

Aus dem Oscar Langendorff Institut für Physiologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. R. Köhling

**Synaptische und zelluläre Mechanismen der
Gedächtnisbildung im Alter: Einfluss von D-Serin auf das
räumliche Lernen und die Langzeitpotenzierung bei Ratten**



Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Mirko Rehberg

Rostock, April 2014

Dekan: Prof. Dr. med. E. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Rüdiger Köhling, Oscar Langendorff Institut für Physiologie
Universität Rostock
2. Gutachter: Prof. Jens Eilers, Carl-Ludwig-Institut für Physiologie,
Universität Leipzig
3. Gutachter: Prof. Heiko Luhmann, Institut für Physiologie, Universität Mainz

Tag der Verteidigung: 28.10.2014

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	V
Zusammenfassung	VI
1 Einleitung	1
1.1 Kognition und Synaptische Plastizität unter physiologischen Bedingungen	1
1.1.1 Gedächtnis und Gedächtnisbildung	1
1.1.2 Gedächtnis, Lernen und die hippocampale Langzeitpotenzierung	5
1.1.3 Räumliches Lernen und räumliches Gedächtnis	7
1.2 Kognition und synaptische Plastizität unter pathophysiologischen Bedingungen	9
1.2.1 Das Pilocarpinmodell der chronischen Temporallappenepilepsie	9
1.2.2 Veränderungen durch Alterungsprozesse	11
1.3 D-Serin als Neuromodulator	12
2 Material und Methoden	14
2.1 Material	14
2.1.1 Geräte	14
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	15
2.2 Modell	16
2.2.1 Versuchstiere	16
2.2.2 Induktion der chronischen Temporallappenepilepsie	17
2.2.3 Alterung der Tiere	18
2.3 Experimentelle Gruppen und experimentelles Protokoll	18
2.4 Methoden	20
2.4.1 Präparation der Hirnschnitte	20
2.4.2 Ableitung elektrophysiologischer, extrazellulärer Potentiale ..	21
2.4.3 Protokoll zur Induktion synaptischer Plastizität	23
2.4.4 Morris Water Maze	23
2.4.5 Auswertung, statistische Analyse und Darstellung der erhobenen Daten	25
3 Ergebnisse	27
3.1 Einfluss von Water Maze Training auf die Langzeitpotenzierung von jungen Kontrollen und jungen Pilocarpin-Tieren	27
3.2 Einfluss des Alterungsprozesses auf das räumliche Lernen und die Langzeitpotenzierung von alten Kontroll-Tiere und alten Pilocarpin-Tieren ..	33
3.3 Einfluss von Water Maze Training auf die Langzeitpotenzierung von alten Kontrollen und Pilocarpin-Tieren	38
3.4 Einfluss von D-Serin auf die Langzeitpotenzierung von alten Kontrollen und alten Pilocarpin-Tieren	42
4 Diskussion	49
4.1 Material und Methoden	49
4.1.1 Water Maze	49
4.1.2 Elektrophysiologische Ableitungen	50
4.2 Ergebnisse	51

4.2.1	Water Maze und LTP bei jungen Tieren	51
4.2.2	Water Maze und LTP bei alten Tieren	52
4.2.3	Water Maze und LTP bei alten Tieren unter D-Serin Behandlung	55
5.	Ausblick	57
6	Anhang	VII
6.1	Literaturverzeichnis	VII
6.2	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	XIV
6.2.1	Abbildungsverzeichnis	XIV
6.2.2	Tabellenverzeichnis	XVI
6.3	Danksagung	XVII
6.4	Thesen zur Dissertationsschrift	XVIII
6.5	Selbständigkeitserklärung	XX
6.6	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
A/C-Faser	Assoziations-/Kommissuralfasern
A/D D/A Wandler	Analog Digitalwandler
bzw.	beziehungsweise
Bsp.	Beispiel
CA	Cornu amonis
cm	Zentimeter
fEPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Feldpotenzial
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
°C	Grad Celsius
HFS	Hochfrequenzstimulation (engl. high-frequency stimulation)
h	Stunde
Hz	Hertz
i.p.	intraperitoneal (in die Bauchhöhle)
ISI	Interstimulusintervall
LTD	Langzeitdepression (engl. long-term depression)
LTP	Langzeitpotenzierung (engl. long-term potentiation)
Max.	Maximum
mg	Milligramm
min	Minute
Min.	Minimum
µm	Mikrometer
MΩ	Megaohm
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
n	Anzahl
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PPF	Doppelpulsbahnung (engl. paired-pulse facilitation)
s.c.	subkutan (unter die Haut)
sec	Sekunde
t _n	Zeitpunkt im Rahmen eines festen Ablaufes
WM	Wasserlabyrinth zum räumlichen Lernen (engl. Water Maze)
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

Zusammenfassung

Die chronische Temporallappenepilepsie ist die am häufigsten therapieresistente Form der Epilepsie beim Menschen. Ziel dieser Arbeit war es, anhand eines Tiermodells (Pilocarpin-induzierte Temporallappenepilepsie bei Ratten), den auch beim Menschen zu beobachtenden Verlust an Lernfähigkeit zu quantifizieren. Zusätzlich wurden Methoden erprobt, diesen Verlust an Lernfähigkeit zu verringern. Dazu wurden Verhaltensexperimente und elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt.

Die Fähigkeit zu Lernen wurde exemplarisch am räumlichen Lernen mit Hilfe eines Labyrinths (Morris Water Maze) untersucht. Die Eigenschaften der Synapsen wurden mit extrazellulären Feldpotentialableitungen in der CA-1 Region des Hippocampus analysiert.

Es wurden insgesamt 94 Tiere in 12 Experimentalgruppen untersucht. Als Einflussfaktoren wurden das Alter, die Pilocarpin-induzierte chronische Temporallappenepilepsie, Lerntraining, sowie die Behandlung mit D-Serin untersucht.

Die Untersuchungen ergaben, dass junge Ratten mit chronischer Temporallappenepilepsie eine geringere Fähigkeit haben, Langzeitpotenzierung auszubilden, als junge, gesunde Tiere ($1,050 \pm 0,179$ zu $1,674 \pm 0,152$). Außerdem weisen sie ein reduziertes räumliches Lernvermögen im Morris Water Maze auf ($153,0$ sec (25 %: $84,25$ sec, 75 %: $244,0$ sec) im Vergleich zu $21,5$ sec (25 %: 12 sec, 75 %: 29 sec) am 7. Versuchstag). Bei jungen, gesunden Ratten führte das Lernverhaltenstraining im Morris Water Maze zur Reduktion der Langzeitpotenzierung ($1,674 \pm 0,153$ zu $1,327 \pm 0,0903$).

Alterung war bei den Experimenten im Morris Water Maze assoziiert mit einer verminderten Lernleistung gesunder Tiere ($21,5$ sec (25 %: $12,0$ sec, 75 % $29,0$ sec) zu $64,0$ sec (25 %: $27,0$ sec, 75 %: $152,5$ sec)). Entsprechend war auch die LTP in den elektrophysiologischen Untersuchungen in der CA-1 Region vermindert ($1,674 \pm 0,153$ zu $1,327 \pm 0,0903$). Zweimaliges Water-Maze-Training erhöhte bei alten, epileptischen Ratten die Langzeitpotenzierung nach Hochfrequenzstimulation ($1,454 \pm 0,0879$ zu $1,181 \pm 0,0821$).

Durch eine Intervention mit niedrigdosierter D-Serin Langzeittherapie konnten die untersuchten Parameter zur Veränderung der kognitiven Leistungsfähigkeit bei chronischer Temporallappenepilepsie oder Alterung nicht wesentlich verbessert werden.

In Zukunft müssen weitere Untersuchungen der Grundlagenforschung und der angewandten, klinischen Forschung folgen, um einerseits die beteiligten Mechanismen besser zu verstehen, andererseits Möglichkeiten zu eröffnen die experimentell und klinisch zu beobachtende Reduktion der Leistungsfähigkeit positiv zu beeinflussen.

1 Einleitung

1.1 Kognition und Synaptische Plastizität unter physiologischen Bedingungen

1.1.1 Gedächtnis und Gedächtnisbildung

Gedächtnis ist die Fähigkeit des zentralen Nervensystems, Informationen zu speichern, zu ordnen oder zu verarbeiten und bei Bedarf abzurufen (Klinke, 2005). Das Gedächtnis kann anhand verschiedener Eigenschaften unterschiedlich eingeteilt und beschrieben werden. Dazu zählen unter anderem die Art der gespeicherten Informationen, der Zeitrahmen und der Kontext in dem die Informationen gespeichert sind, aber auch anatomisch-funktionelle Gesichtspunkte.

Im Jahr 1968 entwickelten Atkinson und Shiffrin die Grundlagen des bis heute gebräuchlichen Mehrspeichermodells. Die Komponenten dieses Modells sind das Sensorische Gedächtnis, das Kurzzeitgedächtnis und das Langzeitgedächtnis (Atkinson et Shiffrin, 1968; Milner et al., 1998; Klinke, 2005; Winkler et al., 2005; Cowan, 2008; Abb. 1).

In diesem klassischen Modell dient das Sensorische Gedächtnis dazu, über die Sinnesorgane aufgenommene Reize und Informationen zu speichern. Das Sensorische Gedächtnis ist dadurch charakterisiert, dass die Informationen unbewusst bleiben und nahezu unselektiv, entsprechend ihrer Modalität in großen Mengen gespeichert werden. Außerdem werden die Informationen ständig durch neue Eindrücke überschrieben, was zu einer sehr geringen Halbwertszeit (< 1 sec) dieser Gedächtnisform führt. Erst durch Aufmerksamkeit gelangen diese Informationen ins Bewusstsein und können somit über Selektions- und Extraktionsprozesse in das Kurzzeitgedächtnis überführt werden (Klinke 2005; Winkler et al., 2005).

Das Kurzzeitgedächtnis stellt mit seiner begrenzten Kapazität und schnellen Verfallszeit (Sekunden/Minuten) eine Verbindung zwischen der unmittelbaren Vergangenheit und der Gegenwart her (Squire et al., 1993).

Das Arbeitsgedächtnis wird häufig als eine Art funktionelle Unterform des Kurzzeitgedächtnisses beschrieben. Es wird in verschiedensten Abwandlungen als ein System mit begrenzter Kapazität betrachtet, in dem

über Wahrnehmung neu erworbene und reaktivierte, gespeicherte Informationen organisiert, integriert und zur weiteren bewussten Verarbeitung aufgearbeitet werden. Dieses betrifft sowohl verbal zugängliches Wissen, als auch nonverbale Informationen. (Becker et al., 1999; Baddeley, 2003; Repovs et Baddeley, 2006).

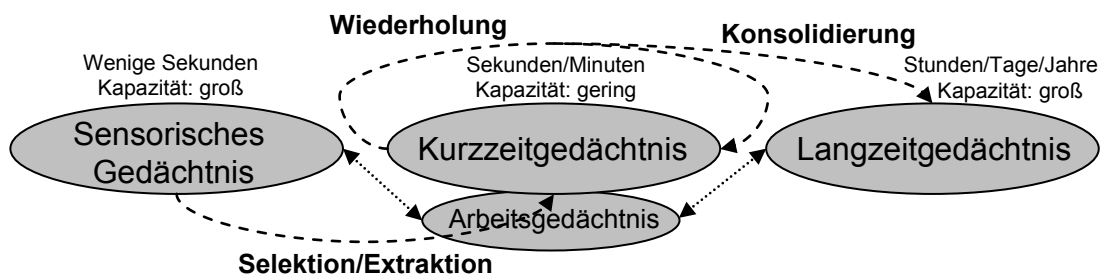


Abb. 1 Heutige Vorstellung vom Mehrkomponentenmodell des Gedächtnisses. (adaptiert nach Atkinson et Shiffrin 1968, Baddeley et Hitch 1974)

Das Gedächtnis besteht aus einem Sensorischen Gedächtnis, welches mit großer Kapazität im Unbewussten die Reize der Umwelt speichert. Über Selektion und Extraktion gelangen ein Teil dieser Informationen ins bewusste Kurzzeitgedächtnis. Von dort werden die Informationen über Wiederholung und Konsolidierung ins Langzeitgedächtnis übertragen. Das Arbeitsgedächtnis als funktioneller Teilbereich des Kurzzeitgedächtnisses integriert die Informationen aus Sensorischem, Kurz- und Langzeitgedächtnis um sie dem Bewusstsein zur Reaktion auf die Gegenwart zur Verfügung zu stellen.

Die nächste Stufe, in dem nach heutiger Auffassung nicht mehr streng hierarchisch gegliedertem System, ist das Langzeitgedächtnis (Abb. 1, Abb. 2). Dieses wird nach Squire (1993) in ein deklaratives und in ein nicht-deklaratives Gedächtnis unterteilt. Das deklarative Gedächtnis speichert das im Bewusstsein vorhandene Wissen von Fakten (semantisch) und Ereignissen (episodisch). Es ist zu einem großen Teil von der Funktionsfähigkeit des medialen Temporallappens abhängig. Zu dieser Region zählen der Hippocampus (Cornu ammonis, Gyrus dentatus, Subiculum), sowie die entorhinalen, perirhinalen und parahippocampalen Kortizes. Das nicht-deklarative Gedächtnis hingegen ist unbewusst. Es sind vor allem Handlungsabläufe (Fahrradfahren), Gewohnheiten und Muster (das Erkennen eines Akzentes) gespeichert. Dieses Gedächtnis wird über Konditionierung, Erfahrungen und beim Lernen durch Beobachten aufgebaut. Die organischen Korrelate dieser Gedächtnisformen sind weniger genau bekannt, scheinen über das ganze zentrale Nervensystem verteilt und

komplex untereinander verknüpft zu sein (Squire et al., 1993; Squire et al., 1996; Milner et al., 1998; Frankland et Bontempi, 2005; Cowan, 2008).

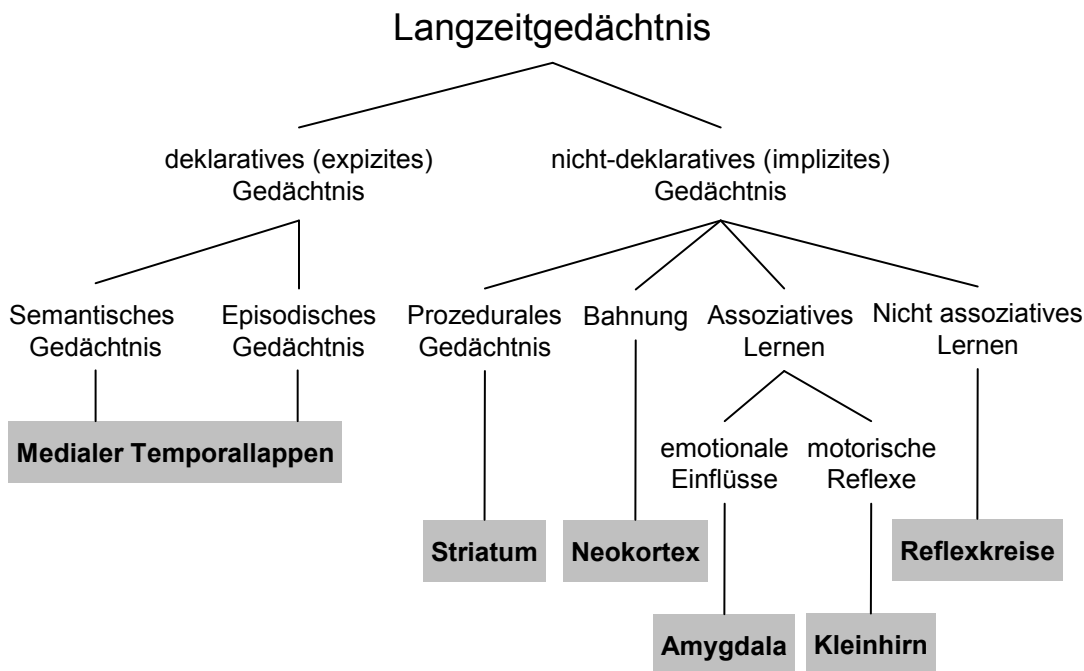


Abb. 2 Das Langzeitgedächtnis hat einen deklarativen und einen nicht-deklarativen Anteil. (nach Squire et al. 1996)

Der deklarative (explizite) Anteil besteht aus dem, dem Bewusstsein zugänglichen Wissen über Fakten (semantisches Gedächtnis) und über Ereignisse im zeitlichen Kontext (episodisches Gedächtnis). Seine Funktionsfähigkeit kann anatomisch ziemlich spezifisch dem medialen Temporallappen zugeordnet werden.

Das nicht-deklarative Gedächtnis ist ein unterbewusster Speicher von Fähigkeiten, Gewohnheiten und Mustern. Dieser Gedächtnisanteil ist anatomisch über das gesamte zentrale Nervensystem verteilt und komplex miteinander verschaltet.

Der Übergang von Informationen ins Langzeitgedächtnis und die Stabilisierung dieser Informationen ist aktuell Gegenstand vieler wissenschaftlicher Diskussionen (Kampa et al., 2011; Carr et al., 2011). Der noch heute für diesen Vorgang benutzte Begriff der Konsolidierung geht auf Müller und Pilzecker (1900) zurück. Diese stellten fest, dass die Speicherung von neuen Informationen, um langfristig verfügbar und unabhängig von äußeren Einflüssen zu sein, einen je nach Art der Information unterschiedlich langen Zeitraum benötigt (Müller et Pilzecker, 1900). Heute wird Konsolidierung als eine fortschreitende Stabilisierung des Gedächtnisses nach der Akquisition beschrieben (Dudai, 2004).

Nach heutiger Erkenntnis gibt es zwei Arten der Konsolidierung. Zum einen handelt es sich um die synaptische Konsolidierung, welche auf zellulärem

Niveau stattfindet. Hierbei kommt es zu molekularen und morphologischen Anpassungsprozessen im Bereich der Synapsen, der Zellkörper und der Nukleoli. Diese Anpassungen finden innerhalb der ersten Stunden nach dem Lernprozess statt.

Zum anderen wird eine zweite Art der Konsolidierung als systemische Konsolidierung bezeichnet. Dabei geht es darum, dass es im Verlauf von Monaten oder sogar Jahren zu einer Reorganisation der Verschaltungen und Systeme kommt, die diese Informationen im Gehirn kodieren. Dabei scheint es zur Verschiebung dieser Information von einem primären Speicherort in einen anderen, unabhängigen Ort zu kommen (Alvarez et Squire, 1994; Lechner et al., 1999; Dudai, 2004, Frankland et Bontempi, 2005).

Über die große Bedeutung des Hippocampus für die Kodierung, die Konsolidierung und das Abrufen von Informationen im Gedächtnis besteht heute allgemeiner Konsens (Squire, 1982; Jarrard, 2001, Carr et al., 2011). Die elektrischen und molekularen Prozesse, die dabei eine Rolle spielen, sind allerdings immer noch ein wichtiger Gegenstand aktueller Forschung. Dabei scheint beim Prozess der Konsolidierung der Mechanismus des wiederholten Abspielens von Gedächtnisinhalten (memory replay) eine Rolle zu spielen. Bei diesem unter anderem im Hippocampus zu beobachtenden Vorgang werden die Aktivierungsmuster hippocampaler Zellen nach dem Erleben erneut aktiviert, ohne dass ein erneuter Zufluss der vorher erlebten Reize notwendig ist. Dadurch kommt es zur Stabilisierung der Information im Hippocampus. Über neuronale Verbindungen zum Neokortex wird dann eine Hippocampus-unabhängige Speicherung aufgebaut. Diese Wiederholungen von neuronalen Erregungsmustern innerhalb eines Netzwerkes wurden initial nur im Schlaf vermutet. Aus diesem Grund wurde dem Schlaf lange Zeit eine große Bedeutung bei der Gedächtnisbildung zugewiesen. Es gibt heute allerdings zunehmend Hinweise darauf, dass diese Prozesse auch im wachen Zustand stattfinden können. Eine Unterbrechung dieser Wiederholungen durch Ablenkung, beziehungsweise durch pharmakologische oder traumatische Beeinflussung führt zu einer gestörten Gedächtnisbildung (Hoffmann et al., 2002; Kampa et al., 2011; Carr et al., 2011).

1.1.2 Gedächtnis, Lernen und die hippocampale Langzeitpotenzierung

Im Jahr 1957 beschrieben Scoville und Milner den Indexpatienten der hippocampalen Lernforschung. Ein junger Patient (H.M.) mit schwerer, chronischer Temporallappenepilepsie erhielt eine beidseitige, radikale Entfernung des medialen Temporallappens. Die Anzahl und Schwere der Anfälle nahm daraufhin deutlich ab, auch wenn es weiterhin zu generalisierten Anfällen kam. Die neurologisch psychiatrischen Untersuchungen in der Folge ergaben zum Teil überraschende Befunde. Während es zum einen keine Persönlichkeitsveränderungen gab und es nur zu geringen neurologischen Beeinträchtigungen kam, war zum anderen bei dem Patienten eine schwere anterograde Amnesie zu beobachten. Außerdem war die Erinnerung an verschiedene, relativ kurz zurückliegende Ereignisse und den unmittelbaren Zeitraum vor der Operation deutlich beeinträchtigt (milde retrograde Amnesie). Dabei blieb aber das Gedächtnis an länger zurück liegende Ereignisse, zum Beispiel Kindheitserinnerungen, unbeeinträchtigt (Scoville et Milner, 1957; Baxendale et al., 1998, Shapiro, 2001). Durch diese Befunde und Folgeuntersuchungen an Menschen und Tieren mit beschädigtem medialem Temporallappen geriet der Hippocampus für mehrere Jahrzehnte ins Zentrum der Lernforschung.

Donald Olding Hebb stellte 1949 eine der ersten weiter reichenden Theorien zum Mechanismus des Lernens auf neuronaler Ebene auf. Er postulierte, falls eine Nervenzelle über ihr Axon eine andere Nervenzelle wiederholt, dauerhaft erregt, die Effizienz dieser synaptischen Verbindung über metabolische Veränderung und Wachstumsprozesse dauerhaft erhöht wird (Hebb, 1949).

Diese Vorstellung konnte durch Bliss und Mitarbeiter für den Hippocampus bestätigt werden (Bliss et Gardner-Medwin, 1973, Bliss et Lomo, 1973). Sie konnten zeigen, dass eine hochfrequente, elektrische Stimulation von hippocampalen Netzwerken eine Erhöhung der synaptischen Antwort sowohl *in vitro* als auch *in vivo* hervorrufen kann. Für dieses Phänomen wird heute gemeinhin der Begriff Langzeitpotenzierung (LTP = long-term potentiation) benutzt. Auch wenn bis heute nur wenige direkte Verbindungen zwischen der LTP und der Bildung von Gedächtnisinhalten gezeigt werden konnten, wird

die LTP von den allermeisten Autoren als ein wahrscheinliches zelluläres Korrelat der Gedächtnisbildung angesehen (Shors et Matzel, 1997; Jeffery, 1997).

Eine schematische, histologische Darstellung, der die Ein- und Ausgangsstrukturen, sowie die Verschaltungen des Hippocampus nach heutiger Auffassung darstellt, ist vereinfacht in Abb. 3 wiedergegeben.

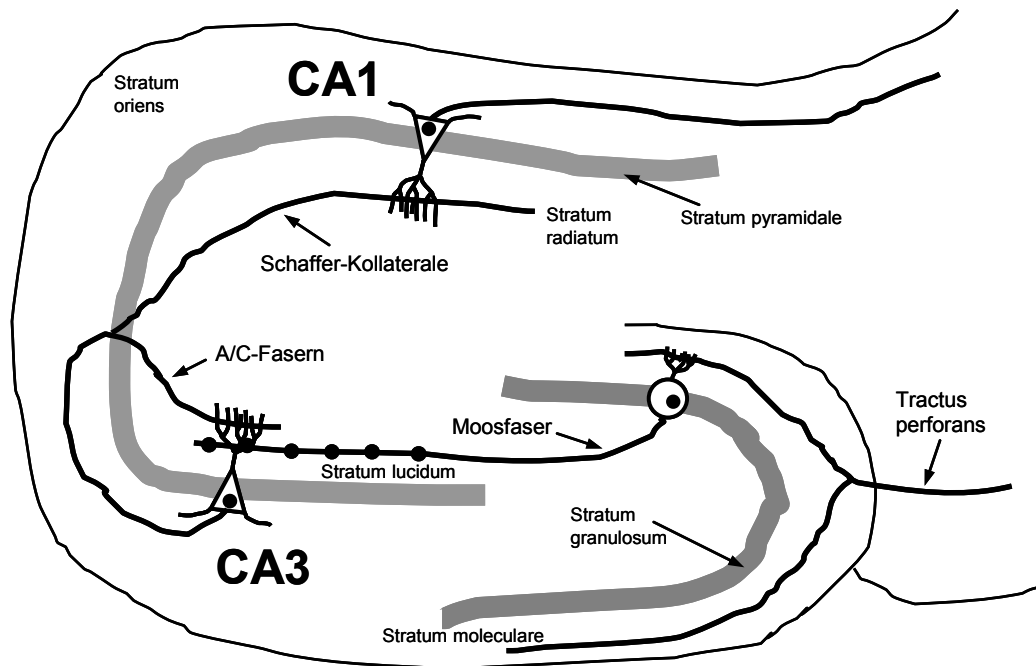


Abb. 3 Schematische Darstellung der Histologie und der Verschaltungen des Hippocampus (modifiziert nach Kirschstein, 2009)

Die Informationen gelangen über den Tractus perforans, welcher sich in eine mediale und in eine laterale Portion aufteilt, in die Hippocampusformation. Dort werden sie im Stratum moleculare mit Dendriten der Moosfasernervenzellen (Körnerzellen) verschaltet. Die Axone dieser Neurone ziehen als Moosfasern ins Stratum lucidum, wo sie mit den Pyramidenzellen der CA3-Region (Cornu ammonis) synaptische Verbindungen eingehen. Die Axone der Pyramidenzellen strahlen mit ihren Axonen entweder in das ipsi- oder kontralaterale Stratum radiatum der CA3-Region (als Assoziations- oder Kommissuralfasern (A/C-Fasern) oder als Schaffer-Kollaterale in das Stratum radiatum der CA1-Region. Dort gehen sie mit den CA1-Pyramidenzellen synaptische Verbindungen ein. Die Axone dieser Zellen stellen die neuronale Ausgangsstruktur des Hippocampus da.

Auf molekularer Ebene spielen bei der Induktion der LTP in bestimmten Hippocampusregionen (u.a. Schaffer-Kollateral-CA1 Synapse) die postsynaptischen NMDA-Glutamatrezeptoren (N-Methyl-D-Aspartat) eine besondere Rolle. Diese ionotropen Rezeptoren öffnen den mit ihnen assoziierten Kanal nur dann, wenn es gleichzeitig zur Bindung des Liganden (Glutamat) auch zu einer starken Depolarisation der Membran kommt. Die

Pore des Kanals ist im inaktivierten Zustand durch Mg^{2+} Ionen blockiert. Die Depolarisation treibt das Magnesium aus der Kanalpore, während die Ligandenbindung den Kanal öffnet. Dadurch kommt es zum einen zu einem Einstrom von Na^{+} -, aber vor allem von Ca^{2+} Ionen, welche die nun folgende intrazelluläre Signalkaskade triggern. Diese führt über verschiedene molekulare Mechanismen zum anderen zur lang anhaltenden Erhöhung der synaptischen Übertragung (Martinez et Derrick, 1996).

1.1.3 Räumliches Lernen und räumliches Gedächtnis

Räumliches Lernen und räumliches Gedächtnis umfassen die Fähigkeit Informationen über Orte, räumliche Anordnungen und Wege zu verschlüsseln, zu speichern und abzurufen (Kessels et al., 2001).

