

**AUSWIRKUNGEN EINER GENETISCHEN N-METHYL-D-ASPARTAT-REZEPTOR  
UNTEREINHEITENSUBSTITUTION AUF GEDÄCHTNISPROZESSE,  
ÄNGSTLICHKEIT, EXPLORATIONSVERHALTEN, MOTORIK UND POST-  
MORTEM HIRNAZETYLCHOLINKONZENTRATIONEN IN DER MAUS**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-  
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

**vorgelegt von  
Ekrem Dere  
aus Heidelberg**

**ULBD, Düsseldorf  
(2003)**

Aus dem Institut für Physiologische Psychologie I  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
(Direktor: Prof. Dr. Joseph P. Huston)

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
(Dekan: Prof. Dr. Gerd Fischer)

Referent: Prof. Dr. Joseph P. Huston

Korreferent: Prof. Dr. Helmut L. Haas

Tag der Kollegialprüfung: 03.11.2003

An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei meinem Mentor Univ.-Prof. Dr. Joseph P. Huston für die exzellente wissenschaftliche Betreuung, und die konzeptionelle Freiheit, bedanken, die er mir bei der Umsetzung unserer Forschungsinitiativen, zugestanden hat. Er hat im Rahmen seiner Betreuungstätigkeit meiner Arbeit immer das richtige Maß an Direktive und Offenheit für neue Ansätze gefunden.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Helmut L. Haas für das meiner Arbeit entgegengebrachte Interesse und für die Übernahme des Korreferats.

Darüber hinaus danke ich PD Dr. Ulrich L.M. Eisel für die Bereitstellung der NR2C-2B Mäuse und den fruchtbaren wissenschaftlichen Austausch. Herrn Günter Abel danke ich für die professionelle Hilfe bei der Erstellung der Abbildungen.

Frau Dipl. Psych. Bianca Topic und allen anderen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Physiologische Psychologie danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und viele anregende Diskussionen.

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen eines von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) geförderten Projekts mit der Kennung: DFG-HU/24-1 und der Projektnummer: 3055, am Institut für Physiologische Psychologie I.

# INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG.....	7
A) THEORETISCHER TEIL.....	10
1. EINLEITUNG.....	10
1.1 Vorbemerkungen.....	10
1.2 Lernen und Gedächtnis.....	12
1.2.1 Die Beziehung zwischen Lernen, neuronaler Plastizität, Verstärkung und Gedächtnis.....	12
1.2.2 Der Hippokampus als ein zentrales Substrat für räumliches Lernvermögen im Besonderen und für die Gedächtnisbildung im Allgemeinen.....	15
1.2.2.1 Die Anatomie des Hippokampus.....	17
1.2.2.2 Versuchsparadigmen zur Messung von hippokampalen Dysfunktionen im Tiermodell.....	19
1.2.2.3 Aus Tiermodellen gewonnene Einsichten in die Funktion des Hippokampus.....	20
1.3 Der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor.....	22
1.3.1 Die Physiologie des NMDA-Rezeptors.....	22
1.3.1.1 Bindungsstellen für Liganden und modulatorisch wirkender Substanzen am NMDA-Rezeptorkomplex.....	24
1.3.2 NMDA-Rezeptoren und synaptische Plastizität.....	25
1.3.3 NMDA-Rezeptor Untereinheiten: Physiologie, hirnregionale Verteilung und funktionale Aspekte.....	30
1.3.3.1 Die NR1-Untereinheit.....	30
1.3.3.2 Die NR2A-Untereinheit.....	33
1.3.3.3 Die NR2B-Untereinheit.....	34
1.3.3.4 Die NR2C-Untereinheit.....	35
1.3.3.5 Die NR2D-Untereinheit.....	38
1.3.3.6 Die NR3A-Untereinheit.....	40
1.3.3.7 Die NR3B-Untereinheit.....	41
1.4 Gentechnische Verfahren zum Studium der Verhaltensrelevanz des NMDA-Rezeptors.....	42
1.4.1 Exemplarische Darstellung des gentechnologischen Ansatzes anhand von NR1 und NR1-CA1 Knockoutmäusen.....	45
1.4.1.1 Elementare Genetik.....	45
1.4.1.2 Aufbau eines Gens.....	45
1.4.1.3 Genexpression.....	46
1.4.1.4 Gen-Knockout.....	46
1.4.1.5 Konditionale Gen-Knockouts.....	49
1.4.1.6 Induzierbare Gen-Knockouts.....	50
1.5 Fragestellungen der Arbeit.....	52
B) EMPIRISCHER TEIL.....	55
2. ALLGEMEINE METHODEN.....	55
2.1 Generierung der NR2C-2B Substitutionsmäuse und deren allgemeine Erscheinung.....	55
2.2 Mögliche altersabhängige Effekte der NR2C-2B Gensubstitution.....	56
2.3 Versuchstiere und Haltung.....	57
2.4 Statistische Auswertung und Darstellung der Versuchsdaten.....	58
3. Darstellung der Experimente.....	60
3.1 Experiment I: Motorische Balancier- und Koordinationsfähigkeit auf dem Rotarod.....	60

3.1.1 Einleitung.....	60
3.1.2 Fragestellungen.....	64
3.1.3 Versuchstiere.....	65
3.1.4 Rationale und Aufbau der Versuchsanordnung.....	65
3.1.5 Versuchsdurchführung.....	67
3.1.6 Abhängige Variablen.....	68
3.1.7 Darstellung der Versuchsdaten und statistische Auswertung.....	68
3.1.8 Ergebnisse.....	68
3.1.8.1 Juvenile NR2C-2B und Wildtypmäuse.....	68
3.1.8.2 Adulte NR2C-2B und Wildtypmäuse.....	70
3.1.9 Diskussion.....	75
3.2 Experiment II: Emotionales Verhalten der NR2C-2B Substitutionsmäuse im Elevated Plus-Maze .....	77
3.2.1 Einleitung.....	77
3.2.2 Fragestellungen.....	82
3.2.3 Versuchstiere.....	82
3.2.4 Rationale und Aufbau der Versuchsanordnung.....	82
3.2.5 Versuchsdurchführung.....	85
3.2.6 Abhängige Variablen.....	85
3.2.7 Darstellung der Versuchsdaten und statistische Auswertung.....	86
3.2.8 Ergebnisse.....	86
3.2.8.1 Juvenile NR2C-2B und Wildtypmäuse.....	86
3.2.8.2 Adulte NR2C-2B und Wildtypmäuse .....	92
3.2.9 Diskussion.....	95
3.3 Experiment III: Non-assoziatives räumliches Habituationlernen im Open-Field.....	97
3.3.1 Einleitung.....	97
3.3.2 Fragestellungen.....	100
3.3.3 Versuchstiere.....	100
3.3.4 Rationale und Aufbau der Versuchsanordnung.....	100
3.3.5 Versuchsdurchführung.....	102
3.3.6 Abhängige Variablen.....	103
3.3.7 Darstellung der Versuchsdaten und statistische Auswertung.....	103
3.3.8 Ergebnisse.....	103
3.3.8.1 Juvenile NR2C-2B und Wildtypmäuse.....	103
3.3.8.2 Adulte NR2C-2B und Wildtypmäuse.....	106
3.3.9 Diskussion.....	108
3.4 Experiment IV: Objektexploration und Wiedererkennung.....	110
3.4.1 Einleitung.....	110
3.4.2 Fragestellungen.....	111
3.4.3 Versuchstiere.....	111
3.4.4 Rationale und Aufbau der Versuchsanordnung.....	111
3.4.5 Versuchsdurchführung.....	113
3.4.6 Abhängige Variablen.....	113
3.4.7 Darstellung der Versuchsdaten und statistische Auswertung.....	113
3.4.8 Ergebnisse.....	114
3.4.9 Diskussion.....	116
3.5 Experiment V: Assoziatives räumliches Lernen von NR2C-2B Substitutionsmäusen im Morris Water-Maze.....	117
3.5.1 Einleitung.....	117
3.5.2 Fragestellungen.....	120

3.5.3 Versuchstiere.....	121
3.5.4 Rationale und Aufbau der Versuchsapparatur.....	121
3.5.5 Durchführung und Auswertung.....	123
3.5.6 Abhängige Variablen.....	123
3.5.7 Darstellung der Versuchsdaten und statistische Auswertung.....	123
3.5.8 Versuchsdesign.....	124
3.5.9 Ergebnisse.....	126
3.5.10 Diskussion.....	136
3.6 Experiment VI: Post-Mortem Gehirnazetylcholin- und CholinKonzentrationen.....	139
3.6.1 Einleitung.....	139
3.6.2 Fragestellungen.....	141
3.6.3 Versuchstiere.....	141
3.6.4 Biochemische Analyse mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie und elektrochemischer Detektion (HPLC-EC).....	141
3.6.5 Darstellung der Versuchsdaten und statistische Auswertung.....	142
3.6.6 Ergebnisse.....	142
3.6.7 Diskussion.....	144
4. ALLGEMEINE DISKUSSION.....	146
5. REFERENZEN.....	149
6. ANHANG.....	184

## ZUSAMMENFASSUNG

N-Methyl-D-Aspartat Rezeptoren (NMDA-R) sind Glutamatrezeptoren die für Kationen und insbesondere für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen permeabel sind und gemeinsam mit Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic Säure (AMPA) und Kainatrezeptoren die exzitatorische Neurotransmission im Gehirn medieren. Der NMDA-R ist ein Multiproteinkomplex und besteht aus NR1, NR2(A-D) und möglicherweise NR3(A,B) Untereinheiten. Die exakte Komposition der Untereinheiten determiniert die biophysischen Charakteristika der NMDA-Rezeptoren und ihre regionsspezifische funktionale Diversität. Hirnregionale Unterschiede in der Untereinheitenzusammensetzung der NMDA-R bilden die Grundlage für eine Vielzahl von physiologischen (Hirnreifung, synaptische Plastizität, Gedächtnis, Emotion, Motorik, etc.) und pathophysiologischen Prozessen (Schizophrenie, Epilepsie, Schlaganfälle, etc.) an denen der NMDA-R partizipiert.

Die dem NMDA-R, in der pertinenten Literatur, häufig attribuierte Koinzidenzdetektorfunktion bei der Induktion erfahrungsabhängiger synaptischer Plastizität, scheint insbesondere auf der Untereinheitenkomposition des Rezeptors zu basieren. Es ist bekannt das Rezeptoren, die die NR2B Untereinheit einschließen, anders als solche, die die NR2C Untereinheit beherbergen, hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Leitfähigkeiten, exzitatorische postsynaptische Potentiale (EPSP), starke  $\text{Mg}^{2+}$ -Sensitivität, und Bindungsstellen für Second Messenger Systeme aufweisen. Diese Eigenschaften prädestinieren NR2B enthaltende NMDA-R zur Mediiierung von Lern- und Gedächtnisprozessen. Rezeptoren, die die NR2C Untereinheit aufweisen scheinen dagegen für eine aktivitätsabhängige synaptische Effizienzsteigerung eher ungeeignet zu sein. Sie sind jedoch für motorische und möglicherweise emotionale Prozesse bedeutsam.

In NR2C-2B Substitutionsmäusen wurde die proteinkodierende Sequenz des Gens, das für die NR2C Untereinheit kodiert durch die des NR2B Gens ersetzt, während die Sequenz der regulierenden Einheiten (Promotorsequenz) des NR2C-Gens beibehalten wurde. Diese NR2C-2B Substitutionsmäuse exprimieren also anstelle der NR2C Untereinheit die NR2B Untereinheit, wobei die Substitution hirnregional und ontogenetisch dem normalen Expressionsverlauf des NR2C Proteins folgt. Da die NR2C Untereinheit in Wildtypmäusen auch in Hirnregionen exprimiert wird, in denen Lern- und Gedächtnisprozesse, emotionale und motorische Prozesse mitgesteuert werden und NMDA-R in die Regulation des zentralen cholinergen

Metabolismus involviert sind, war zu erwarten das die Gensubstitution diese Funktionen beeinflusst. In einer Reihe von Verhaltensexperimenten und einem neurochemischen Experiment sind NR2C-2B Mäuse von uns phänotypisiert worden. Wir haben gefunden, daß die NR2C-2B Gensubstitution in adulten, nicht jedoch in juvenilen Mäusen, mit motorischen Koordinationsdefiziten einhergeht, die mit mikroanatomischen Aberrationen im Kleinhirn dieser Tiere korrelieren und auf die kontinuierliche Expression der NR2B Untereinheit in Körnerzellen zurückzuführen sind. Unkonditionierte Ängstlichkeitsreaktionen waren bei jungen nicht aber bei adulten NR2C-2B Mäusen erhöht. Adulte NR2C-2B Mäuse zeigten dagegen weniger objektinduzierte Furchtreaktionen auf. Diese Befunde deuten auf Interaktionen zwischen dem Reifegrad des Gehirns und/oder dem Expressionsverlauf der NR2C Untereinheit im Laufe der Ontogenese und der Gensubstitution hin. Die NR2C-2B Gensubstitution hat sich bei adulten Substitutionsmäusen nicht auf räumliche Habituationsprozesse nach Reexposition am Folgetag ausgewirkt. Allerdings zeigten die adulten NR2C-2B Mäuse, im Gegensatz zu den Kontrollen, während der dritten Exposition eine weitere Reduktion der explorativen Aktivität auf. Es ist möglich, daß bei den NR2C-2B Mäusen nach der zweiten Exposition erneut ein Gedächtniskonsolidierungsprozeß einsetzte, der den Gedächtnisinhalt weiter gefestigt hat. Um promnestische Effekte der NR2C-2B Gensubstitution bei einer Objektexplorationsaufgabe abbilden zu können, wurde ein Design gewählt, das darauf abzielte Gedächtnisleistungen zu detektieren, zu denen normale Kontrollmäuse unfähig sind. Dies wurde erreicht, in dem das Behaltensintervall zwischen den Testungen von den üblichen 30-90 Minuten auf 24 Stunden verlängert wurde. Erwartungsgemäß waren Kontrolltiere nach 24 stündigen Behaltensintervallen weder in der Lage 2 identische Objekte wiederzuerkennen, noch eindeutig zwischen einem „alten“ und einem „neuen“ Objekt zu diskriminieren, wogegen NR2C-2B Mäuse dazu imstande waren. Dieser höchst bemerkenswerte Befund deutet darauf hin, daß die NR2C-2B Gensubstitution nicht nur das „normale“ Repertoire an Gedächtnisleistungen von Mäusen verbessern kann, sondern vielmehr zu Gedächtnisleistungen befähigt, zu denen normale Kontrollmäuse aufgrund ihrer genetischen Grundausstattung gar nicht fähig sind. Im Morris Water-Maze Test zur Messung des räumlichen Lernvermögens zeigten die NR2C-2B Substitutionsmäuse eine beschleunigte Akquisition einer konventionellen "Hidden Platform" Aufgabe. Während einer multiplen Akquisitionsaufgabe mit insgesamt 3 neu zu erlernenden im

Wasser verborgenen Plattformpositionen, zeigten die NR2C-2B Mäuse erneut eine beschleunigte Akquisition. In einer Kontrollbedingung zur Messung motivationaler und visumotorischer Faktoren unterschieden sich die Gruppen dagegen nicht. Unsere Befunde deuten darauf hin, daß eine geringfügige Verlagerung des Verhältnisses einzelner NMDA-Rezeptortypen im Vorderhirn zugunsten solcher, die die NR2B Untereinheit integrieren, das Objektgedächtnis, wie auch nicht-assoziatives und assoziatives räumliches Lernen und wiederholtes Umlernen verbessern kann. Die NR2C-2B Gensubstitution führte des weiteren zu erhöhten post-mortem AzetylcholinKonzentrationen im frontalen Kortex und der Amygdala. Es ist denkbar, daß die für die NR2C-2B Mäuse gefundenen erhöhten AzetylcholinKonzentrationen zu den verbesserten Lern- und Gedächtnisleistungen via der Faszillitierung von Aufmerksamkeits- und elementaren Informationsverarbeitungsprozessen beigetragen haben.

## **A) THEORETISCHER TEIL**

### **1. EINLEITUNG**

#### **1.1 Vorbemerkungen**

Die vorliegende Arbeit ist dem Feld der Verhaltensneurogenetik zuzuordnen. Dieses Forschungsfeld versucht, durch Manipulation von Genen, (die in Bezug auf ihre Sequenz und Steuerung bereits erforscht sind) und deren Einbringung in die Keimbahn von Mäusen (mittels homologer Rekombination), deren Funktion bzw. die Funktion der, durch diese Gene gebildeten, Proteine im Rahmen der Verhaltenssteuerung zu bestimmen. Dieser Ansatz wird auch als reverse Verhaltensgenetik bezeichnet und hat sich besonders auf Forschungsfeldern bewährt, die mit konventionellen Techniken der Verhaltensneurobiologie (Läsionen, Pharmakologie, Elektrophysiologie etc.), wegen mangelnder Spezifität der Interventionen, nur bedingt bearbeitet werden konnten. In den ersten Studien auf diesem Feld wurden einzelne, später auch mehrere Gene, im gesamten Körper von Mäusen in ihrer normalen Funktion beeinträchtigt (Gen-Knockout). In der Folgezeit wurden Techniken entwickelt, die es ermöglichten Gene auch gewebe- und zellspezifisch auszuschalten (konditionale Gen-Knockouts) oder zu vermehrter Aktivität anzuregen (Gen-Überexpression). Die letzte methodische Neuerung auf diesem prosperierenden Forschungsfeld ermöglichte gar die veränderte Funktionsweise eines Gens auch zeitlich zu regulieren (induzierbare Genmutationen). Im Rahmen der Erforschung der funktionalen Rolle des NMDA-R wurden die oben angesprochenen Methoden genutzt, um zunächst einmal die Auswirkungen einer völligen Abwesenheit von NMDA-R zu erforschen (durch die genetische Inaktivierung der essentiellen NR1-Untereinheit, siehe Abschnitt „Die Physiologie des NMDA-Rezeptors“). Hiernach wurden Mäuse generiert, bei denen NMDA-R nur in Pyramidenzellen der CA1-Region und in der CA3-Region des Hippokampus, postnatal einsetzend, entweder dauerhaft abwesend waren oder auch zeitlich begrenzt inaktiviert werden konnten. Während der Ganzkörperknockout der NMDA-R zu perinataler Letalität führte, waren die konditionalen Knockouts lebensfähig. Die Verhaltensphänotypisierung dieser NR1-Knockoutmäuse führte zu wertvollen Erkenntnissen bezüglich der Rolle der hippocampalen NMDA-R, im

Rahmen der Gedächtnisbildung und Konsolidierung. In der Folgezeit wurden Knockout- und Überexpressionsmäuse einzelner oder zweier NR2 und NR3 Untereinheiten des NMDA-R generiert und verhaltensphänotypisiert. Diese Studien demonstrierten, daß die exakte Untereinheitskomposition des NMDA-R seine elektrophysiologischen und damit auch funktionalen Eigenschaften, im Rahmen der Verhaltenssteuerung, bestimmt. Zur Generierung der in der vorliegenden Arbeit phänotypisierten Mausmutanten wurde (soweit es uns bekannt ist) eine bis dato völlig vernachlässigte Option realisiert. Der Arbeitsgruppe um PD Dr. Ulrich Eisel (Institut für Genetik, Universität Stuttgart) ist es gelungen, die kodierende Sequenz eines Gens, das für eine Untereinheit des NMDA- (N-Methyl-D-Aspartat) Rezeptors kodiert (NR2C), durch ein anderes (NR2B) zu ersetzen und somit eine Gensubstitutionsmaus zu generieren.

Eine große Zahl an pharmakologischen, elektrophysiologischen und genetischen Studien implizieren NMDA-Rezeptoren in motorische, emotionale und insbesondere in Lern- und Gedächtnisprozesse. Deshalb wurden die NR2C-2B Mäuse diversen Verhaltenstests unterzogen, die geeignet sind Alternationen in den genannten Funktionsbereichen abzubilden (siehe Abschnitt "Ziele der Arbeit" und die Abschnitte zu den Experimenten I-VI im "Empirischen Teil"). Weil die NR2C-2B Gensubstitutionsmaus besonders in Hinblick auf Lern- und Gedächtnisprozesse interessant ist, bilden Lern- und Gedächtnisexperimente einen Schwerpunkt im Rahmen der hier präsentierten Verhaltenscharakterisierung der NR2C-2B Maus. Im folgenden theoretischen Teil wird deshalb auch ein kurzer Abriss der tierexperimentellen und in einem Fallbeispiel auch der klinischen Lern- und Gedächtnisforschung präsentiert, um den theoretischen Hintergrund zu bereiten, vor dem die Verhaltensexperimente diskutiert werden. Das Verständnis und die kritische Würdigung der Auswirkungen der NR2C-2B Gensubstitution und anderer NMDA-R Geninterventionen auf das Verhalten von Mäusen und deren Implikationen für die jeweiligen Forschungsfelder (Gedächtnis, Emotion, Motorik) setzt des weiteren eine Darstellung des Hippokampus als einen wesentlichen Teil des endogenen Gedächtnissubstrats, der Grundzüge der Physiologie des NMDA-R, des genetischen Apparates und von methodischen Aspekten des gentechnologischen Ansatzes in der Verhaltensneurobiologie voraus. In der nachfolgenden Einleitung, unter den entsprechenden Abschnitten, wurde versucht den theoretischen Hintergrund der Experimente komprimiert darzustellen. Im empirischen Teil findet sich zu jedem

Experiment eine gesonderte fokussierte Einleitung in der spezifische Fragestellungen vor dem Hintergrund der Fachliteratur hergeleitet werden.

## **1.2 Lernen und Gedächtnis**

### **1.2.1 Die Beziehung zwischen Lernen, neuronaler Plastizität, Verstärkung und Gedächtnis**

Die Frage nach den Bedingungen die Lernen ermöglichen, wie es gefördert werden kann, wie unangepasstes erlerntes Verhalten (z.B. Phobien etc.) wieder extinguiert, d.h. „verlernt“ werden kann oder wie, durch neurologische Erkrankungen oder alterungsbedingt hervorgerufene Lerndefizite pharmakologisch und/oder rehabilitatorisch gemildert werden können, sind zentrale Themen der empirischen Psychologie.

Lernen ist eine relativ überdauernde Verhaltensänderung auf der Grundlage von Erfahrungen. Kein Lernen liegt vor, wenn die Verhaltensänderung durch körperliche Reifung, Reflexe, Instinkte, Ermüdung, Drogen oder biologische Triebzustände etc. induziert wird (siehe auch Heise, 1984; Thompson & Spencer, 1966).

Reize die zeitlich und/oder räumlich gemeinsam auftreten, werden, vorausgesetzt der Organismus befindet sich in einem rezeptiven, d.h. aufmerksamen Zustand, miteinander assoziiert (Pavlov, 1927). Ebenso werden die auf eine Reaktion des Organismus hin auftretenden Konsequenzen bzw. veränderten Reizkonstellationen wie auch die der Reaktion vorangegangenen Reize mit dieser verknüpft (Übersicht bei Dragoi & Staddon, 1999). Eine Reiz-Reaktionsassoziation wird dann verhaltenswirksam bzw. führt zu einer Verhaltensänderung, (d.h. das die Auftrittswahrscheinlichkeit einer Reaktion unter ähnlichen Reiz- und motivationalen Bedingungen ansteigt), wenn auf eine Reaktion ein Zustand folgt, den der Organismus als angenehm empfindet, z.B. eine Futterbelohnung im hungrigen Zustand oder die Beendigung oder Vermeidung einer aversiven Stimulation (z.B. Schmerz, Furcht, forciertes Schwimmen etc.) (Bolles, 1969; Rescorla, 1988; Thorndike, 1932). B.F. Skinner, der Begründer des „radikalen“ Behaviorismus, spricht in diesem Zusammenhang, bar jeder kognitiven Erklärung, von operanter Verstärkung des Verhaltens, vergleichbar einer Maschine die auf einen bestimmten Input mit einem durch die Verstärkung festgestanzten Output bzw. einer Reaktion antwortet (Skinner, 1938), ohne das Kognitionen, z.B. Antizipationen, also

Erwartungen der früher erfahrenen Verhaltenskonsequenz (Tolman, 1966), als intervenierende Variablen eine Rolle spielen.

Grundvoraussetzungen des Lernens sind wiederholte Darbietungen der Lernsituation (Ausnahmen sind sogenannte One-trial Lernaufgaben: konditionierte Geschmacksaversion (Hunt & Amit, 1987), „One-trial step-through avoidance“ (McGaugh, 1973)), Motivation und Verstärkung. Diese Verhaltensänderungen gehen natürlich mit Veränderungen der Arbeitsweise und strukturellen Veränderungen in Teilen des zentralen Nervensystem einher. Damit das Erlernte auch wieder abgerufen werden kann, muß es im Gedächtnis als permanentes Engramm bzw. Gedächtnisinhalt niedergelegt werden (Cahill & McGaugh, 1996; Deutsch, 1983; Gold & McGaugh, 1984).

Huston und Mitarbeiter erarbeiteten eine empirisch überprüfbare Theorie, die versucht die Wechselwirkung zwischen operantem Lernen, Verstärkung und Gedächtnisbildung zu explizieren. Nach dieser Theorie entsteht infolge der räumlich-zeitlichen Kontiguität (gemeinsames Auftreten) zwischen einem bzw. mehreren diskriminativen Reizen (z.B. ein Tonsignal, daß die Verfügbarkeit einer Belohnung anzeigt, nachdem eine definierte Reaktion geäußert wurde, z.B. ein Hebeldruck in einer Skinnerbox) und einer Reaktion, die geeignet ist ein verstärkendes bzw. belohnendes Ereignis einzuleiten, eine sogenannte immediate- (unmittelbare, erste) Gedächtnisspur (repräsentiert als Aktivität in Neuronenverbänden bzw. in Neuronenschaltkreisen während der Darbietung der Lernsituation), die jedoch rasch wieder ausbleicht bzw. zerfällt, wenn nicht kurz darauf ein Verstärker appliziert wird.

Der Verstärker bewirkt also, daß die immediate-Gedächtnisspur bewahrt wird und somit in eine Kurzzeitgedächtnisspur überführt wird, die weniger labil ist, jedoch auch mit einer gewissen Zeitkonstante zerfällt (aber langsamer als die immediate-Gedächtnisspur). Um so kürzer der zeitliche Abstand zwischen Reaktion und Verstärkung, desto länger wird die Gedächtnisspur vor dem Zerfall bewahrt und um so stärker bzw. kräftiger ist die Gedächtnisspur (Huston & Mondadori, 1977; Huston & Mueller, 1978; Huston & Oitzl, 1989).

Schon Donald Hebb (1949) spekulierte, daß die immediate- wie auch die Kurzzeit-Gedächtnisspur als kreisende elektrische Hirnaktivität, in dem am Lernvorgang beteiligten Neuronenschaltkreis repräsentiert ist. Die Applikation von elektrokonvulsiven Schocks, kurz nach dem Lernvorgang, in der labilen Konsolidierungsphase stört diese reverpratorische (kreisende) Aktivität, so das kein

Transfer in das Langzeitgedächtnis erfolgt (Andrade et al., 1994; Duncan & Hunt, 1972; Mondadori et al., 1977) (Der Übertrag von Informationen bzw. Reiz-Reaktionsassoziationen vom Kurzzeit ins Langzeitgedächtnis wird als Konsolidierung bezeichnet).

Das Langzeitgedächtnis ist nicht in Form von kreisender Neuronenaktivität, sondern vielmehr als strukturelles Engramm repräsentiert (d.h. das es an den Synapsen im Neuronenschaltkreis, infolge der durch die kreisende Neuronenaktivität induzierten sogenannten Langzeitpotenzierungs- und Depotenzierungsprozesse, und nachfolgender Aktivierung des genetischen Apparates, zu morphologischen Veränderungen gekommen ist, die die synaptische Übertragung überdauernd verbessern) und ist als solches weniger leicht durch Schocks oder Pharmaka, z.B. Proteinbiosynthesehemmer, oder NMDA-R Antagonisten, stöbar (Kandel & Pittenger, 1999; Mayford & Kandel, 1999; Pittenger & Kandel, 1998).

Nach Huston fördern Verstärker nicht nur die Halbwertszeit einer immediate-Gedächtnisspur, sondern können auch während der Kurzzeitspeicherungsphase stärkend auf die Gedächtnisspur einwirken und somit die Überführung ins Langzeitgedächtnis als permanentes Engramm fördern. Folgerichtig führt auch eine Post-trial Verstärkung (also ein Verstärker der nach dem Lernvorgang gewährt wird, zu einer Erleichterung der Gedächtnisspeicherung (Mondadori et al., 1977). Beispielsweise zeigen Mäuse während eines Testdurchgangs länger andauernde passive Vermeidungsreaktionen („Step-down avoidance“), wenn sie unmittelbar nach dem Lerndurchgang, z.B. am Vortag, bei dem das Absteigen von einer Plattform mit einem Fußschock bestraft wurde, eine Futterbelohnung erhalten. Dieser Befund unterstreicht den hohen Verstärkungswert von Verstärkern die geeignet sind natürliche bzw. biologische Bedürfnisse zu befriedigen (im Sinne der Fähigkeit Verhalten zu bekräftigen bzw. die Auftretenswahrscheinlichkeit einer gegebenen Reaktion unter adäquaten Reizbedingungen zu modulieren). Eine Futterbelohnung (bei ausreichender Deprivation) kann instrumentelles Verhalten bzw. operantes Lernen (Verhalten, das unter Kontrolle von diskriminativen Hinweisreizen und seiner Konsequenzen steht) begünstigen, indem die konsumatorische Reaktion (z.B. die Futteraufnahme), oder auch Zielreaktion genannt (Glickman & Schiff 1967) selbst als Verstärker wirkend, die Überführung der immediate-Gedächtnisspur in eine Kurzzeitgedächtnisspur fördert, während die verzögert einsetzende Beseitigung des physiologischen Mangelzustandes nach Verdauung der Nahrung, einhergehend mit

einem Ansteigen des Glukosespiegels im Blut, den Transfer vom Kurzzeit-Gedächtnis ins Langzeitgedächtnis erleichtert.

### **1.2.2 Der Hippokampus als ein zentrales Substrat für räumliches Lernvermögen im Besonderen und für die Gedächtnisbildung im Allgemeinen**

Die hippokampale Formation im Vorderhirn, genauer im medialen Temporallappen lokalisiert, hat sich, aufgrund einer mittlerweile kaum mehr zu übersehenden Fülle von klinischen und tierexperimentellen Befunden, als eine für die Gedächtnisbildung kritische Struktur erwiesen (Übersicht bei O'Keefe & Nadel, 1978; Rolls, 2000; Squire, 1992). Besonders nachhaltig hat die Gedächtnisforschung die Beschreibung der Gedächtnisdefekte des Amnestikers (Patient der Gedächtnisschwächen, aufgrund einer neurologischen Erkrankung bzw. Hirnschädigung, aufweist) H.M. durch Scoville & Milner (2000) und anderen Neuropsychologen beeinflusst. Das Bemerkenswerte an diesem Fall war, daß eine relativ engumgrenzte Läsion, die bilaterale Entfernung des medialen Temporallappens, zur Milderung von epileptischen Anfällen, deren Ursprungsherd in dieser Region vermutet wurde, zu einem höchst selektiven Gedächtnisdefekt führte, ohne das andere Funktionen, z.B. Sprechen, Rechnen, Schreiben etc. in Mitleidenschaft gezogen wurden. Die beidseitige Entfernung des medialen Temporallappens bei H.M. (die Resektion betraf die anterioren, d.h. vorderen Anteile des Hippokampus, des Mandelkerns, der vor allem mit Furcht bzw. Angst in Verbindung gebracht wurde, und Teile der angrenzenden Hirnrinde), erbrachte zwar tatsächlich eine erhebliche Besserung der epileptischen Symptomatik, allerdings litt der Patient fortan unter einer permanenten Gedächtnisschwäche. Die Gedächtnisschwäche äußerte sich dahingehend, das H.M. nicht mehr in der Lage war, bestimmte Informationskategorien über längere Zeiträume zu behalten (z.B. sich an die Personen zu erinnern, die ihn täglich testeten, die er aber erst nach dem Eingriff kennenlernte, oder sich in einer neuen räumlichen Umgebung zurechtzufinden). Dieser Zustand wird als anterograde (zeitlich gesehen vorwärts gerichtete) Amnesie bezeichnet. Das Gedächtnis für Inhalte, die vor dem Eingriff erworben wurden, blieb dabei relativ unbeschadet (Störungen, bei denen weit zurückliegende Ereignisse nicht mehr erinnert werden können, werden als retrograde bzw. rückwärts gerichtete Amnesien bezeichnet). Kurz vor dem Eingriff erworbene Gedächtnisinhalte waren jedoch für H.M. nicht

abrufbar. Bemerkenswerterweise schien H.M.'s Gedächtnis für neu zu erlernende motorische Fertigkeiten (prozedurales oder auch implizites Gedächtnis genannt), z.B. spiegelverkehrt nachzeichnen, weitestgehend unversehrt (Freed & Corkin, 1988; Gabrieli et al., 1988; Huppert & Piercy, 1979; Kapur et al., 1994; Milner, 1972). Das Studium der Gedächtnisdefekte des Patienten H.M. führte zu weitreichenden Erkenntnissen bezüglich der Organisation des Gedächtnisses. Die bei H.M. entfernten Hinstrukturen waren offenbar nicht der Ort im Gehirn, in denen Gedächtnisinhalte bzw. Engramme niedergelegt waren, da das Erinnern von weit zurückliegenden Ereignissen unbeeinflusst blieb. Bereits Karl S. Lashley (1929) versuchte bereits erworbene Engramme, z.B. für den Weg durch ein Labyrinth, bei Ratten auszulöschen, in dem er Läsionen in definierten Hirnrindenregionen setzte und damit leider kläglich scheiterte, was ihn zur Einsicht führte, daß Gedächtnisinhalte offenbar nicht lokalisierbar sind, sondern vielmehr diffus (ausgebreitet, ausgedehnt) über das Gehirn einschließlich Rückenmark repräsentiert sind (Massenaktionshypothese).

Auch scheint der Hippokampus für den Abruf von bereits gespeicherten Informationen entbehrlich zu sein, wenn diese relativ lange Zeit vor der Schädigung erworben wurden, nicht jedoch wenn diese erst kurze Zeit vor der Läsion gebildet wurden. Es wurde spekuliert, daß Gedächtnisinhalte zunächst transient im Hippokampus gespeichert und erst danach im Neokortex zur permanenten Speicherung abgelegt werden. Eine weitere Hypothese zur Erklärung des temporären Amnesiegradienten von H.M. besagt, daß der Hippokampus möglicherweise für den Abruf von kürzlich gebildeten (noch labilen) Gedächtnisinhalten notwendig ist.

Aus dem Umstand, daß H.M. noch in der Lage war eine Konversation zu betreiben, bei der nur auf das einzugehen war, was sein gegenüber wenige Sekunden vorher von sich gegeben hatte (wobei die Erinnerung daran, daß dieses Gespräch jemals stattgefunden hat, wenige Minuten nach dem Gespräch wenn H.M. in dieser Zeit abgelenkt wurde wieder ausgelöscht war), wurde geschlossen, daß das Kurzzeit- bzw. Arbeitsgedächtnis (Short-term bzw. Working-memory) eine extrahippokampal medierte Funktion ist. Der Fakt, daß der Übertrag vom offensichtlich intakten Kurzzeit-Gedächtnis ins Langzeitgedächtnis (Long-term Memory) bei H.M. unterblieb, deutete darauf hin, daß eine oder mehrere der entfernten Strukturen für diesen

Transfer unerlässlich sind (Postle & Corkin, 1998; Sagar et al., 1990; Scoville & Milner, 2000; Smith, 1988; Sullivan & Sagar, 1991; Woodruff-Pak, 1993).

Diese Erkenntnisse zogen die Entwicklung von Paradigmen zur Messung von hippokampal medierten Funktionen und eine rege tierexperimentelle Untersuchung der Hippokampusformation mittels läsionstechnischer, pharmakologischer, elektrophysiologischer und später auch gentechnologischer Ansätze nach sich, in deren Verlauf dem Hippokampus, neben der dominierenden Rolle als Engrammbildungskordinator auch eine maßgebende Involvierung in räumliche Lernprozesse zugesprochen wurde. Im Folgenden soll zunächst die Anatomie und Neurochemie des Hippokampus dargestellt werden, worauf dann einige Versuchsparadigmen beschrieben werden, die generiert wurden, um hippokampale Dysfunktionen zu quantifizieren, um dann schließlich auf die wichtigsten Befunde zu sprechen zu kommen, die mit diesen Tiermodellen erhoben wurden.

#### **1.2.2.1 Die Anatomie des Hippokampus**

Der Hippokampus, Teil des Telenzephalons (Endhirn), wird den phylogenetisch ältesten Hirnrindenabschnitten zugeordnet. Homologe Hirnstrukturen finden sich bei allen Säugetieren und auch Vögeln (Capaldi et al., 1999). Es lässt sich eine grobe Vierteilung des Hippokampus in entorhinalen Kortex, Subikulum, Ammonshorn und Fascia dentata vornehmen. Das Cornu ammonis oder Ammonshorn lässt sich hinsichtlich der Zytoarchitektur (d.h. den intrinsischen Zelltypen, z.B. Körnerzellen, Pyramidenzellen, Astrozyten etc.) und deren Verschaltung in vier weitere Substrukturen, die Areale CA 1-4, zergliedern (Giap et al., 2000). Die weiße Substanz des Hippokampus, die alle afferenten Eingänge und efferenten Projektionen enthält, wird als Alveus bezeichnet und verläuft zur Fimbria hippocampi, die sich zur Fornix verjüngt. Die Fornix ist eine dem Hippokampus vorgeschaltete Struktur, die diesen mit einer Vielzahl von Vorderhirnstrukturen (Septum, Nukleus accumbens, diagonales Band von Broca) und subkortikalen Arealen (Hypothalamus, Thalamus, Tegmentum, Formatio reticularis), unter anderem durch cholinerge Faserzüge verbindet (Amaral & Witter, 1989; Cassel et al., 1997; Jayaraman, 1985; Swanson, 1977). Der Hippokampus erhält des weiteren, per Tractus perforans über die Area entorhinalis, Afferenzen aus allen Teilen des assoziativen Neokortex, wie auch aus dem limbischen System (u.a. der Amygdala), wobei die Projektionen aus dem zingulären Gyrus, dem orbitofrontalen Kortex, und dem Temporalkortex

besonders hervorzuheben sind (Wen et al., 1999; Witter, 1993). Die Area entorhinalis ist der Ausgangspunkt der sogenannten trisynaptischen Schleife des Hippokampus. Die Informationen aus den primären und sekundären sensorischen Arealen und den polymodalen Assoziationskortex werden im entorhinalen Kortex integrierend verarbeitet und den Körnerzellen des Gyrus dentatus, via des Tractus perforans, übermittelt. Diese entsenden Moosfasern in die CA3-Region des Ammonshorns. Pyramidenzellen der CA3-Region innervieren mit ihren Fortsätzen, Schaeffer-Kollaterale genannt, die CA1-Pyramidenzellen (Patton & McNaughton, 1995). Die Axone der CA1-Pyramidenzellen projizieren daraufhin via Subikulum zurück zum entorhinalen Kortex und schließen den Schaltkreis somit wieder (Frotscher et al., 1994; Thierry et al., 2000). Es gilt mittlerweile als gesichert, daß jede Synapse in diesem Schaltkreis auch die exzitatorische Aminosäure Glutamat als Neurotransmitter aufweist (Baudry & Lynch, 1981; Ottersen & Storm-Mathisen, 1984). Des weiteren wurde berichtet, daß der Hippokampus proper wie auch die Fascia dentata eine relativ hohe Dichte an gabaergen Axonterminale aufweist, die von intrinsischen Interneuronen herkommen (Lopes-da-Silva & Arnolds, 1978; Somogyi et al., 1984). Über das Zingulum und die Fornix erhält der Hippokampus noradrenergen Input aus dem Locus coeruleus und serotoninerge Afferenzen aus den Raphekernen (Molliver, 1987; Moore & Bloom, 1979). Aus dem posterioren Hypothalamus erhält der Hippokampus zudem eine starke histaminerge Innervation. Diese Verbindungen sind reziprok, d.h. der Hippokampus projiziert zu diesen Regionen zurück. Allgemein läßt sich also festhalten, daß der Hippokampus ein polymodales Assoziationszentrum bildet (eine Hirnstruktur, die Input von vielen primären und sekundären sensorischen Systemen erhält), das sowohl sensorische (Schmerzreize, visuelle, olfaktorische, auditive, und somatosensorische Reize) als auch emotionale (Furchtreize, belohnende Reize), endokrinologische (hormonelles Gleichgewicht), aufmerksamkeitsbezogene, und neokortikale (denen Komplexe Verarbeitungsprozesse, wie z.B. Problemlösen etc. zugesprochen werden) Informationen, integrierend, auch hinsichtlich räumlich-zeitlicher Aspekte, verarbeitet (Zola-Morgan & Squire, 1993).

### **1.2.2.2 Versuchsparadigmen zur Messung von hippocampalen Dysfunktionen im Tiermodell**

Zur Operationalisierung des Konstrukts räumliches Lernen wurden eine Reihe von Paradigmen bzw. Versuchsaapparaturen entwickelt, z.B. das radiale 8-Arm Labyrinth (Olton & Feustle, 1981), das Morris Water Maze (Morris, 1984), die „Circular platform task“ (Barnes, 1979), der Hole-board Test (Oades, 1981), und die „Continuous alternation task“ (Gerlai, 1998) um nur einige zu nennen. Exemplarisch soll das radiale Armlabyrinth von D.S. Olton hervorgehoben werden. Eine Beschreibung des Morris Water-Maze Paradigmas findet sich unter Experiment V. Beim radialen Armlabyrinth wird das zuvor futterdeprivierte Versuchstier in definierten Gängen eines 8-Arm Labyrinths (z.B. immer nur 4 gleiche von acht Armen, die von einer kreisförmigen Plattform, die auch als Startpunkt fungiert, ausstrahlen) mit Nahrung belohnt. Die Aufgabe für die Tiere besteht darin, zu behalten, welcher Bereich des Mazes in vergangenen Durchgängen belohnt wurde und welcher nicht, sowie welche Gänge bereits exploriert wurden. Das Paradigma erlaubt die Differenzierung zwischen der Leistung des Arbeitsgedächtnisses (d.h., daß das Tier sich bereits besuchte Gänge merkt und in diese nicht mehr eintritt) und der des sogenannten Referenzgedächtnisses (d.h., daß das Versuchstier in Gänge, die in den vorangegangenen Lerndurchgängen nie belohnt wurden, meidet) Um die Aufgabe adäquat zu bewältigen, muß das Tier die räumlichen Relationen zwischen den Armen des Labyrinths und den Hinweisreizen aus der räumlichen Umgebung erlernen (Extra-maze Cues: Hinweisreize aus der Umgebung wären beispielsweise die Ausstattung des Versuchslabors, Gerätschaften etc.). Kritisch anzumerken ist in diesem Zusammenhang, daß dieses Paradigma die Induktion eines Triebzustandes vorsieht (d.h., das Tier muss futterdepriviert werden, damit es motiviert ist, die Aufgabe zu erlernen). Des weiteren besteht die Möglichkeit, daß die Versuchstiere ihre Entscheidungen auch aufgrund von diskriminativen olfaktorischen Hinweisreizen treffen, z.B. nach dem Setzen von Duftmarken in bereits besuchten Gängen. Man spricht dann von Intra-maze Cues (Becker et al., 1980; Slangen et al., 1990). In der vorliegenden Arbeit wurde das Morris Water-Maze Paradigma zur Messung des räumlichen Lernvermögens genutzt, weil im Rahmen dieses Paradigmas kein künstlicher Triebzustand induziert werden muß und die Nutzung von Intra-maze Cues zur räumlichen Orientierung weniger stark ins Gewicht fällt. Allerdings handelt es sich beim Water-Maze Paradigma um eine aversiv motivierte Lernaufgabe, so daß

emotionale Prädispositionen die Leistung der Tiere in diesem Test beeinflussen können (siehe Dere et al., 2001). Deshalb wurden die Tiere auch im Elevated Plus-Maze, einem Test zur Messung von unkonditionierter Ängstlichkeit, getestet, um mögliche Interaktionen zwischen Gedächtnisprozessen und emotionalen Prozessen detektieren zu können.

### **1.2.2.3 Aus Tiermodellen gewonnene Einsichten in die Funktion des Hippokampus**

Hippokampuslädierte Ratten (durch Aspiration: Absaugen von Hirngewebe oder elektrolytische Läsionen: Gleichstromläsion, wie auch selektivere neurotoxische Läsionen: z.B. Ibotensäure, die nur Zellen innerhalb einer gegebenen Struktur zerstört und durchziehende Fasern unbeschadet lässt. Übersicht bei Cassel et al., 1997) weisen im Water Maze und radialen Acht-Arm Labyrinth erhebliche Lerndefizite auf (Im Water-Maze wird der Weg zu einer verborgenen Plattform langsamer erlernt und in Testdurchgängen schlechter erinnert, siehe Schenk & Morris, 1985; Sutherland et al., 1983; Im 8-Arm Labyrinth werden viele Arbeitsgedächtnis- und Referenzgedächtnisfehler gemacht, d.h. daß immer wieder in dieselben Gänge gelaufen wird, und auch Gänge aufgesucht werden, die nie, auch an den vergangenen Tagen nicht, futterbelohnt wurden; siehe Ikonen & Riekkinen, 1999; Ward et al., 1999).

Weiterhin fanden sich im Hippokampus mittels elektrophysiologischer in vivo Ableitungen (d.h. im intakten, wachen und freibeweglichen Tier) sogenannte Place-Cells, die nur für den Fall aktiviert werden, wenn sich das Tier in einem definierten räumlichen Kontext aufhält. Wurde die räumliche Anordnung der einzelnen diskriminativen Hinweisreize in der Umgebung variiert, so stellten diese Zellen ihre ortsgebundenen Entladungen ein (O'Keefe & Dostrovsky, 1971).

Die pharmakologische Modulation bzw. Inhibition der exzitatorischen Neurotransmission und damit der Informationsverarbeitung im Hippokampus, z.B. durch die intrahippokampale Applikation von Azetylcholin-Rezeptorantagonisten (Blokland et al., 1992; Carli et al., 1997), GABA-Rezeptoragonisten (Arolfo et al., 1998) oder Glutamat-Rezeptorantagonisten (Davis et al., 1992; Morris et al., 1989) ist, ebenso wie das Setzen von Läsionen (Morris et al., 1982), geeignet, räumliches Lernvermögen zu beeinträchtigen.

Aus diesen Läsions-, pharmakologischen und elektrophysiologischen Befunden wurde gefolgert, daß der Hippokampus für die Ausbildung einer Art kognitiver Landkarte (Cognitive map theory: Tolman 1966; O'Keefe & Nadel, 1978) wesentlich ist, aber auch im Allgemeinen bei der Gedächtnisspeicherung, v.a. von deklarativen Gedächtnisinhalten (explizites Wissensgedächtnis im Tiermodell als Referenzgedächtnis bezeichnet), eine herausragende wenn nicht gar ursächliche Stellung einnimmt (Squire, 1986; Squire, 1992).

D.S. Olton und Mitarbeiter (1979) postulierten dagegen, daß sowohl die Gedächtnisdefizite des Patienten H.M. wie auch die Leistungseinbußen von hippokampal lädierten Ratten in Labyrinthaufgaben primär das Produkt einer tiefgreifenden Störung des Arbeits- bzw. Kurzzeitgedächtnisses ist, das ja, wie schon erwähnt, für eine Langzeitspeicherung von räumlichen und nicht-räumlichen Informationen unerlässlich ist. Diese Sichtweise ist insofern problematisch, als daß, das Kurzgedächtnis des Amnestikers H.M.'s eigentlich gar nicht gestört war. Vielmehr schien H.M.'s Problem darin begründet zu sein, das der Transfer zwischen Kurz- und Langzeitgedächtnis gestört war. Diese Diskrepanz zwischen tierexperimentellen und klinischen Befunden ist möglicherweise das Produkt einer grundlegenden Differenz in der Funktion des Hippokampus bei Primaten und niederen Säugetieren. Des weiteren muss bemerkt werden, daß der Eingriff am Gehirn des Patienten H.M. nicht nur den Hippokampus affektierte, sondern auch umliegende Hirngebiete einschloß, wogegen in tierexperimentellen Studien man i.d.R. darauf bedacht war, mehr oder minder selektive Läsionen zu setzen.

Eine weitere Funktion des Hippokampus wird im Rahmen der Verarbeitung von kontextueller Information vermutet (Hirsh, 1974). Assoziationen zwischen expliziten Reizen (Vordergrundreizen, z.B. einem Tonsignal auf das kontingent ein Elektroschock folgt) werden nicht unabhängig von kontextueller Information (Situationsreize: Hintergrundreize, alle Reize die in einer Lernsituation wirksam sind) gespeichert. So können hippokampuslädierte Ratten die Diskrimination zwischen einem Kontext (Box A) in dem ein CS (Konditionierter Stimulus) von einem aversiven Reiz gefolgt wird und einem Kontext (Box B), mit unterscheidbaren physikalischen Charakteristika, in dem die Präsentation desselben CS keine aversiven Konsequenzen hat, nicht mehr erlernen (Chen et al., 1996; Rudy & O'Reilly, 1999). Schließlich wurde auch beobachtet, daß Ratten mit bilateralen Hippokampusläsionen Schwierigkeiten haben Verhaltensweisen zu unterdrücken, wenn dieses im Rahmen

der Verstärkungskontingenzen der Aufgabe gefordert ist (Douglas, 1967; Winour & Mills, 1969). In einer Testsituation beispielsweise, in dem ein Tonsignal anzeigt, daß die nächste Reaktion, z.B. ein Hebeldruck in einer Skinnerbox, keine Futterbelohnung mehr zur Folge hat solange der Ton andauert, oder noch gravierender die, nächsten 10 Reaktionen nicht mehr belohnt werden, falls während dieser Zeitspanne reagiert wird, sind hippokampuslädierte Ratten nicht in der Lage die Reaktion solange zu unterdrücken, bis das Tonsignal endet und jede weitere Reaktion wieder zuverlässig belohnt wird (Shull & Holloway, 1985). Der Hippokampus scheint also auch für die Reaktionsunterdrückung und/oder Reaktionsselektion unter geeigneten Reizbedingungen wichtig zu sein. Gegenwärtig wird dem Hippokampus auch eine Rolle in der Verarbeitung von zeitlicher Information, im Rahmen der Gedächtnisbildung, zugeschrieben (engl. Event bzw. Episodic memory), d.h., daß der Hippokampus Gedächtnisinhalte bzw. Informationen möglicherweise mit einem Zeitlabel versieht, so daß der Organismus nicht nur weiß in welchem Kontext etwas gelernt wurde, sondern auch wann es gelernt wurde (Eichenbaum et al., 1999). Diese Funktion ist für adaptives Verhalten, bei sich über die Zeit ändernden Verstärkungskontingenzen, z.B. beim wiederholten Umlernen oder Extinktionslernen, von kardinaler Bedeutung. Insbesondere hippokampale NMDA-R scheinen in die Verarbeitung räumlicher Informationen unter zeitlichen Aspekten involviert zu sein (Steele & Morris, 1999). Wie im folgenden noch weiter ausgeführt wird, sind hippokampale NMDA-R für viele der oben beschriebenen Funktionen der hippokampalen Formation essentiell. Deshalb wurden die NR2C-2B Substitutionsmäuse in der vorliegenden Arbeit in hippokampal medierten assoziativen und non-assoziativen Lernaufgaben getestet.

### **1.3 Der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor**

#### **1.3.1 Die Physiologie des NMDA-Rezeptors**

N-Methyl-D-Aspartat Rezeptoren (NMDA-R) sind ionotrope Glutamaterezeptoren die für  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und insbesondere für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen permeabel sind. Die molekulare Struktur bildet sich aus einem extrazellulären Amino-Signalpeptid Terminal, 4 hydrophoben membranständigen Segmenten (M1-M4) und intrazellulären Carboxyl-Terminalen (C-Terminalen). Die membranständigen Segmente bilden die Pore des, in den Rezeptor

integrierten, Ionenkanals (Ferrer-Montiel et al., 1995). Die C-Termini sind kritisch für die Einbettung der NMDA-R in die Zellmembran, ihre subzelluläre Lokalisation und den Zugriff auf intrazelluläre Second Messenger Systeme (Craven & Brecht, 1998) via Interaktionen mit post-synaptischen Anker- bzw. Adapterproteinen (membranassoziierte Guanylat Kinasen), wie z.B. PSD-93 (Post-synaptic density zone), PSD-95, und SAP-120 (Synapse-associated protein) (Garner et al., 2000; Kornau et al., 1995; Niethammer et al., 1996; Sprengel et al., 1998).

NMDA-R sind aus 4 (Tetramer) oder 5 (Pentamer) Untereinheiten aufgebaut (Laube et al., 1998; Premkumar & Auerbach, 1997). Ein NMDA-Rezeptor ist aus zwei NR1 und 2-3 NR2 (A-D) und NR3 (A-C) Untereinheiten zusammengesetzt (Das et al., 1998). Die NR1 Untereinheit und die NR2 Untereinheiten werden durch separate Gene gebildet. Die NR2 und NR3 Untereinheiten weisen, in Abhängigkeit von der Hirnregion und im Laufe der Ontogenese, distinkte Expressionsmuster, elektrophysiologische Eigenschaften und physiologische Funktionen auf (Nakanishi et al., 1994; Monyer et al., 1994; Charton et al., 1999). Auch unterscheiden sich einzelne Zelltypen bezüglich des Vorkommens und der Anzahl der verschiedenen Rezeptortypen. Das feinregulierte Expressionsmuster der NR2 Untereinheiten während der Ontogenese ist kritisch für die Hirnreifung bzw. Synapsenbildung, deren Aufrechterhaltung und Stabilisierung (Monyer et al., 1994). Im noch nicht ausgereiften Nagetierhirn finden sich auch mehr NMDA-R als im adulten Gehirn, ein Umstand der mit der Notwendigkeit der erfahrungsabhängigen Modifikation von neuronalen Schaltkreisen bei juvenilen Tieren in Verbindung gebracht wurde. Die starke hirnregionale NMDA-R Diversität in adulten Tieren erklärt dagegen die Einbindung des NMDA-R in diverse physiologische und pathophysiologische Funktionszusammenhänge (synaptische Plastizität, Schlafverhalten, Schmerzwahrnehmung, zirkadiane Rhythmen, Gedächtnis, Emotionalität, Hyperaktivität, Drogenabhängigkeit, Epilepsie, Schizophrenie, Depression).

Wie schon angesprochen, findet sich die NR1 Untereinheit 2 mal in jedem NMDA-Rezeptor. Ohne die NR1 Untereinheit sind NMDA-Rezeptoren nicht funktional bzw. arbeitsfähig (weil die Glycinbindungsstelle fehlen würde). Auch wären NMDA-Rezeptoren, die nur durch NR1 Untereinheiten aufgebaut wären nicht arbeitsfähig (weil die Glutamatbindungsstelle an den NR2 Untereinheiten fehlen würde). In Zellkulturen die keine endogenen NMDA-R aufweisen, und in die nur eine NR1 cDNA eingeschleust wurde, werden zwar homomere NR1-NMDA-R ausgebildet, diese

haben jedoch nur Leitfähigkeiten die 100-fach geringer sind als solche von heteromeren NR1-NR2 Rezeptoren, so daß davon auszugehen ist das in vivo die Mehrzahl der funktionalen NMDA-R heteromere Kombinationen von NR1 und NR2 Untereinheiten aufweisen. Es gibt eine Vielzahl möglicher Kombinationen von NMDA-Rezeptoruntereinheiten. Jeder Rezeptor weist, in Abhängigkeit von seiner Zusammensetzung, unterschiedliche Eigenschaften auf. In Abhängigkeit von der Zusammensetzung des NMDA-Rezeptorkomplexes ändern sich auch seine kinetischen-, Permeabilitäts-, Ligandenbindungs-, sowie Desensibilisierungseigenschaften, wie auch die Amplitude der postsynaptisch induzierten Depolarisation nach Aktivierung, und ihre  $Mg^{2+}$ -Sensitivität. Der NMDA-R wird aktiviert wenn folgende Bedingungen erfüllt sind: a) Zwei Glycinmoleküle müssen an die NR1 Untereinheiten anbinden; b) Zwei Glutamatmoleküle müssen an die NR2 Untereinheiten anbinden (Clements & Westbrook, 1991); c) die Zellmembran an der sich der Rezeptor befindet muß depolarisiert sein, damit die im Ruhezustand tonisch vorherrschende  $Mg^{2+}$  Blockade des  $Ca^{2+}$ -Kanals aufgehoben wird. Sind diese Bedingungen erfüllt, kommt es zu einem Einstrom von  $Ca^{2+}$  und  $Na^{+}$  Ionen in die Zelle und einem Ausstrom von  $K^{+}$  Ionen aus der Zelle (Meguro et al., 1992). Die NMDA-R Funktion kann post-translational durch Kinasen oder Phosphatasen moduliert werden, z.B. durch Proteinkinase C (PKC) (Chen & Huang, 1992), cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) (Leonard & Hell, 1997), Kalzium-Kalmodulinkinase II (CaMKII) (Omkumar & Kiely, 1996), Src Kinase (Wang & Salter, 1994), Calcineurin und Protein Phosphatase 1 (PP1) (Wang et al., 1994).

### **1.3.1.1 Bindungsstellen für Liganden und modulatorisch wirkender Substanzen am NMDA-Rezeptorkomplex**

Der NMDA-Rezeptor ist relativ komplex organisiert, mit einer Vielzahl von Bindungsstellen für Liganden und modulatorisch wirkenden Substanzen (6 verschiedene Bindungsstellen wurden bisher identifiziert, weitere, möglicherweise spezifisch für einzelne NR2 Untereinheiten, sind jedoch nicht auszuschließen), die potentielle Angriffspunkte für Pharmaka bilden (Dingledine et al., 1999). Die NR1 Untereinheit des NMDA-Rezeptors beherbergt eine Bindungsstelle für den essentiellen Ko-Agonisten Glycin (Kleckner & Dingledine, 1988), die durch Serine stimuliert und durch  $(+)$ -HA-966 antagonisiert werden kann (Danysz et al., 1989). Die

NR2-Untereinheiten dagegen beherbergen die Glutamatbindungsstelle (dort binden auch Aspartat und natürlich NMDA), die z.B. durch 3-(2-carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid (CPP) blockiert werden kann (Ungerer et al., 1991). Die in Verhaltensstudien am häufigsten verwendeten NMDA-R Antagonisten sind Dizocilpin (MK-801; Sircar et al., 1987) und Phencyclidin (PCP; Snell & Johnson, 1985), die direkt an den Ionenkanal des Rezeptors binden und diesen während des geöffneten Zustandes non-kompetitiv blockieren. Die NMDA-Rezeptorfunktion kann aber auch durch Substanzen moduliert werden, die an der Polyamin-Bindungsstelle, die sich an den NR2-Untereinheiten befinden, andocken (z.B. Spermidine und möglicherweise der NR2B Antagonist Ifenprodil) (Traynelis et al., 1995). Weitere Angriffspunkte sind die sogenannten "Redox-agent effector sites" an die gasförmige Botenstoffe wie Stickoxid (NO) und Kohlenmonoxid (CO) binden können und die  $Mg^{2+}$  Bindungsstelle (Lipton, 1993) innerhalb des integrierten Ionenkanals. Des weiteren gibt es Erkennungsorte für Protonen, z.B.  $H^+$  [die eine tonisch inhibitorische Wirkung auf den Rezeptor haben, die durch Polyamine egalisiert werden kann (Gallagher et al., 1997)],  $Zn^{2+}$  (negative und positive Modulation der NMDA-R Leitfähigkeit; bindet an die NR1-Untereinheiten), Proteinkinasen, und Phosphatasen (Yamakura & Shimoji, 1999).

### **1.3.2 NMDA-Rezeptoren und synaptische Plastizität**

NMDA-Rezeptoren spielen eine zentrale Rolle beim Prozess der Induktion von plastischen Veränderungen an Kontaktstellen zwischen Neuronen und nehmen damit vermutlich auch eine herausragende Stellung bei der Bildung von Gedächtnisinhalten ein (Gnagy, 2000; Platenik et al., 2000). Das Phänomen der synaptischen Langzeitpotenzierung (LTP), das an Hirnschnittpräparaten des Hippokampus erstmals beobachtet wurde, einer Hirnstruktur, die eng mit Lern- und Gedächtnisprozessen in Verbindung steht, wird gemeinhin als das molekulare Korrelat von Lernvorgängen betrachtet, und wird u.a. auch von NMDA-Rezeptoren mediiert (Bliss & Lomo, 1973; Bliss & Collingridge 1993, Pulvirenti, 1992; Tsien et al., 1996). LTP wurde auch in vivo demonstriert (Keller et al., 1990). Sehr vereinfacht lässt sich das Protokoll einer LTP-Induktion wie folgt beschreiben: Axonterminale, die mit Dendritenbäumen postsynaptischer Neurone synaptische Kontakte bilden, werden hochfrequent elektrisch gereizt, so daß Glutamat freigesetzt wird und an postsynaptischen AMPA und NMDA-Rezeptoren anbindet. Wenn man nun nach der

hochfrequenten Reizung (oder auch tetanische Reizung genannt) die Axonterminale, nicht mit einer Reizserie, sondern mit nur einem Einzelimpuls stimuliert, so findet man, daß die postsynaptische Antwort bzw. das erregende postsynaptische Potential nach einem Einzelimpuls, über Stunden bis hin zu Tagen (in Abhängigkeit von den exakten Stimulationsparametern, der Zusammensetzung des Perfusionsmediums, und natürlich der Hirnregion) vergrößert ist, als wenn der Einzelimpuls ohne vorherige tetanische Reizung appliziert werden würde (Wheal et al., 1998).

Verschiedene LTP-Formen werden aufgrund der Dauer einer induzierten Potenzierung unterschieden (Abel et al., 1997; Huang & Kandel, 1996; Lu et al., 1999): **LTP1**: Dauer c.a. 1,5 Stunden, kann durch Proteinkinaseinhibitoren blockiert werden, bleibt jedoch z.T. in Anwesenheit von Proteinsyntheseinhibitoren erhalten und beruht vermutlich auf posttranslationale Modifikationen von existierenden Proteinen. Diese LTP-Form basiert also nicht auf einer Aktivierung des genetischen Apparates zur Induktion von morphologischen Veränderungen an der Synapse. **LTP2**: Dauer bis zu 5 Tagen, unabhängig von der Genexpression (mRNA), kann aber durch Translationsinhibitoren blockiert werden. Letztere LTP-Form erfordert also die Synthese neuer Proteine durch das Ablesen von, im Zytosol bereits vorhandenen, mRNA Strängen. **LTP3**: Dauer mehrere Tage bis zu einem Monat. LTP3 ist abhängig von der Genexpression nach Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. CREB (cAMP response element binding protein) und kann durch Transkriptionsinhibitoren geblockt werden. Diese langandauernde Potenzierungsform erfordert die Synthese von neuen Proteinen durch neu gebildete mRNA. Nicht alle LTP-Formen sind NMDA-R abhängig (Johnston et al., 1992). So sind die Synapsen zwischen Körnerzellaxonterminale, die vom Gyrus dentatus entspringen, und Pyramidenzellendriten der CA3 Region des Hippokampus, auch nach Gabe von NMDA-R Antagonisten in das Perfusionsmedium, noch potenzierbar (Lopez-Garcia, 1998). LTP lässt sich auch chemisch durch die Gabe von TEA (tetraethylammonium: K<sup>+</sup>-Kanal Blocker), erhöhte extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen, DG (Diazylglyzerol) in einem Medium mit niedriger Mg<sup>2+</sup>-Konzentration, Noradrenalin, mGluR-Agonisten (metabotrope Glutamatrezeptoragonisten), G-Protein Aktivatoren, „Platelet-activating Factor“, und cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat), entweder in das Perfusionsmedium oder direkt in die Zelle, induzieren. Die Höhe der induzierten LTP lässt sich durch die Applikation von Polyaminen, Arachidonsäure, NO, CO, Noradrenalin,

Azetlycholinesterase-Inhibitoren, Hämoglobin, L-Arginin in das Perfusionsmedium und veränderte extrazelluläre  $H^+$ -Konzentrationen modulieren (Abel & Kandel, 1998; Hawkins et al., 1998; Mayford & Kandel, 1999).

Wichtige Merkmale der NMDA-R abhängigen LTP an der Synapse zwischen CA3 Schaefferkollateralen und CA1 Pyramidenzellen im Hippokampus sind a) Assoziativität und b) Selektivität. Zeitnahe Aktivierung eines "starken" und eines "schwachen" Eingangs bzw. Inputs zu postsynaptischen Neuronen führt zur Effizienzsteigerung der Synapsen, die vormals nicht in der Lage waren die postsynaptischen Neurone überschwellig zu erregen (Assoziativität, bzw. heterosynaptische LTP). Benachbarte Eingänge die während der Aktivierung des starken Eingangs keine nennenswerte Aktivität aufwiesen oder hyperpolarisiert waren, ändern dagegen ihr synaptisches Gewicht nicht (Selektivität), oder werden im Gegenteil geschwächt (LTD, synaptische Langzeitdepression; Übersicht bei Levenes et al., 1998; McEachern & Shaw, 1996; Tsumoto, 1992).

LTP3 hat sowohl prä- als auch postsynaptische Konsequenzen (Agnihotri et al., 1998): **Präsynaptisch:** A) erhöhte Transmitterfreisetzung pro Einzelimpuls, B) Redistribution von Neurotransmittervesikeln zur aktiven Zone der Synapse, C) perforierte Synapsen, D) Übernahme von benachbarten Kontaktstellen die weniger häufig genutzt werden, E) Erhöhung der Anzahl der synaptischen Kontakte durch Kollateralbildung.

**Postsynaptisch:** A) Erhöhung der AMPA- und NMDA Rezeptordichte, B) die AMPA-R Leitfähigkeit bzw. Sensitivität wird erhöht, C) NMDA-R Leitfähigkeit bzw. Sensitivität wird erhöht, weil die  $Mg^{2+}$  Sensitivität sinkt, D) Auswachsen des Dendritenbaums, E) Veränderungen des Zytoskeletts, F) mehr und breitere Spines, G) Erhöhung der synaptischen Kontaktfläche, H) LTD an benachbarten nicht-zeitgleich zur LTP Induktion aktivierten Synapsen. I) Leitfähigkeitsmodulation von spannungsabhängigen Kalium, Calcium, Chlorid und Natriumkanälen.

