien, bei denen signifikante Verluste GABAerger Interneuronen, wie Sst- und Parv-positive Zellen, im GD und der CA1-Region im Hippocampus nachgewiesen wurden (Obenaus et al., 1993; Houser & Esclapez, 1996; de Lanerolle et al., 1989; Robbins et al., 1991; Cossart et al., 2001, Gorter et al., 2001). Die Funktion Sst-positiver Interneurone im Hilus ist anscheinend die Kontrolle des exzitatorischen Eingangs vom entorhinalen Cortex (Sloviter, 1989; Leranth et al., 1990), indem sie inhibitorische Kontakte mit den Körnerzellen eingehen (Bakst et al., 1986; Leranth et al., 1990). Eine ähnliche Funktion scheinen Parv-positive Interneurone im Hilus zu haben, die ihre Axone auf Körnerzellen projizieren (Nitsch et al., 1990; Ribak et al., 1990). Somit führt der Verlust dieser Interneuronen im GD bei GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen zu einer reduzierten Inhibition von Körnerzellen und könnte gleichzeitig auch die oben beschriebene Umorganisation der Körnerzellaxone erklären. Zusätzlich verringert der Verlust Sst-positiver Interneurone im SO von GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen die inhibitorischen Projektionen auf CA1-Neurone (Cossart et al., 2001). Der Verlust der Interneurone muß auf die, über einen längeren Zeitraum stattfindene Übererregung des Gehirns von GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen zurückzuführen sein und nicht auf eine Fehlfunktion derselben, da diese die GluR-B-Untereinheit nicht oder in sehr geringen Mengen produzuieren (Geiger et al., 1995).

Die Abnahme der Interneurone im Hippocampus von GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen begünstigt eine verstärkte Exzitation der Prinzipalneuronen und ist für die Bildung aberranter Körnerzellaxone mitverantwortlich, die ihrerseits wie bereits beschrieben ein rückläufig exzitatorisches Netzwerk bilden.

3.2.6 GluR-B(Q)-Expression führt zu einer erhöhten Neurogenese im Hippocampus

Wie bei anderen pharmakologischen Tiermodellen zur Epilepsie wurde auch bei GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen eine erhöhte Neurogenese beobachtet (Parent et al., 1997, 2002a; b; Jin et al., 2001; Bengzon et al., 1997; Liu et al., 1998). Mittels den Proliferationsmarkern BrdU und Ki67 wurde bei adulten, spontan epileptischen GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen jeweils eine zweifach erhöhte Neurogenese in der subgranulären Zone (SGZ) des GD gefunden. Mit dem umstrittenen Proliferationsmarker TOAD 64 (TUC-4), der auch Astrozyten und/oder Oligodendrozyten erkennen soll (Rakic, 2002), wurde eine verstärkte Immunreaktion in der SGZ von GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen beobachtet. Die erhöhte Neurogenese in der SGZ läßt sich mit der verstärkten Exzitation des Hippocampus von GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen erklären, denn Stimulationen der perforanten Fasern führten ebenfalls zu einer erhöhten Zellproliferation in der SGZ (Parent et al., 1997). Die Neurogenese ist wahrscheinlich auch an der Generierung der umorganisierten Moosfaseraxone beteiligt, denn bei der Pilocarpin-induzierten Epilepsie bei Mäusen traten umorganisierte, Moosfaser-ähnliche Fortsätze von neugenerierten Zellen im GD auf und bildeten aberrante Projektionen zum SO der CA3-Region und in die innere Molekularschicht des GD aus (Parent et al., 1997). Irradiationsversuche, welche die Neurogenese im Hippocampus inhibieren, zeigten jedoch, daß die anfallsbedingte Ausprägung des “Mossy Fiber Sproutings” durch Hemmung der Neurogenese nicht beeinträchtigt war (Parent et al., 1999).

Durch längere orale BrdU-Behandlung von GluR-B$^{\Delta ECS:Vorderhirn}$-Mäusen konnten BrdU-positive Zellen in der Körnerzellschicht beobachtet werden, die mit dem neuronalen Marker NeuN kolokalisierten. Somit werden einige Körnerzellen durch epileptische Anfälle entweder beschädigt und über eine DNA-Reparatur BrdU inkorporiert oder sterbende Körnerzellen werden durch neu generierte Zellen, die aus der subgranulären Zone einwandern, ersetzt.

3.3 Vorderhirn-spezifische GluR-B-Deletion

Der Verlust der AMPAR-Untereinheit GluR-B führt bei der Maus zu phänotypischen und multiplen physiologischen Veränderungen (Jia et al., 1996; Gerlai et al., 1998; Yan et al., 2002) im Gegensatz zur GluR-A- (Zamanillo et al., 1999) und GluR-C-Deletion (Borchardt, Dissertation, 2002). Mäuse mit vorderhirnspezifischem GluR-B-Verlust (GluR-$B^{2lox/2lox}/Tg^{Cre4}$ bzw. GluR-$B^{\Delta Vorderhirn}$) zeigten, anders als GluR-B-"knockout"-Mäuse (Gerlai et al., 1998; Jia et al., 1996), allerdings keinen auffälligen Phänotyp. Zur Erfassung subtiler phänotypischer Veränderungen mussten verschiedene Verhaltensuntersuchungen durchgeführt werden.

3.3.1 Der vorderhirnspezifische GluR-B-Verlust führt zu Verhaltensänderungen im Rotarod, offenen Feld, Hell/Dunkel-Test und in der Angstkonditionierung

Die Studien an GluR-$B^{\Delta Vorderhirn}$-Mäusen zeigten, daß der Verlust der GluR-B-Untereinheit ein Spektrum von Verhaltensänderungen verursacht. Erstaunlicherweise hatten die Tiere im Rotarod-Test starke Motorkoordinationsprobleme. Da der GluR-B-Verlust sich nur auf Teile des Vorderhirns bezieht, wird deutlich, daß der Rotarodtest nicht nur cerebelläre Funktionen abfragt. Die gestörte Motorkoordination wirkt sich jedoch nicht auf das normale Laufverhalten aus. Die GluR-$B^{\Delta Vorderhirn}$-Mäuse sind im offenen Feld deutlich aktiver als Kontrollmäuse und ein vielfaches besser als GluR-B--"knockout"-Mäuse (Gerlai et al., 1998; Jia et al., 1996). Trotz der erhöhten Ängstlichkeit von GluR-$B^{\Delta Vorderhirn}$-Mäusen in Hell/Dunkelfeldanalysen ist die Erinnerung an negative Stimuli, der sie bei der Angstkonditionierung ausgesetzt sind, schlechter als bei weniger ängstlichen Kontrollmäusen. Fehlfunktionen im Hippocampus und/oder der Amygdala könnten hierfür die Ursache sein. LTP-Studien von GluR-$B^{\Delta Vorderhirn}$-Mäusen zeigten allerdings keine Beeinträchtigung der aktivitätsabhängigen Plastizität der SC/CA1-Synapsen im Hippocampus (durchgeführt von Dr. V. Jensen und Dr. Ø. Hvalby, Abteilung Neurophysiology, Institut für med. Grundlagenforschung, Universität Oslo; Daten nicht gezeigt) und schließen eine hippokampale Beteiligung bei GluR-$B^{\Delta Vorderhirn}$-Mäusen weitgehend aus, obwohl eine Beteiligung des Hippocampus bei kontextbezogenen Angstkonditionierungen gezeigt werden konnte (LeDoux, 2000; Fanselow, 2000).

Es bleibt weiterhin zu klären, ob eine vorderhirnspezifische GluR-B-Deletion zu einer Beeinträchtigung Hippocampus-bezogenen räumlichen Lernens, z.B. im "Morris Water Maze", führt. Dies wäre, da das hippokampale LTP normal ist, eigentlich nicht zu erwarten.

3.3.2 GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$-Mäuse zeigen verbesserte Geruchsdiskriminierung, aber vermindertes Erinnerungsvermögen erlernter Gerüche

Mäuse mit fehlender GluR-B-Untereinheit im Vorderhirn wiesen bei Geruchsunterscheidungstests eine deutlich bessere Lernkurve als Kontrollmäuse auf. Somit erlernen Mäuse ohne GluR-B im Bulbus olfactorius schneller Geruchspaare zu unterscheiden. Dies könnte durch eine verbesserte Funktion der den Riechsinneszellen nachgeschalteten Neuronen erklärt werden. Da die GluR-B-Untereinheit in den Körnerzellen des Bulbus olfactorius der Mutanten fehlt, werden jetzt AMPAR mit erhöhter Ca^{2+}-Permeabilität und Leitfähigkeit gebildet. Ein erhöhter Ca^{2+}-Einstrom könnte zu einer verstärkten Aktivierung und damit zu einer gesteigerter lateralen Inhibition der Mitralzellen führen. Die Geruchs-Feinabstimmung, bedingt über eine Körnerzell-abhängige GABAerge dendro-dendritische Inhibition der Mitralzellen (Yokoi et al., 1995; Isaacson & Strowbridge, 1998), wäre somit verbessert und eine Diskriminierung von Geruchsinformationen optimiert. Unterstützungen findet diese Annahme in neuronalen Zelladhäsions-Molekül (NCAM)-"knock-out"-Mäusen. Diese besitzen weniger Körnerzellen, haben eine geringere laterale Inhibition der Mitralzellen und sind ebenfalls in ihrer Diskriminierung von Gerüchen beeinträchtigt (Gheusi et al., 2000).

Zusätzlich zur verbesserten lateralen Inhibition könnten veränderte dendritische AMPA-Autorezeptoren der Mitralzellen eine Rolle spielen. Diese sind -zusammen mit "gap-junctions"- in Geruchsunterscheidungen involviert (Schoppa & Westbrook, 2002) und ihre synchronisierte Geruchsstoff-Antwort ist zusammen mit der lateralen Inhibition benachbarter nicht aktivierter Mitralzellen für ein verbessertes "Signal/Rausch"-Verhältnis notwendig. So könnten die Ca^{2+}-permeablen AMPA-Autorezeptoren mit ihrer verbesserten Leitfähigkeit auf Mitralzellen zu einer erhöhten Selbstaktivierung beitragen und damit das Signal aktivierter gegenüber nicht aktivierter Mitralzellen erhöhen, was ebenfalls eine gesteigerte Geruchsunterscheidung begünstigt.

Im Gegensatz zur schneller erlernten Geruchsdiskriminierung fand sich bei bei den Mutanten ein reduziertes Erinnerungsvermögen. Bei GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$-Mäusen wurde eine signifikant schlechteres Gedächtnis für erlernte Geruchsstoffe festgestellt. Dabei wurden drei

Mausgruppen mit unterschiedlichen Erinnerungsvermögen beobachtet: Gruppen mit guter, mittlerer und schwacher Erinnerung. Immunhistologische Analysen bei Tieren der drei Gruppen zeigten einen Unterschied im regionalen Verlust der GluR-B-Untereinheit, der im direkten Zusammenhang mit dem Erinnerungsvermögen stand. Auch quantitative Immunoblotanalysen hippokampaler und bulbaler Proteine im Olfaktometer getesteter GluR-$B^{\Delta Vorderhirn}$-Mäuse zeigten diese Korrelation. Diese Unterschiede bei der GluR-B-Deletion ist auf das bereits beschriebene Expressionsmuster der Tg^{Cre4}-Linie im adulten Tier zurüchzuführen. Somit trägt die AMPAR-Untereinheit GluR-B auch zur Erhaltung des deklarativen Geruchsgedächtnisses bei. Hier bleibt unklar, welche Gehirnbereiche involviert sind. Eine Beteiligung des Hippocampus am nicht-räumlichen assoziativen Gedächtnis ist möglich (Bunsey & Eichenbaum, 1995; Fortin et al., 2002), wurde aber von anderen auch ausgeschlossen (Burton et al., 2000). Die Rolle anderer Gehirnregionen, etwa der piriforme Cortex, die Amygdala, der orbitale Cortex, die im Zusammenhang mit dem lateralen olfaktorischen Trakt stehen, bleibt weiterhin zu klären (Ramus & Eichenbaum, 2000; Zinyuk et al., 2001). Um hier klare Aussagen über die Beteiligung einzelner Regionen am Geruchsgedächtnis treffen zu können, sind spezifischere GluR-B-Deletionen im Gehirn notwendig.