Ein Meilenstein in der wissenschaftlichen Forschung zum räumlichen Lernen waren die Experimente von Morris (Morris et al., 1982). In diesen Studien wurde die Fähigkeit von Ratten getestet, eine Plattform in einem runden Wasserbassin (Water Maze) zu finden, welche sich für die Tiere nicht sichtbar unterhalb der Wasseroberfläche befand (siehe 2.4.4 Morris Water Maze). Die Tiere waren auf drei Gruppen verteilt: Kontrolltiere ohne Verletzungen des ZNS, Tiere mit Läsionen im Neokortex direkt oberhalb des Hippocampus und Tieren mit Neokortex- und Hippocampusläsionen. Das Ergebnis dieser Experimente war erstaunlich. Während die Tiere mit der Läsion des Neokortex die Plattform genauso schnell gefunden haben und dazulernten wie die Kontroll-Tiere, brauchten die Ratten mit den Hippocampusläsionen signifikant länger. In einem anderen Versuch war die Plattform oberhalb der Wasseroberfläche sichtbar. In dieser Anordnung gab es zwischen den drei Gruppen keinen signifikanten Unterschied. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen und durch Goodrich-Hunsaker in einem virtuellen Water Maze auch bei Menschen bestätigt, dass die indirekte räumliche Orientierung anhand von Umgebungsmerkmalen und das damit verbundene räumliche Gedächtnis von der Funktionsfähigkeit des Hippocampus abhängt (Goodrich-Hunsaker et al., 2010). Seit der Entdeckung von Morris wurden in Folgestudien weitere Hirnregionen identifiziert, die für verschiedene Teilaspekte des räumlichen Lernens benötigt werden. Hierzu zählen unter anderem die parahippocampalen

Kortizes, der retrospleniale Kortex, der Nucleus caudatus und der parietale Kortex (Barrash et al., 2000; Hartley et al., 2003; Bohbot et al., 2004; Spiers et Maguiere, 2007)

Somit besteht in der wissenschaftlichen Gemeinde heute Konsens darüber, dass der Hippocampus eine zentrale Stellung für das räumliche Lernen und das räumliche Gedächtnis einnimmt. Allerdings wird zunehmend klar, dass der ganze mediale Temporallappenkomplex und weitere Bereiche des Gehirns in unterschiedlichem Ausmaß ebenfalls Anteil am räumlichen Lernen haben (Moscovitch et al., 2005).

Die molekularen und morphologischen Prozesse, welche beim räumlichen Lernen eine Rolle spielen, sind zunehmend Gegenstand aktueller Forschung. 1971 lieferten O'Keefe und Dostrovsky erste Beweise für die 1948 von Tolman aufgestellte Theorie der kognitiven Karte (cognitiv mapping) und der Platzzellen (Tolman, 1948; O'Keefe et Dostrovsky 1971). Er zeigte, dass es im Hippocampus Zellen gibt, die spezifisch immer dann aktiv sind, wenn das Tier einen bestimmten Ort durchquert. Zudem konnten Hinweise dafür gefunden werden, dass sich im Gehirn eine Art kognitive Karte der Umgebung abbildet. Dieses Modell besagt, dass Orte, Richtung und Orientierungen durch spezifische Regionen innerhalb des Hippocampus abgebildet werden. Die Theorie von Tolman und die Befunde von O'Keefe wurden in vielen weiteren Experimenten weitestgehend bestätigt und weiterentwickelt (Muller et al., 1999; Hölscher, 2003). So geht man mittlerweile davon aus, dass es neben spezifischen Zellen für den aktuellen Ort auch Zellen für die Orientierung zueinander, die Blickrichtung und die Orientierung sowie die Geschwindigkeit von Objekten gibt. Außerdem scheint gesichert, dass hierbei nicht nur der Hippocampus eine Rolle spielt, sondern auch eine Reihe weiterer Hirnregionen, wie zum Beispiel Teile des Neokortex (Hölscher, 2003).

1.2 Kognition und synaptische Plastizität unter pathophysiologischen Bedingungen

1.2.1 Das Pilocarpinmodell der chronischen Temporallappenepilepsie

Die Epilepsien werden wohl am treffendsten durch folgende Definition beschrieben:

„Epilepsie ist eine sich wiederholende anfallsartige Funktionsstörung des Gehirns durch synchronisierte exzessive Entladung vieler Neurone.“ (Gleixner et al., 2007). Die Epilepsie ist eine der häufigsten, schweren Erkrankungen des zentralen Nervensystems. Weltweit wird die Prävalenz auf 50 Millionen Erkrankte geschätzt (Sander, 2003). Bis zu 0,52 % der europäischen Bevölkerung und ungefähr 1,5 % der Bevölkerung in Entwicklungsländern leiden unter dieser Erkrankung (Strzelczyk et al., 2008). Die Temporallappenepilepsie als die häufigste Form der fokalen Epilepsien macht nahezu 20 % aller Epilepsien beim Menschen aus. Zudem ist sie die häufigste medikamentenrefraktäre Form dieser Erkrankung (Engel, 1993; Babb, 1999).

Zur Erforschung dieser speziellen Form der Epilepsie werden in der Literatur eine Reihe unterschiedlicher Tiermodelle beschrieben, die entweder pharmakologisch oder elektrisch induziert einen Status epilepticus auslösen. Dieser führt im Verlauf über morphologische (Zelltod, Vernarbung) und molekulare Veränderungen zur Ausprägung einer chronischen Temporallappenepilepsie (Coppola et Moshé, 2012).

Ein Beispiel für diese Tiermodelle ist die Pilocarpin-induzierte chronische Temporallappenepilepsie. Pilocarpin ist ein Alkaloid, welches muskarinergen Acetylcholinrezeptoren aktiviert (Spalding et al., 2002). Im Tiermodell wird es systemisch appliziert, erst nachdem periphere Rezeptoren blockiert wurden um parasymphatische Nebenwirkungen auszuschließen. Die Verhaltensänderungen nach systemischer Administration von Pilocarpin lassen sich entsprechend dem Zeitverlauf in drei charakteristische Phasen einteilen. Kurze Zeit nach Applikation entwickeln die Tiere einen dauerhaften Status epilepticus, der nach einem unterschiedlich langen Zeitraum pharmakologisch (zum Beispiel durch Diazepam) terminiert werden muss. Im Anschluss folgt eine Tage bis Wochen dauernde Phase ohne Anfälle und

sich zunehmend verbessernden EEG Ableitungen (latente Phase). Danach entwickeln die Tiere wiederum zunehmende, spontane, sich wiederholende Anfälle (Turski et al., 1983; Lemos et Cavalheiro, 1995; Curia et al., 2008; Scorza et al., 2009).

In weiterführenden Untersuchungen des von Turski et al. (1983) erstmals beschriebenen Modell der Pilocarpin-induzierten Temporallappenepilepsie zeigte sich, dass es in weiten Teilen ähnlich geartete Veränderungen mit der beim Menschen zu beobachteten Temporallappenepilepsie aufzeigt. Vor allem der Zeitverlauf und der Nutzen in Therapiestudien zeigen eine große Übereinstimmung mit den beim Menschen beobachtbaren Veränderungen (Turski et al., 1983; Covolan, 2000; Leite et al., 2002; Curia et al., 2008).

Wesentliche Übereinstimmungen finden sich auch bei den neuropathologischen Veränderungen. Bei Menschen mit Temporallappenepilepsie werden Atrophien und eine zunehmende Hippocampusklerose beobachtet (Cendes 2005). Auch bei der Pilocarpin-induzierten Temporallappenepilepsie wurde sowohl ein unmittelbarer Zelltod in den ersten Stunden nach dem Status beobachtet, als auch eine weiterführende, fortschreitende neuronale Degeneration über Wochen und Monate. Diese Schäden werden in verschiedenen Regionen des Gehirns beobachtet, zum Beispiel in den oberflächlichen Zellschichten des Neokortex, im Hippocampus, im piriformen Kortex, im Claustrum, im enterohinalen Kortex, in der Amygdala, im ventromedialen Nukleus des Hypothalamus und im Subiculum. Zudem ist zu beobachten, dass beim Pilocarpinmodell der chronischen Temporallappenepilepsie hauptsächlich die Pyramidenzellen und die Granulosazellen des Hippocampus geschädigt werden. Allerdings sind auch für eine Reihe weiterer Zellen Schädigungen beschrieben, z.B. hiläre Mooszellen, Interneurone in anderen Zellschichten und GABAerge Neurone. (Turski et al. 1983; Turski et al., 1984; Leite et al., 1990, Cavalheiro et al., 1996, Curia et al., 2008). Neben den neuronalen Veränderungen gibt es auch Veränderungen in der Gliazellpopulation. Hier kommt es zur Proliferation von Astrozyten. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Gliazellen der CA1 – Region in der Lage sind, höhere Kaliumkonzentrationsanstiege abzapuffern als im gesunden Gewebe (Garzillo et al., 2002; Binder et Steinhäuser, 2006).

1.2.2 Veränderungen durch Alterungsprozesse

Es ist allgemein bekannt, dass sich bestimmte, für junge Menschen normale, kognitive Funktionen während des Alterungsprozesses zunehmend verschlechtern. Es kommt zur erhöhten Vergesslichkeit und Ablenkbarkeit, zu geringerer Flexibilität in den Gedankenabläufen und eine Verminderung der exekutiven Funktionen (Wang et al., 2011). Sehr charakteristisch zeigte sich in Verhaltensuntersuchungen die verminderte Leistungsfähigkeit des episodischen Gedächtnisses (Balota et al., 2000) und des Arbeitsgedächtnisses (Foos et Wright, 1992; Burke et Barnes, 2006). In verschiedenen Studien konnte eine Verringerung der Hirnaktivität beim Kodieren neuer Informationen im Bereich des linken präfrontalen Kortex und im medialen Temporallappen im Vergleich zu jungen Menschen gezeigt werden (Cabeza et al., 1997; Cabeza et al., 2004). Andererseits können bei den gleichen Prozessen auch erhöhte Aktivitäten in anderen Hirnregionen beobachtet werden. Hier sind vor allem die Bereiche des präfrontalen Kortex zu nennen, welche bei jungen Menschen keine Rolle spielen oder homologe Bereiche des kontralateralen, präfrontalen Kortex, sowie bestimmte Bereiche im parietalen Kortex. Diese erhöhte Aktivität scheint zumindest in Teilen als Kompensationsmechanismus für die verlorene Leistungsfähigkeit des medialen Temporallappensystems zu dienen. Diese Theorie wird unter anderem von Erkenntnissen gestützt, welche zeigen, dass alte Menschen mit einer erhöhten Aktivität in den beschriebenen Bereichen signifikant bessere Leistungen in Tests zur kognitiven Leistungsfähigkeit zeigen (Grady et al., 1995; Grady et al., 1998; Dolcos et al., 2002; Cabeza et al., 2002; Grady, 2008). Als Ursache für die verminderte kognitive Leistungsfähigkeit wurde lange Zeit eine allgemeine Hirnatrophie vermutet (Brody, 1955). Dieser Verdacht gründete sich vor allem auf pathologische und radiologische Untersuchungen. Heute werden zumindest für den krankheitsfreien Alterungsprozess Atrophien, insbesondere der Verlust von Nervenzellen sehr viel differenzierter und nur selektiv für bestimmte Hirnregionen beschrieben (Hof et Morrison, 2004). So korreliert der Verlust von Neokortexdicke eng mit dem Ausmaß der neurovaskulären Pathologie und mit der kognitiven Leistungsfähigkeit, nicht aber mit dem Ausmaß der häufig ebenfalls beschriebenen Atrophie von Hippocampus und Amygdala (Kochunov et al.,

2008; Folstein et Folstein, 2010). Ein früher als verantwortlich angenommener genereller Verlust von Neuronen und dendritischen Verzweigungen wird mit moderneren Untersuchungsmethoden nicht mehr beobachtet. Vielmehr werden für den Verlust der kognitiven Fähigkeiten beim krankheitsfreien Altern morphologische und molekulare Umbauvorgänge in kleinen, umschriebenen Hirnregionen verantwortlich gemacht. Die zellulären und molekularen Ursachen dafür liegen unter anderem in Veränderungen der Dendritenmorphologie, Ca^{2+} Regulationsstörungen, eine Veränderung der Genregulation, sowie die mitochondriale Kapazität für oxidativen Stress. Durch diese Prozesse kommt es zur Beeinträchtigung der synaptische Plastizität und damit wird letztendlich auch die Netzwerkdynamik der Schaltkreise verändert, welche für die Kognition verantwortlich sind. Diesen als ein Grundprinzip des neurologischen Alterns angesehenen Prozess beschrieb McEwen (2000) als verminderte homöostatische Reserve. Zugrunde liegt diesen Prozessen möglicherweise eine Veränderung der mitochondrialen Funktion. Zu den Hirnregionen, die für diese Art von Veränderungen besonders empfindlich sind, gehören die für das Arbeitsgedächtnis und das semantische Langzeitgedächtnis wichtigen Regionen des präfrontalen Kortex und des Hippocampus (Toescu, 2005; Burke et Barnes, 2006).

Als ein weiterer zugrundeliegender Mechanismus wird aktuell auch eine verminderte D-Serin Konzentration angesehen. Dabei scheint der zunehmende oxidative Stress die Serin-Racemase-Aktivität zu verringern und somit zum kognitiven Alterungsprozess beizutragen (Potier et al, 2010, Turpin et al., 2011, Haxaire et al., 2012).

1.3 D-Serin als Neuromodulator

D-Serin, das Enantiomer der proteinogenen, nicht essentiellen Aminosäure L-Serin, ist eine endogene Substanz die in hohen Konzentrationen in spezifischen Hirnregionen nachweisbar ist. Hier scheint D-Serin ein physiologisch vorhandener intrinsischer Co-Agonist des NMDA-Rezeptors (N-Methyl-D-Aspartat) zu sein (Wroblewski, 1989; Wolosker 2007). Dabei bindet D-Serin stereoselektiv an die Glycin-Bindungsstelle des

NMDA-Rezeptors und aktiviert ihn damit. In Experimenten der Grundlagenforschung und in klinischen Beobachtung hat sich über die letzten Jahre die große Bedeutung von D-Serin zum einen in der Gehirnentwicklung, zum anderen in höheren kognitiven Funktionen gezeigt. Zudem scheinen anormale D-Serin - NMDA Rezeptorinteraktionen eine Rolle in der Pathophysiologie einer Vielzahl von neuropsychiatrischen Krankheiten zu spielen. Beispielhaft sind Prozesse im Rahmen einer Schizophrenie bzw. beim ischämischen Zelltod von Neuronen (Wu et al., 2004, Wolosker et al., 2008).

Zu den wichtigsten offenen Fragen zählen aktuell die Rolle der Serin-Racemase und der D-Amino-Acid-Oxidase im physiologischen D-Serinstoffwechsel. Zudem beschäftigen sich weltweit Wissenschaftler mit der Rolle von D-Serin in der Expressionssteuerung des NMDA Rezeptors, sowie mit der daraus resultierenden Beeinflussung glutamatabhängiger Aktivierung neuronaler Kreisläufe. Die Beteiligung dieser Mechanismen bei einer Vielzahl von neuropsychiatrischen Erkrankungen gilt als sicher. Somit ist die therapeutische Beeinflussung oben genannter Enzyme ein wesentliches Thema aktueller Forschung in diesem Gebiet (Pollegioni et Sacchi, 2010; Sacchi et al., 2012; Wolosker et Mori, 2012; Billard 2012).

Die Ziele dieser Arbeit bestehen darin, anhand eines Tiermodells, den auch beim Menschen zu beobachtenden Verlust an Lernfähigkeit im Rahmen einer chronischen Temporallappenepilepsie darzustellen. Zusätzlich sollen mit Hilfe von Methoden der Grundlagenforschung Mechanismen dieser reduzierten Leistungsfähigkeit auf Verhaltensebene, auf zellulärer, sowie synaptischer Ebene beschrieben werden. Im Weiteren werden Methoden erprobt, diesen Verlust an Lernfähigkeit mit Hilfe von Verhaltensexperimenten und pharmakologischer Intervention zu verringern.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

2.1.1.1 Geräte zur Präparation der Gehirnschnitte und für die elektro-physiologische Ableitung

Gerät	Typenbezeichnung/Lieferant
Ableitungskammer	Interface-Kammer nach Haas (Eigenbau)
Absaugvorrichtung	ALA Scientific Instruments, Westbury, USA
Akquisitionsoftware	Signal 2.16
Analog-Digital-Konverter	Power 1401 (CED, Cambridge, England)
Computer zur Datenakquisition	Intel Pentium 4 CPU (2,4 GHz), 1 Gb RAM
Extrazellulärverstärker	EXT-08, DPA-2F (npi electronic, Tamm, Deutschland)
Faraday-Käfig	Eigenbau (IPHYS, Rostock, Deutschland)
Frequenzgeber	Master-8, A.M.P.I., Jerusalem, Israel
Interface	Digidata 1322, Axon Instruments, Foster City CA, USA
Kaltlichtquelle	Schott KL200, D-Mainz
Magnetrührer	RH basic 2 (IKA, Staufen, Deutschland)
Mikromanipulator	Narishige UMM-3FC, Long Island NY, USA
Osmometer	Automatic (Knauer, Berlin, Deutschland)
pH-Meter	CG840 (Schott, Mainz, Deutschland)
Pipettenziehgerät	PIP5 (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland)
Platindraht	0,05mm (WPI, Saratota, USA)
Pulsstimulator	A365 (WPI, Saratota, USA) ISO-STIM 01D (npi electronic, Tamm, Deutschland)
Schlauchpumpe	Minipuls 3 (Gilson, Villiers le Bel, Frankreich)
Schwingungsgedämpfter Tisch	Eigenbau (IPHYS, Rostock, Deutschland)
Silberdraht	0,005 Zoll (Science Products, Hofheim, Deutschland)
Small Animal Decapitator	Stoelting, Wood Dale, USA
Stereolupe	Leica MZ 6 (Leica, Wetzlar, Deutschland)
Temperaturregler	TC-10 (npi electronic, Tamm, Deutschland)
Vibrator	Integraslice 7550MM (Campden Instruments, England)
Wasserbad	Haake C 10 (Thermo, Karlsruhe, Deutschland)

2.1.1.2 Geräte für Untersuchungen im Water Maze

Gerät	Typenbezeichnung/Lieferant
Water Maze	Eigenbau (IPHYS, Rostock, Deutschland)
Computer zur Datenakquisition	Intel Pentium 4 CPU (2,4 GHz), 1 Gb RAM
Akquisitionsssoftware	Ethovision 3.1, Noldus

2.1.1.3 Geräte zur Datenauswertung

Gerät	Typenbezeichnung/Lieferant
Computer	HP Laptop, Intel Centrino Duo Prozessor, 1.66 GHz
Betriebssystem	Windows XP Professional

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

2.1.2.1 Verbrauchsmaterialien für die elektrophysiologischen Ableitungen

Material	Lieferant
Borosilikat-Glaskapillaren	Science Products, GB 150-8P, D-Hofheim
Carbogen	Linde, D-Wiesbaden

2.1.2.2 Chemikalien für die elektrophysiologischen Ableitungen

Substanz	Vollständiger Name	Lieferant	Bestell-Nr.
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	Calciumchlorid (Dihydrat)	Sigma	C-5080
Ether	Diethylether	Merck	1.00926.1000
Glucose	D-(+)-Glucose	Sigma	G-7528
HCl	Salzsäure (1 N)	Merck	1.09057.1000
KCl	Kaliumchlorid	Sigma	P-9333
MgCl ₂	Magnesiumchlorid	Sigma	M-8266
MgSO ₄ · 2 H ₂ O	Magnesiumsulfat (Heptahydrat)	Sigma	M-5921
NaCl	Natriumchlorid	Sigma	S-7653
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat	Sigma	S-6297
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat	Sigma	S-8282
NaOH	Natronlauge (1 N)	Merck	1.09137.1000

2.1.2.3 Agonisten und Antagonisten

Substanz	Vollständiger Name	Pharmakologie	Lieferant	Bestell-Nr.
Pilokarpin	Pilokarpin	mAChR-Agonist	Sigma	P-6503
D-Serin	D-Serin	NMDA-Koagonist	Sigma	S-135
Scopolamin	N-Methylscopuolamin	mAChR-Antagonist	Sigma	S-2250

2.1.2.4 Lösungen für die elektrophysiologischen Ableitungen

Substanz	Molekulargewicht (g/mol)	Messlösung (mmol/l)	Präparationslösung (mmol/l)
NaCl	58,55	125	125
NaHCO ₃	84,01	26	25
KCl	74,56	3	3
NaH ₂ PO ₄	120	1,25	1,25
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	147,02	2,5	0,2
MgCl ₂	95,21	1,3	-
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	246,5	-	5
D-Glucose	180,2	13	13
Saccharose	-	306–314 mosmol/l	306–314 mosmol/l
HCl bzw. NaOH	-	pH = 7,4	pH = 7,4

2.2 Modell

2.2.1 Versuchstiere

In den Versuchsreihen der vorliegenden Studie wurden ausschließlich männliche Wistar-Ratten verwendet. Sie wurden zunächst gruppiert, ab dem 30. Tag dann einzeln in Standartnagerkäfigen in einem klimatisierten Tierraum gehalten. Sie lebten in einem konstanten 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus (08:00 Uhr bis 20 Uhr hell, 20:00 Uhr bis 08:00 Uhr dunkel) und wurden mit Standardfutter für Ratten und Wasser ad libitum versorgt. Die Pflege und Beobachtung der Tiere wurde durch eine ausgebildete Tierpflegerin gewährleistet. Die Versuche waren gemäß §8 (1) des Tierschutzgesetzes genehmigt und standen unter Aufsicht des Tierschutzbeauftragten der Universität Rostock.

2.2.2 Induktion der chronischen Temporallappenepilepsie

Zu Beginn der Studie wurden alle Tiere in eine Pilocarpin-Gruppe (Pilocarpin) und in eine Kontrollgruppe (Kontrollen) randomisiert. Zum Zeitpunkt der Induktion der chronischen Temporallappenepilepsie waren die Tiere 130 - 150g schwer und 32 - 35 Tage alt. Primär wurde allen Tieren (Kontrollen, Pilocarpin) N-Methylscopolamin (1 mg/kg subcutan (s.c.)) verabreicht, um den peripheren cholinergen Effekten des Pilocarpins entgegenzuwirken. Nach 30 Minuten wurde daraufhin das Pilocarpin (340 mg/kg s.c.) injiziert, um einen lang anhaltenden, generalisierten Krampfanfall (Status epilepticus) auszulösen. Die gleichzeitig behandelte Kontrollgruppe erhielt die gleiche Volumenmenge 0,9 %iger NaCl-Lösung s.c. Innerhalb von 15-45 Minuten nach Injektion entwickelte ein Großteil der Pilocarpin-Tiere einen Status epilepticus. Falls binnen einer Stunde nach erstmaliger Pilocarpininjektion kein Status auftrat, wurde noch bis zu zwei weitere Male mit je 170 mg/kg Pilocarpin s.c. nachinjiziert. Vierzig Minuten nach Beginn des Status wurde dieser durch eine Injektion von Diazepam (4 mg/kg s.c.) terminiert. Bei einem Teil der Tiere war eine wiederholte Gabe von Diazepam notwendig. Die Kontrollgruppe erhielt zeitgleich, nach circa einer bis eineinhalb Stunden eine äquivalente Diazepam-Dosis. Nach Beendigung des Status epilepticus durch Diazepam waren einige Tiere deutlich beeinträchtigt. Deshalb wurden sie mit 5 %iger Glucoselösung per os rehydriert. Die Tiere erholten sich innerhalb kurzer Zeit. Die Erzeugung eines lang andauernden Krampfanfalls gelang im Durchschnitt bei etwa 70 % der Tiere. Die Letalität dieses Modells variierte zwischen 10 % und 40 %.

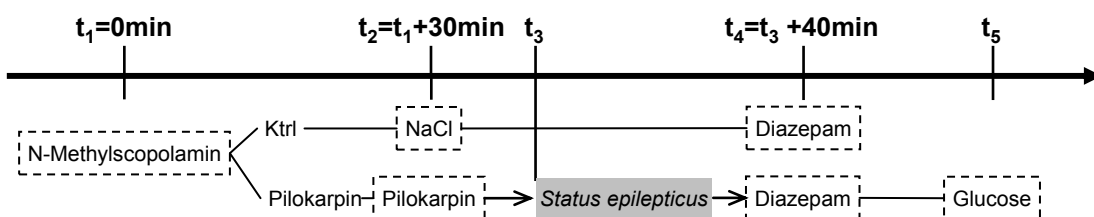


Abb. 4 Zeitlicher Ablauf der Interventionen gemäß unserem Protokoll zur Induktion einer chronischen Temporallappenepilepsie.

t_1 = Start des Protokolls mit Gabe von N-Methylscopolamin; t_2 = 30 min Start; t_3 = individueller Beginn des Status epilepticus; t_4 = 40 min nach Beginn des Status epilepticus; t_5 = orale Rehydratation mit 5%iger Glucoselösung

Kontroll- und Pilocarpin-Tiere wurden unter oben beschriebenen Bedingungen nachbehandelt und gehalten. Innerhalb von circa zwei Wochen entwickelten die mit Pilocarpin behandelten Tiere spontane epileptische Anfälle. Mit Hilfe eines Videoüberwachungssystems wurden diese dokumentiert.

2.2.3 Alterung der Tiere

Ein Teil der Kontroll-Tiere, wie auch der Pilocarpin-Tiere wurden in einen separaten Tierraum, unter den gleichen Bedingungen als Alterungsgruppe gehalten. Bei diesen Tieren wurde alle 7 bis 10 Tage das Gewicht dokumentiert und die Trinkmenge festgestellt.

2.3 Experimentelle Gruppen und experimentelles Protokoll

Die Experimente der vorliegenden Studie wurden inhaltlich und organisatorisch in zwei Versuchszweige unterteilt.

Der erste Zweig bestand aus jungen Ratten die zum Zeitpunkt der elektrophysiologischen Messung im Durchschnitt 89 Tage alt waren (Abb. 5). Sie gehörten zur Hälfte einer unbehandelten Kontrollgruppe an und zur anderen Hälfte der Pilocarpingruppe. In beiden Gruppen wurde der Einfluss des Morris Water Maze (WM) auf die synaptische Langzeitpotenzierung (LTP) untersucht. Die Tiere beider Gruppen wurden auf eine „Water Maze Gruppe“ (WM (+)) und eine „nicht Water Maze Gruppe“ (WM (-)) randomisiert. Circa 12 h - 24 h nach dem letzten Versuch entsprechend des Water Maze Protokolls wurde bei den Tieren der WM (+) - Gruppe die Langzeitpotenzierung (long-term potentiation; LTP) nach Hochfrequenz-Stimulation mittels extrazellulärer Potentialmessung bestimmt. Zeitgleich fanden auch die Messungen der LTP bei der WM (-) - Gruppe statt.

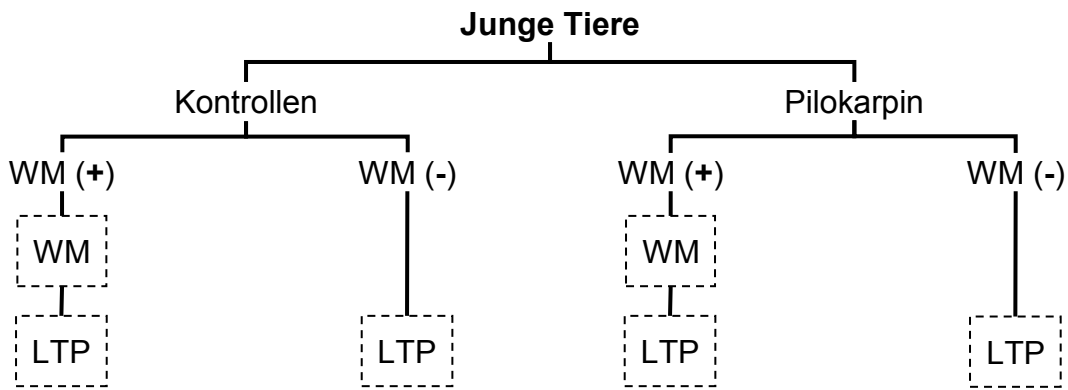


Abb. 5 Erster Untersuchungszeitpunkt

Dieser enthielt junge Tiere (89 Tage zum Zeitpunkt der LTP Messung), welche in eine Kontrollgruppe und eine Gruppe mit Pilocarpin-induzierter chronischer Temporallappenepilepsie (Pilocarpin) unterteilt wurden. Die Tiere beider Gruppen wurden jeweils in eine „Water Maze Gruppe“ (WM (+)) und eine „nicht Water Maze Gruppe“ (WM (-)) randomisiert. 12 h – 24 h nach Beendigung des Water Maze Protokolls erfolgte die Ableitung extrazellulärer Potentiale und die Induktion von Langzeitpotenzierung (LTP) mittels High Frequency Stimulation (HFS).

