

**Die Wirkungsweise der TRPV1-Kanäle
auf die synaptische Plastizität im
lateralen Kern der Amygdala**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Christoph Kulisch
aus Wriezen

2014

Diese Arbeit wurde im Zeitraum vom 20.07.2009 bis zum 15.01.2014 am Institut für Neurophysiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin unter der Betreuung von Frau PD Dr. Doris Albrecht angefertigt.

1. Gutachter: Frau PD Dr. Doris Albrecht
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Hans-Joachim Pflüger

Disputation am: 24.07.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	10
1. Einleitung	14
1.1 Die Amygdala.....	14
1.2 Der laterale Kern der Amygdala.....	17
1.2.1 Konnektivität und Funktion des LA	17
1.3 Synaptische Plastizität	18
1.3.1 Extrazelluläre Ableitungen von Feldpotenzialen	19
1.3.2 Die Langzeitpotenzierung im LA.....	19
1.3.3 prä- und postsynaptische Eigenschaften von Projektionsneuronen	23
1.4 Der TRPV1-Rezeptor	24
1.5 Stress und die Amygdala	26
1.6 Fragestellung	28
2. Methoden.....	30
2.1 Narkose und Präparation	30
2.1.1 Narkose.....	30
2.1.2 Präparation von horizontalen Gehirnschnitten	31
2.2 Extrazelluläre Ableitungen von Feldpotenzialen	33
2.2.1 Die Langzeitpotenzierung	35
2.2.2 Die Doppelpulsreizung (Paired Pulse Stimulierung)	36
2.3 Der Forced Swimming Test.....	36
2.4 Untersuchung der Wirkung von CPS auf die NO-Synthese bei HFS	38
2.5 Die whole-cell patch-clamp Technik.....	40
2.5.1 Untersuchung der Wirkung von Serotonin und -rezeptoren auf mEPSC.....	43
3. Ergebnisse	46
3.1 Auswirkung der Narkose auf die Langzeitpotenzierung	46

3.2 Der TRPV1-Rezeptor und seine Beeinflussung	51
3.2.1 Beteiligung des TRPV1-Rezeptors an der LTP	51
3.2.2 Auswirkung des Forced Swimming Tests auf die LTP.....	54
3.2.3 Untersuchung der Wirkung von Ethanol auf die LTP.....	57
3.2.4 Untersuchung der Wirkung von Serotonin auf die LTP.....	58
3.2.5 Untersuchung der Lokalisation von TRPV1-Rezeptoren.....	61
3.3 Untersuchung der Wirkung von CPS auf die NO-Synthese bei HFS	62
3.4 whole-cell patch-clamp Messungen	66
3.4.1 Untersuchung der Wirkung von Serotonin auf mEPSC.....	66
3.4.2 Untersuchung der Wirkung bestimmter Serotoninrezeptoren auf mEPSC	69
4. Diskussion	74
4.1 Auswirkung der Narkose auf die Langzeitpotenzierung	74
4.2 Die Beteiligung von TRPV1-Rezeptoren an der LTP im LA	77
4.3 Untersuchung der Lokalisation der TRPV1-Rezeptoren.....	78
4.4 Untersuchung der Wirkung von CPS auf die NO-Synthese bei HFS	80
4.5 Auswirkung des Forced Swimming Tests auf die LTP.....	82
4.6 Untersuchung der Wirkung von Ethanol auf die LTP.....	85
4.7 Wirkung von Serotonin und bestimmter Serotoninrezeptoren	86
4.7.1 Untersuchung der Wirkung von Serotonin.....	86
4.7.2 Untersuchung der Wirkung bestimmter Serotoninrezeptoren auf mEPSC	87
4.8 Wirkungsweise der TRPV1-Kanäle auf die synaptische Plastizität.....	94
5. Zusammenfassung	97
6. Summary	99
7. Literaturverzeichnis	100
8. Eidesstattliche Erklärung.....	123
9. Danksagung	125
10. Verzeichnis der Publikationen.....	127

Abkürzungen

2-AG	2-Arachidonoylglycerol
5-HT	Serotonin – 5-Hydroxytryptamin
5-HT ₂ R	Serotoninrezeptor Typ 2
∅	Durchmesser
°C	Grad Celsius
%	Prozent
λ	Wellenlänge (in Meter)
μM	Mikromolar
μm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ACSF	künstliche Zerebrospinalflüssigkeit (engl.: artificial cerebrospinal fluid)
AEA	Anandamid
AMG	AMG 9810
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
AMPAR	α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor
ATD	1H-anthra-[1,2d]-[1,2,3]-triazole-6,11-dione
ATP	Adenosintriphosphat
Bicu	Bicucullin [1(S),9(R)-(-)-Bicuculline methiodide]
BLA	Basolateraler Komplex der Amygdala
Ca ²⁺	Kalziumion(en)
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CaM	Ca ²⁺ -Calmodulin
cAMP	zyclisches Adenosinmonophosphat
CB1	Cannabinoid Rezeptortyp 1
CB1R	CB1-Rezeptor
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPS	Capsaicin
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element binding protein
D ₄ -Rezeptor	Dopaminrezeptor Typ 4

DAQ	1,2-Diaminoanthraquinonesulfat
EC	externe Kapsel (Capsula externa)
eIPSC	engl.: evoked inhibitory postsynaptic currents
eNOS	epitheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EtOH	Ethanol
FST	Forced Swimming Test
GABA	engl.: γ -aminobutyric acid; γ -Aminobuttersäure
GABAR	GABA-Rezeptor
ggü.	gegenüber
HEK	engl.: human embryonic kidney
HFS	Hochfrequenzstimulation(en)
Hz	Hertz
I	Stromstärke (in Ampere)
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
I _{max}	maximal messbare Stromstärke
IN	Intranukleär
I/O	Input/Output-Kurve
K ⁺	Kaliumion(en)
KC	Kaliumionenkanal
KCl	Kaliumchlorid
KO	knockout
LA	lateraler Kern der Amygdala
LTP	engl.: long-term potentiation; Langzeitpotenzierung
M Ω	Megaohm
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
mEPSC	miniature excitatory post-synaptic currents
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute(n)
mIPSC	engl.: miniature inhibitory postsynaptic currents
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mRNS	Boten-RNS (von engl.: messenger)
ms	Millisekunde(n)

Abkürzungen

mV	Millivolt
Na ⁺	Natriumion(en)
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMDA	N-methyl-D-Aspartat
NMDAR	NMDA-Rezeptor
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
O ₂	Disauerstoff
OLDA	N-Oleoyldopamin
Ondansetron	Ondansetronhydrochloriddihydrat
P	Phosphat
pA	Pikoampere
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pK _i	negativer dekadischer Logarithmus der Inhibitionskonstanten
PLC	Phospholipase C
PP	paired pulse stimulation (Doppelpulsreizung)
PPF	paired pulse facilitation
PTBS	Posttraumatische Belastungsstörung(en)
R	elektrischer Widerstand (in Ω)
RNS	Ribonukleinsäure
SB	SB-206553 Hydrochloridhydrat
TRP	Transient Receptor Potential
TRPM1	Transient Receptor Potential Melastatin Type 1
TRPV1	Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1
TRPV1R	TRPV1-Rezeptor
TTX	Tetrodotoxin
U	Spannung (in Volt)
U _{Imax}	Spannung, bei der die maximale Stromstärke (I) gemessen wird
U _{I50}	Spannung, bei der 50 % der maximalen Stromstärke (I) gemessen werden

V	Volt
VGCC	spannungsgesteuerte Kalziumionenkanäle
vgl.	vergleiche
WAY	WAY-100635 Maleat
WT	Wildtyp
ZI	Zeitintervall(e)

1. Einleitung

1.1 Die Amygdala

Die Amygdala (vom altgriechischen *amygdalon*: Mandel) ist eine Struktur des medialen Temporallappens, welche in beiden Hemisphären zu finden ist und als Bestandteil des limbischen Systems auch als Corpus amygdaloideum bezeichnet wird. Die Amygdalae stellen komplexe Strukturen dar, welche in eine Vielzahl von normalen und pathophysiologischen Verhaltensfunktionen involviert sind (LeDoux 2007). Zum einen spielen sie eine wesentliche Rolle bei emotionalen Prozessen, wie der Verarbeitung von emotionalen und sozialen Informationen (Albrecht and von Bohlen und Halbach 2008; Talmi et al. 2008), der Erkennung von Emotionen anderer Individuen und der Bewertung dieser (z. B. der Mimik (Schmolck et al. 2007) und der Stimme (Scott et al. 1997)) oder der Entwicklung von Empathie (Pfeifer et al. 2008) und Abscheu (Harris and Fiske 2006). Zum anderen sind sie wichtig für operante Konditionierungen (Roberts et al. 2007), also der Veränderung der Häufigkeit des Auftretens von ursprünglich spontanem Verhalten durch angenehme oder unangenehme Konsequenzen, sowie für die Reaktion auf Ängste (Milad and Rauch 2007) und das Erlernen von Furcht (LeDoux 2007). Es wird auch postuliert, dass die Amygdalae für die Verschaltungen von Schmerzen und Emotionen verantwortlich sind (Fields 2000; Meagher et al. 2001), da Untersuchungen bei Läsionen der Amygdalae eine Reduzierung der emotionalen Reaktionen auf Schmerzen aufzeigen (Bourgeois et al. 2001; Calvino et al. 1982; Manning 1998; Manning and Mayer 1995a; Manning and Mayer 1995b; Werka 1997). Sie sind nicht nur für das Verarbeiten von negativen Reizen verantwortlich sondern auch beim Erlernen von positiven Assoziationen (z. B. Lernen durch Belohnung) beteiligt (Baxter and Murray 2002). Die Amygdalae sind essentiell für das emotionale Lernen und der Bildung von impliziten Gedächtnisinhalten (Maren 1999), wodurch sie für die Einschätzung einer Situation auf eine potentielle Gefahr hin wichtig sind. Zudem sind die Amygdalae an der Unterdrückung der Schmerz Wahrnehmung während einer gefährlichen Situation beteiligt, so dass die volle Aufmerksamkeit auf eine Flucht- oder Verteidigungsreaktion gerichtet werden kann (Manning et al. 2003). Hinsichtlich der Funktion einer Einschätzung der emotionalen Signifikanz eines sensorischen Reizes sind sie entscheidend (Pitkanen 2000).

Eine weitere Funktion der Amygdalae besteht in der Modulation der Abspeicherung deklarativer Gedächtnisinhalte wie zum Beispiel im Hippokampus sowohl nach Stress-induzierten als auch nach emotionalen Ereignissen (Pitkanen et al. 2000; Tsoury et al. 2008). Sie übernehmen weiterhin eine wichtige Funktion bei der Konsolidierung von neu Erlerntem in anderen Gehirnarealen (McGaugh 2002). Die Amygdalae sind Schlüsselkomponenten für die Gedächtnisbildung und für soziales Verhalten (Baxter and Murray 2002; Bellani et al. 2011).

Die komplexe Struktur einer Amygdala ist aus verschiedenen, individuellen Arealen, auch Kerne genannt, zusammengesetzt. Eine größtenteils akzeptierte Theorie ist, dass die Amygdala aus einem evolutionär älteren Bereich, bestehend aus kortikalem, medialem und zentralem Kern, und aus einem phylogenetisch jüngeren Bereich, bestehend aus lateralem, basalem und akzessorisch basalem Kern, aufgebaut ist (LeDoux 2007). Der prominente mandelförmige Bereich, welcher der Amygdala ihren Namen gab, ist eher nur einer dieser Kerne, der basolaterale Kern der Amygdala (LeDoux 2007). Diese Kerne können bei Ratten und Mäusen teils in weitere Kerngebiete unterteilt werden, so dass insgesamt 13 Kerngebiete mit unterschiedlichen Verbindungs- und Funktionsprofilen benannt werden können (Bzdok et al. 2012; Pitkanen 2000). Für den Menschen werden sogar bis zu 36 Kerne diskutiert (de Olmos 2004; Yilmazer-Hanke 2011).

Die Amygdala ist eine Gehirnregion, die unter normalen Bedingungen aufgrund ihres starken, inhibitorischen Netzwerkes eine sehr geringe Spontanaktivität aufweist. Dieses inhibitorische Netzwerk hält die zelluläre Aktivität niedrig und unterdrückt die Entstehung von Aktionspotenzialen aufgrund von irrelevanten Stimuli (LeDoux 2007). Gebildet wird dieses Netzwerk von den rund 20 % der γ -Aminobuttersäure als Neurotransmitter freisetzenen Interneuronen, die in der Amygdala vorhanden sind. Die anderen rund 80 % sind glutamaterge, exzitatorische Projektionsneurone (Kamal and Tombol 1975; McDonald 1992; Pape and Pare 2010). Funktional arbeitet dieses Netzwerk wie folgt zusammen. Ein neuer Stimulus kann eine zelluläre Antwort hervorrufen. Wenn sich dieser Stimulus wiederholt, dann überwiegt schnell die Aktivität der Interneurone und die Auslösung einer Antwort wird inhibiert. Wenn jedoch ein neuer Stimulus zusammen mit einem signifikanten Ereignis auftritt, dann kann die Inhibition überwunden werden (LeDoux 2007).

Die meisten Eingänge in die Amygdala kommen von exzitatorischen Neuronen, welche Glutamat als Botenstoff freisetzen. Diese Neurone bilden synaptische Verbindungen mit den Dendriten von stimulierenden Projektionsneuronen der Amygdala, welche Signale an

andere Regionen in der Amygdala oder an extrinsische Regionen projizieren können (LeDoux 2007). Gleichzeitig bilden diese Projektionsneurone synaptische Verbindungen mit inhibitorischen Interneuronen aus, wodurch eine rekurrente (feedback) Hemmung nachgeschalteter Neurone zustande kommt. Auch die exzitatorischen Neurone der Eingangsstrukturen bilden zusätzlich zu den Verbindungen mit Projektionsneuronen Verbindungen mit Interneuronen aus, welche dann mit den Projektionsneuronen Synapsen ausbilden, wodurch es zu einer feedforward Hemmung kommen kann. Durch beide, die vor- und die nachgeschaltete Hemmung, wird die Abnahme der Reizantwort auf sich wiederholende Stimuli reguliert (LeDoux 2007).

Klinisch wird die Amygdala mit der rezidivierenden depressiven Störung in Verbindung gebracht (Albrecht and von Bohlen und Halbach 2008; Bellani et al. 2011). Als Erstbehandlung wird in der Regel ein selektiver Serotoninwiederaufnahmehemmer verabreicht (Ruhe et al. 2006), wodurch die Serotoninkonzentration im synaptischen Spalt langfristig zunimmt, was zu einer Stimmungsaufhellung und Angstlösung führen kann. Als Ursache wird ein durch verschiedene Magnetresonanztomographiestudien bekanntes, verringertes Volumen der Amygdalae bei depressiven Patienten und Patientinnen vermutet (Hickie et al. 2007; Keller et al. 2008; Kronenberg et al. 2009; Sheline et al. 1998). Begründet wird die Volumenabnahme durch ein ständig erhöhtes, stressinduziertes Niveau von Glucocorticoiden dieser Patientengruppe, welches auf Dauer neurotoxisch wirken kann (Bellani et al. 2011; Henzen 2003; Lupien et al. 2007). Weiterhin beeinflussen Glucocorticoide sowohl die Gedächtnisausbildung als auch das Abrufen von bereits erlernten Informationen. Da all diese Prozesse durch die Amygdala moduliert werden (de Quervain et al. 2009; McGaugh et al. 2002), kann davon ausgegangen werden, dass die Amygdala sowohl eine beeinflussende Wirkung auf die Gedächtnisausbildung in anderen Gehirnarealen als auch die Aufgabe selber Informationen zu speichern hat (LeDoux 2000; Muller et al. 1997).

Weiterhin wird das serotonerge System mit anderen Störungen des Zentralnervensystems wie übertriebener Furcht und der Panikstörung (Baxter et al. 1995; Maron and Shlik 2006) und weiteren Erkrankungen wie der Schizophrenie (Eggers 2013) in Verbindung gebracht.

1.2 Der laterale Kern der Amygdala

Anatomisch betrachtet befindet sich der laterale Kern der Amygdala (LA) im dorsalen Bereich der Amygdala. Dort ist er medial von der externen Kapsel und lateral sowohl vom zentralen Kern der Amygdala als auch vom lateralen Hirnventrikel lokalisiert. Ventral des LA liegt der basale Kern der Amygdala (Pitkanen 2000).

Verschiedene Untersuchungen führen zu der Annahme, dass der hauptsächliche Neurotransmitter an exzitatorischen Projektionsneuronen im lateralen Kern der Amygdala Glutamat ist (Huang et al. 2000; Lin et al. 2001; Pollandt et al. 2003). Untersuchungen an Ratten zeigten, dass der LA circa 60.000 Neurone enthält, was etwa 10 % der Gesamtzahl an Neuronen einer Amygdala von ausgewachsenen Ratten entspricht (Pitkanen 2000).

1.2.1 Konnektivität und Funktion des LA

Der laterale Kern der Amygdala wird im Allgemeinen als Torwächter der Amygdala angesehen, da hauptsächlich in dieser Region die Informationen aus den sensorischen Systemen empfangen werden (Albrecht and von Bohlen und Halbach 2008; LeDoux 2007). Dazu gehören das visuelle, das auditive, das olfaktorische und gustatorische sowie das somatosensorische System (LeDoux 2007; Pitkanen 2000). Das somatosensorische System ist für die haptische Wahrnehmung verantwortlich, welche die Oberflächen- und die Tiefensensibilität umfasst, was die Wahrnehmung von mechanischen Reizen, von Temperaturreizen, Schmerzreizen und die Propriozeption ermöglicht. Die eingehenden Informationen sind in verschiedenen Graden von anderen Gehirnregionen wie dem Thalamus, dem Hippokampus und dem Kortex vorverarbeitet (LeDoux 2007; Pitkanen et al. 1997). Dabei sind die thalamischen Informationen nur in sehr geringem Maße vorverarbeitet, was einerseits eine schnelle andererseits aber eine unpräzise Informationsweitergabe an die Amygdala bedeutet (LeDoux 2007). Der Vorteil dieser schnellen aber unpräzisen Informationsweiterleitung ist eine rapide Reaktion auf eine potentielle Gefahrensituation. Die kortikalen Eingaben werden detaillierter verarbeitet und gewähren eine genauere Analyse der Umweltreize (LeDoux 2007), wodurch entweder eine begonnene Fluchtreaktion beibehalten und verstärkt oder aber abgebrochen werden kann.

Die Funktion eines Gehirnareals wird durch dessen Konnektivität definiert (LeDoux 2007). Somit bestehen wichtige Aufgaben in der Verarbeitung von gesehenen, gehörten, gerochenen, geschmeckten und gefühlten Informationen, wie z. B. dem Erkennen fröhlicher oder verärgelter Gesichter (LeDoux 2000), und der Reaktion auf diese Reize.

Weiterhin erhält die Amygdala Informationen von den Raphe-Kernen des Hirnstamms, von welchen etwa 10 % ihrer serotonergen Axone in die Amygdala strahlen (Ma et al. 1991). Bei Aktivierung (z. B. bei Stress) führt das in der Amygdala zu einem Anstieg der extrazellulären Serotoninkonzentration (Crawford et al. 2013). Es ist bekannt, dass Serotonin als Neurotransmitter eine modulierende Funktion bei Furcht und emotionalem Verhalten hat (Gordon and Hen 2004; Huang and Kandel 2007).

Somit besteht eine weitere Funktion des lateralen Kerns der Amygdala sowohl an dem Erlernen von Furcht als auch an der langfristigen Speicherung und dem Erinnern an die erlernte Furcht (LeDoux 2007).

Die durch den lateralen Kern der Amygdala verarbeiteten Informationen werden über verschiedene Amygdalakerne weitergeleitet. So können Signale an den basalen Kern und mehrheitlich über zwischengeschaltete Zellen (intercalated cells) in der Amygdala an den zentralen Kern weitergeleitet werden (LeDoux 2007; Pitkanen 2000). Sowohl der basale als auch der zentrale Kern der Amygdala leiten dann ihrerseits Signale an andere Hirnareale weiter, um entsprechende Regulationen (z. B. der Hormone, des Sympathikus und des Parasympathikus, von Instinkthandlungen) auszulösen (LeDoux 2007; Pitkanen et al. 1997). Weiterhin projiziert der LA direkt an den zentralen Kern und an den medialen Kern der Amygdala und er erhält auch Informationen z. B. aus dem basalen und dem medialen Kern der Amygdala (Pitkanen 2000). Vom LA führt auch eine direkte starke Konnektivität zum entorhinalen Kortex (Pikkarainen et al. 1999), welcher u. a. Funktionen bei der Gedächtnisbildung hat (Coutureau and Di Scala 2009).

1.3 Synaptische Plastizität

Synaptische Plastizität ist die Fähigkeit die Stärke einer synaptischen Verbindung zu verändern, also die synaptische Transmission zu modulieren. Es sind verschiedene Mechanismen bekannt, die teilweise zusammen wirken, um synaptische Plastizität zu bewirken. Dazu zählen die Veränderungen der Quantität der Transmitterfreisetzung in den

synaptischen Spalt sowie Veränderungen der Reaktionseffizienz von Zellen auf die freigesetzten Transmitter (Kaiser and Peters 2008). Die synaptische Plastizität ist der fundamentale Prozess, welcher dem Lernen und der Gedächtnisbildung zugrunde liegt (Albrecht and von Bohlen and Halbach 2008).

1.3.1 Extrazelluläre Ableitungen von Feldpotenzialen

Bei Feldpotenzialen handelt es sich um die Summation von elektrischen Strömen, die durch die synaptische Aktivität von Neuronen, also durch die Zellmembranen fließenden Ionenströme, entstehen und in einem begrenzten Umfeld zu einer Ableitelektrode gemessen werden können. Wenn mittels einer Stimulation über eine Reizelektrode Neuronen zur Ausbildung eines zeitgleichen Aktionspotenzials angeregt werden, so werden die daraufhin auftretenden, extrazellulären Potenzialänderungen (Summe von exzitatorischen und inhibitorischen postsynaptischen Strömen) in einem Radius von bis zu 350 μm von der Spitze der Ableitelektrode gemessen (Gray et al. 1995; Legatt et al. 1980). Durch die Messung von Feldpotenzialen können zusammen mit geeigneten Stimulationen sowohl Langzeit- als auch Kurzzeitpotenzierungen untersucht werden.

1.3.2 Die Langzeitpotenzierung im LA

Bei einer Langzeitpotenzierung (engl.: long-term potentiation – LTP) wird die synaptische Transmission von Neuronen nach einer entsprechenden Stimulation langanhaltend verstärkt (Brown et al. 1988). Es ist generell akzeptiert, dass das Phänomen der Langzeit-Potenzierung die zelluläre Basis für die Gedächtnisbildung darstellt (Barnes and Sharp 1999; Collingridge and Singer 1990; Staubli and Xu 1995). In der Forschung ist die LTP eines der vorherrschenden experimentellen Modelle, um die Mechanismen, welche der synaptischen Plastizität zugrunde liegen, eingehend studieren zu können.

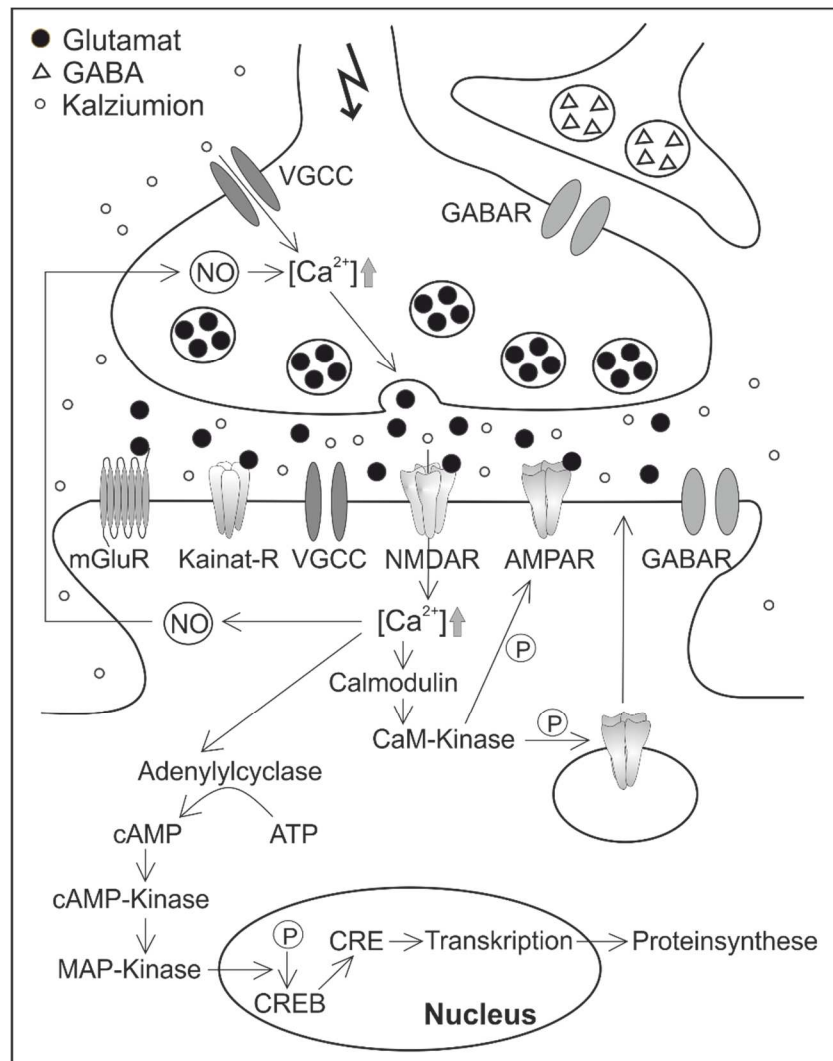


Abbildung 1: Mechanismen der Langzeitpotenzierung. Schematische Darstellung einer synaptischen Verbindung an dendritischen Dornfortsätzen mit prä- und postsynaptischen Komponenten sowie einem assoziierten Interneuron. Bei normaler synaptischer Transmission vermittelt Glutamat über postsynaptische Kainat- und AMPA-Rezeptoren eine Reizantwort. Durch starke Depolarisation werden die postsynaptischen NMDA-Rezeptoren deblockiert, was einen Ca^{2+} -Einwärtsstrom bewirkt. Dies führt zu einer Phosphorylierung von AMPA-Rezeptoren und zur Bildung und Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO). Die Folgen sind eine kurzfristige Steigerung der Glutamatfreisetzung und der postsynaptischen Reizantworten. Das induziert eine LTP. Bei der Aufrechterhaltung der LTP bewirkt die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung von Kinasen eine Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren (CREB) und dadurch die Aktivierung von Promotoren (CRE) mit der Folge einer veränderten Genexpression. Die synaptische Verbindung der beiden Neurone wird gestärkt. Eine Freisetzung von GABA aus einem assoziierten Interneuron würde über GABA-Rezeptoren vermittelt zu einer Hemmung der synaptischen Plastizität führen. Schematisch sind $GABA_A$ -Rezeptoren dargestellt. Abkürzungen: AMPAR – AMPA-Rezeptor; ATP – Adenosintriphosphat; CaM-Kinase – Ca^{2+} -Calmodulin-Kinase; cAMP – zyklisches Adenosinmonophosphat; cAMP-Kinase – cAMP-abhängige Kinase; CRE – cAMP response element; CREB – cAMP response element binding protein; GABAR – GABA-Rezeptor; MAP-Kinase – Mitogenaktivierte Proteinkinase; mGluR – metabotroper Glutamatrezeptor; NMDAR – NMDA-Rezeptor; P – Phosphat, VGCC – spannungsgesteuerter Kalziumionenkanal

Glutamat wird aus den synaptischen Vesikeln an der präsynaptischen Membran freigesetzt. An der postsynaptischen Membran bindet Glutamat an AMPA-Rezeptoren (AMPA - α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid), Kainatrezeptoren und NMDA-Rezeptoren (NMDA – N-methyl-D-Aspartat). Es werden aber nur AMPA- und Kainatrezeptoren aktiviert, wodurch ein Nettoeinstrom von Natriumionen ins Zytosol und damit eine Depolarisation der postsynaptischen Membran hervorgerufen wird. Bei dem NMDA-Rezeptor besteht nahe dem Ruhemembranpotenzial von etwa -70 mV eine Blockierung der Ionenpore durch ein extrazelluläres Magnesiumion. Diese Blockierung wird erst durch eine starke Depolarisierung aufgehoben.

Die synaptische Übertragungsstärke ergibt sich aus dem Produkt der Anzahl der Freisetzungstellen für einen Neurotransmitter, dessen Freisetzungswahrscheinlichkeit und der Amplitude des Quantenstroms an der postsynaptischen Membran. Die Anzahl der Freisetzungstellen kann durch Neuordnung der Synapsen, durch die Veränderung der Fläche einer Synapse sowie durch die Bereitstellung von mehr oder weniger synaptischen Vesikeln beeinflusst werden. Die Freisetzungswahrscheinlichkeit für den Neurotransmitter kann dadurch beeinflusst werden, wie leicht ein Vesikel mit der Membran fusionieren kann. Die Amplitude des Quantenstroms kann durch den Ein- oder Ausbau von AMPA-Rezeptoren (durch $[Ca^{2+}]$ -Erhöhung oder -Senkung) und durch deren Phosphorylierung oder Dephosphorylierung, was zu einer erhöhten oder einer herabgesetzten Öffnungswahrscheinlichkeit der Rezeptoren führt, verändert werden.

Wird ein exzitatorisches Neuron bspw. hochfrequent stimuliert, führt das zu einer hochfrequenten Abfolge von Aktionspotenzialen und daraus resultierend zu einer massiven Erregung der postsynaptischen Membran. Dadurch wird eine starke Depolarisation hervorgerufen, die zu der Deblockierung der NMDA-Rezeptoren führt (Bekkers and Stevens 1993; Mayer et al. 1984; Nowak et al. 1984). Wenn der nicht nur liganden- sondern auch spannungsgesteuerte NMDA-Rezeptor aktiviert wird, ist dessen Pore zusätzlich zu Natrium- und Kaliumionen auch für Kalziumionen permeabel. Verschiedene Untersuchungsmethoden wie z. B. die intrazelluläre Pufferung der Kalziumionen auf eine sehr niedrige Konzentration haben die Ausbildung einer LTP verhindert (Malenka et al. 1988). Der Kalziumioneneinstrom durch die geöffneten NMDA-Rezeptoren bewirkt einen Anstieg der Kalziumionenkonzentration im dendritischen Dornfortsatz (Malenka and Bear 2004). Daraufhin binden Kalziumionen an Calmodulin, welches die Kalzium-Calmodulin-Kinase (CaM-Kinase) aktiviert (Hayashi et al. 2000; Zhu et al. 2000), wodurch die AMPA-Rezeptorkanäle phosphoryliert werden (siehe Abbildung 1). Phosphoryliert sind die

AMPA-Rezeptoren sensitiver für Glutamat, was eine verstärkte Amplitude des Quantenstroms bewirkt (Benke et al. 1998; Lee et al. 2003; Soderling and Derkach 2000). Weiterhin wird die Produktion eines retrograden Botenstoffes ausgelöst (Bear and Malenka 1994). Dieser bewirkt dann eine verstärkte Neurotransmitterfreisetzung bei jedem an der präsynaptischen Membran ankommenden Nervenimpuls. Stickstoffmonoxid (NO) ist ein sehr wahrscheinlicher Kandidat für den retrograden Botenstoff (Stevens 1993). Dieser Vorgang stellt die frühe Phase der Induktion der LTP dar.

Es wird davon ausgegangen, dass bei der Etablierung einer LTP Proteine neu synthetisiert werden müssen (Huang et al. 2000). Diese durch den Kalziumioneneinstrom in den dendritischen Dornfortsatz ausgelöste Kaskade, welche zur Proteinsynthese führt (Kandel 1997), trägt zur Stabilisierung der Veränderungen über eine lange Zeit bei (LeDoux 2000). Untersuchungen haben gezeigt, dass die Ausbildung einer LTP durch eine Inhibition der Proteinsynthese verhindert werden kann (Frey et al. 1988; Krug et al. 1984; Ris et al. 2009; Taha et al. 2013). Die erhöhte Kalziumionenkonzentration führt zu einer verstärkten Aktivität der Adenylylcyclase, wodurch vermehrt zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) gebildet wird, was zu der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP response element binding protein) führt. Dieser Faktor bewirkt letztlich die Transkription verschiedenster Gene, die zur Bildung und den Einbau neuer AMPA-Rezeptoren führen (Song and Huganir 2002; Zhu et al. 2000) und zur Neubildung von Synapsen führen können. Diese Vorgänge stellen die späte Phase der Aufrechterhaltung der induzierten LTP dar.