3.4 Hypothalmaus-spezifische GluR-B-Deletion

GluR-B-haltige AMPAR sind essentiell für normale Reproduktion der männlichen Mäuse. Dies zeigte sich schon bei GluR-B-“knockout”-Mäusen, die als homozygote Linie nicht züchtbar ist. Die GluR-B-Untereinheit wird in GnRH-Neuronen, die das, für den Sexualzyklus essentielle GnRH zyklisch freisetzen, exprimiert. Immunhistologisch und elektrophysiologisch konnte gezeigt werden, daß bei GluR-$B^{\Delta Hypothalamus}$-Mäusen (GluR-$B^{2lox/2lox}$/Tg^{GniCre}) GluR-B spezifisch in den GnRH-Neuronen und in hypothalamischen Regionen, wie DBB, APO, LA und SM fehlt, wenn diese gleichfalls Cre unter der Kontrolle des GnRH-Promoters exprimieren. Auch hier wurden AMPA-Rezeptoren in GnRH-Neuronen ohne die Untereinheit GluR-B permeabel für Ca^{2+}-Ionen und zeigten in ihrer Strom/Spannungskurve eine Rektifizierung bei positiven Halte-Spannungen.

3.4.1 GluR-B$^{\Delta Hypothalamus}$-Mäuse haben ein unverändertes GnRH-Sekretionsprofil

In GnRH-Sekretions-Analysen war die pulsatile GnRH-Sekretion männlicher GluR-B$^{\Delta Hypothalamus}$-Mäuse unverändert. Sowohl in der Amplitude als auch in der Frequenz des Sekretionsprofils unterschieden sich Mutanten nicht von Wildtypen. Da angenommen wird, daß intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentrationen die GnRH-Ausschüttung kontrollieren, könnte ein Grund für das unveränderte Sekretionsprofil von männlichen GluR-B$^{\Delta Hypothalamus}$-Mäusen eine Reduktion der Oberflächen-Expression der verbliebenen AMPAR-Untereinheiten GluR-A, GluR-C und GluR-D sein, die zu einem verminderten AMPAR-vermittelten Ca^{2+}-Einstrom führt und somit eine intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentrationserhöhung verhindert. Wahrscheinlicher ist, daß ein AMPAR-vermittelter Ca^{2+}-Einstrom für die kontrollierte GnRH-Sekretion nicht verantwortlich ist, denn die vorhandene Fertilität weiblicher, hypothalamusspezifisch GluR-B-defizienter Mäuse unterstützt das Ergebnis des unveränderten GnRH-Sekretionsprofils männlicher GluR-B$^{\Delta Hypothalamus}$-Mäuse. Letzendlich könnte die geringe Sensitivität des benuzten Tests zur Detektion von sekretiertem GnRH aus Lebendschnitten der Maus nicht geeignet sein, um Veränderungen im Sekretionsprofil nachzuweisen.

3.4.2 Fehlender Verpaarungswillen und fehlende Aggression charakterisieren männliche GluR-B$^{\Delta Hypothalamus}$-Mäuse

Trotz der normalen GnRH-Sekretion fiel auf, daß männliche Mäuse ohne GluR-B in GnRH-Neuronen und Teilen des Hypothalmus Reproduktionsprobleme hatten, die auf ein fehlenden Verpaarungswillen zurückgeführt werden konnten. Dies basiert wahrscheinlich nicht auf einen spezifischen Wegfall der GluR-B-Untereinheit in GnRH-Neuronen, sondern auf einen generelleren GluR-B-Verlust in hypothalamischen Regionen, die ohne GluR-B emotionale Schlüsselreize fehlerhaft zu prozessieren scheinen.

Ein weiterer Beweis der fehlenden Verarbeitung sexualer Geruchsstoffe liefert das Aggressionsverhalten (Leypold et al., 2002; Del Punta et al., 2002; Stowers et al., 2002). Die männlichen, hypothalamusspezifisch GluR-B-defizienten Mäuse reagieren auf Eindringlinge ohne Anzeichen von Aggression, denn nach Zugabe eines Eindringlings in den Heimkäfig eines GluR-B$^{\Delta Hypothalamus}$-Männchens verteidigt dieses weder das eigene Territorium noch führt es Angriffe auf den Eindringling durch.

Der mangelnde Verpaarungswillen wie auch die gestörte Aggression der männlichen GluR-B$^{\Delta Hypothalamus}$-Mäuse beruhen nicht auf körperliche Beeinträchtigungen, da lokomotorische Aktivität im offenen Feld und Vorderpfoten-Griffstärke mit Kontroll-Tieren vergleichbar waren.

Unter der Annahme das der akzessorische Bulbus olfactorius den gleichen Regeln unterliegt wie der Bulbus olfactorius ist eine verminderte Effizienz des vomeronasalen Organs bei männlichen GluR-B$^{\Delta Hypothalamus}$-Mäusen unwahrscheinlich, da der Geruchssinn der Vorderhirn-spezifisch GluR-B-defizienter Mäuse (GluR-B$^{\Delta Vorderhirn}$) eher verbessert als verschlechtert war. Die auftretenden Verhaltensdefizite sind daher wahrscheinlich auf eine gestörte Prozessierung der Pheromon-Signale zurückzuführen. Neurone des vomeronasalen Organs ziehen zu solchen im akzessorischen Bulbus olfactorius, die wiederum über Regionen der Amygdala zu hypothalamischen Bereichen projizieren (Halpern, 1987). Somit könnten veränderte synaptische Transmissionen durch GluR-B-Deletionen in der Amygdala und/oder im Hypothalamus zu einer Beeinträchtigung der Pheromon-Signalweitergabe führen, welches dann das veränderte Sexual- und Aggressions-Verhalten der männlichen GluR-B$^{\Delta Hypothalamus}$-Mäuse verursacht. Eine solche Charakterisierung von GluR-B$^{\Delta Hypothalamus}$-Mäusen wäre noch durchzuführen. Auch eine Untersuchung der Testosteron-Werte im Blut der Mäuse könnte Aufschluß über das verminderte Aggression erbringen, da Testosteron dabei anscheinend eine wichtige Rolle einnimmt (Frye et al., 2002).

3.5 Zusammenfassung

Mäuse mit vorderhirnspezifischer Expression Ca^{2+}-permeabler AMPAR in Prinzipalneuronen erreichen das adulte Stadium. Diese Mäuse zeigten Temporallappenepilepsien, reaktive Astrozytose, Verlust Sst- und Parv-positiver Interneurone im Hippocampus, aber keine Schädigungen hippokampaler Pyramidenzellen, “mossy fiber sprouting” und erhöhte Neurogenese in der subgranulären Schicht des Hippocampus.

Vorderhirnspezifische GluR-B-Deletion verschlechtert die Feinmotorik, erhöht die Angst, steigert die Lokomotion und beeinträchtigt die Lernfähigkeit in der Angstkonditionierung. Desweiteren erlernen sie aber vergessen schneller Geruchsstoffe zu unterscheiden, und sind somit nicht in ihrer Geruchswahrnehmung, sondern in ihrem Erinnerungsvermögen gestört.

Deletionen des GluR-B-Gens in hypothalamischen Neuronen, einschließlich den GnRH-Neuronen, führten zu einer Beeinträchtigung des männlichen Sexualverhaltens. Die Männchen zeigten keinerlei Aggression und waren in ihrem Paarungsverhalten gestört. Es konnten aber keine Veränderungen in Frequenz und Amplitude der pulsatilen GnRH-Sekretion beobachtet werden.

4. Material und Methoden

Zell- und molekularbiologische Standardverfahren wurden, soweit nicht explizit erwähnt, folgenden Standardwerken entnommen: Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl; Wiley Interscience, 1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition; J. Sambrock, E.F. Frisch, T. Maniatis; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), Manipulating the Mouse Embryo (B. Hogan, R. Beddington, F. Costantini, E. Lacy; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994), The Atlas of Mouse Development (M. H. Kaufman; Academic Press, 1999)

4.1 Methoden

4.1.1 Genotypisierung der mutantan Mauslinien mittels PCR

Mausschwanzbiopsien wurden mit Proteinase K (1 mg/ml) in TENS-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 % SDS) bei 55 °C verdaut. Nach Präzipitation in 1 Volumina Isopropanol und Waschen in 70 % Ethanol wurde die genomische DNA in 300-600 µl sterilem H_2O-Millipore, durch Erhitzen auf 55 °C für 30 min gelöst und für die Genotypisierung durch PCR-Analyse eingesetzt. Ein 25 µl PCR-Ansatz enthielt PCR-Puffer (GibcoBRL), 2 mM $MgCl_2$, dNTP-Mix (0.2 mM pro Nukleotid), spezifische Sinn- und Gegensinn-Oligonukleotide (jeweils 0.4 µM), 0.2-0.5 U *Taq*-Polymerase, ddH_2O und 1µl Matrizen-DNA-Lösung (10-100 ng/µl). Einer initialen Denaturierung (3 min, 94 °C) folgten 20-35 Zyklen mit je 20 sec, 94 °C (Denaturierung), 30 sec, 55 °C (Oligonukleotid-Anlagerung), 1 min/Kb, 72 °C (Extension). Nach dem letzten Zyklus wurde eine finale Extension (10 min bei 72 °C) durchgeführt. Die erwarteten Größen der PCR-Produkte wurden anschließend durch Agarosegel-Elektrophorese überprüft.

Für eine Genotypisierung der verschiedenen mutanten Mauslinien wurden folgende Oligonukleotide benutzt (ca. Längenangaben ijn bp):

GluR-B^{neo}: MH53a, MH117, MH63 (wt: 500; neo: 400)

Cam.Cre4: rspCre1, rspCre2 (Cre: 200)

sCam.Cre3: rspCre1, rspCre2 (Cre: 200)

sCam.Cre2: rspCre1, rspCre2 (Cre: 200)

GnRH.iCre: GnRH51, hCre32 (GnRH.iCre: 350)

GnRH.hGFP2: GnRH51, hGFP1 (GnRH.hGFP2: 300)
GluR-B^{2lox}: VM12, VM10 (wt: 300; 2lox: 350)
und VM17, VM10 (wt: 1200, 2lox: 1300, 1lox: 300)
R26R : lac3', lac5' (lac: 500)

4.1.2 Isolierung hochmolekularer genomischer DNA

Für die Gewinnung hochmolekularer genomischer DNA aus Schwanzspitzen oder Lebern adulter Mäuse für Southernblot-Analysen wurde Lebergewebe mechanisch zerkleinert und in 5 ml TENS-Puffer mit 10 mg Proteinase K bzw. Schwanzspitzen in 300 µl TENS-Puffer mit 50 µg Proteinase K für 1-2 Tage bei 55 C° unter leichtem Schütteln (40 Upm) inkubiert. Nach 2-3maliger Phenol-Chloroform-Extraktion und 2-3maliger Chloroform-Extraktion wurde die in der wässrigen Phase gelöste DNA mit 10 % 3M Natrium-Acetat und 2,5 Volumina Ethanol bei Raumtemperatur präzipitiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, abgetropft und in 0.5-1.5 ml ddH_20 bei 4 °C auf einem Überkopf-Schüttler (40 Upm) gelöst.