Im zweiten Arm wurde der Einfluss chronisch pathologischer Bedingungen (Alterung, chronische Temporallappenepilepsie) auf das räumliche Lernvermögen und die Langzeitpotenzierung im Hippocampus untersucht (Abb. 6). Dazu wurde ein Teil der Tiere im Rahmen eines therapeutischen Interventionsversuchs ab dem 72. Lebensstag mit D-Serin (40 mg/kg/Tag) behandelt. D-Serin wurde entsprechend wöchentlicher Messungen von Gewicht und Trinkmenge in das Trinkwasser dosiert. Die daraus entstandenen Gruppen wurden ebenfalls zufällig in WM (+) und WM (-) Gruppen eingeteilt. Der erste Durchgang des Water Maze Protokolls fand in diesem Untersuchungszeitpunkt im Alter von ungefähr 500 Tagen statt. Es wurden zwei Durchgänge im Abstand von circa 50 Tagen (letzter Tag des ersten Durchgangs bis zum ersten Tag des zweiten Durchgangs) durchgeführt. Im Anschluss wurde ebenfalls 12 - 24 Stunden nach dem letzten WM-Versuch die LTP im Hippocampus gemessen.

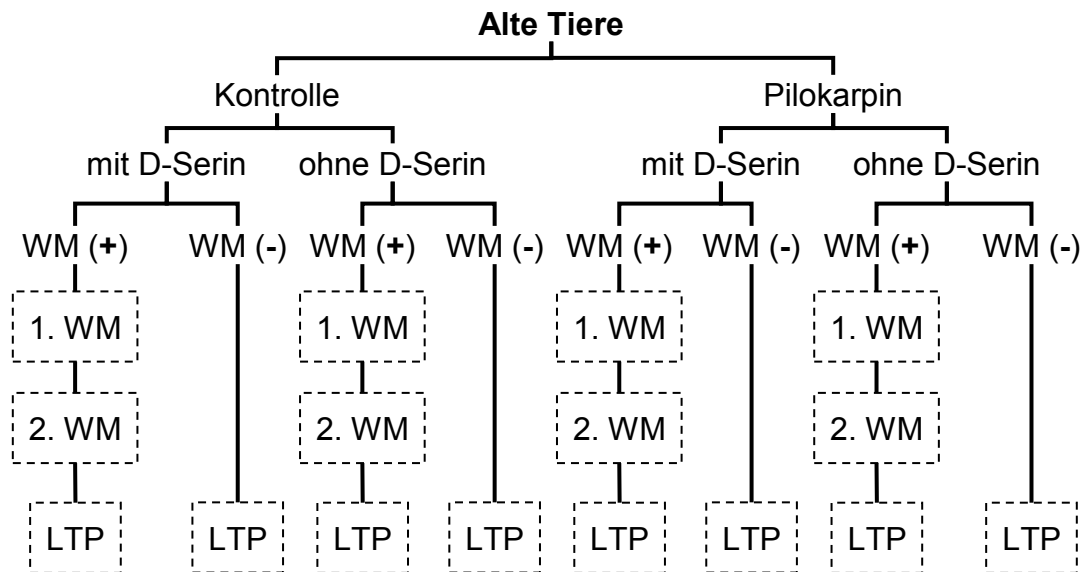


Abb. 6 Zweiter Untersuchungsweig.

Es handelte sich um alte Tiere (18,5 Monate zum Zeitpunkt der LTP Messung). Es gab jeweils eine über das Trinkwasser mit D-Serin (40 mg/kg/Tag) behandelte Gruppe und eine Kontrollgruppe ohne D-Serin. Nach im Durchschnitt 16,2 Monaten wurde randomisiert bei jeweils der Hälfte der Tiere ein Versuchsdurchgang im Water Maze (1. WM) durchgeführt, darauffolgend 50 Tage später ein 2. Durchgang (2. WM). Bei allen Tieren wurde im Anschluss die Messung der LTP nach HFS im Hippocampus durchgeführt.

2.4 Methoden

2.4.1 Präparation der Hirnschnitte

Die Tiere wurden zur Präparation der Hirnschnitte vorsichtig in den Präparationsraum gebracht und unter einem Luftabzug mit Diethylether narkotisiert. Der Erfolg dieser Maßnahme wurde durch Prüfung der Halte-, Stell- und Schmerzreflexe sichergestellt. Die Tötung erfolgte schmerzfrei durch Dekapitation mit Hilfe eines Small-Animal-Decapitator (Guillotine). An diese Maßnahme schloss sich die schnellstmögliche Entnahme des Gehirns an. Dazu wurde zunächst das Fell über der Kalotte durch einen medialen Skalpellschnitt mit Hilfe einer Pinzette entfernt. Im Anschluss wurden die Schädeldecke und die Dura mater vom Foramen magnum aus entlang der Fissura longitudinalis mit einer Schere gespalten. Um das Abheben der Schädeldecke durch Pinzette zu erleichtern, wurden am Ende des Kalottenschnittes zwei kurze Schnitte in anterolateraler Richtung durchgeführt. Daraufhin wurden die Kalottenfragmente abgehoben, das

Kleinhirn mit Hilfe eines Skalpells entfernt und das Gehirn mit einem gebogenen Spatel aus der Schädelgrube herausgelöst. Das Präparat wurde umgehend in eisgekühlte und vorher ausreichend mit Carbogen begaste Präparationslösung überführt.

Zur Herstellung der Schnitte wurde das Gehirn nun mit Hilfe von handelsüblichem Sekundenkleber mit der Konvexität nach unten in der Vibratomkammer fixiert. Die Kammer wurde dann mit der eisgekühlten Präparationslösung gefüllt und während des gesamten Schneidvorgangs von dieser mit Carbogen begasten Lösung umspült. Es wurden je Gehirn drei bis fünf 400 µm dicke, transversale Scheiben angefertigt. Aus jedem dieser Schnitte konnten jeweils zwei Hippocampi mit Hilfe von gebogenen Insulinspritzen herauspräpariert werden. Diese wurden zunächst in eine mit normaler Messlösung gefüllte Aufbewahrungskammer transferiert und mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur unter Carbogenbegasung äquilibriert. Anschließend wurden je Messung zwei Hippocampi in die Messkammern überführt, in der sie von einer dann langsam auf 35 °C erwärmten Messlösung umspült wurden. Nach weiteren 30 min Äquilibration konnte mit den elektrophysiologischen Experimenten begonnen werden.

2.4.2 Ableitung elektrophysiologischer, extrazellulärer Potentiale

Auf einem hydraulisch gelagerten Tisch, welcher sich innerhalb eines geerdeten Faraday Käfigs befand, waren die Messkammer, 4 Manipulatoren und ein Stereomikroskop angebracht (Abb. 7). Zur Messkammer gehörten die Carbogenzufuhr, die Zu- und Abflüsse für die Messlösung, sowie das Wasserbad und der Heizdraht zur Erwärmung der Messlösung. Diese wurde mittels Rollerpumpe, um die auf der Messplattform platzierten Hippocampi mit konstantem Fluss herumgeleitet. Gleichzeitig wurde die Temperatur der Lösung über eine direkte Rückkopplungsschleife bei konstant 35 °C gehalten.

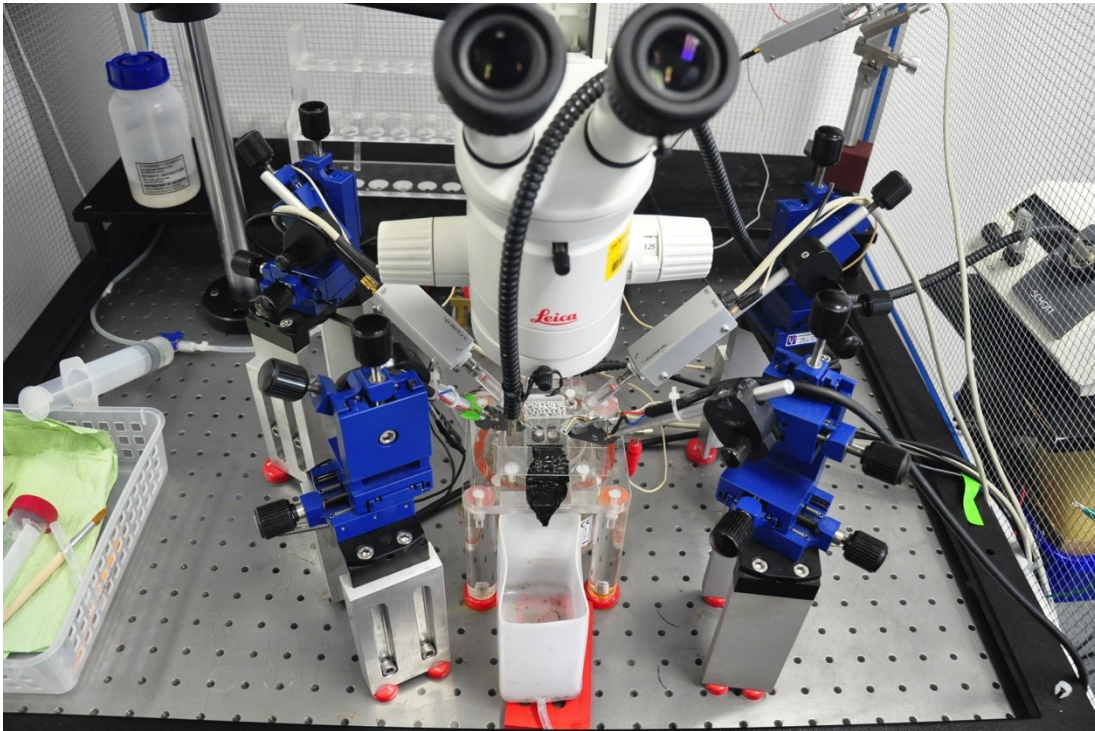


Abb. 7 Foto des Messplatzes für die elektrophysiologischen Untersuchungen.

Die Messapparatur innerhalb eines geerdeten Faraday Käfigs besteht aus einer Messkammer, 4 Manipulatoren und ein Stereomikroskop.

Die elektrophysiologischen, extrazellulären Potentiale wurden im Stratum radiatum, genauer im Bereich der Schaffer-Kollateral-CA1-Synapse abgeleitet. Zur Bestimmung der basalen synaptischen Übertragung wurde eine Doppelpuls-Stimulationen (Abstand 40 ms) benutzt. Die Reize wurden mit bipolaren Stimulationselektroden appliziert, welche aus mit Titan beschichteten Platindrähten hergestellt wurden. Die Stimmulationsstromstärke betrug 0,010 A bis 0,200 A. Diese wurde so justiert, dass etwa 40 % bis 50 % der maximalen Reizantwort ausgelöst wurden. Die Ableitelektroden bestanden aus chloriertem Silberdraht (Ag/AgCl-Draht), welcher sich in einer mit Messlösung gefüllten Glaspipette aus Borosilikatröhrchen befand. Die Glaspipetten wurden in einem vertikalen Pipettenziehgerät so gezogen, dass der Elektrodenwiderstand ca. 2 – 4 M Ω betrug.

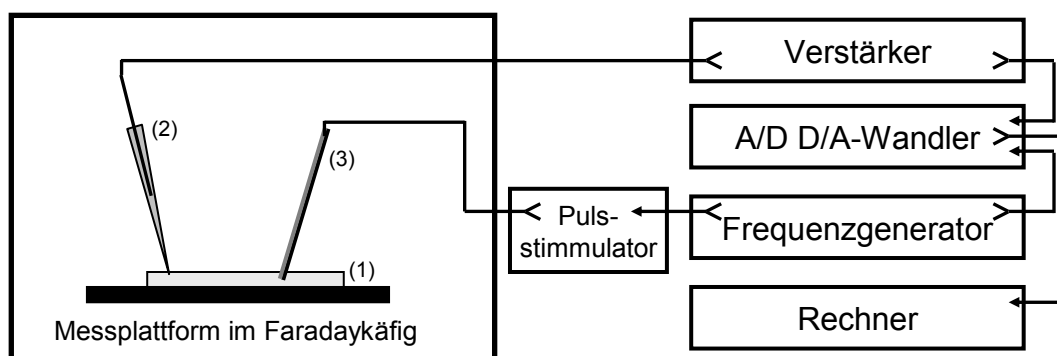


Abb. 8 Verschaltung von Stimulationselektrode (3) und Ableitelektrode (2) bei der Ableitung exzitatorischer, extrazellulärer postsynaptischer Potentiale (fEPSP) in einem Hippocampuschnitt (1).

Der Frequenzgenerator triggert die Stimulation im Pulsstimulator und gibt gleichzeitig ein Signal an den Analog-Digital-Wandler (A/D D/A Wandler). Die durch die synaptische Übertragung hervorgerufene elektrische Antwort der Nervenzellen wird durch den Verstärker aufgenommen, verstärkt und ebenfalls an den A/D D/A Wandler weitergeleitet. Dieser integriert die an ihn gesendeten Daten und leitet sie an einen Personal Computer zur grafischen Darstellung, Aufzeichnung und Auswertung weiter.

2.4.3 Protokoll zur Induktion synaptischer Plastizität

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, synaptische Plastizität bei in vitro Gehirnschnitten auszulösen. Abhängig vom Protokoll ist es möglich, eine Langzeitdepression (long-term depression; LTD), sowie eine Langzeitpotenzierung (long-term potentiation; LTP) zu induzieren. In der vorliegenden Studien wurde ein Hochfrequenz-Stimulationsprotokoll (HFS) benutzt, welches zuverlässig Langzeitpotenzierung in der Kontrollgruppe induziert. Nach sorgfältiger Positionierung der Elektroden im Stratum radiatum der CA1 Region wurden für 20 Minuten die basalen synaptischen Antworten aufgezeichnet (Baseline). Bei ausreichender Stabilität dieser Grundantwort wurde durch ein standardisiertes Protokoll synaptische Plastizität induziert. Dazu wurden die Schnitte mit 100 Impulsen in einer Sekunde bei doppelter Reizstärke stimuliert. Dieses Protokoll ermöglichte in den Schnitten junger Kontroll-Tiere mit hoher Sicherheit die Auslösung einer lang anhaltenden Erhöhung der synaptischen Erregbarkeit (LTP).

2.4.4 Morris Water Maze

Begleitend zu den elektrophysiologischen Untersuchungen wurden Verhaltensexperimente zum räumlichen Lernen im runden Morris Water Maze durchgeführt. Das Morris Water Maze war in einem separaten Raum aufgebaut. Es bestand aus einem Wasserbassin (Durchmesser 110 cm), in dem in allen vier Quadranten eine Plattform (Durchmesser 7,5 cm) positioniert werden konnte. Das Bassin wurde soweit mit Wasser gefüllt, das

die Plattform 1 - 2 cm unterhalb der Wasseroberfläche lag und somit beim Schwimmen von den Tieren nicht gesehen werden konnte. Umgeben war das Bassin zu allen Seiten von weißen Wänden an denen großflächige, deutlich voneinander abgrenzbare schwarze Symbole angebracht waren. Die Wasser- und Raumtemperatur wurden überwacht und die Bewegung der Tiere mit Hilfe einer Aufzeichnungssoftware (Ethovision, Noldus) durch eine über dem Bassin angebrachte Kamera aufgezeichnet.



Abb. 9 Fotografie und schematischer Aufbau des Morris Water Maze.

Die Versuchsanordnung bestand aus einem mit Wasser gefüllten Bassin in dem es eine auf 4 Positionen variabel platzierbare Plattform gab. Der Wasserstand war 1 - 2 cm oberhalb der Plattform, sodass diese von den Tieren nicht gesehen werden konnte. Zur Orientierung gab es an den 4 Wänden jeweils unterschiedliche Symbole, deren Position nicht verändert wurde.

Initial wurde jedem Tier eine feste Plattformposition zugewiesen, die es während aller folgenden Water-Maze Experimente behielt. Das Tier wurde für den ersten Schwimmversuch an einen zufällig Ort innerhalb des Water Maze ins Wasser gesetzt. Die Tiere fingen spontan an zu schwimmen. Im Verlauf entdeckten die meisten Ratten durch Zufall die Plattform, auf welcher sie dann 30 Sekunden zur Orientierung sitzen gelassen wurden. Tiere, die die Plattform innerhalb von 60 Sekunden nicht entdeckten, wurde dann für 30 Sekunden auf die Plattform gesetzt. Innerhalb dieser Zeit konnten sich die Tiere mit Hilfe der Symbole orientieren. Im Anschluss wurden die Tiere für 60 Sekunden in einen Ruhekäfig gesetzt. Danach wurden sie erneut an eine zufällige, allerdings innerhalb eines Tages sich nicht wiederholende Position, in das Water Maze gesetzt. Im Verlauf fanden die Tiere die Position der Plattform zunehmend schneller und zielgerichteter. Das Protokoll für das Experiment eines einzelnen Tieres bestand aus 6 aufeinanderfolgenden, wie

oben beschriebenen Einzelversuchen pro Tag an sieben aufeinanderfolgenden Tagen.

Im zweiten Untersuchungszweig wurde der eben beschriebene Untersuchungsablauf zweimal durchgeführt (Abb. 6). Dabei lagen zwischen dem letzten Tag des ersten Durchganges und dem ersten Tag des zweiten Durchganges hierbei ungefähr 50 Tage.

2.4.5 Auswertung, statistische Analyse und Darstellung der erhobenen Daten

Bei den elektrophysiologischen Untersuchungen wurden 2 Eigenschaften der Feldpotentialableitungen bestimmt. Zum einen wurde zur Ermittlung der Amplitude mittels Maximalwertanalyse der größte Betrag des vertikalen Abstands der Feldpotentialkurve zur Grundlinie bestimmt (Peak-Analyse). Zum anderen wurde die Originalkurve zur Ermittlung der maximalen Steigung differenziert (Slope-Analyse). Zur Auswertung der synaptischen Plastizität wurden die Werte der ersten Reizantworten der Doppelpulsstimulation über einen Zeitraum von 20 Minuten vor Hochfrequenzstimulation gemittelt und die Werte nach Stimulation für 60 Minuten aufgezeichnet.

Für die Statistik und die graphischen Darstellung innerhalb dieser Arbeit wurden ausschließlich die Werte der Anstiegsanalyse benutzt. Um die Ausprägung der lang anhaltenden Erhöhung der synaptischen Übertragung zu vergleichen, wurde der Mittelwert der Anstiegsanalyse der letzten 5 Minuten des einstündigen Beobachtungszeitraumes berechnet. Dieser Mittelwert wurde im Weiteren als Vergleichswert für die Langzeitpotenzierung (LTP) herangezogen.

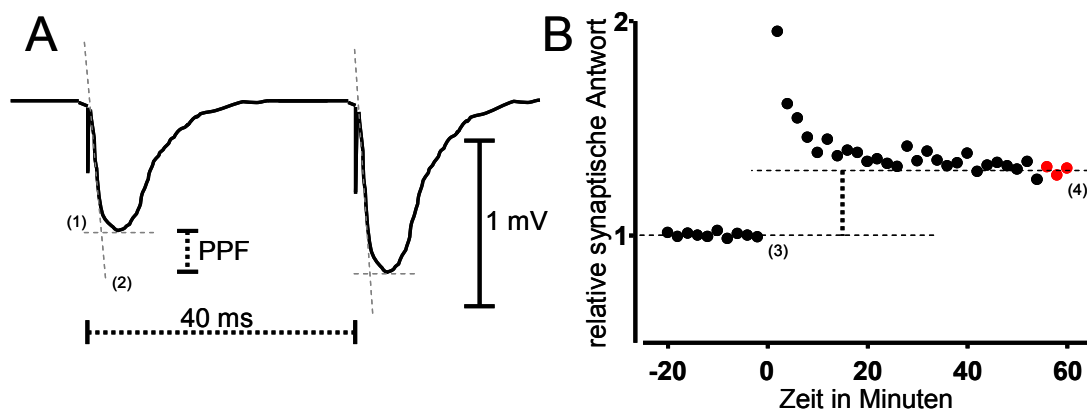


Abb. 10 Beispielhafte synaptische Feldpotentialantwort (A) und Darstellung der Normierung dieser Antworten im zeitlichen Verlauf (B).

(A) Die Analyse der exzitatorischen postsynaptischen Potentiale (fEPSP) erfolgt über eine Maximalwert-Analyse (1) der ersten Reizantwort der Doppelpulsstimulation bzw. in einem zweiten Schritt über eine Bestimmung der Anstiegssteilheit (2) mittels Differentialrechnung. Das Verhältnis des Peaks der Anstiegssteilheit des zweiten Reizes geteilt durch den entsprechenden Wert des ersten Reizes ergibt die Perforant Pathway Facilitation (PPF).

(B) Zur übersichtlichen Darstellung der Reizantworten im zeitlichen Verlauf werden die Absolutwerte von Peak- oder Slope-Analyse über die 20 Minuten vor HFS gemittelt und auf diesen Mittelwert normiert (Baseline (3)). Die Werte nach HFS werden zur Baseline in ein relatives Verhältnis gesetzt. Als Vergleichszeitraum für die lang anhaltenden, synaptischen Effekte wurde der Mittelwert (4) der Relativwerte der letzten 5 Minuten des einstündigen Messzeitraumes nach High Frequency Stimulation benutzt.

Die Lernverhaltensexperimente im Morris-Water-Maze wurden ausgewertet, indem pro Tier jeweils die Summe der Zeit der 6 Einzelversuche pro Tag gebildet wurde, bis das Tier die Plattform gefunden hatte (kumulative Latenz). Wurde die Plattform nicht gefunden, wurde der Versuch nach 60 Sekunden abgebrochen und die Zeit für diesen Versuch auf 60 Sekunden festgelegt. Bei 6 Versuchen pro Tag ergab sich deshalb eine maximale kumulative Latenz von 360 Sekunden.

Die Auswertung der Originaldaten der elektrophysiologischen, sowie auch der Lernverhaltensexperimente erfolgte primär mit Microsoft Excel 2003. Die statistische Analyse wurde mit Sigma Stat 3.5 durchgeführt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass statistische Vergleiche von normalverteilten Daten mit Hilfe des t-Tests, nicht-normalverteilte Daten mit Hilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests (Rangsummentest) verglichen wurden. Dementsprechend werden normalverteilte Daten mit Hilfe eines vertikalen Balkendiagrammes dargestellt (arithmetisches Mittel, \pm Standardfehler) und nicht-normalverteilte Daten in einem sogenannten Boxplot-Diagramm (Median, 10., 25., 75. und 90. Perzentile, Ausreißer) dargestellt.

Die grafischen Darstellungen aller Ergebnisse wurden mit Sigma Plot 10.0 erstellt und dann in Corel Draw 12 als Gesamtabbildung nachbearbeitet.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Water Maze Training auf die Langzeitpotenzierung von jungen Kontrollen und jungen Pilocarpin-Tieren

Ziel des ersten Untersuchungszeitpunktes war es festzustellen, welchen Einfluss das Lerntraining *in vivo* auf die später *in vitro* untersuchte Langzeitpotenzierung von jungen Wistar-Ratten hat. Dieses haben wir zunächst an jungen Kontrolltieren und an jungen Tieren mit Pilocarpin-induzierter Temporallappenepilepsie getestet. Die Tiere waren zum Zeitpunkt des ersten Versuchstages im Water Maze im Median 82 Tage (Min.: 77 Tage; Max.: 91 Tage) alt. Zum Zeitpunkt der LTP Messung betrug das Alter im Median 86 Tage (Min.: 82 Tage; Max.: 98 Tage).

Bei Tieren ohne vorheriges Lerntraining war lediglich im Gewebe der nicht epileptischen Ratten eine Langzeitpotenzierung zu beobachten, welche im chronisch epileptischen Gewebe fehlte.

Der Mittelwert der auf die Ausgangswerte genormten Anstiegswerte (rechnerisch LTP) betrug in den letzten 5 Minuten des 60-minütigen Beobachtungszeitraums nach HFS (LTP) bei den jungen Kontroll-Tieren 1,674 ($\pm 0,152$, $n = 11$). Für die Pilocarpin-Tiere betrug die Langzeitpotenzierung 1,050 ($\pm 0,179$, $n = 9$). Es bestand zwischen beiden Gruppen ein signifikanter Unterschied ($p = 0,016$ im t-Test, Abb. 11B).

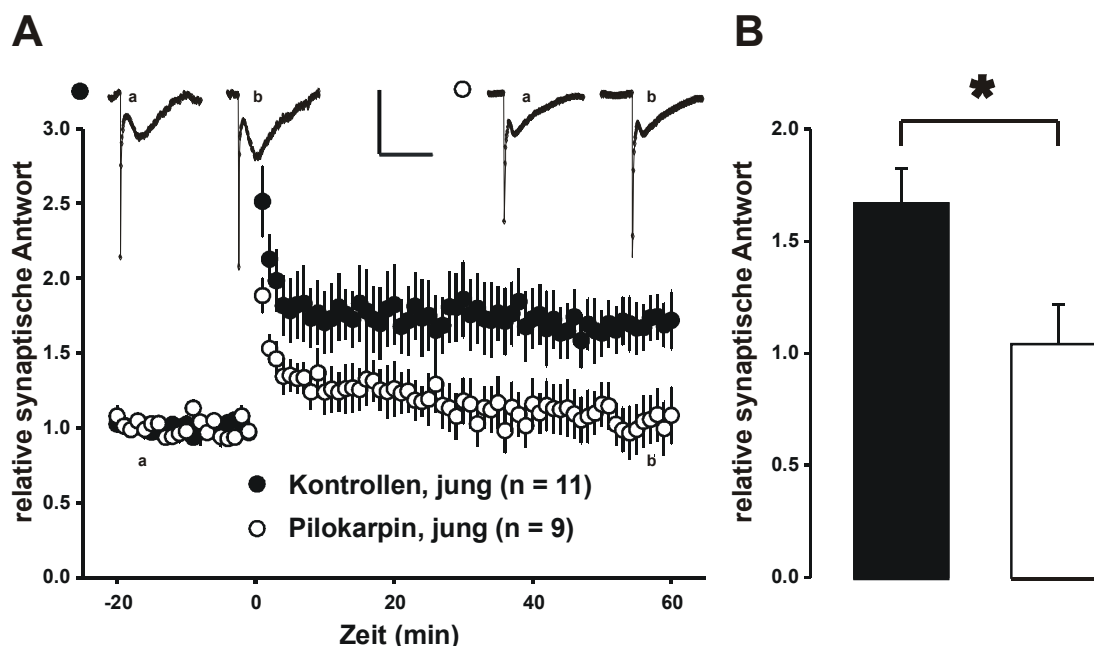


Abb. 11 Die LTP nach HFS war bei jungen Pilocarpin-Tieren im Vergleich zu jungen Kontrollen signifikant reduziert.