Es ist bekannt, dass der NMDA-Rezeptor an der postsynaptischen Membran von Projektionsneuronen des LA lokalisiert ist (Albrecht and von Bohlen und Halbach 2008; Farb and LeDoux 1997; Farb and LeDoux 1999). Damit eine LTP an einer chemischen, exzitatorischen Synapse zweier Neuronen im LA ausgebildet werden kann, ist die Öffnung der NMDA-Rezeptoren von entscheidender Bedeutung (Huang and Kandel 1998; Malenka et al. 1988; Schroeder and Shinnick-Gallagher 2004; Tsvetkov et al. 2002).

Im lateralen Kern der Amygdala wurde zuerst eine LTP *in vitro* in horizontalen Gehirnschnitten nach einer Stimulation von Fasern der externen Kapsel (EC - Capsula externa) charakterisiert (Chapman et al. 1990). Es wurde gezeigt, dass durch EC-Reizung erregende Afferenzen aus dem Kortex im LA aktiviert werden (von Bohlen und Halbach and Albrecht 2002). Eine stabile LTP im LA von horizontalen Gehirnschnitten kann sowohl durch kurze tetanische Reizung an der externen Kapsel als auch intranukleär initiiert werden

(Albrecht and von Bohlen und Halbach 2008; Drephal et al. 2006; Schubert et al. 2005). Eine intranukleäre Stimulation aktiviert zusätzlich Afferenzen von anderen Kernen der Amygdala (von Bohlen und Halbach and Albrecht 2002).

Abhängig von der hochfrequent gereizten Struktur bestehen Unterschiede darin, ob die Ausbildung einer LTP nur NMDA-rezeptorgesteuert ist. Es wurde gezeigt, dass bei intranukleärer Reizung die LA-LTP lediglich durch den NMDA-Rezeptor vermittelt wird und das bei Reizung der externen Kapsel zusätzlich L-Typ spannungsabhängige Kalziumionenkanäle involviert sind (Drephal et al. 2006). Dies deutet auf eingangsspezifische Eigenschaften der Plastizität des lateralen Kerns der Amygdala hin (Albrecht and von Bohlen und Halbach 2008).

Weiterhin ist bekannt, dass die Etablierung einer LA-LTP in coronalen Gehirnschnitten von Ratten von L-Typ spannungsgesteuerten Kalziumionenkanälen abhängig sein kann (Bauer et al. 2002). In Untersuchungen an coronalen Gehirnschnitten von Mäusen konnte eine Abhängigkeit der LA-LTP-Etablierung vom metabotropen Glutamatrezeptor Typ 7 nachgewiesen werden (Fendt et al. 2013).

1.3.3 prä- und postsynaptische Eigenschaften von Projektionsneuronen

Projektionsneurone sind Neurone, deren Axone in andere Gehirnregionen oder als Efferenzen in andere Organe des Körpers reichen (Cederquist et al. 2013; Hevner 2006; O'Leary and Koester 1993). Sie projizieren in andere Körperabschnitte (Cederquist et al. 2013; O'Leary and Koester 1993). Als Neurotransmitter dient den Projektionsneuronen Glutamat. Somit stellen sie lange, exzitatorische Verbindungen dar, was sie von den lokal wirkenden Interneuronen unterscheidet, welche den Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA - engl.: γ -aminobutyric acid) freisetzen und inhibitorische Funktionen ausüben (Hevner 2006; Merot et al. 2009).

Werden Ionenströme im whole-cell patch-clamp Verfahren (siehe Abschnitt 2.5) gemessen, so können deren Frequenzen und Amplituden registriert und analysiert werden. Dabei sind durch Änderungen der Frequenz Rückschlüsse auf präsynaptische Einflüsse möglich (Cormier and Kelly 1996; Cummings et al. 1996), was eine gewisse Vergleichbarkeit mit Ergebnissen aus extrazellulären Doppelpulsreizungen erlauben kann, und durch

Änderungen der Amplituden sind Aussagen über Veränderungen an der postsynaptischen Membran möglich (Cormier and Kelly 1996; Cummings et al. 1996).

Entscheidend für Veränderungen der prä- und/oder postsynaptischen Aktivität ist die direkte oder indirekte Aktivierung bzw. Hemmung von Ionenkanälen durch entsprechende Transmitter, wodurch präsynaptisch die Freisetzungsrates von Neurotransmittern und postsynaptisch die Intensität der Reizantwort sowie unter Umständen die Bildung von retrograden Botenstoffen beeinflusst wird.

Postsynaptisch sind der NMDA-Rezeptor (Albrecht and von Bohlen und Halbach 2008; Farb and LeDoux 1997; Farb and LeDoux 1999) sowie die beiden anderen ionotropen Glutamatrezeptoren, AMPA- und Kainat-Rezeptoren, lokalisiert (Albrecht and von Bohlen und Halbach 2008; Mahanty and Sah 1999).

Es ist bekannt, dass präsynaptisch der Cannabinoid Rezeptortyp 1 (CB1-Rezeptor) lokalisiert ist, welcher blockierend auf spannungsgesteuerte Kalzium- sowie aktivierend auf spannungsgesteuerte Kaliumionenkanäle wirkt (Schlicker and Kathmann 2001), wodurch seine Aktivierung eine hemmende Wirkung auf die Neurotransmitterfreisetzung exzitatorischer Neuronen hat (Gerdeman and Lovinger 2003; Ronesi et al. 2004). Auch auf Interneuronen wurde der CB1-Rezeptor präsynaptisch beschrieben (Alle and Geiger 2007; Azad et al. 2004). Weiterhin legen Untersuchungen nahe, dass der NMDA-Rezeptor auch präsynaptisch lokalisiert sein könnte (Gracy and Pickel 1995; Humeau et al. 2003).

1.4 Der TRPV1-Rezeptor

Zur Familie der TRP-Rezeptoren (Transient Receptor Potential) gehört die Vanilloid-TRP-Unterfamilie. Ein Kanal dieser Unterfamilie ist der Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) (Caterina et al. 1997; Goswami et al. 2010).

Es ist bekannt, dass der TRPV1-Rezeptor in vielen Gehirnarealen der Mammalia ausgebildet ist. Dazu gehören u. a. das Cerebellum (Kleinhirn), das Mesencephalon (Mittelhirn) und im Telencephalon (Großhirn) Strukturen wie der Kortex, der Thalamus, der Hypothalamus, die Amygdala und der Hippokampus (Cristino et al. 2006; Mezey et al. 2000; Toth et al. 2005). Weiterhin kommt der Rezeptor in afferenten, nozizeptiven Nervenfasern und in nozizeptiven Arealen der Medulla spinalis (dem Rückenmark) vor (Caterina et al. 1997; Matta and Ahern 2011; Yang et al. 1998). In der zum Mesencephalon

gehörenden Substantia nigra konnten präsynaptisch TRPV1-Rezeptoren nachgewiesen werden (Marinelli et al. 2003). In kortikalen Neuronen gibt es Hinweise, dass der Rezeptor sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert ist (Goswami et al. 2010). Zusätzlich wird der TRPV1-Rezeptor auch in anderen Körperzellen als Neuronen exprimiert, wobei die jeweiligen Funktionen teils noch zu klären sind (Starowicz et al. 2008).

Der TRPV1-Rezeptor ist ein nichtselektiver Kationenkanal, welcher für Kalziumionen knapp zehnmal durchlässiger als für Natriumionen ist (Caterina et al. 1997; Matta and Ahern 2011). Seine Aktivierung bewirkt demnach eine Depolarisierung der Zellmembran, wodurch er sowohl die spontane als auch die evozierte Freisetzung von Neurotransmittern beeinflussen kann (Marinelli et al. 2003; Matta and Ahern 2011). Er selbst kann durch verschiedene Stimuli aktiviert werden. Dazu zählen Zellschäden verursachende Temperaturen von etwa 43 °C und mehr (Caterina et al. 1997; Trevisani et al. 2002) oder erhöhte Protonenkonzentrationen (Caterina et al. 1997; Matta and Ahern 2011). TRPV1-Rezeptor-liganden sind Vanilloide wie das Capsaicin (exogen) (Caterina et al. 1997) oder N-Oleoyldopamin (endogen) (Chu et al. 2003) sowie das Cannabinoid Anandamid (endogen) (Ross 2003), welches seine Wirkung im Gehirn hauptsächlich auf den Cannabinoid Rezeptortyp 1 ausübt (Cella et al. 2008). Ebenfalls besitzt der TRPV1-Kanal konservierte Cysteinreste, welche eine Reaktion auf Stickstoffmonoxid vermitteln (Yoshida et al. 2006). Zusätzlich kann der TRPV1-Rezeptor durch Ethanol aktiviert werden (Blednov and Harris 2009). Es gibt Hinweise dafür, dass der TRPV1-Rezeptor auch unter normalen physiologischen Bedingungen strukturell bedingt eine gewisse permanente Öffnungswahrscheinlichkeit hat (Marinelli et al. 2003).

Neben der Schmerzwahrnehmung im peripheren Nervensystem hat der TRPV1-Rezeptor eine wichtige physiologische Funktion beim Auftreten und dem Erlernen von Furcht, da bei TRPV1-knockout Mäusen beides reduziert ist (Marsch et al. 2007). Weiterhin wird über Funktionen bei der Regulation der Körpertemperatur, der Bewegung und dem Erbrechen diskutiert (Starowicz et al. 2008).

Studien zeigen, dass über längere Zeit erhöhte Capsaicinkonzentrationen zur Desensibilisierung von Nozizeptoren führen, weswegen Capsaicin in der Schmerztherapie eingesetzt werden kann (Szallasi and Blumberg 1996). Es ist bekannt, dass eine leichte Erhöhung der Protonenkonzentration (pH 6 - 7) den TRPV1-Rezeptor für andere Stimuli sensibilisieren kann (Matta and Ahern 2011). Weiterhin löst Serotonin in Schmerzfasern eine Sensibilisierung von TRPV1-Rezeptoren aus (Loyd et al. 2011).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die positiv auf die Gesundheit wirkenden Omega-3-Fettsäuren im Gehirn auf den TRPV1-Kanal einen Einfluss haben und ihn je nach Öl aktivieren oder hemmen können (Matta et al. 2007).

1.5 Stress und die Amygdala

Als Stress werden starke physische oder psychische Reize bezeichnet, die bestimmte Reaktionsmuster eines Organismus auslösen. Diese Einflüsse können Umweltbedingungen, Krankheiten, extreme Situationen oder emotionale Belastungen sein, welche die Fähigkeit zur Bewerkstelligung der Belastungen stark beansprucht oder gar übersteigt und dabei physische, kognitive sowie emotionale und dadurch auch Verhaltensveränderungen bewirken können (Arnold et al. 2011; Gerrig and Zimbardo 2008).

Es konnte gezeigt werden, dass die Amygdala wesentlich an der Regulierung von Stresseffekten auf die Gedächtnisbildung beteiligt ist (McGaugh and Roozendaal 2002). Moderater Stress erhöht die Konsolidierung von Erlebten, wobei die Aktivierung der Amygdala für eine verstärkte Speicherung der verschiedenen Informationen durch ihr weit verzweigtes Netz an Projektionsneuronen in andere Gehirnareale verantwortlich zu machen ist (Roozendaal et al. 2009). Der basolaterale Komplex der Amygdala (BLA), zu dem der laterale, der basale und der akzessorisch basale Kern gezählt werden, ist bei diesen Vorgängen entscheidend (Roesler et al. 2002; Roozendaal et al. 2009). Evolutionär gesehen sind die stressbedingten Gedächtniswirkungen demzufolge neuere Funktionen der Amygdala. Wenn extreme emotionale Ereignisse oder chronische Stresssituationen erlebt werden, kann dies zu traumatischen Erinnerungen und sogar zu ernsthaften gesundheitlichen Problemen wie Depressionen, Angst- und Belastungsstörungen oder in sehr schweren Fällen zu posttraumatischen Belastungsstörungen führen (Ahmari et al. 2013; Roozendaal et al. 2009; Rosenkranz et al. 2010).

Der Forced Swimming Test, bei dem Ratten oder Mäuse zum Schwimmen gezwungen sind (siehe Abschnitt 2.3), ist eine Stresssituation und bewirkt als solche einen Anstieg der Corticoidkonzentration im Blut (Ahmed et al. 2006; Korz and Frey 2003; Patel et al. 2004). Die durch Stressinduktion gebildeten Corticoidhormone (Henzen 2003; Lupien et al. 2007) beeinflussen das Erlernen und Abrufen von Informationen in der Amygdala (de Quervain et al. 2009; McGaugh et al. 2002). Es ist bekannt, dass chronischer Stress zu einer

gesteigerten Erregbarkeit der Amygdala von Ratten führt (Roozendaal et al. 2009) und Untersuchungen mit physiologischen Konzentrationen von Corticoiden zeigten im BLA eine erhöhte Erregbarkeit von Projektionsneuronen und einen verminderten Einfluss von inhibitorischen Interneuronen (Duvarci and Pare 2007). Durch neurotoxische Läsionen des BLA konnte die verstärkte Erregbarkeit geblockt werden (Roozendaal et al. 1996). Weiterhin werden bei Stress die Raphe-Kerne aktiviert, wodurch ihre serotonergen Neurone in den entsprechenden Gehirnregionen, in die sie projizieren (u. a. in die Amygdala), Serotonin freisetzen (Crawford et al. 2013; Ma et al. 1991), welches dann einen Einfluss auf die Aktivität der Amygdala hat. Serotonin beeinflusst grundlegende biologische Funktionen wie zum Beispiel den Schlaf, den circadianen Rhythmus, Appetit, kognitive Leistungen (Mann 1999) oder den Augeninnendruck (Costagliola et al. 2008). Somit ist das serotonerge System auch an verschiedenen psychiatrischen Erkrankungen wie Essstörungen, Alkoholismus, suizidalem Verhalten (Mann 1999), der Panikstörung (Maron and Shlik 2006), bei Zwangsstörungen (Kellner 2010) oder der rezidivierenden depressiven Störung (Ruhe et al. 2006) beteiligt. Wie in vielen anderen Hirnstrukturen auch wird Serotonin in der Amygdala sowohl unter physiologischen als auch pathophysiologischen Bedingungen freigesetzt (Crawford et al. 2013; Rueter and Jacobs 1996).

Eine wichtige Funktion von Stress ist die Induktion von langfristig angepassten Reaktionen (McEwen 1998). Dazu zählt das Erinnern von belastenden und emotional sehr bewegenden Geschehnissen (Roozendaal et al. 2009). Dies ist nicht nur auf unangenehme oder aversive Ereignisse beschränkt, sondern gilt genauso für angenehme Situationen (Roozendaal et al. 2009).

Untersuchungen haben gezeigt, dass unter normalen physiologischen Bedingungen die Corticoidaktivität synchron mit dem circadianen Rhythmus oszilliert und dass dies wichtig sowohl für die Ausbildung neuer synaptischer Verbindungen als auch für deren Stabilisierung und somit entscheidend für die Langzeitplastizität ist (Liston et al. 2013). In der gleichen Studie konnte gezeigt werden, dass chronische und sehr hohe Dosen an Corticoiden zum Verlust neuer Erinnerungen führen.

1.6 Fragestellung

In den bisherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Capsaicin die LA-LTP rezeptorspezifisch reduziert. Das TRPV1-Protein konnte durch immunhistochemische Methoden im LA nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe hat eine Beteiligung sowohl des Cannabinoid Rezeptortyps 1 als auch des retrograden Neurotransmitters Stickstoffmonoxid an den Wirkungen von Capsaicin gezeigt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Suppression der LA-LTP ohne Beteiligung der GABAergen Interneurone zustande kommt. Deshalb konzentriert sich diese Arbeit auf glutamaterge Projektionsneurone des lateralen Kerns der Amygdala, um die Wirkungsweise von TRPV1-Agonisten auf die synaptische Plastizität weiter aufzuklären. Schwerpunkte der Arbeit stellen die Auswirkungen einer TRPV1-Rezeptoraktivierung unter verschiedenen Bedingungen sowie die detaillierte Untersuchung der Wirkungsweise möglicher Sensibilisatoren des TRPV1-Rezeptors im LA dar. Ausgehend von den bisherigen Befunden werden folgende Fragestellungen und Hypothesen zu klären sein:

1. Es ist bekannt, dass der TRPV1-Rezeptor durch Isofluran sensibilisiert wird (Cornett et al. 2008; Harrison and Nau 2008; Matta et al. 2008). Es wird postuliert, dass Isofluran, welches zur Narkose der Mäuse vor der Dekapitierung verwendet wird, die synaptische Plastizität im LA modifiziert. Da Isofluran sowohl die glutamaterge als auch die GABAerge Transmission beeinflusst (Ranft et al. 2004; Simon et al. 2001), wird bei Verwendung von Isofluran eine reduzierte Amplitude der LA-LTP erwartet. Dieser Effekt sollte durch Capsaicin umkehrbar sein.

2. Obwohl in früheren Versuchen der Arbeitsgruppe Capsazepin als TRPV1-Rezeptorantagonist in der Lage war, in hohen Konzentrationen den Effekt von CPS auf die LA-LTP zu blockieren, muss der Nachweis des rezeptorspezifischen Effekts von TRPV1-Rezeptoragonisten durch den Einsatz von TRPV1-knockout-Mäusen verifiziert werden, weil Rezeptorantagonisten auch unspezifische Wirkungen entfalten können.

In TRPV1-gendefizienten Mäusen sollte der Effekt von Capsaicin auf die LA-LTP nicht mehr nachweisbar sein.

3. Eine Aktivierung der TRPV1-Rezeptoren durch Capsaicin kann stressbedingte Wirkungen auf die Plastizität im Hippokampus reduzieren (Li et al. 2008). Demzufolge müsste eine Aktivierung der TRPV1-Rezeptoren auch stressinduzierte Wirkungen im lateralen Kern der Amygdala reduzieren oder sogar vollständig aufheben können.

4. Eine Sensibilisierung der TRPV1-Rezeptoren im lateralen Kern der Amygdala könnte durch direkte Substanzeinwirkungen (z. B. von Isofluran oder Ethanol) oder über second messenger Kaskaden (wie sie z. B. durch Serotonin-Rezeptoren vermittelt werden könnten) zustande kommen.

5. Es wird postuliert, dass die Wirkungen des Capsaicins sowohl durch prä- als auch durch postsynaptische TRPV1-Rezeptoren zustande kommen.

6. In der Amygdala von Mäusen, denen das Gen für die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) fehlt, wurde eine signifikant verringerte LTP gemessen, welche durch eine zusätzliche Applikation von Capsaicin nicht weiter reduziert wurde (Zschenderlein et al. 2011). Zusätzlich führt die Applikation von Capsaicin zu einer verstärkten Expression der nNOS (Okere et al. 2000). Dies führt zu der Hypothese, dass eine TRPV1-Rezeptoraktivierung eine verstärkte NO-Synthese hervorrufen kann. Dies sollte besonders während und direkt nach einer Hochfrequenzstimulation der Fall sein.

7. Aufgrund der Freisetzung von Serotonin aus den Projektionsneuronen der Raphe-Kerne in der Amygdala bei stress-induzierten Situationen muss von einer Beeinflussung der Transmission im LA durch Serotonin ausgegangen werden.

8. Wegen der Relevanz von Serotonin bei der Behandlung von Depressionen und aufgrund einer hypothetischen Involvierung von TRPV1-Rezeptoren bei der Wirkung von Antidepressiva soll eine Analyse der funktionalen Serotoninrezeptoren an glutamatergen Neuronen des lateralen Kerns der Amygdala erste Befunde zu einem eventuell dominanten Serotoninrezeptor an den Projektionsneuronen ermöglichen.

2. Methoden

Für diese Promotion wurden ausschließlich männliche Mäuse verwendet. Die Haltung der Mäuse erfolgte unter standardisierten Bedingungen (Raumtemperatur: 22 ± 1 °C; relative Luftfeuchtigkeit von rund 60 %; automatisierter 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus; Futter und Wasser frei verfügbar; Anreicherungsmaterialien). Für verschiedene Untersuchungen wurden unterschiedliche Mäusestämme verwendet. Die Stämme C57BL/6J und C57BL/6N wurden von Harlan Winkelmann, The Jackson Laboratory und der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der Charité bezogen und die TRPV1-KO wurden von The Jackson Laboratory geliefert.

Die durchgeführten Experimente erfolgten nach den Tötungsanzeigen beim Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin T0344/05 und T0381/11 bzw. für die Forced Swimming Tests nach der genehmigungspflichtigen Tierversuchsanzeige bei dem Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin G0354/09. Alle Versuche wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen „Animal Welfare Act“ vom 25. Mai 1998 durchgeführt und an die „European Communities Council Directive“ vom 24. November 1986 (86/609/EEC) angepasst.

2.1 Narkose und Präparation

2.1.1 Narkose

Ein Haupteffekt einer Allgemeinanästhesie ist die Unterdrückung des Bewusstseins (Schneider and Kochs 2007). Weiterhin muss eine Immobilisierung, Analgesie und eine Amnesie erreicht werden (Hudetz 2012; John and Prichep 2005). Die molekularen Mechanismen, welche einer Anästhesie zugrunde liegen, sind bisher noch nicht geklärt (Soholm and Olsen 2013). Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass zum Erreichen der Ziele einer Narkose verschiedene Gehirnareale durch die Anästhetika beeinflusst werden müssen (Chortkoff et al. 1995a; Chortkoff et al. 1995b; John and Prichep 2005). Als mögliche Mechanismen einer Narkose werden die Hyperpolarisation thalamischer und kortikaler

Zellmembranen, die Unterdrückung des Mittelhirns, Pons und der thalamokortikalen Schleifen durch Inhibition glutamaterger und cholinergischer Neurotransmission, sowie der Verstärkung von GABA-Rezeptortyp A-vermittelter (GABA_A-Rezeptor) Neurotransmission diskutiert (John and Prichet 2005; Schneider and Kochs 2007).

Um bei einer Maus eine Narkose einzuleiten, wurde entweder Isofluran oder Diethylether verwendet. Das jeweilige Betäubungsmittel wurde in ein mit Zellstoff ausgekleidetes Glasgefäß gegeben und mit einem Glasdeckel verschlossen. Beide Mittel sind stark flüchtig, wodurch es möglich war, eine Maus schon nach einer Minute für die Betäubung in das Gefäß zu setzen. Durch das Inhalieren des Betäubungsmittel-Luft-Gemischs wurden die Mäuse innerhalb kürzester Zeit bewusstlos und konnten für die anschließende Präparation aus dem Gefäß entnommen werden. Es musste darauf geachtet werden, dass eine Maus sofort nach dem Eintreten der Bewusstlosigkeit dem Gefäß entnommen wird, damit eine durch weiteres Inhalieren herbeigeführte tiefere Narkose keine Auswirkungen auf die Messungen haben könnte.

Bei einigen Tieren wurde im Rahmen einer Untersuchung keine Narkose durchgeführt, was ebenfalls den Behörden angezeigt und von diesen genehmigt wurde.

2.1.2 Präparation von horizontalen Gehirnschnitten

Nachdem die Maus dem Gefäß entnommen wurde, erfolgte die Dekapitation. Das Gehirn wurde freipräpariert, indem zunächst die Kopfhaut median eingeschnitten und zur Seite geklappt wurde. Anschließend wurde die Schädeldecke median von spinal nach rostral in der Sagittalebene eingeschnitten und die Scheitelbeine (Os parietale) jeweils nach lateral abgeklappt. Sollten noch Teile der Pia mater encephali dem Cerebrum aufgelegt haben, wurden diese vorsichtig entfernt, damit sie im nächsten Schritt keinen Schaden am Telencephalon (Großhirn) verursachen konnten. Mit einem Spatel, der zwischen den Schädelknochen und dem Großhirn entlang auf die caudale Seite des Telencephalons geführt wurde, erfolgte die Gehirnentnahme. Das Organ wurde sofort in eisgekühltes und mit Carbogen begastes ACSF (artificial cerebrospinal fluid – künstliche Zerebrospinalflüssigkeit; Zusammensetzung: 129 mM NaCl, 1,25 mM NaH₂PO₄, 10 mM D-(+)-Glucose, 1,8 mM MgSO₄, 1,6 mM CaCl₂, 3 mM KCl und 21 mM NaHCO₃) überführt. Um eine Schädigung des Gehirns durch Sauerstoffmangel zu verhindern, durfte dieser Vorgang

keinesfalls länger als vier Minuten dauern. Durch das Begasen des ACSF mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) war zum einen die Sättigung der Lösung mit O₂ gewährleistet und zum anderen wurde durch CO₂ der pH der Lösung konstant bei ca. 7,4 gehalten. Als nächstes erfolgte die Vorbereitung für das Anfertigen der Gehirnschnitte.

Für die extrazellulären Messungen erfolgte das Schneiden des Gehirns in dünne Gewebescheiben mit dem Motorized Advanced Vibroslice (World Precision Instruments). Die auf -18 °C gekühlte Schneidekammer wurde in das Gerät eingespannt und die Klinge positioniert. Auf einer ebenfalls auf -18 °C gekühlten Petrischale erfolgte die weitere Präparation. Dafür wurde das Gehirn dem ACSF entnommen und mit der caudalen Seite auf die Petrischale gelegt. Die Hemisphären wurden mit einer Rasierklinge voneinander getrennt und auf die Schnittflächen in Sagittalebene gelegt. Jeweils etwa 1 – 2 mm der dorsalen Enden der Hemisphären wurden abgeschnitten und die Hemisphären auf diese Schnittflächen gelegt. Mittels Filterpapierstreifen (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) wurden diese in die Schneidekammer überführt, in der sie auf einem Sockel mit Cyanoacrylat-Kleber (einem Sekundenkleber; UHU GmbH & Co. KG) fixiert wurden. Der Kleber wurde vor diesem Präparierschritt dünn auf die entsprechenden Stellen des Sockels aufgetragen. Anschließend wurde die Kammer mit dem eisgekühlten ACSF aufgefüllt, so dass das Gewebe wieder von Nährflüssigkeit umgeben war. Auch diese Phase der Präparation musste in weniger als vier Minuten durchgeführt worden sein, damit das Gewebe außerhalb des ACSF keine Schädigungen durch Sauerstoffmangel erleidet. Mit dem Vibroslicer wurden 400 µm dünne Schnitte (horizontal) angefertigt und in die Interfacekammern überführt, welche konstante Bedingungen von 35 ± 1 °C und Carbogenbegasung aufwiesen. In jeder Interfacekammer gewährleisteten vier Schichten von Linsenpapier (Kodak) (zwei auf dem Boden der gesamten Kammer, zwei unter jedem Schnitt) eine kontinuierliche Perfusion der Schnitte mit ACSF. Es herrschte eine Wasserdampf enthaltende Carbogenatmosphäre in jeder Interfacekammer, die die Schnitte auch vor dem Austrocknen schützte. Mit den Experimenten wurde nach zwei Stunden begonnen, damit die durch das Schneiden in den Neuronen stark hochregulierten second Messenger Kaskaden wieder herunter reguliert werden konnten.

Für die whole-cell patch-clamp Messungen verliefen die weiteren Präparationsschritte relativ ähnlich. Unterschiede bestanden jedoch einerseits im verwendeten Gerät (Leica VT 1200 S) andererseits wurden 350 µm dünne Schnitte (horizontal) hergestellt. Die Schnitte wurden nach dem Schneiden in ein Becherglas mit einzelnen Kammern überführt, in denen sie von mit Carbogen gesättigtem ACSF umgeben waren. Nachdem alle

Gewebeschnitte angefertigt waren, wurden die Schnitte für 20 Minuten in einem 35 °C Wasserbad inkubiert und danach bei Raumtemperatur verwahrt.

Zum Schluss beider Präparationsmethoden konnte angegeben werden, welcher Gewebeschnitt (von caudal nach dorsal) von welcher Hemisphäre wo platziert wurde.

Die horizontalen Gehirnschnitte enthalten unter anderem verschiedene amygdaläre Kerne wie den lateralen Kern der Amygdala, den basolateralen, den zentralen und den medialen Kern der Amygdala genauso wie Teile des entorhinalen Kortex (von Bohlen und Halbach and Albrecht 1998). Diese Hirnschnitte weisen funktionale Verbindungen zwischen den verschiedenen Arealen auf, so dass sie für physiologische Untersuchungen geeignet sind.

2.2 Extrazelluläre Ableitungen von Feldpotenzialen

Bei Feldpotenzialmessungen werden extrazelluläre Potenzialänderungen im Ionenstrom registriert, welche auf einen künstlichen Reiz hin in Gewebeschnitten ausgelöst und mittels einer Ableitelektrode gemessen werden können.

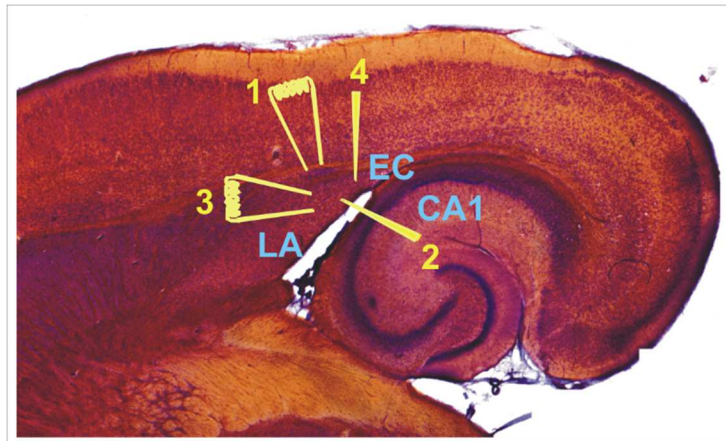


Abbildung 2: Lokalisation der Elektroden im horizontalen Gehirnschnitt. Zu sehen ist ein Ausschnitt eines Gehirnschnittes. Mittig im Bild ist der laterale Kern der Amygdala (LA) lokalisiert. Daneben ist der Hippokampus zu sehen (als markiertes Beispiel die CA1-Region). Positionierung der Elektroden: 1 – Reizelektrode für die Reizung der Externen Kapsel (EC); 2 – Ableitelektrode für die EC-Reizung; 3 – Reizelektrode für die intranukleäre Reizung (IN); 4 – Ableitelektrode für die IN-Reizung. (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Oliver von Bohlen und Halbach).

Aus einer Präparation konnten sechs bis sieben Gehirnschnitte gewonnen werden, die Anteile des lateralen Kerns der Amygdala (LA) enthielten. Die Messungen erfolgten an zwei Messplätzen gleichzeitig. Jeder Messplatz hatte einen Versuchsaufbau mit zwei Interfacekammern. Für die Messungen wurde eine bipolare Reizelektrode entweder auf die externe Kapsel (EC - Capsula externa) oder intranukleär (IN) im LA und eine mit ACSF gefüllte Ableitelektrode auf dem LA positioniert (siehe Abbildung 2).

Die Elektroden wurden durch je einen Magnet-Mikromanipulator gehalten, die genau wie die Messkammern an der magnetischen Oberfläche der schwingungsarm gelagerten Arbeitstische befestigt waren. Dadurch wurde sichergestellt, dass sich die Position der Elektroden im Verhältnis zu den Gehirnschnitten nicht veränderte. Durch die PC-Software Signal 4.0 (Cambridge Electronic Design) und über den Analog-Digital-Wandler MicroCED 1401 wurde über eine Stimulator Unit die Impulsgabe an die Reizelektrode gesteuert. Das resultierende Feldpotenzial wurde über die Ableitelektrode gemessen, durch einen Vor- und einen Nachverstärker (10fach bzw. 100fach) vergrößert und über den Analog-Digital-Wandler durch die Signal 4.0-Software registriert. Durch ein für dieses Programm geschriebenes Script (Dr. H. Siegmund) konnten die Amplituden während der Messung dargestellt und über die Zeit analysiert werden. Die aufgezeichneten Daten wurden später nochmals offline ausgewertet. Um elektrische Störsignale während der Messungen weitestgehend zu vermeiden, wurden die Arbeitstische, die Interfacekammern und alle Geräte geerdet und der Messplatz abgeschirmt.

Eine Reizelektrode bestand aus einer zweikammrigen sich an der Spitze verjüngenden Glaskapillare (Thetaglas), bei der in jede Kammer ein circa 5 cm langer Platindraht (\varnothing 0,051 mm), der am anderen Ende mit einem circa 7 cm langen Silberdraht (\varnothing 0,2 mm) verlötet war (beide von Science Products GmbH, Hofheim), eingeführt wurde, so dass er aus der Verjüngung herausragte. Um eine Berührung der Drähte miteinander zu vermeiden wurden zum einen die Platindrähte am spitzen Ende der Kapillare mit Schellack und zum anderen die Silberdrähte am weiten Ende der Glaskapillare mit Siegelwachs voneinander getrennt fixiert. Die herausragenden Platindrähte wurden auf einige Millimeter gleich lang abgeschnitten und die Enden in einen Abstand von unter einem Millimeter zueinander gebracht. Die Platindrähte wurden bei der Messung auf den Schnitt gesetzt und die Silberdrähte mit der Stimulator Unit verbunden.