An den prä- und postsynaptischen Auswirkungen einer LTP-Induktion sind z.T. unterschiedliche Mechanismen bzw. Ereigniskaskaden beteiligt:

**Präsynaptisch:** A)  $Ca^{2+}$ -Calmodulinkinaseaktivierung, und B) Proteinkinase C Aktivierung. A) und B) phosphorylieren Vesikelproteine und modulieren die Leitfähigkeit von spannungsabhängigen Kalium-, Kalzium-, Chlorid- und Natriumkanälen.

**Postsynaptisch:** A) NMDA-Rezeptoraktivierung und mGluR-Aktivierung führt zu einem lokalen Anstieg der  $Ca^{2+}$  Konzentration auch durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern (endoplasmatisches Retikulum via.  $IP_3$ ), B) Nach dem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) werden eine Reihe von Funktionsproteinen aktiviert: Calpain (Protease), Calcineurin (Phosphatase), PKC, cAMP abhängige PKA, Calmodulin, CaMKII, CaMKIV, Tyrosinkinasen, Gewebe Plasminogenaktivator, Neurotrophine (BDNF, NT-3), und die Ras/MAP Kinease (Ras (GTPase)). Diese ist im Ruhezustand membranständig und GDP-gebunden. Die Aktivierung von Wachstumsfaktoren führt zu einer Hemmung von SynGAP und hiernach zu der Autophosphorylierung an der Tyrosinresidue von Ras. Die aktive GTP-Form von Ras aktiviert daraufhin eine zytosolische Proteinkaskade. Diese Proteine wiederum aktivieren finale Effektorkinasen ERK-1 und ERK-2 (MAP-Kinasevertreter)). C) Aktivierung von retrograden Botenstoffen die postsynaptisch synthetisiert aus der Zelle herausdiffundieren und in die präsynaptische Axonterminale hineindiffundieren. 1. NO: nNOS, und eNOS katalysieren die Konversion von L-Arginine in L-Citrullin und NO nach Aktivierung durch  $Ca^{2+}$ -Calmodulin und einer Reihe von Kofaktoren. 2. CO: Häm-Oxygenase katalysiert die Konversion von Häm in Biliverdin und CO. 3. Arachidonsäure: Phospholipide der Plasmamembran werden durch  $PLA_2$  in Arachidonsäure umgewandelt (nach mGluR: Quisqualat-B Rezeptoraktivierung) (Abel & Kandel, 1998; Agnihotri et al., 1998; Hawkins et al., 1998; Levenes et al., 1998; Lu et al., 1999; Massicotte & Baudry, 1991; McEachern & Shaw, 1996; Roberson et al., 1996; Tsumoto, 1992).

Der NMDA-Rezeptor funktioniert als eine Art Koinzidenzdetektor, d.h. er ist in der Lage, zeitgleiche prä- und postsynaptische Aktivität zu detektieren und leitet sowohl prä- als auch postsynaptisch Veränderungen ein die die synaptische Effizienz steigern (Lynch, 1986). Postsynaptisch werden durch Anregung der Genexpression strukturelle Veränderungen, infolge von vermehrter Proteinbiosynthese und/oder Phosphorylierungs- Dephosphorylierungsprozessen von Funktionsproteinen, eingeleitet. Präsynaptisch kommt es, möglicherweise durch Aktivierung retrograder Botenstoffe, zu Veränderungen in der präsynaptischen Transmitterfreisetzung. Assoziationen zwischen Reizen, die in neuronalen Schaltkreisen kodiert werden, werden u.U. erst durch diese Faszilitierung der Signalübertragung ermöglicht. Die Applikation von NMDA-Rezeptorantagonisten reduziert dosisabhängig die Induzierbarkeit von LTP an Hirnschnitten und verschlechtert in vivo die Akquisition

von Lernaufgaben im Tiermodell (Morris et al., 1986). Des Weiteren wurden NMDA-Rezeptoralterationen auch im Zusammenhang mit kognitiven Beeinträchtigungen, die mit neurodegenerativen/psychiatrischen und neurokonvulsiven Erkrankungen, wie z.B. der Schizophrenie, Depression, Epilepsie, Morbus Alzheimer und der parkinsonschen Krankheit einhergehen, diskutiert (Choi et al., 1988; Heresco-Levy & Javitt, 1998; Lipton & Rosenberg, 1994). Ionotrope, d.h. ligandenabhängige NMDA-Rezeptoren setzen sich bei der Maus, wie auch beim Menschen, aus einer essentiellen NMDA-NR1-Untereinheit (die genetische Inaktivierung dieser Einheit im gesamten Organismus führt zur pränatalen Letalität, Forrest et al., 1994, Li et al., 1994), und mindestens einer NMDA-NR2(A-D)-Einheit zusammen, die in Abhängigkeit von der Hirnregion und im Laufe der Ontogenese distinkte Expressionsmuster und physiologische Funktionen aufweisen (Nakanishi et al., 1994; Monyer et al., 1994; Charton et al., 1999). Jede Untereinheit wird durch ein separates Gen kodiert. In Abhängigkeit von der Zusammensetzung des NMDA-Rezeptorkomplexes ändern sich auch seine kinetischen-, Permeabilitäts-, Ligandenbindungs-, sowie Desensibilisierungseigenschaften, wie auch die Amplitude der postsynaptisch induzierten Depolarisation nach Aktivierung und ihre  $Mg^{2+}$  (Magnesium)-Sensitivität; allesamt Faktoren, die die Fähigkeit zur synaptischen Plastizität des jeweiligen Neurons, die durch den NMDA-Rezeptor vermittelt wird, beeinflussen können. Langandauernde Veränderungen der synaptischen Transmission als neuronale Basis von Lernvorgängen sind, wie oben schon angedeutet, auch von der Funktionalität des NMDA-Rezeptors abhängig. Der Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$  (Calcium)-Konzentration nach NMDA-Rezeptoraktivierung, leitet, im Rahmen von synaptischer Plastizität, essentielle Second Messenger Kaskaden ein, und steuert u.a. die Aktivierung der  $Ca^{2+}$ /Calmodulin abhängigen Proteinkinase 2 (CaMKII), die ihrerseits an die C-Terminalen der NMDA-NR1- und NMDA-NR2B Untereinheiten des NMDA-Rezeptormolekülkomplexes, aber nicht an andere Untereinheiten bindet (Leonard et al., 1999, Omkumar & Kiely, 1996). Das Enzym CaMKII nimmt, im Rahmen der synaptischer Plastizität, eine herausragende Stellung ein, und phosphoryliert sowohl den NMDA-Rezeptor wie auch AMPA-Rezeptoren (alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate-receptors= Glutamaterezeptoren). Phosphorylierte NMDA und AMPA Rezeptoren können sich in die Zellmembran eingliedern. CaMKII ist somit an der Erhöhung der postsynaptischen Rezeptordichte und damit auch an der gesteigerten

eingangsselektiven Erregbarkeit der Zelle nach LTP beteiligt (Barria et al., 1997). AMPA-Rezeptoren gewährleisten die überdauernde Aufrechterhaltung der nach NMDA-Rezeptoraktivierung eingeleiteten Erhöhung der Effizienz der synaptischen Übertragung (Malinow et al., 1989, Mayford et al., 1995).

Für CaMKII-Knockoutmäuse konnte eine Beeinträchtigung sowohl von Hippokampus-LTP wie auch der räumlichen Lernfähigkeit im Morris Water-Maze nachgewiesen werden (Silva et al., 1992a; Silva et al., 1992b). Neben CaMKII ist auch das Adaptorprotein PSD-95, das selbst keine enzymatische Aktivität aufweist und Protein-Protein Interaktionen mediiert, an die C-Termini der NMDA-NR1- und NMDA-NR2B Einheiten gebunden (Migaud et al., 1998). Dieses Adaptorprotein hat u.a. die Funktion, den NMDA-Rezeptor mit diversen Funktionsproteinen zu assoziieren (Kornau et al., 1995). nNOS beispielsweise ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-aktiviertes Enzym, das ein membranpermeables Gas, Stickoxid (NO), synthetisiert (Brenman et al., 1996). NO wurde im Zusammenhang mit der LTP als postsynaptisch produzierter retrograder Botenstoff diskutiert, der in die präsynaptische Axonterminale hineindiffundiert und dort via Aktivierung von cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat) die präsynaptische Transmitterfreisetzung auf einen Einzelimpuls hin, nach hochfrequenter tetanischer Reizung, erhöht (Arancio et al., 1996).

### **1.3.3 NMDA-Rezeptoruntereinheiten: Physiologie, hirnregionale Verteilung und funktionale Aspekte**

#### **1.3.3.1 Die NR1-Untereinheit**

Acht verschiedene Isoformen bzw. Varianten der NR1 Untereinheit (A-H) wurden bislang identifiziert (Anantharam et al., 1992). Diese Varianten entstehen durch posttranskriptionale Modifikation der NR1 mRNA. Unterschiede zwischen den sogenannten „Splice variants“ finden sich in den Exonen 5 (bestimmt die An- oder Abwesenheit eines N-Terminals  $\text{NH}_2\sim$ ), 21 (C1-Terminal  $\sim\text{COOH}$ ), und 22 (C2-Terminal) (Bestimmen die An- oder Abwesenheit von zwei C-Terminalen) (Behe et al., 1995; Durand et al., 1993; Hollmann et al., 1993). Die Kanalblockerbindungsstelle von NR1-Splicevarianten liegt in der membranständigen M2 und M3 Region (welche die Ausrichtung des Ionenkanals determinieren, Ferrer-Montiel et al., 1995), sich

aber zwischen den Splicevarianten nicht unterscheiden (Sugihara et al., 1992). Deshalb haben alle NR1-Varianten dieselbe pharmakologische Sensitivität. Dagegen haben die Gene der NR2 Untereinheiten unterschiedliche Residuen in der Region, die für die Kanalblockerbindungsstelle kodiert (Kutsuwada et al., 1992, Monyer et al., 1992) und demzufolge auch andere Affinitäten für Kanalblocker, wie z.B. Phencyclidin (PCP) oder Dicocilpin (MK-801). Die C-Terminale der NR1 aber auch der NR2 Untereinheiten können durch Kinasen (CaMKII; PKC, PKA, Tyrosinkinase Src etc.) phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierung führt u.a. zu einer Potenzierung der Kanalöffnungsfrequenz und oder Öffnungswahrscheinlichkeit bei Anbindung von Glutamat und Glycin. Die C-Terminale sind also u.a. wichtig für die Regulation der Kanalleitfähigkeit des NMDA-R (Kim & Huganir et al., 1999).

Die NR1 Splicevarianten weisen regional unterschiedliche Expressionsmuster auf, deren hirregionsspezifische Expressionsrate sich im Laufe der Hirnentwicklung verändert (Laurie & Seeburg, 1994). Im Kortex und Hippokampus findet sich hauptsächlich NR1A bzw. NR1-011 und NR1E bzw. NR1-000 (Sugihara et al., 1992; Zhong et al., 1995; Laurie & Seeburg, 1994). NR1-011 z.B. heißt in diesem Zusammenhang, daß das Protein kein N-Terminal (0) aber zwei C-Terminale (11) aufweist. Im adulten Cerebellum wurde hauptsächlich NR1G bzw. NR1-100 gefunden (Sugihara et al., 1992). Diese regionsspezifischen Variationen sind möglicherweise Ausdruck der unterschiedlichen Funktionen, die NMDA-R in verschiedenen Hirnregionen erfüllen müssen, und deuten darauf hin, daß nicht nur die NR2 und NR3 Untereinheitszusammensetzung des NMDA-R für die biophysischen Eigenheiten eines NMDA-R verantwortlich ist, sondern, daß auch die jeweiligen NR1-Splice Varianten der NMDA-R diese Charakteristika mitdeterminieren. Es ist noch nicht bekannt, ob die einzelnen NR1 Varianten unterschiedliche Affinitäten zu den NR2 und/oder NR3 Untereinheiten aufweisen, entsprechende Forschungsvorhaben sind jedoch in Vorbereitung (PD Dr. Ulrich Eisel, Universität Stuttgart, persönliche Mitteilung). Eine NR1 cDNA Transfektion von *Xenopus* Oozyten führt zur Ausbildung von funktionalen NMDA-R; jedoch mit nur geringer Leitfähigkeit (Nakanishi et al., 1992); vermutlich durch die Bildung von heteromeren Rezeptoren mit noch nicht identifizierten endogenen NR2 Untereinheiten (Soloviev et al., 1996). Nach NR1 cDNA Transfektion von Säugtierexpressionszelllinien werden jedoch keine funktionalen NMDA-R gebildet (Chazot et al., 1992).

NR1-/- Knockoutmäuse sterben neonatal, infolge von Entwicklungsaberrationen in lebenswichtigen Hirnstammzentren (Forrest et al., 1994; Li et al., 1994). Wenn der NR1 Knockout auf die CA1 Region des Hippokampus beschränkt wird, sind die Mäuse allerdings lebens- und fortpflanzungsfähig. Konditionale CA1-NR1-/- Mäuse weisen in der CA1 Region (elektrophysiologische Messungen im Gyrus dentatus waren normal) keine NMDA-R mediierten EPSC's, defiziente synaptische Langzeitpotenzierung (100 Hz für 1s) und synaptische Langzeitdepression (1 Hz für 10 Min) auf. Die CA1-NR1-/- Mäuse zeigten zudem beeinträchtigt räumliches Lernen in einer Morris Water-Maze Aufgabe (Tsien et al., 1996). Die räumliche Spezifität hippocampaler Ortszellen war bei CA1-NR1-/- Mäusen schwächer ausgeprägt (McHugh et al., 1996). CA1-NR1-/- Mäuse hatten weiterhin Gedächtnisdefizite in einer Objektwiedererkennungsaufgabe, einer Geruchsdiskriminationsaufgabe, und einer Furchtkonditionierungsaufgabe. Diese Defizite konnten nach zweiwöchiger Haltung in einer angereicherten Umgebung wieder egalisiert werden (Rampon et al., 2000). Mittels eines induzierbaren CA1-NR1 Knockout, bei dem das Gen nach belieben an- und wieder abgeschaltet werden kann, konnte gezeigt werden, daß NMDA-R in der CA1 Region des Hippokampus für die Gedächtniskonsolidierung nach einer Lernepisode kritisch sind (Shimizu et al., 2000). Damit läßt sich zusammenfassend sagen, daß CA1-NMDA-Rezeptoren nicht nur für das anfängliche Lernen diverser Lernaufgaben von Bedeutung sind, sondern auch für die Post-training Konsolidierungsphase, die unmittelbar nach dem Training beginnt und mindestens eine Woche anhält kritisch sind (Shimizu et al., 2000). Kürzlich wurde auch eine CA3 spezifische NR1 Knockout Maus erzeugt. Diese Tiere wiesen normales räumliches Lernvermögen auf, waren allerdings beim Abruf von Gedächtnisinhalten beeinträchtigt, wenn nur wenige diskriminative Hinweisreize der ursprünglichen Lernsituation dargeboten wurden bzw. wenn die ursprüngliche Lernsituation leicht variierte (Nakazawa et al., 2003). Damit läßt sich folgern, daß NMDA-R in der CA1-Region offenbar für die Ausbildung räumlicher und nichträumlicher Gedächtnisinhalte kritisch sind, wogegen NMDA-R in der CA3 Region für den Abruf von räumlichen und möglicherweise nichträumlichen Gedächtnisinhalten unter erschwerten Bedingungen relevant sind.

### 1.3.3.2 Die NR2A-Untereinheit

Die NR2A Expression im Gehirn ist, ebenso wie die der obligatorischen NR1 Untereinheit, ubiquitär und beginnt nach dem postnatalen Tag 7 (P7) und erreicht ihr Plateau bei P12-21 (Monyer et al., 1994; Sheng et al., 1994). Quantitativ betrachtet ist die NR2A Expression im Vergleich mit den anderen NR2 Untereinheiten am stärksten. cDNA Zelltransfektionsstudien haben gezeigt, daß NR1-NR2A-Rezeptoren, im Vergleich mit anderen NMDA-R Typen, schnell anwachsende und deaktivierende bzw. zerfallende Kanalströme (EPSC's), unabhängig von der NR1-splice Variante, mit der sie assoziiert sind, aufweisen. Der NR1-NR2A Rezeptortyp erholt sich auch schneller von einer Desensitivierung (infolge einer andauernden Agonistenwirkung am Rezeptor bzw. nachdem hohe intrazelluläre Konzentrationen von  $Ca^{2+}$  entstanden sind) als z.B. NR1-NR2B Kanäle (Vincini et al., 1998). Charakteristisch für den NR1-NR2A Typ ist weiterhin eine hohe Ionenleitfähigkeit (Ebrasilide et al., 1996), hohe  $Mg^{2+}$ -Sensitivität (Kutsuwada et al., 1992) und eine niedrige Glycin-Sensitivität (Kutsuwada et al., 1992). Das NR2A Protein ist, ebenso wie das NR2B Protein, am C-Terminal mit den postsynaptischen Adapterproteinen PSD-93 und PSD-95 (bindet nNOS, Brenman et al., 1996) assoziiert (Kornau et al., 1995; Sans et al., 2000).

NR2A<sup>-/-</sup> Mäuse haben reduzierte NMDA-R medierte EPSC's und höhere LTP-Induktionsschwellen in der CA1-Region. Diese elektrophysiologischen Aberrationen gehen mit verschlechtertem Water-Maze Lernen einher (Sakimura et al., 1995). Allerdings sind die LTP Defizite von NR2A<sup>-/-</sup> Mäusen nach stärkerer Tetanisierung bzw. bei höheren Reizstärken nicht mehr zu beobachten (Kiyama et al., 1998). NR2A<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen auch eine verschlechterte Kontext-Furchtkonditionierung auf (Kiyama et al., 1998). Interessanterweise führt die Deletion des intrazellulären C-Terminals, das mit den PSD-Proteinen interagiert, zum selben Phänotyp, wie ein klassischer NR2A-knockout (Sprengel et al., 1998). NR2A<sup>-/-</sup> Mäuse weisen zudem einen erhöhten Dopamin- und Serotoninmetabolismus im frontalen Kortex und im Striatum auf (Miyamoto et al., 2001) und zeigen erhöhte Lokomotion und vertikale Aktivität in einer neuen Umgebung (Miyamoto et al., 2001). Allerdings wurde auch berichtet, daß exploratives Verhalten im Offenfeld bei NR2A<sup>-/-</sup> Mäusen unverändert ist (Kadotani et al., 1996). Latentes Lernen ist in NR2A<sup>-/-</sup> Mäusen beeinträchtigt (Miyamoto et al., 2001). In Bezug auf motorische Funktionen wurde gefunden, daß

NR2A C-Terminal Knockout Mäuse ataxisch sind (Sprengel et al., 1998) und daß NR2A<sup>-/-</sup> Mäuse reduzierte zerebelläre NMDA-R medierte EPSC's in Körnerzellen aufweisen (Kadotani et al., 1996). Fünf bis sechs Wochen alte NR2A<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten jedoch keine motorischen Defizite im Rotarodtest auf (25 RpM, nicht akzelerierend) (Kadotani et al., 1996). In Bezug auf synaptische Plastizität, wie auch hinsichtlich Lern- und Gedächtnisfunktionen, wirkt sich ein NR2A Knockout also ähnlich wie ein CA1-spezifischer NR1 Knockout aus, so daß davon auszugehen ist, daß die NR2A Untereinheit des NMDA-R für dessen Koinzidenzdetektorfunktion, ebenso wie die NR2B Untereinheit (siehe folgenden Abschnitt), kritisch ist.

### **1.3.3.3 Die NR2B-Untereinheit**

Die NR2B Untereinheit wird im adulten Gehirn hauptsächlich in Vorderhirnstrukturen exprimiert. Man findet hohe Expressionsraten im embryonalen und juvenilen Gehirn, danach jedoch einen kontinuierlichen Abfall. Im adulten Gehirn wird die NR2B Untereinheit jedoch immer noch stärker exprimiert als die NR2C oder NR2D Untereinheiten. Im Zerebellum ist die NR2B mRNA an P1 maximal und zwischen P21 und P28 nicht mehr reliabel zu detektieren (Akazawa et al., 1994; Zhong et al., 1995). NR1-NR2B-Rezeptoren haben langsam anwachsende und deaktivierende Kanalströme (EPSC's) und deshalb länger andauernde EPSP's als NR1-NR2A Rezeptoren (Chen et al., 1999; Monyer et al., 1994; Vincini et al., 1998). Auch weist der NR1-NR2B Typ eine höhere Mg<sup>2+</sup>-Sensitivität (Kuner & Schöpfer, 1996; Kutsuwada et al., 1992), Glycinsensitivität (Kew et al., 1998; Kutsuwada et al., 1992), Glutamataffinität (Kutsuwada et al., 1992; Priestley et al., 1995), wie auch Polyaminsensitivität (Lynch et al., 1995) und geringere Anfälligkeit für (Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub>-induzierte Desensitivierungen (Krupp et al., 1996; Monyer et al., 1994), als der NR1-NR2A Typ, auf. Am C-Terminus der NR2B Untereinheit finden sich Bindungsstellen für autophosphoryliertes CaMKII (Strack & Colbran, 1998, Strack et al., 2000) und PSD-95 (Kornau et al., 1995; Sans et al., 2000). Triheteromere NR1-NR2A-NR2B Kanäle wurden in situ beschrieben (Sheng et al., 1994). Quantitative Co-Immunoprecipitationsstudien deuten darauf hin, daß ca. 60 % aller kortikalen NMDA-R vom NR1-NR2A-NR2B Typ sind (Luo et al., 1997).

Hippokampale Hirnschnitte von neonatalen NR2B<sup>-/-</sup> Mäusen weisen keine NMDA-medierten synaptischen Antworten und erhöhte LTP-Schwellen auf (offenbar ist die

NR2B Untereinheit kritisch für die Ausbildung des Ionenkanals und/oder der synaptischen Lokalisation von NMDA-Rezeptoren) (Ito et al., 1997; Kutsuwada et al., 1996). NR2B<sup>-/-</sup> Mäuse konnten jedoch nicht verhaltenscharakterisiert werden, weil sie perinatal sterben bzw. infolge eines abwesenden Saugreflexes verhungern (Kutsuwada et al., 1996). Auch ein NR2B C-Terminal Knockout führt zu perinataler Letalität (Mori et al., 1998). In Bezug auf elektrophysiologische Messungen führt die Deletion des intrazellulären C-Terminals, das mit der PSD interagiert zum selben Phänotyp wie ein NR2B-Knockout (Sprengel et al., 1998). Mäuse, die die NR2B Untereinheit in Vorderhirnstrukturen verstärkt exprimieren, sind, im Gegensatz zu einem NR2B Knockout, lebensfähig. NR2B Tg Mäuse weisen höhere NMDA-R medierte EPSP's in der CA1-Region und reduzierte LTP-Schwellen (10-100 Hz, 1s) auf (Tang et al., 1999). Allerdings fand man auch erhöhte NR1 Expressionsraten im Kortex und im Hippokampus (Tang et al., 1999). Die NR2B Tg Mäuse zeigten eine beschleunigte Akquisition und Extinktion einer kontextuellen Furchtkonditionierungsaufgabe, verbessertes Objektgedächtnis und eine beschleunigte Akquisition einer Morris Water-Maze Aufgabe (Tang et al., 1999). Diese Lern- und Gedächtnissteigerung fand sich auch noch in der 12. Generation (Tang et al., 2001). NR2B Tg Mäuse zeigten auch stärkere chronische Schmerzreaktionen 55 bis 120 Minuten nach peripherer Injektion von Formalin in die Hinterpfote auf (Wei et al., 2001). Im Gegensatz zu Kontrollmäusen führte eine angereicherte Lebensumwelt nicht zu einer Verbesserung von Lern- und Gedächtnisleistungen von NR2B Tg Mäusen, gemessen anhand einer Kontext-Furchtkonditionierungsaufgabe (Tang et al., 2001). NR2B Tg Mäuse unterscheiden sich nicht von Wildtypmäusen im Offenfeld (Tang et al., 1999).

Die Studien, die mit NR2A und NR2B Mausmutanten durchgeführt worden sind, suggerieren, daß diese Untereinheiten dem NMDA-R die geeigneten elektrophysiologischen Eigenschaften verleihen um als Koinzidenzdetektoren fungierend erfahrungsabhängige synaptische Plastizität in vivo zu medieren.

#### **1.3.3.4 Die NR2C-Untereinheit**

Die NR2C mRNA Expression beginnt erst postnatal und wurde in der Retina (Goebel & Pooch, 1999), im frontalen Kortex (Kuehl-Kovarik, et al., 2000), dem Gyrus dentatus (Lin et al., 1996), dem medialen Septum (Plant et al., 1997), im

Hippokampus (Rafiki et al., 2000), der Amygdala (Karst et al., 2002), dem Striatum (Beas-Zárate et al., 2002), dem Thalamus (Pollard et al., 1993), dem Hypothalamus (Goebel & Poosch, 1999), der Substantia nigra pars compacta (Lin et al., 1996), dem Colliculus inferior und superior (Goebel & Poosch, 1999), im Hirnstamm, den Vestibularkernen (Lin et al., 1996), dem Zerebellum (Zhong et al., 1995), im entorhinalen (Linden et al., 2001), olfaktorischen, visuellen, motorischen und parietalen Kortex (Sun et al., 2000) gefunden. In der Peripherie wird die NR2C mRNA im Herzen, Skelettmuskel und der Bauchspeicheldrüse exprimiert. Jedoch wurde keine NR1 mRNA in diesen Strukturen gefunden (Kuehl-Kovarik, et al., 2000), so daß in der Peripherie wohl keine funktionalen NMDA-R ausgebildet werden. Die NR2C mRNA wird im Hippokampus erstmalig zwischen P3 und P14 exprimiert, und findet sich im Stratum radiatum, Stratum oriens, der Pyramidenzellschicht und in gabaergen Interneuronen (Pollard et al., 1993; Rafiki et al., 2000; Ritter et al., 2002). Die Expressionsrate erreicht ein Plateau zwischen P20 und P28 (Ritter et al., 2002; Zhong et al., 1995) und wird auch um P60 und später noch gefunden (Beas-Zárate et al., 2002; Goebel & Poosch, 1999; Lin et al., 1996; Rafiki et al., 2000). Nach Ritter und Mitarbeitern, (2002) wird die NR2C mRNA an P3 im Hippokampus zunächst relativ stark exprimiert, fällt dann aber unter das neonatale Niveau ab und erreicht adulte NR2C-Konzentrationen ab P20. Zwischen P1 und P35 wird NR2C am stärksten in der CA1 Region des Hippokampus exprimiert.

Weil das NR2C Protein in diversen Hirnregionen keine laminare Organisation aufweist, sind NR2C positive Zellen nur vereinzelt und nicht konzentriert auszumachen (Monyer et al., 1994; Rudolf et al., 1996; Scherzer et al., 1998). Dieser Umstand erklärt möglicherweise negative Befunde bezüglich der Expression von NR2C im adulten Hippokampus von Nagetieren (Guilarte & McGlothan, 1998, Ikeda et al., 1995; Kutsuwada et al., 1992; Meguro et al., 1992; Monyer et al., 1992; Scherzer et al., 1998; Thompson et al., 2002). Im Allgemeinen muß man festhalten, daß in situ Hybridisierungsstudien zwar nützlich sind, um Hinweise zu erhalten, ob eine NMDA-Untereinheit in einem bestimmten Zelltyp potenziell exprimiert werden kann; die Abwesenheit der mRNA einer NR2 Untereinheit, besonders in kleinen Zellen oder solchen, die in einer gegebenen Hirnstruktur eine geringe Dichte haben, kann aber nicht als Evidenz für die völlige Abwesenheit dieser Untereinheit angesehen werden. Umgekehrt kann aufgrund des Vorhandenseins einer mRNA nicht auf eine entsprechende Proteinsynthese einer Untereinheit oder deren

Eingliederung in funktionale membranständige NMDA-R geschlossen werden (Cull-Candy et al., 1998). Es existiert häufig keine proportionale Beziehung zwischen der Quantität einer mRNA und der Expressionsrate des zugehörigen Proteins. Auch kann die Translation einer mRNA in das zugehörige Protein zeitlich verzögert sein, d.h. daß die mRNA in einer gegebenen Hirnregion durchaus detektiert werden kann, aber der Nachweis des Proteins nicht gelingt (Goebel & Poosch, 1999; Wenzel et al., 1997). Phaeochomozytomzellen und Neuroblastomzellen in Kultur weisen z.B. mRNA für NMDA-R Untereinheiten auf, nicht jedoch die entsprechenden Proteine (Kopke et al., 1993; Sucher et al., 1993). Niedrige NR2C mRNA Konzentrationen im Vorderhirn sind u.U. auf eine unzureichende Stabilität der mRNA während bestimmter Präparationsprotokolle zurückzuführen (Pollard et al., 1993). Der Proteinnachweis einer NR2 Untereinheit gestaltet sich durch mangelnde Spezifität der Antikörper noch schwieriger und ist deshalb noch weniger verlässlich, als die mRNA Analyse.

NR1-NR2C-Rezeptoren haben langsam deaktivierende Kanalströme (EPSC's) (Vincini et al., 1998), weisen niedrige spannungsabhängige  $Mg^{2+}$ -Sensitivität auf (Kuner & Schoepfer, 1996; Monyer et al., 1992) und werden bei einer Membrandepolarisation auf  $-35$  mV schon maximal aktiviert (wogegen der NR1-NR2B oder NR1-NR2A Typ erst bei  $-25$  mV maximal aktiviert wird; Kuner & Schoepfer, 1996). Auch weist der NR1-NR2C Typ eine höhere Glycinsensitivität als der NR1-NR2A Typ auf (Stern et al., 1992); hat eine niedrigere Leitfähigkeit als der NR1-NR2A oder NR1-NR2B Typ (Stern et al., 1992); eine niedrige Glutamat Sensitivität (Kutsuwada et al., 1992); weist eine niedrige Sensibilität für eine spannungsabhängige  $Zn^{2+}$  Inhibition auf (Krupp et al., 1996) und ist weniger anfällig für eine agonistinduzierte Desensitivierung als der NR1-2A Typ (Monyer et al., 1994). cDNA Zelltransfektionsstudien haben gezeigt, daß NR2A und NR2C gemeinsam mit NR1 Untereinheiten funktionale NMDA-R bilden, sich jedoch in ihren biophysischen Eigenschaften von diheteromeren NR1-NR2A und NR1-NR2C Rezeptoren unterscheiden (Wafford et al., 1993). Allerdings hat man mit Antikörperablagerungsstudien im Zerebellum noch keine tri-hereromeren NR1-NR2A-NR2C Rezeptoren nachweisen können (Didier et al., 1995).

NR2C-/- Mäuse wurden noch nicht in Hinblick auf Lern- und Gedächtnisprozesse oder emotionale Prozesse untersucht. Da die NR2C Untereinheit in adulten Mäusen hauptsächlich im Zerebellum exprimiert wird, konzentrierten sich die ersten Arbeiten

mit NR2C<sup>-/-</sup> Mäusen auf die Elektrophysiologie des Zerebellums und allgemeine motorische Funktionen. Im Kleinhirn wird ein einzigartiges Expressionsmuster von NMDA-R Untereinheiten beobachtet (Cathala et al., 2000; Monyer et al., 1994). Perinatal und während der ersten zwei Wochen postnatal exprimieren Körnerzellen im Zerebellum hauptsächlich die NR1 und die NR2B Untereinheit. Die NR2A Untereinheit ist pränatal abwesend und beginnt innerhalb der ersten Woche postnatal anzusteigen. Die NR2C Expression dagegen startet erst nach der zweiten Woche postnatal und erreicht in Körnerzellen ein Plateau nach dem ersten Lebensmonat. Im selben Zeitraum wird die NR2B Expression reduziert und wird nach der dritten Woche gänzlich eingestellt (Dingledine et al., 1999; Hatten, 1999; Hollmann & Heinemann, 1994). Im adulten Zerebellum der Maus finden sich in Körnerzellen also nur die NR1, NR2A und NR2C Untereinheiten, wobei di- und triheteromere Rezeptortypen beschrieben wurden (Sircar et al., 1996; Zhong et al., 1995). NR2C<sup>-/-</sup> Mäuse weisen reduzierte zerebelläre AMPA EPSC's (Ebraldze et al., 1996) und zeitlich reduzierte zerebelläre NMDA-R mediierte EPSC's mit höherer Amplitude in Körnerzellen auf (Ebraldze et al., 1996; Kadotani et al., 1996). Fünf bis sechs Wochen alte NR2C<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten allerdings keine motorischen Defizite im Rotarodtest (25 RpM, nicht akzelerierend) (Kadotani et al., 1996) und exhibierten normales Explorationsverhalten im Offenfeld (Kadotani et al., 1996). Ebenso zeigten NR2A<sup>-/-</sup> Mäuse keine Defizite im Rotarodtest auf. Nur für 5-6 Wochen alte NR2A/2C<sup>-/-</sup> Doppelknockoutmäuse wurden motorische Defizite im Rotarodtest (25 RpM, nicht akzelerierend) (Kadotani et al., 1996) und reduzierte vertikale aber nicht horizontale Aktivität im Offenfeld gefunden (Kadotani et al., 1996). Trotz der starken Expression der NR2C Untereinheit im Zerebellum hat ein isolierter NR2C Knockout folglich keinen Einfluß auf motorische Funktionen und kann durch die NR2A Untereinheit kompensiert werden. Offenbar ist die Anwesenheit der NR2A Untereinheit im Zerebellum ausreichend um grundlegende motorische Funktionen aufrechtzuerhalten.

#### **1.3.3.5 Die NR2D-Untereinheit**

Die NR2D mRNA wird im Embryonalstadium und zwischen P1-7 im Zerebrum (in kortikalen Interneuronen; Standaert et al., 1996) und im Dienzephalon exprimiert, ist danach aber nicht mehr reliabel zu detektieren (Watanabe et al., 1992), kommt also

im adulten Nagerhirn nur in geringen Mengen vor. Der NR1-NR2D Rezeptortyp weist eine niedrige spannungsabhängige  $Mg^{2+}$ -Sensitivität auf (Kuner & Schoepfer, 1996); hat langsam deaktivierende Kanalströme (Vincini et al., 1998) und eine niedrigere Ionenleitfähigkeit als solche, die die NR2A oder NR2B Untereinheiten aufweisen (Cull-Candy et al., 1998). Diese Eigenschaften ähneln denjenigen der NR2C Untereinheit. NMDA-R, die die NR2D Untereinheit aufweisen, haben die höchste Glutamat und Gyzinaffinität im Vergleich zu anderen NR2 Untereinheiten (Ikeda et al., 1992). Der NR1-NR2D Typ wird schon bei  $-35mV$  Depolarisation maximal aktiviert, wogegen der NR1-NR2B Typ erst bei  $-25mV$  maximal aktiviert wird (Kuner & Schoepfer, 1996). Zwei verschiedene Isoformen des NR2D Proteins NR2D<sub>1</sub> und NR2D<sub>2</sub> wurden gefunden (Ishii et al., 1993).

Adulte NR2D<sup>-/-</sup> Mäuse weisen reduzierte NR1-Protein Konzentrationen im frontalen Kortex und im Striatum, nicht jedoch im Hippokampus und Thalamus auf (Miyamoto et al., 2002). NMDA-R im Vorderhirn von 3 Monate alten NR2D<sup>-/-</sup> Mäusen weisen nach NMDA-Stimulierung weniger  $Ca^{2+}$ -Einstrom und [ $^3H^+$ ] MK-801 Anbindung auf (Miyamoto et al., 2002). Juvenile NR2D<sup>-/-</sup> Mäuse (P26-P28) zeigten reduzierte Spontanaktivität, aber keine erhöhte Ängstlichkeit, verglichen mit heterozygoten NR2D<sup>+/-</sup> Mäusen (Ikeda et al., 1995). Adulte NR2D<sup>-/-</sup> Mäuse weisen dagegen weniger Ängstlichkeit im Elevated Plus-Maze (EPM) und im Light-Dark Test, sowie weniger Immobilität im Forced Swim Test (eine einzige Darbietung) und reduzierte horizontale und vertikale Aktivität in einer neuen Umgebung auf (30 Min. Test) (Miyamoto et al., 2002). Der NR2D Knockout führte auch zu einer sehr umfangreichen Störung der monoaminergen Systeme im Gehirn. Adulte NR2D<sup>-/-</sup> Mäuse haben weniger Dopamin, mehr Homovanilinsäure, und mehr 5-Hydroxyindol Säure im frontalen Kortex; weniger Noradrenalin, mehr Dihydrophenylsäure, mehr Homovanilinsäure, mehr Serotonin und 5-Hydroxyindol Säure im Striatum; weniger Noradrenalin, weniger Dopamin, weniger Dihydrophenylsäure, weniger Homovanilinsäure, weniger Serotonin, und weniger 5-Hydroxyindol Säure im Hippokampus (Miyamoto et al., 2002). NR2D Tg Mäuse (Überexpression der NR2D Untereinheit im Vorderhirn durch einen vorderhirnspezifischen CaMKII $\alpha$ -Promotor) haben kleinere NMDA-R medierte EPSC Amplituden und längere Zerfallszeiten des EPSP und eine reduzierte NR2B mRNA Expression (Okabe et al., 1998). Adulte NR2D Tg Mäuse weisen hippokampale LTP- und juvenile LTD (1-5 Hz Stimulation) Defizite auf (Okabe et al., 1998). NR2D Tg Mäuse zeigen auch weniger explorative

Aktivität im Offenfeld (Okabe et al., 1998), haben aber keine motorischen Defizite auf einem akzellerierenden Rotarod (4-40 RpM über 5 Min) (Okabe et al., 1998). NR2D Tg Mäuse weisen auch keine Defizite in einer Water-Maze Aufgabe auf (Okabe et al., 1998). Diese z.T. dramatischen neurophysiologischen und Veraltensaberrationen können jedoch nicht als Evidenz für eine aktive Rolle von NR1-NR2D Rezeptoren im adulten Gehirn bei diesen Prozessen angesehen werden, weil die NR2D Untereinheit stark in die Ontogenese des Gehirns involviert ist und somit diese Effekte z.T. auch auf periphere Entwicklungsstörungen und/oder eine abnorme Hirnentwicklung zurückgeführt werden können.

#### **1.3.3.6 Die NR3A-Untereinheit**

Die NR3 Untereinheiten formen keine funktionalen diheteromere NR1-NR3 Rezeptoren und sind wahrscheinlich dominant-negative regulatorische Elemente in triheteromeren NMDA-R Komplexen, die auch NR2 Untereinheiten aufweisen (Ciabarra et al., 1995; Sucher et al., 1995; Das et al., 1998).

NR3A<sup>-/-</sup> Mäuse weisen erhöhte NMDA-R mediierte Antworten und vermehrte Dornenfortsätze in neonatalen zerebrokortikalen Neuronen auf (Das et al., 1998). Wenn NR3A zusammen mit NR1 und NR2 Untereinheiten tri-heteromere NMDA-R bilden, ist die Leitfähigkeit der NMDA-R reduziert; dies erfolgt durch Senkung der Öffnungswahrscheinlichkeit, aber nicht der Öffnungsdauer des integrierten Ca<sup>2+</sup>-Kanals (Ciabarra et al., 1995; Sucher et al., 1995; Das et al., 1998). Bemerkenswerterweise hat das C-Terminal der NR3A Untereinheit eine Bindungsstelle für Phosphatase 2A (Chan et al., 2001), ein Protein, das mit Verlernen bzw. Vergessen in Verbindung gebracht wurde (Silva & Josselyn, 2002) und NMDA-R dephosphoryliert und damit weniger erregbar macht. NR3A wird pränatal und in der frühen postnatalen Entwicklungsphase exprimiert und wurde mit der Entwicklung von dendritischen Dornenfortsätzen, dem Auswachsen von Axonen und der Synaptogenese in Verbindung gebracht (Das et al., 1998; Sucher et al., 1995).

NR3A mRNA wird im Laufe der Entwicklung, ähnlich wie die NR1 und NR2A Untereinheiten, ubiquitär exprimiert, mit maximalen Expressionsraten um P7. Danach sinkt die Expressionsrate stetig und wird in adulten Tieren hauptsächlich in Kernen des Thalamus, der Amygdala, und des lateralen Tractus olfactorius exprimiert

(Ciabarra et al., 1995; Sucher et al., 1995). Das Expressionsmuster des NR3A Proteins ähnelt dem der NR1, NR2A und NR2B Untereinheiten, sowohl in Bezug auf die hirregionale Verteilung, wie auch hinsichtlich des Vorkommens in spezifischen Zelltypen und der subzellulären Lokalisation (Wong et al., 2002). Das NR3A Protein wurde in allen Regionen des zerebralen Kortex, der Amygdala, des Thalamus, Hippokampus, Hypothalamus, dem Striatum, dem Colliculus inferior, den Nuclei cochlearis, Nucleus olivaris superior, Nucleus reticularis pontis und dem Zerebellum nachgewiesen (Wong et al., 2002). In der Amygdala findet sich das NR3A Protein in hohen Konzentrationen an P16 (und in reduzierten Konzentrationen auch in adulten Tieren), besonders im basolateralen Nucleus, in geringen Konzentrationen auch im kortikalen, zentralen Nucleus und dem BNST (Wong et al., 2002). Das NR3A Protein findet sich primär an asymmetrischen Synapsen (exzitatorisch), an dendritischen Dornenfortsätzen, dendritischen Shafts und gelegentlich auch in der Plasmamembran des Soma, nicht jedoch an präsynaptischen Axonterminalen oder symmetrischen (inhibitorischen) Synapsen (Wong et al., 2002). Derzeit liegen noch keine Verhaltensstudien mit NR3A<sup>-/-</sup> Mäusen vor.

#### **1.3.3.7 Die NR3B-Untereinheit**

Wenn NR3B zusammen mit NR1 und NR2 Untereinheiten tri-heteromere NMDA-R bilden, ist die Leitfähigkeit der NMDA-R ebenso wie bei NR3A reduziert. Keine funktionalen Rezeptoren resultieren aus der diheteromeren NR1-NR3B Kombination (Nishi et al., 2001). Wenn jedoch *Xenopus* Oozyten mit NR3A plus NR1 oder NR3B plus NR1 cDNA transfiziert werden, entsteht ein neuer NMDA-R Typ mit völlig neuen Eigenschaften. Es wird ein exzitatorischer Glycinrezeptor gebildet, der insensitiv für Glutamat oder NMDA ist, durch D-Serine gehemmt wird, für Ca<sup>2+</sup> impermeabel ist, und nicht durch MK-801, Mg<sup>2+</sup> und kompetitive NMDA-R Antagonisten gehemmt wird (Chatterton et al., 2002). Das NR3B Protein weist am C-Terminal vermutlich keine PSD Bindungsstelle auf (Nishi et al., 2001). NR3B mRNA wurde ausschließlich in Motoneuronen des Hirnstamms und Rückenmark gefunden; schwächere Expressionsraten fanden sich in anderen Motoneuronen (Nishi et al., 2001). Die NR3B mRNA Expression ist, in Bezug auf regionale und temporäre Faktoren, im Laufe der postnatalen Entwicklung bis hin zum adulten Zustand, relativ konstant (Matsuda et al., 2002). Ein NR3B Knockout wurde bislang noch nicht beschrieben.

## **1.4 Gentechnische Verfahren zum Studium der Verhaltensrelevanz des NMDA-Rezeptors**

Infolge der rasanten Entwicklungen im Bereich der Neurogenetik, also der gezielten Inaktivierung, Substitution oder Überexpression einzelner Gene und deren Einführung in die Keimbahn von Mäusen, ist es gelungen, transgene und Knockout-Mausstämme zu erzeugen, bei denen Gene manipuliert wurden, deren Genprodukte im Zusammenhang mit psychologischen Konstrukten, wie z.B. Lernen- und Gedächtnis, Verstärkung und Emotionalität, von Bedeutung sind und die mit Verhaltens-, elektrophysiologischen- und neurochemischen Methoden phänotypisiert werden können, um damit Rückschlüsse bezüglich der Funktion dieser Genprodukte im Rahmen der Verhaltenssteuerung zu ziehen (Capecchi, 1989; Capecchi, 1994; Crawley & Paylor 1997; Müller 1999). Es ist zu erwarten, daß sich aus diesem Ansatz weitreichende Erkenntnisse gewinnen lassen, die für die pharmakologische und gentechnologische Therapie von diversen, auch erblich bedingten, kognitiven und emotionalen Störungen relevant sind (Aguzzi et al., 1994; Erickson, 1996; Van-Broeckhoven, 1995; Martini, 2000; Peier et al., 2000; Rosenberg, 2000; Stuchler-Pierrat & Sommer, 1999).

Dieser interdisziplinäre Ansatz kann auch die Erforschung der neurobiologischen Grundlagen des Verhaltens wesentlich bereichern, da die Gentechnik Möglichkeiten eröffnet, die durch die in der Vergangenheit in den Verhaltensneurowissenschaften verwendeten Ansätze, (Läsions-, pharmakologische- und elektrophysiologische Studien) nicht abgedeckt werden konnten (Mayford et al., 1995). Dieser Gesichtspunkt ist besonders für das Studium der funktionalen Aspekte der verschiedenen NMDA-Rezeptortypen von Bedeutung, die bislang noch nicht selektiv stimuliert oder antagonisiert werden können. Genetische Interventionen in der intakten Maus eröffnen des weiteren die Möglichkeit, Interaktionen zwischen der Manipulation von einzelnen Genen bzw. deren Genprodukten und experimentell kontrollierten Umwelten (verschiedenen Lernsituationen oder auch Haltungsbedingungen; z.B. angereicherte Umwelten, Gruppen vs. Einzelhaltung etc.) anhand der korrelierten Variation des Phänotyps zu spezifizieren (Gingrich & Hen, 2000, Pleskacheva et al., 2000).

Der Umstand das Verhalten in komplexer Weise, unter der Mitwirkung einer Vielzahl von genetischen und Umweltfaktoren, reguliert wird, erschwert allerdings in einigen

Fällen die eindeutige Zuschreibung einer neurobiologischen oder Verhaltensanomalie zu der vorgenommenen genetischen Intervention. Weitere interpretatorische Probleme ergeben sich beispielsweise durch das a) Auftreten von kompensatorischen Effekten infolge von genetischer Redundanz; b) wenn die Genintervention vor einem gemischten genetischen Hintergrund vorgenommen wurde; c) durch mögliche hirnanatomische oder periphere Entwicklungsaberrationen, falls die Genintervention bereits bei der Konzeption bestand und das Genprodukt für basale Entwicklungsprozesse relevant ist; wobei sich diese Probleme durch die Verwendung von Mausmutanten der zweiten (z.B. konditionale Knockouts) und dritten Generation (induzierbare Knockouts) und elaborierte, aber sehr aufwendige Züchtungsstrategien überwinden lassen (Gerlai, 1996; Gerlai, 2000; Lathe, 1996; Nelson & Young, 1998; Silva, 1997; Tsien et al., 1996; Wilson & Tonegawa, 1997).

Es besteht auch die Auffassung, daß das Genom möglicherweise auf isolierte Geninterventionen systemisch oder zumindest im Rahmen einer funktional definierten Gengruppe reagiert. Einzelne Geninterventionen können beispielsweise zu kompensatorischen Überexprimierungen oder einer supprimierten Expression von anderen Genen führen und möglicherweise falsch positiven oder falsch negativen Interpretationen eines bestehenden oder fehlenden Phänotyps Vorschub leisten. Auch wurde in der Vergangenheit angemerkt, daß das Genom unter Umständen eine nicht unerhebliche, auch funktionale, Redundanz aufweist (z.B. existieren viel mehr bekannte Gene als Proteine), so daß eine gegebene Genmanipulation u.U. keinen erkennbaren Phänotyp induziert und fälschlicherweise aus diesem Umstand geschlossen wird, daß dieses Gen für die betrachtete Funktion irrelevant sei (Gerlai, 1996; Nelson, 1997). Deshalb wäre es wichtig zu wissen, wie sich die Expressionsraten von anderen Genen und/oder Isoformen des manipulierten Gens im Gehirn der Mausmutanten verändern.

Die Methodik zur synchronen Messung der Expressionsrate einer Vielzahl von DNA-Sequenzen (cDNA-Microarray) wurde vor wenigen Jahren entwickelt. Im Rahmen der Microarray-Technik (Schena et al., 1995) werden PCR-amplifizierte und gereinigte cDNA-Fragmente bzw. Sonden von relevanten Genen an bezeichneten Orten auf einer Glasplatte (Chip) aufgetragen. Aufbereitete revers transkribierte mRNA-Proben aus Hirnschnitten von Mutanten und Wildtypen werden mit unterschiedlich fluoreszierenden Nukleotidanalogen markiert und gleichzeitig mit dem cDNA-Microarray-Chip in Verbindung gebracht bzw. hybridisiert. Unterschiedliche

Farbreaktionen zwischen den beiden Proben kennzeichnen Unterschiede in der Expressionsrate bzw. den Expressionsstatus einzelner Gene im Laufe der Ontogenese (Watson et al., 2000; Xiang & Chen, 2000). Die von den Proben emittierte Fluoreszenzdichte wird von einem Laserscanner erfasst. Allerdings ist diese Technik außerordentlich kostspielig und konnte in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt werden.

Auch ist es möglich, daß eine Genintervention vor einem genetischen Hintergrund A (z.B. Mausstamm C57BL/6) zu einem Phänotyp führt, aber nicht vor einem genetischen Hintergrund B (z.B. Mausstamm DBA/2), also eine Interaktion zwischen Genintervention und genetischer Ausstattung des Empfängerorganismus besteht. So wurde berichtet, daß bestimmte Mausstämme (z.B. DBA/2, 129/Sv) nicht in der Lage sind, räumliche Lernaufgaben im Water-Maze angemessen zu bewältigen (Crawley et al., 1997). Andererseits gibt es Mausstämme, z.B. C57BL/6, die im Vergleich mit anderen Mausstämmen zu den besseren räumlichen Lernern gehören, was sowohl für räumliche Probleme im Wasser (Water-Maze) als auch zu Lande (Radial-Maze) gilt (Whishaw, 1995). Diese große Variationsbreite hinsichtlich hippokampal-medierten Lernens konnte auch für einzelne Mausstämme mit morphologischen Alternationen des Gehirns in Verbindung gebracht werden (Crusio et al., 1987; Bertholet & Crusio, 1991). Bei der NR2C-NR2B Substitutionsmaus wurde die NR2C Untereinheit durch die NR2B Untereinheit ersetzt, also eine Maus generiert bei der die NR2B Untereinheit im Vorderhirn vermehrt exprimiert wird. Diese Erhöhung der NR2B Expression sollte sich auf kognitive Leistungen, ähnlich wie bei NR2B Überexpressionsmäusen (Tang et al., 1999) förderlich auswirken. In der vorliegenden Arbeit wurde die Genintervention vor einem C57BL/6 genetischen Hintergrund vorgenommen. Also ein Mausstamm genutzt der ohnehin schon eine exzellente Lernfähigkeit aufweist und damit faktisch gegen die implizite Hypothese gearbeitet, daß die Genintervention zu einer Verbesserung kognitiver Leistungen auch im Water-Maze Paradigma führen würde (siehe auch die Einleitung zu Experiment V), weil diese Leistungsverbesserung der NR2C-2B/C57BL/6 Mäuse sich im Vergleich mit C57BL/6 Wildtypmäusen einstellen müsste. Einen entsprechenden Lernzuwachs der NR2C-2B Mäuse vor einem C57BL/6 Hintergrund zu finden ist deshalb weitaus schwieriger als beispielsweise vor einem 129/SvJ Hintergrund, weil der letztere Mausstamm in räumlichen Lernaufgaben relativ schlechte Leistungen erbringt.

Bei der Interpretation der Befunde (und der Einschätzung ihrer Implikationen für diverse Forschungsfelder), die anhand von NMDA-R Mausmutanten gewonnen wurden, sollten auch immer die oben genannten Nachteile bzw. Beschränkungen des verhaltensgenetischen Ansatzes im Rahmen der Physiologischen Psychologie in Betracht gezogen werden.

#### **1.4.1 Exemplarische Darstellung des gentechnologischen Ansatzes anhand von NR1 und NR1-CA1 Knockoutmäusen**

##### **1.4.1.1 Elementare Genetik**

Die Erbinformation von allen Organismen (Menschen, Tieren, Mikroorganismen, und Pflanzen) findet sich auf den Chromosomen im Zellkern bzw. in der Zelle. Jedes Chromosom ist aus einem doppelsträngigen Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Molekül aufgebaut. Der DNA-Strang ist eine Abfolge von 4 Nucleotidbasen (Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin). Einzelne Abschnitte des DNA-Strangs werden als Gene bezeichnet, weil die Abfolge der Nucleotidbasen in diesen Abschnitten die Information für den Aufbau eines Proteins enthält. Proteine sind durch Wasserstoffbrücken aneinandergeschaltete Aminosäuren (Southern, 1984; Young, 1984). Die NR2C Untereinheit z.B. ist auch ein Protein.

##### **1.4.1.2 Aufbau eines Gens**

Jedes Gen hat einen Promotor, d.h. eine regulatorische Sequenz die determiniert, in welcher Hirnregion und in welchen Zelltypen in dieser Hirnregion das zugehörige Protein gebildet wird (z.B. in Pyramidenzellen der CA1-Region des Hippokampus oder in Astrozyten des Stratum moleculare im Kleinhirn). Der Promotor hat eine Bindungsstelle für zell- und regionspezifische Transkriptionsfaktoren, die das Signal zum Ablesen des Gens geben, wenn ein Aktivator an eine zweite Bindungsstelle am Gen, die Enhancerregion anbindet. Die Enhancerregion bestimmt, wann und wie viel von dem Protein gebildet werden soll. Nachdem ausreichende Mengen des Proteins synthetisiert wurden, wird das Gen durch einen Repressor, der an die Silencerregion des Gens anbindet, wieder abgeschaltet. Das Gen hat auch eine Stelle die anzeigt, wo auf dem Gen die Information für die Bildung des Proteins beginnt (Start Codon) und wo sie endet (Stop Codon), wo also das Ablesen beginnen und wieder enden

soll. Dazwischen liegen Exons und Introns. Die Exons beinhalten die Information für die Abfolge der Aminosäuren, die aneinander gehängt werden sollen, um das Protein zu bilden. In den Introns findet sich möglicherweise keine Information oder Informationen, die im Laufe der Phylogenese aussortiert wurden (Holland & Blake, 1987).

#### **1.4.1.3 Genexpression**

Damit ein Gen abgelesen werden kann, muß der Doppelstrang sich erst an der richtigen Stelle aufwinden. Das geschieht durch Anbindung eines Aktivators und eines Transkriptionsfaktors (Sigma-Faktor + RNA-Polymerase II) an die entsprechenden Erkennungsorte am Gen im Zellkern. Dann wird das Gen abgelesen und eine sogenannte Precursor bzw. Vorläufer pmRNA gebildet. Die Umwandlung der pmRNA in eine mRNA (RNA Processing bzw. Splicing genannt), die keine Introninformationen mehr enthält, erfolgt noch im Nukleus bzw. Zellkern durch Spliceosome (snRNPs). Die mRNA verläßt daraufhin den Zellkern und wandert ins Zytoplasma (Translokation). Dort lesen dann Ribosomen die mRNA ab, in dem sie an dieser entlangwandern, und setzen die, von der transfer-RNA herantransportierten Aminosäuren in der richtigen Reihenfolge, so wie es auf der mRNA niedergeschrieben steht, zusammen, bis das Stop-Codon erreicht wird und das Protein fertiggestellt ist (Lewin, 1975; Revel & Groner, 1978; Tomkins & Martin, 1970).

#### **1.4.1.4 Gen-Knockout**

Um z.B. eine NR1-Knockout Maus zu erzeugen, d.h. eine Maus die kein NR1 Protein mehr bilden kann, weil das zugehörige Gen verändert wurde, muß man zunächst das NR1-Gen klonen und dann so verändern das es nicht mehr funktioniert. Das Gen funktioniert dann nicht mehr, wenn man in ein Exon (wo eine wichtige Information zur Bildung des Proteins steht), z.B. ein Neomycin-Resistenzgen (NEO, ein Antibiotika) einfügt und somit das Ablesen der Information an dieser Stelle unterbindet, d.h. das ein Teil der Information fehlt und das gebildete Protein nicht vollständig ist. Zusätzlich wird hinter dem Stop-Codon, also außerhalb des Gens, ein Herpes-Simplex Virus-Gen (HSV-tk) eingebaut, das nach Gabe eines Aktivators, z.B. von Gancicovir aktiviert werden kann. Das NEO und auch das HSV-tk Insert wird

durch einen ubiquitären Promotor, z.B. für Phosphoglycerate Kinease (PGK), reguliert und dient auch zur positiv/negativ Selektion der, mit dem Konstrukt transfizierten, Stammzellen. Das veränderte Gen wird in embryonale Stammzellen eingeschleust (ES-Zellen: pluripotente, undifferenzierte Zellen aus der inneren Zellmasse von Blastozysten). ES-Zellen der Mausstämmen 129/Sv, 129/Ola, C57BL/6, CBA/ca und BALB/c etc. sind bereits verfügbar. Aus embryonalen Stammzellen können sich ganze Mäuse entwickeln. Man kann diese Zellen in Kultur, d.h. in einer Petrischale mit Nährlösung und einem Differenzierungsinhibitor (z.B. LIF: Leukaemia Inhibitionsfaktor) in einem undifferenzierten Zustand halten (Pease & Williams, 1990). Das bedeutet, daß die Entwicklung dieser Zellen arretiert bzw. angehalten wurde. Erst wenn man den Differenzierungsinhibitor aus der Petrischale entfernt, entwickeln sich die Zellen weiter, d.h. teilen sich und wachsen zu Mausembryonen heran. Der 129 Mausstamm eignet sich ausgezeichnet zur Kultivierung von ES-Zellen. Wenn man an die Petrischale mit den ES-Zellen einen Strom anlegt, dann wird die Zellmembran der ES-Zellen durchlässig. Man kann dann das manipulierte Gen in vielen Kopien in die Petrischale geben, woraufhin einige Zellen das manipulierte Gen in ihr Genom einbauen, wenn sie sich nach Entfernung des Differenzierungshemmers weiter teilen. Wenn eine Zelle das Gen aufgenommen hat und es in das Genom (d.h. in ein Chromosom) eingebaut hat, dann ist es auch nicht mehr für das Antibiotika Neomycin anfällig. Wenn man das Antibiotika Neomycin in die Petrischale gibt, sterben alle Zellen, die das manipulierte Gen mit dem Neomycin-Resistenzgen nicht aufgenommen haben, ab (positive Selektion). Die anderen Zellen überleben. Bei den überlebenden Zellen ist jedoch nicht klar, ob sie das Gen auch am entsprechenden Genlokus auf dem richtigen Chromosom oder lediglich zufällig irgendwo in das Genom integriert haben. Wenn das manipulierte Gen (NR1-) an der richtigen Stelle, anstelle von NR1+, eingebaut wurde, spricht man von homologer Rekombination (dieser Begriff bezeichnet den in vivo Austausch von genomischen Sequenzen zwischen homologen DNA-Fragmenten), andernfalls von nicht-homologer Rekombination. Bei der homologen Rekombination wird das HSV-tk Virus, das durch Zugabe von Ganciclovir aktiviert werden kann (und die Zelle töten würde) herausgeschnitten. Wenn man also Ganciclovir in die Petrischale gibt, überleben nur diejenigen Zellen, die das Gen richtig eingebaut und den Virus verloren haben (negative Selektion). Die überlebenden ES-Zellen haben eine Kopie des manipulierten bzw. defekten Gens und eine intakte Kopie. Diese ES-Zellen werden

deshalb als heterozygot (NR1+/-) für die Genmanipulation bezeichnet. Jedes Chromosom findet sich im Genom doppelt und deshalb ist auch jedes Gen doppelt. In den ES-Zellen wird bei der homologen Rekombination jedoch immer nur ein Gen (NR1+) durch das manipulierte Gen (NR1-) ersetzt, das andere nicht, weil eine homozygote homologe Rekombination ein sehr unwahrscheinliches Ereignis ist, bzw. mit einer Wahrscheinlichkeit auftritt, die gegen Null geht. Die ES-Zellen (i.d.R. vom 129-Stamm) werden daraufhin in Blastozyten, das sind Zellhaufen von Mausembryos, die noch in einem frühen Entwicklungsstadium sind, injiziert. Aus einem Blastozyt können sich bis zu einem dutzend Tiere entwickeln. Die Blastozyten stammen in der Regel vom Mausstamm C57BL/6, weil man von diesen Mäusen am einfachsten Blastozyten gewinnen kann. Die mit ES-Zellen injizierten Blastozyten werden dann in scheinchwangere bzw. superovulierte Mausweibchen verpflanzt und von diesen ausgetragen. Der 129-Stamm hat eine braune Fellfarbe, das Allel, daß diese Fellfarbe hervorruft, ist dominant. Die Mäuse vom C57BL/6 Stamm haben eine schwarze Fellfarbe und das dazugehörige Allel ist rezessiv. Das heißt, daß wenn man eine homozygote braune Maus mit einer schwarzen verpaaren würde, wären die Nachkommen alle braun obwohl sie beide Allele des Gens, das für die Fellfarbe kodiert, also sowohl braun als auch schwarz, besitzen. Im Wurf findet man dann schwarze und gefleckte Mäuse. Schwarze Mäuse sind isogen bzw. reinerbig d.h. sie haben nur C57BL/6 Gene. Die ES-Zellen haben bei diesen Mäusen also weder zum Aufbau der Körperzellen (Phänotyp) noch der Geschlechtszellen (Genotyp) beigetragen. Die Körperzellen der gefleckten Mäuse (gemustertes Fell Schwarz und Braun) sind zum Teil aus den manipulierten ES-Zellen (129) (in diesen Zellen findet sich das defekte Gen NR1+/-) und in Teilen aus den Blastozytenzellen (C57BL/6) hergeleitet, (in denen sich das defekte Gen nicht findet). Die Geschlechtszellen der gefleckten Mäuse können jedoch sowohl reinerbig vom C57BL/6 Stamm (+/+) oder mischerbig bzw. heterozygot (C57BL/6/129 +/-) sein. Bei den mischerbigen bzw. heterozygoten Mäusen sind die Geschlechtszellen von den ES-Zellen aufgebaut worden. Nur diese Mäuse können den Gendefekt weitervererben (man spricht dann von einer erfolgreichen Keimbahntransmission). Die Nachkommen dieser heterozygoten +/- Mäuse sind dann zu 100 % braun, weil die Geschlechtszellen vom 129 Stamm herrühren und das Gen für braun dominant ist. Indem man also gefleckte Mäuse mit schwarzen verpaart kann man herausfinden welche der gefleckten Mäuse ihre Geschlechtszellen durch ES-Zellen aufgebaut haben. Wenn man eine

gescheckte +/- Maus mit einer schwarzen +/+ Maus kreuzt, erhält man zu 3/4 NR1+/+ Mäuse und nur zu 1/4 NR1+/- Mäuse, weil jeder Elternteil nur zufällig die eine oder andere Kopie des NR1 Gens weitervererbt und das zweite Gen vom anderen Elternteil beigesteuert wird. Die heterozygoten Mäuse +/- haben nämlich auch noch eine intakte Kopie. Die heterozygoten +/- Mäuse produzieren nur ca. 50 % des NR1 Proteins das in homozygoten +/+ Mäusen gefunden wird. Man will aber Mäuse generieren, die das NR1 Protein überhaupt nicht mehr bilden können. Deshalb muß man zwei +/- Mäuse miteinander verpaaren, um auch homozygote NR1-/- Mäuse zu erhalten. Die heterozygoten NR1+/- Mäuse werden darum miteinander verpaart. Im Wurf finden sich zu einem viertel CA1-NR1+/+ Mäuse, also ganz normale Wildtypmäuse, zwei viertel heterozygote CA1-NR1+/- Mäuse und etwa ein viertel homozygote CA1-NR1-/- Mäuse, die kein intaktes NR1 Gen mehr aufweisen. Diese Verteilung ergibt sich aus dem Umstand, daß jedes Elternpaar nur einen Chromosomensatz an die Nachkommen weitergibt, aber beide Elternteile jeweils ein intaktes NR1+ und ein inaktiviertes NR1- Gen aufweisen (Forrest et al., 1994; Übersicht bei Galli-Taliadoros et al., 1995; Moreadith & Radford, 1997; Müller, 1999; Picciotto & Wickman, 1998; Soriano, 1995; und Rudolph & Mohler, 1999).