4.1.3 Southern Blot

Für eine Sothern Blot Analyse wurde genomische DNA (mind. 10 µg) in einem entsprechenden Volumen mit entsprechenden Restriktionsenzymen (MBI) nach einem Standardprotokoll für 24-48 h inkubiert. Nach einem kompletten Verdau wurde die DNA mit einem 2,5-fachen Volumens von 100%igem Ethanol und 0,1-fachen Volumens von 3 M Natriumacetat-Lösung präzipitiert und mit 70 % Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in 30 µl Wasser gelöst. Anschließend erfolgte eine Rnase-Behandlung; hierfür wurde 1 U Rnase zugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von Ficoll-Probenpuffer wurde die Lösung bei 55 °C für 10 min inkubiert und auf einem 1%igen Agarosegel bei 25 V für 24 h aufgetrennt. Für eine Gelaufnahme mit Maßstabsanzeige wurde das Agarosegel in einem 0,01%igem Ethidiumbromid-Bad für 10 min gefärbt. Anschließend wurde das Gel für 30 min in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl; 0,5 N NaOH) und danach 30 min in Reneutralisieungslösung (1,5 M NaCl; 1,5 M Trishydroxyaminomethan [Trizma], pH 7,4) inkubiert. Eine Nitrocellulose-Membran (porablot, Macherey-Nagel) und Whatman-Papiere entsprechender Größe wurden angefertigt. Für den Aufbau der Blot-Apparatur wurde das Gel auf eine Whatman-Papier-"Brücke", getränkt in 20X SSC, luftblasenfrei plaziert. Es folgte die Nitrocellulose-Membran, getränkt in Wasser und in 10X SSC, danach drei Lagen Whatmann-Papier, getränkt in 10X SSC und

anschließend mehrer Lagen an trockenen Whatman-Papierlagen und einem 500 g schweren Gewicht. Die Whatman-Papier-"Brücke" hatte Kontakt mit einer Wanne gefüllt mit 20X SSC. Nach erfolgtem übernacht Blottens wurde die Nitrocellulose-Membran in 5X SSC gewaschen, luftgetrocknet und zweimalig UV behandelt.

4.1.4 Radioaktive Markierung von Sonden und Hybridisierung von Nitrocellulose-Membranen

Die DNA-Sonde wurde entsprechend des Protokolls vom "Random Primed DNA Labeling Kit" (Boehringer Mannheim) behandelt und über Bio-Spin 30 Säulen (Bio Rad) dem mitgelieferten Protokoll entsprechend aufgereinigt.
Die geblottete Nitrocellulose-Membran wurde kurz in dest. Wasser gewaschen und mit entsprechender Menge von "QuikHyb Hybridization Solution" (Stratagene). Die weiteren Schritte wurden dem beiliegendem Protokoll entnommen.

4.1.5 Gesamt-RNA Isolation

RNA wurde aus Gehirngewebe nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) mit TRI-Reagenz (TRI-REAGENT, Molecular Research Center Inc.) isoliert. Dafür wurde das TRI-Reagenz Protokoll verwendet. Die RNA wurde in ddH_2O gelöst und bei –70 °C gelagert.

4.1.6 RT-PCR

Von Gesamt-RNA wurden 1-5 µg mit 200 ng Hexamer-Oligonukleotiden ($d(N)_6$, 10 ng/µl, Boehringer Mannheim) in einem Volumen von 20 µl für 10min bei 70 °C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Danach wurden 10 µl RT-Mix (50mM Tris-HCl pH 8.5; 75 mM KCl; 3 mM $MgCl_2$; 10 mM DTT; 20 U Rnase-Inhibitor [MBI-Fermentas]), 500 µM je dNTP (Amersham-Pharmacia) zugegeben, ein 10 µl Aliquot für Kontrollreaktionen entnommen und die verbleibenden 20 µl mit 200 U Reverser Transkriptase (MMLV, Gibco-BRL) für 1h bei 37 °C inkubiert. Nach Denaturierung verbliebener RNA (5 min, 95 °C) wurden 1-3 µl in die PCR-Reaktion (mit den Oligonukleotiden B52 und 3'lamlo) eingesetzt. Die Größe der PCR-Produkte wurde anschließend durch Agarosegelelektrophorese überprüft.
Um die nicht inkorporierten Nukleotide der PCR-Reaktion zu inaktivieren wurde das PCR-Produkts für eine Sequenzierung mit je einem Unit Alkalische-Phosphatase aus der Krabbe

(SAP) und ExonucleaseI bei 37 °C füt 1 h inkubiert. Nach einer Inaktivierung von 15 min bei 72 °C wurden 2-3 µl des PCR-Produktes in die Sequenzierreaktion eingesetzt.

4.1.7 cDNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von cDNA-Fragmenten erfolgte, basierend auf der Kettenabbruchmethode (Sanger et al, 1977), nach Protokollen der Firma ABI (Applied Biosystems) durch "Dye Terminator Cycle Sequencing" auf der automatischen Sequenziermaschine 377 (Applied Biosystems). Pro Reaktion wurden 10-20 ng/kb cDNA-Produkt in 5.5 µl ddH_2O, 0.5 µl Oligonukleotid (MH2, 10 µM) und 4 µl „Big Dye-Terminator“-Mix (ABI) eingesetzt.

4.1.8 Protein-Präparation aus Hirngewebe und Proteinkonzentrationsbestimmung

Alle Präparationsschritte wurden bei 4 °C in Anwesenheit von Proteinase-Inhibitoren (Complete, EDTA-free, Roche Diagnostics) durchgeführt. Hippocampus oder Hirnstamm von Mäusen wurde durch 10-15maliges Auf- und Abziehen bei 900Upm im Glas-Teflon Potter in 25 mM HEPES (pH 7.4) homogenisiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Homogenate wurden durch Zentrifugation bei 900 g für 5 min (4 °C) von Zellkernen und großen Zelltrümmern getrennt und bei –70 °C gelagert.
Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch die Bradford-Methode (Bio-Rad). Hierfür wurden die Proteinlösungen 1:10 in in 25 mM HEPES (pH 7.4) mit Proteinase-Inhibitoren verdünnt und 10 µl davon mit 1 ml einer 1:5 verdünnten Bradfordlösung in H_2O für 20 min bei RT inkubiert und anschließend wurde bei 595 nm die OD bestimmt.

4.1.9 Western Blot

Je nach Experiment wurden unterschiedliche Proteinmengen (10-20 µg) aus Protein-Präparationen in 2X SDS-Ladepuffer für 5 min bei 95 °C denaturiert und durch 7-10%ige SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt (Mini-Protean 3, Bio-Rad). Der Naß-Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte bei 30 V, 90 mA für 16 h oder unter Kühlung bei 100 V, 350 mA für 1 h (Protran BA 85, Schleicher & Schuell; Mini Trans-Blot, Bio-Rad) in Transferpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glyzin; 20 % Methanol). Die Membranen wurden mit Block-Puffer (0.1 % Tween 20; 8 % Magermilchpulver in PBS pH 7.4) für 2-3 h bei RT geblockt. Die Inkubation mit den spezifischen Primärantikörpern (für Verdünnungen siehe Materialteil) erfolgte in PBS/0,1 % Tween 20 (PBS-T) für 2 h bei

Raumtemperatur. Nach viermaligem Waschen für jeweils 10 min in PBS-T erfolgte die Detektion der Primärantikörper durch Spezien-spezifische Meerrettich-Peroxidase gekoppelte anti-IgG Sekundärantikörper (anti-Kaninchen IgG oder anti- Maus IgG; Dianova) für 45 min in PBS-T (Verdünnung: 1:15000-1:20000). Die Detektion der Antigen-Antikörperreaktionen erfolgte durch „Verstärkte Chemilumineszenz“ (ECL+Plus, Amersham Pharmacia).

4.1.10 Anfertigung von Vibratom-Gewebeschnitten des Mausgehirns

Mäuse wurden mit Halothan betäubt und intrakardial mit PBS (pH 7,4) und anschließend mit 4 % PFA/PBS perfundiert. Das Gehirn wurde entnommen und für 1-3 h oder übernacht in 4 % PFA/PBS bei 4 °C postfixiert. Danach wurde das Gehirn mit PBS gewaschen, in 2 % Agarose/PBS eingebettet, in 70 µm dicke Schnitte am Vibratom (Leica VT1000S) geschnitten und in PBS bei 4 °C aufbewahrt.

4.1.11 Anfertigung von Kryostat-Gewebeschnitten des Mausgehirns

Die Maus wurde mit Halothan betäubt und intrakardial mit PBS (pH 7,4) perfundiert. Das Gehirn wurde entnommen und auf Trockeneis eingefroren. Zur Ananlyse wurden bei –20 °C 15 µm dicke Schnitte am Kryostat (Bright, Model OTF) geschnitten und auf Poly-Lysin (Sigma) beschichtete Objektträger überführt, anschließend für 5-10 min in 2-4 % Paraformaldeyd/PBS fixiert und in PBS gewaschen. Entweder wurden die Schnitte direkt benutzt oder in einer Ethanolreihe (70 %/90 %/95 %) entwässert und in 100 % Ethanol bei 4 °C gelagert.

4.1.12 Anfertigung von Parafin-Gewebeschnitten des Mausgehirns

Die Maus wurde mit Halothan betäubt und intrakardial mit PBS (pH 7,4) und anschließend mit 4 % PFA in PBS perfundiert. Das Gehirn wurde entnommen und 1 h in 4 % PFA in PBS postfixiert. Nach zweimaligen Waschen in PBS wurden das Gehirn in einer Methanolreihe (30 %, 50 %, 70 %, 100 %, jeweils 12 min) dehydriert. Das Gehirn wurde dreimalig in Isopropanol für jeweils 15 min geschwenkt und in ein entsprechendes Glasgefäß mit 20 ml Isopropanol überführt, mit flüssigem Parafin aufgefüllt und 2-3 h bei 65 °C im Ofen mit mehrmaligem Mischen inkubiert, bis eine homogene Lösung entsteht. Homogene Lösung verwerfen und mit frischem flüssigem Parafin auffüllen und bei 65 °C für 2 h inkubieren. Erneut Parafin wechseln und übernacht bei 65 °C inkubieren und anschließend mit flüssigen

Parafin bei RT einbetten. Es wurden anschließend 10 µm dicke Schnitte Schneidegerät (Leica RM2145) angefertigt und auf Objektträger aufgezogen.

4.1.13 Vorbehandlung von Kryostat- und Vibratom-Gehirnschnitten zur Antigen-Freilegung

Zur Detektion von BrdU und Ki67 müssen Vibratom- und Kryostat-Schnitte vorbehandelt werden. Für eine BrdU-Detektion mit Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper wurde die DNA in Vibratom- und Kryostat-Schnitte zuerst durch Inkubation in 50 % Formamid/50 % 2X SSC (0,3 M NaCl, 0,03 M Natruimcitrat) bei 65 °C für 2 h denaturiert. Anschließend wurden sie in 2X SSC gewaschen und in 2 M HCl bei 37 °C für 30 min und abschließend in 0,1 M Boratpuffer (pH 8,5) für 10 min inkubiert. Für eine BrdU-Detektion mit Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper wurde direkt in 2 M HCl bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die restlichen Schritte wie oben beschrieben.
Für eine Ki67-Detektion wurden Kryostat-Schnitte in 10 mM Citratpuffer (pH 6,0) auf 80 °C erhitzt und bei langsam abkühlendem Puffer bei Raumtemperatur für 40 min inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in PBS gewaschen.

4.1.14 Immunhistochemische Untersuchungen und Immunfluoreszenz-Markierungen/Doppelmarkierungen von Vibratom- und Kryostat-Gewebeschnitten

Vibratom-Schnitte wurden für die Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität in PBS/2 % H_2O_2 für 15 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS für je 10 min wurden die Schnitte für 1 h zur Reduktion unspezifischer Antikörper-Reaktionen in Tag 1-Puffer (1 % BSA; 0.3 % Triton X-100 in PBS) mit 4 % Normal Serum (NS) blockiert. Das Normal Serum entspricht der Spezies in der der 2. Antikörper gezüchtet wurde. Die Inkubation mit Primärantikörpern (für Verdünnungen siehe Materialteil) erfolgte in Tag 1-Puffer/1 % NS über Nacht bei RT. Nach dreimaligem Waschen in Tag 2-Puffer (0.3 % BSA; 0.1 % Triton X-100 in PBS) erfolgte die Inkubation mit Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern (1:600, Vector) für 1 h bei Raumtemperatur. Nach zweimaligem Waschen in Tag 2-Puffer und zweimaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte in 0.05 % DAB (Diaminobenzidin-Hydrochlorid, Sigma) in 20 mM Tris-HCl (pH 7.6)/0,01 % H_2O_2 entwickelt. Nach zweimaligem Waschen in PBS und einmaliger kurzer Inkubation in 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) wurden die Schnitte auf Objektträgern überführt und getrocknet.