Die sich ebenfalls verjüngenden Ableitelektroden wurden aus Borsilikatglaskapillaren (1B120F-4, Science Products GmbH, Hofheim) gezogen. Nach kontrolliertem Abbrechen

der Spitzen und dem Befüllen der Kapillaren mit ACSF-Lösung lagen die Widerstände zwischen 3 und 8 M Ω . Im Lumen der Ableitelektrode befand sich bei der Messung ein chlorierter Silberdraht, der an den Vorverstärker angeschlossen war und die Feldpotenzialdifferenzen weiterleitete.

Um mögliche Unterschiede von Tag zu Tag und tageszeitliche Unterschiede in den Messergebnissen zu vermeiden, wurden die jeweiligen Gruppen in einer Versuchsreihe alternierend und jeden Messtag in unterschiedlichen Reihenfolgen gemessen. Ebenso wurden die verschiedenen Schnitte aus den Hemisphären jeden Tag an andere Plätze in den Interfacekammern platziert, um eventuelle Unterschiede durch die Platzierung zu vermeiden.

2.2.1 Die Langzeitpotenzierung

Um Aussagen zur basalen Transmission treffen zu können, wurde zunächst eine Input/Output-Kurve (I/O) erstellt. Mit einer Reizstärke wurden im Abstand von jeweils zehn Sekunden sechs Impulse appliziert und dann gemittelt. Die Reizstärke wurde in Schritten von 0,5 V erhöht. Es wurde die Spannung ($U_{I_{max}}$) ermittelt, bei der die maximale Amplitude der Reizantwort des Feldpotenzials (I_{max}) hervorgerufen werden konnte. Im Anschluss wurde diejenige Spannung ($U_{I_{50}}$) bestimmt, bei der die Hälfte der maximalen Amplitude des Feldpotenzials gemessen werden konnte. Mit der so ermittelten Spannung wurden die weiteren Messungen durchgeführt.

Für die Messung der Langzeitpotenzierung (LTP – long-term potentiation) wurde für 30 Minuten alle zehn Sekunden ein Puls appliziert und das Feldpotenzial gemessen. Wenn die Amplitudengrößen konstant blieben, wurde eine Hochfrequenzstimulation (HFS) (zwei Abfolgen im Abstand von 30 Sekunden; 1 Sekunde mit 100 Hz mit 0,1 ms je Impuls und 10 ms Abstand) des Schnittes durchgeführt. Im weiteren Verlauf des Experimentes wurde für 60 Minuten alle zehn Sekunden ein Puls gegeben.

Bei der Auswertung wurden für jede Minute die jeweiligen sechs Feldpotenziale gemittelt. Analysiert wurden die so erhaltenen Ergebnisse mittels der Software GraphPad Prism 5. Eine LTP lag vor, wenn beruhend auf der Ausgangsaktivität vor dem HFS eine signifikante Zunahme des Feldpotentials am Ende der 60-minütigen Messung festgestellt

werden konnte (ermittelt mit dem zweifaktoriellen ANOVA-Test für fortlaufende Messungen).

Die erhaltenen Werte für die I/O konnten ebenfalls ausgewertet werden. Diese Daten spiegeln die Grundaktivität der Neuronen wieder. Wird z. B. durch ein Pharmakon die Öffnungswahrscheinlichkeit für einen Ionenkanal verändert, so kann die Grundaktivität verstärkt oder verringert sein. Die statistische Analyse der jeweiligen Gruppen erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test.

2.2.2 Die Doppelpulsreizung (Paired Pulse Stimulierung)

Zur Prüfung der präsynaptischen Beeinflussung der glutamatergen Transmission wurden in einem Teil der Untersuchungen Doppelpulsstimulationen verwendet. Wenn zwei Pulse in kurzem zeitlichem Abstand eine präsynaptische Faser depolarisieren, kann davon ausgegangen werden, dass die Kalziumionenpumpen beim Eintreffen des zweiten Impulses die intrazelluläre Kalziumionenkonzentration noch nicht wieder auf das Ausgangsniveau eingestellt haben. Somit kann es zu einer Faszilitierung der glutamatergen Transmission auf den zweiten Puls kommen. Um die Zeitabhängigkeit zu prüfen, wurden Doppelpulse mit Abständen in Millisekunden von: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200 und 500 appliziert. Für jedes Zeitintervall wurden die Doppelpulse mit einem Abstand von je zehn Sekunden sechsmal wiederholt und zehn Sekunden später mit dem nächst größeren Zeitintervall fortgefahren. Die Reizstärke entsprach der in einer Input/Output-Kurve ermittelten U_{I50} (Staschewski et al. 2011).

Bei der Auswertung wurden für jeden Zeitabstand die sechs Feldpotenzialamplituden des ersten Pulses des Paares sowie die sechs des zweiten Pulses gemittelt. Anschließend wurde für jedes Wertepaar das Verhältnis (2. Pulsantwort/1. Pulsantwort) zueinander ausgerechnet und in einem Diagramm dargestellt (Staschewski et al. 2011).

2.3 Der Forced Swimming Test

1977 wurde dieser Stress-Test erstmals für Ratten von Porsolt et al. beschrieben, um die Wirksamkeit von Antidepressiva und anderen Medikamenten zu untersuchen (Porsolt et

al. 1977a). Die Methode basiert auf der Beobachtung, dass Ratten, welche in einem Gefäß schwimmen müssen, nach einer Periode starker Aktivität aufhören aktiv zu schwimmen und nur noch die nötigsten Bewegungen machen, um den Kopf über Wasser halten zu können. Porsolt et al. schlussfolgerten, dass die Ratten lernten, dass es keinen Ausweg gibt und ein Zustand der Aussichtslosigkeit und Depression eintritt. Für den Test wurden die Ratten für 15 Minuten in einem Plexiglaszylinder schwimmen gelassen und 24 Stunden später erneut für fünf Minuten und dabei die Zeit der Bewegungslosigkeit, des Treibens gemessen (Porsolt et al. 1977b).

Wenn ein Tier noch nie zuvor geschwommen ist, löst diese neue Situation Stress aus. Kann dann kein Ausweg aus dieser ungewohnten und potentiell bedrohlichen Situation gefunden werden, steigt die Stressreaktion des Körpers an. Demzufolge ist auch ein einzelner Schwimmabschnitt geeignet, um einen moderaten Stress zu induzieren und anschließend die Auswirkungen zu untersuchen.

Aus diesem Grunde wurde bei Mäusen ein einzelner Schwimmabschnitt mit darauf folgender Untersuchung dessen Effekts auf die Langzeit-Potenzierung durchgeführt. Für einen Test dieser Art muss sichergestellt werden, dass die Maus weder den Grund noch den Rand des Gefäßes erreichen kann, wodurch sie zum Schwimmen gezwungen ist. Ausgehend von der Literatur, in der verschiedene Gefäßdurchmesser, Gefäßhöhen, Wasserstände und Wassertemperaturen beschrieben sind (Beckley and Finn 2007; Gould et al. 2008; Karolewicz et al. 2001; Piotrowska et al. 2008; Rollema et al. 2009), fielen die Entscheidungen auf einen Glaszylinder mit 25 cm in Höhe und Durchmesser, einen Wasserstand von 12 cm, sowie auf eine Wassertemperatur von 25 °C. Die Schwimmdauer wurde auf 6 min festgelegt (Gould et al. 2008; Karolewicz et al. 2001; Piotrowska et al. 2008).

Für diese Versuche wurden 17 Mäuse des Stammes C57BL/6N von der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin, sieben TRPV1-knockout-Mäuse des Stammes B6.129S4-Trpv1^{tm1Jul/J} und sieben C57BL/6J-Mäuse von „The Jackson Laboratory“ verwendet. Die Mäuse hatten jeweils ein Alter zwischen neun und 14 Wochen. Während des Tests wurde die Zeit gemessen, die sich die jeweilige Maus hat treiben lassen. Im Anschluss an den Test wurden die Mäuse aus dem Wasser genommen und mit einem Papierhandtuch vorsichtig abgetrocknet. Bei Ratten wurde gezeigt, dass das Abtrocknen einen geringen Effekt auf die Corticosterone-Antwort hat und dass diese die des Anfassens und Handhabens der Tiere nicht übersteigt (Korz and Frey 2003). Nach dem Verhaltenstest wurden die Mäuse für fünf Minuten in Ruhe sitzen gelassen, bevor sie anästhesiert und dann

die Gehirne wie im Abschnitt 2.1.2 für extrazelluläre Messungen beschrieben präpariert und Gewebeschnitte angefertigt wurden. Die Mäuse der Kontrollgruppe wurden genauso behandelt ohne jedoch dem Forced Swimming Test selber unterzogen zu werden. Da eine tiefe Isoflurannarkose sowohl eine Sensibilisierung des TRPV1-Rezeptors (Harrison and Nau 2008) als auch Plastizitätsänderungen in der Amygdala bewirkt (siehe Abschnitt 4.1; (Kulisch et al. 2011)), wurden die Mäuse mit Diethylether anästhesiert.

2.4 Untersuchung der Wirkung von CPS auf die NO-Synthese bei HFS

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein Gas, welches in fast allen Organismen eine biologische Funktion hat. Es wird z. B. bei den Mammalia u. a. von der neuronalen Stickstoff-monoxid-Synthase (nNOS) gebildet. Aufgrund seiner Halbwertszeit von ungefähr fünf Sekunden in biologischen Systemen, welche für ein Radikal ungewöhnlich lange ist, konnte in mathematischen Modellen eine Diffusionsstrecke von ungefähr 200 μm berechnet werden (Wood and Garthwaite 1994). NO ist u. a. im Gehirn ein Signalmolekül (Bredt and Snyder 1989; Garthwaite et al. 1988) und wirkt dort in den Synapsen retrograd (Staschewski et al. 2011; Stevens 1992), wird demnach postsynaptisch gebildet und hat dann einen präsynaptischen Effekt. NO ist somit an der synaptischen Signalübertragung und an der Plastizität beteiligt (Bon and Garthwaite 2003; Prast and Philippu 2001). Es wurde gezeigt, dass die LTP im lateralen Kern der Amygdala in Hirnschnitten von Mäusen sowohl bei durch L-NAME blockierter NO-Synthase als auch bei eNOS- (endotheliale NOS) und nNOS-knockout-Tieren reduziert ist (Staschewski et al. 2011).

Für diesen Versuch wurde die Freisetzung von Stickstoffmonoxid mit Hilfe eines Farbstoffs gemessen, der nach der Reaktion mit NO unter Anregung fluoresziert. Der nicht-fluoreszierende, dunkel-violette Farbstoff DAQ (1,2-Diaminoanthraquinonesulfat) (Heiduschka and Thanos 1998) reagiert mit NO unter Anwesenheit von Sauerstoff über Zwischenprodukte zum wasserunlöslichen und rot fluoreszierenden ATD (1H-anthra-[1,2d]-[1,2,3]-triazole-6,11-dione) (Gomes et al. 2006). Bei der Photomultiplier-basierten Microfluorimetrie kann ATD durch die Benutzung eines Rhodamin-Filters ($\lambda > 580 \text{ nm}$) unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden (von Bohlen und Halbach 2003). ATD wurde in dem Experiment mit einer Wellenlänge von 520 nm angeregt und die Emission bei über 590 nm mit Hilfe eines 590 nm long-pass-Filters gemessen (Schuchmann

et al. 2002). Da ATD wasserunlöslich ist, lagert es sich am Entstehungsort ab und kann nicht im Schnitt diffundieren (von Bohlen und Halbach 2003).

Die Anfertigung der Schnitte erfolgte nach dem Vorgehen zur Anfertigung von Gehirnschnitten für die Patch-Clamp-Versuche. Jedoch betrug die Dicke der Schnitte 400 μm .

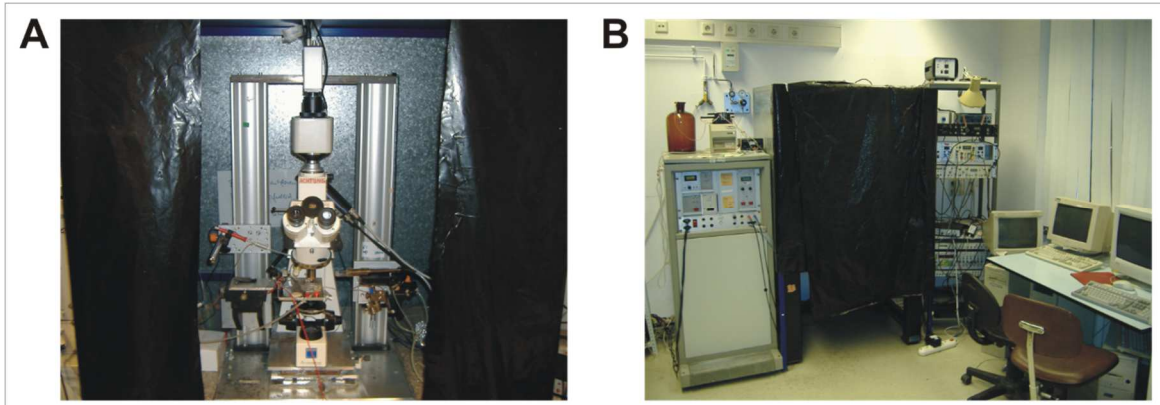


Abbildung 3: Messplatz für die Fluoreszenzmikroskopie zum Nachweis der Stickstoffmonoxidbildung.

(A) Abgebildet ist der Aufbau des Messplatzes. In der Mitte das Axioskop von Zeiss mit der Messkammer. Links davon die Halterung für die Reizelektrode und rechts die Halterung der Ableitelektrode. Hinter dem Mikroskop ist das PMT-Modul (Photo Technology International) für die Detektierung der Fluoreszenz zu sehen (schwarz, nach rechts unten verlaufend mit grauem Kabelast). Der Messplatz befindet sich in einem Metallkäfig zur Abschirmung vor störenden elektromagnetischen Feldern. (B) Verdunkelter Messplatz. Links daneben das Fluoscan Interface Panel. Rechts daneben ein Geräteregal in das u. a. die benötigte Stimulationseinheit und der benötigte MASTER-8 Pulsgenerator eingebaut sind.

Ein Schnitt wurde zunächst für 30 Minuten in einem Inkubationsgefäß in eine ACSF-Lösung, die DAQ in einer Konzentration von 15 μM enthielt und mit Carbogen begast wurde, gelegt, so dass er mit DAQ gesättigt wurde. In der Untersuchungskammer wurde der Schnitt anschließend mit 30 °C warmen ACSF umspült, welches 1,5 μM DAQ enthielt (Kovacs et al. 2009). Die Reizelektrode wurde auf den Fasern der externen Kapsel platziert und die Ableitelektrode im LA entsprechend der Lokalisation bei den extrazellulären Ableitungen positioniert. Wie unter 2.2.1 beschrieben wurde U_{150} ermittelt. Mit dieser Spannung wurde im Anschluss für mindesten zehn Minuten und solange bis ein stabiler Anstieg der Fluoreszenz registriert wurde alle 20 Sekunden ein Puls appliziert. Es folgte die HFS und für weitere zehn Minuten wieder alle 20 Sekunden ein Puls. Die Stimulation erfolgte mittels Stimulator Unit und einem MASTER-8 Pulsgenerator (A.M.P.I., Jerusalem, Israel).

Während des gesamten Experiments wurde die Fluoreszenz im Bereich des LA mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop; Zeiss) unter Benutzung eines 60x-Wasserimmersionsobjektives und der Software FeliX (Photon Technology International) gemessen (Kovacs et al. 2009), wobei zehn Messungen pro Sekunde durchgeführt wurden. Um lediglich das emittierte Licht vom ATD zu messen, wurde sowohl der Messplatz als auch der gesamte Raum verdunkelt. Das Anregungslicht stammt vom Fluoscan Interface Panel (Photon Technology International). Die Feldpotenziale wurden während der Versuche nicht gemessen.

Für die Auswertung der Daten wurden die von der Software FeliX aufgezeichneten Werte in das Programm Origin 6.0 (Microcal Software, Inc.; Northhaptton, Massachusetts, USA) kopiert, in welchem die Kurven geglättet wurden. Mit den entstandenen Werten wurde mit der Software Clampfit 10.2 (Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA) in der Kurve die Anstiege für die jeweiligen Zeitintervalle vor bzw. nach einer HFS berechnet und grafisch dargestellt. In der Software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.; La Jolla, California, USA) wurden anschließend die Anstiege der einzelnen Zellen für die jeweiligen Gruppen zusammengefasst, in Diagrammen dargestellt und anschließend statistisch ausgewertet. Es wurden verschiedene Zeitintervalle (ZI) ausgewertet (ZI1: 5 min vor HFS; ZI2: 30 s während HFS; ZI3: 1. min nach HFS; ZI4: 2. min nach HFS; ZI5: 3. min nach HFS; ZI6: 4. – 6. min nach HFS; ZI7: 7. – 9. min nach HFS).

2.5 Die whole-cell patch-clamp Technik

Die Patch-Clamp-Technik ist eine Methode, welche es erlaubt, die Veränderungen von Ladungen über der Zellmembran einer Zelle zu messen und durch geeignete Experimente Rückschlüsse auf die Beteiligung z. B. von Ionenkanälen, Rezeptorproteinen, Signalmolekülen oder angrenzenden Zellen an den Vorgängen der Signalweiterleitung an dieser Zelle zu untersuchen.

Bei dieser Methode werden Glaspipetten mit einer Öffnung von 3 – 5 μm im Durchmesser (Neher and Sakmann 1976) an die Membran einer Zelle gedrückt, so dass eine elektrische Dichtung (engl.: Seal) von mindestens 50 Megaohm entsteht (Neher et al. 1978). Im Anschluss daran sind verschiedene Schritte möglich, die unterschiedliche Messmethoden erlauben. Eine mögliche Methode ist die Patch-Clamp-Aufnahme der gesamten

Zelle (engl.: whole-cell patch-clamp recording), wodurch die Ionenströme der vollständigen Zelle registriert werden können (Hamill et al. 1981).

Um Veränderungen der Stromstärke an Membranen von Zellen messen zu können, wurden Ableitelektroden benutzt. Für deren Anfertigen wurden Borsilikatglaskapillaren (GB150F-8P; Science Products GmbH, Hofheim) verwendet, die in einem zweistufigen Prozess im Elektrodenziehgerät PC-10 (*NARISHIGE*, Japan) zu sich verjüngenden Ableitelektroden gezogen wurden. Für eine Messung wurden die Elektroden mit einer Intrazellulärlösung befüllt und an der Headstage CV-7B (Axon Instruments) befestigt (siehe Abbildung 4B). In die Intrazellulärlösung ragte ein chlorierter Silberdraht, über den die Stromstärke registriert wurde. Die Widerstände der Ableitelektroden im ACSF lagen zwischen 5 und 7 M Ω .

Über das PC-Programm MultiClamp 700B wurde das Haltepotential der Ableitelektrode sowie deren Kapazitäten reguliert. Durch das PC-Programm Clampex 9.2 konnte für die Reizelektrode reguliert werden, wann Impulse abgegeben wurden und über eine Stimulator Unit konnte die Reizintensität eingestellt werden.

Die Positionierung der Ableitelektrode erfolgte wie im Abschnitt 2.2 beschrieben und in Abbildung 2 dargestellt.

Bei den Versuchen erfolgte die Messung von miniatur exzitatorischen postsynaptischen Strömen (engl.: miniature excitatory postsynaptic currents – mEPSC). Dies sind Ströme, die an einer postsynaptischen Membran fließen, wenn nach der Freisetzung eines Neurotransmitters von der präsynaptischen Membran in den synaptischen Spalt und anschließender Bindung an postsynaptisch lokalisierte Rezeptormoleküle Ionenkanäle geöffnet werden. Entweder sind die Rezeptoren selbst Teil eines Ionenkanals oder sie veranlassen durch Signalkaskaden die Öffnung von Ionenkanälen.

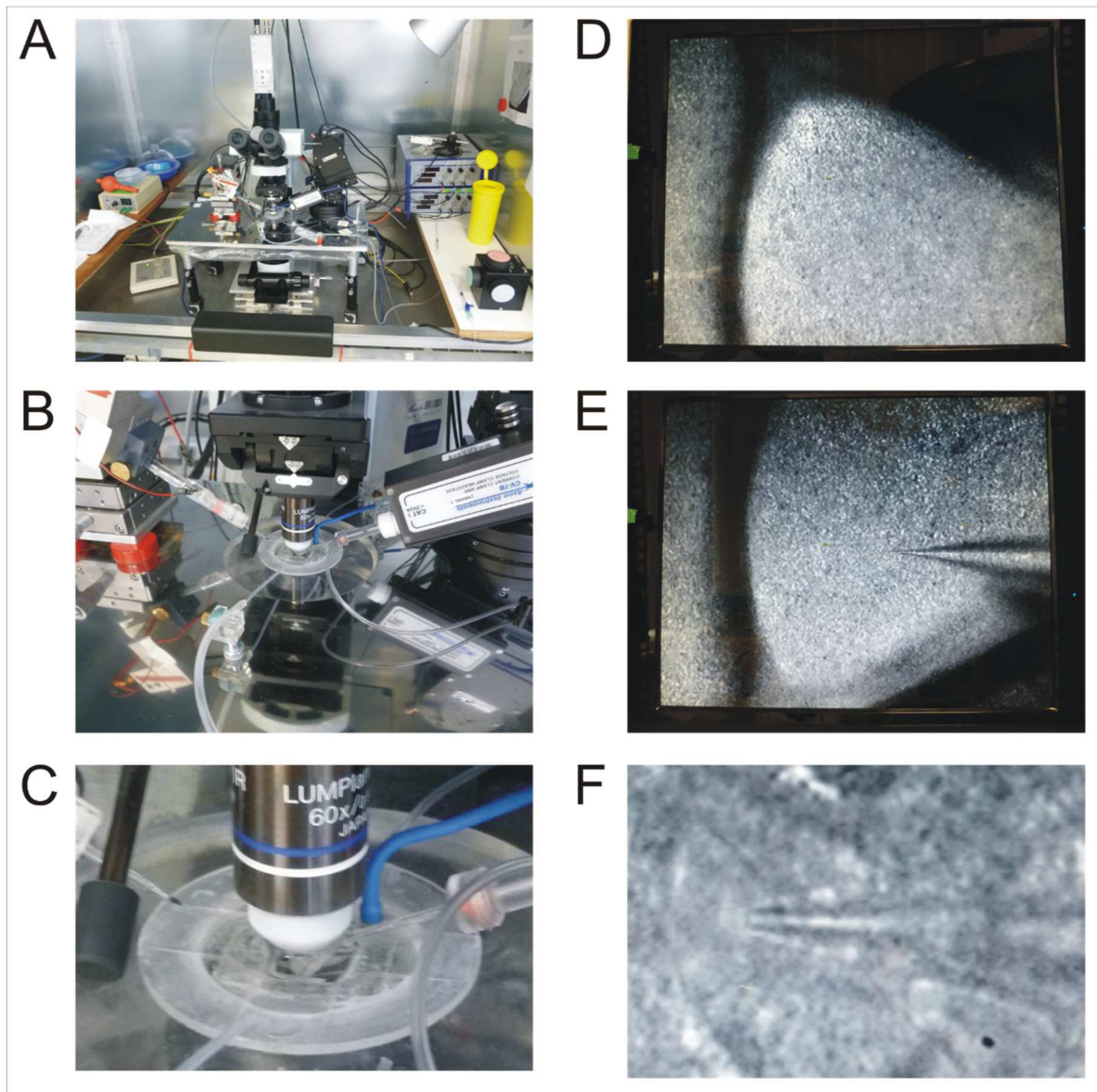


Abbildung 4: Aufnahmen vom Messplatz für die whole-cell patch-clamp Versuche. (A) In der Mitte ist das Olympus BX51WI Mikroskop zu sehen. Darüber ist die VX55 Camara (Photonics) angeschlossen, um die Bilder auf einen Monitor zu übertragen. Links im Bild steht die Stimulator Unit. Links vom Mikroskop steht die Halterung für eine Reizelektrode und rechts vom Mikroskop der PatchStar Micromanipulator (Scientifica), der die Headstage CV-7B (Axon Instruments) führt. Vorne am rechten Bildrand steht die Steuerungseinheit für den PatchStar, um die Headstage in x-, y- und z-Richtung zu bewegen. (B) Nahaufnahme der Messkammer. Links die Reizelektrodenhalterung, in der Mitte das Objektiv und rechts die Headstage mit Ableitelektrode. (C) Vergrößerung der Messkammer aus B. Links ist eine Reizelektrode zu sehen und rechts eine Ableitelektrode. Unter dem Objektiv ist ein Schnitt der linken Hemisphäre sichtbar. Blau ummantelt ist ein Silberchloridstab zu sehen, der die Ableitelektrode gegen die Messkammer erdet. (D) Foto eines Monitorbildes. Sichtbar ist ein Ausschnitt vom lateralen Kern der Amygdala (LA) in einem Gehirnschnitt der linken Hemisphäre. Nach rechts oben aus dem Bild befindet sich der Hippokampus und am linken Bildrand ist der Cortex sichtbar. Die dunkle Line stellt die Fasern der externen Kapsel dar. (E) Auf dem Monitorbild ist ein Ausschnitt des LA eines Gehirnschnittes der rechten Hemisphäre zusammen mit einer Ableitelektrode zu sehen. (F) Vergrößerter Ausschnitt eines Monitorbildes. Zu sehen ist eine „gepatchte“ Zelle und die Spitze einer Ableitelektrode.

Für die Patch-Clamp-Untersuchungen der mEPSC wurden der ACSF-Lösung im Gegensatz zu den extrazellulären Ableitungen von Feldpotenzialen 10 μM Bicucullin und 0,5 μM Tetrodotoxin zugesetzt. Bicucullin (Bicu) ist ein GABA_A-Rezeptorantagonist, durch den die inhibitorische Wirkung von GABA_A-Rezeptoren supprimiert werden kann (Nicoll et al. 1990), und Tetrodotoxin (TTX) ist ein Natriumionenkanalblocker (Humeau et al. 2007), der die Ausbildung von Aktionspotenzialen unterdrückt, wodurch die Aktivität von Afferenzen des lateralen Kerns der Amygdala supprimiert werden sollen. Um auch geringe Änderungen der Intensität von mEPSC registrieren zu können, ist die Unterdrückung der Inhibition durch GABA_A-Rezeptoren sinnvoll. Bei der Induktion einer LTP in extrazellulären Messungen ist dies nicht notwendig, da in horizontalen Gehirnschnitten trotzdem verlässlich eine Langzeitpotenzierung ausgelöst werden kann (Albrecht and von Bohlen und Halbach 2008) und es stets objektiver ist, so wenig Pharmaka wie möglich zu benutzen. Weiterhin sollten in diesen Patch-Clamp-Untersuchungen die glutamatergen, exzitatorischen Ereignisse möglichst isoliert betrachtet werden.

Um in den „whole-cell patch-clamp“-Modus zu kommen, wurde eine Ableitelektrode mit Überdruck auf der Intrazellulärlösung auf die Membran des ausgesuchten Zellsomas gesetzt und der Druck ausgeglichen. Es entstand ein Seal zwischen der Glaselektrodenwand und der Zellmembran. Anschließend wurde Unterdruck erzeugt, bis die Zellmembran innerhalb der Ableitelektrode aufgerissen wurde, wobei der Seal bestehen blieb (Hamill et al. 1981). Das Haltepotenzial betrug während des gesamten Vorgangs -70 mV.

Durch die whole-cell patch-clamp Technik ist es möglich mEPSC zu messen und somit deren Frequenz und Amplitude zu registrieren. 1962 hat Bernard Katz aufgrund seiner Forschungen postuliert, dass Veränderungen der Frequenz von mEPSC präsynaptische Mechanismen und Veränderungen der Amplitude postsynaptische Mechanismen reflektieren (Cormier and Kelly 1996; Cummings et al. 1996).

2.5.1 Untersuchung der Wirkung von Serotonin und -rezeptoren auf mEPSC

Serotonin konnte erstmals 1953 im Zentralnervensystem von Säugetieren nachgewiesen werden und spielt dort eine entscheidende Rolle bei einer Vielzahl an physiologischen Prozessen (Nicoll et al. 1990).

Um Auswirkungen von Serotoninantagonisten auf die miniatur exzitatorischen postsynaptischen Ströme beurteilen zu können, wurde zunächst die Auswirkung von Serotonin (5-Hydroxytryptamin; 5-HT) selber auf die mEPSC untersucht. Dafür wurde für zehn Minuten eine ACSF-Lösung mit 10 μ M Bicucullin und 0,5 μ M Tetrodotoxin appliziert. Anschließend wurde eine ACSF-Lösung mit zusätzlichen 3 μ M Serotonin appliziert und für weitere zehn Minuten gemessen. Das Haltepotential der Zelle wurde bei -70 mV geklemmt.

Für die Auswertung wurden jeweils die letzten beiden Minuten der zehnminütigen Phasen analysiert (B + T und B +T + S). Diese Intervalle wurden durch die Software Clampfit 10.2 mittels einer erstellten Beispielmatrix auf mEPSC hin analysiert. Für ein Ereignis wurden unter anderem die Werte für die Amplitude und dessen zeitliche Lokalisation registriert. Mit der Software Origin 6.0 wurden die Werte gemittelt und dann mit GraphPad Prism 5 statistisch ausgewertet und in Diagrammen dargestellt, wobei hier die Daten für die Amplituden und für die tatsächlichen Frequenzen (Anzahl der Ereignisse pro Sekunde) genauer untersucht wurden. Nachdem der Ausreißertest nach Grubb's durchgeführt wurde, erfolgte die Analyse der Datentabellen mit dem studentischen t-Test. Dabei wurde für den Vergleich von zwei Zeitintervallen derselben Versuchsgruppe mit einem zweiseitigen, gepaarten t-Test und für den Vergleich zweier Zeitintervalle von unterschiedlichen Gruppen ein zweiseitiger, ungepaarter t-Test durchgeführt. Als signifikante Unterschiede wurden erachtet $P < 0,05$ *; $P < 0,01$ ** und $P < 0,001$ ***.

Um die Beteiligung einiger Serotoninrezeptoren an der Wirkung des Serotonins auf die mEPSC zu testen, wurden der ACSF-Lösung zu den 10 μ M Bicu und 0,5 μ M TTX in verschiedenen Phasen der Experimente sowohl bestimmte Serotoninrezeptorantagonisten als auch 3 μ M Serotonin zugesetzt. Aufgrund der Dauer des Einzelversuchs wurde mit der Applikation des jeweiligen Antagonisten zeitgleich mit der Applikation von Bicucullin und Tetrodotoxin begonnen. Nach zehn Minuten wurde zusätzlich Serotonin zugesetzt und weitere zehn Minuten gemessen. Als Antagonisten wurden 1 μ M WAY-100635 Maleat (WAY) als 5-HT_{1A}-Rezeptorantagonist, 10 μ M SB-206553 Hydrochloridhydrat (SB) als 5-HT_{2B}/5-HT_{2C}-Rezeptorantagonist und als 5-HT₃-Rezeptorantagonist wurden 25 μ M Ondansetronhydrochloriddihydrat (Ondansetron) untersucht.

Analog zu den Versuchen zur Messung des Serotonineffekts auf mEPSC wurden jeweils die letzten beiden Minuten der zehnminütigen Phasen analysiert (B + T + A und B +T + A + S).

3. Ergebnisse

3.1 Auswirkung der Narkose auf die Langzeitpotenzierung

Im Zuge der gesetzlich vorgeschriebenen Umstellung von Diethylether für die Betäubung von Tieren auf Isofluran wurde beobachtet, dass sich die Ergebnisse nach der Umstellung von den ansonsten gleichen Versuchen vor der Umstellung signifikant unterschieden. Aus diesem Grunde sollten die Auswirkung von verschiedenen Narkosen auf die Versuchsergebnisse untersucht werden.