(A) Im Zeitverlauf der EPSPs zeigte sich bei jungen Kontrollen (geschlossene Kreise) im Vergleich zu jungen Pilocarpin-Tieren (offene Kreise) eine deutlich gesteigerte synaptische Erregbarkeit nach HFS (1 sec, 100 Hz, doppelte Reizstärke). Der Eichwinkel für die Beispielspuren entspricht 1 mV in vertikaler und 20 ms in horizontaler Richtung. Die Beispielspuren wurden an den mit den Kleinbuchstaben (a, b) markierten Zeitpunkten entnommen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

(B) Die LTP war bei jungen Pilocarpin-Tieren signifikant reduziert im Vergleich zu jungen Kontrollen (* $p < 0,05$ im t-Test). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

Die Gruppen der Tiere mit vorherigem Lerntraining wurde vor den elektrophysiologischen *in vitro* Experimenten *in vivo* im Morris Water Maze untersucht. Dabei lassen Latenzzeiten, welche die Tiere benötigen, um die Plattform zu finden, Rückschlüsse auf die Fähigkeit zum räumlichen Lernen zu (Morris, 1982; Wenk, 2004). Wie in Abb. 12 zu sehen ist, benötigten gesunde Kontrollen an allen sieben Tagen signifikant weniger Zeit, um die Plattform zu finden, als epileptische Tiere. Das arithmetische Mittel der kumulativen Latenz für Kontrollen am ersten Tag betrug 164,5 sec ($\pm 21,187$ sec, $n = 10$). Für die Pilocarpin-Tiere hingegen betrug dieses 342,4 sec ($\pm 11,652$ sec, $n = 5$), das war nur unwesentlich kürzer als die bei sechs Einzelversuchen maximal mögliche Zeit von 360 sec. Der dargestellte Unterschied war signifikant ($p < 0,001$). Hier exemplarisch für den 7. Tag (Abb. 12B) dargestellt betrug der Median der kumulativen Latenzen der Kontroll-Tiere 21,5 sec (25 %: 12 sec, 75 %: 29 sec, $n = 10$) und der Median

der Pilocarpin-Tiere 153,0 sec (25 %: 84.25 sec, 75 %: 244.0 sec, n = 5). Das entsprach im Rangsummentest einer Signifikanz von $p = 0,004$.

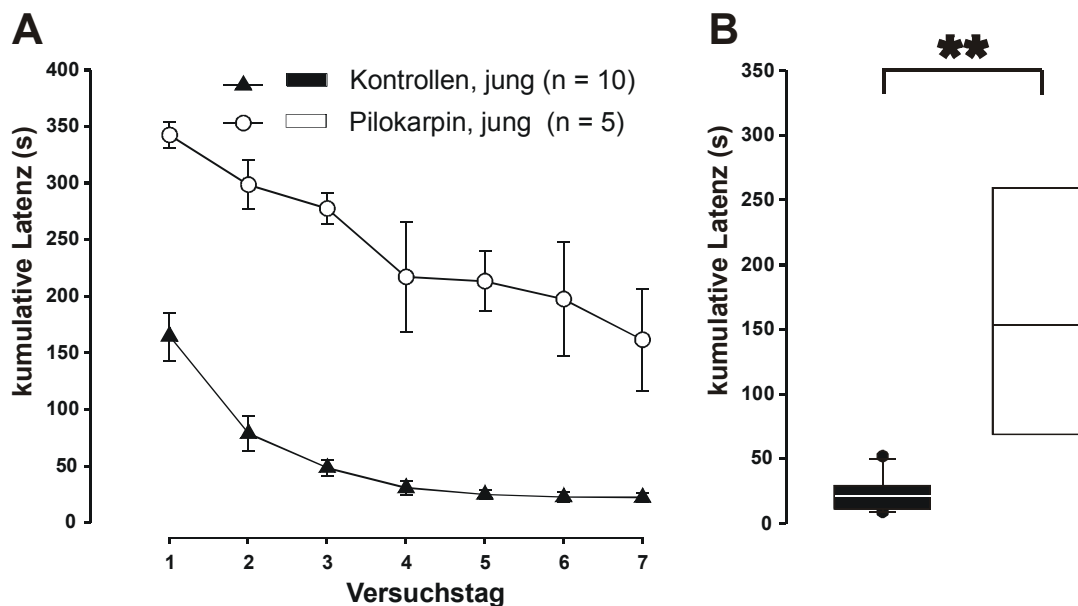


Abb. 12 Junge Kontroll-Tiere fanden die Plattform im Morris Water Maze an allen 7 Tagen signifikant schneller als junge Pilocarpin-Tiere.

(A) Arithmetisches Mittel der Summen der 6 Einzelversuche (kumulative Latenz) an jedem der 7 Versuchstage im Morris Water Maze für junge Kontroll-Tiere (schwarze Dreiecke) und junge Pilocarpin-Tiere (offene Kreise). Kontrollen fanden die Plattform an allen 7 Tagen signifikant schneller. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.
 (B) kumulativen Latenzen für den 7. Versuchstag, welche signifikant verschieden voneinander waren (** $p < 0,01$, Rangsummentest).

Da die Tiere beider Gruppen bereits am ersten Tag unterschiedlich lange gebraucht haben, und um den möglichen Einfluss äußerer Faktoren, wie zum Beispiel den der Schwimgeschwindigkeit zu minimieren, wurde als ein weiteres Lernmaß der sogenannte Lernzuwachs berechnet. Dazu wurde jeweils von einem Tier der prozentuale Anteil des arithmetischen Mittelwertes der Schwimmzeiten des 5. bis 7. Tages vom ersten Tag berechnet [% = (Mittelwert (kumulative Latenzen 5., 6., 7. Tag)/(kumulative Latenz 1. Tag) * 100)]. Dabei zeigte sich, dass junge Kontroll-Tiere im Mittel des 5. bis 7. Tag nur 11,7 % der Zeit des ersten Tages benötigen. Pilocarpin-Tiere benötigten immer noch die Hälfte der Zeit (Median: 49,63%). Dieser Unterschied war ebenfalls signifikant ($p = 0,004$ im Rangsummentest, Tab. 1)

	Median der kumulativen Latenz 1. Tag	Median der Kumulativen Latenz 5. - 7. Tag	Lernzuwachs Median %	Signifikanz des Lernzuwachses
Kontrollen, jung	160,50 sec (25 %: 96,0 sec 75 %: 233,0 sec)	20,0 sec (25 %: 15,0 sec 75 %: 30,0 sec)	11,718 % (25 %: 10,417 % 75 %: 20,567 %)	Rangsummentest p = 0,004
Pilokarpin, jung	360,0 sec 25 %: 323,0 sec 75 %: 360,0 sec)	196,0 sec 25 %: 128,25 sec 75%: 271,0 sec)	49,630 % (25 %: 38,985 % 75 %: 77,915 %)	

Tab. 1 Junge Kontroll-Tiere benötigten bis zum Auffinden der Plattform im Vergleich der Mittelwerte des 5. bis 7. Tages zum ersten Tag im Median nur 11,7 %, Pilokarpin-Tiere brauchten noch 50 % der Zeit.

Medianen Latenzzeiten für junge Kontrollen und junge Pilokarpin-Tiere am ersten Tag im Water Maze und für den Mittelwert der Zeiten vom 5. - 7. Tag. „Median %“ repräsentiert den Median der prozentualen Anteile der für jedes Tier individuell berechnet wurden: [% = (Mittelwert (kumulative Latenzen 5., 6., 7. Tag)/(kumulative Latenz 1. Tag) * 100]. Die prozentualen Anteile zwischen beiden Gruppen unterschieden sich signifikant (p = 0,004 im Rangsummentest).

Innerhalb von 24 h nach dem letzten *in vivo* Lerntraining im Morris Water Maze wurden dieselben Ratten *in vitro* elektrophysiologisch untersucht. Die Stärke der synaptischen Antworten nach HFS (1 sec mit 100Hz bei doppelter Reizstärke) war hierbei bei den Kontroll-Tieren mit vorherigem Water Maze Training im Vergleich zu den Geweben von Kontroll-Tieren ohne Training deutlich reduziert (Abb. 13A). Dementsprechend lag der Mittelwert der LTP der Kontrollen ohne WM bei 1,674 (± 0,153, n = 11) und für die LTP von Kontroll-Tieren mit WM bei 1,327 (± 0,0903, n = 9); (p = 0,048, t-Test, Abb. 13B).

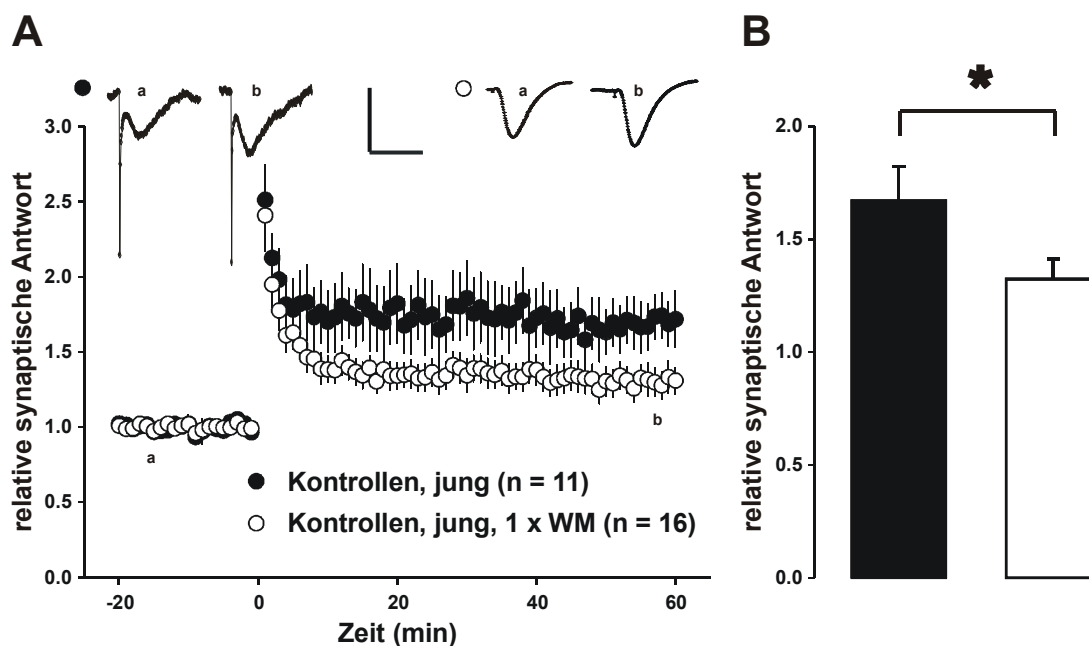


Abb. 13 Die Behandlung junger Kontroll-Tiere im Morris Water Maze reduzierte die im Anschluss gemessene LTP nach HFS signifikant.

(A) Zeitverlauf von CA-1 Feldpotenzialen nach HFS (1sec, 100Hz, doppelte Reizstärke). Hierbei zeigte sich, dass die mit WM behandelten Kontrollen (offene Kreise) eine im Vergleich zu den nicht mit Water Maze behandelten Kontrollen (geschlossene Kreise) signifikant unterschiedliche synaptische Antwort hatten. Der Eichwinkel für die Beispielspuren entspricht 1 mV in vertikaler und 20 ms in horizontaler Richtung. Die Beispielspuren wurden an den mit den Kleinbuchstaben (a, b) markierten Zeitpunkten entnommen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

(B) Die LTP war bei jungen Kontrollen nach WM im Vergleich zu jungen Kontrollen ohne WM signifikant reduziert (* $p < 0,05$).

Mit gleichem Ablauf wurden auch junge Pilocarpin-behandelte Tiere untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die synaptische Antwort der CA-1-Schaffer-Kollateralen von Pilocarpin-Tieren mit Water Maze Training tendenziell sogar eher stärker ausfiel (Abb. 14A). Der Mittelwerten der LTP für Pilocarpin-Tiere ohne vorherige Water Maze Behandlung war $1,050 (\pm 0,179, n = 9)$ und $1,168 (\pm 0,148, n = 11)$ für Tiere mit vorheriger Water Maze Behandlung. Dies war allerdings kein signifikanter Unterschied ($p = 0,61$, t-Test, Abb. 14B).

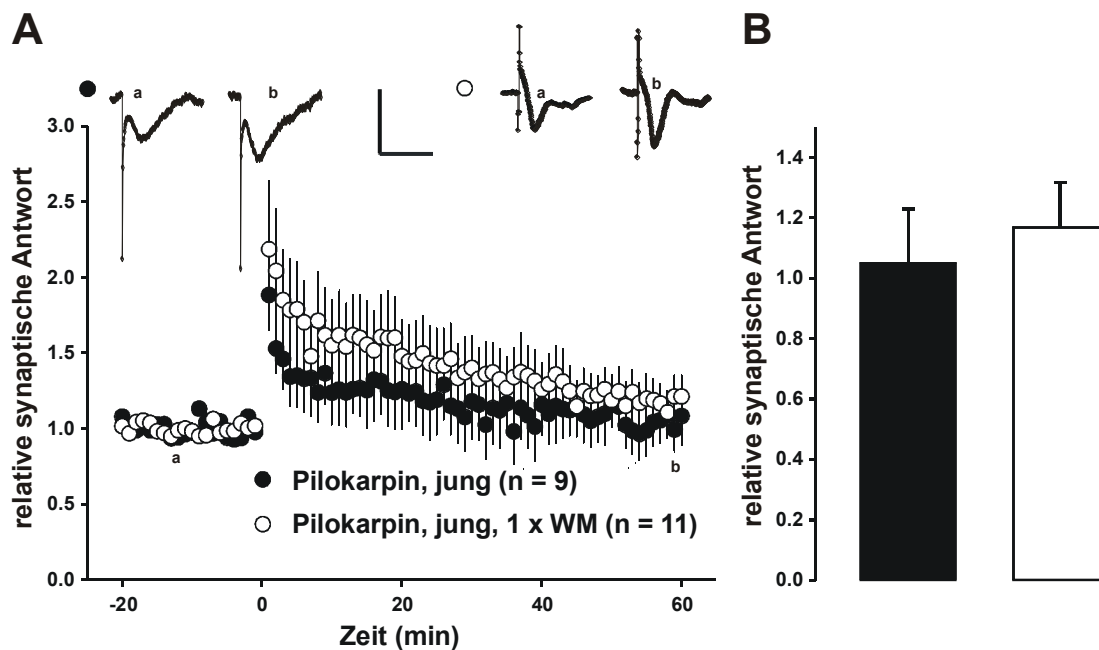


Abb. 14 Die LTP von jungen Pilocarpin-Tieren mit und ohne WM unterschied sich nicht signifikant.

(A) Zeitlicher Verlauf der synaptischen Antworten vor und nach HFS bei jungen Pilocarpin-Tieren ohne WM Training (geschlossene Kreise) und jungen Pilocarpin-Tieren mit WM Training (offene Kreise). Der Eichwinkel für die Beispielspuren entspricht 1 mV in vertikaler und 20 ms in horizontaler Richtung. Die Beispielspuren wurden an den mit den Kleinbuchstaben (a, b) markierten Zeitpunkten entnommen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

(B) Es bestand kein signifikanter Unterschied der Mittelwerte in den letzten 5 Minuten des Beobachtungszeitraumes ($p = 0,61$ im t-Test). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

Mit den in diesem Teil dargestellten Experimenten konnte gezeigt werden, dass zwischen gesunden Ratten und Ratten mit chronischer Temporalepilepsie ein Lernunterschied im Morris Water Maze bestand. Zudem zeigte sich, dass das hier verwendete Reizprotokoll in der Lage ist bei jungen, gesunden Tieren Langzeitpotenzierung zu induzieren. Diese *in vitro* induzierte Langzeitpotenzierung wurde durch vorheriges *in vivo* Lerntraining bei gesunden Tieren signifikant reduziert. Bei Ratten mit chronischer Epilepsie konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden.

3.2 Einfluss des Alterungsprozesses auf das räumliche Lernen und die Langzeitpotenzierung von alten Kontroll-Tiere und alten Pilocarpin-Tieren

Ziel dieser Reihe von Experimenten war es den Einfluss einer chronischen Epilepsie auf das Lernverhalten im Water Maze und die Langzeitpotenzierung darzustellen. Hierzu wurde getestet, welchen Einfluss der Alterungsprozess auf die beiden Parameter hat. Die Tiere, welche in diesem Zweig getestet wurden, waren zu Beginn der Water Maze Experimente im Median 16,2 Monate (Min.: 15,6 Monate, Max.: 18,7 Monate) alt. Zwischen ersten und zweitem Water Maze Durchgang lagen durchschnittlich 49 Tage, sodass die Tiere zu Beginn des zweiten Durchganges im Median 18,1 Monate (Min.: 17,3 Monate, Max.: 20,33 Monate) alt waren. Zum Zeitpunkt der LTP-Messungen betrug das mediane Alter dieses Kollektives 18,35 Monate (Min.: 17,5 Monate, Max.: 22,6 Monate).

Es wurde die Langzeitpotenzierung bei den alten Tieren (Kontroll- und Pilocarpin-Tiere) gemessen, die kein Water Maze Training durchlaufen hatten. Hierbei zeigte sich, dass zwar tendenziell eine geringere Langzeitplastizität im chronisch, epileptischen Gewebe zu sehen war, diese jedoch weder im Zeitverlauf der auf die Ausgangswerte genormten Anstiegs-Analyse (Abb. 15A), noch im Vergleich der beiden LTP signifikante unterschiedlich zwischen den beiden Gruppen war. Die LTP der Kontrollen betrug $1,327 (\pm 0,09, n = 16)$, die der Pilocarpin-Tiere $1,181 (\pm 0,08, n = 20)$; ($p = 0,24$, t-Test, Abb. 15B).

Alte Kontroll-Tiere und alte Tiere mit chronischer Temporallappenepilepsie ohne vorheriges Lerntraining hatten in dieser Untersuchung keine signifikant unterschiedliche Langzeitpotenzierung.

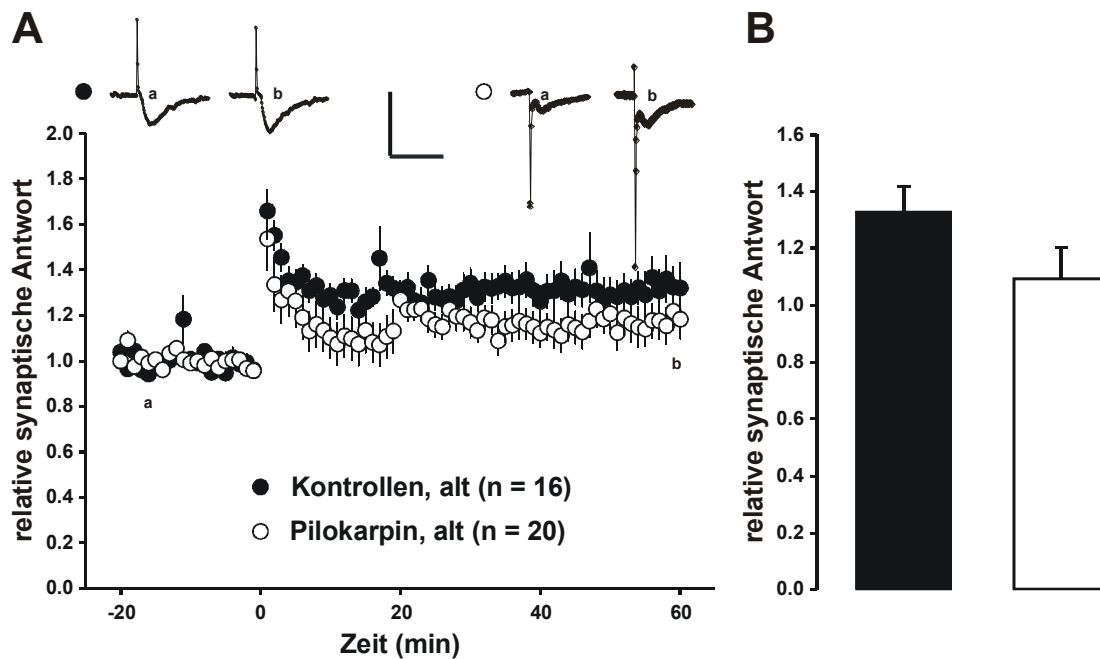


Abb. 15 Die LTP von alten Kontrollen und alten Pilocarpin-Tieren war nicht signifikant unterschiedlich.

(A) Zeitlicher Verlauf die Stärke der synaptischen Reizantwort vor und nach HFS bei alten Kontroll-Tieren (geschlossenen Kreise) und alten Pilocarpin-Tieren (offene Kreise). Die auf die Ausgangswerte normierten Kurven hatten einen sehr ähnlichen Verlauf. Der Eichwinkel für die Beispielspuren der alten Kontrolltiere entspricht 1 mV in vertikaler und 20 ms in horizontaler Richtung, während der für die Beispielspuren der alten Pilocarpin-Tiere 0,5 mV in vertikaler Richtung und ebenfalls 20 ms in horizontaler Richtung entspricht. Die Beispielspuren wurden an den mit den Kleinbuchstaben (a, b) markierten Zeitpunkten entnommen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

(B) Für die LTP bestand zwischen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied (* $p = 0,24$ im t-Test). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

Zum Vergleich wurde eine Teilmenge der gealterten Raten dem Water Maze Protokoll des zweiten Untersuchungszweiges unterzogen. Diese Tiere wurden zwei Mal im Abstand von 49 Tagen 7 Tage im Water Maze trainiert (Abb. 6).

In Abb. 16A sind die kumulativen Latenzen aller 4 Gruppen für die 7 Versuchstage des ersten Durchganges im Water Maze dargestellt.

Alte Kontroll-Tiere brauchten im Mittel an allen 7 Tagen länger um die Plattform zu finden als jungen Kontrollen. Allerdings waren die alten Kontroll-Tiere schneller beim Auffinden der Plattform, als die alten Pilocarpin-Tiere. Zwischen jungen und alten Pilocarpin-Tieren gab es keine Unterschiede in den kumulativen Latenzen am 7. Versuchstag. In Abb. 16B sind die Mediane der kumulativen Latenzen für den 7. Versuchstag dieser Gruppen aufgetragen. Für die jungen Kontrollen ergab sich ein Median von 21,5 sec (25 %: 12,0 sec, 75 % 29,0 sec, $n = 10$), im Vergleich zu 64,0 sec

(25 %: 27,0 sec, 75 %: 152,5 sec, n = 9) für die alten Kontrollen (p = 0,021, Rangsummentest). Der Vergleich der alten Kontrollgruppe (64,0 sec, 25 %: 27,0 sec, 75 %: 152,5 sec) zu den alten Pilocarpin-Tieren (213,0 sec, 25 %: 58,0 sec, 75 %: 304,5 sec) ergab im Rangsummentest einen signifikanten Unterschied von p = 0,024. Der Vergleich der jungen Pilocarpin-Tiere mit den alten Pilocarpin-Tieren ergab keinen signifikanten Unterschied (Abb. 16B).

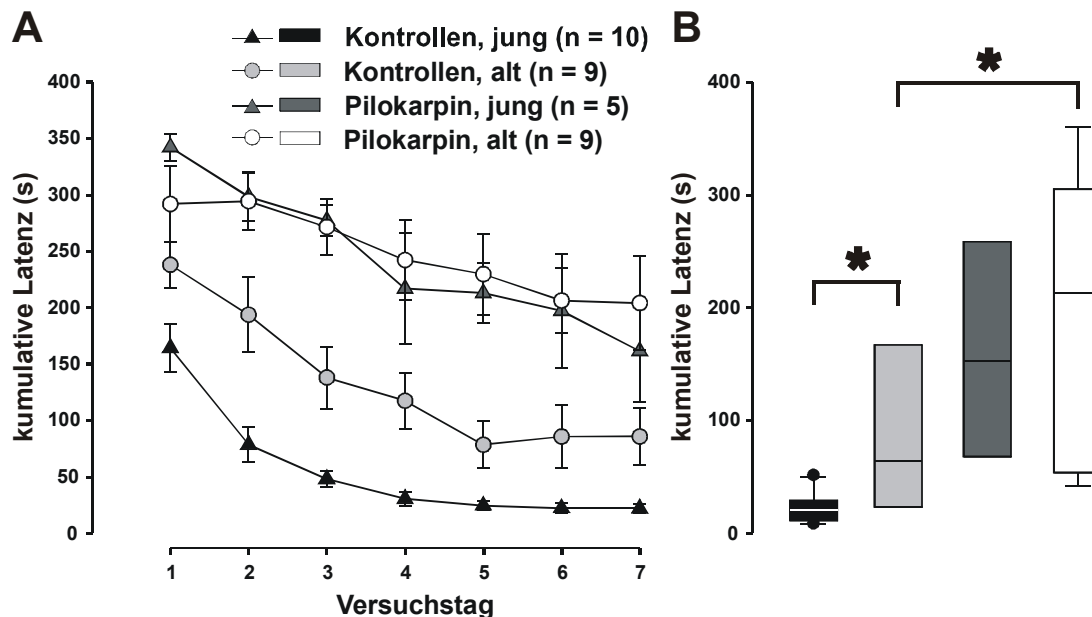


Abb. 16 Die Lernleistung im Water Maze unterschied sich zwischen jungen und alten Kontroll-Tieren signifikant. Alte Kontroll-Tiere lernten ebenfalls signifikant schneller als alte Pilocarpin-Tiere.

(A) Mittelwert der kumulativen Latenzen von jungen (schwarze Dreiecke) und alten (hellgraue Kreise) Kontroll-Tieren, sowie von jungen (dunkelgraue Dreiecke) und alten (offene Kreise) Pilocarpin-Tieren. Bei allen Tieren war ein signifikanter Lerneffekt über die sieben Versuchstage darstellbar. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

(B) Die Mediane der Summen der sechs Einzelversuche am siebten Tag unterschieden sich signifikant zwischen jungen und alten Kontroll-Tieren, nicht jedoch zwischen jungen und alten Pilocarpin-Tieren. Des Weiteren ist gab es einen signifikanten Unterschied zwischen alten Kontrollen und alten Pilocarpin Tieren (* p < 0,05 im Rangsummentest).

Auch bei diesen Gruppen wurde der Lernzuwachs der Tiere zwischen dem ersten Tag und den Mittelwerten des 5. bis 7. Tages bestimmt (Tab. 2). Der Lernzuwachs der alten Kontroll-Tiere war geringer als der der jungen Kontroll-Tiere. Der Lernzuwachs betrug bei den jungen Kontrollen im Median 11,7 %, während er bei alten Kontrollen nur 31,7 % betrug (p = 0,019, Rangsummentest nach Wilcoxon-Mann-Whitney). Der Lernzuwachs von alten Pilocarpin-Tieren war geringer, als der altern Kontroll-Tiere. Die alten Pilocarpin-Tiere verkürzten ihre mediane Latenz von 350,0 sec auf 235,0 sec

und damit im Median auf 68,32%, zu 31,7 % bei alten Kontrollen ($p = 0,024$, Rangsummentest). Wiederum konnte auch beim Vergleich von Median % zwischen der Gruppe der jungen (Median: 49,63 sec, 25 %: 38,985 sec, 75 %: 77,915 sec) und alten Pilokarpin-Tiere (Median: 68,320 sec, 25 %: 55,285 sec, 75 %: 89,075 sec) kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,505$).

	Median 1. Tag	Median 5. - 7. Tag	Median %	Signifikanz von Median %
Kontrollen, jung	160,50 sec (25 %: 96,0 sec 75 %: 233,0 sec)	20,0 sec (25 %: 15,0 sec 75 %: 30,0 sec)	11,718% (25 %: 10,417 75 %: 20,567)	Rangsummentest p = 0,019
Kontrollen, alt	228,5 sec (25 %: 214,5 sec 75 %: 265,5 sec)	71,5 sec (25 %: 38,5 sec 75 %: 99,5 sec)	31,731% (25 %: 21,348 % 75 %: 44,818 %)	
Pilokarpin, alt	350,0 sec (25 %: 215,250 sec 75 % 360,0 sec)	235,0 sec 25 %: 128,250 sec 75 %: 301,750 sec)	68,320 % (25 %: 55,285 % 75 %: 89,075 %)	Rangsummentest p = 0,024

Tab. 2 Junge Kontroll-Tiere hatten einen signifikant höheren Lernzuwachs als alte Kontrollen. Ebenso hatten alte Kontrollen einen höheren Zuwachs als alte Pilokarpin-Tiere.