Nach einer kurzer Inkubation in Xylol wurden die Schnitte mit Eukitt (Kindler GmbH, Freiburg) eingebettet.

Eine Verstärkung des DAB-Signals kann durch eine Anwendung von ABC (Vector) erfolgen. Hiefür wurden die Schnitte nach der Inkubation des Primärantikörpers und dreimaligem Waschen in Tag 2-Puffer mit Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper (1:600, Vector) in Tag 2-Puffer für 1 h bei Raumtemperatur behandelt. Nach dreimaligem Waschen in Tag 2-Puffer wurden die Schnitte in ABC-Lösung (1:400, Vector) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte zweimal in Tag 2-Puffer und in zweimal PBS gewaschen und in 0.05 % DAB in 20 mM Tris-HCl (pH 7.6)/0,01 % H_2O_2 entwickelt. Nach zweimaligem Waschen in PBS und einmaliger kurzer Inkubation in 10 mM Tris-HCl pH 7.6 wurden die Schnitte auf Objektträgern überführt und getrocknet. Nach einem kurzer Inkubation in Xylol wurden die Schnitte in Eukitt eingebettet.

Für eine Immunfluoreszenz-Markierung wurden Vibratome und Kryostat-Schnitte in PBS gewaschen und für 2 h in Tag 1-Puffer mit 4 % NS inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit den entsprechenden Primärantikörpern (für Verdünnungen siehe Materialteil) in Tag 1-Puffer/1 % NS inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in Tag 2-Puffer erfolgte eine Inkubation mit Fluoreszenz-markiertem Sekundärantikörpern in Tag 2-Puffer für 2 h bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach dreimaligem Waschen in Tag 2-Puffer und PBS und einmaliger kurzer Inkubation in 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) wurden die Schnitte für 30 min auf Objektträger getrocknet und mit Vactashield (Vector) eingedeckelt.

Für eine Verstärkung der Fluoreszenzintensität und für eine Doppelmarkierung mit Primärantikörpern aus gleichen Spezien können Biotin-gekoppelte Sekundärantikörper und Fluoreszenz-markiertes Avidin eingesetzt werden. Nach Inkubation mit den entsprechenden Primärantikörpern (für Verdünnungen siehe Materialteil) und dreimaligem Waschen in Tag 2-Puffer wurden die Schnitte mit Biotin-gekoppelte Sekundärantikörpern (1:600, Vector) für 1 h bei Raumtemperatur behandelt. Anschließend werden sie dreimal in Tag 2-Puffer gewaschen und mit Fluoreszenz-markiertem Avidin (1:400, Vector) 2 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in Tag 2-Puffer und PBS und einmaliger kurzer Inkubation in 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) wurden die Schnitte für 30 min auf Objektträger getrocknet und mit Vactashield eingedeckelt.

4.1.15 Timm-Färbung von Kryostat-Schnitten

Kryostat-Schnitte in 100 % Ethanol wurden rehydriert in einer absteigenden Ethanolreihe (95 %/70 %/50 %/H_2O). Die Objektträger wurden kurz in 0,5 % Gelatine inkubiert (zur Verhinderung von Präzipitaten) und mit einem Tischventilator getrocknet. Die physikalische Entwicklung wurde im Dunkeln für 30-150 min in der Entwicklerlösung durchgeführt. Die Entwicklerlösung bestand aus folgenden Lösungen: 4 Teile einer 50%igen Gum arabicum Lösung, 0,8 Teile eines Zitratpuffers (66,4 mM Zitratsäure, 55,9 mM tri-Natriumzitrat), 1,2 Teile einer 5,7%igen Hydrochinonlösung in H_2O, 1,8 Teile einer 0,73%igen Silbernitratlösung in H_2O und 2,8 Teile H_2O. Anschliessend wurden die Objektträger, zur Beseitigung von der Gelatine für 10 min in H_2O bei 40 °C gewaschen und 3X 2 min in H_2O. Nach einer Inkubation von 12 min in einer 5%igen Thiosulphatlösung in H_2O (zur Beseitigung von Überflüssigem Silber) wurden die Schnitte erneut 2X 2 min in H_2O gewaschen und 30 min in 70%igem Ethanol postfixiert. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Ethanolreihe (95 %/100 %) dehydriert, kurz in Xylol inkubiert und mit Eukitt eingedeckelt.

4.1.16 X-Gal Färbung von Vibratom-Gehirnschnitten

Vibratom-Schnitte wurden in X-Gal Färbelösung (5 mM $K_4Fe(CN)_6$, 5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 2 mM $MgCl_2$, 2 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid/PBS) transferiert. Die Inkubation in der Färbelösung erfolgte je nach Präparat für 2–60 min oder übernacht bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Schnitte 2x mit PBS und zuletzt mit 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) gewaschen. Die gefärbten Vibratom-Schnitte wurden dann auf Objektträger übertragen und getrocknet. Eine Gegenfärbung der Gehirnschnitte wurde mit Eosin (Sigma, 1% in 80 % Ethanol) oder Red-Neutral (Sigma, 1 % in 50 mM Sodium Acetat, pH 3,3) durchgeführt. Die Objektträger mit den aufgebrachten Schnitten wurden für 25 sec in Eosin-Lösung oder für 2 min in Red-Neutral Lösung inkubiert und nacheinander mit 70 % / 90 % / 95 % Ethanol gewaschen und dehydriert. Nach dem Trocknen wurden sie in Xylol überführt und in Eukitt eingebettet.

4.1.17 Hämatoxylin/Eosin- (H/E) von Parafin-Schnitten und Nissl-Färbung von Kryostat-Schnitten

Parafin-Schnitte wurden mit Xylol entwachst, über abnehmende Ethanol-Konzentrationen schrittweise rehydriert, in Gill´s Hematoxylin No. 3 (PolySciences, Inc.) gefolgt von Eosin

Y (PolySciences, Inc.) gefärbt, in Ethanol entfärbt, in Xylol geklärt und mit Eukitt eingebettet.

Nissl Färbungen wurden an Kryostat-Schnitten angefertigt. Die Objekträger wurden in eine Thionin-Lösung (0,1 % Thionin in 0,1 M Essigsäure und 0,1 M Natriumacetat, gefiltert) kurz inkubiert und in H_2O gewaschen. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte mit Eukitt eingedeckelt.

4.1.18 Konfokale Mikroskopie

Konfokale Bildserien (optische Schnitte) der Fluoreszenz der 2. Antikörper wurden mit einem LEICA TCS NT konfokalen Mikroskop aufgenommen. Die Anregung der Fitc-Fluoreszenz erfolgte mit der 488 nm-Linie eines Argon-Krypton Lasers. Die Fluoreszenz-Emission wurde mit einem 500-550 nm-Bandpassfilter selektiert und die Fluoreszenzstärke mit einem Photomultiplier gemessen, dessen Signale nach Digitalisierung als Bildserie abgespeichert wurden.

4.1.19 BrdU-Applikation

Für eine orale Applikation wurde 1 mg/ml BrdU (Sigma) in Wasser mit 1 % Sukrose gelöst. Die Dauer der Applikation betrug 1-2 Wochen und die BrdU-Lösung wurde jeden zweiten Tag erneuert.

Eine intraperitonale Applikation von 50 µg Brdu/g Körpergweicht wurde jeden Tag für eine Woche durchgeführt.

4.1.20 Radio-Immuno-Assay

Für eine Detektion von GnRH im pg-Bereich wurde ein Radio-Immuno-Assay (RIA) angewendet. Es wurden Duplikate-Messungen durchgeführt. 350 µl der Proben wurden in 150 µl PBS-T (0,063 M Na_2HPO_4, 0,013 M EDTA, 0,02 % NaN_3,, 0.1 % Triton X-100, 0,2 % BSA, PH 7,4) überführt und mit 50 µl einer 1. Antikörperlösung gegen das GnRH-Decapeptid (R1245, Finalkonzentration 1:300000) für 48 h bei 4 °C inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl einer 0,06 pg/µl ^{125}I-markierter GnRH-Peptid-Lösung (Amersham) wurde erneut für 48 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Antigen/Antikörper-Komplex mit 95%iger eiskalter Ethanollösung gefällt. Das Pellet wurde kurz getrocknet und in 150 µl einer 5 % SDS-Lösung gelöst. Nach kräftigem vortexen mit 1,5 ml Szintillationslösung

(Ready Solv HP, Beckman) wurde die Probe im Szintillationszähler (Beckman) gemessen. Es wurde eine Probe zweimal für 3 min gemessen.

Als Standard diente gelöstes reines GnRH-Peptid (Bachem). Das Peptid wurde in deionisiertem Wasser gelöst und 100 ng/50 µl Aliquots bei –20 °C für zwei Monate gelagert. Die Standerdreihe in Normal-Ringer-Lösung erfasste acht GnRH-Konzentartionen: 1000 pg, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 0,5 pg, 0,1 pg, 0,01 pg und kein GnRH (maximale Bindung). Die Standards wurden auch in Duplikaten gemessen. Jeweils 350 µl der Standardreihe wurden in 150 µl PBT aufgenommen und wie oben bereits beschrieben weiterbahndelt.

4.1.21 Präparation akuter Gehirnschnitte

Für elektrophysiologische Untersuchungen und die Kollektion pulsatile GnRH-Ausschüttung von lebend Schnitten wurden Mäuse in Halothan (Eurim-Pharm, Piding, Germany) betäubt und dekaptiert. Es wurden 300 µm für elektrophysiologische Analysen bzw. 600 µm Schnitte für die GnRH-Sekretion koronale oder sagittale Lebendschnitte am Vibratom (HR-2, Sigmann Elektronik, Hüffenhardt, Germany) in eiskalter Normal-Ringer-Lösung (125 mM NaCl, 25 mM $NaHCO_3$, 1.25 mM NaH_2PO_4, 2.5 mM KCl, 2 $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, and 25 mM Glukose, 316 mOsm, pH 7.4) angefertigt und für 30 min bei 35 °C in 95 % O_2/5 % CO_2 equlibrierter Normal-Ringer-Lösung inkubiert (Spergel et al., 1999). Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur in gleicher obiger Lösung bis zum Experiment aufbewahrt.

4.1.22 GnRH-Sekretions-Experiment

Für die GnRH-Sekretion wurden akute Schnitte (600 µm) in eine Perifusionsapparatur bei 35 °C überführt und mit 95 % O_2/5 % CO_2 equlibrierter Normal-Ringer-Lösung überspült. Es wurden alle 15 min 800 µl Fraktionen gesammelt, schock-gefroren und bei –70 °C gelagert.

4.1 23 Elektrophysiologische Ableitungen

“Nucleated soma patch”-Ableitungen wurden von Dr. D. J. Spergel (Max-Planck-Institut f. med. Forschung, Abteilung Molekulare Neurobiologie, Heidelberg) wie bereits beschrieben (Spergel et al., 1999) durchgeführt. Dafür wurden akute Schnitte (300 µm) benutzt. Die intrazelluläre Lösung (PH 7,3; 286 mOsm) der “Patch”-Pipette setzte sich aus 140 mM CsCl, 2 mM Mg-ATP, 10 mM EGTA und 10 mM HEPES mit CsOH zusammen.

AMPAR-vermittelte Ströme wurden durch Applikation von 1 mM Agonist (Glutamat) aktiviert. Die Applikation im "nucleated soma patch" erfolgte mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe (IPC-N8; Ismatec, Zurich, Switzerland) in einer doppel-läufigen Pipette; der eine Pipettenlauf enthielt eine Mg^{2+}-freie Kontroll-Lösung (152 mM NaCl; 5,8 mM KCl; 1,9 mM $CaCl_2$; 5,4 mM HEPES; 10 µM Glyzin; pH 7,25 (mit NaOH); 290 mOsm), der andere Kontroll-Lösung mit Agonist. Rezeptor-vermittelte Ströme wurden bei Haltepotentialen von -100 mV bis +100 mV in 20 mV Schritten gemessen. Es wurden ein EPC-9 Verstärker und Pulse 8.53 Programm (HEKA, Lambrecht, Germany) zur Erhaltung (10 kHz), zum Filtern (Bessel; 3,33 kHz) und zur Analyse der "Patch-Clamp"-Daten benutzt. Die Ableitungen wurden mit den Programmen Igor 3.03 (Wavemetrics, Lake Oswego, OR) and Canvas 7.0.2 prozessiert.