#### **1.4.1.5 Konditionale Gen-Knockouts**

Um einen gewebe- und zellspezifischen NR1-Knockout zu generieren, muß man zwei transgene Mausstämme herstellen und dann miteinander kreuzen. Bei transgenen Mäusen wird kein Gen inaktiviert, sondern es werden zusätzliche Gene, die Transgene, in das Genom der Tiere eingeschleust (häufig wird der Begriff Transgen synonym für das Einbringen von artfremden Genen in eine Spezies benutzt; hier bezieht sich der Begriff auch auf das Einbringen von zusätzlichen Mausgenen in das Mausgenom). Das erste Transgen, das in den Mausstamm 1 eingebracht wird besteht aus einem Cre-Rekombinase Gen und einem CA1-pyramidenzellenspezifischen Promotor, der gewährleistet, daß das Cre-Gen nur in dieser Hirnregion und nur in diesem Zelltyp abgelesen wird. Nur dort wird das Enzym Cre-Rekombinase gebildet. Die Cre-Rekombinase ist ein Restriktionsenzym, das in der Lage ist DNA bzw. Gene an entsprechenden Angriffsstellen, den loxP Sites, zu zerschneiden. Man kann die Cre-Rekombinase also als eine Art DNA-Schere verstehen, die an definierten Stellen eines Gens, den loxP Stellen, den dazwischen liegenden Teil eines Gens, ausschneiden kann, z.B. die für die NR1 Untereinheit

kodierende Sequenz des Gens. Bei einem zweiten Stamm werden zwei loxP Einheiten in die NR1-Gensequenz eingeschleust (mittels homologer Rekombination wie beim klassischen Knockout). LoxP Einheiten sind Bindungsstellen für das Restriktionsenzym Cre-Rekombinase, an denen das Enzym die dazwischen liegenden Teile des Gens ausschneiden kann. Dadurch fehlt beim Ablesen des beschnittenen Gens eine wichtige Information zum Aufbau des NR1-Proteins. Zusätzlich befindet sich in dem Transgen, das in das Genom von Mausstamm 2 eingeschleust wird, ein sogenanntes lacZ-Insert. Das lacZ-Insert wird auch als Reporter gen bezeichnet. Dieses Reporter gen wird nur dann aktiv, wenn die Cre-Rekombinase an den loxP-Stellen die dazwischen liegenden Anteile ausschneidet, also eine für die NR1-Einheit kodierende Sequenz inklusive eines Stop-Kodons. Wenn das Stop-Kodon herausgeschnitten wird, dann wird auch das angehängte lacZ Gen abgelesen. Wenn man nun die Tiere des ersten Stamms mit denen des zweiten Stamms kreuzt, wird die Cre-Rekombinase nur in Pyramidenzellen der CA1-Region des Hippokampus aktiv und schneidet nur dort eine für die NR1-Untereinheit kodierende Sequenz des NR1-Gens und das Stop-Kodon heraus. Nur dort im Gehirn hat man dann einen NR1-Knockout. Gleichzeitig wird auch, weil das Stop-Kodon mitherausgeschnitten wurde, das lacZ-Gen abgelesen und produziert Beta-Galactosidase. Diese Beta-Galactosidase kann durch die Substanz X-Gal angefärbt werden. Im Hirnschnitt färben sich dann nur diejenigen Zellen im Gehirn blau, in denen das NR1-Gen inaktiviert worden ist, also nur Pyramidenzellen in der CA1-Region des Hippokampus und man weiß damit, dass man Erfolg gehabt hat. Das restliche Gehirn wird nicht angefärbt, was bedeutet, dass das NR1-Gen außerhalb der CA1-Region nach wie vor intakt ist und dort funktionale NMDA-Rezeptoren gebildet werden (Feil et al., 1996; Lobe & Nagy, 1998; Tsien, 1998; Tsien et al., 1996; van-der-Neut, 1997; Wang et al., 1996).

#### **1.4.1.6 Induzierbare Gen-Knockouts**

Der Nachteil eines konditionalen CA1-NR1-pyramidenzellspezifischen Knockouts ist, dass er irreversibel ist, d.h. man kann ihn nicht mehr rückgängig machen. Das wäre aber gerade bei Verhaltensstudien von Vorteil, weil man dann auch die Option hätte, in der selben Maus zu untersuchen, wie das Tier mit und ohne die Geninaktivierung, z.B. lernt oder auf aversive Stimulation, reagiert. Man könnte also einen Vorher-

Nachher bzw. mit-ohne Vergleich machen. Mit den normalen Knockoutmäusen dagegen kann man nur Gruppenvergleiche anstellen, also CA1-NR1<sup>-/-</sup> Knockout mit CA1-NR1<sup>+/+</sup> Wildtypmäusen vergleichen. Mäuse bei denen man nach belieben ein Gen an- und wieder abschalten kann nennt man induzierbare konditionale Knockoutmäuse. Das Vorgehen ist im Prinzip dasselbe, wie bei den CA1-NR1<sup>-/-</sup> Mäusen, nur das bei Stamm 1 zusätzlich ein Gen eingefügt wurde, das einen sogenannten tet (tetracycline)-Transaktivator (tet-TA) synthetisiert und bei Stamm 2 zwei weitere Gensequenzen: Zum Einen eine regulatorische Einheit, den tet-Operator (tet-op) und ein zusätzliches NR1 Gen. Der Stamm 2 hat also zwei NR1-Gene. Wenn man Stamm 1 mit Stamm 2 kreuzt, wird das native, gefloxtete NR1-Gen zwar durch die Cre-Rekombinase teilweise herausgeschnitten und damit inaktiviert, aber das zweite NR1 Gen wird durch eine Interaktion zwischen dem (durch das tet-TA produzierten) tet-TA Protein und dem tet-Operator (tet-Op) abgelesen. Interaktion heißt in diesem Zusammenhang, daß das tet-TA Gen abgelesen wird und ein zugehöriges tet-TA Protein gebildet wird, dieses Protein bindet an den tet-Op und aktiviert somit das Ablesen des zweiten noch intakten NR1-Gens. Das geschieht jedoch nur in Pyramidenzellen der CA1-Region des Hippokampus, anderswo im Gehirn wird das zweite NR1-Gen nicht abgelesen. Das ist so, weil der Promotor, der das Ablesen des tet-TA Gens reguliert, derselbe ist, der auch die Expression des Cre-Gens steuert. Die Interaktion zwischen dem tet-TA und dem tet-op, die zusammen das Ablesen des zweiten NR1 Gens steuern, kann durch die Gabe der Substanz Doxycyclidin (ein tet-Analog), z.B. im Trinkwasser der Mäuse, gehemmt werden (tet-off System), so daß verhindert wird, daß das zweite intakte NR1-Gen abgelesen wird. Solange die Mäuse also doxycyclidin-versetztes Wasser zu trinken bekommen, wird in Pyramidenzellen der CA1-Region wie zuvor auch das NR1-Gen beschnitten und dadurch inaktiviert. Das zweite intakte NR1-Gen wird aber nicht abgelesen, so daß man den CA1-NR1<sup>-/-</sup> (Knockout)-Zustand hat. Wenn aber das Doxycyclidin abgesetzt wird und die Tiere normales Wasser zu trinken bekommen, wird das zweite NR1-Gen wieder abgelesen und es werden wieder funktionierende NMDA-Rezeptoren gebildet, d.h. man hat eine (nahezu) normale Maus ohne Geninaktivierung (Furth et al., 1994; Gossen & Bujard, 1992; Kistner et al., 1996; Mayford et al., 1996; Saez et al., 1997; Shimizu et al., 2000; Tsien et al., 1996; Van der Neut, 1997).

## 1.5 Fragestellungen der Arbeit

Bei den in dieser Arbeit charakterisierten NR2C-2B Substitutionsmäusen wurde die proteinkodierende Sequenz des Gens, das für die NR2C Untereinheit kodiert durch die des NR2B Gens ersetzt, während die Sequenz der regulierenden Einheiten des NR2C-Gens beibehalten wurde. Diese NR2C-2B Substitutionsmäuse exprimieren im Gehirn also anstelle der NR2C Untereinheit die NR2B Untereinheit, wobei die Substitution hirnregional und ontogenetisch dem Expressionsverlauf des NR2C Proteins folgt. Da die NR2C Untereinheit in Wildtypmäusen auch in Hirnregionen exprimiert wird, in denen Lern- und Gedächtnisprozesse, emotionale und motorische Prozesse gesteuert werden und NMDA-R an der Regulation des zentralen cholinergen Systems partizipieren, war zu erwarten das die Gensubstitution diese Funktionen beeinflusst. In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen einer NMDA-R Untereinheiten NR2C-NR2B Gensubstitution bei Mäusen auf motorische Koordinationsleistungen (Experiment I), emotionales Verhalten (Experiment II), räumliche Exploration und Habituationsprozesse (Experiment III), Objektgedächtnis (Experiment IV), negativ verstärktes räumliches Lernen (Experiment V) und post-mortem Gehirnazetylcholkonzentrationen (Experiment VI) bestimmt.

**EXPERIMENT I:** Bei Wildtypmäusen beginnt die NR2C Expression im Kleinhirn nach der zweiten Woche postnatal und erreicht gegen Ende des ersten Monats ein Plateau in Körnerzellen. Im selben Zeitraum verringert sich die NR2B Expression und wird nach der dritten Woche völlig eingestellt. Der zeitliche Verlauf dieser Ereigniskaskade korrespondiert mit kritischen Reifungsprozessen des Kleinhirns. In NR2C-2B Mäusen dagegen wird die NR2B Expression auch über den ersten Lebensmonat hinaus aufrechterhalten und führt in adulten NR2C-2B Mäusen zu mikroanatomischen Entwicklungsaberrationen im Kleinhirn, die möglicherweise zu motorischen Balancierungs- und Koordinationsdefiziten führen. Ein solcher Effekt ist dagegen bei 3 Wochen alten NR2C-2B Mäusen weniger wahrscheinlich, weil bei diesen Tieren die Entwicklungsaberrationen im Keinhirn noch nicht vollends zum tragen kommen.

**EXPERIMENT II:** Die Expression der NR2C Untereinheit in gabaergen Interneuronen der Amygdala und anderen Hirnregionen, die in die Mediierung unkonditionierter Ängstlichkeit involviert sind, könnte für die Detektion von unkonditionierten Angstreizen relevant sein. Die NR2C-2B Gensubstitution könnte sich deshalb auf unkonditionierte Ängstlichkeit auswirken; möglicherweise bedingt durch einen Mangel

an NR2C enthaltenden NMDA-R in Hirnregionen, die dem „Brain Defence System“ zugesprochen werden. Denkbar sind auch altersabhängige Effekte bei NR2C-2B und Wildtypmäusen, weil die NR2C Untereinheit in Vorderhirnstrukturen im Laufe der Hirnentwicklung herunterreguliert wird und diese Herunterregulierung unter Umständen mit Befunden in Verbindung steht, die zeigen das junge Nagetiere in neuen angstinduzierenden Umgebungen emotionaler reagieren als adulte Tiere.

**EXPERIMENT III:** Funktionale NMDA-R in der CA1 Region des Hippokampus sind für die Ausbildung und/oder Stabilisierung einer internen Repräsentation einer neuen räumlichen Umgebung kritisch. Die NR2C mRNA, wie auch das NR2C Protein wurde im juvenilen und adulten Hippokampus von Nagern gefunden. Weil NMDA-R abhängige neuronale Plastizität (besonders LTP) für den Aufbau und/oder der Stabilisierung einer kognitiven Landkarte in einer neuen räumlichen Umgebung relevant sind, ist es möglich, daß die Substitution der NR2C durch die NR2B Untereinheit, die für erfahrungsabhängige synaptische Effizienzsteigerungen (LTP) besser geeignet sind, in hippokampalen Neuronen sich qualitativ und/oder beschleunigend auf diese Prozesse auswirkt. Deshalb ist es denkbar, daß die NR2C-2B Substitutionsmäuse ein verändertes räumliches Explorations- und Habitationsverhalten äußern.

**EXPERIMENT IV:** Systemische Applikation von NMDA-R Antagonisten beeinträchtigt das Objektgedächtnis von Nagetieren. Gleichermäßen beeinträchtigte ein CA1-pyramidenzellspezifischer NR1-Knockout das Objektgedächtnis, wogegen eine Überexprimierung der NR2B Untereinheit im Vorderhirn von Mäusen zu einer Verbesserung des Objektgedächtnisses nach kurzen zeitlichen Intervallen zwischen Lerndurchgang und Test führte. Die NR2C-2B Gensubstitution sollte sich promnestisch auswirken und die NR2C-2B Substitutionsmäuse in die Lage versetzen Objekte auch nach einem 24 stündigen Intervall wiederzuerkennen, wogegen diese Leistung von Kontrolltieren nicht erbracht werden sollte.

**EXPERIMENT V:** NMDA-R wurden in Verbindung mit spezifischen Formen von hippokampaler synaptischer Plastizität und dem räumlichem Gedächtnis in Verbindung gebracht. NR2B enthaltende NMDA-R weisen elektrophysiologische Eigenschaften auf, die für LTP besonders geeignet sind, wogegen NR2C enthaltende NMDA-R für aktivitätsabhängige synaptische Effizienzsteigerungen eher ungeeignet sind. Nicht-räumliches und räumliches Vortraining beseitigt die Anfälligkeit des räumlichen Lernsubstrats für nachfolgende pharmakologische NMDA-R Blockade

und hippocampale LTP-Sättigung bei der Standardversion des Morris Water-Maze Paradigmas, induziert aber nach wie vor eine Lernschwäche, wenn die Tiere täglich neue räumliche Beziehungen erlernen müssen. Wir nahmen an, daß eine moderate Erhöhung der NR2B Expression im Vorderhirn der NR2C-2B Mäuse die Lernleistung von Mäusen in einer konventionellen Water-Maze Akquisitionsaufgabe und in einer multiplen Akquisitionsaufgabe verbessern würde.

**EXPERIMENT VI:** Cholinerge Zellen im Nukleus basalis magnozellularis (NBM) im basalen Vorderhirn und im Septum innervieren den gesamten Neokortex und limbische Strukturen, wie z.B. den Hippokampus und die Amygdala. Die Ursprungskerne cholinergischer Zellen weisen eine hohe Dichte an NMDA-R auf. NMDA-Agonisten, nicht jedoch AMPA Agonisten, in den NBM injiziert, erhöhen die Azetylcholinfreisetzung in kortikalen und subkortikalen Strukturen. Die NR2C-2B Gensubstitution könnte in den Ursprungskernen des cholinergen Systems im basalen Vorderhirn die Erregbarkeit cholinergischer Neurone und den Azetylcholinmetabolismus beeinflussen und dadurch zu veränderten Azetylcholin- und oder CholinKonzentrationen in neokortikalen und subkortikalen Regionen führen.

## **B) EMPIRISCHER TEIL**

### **2. ALLGEMEINE METHODEN**

#### **2.1 Generierung der NR2C-2B Substitutionsmäuse und deren allgemeine Erscheinung**

Die Generierung der NR2C-2B Substitutionsmäuse wurde an anderer Stelle im Detail beschrieben (Pieri et al., 2003). In Kürze lässt sich das Protokoll wie folgt beschreiben: Zunächst wurde eine Maus-Genbank (beherbergt Sammlungen von Klonen bzw. Kopien jeder DNA-Sequenz (komplementäre DNA oder cDNA) eines Organismus) gesichtet, um das NR2C Gen zu isolieren und zu klonieren, d.h. zu vervielfältigen. Anschließend wurde ein sogenannter Targeting Vektor konstruiert bzw. das NR2C Gen modifiziert. Hierbei wurden die für das NR2C Protein kodierenden Sequenzen des NR2C Gens durch die des NR2B Gens ersetzt, wobei jedoch die Promotorsequenz des NR2C Gens beibehalten wurde. Zusätzlich wurden noch Selektionsmarker in das Insert integriert. Noch undifferenzierte embryonale Stammzellen (ES) des Stamms 129/Sv wurden daraufhin mit dem modifizierten Gen mittels Elektrophorese transfiziert (Die Zellmembran der ES-Zellen wird durch einen angelegten Strom porös gemacht, so daß der Vektor in die Zelle gelangen kann). In der Zelle legt sich der Vektor dann (auch) an die homologe Stelle des Chromosoms und das Gen wird integriert). Nach der Selektion für homolog rekombinierte ES-Zellen wurden diese in C57/BL6-Blastozyten (3,5 Tage alte Embryos) injiziert und dann in scheinchwangere Weibchen verpflanzt. Heterozygote Mäuse wurden verpaart um homozygote Substitutionsmäuse zu erhalten, die überall dort im Körper, wo in Wildtypmäusen das NR2C Protein gebildet wird, nun das NR2B Protein bilden. Der Nachweis der erfolgreichen Gensubstitution in NR2C-2B Mäusen wurde mittels in situ Hybridisierungstechniken (mRNA Nachweis) und Western Blot Analysen (Protein Nachweis) erbracht (Pieri et al., 2003). Die NR2C-2B Substitutionsmäuse sind fruchtbar und die Geburtenrate homozygoter NR2C-2B Mäuse nach Verpaarung von heterozygoten Mäusen bewegt sich im Rahmen der zu erwartenden mendelschen Frequenz. NR2C-2B Mäuse weisen ungetrübte Augen und voll ausgebildete Vibrissen auf. Auch weist ihr Körperbau keine offensichtlichen Anomalien auf. Die Tiere zeigen normale Orientierungsreaktionen auf plötzliche

akustische Störreize hin. Andere Indikatoren des allgemeinen Gesundheitszustandes wie Körpergewicht, Fellzustand, und Hautfarbe deuteten auf eine gute Gesundheit hin. Der virale Status der Tiere nach FELASA wurde als unbedenklich eingestuft. Das Hirngewicht, wie auch die Größe der Gehirne der NR2C-2B Mäuse war relativ zu altersgepaarten Wildtypmäusen unverändert. Wir beobachteten keine offensichtlichen Missbildungen oder pathologische Veränderungen im Endhirn und Hirnstamm von NR2C-2B Mäusen.

## **2.2 Mögliche altersabhängige Effekte der NR2C-2B Gensubstitution**

Gene und die durch sie kodierten Proteine können sowohl am Aufbau des ZNS wie auch an der Erfüllung von Routinefunktionen dieses ZNS beteiligt sein. Auch ist anzunehmen, daß die Funktionen eines Gens bzw. eines Proteins für den Gesamtorganismus sich im Laufe der Ontogenese, regionspezifisch mit z.T. unterschiedlichen Zeitverläufen, verändert. Sowohl das NR2C Gen als auch das NR2B Gen weist während der Ontogenese Veränderungen in Hinblick auf seine regionale, zelluläre und subzelluläre Expression auf und ist damit auch sicherlich in distinkte Funktionssysteme eingebunden. Dieses zeitlich und hirnregional definierte Expressionsprogramm wird durch die Gensubstitution vermutlich gestört und zwingt den Gesamtorganismus sowohl auf genetischer- wie auch auf Verhaltensebene zu kompensatorischen Reaktionen. Die kompensatorischen Gegenregulationen auf genetischer Ebene sind sehr wahrscheinlich regionspezifisch und können transients Natur sein, u.U. aber auch chronisch vorherrschen. Da im Laufe der Ontogenese bestimmte Funktionen für den Organismus lebenswichtiger sind als andere, ist es möglich, daß diese Kompensationen einerseits eine Funktion aufrechterhalten können, eine andere aber beeinträchtigen oder qualitativ verändern. Deshalb ist es plausibel anzunehmen, daß die NR2C-2B Mäuse altersabhängige transiente Verhaltensaberrationen aufzeigen. Um die Effekte der NR2C-2B Gensubstitution auch in Interaktion mit postnatalen Reifungsprozessen des Gehirns einzuschätzen, wurden in der vorliegenden Arbeit neben adulten NR2C-2B Mäusen auch 3-5 Wochen alte NR2C-2B Substitutionsmäuse in Bezug auf ihr motorisches, emotionales und kognitives Verhalten untersucht.

## 2.3 Versuchstiere und Haltung

Die Tiere wurden bis zum Versuchsbeginn und während des Versuchs im Tierhaltungsraum (Sicherheitsstufe 1; gemäß dem Gesetz zur Regelung der Gentechnik vom 16. Dezember 1993; BGBl. I S. 2066) des Instituts für Physiologische Psychologie I der Universität Düsseldorf gehalten. Ihre Pflege und Betreuung oblag diesbezüglich geschulten Mitarbeitern des Instituts. Die Tiere wurden für den gesamten Versuchszeitraum in Einzelmakrolonkäfigen des Typs 1 auf unbehandeltem Weichholzgranulat als Einstreu untergebracht und täglich 1 Stunde nach Versuchsende gewogen. Es wurden nur Tiere getestet die keine auffälligen anatomischen Abnormitäten, Gewichtsverlust oder andere gesundheitliche Probleme aufwiesen. Die Versuchstiere waren einem biphasischen (12/12 Std.) Hell-Dunkel Zyklus unterworfen. Futter (Sniff, Spezialdiäten, Soest, Deutschland) und Wasser standen ad libitum zur Verfügung. Die Adaptationszeit an die Haltungsbedingungen im Experiment betrug sieben Tage. Die Raumtemperatur wurde über eine Klimaanlage reguliert und schwankte zwischen 20-24 °C. Alle Testabschnitte der Experimente wurden während der Hellperiode des 12 stündigen Hell- Dunkel- Zyklus zwischen 9.00 – 16.00 Uhr durchgeführt. Die in den Verhaltensversuchen verwendeten Tiere wurden nach den Verhaltensmessungen gemäß den Vorschriften des Tierschutzgesetzes (vom 25. Mai 1998; BGBl. I S. 1105) mittels zervikaler Dislokation getötet und ihre Gehirne neurochemisch untersucht. Die allgemeine Belastung der Tiere war als geringfügig bis mäßig einzustufen. Zur Stressreduktion wurden die Tiere vor dem Beginn der Verhaltensuntersuchungen und der Behandlungen ausreichend an die Hand des Versuchsleiters gewöhnt. Alle Verhaltensexperimente wurden vom Umweltamt der Bezirksregierung Düsseldorfs des Bundeslandes Nordrheinwestfalen legitimiert (Aktenzeichen: 23.05-230-3-88/00) und von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert (Geschäftszeichen: 306/24-1; Projektnummer: 3055). Die Versuche wurden im S1-Labor (Geb.: 23.12, Eb.: 00, R.: 42) und in den biochemischen Labors (Geb.: 23.12, Eb.: 00, R.: 44 und R.: 46) am Institut für Physiologische Psychologie I der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf durchgeführt.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Versuchstiere durchliefen mehrere Verhaltensexperimente. Gelegentlich wurde angemerkt, daß die Interpretierbarkeit von Verhaltensexperimenten, die unter Verwendung von experimentell vorexfahrenen

Tieren unter Umständen infolge von proaktiven Effekten nach vielfältiger experimenteller Stimulation, eingeschränkt ist (Holmes et al., 2001; Morato & Brandao, 1997). Andererseits ist aber auch gezeigt worden, daß Nagetiere die transient oder chronisch in einer angereicherten Lebensumwelt, mit vielfältiger Stimulation durch Objekte und Artgenossen gehalten wurden, weitaus bessere Lernleistungen aufweisen als solche unter Standardlaborhaltung (Nilsson et al., 1999; Paylor et al., 1992). Eine unzureichende Stimulation durch die Lebensumwelt interferiert offensichtlich mit der Ausbildung elementarer kognitiver Leistungen. Es ist auch gezeigt worden, daß NMDA-R nicht in die promnestischen Effekte einer angereicherten Lebensumwelt involviert sind (Rampon & Tsien, 2000). Im Falle der NR2C-2B Substitutionsmäuse haben wir somit bewusst gegen unsere Arbeitshypothese gearbeitet, wonach die NR2C-2B Substitutionsmäuse verbesserte Lern- und Gedächtnisleistungen aufweisen sollten, weil ein solcher Effekt sich trotz der Verwendung vielseitig stimulierter und damit kognitiv leistungsfähiger Kontrollmäuse einstellen müsste. Alle der in dieser Arbeit beschriebenen Verhaltens- und neurochemischen Tests für Mäuse werden am Institut für Physiologische Psychologie I routinemäßig angewendet und erforderten keine separaten Pilot- bzw. Validierungsstudien.

## **2.4 Statistische Auswertung und Darstellung der Versuchsdaten**

Zur graphischen und tabellarisch/numerischen Aufbereitung der Resultate wurden Mittelwerte und Standardfehler errechnet. Die Rohdaten wurden zunächst auf Normalverteilung, mittels des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests, geprüft. Inner- und Zwischengruppenvergleiche wurden mittels parametrischer Testverfahren durchgeführt. Zwischengruppenvergleiche über mehrere Meßpunkte wurden mit einfaktoriellen Varianzanalysen mit Meßwiederholung vorgenommen. Gruppenvergleiche für einzelne Meßpunkte wurden mit dem T-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Für Vergleiche abhängiger Daten wurde der T-Test für abhängige Stichproben genutzt. Zur statistischen Aufbereitung der Daten wurde das Datenverarbeitungsprogramm SPSS<sup>®</sup> in der Version 10.0 verwendet. Wenn nicht anders ausgewiesen (in Fällen in denen die sachdienliche Literatur keine gerichteten Hypothesen zuließ) sind die p-Werte (Wahrscheinlichkeits-Werte) zweiseitig zu lesen (sonst einseitig; für Verhaltensmessungen mit expliziten Hypothesen) und wurden in

allen Fällen als deskriptives Maß des Effekts zur Beschreibung der Ergebnisse herangezogen (Krauth, 1988; Winer, 1962). Darüber hinaus wurden, um die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Resultate, die progressiv mit der Anzahl der erhobenen Verhaltensparameter und der damit einhergehenden Anzahl der durchgeführten teststatistischen Vergleiche anwächst, weitestgehend zu minimieren, nur die validesten und reliabelsten Verhaltensparameter zur Beschreibung der Effekte der NR2C-2B Gensubstitution in der Maus in den einzelnen Paradigmen herangezogen und teststatistisch ausgewertet. Von einem bedeutsamen Effekt der NR2C-2B Genintervention wurde ausgegangen wenn p-Werte  $< 0.05$  gefunden wurden.

### **3. Darstellung der Experimente I-VI**

#### **3.1 Experiment I: Motorische Balancier- und Koordinationsfähigkeit auf dem Rotarod**

##### **3.1.1 Einleitung**

Eine koordinierte Bewegung setzt das Zusammenspiel einer Vielzahl von distalen Muskelgruppen voraus, die in einer exakten zeitlichen Abfolge und mit einem präzise regulierten Kraftaufwand rekrutiert werden müssen. Da beide Parameter (zeitliche Abfolge und Kraftentwicklung) bei sich ändernden Umweltbedingungen (z.B. unvorhergesehene Störreize, die bei der Programmierung der Bewegung nicht kalkulierbar waren) kontinuierlich adjustiert werden müssen, ist es notwendig über eine Monitorinstanz zu verfügen, die einen Vergleich zwischen intendierter Bewegung und tatsächlich erfolgter Bewegung vornimmt und im Falle einer Diskrepanz ein entsprechendes Korrektursignal an primäre und sekundäre motorische Areale des Neokortex ausgibt.

Das Zerebellum nimmt im Rahmen der Motorik und von Lernprozessen eine herausragende Stellung ein (Perrett et al., 1993). Die Funktionen an denen das Zerebellum partizipiert sind: a) die Ausbildung von klassisch konditionierten Reaktionen, b) die Programmierung von neuen motorischen Sequenzen, und c) die Überwachung des geordneten Ablaufs von bereits bestehenden motorischen Programmen.

Die Fähigkeit des Zerebellums zur zeitlichen Sequenzierung von sukzessiven Teilbewegungen, bzw. zur Zeitmessung, scheint in der besonderen anatomisch-räumlichen Organisation von spalierförmig aufgerichteten Purkinjezellendriten und den, zu diesen orthogonal verlaufenden, Parallelfasern begründet zu sein. Es wird angenommen, daß die Parallelfasern die Messstrecke definieren und, die zu diesen quergestellten, Dendritenbäume der Purkinjezellen, durch ihre exakt definierten Abstände, die zeitliche Abfolge der Hemmung der Kleinhirnkerne determinieren (Kistler et al., 2000; Meek, 1992; Perrette et al., 1993; Thier et al., 2000). Der Kletterfasereingang zu den Purkinjezellen aus der unteren Olive scheint für die Fehlererkennung, wie auch für die Adjustierung von motorischen Programmen bedeutsam zu sein (De Zeeuw et al., 1998; Yanagihara & Udo, 1994).

Wenngleich kürzlich eine Form von NMDA-R abhängiger LTP an der Synapse zwischen Moosfaseraxonterminalen und Körnerzellendriten erstmalig nachgewiesen wurde (Armano et al., 2000; D'Angelo et al., 1999), wird nichtsdestotrotz weiterhin LTD an der Synapse zwischen Parallelfasern und Purkinjezellen, hervorgerufen durch synchrone oder zeitlich eng aufeinanderfolgende Aktivierung von Kletterfaser- und Parallelfaserinputs zu den Purkinjezellen (heterosynaptische oder assoziative LTD), als das molekulare Korrelat von motorischen Lernprozessen angesehen (Ito, 1989). Diese LTD scheint aber nicht NMDA-R mediiert zu sein, weil Purkinjezellen offenbar keine NR2 Untereinheiten aufweisen, sondern ist vielmehr auf die Aktivierung von metabotropen Glutamatrezeptoren zurückzuführen (Levenes et al., 1998).

Im Laufe der Ontogenese wird im Kleinhirn ein einzigartiges Expressionsmuster von NMDA-R Untereinheiten beobachtet (Cathala et al., 2000; Monyer et al., 1994). Perinatal und während der ersten zwei Wochen postnatal exprimieren Körnerzellen im Zerebellum hauptsächlich die NR1 und die NR2B Untereinheit. Die NR2A Untereinheit ist pränatal abwesend und beginnt innerhalb der ersten Woche postnatal anzusteigen. Die NR2C Expression beginnt nach der zweiten Woche postnatal und erreicht gegen Ende des ersten Monats ein Plateau in Körnerzellen. Im selben Zeitraum verringert sich die NR2B Expression und wird nach der dritten Woche völlig eingestellt (Dingledine et al., 1999; Hatten, 1999; Hollmann & Heinemann, 1994).

In der adulten Maus finden sich in Körnerzellen also nur die NR1, NR2A und NR2C Untereinheiten, wobei di- und triheteromere Rezeptortypen möglich sind (Sircar et al., 1996; Zhong et al., 1995). Die NR2D Untereinheit ist nur im frühen Embryonalstadium relevant und perinatal schon nicht mehr detektierbar. Der zeitliche Verlauf dieser Ereigniskaskade (transiente Expression E14-P21 von NR2B und das Ersetzen der NR2B durch die NR2C Untereinheit bis zum Ende des ersten Lebensmonats) korrespondiert mit kritischen Reifungsprozessen des Kleinhirns: a) Körnerzellmigration, b) Auswachsen und adäquate Verzweigung der Purkinjezellendritenbäume, c) Ausbildung der synaptischen Verbindungen zwischen Körnerzellen und Purkinjezellen, d) Elimination überzähliger Kletterfaser-Purkinjezellsynapsen, und e) Veränderungen der biophysischen Charakteristika der NMDA-R (Farrant et al., 1994; Vallano et al., 1996). Die transiente Expression der NR2B Untereinheit und deren Ersetzen durch die NR2C Untereinheit scheint also für

die Entwicklung der anatomischen Grundverschaltung und der Mikroarchitektur des Zerebellums, wie auch der elektrophysiologischen und pharmakologischen Charakteristika der zerebellären NMDA-R und damit auch für die durch das Kleinhirn vermittelten motorischen Funktionen von Bedeutung zu sein.

Die Rolle einzelner NMDA-R Untereinheiten in Bezug auf die elektrophysiologischen Charakteristika der von ihnen gebildeten NMDA-Rezeptoren, ihre Funktionen in Verbindung mit anatomischen Reifungsprozessen des Kleinhirns, wie auch hinsichtlich ihrer Bedeutung für motorische Funktionen lassen sich potentiell mittels Geninterventionen in das Mausgenom, bei denen einzelne oder zwei dieser Untereinheiten inaktiviert wurden untersuchen. Allerdings ist es für einige Untereinheiten, wie z.B. NR1 und NR2B, zwingend den Gendefekt auf das Zerebellum zu beschränken, da ein Ganzkörperknockout zu perinataler Letalität führt (Forrest et al., 1994; Mori et al., 1998). Obgleich entsprechende Techniken für eine gewebsspezifische Geninaktivierung einzelner Gene bereits beschrieben wurden (Tsien et al., 1996), ist noch keine zerebellumspezifische NR2B-Knockout Maus generiert wurden. Bereits verfügbar sind NR2A, NR2C, und NR2A/2C-Doppelknockoutmäuse. Elektrophysiologische Untersuchungen der zerebellären NMDA-Rezeptorströme an NR2C defizienten Mäusen ergaben jedoch inkonsistente Resultate. Während Ebrasilide und Mitarbeiter, (1996) von höheren Rezeptorströmen berichten, (ein Befund der mit der Abwesenheit von NR1-NR2C diheteromeren Rezeptoren mit einer niedrigen Leitfähigkeit im Einklang stehen würde, weil nur NR1-NR2A Rezeptoren mit einer hohen Leitfähigkeit die gemessenen Ströme bedingen können), fanden Kadotani et al., (1996) eine Reduktion der maximalen EPSC-Amplitude. Auch fand man keine Anzeichen für eine Veränderung der morphologischen Mikrostruktur inklusive neuronaler Verschaltungen des Kleinhirns, weder in NR2A<sup>-/-</sup>, noch in NR2C<sup>-/-</sup>, und auch nicht in NR2A/2C<sup>-/-</sup> Mäusen (Kadotani et al., 1996). Bemerkenswerterweise fanden sich auch keine motorischen Koordinationsdefizite im Rotarodtest in NR2A<sup>-/-</sup> und NR2C<sup>-/-</sup> Mäusen. Lediglich NR2A/2C Doppelknockoutmäuse zeigten ein motorisches Defizit (Kadotani et al., 1996). Allerdings muß angemerkt werden, daß in diesen Experimenten ein nicht-akzellerierendes Rotarod benutzt wurde, mit einer Testdauer von nur einer Minute pro Durchgang, das zudem unter einer relativ niedrigen Rotationsgeschwindigkeit (20 und 25 RpM) genutzt wurde, so das eine kontinuierliche zeitliche Adjustierung der Abfolge der einzelnen motorischen Sequenzen, wie sie bei einem akzellerierenden

Rotarod notwendig ist, von den Tieren nicht vorgenommen werden mußte. Mit anderen Worten, die Aufgabe war für die Tiere relativ einfach zu meistern. Möglicherweise hätten die Autoren auch bei den NR2A<sup>-/-</sup> und NR2C<sup>-/-</sup> Mäusen ein Defizit detektieren können, wenn sie ein beschleunigendes Rotarod mit einer längeren Testdauer pro Durchgang genutzt hätten. Nichtsdestotrotz lässt sich festhalten, daß ein NR2A oder NR2C Defizit für sich genommen offenbar für die Ausreifung des Kleinhirns und für einfache motorische Koordinationsleistungen, die keine kontinuierliche Anpassung der motorischen Programme erfordern, entbehrlich ist. Nur eine vollständige Inaktivierung der NMDA-Rezeptorfunktion im Doppelknockout scheint ein motorisches Defizit hervorzurufen. Deshalb kann davon ausgegangen werden, daß NR2A und NR2C jeweils die Abwesenheit der anderen Untereinheit kompensieren können. Aus den oben angeführten Knockoutstudien läßt sich weiter folgern, daß die NR2B Untereinheit, nicht jedoch die NR2A und NR2C Untereinheiten, für die normale Entwicklung des Zerebellums kritisch ist. Durch in vitro Zelltransfektionsstudien ist bekannt, daß die NR2B Untereinheit dem NMDA-R, im Gegensatz zu der NR2C Untereinheit, eine höhere Ionenleitfähigkeit, vergrößerte erregende postsynaptische Potentiale (EPSP's), eine höhere Sensitivität für eine Mg<sup>2+</sup>-Blockade des Kanals und zusätzlich Bindungsstellen für Second Messenger gekoppelte Funktionsproteine, verleiht (Nakanishi et al., 1994).

Wenn nun, wie in der NR2C-2B Substitutionsmaus geschehen, die NR2B Untereinheit auch nach der dritten Woche noch in Körnerzellen des Zerebellums exprimiert wird, dann sollten sich auch entsprechende elektrophysiologische, morphologische, und motorische Aberrationen in diesen Mäusen einstellen. Folgerichtig fand man in zerebellären Hirnschnitten von NR2C-2B Substitutionsmäusen (zwischen P22-P25), im Vergleich zu den Wildtypmäusen, höhere maximale Amplituden erregender postsynaptischer NMDA-Rezeptor mediierter Ströme an der Moosfaser-Körnerzellensynapse, die durch Zugabe von CP101,606 einem selektiven NR2B-Antagonisten in das Perfusionsmedium wieder normalisiert werden konnten. Paradoxerweise wurde die Zerfallszeit der EPSP's in den NR2C-2B Hirnschnitten durch Kogabe von CP101,606 nicht, wie zu erwarten war, verkürzt (weil sowohl NR2B als auch NR2C Untereinheiten NMDA-R bilden die postsynaptisch längere EPSP Dauern aufweisen als solche die nur von NR1 und NR2A gebildet werden, so das bei CP101,606 Gabe nur diese Rezeptoren funktional wären und man demzufolge schnellere Zerfallsraten beobachten müßte), sondern, im

Gegenteil, stark verlängerte Zerfallsraten. Auch wurde gefunden das NR2C-2B Mäuse tendenziell kleinere AMPA-Rezeptorströme aufweisen. In Bezug auf die Morphologie des Zerebellums fand man für die NR2C-2B Mäuse (sowohl zwischen P10-P21, als auch bei 4 Monate alten Tieren) eine deutlich reduzierte Dicke der Molekularschicht des Zerebellums, in der sich die Dendritenbäume der Purkinjezellen befinden. Diese reduzierte Molekularschicht ging bei 4 Monate alten NR2C-2B Mäusen mit einer quantitativ schwächeren Verzweigung der Purkinjezellendriten einher, die zudem verlängert waren und einen größeren Bereich okkupierten als bei den Wildtypmäusen. Des weiteren war die mittlere Anzahl an exzitatorischen Synapsen reduziert und die Dornenfortsätze wiesen eine Mehrfachinnervation durch Parallelfaserterminale auf. Diese Fehlentwicklungen scheinen sich graduell-progressiv zu entwickeln und sind erst bei den adulten Mäusen abgeschlossen, da die Abnormitäten bei juvenilen Mäusen weitaus schwächer ausgeprägt waren. Folglich führte die über den 1. Monat postnatal andauernde NR2B Expression zu dramatischen Entwicklungsaberrationen in Bezug auf die räumliche Organisation und der Verschaltung der Purkinjezellen mit den Körnerzellen in adulten Mäusen. Da NMDA Rezeptoren, die die NR2B oder NR2A Untereinheit aufweisen, weitaus größere EPSP's induzieren als Rezeptoren, die die NR2C Untereinheit einschließen, ist vermutet worden, daß Körnerzellen die NR2A und zusätzlich NR2B, aber nicht mehr NR2C exprimieren, u.U. einer chronischen Übererregung ausgesetzt sind, die auf lange Sicht zu einer progressiven Degeneration dieser Körnerzellen führen müßte. Hirnschnitte von 4 Wochen alten NR2C-2B Substitutionsmäuse weisen noch eine normal ausgeprägte internale Körnerzellschicht auf. Nach 16 Wochen allerdings findet man, daß infolge eines kontinuierlichen Körnerzellverlusts diese Schicht reduziert ist. Der Körnerzellschwund wird bei adulten NR2C-2B Mäusen vermutlich verlangsamt, in dem kompensatorisch die Expressionsrate des NR2A Gens heruntergefahren wird. Diese verminderte NR2A Expression findet sich weder bei juvenilen NR2C-2B und Wildtypmäusen, noch bei adulten Wildtypmäusen (Pieri et al., 2003).

### **3.1.2 Fragestellungen**

Adulte NR2C-2B Substitutionsmäuse sollten, infolge der nachgewiesenen morphologischen und elektrophysiologischen Aberrationen im Kleinhirn, auf einer

akzellerierend rotierenden Walze motorische Balancierungs- und Koordinationsdefizite aufweisen.

Wenn Defizite gefunden werden, sind diese über mehrere Testtage stabil bzw. unabänderlich oder können anfängliche Defizite durch zusätzliches Training kompensiert werden?

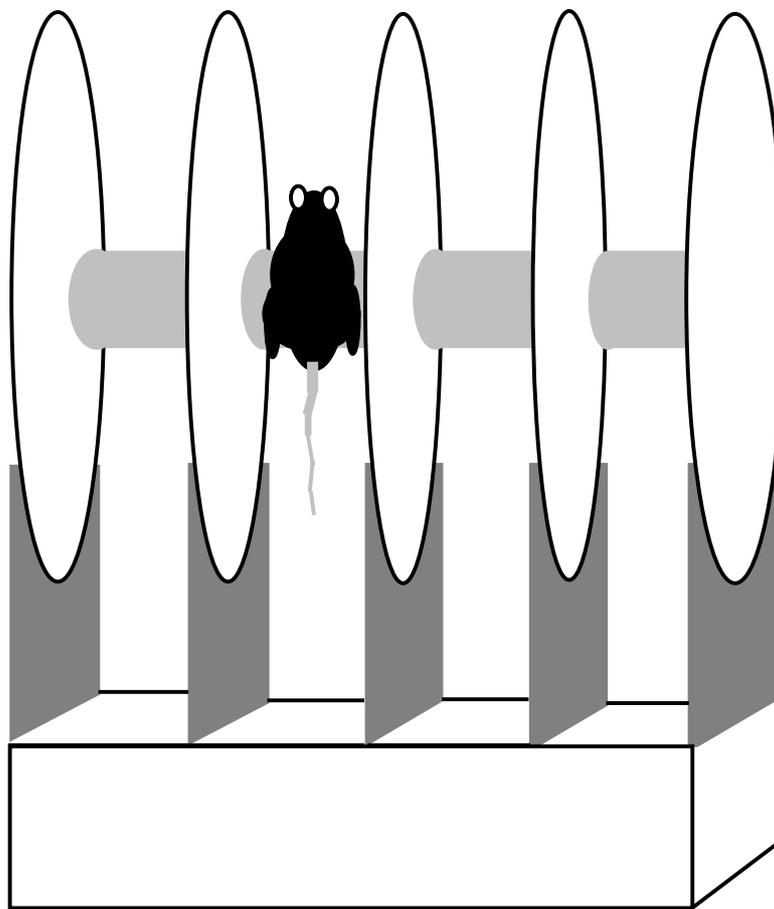
Wie wirkt sich die NR2C-2B Gensubstitution bei juvenilen Mäusen (die sich in der ontogenetisch vorgegebenen, und durch die Gensubstitution gestörten, dynamischen Phase der Reorganisation der Untereinheitskomposition der NMDA-Rezeptoren in Körnerzellen befinden) auf die motorische Balancier- und Koordinationsfähigkeit aus?

### **3.1.3 Versuchstiere**

Als Versuchstiere dienten männliche juvenile (MW:  $25,1 \pm 0,43$  Tage alte;  $n = 10$ ) und adulte (MW:  $15,57 \pm 0,22$  Wochen alte,  $n = 10$ ) NR2C-2B Gensubstitutionsmäuse, wie auch juvenile (MW:  $24,3 \pm 0,22$  Tage alte;  $n = 15$ ) und adulte (MW:  $15,9 \pm 0,04$  Wochen alte;  $n = 9$ ) Wildtypmäuse.

### **3.1.4 Rationale und Aufbau der Versuchsanordnung**

Das Rotarod (Schemazeichnung 1) ist eine von einem Motor angetriebene Walze (Durchmesser 2,5 cm), die mit geriffeltem Gummi beschichtet ist und um ihre Längsachse rotiert (Jones & Roberts, 1968).



Schemazeichnung 1: Schematische Darstellung der Rotarod-Apparatur. Erläuterungen im Text.

Über ein Zeitfenster von 5 Minuten wird die Walze kontinuierlich beschleunigt und erreicht ein Maximum von 40 Umdrehungen pro Minute (7650 TSE, Deutschland). Unterhalb der Walze, mit einem Abstand von 10 cm befinden sich Kontaktplättchen, mit denen sich das Herabfallen der Mäuse registrieren lässt, in dem ein Stromkreislauf unterbrochen wird, der die Latenzmessung, die auf einem digitalen Display angezeigt wird, beendet.

Das Rotarod wurde zur Messung der motorischen Balancier- und Koordinationsfähigkeit bei Nagetieren, u.a. in genetischen Studien genutzt und zeigt sich sensitiv für zerebelläre und extrapyramidalmotorische Läsionen (Dere et al., 2003b; Rozas & Labandeira-Garcia, 1997; Jones & Roberts, 1968; Sedelis et al., 2000; Sedelis et al., 2001). Anfänglich wurde in Experimenten zur Neurobiologie des motorischen Systems eine Apparatur genutzt, die nur konstante Rotationsgeschwindigkeiten hervorrufen konnte (5-40 RpM). Es hat sich aber herausgestellt, daß eine kontinuierlich beschleunigende Walze weitaus trennschärfer mißt, weil diese Aufgabe von Nagetieren schwieriger zu meistern ist. Beim beschleunigenden Rotarod sind die Tiere nicht nur genötigt ein motorisches Programm für eine konstante Rotationsgeschwindigkeit zu entwickeln, das dann ohne weitere Modifikation automatisiert genutzt werden kann, sondern sind vielmehr gezwungen, in diesem motorischen Programm kontinuierliche

Parameteradjustierungen vorzunehmen (z.B. Variation der zeitliche Abstände mit der einzelne motorischen Sequenzen eingeleitet werden und kontinuierliche Regulierung der Kraftentwicklung durch Rekrutierung von weiteren oder anderen Muskelgruppen bei Veränderungen der Rotationsgeschwindigkeit).

Bei Mehrfachtestung hat das Rotarod den Charakter einer aktiven Vermeidungsaufgabe, weil die Tiere solange, wie es ihnen möglich ist, entgegen der Rotationsachse der Walze laufen, bis die Rotationsgeschwindigkeit ihre motorischen Kapazitäten übersteigt und sie abgleiten. Somit läßt sich nicht ausschließen, daß der Grad der Empfänglichkeit für Stress bzw. Furcht die Leistung der Mäuse beeinflussen kann. Wir haben z.B. gefunden, daß die sehr schlechten Leistungen des 129/Sv Mausstamms auf dem Rotarod sehr wahrscheinlich auf einer reduzierten Furcht vor erhöhten Apparaturen basiert (Dere E, De Souza-Silva MA, Topic B, Haas HL, Huston JP, unpublizierte Beobachtungen). In der vorliegenden Arbeit wurde u.a. auch deshalb in Experiment II der Einfluß der NR2C-2B Gensubstitution auf angstkorreliertes Verhalten bestimmt. Die unter dem entsprechenden Abschnitt referierten Befunde legen jedoch nicht nahe, daß eine Interaktion zwischen veränderter Emotionalität und der Leistung im Rotarod bei NR2C-2B Mäusen vorliegt.

Bei naiven Kontrolltieren findet man i.d.R. eine Leistungssteigerung über mehrere Durchgänge bzw. Tage, so daß auch eine Lernkomponente im Test wirksam ist.

Obgleich eine mögliche Konfundierung der Rotarodmessung durch Lern- und Emotionalitätsprädispositionen der getesteten Tiere in diesem Paradigma nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann, ist das Rotarod nichtsdestotrotz gegenwärtig immer noch der aussagekräftigste, d.h. reliabelste und valideste, motorische Test (Sedelis et al., 2001).

### **3.1.5 Versuchsdurchführung**

Die Maus wurde auf die zunächst ruhende Walze gesetzt. Nach 5 Sekunden wurde die Walze aktiviert und über 5 Minuten kontinuierlich bis auf 40 Rotationen pro Minute beschleunigt. Der Test war beendet, nachdem das Tier von der Walze abglitten war oder wenn 5 Minuten verstrichen waren. Jede Maus erhielt 3 Durchgänge pro Tag an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit einem Inter-trial-Intervall von einer Minute.

### **3.1.6 Abhängige Variablen**

Gemessen wurde die Zeit bis zum Abgleiten von der rotierenden Walze. Tiere, die sich über die gesamte Beobachtungsdauer auf der Walze halten konnten, erhielten einen Höchstscore von 300 Sekunden.

### **3.1.7 Darstellung der Versuchsdaten und statistische Auswertung**

In Tabelle 1 im Anhang sind die Rohwerte beider Gruppen aufgelistet (juvenile und adulte NR2C-2B vs. juvenile und adulte WT Mäuse). Zur graphischen und statistischen Aufbereitung der Daten wurden Gruppenmittelwerte und Standardabweichungen für die insgesamt 9 Testdurchgänge errechnet. Der Kolmogorov-Smirnov Anpassungstest ergab, daß den Daten eine Normalverteilung zugrunde liegt (alle p-Werte  $> 0,1$ ). Zwischengruppenvergleiche über alle 9 Meßpunkte wurden mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit Meßwiederholung vorgenommen. Zwischengruppenvergleiche einzelner Meßpunkte wurden mit dem T-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Innergruppenvergleiche wurden mittels eines T-Tests für abhängige Stichproben vorgenommen. Die angegebenen p-Werte dienen als deskriptives Maß des Effekts und sind wenn nicht anders ausgewiesen zweiseitig zu lesen.

### **3.1.8 Ergebnisse**

#### **3.1.8.1 Juvenile NR2C-2B und Wildtypmäuse**

Die juvenilen NR2C-2B Substitutionsmäuse, wie auch die Kontrollmäuse hielten sich am letzten Durchgang 9 im Vergleich zum ersten Durchgang, länger auf der rotierenden Walze (NR2C-2B:  $p < 0,001$ ; WT:  $p < 0,001$ ; Abb. 1). Dieser Befund ist ein Hinweis auf das Vorliegen eines motorischen Lernprozesses, der es den Tieren ermöglichte sich auch bei höheren Rotationsgeschwindigkeiten auf der Walze zu halten.

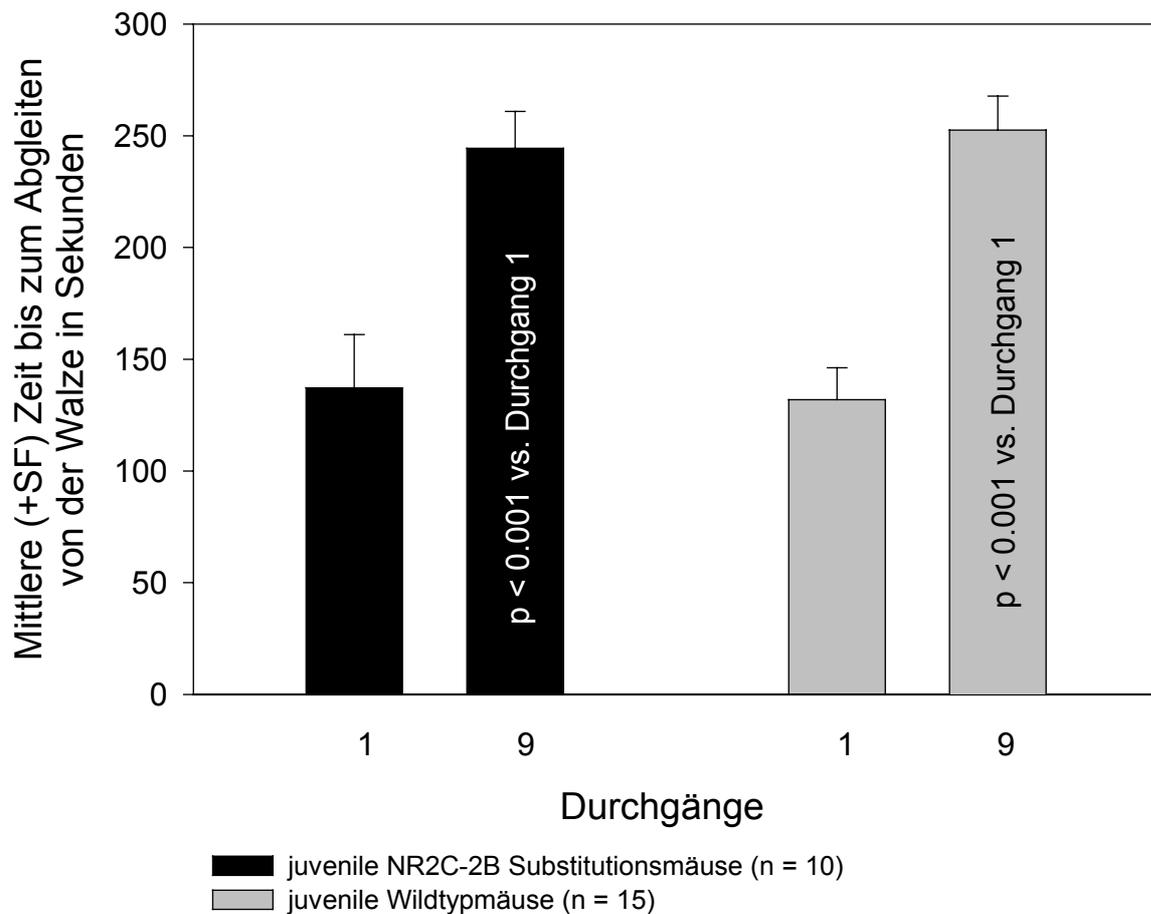


Abbildung 1: Rotarodlatenzen der juvenilen NR2C-2B und Wildtypmäuse während des ersten und letzten Durchgangs. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf Innergruppenvergleiche des ersten mit dem letzten Durchgang (T-Test für abhängige Stichproben).

Der Zwischengruppenvergleich der Zeit bis zum Abgleiten von der akzellerierenden Walze über die 9 Durchgänge zeigte allerdings keinen bedeutsamen Leistungsunterschied zwischen NR2C-2B und Wildtypmäusen [ $F_{(1,23)} = 0,019$ ;  $p = 0,890$ ; Abbildung 2].

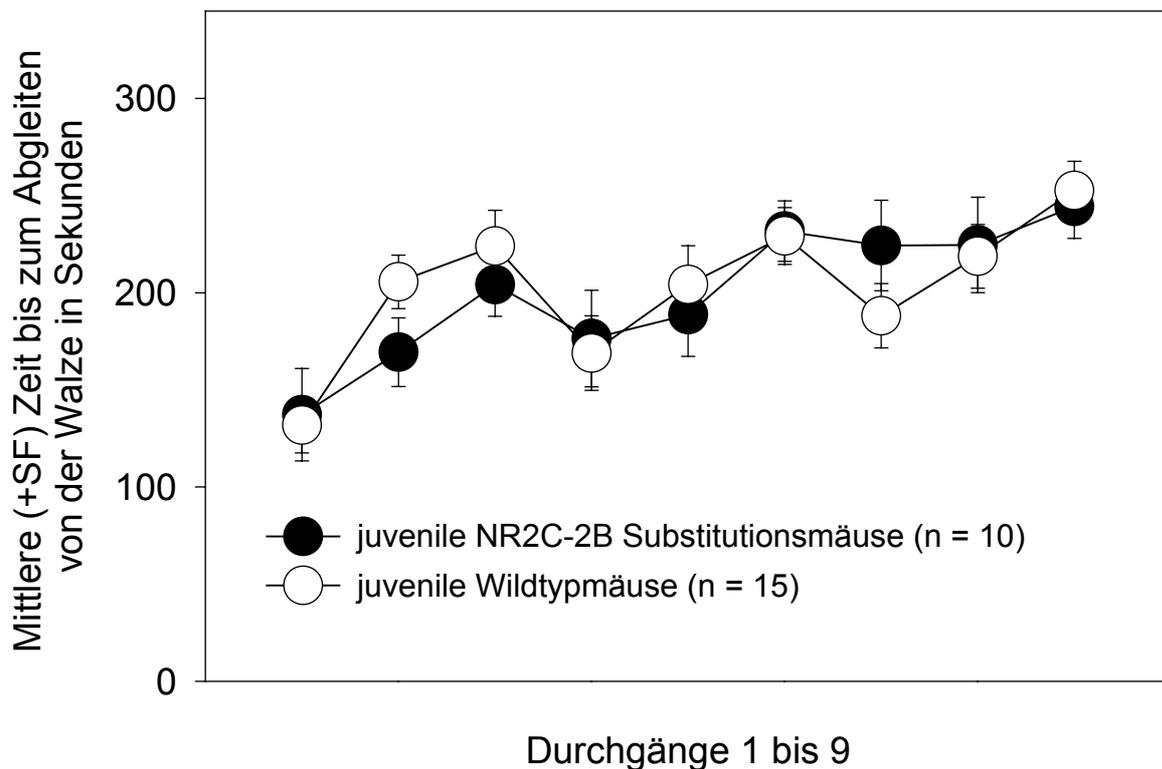


Abbildung 2: Zeit bis zum Abgleiten von der rotierenden Walze für juvenile NR2C-2B und Wildtypmäuse über die 9 Testdurchgänge.

Diese Ergebnisse suggerieren, dass die NR2C-2B Gensubstitution sich nicht auf die motorische Koordinationsfähigkeit von juvenilen Mäusen auf einem akzelerierenden Rotarod auswirkt. Allerdings lag das Leistungsniveau beider Gruppen deutlich unter dem von adulten Mäusen des Stamms C57BL/6, aber über dem des Mausstamms 129/Sv (unpublizierte Beobachtungen).

### 3.1.8.2 Adulte NR2C-2B und Wildtypmäuse

Während die adulten Wildtypmäuse eine asymptotische Leistungskurve aufwiesen, d.h. keine wesentliche Leistungssteigerung von Durchgang 1 auf Durchgang 9 aufzeigten ( $p = 0,339$ ; T-Test für abhängige Stichproben; Abbildung 3), fand sich für die adulten NR2C-2B Mäuse ein entsprechender Leistungszuwachs ( $p < 0,001$ ).

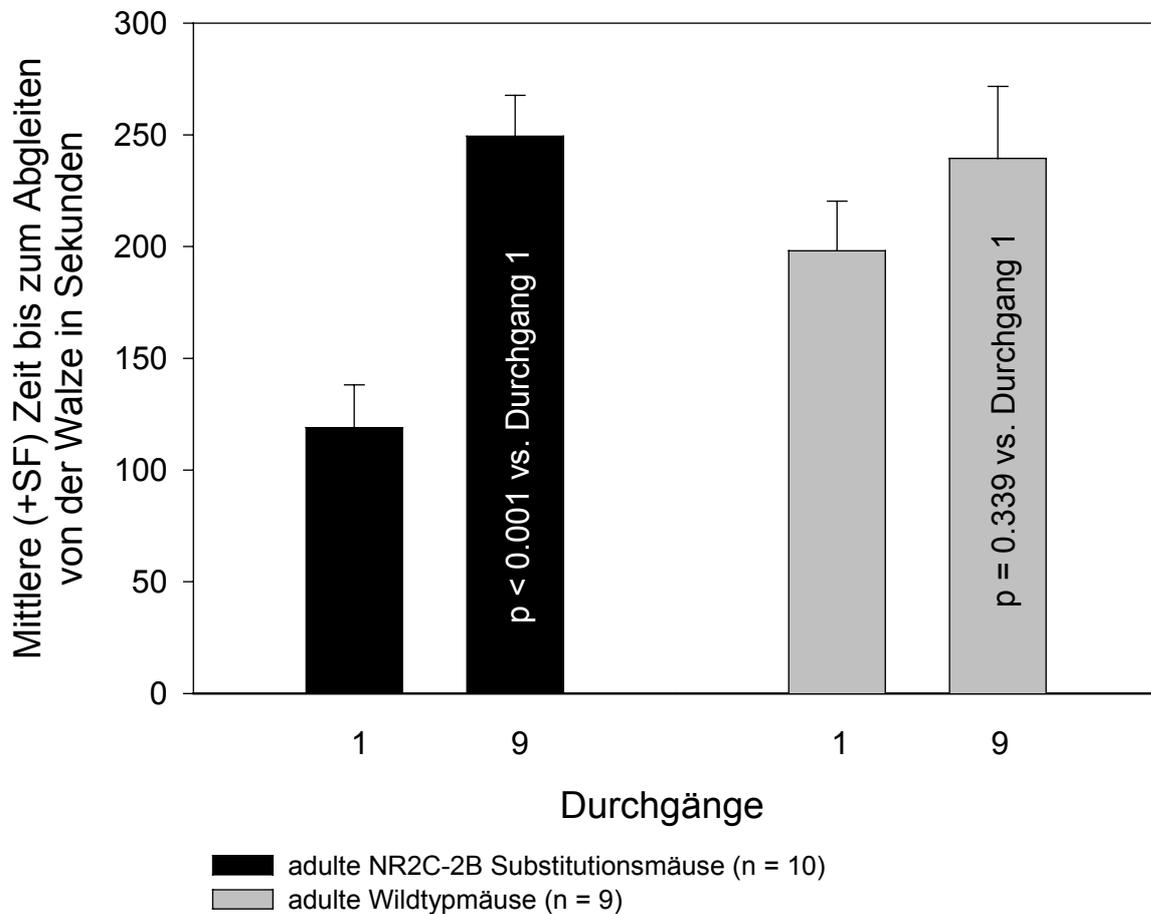


Abbildung 3: Rotarodlatenzen der adulten NR2C-2B und Wildtypmäuse während des ersten und letzten Durchgangs. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf Innergruppenvergleiche des ersten mit dem letzten Durchgang (T-Test für abhängige Stichproben).

Im Zwischengruppenvergleich über die 9 Testdurchgänge wiesen die adulten Substitutionsmäuse ein niedrigeres Leistungsniveau als die Kontrollmäuse auf [ $F_{(1,17)} = 5,999$ ;  $p = 0,013$ ; einseitige Testung; Abbildung 4].

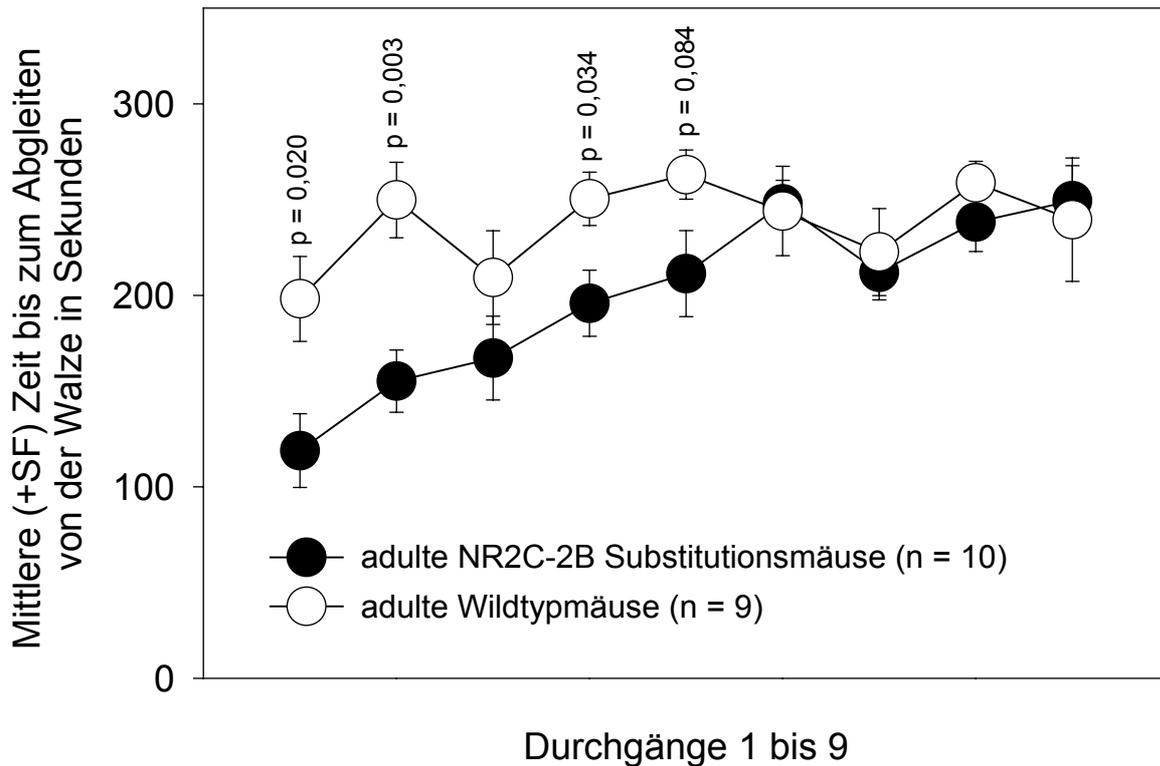


Abbildung 4: Zeit bis zum Abgleiten von der rotierenden Walze für adulte NR2C-2B und Wildtypmäuse über die 9 Testdurchgänge. P-Werte beziehen sich auf Zwischengruppenvergleiche für einzelne Durchgänge (T-Test für unabhängige Stichproben).

Diese verminderte motorische Koordinations- und Balancierfähigkeit der adulten NR2C-2B Mäuse manifestierte sich an den ersten beiden Durchgängen der Tage 1 und 2 (Durchgänge; 1:  $p = 0,020$ ; 2:  $0,003$ ; 3:  $p = 0,241$ ; 4:  $p = 0,034$ ; 5:  $p = 0,084$ ; 6:  $p = 0,893$ ; T-Test für unabhängige Stichproben), war aber an Tag 3 nicht mehr zu beobachten (Durchgänge; 7:  $p = 0,709$ ; 8:  $p = 0,333$ ; 9:  $p = 0,794$ ).

Bemerkenswerterweise war die Leistung der juvenilen Wildtypmäuse schlechter als die der adulten Wildtypmäuse [ $F_{(1,22)} = 6,333$ ;  $p = 0,020$ ; Abbildung 5], wogegen juvenile und adulte NR2C-2B Substitutionsmäuse über die 9 Testdurchgänge vergleichbare, d.h. gleich schlechte Leistungen aufwiesen [ $F_{(1,18)} = 0,001$ ;  $p = 0,979$ ; Abbildung 6].

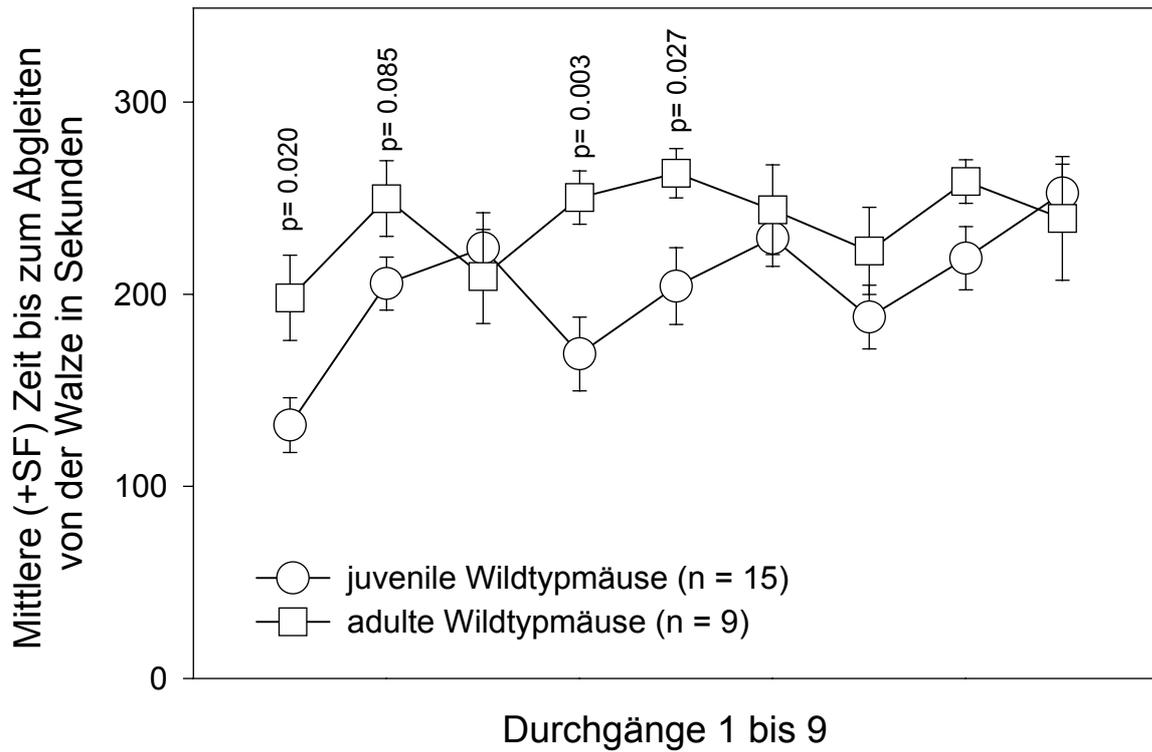


Abbildung 5: Zeit bis zum Abgleiten von der rotierenden Walze für juvenile und adulte Wildtypmäuse über die 9 Testdurchgänge. P-Werte beziehen sich auf Zwischengruppenvergleiche für einzelne Durchgänge (T-Test für unabhängige Stichproben).