Medianen Latenzzeiten für junge Kontrollen und junge Pilokarpin-Tiere für den ersten Tag im Water Maze und für den fünften bis siebten Tag. „Median %“ repräsentiert den Median der prozentualen Anteile die nach folgender Formel für jedes Tier individuell berechnet wurden: $\% = [\text{Mittelwert (kumulative Latenzen 5., 6., 7. Tag)} / (\text{kumulative Latenz 1. Tag}) * 100]$. Die prozentualen Anteile zwischen den jungen und alten Kontrolltieren ($p = 0,019$ im Rangsummentest) und zwischen den alten Kontrollen und alten Pilokarpin ($p = 0,024$ im Rangsummentest) unterschieden sich signifikant.

Zusammenfassen lässt sich feststellen, dass Alterung in gesunden Tieren zu schlechterer Lernleistung führte. Allerdings ist diese bei epileptischen Tieren, unabhängig vom Alter noch schlechter.

Die anschließend an die Water Maze Experimente durchgeführten elektrophysiologischen Untersuchungen zeigten, dass die Langzeitpotenzierung von jungen Kontrollen stärker ausgeprägt ist, als bei alten Kontrollen. Während die LTP von jungen Kontroll-Tieren $1,674 (\pm 0,153, n = 11)$ war, ergab sich für die alten Kontroll-Tiere eine LTP von $1,327 (\pm 0,0903, n = 16)$; ($p = 0,048$, t-Test, Abb. 17B).

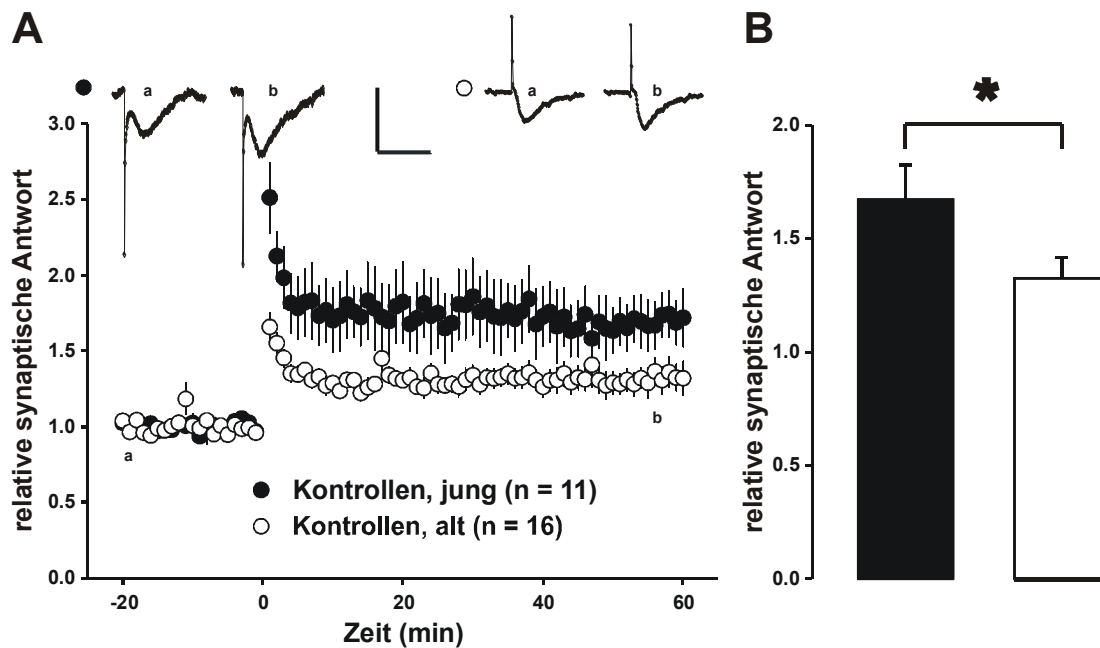


Abb. 17 Die LTP von jungen und alten Kontroll-Tieren war signifikant unterschiedlich.

(A) Relative synaptische Antwort im zeitlichen Verlauf über 20 Minuten vor, bis 60 Minuten nach HFS. Es wurden junge (geschlossene Kreise) mit alten Kontroll-Tieren (offen Kreise) verglichen. Beide Gruppen erreichten innerhalb eines kurzen Intervalls nach posttetanischer Potenzierung ein stabiles, signifikant unterschiedliches Niveau. Der Eichwinkel für die Beispielspuren entspricht 1 mV in vertikaler und 20 ms in horizontaler Richtung. Die Beispielspuren wurden an den mit den Kleinbuchstaben (a, b) markierten Zeitpunkten entnommen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

(B) Durch Alterung reduzierte sich die LTP von Kontrollen signifikant ($p = 0,048$). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

Die LTP Messungen wurden auch bei alten Pilocarpin-Tieren durchgeführt. Alte Pilocarpin-Tiere hatten im Vergleich zu jungen Pilocarpin-Tieren keine unterschiedliche Langzeitpotenzierung (Abb. 18A). Für die jungen Tiere ergab sich im arithmetischen Mittel eine LTP von $1,05 (\pm 0,179, n = 9)$, für die der alten Tiere von $1,181 (\pm 0,0821, n = 20)$; ($p = 0,45$ im t-Test, (Abb. 18B).

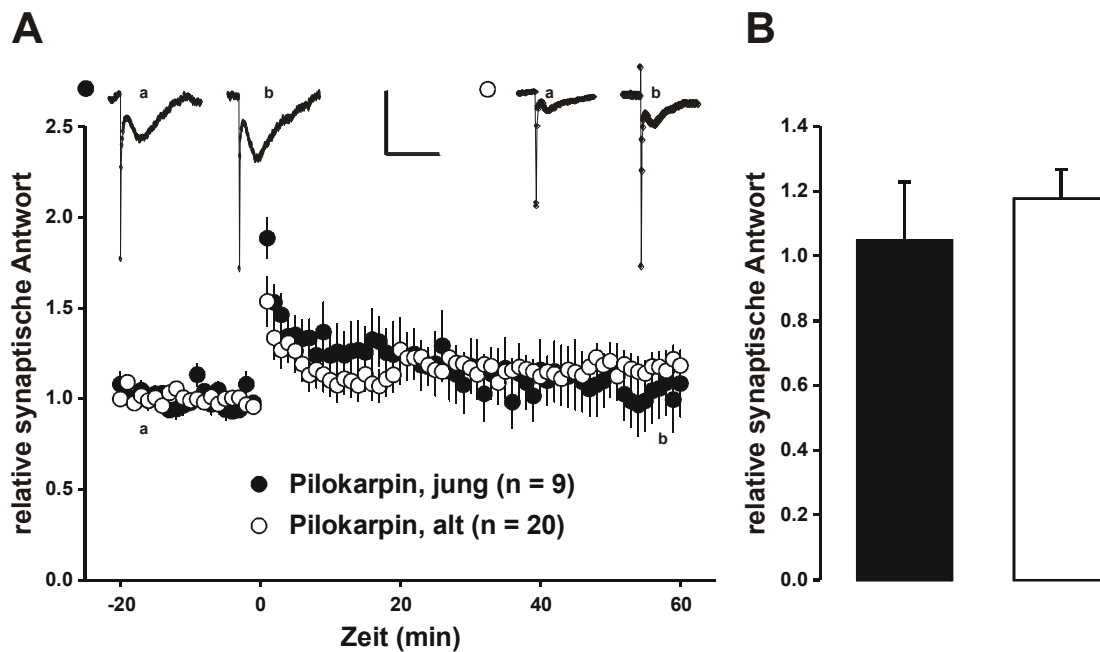


Abb. 18 Die LTP von jungen Pilocarpin-behandelten Tieren war nicht signifikant verschieden von alten Pilocarpin-behandelten Tieren.

(A) Synaptische Reizantwort vor und nach HFS bei jungen (geschlossene Kreise) und alten (offene Kreise) Ratten mit Pilocarpin-induzierter chronischer Temporallappenepilepsie. Der Eichwinkel für die Beispielspuren der jungen Pilocarpin-Tiere entspricht 1 mV in vertikaler und 20 ms in horizontaler Richtung, während der für die Beispielspuren der alten Pilocarpin-Tiere 0,5 mV in vertikaler Richtung und ebenfalls 20 ms in horizontaler Richtung entspricht. Die Beispielspuren wurden an den mit den Kleinbuchstaben (a, b) markierten Zeitpunkten entnommen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

(B) Es gab keinen signifikanten Unterschied der LTP von jungen und alten Pilocarpin-Tieren ($p = 0,45$ im t-Test). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die LTP von gesunden alten Ratten im Vergleich zu jungen gesunden Ratten signifikant geringer ausfiel. Bei Ratten mit chronischer Temporallappenepilepsie ließ sich kein Unterschied in der Langzeitpotenzierung feststellen.

3.3 Einfluss von Water Maze Training auf die Langzeitpotenzierung von alten Kontrollen und Pilocarpin-Tieren

Ziel des nächsten Abschnittes dieser Arbeit war es, den Einfluss von Water Maze Training auf die Langzeitpotenzierung von alten Tieren (Kontrollen und Ratten mit Pilocarpin-induzierter chronischer Temporallappenepilepsie) zu ermitteln. Die alten Tiere wurden im Abstand von circa 50 Tagen in zwei Durchgängen im Morris Water Maze getestet. Anschließend wurde erneut synaptische Plastizität in Form von Langzeitpotenzierung induziert.

Es fiel auf, dass die Tiere die Position der Plattform zwischen den beiden Durchgängen (im Abstand von 50 Tagen) scheinbar nicht vergaßen. Selbst der Standardfehler zwischen dem letzten Tag des ersten Durchganges und dem ersten Tag des zweiten Durchganges unterscheidet sich nicht wesentlich (Abb. 19). Auffällig war weiterhin dass beide Gruppen im zweiten Durchgang keinen nachweisbaren Lernzuwachs mehr haben.

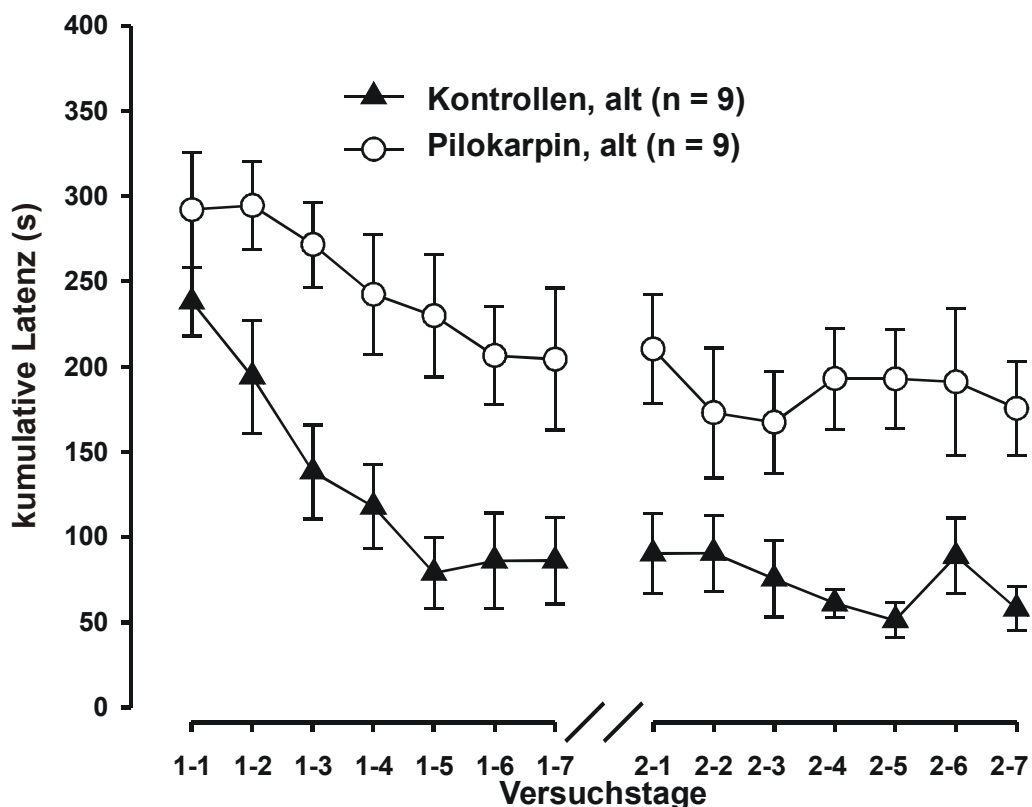


Abb. 19 Alte Kontrollen fanden über beide Durchgänge hinweg die Plattform signifikant schneller als alte Pilocarpin-Tiere.

Verlauf der kumulativen Latenzen von Versuchen im Morris Water Maze mit alten Kontroll-Tieren (schwarze Dreiecke) und alten Pilocarpin-Tieren (offene Kreise). Diese wurden in zwei Durchgängen a sieben Tage durchgeführt. Zwischen dem letzten Tag des ersten Durchganges und dem ersten Tag des zweiten Durchganges lagen im Durchschnitt 49 Tage. Die erste Zahl der Beschriftung der x-Achse steht dabei für die Nummer des Durchganges, die zweite Zahl für die Nummer des Versuchstages innerhalb des Durchganges. (Bsp.: 2-4; zweiter Durchgang, vierter Versuchstag). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

Darauf aufbauend haben wir die synaptischen Antworten von alten Kontrollen (Abb. 20) und alten Pilocarpin-Tieren (Abb. 21) nach den beiden Water Maze Durchgängen gemessen. Diese Messungen fanden, entsprechend den Versuchen bei den jungen, Tieren innerhalb von 24 h nach dem letzten Water Maze Versuch statt.

Die Langzeitpotenzierung von alten Kontroll-Tieren mit und ohne zweimaliges Water Maze Training war nicht signifikant verschieden voneinander. Bei den alten Kontrollen ergaben sich für die nicht im Water Maze getestete Gruppe eine mediane LTP von 1,254 (25 %: 1,085, 75 %: 1,472, n = 16) und für die Gruppe der alten Kontroll-Tiere mit Water Maze Behandlung eine mediane LTP von 1,354 (25 %: 1,204, 75 %: 1,589, n = 18); (p = 0,398, Rangsummentest, Abb. 20B).

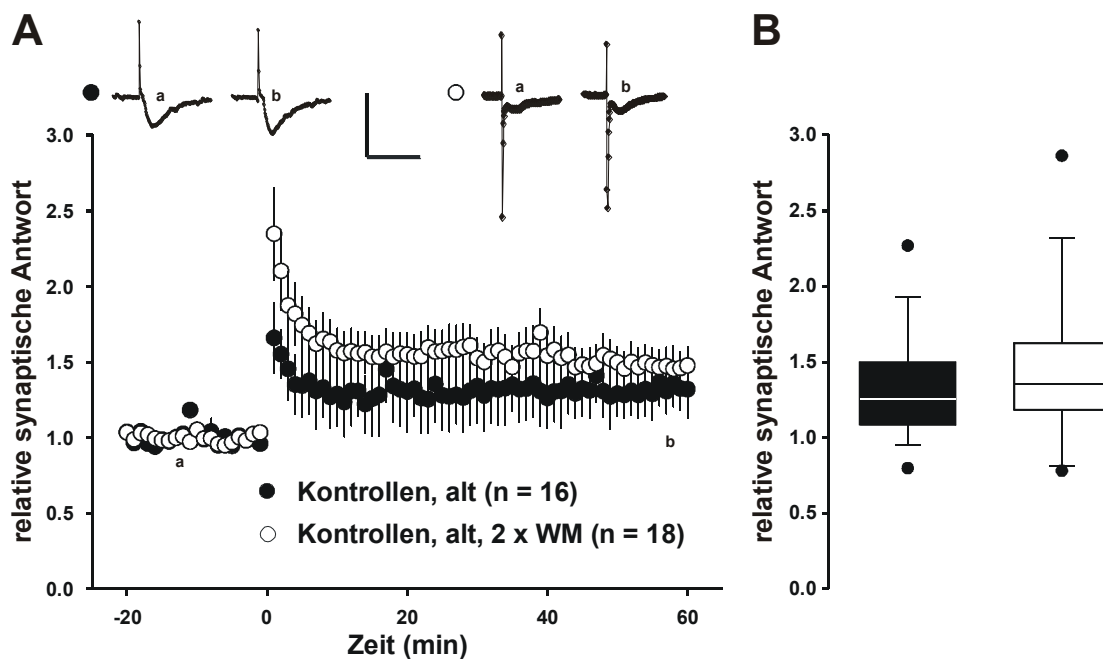


Abb. 20 Zweimaliges Water Maze hatte bei alten Kontroll-Tieren keine signifikanten Einfluss auf die LTP nach HFS.

(A) CA-1 Feldpotentiale von alten Kontroll-Tieren die entweder vorangehend 2 Durchgänge WM im Abstand von 49 Tagen erhalten hatten oder die keine Behandlung im WM erhielten. Es konnte kein signifikanter Einfluss von WM auf die LTP von alten Kontrolltieren erkannt werden. Der Eichwinkel für die Beispielspuren entspricht 1 mV in vertikaler und 20 ms in horizontaler Richtung. Die Beispielspuren wurden den mit den Kleinbuchstaben (a, b) markierten Zeitpunkten entnommen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. (B) Es gab keinen signifikanten Unterschied der LTP von alten Kontroll-Tieren durch die vorherige 2-malige WM-Behandlung (p = 0,398).

Bei den alten Tieren mit chronischer Temporallappenepilepsie war die Langzeitpotenzierung mit Water Maze Behandlung signifikant höher, im Vergleich zu den Tieren ohne Water Maze Training (Abb. 21). Der Mittelwert der LTP von alten Pilocarpin-Tieren ohne WM war 1,181 (\pm 0,0821, n = 20), während das arithmetische Mittel der Pilocarpin-Tiere mit 2-maliger Water Maze Behandlung 1,454 (\pm 0,0879, n = 13) war. Somit ergab sich im t-Test eine Signifikanz von p = 0,035 (Abb. 21B).

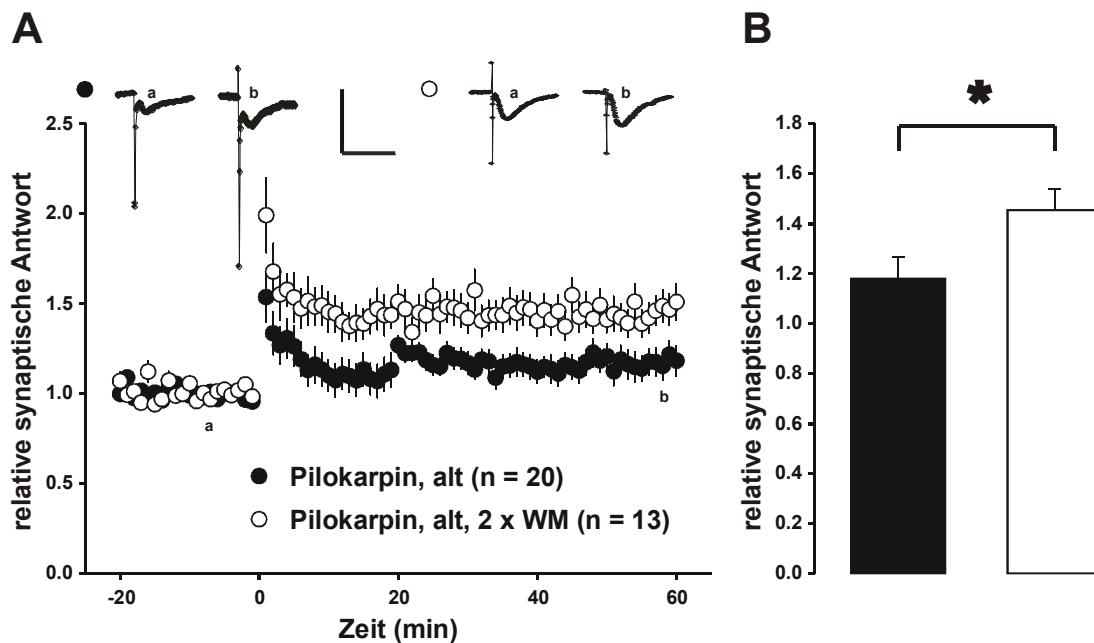


Abb. 21 Die LTP von alten Pilocarpin-Tieren die 2 Durchgänge im Morris Water Maze trainiert wurden, war signifikant erhöht im Vergleich zu alten Pilocarpin-Tieren die nicht im Morris Water Maze trainiert wurden.

(A) Auf die Ausgangswerte normierte Zeitverläufe der synaptischer Antworten bei Reizung der Hippocampi vor und nach HFS. Getestete Gruppen waren alten Pilocarpin-Tieren mit (offene Kreise) und ohne (geschlossene Kreise) WM-Behandlung. Es ist zu sehen das 2 Durchgänge Morris Water Maze die Stärke der synaptische Antwort bei alten Pilocarpin-Tieren nach HFS deutlich erhöhte. Der Eichwinkel für die Beispielspuren der alten Pilocarpin-Tiere mit WM entspricht 1 mV in vertikaler und 20 ms in horizontaler Richtung, während der für die Beispielspuren der alten Pilocarpin-Tiere ohne WM 0,5 mV in vertikaler Richtung und ebenfalls 20 ms in horizontaler Richtung entspricht. Die Beispielspuren wurden an den mit den Kleinbuchstaben (a, b) markierten Zeitpunkten entnommen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

(B) Die Durchschnittswerte die auf die Ausgangswerte genormten Anstiegs-Analyse der letzten 5 Minuten des 60-minütigen Beobachtungszeitraumes (LTP) unterschieden sich signifikant zwischen der Gruppe der alten Pilocarpin-Tieren mit ohne WM ($p = 0,035$). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

Zusammenfassend konnte in diesem Abschnitt gezeigt werden, dass weder die alten Kontroll-Tiere, noch die alten Pilocarpin-Tiere zwischen den zwei Water-Maze Blöcken die Position der Plattform vergaßen. Die Langzeitpotenzierung wurde durch das Water Maze Training bei den alten Pilocarpin-Tieren signifikant erhöht, bei den alten Kontrolltieren konnte kein Unterschied dargestellt werden.

3.4 Einfluss von D-Serin auf die Langzeitpotenzierung von alten Kontrollen und alten Pilocarpin-Tieren

Ziel dieses Versuchszweiges war es, zu testen, welchen Einfluss D-Serin auf das räumliche Lernen und die Langzeitpotenzierung im Alterungsprozess und bei chronischer Temporallappenepilepsie hat. Dazu erhielt eine Gruppe von Tieren ab dem 72. Lebensstag gewichtsadaptiert D-Serin über das Trinkwasser.

Initial haben wir in dieser Versuchsreihe den Einfluss von chronischer D-Serin Behandlung auf die LTP von alten Tieren gemessen. Dazu haben wir sowohl Kontrollen als auch Pilocarpin-Tiere, die nicht mit D-Serin behandelt wurden, mit Tieren verglichen, die eine Langzeit-D-Serin-Behandlung erhielten.

D-Serin schien die Langzeitpotenzierung von alten Kontroll-Tieren tendenziell zu erhöhen. Die LTP von alten Kontrollen betrug $1,327 (\pm 0,0903, n = 16)$, für die alten Kontroll-Tiere mit D-Serin Behandlung hingegen $1,545 (\pm 0,0991, n = 21)$. Dieses ergab, wie in der Abb. 22B zu sehen ist, nur einen nicht-signifikanten Unterschied ($p = 0,12$ im t-Test).

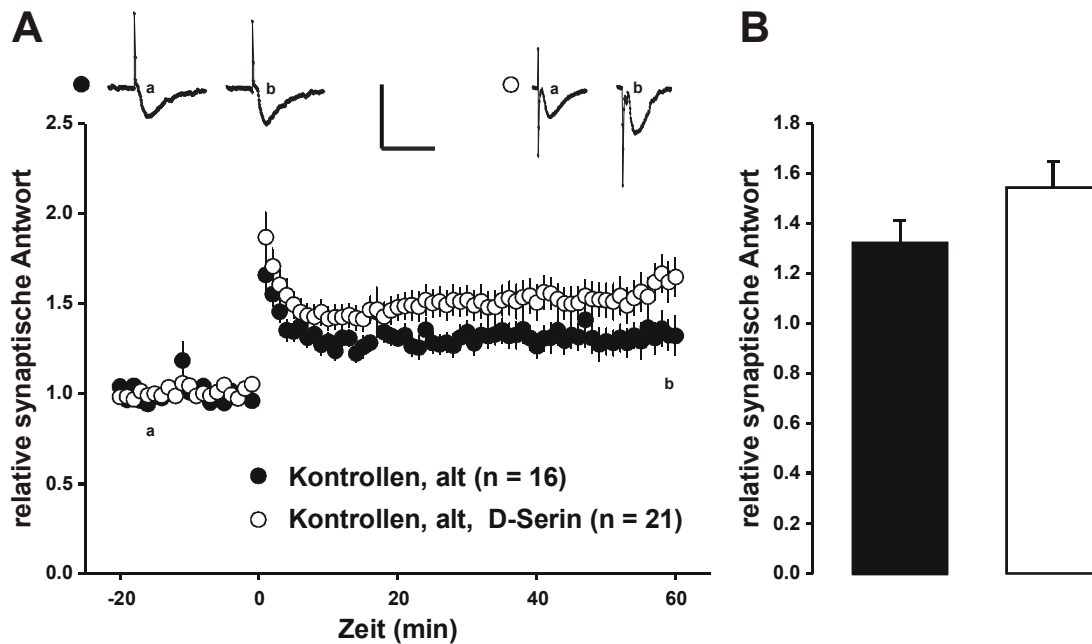


Abb. 22 Die LTP von alten Kontrollen mit D-Serin Behandlung zeigte keinen signifikanten Unterschied zu alten Kontrollen die nicht mit D-Serin behandelt wurden.

(A) Synaptische Reizantwort in einem Zeitraum von 20 Minuten vor und 60 Minuten nach HFS bei alten Kontroll-Tieren mit (offene Kreise) und ohne (geschlossene Kreise) D-Serin Langzeitbehandlung. Der Eichwinkel für die Beispielspuren entspricht 1 mV in vertikaler und 20 ms in horizontaler Richtung. Die Beispielspuren wurden den mit den Kleinbuchstaben (a, b) markierten Zeitpunkten entnommen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

(B) Es gab keinen signifikanten Unterschied in der LTP von mit D-Serin behandelten alten Kontroll-Tieren im Vergleich zu den nicht mit D-Serin behandelten ($p = 0,12$ im t-Test). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

Gleichzeitig haben wir auch die LTP von alten Pilokarpin-Tieren unter D-Serin Behandlung gemessen, um zu testen ob D-Serin einen Einfluss auf die LTP unter chronisch einwirkender Temporallappenepilepsie hat. Die Reizantwort beider Gruppen schien nahezu identisch (Abb. 23A). Die LTP im Gewebe alter Pilokarpin-behandelter Ratten ohne WM betrug $1,181 (\pm 0,0821, n = 20)$, für die Tiere mit D-Serin Behandlung $1,092 (\pm 0,110, n = 14)$; ($p = 0,52, t$ -Test, Abb. 20B).