4.1.24 EEG-Aufnahmen von der Maus

Implantationen und EEG-Aufnahmen und –Analysen wurden von Dr. H. Krestel (Max-Planck-Institut f. med. Forschung, Abt. Molekulare Neurobiologie, Heidelberg) durchgeführt.

Für die folgenden chirurgischen Eingriffe wurde die Maus anaesthesiert. Hiefür wurde eine Stocklösung von1,66 % Ketamin und 0,16 % Xylazin (Rompun) hergestellt und 6 µl pro g Körpergewicht i.p. injiziert.

Für telemetrische EEG-Aufnahmen wurden Mäuse chirurgisch mit einem telemetrischen Transmitter unterhalb der Haut auf dem Rücken versehen (TA10EA-F20, DataSciences International, St. Paul, MN, USA), die mit den zwei Schrauben (Länge: 2,6 mm; Durchmesser: 1 mm) in der Schädeldecke verbunden waren. Die eine Schraube wurde oberhalb des oberhalb des frontalen Cortex, die andere oberhalb des parietalen Cortex positioniert (die erste: 1,5 mm lateral zur sagittalen Naht und rostral zum Bregma; die zweite: contralateral zur ersten, 1,5 mm lateral zur sagittalen Naht und caudal zum Bregma). Zur Stabilisierung der Schrauben wurde Zahnzement benutzt. EEG-Daten wurden mit Dataquest A.R.T. 2.2 software (DataSciences International, St Paul, MN, USA) erfasst und die Spike- und Frequenz-Analysen erfolgten mit Spike2 software Version 4.08 (Cambridge Electronic Design Limited, Cambridge, UK).

4.2 Material

4.2.1 Mauslinien

C57BL/6: Fa. Charles River (Deutschland)

NMRI: Fa. Charles River (Deutschland)

Cam.Cre4: G. Schütz

sCam.Cre2: R. Sprengel

sCam.Cre3: R. Sprengel

R26R: P. Soriano

GluR-B^{neo}: R. Sprengel

GluR-B^{2lox}: R. Sprengel

GnRH.iCre: R. Sprengel

GnRH.hGFP2: R. Sprengel

4.2.2 Sequenzen verwendeter Oligonukleotide (5'-3')

MH53a	GAATGTTGATCATGTGTTTCCCTG
MH117	GTTCGAATTCGCCAATGACAAGACG
MH65	CAATAGCAATTGGTGATTTGTGAC
rspCre1	ACCAGGTTCGTTCACTCATGG
rspCre2	AGGCTAAGTGCCTTCTCTACAC
Lac3'	TTACCCGTAGGTAGTCACGCA
Lac5'	TTACGATGCGCCCATCTACAC
VM12	GCGTAAGCCTGTGAAATACCTG
VM10	GTTGTCTAACAAGTTGTTGACC
VM17	GAATCATTGTTGACAGATTGCCAC
GnRH51	GAAGTACTCAACCTACCAACGGAAG
hCre32	CACAGACAGGAGCATCTTCCAG
hGFP1	GCCATCCAGTTCCACGAGAATTGG
3'lamlo	TCGTACCACCATTTGTTTTTCA
B52	CACAAAGTAGTGAATCAACTA
MH2	GCTTAGACAGATCCTCAGCAC

4.2.3 Verwendete Antikörper und deren Verdünnungen

Rabbit polyclonal Anti-Glutamate Receptor 1, AB1504, Chemicon; IHC: 1:100, IB: 1:2000

Rabbit polyclonal Anti-Glutamate Receptor 2, AB1768, Chemicon; IHC: 1:50, IB: 1:600

Rabbit polyclonal Anti-NMDA Receptor 1, AB AB1516 Chemicon; IB: 1:600

Rabbit polyclonal Anti-GFAP, Z0334, DAKO; IHC: 1:400

Rabbit polyclonal Anti-TUC-4 (Ulip-4/CRMP-4), AB5454, Chemicon; IHC: 1:100

Rabbit polyclonal Anti-Cre (Cre Recombinase), PRB-106C, BabCo; IHC: 1:3000

Rabbit polyclonal Anti-Ki67, NCL-Ki67p, Novo Castra; IHC: 1:6500

Mouse monoclonal Anti-NeuN (Neuronal Nuclei), MAB377, Chemicon; IHC: 1:1000

Mouse monoclonal Anti-□-Actin, Clone AC-15, A5441, Sigma; IB: 1:40000

Mouse monoclonal Anti-Parvalbumin, P 3088, Sigma; IHC: 1:1000

Mouse monoclonal Anti-BrdU, 1170376, Roche; IHC: 1:100

Mouse monoclonal Anti-Ki67, NCL-Ki67-MM1, Novo Castra; IHC: 1:50

Rat monoclonal Anti-Somatostatin, MAB354, Chemicon; IHC: 1:1000

Rat monoclonal Anti-BrdU, OBT 0030, Acurate; IHC: 1:400

Rabbit polyclonal Anti-GnRH, R1245, Dr. T.M. Nett, Colorado State University, Ft. Collins, CO, USA; RIA: 1:300000

Rabbit polyclonal Anti-GnRH, LR-1, Dr. R. Benoit, Montreal General Hospital, Montreal, Quebec, Canada; IHC: 1:10000

Peroxidase-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), PI-1000, Vector

Peroxidase-conjugated Horse Anti-Mouse IgG (H+L), PI-2000, Vector

Biotinylated Goat Anti-Mouse IgG (H+L), BA-9200, Vector

Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), BA-1000, Vector

Biotinylated Rabbit Anti-Rat (H+L), BA-4001, Vector

TexasRed dye-conjugated Goat Anti-Mouse IgG (H+L), 115-075-146, Dianova

TexasRed dye-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), 111-075-144, Dianova

Fitc dye-conjugated Goat Anti-Mouse IgG (H+L), 115-095-146, Dianova

Fitc dye-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), 111-095-144, Dianova

TexasRed dye-conjugated Avidin, A-1100, Vector

Fitc dye-conjugated Avidin, A-1100, Vector

5. Abkürzungen

α	Alpha
α-	Anti
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AC	Commissura anterior
ACh	Acetylcholin
ADAR	RNA-bindene Adenosin-Desaminasen
AHN	Nucleus hypothalamicus anterior
AMPA	L-α-Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure
AMPAR	AMPA-Rezeptor bzw. -Rezeptoren
APO	Area preoptica
ATP	Adenosin-tri-Phosphat
β	Beta-
BNST	Regio nuclei striatum terminalis
BO	Bulbus olfactorius
bp	Basenpaar
BrdU	Bromodeoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
BSA	Rinder (Bovine) Serumalbumin
C-	Carboxy-
CA	Cornu ammonis
CaMKII	Kalzium/Calmodulin-abhängige ProteinkinaseII
CC	Corpus callosum
cDNA	zur mRNA komplementärer DNA-Strang (copy DNA)
Ce	Cerebellum
cm	Zentimeter
CO	Chiasma opticum
Cre	Cre-Rekombinase
Cx	Cortex
DAB	Diaminobenzidin-Hydrochlorid
DBB	Bandaletta diagonalis
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Deoxyuridintriphosphat
EEG	Elektroencephalogramm
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ECS	zur Editierungsstelle komplementäre Sequenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Eminentia mediana
et al.	und andere
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
G	Glomeruli
GABA	γ-Amminobuttersäure
GD	Gyrus dentatus
GFAP	Glial-fibrillär azidisches Protein
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GluR	Glutamat-Rezeptor-Untereinheit
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor

h	Stunde
H/E	Hematoxylin/Eosin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N´-ethansulfonsäure
hpg	hypogonadal
IB	Immunoblot
IHC	Immunohistochemie
i.p.	intraperitonal
kbp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
kHz	kiloherz
LH	Lutenisierendes Hormon
Kö	Körnerzellschicht
LTP	Langzeitpotenzierung
m	Milli
M	Mol
µ	Mikro
MD	Mediodorsal thalamischer Nucleus
µg	Mikro Gramm
Mi	Mitralzellschicht
min	Minute
mm	Millimeter
MPN	Nucleus preopticus
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
N-	Amino-
n	nano
Neo	Neomyzin
NGS	Normal Ziegenserum
NHA	Nucleus hypothalamicus anterior
nm	nano Meter
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR	NMDA-Rezeptor bzw. -Rezeptoren
NEO	Neomyzinphosphotransferase
ng	Nano Gramm
NS	Normal-Serum
Nt	Nukleotid
NTP	Nukleotid-tri-Phosphat
W	Ohm
OC	Chiasma opticum
Or	Stratum oriens
OSN	olfaktorisch-sensorisches Neuron
OVLT	Organum vasculosum laminae terminalis
p	Pico
P	Postnataler Tag
P	Signifikanz
pA	Polyadenylierungssignal
pA	Piko Amper
Parv	Parvalbumin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-T	PBS-Tween
PCR	Polymerasekettenreaktion
pg	Piko Gramm
pH	potentia Hydroxy
PFA	Paraformaldehyd
RIA	Radio-Immuno-Assay

RNA	Ribonukleinsäure
RNST	Regio nuclei stria terminalis
Upm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
sec	Sekunde
S+	positiver Stimulus
S-	negativer Stimulus
SAP	Krabbe (shrimp) alkalische Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SGZ	Subgranuläre Zone
SL	Septum lateralis
SM	Submedialer thalamischer Nucleus
SM	Septum medialis
SO	Stratum oriens
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Lösung
Sst	Somatostatin
TE	Tris/EDTA-Puffer
TENS	Tris-EDTA-Natriumchlorid-SDS-Puffer
Tg	Transgen
TK	Thymidinkinase
TR	TexasRed
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Units
UTR	Untranslatierte Region
V	Volt
W	Watt
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-□-D-Galaktopyranoid
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

6. Literaturverzeichnis

Akagi, K., Sandig, V., Vooijs, M., Van der Valk, M., Giovannini, M., Strauss, M., and Berns, A. (1997). Cre-mediated somatic site-specific recombination in mice. Nucleic Acids Res 25, 1766-73.

Ascher, P., and Nowak, L. (1988). The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. J Physiol 399, 247-66.

Asztely, F., and Gustafsson, B. (1996). Ionotropic glutamate receptors. Their possible role in the expression of hippocampal synaptic plasticity. Mol Neurobiol 12, 1-11.

Ayalon, G., and Stern-Bach, Y. (2001). Functional assembly of AMPA and kainate receptors is mediated by several discrete protein-protein interactions. Neuron 31, 103-13.

Babb, T. L., Kupfer, W. R., Pretorius, J. K., Crandall, P. H., and Levesque, M. F. (1991). Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. Neuroscience 42, 351-63.

Babb, T. L., Mathern, G. W., Leite, J. P., Pretorius, J. K., Yeoman, K. M., and Kuhlman, P. A. (1996). Glutamate AMPA receptors in the fascia dentata of human and kainate rat hippocampal epilepsy. Epilepsy Res 26, 193-205.

Bading, H., Ginty, D. D., and Greenberg, M. E. (1993). Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. Science 260, 181-6.

Bading, H., and Greenberg, M. E. (1991). Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by NMDA receptor activation. Science 253, 912-4.

Bakst, I., Avendano, C., Morrison, J. H., and Amaral, D. G. (1986). An experimental analysis of the origins of somatostatin-like immunoreactivity in the dentate gyrus of the rat. J Neurosci 6, 1452-62.

Ballanyi, K., Grafe, P., and ten Bruggencate, G. (1987). Ion activities and potassium uptake mechanisms of glial cells in guinea-pig olfactory cortex slices. J Physiol 382, 159-74.

Barria, A., Muller, D., Derkach, V., Griffith, L. C., and Soderling, T. R. (1997). Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. Science 276, 2042-5.

Ben-Ari, Y. (1985). Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. Neuroscience 14, 375-403.

Bengzon, J., Kokaia, Z., Elmer, E., Nanobashvili, A., Kokaia, M., and Lindvall, O. (1997). Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. Proc Natl Acad Sci U S A 94, 10432-7.