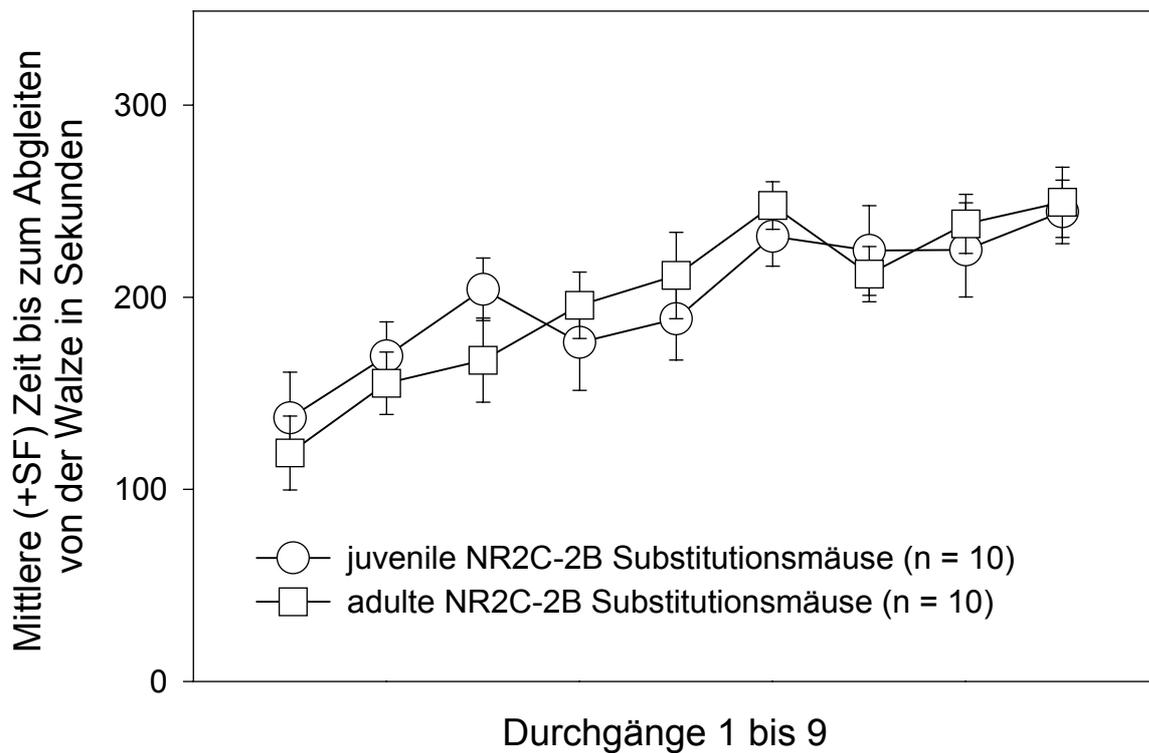


Abbildung 6: Zeit bis zum Abgleiten von der rotierenden Walze für juvenile und adulte NR2C-2B Substitutionsmäuse über die 9 Testdurchgänge. P-Werte beziehen sich auf Zwischengruppenvergleiche für einzelne Durchgänge (T-Test für unabhängige Stichproben).

Offenbar sind motorische Funktionen erst in adulten Wildtypmäusen voll ausgebildet. Dagegen scheinen grundlegende motorische Funktionen bei NR2C-2B Substitutionsmäusen sich, über den juvenilen Status hinaus, nicht mehr weiterzuentwickeln bzw. beginnen zu stagnieren. Andererseits entwickelt sich die Fähigkeit zur Adaptation bzw. zur motorischen Plastizität auch bei NR2C-2B Substitutionsmäusen offenbar normal und ist ausreichend, um initiale Defizite zu kompensieren.

Zusammenfassend lässt sich also folgern, daß adulte NR2C-2B Mäuse auf einer akzellerierenden Walze anfänglich (Tage 1 und 2) motorische Koordinationsschwierigkeiten aufweisen, diese jedoch durch weiteres Training kompensieren können und sich in ihrem finalen Leistungsniveau nicht mehr von den adulten Wildtypmäusen unterscheiden.

### 3.1.9 Diskussion

Die chronische Phase der NR2C-2B Gensubstitution geht in adulten Mäusen mit motorischen Defiziten einher, die in der dynamischen Phase der Reorganisation der NMDA-R Untereinheitenkomposition in Körnerzellen des Zerebellums, (bei der zwischen der zweiten und vierten Woche postnatal normalerweise NR2B durch NR2C ersetzt wird) nicht zu beobachten sind (juvenile NR2C-2B Mäuse). Die anfänglichen motorischen Defizite der adulten NR2C-2B Mäuse scheinen mit den mikroanatomischen Aberrationen im Kleinhirn dieser Tiere in Verbindung zu stehen. Diese Aberrationen setzten postnatal ein und finden ihre Vollendung um die 16. Lebenswoche. Zurückzuführen sind diese hirnanatomischen Fehlentwicklungen auf die kontinuierliche Expression der NR2B Untereinheit in Körnerzellen (siehe folgende Abschnitte). Die gefundenen neuroanatomischen Abnormitäten [a) Körnerzellschwund, b) reduzierte Verzweigung und abnorme Verlängerung der Purkinjezellendriten, die zudem eine räumliche Expansion aufweisen, c) reduzierte Synapsenzahl zwischen Parallelfasern und Purkinjedendriten und d) Mehrfachinnervation der Dornfortsätze der Purkinjezellen], sind durchaus geeignet die Zeitmesser- und Fehlerdetektionsfunktion des Kleinhirns zu beeinträchtigen, so daß motorische Programme nicht mehr koordiniert und in der intendierten Art und Weise ablaufen können (De Zeeuw et al., 1998; Kistler et al., 2000; Meek, 1992; Pieri et al., 2003; Thier et al., 2000). Die motorischen Defizite können nicht auf die erhöhte Erregbarkeit der NMDA-R an der Moosfaser-Körnerzellsynapse zurückgeführt werden, da diese bereits bei juvenilen NR2C-2B Mäusen (P22-P25) zu beobachten war und die keine motorische Beeinträchtigung aufzeigten. Die Übererregbarkeit dieser Rezeptoren hat jedoch vermutlich zu dem progressiven Körnerzellverlust, der sein Plateau erst in adulten NR2C-2B Tieren erreicht, beigetragen. Die für die adulten NR2C-2B Mäuse beschriebene Reduktion der Expressionsrate der NR2A Untereinheit scheint eine kompensatorische Reaktion auf die Überstimulierung der Körnerzellen zu sein, deren NMDA-R nur aus di- oder triheteromeren NR1, NR2A und NR2B zusammengesetzt sind, also Rezeptoren die hohe EPSP's hervorrufen. Es ist unwahrscheinlich, daß die Reduktion der NR2A Expression bei den NR2C-2B Mäusen für die gefundenen motorischen Defizite ursächlich ist. Diese Einschätzung ergibt sich aus Befunden, die zeigen, daß eine komplette Inaktivierung des NR2A Gens keinerlei neuroanatomische oder motorische Defizite nach sich zieht (Kadotani

et al., 1996). Auch kann die Abwesenheit der NR2C-Untereinheit in den adulten NR2C-2B Substitutionsmäusen die motorische Beeinträchtigung dieser Mäuse nicht erklären, weil auch der Knockout dieses Gens weder neuroanatomische Aberrationen noch motorische Defizite hervorruft (Kadotani et al., 1996). Einschränkend muß jedoch bemerkt werden, daß das in der Kadotani und Mitarbeiter, (1996) Studie benutzte Testprotokoll nicht optimal war (siehe Einleitung zu diesem Experiment). Die kontinuierliche Expression der NR2B Untereinheit in Körnerzellen des Zerebellums von adulten NR2C-2B Mäusen hat offenbar keinen Einfluß auf die Fähigkeit des motorischen Systems zur Plastizität bzw. auf motorisches Lernen zu haben, da die adulten NR2C-2B Mäuse nur anfänglich eine Leistungsschwäche aufzeigten, die jedoch über die 3 Tage immer schwächer wurde. Dieser Befund ist in Einklang mit der Hypothese, daß motorisches Lernen durch zeitnahe Aktivierung von Kletterfaser- und Parallelfasereingängen zu postsynaptischen Purkinjezellen erfolgt und an der Synapse zwischen Parallelfaser und Purkinjezelle eine synaptische Langzeitdepression induziert, die nicht durch NMDA-R mediiert wird, weil Purkinjezellen keine funktionalen NMDA-R bilden können (Levenes et al., 1998).

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß eine kontinuierliche NR2B Expression die Entwicklung des Kleinhirns stark beeinträchtigt und in letzter Konsequenz zu motorischen Defiziten im Rotarod-Test führt, aber motorisches Lernen nicht affektiert. Die anderen beiden NR2 Untereinheiten (NR2A und NR2C) scheinen weder für die postnatale Reifung des Kleinhirns, noch für motorische Koordinationsfähigkeit per se, oder motorisches Lernen unentbehrlich zu sein. Allerdings muß einschränkend die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß die motorischen Defizite der adulten NR2C-2B Mäuse, nicht ausschließlich durch die anatomischen Abnormitäten, infolge des Wegfalls der Herunterregulierung der NR2B Untereinheit, hervorgerufen wurden, sondern u.U. auch die Folge des Zusammenfallens der reduzierten NR2A Expression (die bei juvenilen NR2C-2B Mäusen nicht zu beobachten war) mit der NR2C-Geninaktivierung war und damit auch auf eine inadäquate Stimulation der Purkinjezellen zurückzuführen wäre (siehe Kadotani et al., 1996). Um diese Möglichkeiten auszuschließen, könnte man unter Nutzung des Cre-Recombinase-loxP-Tet-on bzw. Tet-off Systems (siehe Einleitung Abschnitt "induzierbare Gen-Knockouts") eine konditionale, möglicherweise gar körnerzellspezifische NR2C-2B Substitutionsmaus generieren, um zu zeigen, daß die motorischen Defizite

tatsächlich die Folge der anatomischen Abberationen im Zerebellum und nicht die Folge der Störung der NMDA-medierten Routine Neurotransmission, oder von progressivem Körnerzelltod durch Überstimulation sind. Man könnte dann konventionelle NR2C-2B Substitutionsmäuse mit Substitutionsmäusen (gleichen Alters) vergleichen, bei denen die Gensubstitution erst nach der 2. Woche, nach 3 Wochen und erst nach 4 Wochen (durch Zugabe bzw. Absetzen von Doxycyclidine ins Trinkwasser) induziert wurde, so daß man eventuell einen graduellen Effekt nachweisen und wirkliche korrelative Beziehungen zwischen Migrationsstatus, Körnerzellzahl, etc. und altersabhängiger motorischer Leistung herstellen kann.

## **3.2 Experiment II: Emotionales Verhalten der NR2C-2B Substitutionsmäuse im Elevated Plus-Maze**

### **3.2.1 Einleitung**

Die primäre aversiv-emotionale Reizverarbeitung und deren Übersetzung in adäquate Antworten auf endokrinologischer, vegetativer und Verhaltensebene wird von der Amygdala im Temporallappen mediert. Der basolaterale Nukleus der Amygdala ist die Haupteingangsschicht der Amygdala, und erhält afferent-sensorische Informationen von primären und sekundären sensorischen Kortexarealen und dem Thalamus (LeDoux, 2000; McDonald, 1998).

In einer kürzlich erschienenen Studie konnte eine NR2C mRNA Expression im basolateralen Nukleus der Amygdala nachgewiesen werden (Karst et al., 2002). Deshalb ist davon auszugehen, daß die NR2C-2B Gensubstitution sich auf intra-amygdaläre NMDA-R Verarbeitungsprozesse auswirkt und sich deshalb auch in verändertem emotionalen Verhalten der NR2C-2B Mäuse äußert.

Die Amygdala ist auch in die Ausbildung emotionaler Gedächtnisinhalte involviert. In intrazerebralen Mikroinfusionsstudien konnte gezeigt werden, daß die Blockade von NMDA-R mittels nicht untereinheitsselektiver NMDA-R Antagonisten im basolateralen Teil der Amygdala mit der Akquisition und Extinktion von Furchtkonditionierungsaufgaben interferiert (Davis et al., 1997). Hierbei fand man suppressive Effekte auf aversives Lernen, sowohl nach pre-trial wie auch post-trial Applikationen. An der genikulo-amygdalären und kortiko-amygdalären Synapse konnte eine NMDA-R mediierte synaptische Langzeitpotenzierung nachgewiesen werden (Clugnet & LeDoux, 1990). Diese und weitere Arbeiten führten zu der

Auffassung, daß NMDA-R im basolateralen Teil der Amygdala, die als eine Art Interface (Schnittstelle) bzw. Konvergenzpunkt für CS (zu konditionierende Stimuli) und UCS (unkonditionierte Stimuli) Informationen dient, als Koinzidenzdetektoren fungieren, die die Ausbildung von CS-UCS Assoziationen medieren (Falls et al., 1992; Miserendino et al., 1990; Trullas & Skolnick, 1990). Diese Funktion wird wahrscheinlich von NMDA-R mediert, die entweder die NR2A und oder die NR2B Untereinheit aufweisen, weil diese Untereinheiten im Gegensatz zu den NR2C und NR2D Untereinheiten dem NMDA-R diejenigen elektrophysiologischen Eigenschaften verleihen, die für eine Koinzidenzdetektion besonders geeignet sind (hohe Kanalleitfähigkeit für  $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen, starke  $\text{Mg}^{2+}$ -Sensitivität, Koppelung mit intrazellulären Second Messenger Systemen etc.; siehe Rodrigues et al., 2001) und zudem hauptsächlich an postsynaptischen Projektionsneuronen identifiziert wurden (siehe jedoch auch Szinyei et al., 2003), wogegen die NR2C und NR2D Untereinheiten auch vermehrt in zentralen (vermutlich) inhibitorischen, d.h. gabaergen Interneuronen, lokalisiert wurden. Die Involvierung der NR2B Untereinheit in die Mediierung von erlernter Furcht wurde kürzlich mittels des relativ selektiven NR2B-Antagonisten Ifenprodil bestätigt. Systemische Administration von Ifenprodil verschlechterte dosisabhängig die Akquisition einer Furchtkonditionierungsaufgabe bei der entweder ein Ton oder ein räumlicher Kontext als konditionierter Reiz diente, während eine Ifenprodilgabe (nach Konditionierung im unbehandelten Zustand) vor dem Test, die Expression der konditionierten Furchtreaktion nicht beeinflusste (Rodrigues et al., 2001). Gegenwärtig akkumulieren Befunde, wonach untereinheitsunspezifische NMDA-Antagonisten wie z.B. D-2-Amino-5-phosphopentanoische Säure (APV), nicht nur mit der Akquisition einer Furchtkonditionierungsaufgabe interferieren, also für synaptische Plastizität bzw. die Ausbildung von CS-UCS Assoziationen von Bedeutung sind, sondern auch die Expression von furchtkorrelierten Reaktionen blockieren (Maren et al., 1996; Lee & Kim, 1998; Lee et al., 2001), also darauf hindeuten, daß andere NMDA-R Typen, die eine weniger starke Spannungssensitivität aufweisen, wie z.B. NMDA-R die, die NR2C und oder NR2D Untereinheit aufweisen, an der Mediierung von unkonditionierter Ängstlichkeit beteiligt sind. Es konnte gezeigt werden, daß untereinheitsunspezifische NMDA-Antagonisten, in das periaqueduktale Grau appliziert, (Guimaraes et al., 1991) anxiolytische Effekte im Elevated Plus-Maze,

einem Test für unkonditionierte Ängstlichkeit, haben und das NMDA (Vasar et al., 1993) in diesem Test anxiogene Effekte entfaltet.

Die mögliche Involvierung distinkter NMDA-R Typen in Ängstlichkeitsprozesse wurde kürzlich auch durch elektrophysiologische Befunde gestärkt. Nicht näher spezifizierte NMDA-R am basolateralen Teil der Amygdala und des periaqueduktalen Grau scheinen an der Routineneurotransmission exzitatorischer Signale beteiligt zu sein, die lange Zeit nur AMPA-Rezeptoren zugeschrieben wurde (Weisskopf & LeDoux, 1999; Li et al., 1995; Fendt, 2001; Maren et al., 1996; Weisskopf & LeDoux, 1999).

Des Weiteren konnte mittels Zelltransfektionsstudien gezeigt werden, daß NR1-NR2C Rezeptoren im Gegensatz zu NR1-NR2A Rezeptoren keine unmittelbare Kanalaktivierung, nach einem intrazellulären Anstieg der  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen bzw. nach andauernder Stimulation durch Agonisten, aufweisen, und somit zeitlich überdauernd aktiv bleiben können, was darauf hindeutet, daß diese Rezeptoren, wenn sie an Prinzipalzellen der Amygdala lokalisiert sind, auch auf unkonditionierte zeitlich überdauernde Angstreize reagieren können (Vissel et al., 2002). Bei einer Furchtkonditionierung wird der CS i.d.R. nur für 500-1500 Millisekunden dargeboten und kann deshalb auch durch NR1-NR2A, NR1-NR2B oder triheteromere NR1-NR2A-NR2B Rezeptoren erfasst werden, wogegen unkonditionierte Angstreize, z.B. eine ungeschützte, weitflächige und hell erleuchtete Umgebung, über Stunden hinweg ängstliches Verhalten erzeugen können und somit zeitlich überdauernd registriert werden müssen. Ein Rezeptor der schnell desensitiviert kann diese Funktion möglicherweise nicht medieren. Es ist denkbar, daß NMDA-R des NR2A und oder NR2B Typs an postsynaptischen Projektionsneuronen des basolateralen Kerns der Amygdala für erlernte Furcht kritisch sind, wogegen NMDA-R des NR2C und oder NR2D Typs, die vermutlich sowohl an Prinzipalzellen als auch an gaberegeren Interneuronen lokalisiert sind, für die Mediierung von unkonditionierter Ängstlichkeit in Hirnstrukturen relevant sind, die dem sogenannten „Brain Defence System“ (Amygdala, BNST, medialer Hypothalamus, colliculi, periaqueduktales Grau etc. Fanselow, 1994) zugerechnet werden. Gegenwärtig läßt sich die Rolle einzelner NMDA-R Untereinheiten auf das Angstsubstrat des Gehirns nur schwierig pharmakologisch untersuchen, weil nur wenige untereinheitsselektive NMDA-R Antagonisten verfügbar sind. Für die NR2C und die NR2D Untereinheit ist bislang noch kein spezifischer Antagonist verfügbar. Ein relativ selektiver NR2B Antagonist ist Ifenprodil. Ifenprodil wurde von Gotti und Mitarbeitern (1988), entwickelt und hat

eine 140-fache höhere Affinität für NMDA-R, die die NR2B Untereinheit aufweisen, als für solche NMDA-R, die nur die NR2A Untereinheit aufweisen, und scheint deshalb geeignet um NMDA-R des Typs NR1-NR2B und möglicherweise auch di- und tri-heteromere NMDA-Rezeptoren, die die NR2B Untereinheit aufweisen zu blockieren (Chenard & Menniti, 1999). Einschränkend muß jedoch auch bemerkt werden das Ifenprodil bei höheren Dosierungen (> 10 mg/kg) auch eine Wirkung an 5-HT<sub>3</sub> und  $\alpha$ 1 Adrenorezeptoren entfaltet (Daniell, 1992; Gotti et al., 1988; McCool & Lovinger, 1995). Ifenprodil ist ein Phenylethanolaminderivat, dessen inhibitorische Wirkung auf den NMDA-R die Folge einer allosterischen Modulation des Rezeptormolekülkomplexes ist. Der Rezeptor vollzieht eine Untereinheitskonformationsänderung, die den Durchmesser des Ionenkanals verringert, ohne das der Ionenkanal vollständig blockiert oder die Dauer/Frequenz des geschlossenen Zustandes des Kanals verlängert wird (Legendre & Westbrook, 1991). [Randbemerkung: Wenn ein Ligand an die entsprechende Bindungsstelle eines Rezeptors anbindet kommt es zu einer Konformationsänderung am Rezeptormolekülkomplex und der Ionenkanal öffnet sich, bzw. der Durchmesser der Pore wird verbreitert, bleibt jedoch nicht dauernd offen sondern oszilliert zwischen offen und geschlossen Zuständen, solange der Ligand angebunden bleibt. Auch die Öffnungsdauer variiert in einem vorgegebenen Rahmen. Wann ein Kanal öffnet, unterliegt stochastischen Gesetzen. Neben der Bindungsstelle für den Liganden weisen ionotrope Rezeptoren häufig noch zusätzliche Bindungsstellen für modulatorisch wirkende Substanzen, d.h. Substanzen die für sich genommen keine Kanalöffnung hervorrufen. Diese modulatorisch wirkenden Substanzen können aber bei gleichzeitiger Anbindung des Liganden, die Öffnungsfrequenz und/oder Dauer erhöhen oder erniedrigen.]

Ifenprodil hat offenbar auch eine höhere Affinität bzw. Bindungsneigung an den NMDA-R, wenn dieser zuvor aktiviert wurde, als wenn er sich im Ruhezustand befindet (Kew et al., 1996). Bislang wurde der Effekt von Ifenprodil auf unkonditionierte Ängstlichkeit nur in drei Studien untersucht. Fraser und Mitarbeiter, (1996) berichten, das Mäuse, denen Ifenprodil i.P. appliziert wurde, im Elevated Plus-Maze die angstbesetzten offenen Arme weniger stark meiden als solche Mäuse, denen eine physiologische Kochsalzlösung injiziert wurde. Allerdings wurde auch gefunden, daß Ifenprodil zu erhöhter lokomotorischer Aktivität führt und es wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, daß Ifenprodil die Freisetzung von Purinen, die an

Adenosinrezeptoren binden, fördert. In einem hell-dunkel Explorationstest dagegen hatte Ifenprodil bei einem breiten Spektrum an Dosierungen (2.5-20 mg/kg) keinen Effekt auf das Angstverhalten von Mäusen (Sanger & Joly, 1991). In einem modifizierten Elevated Plus-Maze Test, der auch unspezifische Effekte einer gegebenen Substanz auf Sensorik und Motorik nachweisen kann (Dere et al., 2002b) hatte systemische Ifenprodilgabe (1-, 3-, und 5-mg/kg) sensorische Beeinträchtigungen zufolge, wirkte sich aber nicht auf unkonditionierte Ängstlichkeit oder lokomotorische Aktivität aus (Dere et al., 2003a). Damit scheint es relativ unwahrscheinlich, daß NMDA-R, die die NR2B Untereinheit aufweisen, in die Mediiierung von unkonditionierter Ängstlichkeit involviert sind.

Dextromethorphan (DM) hat eine höhere Affinität für rekombinante NR1b-NR2C Rezeptoren als für rekombinante NR1b-NR2A und NR1b-NR2B Rezeptoren (Monaghan & Larsen, 1997). Weil in der Vergangenheit häufig davon ausgegangen wurde, daß die NR2C und NR2D Untereinheiten im adulten Vorderhirn nur in vernachlässigbaren Mengen exprimiert werden, wurde DM primär als ein relativ schwacher NR2A-antagonist angesehen, weil DM auch eine höhere Affinität für NR1-NR2A als NR1-NR2B Rezeptoren hat (Kew et al., 1996). Nachdem es nun als gesichert gilt, daß auch das NR2C Protein im adulten Vorderhirn, wenngleich in geringeren Konzentrationen als die NR2A Untereinheit, durchaus exprimiert wird, könnte DM als ein pharmakologisches Werkzeug dienen, um die Involvierung der NR2C Untereinheit in unkonditionierte Ängstlichkeitsprozesse zu untersuchen. Allerdings bindet DM in hohen Konzentrationen (> 40 mg/kg) auch an  $\delta$ 1-Rezeptoren (Chou et al., 1999). DM wurde noch nicht an Nagetieren im konventionellen Elevated Plus-Maze getestet. In einer hell-dunkel Explorationsaufgabe hatte DM über ein Spektrum von 5-40-mg/kg keinen Effekt auf angstkorreliertes Verhalten (Sanger and Joly, 1991). Wir haben allerdings zeigen können, das niedrige, systemisch verabreichte, Dosierungen von DM anxiolytisch (10-mg/kg) und höhere Dosierungen (30-mg/kg) anxiogen, in einem modifizierten Elevated Plus-Maze, wirken (Dere et al., 2003a), möglicherweise auch durch die Blockade von NMDA-R, die die NR2C Untereinheit aufweisen. Die Rolle der NR2 Untereinheiten im Rahmen unkonditionierter Ängstlichkeit könnte mittlerweile anhand von bereits verfügbaren Mausmutanten näher spezifiziert werden, weil NR2A-, NR2C-, NR2A/2C-, und NR2D-Knockoutmäuse, wie auch NR2B und NR2D Überexprimierungsmäuse bereits verfügbar sind. Allerdings wurden bislang nur NR2D Knockoutmäuse in Bezug auf

Ängstlichkeit untersucht. Bemerkenswerterweise sind adulte NR2D<sup>-/-</sup> Mäuse weniger ängstlich im Elevated Plus-Maze und dem hell-dunkel Test (Miyamoto et al., 2002), wogegen juvenile NR2D<sup>-/-</sup> Mäuse normale Ängstlichkeitsreaktionen aufweisen (Ikeda et al., 1995). Die bisher referierten Befunde legen die Annahme nahe, daß eine NR2C-NR2B Gensubstitution sich auf unkonditionierte Ängstlichkeit auswirken könnte, möglicherweise bedingt durch einen Mangel an NR2C enthaltenden NMDA-R in Hirnregionen, die dem Brain defence system zugesprochen werden. Möglicherweise finden sich auch, wie bei den NR2D<sup>-/-</sup> Mäusen, altersabhängige Effekte, weil die NR2C Untereinheit in Vorderhirnstrukturen im Laufe der Hirnentwicklung herunterreguliert wird.

### **3.2.2 Fragestellungen**

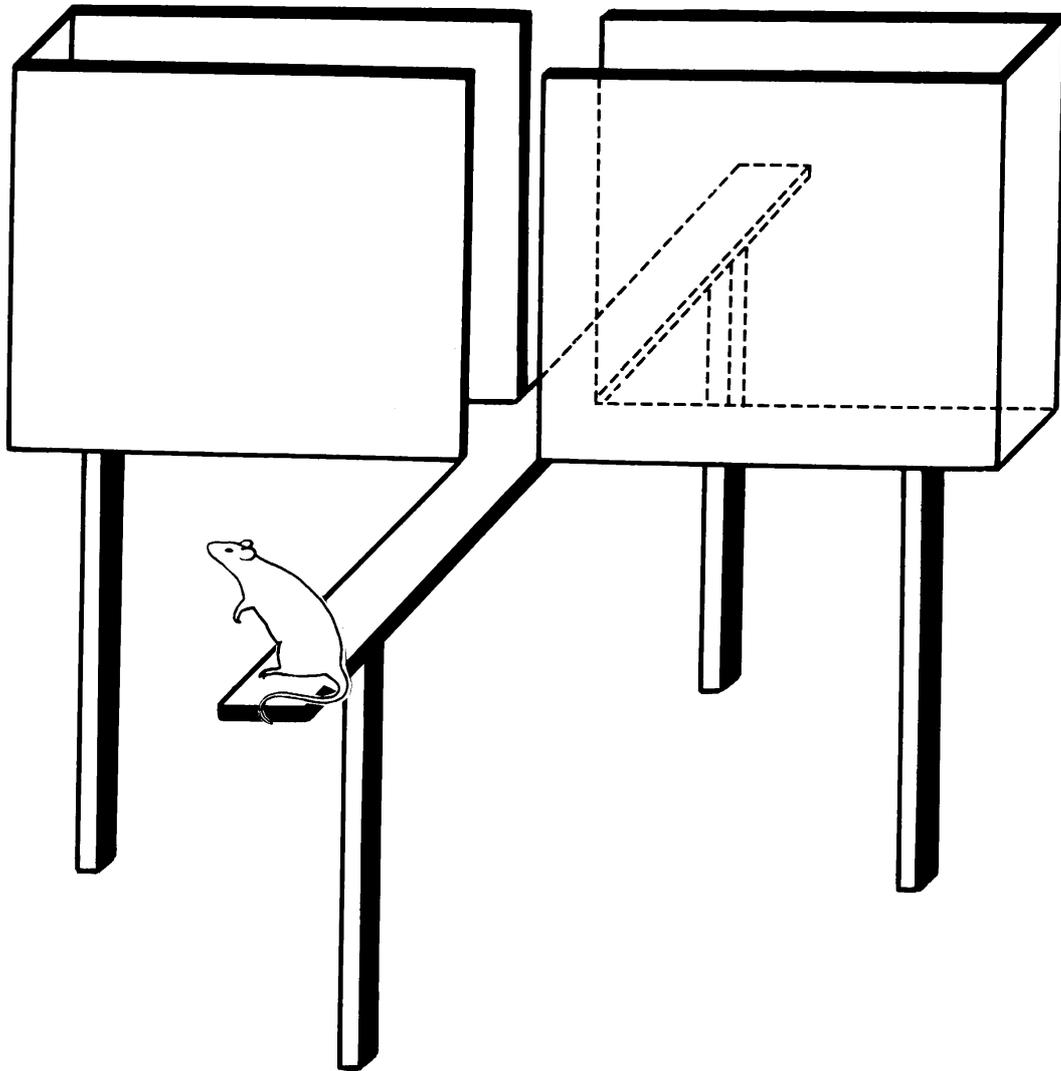
Wie wirkt sich die NR2C-2B Gensubstitution auf unkonditionierte Ängstlichkeit aus? Variiert die durch die NR2C-2B Gensubstitution u.U. induzierte Änderung emotionalen Verhaltens zwischen juvenilen und adulten Mäusen?

### **3.2.3 Versuchstiere**

Als Versuchstiere dienten männliche junge (MW: 34,1 ± 0,43 Tage alte; n = 10) und adulte (MW: 10,43 ± 0,22 Wochen alte; n = 10) NR2C-2B Gensubstitutionsmäuse, wie auch junge (MW: 33,3 ± 0,22 Tage alte; n = 15) und adulte (MW: 10,75 ± 0,04 Wochen alte; n = 9) Wildtypmäuse.

### **3.2.4 Rationale und Aufbau der Versuchsanordnung**

Das "Elevated Plus-Maze" (EPM) (Schemazeichnung 2) wird zur Untersuchung anxiolytischer oder anxiogener Effekte nach verschiedensten Interventionen in das Angstsubstrat des Gehirns verwendet (Cruz et al., 1994).



Schemazeichnung 2: Schematische Darstellung der Elevated Plus-Maze Apparatur. Erläuterungen im Text.

Das EPM besteht aus zwei unbewandeten und zwei an den Seiten durch Begrenzungswände geschützten Armen, die in Form eines Kreuzgangs angeordnet sind. Die Apparatur steht auf einem Sockel etwa einen halben Meter über dem Boden. Das Verhaltensmodell beruht auf einer natürlichen unkonditionierten Aversion der Versuchstiere in Bezug auf erhöhte, offene, relativ stark erleuchtete und ungeschützte Bereiche. Mäuse, die das EPM explorieren, verbringen die meiste Zeit in den bewandeten Armen und meiden die offenen bzw. nicht bewandeten Arme.

Man nimmt an, daß die Tendenz die offenen Arme zu meiden eine natürliche Furcht vor der Höhe der offenen Arme bzw. der „visuellen Klippe“ reflektiert; mögliche Alternativerklärungen wären auch z.B. der Mangel an thigmotaxischen Reizen auf den offenen Armen. Nagetiere neigen nämlich dazu, ihre Umgebung durch das Abtasten mit den Vibrissen zu erkunden. Auch ist es möglich, daß der Leuchtdichtengradient, der zwischen den bewandeten und offenen Armen vorherrscht, die charakteristische Verteilung der Aufenthaltszeiten und Eintritte zu Gunsten der bewandeten Arme hervorruft.

Werden die Tiere auf den offenen Armen eingeschlossen, so beobachtet man eine Reihe von angstkorrelierten Verhaltensweisen und angstkorrelierte physiologische Reaktionen, wie z.B. erstarrtes Stillsitzen (engl. Freezing, vergleichbar einer Angstparalyse beim Menschen), Defäkation, Urination, erhöhte Herzschlagraten und erhöhte Kortikosteroid-Konzentrationen im Blutplasma. Diese Reaktionen sind bei weitem weniger stark ausgeprägt, wenn die Tiere auf den bewandeten Armen eingeschlossen werden. Wird ein Tier in das EPM gesetzt (typischerweise in den Kreuzungspunkt der vier Arme), so orientiert es sich tendenziell eher zu einem der bewandeten Arme. Diese natürliche Tendenz kann durch die Gabe von Anxolytika (z.B. Diazepam) bzw. GABA-R Agonisten bei Mäusen abgeschwächt werden (Lister, 1987). Das EPM-Paradigma besitzt gegenüber anderen Paradigmen eine Reihe von Vorzügen. Es ist relativ einfach durchzuführen, basiert auf spontanen Verhaltensweisen, erfordert weder Training noch aversive Stimulationen, z.B. die Applikation eines Fußschocks, und es ist möglich, sowohl anxiolytische als auch anxiogene Effekte von experimentellen Interventionen zu identifizieren. Auch weist es eine hinreichende Retest-Reliabilität für mindestens zwei Testdurchgänge auf (Pellow et al., 1985, siehe jedoch auch File et al., 1993). Anxiolytisch wirkende Drogen (z.B. Benzodiazepine) erhöhen die Aufenthaltszeit auf den offenen Armen und vermindern die Häufigkeit anderer Indikatoren von Angst, wie Defäkation oder erstarrtes Stillsitzen ("Freezing") (File et al., 1993 ; Pellow et al., 1985). Eine Verringerung der Eintritte in die offenen Arme und der Aufenthaltszeit in den offenen Armen ist dagegen ein Hinweis auf eine anxiogene Wirkung der Substanz.

(Zur Definition von Angst und Furcht: Angst ist eine emotionale Reaktion begleitet von Reaktionen auf Verhaltens- und physiologischer Ebene, die von Umweltreizen ausgelöst wird, die ihre Fähigkeit Angst auszulösen nicht erst durch Lernprozesse, d.h. der Paarung mit einem aversiven Reiz, z.B. einem Fußschock erwerben müssen. Eine Extinktion der Angstreaktion durch wiederholte Darbietung der angstauslösenden Reize kann nicht induziert werden. Furcht ist hingegen eine emotionale Reaktion, begleitet von Reaktionen auf Verhaltens- und physiologischer Ebene, die von Umweltreizen ausgelöst wird, die ihre Fähigkeit Furcht auszulösen erst durch Lernprozesse, d.h. wiederholte oder einmalige Paarung mit unkonditionierten aversiven Reizen, erwerben müssen. Furcht kann im Gegensatz zu Angst durch gegenläufige Erfahrungen, z.B. das der konditionierte Reiz nicht mehr von aversiven Konsequenzen gefolgt wird, auch wieder abgeschwächt werden. Beispielsweise löst ein Lichtreiz per se keine Furcht aus, sondern erst nachdem er kontingent von einem aversiven Reiz, z.B. einem Fußschock, gefolgt wurde, wohingegen hohe Beleuchtungsintensitäten oder große offene Ebenen bei Nagetieren auch bei der ersten Darbietung schon Angst auslösen).

Das EPM (Material: graues PVC) bestand aus zwei offenen (29 x 5 cm), d.h. ohne seitliche Begrenzungswände und 2 bewandeten Armen (29 x 5 x 15 cm) die in Form eines “+” angeordnet waren und von einer zentralen Plattform (5 x 5 cm) ausstrahlten. Das Maze war auf einem 40 cm hohen Sockel angebracht. Diffuse Beleuchtung mit weißem Licht erzeugte eine Beleuchtungsstärke von ca. 0,3 Lux im Zentrum des Plus-Maze. Eine Klimaanlage generierte ein konstantes Rauschen von ca. 25 dB/SPL zur Maskierung von akustischen Störreizen (Lister, 1987).

### **3.2.5 Versuchsdurchführung**

Die Mäuse wurden auf die zentrale Plattform, mit dem Kopf in Richtung eines geschlossenen Arms zeigend, eingesetzt und für 5 Minuten beobachtet. Nach jedem Durchgang wurden Fäkalboli entfernt und die Apparatur wurde mit 0,1 % Essigwasser ausgewischt und getrocknet um olfaktorische Reize (Scent-Marking) zu maskieren.

### **3.2.6 Abhängige Variablen**

Gemessen wurde die Anzahl der Eintritte und die Aufenthaltszeit (in Sekunden) in den offenen und bewandeten Armen. Ein Eintritt wurde gewertet, wenn das Tier mit allen 4 Pfoten die Schwelle eines Armes überschritten hat.

### **3.2.7 Darstellung der Versuchsdaten und statistische Auswertung**

In Tabelle 2 im Anhang sind die Rohwerte der 4 Gruppen aufgelistet. Zur graphischen Aufbereitung der Daten wurden Mittelwerte und Standardfehler für die 4 Gruppen errechnet. Der Kolmogorov-Smirnov Anpassungstest auf Normalverteilung (alle p-Werte > 0,1) rechtfertigte eine parametrische Teststatistik. Die angegebenen p-Werte dienen als deskriptives Maß des Effekts und sind in allen Fällen zweiseitig zu lesen. Gruppenvergleiche unabhängiger Daten wurden mit dem T-Test für unabhängige Stichproben, Vergleiche abhängiger Daten wurden mit dem T-Test für abhängige Stichproben durchgeführt.

### **3.2.8 Ergebnisse**

#### **3.2.8.1 Juvenile NR2C-2B und Wildtypmäuse**

Erwartungsgemäß wurden die offenen Arme von den Mäusen gemieden und die bewandeten Arme präferiert. Die Mäuse beider Gruppen frequentierten die bewandeten Arme häufiger (NR2C-2B:  $p < 0,001$ ; WT:  $p = 0,001$ ; T-Test für abhängige Stichproben; Abbildung 7) und verweilten dort länger (NR2C-2B:  $p < 0,001$ ; WT:  $p < 0,001$ ; Abbildung 8) als auf den offenen Armen. Die NR2C-2B Mäuse hielten sich für eine kürzere Zeit auf den offenen Armen auf als die Kontrolltiere ( $p = 0,030$ ; T-Test für unabhängige Stichproben), bei zwischen den Gruppen vergleichbarer Anzahl der Eintritte in diese Arme ( $p = 0,382$ ).

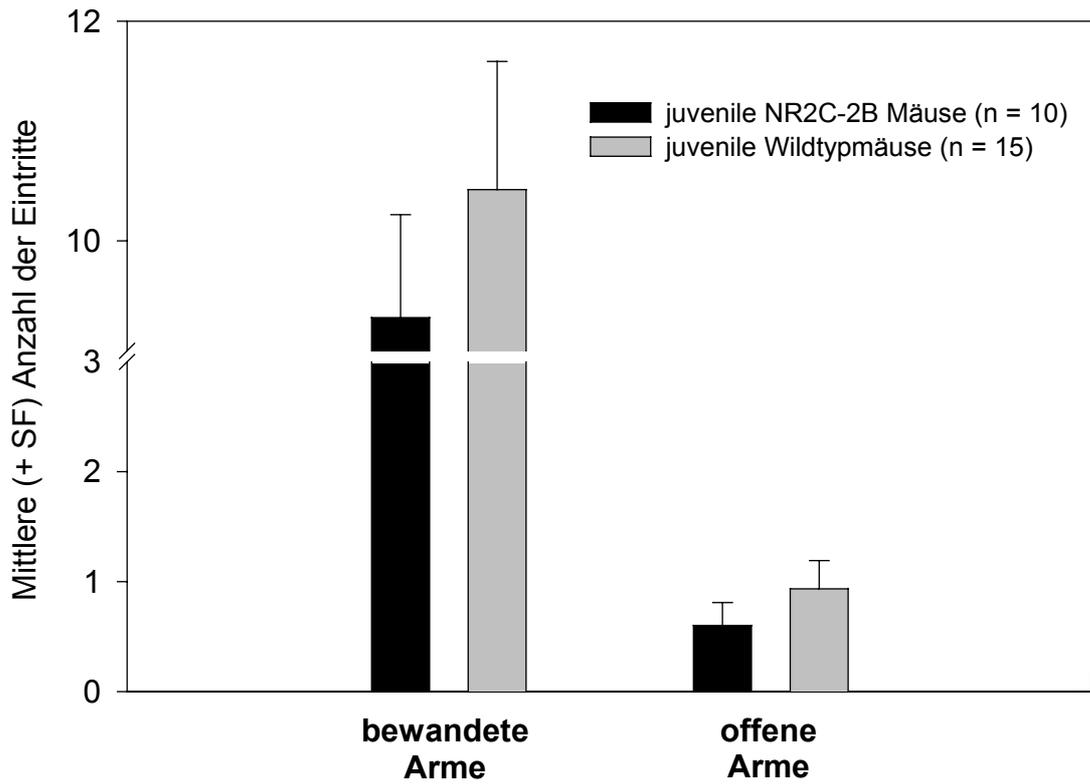


Abbildung 7: Anzahl der Eintritte auf die offenen und bewandeten Arme des Elevated Plus-Maze für juvenile NR2C-2B Substitutionsmäuse und Wildtypmäuse.

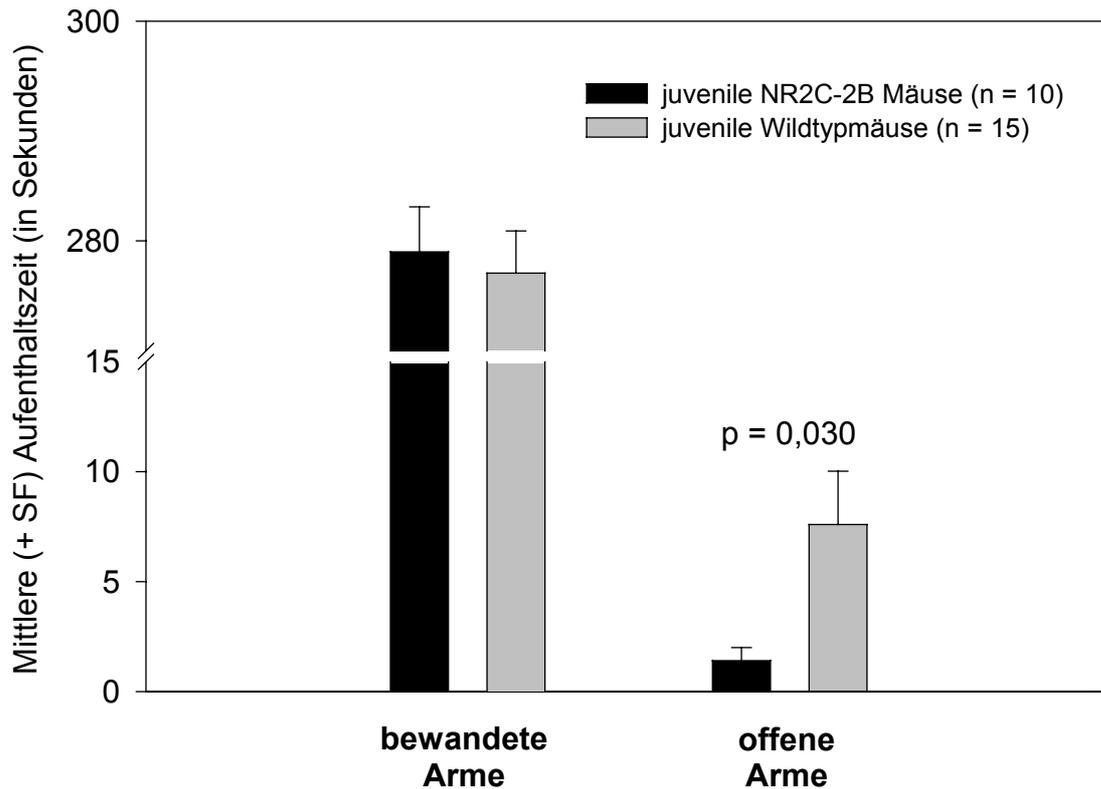


Abbildung 8: Verweildauer auf den offenen und bewandeten Armen des Elevated Plus-Maze für juvenile NR2C-2B Substitutionsmäuse und Wildtypmäuse. Der p-Wert bezieht sich auf den Zwischengruppenvergleich hinsichtlich der Aufenthaltszeit auf den offenen Armen (T-Test für unabhängige Stichproben).

Keine bedeutsamen Gruppenunterschiede wurden in Hinblick auf die Anzahl der Eintritte in die bewandeten Arme wie auch in Bezug auf die Verweildauer in diesen Armen gefunden (Aufenthaltszeiten:  $p = 0,751$ ; Eintritte:  $p = 0,497$ ). Die vorliegenden Daten suggerieren, daß die Gensubstitution sich bei juvenilen Mäusen anxiogen auswirkt ohne Aktivitätsparameter zu beeinflussen.

Im Vergleich mit adulten Mäusen zeigten die juvenilen Mäuse beider Genotypen weniger Aktivität aber auch erhöhte Ängstlichkeit. Juvenile Wildtypmäuse zeigten weniger Eintritte in die geschlossenen Arme als adulte Wildtypmäuse, verweilten aber für eine längere Zeit in den geschlossenen Armen (Eintritte:  $p = 0,001$ ; Abb. 9; Aufenthaltszeiten:  $p < 0,001$ ; Abb. 10). Sowohl die Aufenthaltszeit auf den offenen Armen als auch die Zahl der Eintritte in die offenen Arme war in den juvenilen Wildtypmäusen reduziert (Eintritte:  $p = 0,035$ ; Abb. 9; Aufenthaltszeiten:  $p = 0,063$ ; Abb. 10).

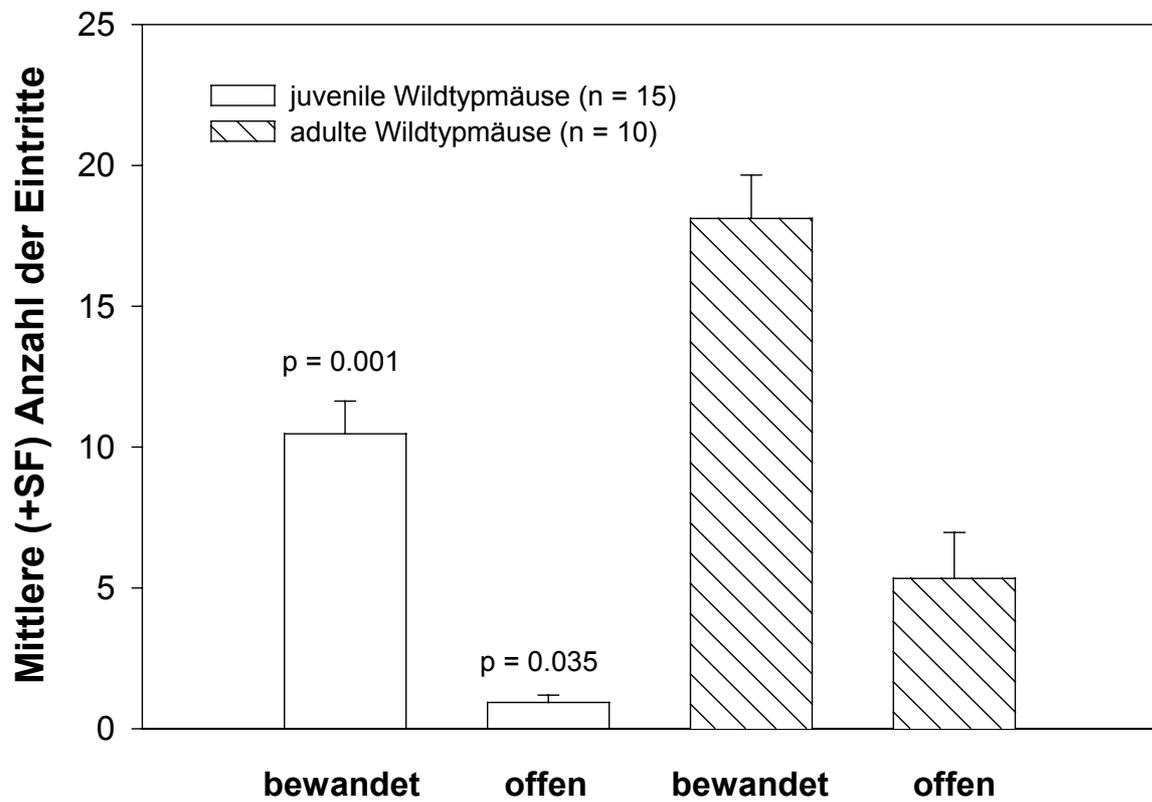


Abbildung 9: Anzahl der Eintritte auf die offenen und bewandeten Arme des Elevated Plus-Maze für juvenile und adulte Wildtypmäuse. Die p-Werte beziehen sich auf Zwischengruppenvergleiche hinsichtlich der Anzahl der Eintritte in die Arme (T-Test für unabhängige Stichproben).



Abbildung10: Verweildauer auf den offenen und bewandeten Armen des Elevated Plus-Maze für juvenile und adulte Wildtypmäuse. Die p-Werte beziehen sich auf Zwischengruppenvergleiche hinsichtlich der Aufenthaltszeiten in den Armen (T-Test für unabhängige Stichproben).

Für den Vergleich der juvenilen und adulten NR2C-2B Substitutionsmäuse fanden sich ähnliche Unterschiede (bewandete Arme: Eintritte:  $p = 0,026$ ; Abb. 11; Aufenthaltszeiten:  $p = 0,001$ ; Abb. 12; offene Arme: Eintritte:  $p = 0,020$ ; Abb.11; Aufenthaltszeiten:  $p = 0,016$ ; Abb. 12).

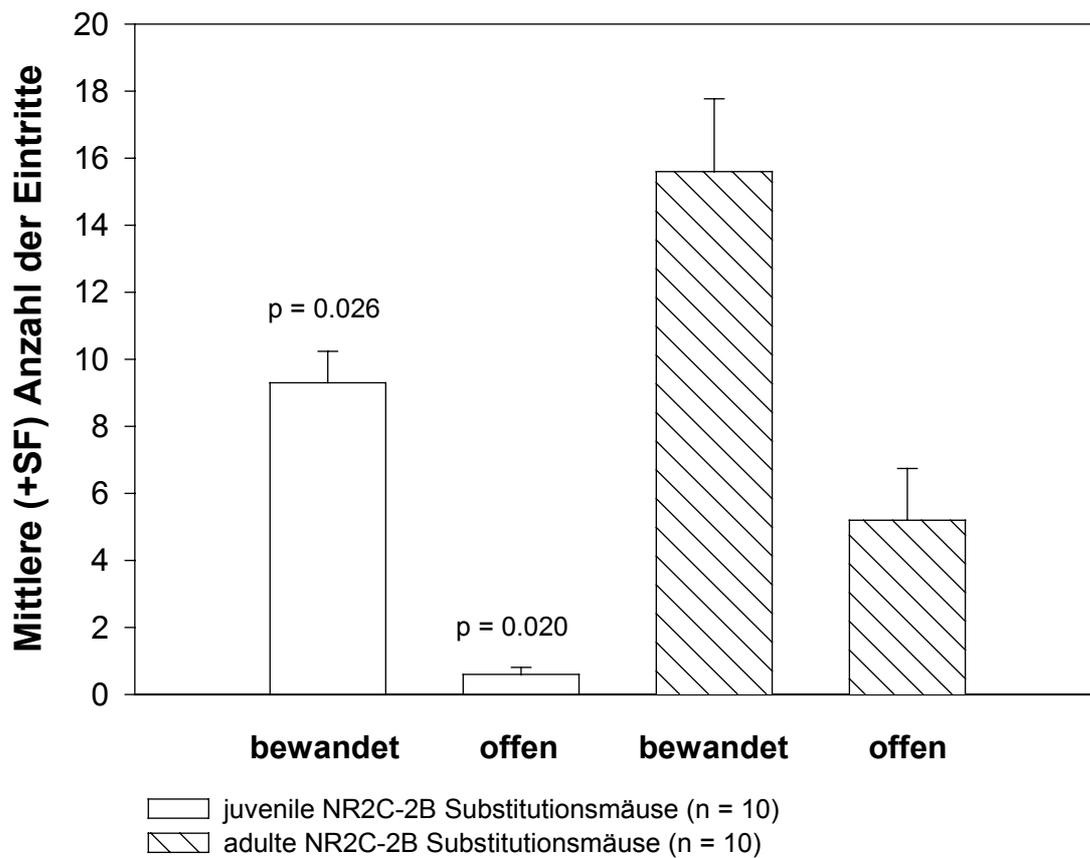


Abbildung 11: Anzahl der Eintritte auf die offenen und bewandeten Arme des Elevated Plus-Maze für juvenile und adulte NR2C-2B Substitutionsmäuse. Die p-Werte beziehen sich auf Zwischengruppenvergleiche hinsichtlich der Anzahl der Eintritte in die Arme (T-Test für unabhängige Stichproben).

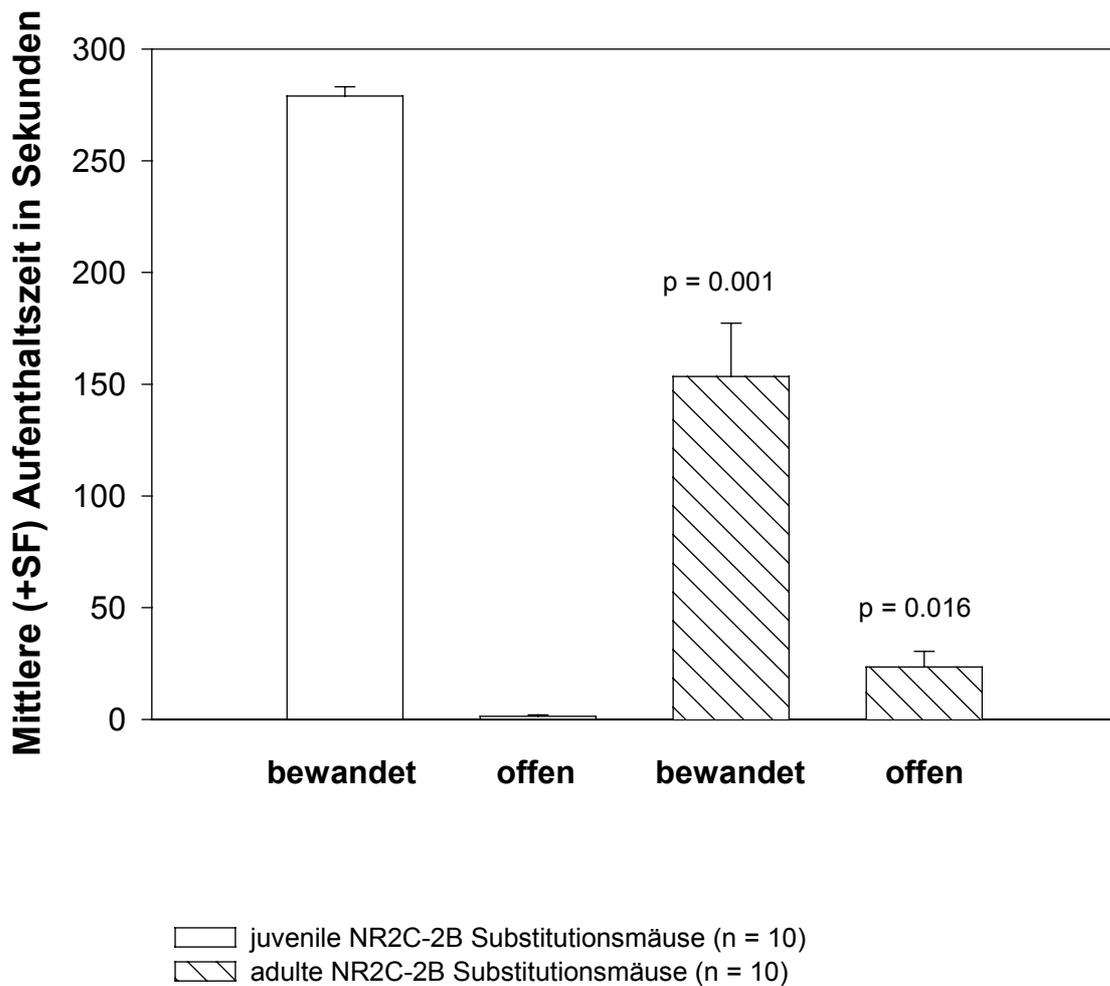


Abbildung12: Verweildauer auf den offenen und bewandeten Armen des Elevated Plus-Maze für juvenile und adulte NR2C-2B Substitutionsmäuse. Die p-Werte beziehen sich auf Zwischengruppenvergleiche hinsichtlich der Aufenthaltszeiten in den Armen (T-Test für unabhängige Stichproben).

### 3.2.8.2 Adulte NR2C-2B und Wildtypmäuse

Erwartungsgemäß äußerten beide Gruppen eine höhere Vermeidungstendenz hinsichtlich der offenen vs. der bewandeten Arme (Aufenthaltszeiten; NR2C-2B:  $p = 0,003$ ; WT:  $p = 0,012$ ; Abb. 13; Eintritte; NR2C-2B:  $p = 0,003$ ; WT:  $p = 0,002$ ; Abb. 14).

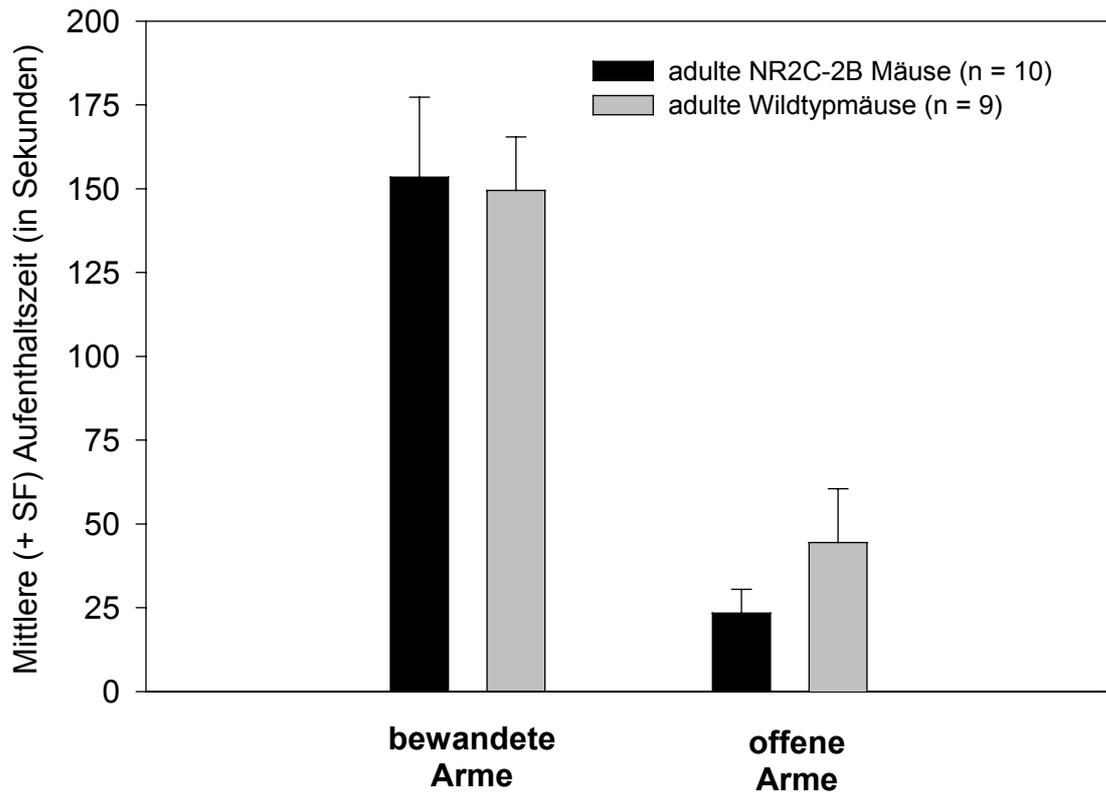


Abbildung 13: Verweildauer auf den offenen und bewandeten Armen des Elevated Plus-Maze für adulte NR2C-2B Substitutionsmäuse und Wildtypmäuse.

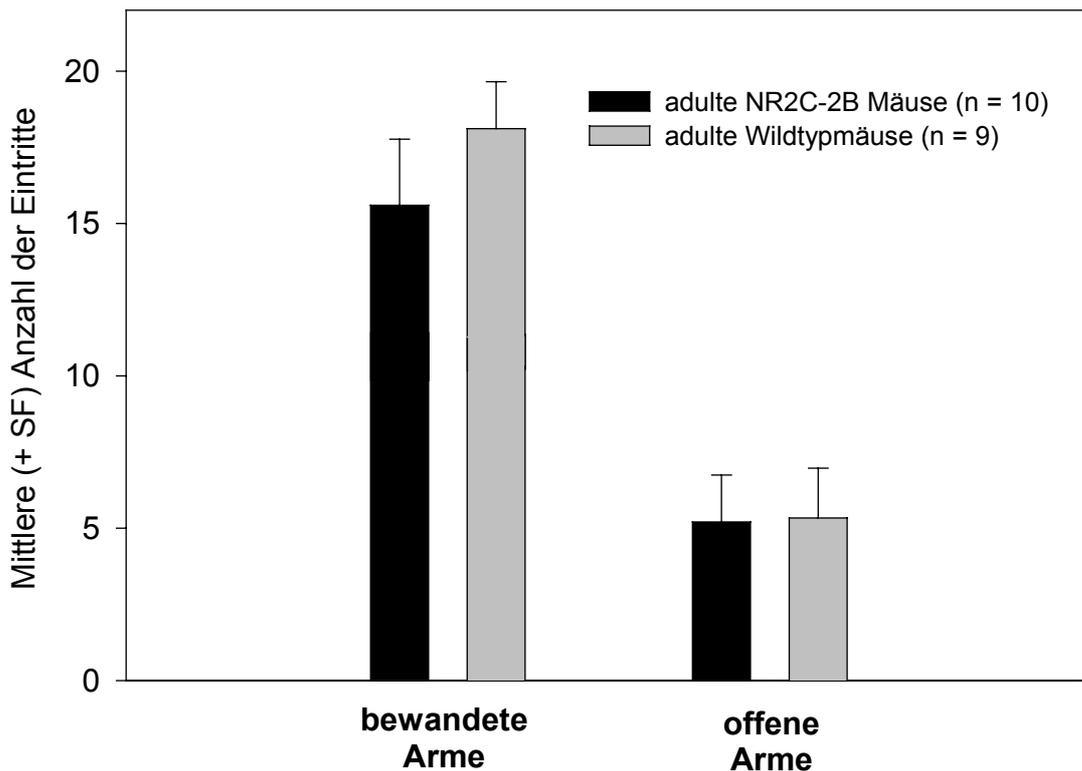


Abbildung 14: Anzahl der Eintritte auf die offenen und bewandeten Arme des Elevated Plus-Maze für adulte NR2C-2B Substitutionsmäuse und Wildtypmäuse.

Die adulten NR2C-2B Mäuse zeigten im Elevated Plus-Maze ein Verhaltensprofil, das sich nicht bedeutsam von dem der Wildtypmäuse unterschied. Die Gruppen waren vergleichbar hinsichtlich der Aufenthaltszeiten in den Armen (Bewandete Arme:  $p = 0,901$ ; Offene Arme:  $p = 0,257$ ), wie auch in Hinblick auf die Frequenz der Eintritte in die Arme (Bewandete Arme:  $p = 0,394$ ; offene Arme:  $p = 0,956$ ).

Diese Daten suggerieren, daß die finale Phase der Gensubstitution nach abgeschlossener Hirnreifung im Kontrast zum hirnorganisch unausgereiften Zustand nicht mit erhöhter Ängstlichkeit einhergeht. Diese Verhaltensdivergenz zwischen unausgereiften und adulten NR2C-2B Mäusen, wie auch schon für motorische Funktionen gefunden, scheint mit der progressiven Komplettierung der Gensubstitution im Laufe der Ontogenese und zeitlich gleichgerichteten kompensatorischen Gegenregulationen auf genetischer Ebene in Verbindung zu stehen, die offenbar wiederum mit dem Reifegrad des Gehirns in Wechselwirkung treten (siehe Diskussion zu diesem Experiment).

