2. Material und Methoden

**Versuchstiere**

Alle Experimente wurden an männlichen Wistar-Ratten (Charles River Laboratories GmbH, Sulzfeld, Deutschland; XXXXXXXXXXXXXXX) durchgeführt. Die Tiere wurden vor dem achten Lebenstag in Gruppen von 12 bis 15 Jungtieren und einer Mutter geliefert. Dann erfolgte die Haltung bei stabilen klimatischen Bedingungen und einem festgelegten Hell-Dunkel-Zyklus mit 12 Stunden Belichtung und Nahrung und Wasser ad libitum. Die Trennung der Tiere von der Mutter erfolgte an Tag XX zu Paaren. Ab Tag XX erfolgte die Einzelhaltung.

**Methoden**

Alle angewandten experimentellen Verfahren entsprachen nationalen und internationalen Richtlinien bzgl. der ethischen Verwendung von Tieren (European Council Directive 86/609/EEC).

**Pilokarpininjektion**

Am Tag der Injektion wurden alle Jungtiere gegen 9 Uhr aus dem Stall in den Tierversuchsraum gebracht und dort von der Mutter getrennt. Anschließend wurden die Tiere gewogen. Die leichtesten zwei Tiere wurden zurück zur Mutter gesetzt. Die Mutter mit den beiden Jungtieren wurde für die Dauer der Injektion zurück in den Tierstall gebracht. Für die übrigen Tiere erfolgte eine zufällige Aufteilung entweder zur Versuchsgruppe oder zur Kontrollgruppe. Für die Dauer der Injektion befanden sich alle Tiere in einem Sammelkäfig. Dieser wurde mit einer Heizmatte und einer Rotlichtlampe beheizt. Die beiden Gruppen wurden für die eindeutige Zuordnung während der Injektionen farblich unterschiedlich nummeriert.

Um die peripheren cholinergen Wirkungen des Pilokarpins zu reduzieren wurden alle Tiere mit N-Methylscopolamin-Lösung 100 μl pro 20 g Körpergewicht i.p. injiziert. 30 Minuten später erfolgte für die Versuchstiere die Injektion mit Pilokarpin-Lösung 100 µl pro 20 g Körpergewicht i.p. Kontrolltiere wurden analog mit 100 µl NaCl-Lösung injiziert.

40 Minuten nachdem das erste Tier einen SE entwickelt hatte, wurde dieser bei allen Versuchstieren mit Diazepam terminiert. Es ist zu bemerken, dass die Entwicklung eines SE bei allen Tieren mit in einem Zeitraum von fünf bis zehn Minuten nach der Pilokarpininjektoin erfolgte. Es wurde alle Tieren 10-30µl Diazepam-Lösung injiziert. Die Dosierung erfolgte abgestimmt auf die Ausprägung des SE und der Anfälle während des SE. Bei Bedarf wurden 10µl Diazepam nachgegeben. Direkt nach der Injektion, bevor eine Wirkung eintreten konnte, wurde allen Tieren frisch angesetzte Glukoselösung mit einer Pipette angeboten. Sobald die Tiere schliefen, wurden ihnen zum Ausgleich von Flüssigkeitsverlusten 200 µl NaCl-Lösung s.c. verabreicht. Nach 60 Minuten erfolgte eine zweite Gabe von NaCl-Lösung s.c.

Nach der zweiten Gabe von NaCl-Lösung wurden alle Tiere zurück zur Mutter gegeben.

Am ersten Injektionstag wurden alle Tiere während der Schlafphase nach Injektion des Diazepams eindeutig an den Pfoten tätowiert. An den folgenden Tagen wurden die Tätowierungen kontrolliert und gegebenenfalls erneuert.

**Präparation der Hirnschnitte**

Die Präparation der Hirnschnitte erfolgte immer nach demselben festgelegten Schema um eine gleichbleibende Qualität zu sichern.