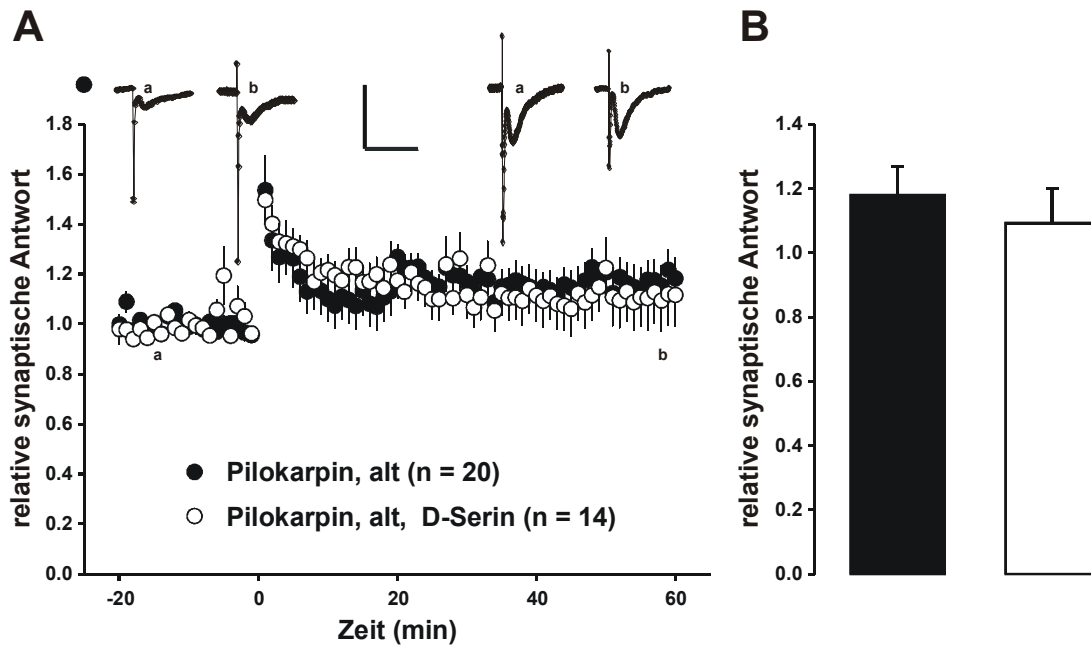


Abb. 23 D-Serin hatte keinen signifikanten Einfluss auf die synaptische Antwort von alten Pilocarpin-Tieren nach HFS.

(A) Zeitlicher Verlauf der fEPSPs und Beispielspuren für alte Pilocarpin-Tiere mit (offene Kreise) und ohne (geschlossene Kreise) D-Serin Langzeitbehandlung. Die Messungen fanden im Stratum radiatum der hippocampalen CA-1 Region statt. Der Eichwinkel für die Beispielspuren der alten Pilocarpin-Tiere entspricht 0,5 mV in vertikaler und 20 ms in horizontaler Richtung, während er für die Beispielspuren der alten Pilocarpin-Tiere mit D-Serin Behandlung 1 mV in vertikaler Richtung und ebenfalls 20 ms in horizontaler Richtung entspricht. Die Beispielspuren wurden den mit den Kleinbuchstaben (a, b) markierten Zeitpunkten entnommen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

(B) Die LTP von D-Serin behandelten alten Pilocarpin-Tieren war nicht signifikant verschieden von den nicht mit D-Serin behandelten Tieren ($p = 0,52$ im t-Test). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

Zusammenfassend bleibt an dieser Stelle festzuhalten, das D-Serin weder bei Kontroll-Tieren, noch bei Pilocarpin-Tieren einen nachweisbaren Einfluss auf die synaptische Plastizität hatte. Allerdings schien D-Serin bei Kontroll-Tieren die Fähigkeit zu besitzen die LTP, wenn auch nicht signifikant, zu erhöhen.

Die Experimente im Morris Water Maze unter dauerhafter D-Serin Gabe dienten dazu, zu testen, ob D-Serin die durch Alter oder Epilepsie verschlechterte Lernfähigkeit der Ratte verbessern oder gar normalisieren kann. Dazu wurden diese Tiere zwei Durchgänge im Abstand von 49 Tagen im Morris Water Maze trainiert.

Wie in Abb. 24 zu sehen ist, hatte D-Serin weder auf die alten Kontrolltiere, noch auf die alten Pilocarpin-Tiere einen signifikanten Einfluss. Im Gegenteil scheint es bei alten Kontrollen tendenziell so zu sein, dass D-Serin die Lernleistung im Water Maze verringert (Abb. 24A).

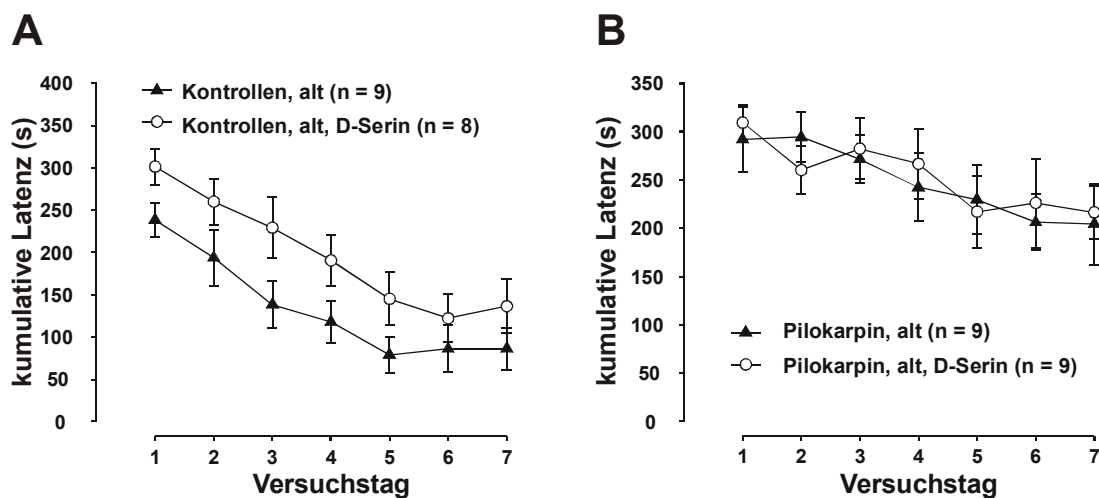


Abb. 24 Langzeitbehandlung mit D-Serin hat weder bei alten Kontroll-Tieren, noch bei alten Pilocarpin-Tieren einen signifikanten Einfluss auf die Leistung im Morris Water Maze.

(A) Die kumulative Latenz an den sieben Versuchstagen des ersten Durchganges im Morris Water Maze von alten Kontroll-Tieren mit (offene Kreise) und ohne (schwarze Dreiecke) D-Serin Langzeitbehandlung unterschied sich nicht signifikant. Tendenziell schien D-Serin die kumulativen Latenzen sogar zu erhöhen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

(B) Ebenso gab es keinen signifikanten Unterschied dieser Größe bei alten Pilocarpin-Tieren mit (offene Kreise) und ohne (schwarze Dreiecke) D-Serin Langzeitbehandlung. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

In Abb. 25 sind die kumulativen Latenzen der Morris Water Maze Versuche von den mit D-Serin behandelten alten Tieren über beide Durchgänge aufgetragen. Man kann zum einen erkennen, dass die Tiere zwischen den beiden Durchgängen scheinbar die Position der Plattform nicht vergaßen. Zum anderen ist zu sehen, dass beide Gruppen im zweiten Durchgang keinen wesentlichen Lernzuwachs hatten. Vielmehr scheint es, dass ein Plateau für die Lernleistung ab dem 5. bzw. 6. Tag des ersten Durchganges erreicht wurde. Dieses Ergebnis unterschied sich auch nicht von den in Abb. 19 dargestellten Ergebnissen. In Abb. 19 wurden die gleichen Gruppen ohne D-Serin Behandlung dargestellt. Es bleibt festzuhalten, dass D-Serin keinen erkennbaren Einfluss auf die Performance alter Ratten im Morris Water Maze hatte.

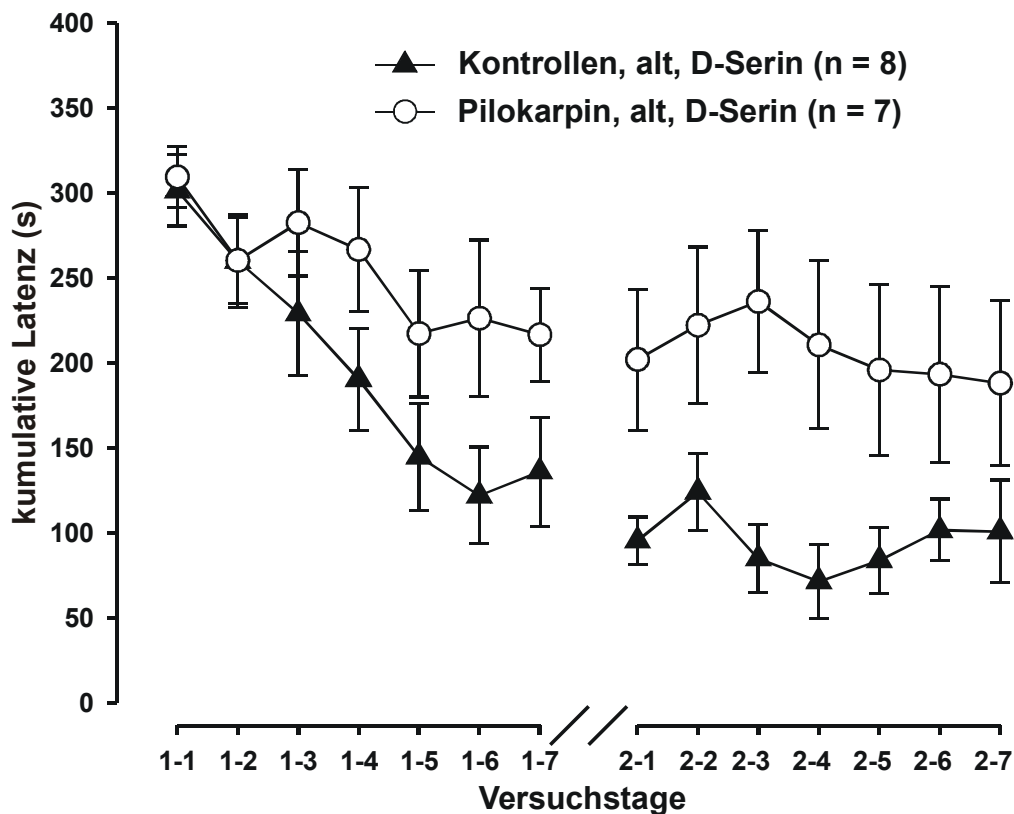


Abb. 25 Weder die mit D-Serin behandelten alten Kontroll-Tieren (schwarze Dreiecke), noch die mit D-Serin behandelten alten Pilocarpin-Tieren schienen die Position der Plattform in den 49 Tagen zwischen den beiden Durchgängen zu vergessen. Es gibt in beiden Gruppen keinen Lernzuwachs im zweiten Durchgang.

Verlauf der kumulativen Latenzen von Versuchen im Morris Water Maze mit alten Kontroll-Tieren (schwarze Dreiecke) und alten Pilocarpin-Tieren (offene Kreise), welche jeweils mit ab dem 75. Lebenstag mit D-Serin behandelt wurden. Diese wurden in zwei Durchgängen a sieben Tage durchgeführt. Zwischen dem letzten Tag des ersten Durchganges und dem ersten Tag des zweiten Durchganges lagen ungefähr 50 Tage. Die erste Zahl der Beschriftung der x-Achse steht dabei für die Nummer des Durchganges, die zweite Zahl für die Nummer des Versuchstages innerhalb des Durchganges. (Bsp.: 2-4; zweiter Durchgang, 4 Versuchstag). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

Wir konnten in den Verhaltensexperimenten keinen Einfluss von D-Serin auf die kognitive Leistungsfähigkeit innerhalb unserer Versuchsanordnung nachweisen. Allenfalls schien D-Serin die Leistungen von alten Kontroll-Tieren im Morris Water Maze zu reduzieren.

Im letzten Abschnitt der Versuche mit D-Serin wurde nun noch die LTP der Tiere nach 2-maliger Durchführung des Morris Water Maze Protokolls getestet. Dafür wurden, wie schon in anderen Abschnitten dieser Arbeit innerhalb von 24 h nach Durchführung des letzten Water Maze Versuches die synaptische Antworten vor und nach Hochfrequenzstimulation (1 sec, 100 Hz bei doppelter Reizstromstärke) gemessen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 26 und Abb. 27 dargestellt.

Abb. 26A zeigt den Zeitverlauf der EPSPs von alten Kontrolltieren mit 2-maliger Water Maze Behandlung, welche entweder D-Serin erhielten oder nicht. Am Verlauf konnte man erkennen, dass kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen bestand. Abb. 26 zeigt, dass die beiden LTP Bestimmungen mit $1,462 (\pm 0,121, n = 18)$ für Tiere ohne D-Serin und mit $1,481 (\pm 0,140, n = 22)$ für Tiere mit D-Serin nahezu identisch waren.

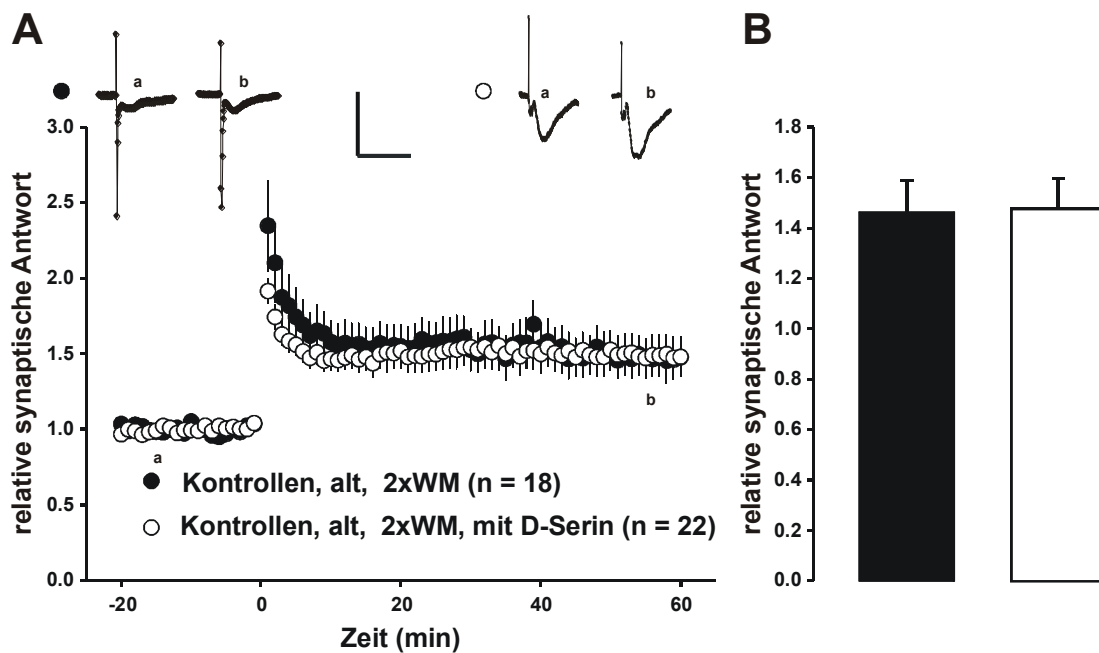


Abb. 26 Auf die Reizantwort der Schaffer-Kollateral-CA-1 Synapsen von alten Kontroll-Tieren nach zweimaligem WM hatte D-Serin keinen signifikanten Einfluss.

(A) Zeitlicher Verlauf der synaptischen Antwort von alten Kontrollen, welche zwei Durchgänge im Water Maze absolviert hatten. Die Kurve mit den offenen Kreisen zeigt dieses für Tiere die mit D-Serin behandelt wurden, während die Kurve mit den geschlossenen Kreisen die unbehandelten Tiere zeigt. Der Eichwinkel für die Beispielspuren entspricht 1 mV in vertikaler und 20 ms in horizontaler Richtung. Die Beispielspuren wurden den mit den Kleinbuchstaben (a, b) markierten Zeitpunkten entnommen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

(B) Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

Eine ähnliche Konstellation ergab sich für alte Pilocarpin-Tiere mit 2-maligem Training im Morris Water Maze (Abb. 27). Auch hier konnte weder im Verlauf der synaptischen Antworten über die Zeit (Abb. 27A), noch für die LTP (Abb. 27B) ein durch die D-Serin Behandlung verursachter Unterschied gesehen werden.

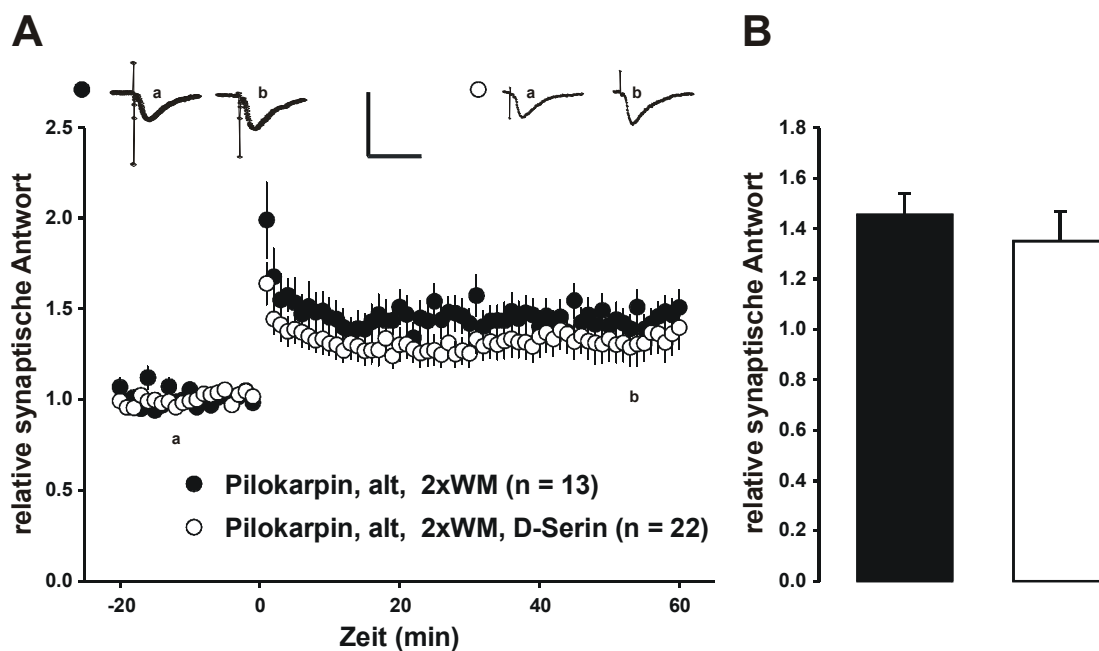


Abb. 27 D-Serin hatte keinen signifikanten Einfluss auf die synaptische Antwort von alten Pilokarpin-Tieren nach 2 Versuchsdurchgängen im Morris Water Maze.

(A) Zeitverlauf der fEPSPs vor und nach HFS von alten Pilokarpin-Tieren nach zwei Durchgängen Morris Water Maze. Verglichen werden D-Serin behandelte (offene Kreise) mit nicht D-Serin behandelten (geschlossene Kreise) Tieren. Der Eichwinkel für die Beispielspuren entspricht 1 mV in vertikaler und 20 ms in horizontaler Richtung. Die Beispielspuren wurden den mit den Kleinbuchstaben (a, b) markierten Zeitpunkten entnommen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

(B) Es gab keinen signifikanten Unterschied in der LTP beider Gruppen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

Zusammenfassen lässt sich an dieser Stelle festhalten, das D-Serin keinen nachweisbaren Einfluss auf die Ausprägung der Langzeitpotenzierung bei Ratten nach Training im Morris Water Maze hatte. Dieses trifft auf Kontroll-Tiere und Pilokarpin-Tiere im gleichen Maße zu.

4 Diskussion

4.1 Material und Methoden

4.1.1 Water Maze

Die Versuche im Morris Water Maze werden von einer Vielzahl von äußeren Faktoren beeinflusst. Die Übersichtartikel von Brandeis et al. (1989) und D'Hooge et Deyn (2001) nennen einige dieser Faktoren. So kann das Geschlecht der Tiere, das Alter oder der Tierstamm eine Rolle spielen. Zusätzlich zu diesen Faktoren spielen auch Ernährungsfaktoren, das Gewicht und die physische Entwicklung für die Schwimgeschwindigkeit eine entscheidende Rolle (Wenk, 2004). Wir haben diese Parameter bei allen Tieren sorgfältig überwacht und dokumentiert. Außerdem haben wir auf eine konstante Wassertemperatur, geringe Geräuschentwicklung in der Umgebung und annähernd gleiche Tageszeiten für die Versuche im Water Maze geachtet. Trotz allem kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese oder andere Faktoren, zum Beispiel die Sehfähigkeit der Tiere, eventuelle Probleme mit dem Herz- Kreislaufsystem, dem Muskuloskelettsystem oder auch die Motivation der Tiere eine Rolle gespielt haben. Den Einfluss dieser Faktoren könnte man dadurch minimieren, dass man andere Testanordnungen zum räumlichen Lernen benutzt, wie zum Beispiel das Radial-Arm-Maze oder T-Maze. Allerdings haben auch diese Tests ihre spezifischen Anwendungsgebiete und Nachteile (Wenk, 2001).

Unabhängig von diesen Einflussfaktoren bleibt festzuhalten, dass das Water Maze eine der am weitesten verbreiteten und anerkanntesten Methoden ist, das räumliche Lernen und das räumliche Gedächtnis unter verschiedenen Bedingungen zu testen (Sutherland et al., 1989; Brandeis et al., 1989; D'Hooge et Deyn, 2001; Sharma et al., 2010).

4.1.2 Elektrophysiologische Ableitungen

Die Ableitung extrazellulärer, postsynaptischer Potentiale gilt seit der Erstbeschreibung durch Bliss et Lomo (1973) und Bliss et Gardner-Medwin (1973) und der Vielzahl von nachfolgenden Untersuchungen als das Wahrscheinlichste und das am bestuntersuchte zelluläre Korrelat von Lernen und Gedächtnis (Bliss et Collingridge, 1993; Abel et al., 1997; Malenka et Nicoll, 1999; Martin et al., 2000; Lynch, 2004). Die letzten 40 Jahre wissenschaftlicher Forschung haben dieses sich aus der Hebb'schen Hypothese entwickelte Bild zwar grundsätzlich bestätigt, uns allerdings auch einen sehr viel differenzierteren Blick auf die Repräsentation von Gedächtnis durch Langzeitpotenzierung gegeben. So ist heute klar, dass es keine eindeutige und direkte Korrelation zwischen der einfachen Auslösung von LTP *in vitro* und *in vivo* Lernen und Gedächtnis gibt. Vielmehr scheint es wahrscheinlich, dass es eine Reihe von verschiedenen Formen und Unterformen von synaptischen Veränderungen (LTP, LTD) gibt, welche Anteil an Lern- und Gedächtnisprozessen haben. So gilt es bis heute nur als sehr wahrscheinlich, aber nicht als eindeutig bewiesen, dass synaptische Potenzierung in natürlichen *in vivo* Lernprozessen eine Rolle spielt. Zum anderen ist weiterhin unklar, welche molekularen Mechanismen auf Ebene der Synapse und welche Mechanismen in den spezifischen Netzwerken *in vivo* notwendig sind um spezifische synaptische Veränderungen auszulösen (Hölscher, 1999; Martin et al., 2000; Martin et Morris, 2002; Lynch, 2004; Baudry et al., 2011). Es scheint, dass der Ort der Messung, die dem Stimulationsprotokoll zugrunde liegenden Mechanismen und der spezifische Gedächtnistyp, sowie die Art der gespeicherten Informationen in einem sehr spezifischen Verhältnis zueinander zu stehen. Dieser komplexe Zusammenhang scheint dafür verantwortlich zu sein, dass es schwierig ist *in vivo* Lernprozesse, *in vitro* als synaptische Potenzierung nachzuweisen.

Wir haben unsere Methoden (unter anderem Reizort, Stimulationsprotokoll) unter Berücksichtigung aktueller Literatur gewählt. (Habib et Dringenberg, 2010; Kumar, 2011).

Trotzdem bleibt insgesamt unklar, inwiefern es möglich ist durch artifizielle Messungen der Langzeitpotenzierung in einer spezifischen Hirnregion *in*

vitro, *in vivo* relevante Effekte zu beobachten. Ein kausaler Zusammenhang ist mit den durchgeführten Experimenten sicher nicht zu beweisen.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Water Maze und LTP bei jungen Tieren

Im ersten Untersuchungszweig haben wir den Einfluss von Morris-Water-Maze Experimenten auf die Langzeitpotenzierung junger Wistar-Ratten untersucht. Hierbei zeigte sich, dass junge Ratten mit Pilocarpin-induzierter Epilepsie eine signifikant geringere Langzeitpotenzierung nach *in vitro* Hoch-Frequenz-Stimulation ausbilden, als gesunde Ratten im selben Alter (Abb. 11). Zudem konnte ebenfalls gezeigt werden, dass epileptische Tiere eine deutlich schlechtere räumliche Lernfähigkeit im Morris Water Maze aufweisen, als nicht epileptische Tiere (Abb. 12, Tab. 1). Somit scheint die Pilocarpin-induzierte chronische Temporallappenepilepsie bei Ratten sowohl *in vivo* das räumliche Lernvermögen zu reduzieren, als auch *in vitro* die Fähigkeit zu verringern, synaptische Plastizität auszubilden.

Zu den *in vitro* Messungen der synaptischen Plastizität nach *in-vivo*-Induktion gibt es bisher nur wenige Untersuchungen in der Literatur (Arida et al., 2004, Avchalumov et al., 2011). Die Ergebnisse der hier durchgeführten Lernexperimente, entsprechen im Wesentlichen den Befunden aus Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen mit Tieren (Hattiangady et al., 2011; Inostroza et al., 2011).

Auch an Menschen konnte gezeigt werden, dass eine chronische Temporallappenepilepsie die Fähigkeit zum räumlichen Lernen negativ beeinflusst (Dige et Wik, 2001; Cánovas et al., 2011).

Ein offenbar schwierig darzustellendes und in der Literatur deshalb noch nicht so häufig beschriebenes Ergebnis ist der Nachweis von *in vivo* Einflüssen auf die *in vitro* messbare synaptische Potenzierung (Martin et Morris, 2002; Artola et al., 2006; Eckert et al., 2010). Dafür werden unter anderem die Genauigkeit der Meßmethode, sowie das Verständnis über die physiologisch verantwortlichen Prozesse verantwortlich gemacht. Abb. 13 zeigt das Ergebnis eines solchen Experiments, bei dem *in vivo* Lernen im

Morris Water Maze die LTP in der CA1 Region *in vitro* verändert hat. Die Signifikanz dieses Befundes ist allerdings bei der insgesamt geringen Menge an eigenen und fremden Daten aktuell noch schwer zu evaluieren. Die Schwächen der hier durchgeführten Experimente liegen darin, dass unklar bleibt, in welchem Ausmaß der beobachtete Effekt ein Resultat von räumlichen Lernen ist, beziehungsweise in welchem Ausmaß er möglicherweise aktivitätsabhängig ist. Für diese Differenzierung wären weitere Experimente, zum Beispiel mit einer sichtbaren Plattform im Water Maze oder Radial Maze Experimente notwendig. Zudem sollte ein Paradigma entwickelt werden, welches aus rein physischer Aktivität besteht, ohne eine räumliche Lernkomponente zu umfassen. Die Schwierigkeiten anderer Arbeitsgruppen überhaupt einen Effekt nachzuweisen (z.B. Eckert et al., 2010) könnte daraufhin deuten, dass hier ein relevanter Effekt gemessen wurde.

Einen Einfluss von Water Maze Training auf die LTP von jungen, chronisch epileptischen Ratten nach Hoch-Frequenz-Stimulation konnten wir nicht nachweisen (Abb. 14). Dieses Ergebnis könnte ein Hinweis darauf sein, dass eine dauerhafte, signifikante LTP Veränderung nur dann zu erwarten ist, wenn die Fähigkeit zum räumlichen Lernen noch erhalten ist.

4.2.2 Water Maze und LTP bei alten Tieren

In diesem Untersuchungszweig wurde der Einfluss des Alterungsprozesses auf die räumliche Lernfähigkeit untersucht.

Es zeigte sich, dass alte Ratten ohne Epilepsie sowohl bei den *in vivo* Lernversuchen im Water Maze signifikant langsamer lernen als junge Vergleichstiere und als auch dass sie eine signifikant niedrigere Langzeitpotenzierung nach Hoch-Frequenz-Stimulation haben.