### 3.2.9 Diskussion

Die vorliegenden Befunde lassen sich wie folgt zusammenfassen: Nur bei jungen NR2C-2B Mäusen scheint sich die Gensubstitution auf unkontrollierte Ängstlichkeitsreaktionen im Sinne einer höheren Ängstlichkeit ausgewirkt zu haben. Die Diskussion der vorliegenden Resultate wird allerdings durch den Umstand erschwert, daß der Expressionsverlauf der NR2C Untereinheit im Laufe der Ontogenese und die Spezifizierung der zellulären und subzellulären Lokalisation dieser Untereinheit bislang nur für das Zerebellum mittels mRNA- und Proteinnachweis detailliert beschrieben worden ist, aber nur unzureichend für Hirnregionen, die für die Mediierung von unkontrollierter Ängstlichkeit (Amygdala, BNST, medialer Hypothalamus, Colliculi, periaqueduktales Grau etc., (Fanselow, 1994) relevant sind. Deshalb ist es schwierig einzuschätzen, ob und wie die Gensubstitution sich in diesen Regionen ausgewirkt hat. Sicher ist jedoch, daß das NR2C Gen im basolateralen Nukleus der Amygdala exprimiert wird (Karst et al., 2002), so daß sich die Gensubstitution möglicherweise auf intra-amygdaläre NMDA-R mediierte Verarbeitungsprozesse zumindest bei juvenilen NR2C-2B Mäusen auswirkt hat. Offenbar scheint jedoch der Reifegrad des Gehirns und damit auch die im Laufe der Ontogenese regionsspezifisch schwankende, Expressionsrate der NR2C Untereinheit mit den Effekten der Gensubstitution auf ängstliches Verhalten zu interagieren. Progressiv verlaufende kompensatorische Prozesse auf Ebene der Genexpression der NR2A, NR2B und möglicherweise auch der in der Amygdala exprimierten NR3 Untereinheiten mögen hierbei auch eine Rolle gespielt haben. Die erhöhte Ängstlichkeit der juvenilen NR2C-2B Mäuse ist vermutlich eher auf die Abwesenheit der NR2C Untereinheit als die Erhöhung der NR2B Expressionsrate im Vorderhirn der NR2C-2B Mäuse zurückzuführen, weil eine selektive Blockade der NR2B Untereinheit angstkorreliertes Verhalten, zumindest in adulten Mäusen, nicht moduliert und eine hohe Dosis von Dextromethorphan, die vermutlich auch die im Vorderhirn quantitativ geringer ausgeprägten NR2C enthaltenden NMDA-R blockiert, anxiogene Effekte hat (Dere et al., 2003a). Es ist möglich, daß die gefundenen anxiolytischen Effekte moderater Dosen von nicht-untereinheitsselektiven NMDA-R Antagonisten (Guimaraes et al., 1991) auf die Blockade von NR2A enthaltenden NMDA-R zurückführbar sind, deren Blockade entweder tatsächlich das endogene Angstsubstrat blockiert, oder nur eine allgemeine Hyperaktivierung und/oder

sensorische Defizite hervorruft, die im EPM ein Verhaltensprofil induzieren, das als Anxiolyse misinterpretiert werden kann, wogegen eine gleichzeitige Blockade von NR2A und NR2C nach hohen Dosierungen von NMDA-R Antagonisten, wie im Falle von Dextromethorphan (Dere et al., 2003a), auch anxiogene Effekte infolge von zusätzlicher NR2C Blockade (vielleicht über NR2C-NMDA-R die an gabaergen Interneuronen am basolateralen Teil der Amygdala lokalisiert sind) hervorrufen kann. Die Divergenz emotionalen Verhaltens von jungen und adulten NR2C-2B Mäusen mag auch damit zusammenhängen, daß die NR2C Untereinheit im Laufe der Vorderhirnreifung herunterreguliert wird, so daß der anxiogene Effekt der Abwesenheit der NR2C Untereinheit sich vom juvenilen zum adulten Status progressiv abschwächt. Vergleichbare Befunde wurden für NR2D Knockoutmäuse beschrieben. Adulte NR2D Knockouts weisen ein anxiolytisches Verhaltensprofil, juvenile NR2D<sup>-/-</sup> Mäuse dagegen normale emotionale Reaktionen, auf (Ikeda et al., 1995; Miyamoto et al., 2002). Allerdings sind diese Befunde weit schwieriger zu interpretieren, weil die NR2D Untereinheit hauptsächlich embryonal exprimiert wird und nachweislich in die Zellmigration, Synapsenbildung und deren Stabilisierung und damit in die Ausbildung der Grundverschaltung des Gehirns involviert ist, so daß davon auszugehen ist, daß dieser Effekt auf Ängstlichkeit wahrscheinlich mit hirnanatomischen Aberrationen in Vorderhirnstrukturen in Verbindung steht und weniger auf eine Involvierung von NR2D enthaltenden NMDA-R in die Mediierung von ängstlichem Verhalten hindeutet. In der NR2C-2B Substitutionsmaus dagegen sind hirnanatomische Aberrationen in Hirnstrukturen, die dem endogenen Angstsubstrat zugerechnet werden, zwar nicht auszuschließen, jedoch eher unwahrscheinlich, weil die NR2C Untereinheit erst postnatal exprimiert wird und somit die Gensubstitution erst einsetzt, nachdem die Grundverschaltung im Vorderhirn in weiten Teilen abgeschlossen ist, weil die Gensubstitution an den NR2C Promotor gekoppelt ist. Zudem manifestierte sich der Effekt in NR2C-2B Mäusen nur transient in juvenilen Tieren und nicht nach abgeschlossener Hirnreifung in adulten Tieren. Unsere Befunde deuten darauf hin, daß die Entwicklung von NR2C spezifischen NMDA-R Agonisten und die Bestimmung ihrer anxiolytischen Potenz für therapeutische Zwecke vielversprechend wäre.

### **3.3 Experiment III: Non-assoziatives räumliches Habituationlernen im Open-Field**

#### **3.3.1 Einleitung**

Es ist aus Läsions- und pharmakologischen Studien bekannt, daß die hippocampale Formation für die Detektion von Reizen mit Neuheitswert von kardinaler Bedeutung ist (Clark et al., 2000) und daß NMDA-R Antagonisten Explorationsverhalten und Habituationsprozesse in neuen räumlichen Umgebungen modulieren (Dai & Carey, 1994; Gironi-Carnevale et al., 1990). In der Vergangenheit wurde postuliert, das bei adulten Nagetieren, die einer neuen räumlichen Umgebung ausgesetzt werden, im Hippokampus eine Art kognitive Landkarte entwickelt wird, anhand der das Tier entscheiden kann ob die Umgebung vertraut ist oder nicht und die es dem Tier ermöglicht, sich in dieser Umgebung zu orientieren, bzw. das Tier in seinem Explorationsverhalten leitet. Die neuronale Grundlage dieser kognitiven Landkarte sind wahrscheinlich die sogenannten Platzzellen (engl. Place cells), die sich mit zunehmendem Vertraut werden mit der neuen Umgebung, z.B. an Tag 1 einer Offenfeld Testung, im Zuge der spontanen explorativen Aktivität des Tieres, entwickeln. Hierbei formt jede dieser Platzzellen ein zeitlich überdauerndes (bis zu 6 Monaten stabiles, bzw. solange man die elektrische Aktivität einer Platzzelle bei chronisch implantierten Nagern ableiten kann) charakteristisches Ortsfeld, das heißt es feuert nur dann, wenn das Tier sich an einer bestimmten Position im Feld befindet (Hill, 1978). Nach den primären Ortszellen entwickelt sich entweder eine zweite Klasse von Ortszellen, die die Aktivität der primären Ortszellen moduliert, oder die primären Ortszellen selbst verändern ihre Entladungseigenschaften dahingehend, daß sie auch dann feuern, wenn das Tier sich in Richtung des zugehörigen Ortsfeldes der Platzzelle bewegt, oder, wie bei Primaten gefunden, nur in diese Richtung geblickt wird (Bures et al., 1997, Müller, 1996; O'Keefe & Dostrovsky, 1971). Möglich ist auch, daß eine Ortszelle deren Ortsfeld in relativer Nähe zum Ortsfeld einer zweiten Platzzelle liegt diese möglicherweise antizipatorisch aktiviert, während das Tier sich durch den Raum bewegt. Räumliche Relationen können sich somit in der Aktivität der Ortszellen widerspiegeln und dem Tier signalisieren an welchem Punkt im Raum es sich befindet und an welche räumliche Position es gelangen würde wenn es sich nach links, rechts, zurück oder geradeaus bewegen

würde. Die räumliche Spezifität dieser Ortszellen im Hippokampus wird jedoch nur dann aufgebaut, wenn das Tier sich in der neuen Umgebung frei bewegen kann.

In Hinblick auf eine wiederholte Offenfeldtestung würde dies bedeuten, daß nachdem die kognitive Landkarte an Tag 1 der Offenfeldtestung etabliert wurde, dem Tier möglicherweise an Tag 2 durch die Aktivität dieser Ortszellen signalisiert wird, daß die Umgebung bereits bekannt ist, was zur Folge hat, das erneute intensive explorative Tätigkeit inhibiert wird. Das Ortsfeld bzw. das Verhalten einer gegebenen Platzzelle im Hippokampus ändert sich jedoch abrupt (in Hinblick auf die Feuerrate, die Form seines rezeptiven Feldes, und/oder der von ihr räumlich kodierten Position), wenn das Tier in eine zweite, zwar bereits bekannte, aber physikalisch distinkte Umgebung gesetzt wird (Müller & Kubie, 1987). Das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit ortsgebundener Aktivität von hippokampalen Neuronen scheint also die neurobiologische Grundlage, der Entscheidung bekannt vs. unbekannt bzw. der Komparatorfunktion des Hippokampus in Bezug auf den Neuheitswert von räumlichen Reizen, zu sein (O'Keefe & Nadel, 1978). Eine NMDA-Rezeptor Blockade, die auch geeignet ist hippokampale LTP zu blockieren, beeinflußt die Ausbildung von kognitiven Landkarten während einer explorativen Episode nicht, interferiert jedoch mit der Konsolidierung, Aufrechterhaltung, und/oder Stabilität der Ortsspezifität von Platzzellen, so daß bei einer Reexposition, z.B. nach einem 24 stündigen Behaltensintervall, keine ortsgebundene Aktivität mehr auszumachen ist (Kentros et al., 1998). Der konditionale Knockout der NR1 Untereinheit in Pyramidenzellen der CA1-Region des Hippokampus, mittels der Cre-loxP Rekombinasetechnik, führte zu einer schwächer ausgeprägten räumlichen Spezifität hippokampaler Ortszellen bei Mäusen. Die Platzzellen der CA1-NR1-Knockoutmäuse wurden durch ein, um ein Drittel größeres, räumliches Areal aktiviert (McHugh et al., 1996). Gleichermaßen beeinträchtigte eine Inhibition der NR1 Genexpression im dorsalem Hippokampus, mittels der Antisense-Technik, räumliches Habitualionslernen in Ratten nach einem Behaltensintervall von 24 Std. (Cheli et al., 2002).

(Ein Antisense Oligonucleotid ist eine, synthetisch hergestellte, kurze komplementäre Nukleotidsequenz zu einer definierten mRNA, deren Übersetzung in das zugehörige Protein gehemmt werden soll. Wenn ein Antisense Oligonucleotid von einer Zelle aufgenommen wird, bildet es mit der Ziel-mRNA einen Hybridstrang und blockiert damit die Translation der, auf der mRNA niedergeschriebenen, Aminosäuresequenz in das entsprechende Protein, weil die Ribosomen, an

denen das Protein gebildet wird, an die mRNA nicht mehr andocken können. Die Hybridisierung erhöht auch die Abbaurrate der Ziel-mRNA durch RNase-Enzyme (Pilowsky et al., 1994)).

Offenbar sind also funktionale NMDA-R in der CA1 Region für die Ausbildung und/oder Stabilisierung (Kentros et al., 1998) einer internen Repräsentation der äußeren räumlichen Umgebung notwendig, die es dem Tier ermöglichen, räumliche Kontexte wiederzuerkennen und sich in diesen zu orientieren. Es wurde gefunden, daß NMDA-R abhängige LTP mit der Ausbildung von kognitiven Landkarten bzw. der Ortsspezifität von Platzzellen im Hippokampus korreliert und daß NMDA-R Blockade mit der Ausbildung und/oder Stabilisierung dieser kognitiven Landkarten interferiert (Ekstrom et al., 2001; Kentros et al., 1998; Shapiro, 2001). Die NR2C mRNA und das NR2C Protein selbst wird im juvenilen und adulten Hippokampus in nicht-neuronalen Zellen, Interneuronen und Prinzipalzellen des Stratum radiatum, Stratum oriens und der Pyramidenzellschicht exprimiert (Beas-Zárate et al., 2002; Goebel & Poosch, 1999; Lin et al., 1996; Monyer et al., 1994; Pollard et al., 1993; Rafiki et al., 2000; Ritter et al., 2002; für gegenteilige Befunde siehe Guilarte & McGlothan, 1998; Ikeda et al., 1995; Ishii et al., 1993; Kutsuwada et al., 1992; Meguro et al., 1992; Monyer et al., 1992; Nakanishi et al., 1992; Scherzer et al., 1998; Thompson et al., 2002). Wenn nun NMDA-R abhängige neuronale Plastizität bzw. LTP für den Aufbau und/oder der Stabilisierung einer kognitiven Landkarte in einer neuen räumlichen Umgebung relevant ist, so ist es möglich, daß die Substitution der NR2C durch die NR2B Untereinheit in hippokampalen Neuronen, sich qualitativ oder beschleunigend auf diese Prozesse auswirkt. NR2B enthaltende NMDA-R weisen nämlich (wie bereits in der allgemeinen Einleitung ausgeführt) elektrophysiologische Eigenschaften auf, die für eine LTP Induktion besonders geeignet sind (hohe Leitfähigkeit (Chen et al., 1999; Monyer et al., 1994; Vincini et al., 1998), hohe  $Mg^{2+}$ -Sensitivität (Kuner & Schöpfer, 1996; Kutsuwada et al., 1992), hohe Glutamataffinität (Kutsuwada et al., 1992; Priestley et al., 1995), hohe Polyaminsensitivität (Lynch et al., 1995), Bindungsstellen für autophosphoryliertes CaMKII und andere Funktionsproteine (Strack & Colbran, 1998, Strack et al., 2000)), wogegen NR2C enthaltende NMDA-R für aktivitätsabhängige synaptische Effizienzsteigerungen (niedrige spannungsabhängige  $Mg^{2+}$ -Sensitivität (Kuner & Schoepfer, 1996), niedrige Leitfähigkeit (Stern et al., 1992), niedrige Glutamat Sensitivität (Kutsuwada et al., 1992) eher ungeeignet sind. Nach systemischer oder intrazerebraler Applikation von NMDA-R Antagonisten findet man in Nagetieren eine Disinhibition horizontaler Aktivität (Heale & Harley, 1990; Hiramatsu et al., 1989; Loscher et al., 1991), ebenso

weisen NR2A-/- Mäuse erhöhte Lokomotion in einem Offenfeld auf (Miyamoto et al., 2001, für einen gegenteiligen Befund siehe Kadotani et al., 1996). Deshalb ist es denkbar, daß die NR2C-2B Substitutionsmäuse ein verändertes Explorationsverhalten und möglicherweise auch verbessertes räumliches Habitationslernen äußern.

### **3.3.2 Fragestellungen**

Weisen adulte NR2C-2B Substitutionsmäuse verbessertes räumliches Habitationslernen nach 24 und 72 stündigen Behaltensintervallen auf?

Wie wirkt sich die NR2C-2B Gensubstitution auf explorative Aktivität und räumliches Habitationslernen bei juvenilen Mäusen mit einer noch nicht vollständig ausgereiften hippocampalen Formation aus?

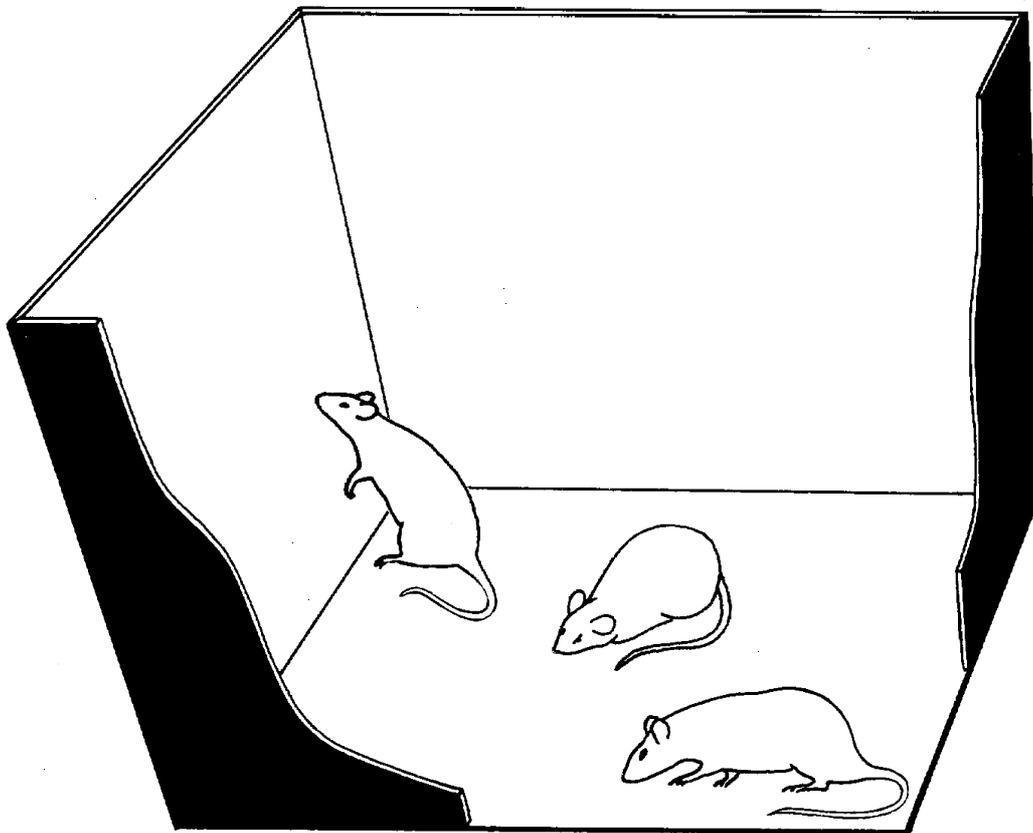
Führt die Gensubstitution zu einer generellen Veränderung der Quantität explorativer Verhaltensweisen?

### **3.3.3 Versuchstiere**

Als Versuchstiere dienten männliche junge (MW:  $30,1 \pm 0,43$  Tage alte;  $n = 10$ ) und adulte (MW:  $8,86 \pm 0,22$  Wochen alte;  $n = 10$ ) NR2C-2B Gensubstitutionsmäuse, wie auch junge (MW:  $29,3 \pm 0,22$  Tage alte;  $n = 15$ ) und adulte (MW:  $9,17 \pm 0,04$  Wochen alte;  $n = 9$ ) Wildtypmäuse.

### **3.3.4 Rationale und Aufbau der Versuchsanordnung**

Das Offenfeld (siehe Schemazeichnung 3) ist eine weit verbreitete Methode zur Untersuchung der neurobiologischen Grundlagen des non-assoziativen räumlichen Gedächtnisses bei Nagetieren.



Schemazeichnung 3: Schematische Darstellung der Offenfeldapparatur. Erläuterungen im Text.

Der Test basiert auf der natürlichen Tendenz von Nagetieren, neue Umwelten zu explorieren, um neue Nahrungs-, Reproduktions-, Schutz-, und Nestressourcen ausfindig zu machen (Dere, 2002). Die Häufigkeit von explorativen Verhaltensweisen in einem unvertrauten Offenfeld wird begrenzt durch die widerstreitende Motivation potentielle Gefahrenquellen zu vermeiden. Das beobachtbare Verhalten ist also immer ein Kompromiß zwischen diesen diametral entgegengesetzten Verhaltenstendenzen. Welche Motivationsquelle die Oberhand gewinnt, wird durch den aktuellen physiologischen Bedürfnisstatus des Tieres moduliert (Gerlai 1999), beispielsweise exploriert ein hungriges Tier eine neue Umgebung stärker als ein gesättigtes.

Räumliche Habituation ist definiert als eine Aktivitätsabnahme nach wiederholter Darbietung der zuvor unvertrauten Umgebung. Diese Aktivitätsreduktion weist auf die Bildung eines Gedächtnisinhaltes hin, der die physikalischen Charakteristika der Umgebung abbildet und bei erneuter Darbietung zu einem Wiedererkennen führt und damit neuerliche intensive Exploration inhibiert. Der Test reagiert sensitiv auf Interventionen, die geeignet sind die Enkodierung, Konsolidierung und den Abruf von

Gedächtnisinhalten zu modulieren (Archer, 1973; Cerbone & Sadile, 1994; Gerhard et al., 1994; Treit & Fundytus, 1988; Voits et al., 1995).

Das Open-Field ist eine quadratische Box (29 x 29 x 40 cm), die nach oben hin offen ist und aus grauem PVC besteht. Über der Box befindet sich eine CCD-Videokamera, die an einen Videorekorder angeschlossen ist und den Versuchsdurchgang aufzeichnet. Diffuse Beleuchtung mit weißem Licht erzeugt eine Beleuchtungsstärke von ca. 4 Lux im Zentrum des Offenfeldes. Eine Klimaanlage erzeugt ein konstantes Rauschen ca. 25 dB/SPL, zur Maskierung von akustischen Störreizen.

Unter Verwendung eines Image Analyzers und einer geeigneten Software (EthoVision<sup>®</sup>, Noldus, Niederlande) wird der Bewegungspfad der Tiere post-hoc anhand der Videoaufzeichnungen digitalisiert. Hierbei wird zunächst eine Schwellenbestimmung aller Kontraste auf dem Fernsehbild ohne Versuchstier vorgenommen, wobei das Bild in kleine Kästchen (Pixel) unterteilt wird, denen in Abhängigkeit von der Helligkeit in den umliegenden Kästchen ein Graustufenwert zugeordnet wird. Während der Tracking-Phase, wenn das Tier sich im Offenfeld befindet, wird das aktuelle Bild, das ebenso in Pixel aufgeteilt ist und denen jeweils ein Graustufen bzw. Kontrastwert zugeordnet wird, 6 mal pro Sekunde von dem während der Schwellenbestimmung aufgezeichneten Referenzbild subtrahiert. Das Ergebnis dieser Subtraktion ist überall im Offenfeld gleich null, bis auf den Ort, an dem sich das Versuchstier gerade aufhält. Das System erkennt also jeden Kontrast, dessen Graustufe einen zuvor bestimmten Schwellenwert, an einem definierten Ort im Maze, überschreitet, als Objekt, hebt dieses aus dem Hintergrund hervor und zeichnet dessen Bewegungspfad anhand von x-y (zweidimensionalen) Raumkoordinaten und der zeitlichen Dimension auf (d.h. zum Zeitpunkt z hält sich das Versuchstier am Ort x,y im Offenfeld auf).

### **3.3.5 Versuchsdurchführung**

Die Mäuse werden im Zentrum des Offenfeldes eingesetzt. Der Versuchsdurchgang dauert 5 Minuten. Nach jedem Durchgang werden Fäkalboli entfernt und das Offenfeld wird mit 0,1 % Essigwasserlösung ausgewischt, um olfaktorische Reize (Scent-Marking) zu maskieren und anschließend getrocknet.

### **3.3.6 Abhängige Variablen**

Erhoben werden, aufsummiert über die 5 minütigen Sitzungen: 1. Horizontale Aktivität; die zurückgelegte Distanz in Zentimetern, 2. Vertikale Aktivität; die Frequenz des Aufrichtverhaltens (Die Vorderpfoten sind entweder gegen eine Wand gelehnt oder in der Luft und bilden mit der Längsachse des Körpers einen Winkel von mindestens 45°).

### **3.3.7 Darstellung der Versuchsdaten und statistische Auswertung**

In Tabelle 3 im Anhang sind die Rohwerte der 4 Gruppen aufgelistet. Zur graphischen Aufbereitung der Daten wurden Mittelwerte und Standardfehler für die 4 Gruppen errechnet. Der Kolmogorov-Smirnov Anpassungstest auf Normalverteilung (alle p-Werte > 0,1) rechtfertigte eine parametrische Teststatistik. Die angegebenen p-Werte dienen als deskriptives Maß des Effekts und sind, wenn nicht anders ausgewiesen, zweiseitig zu lesen. Gruppenvergleiche unabhängiger Daten wurden mit dem T-Test für unabhängige Stichproben, Vergleiche abhängiger Daten wurden mit dem T-Test für abhängige Stichproben durchgeführt.

### **3.3.8 Ergebnisse**

#### **3.3.8.1 Juvenile NR2C-2B und Wildtypmäuse**

Für Tag eins wurden keine teststatistisch bedeutsamen Gruppenunterschiede im Explorationsverhalten gefunden (Vertikale Aktivität:  $p = 0,176$  Abb. 15; Horizontale Aktivität:  $p = 0,313$ ; Abb. 16; T-Test für unabhängige Stichproben).

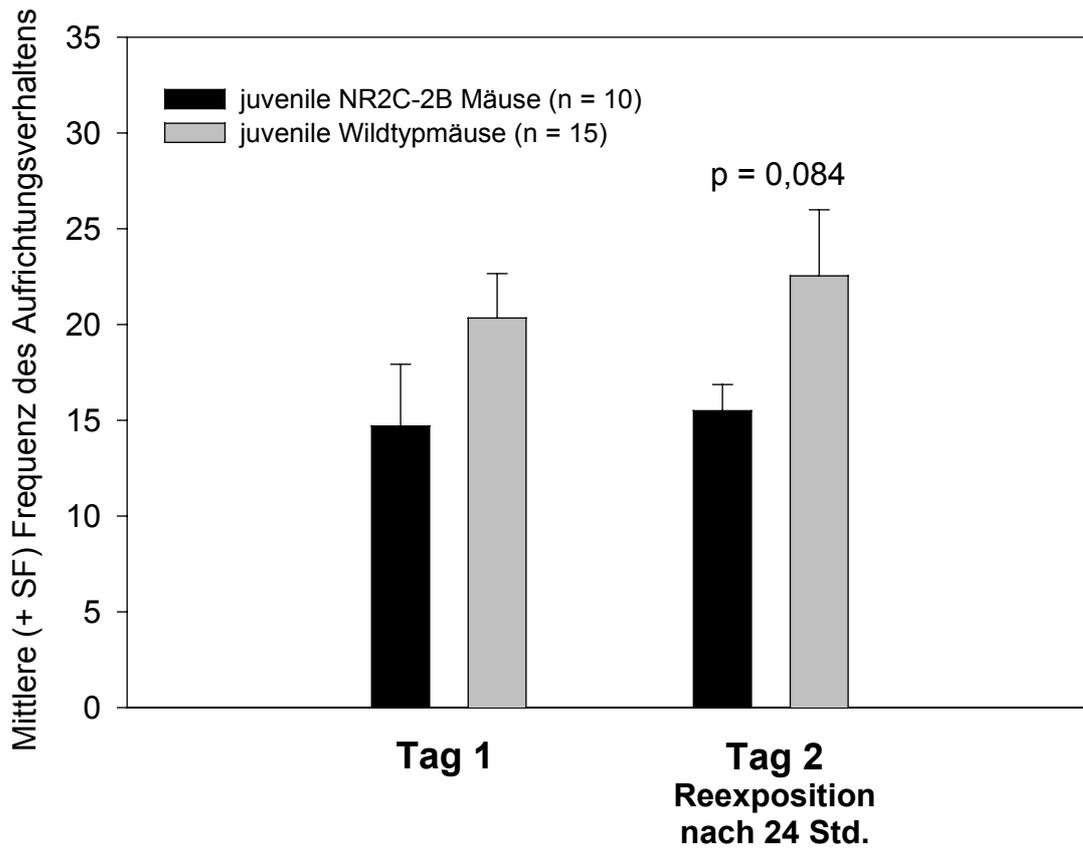


Abbildung 15: Aufrichtverhalten von juvenilen NR2C-2B Substitutionsmäusen und Wildtypen im Offenfeld an zwei aufeinanderfolgenden Tagen. Der p-Wert bezieht sich auf einen Zwischengruppenvergleich (T-Test für unabhängige Stichproben).

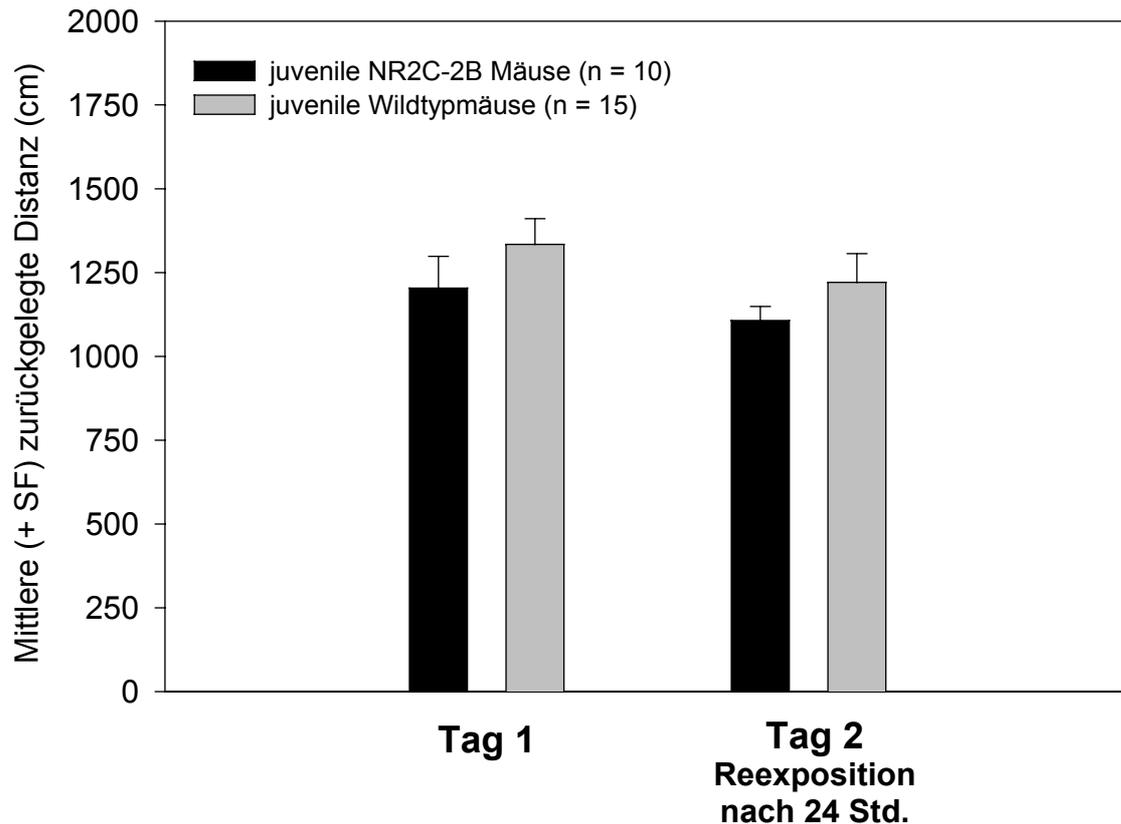


Abbildung 16: Lokomotorische Aktivität der juvenilen NR2C-2B und Wildtypmäuse während der Tage der Offenfeldtestung.

An Tag zwei zeigten die NR2C-2B Mäuse tendenziell weniger vertikale Aktivität als die Kontrollmäuse ( $p = 0,084$ ), unterschieden sich jedoch nicht bedeutsam bezüglich der horizontalen Aktivität ( $p = 0,262$ ). Innergruppenvergleiche der explorativen Aktivität an Tag 1 mit Tag 2 zeigten für beide Gruppen eine vergleichbare Aktivität, also keine räumliche Habituation (NR2C-2B; Vertikale Aktivität:  $p = 0,768$ ; Horizontale Aktivität:  $p = 0,435$ ; WT: Vertikale Aktivität:  $p = 0,531$ ; Horizontale Aktivität:  $p = 0,311$ ; T-Test für abhängige Variablen). Zusammenfassend läßt sich anmerken, daß die Offenfeldaktivität von 4 Wochen alten Mäusen durch die Genintervention nur marginal beeinflusst wird und daß räumliche Habituationsleistungen von juvenilen Mäusen nicht erbracht werden können. Es muß jedoch berücksichtigt werden, daß juvenile Mäuse offenbar eine generell reduzierte explorative Aktivität aufweisen, die u.U. auf die erhöhte Ängstlichkeit dieser Mäuse im Vergleich zu adulten Mäusen zurückzuführen ist (siehe Ergebnisse zu Experiment II).

### 3.3.8.2 Adulte NR2C-2B und Wildtypmäuse

Das explorative Verhalten (vertikale und horizontale Aktivität) der adulten NR2C-2B und WT Mäuse war an allen drei Testtagen vergleichbar (Vertikale Aktivität; Tag 1:  $p = 0,114$ ; Tag 2:  $p = 0,475$ ; Tag 5:  $p = 0,288$ ; Abb. 17; Horizontale Aktivität; Tag 1:  $p = 0,285$ ; Tag 2:  $p = 0,424$ ; Tag 5:  $p = 0,434$ ; Abb. 18; T-Test für unabhängige Stichproben; einseitige Testung).

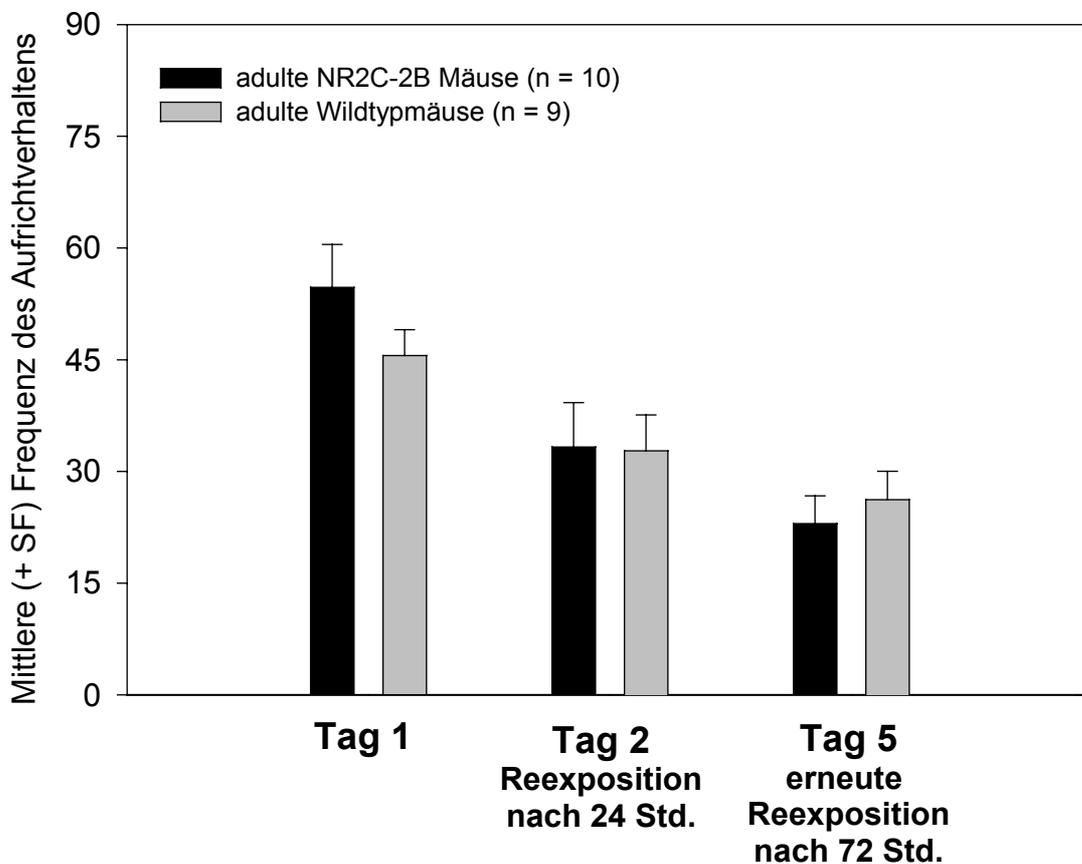


Abbildung 17: Aufrichtverhalten von adulten NR2C-2B Substitutionsmäusen und Wildtypen im Offenfeld an den entsprechenden Tagen. Die p-Werte beziehen sich auf Innergruppenvergleiche (T-Test für abhängige Stichproben).

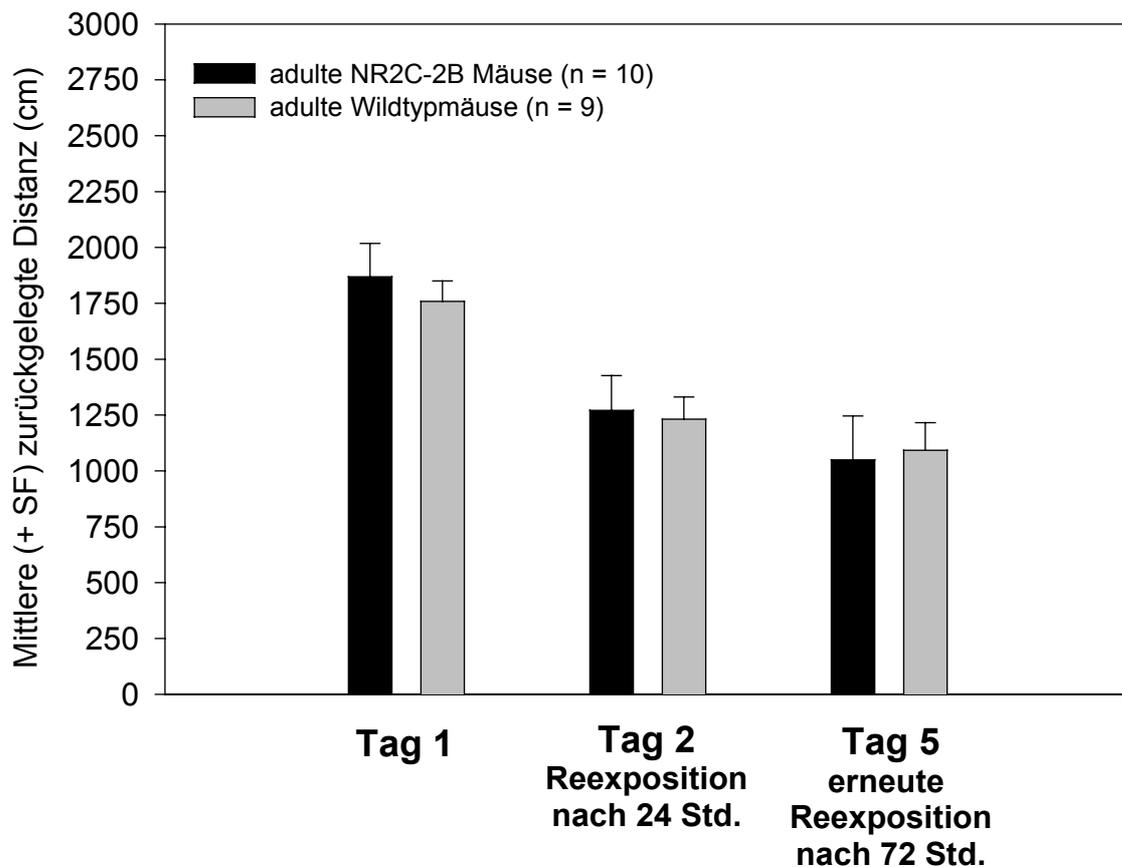


Abbildung 18: Horizontale Aktivität von adulten NR2C-2B Substitutionsmäusen und Wildtypen im Offenfeld an den entsprechenden Tagen. Die p-Werte beziehen sich auf Innergruppenvergleiche (T-Test für abhängige Stichproben).

Beide Gruppen zeigten eine Reduktion des explorativen Verhaltens von Tag 1 auf Tag 2, was im Sinne eines räumlichen Wiedererkennens interpretiert werden kann (Tag 1 vs. Tag 2; Vertikale Aktivität; NR2C-2B:  $p = 0,005$ ; WT:  $p = 0,022$ ; Horizontale Aktivität; NR2C-2B:  $p < 0,0005$  WT:  $p < 0,0005$ ; einseitige Testung, T-Test für abhängige Variablen). Während die NR2C-2B Mäuse von Tag 2 auf Tag 5 wiederum einen Abfall der Erkundungstätigkeit aufzeigten, war das Verhalten der Wildtypmäuse an diesen Tagen vergleichbar (Tag 2 vs. Tag 5; Vertikale Aktivität; NR2C-2B:  $p = 0,031$ ; WT:  $p = 0,105$ ; Horizontale Aktivität; NR2C-2B:  $p = 0,016$ ; WT:  $p = 0,170$ ; einseitige Testung).

### 3.3.9 Diskussion

Die NR2C-2B Gensubstitution hat sich bei adulten Substitutionsmäusen nicht auf räumliche Habituationsprozesse nach Reexposition am Folgetag ausgewirkt. Dieser Befund scheint darauf hinzudeuten, daß die initiale Ausbildung einer internen Repräsentation der physikalischen Charakteristika des Offenfeldes, die für das Wiedererkennen nach 24 Stunden notwendig ist, durch die Gensubstitution nicht beeinflusst wurde. Allerdings zeigten die adulten NR2C-2B Mäuse, im Gegensatz zu den Wildtypmäusen, während der dritten Exposition eine weitere Reduktion der explorativen Aktivität auf. Dieser Effekt deutet darauf hin, daß bei den NR2C-2B Mäusen nach der zweiten Exposition möglicherweise erneut ein Gedächtniskonsolidierungsprozess einsetzte, der den Gedächtnisinhalt bzw. die kognitive Landkarte (Ortsspezifität hippocampaler Platzzellen) weiter gefestigt hat (Siehe auch Kentros et al., 1998). Sogenannte Reminder-reconsolidation Studien haben nahegelegt, daß ein aktivierter Gedächtnisinhalt durch neue Informationen, die während des Abrufs aufgenommen wurden, ergänzt wird, um hiernach erneut abgespeichert zu werden und daß diese erneute Abspeicherung eine NMDA-R Aktivierung erfordert und eine NMDA-R Blockade während des Abrufs oder, unmittelbar danach, eine Löschung des Gedächtnisinhaltes hervorruft (Nader et al., 2000a; Nader et al., 2000b; Sara, 2000). Wiederholte Konsolidierung stabilisiert Gedächtnisinhalte, macht sie leichter abrufbar und weniger anfällig für Interferenzen durch konkurrierende Gedächtnisinhalte. Im Einklang mit dieser Theorie stehen Befunde, wonach eine MK-801 Gabe (ein nichtkompetetiver NMDA-R Antagonist), nach Reaktivierung eines ausreichend konsolidierten Gedächtnisinhaltes, den Abruf dieses Gedächtnisinhaltes, nach einer zeitlichen Verzögerung von 24 Stunden, auch ohne erneute MK-801 Applikation, beeinträchtigt. Tiere, die erst 120 Minuten nach der Reaktivierung eine MK-801 Injektion erhielten, zeigten keine Defizite auf, so daß davon auszugehen ist, daß das kritische Zeitfenster zur Wiederabspeicherung eines aktivierten Gedächtnisinhaltes etwa 2 Stunden beträgt und daß der Gedächtnisinhalt während dieser Zeitperiode labil und damit für amnestische Interventionen anfällig ist (Przybylski & Sara, 1997).

Es ist also denkbar, daß infolge der Gensubstitution bei NR2C-2B Mäusen Rekonsolidierungsprozesse nach Reexposition in ein Offenfeld eingeleitet werden, wogegen bei Wildtypmäusen offenbar eine solche Rekonsolidierung nicht stattfindet.

Es ist allerdings auch möglich, daß die NR2C-2B Mäuse, im Gegensatz zu den Wildtypmäusen, während der zweiten Exposition subtile Abweichungen von der ursprünglichen Lernsituation detektiert haben (möglicherweise infolge von verbesserten Wahrnehmungsleistungen) und deshalb eine Rekonsolidierung einleiteten, um diese zusätzlichen Informationen in den bereits gebildeten Gedächtnisinhalt zu integrieren. Nichtsdestotrotz können Rekonsolidierungsleistungen von NR2C-2B Mäusen auch generell verbessert sein.

Es ist aus Läsions- und pharmakologischen Studien bekannt, daß die hippocampale Formation für nicht-assoziative räumliche Habituation von kardinaler Bedeutung und die intrahippokampale Verschaltung erst nach 4 Wochen post-natal vollständig ausgebildet ist (Galvan et al., 2000). Damit kann das gefundene Habituationsdefizit von 4 Wochen alten NR2C-2B und Kontrollmäusen auf die möglicherweise noch anhaltenden strukturellen Reorganisationsprozesse der hippocampalen Formation zurückgeführt werden. Die tendenziell reduzierte vertikale Aktivität der juvenilen Substitutionsmäuse, insbesondere an Tag 2, ist ein Befund, der weitere Experimente erforderlich macht und gegenwärtig noch keine schlüssige Aussage zulässt. Es scheint also wenig Sinn zu machen, juvenile NR2C-2B Mäuse auch in komplexeren räumlichen Lernaufgaben zu testen, wenn sie, wie juvenile Wildtypmäuse, nicht einmal nicht-assoziative räumliche Habituationsleistungen erbringen können. Ein möglicher kognitionsverbessernder Effekt der NR2C-2B Gensubstitution in komplexen Lernaufgaben scheint also einen ausgereiften Organismus vorauszusetzen. Deshalb wurden juvenile Mäuse nicht in komplexeren Lernaufgaben, wie der Objektwiedererkennung und dem Morris Water-Maze getestet.

Die NR2C-2B Gensubstitution in juvenilen und adulten Mäusen hat sich nicht auf die initiale explorative Aktivität (Tag 1) in einer neuen räumlichen Umgebung ausgewirkt. Dieser Befund steht in Einklang mit Beobachtungen, daß weder eine NR2C-Geninaktivierung (Kadotani et al., 1996) noch eine NR2B Überexpression (Tang et al., 1999) die Quantität explorativer Verhaltensweisen in einem unverbauten Offenfeld beeinflusst. Nur für NR2A defiziente Mäuse wurde erhöhte horizontale und vertikale Aktivität in einer neuen Umgebung beschrieben (Miyamoto et al., 2001), vergleichbar mit hippocampal lädierten Ratten, die ebenfalls erhöhte Offenfeldaktivität aufzeigen (O'Keefe & Nadel, 1978). Bemerkenswerterweise führte ein Doppelknockout, sowohl der NR2A und NR2C Untereinheit, zu reduzierter vertikaler aber nicht horizontaler

Aktivität im Offenfeld (Kadotani et al., 1996). Dieser Effekt basiert möglicherweise auf der Abwesenheit von funktionalen NMDA-R im Zerebellum, die zu motorischen Defiziten führt, wenn sowohl NR2C und NR2A nicht mehr exprimiert werden. Deshalb ist es möglich, daß die reduzierte vertikale Aktivität der NR2A/2C Knockoutmäuse ein motorisches Defizit widerspiegelt. Die Reduktion explorativer Aktivität von NR2D Knockoutmäusen, wie auch von NR2DTg Mäusen, scheint dagegen mit unspezifischen Effekten z.B. der Hirnentwicklung, zusammenzuhängen, weil NR2D hauptsächlich im embryonalem und neonatalen Gewebe exprimiert wird (Miyamoto et al., 2002; Okabe et al., 1998). Diese Befunde deuten darauf hin, daß die motorische Aktivierung, die nach untereinheits-nichtselektiver NMDA-R Blockade (Loescher et al., 1991; Heale & Harley, 1990) und Dextromethorphan (Dere et al., 2003a) Applikation hervorgerufen wird, über NR2A enthaltende Rezeptoren vermittelt wird.

### **3.4 Experiment IV: Objektexploration und Wiedererkennung**

#### **3.4.1 Einleitung**

Systemische Applikation von NMDA-R Antagonisten beeinträchtigt das Objektgedächtnis von Nagetieren (Baker & Kim, 2002; Packard & Teather, 1997). Ebenso fand man Defizite nach hippokampaler, septaler, perirhinaler und accumbaler NMDA-Rezeptor Antagonisierung in Objektexplorationsaufgaben (Abe & Iwasaki, 2001; Baker & Kim, 2002; Puma et al., 1998; Usiello et al., 1998). Intraseptale NMDA-Applikation nach dem Lerndurchgang hingegen verbesserte die Objektwiedererkennung (Puma et al., 1998). Während ein CA1-pyramidenzellspezifischer NR1-Knockout das Objektgedächtnis beeinträchtigte, (Rampon et al., 2000) führte die Überexprimierung der NR2B Untereinheit im Vorderhirn von Mäusen zu einer Verbesserung des Objektgedächtnisses (Tang et al., 1999) nach kurzen zeitlichen Intervallen zwischen Lerndurchgang und Test. Aus der Literatur ist zu entnehmen, daß Nagetiere zwischen bekannten und neuen Objekten diskriminieren können, wenn Behaltensintervalle kleiner als 90 Minuten benutzt werden. Längere Behaltensintervalle führen nicht mehr zu einem signifikanten Wiedererkennen von bereits dargebotenen Objekten (Puma et al., 1998). Weil davon auszugehen war, daß die Gensubstitution sich förderlich auf das Objektgedächtnis von Mäusen auswirkt, wurde ein Behaltensintervall von 24 Stunden zwischen den

Testungen benutzt, um die hypostasierten promnestische Effekte der Genintervention sicher detektieren zu können.

### **3.4.2 Fragestellungen**

Die NR2C-2B Gensubstitution sollte sich promnestisch auswirken und die NR2C-2B Substitutionsmäuse in die Lage versetzen, Objekte auch nach einem 24 stündigen Intervall wiederzuerkennen, wogegen diese Leistung von Kontrolltieren nicht erbracht werden sollte.

Ist objektinduziertes furchtkorreliertes Verhalten durch die Gensubstitution beeinflusst worden?

### **3.4.3 Versuchstiere**

Als Versuchstiere dienten männliche adulte (MW:  $9,71 \pm 0,22$  Wochen alte;  $n = 10$ ) NR2C-2B Gensubstitutionsmäuse, wie auch (MW:  $10,3 \pm 0,03$  Wochen alte;  $n = 9$ ) Wildtypmäuse.

### **3.4.4 Rationale und Aufbau der Versuchsapparatur**

Exploration ist ein Verhalten, das durch neuartige Reize (u.a. auch von neuen Umgebungen, unbekannter Nahrung, unbekanntem Objekten etc.) induziert wird und höchst adaptiv ist, d.h. es ermöglicht einem Nagetier maximalen Gewinn aus seiner Umgebung zu ziehen. Wenn Nagetiere die Wahl haben, ein bereits bekanntes oder ein neues Objekt zu explorieren, so präferieren sie das neue Objekt. Die Häufigkeit von explorativen Verhaltensweisen in Bezug auf ein unvertrautes Objekt wird begrenzt, durch das Bedürfnis potentielle Gefahrenquellen zu vermeiden. Das beobachtbare Verhalten ist also immer ein Kompromiß zwischen diesen widerstreitenden Verhaltenstendenzen und wird z.T. durch den aktuellen physiologischen Bedürfnisstatus des Tieres moduliert (z.B. explorieren hungrige Tiere auch Objekte stärker als gesättigte). Da Nagetiere neben dem visuellen System auch stark ihre Nahsinne bei der Informationsaufnahme nutzen, nähern sie sich neuen Objekten und haben physischen Kontakt mit diesen, so daß man aus der Häufigkeit der Kontakte auf den Neuheitswert der Objekte schließen kann. Objekt-Wiedererkennung kann definiert werden als eine Abnahme der Erkundungstätigkeit

(Kontakte) in Bezug auf ein Objekt nach wiederholter Darbietung. Diese Reduktion der objektbezogenen explorativen Aktivität, i.d.R. 30-90 Minuten nach der ersten Darbietung gemessen, weist auf die Bildung eines Gedächtnisinhaltes hin, der die physikalischen Charakteristika des oder der Objekte abbildet und bei erneuter Darbietung zu einem Abruf und damit Wiedererkennen führt und somit erneute intensive Exploration inhibiert. Nach einem 24 Stunden Intervall sind Kontrollmäuse zu dieser Diskriminationsleistung nicht mehr fähig, so daß ein 24 Stunden Intervall zwischen den Darbietungen zur Einschätzung von promnestischen Effekten einer pharmakologischen oder Genintervention herangezogen werden kann (Puma et al., 1998). Nagetiere haben ein relativ breites Verhaltensrepertoire, so daß es auch möglich ist zu bestimmen, wie stark der Annäherungs-Vermeidungskonflikt der Tiere in Bezug auf Objekte ist. Tiere die sehr furchtsam sind, weisen mehr Risikoabwägungsverhalten auf das auf neue Objekte ausgerichtet ist. Dieses Verhalten stellt sich wie folgt dar: Das Tier nähert sich zunächst dem Objekt, macht aber einige Zentimeter vor diesem Halt, wobei der Kopf des Tieres in Richtung des Objektes zeigt und die Vibrissen sehr aktiv sind. Dann streckt es den Körper vorsichtig, wobei sich nur die Vorderpfoten nach vorne tasten, ohne daß jedoch ein Kontakt mit dem Objekt stattfindet, bis es dann unvermittelt zurückzuckt. Dieses Verhalten wiederholt sich i.d.R. einige Male, bis das Tier sich entweder vom Objekt abwendet oder schließlich den Kontakt sucht.

Objektexploration wird in einer Offenfeldanordnung untersucht. Das von uns genutzte Offenfeld ist eine quadratische Box (29 x 29 x 40 cm), die nach oben hin offen ist und aus grauem PVC besteht. Zwei identische Glasobjekte (mit einer Höhe von 12 cm und einem Durchmesser von 4 cm und ein Glasfläschen (das als neues Objekt dient), mit einer Höhe von ebenfalls 12 cm, aber einer anderen Form, wurden benutzt. Über der Box befand sich eine CCD-Videokamera, die an einem Videorekorder angeschlossen war und den Versuchsdurchgang dokumentierte. Diffuse Beleuchtung mit weißem Licht erzeugte eine Beleuchtungsstärke von ca. 0,3 Lux im Zentrum des Offenfeldes. Ein White-Noise Generator gewährleistete ein konstantes Rauschen von 25 dB/SPL, zur Maskierung von akustischen Störreizen.

### **3.4.5 Versuchsdurchführung**

Zwei identische Objekte wurden diametral in 2 Ecken des Offenfeldes, in einer über die Gruppen ausbalancierten Weise, an zwei aufeinanderfolgenden Tagen plaziert. Am dritten Tag wurde ein Objekt durch ein neues ersetzt. Die Mäuse wurden im Zentrum des Offenfeldes eingesetzt. Der Versuchsdurchgang dauerte 5 Minuten. Nach jedem Tier wurden Fäkalboli entfernt und das Offenfeld wie auch die Objekte mit 0,1 % Essigwasser gereinigt um olfaktorische Spuren (in der anglo-amerikanischen Fachliteratur als „Scent-Marking Behavior“ bezeichnet) zu entfernen bzw. zu maskieren. Behaltensintervalle von 24 Stunden zwischen den Testungen wurden benutzt, um promnestische Effekte der Genintervention detektieren zu können, weil bekannt ist, daß Nagetiere Objekte nach einem 24 stündigen Intervall nicht mehr wiedererkennen können und sie ebenso intensiv explorieren, wie bei der ersten Darbietung (Puma et al., 1998).

### **3.4.6 Abhängige Variablen**

Erhoben wurden folgende Verhaltensparameter: (1) Kontakte, die Anzahl der physischen Objektkontakte mit den Vorderpfoten, Vibrissen oder der Schnauze, (2) Annäherungs-Rückzugsreaktionen als Maß für objektinduzierte Furcht.

### **3.4.7 Darstellung der Versuchsdaten und statistische Auswertung**

In Tabelle 4 im Anhang sind die Rohwerte beider Gruppen aufgeführt. Zur graphischen und statistischen Aufbereitung der Daten wurden Gruppenmittelwerte und Standardabweichungen errechnet. Der Kolmogorov-Smirnov Anpassungstest ergab, das den Daten eine Normalverteilung zugrunde liegt (alle p-Werte > 0,1). Zwischengruppenvergleiche wurden mit dem T-Test für unabhängige Stichproben, Innergruppenvergleiche mit dem T-Test für abhängige Stichproben vorgenommen. Wenn nicht anders ausgewiesen, sind die p-Werte zweiseitig zu lesen und dienen in allen Fällen als deskriptives Maß des Effekts.

### 3.4.8 Ergebnisse

Die Anzahl der Kontakte mit den beiden identischen Objekten an Tag 1 und 2 war zwischen den Gruppen vergleichbar (Kontakte; Tag 1:  $p = 0,47$ ; Tag 2:  $p = 0,295$ ; einseitige Testung; T-Test für unabhängige Stichproben; Abb. 19).

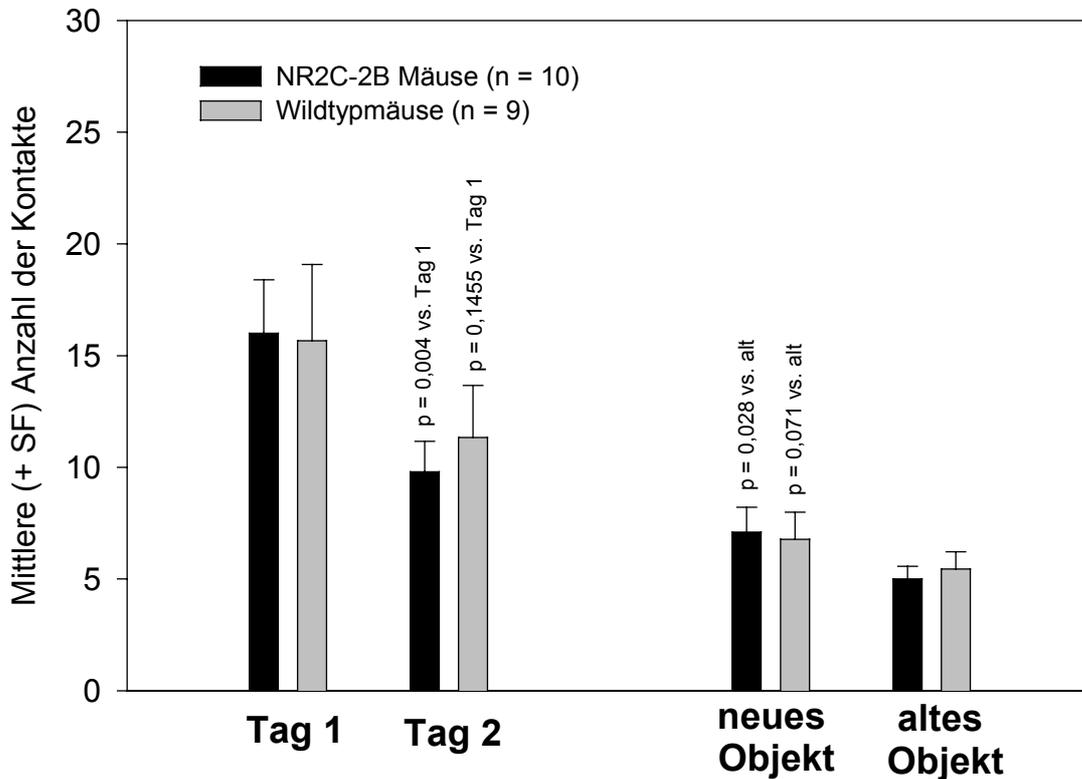


Abbildung 19: Anzahl der Kontakte mit 2 identischen Objekten an den Tagen 1 und 2 und mit einem neuen Objekt an Tag 3 für adulte NR2C-2B Substitutionsmäuse und Wildtypmäuse. P-Werte beziehen sich auf Innergruppenvergleiche (T-Test für abhängige Stichproben).

Allerdings zeigten die NR2C-2B Mäuse an Tag zwei in Relation zum Vortag weniger Kontakte mit den Objekten ( $p = 0,004$ ; einseitige-Testung; T-Test für abhängige Stichproben), wogegen bei den Kontrollmäusen, hypothesenkonform, diesbezüglich kein bedeutsamer Unterschied zu beobachten war ( $p = 0,1455$ ; einseitige Testung). Es ist also davon auszugehen, daß die Substitutionsmäuse an Tag 2 weniger Kontakte mit den Objekten aufzeigten, weil sie sich an diese Objekte erinnern konnten, wogegen die Kontrollmäuse ein Verhalten äußerten, das darauf hindeutet, daß die Objekte an Tag zwei nicht sicher identifiziert wurden und deshalb erneut stark exploriert werden mußten. An Tag drei zeigten, erwartungsgemäß, nur die NR2C-2B Mäuse eine deutliche Präferenz für das neue Objekt, nicht jedoch die

Wildtypmäuse, für die nur tendenziell mehr Kontakte mit dem neuen versus dem alten Objekt gefunden wurde (NR2C-2B:  $p = 0.028$ ; WT:  $p = 0.071$ ; einseitige Testung). Die Anzahl der Kontakte mit dem neuen ( $p = 0,428$ ; einseitige Testung; T-Test für unabhängige Stichproben) wie auch mit dem bereits bekannten Objekt ( $p = 0,331$ ; einseitige Testung) war jedoch zwischen den Gruppen vergleichbar. Der Vergleich der Summe der Annäherungs-Rückzugsreaktionen über alle 3 Testtage ergab, daß die NR2C-2B weit weniger objektinduzierte Furcht aufzeigten als die Wildtypmäuse ( $p = 0.046$ ; Abb. 20).

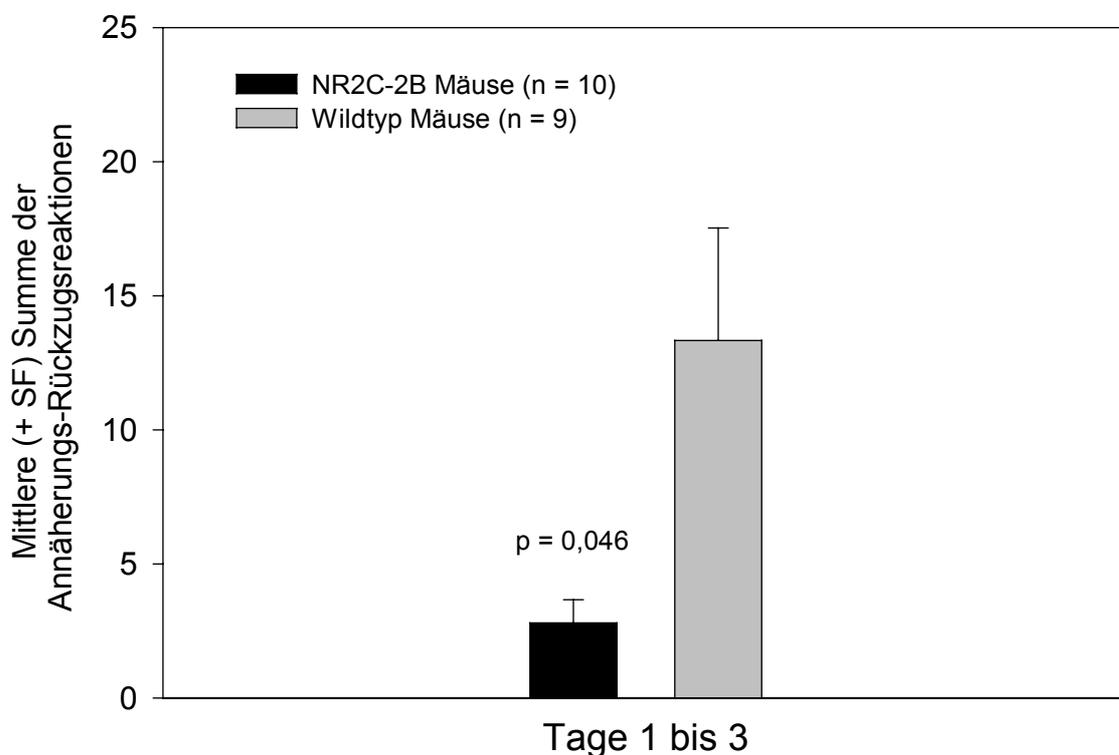


Abbildung 20: Objektinduzierte furchtkorrelierte Reaktionen der NR2C-2B und Wildtypmäuse. Der p-Wert bezieht sich auf einen Zwischengruppenvergleich (T-Test für unabhängige Stichproben).

Diese Befundlage scheint darauf hinzudeuten, daß die Substitutionsmäuse offenbar an Tag zwei die Objekte wiedererkannten (reduzierte Anzahl der Kontakte), wogegen zwei Darbietungen für eine deutliche Reduktion der Erkundungstätigkeit bei den Wildtypmäusen erwartungsgemäß nicht ausreichten. NR2C-2B Mäuse waren auch in der Lage nach einem 24 stündigen Behaltensintervall zwischen einem bekannten und einem neuen Objekt zu unterscheiden, wogegen Wildtypmäuse nur tendenziell mehr Kontakte mit dem neuen Objekt aufwiesen. Allerdings ist nicht mit Sicherheit

auszuschließen, daß die zwischen den Gruppen divergierende emotionale Reaktion auf Objekte, die oben beschriebenen Befunde mitbedingt hat. Allerdings bleibt anzumerken, daß im Elevated Plus-Maze keine reduzierte Ängstlichkeit der NR2C-2B Substitutionsmäuse gefunden wurde.

### **3.4.9 Diskussion**

Um promnestische Effekte der NR2C-2B Gensubstitution abbilden zu können wurde ein Design gewählt, bei dem erwartet wurde, daß die Substitutionsmäuse Gedächtnisleistungen erbringen, zu denen normale Kontrollmäuse unfähig sind. Dies wurde erreicht, in dem das zeitliche Intervall zwischen den Testungen von den üblichen 30-90 Minuten auf 24 Stunden verlängert wurde (Puma et al., 1998). Erwartungsgemäß waren Kontrolltiere nach 24 Stunden weder in der Lage 2 identische Objekte wiederzuerkennen, noch eindeutig zwischen einem „alten“ und einem „neuen“ Objekt zu diskriminieren, wogegen NR2C-2B Mäuse dazu imstande waren. Dieser höchst bemerkenswerte Befund deutet darauf hin, daß die NR2C-2B Gensubstitution nicht nur das „normale“ Repertoire an Gedächtnisleistungen von Mäusen verbessern kann, sondern vielmehr zu Gedächtnisleistungen befähigt, zu denen normale Kontrollmäuse aufgrund ihrer genetischen Grundausstattung gar nicht fähig sind. Unsere Resultate bestätigen die Annahme, daß eine Erhöhung der NR2B Expression in Vorderhirnstrukturen sich förderlich auf das Objektgedächtnis von Mäusen auswirkt und stützen auch die von Tang und Mitarbeitern, (1999) aufgebrachte (von der Fachwelt allerdings äußerst kontrovers diskutierte) Spekulation<sup>1</sup>, um die potenzielle Möglichkeit, die Intelligenz von Tieren mittels gentechnischer Eingriffe zu erhöhen. Allerdings muß in Hinblick auf die vorliegenden Befunde in Betracht gezogen werden, daß die Gruppen (NR2C-2B vs. Wildtypmäuse) auch Unterschiede in der emotionalen Reaktivität in Bezug auf Objekte aufwiesen und deshalb nicht von einem reinen Gedächtniseffekt auszugehen ist. <sup>1</sup> „Our results suggest that genetic enhancement of mental and cognitive attributes such as intelligence and memory in mammals is feasible“. Zitiert aus Tang et al., 1999, Nature 401, Zitiert aus der Zusammenfassung auf Seite 63.