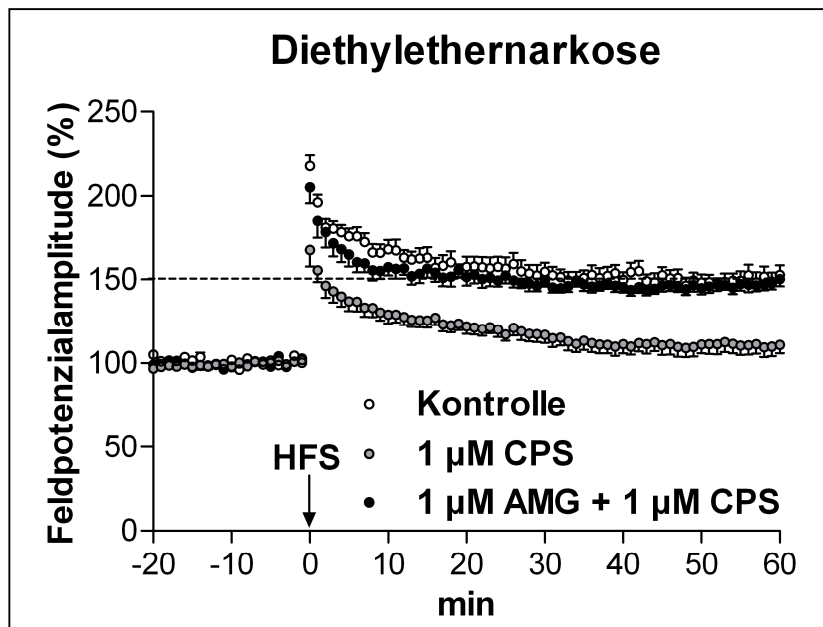


Abbildung 5: Versuchsergebnisse von Hirnschnitten, die nach einer Diethylethernarkose hergestellt wurden. Bei Kontrollmessungen bewirkt die Stimulation der Nervenfasern der externen Kapsel eine stabile LA-LTP. Die Applikation von 1 µM CPS bewirkt eine signifikante Suppression der LA-LTP ($P < 0,0001$), welche durch die Koapplikation des spezifischen TRPV1-Rezeptorantagonisten AMG 9810 blockiert werden konnte ($P = 0,0002$). Die Datenpunkte stellen gemittelte Amplituden mit den dazugehörigen Standardfehlern des arithmetischen Mittels dar. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem zweifaktoriellen ANOVA-Test für fortlaufende Messungen. (Zschenderlein, C., Gebhardt, C., von Bohlen und Halbach, O., Kulisch, C., and Albrecht, D. 2011. Capsaicin-induced changes in LTP in the lateral amygdala are mediated by TRPV1. *PLoS. One.* 6: e16116.)

Nach einer Narkose der Mäuse mit Diethylether vor der Präparation bewirkt die Applikation von 1 μ M Capsaicin (CPS), ein selektiver TRPV1-Rezeptoragonist, eine Blockierung der Langzeitpotenzierung (LTP) im lateralen Kern der Amygdala (LA) ($110,4 \pm 5,5$ % [n = 12]). Wie aus Abbildung 5 ersichtlich wird, bewirkt die Koapplikation von 1 μ M AMG 9810 eine Aufhebung des Capsaicin-Effekts ($147,9 \pm 3,6$ % [n = 7]), so dass die Versuchswerte denen der Kontrollgruppe entsprechen ($149,6 \pm 5,3$ % [n = 13]) (Zschenderlein et al. 2011). Die Schnitte dieser Versuchsreihe stammen von insgesamt sechs Tieren. AMG 9810 ist ein selektiver TRPV1-Rezeptorantagonist, der u. a. kompetitiv die Wirkung von CPS inhibiert (IC_{50} bei TRPV1 von Ratten: $85,6 \pm 39,4$ nM) (Gavva et al. 2005). Die Ergebnisse der beiden Messgruppen unterscheiden sich signifikant ($P = 0,0002$).

Bei Messungen an nach einer Isoflurannarkose hergestellten horizontalen Gehirnschnitten, insgesamt fünf Tiere, trat eine Reduzierung der LA-LTP bei Kontrollmessungen auf ($128,1 \pm 4,1$ % [n = 10]; siehe Abb. 6). Bei der Applikation von 1 μ M CPS wurde eine Verstärkung der LA-LTP festgestellt ($150,8 \pm 5,4$ % [n = 8]). Diese Ergebnisse stellen das Gegenteil der Ergebnisse der Messungen nach einer Diethylethernarkose dar. Die einzige Gemeinsamkeit wurde bei der Applikation von AMG 9810 festgestellt, welches auch bei dieser Versuchsreihe die Wirkung von CPS aufhob und die Werte auf Kontrollniveau führte ($122,3 \pm 6,5$ % [n = 8]) (Zschenderlein et al. 2011). Die Messungen der CPS-Gruppe unterschieden sich signifikant von denen der Kontroll- ($P = 0,0037$) und der AMG-CPS-Gruppe ($P = 0,0046$). Demnach scheint eine Isoflurannarkose vor der Dekapitation zu einer Hemmung der LA-LTP zu führen. Die zusätzliche Applikation von Capsaicin in dieser Versuchsreihe führte zu einem Anstieg der LA-LTP, welche auf eine Sensibilisierung des TRPV1-Rezeptors zurückzuführen ist.

Diese Befunde legen nahe, dass die Anästhesiemethode vor der Dekapitation ein wichtiger Faktor für die Ergebnisse einer Untersuchung der Plastizität von Gehirnarealen darstellt. Sie stehen im Einklang mit den Befunden einer Sensibilisierung des TRPV1-Rezeptors durch Isofluran (Cornett et al. 2008; Harrison and Nau 2008; Matta et al. 2008). Aus diesem Grunde wurden weiterführende Untersuchungen durchgeführt, welche die Effekte der Narkose auf die Versuchsergebnisse genauer darstellen sollen. Weiterhin soll eine geeignete Isoflurankonzentration ermittelt werden, bei der die erzielten Resultate mit denen nach einer Diethylethernarkose vergleichbar sind.

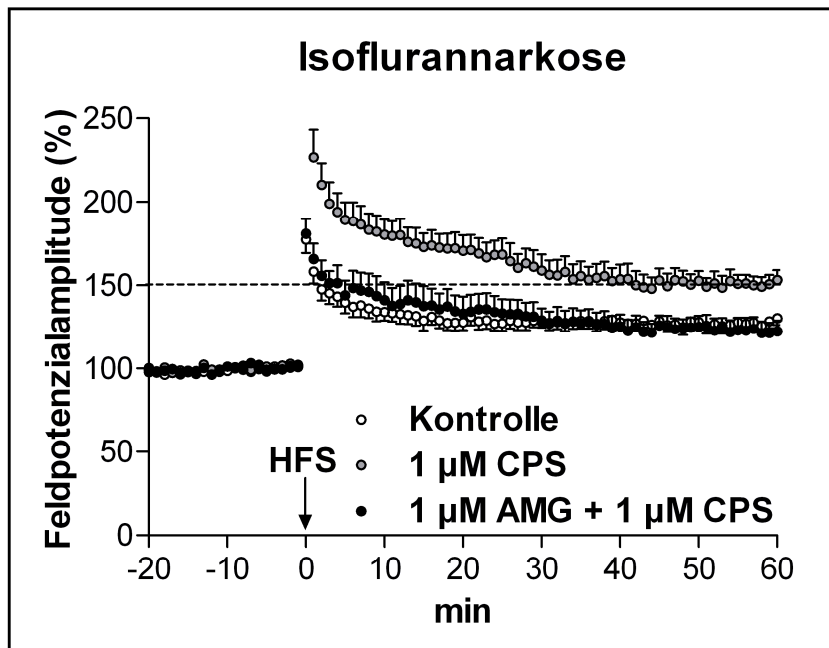


Abbildung 6: Versuchsergebnisse von Hirnschnitten, die nach einer Isoflurannarkose hergestellt wurden. Bei den Kontrollmessungen tritt eine Reduzierung der LA-LTP auf. Die Stärke der LTP wird durch 1 μM CPS erhöht. Dieser Anstieg kann durch den spezifischen TRPV1-Rezeptorantagonisten AMG 9810 blockiert werden. Isofluran kann somit hemmend auf die LTP wirken und den TRPV1-Rezeptor sensibilisieren. Die Datenpunkte stellen gemittelte Amplituden mit den dazugehörigen Standardfehlern des arithmetischen Mittels dar. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem zweifaktoriellen ANOVA-Test für fortlaufende Messungen. (Zschenderlein, C., Gebhardt, C., von Bohlen und Halbach, O., Kulisch, C., and Albrecht, D. 2011. Capsaicin-induced changes in LTP in the lateral amygdala are mediated by TRPV1. *PLoS. One.* 6: e16116.)

Um möglichst genaue Erkenntnisse über die Auswirkungen der Narkoseform auf die LA-LTP zu erlangen, wurden Messungen mit verschiedenen Narkoseformen sowohl mit Reizungen der externen Kapsel (EC), welche hauptsächlich Afferenzen aus dem entorhinalen und perirhinalen Kortex enthält (von Bohlen und Halbach and Albrecht 2002), als auch mit Reizungen von intranukleären Fasern (IN) im LA, welche zusätzlich Afferenzen von anderen Arealen der Amygdala umfassen (von Bohlen und Halbach and Albrecht 1998), durchgeführt. Dafür wurden horizontale Gehirnschnitte von insgesamt 22 Tieren verwendet.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus früheren Untersuchungen (Drephal et al. 2006; Müller et al. 2009) ist in den Messgruppen der Diethylethernarkose durch Hochfrequenzstimulation (HFS) sowohl bei EC- als auch bei IN-Reizung eine stabile Zunahme der Feldpotenziale des LA gemessen worden (EC: $150,7 \pm 5,6$ % [n = 11] und IN: $148,1 \pm 6,8$ % [n = 9]; Abb. 7A und B) [Kulisch et al. 2011]. Eine Dekapitation ohne

vorheriger Narkose sowie eine Narkose mit 4 % Isofluran bewirkten keine signifikanten Veränderungen bei den EC-induzierten LA-LTP (Dekapitation: $141,7 \pm 9,8$ % [n = 9]; Abb. 7A und E; 4 % Isofluran: $158,1 \pm 8,8$ % [n = 9]; Abb. 7C und E). Die Durchführung einer Narkose mit 8 % Isofluran bewirkte hingegen eine signifikante Reduktion der EC-induzierten LA-LTP (8 % Isofluran: $126,5 \pm 4,6$ % [n = 11]; Abb. 7C und E) (Kulisch et al. 2011). Wenn die LA-LTP intranukleär induziert wurde, trat kein Unterschied bei einer Narkose mit 4 % Isofluran auf ($155,4 \pm 9,2$ % [n = 9]; Abb. 7D und E). Nach Dekapitation ohne vorangegangener Narkose und nach der Narkose mit 8 % Isofluran traten jedoch signifikante Unterschiede auf (Dekapitation: $133,7 \pm 6,2$ % [n = 9]; Abb. 7B und E; 8 % Isofluran: $133,6 \pm 8,7$ % [n = 11]; Abb. 7D und E) [Kulisch et al. 2011].

Die Verläufe der Input/Output-Kurven (I/O) der Gruppen mit Diethylether- und Isoflurannarkose mit 8 % sowie der Gruppe ohne Narkose weisen nach statistischer Auswertung mit dem Mann-Whitney-Test keinen signifikanten Unterschied auf ($P > 0,05$) (Abb. 7F). Die Art der Narkose ändert die synaptische Grundaktivität der Neuronen, welche durch AMPA- und Kainat-Rezeptoren vermittelt wird (Pollandt et al. 2003; Schubert and Albrecht 2008), demnach nicht [Kulisch et al. 2011].

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung der Mäuse vor der Dekapitation einen wesentlichen Einfluss auf die Resultate der LTP-Experimente mit den anschließend erhaltenen Gewebeschnitten der Gehirne haben kann. Weiterhin wird ersichtlich, dass eine Narkose mit 4 % Isofluran noch geeignet ist, um vergleichbare Resultate zu Experimenten mit Diethylethernarkosen zu erlangen. Bei höheren Konzentrationen wird eine Hemmung der LA-LTP induziert.

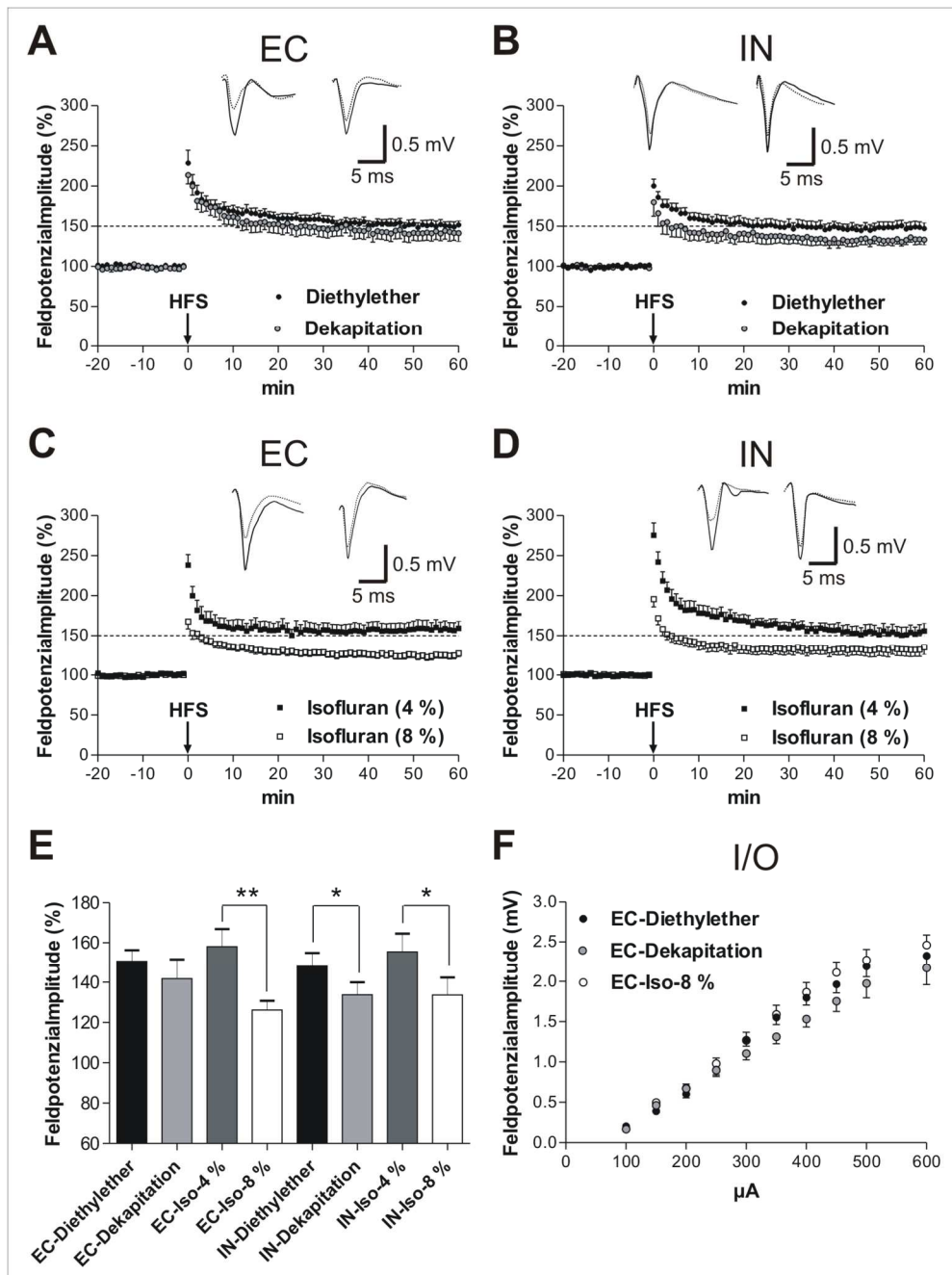


Abbildung 7: Die Betäubungsmethode hat Auswirkungen auf die Stärke der LA-LTP. (A) An den Fasern der externen Kapsel (EC) applizierte Hochfrequenzstimulationen (HFS) induzierten LA-LTP, die keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gehirnschnitten von Mäusen mit Diethylethernarkose vor der Präparation (n = 11 Schnitte; 5 Tiere) und denen ohne Narkose (n = 9 Schnitte; 7 Tiere) aufwies. (B) Intranukleär (IN) applizierte HFS bewirkten eine signifikant niedrigere LA-LTP in der Gruppe ohne Narkose (n = 9 Schnitte; 6 Tiere) verglichen mit der mit Diethylether narkotisierten Gruppe (n = 9 Schnitte; 5 Tiere). (C) Eine Narkose mit 8 % Isofluran (n = 11 Schnitte; 5 Tiere) verursachte eine signifikant niedrigere LA-LTP als eine mit 4 % Isofluran (n = 9 Schnitte; 3 Tiere) ermittelte, wenn eine EC-Reizung erfolgte. (D) Ähnliche Ergebnisse wurden bei IN-Reizung für eine Narkose mit 4 % (n = 9 Schnitte; 4 Tiere) und mit 8 % Isofluran (n = 11 Schnitte; 6 Tiere) ermittelt. (E) Säulendiagramm der aus den Diagrammen A bis D gemittelten Werte der 59. und 60. Minute nach HFS. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem zweifaktoriellen ANOVA-Test. Signifikante Unterschiede sind angezeigt (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$) (F) Diagramm der

sich nicht signifikant unterscheidenden Input/Output-Kurven (I/O) von EC-stimulierten Feldpotenzialen des LA der Gruppen mit Diethylether- (n = 35 Schnitte; 6 Tiere) und 8 % Isoflurannarkose (n = 35 Schnitte; 6 Tiere) sowie ohne Narkose (n = 35 Schnitte; 6 Tiere). In den Diagrammen sind die Durchschnittswerte mit den jeweiligen Standardfehlern des arithmetischen Mittels dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test. (Kulisch et al. 2011. Method of euthanasia affects amygdala plasticity in horizontal brain slices from mice. *Journal of Neuroscience Methods* **201**: 340-345)

3.2 Der TRPV1-Rezeptor und seine Beeinflussung

3.2.1 Beteiligung des TRPV1-Rezeptors an der LTP

Nach einer Hochfrequenzstimulation der Fasern der externen Kapsel wurden die Amplituden der Feldpotenziale in Schnitten von Wildtypmäusen ohne Pharmakon effektiv erhöht, was mit früheren LA-LTP-Studien überein stimmt (Drephal et al. 2006; Müller et al. 2009). Im Unterschied zu der steigernden Wirkung von Capsaicin auf die hippocampale LTP (Li et al. 2008), verursachte Capsaicin im lateralen Kern der Amygdala eine signifikante Reduzierung der HFS-induzierten LTP. Diese ist durch den selektiven TRPV1-Rezeptorantagonisten AMG 9810 aufgehoben worden (vgl. Abb. 5 im Abschnitt 3.1). Da Capsaicin auch in der Lage ist den TRPM1-Rezeptor (Transient Receptor Potential Melastatin Type 1) zu aktivieren (Shen et al. 2009), wurden nicht nur TRPV1-Rezeptorantagonisten sondern auch der Effekt von Capsaicin auf die Induktion der LTP in TRPV1-gendefizienten Tieren getestet (Zschenderlein et al. 2011). Wie in Abbildung 8 zu sehen ist, fehlt in TRPV1-knockout-Mäusen die hemmende Wirkung von Capsaicin auf die LA-LTP (Kontrolle: $127,8 \pm 4,9$ % [n = 11] gegenüber (ggü.) CPS: $124,2 \pm 1,9$ % [n = 9]; $P > 0,05$; von 3 Tieren). Somit konnte die receptorspezifische Wirkung von Capsaicin als Agonist des TRPV1-Rezeptors weiter gesichert werden.

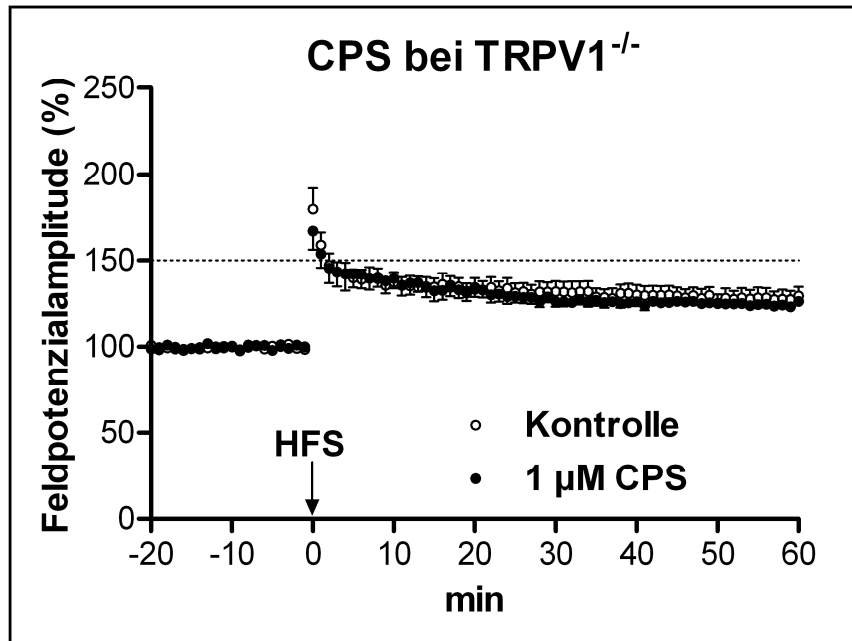


Abbildung 8: Ohne exprimierten TRPV1-Rezeptor im LA fehlt der suppressive Effekt von Capsaicin. Wird bei Hirnschnitten von TRPV1-knockout-Mäusen eine LTP induziert, fällt diese geringer aus als bei Wildtypmäusen (Vergleich mit Abb. 5). Bei zusätzlicher Verabreichung von Capsaicin fehlt die Unterdrückung der LTP vollständig. Die Datenpunkte stellen gemittelte Amplituden mit den dazugehörigen Standardfehlern des arithmetischen Mittels dar. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem zweifaktoriellen ANOVA-Test. (Zschenderlein, C., Gebhardt, C., von Bohlen und Halbach, O., Kulisch, C., and Albrecht, D. 2011. Capsaicin-induced changes in LTP in the lateral amygdala are mediated by TRPV1. *PLoS. One.* 6: e16116.)

Zusätzlich wurden Untersuchungen mit dem selektiven, endogenen TRPV1-Agonisten N-Oleoyldopamin (OLDA) (Chu et al. 2003; Zhong and Wang 2008) sowie mit dem selektiven TRPV1-Antagonisten AMG 9810, der neben den Wirkungen von Protonen und Hitze auch die der endogenen TRPV1-Agonisten (OLDA, Anandamid) inhibiert (Gavva et al. 2005), durchgeführt. Um die Auswirkung von OLDA auf die Grundaktivität zu testen, wurden Input/Output-Kurven von Hirnschnitten ohne Pharmakon und anschließend bei denselben Schnitten mit Pharmakon erstellt. Aus Abbildung 9A wird ersichtlich, dass die Feldpotenzialamplituden mit zunehmender Reizstärke ähnlich verlaufen aber in der OLDA-Gruppe leicht erhöht sind. Der Mann-Whitney-Test ergab keine signifikanten Unterschiede. Bei Versuchen mit Capsaicin wurden gleiche Ergebnisse erzielt (Zschenderlein et al. 2011).

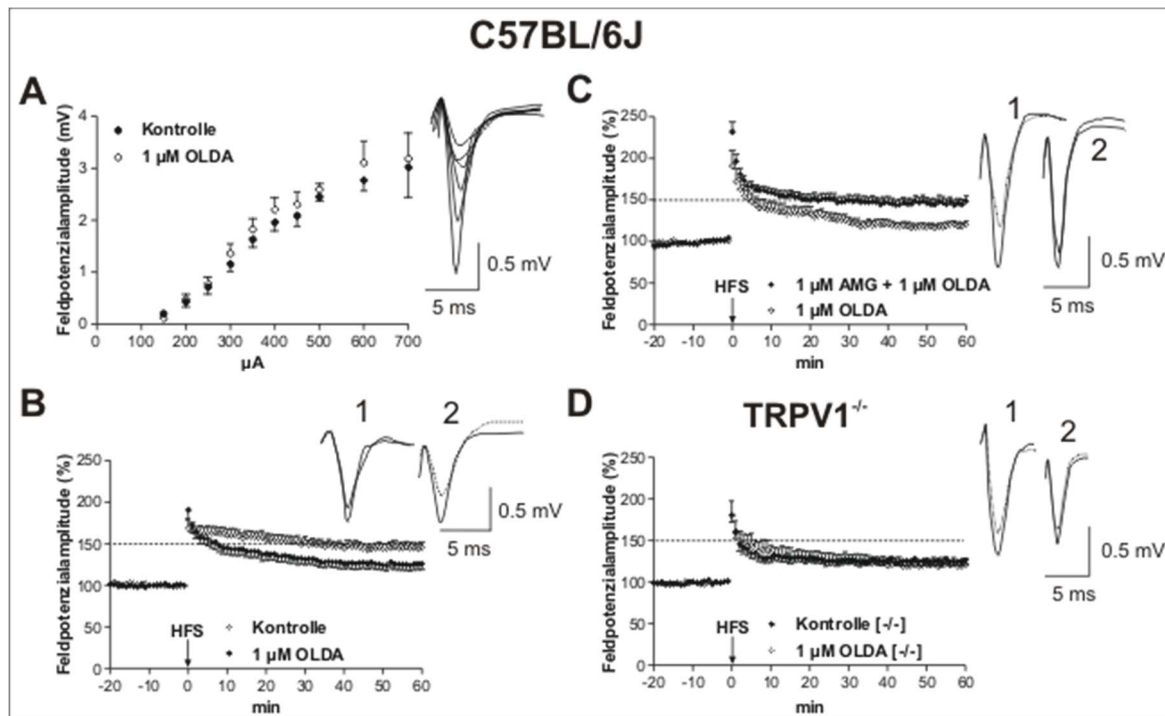


Abbildung 9: OLDA reduziert rezeptorspezifisch die Stärke der LA-LTP ohne die Grundaktivität zu verändern. (A) Input/Output-Kurven der durch Einzelpulsreizung an der externen Kapsel (EC) hervorgerufenen Feldpotenziale im lateralen Kern der Amygdala (LA). Die Messungen ohne Substanz und mit appliziertem OLDA wurden an den gleichen Schnitten durchgeführt (n = 8 Schnitte, 3 Tiere). Es traten keine signifikanten Unterschiede auf ($P > 0,05$). (B) Die Applikation von 1 μM OLDA (n = 12 Schnitte; 5 Tiere) reduzierte die LA-LTP im Vergleich zur substanzfreien Kontrolle (n = 13 Schnitte; 5 Tiere) signifikant. (C) Die LA-LTP unter Gabe von 1 μM OLDA (erneute Messungen, n = 9 Schnitte; 3 Tiere) war im Vergleich zu einer Koapplikation von 1 μM AMG 9810 und 1 μM OLDA (n = 9 Schnitte; 3 Tiere) signifikant reduziert. (D) Bei Mäusen ohne TRPV1-Expression unterschied sich die Stärke der LA-LTP von substanzfreien Messungen (n = 8 Schnitte; 3 Tiere) nicht signifikant von denen mit 1 μM OLDA (n = 7 Schnitte; 3 Tiere). Die Datenpunkte stellen gemittelte Amplituden mit den dazugehörigen Standardfehlern des arithmetischen Mittels dar. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem zweifaktoriellen ANOVA-Test. Repräsentative Amplituden sind am rechten Rand dargestellt und wurden fünf Minuten vor dem HFS (gepunktete Linie) bzw. 60 Minuten nach dem HFS (durchgehende Linie) aufgezeichnet. 1: substanzfreie Kontrolle (B, D) bzw. 1 μM AMG 9810 + 1 μM OLDA (C), 2: 1 μM OLDA. Es wurden 13 C57BL/6J-Mäuse und 3 TRPV1-KO-Mäuse verwendet. (nach: Kulisch, C. and Albrecht, D. 2012. Effects of single swim stress on changes in TRPV1-mediated plasticity in the amygdala. *Behavioural Brain Research* **236**: 344-349)

Das Zusetzen von 1 μM OLDA zur ACSF-Lösung bewirkte eine Unterdrückung dieser erhöhten Feldpotenzialamplituden nach HFS (Kontrolle: $144,9 \pm 6,1$ % [n = 13] ggü. 1 μM OLDA: $125,9 \pm 7,2$ % [n = 12]; $P = 0,007$; Abb. 9B). Da OLDA auch ein schwacher Ligand für den CB1-Rezeptor ist (Chu et al. 2003), wurde weiterhin untersucht, ob die Reduzierung der LA-LTP durch OLDA nach Koapplikation von OLDA und AMG 9810 weiterhin

besteht. Die Ergebnisse dieser Koapplikation im Vergleich zu einer erneuten Messung mit OLDA (1 μ M AMG + 1 μ M OLDA: $145,8 \pm 5,9$ % [n = 9] ggü. 1 μ M OLDA: $119,4 \pm 4,4$ % [n = 9]; $P < 0,05$; Abb. 9C) zeigen, dass der durch OLDA hervorgerufene Effekt der LA-LTP-Reduzierung durch den TRPV1-Rezeptor vermittelt wird, da er vollständig durch den selektiven TRPV1-Rezeptorantagonisten aufgehoben werden konnte. Zusätzlich konnte in Untersuchungen mit TRPV1-knockout-Mäusen beobachtet werden, dass die Stärke der LTP ohne Pharmakon gegenüber den Mäusen vom Wildtyp (WT) reduziert ist und der Stärke der LTP nach Applikation von 1 μ M OLDA bei WT entspricht. Die Stärke der LTP bei den KO-Mäusen konnte durch das Applizieren von OLDA nicht weiter reduziert werden (Kontrolle [-/-]: $125,4 \pm 5,0$ % [n = 8] ggü. 1 μ M OLDA [-/-]: $120,8 \pm 6,3$ % [n = 7]; $P > 0,05$; Abb. 9D). Diese Ergebnisse stimmen mit denen der Messungen mit Capsaicin überein und stützen die Schlussfolgerung, dass eine schwächer ausfallende LA-LTP nach Gabe von OLDA durch TRPV1-Rezeptoren vermittelt wird.

3.2.2 Auswirkung des Forced Swimming Tests auf die LTP

Zunächst wurde die Auswirkung des Forced Swimming Tests (FST) auf die generelle Erregbarkeit ausgewertet, indem die durchschnittlichen Input/Output-Kurven der unbehandelten Kontrollgruppe mit denen der schwimmgestressten Gruppe verglichen wurden. Wie in Abbildung 10A ersichtlich ist, unterscheiden sich die beiden Kurven nicht signifikant. Daraus kann gefolgert werden, dass eine einzelne Periode von Schwimmstress keine Auswirkung auf die Grundaktivität im Lateralen Kern der Amygdala hat. Durch den FST wurde die LA-LTP vermindert (Kontrolle [FST]: $129,8 \pm 6,6$ % [n = 14] ggü. Kontrolle: $144,9 \pm 6,1$ % [n = 13]; $P < 0,02$; Abb. 10C). OLDA wirkte dieser Minderung signifikant ($P = 0,05$) entgegen und erhöhte die Stärke der Feldpotenziale nach der HFS der Fasern der externen Kapsel in Schnitten von schwimmgestressten Mäusen (1 μ M OLDA [FST]: $141,0 \pm 5,5$ % [n = 18]; Abb. 10B). Weiterhin unterscheidet sich die LTP von mit OLDA-behandelten Schnitten nach FST signifikant von OLDA-behandelten Schnitten, die von nicht-gestressten Mäusen stammen ($P = 0,003$; Abb. 10C). Mit dem spezifischen TRPV1-Antagonisten AMG 9810 konnte die Erhöhung der LA-LTP durch OLDA nach FST geblockt werden (1 μ M AMG + 1 μ M OLDA [FST]: $127,5 \pm 8,3$ % [n = 8]; $P = 0,0136$; Abb. 10B und C). Für diese Messungen wurden Gehirnschnitte von 14 Mäusen verwendet.