Der Vergleich von jungen und alten *epileptischen* Tieren ergibt in keinen der beiden Parameter einen signifikanten Unterschied.

In der Literatur ist dieser Zusammenhang für gesunde Tiere, als auch für Menschen umfänglich beschrieben (siehe Review von Moffat, 2009; Kumar, 2011). Die verminderte kognitive Leistungsfähigkeit im Allgemeinen, sowie die verminderte Fähigkeit zum räumlichen Lernen im Speziellen, werden zu

einem großen Teil beim Tier und beim Menschen auf die Atrophie beteiligter Hirnstrukturen zurückgeführt. Atrophien findet man zum Beispiel im Hippocampus, im präfrontalen Kortex und in mit diesen Regionen assoziierten Hirnstrukturen (Moffat et al., 2007; Antonova et al., 2009; Moffat, 2009).

Über die Mechanismen hingegen, die der verringerten Fähigkeit zur Ausbildung einer LTP im Alter zugrunde liegen, wird noch viel spekuliert. Gesichert scheint, dass die Signalwege und Mechanismen zur Auslösung der LTP intakt sind. Experimente verschiedener Arbeitsgruppen weisen darauf hin, dass die Schwelle zum Auslösen einer LTP erhöht ist (Landfield et al., 1978; Norris et al., 1996; Foster et Kumar, 2007; Kumar et al., 2007). Diese Verschiebung der Schwelle scheint zum Teil durch eine verminderte postsynaptische Depolarisation ausgelöst zu werden. Es scheint zu einer Veränderung in den Regulierungsmechanismen zum Auslösen der synaptischen Erregbarkeit zu kommen (Kumar et al., 2007). Als Ursache wurde unter anderem eine verminderte NMDA-Rezeptor Antwort bei alten Tieren gefunden. Diese wird, wie in der Einleitung beschrieben, zum Teil durch eine durch oxidativen Stress ausgelöste verminderte Aktivität der Serin Racemase begründet (Barnes et al., 1997; Billard et Rouaud, 2007; Bodhinathan et al., 2010).

Auf der anderen Seite haben die Experimente keine Unterschiede im Lernverhalten oder der Langzeitpotenzierung zwischen jungen und alten Tieren mit Pilocarpin-induzierter chronischer Temporallappenepilepsie gezeigt. Zu diesen Parametern gibt es für Tiere bis heute keine aussagekräftigen Studien in der Literatur. Bei den *in vivo* Experimenten im Water Maze spielt wahrscheinlich die schlechte Ausgangsperformance der jungen Tiere eine Rolle, welche im Rahmen unserer Testparameter kaum eine signifikante Verschlechterung zugelassen hätte. Allerdings sind solche Langzeitverläufe mit Verschlechterung der kognitiven Funktion bei Menschen mit chronischer Temporallappenepilepsie hinreichend beschrieben (Stefan et Pauli, 2002; Sutula, 2004). Bemerkenswert ist, dass der *in vivo* Befund zu den *in vitro* erhobenen Daten der postsynaptischen Langzeitpotenzierung passt. Auch hier gibt es keinen Unterschied in der Fähigkeit eine stabile LTP nach Hoch-Frequenz-Stimulation auszubilden.

Viele Studien konnten einen positiven Effekt von körperlicher Bewegung sowohl auf *in vivo* Parameter wie Anfallshäufigkeit und Stoffwechselaktivität, als auch auf *in vitro* Befunde in elektrophysiologischen Untersuchungen, wie die Spikehäufigkeiten bei extrazellulären Ableitungen, nachweisen (Cordova, 1993; Arida et al., 2004; Scorza et al., 2009). Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Water Maze Training von alten Tieren (Kontrolltiere, epileptische Tiere) einen Einfluss auf die Leistung in einem zweiten zeitlich versetzten Water Maze Versuch hat. Darüber hinaus ging es darum zu testen, ob es einen Einfluss von zweimaligem Water Maze auf die LTP von alten Tieren gibt. Wie in Abb. 19 zu sehen ist, finden alte Kontrolltiere im Vergleich zu Pilocarpin-behandelten Tieren die Plattform zwar über alle Versuche schneller und haben auch einen größeren Lernzuwachs. Allerdings ist durch ein zweites Training kein zusätzlicher positiver Effekt auf die Leistung im Morris Water Maze darstellbar. Es scheint eher so, dass weder die Kontroll- noch die epileptischen Tiere in der 49 Tage dauernden Trainingspause die Position der Plattform vergessen und auch kein zusätzliches Verbesserungspotential mehr vorhanden ist. Die Ergebnisse zeigen, dass bereits nach dem 5. Trainingstag des ersten Durchgangs für beide Gruppen eine Sättigung erreicht ist, von dem aus keine Verbesserungen möglich sind. Dies kann zum einen daran liegen, dass der Zeitraum zwischen den beiden Versuchen nicht lang genug war, um ein Vergessen der Position zu erreichen. Zum anderen scheint für den Durchschnitt der Tiere das Potential noch detaillierter räumlich zu lernen, erschöpft. In der Gruppe der alten Kontrolltiere gab es zwar individuelle Tiere, welche mit ihrer Leistung in die Nähe der Zeiten junger Tiere heranreichten. Im Durchschnitt ist der Unterschied der kumulativen Latenz junger und alter Kontrolltiere allerdings deutlich signifikant verschieden voneinander.

In den ersten Experimenten konnten wir einen Einfluss von einmaligem Water Maze Training auf die LTP junger Kontrollen nachweisen. Allerdings gelang kein Nachweis eines Einflusses auf die LTP junger Pilocarpin-behandelter Tiere. In dieser Versuchsreihe haben wir nun den Einfluss eines zweimaligen Water Maze Trainings auf die LTP alter Kontrollen und alter epileptischer Tiere untersucht. Hierbei zeigte sich, dass

ein solches Trainingsparadigma keinen signifikanten Einfluss auf die LTP alter Kontrolltiere hat (Abb. 20), allerdings die LTP von alten Tieren mit chronischer Temporallappenepilepsie signifikant erhöht (Abb. 20). Untersuchungen von Arida et al. (u.a. 2004, 2010) konnten bei Ratten mit chronischer Temporallappenepilepsie sowohl eine reduzierte Anfallshäufigkeit *in vivo* durch aerobes Training nachweisen, als auch extrazelluläre, elektrophysiologische und morphologische Veränderungen in der CA1 Formation des Hippocampus zeigen. Der positive Effekt von physischer und kognitiver Aktivität auf die Anfallshäufigkeit konnte auch beim Menschen nachgewiesen werden (Cordova, 1993; Scorza et al., 2009). Insgesamt ist die Studienlage zur Verringerung der epileptischen Aktivität durch Lerntraining im Alter noch sehr überschaubar, so dass wir aus unseren Daten nicht mit Sicherheit ableiten können, ob die Erhöhung der synaptischen Plastizität nach zweimaligem Water Maze Training ein Effekt der physischen Aktivität oder des Trainings der räumlichen Lernfähigkeit ist. Gerade vor dem Hintergrund, dass das gleiche Trainingsparadigma bei alten, gesunden Ratten keinen Einfluss auf die Langzeitpotenzierung hat, macht deutlich, dass hier weitere Untersuchungen, zum Beispiel der NMDA-Rezeptorfunktion und -steuerung notwendig sind.

4.2.3 Water Maze und LTP bei alten Tieren unter D-Serin Behandlung

Als einen Ansatzpunkt zur Behandlung der von beobachteten Verringerung der räumlichen Lernfähigkeit durch Alterungsprozesse und durch chronische Temporallappenepilepsie, haben wir die therapeutische Langzeitgabe von D-Serin und deren Einfluss auf die Performance im Water Maze und auf die Langzeitpotenzierung untersucht. Hier konnte leider keinen positiven Einfluss von D-Serin auf die Lernleistung im Water Maze von sowohl alten, nicht epileptischen Ratten, als auch alten, epileptischen Tieren nachgewiesen werden (Abb. 24). Entsprechende Vorversuche aus unserer eigenen Arbeitsgruppe deuten daraufhin das D-Serin über kurze Zeit und in höherer Dosierung appliziert einen signifikanten Effekt auf die Lernleistung im Water Maze und die Langzeitpotenzierung haben kann. Das dieser Befund mit einer niedrigdosierten Langzeittherapie nicht wiederholt werden konnte, kann mit

der niedrigeren Dosis zusammen hängen. Wir haben die Dosis entsprechend eigener Daten und in der Literatur besprochenen Dosierungen angepasst (Orozca-Ibarra et al., 2007; Krug et al., 2007). Insofern könnten auch erst längerfristig wirksame metabolische Anpassungsprozesse im Sinne einer Tachyphylaxie eine Rolle spielen. Vorstellbare Mechanismen wären eine Veränderung der Rezeptordichte, sowie ein erhöhter Abbau durch angebotsinduzierte Enzymregulation.

In einem letzten Schritt haben wir untersucht, ob die Langzeitgabe von D-Serin einen Einfluss auf die LTP ohne (Abb. 26) und mit Water Maze Training (Abb. 27) hat. Auch bei dieser Untersuchung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen festgestellt werden. Wir hatten erwartet, dass es nach chronischer D-Serin Gabe zu langfristigen strukturellen Veränderungen in der Rezeptorarchitektur kommt, welche man in Form von unterschiedlicher LTP Ausprägung messen kann. Dieses Resultat konnten Haxaier et al. (2012) in einem anderen Experiment nachweisen. Die Arbeitsgruppe hatte gezeigt, dass die D-Serin abhängige Aktivierung des NMDA-Rezeptors bei alten Tieren reduziert ist und dass dieser Mechanismus einen großen Einfluss auf die durch Alterungsprozesse ausgelöste verminderte synaptische Plastizität in der CA1 Region des Hippocampus hat. Diese Effekte konnten durch exogenes D-Serin, beziehungsweise durch eine Langzeitapplikation von N-Acetyl-L-Cystein als reduzierendes Agens verringert werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Langzeitapplikation von N-Acetyl-L-Cystein den zugrundeliegenden Mechanismus der geringeren D-Serin Konzentrationen, nämlich die verminderte Aktivität der D-Serin Racemase aufhebt (Haxaire et al., 2012).

Diese Ergebnisse zeigen vor dem Hintergrund unserer Ergebnisse, dass es scheinbar effektiver ist die körpereigene Homöostase im D-Serin Stoffwechsel wieder herzustellen als D-Serin exogen zuzuführen.

5. Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war es, dass Ausmaß und die Einflüsse sowohl des Alterungsprozesses, als auch von chronischer Temporallappenepilepsie auf die Lernfähigkeit *in vivo* und die synaptische Plastizität *in vitro* zu ermitteln. Zudem sollte mit einer niedrig dosierten D-Serin Dauertherapie ein Ansatz getestet werden, therapeutisch Einfluss auf die verminderte Leistungsfähigkeit zu nehmen.

Die in dieser Arbeit verwendete Methode war in der Lage zu erwartende Befunde sowohl bei der Lernfähigkeit, als auch bei der Ausbildung postsynaptischer Potentiale sicher darzustellen und zu reproduzieren. Speziell fand sich darunter die verringerte Leistungsfähigkeit zum räumlichen Lernen im Alter und die verringerte Induzierbarkeit von synaptischer Plastizität. Deshalb ist nicht von einem grundsätzlichen Fehler der Methodik auszugehen.

Es ist allerdings nicht gelungen, einen eindeutigen kausalen Zusammenhang zwischen der Fähigkeit zum räumlichen Lernen und der Induzierbarkeit von LTP herzustellen. Außerdem hatte das verwendete Protokoll zur D-Serin Therapie keinen signifikanten Einfluss auf die Lernfähigkeit im Morris Water Maze und die Fähigkeit synaptische Plastizität nach Hoch-Frequenz-Stimulation auszubilden.

Es wird in zukünftigen Experimenten darum gehen, neben den in dieser Arbeit kontrollierten Einflussfaktoren, wie dem Alter, der chronischen Erkrankung, der Medikation, dem Trainingsprotokoll und den äußeren Rahmenbedingungen, weitere Einflussfaktoren zu identifizieren. So wird man zum Beispiel den Einfluss der körperlichen Leistungsfähigkeit unter chronischer Temporallappenepilepsie und den Einfluss von körperlicher Aktivität im Allgemeinen auf die Lernfähigkeit und die LTP genauer untersuchen müssen. Dazu könnte man zum Beispiel mit anderen Lern- und Trainingsprotokollen arbeiten, durch die man verschiedene Aspekte, wie den körperlichen Fitnesszustand, die Sehfähigkeit oder die Fähigkeit Informationen aus dem Kurz- ins Langzeitgedächtnis zu übertragen genauer kontrolliert. Des Weiteren könnten durch ein intensiveres Verhaltensmonitoring andere Aspekte zum Vorschein kommen, die durch

das hier verwendete Trainings- und Medikationsprotokoll beeinflusst werden. Dazu zählen zum Beispiel die Dokumentation der Anfallshäufigkeit, eine Bestimmung des Ausmaßes der Angst und des aggressiven Verhaltens der Tiere oder aber auch von intellektuellen Fähigkeiten jenseits der räumlichen Lernfähigkeit. So haben wir den Eindruck gehabt, dass die Tiere die mit D-Serin behandelt wurden, seltener epileptische Anfälle hatten und weniger gestresst waren. Dieses wurde aber nur semiquantitativ während der Reinigungs- und Fütterungsarbeiten dokumentiert.

Es wird zum anderen auch notwendig sein, die Methodik *in vitro* zu verfeinern. Dazu müssten Techniken entwickelt oder genutzt werden, die sensitiver die durch Training oder Medikation induzierten Veränderungen aufspüren. So sollten zukünftige Untersuchungen versuchen sich über histologische Aufarbeitung, molekularbiologische Untersuchungen (z.B. PCR, Western Blot) oder auch elektrophysiologische Messungen auf zellulärer Ebene den Subphänomenen der natürlichen oder induzierten Veränderungen zu nähern. So wäre es zum Beispiel möglich, dass zwei auf die extrazelluläre Potentialmessung gegenläufig wirkende Prozesse eine signifikante Darstellung von Veränderungen mit Hilfe dieser Methode erschweren.

Was macht Erinnerung, Gedächtnis und Lernen aus? Welche anatomischen Strukturen, physiologischen Vorgänge und molekularbiologischen Prozesse sind beteiligt? Welche philosophischen Konsequenzen haben die Erkenntnisse auf diesem Forschungsgebiet?

Das Feld der Lern- und Gedächtnisforschung im Allgemeinen und der Neurophysiologie im Speziellen ist auch mehr als 100 Jahre nach dem Beginn einer systematischen wissenschaftlichen Bearbeitung viel größer, als die zur Verfügung stehenden Antworten. Es wird vor allem darauf ankommen, dass es neben kleinen, hochspezialisierten Arbeiten auf der Ebene von Substrukturen einzelner Zellen oder sogar Untereinheiten von Ionenkanälen, auch große, interdisziplinäre Übersichtsarbeiten gibt. Arbeiten, die sich mit der Integration aller bisherigen Erkenntnisse beschäftigen und ein Gesamtkonzept für bestimmte Problemstellungen entwickeln. Vielleicht muss sich in der Grundlagenforschung ein ähnlich systemischer Ansatz etablieren, wie es ihn in der klinischen Forschung zum Teil bereits gibt. Dort

werden koordiniert verschiedene Teilaspekte eines Problems in verschiedenen Zentren bearbeitet.

Nicht zuletzt wird es notwendig sein, die Experimente mit den heute zur Verfügung stehenden modernen Methoden, soweit wie möglich am Menschen selbst durchzuführen, beziehungsweise die Übertragbarkeit der Tiermodelle noch stärker im Blick zu haben.

Die Lern- und Gedächtnisforschung ist ein spannendes, weites und komplexes Forschungsfeld. Seit Jahrtausenden beschäftigen sich die Menschen mit dem Ursprung von Ideen und Gedanken, mit der Funktionsweise und den Aufgaben des Gehirns und mit den Möglichkeiten und Grenzen von Erkenntnis und Vernunft. Trotzdem steht dieser spannende Forschungszweig noch immer am Anfang. Es kommen aufregende, spannende und hoffentlich erkenntnisreiche Jahre auf die Lern- und Gedächtniswissenschaft zu.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

1. Abel, T.; Nguyen, P. V.; Barad, M.; Deuel, T. A.; Kandel, E. R.; Bourtchouladze, R. (1997): Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. In: *Cell* 88 (5), S. 615–626.
2. Alvarez, P.; Squire, L. R. (1994): Memory consolidation and the medial temporal lobe: a simple network model. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (15), S. 7041–7045.
3. Antonova, E.; Parslow, D.; Brammer, M.; Dawson, G. R.; Jackson, S. H. D.; Morris, R. G. (2009): Age-related neural activity during allocentric spatial memory. In: *Memory* 17 (2), S. 125–143.
4. Arida, Ricardo Mario; Sanabria, Emilio Rafael Garrido; da Silva, Andre Cesar; Faria, Leonardo Coutinho; Scorza, Fulvio Alexandre; Cavalheiro, Esper Abrão (2004): Physical training reverts hippocampal electrophysiological changes in rats submitted to the pilocarpine model of epilepsy. In: *Physiol. Behav.* 83 (1), S. 165–171.
5. Arida, Ricardo Mario; Scorza, Fulvio Alexandre; Cavalheiro, Esper Abrão (2010): Favorable effects of physical activity for recovery in temporal lobe epilepsy. In: *Epilepsia* 51 Suppl 3, S. 76–79.
6. Artola, Alain; Frijtag, Josefien C. von; Fermont, Patrick C. J.; Gispen, Willem Hendrik; Schrama, Loes H.; Kamal, Amer; Spruijt, Berry M. (2006): Long-lasting modulation of the induction of LTD and LTP in rat hippocampal CA1 by behavioural stress and environmental enrichment. In: *Eur. J. Neurosci.* 23 (1), S. 261–272.
7. Atkinson, Richard C.; Shiffrin, Richard Martin (1968): Some speculations on storage and retrieval processes in long-term memory. Stanford, Calif: Institute for Mathematical Studies in the Social Sciences, Stanford University.
8. Avchalumov, Yosef; Kirschstein, Timo; Köhling, Rüdiger (2011): Altered physiology and pharmacology in the corticostriatal system in a model of temporal lobe epilepsy. In: *Epilepsia* 52 (1), S. 151–157.
9. Babb, T. L. (1999): Synaptic reorganizations in human and rat hippocampal epilepsy. In: *Adv Neurol* 79, S. 763–779.
10. Baddeley, A.; Hitch G. (1974): Working memory. In: *The psychology of learning and motivation* (8), S. 47–89.
11. Baddeley, Alan (2003): Working memory: looking back and looking forward. In: *Nat. Rev. Neurosci.* 4 (10), S. 829–839.
12. Barnes, C. A.; Rao, G.; Shen, J. (1997): Age-related decrease in the N-methyl-D-aspartateR-mediated excitatory postsynaptic potential in hippocampal region CA1. In: *Neurobiol. Aging* 18 (4), S. 445–452.
13. Barrash, J.; Damasio, H.; Adolphs, R.; Tranel, D. (2000): The neuroanatomical correlates of route learning impairment. In: *Neuropsychologia* 38 (6), S. 820–836.
14. Baudry, Michel; Bi, Xiaoning; Gall, Christine; Lynch, Gary (2011): The biochemistry of memory: The 26year journey of a 'new and specific hypothesis'. In: *Neurobiol Learn Mem* 95 (2), S. 125–133.
15. Baxendale, S. (1998): Amnesia in temporal lobectomy patients: historical perspective and review. In: *Seizure* 7 (1), S. 15–24.
16. Becker, James T.; Morris, Robin G. (1999): Working Memory(s). In: *Brain and Cognition* 41 (1), S. 1–8. Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278262698910922>.

17. Billard, Jean-Marie (2012): D-Amino acids in brain neurotransmission and synaptic plasticity. In: *Amino Acids* 43 (5), S. 1851–1860.
18. Billard, J-M; Rouaud, E. (2007): Deficit of NMDA receptor activation in CA1 hippocampal area of aged rats is rescued by D-cycloserine. In: *Eur. J. Neurosci.* 25 (8), S. 2260–2268.
19. Binder, Devin K.; Steinhäuser, Christian (2006): Functional changes in astroglial cells in epilepsy. In: *Glia* 54 (5), S. 358–368.
20. Bliss, T. V.; Collingridge, G. L. (1993): A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. In: *Nature* 361 (6407), S. 31–39.
21. Bliss, T. V.; Gardner-Medwin, A. R. (1973): Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. In: *J. Physiol. (Lond.)* 232 (2), S. 357–374.
22. Bliss, T. V.; Lomo, T. (1973): Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. In: *J. Physiol. (Lond.)* 232 (2), S. 331–356.
23. Bodhinathan, Karthik; Kumar, Ashok; Foster, Thomas C. (2010): Intracellular redox state alters NMDA receptor response during aging through Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. In: *J. Neurosci.* 30 (5), S. 1914–1924.
24. Bohbot, Véronique D.; Iaria, Giuseppe; Petrides, Michael (2004): Hippocampal function and spatial memory: evidence from functional neuroimaging in healthy participants and performance of patients with medial temporal lobe resections. In: *Neuropsychology* 18 (3), S. 418–425.
25. Brandeis, R.; Brandys, Y.; Yehuda, S. (1989): The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning. In: *Int. J. Neurosci.* 48 (1-2), S. 29–69.
26. BRODY, H. (1955): Organization of the cerebral cortex. III. A study of aging in the human cerebral cortex. In: *J. Comp. Neurol.* 102 (2), S. 511–516.
27. Burke, Sara N.; Barnes, Carol A. (2006): Neural plasticity in the ageing brain. In: *Nat. Rev. Neurosci.* 7 (1), S. 30–40.
28. Cabeza, R.; McIntosh, A. R.; Tulving, E.; Nyberg, L.; Grady, C. L. (1997): Age-related differences in effective neural connectivity during encoding and recall. In: *Neuroreport* 8 (16), S. 3479–3483.
29. Cabeza, Roberto; Anderson, Nicole D.; Locantore, Jill K.; McIntosh, Anthony R. (2002): Aging gracefully: compensatory brain activity in high-performing older adults. In: *Neuroimage* 17 (3), S. 1394–1402.
30. Cabeza, Roberto; Daselaar, Sander M.; Dolcos, Florin; Prince, Steven E.; Budde, Matthew; Nyberg, Lars (2004): Task-independent and task-specific age effects on brain activity during working memory, visual attention and episodic retrieval. In: *Cereb. Cortex* 14 (4), S. 364–375.
31. Cánovas, Rosa; León, Irene; Serrano, Pedro; Roldán, M. Dolores; Cimadevilla, José Manuel (2011): Spatial navigation impairment in patients with refractory temporal lobe epilepsy: evidence from a new virtual reality-based task. In: *Epilepsy Behav* 22 (2), S. 364–369.
32. Carr, Margaret F.; Jadhav, Shantanu P.; Frank, Loren M. (2011): Hippocampal replay in the awake state: a potential substrate for memory consolidation and retrieval. In: *Nat. Neurosci.* 14 (2), S. 147–153.
33. Cavalheiro, E. A.; Santos, N. F.; Priel, M. R. (1996): The pilocarpine model of epilepsy in mice. In: *Epilepsia* 37 (10), S. 1015–1019.
34. Cendes, Fernando (2005): Progressive hippocampal and extrahippocampal atrophy in drug resistant epilepsy. In: *Curr. Opin. Neurol.* 18 (2), S. 173–177.
35. Cohen, Neal J.; Eichenbaum, Howard (1993): Memory, amnesia, and the hippocampal system. Cambridge, Mass: MIT Press.

36. Coppola, Antonietta; Moshé, Solomon L. (2012): Animal models. In: *Handb Clin Neurol* 107, S. 63–98.
37. Cordova, F. (1993): Epilepsy and sport. In: *Aust Fam Physician* 22 (4), S. 558–562.
38. Covolán, L.; Mello, L. E. (2000): Temporal profile of neuronal injury following pilocarpine or kainic acid-induced status epilepticus. In: *Epilepsy Res.* 39 (2), S. 133–152.
39. Cowan, Nelson (2008): What are the differences between long-term, short-term, and working memory? In: *Prog. Brain Res.* 169, S. 323–338.
40. Curia, Giulia; Longo, Daniela; Biagini, Giuseppe; Jones, Roland S. G.; Avoli, Massimo (2008): The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. In: *J. Neurosci. Methods* 172 (2), S. 143–157.
41. D'Hooge, R.; Deyn, P. P. de (2001): Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. In: *Brain Res. Brain Res. Rev.* 36 (1), S. 60–90.
42. Dige, N.; Wik, G. (2001): A visual learning and memory test for preoperative evaluation of patients with temporal lobe epilepsy. In: *Int. J. Neurosci.* 111 (3-4), S. 167–174.
43. Dolcos, Florin; Rice, Heather J.; Cabeza, Roberto (2002): Hemispheric asymmetry and aging: right hemisphere decline or asymmetry reduction. In: *Neurosci Biobehav Rev* 26 (7), S. 819–825.
44. Douglas, R. J. (1967): The hippocampus and behavior. In: *Psychol Bull* 67 (6), S. 416–422.
45. Dudai, Yadin (2004): The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? In: *Annu Rev Psychol* 55, S. 51–86.
46. Eckert, Michael J.; Bilkey, David K.; Abraham, Wickliffe C. (2010): Altered plasticity in hippocampal CA1, but not dentate gyrus, following long-term environmental enrichment. In: *J. Neurophysiol.* 103 (6), S. 3320–3329.
47. Engel, J. (1993): Clinical neurophysiology, neuroimaging, and the surgical treatment of epilepsy. In: *Curr Opin Neurol Neurosurg* 6 (2), S. 240–249.
48. Folstein, Marshal; Folstein, Susan (2010): Functional expressions of the aging brain. In: *Nutr. Rev.* 68 Suppl 2, S. S70-3.
49. Foos, P. W.; Wright, L. (1992): Adult age differences in the storage of information in working memory. In: *Exp Aging Res* 18 (1-2), S. 51–57.
50. Foster, Thomas C.; Kumar, Ashok (2007): Susceptibility to induction of long-term depression is associated with impaired memory in aged Fischer 344 rats. In: *Neurobiol Learn Mem* 87 (4), S. 522–535.
51. Frankland, Paul W.; Bontempi, Bruno (2005): The organization of recent and remote memories. In: *Nat. Rev. Neurosci* 6 (2), S. 119–130.
52. Garzillo, Cibele L.; Mello, Luiz E. A. M. (2002): Characterization of reactive astrocytes in the chronic phase of the pilocarpine model of epilepsy. In: *Epilepsia* 43 Suppl 5, S. 107–109.
53. Gleixner, Christiane; Müller, Markus; Wirth, Steffen B. (2007): Neurologie und Psychiatrie für Studium und Praxis 2007/08. Unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges und der mündlichen Examina in den Ärztlichen Prüfungen. 6. Aufl. Breisach am Rhein: Medizinische Verlags- und Informationsdienste.
54. Goodrich-Hunsaker, Naomi J.; Livingstone, Sharon A.; Skelton, Ronald W.; Hopkins, Ramona O. (2010): Spatial deficits in a virtual water maze in amnesic participants with hippocampal damage. In: *Hippocampus* 20 (4), S. 481–491.
55. Grady, C. L.; McIntosh, A. R.; Bookstein, F.; Horwitz, B.; Rapoport, S. I.; Haxby, J. V. (1998): Age-related changes in regional cerebral blood flow during working memory for faces. In: *Neuroimage* 8 (4), S. 409–425.