### **3.5 Experiment V: Assoziatives räumliches Lernen von NR2C-2B Substitutionsmäusen im Morris Water-Maze**

#### **3.5.1 Einleitung**

NMDA-R sind für spezifische Formen hippokampaler synaptischer Plastizität und Lernleistungen in räumlichen Gedächtnisaufgaben relevant (Collingridge und Lester, 1989; Eichenbaum, 1999). In klassischen Studien von Richard Morris (Morris et al., 1989; Morris et al., 1986) wurde gezeigt, daß chronische intrazerebroventikuläre Infusion eines kompetitiven unspezifischen NMDA-R Antagonisten sowohl synaptische Langzeitpotenzierung wie auch räumliches Lernen im Morris Water-Maze, bei vergleichbarer Dosierung, beeinträchtigt und daß die Lerndefizite der Ratten nach NMDA-R Antagonisierung denen von hippokampalen Ratten ähneln. Nachteilige Effekte von NMDA-Antagonisten auf Lern- und Gedächtnisprozesse wurden auch in anderen, sehr unterschiedlichen Lernparadigmen, wie z.B. dem Radial-Maze (Kesner et al., 1993), der Habituation an einen Schreckreiz (Geyer et al., 1984), der aversiven Konditionierung (Davis et al., 1997; Murphy & Glanzman, 1997) der Prägung (McCabe et al., 1992), des Gedächtnisses für Gerüche (Staubli et al., 1989), dem visuellen Diskriminationslernen (Tang & Ho, 1988), der konditionierten Geschmacksaversion (Jackson & Sanger, 1989) und der passiven Vermeidung (Kim & McGaugh, 1992) beschrieben. Umgekehrt wirken NMDA-R Agonisten, wie z.B. D-Cycloserin (ein partieller Agonist der Glycinanbindungsstelle), bei Nagetieren wie auch Primaten promnestisch (Aura et al., 1998; Matsuoka & Aigner, 1996; Monahan et al., 1989) und können alterskorrelierte Lerndefizite abmildern (Baxter et al., 1994; Riekkinen & Riekkinen, 1997). Diese und andere Befunde legen nahe, daß NMDA-R offenbar unabhängig von den im Lernparadigma wirksamen Verstärkungskontingenzen (positiv vs. negativ), der Modalität des Reizmaterials oder der Komplexität der Aufgabe (explizites vs. implizites Lernen) bei Lern- und Gedächtnisprozessen spezieübergreifend aktiviert werden. Allerdings finden sich vereinzelt auch gegenläufige Befunde für z.B. promnestische Effekte nach NMDA-R Blockade (Gironi-Carnevale et al., 1990; Mondadori et al., 1989). Es ist gegenwärtig noch offen, ob NMDA-R nur an der Akquisition (Kurzzeitgedächtnis respektive Arbeitsgedächtnis), der Konsolidierung (Langzeitgedächtnis respektive Referenzgedächtnis) oder an beiden Stufen der Gedächtnisbildung beteiligt sind. Relativ sicher scheint, daß eine NMDA-R Blockade nach der Akquisitionsphase mit

dem Abruf von Gedächtnisinhalten aus dem Langzeitgedächtnis nicht interferiert (Day & Morris, 2001; Heale & Harley, 1990; Przybyslawski & Sara, 1997; Mondadori et al., 1989; Riedel et al., 1999; Shapiro & O'Connor, 1992; Sharma & Kulkarni, 1991; Shimizu et al., 2000; Sierocinska et al., 1991; Stiedl et al., 2000).

Native NMDA-Rezeptoren sind aus einer NR1 plus mindestens einer von 4 NR2 (A-D) (Kutsuwada et al., 1992) Untereinheiten oder den unlängst entdeckten NR3 Untereinheiten zusammengesetzt (Das et al., 1998). Die letztere Klasse an NMDA-R Untereinheiten ist jedoch noch unzureichend erforscht, scheint aber eher als inhibitorisches Element in heteromeren NMDA-Rezeptoren zu fungieren. Die NR2 Untereinheiten weisen ontogenetisch distinkte und regionsspezifische Expressionsmuster auf. Die Rolle verschiedener NMDA-R Subtypen bei Lern- und Gedächtnisprozessen konnte mangels selektiver pharmakologischer Werkzeuge nur unzureichend bestimmt werden. Mit dem Aufkommen gentechnologischer Methoden zur selektiven Inaktivierung einzelner oder mehrere Gene oder deren verstärkter Expression wurde das Rüstzeug geliefert, um auch diese Fragestellungen zu bearbeiten. Zunächst wurde von Tsien und Mitarbeitern (1996) die Rolle hippocampaler NMDA-R in der CA1 Region für synaptische Plastizität und Lern- und Gedächtnisprozesse bestimmt: NR1-CA1-pyramidenzellenspezifische Knockoutmäuse weisen in der CA1 Region keine NMDA-R medierten EPSC's, defizitäre synaptische Langzeitpotenzierung und synaptische Langzeitdepression auf. Erwartungsgemäß war auch das räumliche Lernen im Morris Water-Maze von CA1-NR1-/- Mäusen gestört (Tsien et al., 1996). Defizite wurden auch in Objektwiederkennung-, Geruchsdiskriminations-, und Furchtkonditionierungsaufgaben gefunden (Rampon et al., 2000). Die Involvierung hippocampaler NMDA-R in der CA1-Region in Gedächtniskonsolidierungsprozesse wurde mittels eines induzierbaren Knockouts untersucht. iCA1-NR1-/- Mäuse, denen unmittelbar nach der Trainingsperiode einer Water-Maze Aufgabe (WM), oder Furchkonditionierungsaufgabe (FK), eine Woche (WM) bzw. zwei Wochen (FK) lang, Doxycyclidin ins Trinkwasser beigemischt wurde, zeigten bei einem Behaltenstest 15 Tage (WM) bzw. 29 Tage (FK) nach dem Training eine schlechtere Leistung als iCA1-NR1-/- Vehikelmäuse, NR1+/+ Doxycyclidinmäuse und NR1+/+ Vehikelmäuse. Wenn das NR1 Gen 9 Tage (WM) bzw. 21 Tage (FK) nach dem Training inaktiviert wurde, war jedoch das Erlernete auch 15 Tage (WM) bzw. 29 Tage (FK) nach dem Training abrufbar. Aus diesen Befunden wurde gefolgert, daß CA1-NMDA-

Rezeptoren nicht nur für das anfängliche Lernen von Bedeutung sind (Akquisition), sondern auch für die post-training Konsolidierungsphase, die unmittelbar nach oder während des Trainings beginnt und offenbar mindestens eine Woche anhält (Shimizu et al., 2000). Etwa zeitgleich zu den NR1-Knockoutmäusen wurden NR2A Knockoutmäuse generiert. Die NR2A Untereinheit wird relativ zu den anderen NR2 Untereinheiten im Vorderhirn am stärksten exprimiert und sollte folglich zu einem ähnlichen Phänotyp wie die NR1-Knockoutmaus führen.

Für NR2A<sup>-/-</sup> Mäuse wurden auch tatsächlich reduzierte NMDA-R EPSC's und höhere LTP-Schwellen in der CA1-Region, Lerndefizite im Water-Maze (Sakimura et al., 1995) und einer Kontext-Furchtkonditionierung gefunden (Kiyama et al., 1998). Bemerkenswerterweise führte eine Deletion des intrazellulären C-Terminals der NR2A Untereinheit, an das Adapterproteine binden, die wiederum mit Funktionsproteinen interagieren, zum selben Phänotyp wie ein klassischer NR2A-Knockout (Sprengel et al., 1998). Es wurde gefolgert, daß NMDA-R über assoziierte Second Messengerkaskaden an der Gedächtnisbildung partizipieren.

Während NR2C<sup>-/-</sup> (Kadotani et al., 1996) und NR2D<sup>-/-</sup> Mäuse (Miyamoto et al., 2002) noch nicht in Bezug auf Gedächtnisleistungen untersucht wurden, zeigten NR2D Überexprimierungsmäuse keine Defizite im Water-Maze auf (Okabe et al., 1998).

Mit Hilfe von in vitro Zelltransfektionsstudien konnte gezeigt werden, daß Rezeptoren, die die NR2B Untereinheit integrieren, anders als solche, die die NR2C Untereinheit beherbergen, hohe Ca<sup>2+</sup>-Leitfähigkeiten, exzitatorische postsynaptische Potentiale (EPSP), starke Mg<sup>2+</sup>-Sensitivität und Bindungsstellen für Second Messenger Systeme aufweisen. Di-heteromere NR1-NR2B-Rezeptoren heben sich auch von solchen ab, die die NR2A Untereinheit aufweisen. NR1-NR2B-Rezeptoren erzeugen beispielsweise länger andauernde EPSP's, die möglicherweise der Koinzidenzdetektorfunktion des NMDA-R's zugute kommen. Folglich sind NR2B enthaltende NMDA-R besser als NR2A oder NR2C Untereinheiten ausgerüstet, um bestimmte Formen assoziativer bzw. heterosynaptischer synaptischer Langzeitpotenzierung (LTP) zu mediieren (Charton et al., 1999; Kornau et al., 1995; Nakanishi et al., 1994).

Mäuse, bei denen die NR2B Untereinheit überexprimiert wurde (mittels eines vorderhirnspezifischen  $\alpha$ -CaM-kinease II Promotor) zeigten u.a. verbessertes Lernen im Morris Water-Maze bei gleichzeitiger Reduktion hippokampaler Reizschwellen zur Induktion von CA1-LTP (Tang et al., 1999). Allerdings berichten diese Autoren auch

von einer generellen Erhöhung der Quantität von NMDA-R in Vorderhirnstrukturen der NR2B Überexprimierungsmäuse, so daß die NR2B Spezifität der Befunde noch ungeklärt ist.

Unser NR2C-2B Gensubstitutionsansatz sollte hingegen, einerseits, die Quantität der NMDA-R im Vorderhirn nicht beeinflussen, aber, andererseits, eine moderat ausgeprägte Verschiebung der Zusammensetzung von di- und tri-heteromeren NMDA-R zugunsten der NR2B Untereinheit in Vorderhirnstrukturen, einschließlich der hippokampalen Formation, gewährleisten. In NR2C-2B Substitutionsmäusen wurde folglich die proteinkodierende Sequenz des NR2C Gens durch die des NR2B Gens ersetzt, aber die natürliche Sequenz der regulierenden Einheiten (Promotorsequenz) des NR2C-Gens beibehalten (Pieri et al., 2003).

Weil bereits bekannt war, daß im Rahmen des Morris Water-Maze Paradigmas nicht-räumliches und räumliches Vortraining (in einer anderen Umgebung) (Bannerman et al., 1995; Saucier & Cain, 1995; Übersicht bei Cain et al., 1997; und Cain, 1998) die Anfälligkeit des räumlichen Lernsubstrats für nachfolgende pharmakologische NMDA-R Blockade und hippokampale LTP-Sättigung bei der Standardversion des Paradigmas („Hidden Platform Task“ bzw. „Place Learning“) beseitigt (Bannerman et al., 1995; Hoh et al., 1999; Moser et al., 1998; Otnaess et al., 1999), aber nach wie vor eine Lernschwäche induziert, wenn die Tiere täglich neue räumlichen Beziehungen erlernen müssen (Steele & Morris, 1999), nahmen wir an, daß eine moderate Erhöhung der NR2B Expression im Vorderhirn der NR2C-2B Mäuse (infolge der relativ zu NR2A und NR2B geringeren Expressionsrate der NR2C Untereinheit in Vorderhirnstrukturen von Wildtypmäusen; siehe Goebel und Poosch, 1999; Kuehl-Kovarik et al., 2000; und Lin et al., 1996), die Lernleistung von NR2C-2B Substitutionsmäusen sowohl in einer konventionellen Water-Maze Akquisitionsaufgabe als auch in einer multiplen Akquisitionsaufgabe, bei der im Zweitagesrhythmus die Navigation zu einer neuen Plattformposition erlernt werden muß, verbessern würde.

### **3.5.2 Fragestellungen**

Weisen die NR2C-2B Substitutionsmäuse verbessertes räumliches Lernen in einer Standardversion des Morris Water-Maze Paradigmas auf?

Ist durch die Gensubstitution der Abruf von überlernten bzw. hinreichend konsolidierten Informationen aus dem Langzeitgedächtnis beeinflusst worden?

Weisen die NR2C-2B Substitutionsmäuse verbessertes räumliches Lernen in einer multiplen Akquisitionsaufgabe des Morris Water-Maze auf?

Können veränderte sensu-motorische Fähigkeiten und/oder motivationale Faktoren, gemessen mit einer nicht-räumlichen Lernaufgabe (Cued version), eventuell gefundene Effekte der Gensubstitution auf räumliches Lernen erklären?

### **3.5.3 Versuchstiere**

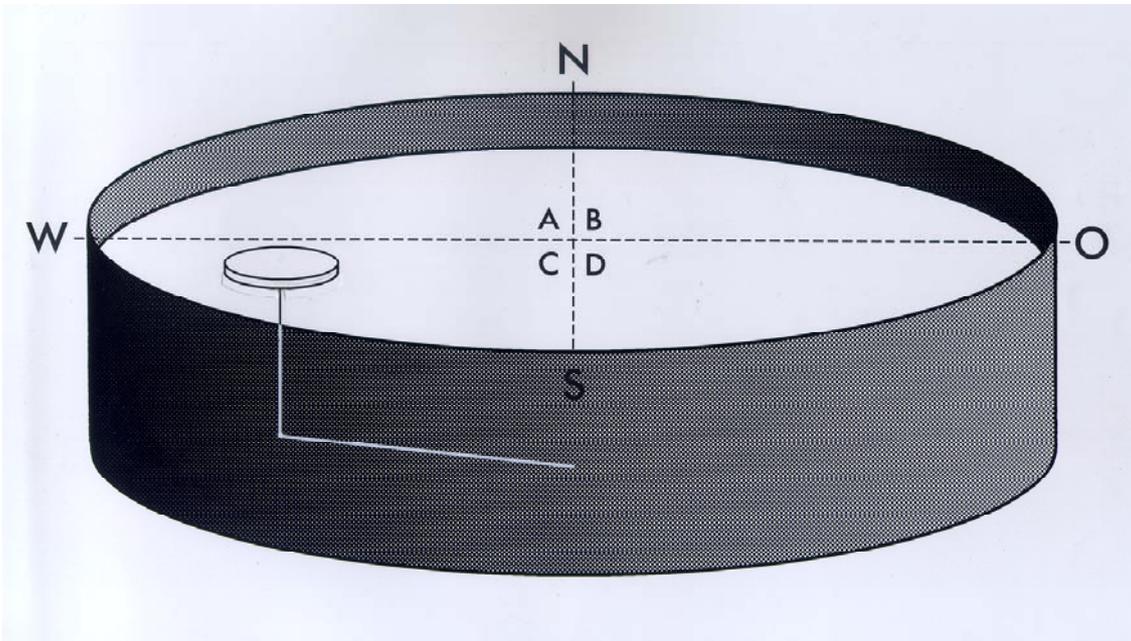
Als Versuchstiere dienten männliche adulte (MW:  $11,29 \pm 0,22$  Wochen alte;  $n = 10$ ) NR2C-2B Gensubstitutionsmäuse, wie auch (MW:  $11,60 \pm 0,03$  Wochen alte;  $n = 9$ ) Wildtypmäuse.

### **3.5.4 Rationale und Aufbau der Versuchsanordnung**

Im Rahmen der Gedächtnisforschung hat dieses Modell zentrale Bedeutung erlangt. Ursprünglich als Erweiterung bzw. als Alternative zum klassischen Stimulus-Response-Ansatz angelegt (Tolman, 1966), hat dieses Modell in Verbindung mit neueren Vorstellungen über den Zusammenhang zwischen Gedächtnis, Emotionalität und Verstärkungsprozessen (Dere et al., 2001; Huston 1982, Huston & Oitzl 1989) hohen Erklärungswert für komplexe Verhaltensabläufe erlangt (White; 1989; Packard & McGaugh, 1992).

In den letzten Jahren konnte, vor allem in Untersuchungen an Nagetieren, eine Vielzahl von genetischen, neuroanatomischen, pharmakologischen und neurochemischen Variablen identifiziert werden, die für das räumliche Gedächtnis der Säuger von Bedeutung sind (Dere et al., 2002a; Frisch et al., 2000; McNamara & Skelton 1993; Packard, 1998; Poucet & Benhamou, 1997; Schaaf et al., 2000; Silva et al., 1998; Zilles et al., 2000). Insbesondere die Identifizierung des hippocampalen Systems als notwendiges anatomisches Substrat für den Aufbau des räumlich-zeitlichen Gedächtnisses (Eichenbaum, 1999; Morris et al., 1982; Sutherland & McDonald, 1990) erweiterte das Verständnis vieler amnestischer Syndrome (Zola-Morgan et al., 1986; Alvarez & Squire 1994).

Das von uns genutzte Water-Maze ist ein kreisrundes schwarzes Bassin mit einem Durchmesser von 112 cm und einer Tiefe von 40 cm (Schemazeichnung 4).



Schemazeichnung 4: Schematische Darstellung der Morris Water-Maze Apparatur. Erläuterungen im Text.

Es wird auf eine Höhe von 25 cm mit Wasser (19-22° C) aufgefüllt und durch Zugabe von einem Liter haltbarer Milch getrübt. Das Wasser wurde täglich nach Versuchsende abgelassen. Das Water-Maze war in vier virtuelle Quadranten aufgeteilt. Die Kreuzungspunkte der Grenzlinien der Quadranten mit der Beckenwand indizieren die vier Startpunkte (Norden, Süden, Osten, Westen; willkürliche Bezeichnungen) an denen die Versuchstiere ins Wasserlabyrinth eingesetzt wurden. Im Zentrum eines Quadranten (28 cm von der Mazemitte entfernt) wurde nach dem Diktum des Versuchsplans eine kreisförmige Plastikplattform mit einer weiß gefärbten Oberfläche positioniert. Die Plattform (Durchmesser: 10 cm) bestand aus transparentem Plexiglas und war höhenverstellbar. Die Versuchsdurchgänge wurden auf Videobänder aufgezeichnet. Der Raum war diffus durch weißes Licht beleuchtet. Visuelle Reize, die zur Navigation genutzt werden konnten, waren vermutlich: Türen, Labortische, Apparaturen, Poster, Trennwände und die Deckentextur. Auch auditive Reize, generiert von einer Klimaanlage und einem breitspektrum Frequenzgenerator (Lautstärke c.a. 20 dB/Spl), die über die Testtage räumlich stabil gehalten wurden, konnten zur räumlichen Orientierung genutzt werden.

### **3.5.5 Durchführung und Auswertung**

Der Genotyp der Versuchstiere war dem Versuchsleiter während der Testung nicht bekannt. Vor Beginn der Testung im Wasserlabyrinth wurden die Mäuse aus dem Heimkäfig genommen und in einen Transportkäfig gesetzt, der auch als Inter-trial-Käfig diente, in dem die Tiere das einminütige Zeitintervall zwischen den Versuchsdurchgängen verbrachten. Die Tiere wurden mit senkrechter Körperachse und zur Beckenwand zeigendem Kopf an den 4 Startpunkten ins Wasser gelassen. Mit Ausnahme der Testtage: Habituation und Quadrantenpräferenz nach Akquisition durchlief jedes Tier im Rahmen der 4 Durchgänge der jeweiligen Testtage alle vier Startpunkte. Die exakte Abfolge der Startpunkte über die Durchgänge war über die Versuchstiere quasi-randomisiert. Für die Versuchstage mit einem einzigen Versuchsdurchlauf wurden die Startpositionen innerhalb der Versuchsgruppen so zugeordnet, daß sie möglichst gleich verteilt waren. Die Plattformposition wurde während der Akquisitionstage für jedes Tier konstant gehalten und zwischen den Gruppen auf die 4 Quadranten gleich verteilt. Nach Beendigung des letzten Tagesdurchgangs wurden die Tiere für ca. 15 Minuten in einem mit saugfähigen Papierhandtüchern ausgelegten Trockenkäfig verwahrt, bevor sie wieder in den Heimkäfig gesetzt wurden. Die Reihenfolge, in der die Versuchstiere getestet wurden, variierte täglich (adaptiert nach Morris, 1984).

### **3.5.6 Abhängige Variablen**

Als primäres Maß der Orientierungsleistung wurde die Suchzeit (in Sekunden) bis zum Erklimmen der Plattform analysiert.

### **3.5.7 Darstellung der Versuchsdaten und statistische Auswertung**

In Tabelle 5 im Anhang sind die Rohwerte beider Gruppen aufgelistet. Zur graphischen und statistischen Aufbereitung der Daten wurden Gruppenmittelwerte und Standardabweichungen errechnet. Der Kolmogorov-Smirnov Anpassungstest ergab, daß die Daten einer Normalverteilung entsprachen (alle p-Werte > 0,1). Zwischengruppenvergleiche über mehrere Meßpunkte wurden mit einfaktoriellen Varianzanalysen mit Meßwiederholung; solche über einzelne Meßpunkte und

abgeleitete Parameter mit T-Tests für unabhängige Stichproben; Innergruppenvergleiche mit dem T-Test für abhängige Stichproben, vorgenommen.

### **3.5.8 Versuchsdesign**

#### ***Adaptationsdurchgang (Tag 1):***

Die Mäuse wurden für 60 Sekunden in das Water-Maze, das keine Plattform enthielt, eingesetzt, um an die Testsituation zu habituierten.

#### ***Initiale Akquisitionsphase (Tage 2-5):***

Die Tiere wurden 4 mal á maximal 60 Sekunden, mit einem Inter-trial-Intervall von 1 Minute, ins Becken gesetzt. Die Plattform befand sich 0,5 cm unterhalb der Wasseroberfläche und war für die Tiere nicht sichtbar. Wurde die Plattform vor Ablauf der 60 Sekunden nicht aufgefunden, so wurden die Tiere für eine Dauer von 30 Sekunden auf der Plattform plziert. Ebenso konnten die Tiere nach dem Auffinden und Aufsteigen auf die Plattform für 30 Sekunden auf dieser verweilen. Im Falle des Abspringens, nach dem Erklettern der Plattform, wurden die Tiere wieder auf der Plattform plziert, bis die vollen 30 Sek. verstrichen waren. Erhoben wurde die Latenz bzw. Suchzeit bis zum Erreichen der Plattform, wobei das Latenzkriterium das Erklimmen der Plattform war.

#### ***Überlernphase (Tage 6-9)***

Die Plattformposition, wie auch die Testprozedur, an diesen Tagen war identisch zu der an den Tagen 2-5. Dieses zusätzliche Training sollte gewährleisten, daß zum Zeitpunkt der Testung des Abrufs aus dem Langzeitgedächtnis (Tag 16) mögliche Gruppenunterschiede nicht auf Ausgangslagenunterschiede zurückführbar sind. Auch sollte gewährleistet werden, daß Gruppenunterschiede während der multiplen Akquisitionsaufgabe nicht auf Ausgangslagenunterschiede, die schon während der initialen Akquisitionsaufgabe bestanden, zurückführbar sind (siehe auch Cain, 1997).

### ***Test auf Präferenz des Plattformquadranten (Tag 10):***

Am 10. Versuchstag wurden die Tiere einmal für 60 Sekunden ohne Plattform getestet. Gemessen wurde die Verweildauer im Plattformquadranten in Relation zu der Verweildauer in den restlichen Quadranten, die während der Akquisitions- und Überlernphase keine Fluchtmöglichkeit bieten.

### ***Abruf aus dem Langzeitgedächtnis (Tag 16):***

Nach einer Testpause von 6 Tagen wurde überprüft ob die Genintervention den Abruf von überlernten räumlichen Informationen aus dem Langzeitgedächtnis beeinflusst hat. Hierbei befand sich die Plattform wieder in dem Quadranten, in dem die Fluchtmöglichkeit auch schon während der initialen Akquisitionsphase positioniert war. Die Verhaltensmessung sowie der Versuchsaufbau entsprechen dem der initialen Akquisitionsphase. Als primäres Maß der Abrufleistung diente die Latenz des ersten Versuchsdurchgangs.

### ***Multiple Akquisitionsaufgabe (Tage 17-22):***

Während der Tage 17-22 lernen die Tiere die Plattform im Zweitagesrhythmus zunächst im diametral entgegengesetzten Quadranten, in Relation zum ursprünglichen Plattformquadranten, aufzufinden, dann im linken, und schließlich im rechten Quadranten. Jede neue Position wurde für zwei Tage mit 4 Durchgängen pro Tag dargeboten. Es wurde eine „Overall“ mittlere Akquisitionskurve, durch Mittelung von korrespondierenden Durchgängen der 3 Plattformpositionen, errechnet. Das heißt beispielsweise, daß die Suchlatenzen des jeweils ersten Durchganges des ersten Tages der Plattformen 1 bis 3 gemittelt wurden und damit einen von insgesamt 8 Meßpunkten lieferten, die sich aus jeweils 3 Einzelmessungen zusammensetzen. Der Meßpunkt 5 entsprach beispielsweise der Behaltensleistung bezüglich einer am Vortag erlernten räumlichen Beziehung zwischen Plattformposition und Umgebungsreizen über ein 24 Stunden Intervall. Es wurde erwartet, daß die Gruppen sich während des gemittelten ersten Durchgangs nicht unterscheiden, aber über die Durchgänge 2-4 unterschiedliche Suchzeiten aufweisen, was auf einen differentiellen Akquisitionsverlauf hindeuten würde. Es ist

leicht nachvollziehbar, daß dieses Design eine zeitlich exakt definierte Stimuluskontrolle und damit eine separate Messung der Akquisitionsleistung (Durchgänge 1-4 an Tag 1) und der Gedächtniskonsolidierungsleistung (Durchgang 5 an Tag 2) ermöglicht.

### ***Cued version (Tag 24):***

Die Plattform wurde mit einem kontrastreichen visuellen Hinweisreiz (ein Stab mit 0,5 cm Durchmesser und einer Höhe von 22 cm, der mit einem schwarz-weißen Streifenmuster versehen war) versehen und in der Mitte des Maze positioniert. Die Durchführung entsprach der initialen Akquisitionsphase. Der Test diente zur Detektion von visuellen, visuomotorischen, motorischen und motivationalen Defiziten bzw. von sogenannten „Gain of Function“ Effekten, insbesondere um auszuschließen, daß Leistungsunterschiede, die während der Testphasen mit verborgener Plattform eventuell gefunden wurden, auf nicht-kognitive Faktoren zurückzuführen sind.

## **3.5.9 Ergebnisse**

### ***Initiale Akquisitionsphase***

Beide Gruppen, sowohl die NR2C-2B als auch die Wildtypmäuse, zeigten eine bedeutsame Reduktion der Suchzeiten von Durchgang eins auf Durchgang 16, d.h. lernten die im Wasser verborgene Plattform anhand von distalen Umgebungsreizen zu lokalisieren (NR2C-2B:  $p = 0,001$ ; WT:  $p = 0,001$ ; T-Test für abhängige Stichproben; Abb. 21).

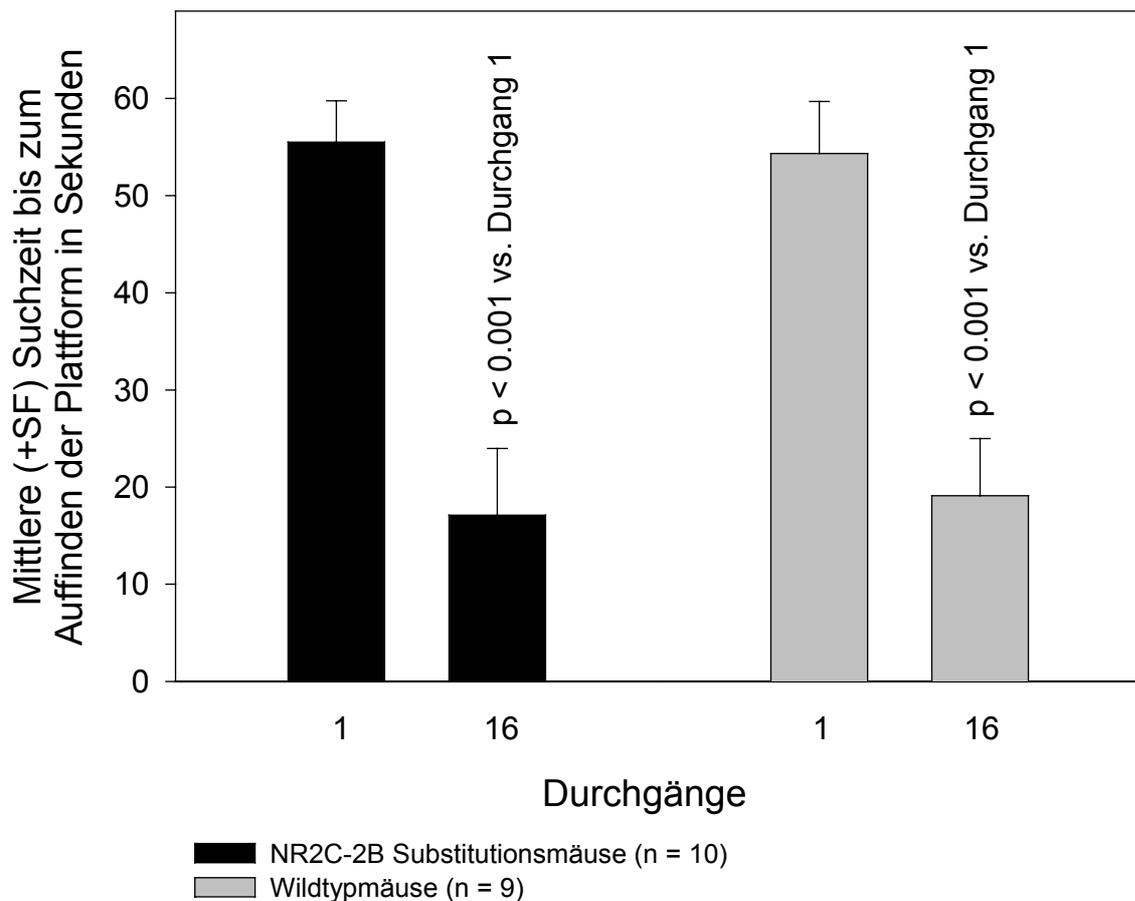


Abbildung 21: Vergleich der Suchzeiten bis zum Auffinden der verborgenen Plattform von Durchgang 1 des ersten Versuchstages mit Durchgang 16 des vierten Versuchstages während der initialen Akquisitionsphase für NR2C-2B Substitutionsmäuse und Wildtypmäuse. Die p-Werte beziehen sich auf Innergruppenvergleiche (T-Test für abhängige Stichproben).

Während dieser initialen Akquisitionsphase an den Tagen 1 bis 4 fanden die NR2C-2B Substitutionsmäuse über alle 16 Durchgänge im Mittel mit kürzeren Suchzeiten zur Plattform als die Kontrollen [ $F_{(1,17)} = 2,881$ ;  $p = 0,054$ ; einseitige Testung; Varianzanalyse mit Meßwiederholung; Abb. 22].

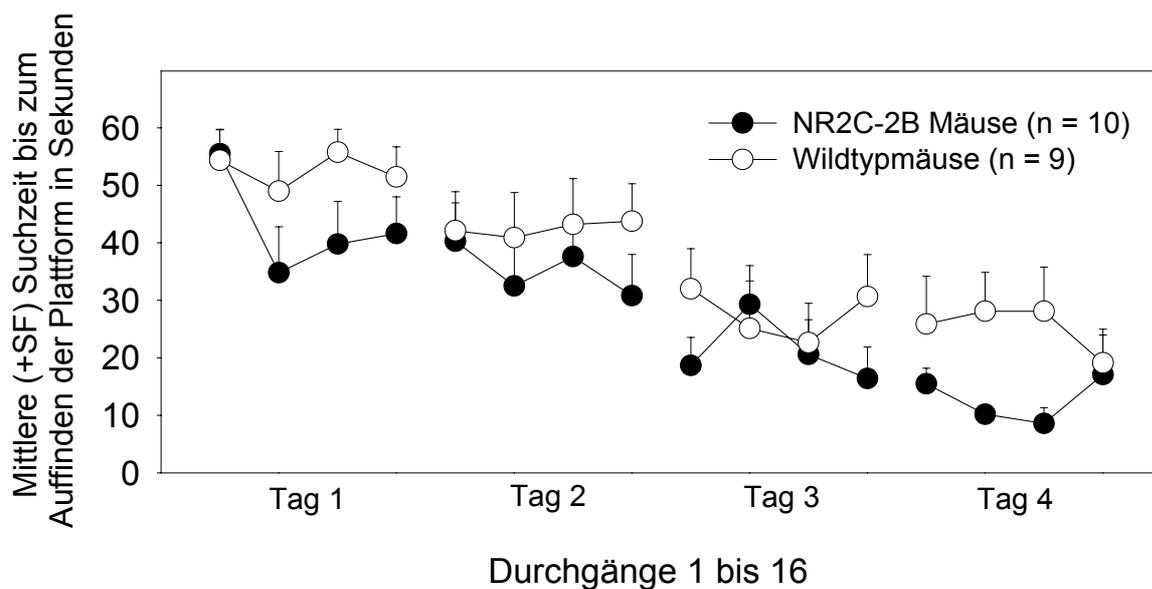


Abbildung 22: Suchzeiten bis zum Auffinden einer verborgenen, räumlich invarianten, Plattform im Morris Water-Maze während der initialen Akquisitionsphase für NR2C-2B und Wildtypmäuse.

Dieser Befund deutet darauf hin, daß die Gensubstitution tatsächlich räumliches Lernen im Morris Water-Maze erleichtert.

### **Überlernphase**

Um vergleichbare Ausgangslagen zu Beginn eines Abrufttests nach einem 6 tägigen Behaltensintervalles und den nachfolgenden Testphasen zu gewährleisten, wurden die Tiere für weitere 4 Tage mit insgesamt 16 Durchgängen trainiert. Im Gegensatz zur initialen Akquisitionsphase verbesserte sich die Leistung der NR2C-2B und Wildtypmäuse von Durchgang 1 auf Durchgang 16 nicht mehr wesentlich (NR2C-2B:  $p = 0,337$ ; WT:  $p = 0,115$ ; T-Test für abhängige Stichproben; Abb. 23).

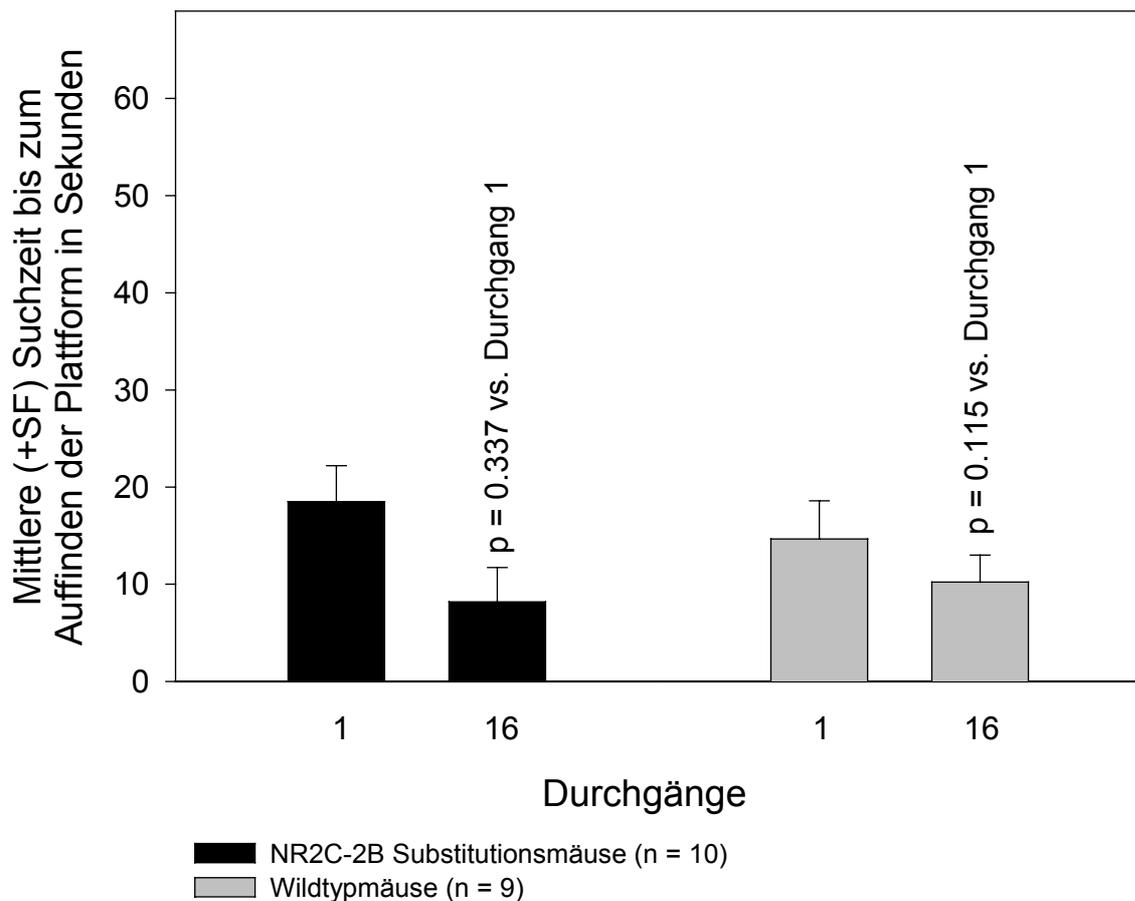


Abbildung 23: Vergleich der Suchzeiten bis zum Auffinden der verborgenen Plattform von Durchgang 1 auf Durchgang 16 während der Überlernphase mit räumlich invarianter verborgener Plattform für NR2C-2B Substitutionsmäuse und Wildtypmäuse. Die p-Werte beziehen sich auf Innergruppenvergleiche (T-Test für abhängige Stichproben).

Über die 4 Tage fand sich folglich auch kein bedeutsamer Gruppenunterschied mehr [ $F_{(1,17)} = 0,270$ ;  $p = 0,610$ ; Varianzanalyse mit Meßwiederholung; Abb. 24], so daß davon auszugehen war, daß auch die Wildtypmäuse ein finales Leistungsniveau erreicht haben, das dem der Substitutionsmäuse vergleichbar war.

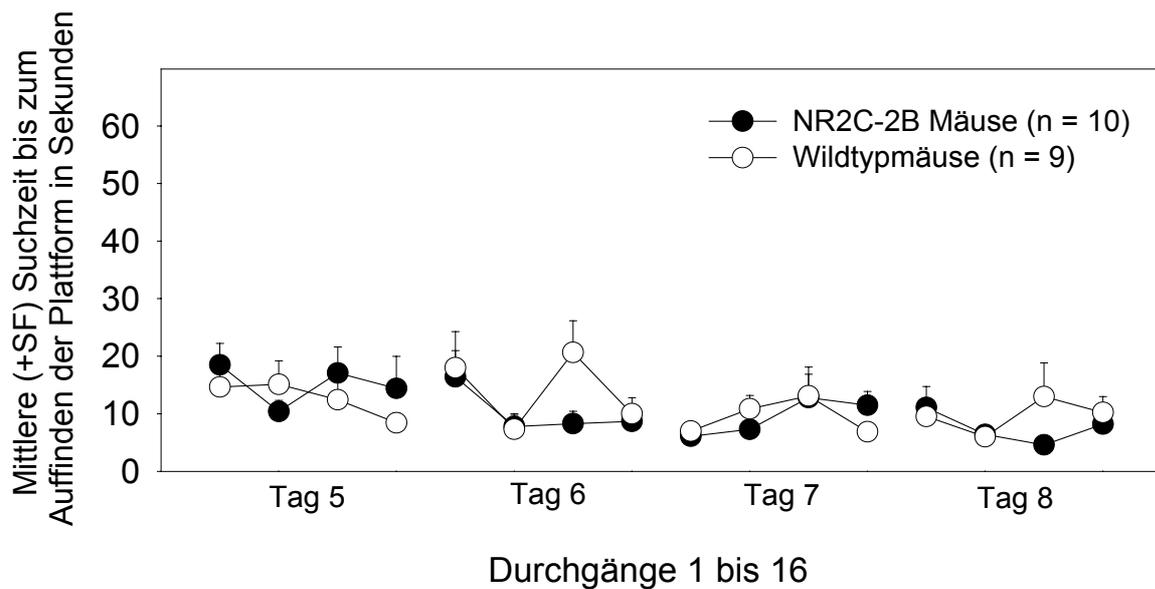


Abbildung 24: Suchzeiten bis zum Auffinden einer verborgenen, räumlich invarianten, Plattform im Morris Water-Maze während der Überlernphase für NR2C-2B und Wildtypmäuse.

### ***Test auf Plattformquadrantenpräferenz***

Beide Gruppen konzentrierten ihr Suchverhalten auf den ehemaligen Plattformquadranten in Relation zu den restlichen Quadranten (NR2C-2B:  $p = 0,002$ ; WT:  $p = 0,003$ ; T-Test für abhängige Stichproben). Die Gruppen verbrachten jedoch im Mittel vergleichbare Zeiten im Plattformquadranten ( $p = 0,500$ ; T-Test für unabhängige Stichproben; Abb. 25).

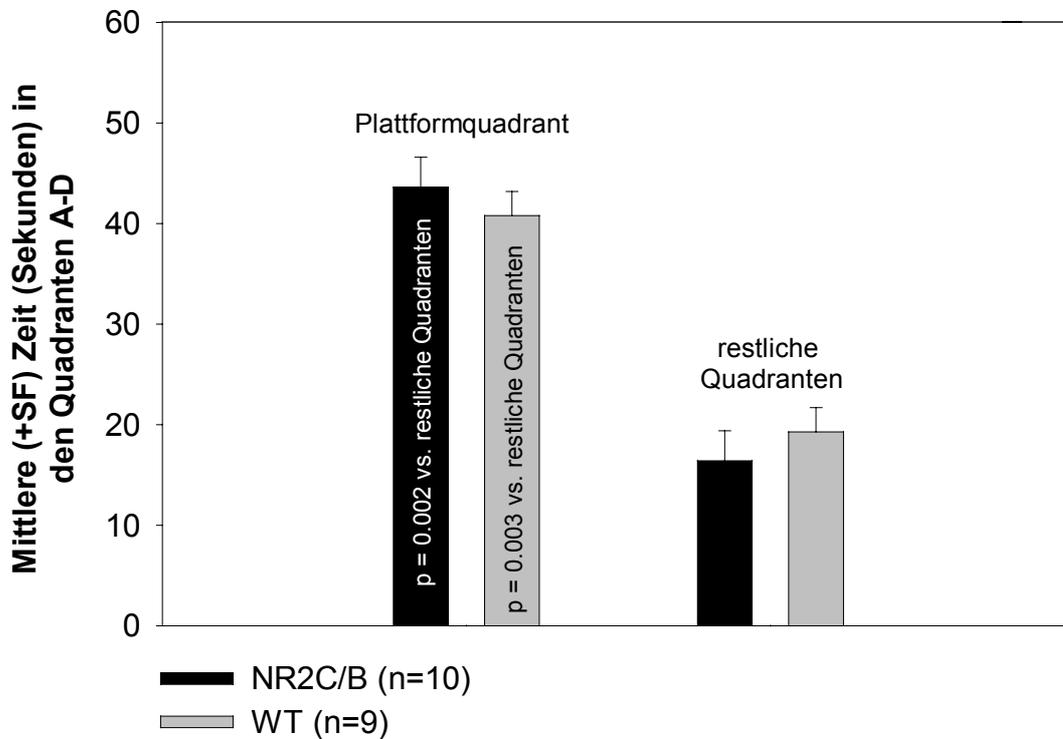


Abbildung 25: Test auf Quadrantenpräferenz während eines 60 sekündigen Durchgangs ohne Plattform nach initialer Akquisition und Überlernphase mit insgesamt 32 Durchgängen. Mittlere Suchzeiten im ehemaligen Plattformquadranten im Vergleich mit den restlichen Quadranten für NR2C-2B und Wildtypmäuse. P-Werte beziehen sich auf Innergruppenvergleiche (T-Test für abhängige Stichproben).

### ***Abruf von räumlichen Informationen aus dem Langzeitgedächtnis***

Nach einer Testpause von 6 Tagen wurde der Abruf der überlernten räumlichen Information aus dem Langzeitgedächtnis überprüft. Die Gruppen unterschieden sich weder im ersten Durchgang noch in den 3 folgenden Durchgängen (alle p-Werte > 0,1; T-Test für unabhängige Stichproben; Abb. 26).

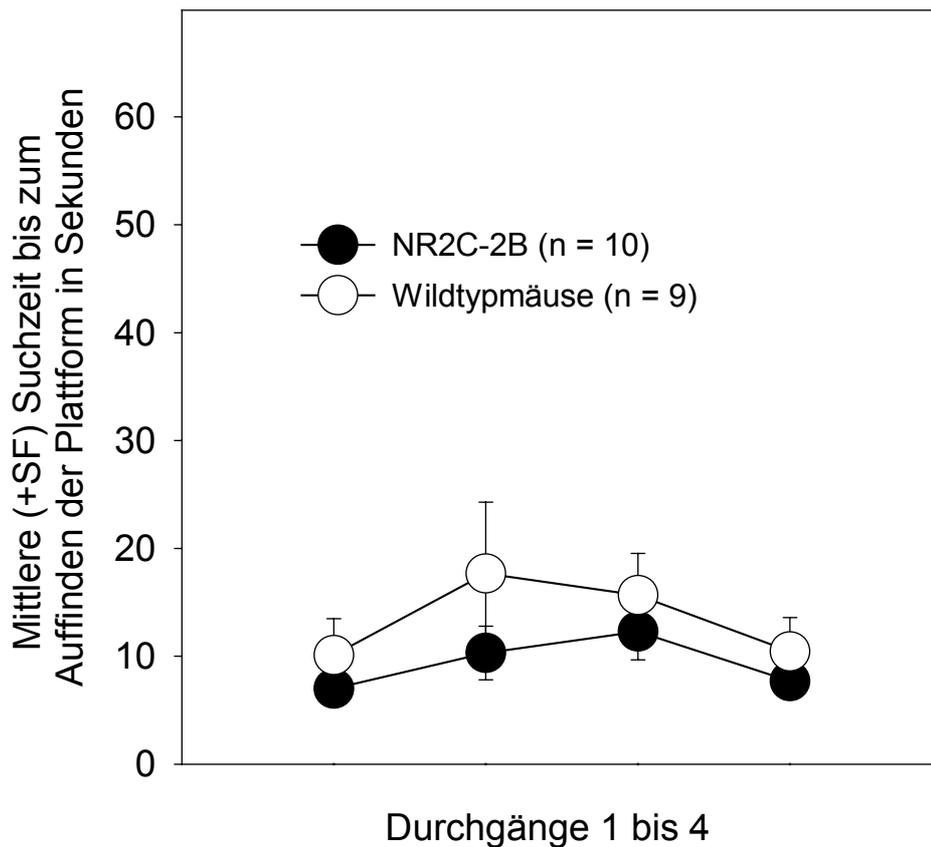
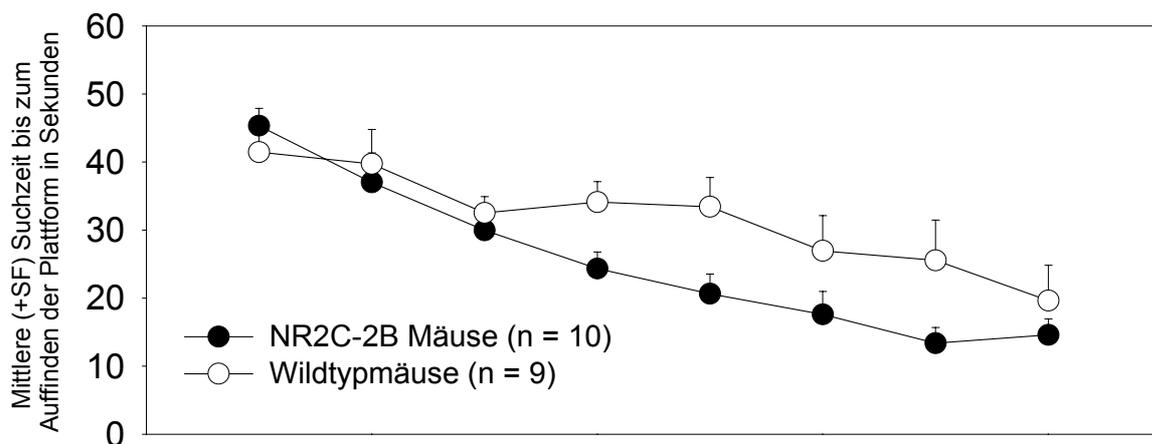


Abbildung 26: Abrufftest aus dem Langzeitgedächtnis nach einer Testpause von 6 Tagen. Suchzeiten bis zum Auffinden der Plattform für NR2C-2B und Wildtypmäuse.

### **Multiple Akquisitionsaufgabe**

Einen Tag nach dem Abrufftest wurden die Gruppen im Zweitagesrhythmus mit 3 neuen Plattformpositionen konfrontiert, deren räumliche Position in Relation zu Umgebungsreizen über insgesamt 8 Durchgänge erlernt werden sollte. Wie auch in der initialen Akquisitionsphase wiesen die NR2C-2B Substitutionsmäuse kürzere Suchzeiten bis zu Auffinden der insgesamt 3 Plattformpositionen auf [ $F_{(1,17)} = 3,442$ ;  $p = 0,040$ ; einseitige Testung; Varianzanalyse mit Meßwiederholung; Abb. 27].



Durchgänge 1 bis 8  
Mittelwert der Suchzeiten über 3 Meßpunkte

Abbildung 27: Mittlere Akquisitionsleistung während der multiplen Akquisitionsaufgabe mit insgesamt 3 verschiedenen Plattformpositionen für NR2C-2B Substitutionsmäuse und Wildtypmäuse.

Der Vergleich der mittleren Suchzeiten über die 3 Plattformpositionen am letzten Durchgang des ersten Tages ergab, daß die Substitutionsmäuse eine kürzere Zeit suchen mussten, bis sie zu den Plattformen aufklettern konnten ( $p = 0.014$ ; T-Test für unabhängige Stichproben; einseitige Testung), wogegen, erwartungsgemäß, am ersten Durchgang kein Gruppenunterschied vorlag ( $p = 0,364$ ; Abb. 28).

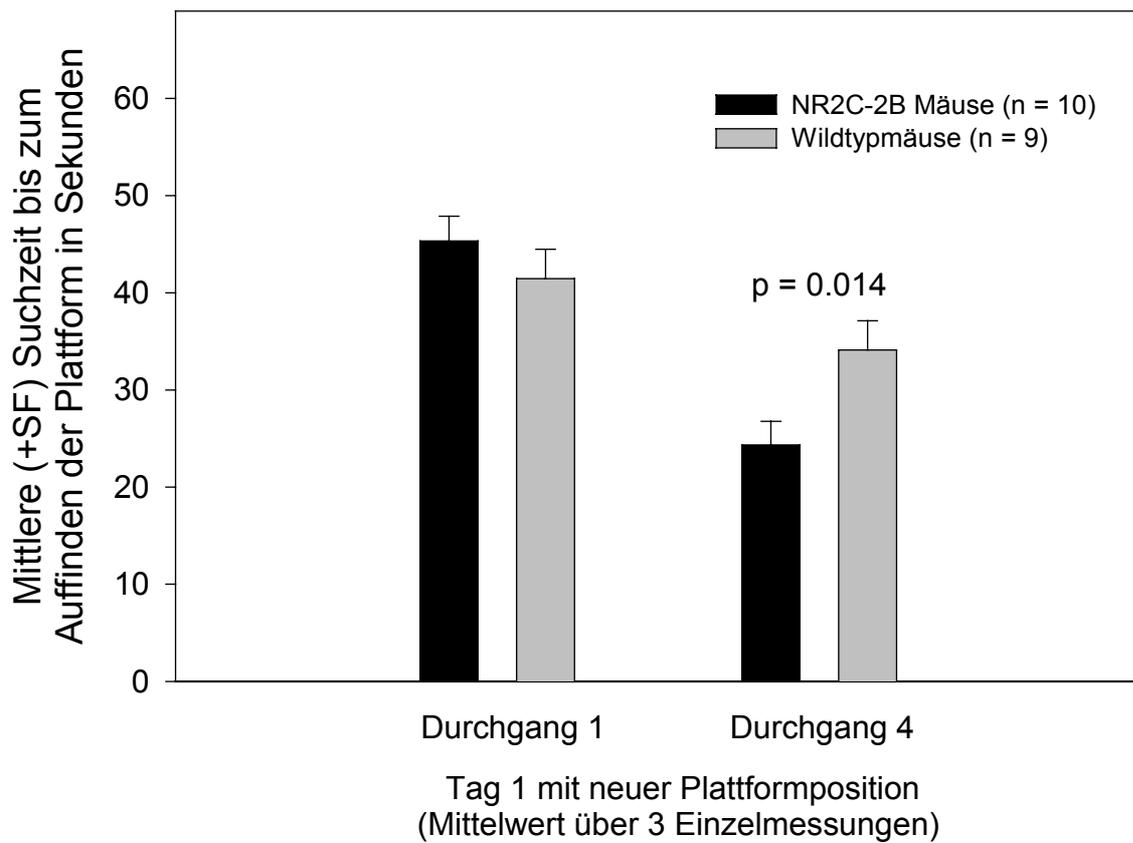


Abbildung 28: Mittlere Suchzeiten während des ersten und letzten Durchgangs des ersten Akquisitionstages mit neuen Plattformpositionen für NR2C-2B Substitutionsmäuse und Wildtypmäuse. Der p-Wert bezieht sich auf einen Zwischengruppenvergleich (T-Test für unabhängige Stichproben).

Innergruppenvergleiche von Durchgang eins auf vier ergaben, daß die NR2C-2B Mäuse beim letzten Durchgang mit kürzeren Suchzeiten zur Plattform fanden als am ersten ( $p = 0,001$ ; T-Test für abhängige Stichproben, wogegen die Kontrollmäuse keine entsprechende Leistungsverbesserung aufwiesen ( $p = 0,206$ ). Am ersten, zweiten und dritten Durchgang des zweiten Tages wiesen die Substitutionsmäuse erneut kürzere Suchzeiten auf als die Kontrollmäuse (Durchgang 1:  $p = 0,015$ , Durchgang 2:  $p = 0,081$ ; Durchgang 3:  $p = 0,038$ ; T-Test für unabhängige Stichproben; einseitige Testung). Bis zum letzten Durchgang des zweiten Tages lernten auch die Kontrolltiere die Plattform mit vergleichbaren Suchzeiten aufzufinden ( $p = 0,201$ ; einseitige Testung; Abb. 29).

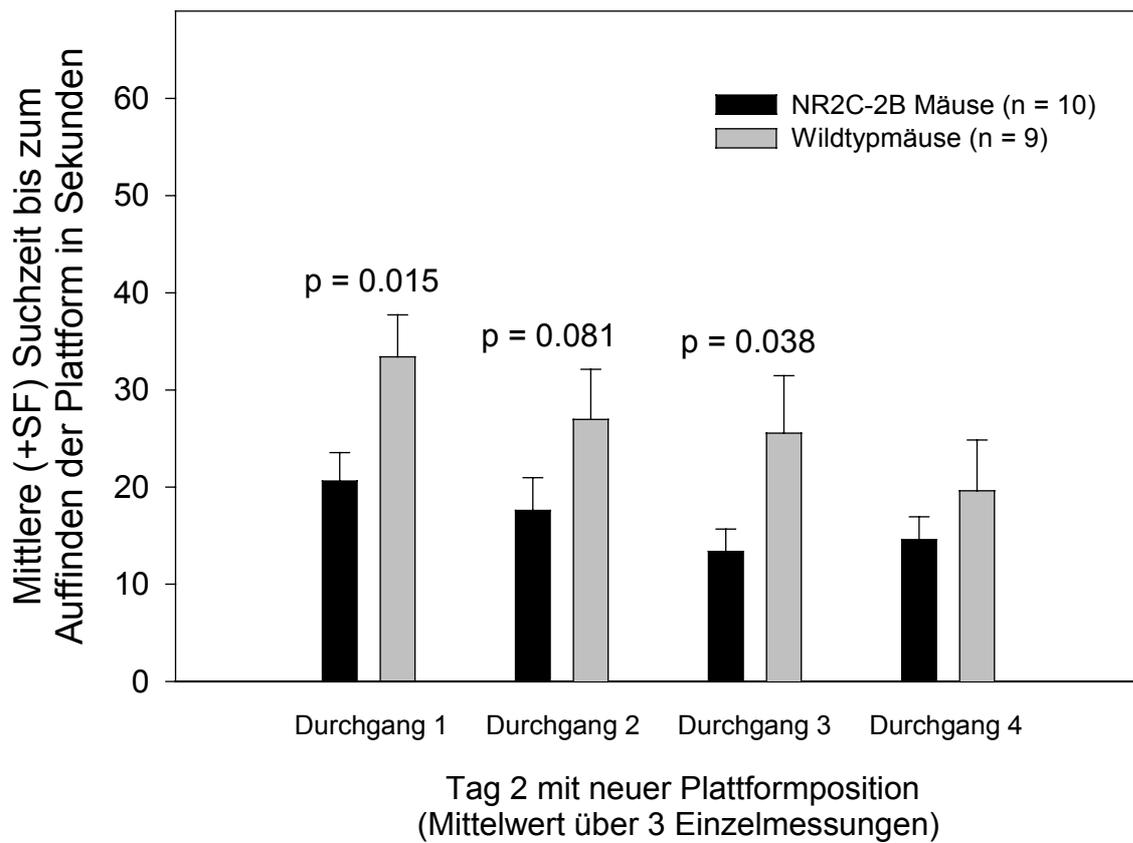


Abbildung 29: Mittlere Suchzeiten während der Durchgänge des zweiten Akquisitionstages mit neuen Plattformpositionen für NR2C-2B Substitutionsmäuse und Wildtypmäuse. Die p-Werte beziehen sich auf Zwischengruppenvergleiche (T-Test für unabhängige Stichproben).

Da die Kontrollmäuse im Verlauf der Durchgänge des zweiten Tages einen Lerngewinn aufwiesen, während die Lernkurve der Substitutionsmäuse bereits asymptotisch verlief, wurde durch Innergruppenvergleiche der Durchgänge 1 versus 4 an Tag zwei untermauert (NR2C-2B:  $p = 0,206$ ; WT:  $p = 0,004$ ; T-Test für abhängige Stichproben).

### ***Cued Version: Test mit visuell angezeigter Plattformposition***

Während dieser Testphase wurde die Plattform mit einem kontrastreichen diskriminativen Hinweisreiz versehen und ins Zentrum des Bassins verschoben. In diesem Test auf motivationale oder sensumotorische Aberrationen wurde kein bedeutsamer Unterschied zwischen den Gruppen vorgefunden [ $F_{(1,17)} = 1,725$ ;  $p = 0,207$ ; Varianzanalyse mit Meßwiederholung; Abb. 30].

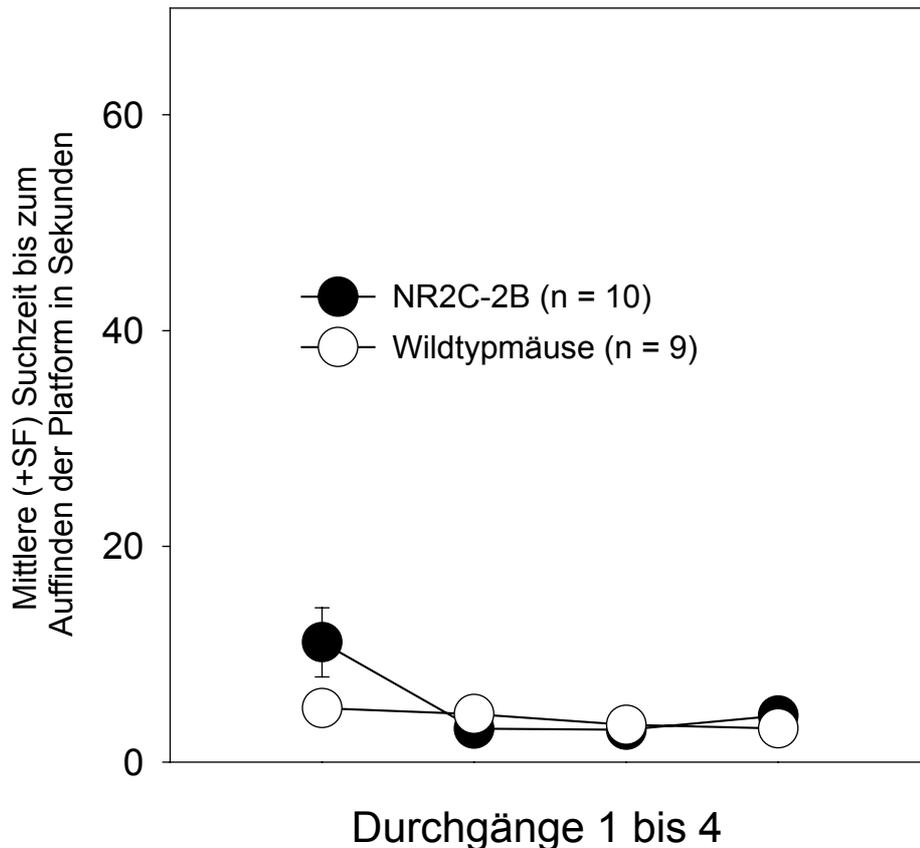


Abbildung 30: Mittlere Suchzeiten während der Durchgänge mit visuell angezeigter Plattformposition für NR2C-2B Substitutionsmäuse und Wildtypmäuse.

Damit ist mit relativer Sicherheit davon auszugehen, daß die in den vorangegangenen Testphasen gefundenen Unterschiede vermutlich nicht auf sekundäre, d.h. nicht-kognitive Faktoren, zurückzuführen sind.

### 3.5.10 Diskussion

Im Morris Water-Maze Test zeigten die NR2C-2B Substitutionsmäuse eine beschleunigte Akquisition einer konventionellen "Hidden Platform" Aufgabe (Durchgänge 1-16), waren aber bei einem Abruffest nach einem Retentionsintervall von 6 Tagen mit den Kontrollmäusen vergleichbar. Der letztere Befund steht im Einklang mit Studien die zeigen, daß untereinheitsunspezifische NMDA-R Blockade den Abruf räumlicher Informationen nach einer Akquisitionsphase (ohne pharmakologische Intervention) nicht beeinflusst (Heale & Harley, 1990). Auch

konditionale Knockoutmäuse, bei denen das NR1 Gen selektiv in der CA3-Region des Hippokampus inaktiviert wurde, weisen keine Abrufdefizite für räumliche Informationen auf, wenn der Abruf im gleichen räumlichen Kontext erfolgte (Nakazawa et al., 2003).

Während der multiplen Akquisitionsaufgabe mit insgesamt 3 neu zu erlernenden, im Wasser verborgenen, Plattformpositionen, zeigten die NR2C-2B Mäuse erneut eine beschleunigte Akquisition. Die Wildtypmäuse benötigten insgesamt 8 Lerndurchgänge mit einer neuen Plattformposition, um auf das finale Leistungsniveau der Substitutionsmäuse aufzuschließen. Die Überlegenheit der NR2C-2B Mäuse während der initialen Akquisitionsphase, bei der die Navigation zur ersten verborgenen Plattformposition erlernt werden mußte, steht in Einklang mit den Water-Maze Leistungen von NR2B Überexprimierungsmäusen (Tang et al., 1999). Allerdings kann die Leistung unserer und der NR2B Überexprimierungsmäuse in dieser initialen Akquisitionsphase nicht ausschließlich einer verbesserten räumlichen Gedächtnisbildung zugeschrieben werden, weil die Geninterventionen möglicherweise nur prozedurales Lernen oder "Use of platform learning", d.h. das Erlernen der grundlegenden "Regeln" der Aufgabe, verbessert hat. Diese "Regeln" sind nach Cain (1998) beispielsweise das Beenden des Abschwimmens der Bassinbegrenzung und das Explorieren der inneren Annuli des Mazes, das Wissen um die verborgene Plattform im Maze, das Erklettern und Sitzenbleiben auf dieser bis der Durchgang beendet ist, das Vermeiden von Deflektionen oder "Swim overs" über die Plattform, die Auswahl und Nutzung von geeigneten visuellen, akustischen und olfaktorischen Hinweisreizen aus der Mazeumgebung zur Navigation, das Wissen darum, daß der Durchgang nach dem Aufklettern auf die Plattform beendet wird, möglicherweise das Überkommen eines Annäherungs-Vermeidungskonflikts in Bezug auf die Plattform bei kurzen Inter-Trial Intervallen etc. Während Tang und Mitarbeiter, (1999) dieser Möglichkeit nicht nachgegangen sind, haben wir die NR2C-2B Mäuse, nach dem diese die prozeduralen Aspekte der Aufgabe während einer initialen Akquisitionsphase mit nachfolgender Überlernphase mit insgesamt 36 Durchgängen bei räumlich stabiler Plattform gelernt haben, einer multiplen Akquisitionsaufgabe unterzogen. Mit dem Ergebnis, daß die NR2C-2B Mäuse auch nach dem Überlernen der prozeduralen Aspekte der Aufgabe in beiden Gruppen an neue räumliche Probleme besser adaptieren. Um abzuklären, ob diese Verbesserung des räumlichen Lernvermögens der Substitutionsmäuse möglicherweise auf einer

"Gain of Function"-Wirkung der Genintervention hinsichtlich visueller, oder motivationaler Faktoren beruht, wurden die Tiere nach der multiplen Umlernaufgabe auch in einer sogenannten "Cued Version" Aufgabe getestet, in der die, nach wie vor verborgene aber erneut räumlich verschobene Plattform, durch einen kontrastreichen visuellen Hinweisreiz kenntlich gemacht wurde. In dieser Kontrollbedingung unterschieden sich die Gruppen nicht. Unsere Befunde deuten darauf hin, dass eine für das Vorderhirn geringfügige Verlagerung des Verhältnisses einzelner NMDA-Rezeptortypen, zugunsten solcher, die die NR2B Untereinheit integrieren, räumliches Lernen und Umlernen im Morris Water-Maze verbessern kann. Die vorliegenden Resultate bekräftigen weiter die Auffassung, daß die NR2B Untereinheit, vermutlich gemeinsam mit der NR2A Untereinheit, dem NMDA-R die geeigneten biophysischen Charakteristika verleiht, um als Koinzidenzdetektor fungierend diejenigen strukturellen Veränderungen an den neuronalen Synapsen zu induzieren, die der Gedächtnisbildung möglicherweise zugrundeliegen. Unsere Resultate sind des weiteren vereinbar mit Studien die zeigten, daß junge Nagetiere mit niedrigen Reizschwellen zur Induktion von assoziativer LTP und gutem räumlichen Lernvermögen hohe hippocampale NR2B-Expressionsraten aufweisen, wogegen das Gegenteil für alte und kognitiv beeinträchtigte Nagetiere gefunden wurde (Adams et al., 2001; Magnusson, 2000). Gleichermaßen führt eine hippocampale LTP Induktion zu vermehrter NR2B-Expression, deren Ausprägungsgrad mit der Stärke der induzierten LTP kovariiert (Thomas et al., 1996; Williams et al., 1998). Neuere Befunde deuten darauf hin, daß hippocampale NMDA-R im Rahmen des Morris Water-Maze Paradigmas möglicherweise nicht nur für räumliches Lernen per se (wissen wo die Plattform aufzufinden ist und wie die Motorik auf visuelle Ziele hin ausgerichtet werden muß, um dorthin zu gelangen; McNaughton et al., 1986; Morris et al., 1986) bedeutsam sind, sondern besonders dann unerlässlich sind, wenn die Aufgabe so gearret ist, daß die Tiere auch behalten müssen, wo die Plattform in jüngster Vergangenheit plazierte war, z.B. wenn die Lokation der Plattform täglich variiert, so daß räumliche Gedächtnisinhalte in einen raum-zeitlichen Kontext eingegliedert werden müssen, um proaktive Interferenzen zu vermeiden (Eichenbaum, 1999; Steele & Morris, 1999). Es ist davon auszugehen, daß diese Fähigkeit auch im Rahmen unserer multiplen Akquisitionsaufgabe gefordert war. Deshalb ist es durchaus denkbar, daß bei unseren NR2C-2B Mäusen die Fähigkeit, räumliche Informationen in einen zeitlichen Kontext zu integrieren,

verbessert war, eine Leistung, die dem was man in der kognitiven Psychologie gemeinhin als episodisches bzw. biographisches Gedächtnis oder in der angloamerikanischen Fachliteratur als „Event Memory“ bezeichnet (Lisman, 1999; Bussey et al., 1999), sehr nahekommt. Im Einklang mit dieser Interpretation steht die Beobachtung, wonach systemische Phencyclidininjektionen die Leistung von Ratten in einer kombinierten räumlich-zeitlichen Diskriminationsaufgabe im Radial-Maze verschlechtert (Long & Kesner, 1995).