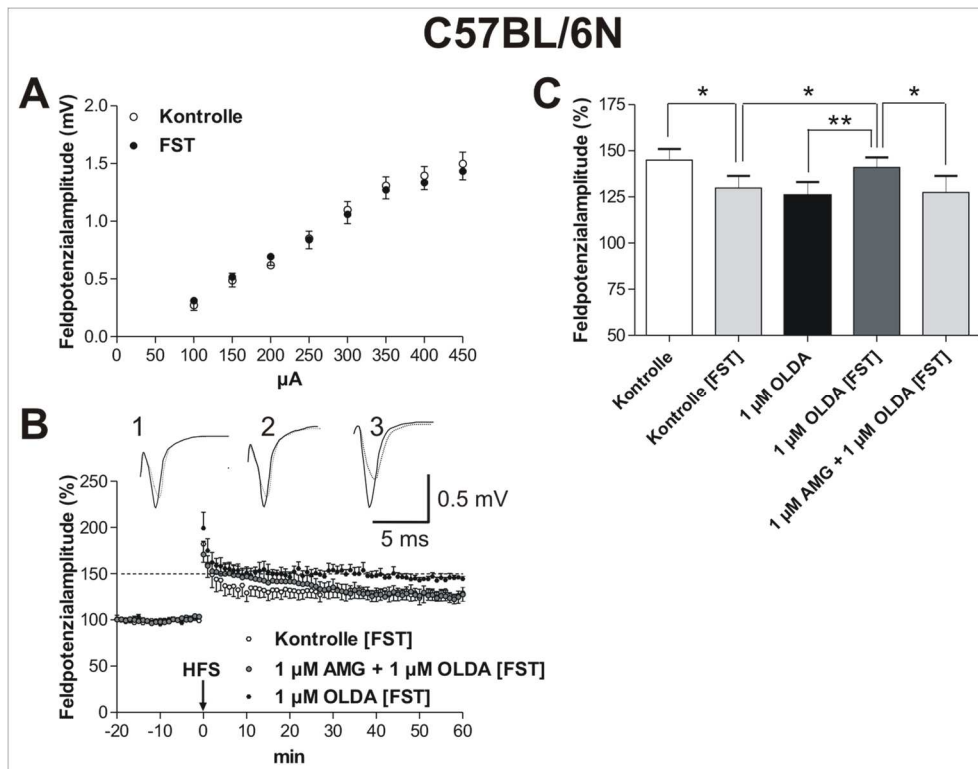


Abbildung 10: OLDA kehrt die Schwimmstress-vermittelte Änderung in der LA-LTP um. (A) Die Input/Output-Kurven der Schnitte von ungestressten ($n = 48$ Schnitte; 7 Tiere) und durch Schwimmen gestresste Mäuse ($n = 47$ Schnitte; 7 Tiere) unterscheiden sich nicht signifikant ($P > 0,05$). (B) Ein einzelner Schwimmstress ($n = 14$ Schnitte; 7 Tiere) rief eine leichte aber signifikante Reduzierung der LA-LTP hervor, wohingegen bei der Gabe von $1 \mu\text{M}$ OLDA die LA-LTP nach FST signifikant erhöht wurde ($n = 18$ Schnitte; 5 Tiere) (vgl. Abb. 9B). Diese Erhöhung nach dem FST konnte durch eine Koapplikation von $1 \mu\text{M}$ AMG 9810 + $1 \mu\text{M}$ OLDA ($n = 8$ Schnitte; 3 Tiere) geblockt werden. (C) Säulendiagramm der aus dem Diagramm B gemittelten Werte der 59. und 60. Minute nach HFS zusammen mit den entsprechenden Werten aus Abbildung 9B mit den jeweiligen Standardfehlern des arithmetischen Mittels. Mit dem zweifaktoriellen ANOVA-Test erfolgte die statistische Auswertung. Signifikante Unterschiede sind angezeigt, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. (nach: Kulisch, C. and Albrecht, D. 2012. Effects of single swim stress on changes in TRPV1-mediated plasticity in the amygdala. *Behavioural Brain Research* **236**: 344-349)

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von den Mäusen des Stammes C57BL/6N zu testen, wurden auch Wildtypmäuse des C57BL/6J-Stammes dem Forced Swimming Test unterzogen. Wie in Abbildung 11A und D gezeigt, erhöht OLDA auch bei diesem Mäusestamm die LA-LTP im Vergleich zur Kontrolle (Kontrolle [+/+] [FST]: $127,7 \pm 8,6 \%$ [$n = 6$] ggü. $1 \mu\text{M}$ OLDA [+/+] [FST]: $145,3 \pm 2,3 \%$ [$n = 6$]; $P = 0,01$). In TRPV1-KO-Mäusen wurde die Grundaktivität der Neuronen nach dem FST gegenüber den Werten der Kontrollgruppe aus Abbildung 9D nicht signifikant verändert (Abb. 11B). Dies deckt sich mit den Ergebnissen von den C57BL/6N-Mäusen (Abb. 10A). Wie erwartet werden konnte, wurde keine OLDA-vermittelte Erhöhung der LA-LTP nach FST im Vergleich zur

schwimmgestressten Kontrollgruppe festgestellt (Kontrolle [-/-] [FST]: $130,9 \pm 6,0$ % [n = 8] ggü. $1 \mu\text{M}$ OLDA [-/-] [FST]: $131,4 \pm 10,0$ % [n = 9]; $P > 0,05$; Abb. 11C und D). Diese Ergebnisse zeigen, dass die LA-LTP durch OLDA in schwimmgestressten Mäusen erhöht wird und dass dies ein Prozess ist, der durch den TRPV1-Kanal gesteuert wird. In diese Analysen flossen Messungen von drei C57BL/6J-Mäusen und sechs TRPV1-knockout-Mäusen ein.

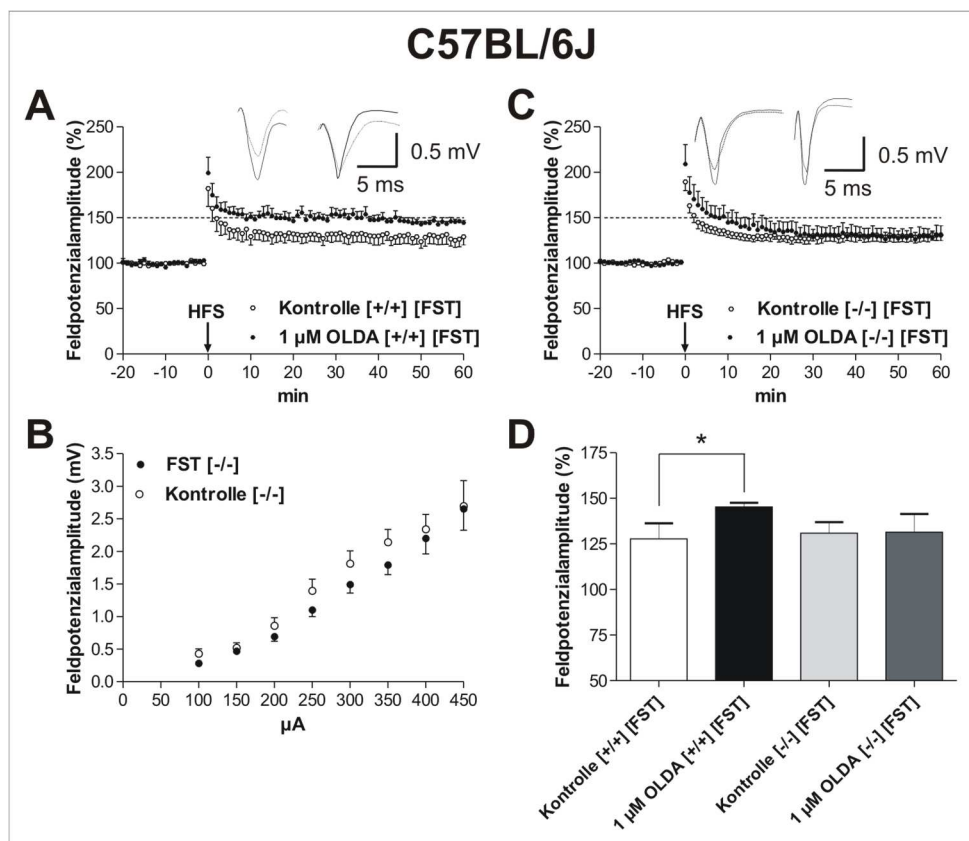


Abbildung 11: Die in Wildtypen beobachtete OLDA-vermittelte Steigerung der LA-LTP fehlt in TRPV1-knockout-Mäusen. (A) Die LTP wurde in Schnitten von Wildtypmäusen durch den FST herabgesetzt (n = 6 Schnitte; 3 Tiere). Mit $1 \mu\text{M}$ OLDA perfundierte Schnitte von Wildtypmäusen wiesen nach dem FST eine signifikant erhöhte LTP auf (n = 6 Schnitte; 3 Tiere). (B) Die Input/Output-Kurven von TRPV1-knockout-Mäusen, die dem FST unterzogen wurden (n = 18 Schnitte; 3 Tiere), unterschieden sich nicht signifikant von denen einer Kontrollgruppe ungestresster Tiere (n = 18 Schnitte; 3 Tiere). (C) Die LA-LTP-Stärke der OLDA-behandelten Schnitte von Knockout-Mäusen (n = 9 Schnitte; 3 Tiere) unterscheidet sich nicht signifikant von der aus der Kontrollgruppe (n = 8 Schnitte; 3 Tiere) nach jeweils erfolgtem FST. In den Diagrammen A und C sind repräsentative Amplituden dargestellt, die fünf Minuten vor (gepunktete Linie) bzw. 60 Minuten nach (durchgängige Linie) einer HFS aufgezeichnet wurden. (D) Säulendiagramm aus den Daten der Diagramme A und C mit gemittelten Werten der 59. und 60. Minute nach HFS und deren Standardfehlern des arithmetischen Mittels. Der signifikante Unterschied ist markiert (* $P < 0,05$). (nach: Kulisch, C. and Albrecht, D. 2012. Effects of single swim stress on changes in TRPV1-mediated plasticity in the amygdala. *Behavioural Brain Research* **236**: 344-349)

3.2.3 Untersuchung der Wirkung von Ethanol auf die LTP

Die Wirkung der Hochfrequenzstimulation könnte davon abhängig sein, ob der TRPV1-Kanal sensibilisiert wird. Eine Sensibilisierung ist z. B. durch Isofluran möglich (Zschenderlein et al. 2011). Weiterhin ist bekannt, dass TRPV1-Rezeptoren durch Ethanol aktiviert werden (Blednov and Harris 2009). Es wurde gezeigt, dass sensorische Neuronen des Nervus trigeminus und des Ganglion spinale sowie TRPV1-ausbildende Zellen der Linie HEK293 konzentrationsabhängig auf Ethanol reagieren (Trevisani et al. 2002). Bei diesen Messungen potenzierte Ethanol die Effekte des TRPV1-Rezeptors, welche durch die Applikation von Capsaicin und von Protonen sowie durch Temperaturerhöhung hervorgerufen wurden. Diese Effekte konnten durch den TRPV1-Rezeptorantagonisten Capsazepin aufgehoben werden. Außerdem wurde der Schwellenwert des TRPV1-Rezeptors zur Aktivierung durch Temperatur von etwa 43 °C auf etwa 34 °C herabgesetzt. Es wurde in weiteren Versuchen gezeigt, dass durch Ethanol verursachte Verhaltensänderungen bei Mäusen durch den TRPV1-Rezeptor mit vermittelt werden (Blednov and Harris 2009; Ellingson et al. 2009).

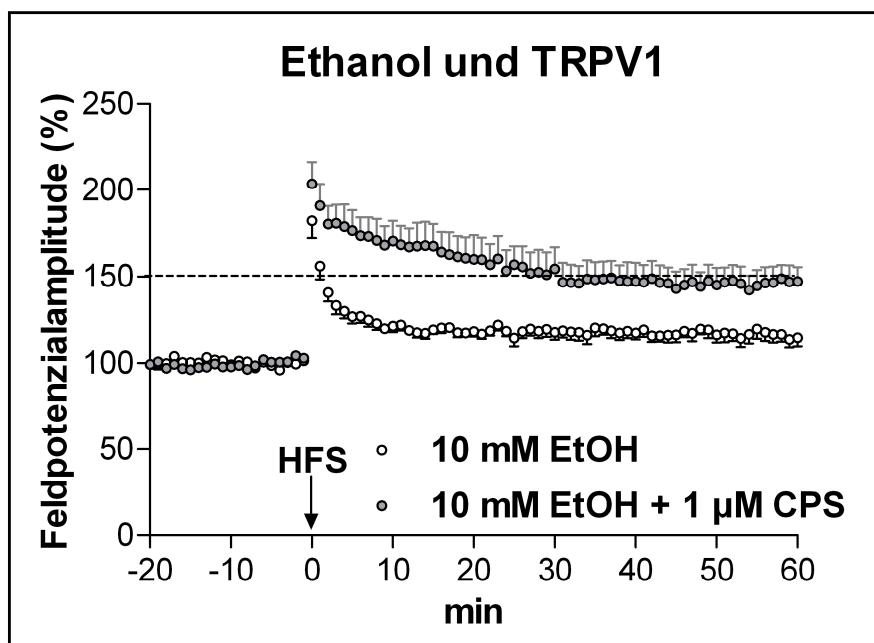


Abbildung 12: Sensibilisierung des TRPV1-Rezeptors durch Ethanol. Dargestellt sind die Messergebnisse für 10 mM Ethanol (EtOH), wodurch eine starke Hemmung der LTP ausgelöst wird. Bei einer Koapplikation mit 1 μ M CPS wird dieser Effekt aufgehoben. Es findet anscheinend eine Sensibilisierung des TRPV1-Rezeptors für CPS durch EtOH statt. Es sind die Durchschnittswerte mit den jeweiligen Standardfehlern des arithmetischen Mittels dargestellt.

In Abbildung 12 ist die Auswirkung von Ethanol bei intranukleärer Reizung auf die LTP der Auswirkung von Ethanol (EtOH) und Capsaicin bei gleichzeitiger Applikation gegenübergestellt. Der zweifaktorielle ANOVA-Test für fortlaufende Messungen ergab einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen (10 mM EtOH: $114,1 \pm 4,6$ % [n = 8] ggü. 10 mM EtOH + 1 μ M CPS: $147,1 \pm 8,9$ % [n = 8]; P = 0,0052; 3 C57BL/6J-Mäuse). Der Vergleich mit den Werten von Kontrollmessungen ($148,1 \pm 6,8$ % [n = 9]; siehe Abb. 7B) zeigt, dass Ethanol die Plastizität im lateralen Kern der Amygdala hemmend beeinflusst und dass die gleichzeitige Aktivierung der TRPV1-Rezeptoren durch CPS dem entgegenwirkt. Ethanol scheint den TRPV1-Rezeptor zu sensibilisieren, da eine alleinige Applikation von CPS ebenfalls zu einer starken Hemmung führt (vgl. Abb. 5).

3.2.4 Untersuchung der Wirkung von Serotonin auf die LTP

Wie die Ergebnisse aus 3.1 und 3.2.3 zeigen, scheinen sowohl Isofluran als auch Ethanol die TRPV1-Rezeptoren zu sensibilisieren. In der Natur kommt Isofluran aber nicht vor und Ethanol kann nur in recht seltenen Fällen, den Homo sapiens ausgenommen, auf die Gehirne von Tieren einwirken. Ein möglicher physiologischer Sensibilisator ist Serotonin (5-Hydroxytryptamin – 5-HT). 5-HT ist eine weit verbreitete Substanz sowohl im Tier- als auch im Pflanzenreich. In Säugetieren hat es vielfältige Funktionen, so als Neurotransmitter im zentralen und peripheren Nervensystem oder als lokales Hormon z. B. beim Immunsystem, dem Gastrointestinaltrakt oder dem kardiovaskulären System (Barnes and Neumaier 2011). Das serotonerge System wird durch Stress beeinflusst, was unter anderem zu einem Anstieg der extrazellulären 5-HT-Konzentration in der Amygdala führen kann (Amat et al. 1998; Chen and Miller 2012; Crawford et al. 2013), und könnte somit auch direkte Auswirkungen auf die LTP haben.

Wie bekannt ist, löst 5-HT in Schmerzfasern eine Sensibilisierung von TRPV1-Rezeptoren aus (Lloyd et al. 2011). Aus diesem Grunde wurde seine Bedeutung für die Sensibilisierung von TRPV1-Rezeptoren im lateralen Kern der Amygdala geprüft. 5-HT wird in der Amygdala, neben vielen anderen Hirnstrukturen, sowohl unter physiologischen als auch pathophysiologischen Bedingungen freigesetzt (Crawford et al. 2013; Rueter and Jacobs 1996).

Wie in Abbildung 13 zu sehen ist, lösen hohe Konzentrationen von 5-HT (100 μ M) nach HFS eine kurzzeitige Potenzierung aus. Die Feldpotenzialamplituden erreichen schon nach 14 Minuten Werte, wie sie auch eine Stunde nach HFS gemessen wurden (108,0 \pm 2,1 % [n = 9]). Während CPS ebenfalls die LA-LTP unterdrückt, verursacht die Koapplikation beider Substanzen eine Steigerung der Feldpotenzialamplituden, wie sie in Pharmakon-freien Kontrollableitungen zu beobachten ist (1 μ M CPS: 113,6 \pm 4,2 % [n = 14] ggü. 100 μ M 5-HT + 1 μ M CPS: 146,1 \pm 4,3 % [n = 11]). Durch die Koapplikation beider Substanzen scheint es zu einer Sensibilisierung der TRPV1-Rezeptoren gekommen zu sein. Die Werte der LTP sind signifikant zu den Werten der beiden anderen Gruppen erhöht (jeweils $P < 0,0001$).

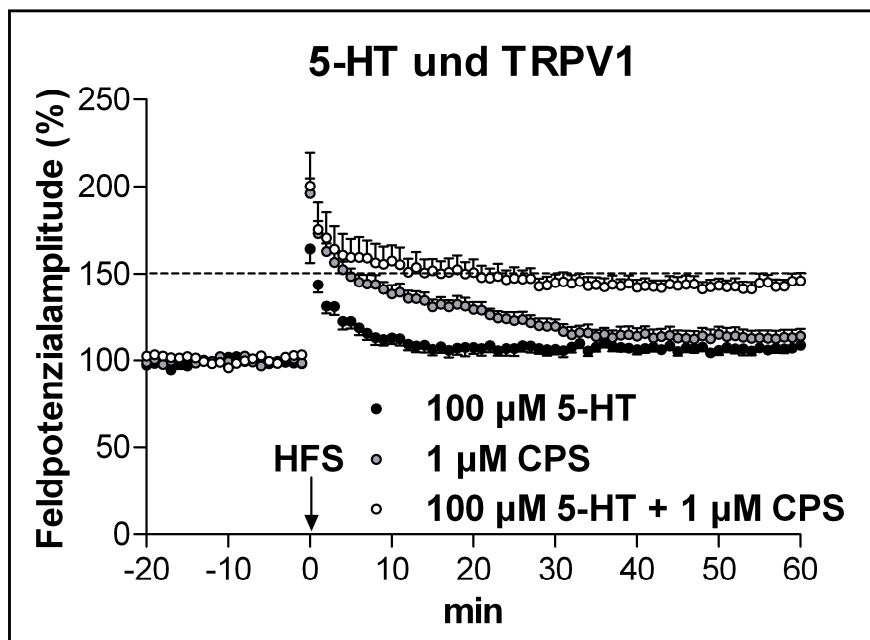


Abbildung 13: Sensibilisierung des TRPV1-Rezeptors durch hohe Serotoninkonzentrationen. 100 μ M Serotonin bewirken eine starke Reduzierung der LA-LTP schon nach 14 Minuten (n = 9 Schnitte; 4 Tiere). Der Prozess der Unterdrückung durch 1 μ M Capsaicin ist im Vergleich langsamer (n = 14 Schnitte; 5 Tiere). Beide Substanzen bewirken nach einer Stunde Messdauer eine sehr deutliche Suppression der LA-LTP. Bei der Koapplikation zeigte sich ein LA-LTP-Verlauf, der dem Verlauf einer Kontrollmessung entspricht und signifikant gegen die beiden anderen Messreihen erhöht ist (n = 11 Schnitte; 4 Tiere). Serotonin scheint eine Sensibilisierung der TRPV1-Rezeptoren bewirkt zu haben. Die Messungen wurden nach einer Diethylethernarkose durchgeführt. Es sind die Durchschnittswerte mit den jeweiligen Standardfehlern des arithmetischen Mittels dargestellt.

Eine geringere Konzentration von 3 μM Serotonin, wie sie auch in weiterführenden Patch-Clamp-Ableitungen zur Untersuchung der mEPSC verwendet wurde, löste ebenfalls eine starke Suppression der LA-LTP aus. Bei Koapplikation von 5-HT und CPS konnte jedoch keine Sensibilisierung des TRPV1-Rezeptors ermittelt werden (3 μM 5-HT: $113,1 \pm 4,2$ % [n = 10] ggü. 3 μM 5-HT + 1 μM CPS: $122,5 \pm 4,4$ [n = 17]; insgesamt 5 Tiere; Abb. 14). Die Werte der Koapplikation sind zwar höher als jene von 3 μM 5-HT, im zweifaktoriellen ANOVA-Test konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Untersuchung erfolgte nach einer Narkose mit 4 % Isofluran.

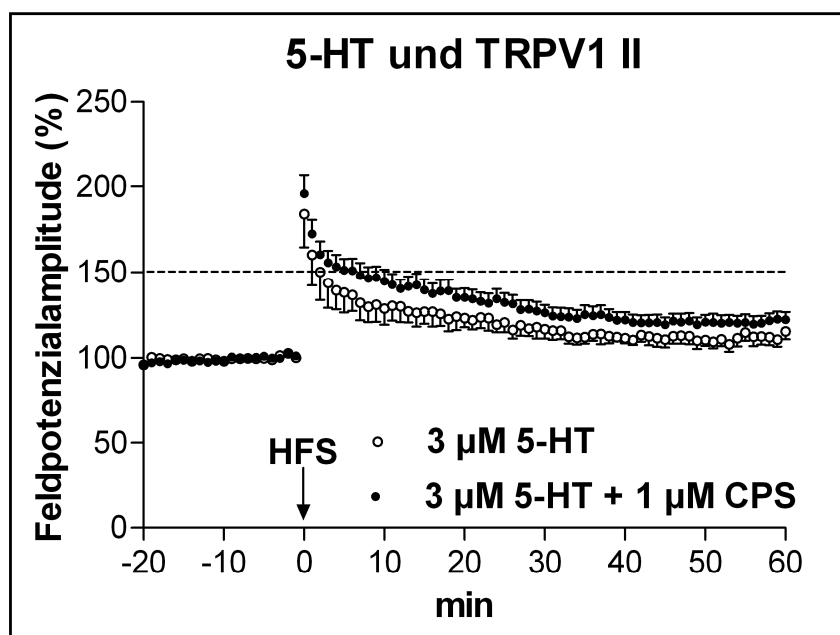


Abbildung 14: Geringe Serotoninkonzentrationen bewirken keine Sensibilisierung der TRPV1-Rezeptoren. Abgebildet sind die Messergebnisse für 3 μM Serotonin (n = 10 Schnitte), welche eine starke Reduzierung der LA-LTP bewirkten. Bei einer Koapplikation mit 1 μM Capsaicin (n = 17 Schnitte) kam es zu einer leichten aber nicht signifikanten Erhöhung der LA-LTP. Im Gegensatz zu einer Applikation von 100 μM Serotonin (vgl. Abb. 13) fand anscheinend keine ausreichende Sensibilisierung der TRPV1-Kanäle statt. Die Versuche wurden nach einer Narkose mit 4 % Isofluran durchgeführt. Es sind die Durchschnittswerte mit den jeweiligen Standardfehlern des arithmetischen Mittels dargestellt.

Sowohl mit Konzentrationen von 100 μM als auch mit 3 μM bewirkt Serotonin eine signifikante Reduzierung der LA-LTP. Die hohe Konzentration bewirkt weiterhin eine deutliche Sensibilisierung der TRPV1-Rezeptoren. Aus diesem Grund soll in Patch-Clamp-Untersuchungen (siehe Versuch 3.4.2) der Frage nachgegangen werden, welche Serotoninrezeptoren in die Vermittlung des Serotonineffekts involviert sind.

3.2.5 Untersuchung der Lokalisation von TRPV1-Rezeptoren

Obwohl in den bisherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe keine Veränderungen von Frequenz und Amplitude der mEPSC gefunden werden konnten (Zschenderlein et al. 2011), sind aus der Literatur Hinweise bekannt, die auf eine präsynaptische Lokalisation von TRPV1-Rezeptoren z. B. in der Substantia nigra hinweisen (Marinelli et al. 2003), wobei eine postsynaptische Lokalisation nicht ausgeschlossen werden kann (Goswami et al. 2010; Toth et al. 2005). Um einen Hinweis auf eine präsynaptische Beteiligung zu finden, wurde deshalb in extrazellulären Untersuchungen die Doppelpulsreizung (Paired Pulse Stimulierung - PP) als Standardtest für präsynaptische Wirkungen (Stevens 1993) von Pharmaka durchgeführt. Dabei werden zwei Reize mit kurzem Zeitintervall gegeben, die resultierenden Feldpotenziale gemessen und anschließend zueinander ins Verhältnis gesetzt (Amplitude des 2. Feldpotenzials/Amplitude des 1. Feldpotenzials).

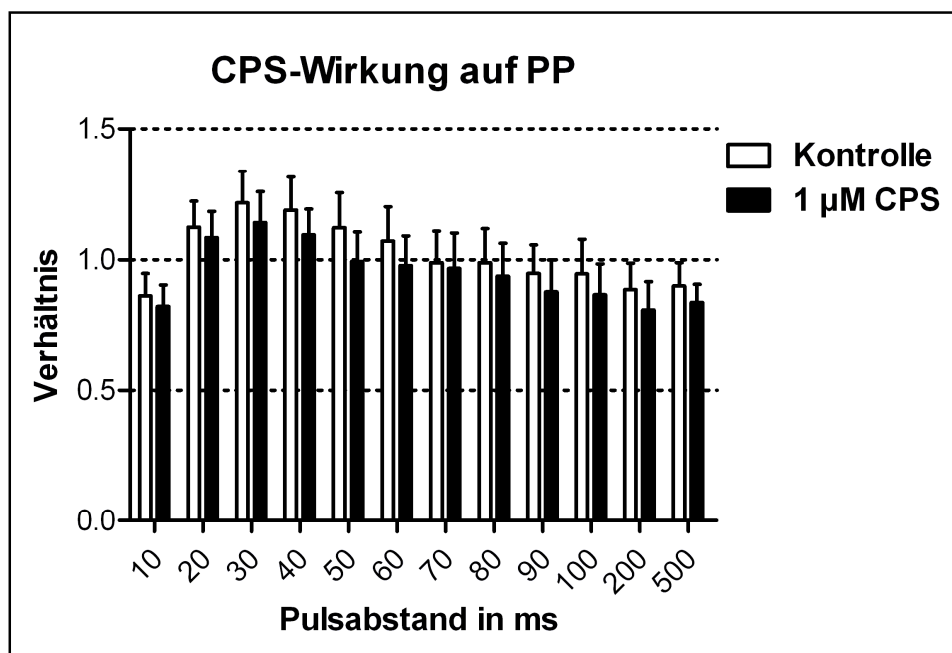


Abbildung 15: Wirkung von Capsaicin auf die Doppelpulsreizung. Dargestellt ist das Verhältnis des zweiten Pulses zum ersten über den zeitlichen Abständen. Verglichen werden die Paired Pulse Stimulationen (PP) zwischen Messungen ohne Substanz und mit 1 µM Capsaicin (CPS). Dabei wurde an einem Schnitt zuerst die Kontrolle gemessen, dann CPS appliziert und erneut gemessen (n = 15 Schnitte). Es wurde ein signifikanter Unterschied festgestellt (P = 0,0005). Dargestellt sind die Mittelwerte aller Messungen mit den Standardfehlern des arithmetischen Mittels. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Wilcoxon Test.

Für diesen Versuch wurden zuerst die Kontrollmessungen an Schnitten durchgeführt und anschließend bei denselben Schnitten 1 μM Capsaicin (CPS) appliziert. Zwischen den beiden Messungen lagen jeweils 30 Minuten. In Abbildung 15 ist bei der Kontrollmessung eine typische Kurve für eine Doppelpulsreizung zu sehen. Wie auch in anderen Untersuchungen der Arbeitsgruppe, fielen die zweiten Reizantworten bei den Zeitintervallen von 30 – 60 ms größer als die ersten Reizantworten aus. Die Abbildung verdeutlicht ebenfalls, dass im Vergleich der beiden Messungen eine Reduzierung des Doppelpulsverhältnisses durch 1 μM CPS erfolgte, die für alle Pulsabstände nachgewiesen werden konnte und signifikant ist ($n = 15$; 5 C57BL/6J-Mäuse; Wilcoxon Test: $P = 0,0005$).

In weiteren Untersuchungen sollte geprüft werden, welche möglichen Capsaicin-induzierten Prozesse die Freisetzungswahrscheinlichkeit von Glutamat aus der präsynaptischen Membran modifizieren können.

3.3 Untersuchung der Wirkung von CPS auf die NO-Synthese bei HFS

Es ist bekannt, dass Stickstoffmonoxid (NO) ein multifunktionales Signalmolekül in einer Vielzahl von Geweben ist und dass es an Synapsen retrograd als Neurotransmitter wirken kann (Bredt and Snyder 1992). NO kann von verschiedenen NO-Synthasen (NOS) gebildet werden und hat weiterhin eine starke Wirkung als Vasodilatator (Bredt and Snyder 1994; Marletta 1993). Weiterhin ist bekannt, dass durch einen verstärkten Ca^{2+} -Einstrom über die postsynaptische Membran von Neuronen die NOS aktiviert werden, wodurch es zu einer erhöhten Freisetzung des Neurotransmitters kommt.

Bisherige Untersuchungen der Arbeitsgruppe zeigten, dass in nNOS-KO-Mäusen, welche keine Gene für die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthasen haben und dementsprechend dieses Enzym nicht bilden können, die LA-LTP signifikant gegenüber denen der Kontrollgruppe reduziert wurden (Kontrolle: $142,7 \pm 4,6$ % [$n = 8$] ggü. nNOS^{-/-}: $133,0 \pm 7,4$ % [$n = 10$]; $P = 0,416$) und Capsaicin keinen weiteren suppressiven Effekt auf die LA-LTP ausübte (1 μM CPS nNOS^{-/-}: $132,7 \pm 4,6$ %). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die Verabreichung von CPS eine verstärkte Synthese von nNOS u. a. in der Amygdala bei Ratten bewirkt (Okere et al. 2000). Untersuchungen in anderen Gewebestrukturen deuten ebenfalls darauf hin, dass die NOS-Aktivitäten durch die TRPV1-Rezeptoren gesteuert werden können (Cella et al. 2008). Diese Ergebnisse zeigen, dass

Capsaicin einen Einfluss auf die Bildung von NO hat und führen zu der Hypothese, dass die Beeinflussung der NO-Synthese einen essentiellen Wirkungsweg darstellt, durch welchen der Effekt von CPS auf die Plastizität vermittelt wird. Um diesen Zusammenhang zu verifizieren, wurde der Einfluss von CPS auf die NO-Produktion nach HFS mittels Fluoreszenzmessungen in einer weiteren Untersuchung geprüft.

Bei diesem Versuch wird der nicht-fluoreszierende Farbstoff DAQ (1,2-Diamino-anthraquinonesulfat) (Heiduschka and Thanos 1998) eingesetzt, welcher bei Anwesenheit von Sauerstoff mit NO über Zwischenprodukte zum wasserunlöslichen und unter Anregung rot fluoreszierenden ATD (1H-anthra-[1,2d]-[1,2,3]-triazole-6,11-dione) (Gomes et al. 2006) reagiert. Aufgrund des Aufbaus des Fluoscan Interface Panel (Photon Technology International), war zunächst eine Glättung der gemessenen Fluoreszenzkurven notwendig. Diese Glättung wurde mit einem 7-Punkte Gleitenden Durchschnitt in der Software Origin 6.0 durchgeführt. In Abbildung 16 ist eine Messung vor der Glättung dargestellt und in Abbildung 17 dieselbe Messung nach der Glättung mit den gleichen Skalierungen der x- und der y-Achsen.

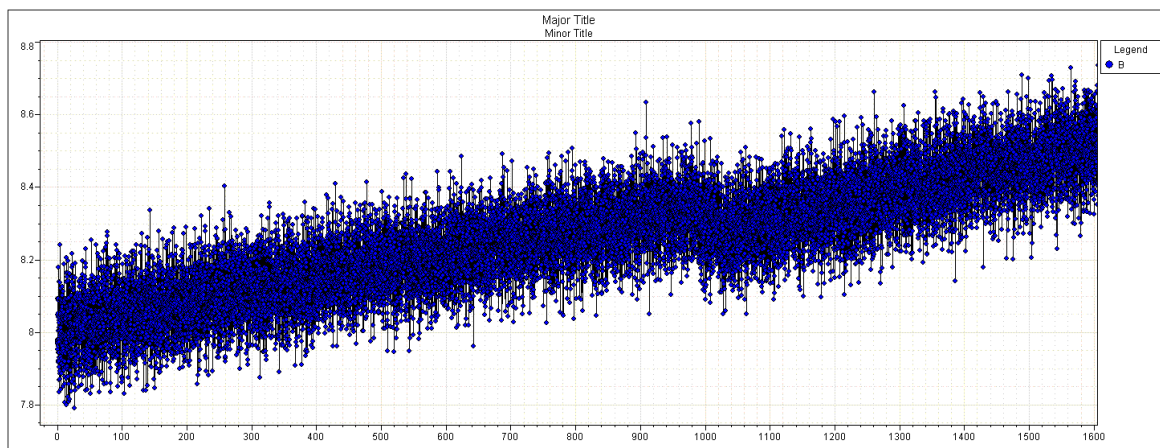


Abbildung 16: Beispiel für eine ungeglättete Fluoreszenzkurve. Dargestellt mit blauen Punkten sind die einzelnen Messwerte für die Intensität des fluoreszierenden ATD, welches aus den Edukten DAQ und NO hervorging, über der Zeit in Sekunden.