Bliss, T. V., and Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. Nature 361, 31-9.

Bliss, T. V., and Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. J Physiol 232, 331-56.

Bodyak, N., and Slotnick, B. (1999). Performance of mice in an automated olfactometer: odor detection, discrimination and odor memory. Chem Senses 24, 637-45.

Boulter, J., Hollmann, M., O'Shea-Greenfield, A., Hartley, M., Deneris, E., Maron, C., and Heinemann, S. (1990). Molecular cloning and functional expression of glutamate receptor subunit genes. Science 249, 1033-7.

Brusa, R., Zimmermann, F., Koh, D. S., Feldmeyer, D., Gass, P., Seeburg, P. H., and Sprengel, R. (1995). Early-onset epilepsy and postnatal lethality associated with an editing-deficient GluR-B allele in mice. Science 270, 1677-80.

Buck, L., and Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. Cell 65, 175-87.

Buckmaster, P. S., and Dudek, F. E. (1997). Network properties of the dentate gyrus in epileptic rats with hilar neuron loss and granule cell axon reorganization. J Neurophysiol 77, 2685-96.

Buckmaster, P. S., and Dudek, F. E. (1997). Neuron loss, granule cell axon reorganization, and functional changes in the dentate gyrus of epileptic kainate-treated rats. J Comp Neurol 385, 385-404.

Buckmaster, P. S., Zhang, G. F., and Yamawaki, R. (2002). Axon sprouting in a model of temporal lobe epilepsy creates a predominantly excitatory feedback circuit. J Neurosci 22, 6650-8.

Buhl, E. H., Otis, T. S., and Mody, I. (1996). Zinc-induced collapse of augmented inhibition by GABA in a temporal lobe epilepsy model. Science 271, 369-73.

Bunsey, M., and Eichenbaum, H. (1995). Selective damage to the hippocampal region blocks long-term retention of a natural and nonspatial stimulus-stimulus association. Hippocampus 5, 546-56.

Burnashev, N., Monyer, H., Seeburg, P. H., and Sakmann, B. (1992). Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. Neuron 8, 189-98.

Burton, S., Murphy, D., Qureshi, U., Sutton, P., and O'Keefe, J. (2000). Combined lesions of hippocampus and subiculum Do not produce deficits in a nonspatial social olfactory memory task. J Neurosci 20, 5468-75.

Cardozo, B. N., Buijs, R., and Van der Want, J. (1991). Glutamate-like immunoreactivity in retinal terminals in the nucleus of the optic tract in rabbits. J Comp Neurol 309, 261-70.

Choi, D. W., Monyer, H., Giffard, R. G., Goldberg, M. P., and Christine, C. W. (1990). Acute brain injury, NMDA receptors, and hydrogen ions: observations in cortical cell cultures. Adv Exp Med Biol 268, 501-4.

Choi, S., Klingauf, J., and Tsien, R. W. (2000). Postfusional regulation of cleft glutamate concentration during LTP at 'silent synapses'. Nat Neurosci 3, 330-6.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162, 156-9.

Cossart, R., Dinocourt, C., Hirsch, J. C., Merchan-Perez, A., De Felipe, J., Ben-Ari, Y., Esclapez, M., and Bernard, C. (2001). Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy. Nat Neurosci 4, 52-62.

de Lanerolle, N. C., Kim, J. H., Robbins, R. J., and Spencer, D. D. (1989). Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. Brain Res 495, 387-95.

Del Punta, K., Leinders-Zufall, T., Rodriguez, I., Jukam, D., Wysocki, C. J., Ogawa, S., Zufall, F., and Mombaerts, P. (2002). Deficient pheromone responses in mice lacking a cluster of vomeronasal receptor genes. Nature 419, 70-4.

Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., and Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. Pharmacol Rev 51, 7-61.

Dingledine, R., McBain, C. J., and McNamara, J. O. (1990). Excitatory amino acid receptors in epilepsy. Trends Pharmacol Sci 11, 334-8.

Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. Cell 97, 703-16.

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

Fagni, L., Chavis, P., Ango, F., and Bockaert, J. (2000). Complex interactions between mGluRs, intracellular Ca2+ stores and ion channels in neurons. Trends Neurosci 23, 80-8.

Fanselow, M. S. (2000). Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. Behav Brain Res 110, 73-81.

Feldmeyer, D., Kask, K., Brusa, R., Kornau, H. C., Kolhekar, R., Rozov, A., Burnashev, N., Jensen, V., Hvalby, O., Sprengel, R., and Seeburg, P. H. (1999). Neurological dysfunctions in mice expressing different levels of the Q/R site-unedited AMPAR subunit GluR-B. Nat Neurosci 2, 57-64.

Firestein, S. (2001). How the olfactory system makes sense of scents. Nature 413, 211-8.

Fortin, N. J., Agster, K. L., and Eichenbaum, H. B. (2002). Critical role of the hippocampus in memory for sequences of events. Nat Neurosci 5, 458-62.

Franck, J. E., Pokorny, J., Kunkel, D. D., and Schwartzkroin, P. A. (1995). Physiologic and morphologic characteristics of granule cell circuitry in human epileptic hippocampus. Epilepsia 36, 543-58.

Freund, T. F., and Buzsaki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. Hippocampus 6, 347-470.

Friedman, L. K. (1998). Selective reduction of GluR2 protein in adult hippocampal CA3 neurons following status epilepticus but prior to cell loss. Hippocampus 8, 511-25.

Friedman, L. K., Pellegrini-Giampietro, D. E., Sperber, E. F., Bennett, M. V., Moshe, S. L., and Zukin, R. S. (1994). Kainate-induced status epilepticus alters glutamate and GABAA receptor gene expression in adult rat hippocampus: an in situ hybridization study. J Neurosci 14, 2697-707.

Friedman, L. K., Sperber, E. F., Moshe, S. L., Bennett, M. V., and Zukin, R. S. (1997). Developmental regulation of glutamate and GABA(A) receptor gene expression in rat hippocampus following kainate-induced status epilepticus. Dev Neurosci 19, 529-42.

Friedman, L. K., and Veliskova, J. (1998). GluR2 hippocampal knockdown reveals developmental regulation of epileptogenicity and neurodegeneration. Brain Res Mol Brain Res 61, 224-31.

Frotscher, M., and Zimmer, J. (1983). Lesion-induced mossy fibers to the molecular layer of the rat fascia dentata: identification of postsynaptic granule cells by the Golgi-EM technique. J Comp Neurol 215, 299-311.

Frye, C. A., Rhodes, M. E., Walf, A., and Harney, J. P. (2002). Testosterone enhances aggression of wild-type mice but not those deficient in type I 5alpha-reductase. Brain Res 948, 165-70.

Gage, F. H. (2002). Neurogenesis in the adult brain. J Neurosci 22, 612-3.

Geiger, J. R., Melcher, T., Koh, D. S., Sakmann, B., Seeburg, P. H., Jonas, P., and Monyer, H. (1995). Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca2+ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. Neuron 15, 193-204.

Gerlai, R., Henderson, J. T., Roder, J. C., and Jia, Z. (1998). Multiple behavioral anomalies in GluR2 mutant mice exhibiting enhanced LTP. Behav Brain Res 95, 37-45.

Gheusi, G., Cremer, H., McLean, H., Chazal, G., Vincent, J. D., and Lledo, P. M. (2000). Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 1823-8.

Golgi, C., Bentivoglio, M., and Swanson, L. (2001). On the fine structure of the pes Hippocampi major (with plates XIII-XXIII). 1886. Brain Res Bull 54, 461-83.

Gore, A. C., Wu, T. J., Rosenberg, J. J., and Roberts, J. L. (1996). Gonadotropin-releasing hormone and NMDA receptor gene expression and colocalization change during puberty in female rats. J Neurosci 16, 5281-9.

Gorter, J. A., van Vliet, E. A., Aronica, E., and Lopes da Silva, F. H. (2001). Progression of spontaneous seizures after status epilepticus is associated with mossy fibre sprouting and extensive bilateral loss of hilar parvalbumin and somatostatin-immunoreactive neurons. Eur J Neurosci 13, 657-69.

Greengard, P., Jen, J., Nairn, A. C., and Stevens, C. F. (1991). Enhancement of the glutamate response by cAMP-dependent protein kinase in hippocampal neurons. Science 253, 1135-8.

Grigorenko, E. V., Bell, W. L., Glazier, S., Pons, T., and Deadwyler, S. (1998). Editing status at the Q/R site of the GluR2 and GluR6 glutamate receptor subunits in the surgically excised hippocampus of patients with refractory epilepsy. Neuroreport 9, 2219-24.

Grooms, S. Y., Opitz, T., Bennett, M. V., and Zukin, R. S. (2000). Status epilepticus decreases glutamate receptor 2 mRNA and protein expression in hippocampal pyramidal cells before neuronal death. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 3631-6.

Halpern, M. (1987). The organization and function of the vomeronasal system. Annu Rev Neurosci 10, 325-62.

Hayashi, Y., Shi, S. H., Esteban, J. A., Piccini, A., Poncer, J. C., and Malinow, R. (2000). Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. Science 287, 2262-7.

Hayes, F. J., and Crowley, W. F., Jr. (1998). Gonadotropin pulsations across development. Horm Res 49, 163-8.

Higuchi, M., Single, F. N., Kohler, M., Sommer, B., Sprengel, R., and Seeburg, P. H. (1993). RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a base-paired intron-exon structure determines position and efficiency. Cell 75, 1361-70.

Hollmann, M., Hartley, M., and Heinemann, S. (1991). Ca2+ permeability of KA-AMPA--gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. Science 252, 851-3.

Hollmann, M., and Heinemann, S. (1994). Cloned glutamate receptors. Annu Rev Neurosci 17, 31-108.

Holmes, G. L., and Thompson, J. L. (1988). Effects of kainic acid on seizure susceptibility in the developing brain. Brain Res 467, 51-9.

Houser, C. R., and Esclapez, M. (1996). Vulnerability and plasticity of the GABA system in the pilocarpine model of spontaneous recurrent seizures. Epilepsy Res 26, 207-18.

Hume, R. I., Dingledine, R., and Heinemann, S. F. (1991). Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. Science 253, 1028-31.

Isaacson, J. S. (1999). Glutamate spillover mediates excitatory transmission in the rat olfactory bulb. Neuron 23, 377-84.

Isaacson, J. S., and Strowbridge, B. W. (1998). Olfactory reciprocal synapses: dendritic signaling in the CNS. Neuron 20, 749-61.

Janigro, D., Gasparini, S., D'Ambrosio, R., McKhann, G., 2nd, and DiFrancesco, D. (1997). Reduction of K+ uptake in glia prevents long-term depression maintenance and causes epileptiform activity. J Neurosci 17, 2813-24.

Jardemark, K., Nilsson, M., Muyderman, H., and Jacobson, I. (1997). Ca2+ ion permeability properties of (R,S) alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) receptors in isolated interneurons from the olfactory bulb of the rat. J Neurophysiol 77, 702-8.

Jia, Z., Agopyan, N., Miu, P., Xiong, Z., Henderson, J., Gerlai, R., Taverna, F. A., Velumian, A., MacDonald, J., Carlen, P., Abramow-Newerly, W., and Roder, J. (1996). Enhanced LTP in mice deficient in the AMPA receptor GluR2. Neuron 17, 945-56.

Jin, K., Minami, M., Lan, J. Q., Mao, X. O., Batteur, S., Simon, R. P., and Greenberg, D. A. (2001). Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 4710-5.

Johansson, C. B., Momma, S., Clarke, D. L., Risling, M., Lendahl, U., and Frisen, J. (1999). Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. Cell 96, 25-34.

Johnson, J. W., and Ascher, P. (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. Nature 325, 529-31.

Jonas, P., and Burnashev, N. (1995). Molecular mechanisms controlling calcium entry through AMPA-type glutamate receptor channels. Neuron 15, 987-90.

Jonas, P., Racca, C., Sakmann, B., Seeburg, P. H., and Monyer, H. (1994). Differences in Ca2+ permeability of AMPA-type glutamate receptor channels in neocortical neurons caused by differential GluR-B subunit expression. Neuron 12, 1281-9.