### **3.6 Experiment VI: Post-Mortem Hirnazetylcholin- und Cholinkonzentrationen**

#### **3.6.1 Einleitung**

Der Neurotransmitter Azetylcholin wurde in der Vergangenheit in Verbindung mit Lern- und Gedächtnisprozessen diskutiert (Muir, 1997; Smith, 1988); u.a. weil die Alzheimersche Demenz mit einer Hypofunktion des cholinergen Systems, infolge von degenerativen Prozessen und dem damit einhergehenden Verlust cholinergischer Zellen, im Nukleus basalis von Meynert (NBM), dem diagonalen Band von Broca, und dem Nukleus medialis septalis, (der den Hauptursprung cholinergischer Projektionen zum Hippokampus bildet) assoziiert ist (Bartus et al., 1982, Bartus et al., 1985; Francis & Bowen, 1994; Whitehouse et al., 1982). Die mit der Alzheimerschen Erkrankung einhergehende kognitive Verlangsamung wird mit wechselhaftem Erfolg durch Pharmaka (z.B. Tacrin®) behandelt, die in die cholinerge Neurotransmission heraufregulierend eingreifen (Sahakian et al., 1993; Knapp et al., 1994). Azetylcholin ist ein Überträgerstoff, der auf einer frühen Stufe der Informationsverarbeitung und damit auch während der Enkodierung von Informationen für das Langzeitgedächtnis wirksam sein könnte (Muir, 1997; Rusted & Warburton, 1989). Gegenwärtig wird davon ausgegangen, daß die Gedächtnisdefizite von Alzheimer-Patienten die Folge von Störungen in Aufmerksamkeitssystemen sind, die durch die reduzierte cholinerge Signalübertragung, besonders in frontalen Kortextbereichen hervorgerufen werden (Blokland, 1995; Sarter et al., 1996).

Azetylcholin senkt kortikale Erregungsschwellen für sensorischen Input und verbessert damit das Signal-Rauschverhältnis und damit grundlegende Informationsverarbeitungsprozesse (Marchi & Raiteri, 1989; McCormick, 1992; Sarter et al., 1996). Eine große Anzahl pharmakologischer Studien belegt, daß eine zentrale

Erhöhung der cholinergen Neurotransmission durch Gabe von cholinergen Rezeptoragonisten oder Abbauhemmern mit verbesserten Gedächtnisleistungen, und eine Blockade cholinergere Rezeptoren, oder eine Hemmung der Azetylcholinsynthese, wie auch selektive Läsionen von cholinergen Zellen, mit Lerndefiziten assoziiert sind (Übersicht bei Decker et al., 1991 und Levin, 1992; siehe auch Voytko, 1996; Winkler et al., 1995). Cholinerge Zellen im NBM im basalen Vorderhirn und im Septum innervieren den gesamten Neokortex und limbische Strukturen, wie z.B. den Hippokampus und die Amygdala. Die Ursprungskerne cholinergere Zellen weisen eine hohe Dichte an NMDA-R auf. NMDA-R Agonisten, nicht jedoch AMPA-R Antagonisten, in den NBM injiziert, erhöhen die Azetylcholinfreisetzung in kortikalen und subkortikalen Strukturen (Giovannini et al., 1997; Wenk, 1984). Administration von NMDA, oder anderen NMDA-R Agonisten, in den NBM verbessert dagegen das räumliche Gedächtnis von Nagetieren (Mason et al., 1999) und kann bei systemischer Kogabe die amnestischen Effekte einer Muskarinrezeptorantagonisierung egalieren (Sirvio et al., 1992). Des weiteren wurde gezeigt, daß eine kombinierte Gabe einer nicht verhaltenswirksamen Dosis von MK-801, gemeinsam mit einer effektiven Dosis Nikotin, die promnestischen Effekte dieser Dosis Nikotin blockieren kann (Ciamei et al., 2001). Umgekehrt blockiert eine subeffektive Dosis Nikotin die amnestischen Effekte von MK-801 auf Arbeits- und Referenzgedächtnisleistungen (Levin et al., 1998). Auch wurde gefunden, daß Azetylcholin hippokampale, amygdaläre und neokortikale NMDA-R mediierte synaptische Langzeitpotenzierung moduliert (Boyd et al., 2000; Matsuyama et al., 2000; Watanabe et al., 1995). Besonders hervorzuheben sind Befunde, wonach NMDA-R Agonisten und Antagonisten den Azetylcholinmetabolismus im Hippokampus, dem frontalen Kortex und Neostriatum von freibeweglichen Tieren modulieren (Zapata et al., 1998). Die oben referierten Befunde weisen darauf hin, daß NMDA-R mediierte Funktionen durch Azetylcholin moduliert werden und daß NMDA-R Aktivität den Azetylcholingehalt in Vorderhirnstrukturen beeinflusst.

Im medialen Septum, einem cholinergen Ursprungskern, wurde sowohl NR2C mRNA als auch das Protein selbst u.a. in gabaergen Interneuronen identifiziert (Plant et al., 1997). Es ist denkbar, daß die NR2C-2B Gensubstitution die Erregbarkeit von cholinergen Zellen und möglicherweise auch deren Azetylcholinmetabolismus beeinflusst und sich auf AzetylcholinKonzentrationen in diversen Zielgebieten dieser Neurone auswirkt.

### **3.6.2 Fragestellungen**

Beeinflusst die NR2C-NR2B Substitution die Erregbarkeit und den Azetylcholinmetabolismus cholinergener Neurone in den Ursprungskernen des cholinergen Systems im basalen Vorderhirn und führt dadurch zu veränderten Azetylcholin- und oder CholinKonzentrationen in Neokortikalen und Subkortikalen Regionen?

### **3.6.3 Versuchstiere**

Als Versuchstiere dienten männliche adulte (MW:  $19,43 \pm 0,22$  Wochen alte,  $n = 10$ ) NR2C-2B Gensubstitutionsmäuse, wie auch adulte (MW:  $19,74 \pm 0,04$  Wochen alte,  $n = 9$ ) Wildtypmäuse.

### **3.6.4 Biochemische Analyse mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie und elektrochemischer Detektion (HPLC-EC)**

Zwei Wochen nach Beendigung der Verhaltenstests wurden Azetylcholin und Cholin Konzentrationen in diversen Hirngebieten bestimmt. Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet, das Gehirn unmittelbar herauspräpariert und auf einer gekühlten Hirnmatrix plaziert. Koronalschnitte wurden unter Zuhilfenahme von Referenzpunkten an der Hirnbasis vorgenommen und folgende Strukturen: frontaler Kortex, ventrales Striatum, dorsales Striatum, Hippokampus, Amygdala, wurden auf einem gekühlten Objektträger bilateral herausgeschnitten. Danach wurde das Hirngewebe gewogen, in einer gekühlten Standardlösung (0,5 N Perchlorsäure mit Ethylhomocholin als internen Standard) homogenisiert, zentrifugiert, gefiltert und bei  $-60$  °C bis zur Analyse aufbewahrt (gemäß der Prozedur nach Sethy & Francis, 1988). Die Proben wurden entsprechend des Verfahrens von Damsma et al., (1987), mit Aushahme des internen Standard (Potter et al., 1983), analysiert (für weitere technische Details siehe De Souza-Silva et al., 1997; De Souza-Silva et al., 2000).

### **3.6.5 Darstellung der Versuchsdaten und statistische Auswertung**

In Tabelle 6 im Anhang sind die Rohwerte beider Gruppen aufgelistet. Zur graphischen und statistischen Aufbereitung der Daten wurden Gruppenmittelwerte und Standardabweichungen errechnet. Der Kolmogorov-Smirnov Anpassungstest ergab, daß die Daten einer Normalverteilung entsprachen (alle p-Werte  $> 0,1$ ) Zwischengruppenvergleiche wurden mit dem T-Test für unabhängige Stichproben vorgenommen.

### **3.6.6 Ergebnisse**

Im frontalen Kortex ( $p = 0.032$ ; T-Test für unabhängige Stichproben) und in der Amygdala ( $p = 0.029$ ) der NR2C-2B Mäuse wurden erhöhte AzetylcholinKonzentrationen gefunden. Die AzetylcholinKonzentrationen (Abb. 31) in den restlichen Hirnregionen wie auch die CholinKonzentrationen (Abb. 32) waren zwischen den Gruppen vergleichbar (alle p-Werte  $> 0,1$ ). Die NR2C-NR2B Substitution hat also tatsächlich den Azetylcholinmetabolismus cholinergener Neurone in den Ursprungskernen des cholinergen Systems im basalen Vorderhirn moduliert und dadurch zu veränderten AzetylcholinKonzentrationen in neokortikalen und subkortikalen Regionen geführt. Die Verhaltensrelevanz dieser Befunde wird im Folgenden diskutiert.

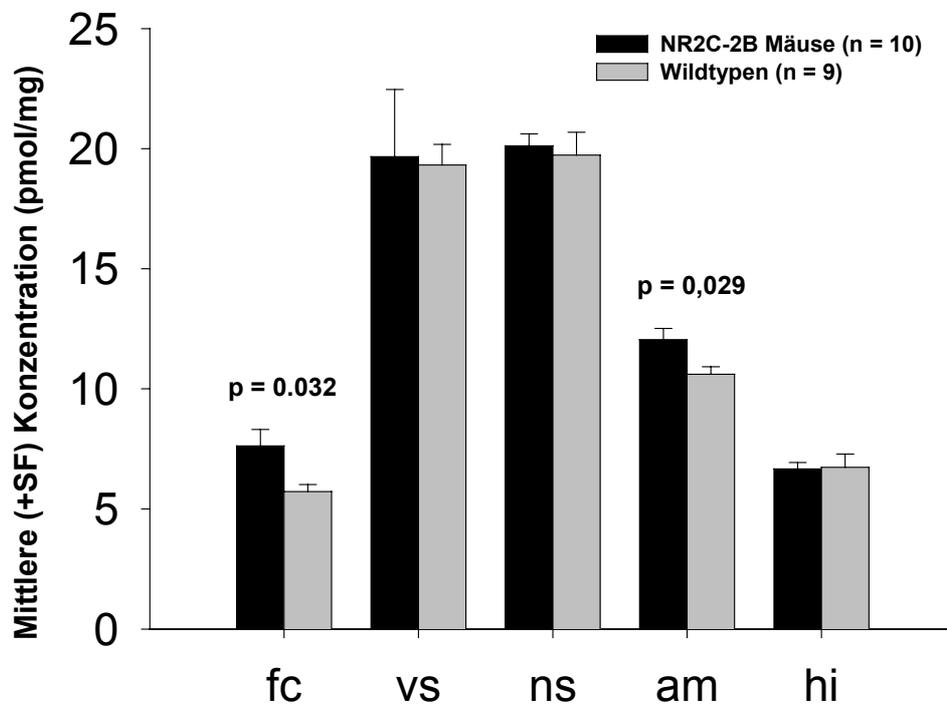


Abbildung 31: Post-mortem GehirnazetylcholinKonzentrationen der NR2C-2B und Wildtypmäuse in entsprechenden Hirnstrukturen. Fc = frontaler Kortex, vs = ventrales Striatum, ns = neostriatum, am = Amygdala, hi = Hippokampus. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf Zwischengruppenvergleiche (T-Test für unabhängige Stichproben).

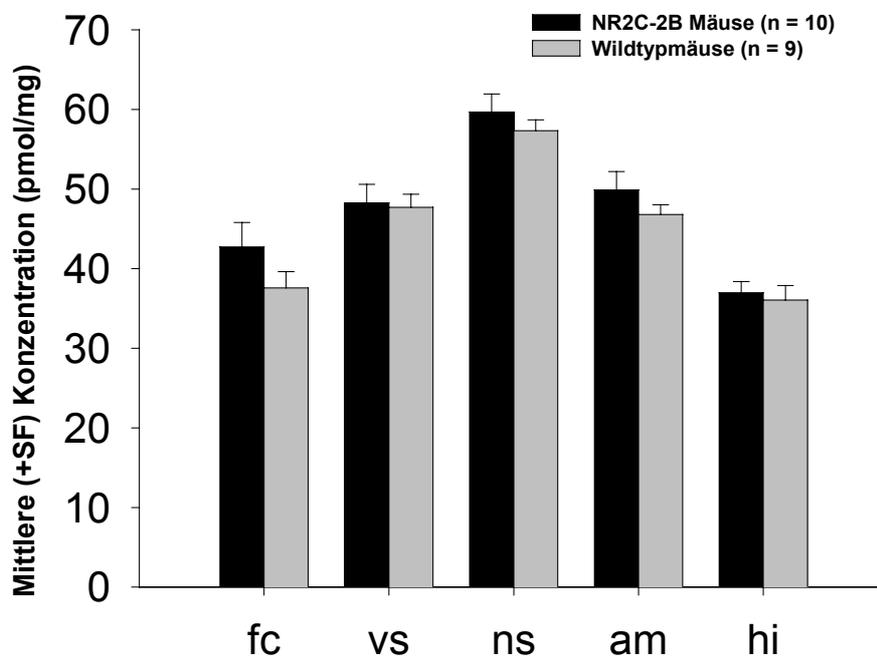


Abbildung 32: Post-mortem GehirncholinKonzentrationen der NR2C-2B und Wildtypmäuse in entsprechenden Hirnstrukturen. Fc = frontaler Kortex, vs = ventrales Striatum, ns = neostriatum, am = Amygdala, hi = Hippokampus.

### 3.6.7 Diskussion

Die für NR2C-2B Substitutionsmäuse gemessene erhöhte post-mortem AzetylcholinKonzentration im frontalen Kortex steht möglicherweise mit den verbesserten Lern- und Gedächtnisleistungen der NR2C-2B Mäuse in Verbindung. Es ist vermutet worden, daß kortikale Azetylcholinfreisetzung mit erhöhter Aufmerksamkeit bzw. einem rezeptiven Zustand einhergeht, der das Aufnehmen neuer Informationen fördert (Himmelheber et al., 2000; Sarter & Bruno, 1997). Gleichmaßen ist gefunden worden, daß beim Abruf bereits gespeicherter Informationen die Azetylcholinfreisetzung im Neokortex gehemmt wird, möglicherweise um Interferenzen mit irrelevanten Störreizen aus der Umgebung zu vermeiden (Sarter et al., 1996). Mittels der in vivo Mikrodialysetechnik konnte gezeigt werden, daß Ratten, die in eine neue Umgebung gesetzt werden, erhöhte Azetylcholinfreisetzung im frontalen Kortex aufweisen (Giovannini et al., 1998). Ebenso ist gezeigt worden, daß cholinerge Agonisten NMDA-R abhängige Formen synaptischer Langzeitpotenzierung begünstigen können (Boyd et al., 2000; Hamid et al., 1997; Maeda et al., 1993; Matsuyama et al., 2000; Watanabe et al., 1995). In Neuroimagingstudien mit Alzheimer-Patienten wurde eine signifikante Korrelation zwischen der Quantität nikotinerger Azetylcholinrezeptoren im frontalen Kortex und dem Schweregrad kognitiver Defizite dieser Patienten gefunden (Nordberg et al., 1995). Es ist also denkbar, daß die Erhöhung frontaler AzetylcholinKonzentrationen die akute Akquisitionsleistung der NR2C-2B Substitutionsmäuse, durch verbesserte Aufmerksamkeitsprozesse, gefördert und möglicherweise auch die permanente neokortikale Speicherung der erlernten Informationen durch Begünstigung von Prozessen neokortikaler Plastizität verbessert hat. Azetylcholin Agonisten erhöhen auch die Erregbarkeit amygdalärer Neurone. Die Amygdala weist starke reziproke Projektionen zum Hippokampus auf und scheint die hippokampale Gedächtnisbildung, besonders bei aversiv motivierten Lernaufgaben, zu modulieren (Izquierdo et al., 1992; Richter-Levin & Akirav, 2000). Auch wurde spekuliert, daß die im Hippokampus gebildeten multidimensionalen Gedächtnisinhalte durch amygdaläre Projektionen um eine emotionale Färbung bereichert werden (Cahill & McGaugh, 1998). Kürzlich ist gezeigt worden, daß amygdaläre Azetylcholinfreisetzung positiv mit der Leistung von Ratten in einer hippokampal medierten räumlichen Lernaufgabe korreliert (McIntyre et al., 2003). Schließlich finden sich Befunde, die suggerieren,

daß das zentrale cholinerge System für räumliche Umlernprozesse kritisch ist, (in Situationen also, in denen erhöhte Aufmerksamkeit und verminderte Interferenzneigung gefordert ist) (Boyd et al., 1990; Puolivali et al., 2000). Es ist also möglich, daß die für die NR2C-2B Mäuse gefundenen erhöhte post-mortem AzetylcholinKonzentrationen im frontalen Kortex und der Amygdala zu den verbesserten Leistungen der NR2C-2B Mäuse während der initialen und multiplen Akquisitionsphase im Morris Water-Maze beigetragen haben. Allerdings bleibt zu berücksichtigen das post-mortem HPLC-EC Messungen von AzetylcholinKonzentrationen im Gehirn nicht zwischen freigesetztem extrazellulärem und intrazellulärem in Vesikel gespeichertem Azetylcholin unterscheiden können. Erhöhte AzetylcholinKonzentrationen bedeuten nicht zwingend das auch vermehrt Azetylcholin in den entsprechenden Hirnregionen freigesetzt wird. Ebenso ist es möglich das die Gensubstitution die intrazelluläre Synthese erhöht hat oder das freigesetztes Azetylcholin vermindert durch cholinesterasen abgebaut wird ohne das die Freisetzungsrates per se erhöht wurde. Nur mittels der in-vivo Mikrodialysetechnik kann schlussendlich der Nachweis erbracht werden, das die NR2C-2B Gensubstitution tatsächlich die Erregbarkeit cholinergischer Ursprungszellen erhöht hat und damit in Lernsituationen mit Neuheitswert zu vermehrter Azetylcholinfreisetzung führte. Allerdings bleibt auch zu bedenken, das die in-vivo Mikrodialysetechnik bei Mäusen nur sehr schwierig anzuwenden ist. Weltweit gelang es bisher nur wenigen Arbeitsgruppen diese Methodik bei Mäusen erfolgreich anzuwenden.

#### 4. ALLGEMEINE DISKUSSION

Wir haben gefunden, daß die NR2C-2B Gensubstitution u.U. in Abhängigkeit von Reifungsprozessen des Gehirns mit motorischen Koordinationsdefiziten (adulte NR2C-2B Mäuse) und erhöhter unkonditionierter Ängstlichkeit einhergeht (juvenile NR2C-2B Mäuse). In adulten NR2C-2B Mäusen fanden sich verbesserte Lern- und Gedächtnisleistungen. Schließlich fanden sich auch erhöhte AzetylcholinKonzentrationen in frontalen Kortextbereichen und der Amygdala der NR2C-2B Mäuse. Die vorliegenden Befunde sind vermutlich nicht auf Entwicklungsaberrationen in Vorderhirnstrukturen, infolge von pränataler NR2C-2B Gensubstitution zurückzuführen, weil die NR2C Untereinheit (soweit gegenwärtig bekannt ist) offenbar erst post-natal exprimiert wird. Mit relativer Sicherheit kann diese Möglichkeit jedoch nur nach der Phänotypisierung einer induzierbaren NR2C-2B Substitutionsmaus (bei der die Gensubstitution erst nach dem 3. Lebensmonat vorgenommen wird) ausgeschlossen werden, die leider gegenwärtig noch nicht verfügbar ist.

Ein wesentlicher Nachteil des NR2C-2B Gensubstitutionmodelles ist, daß man nicht mit Bestimmtheit sagen kann, ob die Effekte auf einer Abwesenheit der NR2C Untereinheit und/oder der NR2B Überexpression beruhen, oder ob sie die Konsequenz einer veränderten Funktionsweise von NMDA-R in Zellen sind, die normalerweise beide Untereinheiten aufweisen, aber nach Gensubstitution NR2B anstelle von NR2C exprimieren. Es ist auch denkbar, daß die Effekte Folge einer Expression der NR2B Untereinheit in Zellen sind, die im Normalzustand keine NR2B Untereinheit aufweisen. Nichtsdestotrotz sind die gefundenen Effekte der NR2C-2B Gensubstitution auf das Gedächtnis und die motorische Koordinationsfähigkeit von Mäusen (unter Berücksichtigung des gegenwärtigen Wissenstandes) eher auf eine NR2B Überexpression, als auf die NR2C Geninaktivierung zurückzuführen (siehe Einleitung Abschnitt "NMDA-R und synaptische Plastizität" und Einleitung und Diskussion zu Experimenten I, III, und V). Der anxiogene Effekt der NR2C-2B Gensubstitution bei juvenilen Tieren andererseits kann am sparsamsten mit der Abwesenheit der NR2C Untereinheit erklärt werden (siehe Einleitung und Diskussion zu Experiment II).

In Körnerzellen des Zerebellums adulter NR2C-2B Mäuse ist die Expressionsrate der NR2A Untereinheit kompensatorisch herabreguliert (Pieri et al., 2003). Es ist möglich, daß auch in anderen, für die in der vorliegenden Arbeit gemessenen

Verhaltensweisen relevanten, Gehirnregionen kompensatorische Prozesse bezüglich der Expressionsrate der NR2A, NR2B, NR2D, und NR3 Untereinheiten eingeleitet wurden, die die gefundenen Verhaltenseffekte möglicherweise mitbedingt haben. Diese Möglichkeit sollte in zukünftigen Untersuchungen evaluiert werden. Die Frage nach kompensatorischen Gegenregulationen auf genetischer Ebene ist nicht nur für den Gensubstitutionsansatz relevant, sondern stellt sich im Grunde bei jeder genetischen Manipulation. Kompensatorische Effekte wurden ebenso in klassischen Genknockout und Gen-Überexpressionsstudien gefunden, sofern dieser Möglichkeit überhaupt nachgegangen wurde. Bei klassischen Knockoutstudien wurde kritisiert, daß ein fehlender Phänotyp nicht unbedingt darauf hindeutet, daß ein bestimmtes Gen an der Regulation der untersuchten neurophysiologischen- und Verhaltensprozesse nicht partizipiert, sondern ebenso gut darauf hindeuten kann, wie erfolgreich die nach der Geninaktivierung gestörten neurophysiologischen- und Verhaltensprozesse kompensiert wurden. Gleiches wurde auch für den Überexpressionsansatz angemerkt, bei dem der Organismus z.B. versucht die gesteigerte Erregbarkeit eines funktionalen Systems zu kompensieren. Es ist nicht von der Hand zu weisen, daß sowohl die komplette Inaktivierung, wie auch Überaktivierung eines Systems mit einem starken Kompensationsdruck einhergeht. Im Falle der NR2C-2B Gensubstitutionsmaus sollte ein möglicher Kompensationsdruck in Endhirnstrukturen primär durch Überaktivierung von NMDA-R hervorgerufen werden, weil auch nach der NR2C-2B Gensubstitution in den Gehirnregionen und Zelltypen, in denen NR2C normalerweise exprimiert, noch funktionale NMDA-R gebildet werden, die dann allerdings stärker erregbar sind. Die synaptische Langzeitpotenzierung und Langzeitdepression werden nach wie vor als neuronales Korrelat von Lern- und Gedächtnisprozessen angesehen. Deshalb bleibt von Elektrophysiologen zu untersuchen, ob die NR2C-2B Gensubstitution tatsächlich zu den hypostasierten elektrophysiologischen Veränderungen im Neokortex, dem Hippokampus, der Amygdala und im Kleinhirn geführt hat. Die vorliegenden Befunde unterstreichen die Bedeutung von NMDA-R, die die NR2B Untereinheit aufweisen für die Gedächtnisbildung. Es wäre wünschenswert, modulatorisch wirkende NR2B selektive Agonisten zu entwickeln, die möglicherweise bei amnestischen Syndromen verschiedenster Ätiologie von therapeutischem Wert wären. Nichtsdestotrotz bleibt festzuhalten, daß eine NMDA-R Untereinheitengensubstitution sich förderlich auf Lern- und Gedächtnisprozesse

auswirkt und somit die Wichtigkeit dieses Rezeptors für kognitive Funktionen unterstreicht.

## 5. REFERENZEN

Abe H, Iwasaki T (2001) NMDA and muscarinic blockade in the perirhinal cortex impairs object discrimination in rats. *Neuroreport* 12:3375-3379.

Abel T, Kandel E (1998) Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long-term memory storage. *Brain Res Rev* 26:360-378.

Abel T, Nguyen PV, Barad M, Deuel TA, Kandel ER, Bourtchouladze R (1997) Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell* 88:615-626.

Adams MM, Morrison JH, Gore AC (2001) N-methyl-D-aspartate receptor mRNA levels change during reproductive senescence in the hippocampus of female rats. *Exp Neurol* 170:171-179.

Agnihotri N, Lopez-Garcia JC, Hawkins RD, Arancio O (1998) Morphological changes associated with long-term potentiation. *Histol Histopathol* 13:1155-1162.

Aguzzi A, Brandner S, Sure U, Ruedi D, Isenmann S (1994) Transgenic and knock-out mice: models of neurological disease. *Brain Pathol* 4:3-20.

Akazawa C, Shigemoto R, Bessho Y, Nakanishi S, Mizuno N (1994) Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *J Comp Neurol* 347:150-160.

Alvarez P, Squire LR (1994) Memory consolidation and the medial temporal lobe: a simple network model. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7041-7045.

Amaral DG, Witter MP (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31:571-591.

Anantharam V, Panchal RG, Wilson A, Kolchine VV, Treistman SN, Bayley H (1992) Combinatorial RNA splicing alters the surface charge on the NMDA receptor. *FEBS Lett* 305:27-30.

Andrade C, Joseph J, Chandra JS, Vankataraman BV, Rani MA (1994) ECT-induced anterograde amnesia: can the deficits be minimized? *Convuls Ther* 10:59-64.

Arancio O, Kiebler M, Lee CJ, Lev-Ram V, Tsien RY, Kandel ER, Hawkins RD (1996) Nitric oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Cell* 87:1025-1035.

Archer J (1973) Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav* 21: 205-235.

Armano S, Rossi P, Taglietti V, D'Angelo E (2000) Long-term potentiation of intrinsic excitability at the mossy fiber-granule cell synapse of rat cerebellum. *J Neurosci* 20: 5208-5216.

Arolfo MP, Zanudio MA, Ramirez OA (1998) Baclofen infused in rat hippocampal formation impairs spatial learning. *Hippocampus* 8:109-113.

Aura J, Riekkinen M, Riekkinen P (1998) Tetrahydroaminoacridine and D-cycloserine stimulate acquisition of water maze spatial navigation in aged rats. *Eur J Pharmacol* 342:15-20.

Baker KB, Kim JJ (2002) Effects of stress and hippocampal NMDA receptor antagonism on recognition memory in rats. *Learn Mem* 9:58-65.

Bannerman DM, Good MA, Butcher SP, Ramsay M, Morris RG (1995) Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade. *Nature* 378:182-186.

Barnes CA (1979) Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 93:74-104.

Barria A, Müller D, Derkach V, Griffith LC, Soderling TR (1997) Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science* 276:2042-1045.

Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217:408-414.

Bartus RT, Dean RL, Pontecorvo MJ, Flicker C (1985) The cholinergic hypothesis: a historical overview, current perspective, and future directions. *Ann NY Acad Sci* 444:332-358.

Baudry M, Lynch G (1981) Hippocampal glutamate receptors. *Mol Cell Biochem* 38:5-18.

Baxter MG, Lanthorn TH, Frick KM, Golski S, Wan RQ, Olton DS (1994) D-cycloserine, a novel cognitive enhancer, improves spatial memory in aged rats. *Neurobiol Aging* 15:207-213.

Beas-Zarate C, Flores-Soto ME, Armendariz-Borunda J (2002) NMDAR-2C and 2D subunits gene expression is induced in brain by neonatal exposure of monosodium L-glutamate to adult rats. *Neurosci Lett* 321:9-12.

Becker JT, Walker JA, Olton DS (1980) Neuroanatomical bases of spatial memory. *Brain Res* 200:307-320.

Behe P, Stern P, Wyllie DJ, Nassar M, Schoepfer R, Colquhoun D (1995) Determination of NMDA NR1 subunit copy number in recombinant NMDA receptors. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 262:205-213.

Bertholet JY, Crusio WE (1991) Spatial and non-spatial spontaneous alternation and hippocampal mossy fibre distribution in nine inbred mouse strains. *Behav Brain Res* 43:197-202.

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

Bliss TV, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:331-356.

Blokland A (1995) Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Res Rev* 21:285-300.

Blokland A, Honig W, Raaijmakers WG (1992) Effects of intra-hippocampal scopolamine injections in a repeated spatial acquisition task in the rat. *Psychopharmacology* 109:373-376.

Bolles RC (1969) Avoidance and escape learning: simultaneous acquisition of different responses. *J Comp Physiol Psychol* 68:355-358.

Boyd CA, Weiler MH, Porter WP (1990) Behavioral and neurochemical changes associated with chronic exposure to low-level concentration of pesticide mixtures. *J Toxicol Environ Health* 30:209-221.

Boyd TE, Trepel C, Racine RJ (2000) Cholinergic modulation of neocortical long-term potentiation in the awake, freely moving rat. *Brain Res* 881:28-36.

Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC, Brecht DS (1996) Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84:757-767.

Bures J, Fenton AA, Kaminsky Y, Zinyuk L (1997) Place cells and place navigation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:343-350.

Bussey TJ, Muir JL, Aggleton JP (1999) Functionally dissociating aspects of event memory: the effects of combined perirhinal and postrhinal cortex lesions on object and place memory in the rat. *J Neurosci* 19:495-502.

Cahill L, McGaugh JL (1996) Modulation of memory storage. *Curr Opin Neurobiol* 6:237-242.

Cahill L, McGaugh JL (1998) Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends Neurosci* 21:294-299.

Cain DP (1998) Testing the NMDA, long-term potentiation, and cholinergic hypotheses of spatial learning. *Neurosci Biobehav Rev* 22:181-193.

Cain DP, Saucier D, Boon F (1997) Testing hypotheses of spatial learning: the role of NMDA receptors and NMDA-mediated long-term potentiation. *Behav Brain Res* 84:179-193.

Capaldi EA, Robinson GE, Fahrback SE (1999) Neuroethology of spatial learning: the birds and the bees. *Annu Rev Psychol* 50:651-682.

Capecchi MR (1989) Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244:1288-1292.

Capecchi MR (1994) Targeted gene replacement. *Sci Am* 270:52-59.

Carli M, Luschi R, Samanin R (1997) Dose-related impairment of spatial learning by intrahippocampal scopolamine: antagonism by ondansetron, a 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist. *Behav Brain Res* 82:185-194.

Cassel JC, Duconseille E, Jeltsch H, Will B (1997) The fimbria-fornix/cingular bundle pathways: a review of neurochemical and behavioural approaches using lesions and transplantation techniques. *Prog Neurobiol* 51:663-716.

Cathala L, Misra C, Cull-Candy S (2000) Developmental profile of the changing properties of NMDA receptors at cerebellar mossy fiber-granule cell synapses. *J Neurosci* 20:5899-5905.

Cerbone A, Sadile AG (1994) Behavioral habituation to spatial novelty: interference and noninterference studies. *Neurosci Biobehav Rev* 18:497-518.

Chan SF, Sucher NJ (2001) An NMDA receptor signaling complex with protein phosphatase 2A. *J Neurosci* 21:7985-7992.

Charton JP, Herkert M, Becker CM, Schroder H (1999) Cellular and subcellular localization of the 2B-subunit of the NMDA receptor in the adult rat telencephalon. *Brain Res* 816:609-617.

Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino KA, Nakanishi N, Tong G, Lipton SA, Zhang D (2002) Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 415:793-798.

Chazot PL, Cik M, Stephenson FA (1992) Immunological detection of the NMDAR1 glutamate receptor subunit expressed in embryonic kidney 293 cells and in rat brain. *J Neurochem* 59:1176-1178.

Cheli VT, Adrover MF, Blanco C, Rial-Verde E, Guyot-Revol V, Vidal R, Martin E, Alche L, Sanchez G, Acerbo M, Epstein AL, Jerusalinsky D (2002) Gene transfer of NMDAR1 subunit sequences to the rat CNS using herpes simplex virus vectors interfered with habituation. *Cell Mol Neurobiol* 22:303-314.

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

Chen L, Huang LY (1992) Protein kinase C reduces Mg<sup>2+</sup> block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature* 356:521-523.

Chen N, Luo T, Raymond LA (1999) Subtype-dependence of NMDA receptor channel open probability. *J Neurosci* 19:6844-6854.

Chenard BL, Menniti FS (1999) Antagonists selective for NMDA receptors containing the NR2B subunit. *Curr Pharm Des* 5:381-404.

Choi DW, Koh JY, Peters S (1988) Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *J Neurosci* 8:185-196.

Chou YC, Liao JF, Chang WY, Lin MF, Chen CF (1999) Binding of dimemorfan to sigma-1 receptor and its anticonvulsant and locomotor effects in mice, compared with dextromethorphan and dextrorphan. *Brain Res* 821:516-519.

Ciabarra AM, Sullivan JM, Gahn LG, Pecht G, Heinemann S, Sevarino KA (1995) Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. *J Neurosci* 15:6498-6508.

Ciamei A, Aversano M, Cestari V, Castellano C (2001) Effects of MK-801 and nicotine combinations on memory consolidation in CD1 mice. *Psychopharmacology* 154:126-130.

Clark RE, Zola SM, Squire LR (2000) Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *J Neurosci* 20:8853-8860.

Clements JD, Westbrook GL (1991) Activation kinetics reveal the number of glutamate and glycine binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor. *Neuron* 7:605-613.

Clugnet MC, LeDoux JE (1990) Synaptic plasticity in fear conditioning circuits: induction of LTP in the lateral nucleus of the amygdala by stimulation of the medial geniculate body. *J Neurosci* 10:2818-2824.

Collingridge GL, Lester RA (1989) Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev* 41:143-210.

Craven SE, Brecht DS (1998) PDZ proteins organize synaptic signaling pathways. *Cell* 93:495-498.

Crawley JN, Belknap JK, Collins A, Crabbe JC, Frankel W, Henderson N, Hitzemann RJ, Maxson SC, Miner LL, Silva AJ, Wehner JM, Wynshaw-Boris A, Paylor R (1997) Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology* 132:107-124.

Crawley JN, Paylor RA (1997) A proposed test battery and constellations of specific behavioral paradigms to investigate the behavioral phenotypes of transgenic and knockout mice. *Horm Behav* 31:197-211.

Crusio WE, Schwegler H, Lipp HP (1987) Radial-maze performance and structural variation of the hippocampus in mice: a correlation with mossy fibre distribution. *Brain Res* 425:182-185.

Cruz AP, Frei F, Graeff FG (1994) Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 49:171-176.

Cull-Candy SG, Brickley SG, Misra C, Feldmeyer D, Momiyama A, Farrant M (1998) NMDA receptor diversity in the cerebellum: identification of subunits contributing to functional receptors. *Neuropharmacology* 37:1369-1380.

Dai H, Carey RJ (1994) The NMDA antagonist MK-801 can impair attention to exteroceptive stimuli. *Behav Brain Res* 62:149-156.

Damsma G, Westerink BH, de-Vries JB, Van-den-Berg CJ, Horn AS (1987) Measurement of acetylcholine release in freely moving rats by means of automated intracerebral dialysis. *J Neurochem* 48:1523-1528.

D'Angelo E, Rossi P, Armano S, Taglietti V (1999) Evidence for NMDA and mGlu receptor-dependent long-term potentiation of mossy fiber-granule cell transmission in rat cerebellum. *J Neurophysiol* 81:277-287.

Daniell LC (1992) Alternation of general anesthetic potency by agonists and antagonists of the polyamine binding site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 261:304-310.

Danysz W, Fadda E, Wroblewski JT, Costa E (1989) Different modes of action of 3-amino-1-hydroxy-2-pyrrolidone (HA-966) and 7-chlorokynurenic acid in the modulation of N-methyl-D-aspartate-sensitive glutamate receptors. *Mol Pharmacol* 36:912-916.

Das S, Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Takasu M, Crandall JE, Dikkes P, Conner DA, Rayudu PV, Cheung W, Chen HS, Lipton SA, Nakanishi N (1998) Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature* 393:377-381.

Davis M, Walker DL, Lee Y (1997) Roles of the amygdala and bed nucleus of stria terminalis in fear and anxiety measured with the acoustic startle reflex: possible relevance to PTSD. *Ann NY Acad Sci* 821:305-331.

Davis S, Butcher SP, Morris RG (1992) The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro. *J Neurosci* 12:21-34.

Day M, Morris RG (2001) Memory consolidation and NMDA receptors: discrepancy between genetic and pharmacological approaches. *Science* 293:755.

De Souza-Silva MA, Hasenöhrl RU, Tomaz C, Schwarting RKW, Huston JP (2000) Modulation of frontal cortex acetylcholine and behavior by injection of substance P into the ventral pallidum in the freely-moving vs. anesthetized preparation. *Synapse* 38:243-253.

De Souza-Silva MA, Mattern C, Häcker R, Nogueira PJC, Huston JP, Schwarting RKW (1997) Intranasal administration of the dopaminergic agonists L-Dopa,

amphetamine and cocaine increases activity in the neostriatum: a microdialysis study in the rat. *J Neurochem* 68:233-239.

De Zeeuw CI, Simpson JI, Hoogenraad CC, Galjart N, Koekkoek SK, Ruigrok TJ (1998) Microcircuitry and function of the inferior olive. *Trends Neurosci* 21:391-400.

Decker AJ, Connor DJ, Thal LJ (1991) The role of cholinergic projections from the Nucleus basalis in memory. *Neurosci Biobehav Rev* 15:299-317.

Dere E (2002) Spatial habituation learning. In: HG Vogel (Ed.) *Drug Discovery and Evaluation 2<sup>nd</sup> Edition*. Heidelberg, Springer, 628-629.

Dere E, Frisch C, De Souza Silva MA, Gödecke A, Schrader J, Huston JP (2001) Unaltered radial-maze performance and brain acetylcholine in endothelial nitric oxide synthase knockout mice. *Neuroscience* 107:561-570.

Dere E, Topic B, De Souza-Silva MA, Fink H, Buddenberg T, Huston JP (2003a) Antagonism of NMDAR-2A and 2B via Dextromethorphan and Ifenprodil modulates graded anxiety test performance of C57BL/6 mice. *Behav Pharmacol* 14:245-249.

Dere E, De Souza Silva MA, Frisch C, Teubner B, Söhl G, Willecke K, Huston JP (2003b) Connexin30 deficient mice show increased emotionality and decreased rearing activity in the open field along with neurochemical changes. *Eur J Neurosci* 18:629-638.

Dere E, De Souza Silva, Topic B, Fiorillo C, Li JS, Sadile AG, Frisch C, Huston JP (2002a) Aged endothelial nitric oxide synthase knockout mice exhibit higher mortality concomitant with impaired open-field habituation and alterations in forebrain neurotransmitter levels. *Genes Brain Behav* 1:204-213.

Dere E, Topic B, De Souza-Silva MA, Srejic M, Frisch C, Buddenberg T, Huston JP (2002b) The graded anxiety test: a novel test of murine unconditioned anxiety based on the principles of the elevated plus-maze and light-dark test. *J Neurosci Methods* 122:65-73.

Deutsch JA (1983) *The physiological basis of memory*. Academic Press, New York.

Didier M, Xu M, Berman SA, Bursztajn S (1995) Differential expression and co-assembly of NMDA zeta 1 and epsilon subunits in the mouse cerebellum during postnatal development. *Neuroreport* 6:2255-2259.

Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61.

Douglas RJ (1967) The hippocampus and behavior. *Psychol Bull* 67:416-442.

Dragoi V, Staddon JE (1999) The dynamics of operant conditioning. *Psychol Rev* 106:20-61.

Duncan N, Hunt E (1972) Reduction of ECS produced retrograde amnesia by post-trial introduction of strychnine. *Physiol Behav* 9:295-300.

Durand GM, Bennett MV, Zukin RS (1993) Splice variants of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 identify domains involved in regulation by polyamines and protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6731-6735.

Ebraldize AK, Rossi DJ, Tonegawa S, Slater NT (1996) Modification of NMDA receptor channels and synaptic transmission by targeted disruption of the NR2C gene. *J Neurosci* 16:5014-5025.

Eichenbaum H (1999) *Neurobiology. The topography of memory.* *Nature* 402:597-599.

Ekstrom AD, Meltzer J, McNaughton BL, Barnes CA (2001) NMDA receptor antagonism blocks experience-dependent expansion of hippocampal "place fields". *Neuron* 31:631-638.

Erickson RP (1996) Mouse models of human genetic disease: Which mouse is more like a man? *Bioessays* 18:993-998.

Falls WA, Miserendino MJD, Davis M (1992) Extinction of fear-potentiated startle: blockade by infusion of an NMDA antagonist into the amygdala. *J Neurosci* 12:854-863.

Fanselow MS (1994) Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. *Psychonomic Bull Rev* 1:429-438.

Farrant M, Feldmeyer D, Takahashi T, Cull-Candy SG (1994) NMDA-receptor channel diversity in the developing cerebellum. *Nature* 368:335-359.

Feil R, Brocard J, Mascrez B, LeMeur M, Metzger D, Chambon P (1996) Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10887-10890.

Fendt M (2001) Injections of the NMDA receptor antagonist aminophosphonopentanoic acid into the lateral nucleus of the amygdala block the expression of fear-potentiated startle and freezing. *J Neurosci* 21:4111-4115.

Ferrer-Montiel AV, Sun W, Montal M (1995) Molecular design of the N-methyl-D-aspartate receptor binding site for phencyclidine and dizolcipine. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8021-8025.

File SE, Zangrossi H, Viana M, Graeff FG (1993) Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? *Psychopharmacology* 111:491-494.

Forrest D, Yuzaki M, Soares HD, Ng L, Luk DC, Sheng M, Stewart CL, Morgan JI, Connor JA, Curran T (1994) Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. *Neuron* 13:325-338.

Francis PT, Bowen DM (1994) Neuronal pathology in relation to molecular biology and treatment of Alzheimer's disease. *Mol Cell Biol Hum Dis Ser* 4:25-54.

Fraser CM, Cooke MJ, Fisher A, Thompson ID, Stone TW (1996) Interactions between ifenprodil and dizocilpine on mouse behaviour in models of anxiety and working memory. *Eur Neuropsychopharmacol* 6:311-316.

Freed DM, Corkin S (1988) Rate of forgetting in H.M.: 6-month recognition. *Behav Neurosci* 102:823-827.

Frisch C, Dere E, De Souza Silva MA, Gödecke A, Schrader J, Huston JP (2000) Superior water maze learning and increase in fear-related behavior in the eNOS<sup>-/-</sup> mouse together with monoamine changes in cerebellum and ventral striatum. *J Neurosci* 20:6684-6700.

Frotscher M, Soriano E, Misgeld U (1994) Divergence of hippocampal mossy fibers. *Synapse* 16: 148-160.

Furth PA, St-Onge L, Boger H, Gruss P, Gossen M, Kistner A, Bujard H, Hennighausen L (1994) Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:9302-9306.

Gabrieli JD, Cohen NJ, Corkin S (1988) The impaired learning of semantic knowledge following bilateral medial temporal-lobe resection. *Brain Cogn* 7:157-177.

Gallagher MJ, Huang H, Grant ER, Lynch DR (1997) The NR2B-specific interactions of polyamines and protons with the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem* 272:24971-24979.

Galli-Taliadoros LA, Sedgwick JD, Wood SA, Korner H (1995) Gene knock-out technology: a methodological overview for the interested novice. *J Immunol Methods* 181:1-15.

Galvan CD, Hrachovy RA, Smith KL, Swann JW (2000) Blockade of neuronal activity during hippocampal development produces a chronic focal epilepsy in the rat. *J Neurosci* 20:2904-2916.

Garner CC, Nash J, Haganir RL (2000) PDZ domains in synapse assembly and signalling. *Trends Cell Biol* 10:274-280.

Gerhardt P, Voits M, Fink H, Huston JP (1994) Evidence for mnemotropic action of cholecystinin fragments Boc-CCK-4 and CCK-8S. *Peptides* 15:689-697.

Gerlai R (1996) Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype ?. *Trends Neurosci* 19:177-181.

Gerlai R (1998) A new continuous alternation task in T-maze detects hippocampal dysfunction in mice: A strain comparison and lesion study. *Behav Brain Res* 95:91-101.

Gerlai R (1999) Ethological approaches in behavioral neurogenetic research. In: Crusio WE, Gerlai RT (eds.) *Handbook of Molecular-Genetic Techniques for Brain and Behavior Research (Techniques in the Behavioral and Neural Sciences, Vol. 13)*. Elsevier Science B.V. New York, pp 605-613.

Gerlai R (2000) Targeting genes and proteins in the analysis of learning and memory: caveats and future directions. *Rev Neurosci* 11:15-26.

Geyer MA, Segal DS, Greenberg BD (1984) Increased startle responding in rats treated with phencyclidine. *Neurobehav Toxicol Teratol* 6:161-164.

Giap BT, Jong CN, Ricker JH, Cullen NK, Zafonte RD (2000) The hippocampus: anatomy, pathophysiology, and regenerative capacity. *J Head Trauma Rehabil* 15:875-894.

Gingrich JA, Hen R (2000) The broken mouse: the role of development, plasticity and environment in the interpretation of phenotypic changes in knockout mice. *Curr Opin Neurobiol* 10:146-152.

Giovannini MG, Bartolini L, Kopf SR, Pepeu G (1998) Acetylcholine release from the frontal cortex during exploratory activity. *Brain Res* 784:218-227.

Giovannini MG, Giovannelli L, Bianchi L, Kalfin R, Pepeu G (1997) Glutamatergic modulation of cortical acetylcholine release in the rat: a combined in vivo microdialysis, retrograde tracing and immunohistochemical study. *Eur J Neurosci* 9:1678-1689.

Gironi-Carnevale UA, Vitullo E, Sadile AG (1990) Post-trial NMDA receptor allosteric blockade differentially influences habituation of behavioral responses to novelty in the rat. *Behav Brain Res* 39:187-195.

Glickman SE, Schiff BB (1967) A biological theory of reinforcement. *Psychol Rev* 74:81-109.

Gnegy ME (2000) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin signaling in NMDA-induced synaptic plasticity. *Crit Rev Neurobiol* 14:91-129.

Goebel DJ, Poesch MS (1999) NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: a quantitative analysis of endogenous mRNA levels of NR1<sub>com</sub>, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D and NR3A. *Mol Brain Res* 69:164-170.

Gold PE, McGaugh JL (1984) Endogenous processes in memory consolidation. In: Weingartner H, Parker ES (Eds.) *Memory consolidation*, Lawrence Erlbaum Associates, Hillsdale, pp. 65-83.

Gossen M, Bujard H (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5547-5551.

Gotti B, Duverger D, Bertin J, Carter C, Dupont R, Frost J, Gaudilliere B, MacKenzie ET, Rousseau J, Scatton B, Wick A (1988) Ifenprodil and SL 82.0715 as cerebral anti-ischemic agents. I. Evidence for efficacy in models of focal cerebral ischemia. *J Pharmacol Exp Ther* 247:1211-1221

Guilarte TR, McGlothan JL (1998) Hippocampal NMDA receptor mRNA undergoes subunit specific changes during developmental lead exposure. *Brain Res* 790:98-107.

Guimaraes FS, Carobrez AP, De-Aguiar JC, Graeff FG (1991) Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. *Psychopharmacology* 103:91-94.

Hamid S, Dawe GS, Gray JA, Stephenson, JD (1997) Nicotine induces long-lasting potentiation in the dentate gyrus of nicotine-primed rats. *Neurosci Res* 29:81-85.

Hatten ME (1999) Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci* 22:511-559.

Hawkins RD, Son H, Arancio O (1998) Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus. *Prog Brain Res* 118:155-172.

Heale V, Harley C (1990) MK-801 and AP5 impair acquisition, but not retention, of the Morris milk maze. *Pharmacol Biochem Behav* 36:145-149.

Hebb DO (1949) *The organisation of behavior. A neuropsychological theory.* Wiley, New York.

Heise GA (1984) Behavioral methods for measuring effects of drugs on learning and memory in animals. *Med Res Rev* 4:535-558.

Heresco-Levy U, Javitt DC (1998) The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-mediated neurotransmission in the pathophysiology and therapeutics of psychiatric syndromes. *Eur Neuropsychopharm* 8:141-152.

Hill AJ (1978) First occurrence of hippocampal spatial firing in a new environment. *Exp Neurol* 62:282-297.

Himmelheber AM, Sarter M, Bruno JP (2000) Increases in cortical acetylcholine release during sustained attention performance in rats. *Cogn Brain Res* 9:313-325.

Hiramatsu M, Cho AK, Nabeshima T (1989) Comparison of the behavioral and biochemical effects of the NMDA receptor antagonists, MK-801 and phencyclidine. *Eur J Pharmacol* 166:359-366.

Hirsh R (1974) The hippocampus and contextual retrieval of information from memory: a theory. *Behav Biol* 12:421-444.

Hoh T, Beiko J, Boon F, Weiss S, Cain DP (1999) Complex behavioral strategy and reversal learning in the water maze without NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *J Neurosci* 19:RC2.

Holland SK, Blake CC (1987) Proteins, exons and molecular evolution. *Biosystems* 2:181-206.

Hollmann M, Boulter J, Maron C, Beasley L, Sullivan J, Pecht G, Heinemann S (1993) Zinc potentiates agonist-induced currents at certain splice variants of the NMDA receptor. *Neuron* 10:943-954.

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

Holmes A, Iles JP, Mayell SJ, Rodgers RJ (2001) Prior test experience compromises the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in the mouse light/dark exploration test. *Behav Brain Res* 122:159-167.

Huang YY, Kandel ER (1996) Modulation of both the early and the late phase of mossy fiber LTP by the activation of beta-adrenergic receptors. *Neuron* 16:611-617.

Hunt T, Amit Z (1987) Conditioned taste aversion induced by self-administered drugs: paradox revisited. *Neurosci Biobehav Rev* 11:107-130.

Huppert FA, Piercy M (1979) Normal and abnormal forgetting in organic amnesia: effect of locus of lesion. *Cortex* 15:385-390.

Huston JP (1982) Searching for the neural mechanism of reinforcement (of "stamping-in"). In: Hoebel B.G., Novin D. (eds.): *The neural basis of feeding and reward*. Academic Press, New York, pp. 75-83.

Huston JP, Mondadori C (1977) Memory and reinforcement: a model. *Activitas Nervosa Superior* 19:17-19.

Huston JP, Mueller CC (1978) Enhanced passive avoidance learning and appetitive T-maze learning with post-trial rewarding hypothalamic stimulation. *Brain Research* 3:265-270.

Huston JP, Oitzl MS (1989) The relationship between reinforcement and memory: parallels in the rewarding and mnemonic effects of the neuropeptide substance P. *Neurosci Biobehav Rev* 13:171-180.

Ikeda K, Araki K, Takayama C, Inoue Y, Yagi T, Aizawa S, Mishina M (1995) Reduced spontaneous activity of mice defective in the  $\epsilon$ 4 subunit of the NMDA receptor channel. *Mol Brain Res* 33:61-71.

Ikeda K, Nagasawa M, Mori H, Araki K, Sakimura K, Watanabe M, Inoue Y, Mishina M (1992) Cloning and expression of the epsilon 4 subunit of the NMDA receptor channel. *FEBS Lett* 313:34-38.

Ikonen S, Riekkinen P (1999) Effects of apamin on memory processing of hippocampal-lesioned mice. *Eur J Pharmacol* 382:151-156.

Ishii T, Moriyoshi K, Sugihara H, Sakurada K, Kadotani H, Yokoi M, Akazawa C, Shigemoto R, Mizuno N, Masu M, Nakanishi S (1993) Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J Biol Chem* 268:2836-2843.

Ito I, Futai K, Katagiri H, Watanabe M, Sakimura K, Mishina M, Sugiyama H (1997) Synapse-selective impairment of NMDA receptor functions in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 or epsilon 2 subunit. *J Physiol* 500:401-408.

Ito M (1989) Long-term depression. *Annu Rev Neurosci* 12:85-102.

Izquierdo I, da-Cunha C, Rosat R, Jerusalinsky D, Ferreira MB, Medina JH (1992) Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behav Neural Biol* 58:16-26.

Jackson A, Sanger DJ (1989) Conditioned taste aversions induced by phencyclidine and other antagonists of N-methyl-D-aspartate. *Neuropharmacology* 28:459-464.

Jayaraman A (1985) Organization of thalamic projections in the nucleus accumbens and the caudate nucleus in cats and its relation with hippocampal and other subcortical afferents. *J Comp Neurol* 231:396-420.

Johnston D, Williams S, Jaffe D, Gray R (1992) NMDA-receptor-independent long-term potentiation. *Annu Rev Physiol* 54:489-505.

Jones BJ, Roberts DJ (1968) The quantitative measurement of motor incoordination in naive mice using an accelerating rotarod. *J Pharm Pharmacol* 20:302-304.

Kadotani H, Hirano T, Masugi M, Nakamura K, Nakao K, Katsuki M, Nakanishi S (1996) Motor discoordination results from combined gene disruption of the NMDA receptor NR2A and NR2C subunits, but not from single disruption of the NR2A or NR2C subunit. *J Neurosci* 16:7859-7867.

Kandel ER, Pittenger C (1999) The past, the future and the biology of memory storage. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:2027-2052.

Kapur N, Ellison D, Parkin AJ, Hunkin NM, Burrows E, Sampson SA, Morrison EA (1994) Bilateral temporal lobe pathology with sparing of medial temporal lobe structures: lesion profile and pattern of memory disorder. *Neuropsychologia* 32:23-38.

Karst H, Nair S, Velzing E, Rumpff-van-Essen L, Slagter E, Shinnick-Gallagher P, Joels M (2002) Glucocorticoids alter calcium conductances and calcium channel subunit expression in basolateral amygdala neurons. *Eur J Neurosci* 16:1083-1089.

Keller A, Iriki A, Asanuma H (1990) Identification of neurons producing long-term potentiation in the cat motor cortex: intracellular recordings and labeling. *J Comp Neurol* 300:47-60.

Kentros C, Hargreaves E, Hawkins RD, Kandel ER, Shapiro M, Müller RV (1998) Abolition of long-term stability of new hippocampal place cell maps by NMDA receptor blockade. *Science* 280:2121-2126.

Kesner RP, Dakis M, Bolland BL (1993) Phencyclidine disrupts long- but not short-term memory within a spatial learning task. *Psychopharmacology* 111:85-90.

Kew JN, Richards JG, Mutel V, Kemp JA (1998) Developmental changes in NMDA receptor glycine affinity and ifenprodil sensitivity reveal three distinct populations of NMDA receptors in individual rat cortical neurons. *J Neurosci* 18:1935-1943.

Kew JN, Trube G, Kemp JA (1996) A novel mechanism of activity-dependent NMDA receptor antagonism describes the effect of ifenprodil in rat cultured cortical neurones. *J Physiol* 497:761-772.

Kim JH, Huganir RL (1999) Organization and regulation of proteins at synapses. *Curr Opin Cell Biol* 11:248-254.

Kim M, McGaugh JL (1992) Effects of intra-amygdala injections of NMDA receptor antagonists on acquisition and retention of inhibitory avoidance. *Brain Res* 585:35-48.

Kistler WM, van Hemmen JL, De-Zeeuw CI (2000) Time window control: a model for cerebellar function based on synchronization, reverberation, and time slicing. *Prog Brain Res* 124:275-297.

Kistner A, Gossen M, Zimmermann F, Jerecic J, Ullmer C, Lubbert H, Bujard H (1996) Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10933-10938.

Kiyama Y, Manabe T, Sakimura K, Kawakami F, Mori H, Mishina M (1998) Increased thresholds for long-term potentiation and contextual learning in mice lacking the NMDA-type glutamate receptor epsilon1 subunit. *J Neurosci* 18:6704-6766.

Kleckner NW, Dingledine R (1988) Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 241:835-837.

Knapp MJ, Knopman DS, Solomon PR, Pendlebury WW, Davis CS, Gracon SI (1994) A 30-week randomized controlled trial of high-dose tacrine in patients with Alzheimer's disease. The Tacrine Study Group. *JAMA* 271:985-991.

Kopke AK, Bonk I, Sydow S, Menke H, Spiess J (1993) Characterization of the NR1, NR2A, and NR2C receptor proteins. *Protein Sci* 2:2066-2076.

Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269:1737-1740.

Krauth J (1988) *Distribution-free statistics: An application-oriented approach*. Elsevier. Amsterdam.

Krupp JJ, Vissel B, Heinemann SF, Westbrook GL (1996) Calcium-dependent inactivation of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors is NR2 subunit specific. *Mol Pharmacol* 50:1680-1688.

Kuehl-Kovarik MC, Magnusson KR, Premkumar LS, Partin KM (2000) Electrophysiological analysis of NMDA receptor subunit changes in the aging mouse cortex. *Mech Ageing Dev* 115:39-59.

Kuner T, Schoepfer R (1996) Multiple structural elements determine subunit specificity of Mg<sup>2+</sup> block in NMDA receptor channels. *J Neurosci* 16:3549-3558.

Kutsuwada T, Kashiwabuchi N, Mori H, Sakimura K, Kushiya E, Araki K, Meguro H, Masaki H, Kumanishi T, Arakawa M, Mishina M (1992) Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature* 358:36-41.

Kutsuwada T, Sakimura K, Manabe T, Takayama C, Katakura N, Kushiya E, Natsume R, Watanabe M, Inoue Y, Yagi T, Aizawa S, Arakawa M, Takahashi T, Nakamura Y, Mori H, Mishina M (1996) Impairment of suckling response, trigeminal neuronal pattern formation, and hippocampal LTD in NMDA receptor epsilon 2 subunit mutant mice. *Neuron* 16:333-344.

Lashley KS (1929) *Brain mechanisms and intelligence*. - Unabridged and corr. republ. of the work. Chicago. Dover Publ., New York, 1963.

Lathe R (1996) Mice, gene targeting and behaviour: more than just genetic background. *Trends Neurosci* 19:183-186.

Laube B, Kuhse J, Betz H (1998) Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *J Neurosci* 18:2954-2961.

Laurie DJ, Seeburg PH (1994) Regional and developmental heterogeneity in splicing of the rat brain NMDAR1 mRNA. *J Neurosci* 14:3180-3194.

LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23:155-184.

Lee H, Kim JJ (1998) Amygdalar NMDA receptors are critical for new fear learning in previously fear-conditioned rats. *J Neurosci* 18:8444-8454.

Lee HJ, Choi JS, Brown TH, Kim JJ (2001) Amygdalar NMDA receptors are critical for the expression of multiple conditioned fear responses. *J Neurosci* 21:4116-4124.

Legendre P, Westbrook GL (1991) Ifenprodil blocks N-methyl-D-aspartate receptors by a two-component mechanism. *Mol Pharmacol* 40:289-298.

Leonard AS, Hell JW (1997) Cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C phosphorylate N-methyl-D-aspartate receptors at different sites. *J Biol Chem* 272:12107-12115.

Leonard AS, Lim IA, Hemsworth DE, Horne MC, Hell JW (1999) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is associated with the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:3239-3244.

Levenes C, Daniel H, Crepel F (1998) Long-term depression of synaptic transmission in the cerebellum: cellular and molecular mechanisms revisited. *Prog Neurobiol* 55:79-91.

Levin ED (1992) Nicotinic systems and cognitive function. *Psychopharmacology* 108:417-431.

Levin ED, Bettegowda C, Weaver T, Christopher NC (1998) Nicotine-dizocilpine interactions and working and reference memory performance of rats in the radial-arm maze. *Pharmacol Biochem Behav* 61:335-340.

Lewin B (1975) Units of transcription and translation: sequence components of heterogeneous nuclear RNA and messenger RNA. *Cell* 4:77-93.

Li XF, Phillips R, LeDoux JE (1995) NMDA and non-NMDA receptors contribute to synaptic transmission between the medial geniculate body and the lateral Nucleus of the amygdala. *Exp Brain Res* 105:87-100.

Li Y, Erzurumlu RS, Chen C, Jhaveri S, Tonegawa S (1994) Whisker-related neuronal patterns fail to develop in the trigeminal brainstem nuclei of NMDAR1 knockout mice. *Cell* 76:427-437.

Lin YJ, Bovetto S, Carver JM, Giordano T (1996) Cloning of the cDNA for the human NMDA receptor NR2C subunit and its expression in the central nervous system and periphery. *Mol Brain Res* 43:57-64.

Linden AM, Vasanen J, Storvik M, Lakso M, Korpi ER, Wong G, Castren E (2001) Uncompetitive antagonists of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors alter the mRNA expression of proteins associated with the NMDA receptor complex. *Pharmacol Toxicol* 88:98-105.

Lipton SA (1993) Prospects for clinically tolerated NMDA antagonists: open-channel blockers and alternative redox states of nitric oxide. *Trends Neurosci* 16:527-532.

Lipton SA, Rosenberg PA (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *New Engl J Med* 330:613-622.

Lisman JE (1999) Relating hippocampal circuitry to function: recall of memory sequences by reciprocal dentate-CA3 interactions. *Neuron* 22:233-242.

Lister RG (1987) The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 92:180-185.

Lobe CG, Nagy A (1998) Conditional genome alteration in mice. *Bioessays* 20:200-208.

Long JM, Kesner RP (1995) Phencyclidine impairs temporal order memory for spatial locations in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 52:645-648.

Lopes da Silva FH, Arnolds DE (1978) Physiology of the hippocampus and related structures. *Annu Rev Physiol* 40:185-216.

Lopez-Garcia JC (1998) Two different forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Neurobiology* 6:75-98.

Loscher W, Annies R, Honack D (1991) The N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 induces increases in dopamine and serotonin metabolism in several brain regions of rats. *Neurosci Lett* 128:191-194.

Lu YF, Kandel ER, Hawkins RD (1999) Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. *J Neurosci* 19:10250-10261.

Luo J, Wang Y, Yasuda RP, Dunah AW, Wolfe BB (1997) The majority of N-methyl-D-aspartate receptor complexes in adult rat cerebral cortex contain at least three different subunits (NR1/NR2A/NR2B). *Mol Pharmacol* 51:79-86.

Lynch DR, Lawrence JJ, Lenz S, Aneqawa NJ, Dichter M, Pritchett DB (1995) Pharmacological characterization of heterodimeric NMDA receptors composed of NR 1a and 2B subunits: differences with receptors formed from NR 1a and 2A. *J Neurochem* 64:1462-1468.

Lynch G (1986) *Synapses, circuits, and the beginnings of memory*. MIT Press, Cambridge, MA.

Maeda T, Kaneko S, Satoh M (1993) Bidirectional modulation of long-term potentiation by carbachol via M1 and M2 muscarinic receptors in guinea pig hippocampal mossy fiber-CA3 synapses. *Brain Res* 619:324-330.

Magnusson KR (2000) Declines in mRNA expression of different subunits may account for differential effects of aging on agonist and antagonist binding to the NMDA receptor. *J Neurosci* 20:1666-1674.

Malinow R, Schulman H, Tsien RW (1989) Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* 245:862-866.

Marchi M, Raiteri M (1989) Interaction acetylcholine-glutamate in rat hippocampus: involvement of two subtypes of M-2 muscarinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 248:1255-1260.

Maren S, Aharonov G, Stote DL, Fanselow MS (1996) N-methyl-D-aspartate receptors in the basolateral amygdala are required for both acquisition and expression of the conditional fear in rats. *Behav Neurosci* 110:1365-1374.