Die Bestimmung und Auswertung der Anstiege erfolgte für die Zeitintervalle von fünf Minuten vor HFS, von 30 Sekunden während der HFS, von einminütigen Intervallen für die ersten drei Minuten nach HFS, sowie in von zwei sich anschließenden dreiminütigen Intervallen. Somit sind sieben Zeitintervalle ausgewertet worden. Für die ersten drei Minuten nach der HFS wurde die Auswertung von einminütigen Intervallen der Auswertung eines

dreiminütigen Intervalls nach der HFS vorgezogen, da, neben dem Anstieg während der HFS, in den ersten Minuten nach der HFS die größten Auswirkungen der Stimulation zu erwarten waren.

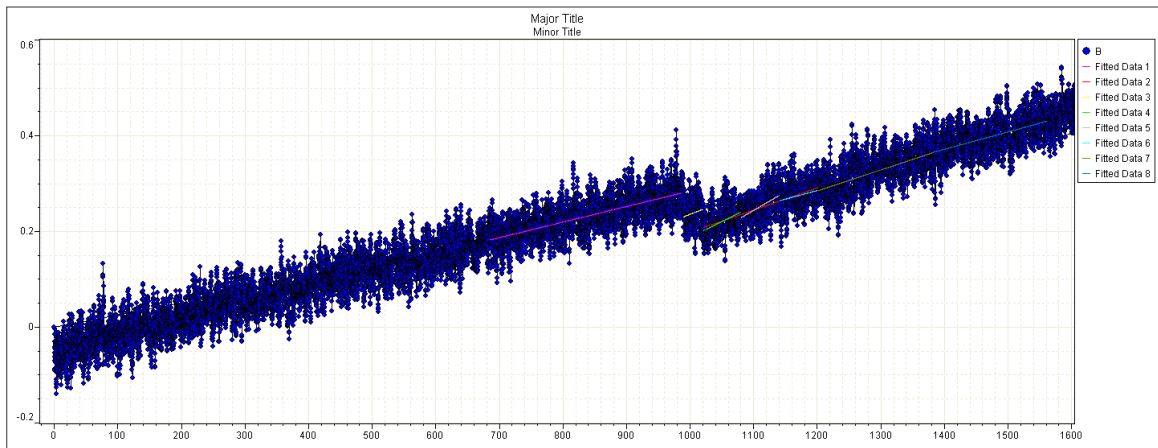


Abbildung 17: Beispiel für die Bestimmung der Anstiege in einer geglätteten Fluoreszenzmessung. Dargestellt sind die geglätteten Messwerte aus Abbildung 16. Weiterhin sind die Anstiege für die verschiedenen Zeitintervalle dargestellt (Fitted Data 1 – 8).

Die so ermittelten durchschnittlichen Anstiege sind in Abbildung 18 dargestellt. Um die Werte der Anstiege anschaulicher zu machen, wurden sie mit dem Faktor 1000 multipliziert. In der Gruppe ohne Capsaicin sind 15 Schnitte (sieben der linken Hemisphäre, acht der rechten) enthalten und in der Gruppe mit Capsaicin sind es 17 (sieben der linken Hemisphäre, zehn der rechten). Für jede Gruppe wurden Messungen an Gehirnschnitten von sieben C57BL/6J-Mäusen durchgeführt und für diese Ergebnisse verwendet. Wie in Abbildung 18A zu sehen ist, nimmt in der Gruppe mit Capsaicin die NO-Freisetzungsrates sehr deutlich schon nach der ersten der beiden Abfolgen der HFS zu (ZI1: $0,37 \pm 0,05$; ZI2: $0,68 \pm 0,12$; $P = 0,0237$). Dahingegen tritt in der Gruppe ohne CPS erst nach der gesamten HFS eine Erhöhung auf, die jedoch nicht signifikant ausfällt (ZI1: $0,29 \pm 0,05$; ZI2: $0,25 \pm 0,16$; ZI3: $0,37 \pm 0,07$). Im ungepaarten, zweiseitigen t-Test konnte ein signifikanter Unterschied im zweiten Zeitintervall zwischen den beiden Versuchsgruppen ermittelt werden ($P = 0,0399$). Der Vergleich der anderen Zeitintervalle ergab keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Bei der Gruppe ohne CPS nimmt die Freisetzungsrates von NO stetig ab (ZI4: $0,32 \pm 0,06$; ZI5: $0,29 \pm 0,07$; ZI6: $0,29 \pm 0,04$; ZI7: $0,26 \pm 0,04$). Auch in der Gruppe mit CPS ist die NO-Freisetzungsrates direkt nach der HFS nur leicht gegenüber dem Wert vor der HFS erhöht (ZI3: $0,42 \pm 0,08$). Gegenüber dem zweiten Zeitintervall ergab sich keine Signifikanz ($P = 0,0635$). Im weiteren Verlauf der

Messung sind die Werte niedriger als vor der HFS (ZI4: $0,30 \pm 0,05$; ZI5: $0,34 \pm 0,07$; ZI6: $0,36 \pm 0,05$; ZI7: $0,31 \pm 0,04$). Die Werte aus diesen vier Zeitintervallen sind signifikant niedriger als der Wert aus dem zweiten Zeitintervall (ZI2 ggü. ZI4: 0,0138; ggü. ZI5: 0,0381; ggü. ZI6: 0,0331; ggü. ZI7: 0,0125). Zudem ist die NO-Freisetzung im letzten Zeitintervall signifikant niedriger als im ersten (ZI1 ggü. ZI7: $P = 0,0355$).

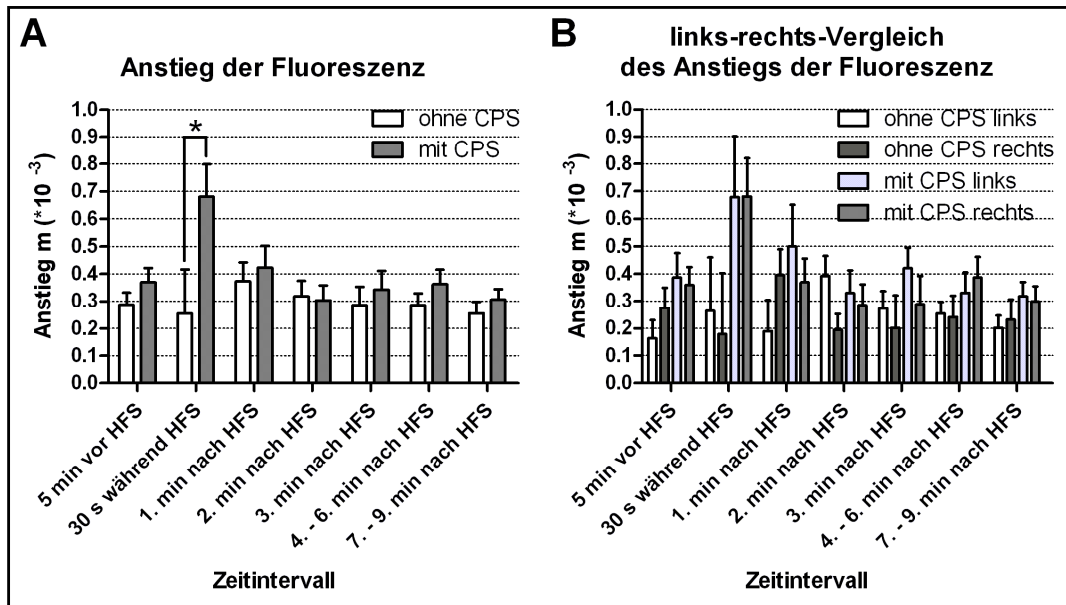


Abbildung 18: TRPV1-Rezeptorvermittelte Erhöhung der NO-Freisetzung. Dargestellt sind die Veränderungen des Anstieges m der Konzentration des fluoreszierenden ATD in den verschiedenen Zeitintervallen der Messungen. Die ATD-Konzentration kann nur zunehmen, wenn DAQ über Zwischenschritte mit NO reagiert. **(A)** In Anwesenheit von Capsaicin reichte eine Reizung von 1 Sekunde mit 100 Hz aus, um im Großteil der horizontalen Gehirnschnitte eine signifikant erhöhte NO-Freisetzung zu bewirken. Ein Anstieg der NO-Bildung in Schnitten ohne Capsaicin war erst nach der gesamten HFS messbar. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist nur der signifikante Unterschied zwischen den beiden Messgruppen während der HFS markiert. Für die Gruppe mit CPS wurde im einfaktoriellen ANOVA-Test für fortlaufende Messungen eine Signifikanz mit $P = 0,0002$ berechnet. **(B)** Bei der Aufgliederung der Gruppen in die Hemisphären ergab die Auswertung keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Amygdalae der linken und rechten Hemisphäre. In den Säulendiagrammen sind die Durchschnittswerte mit den jeweiligen Standardfehlern des arithmetischen Mittels dargestellt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch die agonistische Wirkung von Capsaicin auf den TRPV1-Rezeptor eine signifikante Zunahme der NO-Freisetzung nach dem ersten Teil der Hochfrequenzstimulation ausgelöst wird, welche in der Kontrollgruppe auch nach der vollständigen HFS nur in deutlich geringerem Umfang erfolgt. Dies deutet darauf hin, dass

CPS präsynaptisch die Membran über den TRPV1-Rezeptor depolarisiert, wodurch es nach einer HFS zu einer erhöhten Glutamatfreisetzung kommt. Das verstärkt freigesetzte Glutamat aktiviert die postsynaptisch lokalisierten NMDA-Rezeptoren, welche vermehrt Ca^{2+} in das Neuron diffundieren lassen, was dann in einer gesteigerten NO-Freisetzung durch nNOS-Aktivierung resultiert. Weiterhin ist ersichtlich, dass die verstärkte NO-Freisetzung nur von kurzer Dauer ist und die Freisetzungsraten mit zunehmendem zeitlichem Abstand zur HFS unter die Werte vor der Stimulation absinken. Dies könnte an der Aktivierung von CB1-Rezeptoren liegen, welche dann die präsynaptische Aktivität hemmen. Eine weitere Auffälligkeit ist die zwar nicht signifikante aber deutlich sichtbare, erhöhte NO-Freisetzung vor der HFS in der CPS-Gruppe gegenüber der Gruppe ohne CPS. Dies könnte bedeuten, dass auch ohne HFS eine leicht erhöhte Glutamatfreisetzung erfolgt.

Für die Abbildung 18B wurden die Messwerte der beiden Gruppen noch zusätzlich nach den Hemisphären aufgesplittet. Es konnten keine weiteren signifikanten Unterschiede ermittelt werden, was auf eine hemisphärengleiche Rezeptorverteilung hindeutet.

3.4 whole-cell patch-clamp Messungen

3.4.1 Untersuchung der Wirkung von Serotonin auf mEPSC

Wie aus den Ergebnissen des Versuchs 3.2.4 hervorgeht, beeinflusst Serotonin die Langzeitpotenzierung im lateralen Kern der Amygdala dahingehend, dass einerseits eine Hemmung der LTP hervorgerufen wird und andererseits eine Sensibilisierung der TRPV1-Rezeptoren bei Koapplikation mit CPS stattfinden kann. Durch die Sensibilisierung führt die Koapplikation der jeweils suppressiv wirkenden Substanzen zu einer gesteigerten LTP. Im weiteren Verlauf sollen die Wirkungen von einzelnen Serotoninrezeptoren auf miniatur exzitatorische postsynaptische Ströme (engl.: miniature excitatory postsynaptic currents – mEPSC) untersucht werden, um eventuell Rückschlüsse auf eine Beteiligung an dieser Sensibilisierung ziehen zu können. Dafür muss zunächst die Wirkung von Serotonin selbst auf die mEPSC betrachtet werden.

In Vorversuchen wurde eine Dosis-Wirkungs-Untersuchung durchgeführt, um eine für die Patch-Clamp-Messungen geeignete Konzentration von Serotonin zu ermitteln. Es sollte sichergestellt sein, dass alle für die Messungen nutzbaren Zellen ähnlich stark auf Serotonin

ansprechen und dass die Intensitäten der Zellreaktionen nicht zu stark sind. Bei einer Konzentration von 3 μM Serotonin war dies gegeben.

Für diese Untersuchung wurden elf Ableitungen von mEPSC von Pyramidenzellen aus horizontalen Gehirnschnitten, welche von insgesamt vier Mäusen stammen, gemacht. In der Abbildung 19 sind die Auswirkungen von Serotonin sowohl auf die Amplitude als auch auf die Frequenz dargestellt. Zunächst wurden der GABA_A -Rezeptorantagonist Bicucullin, welcher die GABA_A -Rezeptorvermittelte Inhibition von Interneuronen hemmt, und der Natriumionenkanalblocker Tetrodotoxin, welcher die Ausbildung von Aktionspotenzialen verhindert, appliziert und für zehn Minuten die mEPSC gemessen. Die letzten beiden Minuten wurden ausgewertet (B + T). Anschließend wurde zusätzlich Serotonin appliziert und weitere zehn Minuten registriert. Auch hier wurden die letzten beiden Minuten ausgewertet (B + T + S). Wie in Abbildung 19A ersichtlich ist, nahm die Amplitude der mEPSC zu, nachdem 3 μM Serotonin in der die Gehirnschnitte versorgenden ACSF-Lösung enthalten war (B + T: $-17,48 \pm 0,64$ pA, [n = 7] ggü. B + T + S: $-22,58 \pm 2,05$ pA, [n = 8]). Im zweifaktoriellen t-Test konnten signifikante Unterschiede ermittelt werden ($P = 0,0494$ [n = 7]). Diese Daten zeigen, dass Serotonin einen verstärkenden Einfluss auf die postsynaptische Aktivität hat.

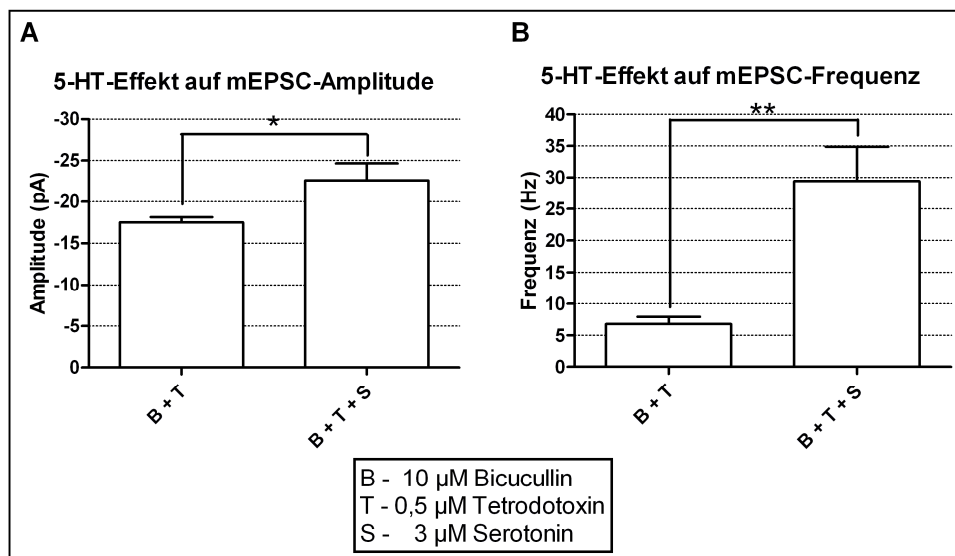


Abbildung 19: Einfluss von Serotonin auf die prä- und die postsynaptische Aktivität von Projektionsneuronen. (A) Serotonin erhöht die Amplituden von mEPSC signifikant. (B) Nachdem Serotonin auf die Neurone wirken konnte, nahm die Häufigkeit an Ereignissen sehr stark zu. Signifikante Unterschiede: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. Die Legende gilt für beide Diagramme.

In Abbildung 19B ist sehr deutlich die Zunahme der tatsächlichen Frequenz der mEPSC nach Applikation von Serotonin zu sehen (B + T: $6,78 \pm 1,18$ Hz, [n = 11] ggü. B + T + S: $29,43 \pm 5,44$ Hz, [n = 11]). Der zweifaktorelle t-Test ergab einen signifikanten Unterschied ($P = 0,0018$; [n = 11]). Somit bewirkt Serotonin auch eine sehr deutliche Steigerung der präsynaptischen Glutamatfreisetzung.

Aus den Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass Serotonin bei diesen Versuchsbedingungen einen deutlichen, erregenden Effekt sowohl auf die prä- als auch auf die postsynaptische Signalübertragung hat.

In Abbildung 20A sind alle Werte zusammengefasst, die in Abbildung 19A zu den Durchschnittswerten geführt haben. Für das Diagramm B sind die Zwischenereignisintervalle analysiert worden. Aus der Anzahl der Zwischenereignisintervalle in einem bestimmten Zeitraum, in dieser Arbeit zwei Minuten, hat sich die Frequenz für den jeweiligen Zeitraum ergeben. Bei diesen Darstellungen ist zum einen die absolute Häufigkeit an Ereignissen im selben Amplituden- bzw. Frequenzbereich dargestellt, wobei bei dieser Analyse eine Schrittgröße mit dem Wert 1 gewählt wurde. Zum anderen ist die relative Häufigkeit an Ereignissen dargestellt, wobei der Wert 1 der Anzahl aller Ereignisse entspricht. Das Verhältnis der Ereignisse aus einem Intervall von der Schrittgröße 1 zur Gesamtanzahl wird dabei fortlaufend von Null an addiert. Bei der Amplitude ist deutlich zu erkennen, dass sowohl die Anzahl der Ereignisse deutlich zugenommen hat als auch die Stärke der Amplituden anstieg. In Abbildung B ist eine sehr deutliche Verschiebung der Frequenzen der Zwischenereignisintervalle hin zu höheren Frequenzen ersichtlich. Weiterhin hat die Bandbreite sowohl bei den Frequenzen als auch bei den Amplituden zugenommen. Dies zeigt ebenfalls die faszilitierende Wirkung von Serotonin.

In der Abbildung 21 sind Ausschnitte aus einer der Messungen zum Versuch der Wirkung von Serotonin auf die mEPSC aus verschiedenen Zeitintervallen dargestellt. Die Ausschnitte zeigen einen Zeitraum von 4 s. Es sind deutlich die Auswirkungen von Serotonin auf die Frequenz und die Amplitude von mEPSC zu erkennen.

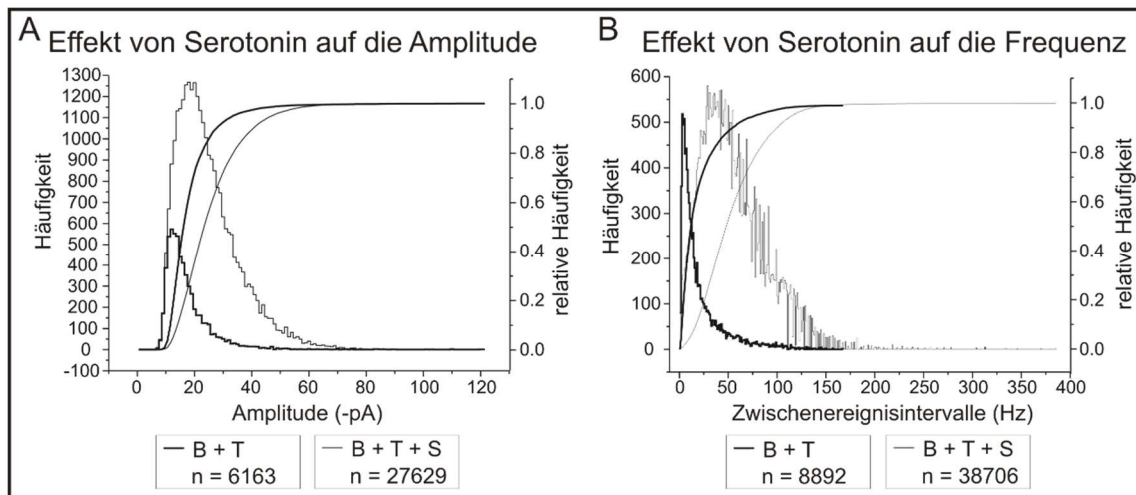


Abbildung 20: Quantitative Analyse der synaptischen Ereignisse. Es sind Häufigkeitsanalysen für die Amplitudengrößen und für die Zwischenereignisintervalle dargestellt. Auf der linken Y-Achse ist die tatsächlich gezählte und auf der rechten Y-Achse die relative Häufigkeit über der jeweiligen X-Achse dargestellt. Die Wirkungen von Serotonin werden mit den Ausgangszuständen derselben Zellen vor der Serotoninapplikation verglichen. **(A)** Sowohl die Häufigkeit als auch die Größe der Amplituden nehmen deutlich zu. Die Anzahl an Ereignissen hat sich mehr als vervierfacht. In diese Grafik sind die Daten von sieben Zellen eingeflossen. **(B)** Deutlich ist eine Verschiebung zu höheren Frequenzen hin zu sehen. Unter Wirkung von Serotonin sind die zuvor vorherrschenden Frequenzen sogar weniger häufig registriert worden. In dieser Auswertung wurden die Werte von elf Zellen analysiert.

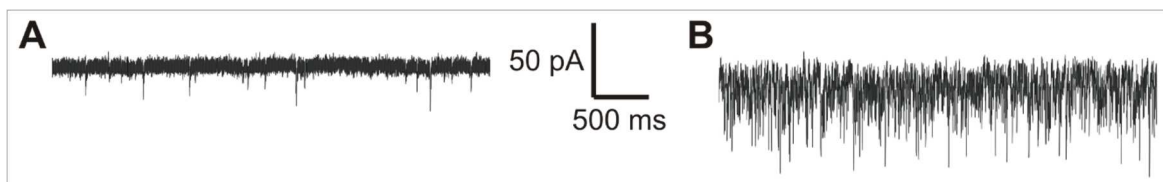


Abbildung 21: Veränderung der mEPSC einer Zelle. Beispielhaft ist je ein Ausschnitt pro analysiertem Zeitintervall der mEPSC-Registrierung einer Zelle aus dem Versuch zur Wirkung von Serotonin auf die mEPSC dargestellt. Die Abbildungen zeigen jeweils einen Zeitraum von genau 4 s. Die Skalierung gilt für beide Abbildungen. **(A)** In diesem Ausschnitt aus dem ersten Zeitintervall sind deutlich mEPSC sichtbar, die sich von dem Rauschen klar abgrenzen. **(B)** Durch die Applikation von Serotonin hat sowohl die Amplitude als auch die Frequenz der mEPSC stark zugenommen.

3.4.2 Untersuchung der Wirkung bestimmter Serotoninrezeptoren auf mEPSC

Um die beteiligten Rezeptoren der 5-HT-vermittelten Erregung differenzieren zu können, wurden vier Messgruppen untersucht. Für die Kontrollgruppe wurden sieben mEPSC-Ableitungen von LA-Pyramidenzellen aus horizontalen Gehirnschnitten, die von vier Mäusen stammen, aufgezeichnet und ausgewertet. In der Gruppe WAY sind acht

mEPSC-Ableitungen (drei Mäuse), bei der SB-Gruppe zehn mEPSC-Ableitungen (vier Mäuse) und für die Ondansetron-Gruppe zehn mEPSC-Ableitungen (vier Mäuse) gemessen und ausgewertet worden. Zunächst wurden für zehn Minuten Bicucullin (Bicu), Tetrodotoxin (TTX) und einer der Antagonisten appliziert und anschließend für zehn Minuten zusätzlich Serotonin. Bei der Kontrollgruppe wurden während des gesamten Versuchs lediglich Bicu und TTX appliziert. In Säulendiagrammen sind die Ergebnisse für diese beiden Applikationsabschnitte dargestellt, wobei jeweils die letzten beiden Minuten dieser Intervalle präsentiert sind. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die Werte der Kontrollgruppe mit denen aus den drei anderen Gruppen einzeln dargestellt.

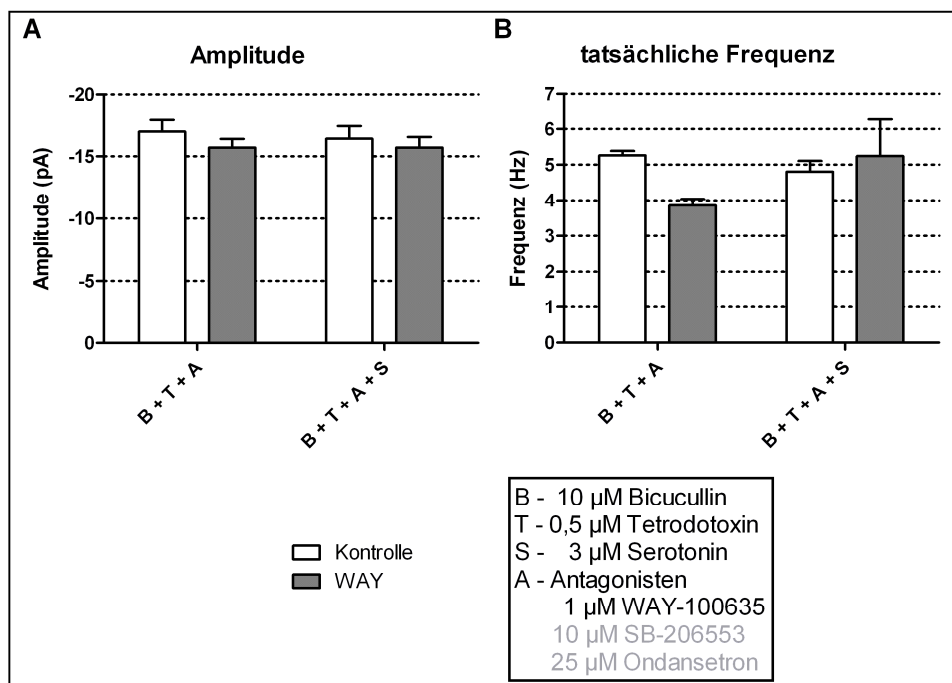


Abbildung 22: Amplituden- und Frequenzhistogramm bei Blockierung des 5-HT_{1A}-Rezeptors. (A) Die Werte der Kontrollgruppe, bei der weder ein Antagonist noch Serotonin appliziert wurde, und der Gruppe mit WAY-100635 ändern sich nur in geringem Umfang. (B) In der Kontrollgruppe bleiben die Werte fast unverändert. In der WAY-Gruppe nimmt die Frequenz bei der Koapplikation von Serotonin und WAY-100635 leicht aber nicht signifikant zu. In den Säulendiagrammen sind die Durchschnittswerte mit den jeweiligen Standardfehlern des arithmetischen Mittels dargestellt. Die Legende gilt für beide Diagramme.

Die Abbildung 22 zeigt für die Kontrollgruppe sowohl für die Amplitude (B + T + A: $-16,95 \pm 0,96$ pA ggü. B + T + A + S: $-16,39 \pm 1,02$ pA, [jeweils n = 7]) als auch für die tatsächliche Frequenz (B + T + A: $5,27 \pm 0,12$ Hz, [n = 5] ggü. B + T + A + S: $4,81 \pm 0,30$ Hz, [n = 7]) nur geringe Veränderungen. Es konnten keine Signifikanzen im zweiseitigen,

gepaarten t-Test ermittelt werden. In Abbildung 22 sind auch die Ergebnisse der Gruppe mit Applikation des 5-HT_{1A}-Rezeptorantagonisten WAY-100635 dargestellt. Die Amplitude blieb dabei konstant (B + T + A: $-15,70 \pm 0,68$ pA, [n = 7] ggü. B + T + A + S: $-15,69 \pm 0,86$ pA, [n = 8]; Abb. 22A). Bei der Auswertung der tatsächlichen Frequenz wurde eine Zunahme nach zusätzlicher Applikation von Serotonin ermittelt (B + T + A: $3,85 \pm 0,18$ Hz, [n = 6] ggü. B + T + A + S: $5,24 \pm 1,03$ Hz, [n = 8]; Abb. 22B), die jedoch deutlich geringer ausfiel als in Versuch 3.4.1 (vgl. Abb. 19B). Im zweiseitigen, gepaarten t-Test konnte keine Signifikanz festgestellt werden.

Nach der Auswertung der Messergebnisse mit dem 5-HT_{2B}/5-HT_{2C}-Rezeptorantagonisten (SB-206553) wurde erkennbar, dass sowohl die Amplituden der mEPSC (B + T + A: $-16,19 \pm 1,10$ pA ggü. B + T + A + S: $-15,93 \pm 1,21$ pA, [jeweils n = 10]) als auch die Frequenzen (B + T + A: $4,16 \pm 0,71$ Hz ggü. B + T + A + S: $4,02 \pm 0,83$ Hz, [jeweils n = 10]) trotz der Applikation des Serotonins nahezu unverändert geblieben sind. Aus Abbildung 23 geht das deutlich hervor. Diese Befunde deuten darauf hin, dass der Rezeptor 5-HT_{2B} oder 5-HT_{2C} oder beide Rezeptoren sowohl in der prä- als auch in der postsynaptischen Membran von Pyramidenzellen im LA lokalisiert sind und deren Aktivierung entscheidend für die Vermittlung der Serotonineffekte ist.

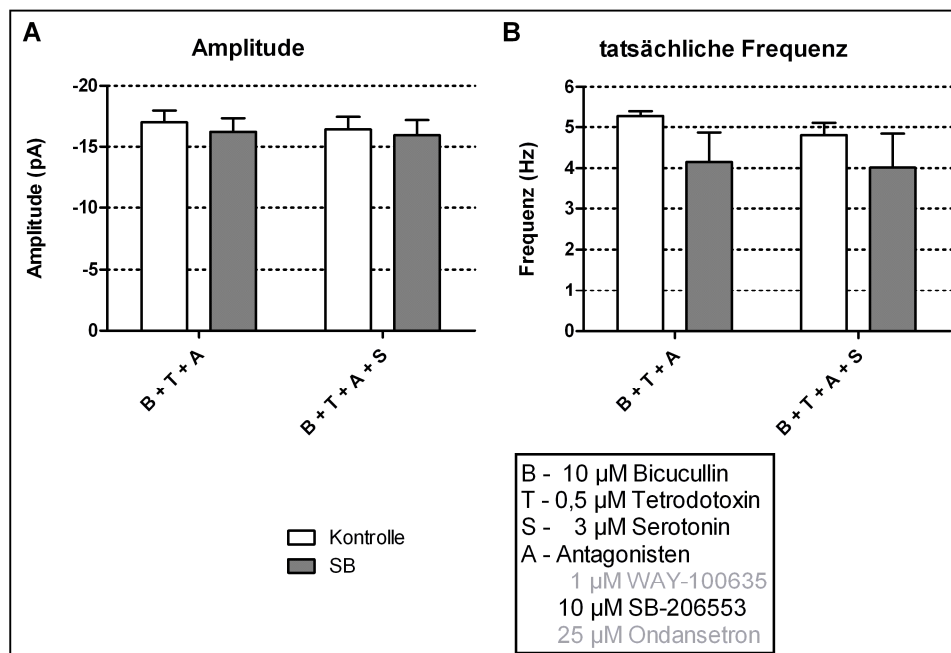


Abbildung 23: Amplituden- und Frequenzhistogramm bei Blockierung der 5-HT_{2B/2C}-Rezeptoren. (A) Die Koapplikation von 5-HT und dem 5-HT_{2B/2C}-Rezeptorantagonisten ändert die Amplitude nicht. (B) Die Frequenzen bleiben ebenfalls konstant. In den Säulendiagrammen sind die Durchschnittswerte mit den jeweiligen Standardfehlern des arithmetischen Mittels gezeigt. Die Legende gilt für beide Diagramme.

Die Abbildung 24A zeigt eine deutliche Zunahme der Amplitudenstärke nach Applikation des 5-HT₃-Rezeptorantagonisten Ondansetron zusammen mit Serotonin verglichen mit der Amplitudenstärke ohne Serotonin (B + T + A: $-17,44 \pm 1,04$ pA ggü. B + T + A + S: $-20,72 \pm 1,86$ pA [jeweils n = 10]). Diese Zunahme nähert sich derjenigen aus Versuch 3.4.1 an, jedoch ist sie im zweiseitigen, gepaarten t-Test nicht signifikant (P = 0,0976). Bei der Betrachtung der Frequenz wird ersichtlich, dass diese nach zehn Minuten der gemeinsamen Applikation von Ondansetron mit Serotonin zunimmt (B + T + A: $10,82 \pm 3,76$ Hz ggü. B + T + A + S: $26,19 \pm 6,29$ Hz [jeweils n = 10]; Abb. 24B). Der zweiseitige, gepaarte t-Test ergab einen signifikanten Unterschied (P = 0,0197 [n = 10]).