Zunächst erfolgte eine tiefe Diethylether-Narkose, welche durch einen Schmerzreiz und die dabei ausbleibende Reaktion des Tieres kontrolliert wurde. Bei ausreichend tiefer Narkose erfolgte die Dekapitation mithilfe einer Guillotine. Der abgetrennte Kopf wurde sofort in einen zuvor bereitgestelltes breitbasiges Behältnis gelegt, in dem sich mit Carbogen (95% CO2, 5% O2) eisgekühlte Succrose-Lösung befand. Die weitere Präparation erfolgte in jenem Gefäß. Der nächste Schritt war eine mediane Inzisur der Kopfhaut mit einem Skalpell mit der der Schädelknochen freigelegt wurde. Anschließend erfolgte mit einer schmalschneidigen Schere die Eröffnung des Schädels vom Foramen magnum aus nach kranial bis hin zum Bregma. Hierbei wurde idealerweise auch die harte Hinrhaut (Dura mater) bereits aufgetrennt. Nach zwei lateralen Schnitten zur Durchtrennung des Os occipitale am Foramen magnum konnte die Schädeldecke mithilfe einer Pinzette vorsichtig zur Seite aufgeklappt werden. Mit einem Skalpell wurde das Kleinhirn (Cerebellum) und Teile des Hirnstamms entfernt. Durch einen gebogenen Spatel konnte nun das verbleibende Gehirn entfernt und in ein sauberes, mit eisgekühlter, durch Carbogen begaster Succrose gefülltes Transportgefäß gegeben werden. Zwischen Dekapitierung und Einfügen in das Transportgefäß sollten nie mehr als 60 Sekunden vergehen.

Im Anschluss wurde das Gehirn mit handelsüblichem Sekundenkleber auf dem Schnittblock der Schnittkammer so fixiert, dass die occipitale Seite des Gehirns zur Schneidklinge und die Unterseite der Temporallappen nach oben wiesen. Sobald das Gehirn aufgebracht war, wurde die Schnittkammer mit eisgekühlter Succrose-Lösung befüllt und mit Carbogen begast. Daraufhin wurden mit dem Vibratom 400 µm Dicke Schnitte bei einem Vortrieb von 0,6 mm pro Sekunde im Bereich des Hippocampus angefertigt. Die Region des Hippocampus wurde dann auf der Klinge liegend abgetrennt und mit einer Transferpipette in die Aufbewahrungskammer überführt.

Die Aufbewahrung erfolgte in der Messlösung bei Raumtemperatur und ständiger Begasung durch Carbogen. Nach einer Ruhezeit von mindestens 60 Minuten erfolgte die Überführung der Schnitte in die Messkammer zur weiteren Untersuchung am Arbeitsplatz.

**Elektrophysiologische Messungen**

Um möglichst störfreie und adäquate elektrophysiologische Messungen durchzuführen, befand sich der Messplatz in einem faradayschen Käfig auf einem vibrationsgedämpften Tisch. Oberhalb der Messkammer befand sich ein Stereomikroskop mit einer Kaltlichtquelle zur genauen Positionierung der Elektroden.

Bis zu zwei Hirnschnitte ruhte in der Messkammer auf einem Nylonnetz, umspült von mit Carbogen begaster Messlösung und bei durch einen Temperaturregler konstant gehaltener Temperatur von 32°C ± 1°C. Die Flussrate wurde dabei durch eine Rollerpumpe konstant gehalten. Nach Einbringen der Schnitte in die Messkammer wurde immer eine Inkubationszeit von mindestens 20 Minuten abgewartet, bevor Messungen durchgeführt wurden.