56. Grady, C. L.; McIntosh, A. R.; Horwitz, B.; Maisog, J. M.; Ungerleider, L. G.; Mentis, M. J. et al. (1995): Age-related reductions in human recognition memory due to impaired encoding. In: *Science* 269 (5221), S. 218–221.
57. Grady, Cheryl L. (2008): Cognitive neuroscience of aging. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1124, S. 127–144.
58. Habib, D.; Dringenberg, H. C. (2010): Surprising similarity between mechanisms mediating low (1 Hz)-and high (100 Hz)-induced long-lasting synaptic potentiation in CA1 of the intact hippocampus. In: *Neuroscience* 170 (2), S. 489–496.
59. Hartley, Tom; Maguire, Eleanor A.; Spiers, Hugo J.; Burgess, Neil (2003): The well-worn route and the path less traveled: distinct neural bases of route following and wayfinding in humans. In: *Neuron* 37 (5), S. 877–888.
60. Hattiangady, Bharathi; Kuruba, Ramkumar; Shetty, Ashok K. (2011): Acute Seizures in Old Age Leads to a Greater Loss of CA1 Pyramidal Neurons, an Increased Propensity for Developing Chronic TLE and a Severe Cognitive Dysfunction. In: *Aging Dis* 2 (1), S. 1–17.
61. Haxaire, Coline; Turpin, Fabrice R.; Potier, Brigitte; Kervern, Myriam; Sinet, Pierre-Marie; Barbanel, Gérard et al. (2012): Reversal of age-related oxidative stress prevents hippocampal synaptic plasticity deficits by protecting D-serine-dependent NMDA receptor activation. In: *Aging Cell* 11 (2), S. 336–344.
62. Hebb, D. O. (1949): The organization of behavior. A neuropsychological theory. New York ;, London: John Wiley & Sons.
63. Hof, Patrick R.; Morrison, John H. (2004): The aging brain: morphomolecular senescence of cortical circuits. In: *Trends Neurosci.* 27 (10), S. 607–613.
64. Hoffman, K. L.; McNaughton, B. L. (2002): Coordinated reactivation of distributed memory traces in primate neocortex. In: *Science* 297 (5589), S. 2070–2073.
65. Hölscher, C. (1999): Synaptic plasticity and learning and memory: LTP and beyond. In: *J. Neurosci. Res.* 58 (1), S. 62–75.
66. Hölscher, Christian (2003): Time, space and hippocampal functions. In: *Rev Neurosci* 14 (3), S. 253–284.
67. Inostroza, Marion; Cid, Elena; Brotons-Mas, Jorge; Gal, Beatriz; Aivar, Paloma; Uzcategui, Yoryani G. et al. (2011): Hippocampal-dependent spatial memory in the water maze is preserved in an experimental model of temporal lobe epilepsy in rats. In: *PLoS ONE* 6 (7), S. e22372.
68. Jarrard, L. E. (2001): Retrograde amnesia and consolidation: anatomical and lesion considerations. In: *Hippocampus* 11 (1), S. 43–49.
69. Jeffery, K. J. (1997): LTP and spatial learning--where to next? In: *Hippocampus* 7 (1), S. 95–110.
70. Kampa, Björn M.; Gundlfinger, Anja; Letzkus, Johannes J.; Leibold, Christian (2011): Circuit mechanisms of memory formation. In: *Neural Plast.* 2011, S. 494675.
71. Kessels, R. P.; Haan, E. H. de; Kappelle, L. J.; Postma, A. (2001): Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. In: *Brain Res. Brain Res. Rev.* 35 (3), S. 295–303.
72. Kirschstein, Timo: Untersuchungen zur hippocampalen synaptischen Plastizität und Metaplastizität im Pilokarpinmodell der Temporallappenepilepsie. Univ., Habil.-Schr.-Rostock, 2009.
73. Klinker, Rainer (Hg.) (2005): Lehrbuch der Physiologie. 5. Aufl. Stuttgart: Thieme. Online verfügbar unter <http://www.thieme.de/ebooklibrary/inhalte/3137960053>.
74. Kochunov, Peter; Thompson, Paul M.; Coyle, Thomas R.; Lancaster, Jack L.; Kochunov, Valeria; Royall, Donal et al. (2008): Relationship among neuroimaging indices of cerebral health during normal aging. In: *Hum Brain Mapp* 29 (1), S. 36–45.

75. Krug, Alexander W.; Völker, Katharina; Dantzer, William H.; Silbernagl, Stefan (2007): Why is D-serine nephrotoxic and alpha-aminoisobutyric acid protective? In: *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 293 (1), S. F382-90.
76. Kumar, Ashok (2011): Long-Term Potentiation at CA3-CA1 Hippocampal Synapses with Special Emphasis on Aging, Disease, and Stress. In: *Front Aging Neurosci* 3, S. 7.
77. Kumar, Ashok; Thinschmidt, Jeffrey S.; Foster, Thomas C.; King, Michael A. (2007): Aging effects on the limits and stability of long-term synaptic potentiation and depression in rat hippocampal area CA1. In: *J. Neurophysiol.* 98 (2), S. 594–601.
78. Landfield, P. W.; McGaugh, J. L.; Lynch, G. (1978): Impaired synaptic potentiation processes in the hippocampus of aged, memory-deficient rats. In: *Brain Res.* 150 (1), S. 85–101.
79. Lechner, H. A.; Squire, L. R.; Byrne, J. H. (1999): 100 years of consolidation--remembering Müller and Pilzecker. In: *Learn. Mem* 6 (2), S. 77–87.
80. Leite, J. P.; Bortolotto, Z. A.; Cavalheiro, E. A. (1990): Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. In: *Neurosci Biobehav Rev* 14 (4), S. 511–517.
81. Leite, J. P.; Garcia-Cairasco, N.; Cavalheiro, E. A. (2002): New insights from the use of pilocarpine and kainate models. In: *Epilepsy Res.* 50 (1-2), S. 93–103.
82. Leite, J. P.; Nakamura, E. M.; Lemos, T.; Masur, J.; Cavalheiro, E. A. (1990): Learning impairment in chronic epileptic rats following pilocarpine-induced status epilepticus. In: *Braz. J. Med. Biol. Res.* 23 (8), S. 681–683.
83. Lemos, T.; Cavalheiro, E. A. (1995): Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats. In: *Exp Brain Res* 102 (3), S. 423–428.
84. Lynch, M. A. (2004): Long-term potentiation and memory. In: *Physiol. Rev.* 84 (1), S. 87–136.
85. Malenka, R. C.; Nicoll, R. A. (1999): Long-term potentiation--a decade of progress? In: *Science* 285 (5435), S. 1870–1874.
86. Martin, S. J.; Grimwood, P. D.; Morris, R. G. (2000): Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. In: *Annu. Rev. Neurosci.* 23, S. 649–711.
87. Martin, S. J.; Morris, R. G. M. (2002): New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. In: *Hippocampus* 12 (5), S. 609–636.
88. Martinez, J. L.; Derrick, B. E. (1996): Long-term potentiation and learning. In: *Annu Rev Psychol* 47, S. 173–203.
89. McEwen, B. S. (2000): Allostasis, allostatic load, and the aging nervous system: role of excitatory amino acids and excitotoxicity. In: *Neurochem. Res.* 25 (9-10), S. 1219–1231.
90. MILNER, B.; Squire, L. R.; Kandel, E. R. (1998): Cognitive neuroscience and the study of memory. In: *Neuron* 20 (3), S. 445–468.
91. Moffat, Scott D. (2009): Aging and spatial navigation: what do we know and where do we go? In: *Neuropsychol Rev* 19 (4), S. 478–489.
92. Moffat, Scott D.; Kennedy, Kristen M.; Rodrigue, Karen M.; Raz, Naftali (2007): Extrahippocampal contributions to age differences in human spatial navigation. In: *Cereb. Cortex* 17 (6), S. 1274–1282.
93. Morris, R. G.; Garrud, P.; Rawlins, J. N.; O'Keefe, J. (1982): Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. In: *Nature* 297 (5868), S. 681–683.
94. Moscovitch, Morris; Rosenbaum, R. Shayna; Gilboa, Asaf; Addis, Donna Rose; Westmacott, Robyn; Grady, Cheryl et al. (2005): Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory. In: *J. Anat.* 207 (1), S. 35–66.

95. Muller, R. U.; Poucet, B.; Fenton, A. A.; Cressant, A. (1999): Is the hippocampus of the rat part of a specialized navigational system? In: *Hippocampus* 9 (4), S. 413–422.
96. Müller, Georg Elias; Pilzecker, Alfons (1900): Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtniss. Leipzig: Barth (Zeitschrift für Psychologie und Physiologie der Sinnesorgane Ergänzungsband, 1).
97. Norris, C. M.; Korol, D. L.; Foster, T. C. (1996): Increased susceptibility to induction of long-term depression and long-term potentiation reversal during aging. In: *J. Neurosci.* 16 (17), S. 5382–5392.
98. O'Keefe, J.; Dostrovsky, J. (1971): The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. In: *Brain Res.* 34 (1), S. 171–175.
99. Orozco-Ibarra, Marisol; Medina-Campos, Omar Noel; Sánchez-González, Dolores Javier; Martínez-Martínez, Claudia María; Floriano-Sánchez, Esaú; Santamaría, Abel et al. (2007): Evaluation of oxidative stress in D-serine induced nephrotoxicity. In: *Toxicology* 229 (1-2), S. 123–135.
100. Pollegioni, Loredano; Sacchi, Silvia (2010): Metabolism of the neuromodulator D-serine. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 67 (14), S. 2387–2404.
101. Potier, B.; Turpin, F. R.; Sinet, P-M; Rouaud, E.; Mothet, J-P; Videau, C. et al. (2010): Contribution of the d-Serine-Dependent Pathway to the Cellular Mechanisms Underlying Cognitive Aging. In: *Front Aging Neurosci* 2, S. 1.
102. Repovs, G.; Baddeley, A. (2006): The multi-component model of working memory: explorations in experimental cognitive psychology. In: *Neuroscience* 139 (1), S. 5–21.
103. Sacchi, Silvia; Caldinelli, Laura; Cappelletti, Pamela; Pollegioni, Loredano; Molla, Gianluca (2012): Structure-function relationships in human D-amino acid oxidase. In: *Amino Acids* 43 (5), S. 1833–1850.
104. Sander, Josemir W. (2003): The epidemiology of epilepsy revisited. In: *Curr. Opin. Neurol.* 16 (2), S. 165–170.
105. Scorza, Fulvio A.; Arida, Ricardo M.; Naffah-Mazzacoratti, Maria da Graça; Scerni, Débora A.; Calderazzo, Lineu; Cavalheiro, Esper A. (2009): The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? In: *An. Acad. Bras. Cienc.* 81 (3), S. 345–365.
106. SCOVILLE, W. B.; MILNER, B. (1957): Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. In: *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 20 (1), S. 11–21.
107. Shapiro, M. (2001): Plasticity, hippocampal place cells, and cognitive maps. In: *Arch. Neurol.* 58 (6), S. 874–881.
108. Sharma, Sunita; Rakoczy, Sharlene; Brown-Borg, Holly (2010): Assessment of spatial memory in mice. In: *Life Sci.* 87 (17-18), S. 521–536.
109. Shors, T. J.; Matzel, L. D. (1997): Long-term potentiation: what's learning got to do with it? In: *Behav Brain Sci* 20 (4), S. 597-614; discussion 614-55.
110. Spalding, Tracy A.; Trotter, Carol; Skjaerbaek, Niels; Messier, Terri L.; Currier, Erika A.; Burstein, Ethan S. et al. (2002): Discovery of an ectopic activation site on the M(1) muscarinic receptor. In: *Mol. Pharmacol.* 61 (6), S. 1297–1302.
111. Spiers, Hugo J.; Maguire, Eleanor A. (2007): A navigational guidance system in the human brain. In: *Hippocampus* 17 (8), S. 618–626.
112. Squire, L. R. (1982): The neuropsychology of human memory. In: *Annu. Rev. Neurosci.* 5, S. 241–273.
113. Squire, L. R.; Knowlton, B.; Musen, G. (1993): The structure and organization of memory. In: *Annu Rev Psychol* 44, S. 453–495.
114. Squire, L. R.; Zola, S. M. (1996): Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (24), S. 13515–13522.

115. Stefan, H.; Pauli, E. (2002): Progressive cognitive decline in epilepsy: an indication of ongoing plasticity. In: *Prog. Brain Res.* 135, S. 409–417.
116. Strzelczyk, Adam; Reese, Jens Peter; Dodel, Richard; Hamer, Hajo M. (2008): Cost of epilepsy: a systematic review. In: *Pharmacoeconomics* 26 (6), S. 463–476.
117. Sutherland, R. J.; McDonald, R. J.; Hill, C. R.; Rudy, J. W. (1989): Damage to the hippocampal formation in rats selectively impairs the ability to learn cue relationships. In: *Behav. Neural Biol.* 52 (3), S. 331–356.
118. Sutula, Thomas P. (2004): Mechanisms of epilepsy progression: current theories and perspectives from neuroplasticity in adulthood and development. In: *Epilepsy Res.* 60 (2-3), S. 161–171.
119. Toescu, Emil C. (2005): Normal brain ageing: models and mechanisms. In: *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 360 (1464), S. 2347–2354.
120. TOLMAN, E. C. (1948): Cognitive maps in rats and men. In: *Psychol Rev* 55 (4), S. 189–208.
121. Tulving, Endel; Craik, Fergus I. M. (2000): The Oxford handbook of memory. Oxford ;, New York: Oxford University Press.
122. Turpin, F. R.; Potier, B.; Dulong, J. R.; Sinet, P-M; Alliot, J.; Olié, S. H. R. et al. (2011): Reduced serine racemase expression contributes to age-related deficits in hippocampal cognitive function. In: *Neurobiol. Aging* 32 (8), S. 1495–1504.
123. Turski, W. A.; Cavalheiro, E. A.; Bortolotto, Z. A.; Mello, L. M.; Schwarz, M.; Turski, L. (1984): Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. In: *Brain Res.* 321 (2), S. 237–253.
124. Turski, W. A.; Cavalheiro, E. A.; Schwarz, M.; Czuczwar, S. J.; Kleinrok, Z.; Turski, L. (1983): Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. In: *Behav. Brain Res.* 9 (3), S. 315–335.
125. Wang, Min; Gamo, Nao J.; Yang, Yang; Jin, Lu E.; Wang, Xiao-Jing; Laubach, Mark et al. (2011): Neuronal basis of age-related working memory decline. In: *Nature* 476 (7359), S. 210–213.
126. Wenk, G. L. (2001): Assessment of spatial memory. In: *Curr Protoc Toxicol* 11, S. Unit11.3.
127. Wenk, Gary L. (2004): Assessment of spatial memory using the radial arm maze and Morris water maze. In: *Curr Protoc Neurosci* 8, S. Unit 8.5A.
128. Winkler, István; Cowan, Nelson (2005): From sensory to long-term memory: evidence from auditory memory reactivation studies. In: *Exp Psychol* 52 (1), S. 3–20.
129. Wolosker, Herman (2007): NMDA receptor regulation by D-serine: new findings and perspectives. In: *Mol. Neurobiol.* 36 (2), S. 152–164.
130. Wolosker, Herman; Dumin, Elena; Balan, Livia; Foltyn, Veronika N. (2008): D-amino acids in the brain: D-serine in neurotransmission and neurodegeneration. In: *FEBS J.* 275 (14), S. 3514–3526.
131. Wolosker, Herman; Mori, Hisashi (2012): Serine racemase: an unconventional enzyme for an unconventional transmitter. In: *Amino Acids* 43 (5), S. 1895–1904.
132. Wroblewski, J. T.; Fadda, E.; Mazzetta, J.; Lazarewicz, J. W.; Costa, E. (1989): Glycine and D-serine act as positive modulators of signal transduction at N-methyl-D-aspartate sensitive glutamate receptors in cultured cerebellar granule cells. In: *Neuropharmacology* 28 (5), S. 447–452.
133. Wu, Sheng-Zhou; Bodles, Angela M.; Porter, Mandy M.; Griffin, W. Sue T.; Basile, Anthony S.; Barger, Steven W. (2004): Induction of serine racemase expression and D-serine release from microglia by amyloid beta-peptide. In: *J Neuroinflammation* 1 (1), S. 2.

6.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

6.2.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Heutige Vorstellung vom Mehrkomponentenmodell des Gedächtnisses. (adaptiert nach Atkinson et Shiffrin 1968, Baddeley et Hitch 1974)	2
Abb. 2 Das Langzeitgedächtnis hat einen deklarativen und einen nicht-deklarativen Anteil. (nach Squire et al. 1996)	3
Abb. 3 Schematische Darstellung der Histologie und der Verschaltungen des Hippocampus (modifiziert nach Kirschstein, 2009)	6
Abb. 4 Zeitlicher Ablauf der Interventionen gemäß unserem Protokoll zur Induktion einer chronischen Temporallappenepilepsie	17
Abb. 5 Erster Untersuchungsweig	19
Abb. 6 Zweiter Untersuchungsweig.	20
Abb. 7 Foto des Messplatzes für die elektrophysiologischen Untersuchungen.	22
Abb. 8 Verschaltung von Stimulationselektrode (3) und Ableitelektrode (2) bei der Ableitung exzitatorischer, extrazellulärer postsynaptischer Potentiale (fEPSP) in einem Hippocampusschnitt (1).	23
Abb. 9 Fotografie und schematischer Aufbau des Morris Water Maze.	24
Abb. 10 Beispielhafte synaptische Feldpotentialantwort (A) und Darstellung der Normierung dieser Antworten im zeitlichen Verlauf (B).	26
Abb. 11 Die LTP nach HFS war bei jungen Pilokarpin-Tieren im Vergleich zu jungen Kontrollen signifikant reduziert.	28
Abb. 12 Junge Kontroll-Tiere fanden die Plattform im Morris Water Maze an allen 7 Tagen signifikant schneller als junge Pilokarpin-Tiere.	29
Abb. 13 Die Behandlung junger Kontroll-Tiere im Morris Water Maze reduzierte die im Anschluss gemessene LTP nach HFS signifikant.	31
Abb. 14 Die LTP von jungen Pilokarpin-Tieren mit und ohne WM unterschied sich nicht signifikant.	32
Abb. 15 Die LTP von alten Kontrollen und alten Pilokarpin-Tieren war nicht signifikant unterschiedlich.	34
Abb. 16 Die Lernleistung im Water Maze unterschied sich zwischen jungen und alten Kontroll-Tieren signifikant. Alte Kontroll-Tiere lernten ebenfalls signifikant schneller als alte Pilokarpin-Tiere.	35

- Abb. 17** Die LTP von jungen und alten Kontroll-Tieren war signifikant unterschiedlich. 37
- Abb. 18** Die LTP von jungen Pilokarpin-behandelten Tieren war nicht signifikant verschieden von alten Pilokarpin-behandelten Tieren. 38
- Abb. 19** Alte Kontrollen fanden über beide Durchgänge hinweg die Plattform signifikant schneller als alte Pilokarpin-Tiere. 39
- Abb. 20** Zweimaliges Water Maze hatte bei alten Kontroll-Tieren keine signifikanten Einfluss auf die LTP nach HFS. 40
- Abb. 21** Die LTP von alten Pilokarpin-Tieren die 2 Durchgänge im Morris Water Maze trainiert wurden, war signifikant erhöht im Vergleich zu alten Pilokarpin-Tieren die nicht im Morris Water Maze trainiert wurden. 41
- Abb. 22** Die LTP von alten Kontrollen mit D-Serin Behandlung zeigte keinen signifikanten Unterschied zu alten Kontrollen die nicht mit D-Serin behandelt wurden. 43
- Abb. 23** D-Serin hatte keinen signifikanten Einfluss auf die synaptische Antwort von alten Pilokarpin-Tieren nach HFS. 44
- Abb. 24** Langzeitbehandlung mit D-Serin hat weder bei alten Kontroll-Tieren, noch bei alten Pilokarpin-Tieren einen signifikanten Einfluss auf die Leistung im Morris Water Maze. 45
- Abb. 25** Weder die mit D-Serin behandelten alten Kontroll-Tieren (schwarze Dreiecke), noch die mit D-Serin behandelten alten Pilokarpin-Tieren schienen die Position der Plattform in den 49 Tagen zwischen den beiden Durchgängen zu vergessen. Es gibt in beiden Gruppen keinen Lernzuwachs im zweiten Durchgang. 46
- Abb. 26** Auf die Reizantwort der Schaffer-Kollateral-CA-1 Synapsen von alten Kontroll-Tieren nach zweimaligem WM hatte D-Serin keinen signifikanten Einfluss. 47
- Abb. 27** D-Serin hatte keinen signifikanten Einfluss auf die synaptische Antwort von alten Pilokarpin-Tieren nach 2 Versuchsdurchgängen im Morris Water Maze. 48

6.2.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Junge Kontroll-Tiere reduzieren die Zeit bis zum Auffinden der Plattform vom ersten im Vergleich zum Mittelwert des 5. bis 7. Tages im Median auf 11,7 %, während Pilocarpin-Tiere diesen Wert nur halbieren.... 30

Tab. 2 Junge Kontroll-Tiere haben einen signifikant höheren Lernzuwachs als alte Kontrollen. Ebenso haben alte Kontrollen einen höheren Zuwachs als alte Pilocarpin-Tiere. 36

6.3 Danksagung

"Es ist ein lobenswerter Brauch:
Wer was Gutes bekommt, der bedankt sich auch."

Wilhelm Busch (1832-1908), dt. Schriftsteller, Maler u. Zeichner

Ich möchte diesen persönlichen Teil nutzen, all denjenigen Dank zu sagen, die mich bei der Arbeit an diesem Projekt unterstützt haben. Als ich am 17.03.2008 mit den Experimenten begonnen habe, war mir nicht klar, wie weit der Weg bis zu diesem Punkt ist.

Geführt und begleitet wurde ich zuallererst von den Mitarbeitern des Oscar Langendorff Instituts für Physiologie in Rostock. Besonders hervorheben möchte ich meinen Doktorvater Prof. Rüdiger Köhling und meinen Betreuer Dr. Timo Kirschstein. Dr. Turson Tokay und Dr. Marco Rohde danke ich herzlich für die, wörtlich gemeint, tägliche Hilfe im wissenschaftlichen Alltag. Die Arbeit, die ihr in dieses Projekt gesteckt habt, war qualitativ und quantitativ außergewöhnlich. Weiterhin danke ich mit großer Freude Mandy Riedel und Katrin Porath für Ihre stets schnelle und unkomplizierte Hilfe bei jeder Art von formalem, organisatorischem und inhaltlichen Problemen und Frau Schmidt für ihre liebevolle Fürsorge für die Tiere. Nicht zuletzt geht mein Dank an alle nicht genannten Mitarbeiter unseres Instituts. Durch die Arbeit mit euch ist aus mir im Denken, im wissenschaftlichen Anspruch und im moralischen Ethos ein leidenschaftlicher Wissenschaftler geworden.

Dass ich diesen Weg bis hierher gehen konnte, verdanke ich aber nicht nur dem handwerklichen Rüstzeug, sondern vor allem meinem wunderbaren persönlichen Umfeld. Auf meiner Reise durchs Studium und die unendlichen Stunden im Labor haben Fabian, Leon, Mandy, Rike und Paul in einem unschätzbaren Maß teilgenommen. Durch eure Hilfe im Täglichen, eure emotionaler Unterstützung in Form lieber Worte oder konstruktiver Ermutigung oder beim wissenschaftlichen Gedankenaustausch habt ihr jeden Schritt bis hierher ermöglicht und jedes Hindernis erträglich gemacht. Jedem von euch gehört somit auch ein Teil dieser Arbeit.

Ich möchte auch den Lektoren dieser Arbeit, Tina Blei und Marcel Rehberg, danken. Ihr habt wahrlich harte Arbeit geleistet.

Durch meine Arbeit als Kinderarzt habe ich gelernt, dass wir nur zu dem werden können, zu dem unsere Familie uns macht und zu dem sie zulassen, dass wir werden. Ich danke meinen Eltern und meinen Geschwistern Nadine und Marcel, dass ich die letzten 28 Jahre so sein durfte wie, und werden durfte was ich bin. Ich liebe euch dafür!

Liebe Kristina, dir möchte ich diese Arbeit widmen. Meiner großen Liebe.

Egal ob ich euch erwähnt habe oder nicht; jedem der zu dieser Arbeit beigetragen hat, sei Dank gesagt. Ich habe viel Gutes von euch bekommen.

Euer Mirko

6.4 Thesen zur Dissertationsschrift

1. Das Gedächtnis besteht aus dem sensorischen Gedächtnis, dem Kurzzeitgedächtnis und dem Langzeitgedächtnis.
2. Das deklarative Gedächtnis scheint hauptsächlich im medialen Temporallappen lokalisiert, während das nicht deklarative Gedächtnis über verschiedene Hirnregionen verteilt ist.
3. Der Übergang von Informationen ins Langzeitgedächtnis (Konsolidierung) findet auf zellulärem und auf systemischem Niveau statt.
4. Der Hippocampus hat eine entscheidende Bedeutung bei der Kodierung, der Konsolidierung und dem Abrufen von Gedächtnisinhalten.
5. Wird eine Nervenzelle über das Axon einer anderen Nervenzelle wiederholt oder dauerhaft erregt, so erhöht sich die Effizienz dieser synaptischen Verbindung.
6. Die Langzeitpotenzierung ist ein zelluläres Korrelat der Gedächtnisbildung.
7. NMDA Kanäle haben eine Bedeutung bei der Ausbildung synaptischer Potenzierung.
8. Räumliches Lernen und räumliches Gedächtnis sind zu einem großen Teil im Hippocampus lokalisiert.
9. Das Pilocarpinmodell der chronischen Temporallappenepilepsie bei Ratten ist geeignet, die pathophysiologischen Bedingungen der menschlichen Temporallappenepilepsie im Rahmen dieser Studie nachzubilden.
10. Alterung führt in spezifischen Bereichen zu einer verminderten kognitiven Leistungsfähigkeit, zum Beispiel die verminderte Leistungsfähigkeit des episodischen und des Arbeitsgedächtnisses.
11. Oxidativer Stress spielt eine Rolle in der durch Alterung ausgelösten Veränderungen.
12. D-Serin, als Co-Rezeptor des NMDA Rezeptors hat eine Bedeutung in der Gehirnentwicklung und bei höheren kognitiven Funktionen.
13. Junge Ratten mit chronischer Temporallappenepilepsie haben eine geringere Fähigkeit Langzeitpotenzierung auszubilden, als junge, gesunde Ratten.
14. Junge Ratten mit chronischer Temporallappenepilepsie haben ein reduziertes räumliches Lernvermögen im Morris Water Maze.
15. *In Vivo* Lernversuche im Morris Water Maze verändern die Fähigkeit von jungen, gesunden Ratten Langzeitpotenzierung auszubilden.

16. Alterung führt bei gesunden Tieren zu einer verminderten Lernleistung. Bei epileptischen Tieren ist diese, unabhängig vom Altern, noch schlechter.

17. Bei gesunden Tieren reduziert Alterung die Langzeitpotenzierung signifikant.

18. Zweimaliges Water-Maze-Training erhöht bei alten, epileptischen Ratten die Langzeitpotenzierung nach Hochfrequenzstimulation.

19. Durch eine niedrigdosierte Langzeittherapie mit D-Serin konnten die untersuchten Parameter zur Veränderung der kognitiven Leistungsfähigkeit bei chronischer Temporallappenepilepsie oder Alterung nicht wesentlich verbessert werden.

19. Bei angenommener Übertragbarkeit der Studienergebnisse in die klinische Patientenversorgung ist aktuell ein therapeutischer Einsatz von D-Serin in den hier untersuchten Situationen noch nicht überlegenswert.

20. D-Serin ist ein noch relativ unbekanntes, aber in seiner Bedeutung hoch eingeschätztes Präparat mit Einfluss auf viele Prozesse im zentralen Nervensystem. Durch weitere Untersuchungen ist die Steigerung der Bedeutung von D-Serin in der Versorgung kognitiver Abbauprozesse noch immer wahrscheinlich.

6.5 Selbständigkeitserklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Promotionsschrift selbständig angefertigt und keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel eingesetzt habe.

Mirko Rehberg; Rostock, 04. April 2014