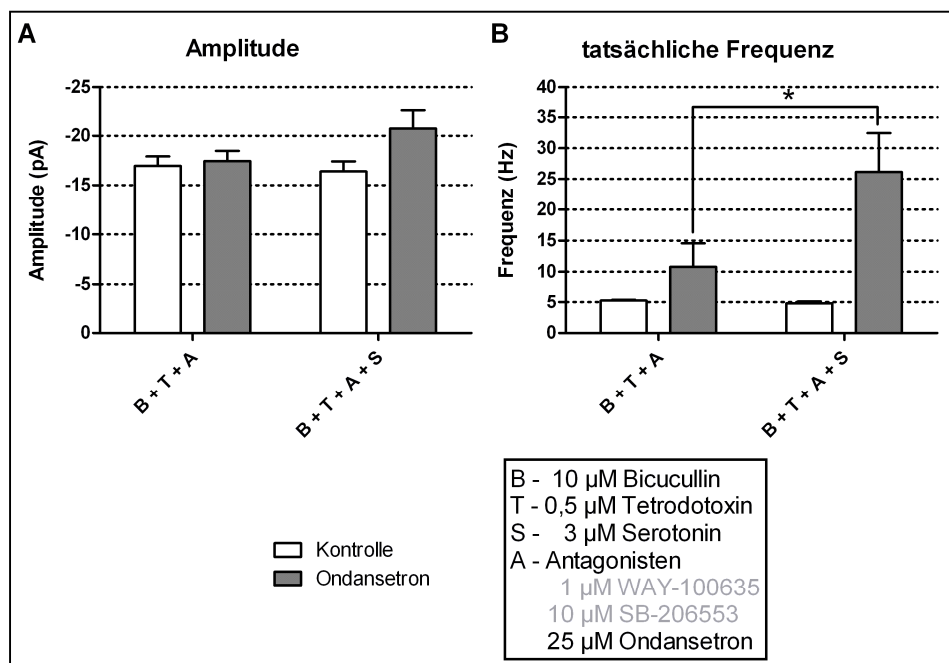


Abbildung 24: Amplituden- und Frequenzhistogramm bei Blockierung des 5-HT₃-Rezeptors. (A) Nach zehnminütiger Koapplikation von Ondansetron und Serotonin nimmt die Amplitude deutlich zu. Es wurde kein signifikanter Unterschied ermittelt. (B) Es wurde eine sehr deutliche Zunahme der tatsächlichen Frequenz nach der Koapplikation beider Substanzen gemessen. In den Säulendiagrammen sind die Durchschnittswerte mit den jeweiligen Standardfehlern des arithmetischen Mittels dargestellt. Signifikante Unterschiede im zweiseitigen, gepaarten t-Test sind dargestellt (* P < 0,05). Die Legende ist für beide Diagramme gültig.

Die Abbildung 25 zeigt jeweils einen Ausschnitt aus den vier Gruppen zur Untersuchung der Wirkung bestimmter Serotoninrezeptoren auf mEPSC. Dargestellt sind genau 4 s, die kurz vor Ende des zweiten Zeitintervalls für eine Zelle aus jeder Gruppe

aufgezeichnet wurden. Deutlich sind die unterschiedlichen Auswirkungen der applizierten Substanzen zu erkennen.

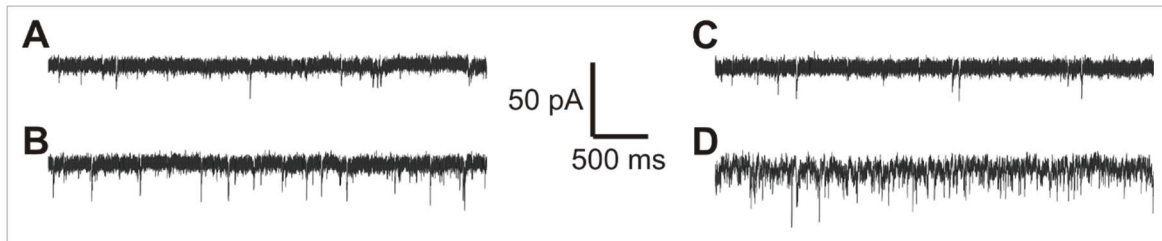


Abbildung 25: Auswirkung von Serotoninantagonisten auf mEPSC. Beispielhaft ist je ein Zeitausschnitt aus den vier Gruppen zur Untersuchung der Wirkung bestimmter Serotoninrezeptoren auf die mEPSC jeweils am Ende des zweiten zehnmütigen Zeitintervalls dargestellt. Die Abbildungen zeigen jeweils einen Zeitraum von 4 s. Die Skalierung gilt für alle vier Abbildungen. **(A)** Dargestellt ist ein Zeitausschnitt der Kontrollgruppe, bei dem Bicucullin und Tetrodotoxin für fast 20 Minuten appliziert wurden. Deutlich sind mEPSC sichtbar, die sich von dem Rauschen klar abgrenzen. **(B)** Knapp 20 Minuten nachdem WAY-100635 in der zugeführten ACSF-Lösung enthalten war. Serotonin wurde seit fast zehn Minuten appliziert. Die Frequenz und die Amplitude sind erhöht. **(C)** Darstellung für die SB-206553-Gruppe bei der weniger Aktivität nachgewiesen wurde. **(D)** Diese Darstellung stammt von der Ondansetron-Gruppe. Sehr deutlich ist eine Zunahme der Amplitude und der Frequenz zu erkennen.

4. Diskussion

4.1 Auswirkung der Narkose auf die Langzeitpotenzierung

Im Unterschied zum Hippokampus, bei dem Capsaicin (CPS) eine rezeptorspezifische, verstärkende Wirkung auf die LTP der CA1-Region hat (Li et al. 2008), zeigen die Ergebnisse, dass nach einer Diethyletheranästhesie die LA-LTP im Hirnschnitt durch CPS supprimiert wird. Frühere Untersuchungen haben nachgewiesen, dass im LA das TRPV1-Kanalprotein exprimiert wird (Zschenderlein et al. 2011), so dass auch in der Amygdala ein erregender Einfluss von CPS zu erwarten war. Wie in der Arbeit von Zschenderlein et al. 2011 ebenfalls gezeigt wurde, konnte die hemmende Wirkung auf die LA-LTP durch den wenig spezifischen TRPV1-Rezeptorantagonisten Capsazepin blockiert werden. In meinen Experimenten konnten diese Daten durch einen hochspezifischen Antagonisten bzw. durch die Messungen an TRPV1-knockout Mäusen verifiziert werden. Demgegenüber wurde nach einer Isoflurannarkose ein TRPV1-vermittelter, verstärkender Einfluss auf die LA-LTP nachgewiesen (Zschenderlein et al. 2011).

Die Ergebnisse aus diesen Versuchen zeigen, dass die Art der Betäubung von Mäusen die Neuroplastizität zumindest im lateralen Kern der Amygdala beeinflussen kann. Obwohl die Betäubung mit Diethylether eine kurze Erregungsphase verursacht und eine Dekapitation ohne vorherige Betäubung eine Stressantwort hervorrufen sollte, konnten keine Unterschiede bei den jeweiligen Input/Output-Kurven festgestellt werden. Für den basalen Kern der Amygdala konnte gezeigt werden, dass durch Stress eine Verstärkung der Grundaktivität hervorgerufen wird (Vouimba et al. 2004). Zudem ist auch bekannt, dass Isofluran, welches in einer Konzentration von 0,3 mM zu der Perfusionslösung der Gehirnschnitte hinzugefügt wurde, im basalen Kern der Amygdala eine reduzierende Wirkung auf die Stärke der synaptischen Signalübertragung hinsichtlich der Aktivierung von NMDA-, nicht-NMDA- und GABA_B-Rezeptoren hat, wobei die GABA_A-rezeptorvermittelten Antworten verstärkt waren (Ranft et al. 2004). Allerdings wurde weder das Ruhemembranpotenzial noch der Eingangswiderstand der Projektionsneurone durch Isofluran verändert (Ranft et al. 2004). [Kulisch et al. 2011]

Bei vorherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte demonstriert werden, dass die Blockade der GABAergen Neurotransmission eine Erhöhung der LA-LTP bei Diethylether-anästhesierten Ratten verursacht (Schubert and Albrecht 2008). Inhalationsanästhetika wie Isofluran und Sevofluran verstärken die GABA_A-rezeptorvermittelte Inhibierung der synaptischen Entladungen (Bieda et al. 2009; Simon et al. 2001; Westphalen and Hemmings, Jr. 2006). Zudem können sie die Ausbildung einer LTP unterdrücken, wie es für 0,3 mM Isofluran im Hippokampus von Mäusen gezeigt wurde (Simon et al. 2001). In diesen Experimenten konnte die Wirkung des Isoflurans durch den GABA_A-Rezeptorantagonisten Picrotoxin blockiert werden. Im Thalamus verlängert Isofluran die Abklingzeitkonstanten sowohl von evozierten inhibitorischen postsynaptischen Strömen (engl.: evoked inhibitory postsynaptic currents – eIPSC) als auch von spontanen miniatur inhibitorischen postsynaptischen Strömen (engl.: miniature inhibitory postsynaptic currents – mIPSC) (Joksovic et al. 2009). Bei klinisch relevanten Isoflurankonzentrationen wurden die Amplituden von eIPSC vollständig inhibiert und die Frequenz der mIPSC verringert (Joksovic et al. 2009). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Isofluran die Frequenz von Gammaoszillationen in neokortikalen Gehirnschnitten um durchschnittlich 41 % herabsetzt (Antkowiak and Hentschke 1997). Für den Tractus solitarius in der Medulla oblongata (der am weitesten kaudal lokalisierte Teil des Hirnstamms) konnte gezeigt werden, dass Isofluran die phasische, inhibitorische Transmission über postsynaptische GABA_A-Rezeptoren erhöht, während die exzitatorische Transmission vorwiegend über präsynaptische Mechanismen supprimiert wird (Peters et al. 2008). [Kulisch et al. 2011]

Trotz dieser Daten ist es überraschend, dass nach sehr kurzer Anästhesie mit 8 % Isofluran in den Experimenten, welche erst zwei bis mehr als sechs Stunden nach der Beendigung der gesamten Präparation durchgeführt wurden, eine Suppression in der Amygdala dokumentiert werden konnte. Die niedrigere Isoflurankonzentration zur Betäubung verursachte hingegen keine Unterdrückung der LA-LTP. Die Stärke der LA-LTP von der Gruppe mit 4 % Isofluran unterscheidet sich nicht signifikant von denen der Gruppen mit oder ohne Diethyletheranästhesie. [Kulisch et al. 2011] Nach der Anästhesie mit 8 % Isofluran wurde demnach die Hemmung der Projektionsneurone durch die Interneurone verstärkt und die präsynaptische Erregung gehemmt, wodurch es zu einer supprimierten LA-LTP kam. Isofluran führt neben der Wirkungen auf die GABAerge und die glutamaterge Transmission auch zu einer Sensibilisierung der TRPV1-Rezeptoren (Cornett et al. 2008; Harrison and Nau 2008; Matta et al. 2008). Meine Ergebnisse zeigen, dass die CPS-vermittelte Sensibilisierung der TRPV1-Rezeptoren über den Einfluss von

8 % Isofluran auf die GABAerge und glutamaterge Transmission dominiert. Eine Sensibilisierung der TRPV1-Rezeptoren müsste zu einem vermehrten Kalzium- und Natriumioneneinstrom in die Neurone führen. Die daraus resultierende, stärkere Depolarisation würde die verstärkende Wirkung von CPS auf die LA-LTP nach einer Isoflurannarkose erklären.

Die Ergebnisse dieser Versuchsserie demonstrieren, dass eine relativ hohe Konzentration von Isofluran notwendig war, um eine Sensibilisierung des TRPV1-Rezeptors auszulösen. Bei diesen Konzentrationen kommt es insbesondere zwei bis sechs Stunden nach der Dekapitation zu einer reduzierten LTP, so dass von einer unerwartet langen Auswaschzeit des Narkotikums auszugehen ist. Diese trifft aber vor allem auf Hirnschnittuntersuchungen in Interfacekammern zu, da der Durchfluss in Submerged-Kammern wesentlich schneller erfolgt. Die Ergebnisse demonstrieren auch, dass mit 4 % Isofluran eine ausreichende Betäubung der Mäuse erreichbar ist. Zudem zeigen sie, dass diese Konzentration zu einer weitgehend Narkose-unabhängigen Induktion der LA-LTP führt. Damit ist diese Narkoseform für weitere Untersuchungen geeignet.

In vielen Publikationen wird entweder überhaupt nicht geschrieben, wie die Tiere narkotisiert wurden, oder es wird oft nur geschrieben, dass sie narkotisiert wurden. Viele Untersuchungen, die Neuroplastizität in der Amygdala analysieren, verwenden darüber hinaus grundsätzlich GABA-Rezeptorantagonisten, um eine LTP induzieren zu können. Da die hier erhobenen Ergebnisse deutlich zeigen, dass die Art und Weise einer Narkose starke Auswirkungen auf das Ergebnis und somit auch auf die Auswertung und Deutung eines Versuches haben kann, ist es wichtig detailliert anzugeben, wie die Tiere betäubt wurden. Auch für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse einer Arbeitsgruppe sind diese Informationen unerlässlich.

Unlängst wurde in Untersuchungen gezeigt, dass durch längere Isofluranexposition eine erhöhte neuronale Apoptoserate in der Großhirnrinde bei jungen Mäusen ausgelöst wird, wobei ungefähr 2 % der kortikalen Neuronen abgestorben sind, darunter auch GABAerge Interneurone (Istaphanous et al. 2013). Dies zeigt, dass durch eine Isofluranarkose bei einer Operation am Menschen potentiell nicht nur mit relativ kurzfristigen Beeinflussungen des Gedächtnisses durch verminderte Aktivität zu rechnen ist, sondern auch ein Verlust an Nervenzellen möglich ist.

4.2 Die Beteiligung von TRPV1-Rezeptoren an der LTP im LA

In TRPV1-knockout-Mäusen wurde eine Reduzierung der hippokampalen LTP und der Kontext-abhängigen, erlernten Furcht nachgewiesen (Marsch et al. 2007). Somit können Pharmaka, welche TRPV1-Rezeptoren inhibieren, als potentielle anxiolytische Substanzen in Betracht gezogen werden (Micale et al. 2009). Weiterhin ist es notwendig den genauen Wirkungsmechanismus einer TRPV1-Rezeptoraktivierung zu kennen, um weitere potentielle Ansatzpunkte für Therapien zu erhalten.

Die Untersuchungsergebnisse zeigen, dass die durch HFS hervorgerufene LTP sowohl durch den exogenen TRPV1-Rezeptoragonisten Capsaicin als auch durch das Endovanilloid OLDA supprimiert wird. Da dieser Effekt durch einen spezifischen Antagonisten aufgehoben wurde, zeigen die Ergebnisse, dass dieser Effekt durch die TRPV1-Rezeptoren vermittelt wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass weder CPS (Zschenderlein et al. 2011) noch OLDA die in TRPV1-knockout-Mäusen hervorgerufenen Potenzialerhöhungen nach HFS reduzieren konnten, wodurch die zweite These bestätigt wurde. Das bedeutet, dass beide Substanzen durch eine Aktivierung des TRPV1-Rezeptors wirken. In Pharmakon-freien Hippokampuschnitten, welche aus TRPV1-gendefizienten Mäusen gewonnen wurden, konnte nur eine reduzierte LTP nachgewiesen werden (Marsch et al. 2007). Diese niedriger als in Wildtypmäusen ausfallende Potenzialerhöhung im LA von TRPV1-KO-Mäusen zeigt, dass der TRPV1-Rezeptor auch an der Ausbildung einer normalen LTP beteiligt ist bzw. kompensatorische Veränderungen in den TRPV1-KO-Mäusen zu einer reduzierten LTP in Hippokampus und Amygdala geführt haben könnte. Dies deckt sich mit Verhaltensuntersuchungen mit TRPV1-KO-Mäusen, bei denen das Kurzzeitgedächtnis, welches mit der Induktion der LTP assoziiert ist, vermindert ist (You et al. 2012). Daraus wurde geschlossen, dass der Verlust der TRPV1-Rezeptoren zu einer verringerten Neurotransmitterausschüttung durch einen verringerten Kalziumioneneinstrom führt.

(Li et al. 2008) haben eine verstärkende Wirkung von Capsaicin auf die LTP im Hippokampus beschrieben. Allerdings ist weder in diesem noch in den vorangegangenen Veröffentlichungen erwähnt, wie die Ratten (zwei bis vier Wochen alt) vor der Dekapitation anästhesiert wurden bzw. ob zuvor eine Narkose erfolgte. Darin könnte ein Grund für den Unterschied zu dem entgegengesetzten CPS-Effekt liegen. Unter tiefer Isoflurannarkose

wurde im LA ebenfalls ein entgegengesetzter CPS-Effekt registriert (siehe oben). Durch die fehlende Angabe der Narkoseform und der Konzentration des eventuell verwendeten Anästhetikums ist eine adäquate Bewertung der Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe für andere Wissenschaftler nicht hinreichend möglich. Weiterhin wurde bei diesen Versuchen Picrotoxin verwendet, um die GABA_A-vermittelte Inhibition zu unterdrücken. Dies stellt einen wesentlichen Unterschied in den Versuchsbedingungen dar. Daraus resultiert, dass die Ergebnisse zusätzlich nur für einen Teil des neuronalen Netzwerkes gelten können. Wie noch später ausgeführt wird, ist die Konzentration von CB1-Rezeptoren im LA wesentlich höher als im Hippokampus. Auch daher könnten die unterschiedlichen Ergebnisse zur Wirkung von Capsaicin in Hippokampus und Amygdala resultieren.

4.3 Untersuchung der Lokalisation der TRPV1-Rezeptoren

Die synaptische Kurzzeitplastizität ist phylogenetisch weit in den aufsteigenden sensorischen Systemen in den Gehirnen der Vertebraten verbreitet und in allen Ebenen der Verarbeitung sensorischer Reize vorhanden (Fortune and Rose 2002). Sie wird mit einfachen Lernformen in Verbindung gebracht sowie mit einer Filterfunktion, welche eine Informationsverarbeitung ermöglicht (Fortune and Rose 2001). Als Kurzzeitgedächtnis wird die Eigenschaft eine geringe Menge an Informationen in einem aktiven und sofort verfügbaren Zustand im Bewusstsein zu halten bezeichnet. Dieser Zustand hält nur wenige Sekunden an (Kalivas and Petralia 2012). Eine Möglichkeit, Aussagen zur Kurzzeitplastizität und indirekt zur präsynaptischen Rezeptorlokalisierung treffen zu können, bietet die Untersuchung der Doppelpulsreizung.

Bei einer Doppelpulsreizung werden zwei Reize in kurzem, zeitlichem Abstand zueinander gegeben und das resultierende Feldpotenzial (Pulsantwort) gemessen. Dies wird für mehrere Zeitabstände durchgeführt. Die beiden Pulsantworten eines Zeitintervalls werden zueinander ins Verhältnis gesetzt (2. Pulsantwort/1. Pulsantwort). Bei bisherigen Untersuchungen des Doppelpulsverhältnisses in der Arbeitsgruppe wurde häufig eine Faszilitierung festgestellt, wenn die Zeitabstände zwischen den Reizen im Bereich von 30 – 60 ms lagen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von anderen Autoren in der Amygdala beschrieben (McKernan and Shinnick-Gallagher 1997). Bei einem sehr kurzen Zeitabstand (10 ms) findet beim zweiten Reiz noch eine rekurrente Hemmung durch nachgeschaltete Interneurone statt (LeDoux 2007). Ist der Zeitabstand etwas größer besteht keine Hemmung

mehr und es findet ein verstärkter Kalziumioneneinstrom in die präsynaptische Membran statt bzw. erhöht sich die Kalziumionenkonzentration, da die Wiederherstellung der Ruhekonzentration an Kalziumionen langsamer als der passive Einstrom ist. Die Zelle ist leichter erregbar und die zweite Pulsantwort ist stärker als die erste. Wenn der Zeitabstand noch größer wird (50 – 100 ms) wird die präsynaptische Membran durch CB1-Rezeptoraktivierung gehemmt (Gerdeman and Lovinger 2003; Ronesi et al. 2004) und die Intensität der zweiten Pulsantwort nimmt wieder ab. Dadurch entsteht eine typische Kurve in einem Diagramm für eine Doppelpulsreizung über dem Zeitabstand. Die Doppelpulsreizung kann als Standardtest für präsynaptische Phänomene angesehen werden (Stevens 1993).

Wenn vor der Durchführung eine Substanz appliziert wurde und ein Anstieg des Doppelpulsverhältnisses gemessen wird, zeigt dies eine Abnahme der Neurotransmitterfreisetzung in den synaptischen Spalt und somit eine präsynaptisch hemmende Wirkung der Substanz an (Gerdeman and Lovinger 2003). Vor dem ersten Reiz bewirkt die Substanz z. B. einen verminderten Kalziumioneneinstrom in die Präsynapse, wodurch diese hyperpolarisiert wird. Der erste Impuls bewirkt somit eine verringerte Pulsantwort. Beim kurz darauf folgenden zweiten Reiz ist die präsynaptische Membran schon vordepolarisiert und die resultierende Pulsantwort ist größer als die erste. Verglichen mit denselben Reizparametern ohne diese Substanz ist das Doppelpulsverhältnis dann größer.

Wenn nach einer zuvor applizierten Substanz eine Verringerung des Doppelpulsverhältnisses gemessen wird, so bewirkt die Substanz eine vermehrte Transmitterfreisetzung.

Die Ergebnisse aus Versuch 3.2.5 zeigen eine durch Capsaicin vermittelte Suppression im Vergleich zur Kontrollmessung derselben Hirnschnitte an. Die Suppression ist signifikant über alle 12 Zeitabständen zwischen den beiden Versuchsgruppen vorhanden. Somit deuten diese Ergebnisse auf eine durch Capsaicin vermittelte vermehrte Glutamatfreisetzung an der präsynaptischen Membran hin. In vielen Arbeiten wurde gezeigt, dass diese Veränderungen der Kurzzeitplastizität präsynaptischen Ursprungs sind (Zucker and Regehr 2002). Auch in der CA1 Region des Hippokampus wurde ein stark reduziertes Doppelpulsverhältnis nach Applikation von 1 μ M Capsaicin beschrieben (Al-Hayani et al. 2001).

Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Gruppe mit Capsaicinapplikation ist das Doppelpulsverhältnis bei einem Zeitabstand von 30 ms am größten. Dies steht im Einklang mit den oben beschriebenen Einflussfaktoren.

Da CPS den TRPV1-Rezeptor aktiviert, strömen präsynaptisch vermehrt Kalzium- und Natriumionen in die Zelle und depolarisieren die Zellmembran. Dies führt zu einer erhöhten Erregbarkeit, was eine verstärkte Sekretion von Glutamat aus den Vesikeln in den synaptischen Spalt bewirkt. Somit wird unter Capsaicineinfluss nicht nur die Amplitudengröße auf den zweiten Reiz hin erhöht sondern auch schon auf den ersten. Dies führt zu einer sehr starken Transmitterfreisetzung nach dem ersten Impuls, so dass auf den zweiten Impuls hin verhältnismäßig weniger Transmitter als bei Kontrollmessungen vorhanden ist. Das Doppelpulsverhältnis (2. Pulsantwort/1. Pulsantwort) wird dementsprechend gegenüber den Kontrollmessungen verringert.

Weiterhin deuten noch unveröffentlichte Ergebnisse der Arbeitsgruppe auf eine hauptsächliche Lokalisation der TRPV1-Rezeptoren in der präsynaptischen Membran von Projektionsneuronen im lateralen Kern der Amygdala hin. Dabei wurde in Patch-Clamp-Untersuchungen eine höhere Frequenz von mEPSC nach HFS in der CPS-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt. Zudem wurde die Amplitude leicht erhöht. Dieser Unterschied war jedoch geringer als bei der Frequenz.

Die Ergebnisse deuten auf eine präsynaptische Lokalisation der TRPV1-Rezeptoren hin. Eine geringe Anzahl an postsynaptisch lokalisierten TRPV1-Rezeptoren wäre möglich. Dies steht im Einklang mit Befunden aus anderen Hirnregionen (Goswami et al. 2010; Marinelli et al. 2003). Die 5. Hypothese konnte somit dahingehend konkretisiert werden, dass die Wirkung des Capsaicins hauptsächlich durch präsynaptisch lokalisierte TRPV1-Rezeptoren ausgelöst wird und weniger durch postsynaptisch lokalisierte.

4.4 Untersuchung der Wirkung von CPS auf die NO-Synthese bei HFS

Im Zentralnervensystem wird Stickstoffmonoxid (NO) durch die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) postsynaptisch gebildet und es hat eine wichtige Funktion bei der Induktion der LTP im lateralen Kern der Amygdala (Schafe et al. 2005). Auch in anderen Studien konnte die Notwendigkeit von NO zur Ausbildung einer LA-LTP nachgewiesen werden (Albrecht 2007). Die nNOS ist ein Enzym, welches von der Ca^{2+} -Konzentration abhängig ist. Wenn durch den Neurotransmitter Glutamat die NMDA-Rezeptoren (NMDA: N-methyl-D-Aspartat) aktiviert werden, bewirken sie einen Einstrom von Ca^{2+} , welche an Calmodulin binden, wodurch dieses die nNOS aktivieren kann (Bredt

and Snyder 1994). Präsynaptisch wirkt das gebildete NO als retrograder Messenger und führt zu einer weiteren Verstärkung der Glutamatfreisetzung.

Zur Untersuchung der Synthese von Stickstoffmonoxid unter Kontrollbedingungen und bei TRPV1-Rezeptoraktivierung wurde die Fluoreszenzmikroskopie genutzt. Diese Messungen zeigen, dass in der Kontrollgruppe schon vor der HFS die Konzentration an ATD, welches nach der Freisetzung von NO aus dem nicht-fluoreszierenden DAQ gebildet wird (Gomes et al. 2006; Heiduschka and Thanos 1998), konstant zunimmt und demnach kontinuierlich NO im LA gebildet wird. Dies deckt sich mit den Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe, welche eine Erhöhung der ATD-Konzentration im Hippokampus vor der Applikation der zu testenden Substanzen registrierte (Kovacs et al. 2009). Da diese spontane NO-Bildung mit anderen Methoden nicht nachgewiesen werden konnte, scheint die bildgebende Fluoreszenzmessung sensitiver als die extrazellulären Messungen zu sein. Weiterhin ist ersichtlich, dass bei der Gruppe mit Capsaicin der Anstieg der ATD-Konzentration stärker ist. Somit scheint durch CPS die präsynaptische Membran vordepolarisiert zu sein, wodurch öfter und damit mehr Glutamat aus den synaptischen Vesikeln auch auf schwächere Impulse hin sezerniert werden kann.

Durch den ersten Stimulationsabschnitt der Hochfrequenzstimulation konnte in der CPS-Gruppe ein signifikanter Anstieg der NO-Freisetzung ausgelöst werden. Im weiteren Verlauf der Messungen fiel der Anstieg wesentlich geringer aus und nahm mit der Zeit ab. In der Kontrollgruppe konnte lediglich eine leichte Zunahme der NO-Freisetzung nach der gesamten HFS gemessen werden. Dies zeigt deutlich, dass durch die Wirkung von TRPV1-Ionenkanälen die Freisetzung von Glutamat zunächst erleichtert wird, was wie die Ergebnisse der Doppelpulsreizung für deren präsynaptische Lokalisation spricht. Anschließend sinken die Anstiege sowohl in der CPS-Gruppe als auch in der Kontrollgruppe unter die Ausgangswerte. In der Gruppe mit CPS waren die Ergebnisse vom Ende der Messung signifikant niedriger verglichen mit denen vom Beginn der Messung. Diese Werte legen die Vermutung nahe, dass durch den signifikanten Anstieg der NO-Freisetzung nach dem ersten Abschnitt der HFS eine Kaskade aktiviert wurde, deren Endprodukt im Anschluss eine hemmende Wirkung auf die Signaltransduktion hat. Es ist möglich, dass es sich dabei um das Cannabinoid Anandamid handelt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass in horizontalen Gehirnschnitten im lateralen Kern der Amygdala die NO-Bildung durch eine HFS verstärkt

wird. Weiterhin wurde die Hypothese der verstärkten NO-Synthese durch TRPV1-Rezeptoraktivierung bestätigt.

4.5 Auswirkung des Forced Swimming Tests auf die LTP

Bei diesen Versuchen wurde eine signifikante Reduzierung in der LA-LTP-Stärke nach einem einzelnen Durchgang des Verhaltenstests „Forced Swimming Test“ festgestellt. Dieser Suppressionseffekt deckt sich mit den Ergebnissen früherer Studien, die sich mit den Auswirkungen von verschiedenen Stressbedingungen auf die LTP in der Amygdala (Kavushansky and Richter-Levin 2006; Kavushansky et al. 2006) und im Hippokampus (Shors et al. 1989) befassten. Die Input/Output-Kurven der Schnitte von schwimmgestressten und denen nicht gestresster Mäuse sind fast identisch, so dass keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden konnten. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass ein einzelner Schwimmstress zu keinen Unterschieden in der Grundaktivität im lateralen Kern der Amygdala nach Reizung an der externen Kapsel führt. Wenn jedoch bei Ratten nach einem Morris water maze-Experiment mit sichtbaren oder unsichtbaren Plattformen im basalen Kern der Amygdala nach Reizung im lateralen entorhinalen Kortex gemessen wird, dann erhöht sich die I/O im Vergleich zu Messungen an Schnitten von nicht gestressten Ratten (Kavushansky et al. 2006). Das zeigt deutlich, dass Stress über verschiedene Nervenbahnen in verschiedenen Subregionen einer Gehirnstruktur unterschiedliche Auswirkungen haben kann. Zusätzlich können die Ergebnisse auch von Spezies zu Spezies variieren. [Kulisch and Albrecht 2013]

Weiterhin unterstützen die hier erhaltenen Daten die Schlussfolgerung, dass akuter, kurz andauernder Stress die LTP in der Amygdala herabsetzt. Ein starker oder chronischer Stresszustand, erhöht hingegen die amygdaläre LTP und führt zu einer Übererregbarkeit der Amygdala (Roozendaal et al. 2009; Rosenkranz et al. 2010). Auch hier zeigen die verfügbaren Daten an, dass es Unterschiede in der Empfänglichkeit für verschiedene Stressereignisse in derselben Gehirnstruktur geben kann. [Kulisch and Albrecht 2013]

Führte die Applikation von 1 μ M N-Oleoyldopamin (OLDA) bei Gehirnschnitten von C57BL/6N-Mäusen, die nicht gestressten waren, zu einer Reduzierung der LA-LTP, so bewirkte sie bei Gehirnschnitten von schwimmgestressten Mäusen im Verhältnis zur Kontrolle eine Erhöhung der LA-LTP. Dieser Effekt konnte in einer zweiten Mauslinie

(C57BL/6J-Mäuse) reproduziert werden. Weiterhin konnte er mit dem TRPV1-Rezeptor-antagonisten AMG 9810 komplett gehemmt werden und er fehlte auch bei TRPV1-knockout-Mäusen. Somit kann geschlussfolgert werden, dass der Effekt der LA-LTP-Erhöhung nach FST im Vergleich zur schwimmgestressten Kontrollgruppe durch TRPV1-Rezeptoren vermittelt wird. [Kulisch and Albrecht 2013]

Unsere Daten aus (Zschenderlein et al. 2011) für den LA legen nahe, dass im Gehirn eine erhöhte Anandamidkonzentration durch den FST bewirkt wird. Anandamid aktiviert bei verhältnismäßig hohen Konzentrationen auch den TRPV1-Rezeptor (Al-Hayani et al. 2001; Smart et al. 2000; Zygmunt et al. 1999).