Kearney, J. A., Plummer, N. W., Smith, M. R., Kapur, J., Cummins, T. R., Waxman, S. G., Goldin, A. L., and Meisler, M. H. (2001). A gain-of-function mutation in the sodium channel gene Scn2a results in seizures and behavioral abnormalities. Neuroscience 102, 307-17.

Keinanen, K., Wisden, W., Sommer, B., Werner, P., Herb, A., Verdoorn, T. A., Sakmann, B., and Seeburg, P. H. (1990). A family of AMPA-selective glutamate receptors. Science 249, 556-60.

Kornack, D. R., and Rakic, P. (2001). Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex. Science 294, 2127-30.

Kortenbruck, G., Berger, E., Speckmann, E. J., and Musshoff, U. (2001). RNA editing at the Q/R site for the glutamate receptor subunits GLUR2, GLUR5, and GLUR6 in hippocampus and temporal cortex from epileptic patients. Neurobiol Dis 8, 459-68.

Kotti, T., Halonen, T., Sirvio, J., Riekkinen, P., Sr., and Miettinen, R. (1997). Comparison of NADPH diaphorase histochemistry, somatostatin immunohistochemistry, and silver impregnation in detecting structural and functional impairment in experimental status epilepticus. Neuroscience 80, 105-17.

Krsmanovic, L. Z., Stojilkovic, S. S., Merelli, F., Dufour, S. M., Virmani, M. A., and Catt, K. J. (1992). Calcium signaling and episodic secretion of gonadotropin-releasing hormone in hypothalamic neurons. Proc Natl Acad Sci U S A 89, 8462-6.

Kuehl-Kovarik, M. C., Pouliot, W. A., Halterman, G. L., Handa, R. J., Dudek, F. E., and Partin, K. M. (2002). Episodic bursting activity and response to excitatory amino acids in acutely dissociated gonadotropin-releasing hormone neurons genetically targeted with green fluorescent protein. J Neurosci 22, 2313-22.

Kuner, T., Wollmuth, L. P., Karlin, A., Seeburg, P. H., and Sakmann, B. (1996). Structure of the NMDA receptor channel M2 segment inferred from the accessibility of substituted cysteines. Neuron 17, 343-52.

LeDoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. Annu Rev Neurosci 23, 155-84.

Lee, H. K., Kameyama, K., Huganir, R. L., and Bear, M. F. (1998). NMDA induces long-term synaptic depression and dephosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors in hippocampus. Neuron 21, 1151-62.

Leranth, C., Malcolm, A. J., and Frotscher, M. (1990). Afferent and efferent synaptic connections of somatostatin-immunoreactive neurons in the rat fascia dentata. J Comp Neurol 295, 111-22.

Lerche, H., Biervert, C., Alekov, A. K., Schleithoff, L., Lindner, M., Klinger, W., Bretschneider, F., Mitrovic, N., Jurkat-Rott, K., Bode, H., Lehmann-Horn, F., and Steinlein, O. K. (1999). A reduced K+ current due to a novel mutation in KCNQ2 causes neonatal convulsions. Ann Neurol 46, 305-12.

Lester, R. A., Clements, J. D., Westbrook, G. L., and Jahr, C. E. (1990). Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. Nature 346, 565-7.

Levine, J. E., and Ramirez, V. D. (1982). Luteinizing hormone-releasing hormone release during the rat estrous cycle and after ovariectomy, as estimated with push-pull cannulae. Endocrinology 111, 1439-48.

Leypold, B. G., Yu, C. R., Leinders-Zufall, T., Kim, M. M., Zufall, F., and Axel, R. (2002). Altered sexual and social behaviors in trp2 mutant mice. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 6376-81.

Liu, J., Solway, K., Messing, R. O., and Sharp, F. R. (1998). Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. J Neurosci 18, 7768-78.

Liu, S. Q., and Cull-Candy, S. G. (2000). Synaptic activity at calcium-permeable AMPA receptors induces a switch in receptor subtype. Nature 405, 454-8.

Lopez, F. J., Merchenthaler, I. J., Moretto, M., and Negro-Vilar, A. (1998). Modulating mechanisms of neuroendocrine cell activity: the LHRH pulse generator. Cell Mol Neurobiol 18, 125-46.

Lux, H. D., Heinemann, U., and Dietzel, I. (1986). Ionic changes and alterations in the size of the extracellular space during epileptic activity. Adv Neurol 44, 619-39.

MacDermott, A. B., Mayer, M. L., Westbrook, G. L., Smith, S. J., and Barker, J. L. (1986). NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. Nature 321, 519-22.

Mano, I., and Teichberg, V. I. (1998). A tetrameric subunit stoichiometry for a glutamate receptor-channel complex. Neuroreport 9, 327-31.

Mansour, M., Nagarajan, N., Nehring, R. B., Clements, J. D., and Rosenmund, C. (2001). Heteromeric AMPA receptors assemble with a preferred subunit stoichiometry and spatial arrangement. Neuron 32, 841-53.

Mantamadiotis, T., Lemberger, T., Bleckmann, S. C., Kern, H., Kretz, O., Martin Villalba, A., Tronche, F., Kellendonk, C., Gau, D., Kapfhammer, J., Otto, C., Schmid, W., and Schutz, G. (2002). Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. Nat Genet 31, 47-54.

Maren, S., and Baudry, M. (1995). Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationships to learning and memory. Neurobiol Learn Mem 63, 1-18.

Mason, A. J., Hayflick, J. S., Zoeller, R. T., Young, W. S., 3rd, Phillips, H. S., Nikolics, K., and Seeburg, P. H. (1986). A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the hpg mouse. Science 234, 1366-71.

Mason, A. J., Pitts, S. L., Nikolics, K., Szonyi, E., Wilcox, J. N., Seeburg, P. H., and Stewart, T. A. (1986). The hypogonadal mouse: reproductive functions restored by gene therapy. Science 234, 1372-8.

Mathern, G. W., Babb, T. L., Leite, J. P., Pretorius, K., Yeoman, K. M., and Kuhlman, P. A. (1996). The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy. Epilepsy Res 26, 151-61.

Mathern, G. W., Pretorius, J. K., Mendoza, D., Lozada, A., Leite, J. P., Chimelli, L., Fried, I., Sakamoto, A. C., Assirati, J. A., and Adelson, P. D. (1998). Increased hippocampal AMPA and NMDA receptor subunit immunoreactivity in temporal lobe epilepsy patients. J Neuropathol Exp Neurol 57, 615-34.

Mayer, M. L., and Westbrook, G. L. (1987). Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. J Physiol 394, 501-27.

Mikuni, N., Babb, T. L., Chakravarty, D. N., Hadam, J. L., and Penrod, C. E. (1998). NMDAR2 upregulation precedes mossy fiber sprouting in kainate rat hippocampal epilepsy. Neurosci Lett 255, 25-8.

Mikuni, N., Babb, T. L., Wylie, C., and Ying, Z. (2000). NMDAR1 receptor proteins and mossy fibers in the fascia dentata during rat kainate hippocampal epileptogenesis. Exp Neurol 163, 271-7.

Mombaerts, P. (2001). The human repertoire of odorant receptor genes and pseudogenes. Annu Rev Genomics Hum Genet 2, 493-510.

Mombaerts, P. (1999). Molecular biology of odorant receptors in vertebrates. Annu Rev Neurosci 22, 487-509.

Mombaerts, P. (1999). Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. Science 286, 707-11.

Monaghan, D. T., Bridges, R. J., and Cotman, C. W. (1989). The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. Annu Rev Pharmacol Toxicol 29, 365-402.

Montgomery, D. L. (1994). Astrocytes: form, functions, and roles in disease. Vet Pathol 31, 145-67.

Monyer, H., Seeburg, P. H., and Wisden, W. (1991). Glutamate-operated channels: developmentally early and mature forms arise by alternative splicing. Neuron 6, 799-810.

Nakanishi, S. (1992). Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. Science 258, 597-603.

Newman, E. A. (1984). Regional specialization of retinal glial cell membrane. Nature 309, 155-7.

Nitsch, R., Soriano, E., and Frotscher, M. (1990). The parvalbumin-containing nonpyramidal neurons in the rat hippocampus. Anat Embryol (Berl) 181, 413-25.

Norenberg, M. D. (1994). Astrocyte responses to CNS injury. J Neuropathol Exp Neurol 53, 213-20.

Obenaus, A., Esclapez, M., and Houser, C. R. (1993). Loss of glutamate decarboxylase mRNA-containing neurons in the rat dentate gyrus following pilocarpine-induced seizures. J Neurosci 13, 4470-85.

Oguro, K., Oguro, N., Kojima, T., Grooms, S. Y., Calderone, A., Zheng, X., Bennett, M. V., and Zukin, R. S. (1999). Knockdown of AMPA receptor GluR2 expression causes delayed neurodegeneration and increases damage by sublethal ischemia in hippocampal CA1 and CA3 neurons. J Neurosci 19, 9218-27.

Okazaki, M. M., Evenson, D. A., and Nadler, J. V. (1995). Hippocampal mossy fiber sprouting and synapse formation after status epilepticus in rats: visualization after retrograde transport of biocytin. J Comp Neurol 352, 515-34.

Parent, J. M. (2002). The role of seizure-induced neurogenesis in epileptogenesis and brain repair. Epilepsy Res 50, 179-89.

Parent, J. M., and Lowenstein, D. H. (1997). Mossy fiber reorganization in the epileptic hippocampus. Curr Opin Neurol 10, 103-9.

Parent, J. M., and Lowenstein, D. H. (2002). Seizure-induced neurogenesis: are more new neurons good for an adult brain? Prog Brain Res 135, 121-31.

Parent, J. M., Tada, E., Fike, J. R., and Lowenstein, D. H. (1999). Inhibition of dentate granule cell neurogenesis with brain irradiation does not prevent seizure-induced mossy fiber synaptic reorganization in the rat. J Neurosci 19, 4508-19.

Parent, J. M., Yu, T. W., Leibowitz, R. T., Geschwind, D. H., Sloviter, R. S., and Lowenstein, D. H. (1997). Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. J Neurosci 17, 3727-38.

Petralia, R. S., and Wenthold, R. J. (1992). Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. J Comp Neurol 318, 329-54.

Pollard, H., Heron, A., Moreau, J., Ben-Ari, Y., and Khrestchatisky, M. (1993). Alterations of the GluR-B AMPA receptor subunit flip/flop expression in kainate-induced epilepsy and ischemia. Neuroscience 57, 545-54.

Rakic, P. (2002). Neurogenesis in adult primates. Prog Brain Res 138, 3-14.

Ramus, S. J., and Eichenbaum, H. (2000). Neural correlates of olfactory recognition memory in the rat orbitofrontal cortex. J Neurosci 20, 8199-208.

Rasmussen, D. D. (1993). Episodic gonadotropin-releasing hormone release from the rat isolated median eminence in vitro. Neuroendocrinology 58, 511-8.

Reier, P. J., and Houle, J. D. (1988). The glial scar: its bearing on axonal elongation and transplantation approaches to CNS repair. Adv Neurol 47, 87-138.

Ribak, C. E., Nitsch, R., and Seress, L. (1990). Proportion of parvalbumin-positive basket cells in the GABAergic innervation of pyramidal and granule cells of the rat hippocampal formation. J Comp Neurol 300, 449-61.

Robbins, R. J., Brines, M. L., Kim, J. H., Adrian, T., de Lanerolle, N., Welsh, S., and Spencer, D. D. (1991). A selective loss of somatostatin in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. Ann Neurol 29, 325-32.

Rodriguez, I. (2003). Nosing into pheromone detectors. Nat Neurosci 6, 438-40.

Ronnekleiv, O. K., Naylor, B. R., Bond, C. T., and Adelman, J. P. (1989). Combined immunohistochemistry for gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and pro-GnRH, and in situ hybridization for GnRH messenger ribonucleic acid in rat brain. Mol Endocrinol 3, 363-71.

Rosenmund, C., Stern-Bach, Y., and Stevens, C. F. (1998). The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. Science 280, 1596-9.

Rothman, S. M., and Olney, J. W. (1986). Glutamate and the pathophysiology of hypoxic--ischemic brain damage. Ann Neurol 19, 105-11.