Für Feldpotentialmessungen befanden sich zu beiden Seiten der Messkammer jeweils eine Stimulations- und eine Ableitelektrode, montiert auf einem Mikromanipulator. Die eigentliche Elektrode bestand aus einem chlorierten Silberdraht in einer mit Messlösung gefüllten Boroselikatpipette mit einem Spitzenwiderstand von 2-3 MΩ. Die Stimulationselektroden waren mit einem Impulsgenerator verbunden, welcher über einen Frequenzregulator kontrolliert wurde. Die Ableitelektroden gaben über einen Vor- und einen Hauptverstärker ihr Signal an einen Stromwandler, welcher die Information weiter an einen Rechner gab.

Für die Intrazellulären Messungen befand sich auf der einen Seite der Messkammer eine Stimulationselektrode, analog zu den Feldpotentialmessungen. Auf der anderen Seite befand sich die intrazelluläre Elektrode auf einem schrittmotorgetriebenen Mikromanipulator. Sie bestand aus einem dünnem chloriertem Silberdraht, der in eine mit intrazellulärer Lösung befüllte Glaspipette eingebracht war. Die intrazelluläre Elektrode war ebenfalls über einen Vor- und einen Hauptverstärker, und einen Stromwandler mit einem Rechner verbunden.

Am Rechner erfolgte die Darstellung und Bearbeitung der Ableitungen über das Programm Signal 2.16. Ebenso war es uns mithilfe von Signal umgekehrt möglich die Zelle intrazellulär mit verschiedenen Stromprotokollen zu erregen.

Die Speicherung der Daten erfolgte am Ende in digitaler Form auf Speichermedien.

**Herstellung von Pipetten**

Für die Messung von Feldpotentialen wurden täglich neue Boroselikatpipetten mit einem Spitzenwiderstand von 2-3 MΩ hergestellt. Dafür wurden Boroselikatpipetten (GB 150-8P) in die Glühwendel des PIP5 Pipette-Pullers eingespannt und in einem zweiphasigen Protokoll gezogen. Dabei wurde die Glühwendel in der ersten Phase auf XXX °C und in der zweiten Phase auf XXX °C erhitzt. Anschließend wurden die Pipetten mithilfe einer Mikropipette mit der Messlösung befüllt und der chlorierte Silberdraht eingeführt. Die so hergestellten Pipetten waren sowohl für die Stimulationselektroden als auch für die Ableitelektroden geeignet.

Für die intrazellulären Messungen mussten Glaspipetten mit einem Spitzenwiderstand von 60 bis 120 MΩ hergestellt werden. Hierfür wurden Quartzglaspipetten mit einem Außendurchmesser von XXX und einem Innendurchmesser von XXX in den horizontalen Pipettenzieher CCCCCC eingespannt und gemäß einem zuvor ausgearbeiteten Protokoll gezogen. Es mussten stets 6 bis 12 Pipetten bestenfalls verschiedener Protokolle vorbereitet werden, da Raumtemperatur, Luftfeuchtigkeit und Luftdruck einen entscheidenden und schwankenden Einfluss auf die Qualität der Pipetten hatten, sodass nicht immer alle Pipetten den Anforderungen genügten und verworfen werden mussten. Die Spitzen der Pipetten wurden anschließend mit Aquadest entlüftet. Danach wurden die Pipetten mit der intrazellulären Lösung befüllt und für mindestens zehn Stunden ruhen gelassen. Das machte eine Vorbereitung der intrazellulären Pipetten am Vortag der Messungen nötig.

Falls es sich am Tag der Messung herausstellte, dass keine der Quartzglaspipetten sich für die Messungen eignete, wurden intrazelluläre Pipetten aus Boroselikat hergestellt. Hierfür wurden Pipetten (GF 120-10F) mit einem horizontalen Pipettenziehgerät (P-97) nach einem zuvor erarbeiteten Protokoll gezogen. Diese Pipetten wurden anschließend mit einem Bunsenbrenner an den offenen Enden abgeflammt und anschließend mit der intrazellulären Lösung entlüftet. Auch hier wurde auf einen Mindestwiderstand von 60 MΩ geachtet. Ungenügende Pipetten wurden verworfen.