Martini R (2000) Animal models for inherited peripheral neuropathies: chances to find treatment strategies ? *J Neurosci Res* 61:244-250.

Mason KI, Mallet PE, Jhamandas K, Boegman RJ, Beninger RJ (1999) Nucleus basalis injections of N-methyl-D-aspartate enhance memory of rats in the double Y-maze. *Brain Res Bull* 48:65-71.

Massicotte G, Baudry M (1991) Triggers and substrates of hippocampal synaptic plasticity. *Neurosci Biobehav Rev* 15:415-423.

Matsuda K, Kamiya Y, Matsuda S, Yuzaki M (2002) Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduces calcium permeability. *Mol Brain Res* 100:43-52.

Matsuoka N, Aigner TG (1996) D-cycloserine, a partial agonist at the glycine site coupled to N-methyl-D-aspartate receptors, improves visual recognition memory in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 278:891-897.

Matsuyama S, Matsumoto A, Enomoto T, Nishizaki T (2000) Activation of nicotinic acetylcholine receptors induces long-term potentiation in vivo in the intact mouse dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 12:3741-3747.

Mayford M, Kandel ER (1999) Genetic approaches to memory storage. *Trends Genet* 15:463-470.

Mayford M, Mansuy IM, Müller RU, Kandel ER (1997) Memory and behavior: a second generation of genetically modified mice. *Curr Biol* 7:R580-589.

Mayford M, Wang J, Kandel ER, O'Dell TJ (1995) CaMKII regulates the frequency-response function of hippocampal slices for the production of both LTD and LTP. *Cell* 81:891-904.

McCabe BJ, Davey JE, Horn G (1992) Impairment of learning by localized injection of an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist into the hyperstriatum ventrale of the domestic chick. *Behav Neurosci* 106:947-953.

McCool BA, Lovinger DM (1995) Ifenprodil inhibition of the 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptor. *Neuropharmacology* 34:621-629.

McCormick DA (1992) Cellular mechanisms underlying cholinergic and noradrenergic modulation of neuronal firing mode in the cat and guinea pig dorsal lateral geniculate nucleus. *J Neurosci* 12:278-289.

McDonald AJ (1998) Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol* 55:257-332.

McEachern JC, Shaw CA (1996) An alternative to the LTP orthodoxy: a plasticity-pathology continuum model. *Brain Res Rev* 22:51-92.

McGaugh JL (1973) Drug facilitation of learning and memory. *Ann Rev Pharmacol* 13:229-241.

McHugh TJ, Blum KI, Tsien JZ, Tonegawa S, Wilson MA (1996) Impaired hippocampal representation of space in CA1-specific NMDAR1 knockout mice. *Cell* 87:1339-1349.

McIntyre CK, Marriott LK, Gold PE (2003) Cooperation between memory systems: acetylcholine release in the amygdala correlates positively with performance on a hippocampus-dependent task. *Behav Neurosci* 117:320-326.

McNamara RK, Skelton RW (1993) The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the morris water maze. *Brain Res Rev* 18:33-49.

McNaughton BL, Barnes CA, Rao G, Baldwin J, Rasmussen M (1986) Long-term enhancement of hippocampal synaptic transmission and the acquisition of spatial information. *J Neurosci* 6:563-571.

Meek J (1992) Why run parallel fibers parallel? Teleostean Purkinje cells as possible coincidence detectors, in a timing device subserving spatial coding of temporal differences. *Neuroscience* 48:249-283.

Meguro H, Mori H, Araki K, Kushiya E, Kutsuwada T, Yamazaki M, Kumanishi T, Arakawa M, Sakimura K, Mishina M (1992) Functional characterization of a heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs. *Nature* 357:70-74.

Migaud M, Charlesworth P, Dempster M, Webster LC, Watabe AM, Makhinson M, He Y, Ramsay MF, Morris RG, Morrison JH, O'Dell TJ, Grant SG (1998) Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* 396:433-439.

Milner B (1972) Disorders of learning and memory after temporal lobe lesions in man. *Clin Neurosurg* 19:421-446.

Miserendino MJD, Sananes CB, Melia KR, Davis M (1990) Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Nature* 345:716-718.

Miyamoto Y, Yamada K, Noda Y, Mori H, Mishina M, Nabeshima T (2001) Hyperfunction of dopaminergic and serotonergic neuronal systems in mice lacking the NMDA receptor epsilon1 subunit. *J Neurosci* 21:750-757.

Miyamoto Y, Yamada K, Noda Y, Mori H, Mishina M, Nabeshima T (2002) Lower sensitivity to stress and altered monoaminergic neuronal function in mice lacking the NMDA receptor epsilon 4 subunit. *J Neurosci* 22:2335-2342.

Molliver ME (1987) Serotonergic neuronal systems: what their anatomic organization tells us about function. *J Clin Psychopharmacol* 7:3S-23S.

Monaghan DT, Larsen H (1997) NR1 and NR2 subunit contributions to N-methyl-D-aspartate receptor channel blocker pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 280:614-620.

Monahan JB, Handelsmann GE, Hood WF, Cordi AA (1989) D-cycloserine, a positive modulator of the N-methyl-D-aspartate receptor, enhances performance of learning tasks in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 34:649-653.

Mondadori C, Waser PG, Huston JP (1977) Time-dependent effects of post-trial reinforcement, punishment or ECS on passive avoidance learning. *Physiol Behav* 18:1103-1109.

Mondadori C, Weiskrantz L, Buerki H, Petschke F, Fagg GE (1989) NMDA receptor antagonists can enhance or impair learning performance in animals. *Exp Brain Res* 75:449-456.

Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH (1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256:1217-1221.

Moore RY, Bloom FE (1979) Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems. *Annu Rev Neurosci* 2:113-168.

Morato S, Brandao ML (1997) Paradoxical increase of exploratory behavior in the elevated plus-maze by rats exposed to two kinds of aversive stimuli. *Braz J Med Biol Res* 30:1113-1120.

Moreadith RW, Radford NB (1997) Gene targeting in embryonic stem cells: the new physiology and metabolism. *J Mol Med* 75:208-216.

Mori H, Manabe T, Watanabe M, Satoh Y, Suzuki N, Toki S, Nakamura K, Yagi T, Kushiya E, Takahashi T, Inoue Y, Sakimura K, Mishina M (1998) Role of the carboxy-terminal region of the GluR2 subunit in synaptic localization of the NMDA receptor channel. *Neuron* 21:571-580.

Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297:681-683.

Morris RG, Halliwell RF, Bowery N (1989) Synaptic plasticity and learning. II: Do different kinds of plasticity underlie different kinds of learning? *Neuropsychologia* 27:41-59.

Morris RGM (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11:47-60.

Morris RGM, Anderson E, Lynch GS, Baudry M (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319:774-776.

Moser EI, Krobot KA, Moser MB, Morris RG (1998) Impaired spatial learning after saturation of long-term potentiation. *Science* 281:2038-2042.

Moyner H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529-540.

Muir JL (1997) Acetylcholine, aging and Alzheimer's disease. *Pharm Biochem Behav* 56:687-696.

Müller R (1996) A quarter of a century of place cells. *Neuron* 17:813-822.

Müller RU, Kubie JL, Ranck JB (1987) Spatial firing patterns of hippocampal complex-spike cells in a fixed environment. *J Neurosci* 7:1935-1950.

Müller U (1999) Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mech Dev* 82:3-21.

Murphy GG, Glanzman DL (1997) Mediation of classical conditioning in *Aplysia californica* by long-term potentiation of sensorimotor synapses. *Science* 278:467-471.

Nader K, Schafe GE, LeDoux JE (2000) The labile nature of consolidation theory. *Nat Rev Neurosci* 1:216-219.

Nader K, Schafe GE, LeDoux JE (2000a) Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406:722-726.

Nakanishi N, Axel R, Schneider NA (1992) Alternative splicing generates functionally distinct N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8552-8556.

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

Nakanishi S, Masu M, Bessho Y, Nakajima Y, Hayashi Y, Shigemoto R (1994) Molecular diversity of glutamate receptors and their physiological functions. *EXS* 71:71-80.

Nakazawa K, Sun LD, Quirk MC, Rondi-Reig L, Wilson MA, Tonegawa S (2003) Hippocampal CA3 NMDA receptors are crucial for memory acquisition of one-time experience. *Neuron* 38:305-315.

Nelson RJ (1997) The use of genetic "Knockout" mice in behavioural endocrinology research. *Horm Behav* 31:188-196.

Nelson RJ, Young KA (1998) Behavior in mice with targeted disruption of single genes. *Neurosci Biobehav Rev* 22:453-62.

Niethammer M, Kim E, Sheng M (1996) Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J Neurosci* 16:2157-2163.

Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson PS (1999) Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J Neurobiol* 39:569-578.

Nishi M, Hinds H, Lu HP, Kawata M, Hayashi Y (2001) Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. *J Neurosci* 21:RC185.

Nordberg A, Lundqvist H, Hartvig P, Lilja A, Langstrom B (1995) Kinetic analysis of regional (S)(-)<sup>11</sup>C-nicotine binding in normal and Alzheimer brains--in vivo assessment using positron emission tomography. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 9:21-27.

O'Keefe J., Nadel L. (1978) *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford: Clarendon.

Oades RD (1981) Type of memory or attention? Impairments after lesions of the hippocampus and limbic ventral tegmentum. *Brain Res Bull* 7:221-226.

Okabe S, Collin C, Auerbach JM, Meiri N, Bengzon J, Kennedy MB, Segal M, McKay RDG (1998) Hippocampal synaptic plasticity in mice overexpressing an embryonic subunit of the NMDA receptor. *J Neurosci* 18:4177-4188.

O'Keefe J, Dostrovsky J (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 34:171-175.

Olton DS, Becker JT, Hendelman GE (1979) Hippocampus, space and memory. *Behav Brain Sci* 2:313-365.

Olton DS, Feustle WA (1981) Hippocampal function required for nonspatial working memory. *Exp Brain Res* 41:380-389.

Omkumar RV, Kiely MJ (1996) Identification of a phosphorylation site for calcium/calmodulin dependent protein kinase II in the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem* 271:31670-31678.

Otnaess MK, Brun VH, Moser MB, Moser EI (1999) Pretraining prevents spatial learning impairment after saturation of hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 19:RC49.

Ottersen OP, Storm-Mathisen J (1984) Glutamate- and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique. *J Comp Neurol* 229:374-392.

Packard MG (1998) Posttraining estrogen and memory modulation. *Horm Behav* 34:126-139.

Packard MG, McGaugh JL (1992) Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: further evidence for multiple memory systems. *Behav Neurosci* 106:439-446.

Packard MG, Teather LA (1997) Double dissociation of hippocampal and dorsal-striatal memory systems by posttraining intracerebral injections of 2-amino-5-phosphonopentanoic acid. *Behav Neurosci* 111:543-551.

Patton PE, McNaughton B (1995) Connection matrix of the hippocampal formation: I. The dentate gyrus. *Hippocampus* 5:245-286.

Pavlov IP (1927) *Conditioned reflexes*. Oxford University Press, London.

Paylor R, Morrison SK, Rudy JW, Waltrip LT, Wehner JM (1992) Brief exposure to an enriched environment improves performance on the Morris water task and increases hippocampal cytosolic protein kinase C activity in young rats. *Behav Brain Res* 52:49-59.

Pease S, Williams RL (1990) Formation of germ-line chimeras from embryonic stem cells maintained with recombinant leukemia inhibitory factor. *Exp Cell Res* 190:209-211.

Peier AM, McIlwain KL, Kenneson A, Warren ST, Paylor R, Nelson DL (2000) (Over)correction of FMR1 deficiency with YAC transgenics: behavioral and physical features. *Hum Mol Genet* 9:1145-59.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14: 149-67.

Perrette SP, Ruiz BP, Mauk MD (1993) Cerebellar cortex lesions disrupt learning-dependent timing of conditioned eyelid responses. *J. Neurosci* 13:1708-1718.

Picciotto MR, Wickman K (1998) Using knockout and transgenic mice to study neurophysiology and behavior. *Physiol Rev* 78:1131-1163.

Pieri I, Schlett K, Metzger F, Steigerwald F, Dere E, Kirilly D, Barabás B, Marchetti L, Gerspach J, Huston JP, Pfizenmaier K, Köhr G, Eisel ULM (2003) Persistent NR2B expression in cerebellar granule cells affects Purkinje cell innervation and motor performance. *J Neurosci*, Eingereicht.

Pilowsky PM, Suzuki S, Minson JB (1994) Antisense oligonucleotides: a new tool in neuroscience. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 21:935-944.

Pittenger C, Kandel E (1998) A genetic switch for long-term memory. *C R Acad Sci III* 321:91-96.

Plant T, Schirra C, Garaschuk O, Rossier J, Konnerth A (1997) Molecular determinants of NMDA receptor function in GABAergic neurons of rat forebrain. *J Physiol* 499:47-63.

Platenik J, Kuramoto N, Yoneda Y (2000) Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals. *Life Sci* 67:335-364.

Pleskacheva MG, Wolfer DP, Kupriyanova IF, Nikolenko DL, Scheffrahn H, Dell'Omo G, Lipp HP (2000) Hippocampal mossy fibers and swimming navigation learning in two vole species occupying different habitats. *Hippocampus* 10:17-30.

Pollard H, Khrestchatisky M, Moreau J, Ben-Ari Y (1993) Transient expression of the NR2C subunit of the NMDA receptor in developing rat brain. *Neuroreport* 4:411-414.

Postle BR, Corkin S (1998) Impaired word-stem completion priming but intact perceptual identification priming with novel words: evidence from the amnesic patient H.M. *Neuropsychologia* 36:421-440.

Potter PE, Meek JL, Neff NH (1983) Acetylcholine and choline in neuronal tissue measured by HPLC with electrochemical detection. *J Neurochem* 41:188-194.

Poucet B, Benhamou S (1997) The neuropsychology of spatial cognition in the rat. *Crit Rev Neurobiol* 11:101-120.

Premkumar LS, Auerbach A (1997) Stoichiometry of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor channels inferred from single-channel current patterns. *J Gen Physiol* 110:485-502.

Priestley T, Laughton P, Myers J, Le-Bourdelles B, Kerby J, Whiting PJ (1995) Pharmacological properties of recombinant human N-methyl-D-aspartate receptors comprising NR1a/NR2A and NR1a/NR2B subunit assemblies expressed in permanently transfected mouse fibroblast cells. *Mol Pharmacol* 48:841-848.

Przybylski J, Sara SJ (1997) Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav Brain Res* 84:241-246.

Pulvirenti L (1992) Neural plasticity and memory: towards an integrated view. *Funct Neurol* 7:481-490.

Puma C, Baudoin C, Bizot JC (1998) Effects of intraseptal infusions of N-methyl-D-aspartate receptor ligands on memory in an object recognition task in rats. *Neurosci Lett* 244:97-100.

Puolivali J, Miettinen R, Pradier L, Riekkinen P (2000) Apolipoprotein E-deficient mice are not more susceptible to the biochemical and memory deficits induced by nucleus basalis lesion. *Neuroscience* 96:291-297.

Rafiki A, Bernard A, Medina I, Gozlan H, Khrestchatisky M (2000) Characterization in cultured cerebellar granule cells and in the developing rat

brain of mRNA variants for the NMDA receptor 2C subunit. *J Neurochem* 74:1798-1808.

Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, Shimizu E, Kyin M, Tsien JZ (2000) Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci* 3:238-244.

Rampon C, Tsien JZ (2000) Genetic analysis of learning behavior-induced structural plasticity. *Hippocampus* 10:605-609.

Rescorla RA (1988) Behavioral studies of Pavlovian conditioning. *Annu Rev Neurosci* 11:329-352.

Revel M, Groner Y (1978) Post-transcriptional and translational controls of gene expression in eukaryotes. *Annu Rev Biochem* 47:1079-1126.

Richter-Levin G, Akirav I (2000) Amygdala-hippocampus dynamic interaction in relation to memory. *Mol Neurobiol* 22:11-20.

Riedel G, Micheau J, Lam AG, Roloff E, Martin SJ, Bridge H, Hoz L, Poeschel B, McCulloch J, Morris RG (1999) Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nat Neurosci* 2:898-905.

Riekkinen M, Riekkinen P (1997) Nicotine and D-cycloserine enhance acquisition of water maze spatial navigation in aged rats. *Neuroreport* 8:699-703.

Ritter LM, Vazquez DM, Meador-Woodruff JH (2002) Ontogeny of ionotropic glutamate receptor subunit expression in the rat hippocampus. *Dev Brain Res* 139:227-236.

Roberson ED, English JD, Sweatt JD (1996) A biochemist's view of long-term potentiation. *Learn Mem* 3:1-24.

Rodrigues SM, Schafe GE, LeDoux JE (2001) Intra-amygdala blockade of the NR2B subunit of the NMDA receptor disrupts the acquisition but not the expression of fear conditioning. *J Neurosci* 21:6889-6896.

Rolls ET (2000) Memory systems in the brain. *Ann Rev Psychol* 51:599-630.

Rosenberg RN (2000) The molecular and genetic basis of AD: the end of the beginning: the 2000 Wartenberg lecture. *Neurology* 54:2045-2054.

Rozas G, Labandeira-Garcia JL (1997) Drug-free evaluation of rat models of parkinsonism and nigral grafts using a new automated rotarod test. *Brain Res* 749:188-199.

Rudolf GD, Cronin CA, Landwehrmeyer GB, Standaert DG, Penney JB, Young AB (1996) Expression of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor subunits in the prefrontal cortex of the rat. *Neuroscience* 73:417-427.

- Rudolph U, Mohler H (1999) Genetically modified animals in pharmacological research: future trends. *Eur J Pharmacol* 375:327-337.
- Rudy JW, O'Reilly RC (1999) Contextual fear conditioning, conjunctive representations, pattern completion, and the hippocampus. *Behav Neurosci* 113:867-880.
- Rusted JM, Warburton DM (1992) Facilitation of memory by post-trial administration of nicotine: evidence for an attentional explanation. *Psychopharmacology* 108:452-455.
- Saez E, No D, West A, Evans RM (1997) Inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Curr Opin Biotechnol* 8:608-816.
- Sagar HJ, Gabrieli JD, Sullivan EV, Corkin S (1990) Recency and frequency discrimination in the amnesic patient H.M. *Brain* 113:581-602.
- Sahakian BJ, Owen AM, Morant NJ, Eagger SA, Boddington S, Crayton L, Crockford HA, Crooks M, Hill K, Levy R (1993) Further analysis of the cognitive effects of tetrahydroaminoacridine (THA) in Alzheimer's disease: assessment of attentional and mnemonic function using CANTAB. *Psychopharmacology* 110:395-401.
- Sakimura K, Kutsuwada T, Ito I, Manabe T, Takayama C, Kushiya E, Yagi T, Aizawa S, Inoue Y, Sugiyama H, Mishina M (1995) Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Nature* 373:151-155.
- Sanger DJ, Joly D (1991) Effects of NMDA receptor antagonists and sigma ligands on the acquisition of conditioned fear in mice. *Psychopharmacology* 104:27-34.
- Sans N, Petralia RS, Wang YX, Blahos J, Hell JW, Wenthold RJ (2000) A developmental change in NMDA receptor-associated proteins at hippocampal synapses. *J Neurosci* 20:1260-1271.
- Sara SJ (2000) Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn Mem* 7:73-84.
- Sarter M, Bruno JP (1997) Cognitive functions of cortical acetylcholine: toward a unifying hypothesis. *Brain Res Rev* 23:28-46.
- Sarter M, Bruno JP, Givens B, Moore H, McGaughy J, McMahan K (1996) Neuronal mechanisms mediating drug-induced cognition enhancement: cognitive activity as a necessary intervening variable. *Cogn Brain Res* 3:329-343.
- Saucier D, Cain DP (1995) Spatial learning without NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Nature* 378:186-189.

Schaaf MJ, De-Kloet ER, Vreugdenhil E (2000) Corticosterone effects on BDNF expression in the hippocampus. Implications for memory formation. *Stress* 3:201-208.

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270:467-470.

Schenk F, Morris RG (1985) Dissociation between components of spatial memory in rats after recovery from the effects of retrohippocampal lesions. *Exp Brain Res* 58:11-28.

Scherzer CR, Landwehrmeyer GB, Kerner JA, Counihan TJ, Kosinski CM, Standaert DG, Daggett LP, Velicelebi G, Penney JB, Young AB (1998) Expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the human brain: hippocampus and cortex. *J Comp Neurol* 390:75-90.

Scoville WB, Milner B (2000) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 12:103-113.

Sedelis M, Hofele K, Auburger GW, Morgan S, Huston JP, Schwarting RKW (2000) Evidence for resistance to MPTP in C57BL/6 x BALB/c F1 hybrids as compared with their progenitor strains. *Neuroreport* 11:1093-1096.

Sedelis M, Schwarting RKW, Huston JP (2001) Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 125:109-125.

Sethy VM, Francis JW (1988) Regulation of brain acetylcholine concentration by muscarinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 246:243-248.

Shapiro M (2001) Plasticity, hippocampal place cells, and cognitive maps. *Arch Neurol* 58:874-881.

Shapiro ML, O'Connor C (1992) N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 and spatial memory representation: working memory is impaired in an unfamiliar environment but not in a familiar environment. *Behav Neurosci* 106:604-612.

Sharma AC, Kulkarni SK (1991) Effects of MK-801 and ketamine on short-term memory deficits in passive avoidance step-down task paradigm in mice. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 13:155-159.

Sheng M, Cummings J, Roldan LA, Jan YN, Jan LY (1994) Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 368:144-147.

Shimizu E, Tang YP, Rampon C, Tsien JZ (2000) NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science* 290:1170-1174.

- Shull RN, Holloway FA (1985) Behavioral effects of hippocampal system lesions on rats in an operant paradigm. *Brain Res Bull* 14:315-322.
- Sierocinska J, Nikolaev E, Danysz W, Kaczmarek L (1991) Dextrorphan blocks long- but not short-term memory in a passive avoidance task in rats. *Eur J Pharmacol* 205:109-111.
- Silva AJ (1997) Mutant mice and neuroscience: recommendations concerning genetic background. Branbury conference on genetic background in mice. *Neuron* 19:755-759.
- Silva AJ, Josselyn SA (2002) The molecules of forgetfulness. *Nature* 418:929-930.
- Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S (1998) CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* 21:127-148.
- Silva AJ, Paylor R, Wehner JM, Tonegawa S (1992a) Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 257:201-206.
- Silva AJ, Stevens CF, Tonegawa S, Wang Y (1992b) Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 257:206-211.
- Sircar R, Follesa P, Ticku MK (1996) Postnatal phencyclidine treatment differentially regulates N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNA expression in developing rat cerebral cortex. *Mol Brain Res* 40:214-220.
- Sircar R, Rappaport M, Nichtenhauser R, Zukin SR (1987) The novel anticonvulsant MK-801: a potent and specific ligand of the brain phencyclidine/sigma-receptor. *Brain Res* 435:235-240.
- Sirvio J, Ekonsalo T, Riekkinen P, Lahtinen H, Riekkinen P (1992) D-cycloserine, a modulator of the N-methyl-D-aspartate receptor, improves spatial learning in rats treated with muscarinic antagonist. *Neurosci Lett* 146:215-218.
- Skinner BF (1938) *The behavior of organisms: an experimental analysis*. Appleton-Century, New York.
- Slangen JL, Earley B, Jaffard R, Richelle M, Olton DS (1990) Behavioral models of memory and amnesia. *Pharmacopsychiatry* 23 Suppl 2:81-84.
- Smith HF (1988) Time, reconstruction and psychic reality. *J Am Acad Psychoanal* 16:71-81.
- Snell LD, Johnson KM (1985) Antagonism of N-methyl-D-aspartate-induced transmitter release in the rat striatum by phencyclidine-like drugs and its relationship to turning behavior. *J Pharmacol Exp Ther* 235:50-57.

Soloviev MM, Abutidze K, Mellor I, Streit P, Grishin EV, Usherwood PN, Barnard EA (1998) Plasticity of agonist binding sites in hetero-oligomers of the unitary glutamate receptor subunit XenU1. *J Neurochem* 71:991-1001.

Somogyi P, Hodgson AJ, Smith AD, Nunzi MG, Gorio A, Wu JY (1984) Different populations of GABAergic neurons in the visual cortex and hippocampus of cat contain somatostatin- or cholecystokinin-immunoreactive material. *J Neurosci* 4:2590-2603.

Soriano P (1995) Gene targeting in ES cells. *Annu Rev Neurosci* 18:1-18.

Southern EM (1984) DNA sequences and chromosome structure. *J Cell Sci* 1:31-41.

Sprengel R, Suchanek B, Amico C, Brusa R, Burnashev N, Rozov A, Hvalby O, Jensen V, Paulsen O, Andersen P, Kim JJ, Thompson RF, Sun W, Webster LC, Grant SG, Eilers J, Konnerth A, Li J, McNamara JO, Seeburg PH (1998) Importance of the intracellular domain of NR2 subunits for NMDA receptor function in vivo. *Cell* 92:279-289.

Squire LR (1986) Mechanisms of memory. *Science* 232:1612-1619.

Squire LR (1992) Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev* 99:195-231.

Standaert DG, Landwehrmeyer GB, Kerner JA, Penney JB, Young AB (1996) Expression of NMDAR2D glutamate receptor subunit mRNA in neurochemically identified interneurons in the rat neostriatum, neocortex and hippocampus. *Mol Brain Res* 42:89-102.

Staubli U, Thibault O, DiLorenzo M, Lynch G (1989) Antagonism of NMDA receptors impairs acquisition but not retention of olfactory memory. *Behav Neurosci* 103:54-60.

Steele RJ, Morris RGM (1999) Delay-dependent impairment of a matching-to-place task with chronic and intrahippocampal infusion of the NMDA-antagonist D-AP5. *Hippocampus* 9:118-136.

Stern P, Behe P, Schoepfer R, Colquhoun D (1992) Single-channel conductances of NMDA receptors expressed from cloned cDNAs: comparison with native receptors. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 250:271-277.

Stiedl O, Birkenfeld K, Palve M, Spiess J (2000) Impairment of conditioned contextual fear of C57BL/6J mice by intracerebral injections of the NMDA receptor antagonist APV. *Behav Brain Res* 116:157-168.

Strack S, Colbran RJ (1998) Autophosphorylation-dependent targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II by the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem* 273:20689-20692.

Strack S, McNeill RB, Colbran RJ (2000) Mechanism and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II targeting to the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem* 275:23798-23806.

Sturchler-Pierrat C, Sommer B (1999) Transgenic animals in Alzheimer's disease research. *Rev Neurosci* 10:15-24.

Sucher NJ, Brose N, Deitcher DL, Awobuluyi M, Gasic GP, Bading H, Cepko CL, Greenberg ME, Jahn R, Heinemann SF (1993) Expression of endogenous NMDAR1 transcripts without receptor protein suggests post-transcriptional control in PC12 cells. *J Biol Chem* 268:22299-22304.

Sucher NJ, Akbarian S, Chi CL, Leclerc CL, Awobuluyi M, Deitcher DL, Wu MK, Yuan JP, Jones EG, Lipton SA (1995) Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain. *J Neurosci* 15:6509-6520.

Sugihara H, Moriyoshi K, Ishii T, Masu M, Nakanishi S (1992) Structures and properties of seven isoforms of the NMDA receptor generated by alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 185:826-832.

Sullivan EV, Sagar HJ (1991) Double dissociation of short-term and long-term memory for nonverbal material in Parkinson's disease and global amnesia. A further analysis. *Brain* 114:893-906.

Sun L, Shipley MT, Lidow MS (2000) Expression of NR1, NR2A-D, and NR3 subunits of the NMDA receptor in the cerebral cortex and olfactory bulb of adult rat. *Synapse* 35:212-221.

Sutherland RJ, McDonald RJ (1990) Hippocampus, amygdala, and memory deficits in rats. *Behav Brain Res* 37:57-79.

Sutherland RJ, Wishaw IQ, Kolb B (1983) A behavioural analysis of spatial localization following electrolytic, kainate- or colchicine-induced damage to the hippocampal formation in the rat. *Behav Brain Res* 7:133-153.

Swanson LW (1977) The anatomical organization of septo-hippocampal projections. *Ciba Found Symp* 58:25-48.

Szinyei C, Stork O, Pape HC (2003) Contribution of NR2B subunits to synaptic transmission in amygdaloid interneurons. *J Neurosci* 23:2549-2556.

Tang AH, Ho PM (1988) Both competitive and non-competitive antagonists of N-methyl-D-aspartic acid disrupt brightness discrimination in rats. *Eur J Pharmacol* 151:143-146.

Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA, Zhuo M, Liu G, Tsien JZ (1999) Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401:63-69.

Tang YP, Wang H, Feng R, Kyin M, Tsien JZ (2001) Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology* 41:779-790.

Thier P, Dicke PW, Haas R, Barash S (2000) Encoding of movement time by populations of cerebellar Purkinje cells. *Nature* 405:72-76.

Thierry AM, Gioanni Y, Degenetais E, Glowinski J (2000) Hippocampo-prefrontal cortex pathway: anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus* 10:411-419.

Thomas KL, Davis S, Hunt SP, Laroche S (1996) Alterations in the expression of specific glutamate receptor subunits following hippocampal LTP in vivo. *Learn Mem* 3:197-208.

Thompson RF, Spencer WA (1966) Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychol Rev* 73:16-43.

Thompson CL, Drewery DL, Atkins HD, Stephenson FA, Chazot PL (2002) Immunohistochemical localization of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in the adult murine hippocampal formation: evidence for a unique role of the NR2D subunit. *Mol Brain Res* 102:55-61.

Thorndike EL (1932) *The fundamentals of learning*. Teachers College, New York.

Tolman EC (1966) *Behavior and psychological man: Essays in motivation and learning*. University of California Press, Berkeley.

Tomkins GM, Martin DW (1970) Hormones and gene expression. *Annu Rev Genet* 4:91-106.

Traynelis SF, Hartley M, Heinemann SF (1995) Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science* 268:873-876.

Treit D, Fundytus M (1988) Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 31:959-962.

Trullas R, Skolnick P (1990) Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *Eur J Pharmacol* 21:1-10.

Tsien JZ (1998) Behavioral genetics: subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Pathol Biol* 46:699-700.

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

Tsumoto T (1992) Long-term potentiation and long-term depression in the neocortex. *Prog Neurobiol* 39:209-228.

- Ungerer A, Mathis C, Melan C, De-Barry J (1991) The NMDA receptor antagonists, CPP and gamma-L-glutamyl-L-aspartate, selectively block post-training improvement of performance in a Y-maze avoidance learning task. *Brain Res* 549:59-65.
- Usiello A, Sargolini F, Roullet P, Ammassari-Teule M, Passino E, Oliverio A, Mele A (1998) N-methyl-D-aspartate receptors in the nucleus accumbens are involved in detection of spatial novelty in mice. *Psychopharmacology* 137:175-183.
- Vallano ML, Lambolez B, Audinat E, Rossier J (1996) Neuronal activity differentially regulates NMDA receptor subunit expression in cerebellar granule cells. *J Neurosci* 16:631-639.
- Van-Broeckhoven CL (1995) Molecular genetics of Alzheimer disease: identification of genes and gene mutations. *Eur Neurol* 35:8-19.
- Van-der-Neut R (1997) Targeted gene disruption: applications in neurobiology. *J Neurosci Methods* 71:19-27.
- Vasar E, Harro J, Lang A, Soosaar A, Oopik T, Koks S, Sihver S, Volke V (1993) Anti-exploratory effect of N-methyl-D-aspartate in elevated plus-maze. *Eur Neuropsychopharmacol* 3:63-73.
- Vicini S, Wang JF, Li JH, Zhu WJ, Wang YH, Luo JH, Wolfe BB, Grayson DR (1998) Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *J Neurophysiol* 79:555-566.
- Vissel B, Krupp JJ, Heinemann SF, Westbrook GL (2002) Intracellular domains of NR2 alter calcium-dependent inactivation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol* 61:595-605.
- Voits M, Fink H, Gerhardt P, Huston JP (1995) Application of 'nose-poke habituation': validation with post-trial diazepam- and cholecystokinin-induced hypo- and hypermnesia. *J Neurosci Methods* 57:101-105.
- Voytko ML (1996) Cognitive functions of the basal forebrain cholinergic system in monkeys: memory or attention ? *Behav Brain Res* 75:13-25.
- Wafford KA, Bain CJ, Le-Bourdelle B, Whiting PJ, Kemp JA (1993) Preferential co-assembly of recombinant NMDA receptors composed of three different subunits. *Neuroreport* 4:1347-1349.
- Wang LY, Orser BA, Brautigan DL, MacDonald JF (1994) Regulation of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons by protein phosphatases 1 and 2A. *Nature* 369:230-232.
- Wang Y, Krushel LA, Edelman GM (1996) Targeted DNA recombination in vivo using an adenovirus carrying the cre recombinase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3932-3936.

- Wang YT, Salter MW (1994) Regulation of NMDA receptors by tyrosine kinases and phosphatases. *Nature* 369:233-235.
- Ward MT, Stoelzel CR, Markus EJ (1999) Hippocampal dysfunction during aging II: deficits on the radial-arm maze. *Neurobiol Aging* 20:373-380.
- Watanabe M, Inoue Y, Sakimura K, Manabe T, Mishina M (1992) Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport* 3:1138-1140.
- Watanabe Y, Ikegaya Y, Saito H, Abe K (1995) Roles of GABAA, NMDA and muscarinic receptors in induction of long-term potentiation in the medial and lateral amygdala in vitro. *Neurosci Res* 21:317-322.
- Watson SJ, Meng F, Thompson RC, Akil H (2000) The "chip" as a specific genetic tool. *Biol Psychiatry* 48:1147-1156.
- Wei F, Wang GD, Kerchner GA, Kim SJ, Xu HM, Chen ZF, Zhuo M (2001) Genetic enhancement of inflammatory pain by forebrain NR2B overexpression. *Nat Neurosci* 4:164-169.
- Weisskopf MG, LeDoux JE (1999) Distinct populations of NMDA receptors at subcortical and cortical inputs to principal cells of the lateral amygdala. *J Neurophysiol* 81:930-934.
- Wen HT, Rhoton AL, de-Oliveira E, Cardoso AC, Tedeschi H, Baccanelli M, Marino R (1999) Microsurgical anatomy of the temporal lobe: part 1: mesial temporal lobe anatomy and its vascular relationships as applied to amygdalohippocampectomy. *Neurosurgery* 45:549-592.
- Wenk GL (1984) Pharmacological manipulations of the substantia innominata-cortical cholinergic pathway. *Neurosci Lett* 51:99-103.
- Wenzel A, Fritschy JM, Mohler H, Benke D (1997) NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins. *J Neurochem* 68:469-478.
- Wheal HV, Chen Y, Mitchell J, Schachner M, Maerz W, Wieland H, Van-Rossum D, Kirsch J (1998) Molecular mechanisms that underlie structural and functional changes at the postsynaptic membrane during synaptic plasticity. *Prog Neurobiol* 55:611-640.
- Whishaw I Q (1995) A comparison of rats and mice in a swimming pool place task and matching to place task: some surprising differences. *Physiol Behav* 58:687-693.
- White NM (1989) Reward or reinforcement: What's the difference? *Neurosci Biobehav Rev* 13:181-186.

Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR (1982) Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 215:1237-1239.

Williams JM, Mason-Parker SE, Abraham WC, Tate WP (1998) Biphasic changes in the levels of N-methyl-D-aspartate receptor-2 subunits correlate with the induction and persistence of long-term potentiation. *Mol Brain Res* 60:21-27.

Wilson MA, Tonegawa S (1997) Synaptic plasticity, place cells and spatial memory: study with second generation knockouts. *Trends Neurosci* 20:102-106.

Winer BJ (1962) *Statistical principles in experimental design*. Mc-Graw-Hill. New York.

Winkler J, Suhr ST, Gage FH, Thal LJ, Fisher LJ (1995) Essential role of neocortical acetylcholine in spatial memory. *Nature* 375:484-487.

Winocur G, Mills JA (1969) Hippocampus and septum in response inhibition. *J Comp Physiol Psychol* 67:352-357.

Witter MP (1993) Organization of the entorhinal-hippocampal system: a review of current anatomical data. *Hippocampus* 3:33-44.

Wong HK, Liu XB, Matos MF, Chan SF, Perez-Otano I, Boysen M, Cui J, Nakanishi N, Trimmer JS, Jones EG, Lipton SA, Sucher NJ (2002) Temporal and regional expression of NMDA receptor subunit NR3A in the mammalian brain. *J Comp Neurol* 450:303-317.

Woodruff-Pak DS (1993) Eyeblink classical conditioning in H.M.: delay and trace paradigms. *Behav Neurosci* 107:911-925.

Xiang CC, Chen Y (2000) cDNA microarray technology and its applications. *Biotechnology Advances* 18:35-46.

Yamakura T, Shimoji K (1999) Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Prog Neurobiol* 59:279-298.

Yanagihara D, Udo M (1994) Climbing fiber responses in cerebellar vermal Purkinje cells during perturbed locomotion in decerebrate cats. *Neurosci Res* 19:245-248.

Young BD (1984) Chromosome analysis by flow cytometry: a review. *Basic Appl Histochem* 28:9-19.

Zapata A, Capdevila JL, Trullas (1998) Region-specific and calcium-dependent increase in dialysate choline levels by NMDA. *J Neurosci* 18:3597-3605.

Zhong J, Carrozza DP, Williams K, Pritchett DB, Molinoff PB (1995) Expression of mRNAs encoding subunits of the NMDA receptor in developing rat brain. *J Neurochem* 64:531-539.

Zilles K, Wu J, Crusio WE, Schwegler H (2000) Water maze and radial maze learning and the density of binding sites of glutamate, GABA, and serotonin receptors in the hippocampus of inbred mouse strains. *Hippocampus* 10:213-225.

Zola-Morgan S, Squire LR (1993) Neuroanatomy of memory. *Annu Rev Neurosci* 16:547-563.

Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG (1986) Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci* 6:2950-2967.

## 6. ANHANG

Tabellen der Rohwerte zu den Experimenten I-VI.

### EXPERIMENT I: ROTAROD. TABELLE 1 A-D:

Tabelle 1A) Rotarod: juvenile NR2C-2B Mäuse. Zeit bis zum Abgleiten von der rotierenden Walze in Sekunden. D = Durchgang, Nr. = Tiernummer, MW = Gruppenmittel, SF = Standardfehler.

Nr.	Tag 1			Tag 2			Tag 3		
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
1	87	159	151	62	135	179	194	233	264
2	170	188	236	106	213	216	272	282	248
3	90	192	189	164	300	285	188	271	300
4	209	204	186	194	247	253	300	131	291
5	76	72	153	130	184	186	132	67	171
6	69	106	143	164	95	239	127	190	189
7	41	127	185	100	105	157	130	172	168
8	170	212	216	300	277	300	300	300	300
9	300	278	300	244	133	300	300	300	300
10	160	156	282	300	198	202	300	300	213
MW	25,10	137,20	169,40	204,10	176,40	188,70	231,70	224,30	224,60
SF	0,43	23,82	17,68	16,28	24,85	21,46	15,57	23,30	24,52

Tabelle 1B) Rotarod: juvenile Wildtypmäuse. Zeit bis zum Abgleiten von der rotierenden Walze in Sekunden. D = Durchgang, Nr. = Tiernummer, MW = Gruppenmittel, SF = Standardfehler.

Nr.	Tag 1			Tag 2			Tag 3		
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
1	45	230	300	284	300	257	298	297	300
2	155	295	236	236	262	300	230	288	300
3	133	176	290	212	263	173	164	139	213
4	156	124	187	300	173	237	105	256	252
5	175	166	237	157	224	182	117	188	152
6	126	218	200	99	188	154	166	79	137
7	293	300	300	63	300	300	185	300	300
8	127	179	205	148	144	257	59	219	279
9	134	158	300	142	300	300	207	233	269
10	135	178	171	67	110	275	160	210	300
11	152	175	36	231	103	263	236	275	300
12	70	234	249	133	223	236	214	209	229
13	77	139	138	229	282	135	218	231	300
14	104	231	211	71	74	138	163	115	158
15	96	280	300	162	117	231	300	242	300
MW	24,33	131,87	205,53	224,00	168,93	204,20	229,20	188,13	218,73
SF	0,22	14,28	13,80	18,43	19,20	19,96	14,63	16,56	16,43

Tabelle 1C) Rotarod: adulte NR2C-2B Substitutionsmäuse. Zeit bis zum Abgleiten von der rotierenden Walze in Sekunden. D = Durchgang, Nr. = Tiernummer, MW = Gruppenmittel, SF = Standardfehler.

Nr.	Tag 1			Tag 2			Tag 3		
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
1	93	163	175	177	89	276	195	283	300
2	116	178	204	183	179	198	229	242	188
3	158	55	78	172	242	272	237	290	282
4	43	166	166	153	156	237	161	211	238
5	51	82	161	109	246	244	181	167	260
6	249	177	192	280	296	281	300	300	300
7	175	217	33	287	277	250	196	213	250
8	83	179	287	234	300	300	267	269	269
9	148	218	236	213	216	257	213	255	300
10	73	117	140	150	112	162	141	152	107
MW	118,90	155,20	167,20	195,80	211,30	247,70	212,00	238,20	249,40
SF	19,21	16,24	21,88	17,24	22,46	12,36	14,43	15,37	18,28

Tabelle 1D) Rotarod: adulte Wildtypmäuse. Zeit bis zum Abgleiten von der rotierenden Walze in Sekunden. D = Durchgang, Nr. = Tiernummer, MW = Gruppenmittel, SF = Standardfehler.

	Tag 1			Tag 2			Tag 3		
Nr.	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
1	153	300	247	300	270	238	274	292	17
2	300	300	121	270	300	300	198	234	252
3	134	216	300	219	261	81	217	285	300
4	151	119	179	220	300	253	157	236	378
5	143	208	195	204	219	250	229	243	204
6	252	300	300	189	209	174	77	237	205
7	132	226	68	300	300	300	300	300	300
8	218	300	225	251	208	300	251	201	199
9	300	279	248	300	300	300	300	300	300
MW	198,11	249,78	209,22	250,33	263,00	244,00	222,56	258,67	239,44
SF	22,18	19,72	24,47	13,88	12,86	23,35	22,67	11,32	32,19

EXPERIMENT II: ELEVATED PLUS-MAZE. TABELLE 2 A-D:

Tabelle 2A) Elevated Plus-Maze: juvenile NR2C-2B Substitutionsmäuse. Verweildauer in Sekunden in den bewandeten/ offenen Armen und Anzahl der Eintritte in die bewandeten/offenen Arme. Nr. = Tiernummer, MW = Gruppenmittel, SF = Standardfehler.

Nr.	Aufenthaltszeiten		Anzahl der Eintritte	
	Bewandet	Offen	Bewandet	Offen
1	296	0	5	0
2	251	5	12	1
3	290	0	12	0
4	283	1	14	1
5	275	0	5	0
6	261	5	11	1
7	284	2	10	2
8	286	0	10	0
9	286	0	7	0
10	278	1	7	1
MW	279,00	1,40	9,30	0,60
SF	4,09	0,60	0,94	0,21

Tabelle 2B) Elevated Plus-Maze: juvenile Wildtypmäuse. Verweildauer in Sekunden in den bewandeten/ offenen Armen und Anzahl der Eintritte in die bewandeten/offenen Arme. Nr. = Tiernummer, MW = Gruppenmittel, SF = Standardfehler.

Nr.	Aufenthaltszeiten		Anzahl der Eintritte	
	Bewandet	Offen	Bewandet	Offen
1	261	19	8	2
2	282	6	9	1
3	280	3	7	1
4	297	0	5	0
5	280	0	12	0
6	260	26	20	3
7	255	11	17	1
8	263	27	13	2
9	281	0	6	0
10	288	0	7	0
11	296	0	7	0
12	271	8	10	2
13	254	14	17	2
14	294	0	6	0
15	294	0	13	0
MW	277,07	7,60	10,47	0,93
SF	3,83	2,43	1,17	0,26

Tabelle 2C) Elevated Plus-Maze: adulte NR2C-2B Substitutionsmäuse. Verweildauer in Sekunden in den bewandeten/ offenen Armen und Anzahl der Eintritte in die bewandeten/offenen Arme. Nr. = Tiernummer, MW = Gruppenmittel, SF = Standardfehler.

Nr.	Aufenthaltszeiten		Anzahl der Eintritte	
	Bewandet	Offen	Bewandet	Offen
1	276	0	9	0
2	82	38	10	5
3	118	40	21	10
4	217	14	12	1
5	139	7	11	2
6	93	22	14	5
7	110	39	22	9
8	49	72	12	16
9	273	0	13	0
10	177	2	32	4
MW	153,44	23,42	15,60	5,20
SF	23,87	7,09	2,17	1,54

Tabelle 2D) Elevated Plus-Maze: adulte Wildtypmäuse. Verweildauer in Sekunden in den bewandeten/ offenen Armen und Anzahl der Eintritte in die bewandeten/offenen Arme. Nr. = Tiernummer, MW = Gruppenmittel, SF = Standardfehler.

Nr.	Aufenthaltszeiten		Anzahl der Eintritte	
	Bewandert	Offen	Bewandert	Offen
1	100	80	18	14
2	81	69	13	9
3	209	0	22	0
4	171	5	25	1
5	220	0	21	0
6	86	157	9	9
7	152	41	21	10
8	159	21	18	2
9	167	26	16	3
MW	149,51	44,44	18,11	5,33
SF	15,92	16,03	1,54	1,63

EXPERIMENT III: OFFENFELD. TABELLE 3 A-D:

Tabelle 3A) Offenfeld: juvenile NR2C-2B Substitutionsmäuse. Horizontale Aktivität bzw. Lokomotion in Zentimetern und Anzahl der Aufrichtungen (vertikale Aktivität).

Nr. = Tiernummer, MW = Gruppenmittel, SF = Standardfehler.

Nr.	Horizontale Aktivität		Vertikale Aktivität	
	Tag 1	Tag 2	Tag 1	Tag 2
1	883	1330	3	18
2	991	1054	8	12
3	1463	1032	17	11
4	1203	877	16	13
5	854	1025	18	20
6	1820	1134	34	21
7	1163	1232	10	14
8	920	1156	1	11
9	1519	976	30	23
10	1223	1255	10	12
MW	1203,74	1107,06	14,70	15,50
SF	94,88	41,91	3,22	1,37

Tabelle 3B) Offenfeld: juvenile Wildtypmäuse. Horizontale Aktivität bzw. Lokomotion in Zentimetern und Anzahl der Aufrichtungen (vertikale Aktivität). Nr. = Tiernummer, MW = Gruppenmittel, SF = Standardfehler.

Nr.	Horizontale Aktivität		Vertikale Aktivität	
	Tag 1	Tag 2	Tag 1	Tag 2
1	1165	1153	25	23
2	1822	1211	42	28
3	856	727	6	7
4	1790	838	18	7
5	1046	1635	15	42
6	1401	1804	18	54
7	1386	1075	25	19
8	1181	1008	21	21
9	1691	923	18	9
10	1179	1127	8	7
11	1268	1381	22	29
12	1178	1216	27	32
13	1688	1631	30	29
14	918	863	8	9
15	1443	1724	22	22
MW	1334,08	1221,00	20,33	22,53
SF	76,22	85,50	2,32	3,45

Tabelle 3C) Offenfeld: adulte NR2C-2B Substitutionsmäuse. Horizontale Aktivität bzw. Lokomotion in Zentimetern und Anzahl der Aufrichtungen (vertikale Aktivität). Nr. = Tiernummer, MW = Gruppenmittel, SF = Standardfehler.

Nr.	Horizontale Aktivität			Vertikale Aktivität		
	Tag 1	Tag 2	Tag 5	Tag 1	Tag 2	Tag 5
1	2903	2365	2767	67	80	32
2	1321	800	848	39	21	23
3	1702	1177	918	51	28	24
4	1466	765	491	39	19	7
5	1504	702	579	38	14	4
6	2270	1344	958	50	28	28
7	2339	1293	779	83	29	24
8	1602	937	649	40	22	12
9	1596	1742	1219	49	52	31
10	1983	1577	1285	91	40	45
MW	1868,64	1270,33	1049,29	54,70	33,30	23,00
SF	149,43	156,23	196,68	5,77	5,92	3,73

Tabelle 3D) Offenfeld: adulte Wildtypmäuse. Horizontale Aktivität bzw. Lokomotion in Zentimetern und Anzahl der Aufrichtungen (vertikale Aktivität). Nr. = Tiernummer, MW = Gruppenmittel, SF = Standardfehler.

Nr.	Horizontale Aktivität			Vertikale Aktivität		
	Tag 1	Tag 2	Tag 5	Tag 1	Tag 2	Tag 5
1	2068	1150	1739	55	26	44
2	2255	1802	1012	49	48	24
3	1561	836	809	38	16	12
4	1880	1147	1422	60	23	34
5	1442	1019	607	44	23	22
6	1572	1391	911	28	33	15
7	1980	1485	1315	58	55	33
8	1490	848	627	34	18	12
9	1577	1402	1388	44	53	40
MW	1758,43	1231,17	1092,22	45,56	32,78	26,22
SF	92,01	99,83	123,56	3,46	4,81	3,79

EXPERIMENT IV: OBJEKTEXPLORATION. TABELLE 4 A-B:

Tabelle 4A Objektexploration: NR2C-2B Substitutionsmäuse. Anzahl der Kontakte mit Objekten und Annäherungs- Rückzugsreaktionen. Tag 1 und 2 = Gesamtzahl der Kontakte mit zwei identischen Objekten, Neu = neues Objekt, Alt = bekanntes Objekt, AR = Annäherungs-Rückzugsreaktionen, Nr. = Tiernummer, MW = Gruppenmittel, SF = Standardfehler.

Nr.	Anzahl der Kontakte				AR
	Tag 1	Tag 2	Neu	Alt	
1	13	6	11	5	6
2	12	12	6	5	0
3	31	22	11	5	2
4	13	21	9	5	6
5	7	13	8	4	2
6	29	22	8	9	0
7	13	2	2	4	2
8	15	12	4	4	0
9	9	1	1	2	8
10	18	8	11	7	2
MW	16,00	11,90	7,10	5,00	2,80
SF	2,39	2,36	1,12	0,57	0,86

Tabelle 4B Objektexploration : Wildtypmäuse. Anzahl der Kontakte mit Objekten und Annäherungs- Rückzugsreaktionen. Tag 1 und 2 = Gesamtzahl der Kontakte mit zwei identischen Objekten, Neu = neues Objekt, Alt = bekanntes Objekt, AR = Annäherungs-Rückzugsreaktionen, Nr. = Tiernummer, MW = Gruppenmittel, SF = Standardfehler.

Nr.	Anzahl der Kontakte				AR
	Tag 1	Tag 2	Neu	Alt	
1	11	1	3	3	12
2	22	16	11	9	8
3	38	17	8	8	0
4	8	8	7	6	22
5	12	4	4	5	6
6	11	10	9	7	16
7	26	19	12	5	2
8	9	16	7	5	10
9	4	0	0	1	44
MW	15,67	10,11	6,78	5,44	13,33
SF	3,41	2,28	1,21	0,77	4,19

EXPERIMENT V: MORRIS WATER-MAZE. TABELLE A-I:

Tabelle 5A) Water-Maze: NR2C-2B Substitutionsmäuse. Suchzeit in Sekunden bis zum Aufklettern auf die Plattform während der initialen Akquisitionsphase. Nr. = Tiernummer, MW = Gruppenmittel, SF = Standardfehler.

	Tag 1				Tag 2				Tag 3				Tag 4			
Nr.	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16
1	60	7	2	60	27	6	11	60	14	60	25	8	29	21	8	12
2	60	60	60	60	60	11	60	3	12	25	10	3	5	7	19	3
3	15	9	8	15	16	51	13	3	16	29	3	7	13	8	2	7
4	60	9	49	5	60	36	60	60	60	60	60	5	15	7	1	60
5	60	60	46	60	20	8	28	9	14	3	25	60	16	12	30	60
6	60	60	60	60	60	60	60	60	24	60	51	27	4	16	2	5
7	60	8	48	25	60	60	60	34	4	12	9	9	16	3	8	2
8	60	60	60	36	60	14	4	18	8	10	13	32	32	10	5	3
9	60	60	60	35	4	60	60	45	8	13	3	3	11	13	5	14
10	60	15	5	60	36	19	20	16	27	21	7	10	14	5	6	5
MW	55,50	34,80	39,80	41,60	40,30	32,50	37,60	30,80	18,70	29,30	20,60	16,40	15,50	10,20	8,60	17,10
SF	4,27	7,99	7,40	6,40	6,68	7,01	7,32	7,19	4,84	6,74	6,02	5,48	2,70	1,63	2,73	6,88

Tabelle 5B) Water-Maze: Wildtypmäuse. Suchzeit in Sekunden bis zum Aufklettern auf die Plattform während der initialen Akquisitionsphase. D = Durchgang, Nr. = Tiernummer, MW = Gruppenmittel, SF = Standardfehler.

	Tag 1				Tag 2				Tag 3				Tag 4			
Nr.	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16
1	60	60	22	60	16	60	60	60	16	5	5	10	8	18	5	9
2	60	60	60	11	60	60	60	60	60	60	10	60	60	36	60	60
3	60	60	60	60	20	9	5	28	16	9	12	21	5	3	17	16
4	60	60	60	60	29	43	16	39	33	4	23	6	7	11	14	22
5	9	14	60	53	14	6	8	10	7	14	11	11	6	14	5	2
6	60	7	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	3
7	60	60	60	39	60	10	60	17	12	9	11	17	2	12	11	9
8	60	60	60	60	60	60	60	60	24	5	12	31	60	39	60	14
9	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	25	60	21	37
MW	54,33	49,00	55,78	51,44	42,11	40,89	43,22	43,78	32,00	25,11	22,67	30,67	25,89	28,11	28,11	19,11
SF	5,34	6,88	3,98	5,25	6,79	7,87	7,96	6,52	6,99	8,28	6,81	7,27	8,29	6,76	7,69	5,87

Tabelle 5C) Water-Maze: NR2C-2B Substitutionsmäuse. Suchzeit in Sekunden bis zum Aufklettern auf die Plattform während der Überlernphase. D = Durchgang, Nr. = Tiernummer, MW = Gruppenmittel, SF = Standardfehler.

	Tag 1				Tag 2				Tag 3				Tag 4			
Nr.	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16
1	11	23	6	4	12	7	5	4	13	9	5	28	8	2	2	41
2	7	9	7	4	10	3	9	6	3	9	24	4	2	4	7	5
3	11	9	13	21	13	2	8	26	3	15	3	17	40	8	4	4
4	7	6	6	60	55	10	1	13	8	7	60	5	7	14	2	2
5	38	6	35	4	12	2	9	2	6	6	5	10	3	5	5	6
6	25	20	14	31	17	2	4	12	7	2	13	13	14	17	7	7
7	27	9	50	9	28	6	26	2	4	7	5	5	10	5	2	2
8	38	5	2	5	3	16	1	10	5	2	3	19	3	4	5	4
9	10	4	16	2	3	5	11	1	5	7	6	11	1	2	2	9
10	11	13	22	4	11	25	9	11	7	9	4	3	23	3	10	2
MW	18,50	10,40	17,10	14,40	16,40	7,80	8,30	8,70	6,10	7,30	12,80	11,50	11,10	6,40	4,60	8,20
SF	3,72	1,93	4,51	5,57	4,59	2,24	2,14	2,27	0,89	1,12	5,34	2,40	3,65	1,54	0,83	3,53

Tabelle 5D) Water-Maze: Wildtypmäuse. Suchzeit in Sekunden bis zum Aufklettern auf die Plattform während der Überlernphase. D = Durchgang, Nr. = Tiernummer, MW = Gruppenmittel, SF = Standardfehler.

	Tag 1				Tag 2				Tag 3				Tag 4			
Nr.	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16
1	12	7	3	4	12	27	8	2	2	14	2	5	3	1	5	3
2	37	40	60	16	4	11	37	5	10	14	7	6	17	7	2	7
3	5	5	3	16	7	4	23	8	8	4	4	4	11	3	17	3
4	29	31	3	6	42	4	16	16	9	15	4	12	15	11	17	14
5	3	2	1	3	3	4	3	8	13	7	16	6	7	7	2	5
6	23	10	13	8	19	4	16	3	12	3	41	8	13	6	7	27
7	5	7	4	3	60	4	58	6	4	25	17	6	3	1	3	1
8	15	22	8	7	2	3	21	11	2	3	16	12	13	12	60	12
9	3	12	17	13	13	5	4	31	3	13	11	3	4	6	4	20
MW	14,67	15,11	12,44	8,44	18,00	7,33	20,67	10,00	7,00	10,89	13,11	6,89	9,56	6,00	13,00	10,22
SF	3,91	4,10	5,85	1,66	6,29	2,43	5,51	2,81	1,36	2,30	3,75	1,01	1,70	1,23	5,84	2,77

Tablelle 5E Water-Maze: NR2C-2B Substitutions- und Wildtypmäuse. Verweildauer in Sekunden im ehemaligen Plattformquadranten und den restlichen Quadranten während des Spatial probe trials bzw. des Tests auf Quadrantenpräferenz nach initialer Akquisition und überlernphase. Nr. = Tiernummer, Rest = restliche Quadranten, MW = Gruppenmittel, SF = Standardfehler.

NR2C-2B Substitutionsmäuse			Wildtypmäuse		
Nr.	Plattformquadrant	Rest	Nr.	Plattformquadrant	Rest
1	32	28	1	37	23
2	47	13	2	53	7
3	44	16	3	33	27
4	30	30	4	40	20
5	60	0	5	43	17
6	50	10	6	49	11
7	51	9	7	46	14
8	34	26	8	33	27
9	50	10	9	32	28
10	37	23			
MW	43,60	16,40	MW	40,78	19,27
SF	2,97	2,97	SF	2,40	2,42

Tablelle 5F Water-Maze: NR2C-2B Substitutions- und Wildtypmäuse. Suchzeit in Sekunden bis zum Aufklettern auf die Plattform während des Abrufftests aus dem Langzeitgedächtnis. D = Durchgang, Nr. = Tiernummer, MW = Gruppenmittel, SF = Standardfehler.

NR2C-2B Substitutionsmäuse					Wildtypmäuse				
Nr.	D1	D2	D3	D4	Nr.	D1	D2	D3	D4
1	8	7	10	8	1	6	60	34	29
2	9	8	5	11	2	34	24	38	5
3	9	11	14	18	3	1	3	11	24
4	15	3	4	3	4	10	3	15	5
5	3	29	18	16	5	3	6	5	3
6	3	21	16	4	6	19	45	8	3
7	14	7	4	6	7	2	9	3	16
8	2	8	33	2	8	3	4	16	5
9	3	4	9	6	9	13	5	11	4
10	4	5	10	3					
MW	7,00	10,30	12,30	7,70	MW	10,11	17,67	15,67	10,44
SF	1,43	2,49	2,63	1,68	SF	3,38	6,64	3,87	3,14

Tabelle 5G Water-Maze: NR2C-2B Substitutionsmäuse. Mittlere Suchzeit in Sekunden bis zum Aufklettern auf die Plattformen 1-3 während der multiplen Akquisitionsaufgabe. D = Durchgang, Nr. = Tiernummer, MW = Gruppenmittel, SF = Standardfehler.

Nr.	Tag 1				Tag 2			
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8
1	39,3	8,0	16,3	25,0	16,7	7,3	12,3	9,3
2	30,7	26,0	14,7	25,0	15,3	19,0	6,0	15,0
3	46,0	39,3	11,7	18,7	9,0	26,3	5,0	31,7
4	49,7	24,0	35,3	37,0	13,3	39,7	20,7	10,7
5	53,7	48,7	36,3	22,7	26,0	24,7	12,3	22,0
6	36,7	44,0	35,0	22,3	9,0	5,7	5,0	13,0
7	60,0	50,3	33,3	11,7	32,7	4,0	7,7	12,7
8	45,7	38,0	41,3	38,3	36,7	9,3	16,3	8,3
9	42,7	35,0	44,0	23,7	20,0	18,0	21,7	4,7
10	49,0	56,7	31,7	19,0	27,7	22,0	26,7	18,7
MW	45,34	37,00	29,97	24,33	20,63	17,60	13,37	14,60
SF	2,55	4,35	3,45	2,42	2,91	3,37	2,32	2,35

Tabelle 5H Water-Maze: Wildtypmäuse. Mittlere Suchzeit in Sekunden bis zum Aufklettern auf die Plattformen 1-3 während der multiplen Akquisitionsaufgabe. D = Durchgang, Nr. = Tiernummer, MW = Gruppenmittel, SF = Standardfehler.

Nr.	Tag 1				Tag 2			
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8
1	52,0	15,0	25,7	36,3	18,0	11,0	12,3	3,3
2	60,0	60,0	34,3	19,7	60,0	42,0	53,3	45,3
3	31,3	49,7	35,7	35,7	32,0	17,3	7,3	3,7
4	38,0	39,7	32,3	22,0	24,0	21,0	20,7	13,0
5	38,0	31,0	26,3	24,7	16,0	17,0	2,0	10,0
6	33,0	60,0	50,0	42,3	38,0	44,0	43,7	8,3
7	32,7	32,0	33,7	40,7	34,3	2,7	13,7	17,7
8	42,0	21,7	24,7	45,7	45,7	45,0	47,7	45,0
9	46,0	48,7	30,0	40,0	32,7	42,7	29,3	30,3
MW	41,44	39,74	32,52	34,11	33,41	26,96	25,56	19,63
SF	3,05	5,06	2,42	3,00	4,32	5,17	5,91	5,22

Tabelle 5I Water-Maze: NR2C-2B Substitutions- und Wildtypmäuse. Mittlere Suchzeit in Sekunden bis zum Aufklettern auf die Plattform während der Testphase mit visuell angezeigter Plattformposition. D = Durchgang, Nr. = Tiernummer, MW = Gruppenmittel, SF = Standardfehler.

NR2C-2B Substitutionsmäuse					Wildtypmäuse				
Nr.	D1	D2	D3	D4	Nr.	D1	D2	D3	D4
1	6	6	2	6	1	2	2	5	2
2	6	1	5	4	2	10	4	3	4
3	25	3	4	4	3	8	2	5	2
4	3	3	2	3	4	4	3	4	2
5	29	2	1	2	5	3	2	3	2
6	3	2	3	3	6	6	5	3	4
7	5	6	4	4	7	3	2	2	2
8	2	2	2	6	8	3	14	4	6
9	7	2	4	2	9	6	6	2	4
10	25	4	3	9					
MW	11,10	3,10	3,00	MW	MW	5,00	4,44	3,44	3,11
SF	3,20	0,52	0,37	SF	SF	0,85	1,22	0,36	0,46

EXPERIMENT VI: POST-MORTEM GEHIRNAZETYLCHOLIN UND CHOLINKONZENTRATIONEN. TABELLE 6 A-B:

Tabelle 6A) Post-mortem Gehirnazetylcholinkonzentrationen in pmol/mg für NR2C-2B Substitutionsmäuse und Wildtypmäuse. Nr. = Tiernummer, MW = Gruppenmittel, SF = Standardfehler.

NR2C-2B Substitutionsmäuse						Wildtypmäuse					
Nr.	Frontaler Kortex	Ventrales Striatum	Neostriatum	Amygdala	Hippokampus	Nr.	Frontaler Kortex	Ventrales Striatum	Neostriatum	Amygdala	Hippokampus
1	8,1	21,6	21,8	11,6	5,8	1	6,9	19,8	19,1	10,1	6,0
2	9,8	16,8	22,1	10,9	6,1	2	5,0	20,0	17,2	10,3	5,7
3	11,1	20,8	20,5	13,0	8,3	3	4,6	20,6	17,2	11,9	7,1
4	7,2	44,8	19,4	11,1	7,5	4	5,8	22,5	26,4	10,8	10,9
5	9,1	17,2	19,6	15,8	6,4	5	6,2	14,7	22,1	9,7	6,4
6	7,6	18,2	22,6	12,1	7,4	6	5,1	21,5	18,0	10,5	6,1
7	6,7	12,9	18,3	11,9	6,3	7	6,4	21,2	21,1	12,0	7,2
8	5,1	12,4	19,9	11,6	5,4	8	6,9	18,5	18,4	11,2	4,6
9	8,4	16,4	19,7	12,5	6,5	9	4,6	15,2	18,1	9,0	6,7
10	3,2	15,5	17,3	10,1	7,1						
MW	7,63	19,67	20,12	12,05	6,67	MW	5,72	19,32	19,73	10,61	6,74
SF	0,68	2,79	0,50	0,47	0,26	SF	0,29	0,86	0,95	0,31	0,54

Tabelle 6B) Post-mortem Gehirnocholinkonzentrationen in pmol/mg für NR2C-2B Substitutionsmäuse und Wildtypmäuse. Nr. = Tiernummer, MW = Gruppenmittel, SF = Standardfehler.

NR2C-2B Substitutionsmäuse						Wildtypmäuse					
Nr.	Frontaler Kortex	Ventrales Striatum	Neostriatum	Amygdala	Hippokampus	Nr.	Frontaler Kortex	Ventrales Striatum	Neostriatum	Amygdala	Hippokampus
1	34,1	49,9	59,4	53,2	35,8	1	34,2	43,1	51,8	46,1	36,1
2	38,1	47,6	52,1	44,8	27,6	2	36,5	50,0	62,1	50,3	36,1
3	35,5	49,1	62,0	55,2	37,9	3	39,2	45,7	56,9	47,4	28,6
4	27,2	33,7	45,9	32,9	34,1	4	36,3	47,7	62,6	48,8	48,5
5	55,8	55,8	68,5	51,6	32,7	5	29,1	48,0	56,8	39,9	33,7
6	42,0	56,8	69,7	55,0	42,0	6	42,5	47,3	52,2	47,7	35,8
7	36,8	45,9	57,4	57,3	38,5	7	35,1	60,1	62,6	45,6	32,4
8	52,7	47,7	61,7	52,8	43,8	8	51,8	45,2	58,0	52,7	32,0
9	47,4	57,8	66,0	54,4	38,5	9	33,6	42,4	52,9	42,8	41,2
10	57,8	38,4	54,2	41,9	39,1						
MW	42,74	48,27	59,68	49,90	36,99	MW	37,57	47,71	57,32	46,82	36,05
SF	3,07	2,32	2,26	2,30	1,40	SF	2,04	1,64	1,38	1,20	1,84