Sagrillo, C. A., Grattan, D. R., McCarthy, M. M., and Selmanoff, M. (1996). Hormonal and neurotransmitter regulation of GnRH gene expression and related reproductive behaviors. Behav Genet 26, 241-77.

Sanchez, R. M., Koh, S., Rio, C., Wang, C., Lamperti, E. D., Sharma, D., Corfas, G., and Jensen, F. E. (2001). Decreased glutamate receptor 2 expression and enhanced epileptogenesis in immature rat hippocampus after perinatal hypoxia-induced seizures. J Neurosci 21, 8154-63.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1992). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. Biotechnology 24, 104-8.

Sassoe-Pognetto, M., and Ottersen, O. P. (2000). Organization of ionotropic glutamate receptors at dendrodendritic synapses in the rat olfactory bulb. J Neurosci 20, 2192-201.

Sattler, R., and Tymianski, M. (2000). Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. J Mol Med 78, 3-13.

Sauer, B. (1998). Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. Methods 14, 381-92.

Sauer, B., and Henderson, N. (1989). Cre-stimulated recombination at loxP-containing DNA sequences placed into the mammalian genome. Nucleic Acids Res 17, 147-61.

Sauer, B., and Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. Proc Natl Acad Sci U S A 85, 5166-70.

Schoppa, N. E., Kinzie, J. M., Sahara, Y., Segerson, T. P., and Westbrook, G. L. (1998). Dendrodendritic inhibition in the olfactory bulb is driven by NMDA receptors. J Neurosci 18, 6790-802.

Schoppa, N. E., and Westbrook, G. L. (2002). AMPA autoreceptors drive correlated spiking in olfactory bulb glomeruli. Nat Neurosci 5, 1194-202.

Schwanzel-Fukuda, M., and Pfaff, D. W. (1989). Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. Nature 338, 161-4.

Schwanzel-Fukuda, M., Zheng, L. M., Bergen, H., Weesner, G., and Pfaff, D. W. (1992). LHRH neurons: functions and development. Prog Brain Res 93, 189-201; discussion 201-3.

Seri, B., Garcia-Verdugo, J. M., McEwen, B. S., and Alvarez-Buylla, A. (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. J Neurosci 21, 7153-60.

Sheng, M., and Sala, C. (2001). PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. Annu Rev Neurosci 24, 1-29.

Shi, S. H., Hayashi, Y., Petralia, R. S., Zaman, S. H., Wenthold, R. J., Svoboda, K., and Malinow, R. (1999). Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. Science 284, 1811-6.

Shimshek, D. R., Kim, J., Hubner, M. R., Spergel, D. J., Buchholz, F., Casanova, E., Stewart, A. F., Seeburg, P. H., and Sprengel, R. (2002). Codon-improved Cre recombinase (iCre) expression in the mouse. Genesis 32, 19-26.

Shumate, M. D., Lin, D. D., Gibbs, J. W., 3rd, Holloway, K. L., and Coulter, D. A. (1998). GABA(A) receptor function in epileptic human dentate granule cells: comparison to epileptic and control rat. Epilepsy Res 32, 114-28.

Siesjo, B. K. (1989). Calcium and cell death. Magnesium 8, 223-37.

Siesjo, B. K., Agardh, C. D., and Bengtsson, F. (1989). Free radicals and brain damage. Cerebrovasc Brain Metab Rev 1, 165-211.

Siesjo, B. K., Bengtsson, F., Grampp, W., and Theander, S. (1989). Calcium, excitotoxins, and neuronal death in the brain. Ann N Y Acad Sci 568, 234-51.

Silva, A. V., Sanabria, E. R., Cavalheiro, E. A., and Spreafico, R. (2002). Alterations of the neocortical GABAergic system in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy: neuronal damage and immunocytochemical changes in chronic epileptic rats. Brain Res Bull 58, 417-21.

Silverman, A. J., and Witkin, J. W. (1994). Biosynthesis of gonadotropin-releasing hormone during the rat estrous cycle: a cellular analysis. Neuroendocrinology 59, 545-51.

Singh, N. A., Charlier, C., Stauffer, D., DuPont, B. R., Leach, R. J., Melis, R., Ronen, G. M., Bjerre, I., Quattlebaum, T., Murphy, J. V., McHarg, M. L., Gagnon, D., Rosales, T. O., Peiffer, A., Anderson, V. E., and Leppert, M. (1998). A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. Nat Genet 18, 25-9.

Slotnick, B. (2001). Animal cognition and the rat olfactory system. Trends Cogn Sci 5, 216-222.

Sloviter, R. S. (1992). Possible functional consequences of synaptic reorganization in the dentate gyrus of kainate-treated rats. Neurosci Lett 137, 91-6.

Sommer, B., Keinanen, K., Verdoorn, T. A., Wisden, W., Burnashev, N., Herb, A., Kohler, M., Takagi, T., Sakmann, B., and Seeburg, P. H. (1990). Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. Science 249, 1580-5.

Sommer, B., Kohler, M., Sprengel, R., and Seeburg, P. H. (1991). RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. Cell 67, 11-9.

Song, I., and Huganir, R. L. (2002). Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. Trends Neurosci 25, 578-88.

Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. Nat Genet 21, 70-1.

Spergel, D. J., Krsmanovic, L. Z., Stojilkovic, S. S., and Catt, K. J. (1994). Glutamate modulates [Ca2+]i and gonadotropin-releasing hormone secretion in immortalized hypothalamic GT1-7 neurons. Neuroendocrinology 59, 309-17.

Spergel, D. J., Kruth, U., Hanley, D. F., Sprengel, R., and Seeburg, P. H. (1999). GABA- and glutamate-activated channels in green fluorescent protein-tagged gonadotropin-releasing hormone neurons in transgenic mice. J Neurosci 19, 2037-50.

Sprengel, R., Aronoff, R., Volkner, M., Schmitt, B., Mosbach, R., and Kuner, T. (2001). Glutamate receptor channel signatures. Trends Pharmacol Sci 22, 7-10.

Steinlein, O. K., Mulley, J. C., Propping, P., Wallace, R. H., Phillips, H. A., Sutherland, G. R., Scheffer, I. E., and Berkovic, S. F. (1995). A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. Nat Genet 11, 201-3.

Stern, P., Behe, P., Schoepfer, R., and Colquhoun, D. (1992). Single-channel conductances of NMDA receptors expressed from cloned cDNAs: comparison with native receptors. Proc R Soc Lond B Biol Sci 250, 271-7.

Stowers, L., Holy, T. E., Meister, M., Dulac, C., and Koentges, G. (2002). Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. Science 295, 1493-500.

Suchanek, B., Seeburg, P. H., and Sprengel, R. (1995). Gene structure of the murine N-methyl D-aspartate receptor subunit NR2C. J Biol Chem 270, 41-4.

Sun, Y., Olson, R., Horning, M., Armstrong, N., Mayer, M., and Gouaux, E. (2002). Mechanism of glutamate receptor desensitization. Nature 417, 245-53.

Tomita, S., Nicoll, R. A., and Bredt, D. S. (2001). PDZ protein interactions regulating glutamate receptor function and plasticity. J Cell Biol 153, F19-24.

Trussell, L. O., and Fischbach, G. D. (1989). Glutamate receptor desensitization and its role in synaptic transmission. Neuron 3, 209-18.

van den Pol, A. N., Hermans-Borgmeyer, I., Hofer, M., Ghosh, P., and Heinemann, S. (1994). Ionotropic glutamate-receptor gene expression in hypothalamus: localization of AMPA, kainate, and NMDA receptor RNA with in situ hybridization. J Comp Neurol 343, 428-44.

Verdoorn, T. A., Burnashev, N., Monyer, H., Seeburg, P. H., and Sakmann, B. (1991). Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. Science 252, 1715-8.

Wallace, R. H., Marini, C., Petrou, S., Harkin, L. A., Bowser, D. N., Panchal, R. G., Williams, D. A., Sutherland, G. R., Mulley, J. C., Scheffer, I. E., and Berkovic, S. F. (2001). Mutant GABA(A) receptor gamma2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures. Nat Genet 28, 49-52.

Walz, W. (1989). Role of glial cells in the regulation of the brain ion microenvironment. Prog Neurobiol 33, 309-33.

Wenthold, R. J., Petralia, R. S., Blahos, J., II, and Niedzielski, A. S. (1996). Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. J Neurosci 16, 1982-9.

Wenthold, R. J., Yokotani, N., Doi, K., and Wada, K. (1992). Immunochemical characterization of the non-NMDA glutamate receptor using subunit-specific antibodies. Evidence for a hetero-oligomeric structure in rat brain. J Biol Chem 267, 501-7.

Wenzel, H. J., Woolley, C. S., Robbins, C. A., and Schwartzkroin, P. A. (2000). Kainic acid-induced mossy fiber sprouting and synapse formation in the dentate gyrus of rats. Hippocampus 10, 244-60.

Wray, S., Grant, P., and Gainer, H. (1989). Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. Proc Natl Acad Sci U S A 86, 8132-6.

Wray, S., and Hoffman, G. (1986). A developmental study of the quantitative distribution of LHRH neurons within the central nervous system of postnatal male and female rats. J Comp Neurol 252, 522-31.

Wu, T. J., Gibson, M. J., Rogers, M. C., and Silverman, A. J. (1997). New observations on the development of the gonadotropin-releasing hormone system in the mouse. J Neurobiol 33, 983-98.

Wuarin, J. P., and Dudek, F. E. (2001). Excitatory synaptic input to granule cells increases with time after kainate treatment. J Neurophysiol 85, 1067-77.

Yan, J., Zhang, Y., Jia, Z., Taverna, F. A., McDonald, R. J., Muller, R. U., and Roder, J. C. (2002). Place-cell impairment in glutamate receptor 2 mutant mice. J Neurosci 22, RC204.

Yokoi, M., Mori, K., and Nakanishi, S. (1995). Refinement of odor molecule tuning by dendrodendritic synaptic inhibition in the olfactory bulb. Proc Natl Acad Sci U S A 92, 3371-5.

Zamanillo, D., Sprengel, R., Hvalby, O., Jensen, V., Burnashev, N., Rozov, A., Kaiser, K. M., Koster, H. J., Borchardt, T., Worley, P., Lubke, J., Frotscher, M., Kelly, P. H., Sommer, B., Andersen, P., Seeburg, P. H., and Sakmann, B. (1999). Importance of AMPA receptors for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning. Science 284, 1805-11.

Zhang, X., Cui, S. S., Wallace, A. E., Hannesson, D. K., Schmued, L. C., Saucier, D. M., Honer, W. G., and Corcoran, M. E. (2002). Relations between brain pathology and temporal lobe epilepsy. J Neurosci 22, 6052-61.

Zhu, J. J., Esteban, J. A., Hayashi, Y., and Malinow, R. (2000). Postnatal synaptic potentiation: delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. Nat Neurosci 3, 1098-106.

Zinyuk, L. E., Datiche, F., and Cattarelli, M. (2001). Cell activity in the anterior piriform cortex during an olfactory learning in the rat. Behav Brain Res 124, 29-32.

7. Publikationen

Shimshek, D. R., Kim, J., Hubner, M. R., Spergel, D. J., Buchholz, F., Casanova, E., Stewart, A. F., Seeburg, P. H., and Sprengel, R. (2002). Codon-improved Cre recombinase (iCre) expression in the mouse. Genesis *32*, 19-26.

Casanova, E., Fehsenfeld, S., Lemberger, T., Shimshek, D. R., Sprengel, R., and Mantamadiotis, T. (2002). ER-based double icre fusion protein allows partial recombination in forebrain. Genesis *34*, 208-14.

Spergel, D. J., Kruth, U., Shimshek, D. R., Sprengel, R. , and Seeburg, P. H. (2001). Using reporter genes to label selected neuronal populations in transgenic mice for gene promoter, anatomical, and physiological studies. Prog Neurobiol *63*, 673-86.

Scheja, L., Makowski, L., Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Shimshek, D. R., Meyers, D. S., Morgan, M., Parker, R. A., and Hotamisligil, G. S. (1999). Altered insulin secretion associated with reduced lipolytic efficiency in aP2-/- mice. Diabetes *48*, 1987-94.