**Vorgehen bei Feldpotentialmessungen**

Für die Feldpotentialmessungen wurden die Elektroden wie in Abb. XX gezeigt, mithilfe des Mikroskops und der Mikromanipulatoren im Stratum oriens positioniert.

Für die Messung wurde anschließend ein Input-Output-Protokoll zur Feststellung der maximalen Stimulationsstärke durchgeführt. Bei diesem wird die Stimulationsstärke schrittweise solange erhöht, bis sich die gemessenen Potentiale auf einem Plateau befanden. Im Anschluss wurde die halbmaximale Stimulationsstärke eingestellt und für die weiteren Messungen beibehalten.

Für die Aufnahme der Baselinespuren wurden die Schnitte bei halbmaximaler Stimulationsstärke alle 30 Sekunden mit einem Einzelpuls für 20 Minuten stimuliert und abgeleitet. Für die Kontrollversuche wurde dieses Protokoll nach der Baseline für weitere 60 Minuten beibehalten.  
Für die Aufnahme der LTP-Spuren wurde nach der Baseline einmalig ein HFS-Protokoll durchgeführt. Die Stimulation erfolgte bei maximaler Stimulationsstärke mit 100 Hz für eine Sekunde. Im Anschluss daran erfolgte die Aufnahme der LTP-Spur bei halbmaximaler Stimulationsstärke alle 30 Sekunden mit Einzelpulsen.

**Vorgehen bei Intrazellulären Messungen**

**Platzierung der Elektroden und Zellsuche**

Für die Intrazellulären Messungen wurden die Extrazelluläre Stimulationselektrode und die intrazelluläre Elektrode wie in Abb. XX gezeigt, mithilfe des Mikroskops und der Mikromanipulatoren platziert.

Vor Beginn der eigentlichen Zellsuche musste der Nullabgleich des Spannungsunterschiedes durchgeführt werden. Hierfür wurde der Widerstand unter Einsatz einer Brückenschaltung am Hauptverstärker so eingestellt, dass der Brückenstrom 0 mV entsprach. Anschließend musste die Kapazität der Pipette ausgeglichen werden.

Bei der eigentlichen Zellsuche wurde die scharfe Mikroelektrode mithilfe des schrittmotorgetriebenen Mikromanipulators in Schritten von 2 µm durch den Schnitt bewegt. Das Vorhandensein einer Zelle an der Spitze der Pipette wurde durch einen Anstieg des Pipettenwiderstandes deutlich. Befand sich eine Zelle vor der Pipette wurde ein Buzzer betätigt, welcher die Pipettenspitze zum Vibrieren brachte. Eine erfolgreiche Penetration zeigte sich durch das Auftreten von spontanen Aktionspotentialen. Direkt nach der Penetration wurde das Potential der Zelle auf -70 mV gehalten, indem ein hyperpolarisierender Strom injiziert wurde. Dieser betrug zu Beginn häufig zwischen -1 und -1.5 nA, konnte während der nächsten zehn Minuten jedoch stetig reduziert werden, bis am Ende idealerweise ein möglichst geringer bis gar kein Haltestrom mehr nötig war.

Wurde eine Zelle gefunden, welche den Einschlusskriterien entsprach, wurde nach einer Ruhezeit von ca. fünf Minuten mit den elektrophysiologischen Messungen begonnen.

Einschlusskriterium für die Zellen war ein Ruhemembranpotential von -55 mV bis -85 mV, ohne dass ein Haltestrom angelegt war. Zellen die diesen Wert innerhalb von maximal 10 Minuten nicht erreichten, wurden nicht gemessen. Für die Messungen wurden alle Zellen annähernd auf einem Ruhemembranpotential von -70 mV gehalten, wofür in der Regel kleine hyperpolarisierende und selten auch kleine depolarisierende Ströme nötig waren. Eventuelle Schwankungen des Ruhemembranpotentials wurden direkt über eine Änderung des Haltestroms ausgeglichen.