In nicht gestressten Kontrolltieren hingegen wird die LA-LTP durch den endogenen CB1-Rezeptorweg moduliert, welcher durch OLDA-vermittelt in Gang gesetzt wird. Es ist möglich, dass in der Folge des FST Endocannabinoide wie Anandamid die Expression des CB1-Rezeptors herunter regulieren, wodurch der Anteil der TRPV1-Rezeptoren an der Signalübertragung steigen würde. Zusätzlich ist es möglich, dass durch die Wirkung von Endocannabinoiden nach dem FST auch die Bildungsrate von TRPV1-Rezeptoren erhöht wird. [Kulisch and Albrecht 2013]

Unter chronischer Stressbelastung kommt es durch direkte Cortisoleinwirkung auf die Neurone zur Atrophie von Dendriten und somit zu einer Hypofunktionalität des präfrontalen Kortex, der unter normalen Bedingungen einen hemmenden Einfluss auf die Amygdala ausübt. Wenn diese Hemmung unter chronischem Stress wegfällt, wird eine Hyperexzitation der Amygdala gefördert (McEwen 1998; Roozendaal et al. 2009). Die Amygdala würde dadurch für die Verhaltenssteuerung an Einfluss gewinnen. Das ist entwicklungsphysiologisch sehr sinnvoll, da die Amygdala dann vermehrt auf wenig vorverarbeitete Signale aus dem Thalamus (LeDoux 2007) reagiert und somit sehr schnelle Reaktionszeiten möglich sind. Die Verarbeitungsprozesse über den Kortex dauern länger (LeDoux 2007), da mehr Gehirnareale an der Informationsverarbeitung beteiligt und hintereinander geschaltet sind, was in Gefahrensituationen wertvolle Zeit kosten würde.

Weiterhin legen erhobene Daten (Zschenderlein et al. 2011) nahe, dass eine Sensibilisierung der TRPV1-Kanäle zu einem Anstieg von Stickstoffmonoxid im Gewebe führt. Dieser Befund konnte durch die bildgebenden Fluoreszenzmessungen im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Allein die anhaltende Aktivierung der TRPV1-Rezeptoren führte zu einer erhöhten NO-Freisetzung (siehe Abschnitt 4.2). Die Daten von (Zschenderlein et al. 2011) zeigen auch, dass in NO-Synthase-defizienten Mäusen, bei denen keine CPS-

induzierte LA-LTP-Verringerung gemessen werden konnte, durch TRPV1-Aktivierung die präsynaptische Glutamatfreisetzung erhöht wird. Diese Erkenntnisse bestätigen Ergebnissen aus dem Hypothalamus (Li et al. 2004). [Kulisch and Albrecht 2013]

Durch chronischen Wasservermeidungsstress (auf kleiner Plattform für eine Stunde pro Tag 1 cm über Wasser an zehn aufeinanderfolgenden Tagen sitzen) wurde in Spinalganglien von Ratten die Anandamidkonzentration erhöht, die Expressionsrate für CB1-Rezeptoren gesenkt und jene für TRPV1-Rezeptoren erhöht (Hong et al. 2009). Dieser reziproke Wechsel der Konzentration der CB1- und TRPV1-Rezeptoren an den primären sensorischen Nervenzellen der chronisch gestressten Ratten scheint durch Corticosteron vermittelt zu sein (Hong et al. 2011). Eine über Tage andauernde Erhöhung des Corticosteronspiegels führt zur Ausbildung einer über Wochen andauernden Zwangsstörung (Ahmari et al. 2013). Es ist bekannt, dass durch Schwimmstress die Konzentration von Corticosteron erhöht wird (Ahmed et al. 2006) und dass sich der Gehalt an Anandamid in der Amygdala umgekehrt proportional zur Konzentration an Serumcorticosteron in gestressten Ratten verhält (Hill et al. 2009). Es konnte gezeigt werden, dass durch Aktivierung des CB1-Rezeptors sowohl die Sekretion des Adrenocorticotropen Hormons, welches bei den verschiedensten Formen von Stress vermehrt ausgeschüttet wird, als auch der Corticosteronspiegel im Plasma herabgesetzt wird (Patel et al. 2004). CB1-defiziente Mäuse weisen eine erhöhte Konzentration des Adrenocorticotropen Hormons und von Corticosteron auf. Außerdem sind sie anfälliger für chronischen Stress als Wildtypmäuse (Barna et al. 2004). [Kulisch and Albrecht 2013]

Mittels Versuchen mit einem Model für Posttraumatische Belastungsstörungen (PTBS) bei Ratten konnte herausgefunden werden, dass eine Aktivierung im basolateralen Kern der Amygdala mit einem CB1-/CB2-Rezeptoragonisten die durch vorherige Stressexposition hervorgerufenen endokrinologischen und Verhaltensabnormalitäten wieder normalisiert werden konnten. Durch eine Koapplikation eines CB1-Rezeptorantagonisten konnte dieser Effekt blockiert werden (Ganon-Elazar and Akirav 2012). Das bedeutet, dass zumindest einige Effekte zur Prävention von stressbedingten Störungen durch eine Aktivierung von CB1-Rezeptoren vermittelt werden. Es konnten schon mögliche Nutzen einer Therapie bei Menschen mit PTBS nachgewiesen werden. Bei 72 % der Patienten konnte nach der Gabe des synthetischen Cannabinoids Nabilon, ein CB1- und CB2-Rezeptoragonist, eine Verbesserung der Lebensqualität z. B. durch Rückgang an Albträumen und Verringerung deren Intensitäten, durch subjektiv eingestufte Verbesserung der Schlafqualität oder durch

vermindertes Auftreten von plötzlichen und intensiven Erinnerungen am Tage festgestellt werden (Fraser 2009). [Kulisch and Albrecht 2013]

Die Hypothese, dass eine TRPV1-Rezeptoraktivierung stressinduzierte Wirkungen in der Amygdala reduzieren oder sogar vollständig aufheben könnte, wurde durch die hier erzielten Ergebnisse bestätigt. Weiterhin konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass durch diesen Verhaltenstest die LA-LTP bei Mäusen signifikant reduziert wird. Aus diesen Daten kann zusätzlich geschlossen werden, dass die TRPV1-Ionenkanäle auch unter Stressbedingungen essentiell für die Plastizität in der Amygdala sind.

Da gezeigt werden konnte, dass die in exzitatorischen Projektionsneuronen des LA postsynaptisch lokalisierte nNOS (Schafe et al. 2005) nach einzelnen Stressepisoden verstärkt exprimiert wird (Echeverry et al. 2004), kann geschlossen werden, dass der kurze Schwimmstress zu einer verstärkten NO-Synthese führte, was letztendlich zu einem capsaicinähnlichen Effekt nach HFS geführt haben könnte (vgl. Abschnitt 4.2). Die durch NO vermittelte, verstärkte Glutamatfreisetzung müsste dann postsynaptisch die Kalziumkonzentration erhöht haben, was dann die Bildung von Anandamid induzieren würde. Präsynaptisch würden die CB1-Rezeptoren aktiviert werden, was zu einer starken Hemmung der Transmitterfreisetzung und damit zu einer reduzierten LTP führen würde.

4.6 Untersuchung der Wirkung von Ethanol auf die LTP

Bei diesem Versuch sollte untersucht werden, ob eine Sensibilisierung der TRPV1-Rezeptoren durch Ethanol im lateralen Kern der Amygdala hervorgerufen werden kann. In der Literatur sind vielfach aktivierende Effekte von Ethanol auf die Funktionen des TRPV1-Rezeptors beschrieben worden (Blednov and Harris 2009; Ellingson et al. 2009; Trevisani et al. 2002). Diese Beobachtungen reichen von molekularbiologischen Messungen auf Rezeptorebene bis zu Verhaltensanalysen.

Die Ergebnisse des Versuchs 3.2.3 zeigen zunächst, dass Ethanol die Plastizität im lateralen Kern der Amygdala beeinflusst. Wie Capsaicin führt die Applikation zu einer sehr deutlichen Hemmung der LTP. Weiterhin wird durch die Applikation von Ethanol der supprimierenden Wirkung von Capsaicin auf die LA-LTP nicht nur entgegen gewirkt sondern sogar auf Kontrollwerte zurückgeführt und damit aufgehoben. Diese gleichzeitige Applikation der beiden Substanzen scheint demnach zu einer Sensibilisierung der TRPV1-

Rezeptoren geführt zu haben, wodurch schon vor der HFS wesentlich mehr Kalziumionen über die präsynaptische Membran ins Zytosol strömen konnten, wodurch mehr Glutamat freigesetzt werden würde. Auch postsynaptisch hätte eine TRPV1-Rezeptorsensibilisierung eine Erhöhung der Kalziumionenkonzentration zur Folge. Zusammen mit der erleichterten Glutamatfreisetzung könnte dies nach HFS zu einer Sensibilisierung der AMPA-Rezeptoren durch Phosphorylierung und/oder eine verstärkte Neusynthese von AMPA-Rezeptoren führen. Somit würde eine LTP etabliert werden können.

4.7 Wirkung von Serotonin und bestimmter Serotoninrezeptoren

4.7.1 Untersuchung der Wirkung von Serotonin

Aus Versuch 3.2.4 geht hervor, dass die Ausbildung einer LA-LTP sowohl durch eine hohe Konzentration an Serotonin von 100 μM als auch durch eine niedrige Konzentration von 3 μM effektiv gehemmt wird. Somit konnte der Nachweis einer Beeinflussung der Langzeitplastizität im LA durch Serotonin erbracht werden. Die Patch-Clamp-Untersuchung des Versuchs 3.4.1, bei der im Gegensatz zu den extrazellulären Messungen die GABA_A-Rezeptoren inhibiert waren, hat deutlich gezeigt, dass eine Applikation von 3 μM Serotonin zu einer massiven Zunahme sowohl der Amplitude als auch der Frequenz von miniatur exzitatorischen postsynaptischen Strömen führt. Serotonin hat somit sowohl prä- als auch postsynaptische Auswirkungen auf die neuronale Signalweiterleitung in den glutamatergen Neuronen des lateralen Kerns der Amygdala.

Biochemische Daten lieferten Hinweise dafür, dass die Serotoninkonzentration in den Amygdalae des Menschen verglichen mit anderen Hirnregionen mit am höchsten ist (Azmitia and Gannon 1986). Wenn durch Stress die Raphe-Kerne aktiviert werden (Crawford et al. 2013; Vertes 1991) und ihre serotonergen Neurone im lateralen Kern der Amygdala Serotonin freisetzen, müsste dies zu einer Verstärkung des supprimierenden Effekts des inhibitorischen Netzwerks in der Amygdala, welches die zelluläre Aktivität niedrig hält (LeDoux 2007), und somit zu einer verstärkten Hemmung der neuronalen Aktivität führen. Die Aktivität der Amygdala würde somit in stressigen Situationen niedrig gehalten werden. Es ist bekannt, dass Veränderungen im Serotoninspiegel in der Amygdala mit gestörtem, emotionalem Verhalten assoziiert sind (Graeff et al. 1997; Hariri et al. 2002;

Stutzmann et al. 1998). Wenn die Serotoninkonzentration verringert wäre, würde die Hemmung durch Interneurone reduziert werden, was dann zu einer Reaktionsauslösung durch die Amygdala auf sensorische Reize führen würde, welche unter normalen Bedingungen nicht ausgelöst werden würden.

Der Versuch 3.2.4 hat weiterhin gezeigt, dass die gleichzeitige Aktivierung des TRPV1-Rezeptors durch den spezifischen Agonisten Capsaicin zusammen mit 100 μM Serotonin eine LA-LTP bewirkt, wie sie auch unter Kontrollbedingungen messbar ist. Dies deutet auf eine Sensibilisierung des TRPV1-Rezeptors hin. Die Koapplikation mit 3 μM Serotonin bewirkte zwar eine Erhöhung der LTP verglichen mit der nach alleiniger Applikation von Serotonin, jedoch fiel diese Erhöhung gering und nicht signifikant aus. Daraus resultiert, dass für eine Sensibilisierung der TRPV1-Rezeptoren relativ hohe Konzentrationen an Serotonin notwendig sind.

4.7.2 Untersuchung der Wirkung bestimmter Serotoninrezeptoren auf mEPSC

Der Übersichtlichkeit wegen werden die Ergebnisse aus dem Versuch 3.4.2 für die vier Versuchsgruppen zunächst einzeln betrachtet.

Kontrolle

Sowohl für die Amplitude als auch für die Frequenz konnten keine deutlichen oder sogar signifikanten Unterschiede bei der Applikation von Bicucullin und Tetrodotoxin auf die Ausbildung der mEPSC ermittelt werden.

SB-206553

Durch die Blockierung der 5-HT_{2B}/5-HT_{2C}-Rezeptoren mit dem spezifischen Antagonisten SB-206553 wurde eine Zunahme der Amplitudenwerte unterdrückt. Dieses Ergebnis zeigt eine postsynaptische Lokalisation von mindestens einem der Rezeptoren an. Aus den Resultaten kann gefolgert werden, dass die Aktivierung eines Rezeptors oder sogar beider Rezeptoren für die Zunahme der Amplitudenstärke unter Serotonineinfluss und damit für den Grad der Depolarisierung der postsynaptischen Zellmembran mit entscheidend ist. Eine Blockierung durch den Antagonisten führt zu einer verminderten Intensität der Signalübertragung. Diese Befunde stehen mit früheren Ergebnissen im Einklang, die eine

verstärkende Wirkung einer Aktivierung von 5-HT₂-Rezeptoren ergaben (Martin and Humphrey 1994; Porter et al. 1999; Roth et al. 1998). Es wird letztlich eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration von diesen Autoren beschrieben. Das führt einerseits zu einer Depolarisation und damit zu einer erleichterten Erregbarkeit der postsynaptischen Membran und andererseits kann es zu einer verstärkten Expression postsynaptischer Glutamatrezeptoren und damit zu einer Erhöhung der Amplitude des Quantenstroms führen.

Mindestens einer der Rezeptoren scheint auch an der präsynaptischen Membran von Projektionsneuronen lokalisiert zu sein, da ebenfalls die serotonininduzierte Frequenzerhöhung durch den Antagonisten vollständig supprimiert wurde. Demzufolge führt eine Rezeptoraktivierung zu einer verstärkten Transmitterfreisetzung. Damit konnte eine präsynaptische Lokalisation von 5-HT₂-Rezeptoren an Projektionsneuronen im lateralen Kern der Amygdala verifiziert werden, wie sie für den Hippokampus diskutiert wird (Chen and Bazan 2003). Dadurch könnte eine präsynaptische Lokalisation für die Interaktion zwischen dem TRPV1- und den 5-HT₂-Rezeptoren postuliert werden.

Für 5-HT₂-Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass deren Aktivierung stimulierend auf die Phospholipase C wirkt (Hoyer et al. 1994). Die Aktivierung dieses Signalwegs kann sensibilisierend auf TRPV1-Rezeptoren wirken (Ahern et al. 2005; Amadesi et al. 2004). Eine Folgeerscheinung dieser Sensibilisierung könnte die bei der Koapplikation von Serotonin und Capsaicin gemessene Verstärkung der LA-LTP sein, welche bei extrazellulären Ableitungen der Feldpotenziale registriert wurde.

In früheren Untersuchungen wurde für die 5-HT₂-Rezeptoren gezeigt, dass durch eine Administration von bestimmten Antagonisten eine Herunterregulation der Rezeptorexpression hervorgerufen wurde (Barker et al. 1994; Boess and Martin 1994; Labrecque et al. 1995; Sanders-Bush 1990). Dabei handelt es sich jedoch um inverse Agonisten, was für SB-206553 nicht beschrieben ist. Somit kann nicht davon ausgegangen werden, dass die zehnmünütige Applikation des Antagonisten zu einer Reduzierung der Rezeptoren geführt hat, wodurch bei anschließender Administration von Serotonin der Effekt nicht hätte ausgelöst werden können.

Die 5-HT_{2B}/5-HT_{2C}-Rezeptoren scheinen insgesamt den Hauptteil des Serotonineffektes zu vermitteln.

Es ist bekannt, dass dieser Antagonist eine ähnliche hohe Affinität für die Rezeptoren wie Serotonin hat (Beattie et al. 2004; Knight et al. 2004; May et al. 2003). Untersuchungen der negativen dekadischen Logarithmen der Inhibitionskonstanten (pK_i) für die humanen 5-

HT_{2B}/5-HT_{2C}-Rezeptoren ergaben entsprechend vergleichbare pK_i-Werte (5-HT_{2B}: pK_i von 5-HT 7,9 – 8,4 und SB-206553 von 7,6 – 8,5; 5-HT_{2C}: pK_i von 5-HT 6,8 – 8,6 und SB-206553 von 7,8 – 7,9) (Andrade et al. 2013b; Andrade et al. 2013c). Je höher der Wert des pK_i ist, desto wahrscheinlicher sind Ligand und Rezeptor assoziiert. Das bedeutet, dass Serotonin nach einigen Minuten der Koapplikation zu entsprechenden Zeitanteilen wie der Antagonist an den Rezeptor binden und ihn somit aktivieren konnte. Diese verringerte Aktivierung, verglichen mit der alleinigen Substitution mit Serotonin, führte jedoch noch nicht zur Auslösung des potenzierten Effekts von Serotonin auf die mEPSC.

Zusätzlich muss noch erwähnt werden, dass SB-206553 auch auf den 5-HT_{2A}-Rezeptor antagonistisch wirkt. Allerdings ist seine Affinität für diesen Rezeptor um das hundert- bis tausendfache niedriger als für die anderen beiden Rezeptoren, was genauso für Serotonin selbst gilt (Barnes and Sharp 1999; Knight et al. 2004; May et al. 2003). Somit ist davon auszugehen, dass dieser Rezeptor auf die Ergebnisse bei dieser Versuchskonzipierung sehr wenig bis keinen Einfluss ausgeübt hat.

Für die 5-HT₂-Rezeptoren wird bei Aktivierung eine faszilitierende Wirkung auf die Amplitudenstärke und Frequenz der IPSCs von Interneuronen beschrieben (Rainnie 1999). Weitere Untersuchungen mit spezifischen Antagonisten für die einzelnen 5-HT₂-Rezeptoren zeigten, dass diese Aktivitätszunahme durch den 5-HT_{2A}-Rezeptor vermittelt wird, welcher hauptsächlich auf Interneuronen in der basolateralen Amygdala lokalisiert ist (Jiang et al. 2009). Die Blockierung der beiden anderen Rezeptoren konnte diese Aktivitätszunahme nicht inhibieren.

Ondansetron

Der 5-HT₃-Rezeptor ist ein ligandengesteuerter Ionenkanal (Derkach et al. 1989; Maricq et al. 1991), wohingegen die anderen 5-HT-Rezeptoren G-proteingekoppelte, metabotrope Rezeptoren sind (Barnes and Sharp 1999). Dieser Ionenkanal wird von fünf Untereinheiten zusammengesetzt, welche eine zentrale Pore von 3 nm Durchmesser bilden (Boess et al. 1995). Der Ionenkanal ist für Na⁺ und K⁺ fast im gleichen Maße (Jackson and Yakel 1995; Peters et al. 1993) sowie für Ca²⁺ (Davies et al. 1999) durchlässig und hat somit eine depolarisierende Wirkung auf die Membran des ihn exprimierenden Neurons. Beim Menschen ist der 5-HT₃-Rezeptor am stärksten im Hirnstamm und vergleichsweise niedrig in der Amygdala, dem Hippokampus und der Großhirnrinde exprimiert (Abi-Dargham et al. 1993; Bufton et al. 1993; Parker et al. 1996), wohingegen er bei Mäusen und Ratten am stärksten im Hippokampus, der Amygdala und der Großhirnrinde und danach in anderen

Strukturen des Prosencephalons (Vorderhirn) ausgebildet wird (Parker et al. 1996; Steward et al. 1993).

Aus den Daten kann geschlussfolgert werden, dass durch die Blockierung des 5-HT₃-Rezeptors mit Ondansetron die Wirkung von Serotonin auf die Amplitudenstärke nach neun bis zehn Minuten der Koapplikation mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht hemmend beeinflusst wird. Das deutet darauf hin, dass der 5-HT₃-Rezeptor nicht an der Vermittlung des postsynaptischen, potenzierenden Serotonineffekts involviert ist. Die Daten zeigen ebenso, dass auch die tatsächliche Frequenz deutlich zugenommen hat, nachdem zusätzlich Serotonin appliziert wurde. Diese Frequenzzunahme ist signifikant. Demzufolge scheint die Rezeptorblockierung durch Ondansetron auch auf die präsynaptische Aktivität von Pyramidenzellen im LA keinen supprimierenden Effekt auf die Wirkung des Serotonins zu haben.

Versuche konnten zeigen, dass im Hippokampus von Mäusen die mRNA (Boten-RNS) des 5-HT₃-Rezeptors hauptsächlich in Interneuronen nachweisbar ist (Tecott et al. 1993), was zu der Annahme führte, dass der 5-HT₃-Rezeptor eine indirekte Inhibition der exzitatorischen Projektionsneuronen durch die Aktivierung der inhibitorischen Interneurone vermittelt. Dadurch kann die Freisetzungswahrscheinlichkeit für Neurotransmitter herabgesetzt werden. Immunhistochemische Untersuchungen zeigen, dass der 5-HT₃-Rezeptor im basolateralen Komplex, zu dem der laterale Kern der Amygdala zählt, fast exklusiv auf Interneuronen exprimiert wird (Mascagni and McDonald 2007; Morales and Bloom 1997). Elektrophysiologische Daten demonstrieren eine verstärkte GABA-Freisetzung nach Aktivierung des Rezeptors (Barnes and Sharp 1999). Untersuchungen mit polyclonalen Antikörpern bestätigten die hauptsächliche Expression des Rezeptors (> 90 %) auf GABAergen Neuronen im Hippokampus und in der Großhirnrinde von Ratten (Morales et al. 1996; Morales and Bloom 1997). Auch extrazelluläre Messungen der Langzeitpotenzierung unterstützen diese Befunde. In hippokampalen Gehirnschnitten konnte eine Verringerung der LTP-Induktion nach der Aktivierung des Rezeptors nachgewiesen werden (Corradetti et al. 1992; Maeda et al. 1994; Passani et al. 1994; Staubli and Xu 1995). Eine Gabe von 5-HT₃-Rezeptorantagonisten wie Ondansetron bewirkten eine Verstärkung der LTP (Maeda et al. 1994).

Die Affinität von Serotonin für den 5-HT_{3A}-Rezeptor (pK_i von 6,5 – 6,9) ist niedriger als die von Ondansetron (pK_i von 7,8 – 8,3) (Barnes et al. 2013). Das bedeutet, dass Serotonin den Antagonisten bei Koapplikation nicht verdrängen kann und es in einem

gegebenen Moment nur einen geringen Prozentsatz der Bindungsstellen besetzt. Die deutlichen Zunahmen der Amplitudenstärke und der Frequenz zeigen somit die Effekte des Serotonins an anderen Rezeptoren an.

WAY-100635

Wenn nur Serotonin zusätzlich im ACSF, welches die Gehirnschnitte versorgt, enthalten ist, so könnten die in der präsynaptischen Membran von Projektionsneuronen lokalisierten 5-HT_{1A}-Rezeptoren aktiviert werden, wodurch die über G-Proteine gekoppelten Kaliumionenkanäle geöffnet werden müssten. Dies würde zu einer Hyperpolarisation der präsynaptischen Membran führen. Es kann vermutet werden, dass daraus eine verminderte Öffnungswahrscheinlichkeit von Kalziumionenkanälen resultiert, welche zu einer reduzierten Verschmelzung von synaptischen Vesikeln mit der präsynaptischen Membran und damit verbunden zu einer verringerten Glutamatfreisetzung führen würde.

Wenn Serotonin und der 5-HT_{1A}-Rezeptorantagonist WAY-100635 (WAY) in der ACSF-Lösung enthalten sind, so würde die Blockierung des 5-HT_{1A}-Rezeptors die eben beschriebene verringerte Glutamatfreisetzung an Projektionsneuronen supprimieren, wodurch ein Anstieg der Frequenz und der Amplitude von mEPSC im Vergleich zu Messungen, bei denen nur Serotonin appliziert wurde, zu erwarten wäre.

Die Ergebnisse aus den Versuchen stimmen mit dieser Theorie nicht überein. Dafür muss es andere Ursachen geben. Wichtig ist die Wirkung der Interneurone. Auf diesen ist der 5-HT_{1A}-Rezeptor ebenfalls lokalisiert. Dort würde seine Aktivierung zu einer verminderten GABA-Freisetzung führen, was in einer verringerten Hemmung der Projektionsneurone durch die Interneurone resultieren würde. Wird der 5-HT_{1A}-Rezeptor durch WAY blockiert, würde daraus eine normale Hemmung durch die Interneurone resultieren, was zu einer niedrigeren Frequenz und Amplitude von mEPSC der Projektionsneurone verglichen mit den Serotoninuntersuchungen führen würde. Die Versuche zeigen ein entsprechendes Resultat. Allerdings wurde bei diesen Versuchen Bicucullin appliziert, welches die GABA_A-Rezeptoren blockiert. Diese vor allem postsynaptisch lokalisierten Rezeptoren vermitteln die Mehrheit der inhibitorischen Signale im Zentralnervensystem. Die GABA_B-Rezeptoren sind nicht blockiert und können somit hemmend auf die synaptische Transmission der Projektionsneurone wirken und präsynaptisch die Frequenz der mEPSC reduzieren. Es ist bekannt, dass diese Rezeptoren prä- und postsynaptisch lokalisiert sein können (Bettler et al. 2004; Deisz et al. 1993). Untersuchungen konnten eine Reduzierung der Frequenz der miniatur inhibitorischen postsynaptischen Ströme durch 8-OH-DPAT,

einen 5-HT_{1A}-Rezeptoragonisten, nachweisen (Koyama et al. 2002). Wird dieser Agonist bei extrazellulären Messungen appliziert und dann hochfrequent stimuliert, so ist die LTP signifikant reduziert (Pollandt et al. 2003). Durch in vivo Experimente konnte nachgewiesen werden, dass eine durch 8-OH-DPAT-vermittelte Erhöhung der Aktionspotenzialfrequenz durch GABA_A-Rezeptorantagonisten blockiert werden kann (Stein et al. 2000).

Weiterhin wurde in Verhaltensuntersuchungen mit Ratten eine spezifische, agonistische Wirkung von WAY auf den Dopaminrezeptor des Typs 4 (D₄-Rezeptor) unter Ausschluss einer Beteiligung des 5-HT_{1A}-Rezeptors nachgewiesen (Marona-Lewicka and Nichols 2009). Eine Aktivierung der D₄-Rezeptoren hemmt ebenfalls die synaptische Transmission im lateralen Kern der Amygdala (Martina and Bergeron 2008). Dopamin D₄-Rezeptoren sind u. a. in Strukturen wie dem präfrontalen Kortex, der Amygdala und dem Hippokampus exprimiert und könnten kognitive Prozesse modulieren (Ariano et al. 1997; Hurd et al. 1997). Somit könnte die beobachtete Inhibition des serotonergen Effekts durch WAY-100635 sowohl durch GABA_B- als auch durch Dopaminrezeptoren vom Typ 4 hervorgerufen worden sein.

Aus der Literatur ist bekannt, dass WAY-100635 eine ähnlich hohe Affinität für den 5-HT_{1A}-Rezeptor wie Serotonin hat und kompetitiv hemmt (Kalipatnapu et al. 2004; Newman-Tancredi et al. 1998a; Newman-Tancredi et al. 1998b). Die pK_i-Werte aus Untersuchungen des humanen 5-HT_{1A}-Rezeptors für Serotonin liegen bei 9,1 - 9,7 und die für WAY-100635 liegen bei bis zu 9,2 (Andrade et al. 2013a). Somit konnten Agonist und Antagonist nach zusätzlicher Applikation von Serotonin mit annähernd gleichen Wahrscheinlichkeiten an den 5-HT_{1A}-Rezeptor binden.

In HEK-Zellkulturversuchen (engl.: human embryonic kidney) mit artifiziellen Rezeptoren wurde eine Affinität von WAY-100635 für den Dopaminrezeptor D_{4.2} mit einem pK_i von 7,8 bestimmt (Chemel et al. 2006). Somit ist die Affinität für den D_{4.2}-Rezeptor mehr als 20fach niedriger als für den 5-HT_{1A}-Rezeptor. Die Affinität von WAY-100635 für andere D₄-Rezeptoren ist noch niedriger. Der pK_i für D_{4.4} liegt bei 7,4 (Martel et al. 2007), was einer fast 100fach niedrigeren Affinität entspricht.

Der 5-HT_{2B}- oder 5-HT_{2C}-Rezeptor oder beide Rezeptortypen sind sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert und haben jeweils einen entscheidenden Einfluss auf die Signalübertragung zwischen den Projektionsneuronen im lateralen Kern der Amygdala. Sie vermitteln hauptsächlich die verstärkende Wirkung des Serotonins auf die mEPSC. Die 5-HT_{1A}- und die 5-HT₃-Rezeptoren sind hauptsächlich auf hemmenden Interneuronen

lokalisiert und könnten somit bei Aktivierung die Regulierung der aktivierenden Wirkungen durch die anderen Rezeptoren vermitteln. Ebenso ist der 5-HT_{2A}-Rezeptor auf Interneuronen lokalisiert, was auf ein filigranes Zusammenwirken von Exzitation und Inhibition durch Serotonin hindeutet. Je nach Verhältnis von Projektionsneuronen und Interneuronen sowie der Quantität der jeweiligen Rezeptoren könnte der Serotonineffekt von unterschiedlicher Qualität sein.

Da eine Aktivierung der Rezeptoren 5-HT_{2B} und 5-HT_{2C} zu einer Erhöhung der neuronalen Aktivität von Projektionsneuronen zu führen scheint, sind diese Rezeptoren möglicherweise für die Sensibilisierung des TRPV1-Rezeptors bei einer Koapplikation von Serotonin und Capsaicin in extrazellulären Messungen zur Langzeitplastizität verantwortlich.

Die hier diskutierten Hypothesen zur rezeptorspezifischen Wirkung von Serotonin an Projektionszellen im LA sollten in weiteren Untersuchungen unter Einbeziehung weiterer 5-HT-Rezeptoren, einer GABA_B-Blockade und dem Einsatz von 5-HT-Agonisten verifiziert werden.

In der Literatur wird den Serotoninrezeptoren eine Funktion in einer großen Anzahl von Störungen des Zentralnervensystems wie der rezidivierenden depressiven Störung, Angststörungen und angstlösende Effekte, Schizophrenie, Schlafstörungen, Migräne, aversivem Verhalten und krankhaftem Essverhalten zugeschrieben (Barnes and Sharp 1999; Baxter et al. 1995; Costall et al. 1989; Eggers 2013; Knight et al. 2004). Deswegen ist eine möglichst genaue Erforschung der Eigenschaften und Funktionen der Serotoninrezeptoren in den einzelnen Gehirnarealen von entscheidender Bedeutung. Nur mit detailliertem Grundlagenwissen wird es möglich sein hocheffektive und gleichzeitig nebenwirkungsarme Medikamente herzustellen, um betroffenen Menschen zu helfen.

4.8 Wirkungsweise der TRPV1-Kanäle auf die synaptische Plastizität

In extrazellulären Ableitungen von Feldpotenzialen wurde die Ausbildung einer LA-LTP durch Capsaicin unterdrückt. Da der TRPV1-Rezeptor als nichtselektiver Kationenkanal nach Aktivierung hauptsächlich Kalziumionen in das Zytoplasma von Neuronen strömen lässt, resultiert daraus eine Depolarisation der Zellmembran. Demzufolge müssten diese Neuronen auf Grund des herabgesetzten Schwellenwertes leichter und stärker aktiviert werden können. Somit müsste aus der Aktivierung von TRPV1-Rezeptoren eine verstärkte LA-LTP resultieren.

Messungen mit Anandamid zeigen, dass es auf die LA-LTP den gleichen suppressiven Effekt wie Capsaicin ausübt (Zschenderlein et al. 2011). Dieses Ergebnis ist ein sehr deutlicher Hinweis darauf, dass die auf eine Aktivierung des TRPV1-Ionenkanals durch CPS hin erfolgenden Signalwege eine aktivierende Wirkung auf den CB1-Rezeptor ausüben kann. Weiterhin wurde auch gezeigt, dass das exogene Cannabinoid WIN 55,212-2 die Auslösbarkeit einer LTP in der Amygdala hemmt (Azad et al. 2005). Noch unveröffentlichte Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigen, dass die supprimierende Wirkung von CPS auf die LA-LTP in CB1-KO-Mäusen nicht mehr nachzuweisen ist. Zusammengefasst zeigen die Resultate, dass eine Aktivierung von CB1-Rezeptoren die Auslösbarkeit von Langzeitpotenzierungen in der Amygdala inhibiert. Somit haben endogene Cannabinoide in der Amygdala einen hemmenden Einfluss auf die synaptische Plastizität. Auch in anderen Gehirnarealen wurde solch ein hemmender Einfluss nach Aktivierung des CB1-Rezeptors festgestellt (Gerdeman and Lovinger 2003). Es konnte in Neuronen des Corpus striatum gezeigt werden, dass Anandamid postsynaptisch synthetisiert und über die Zellmembran transportiert wird und dann präsynaptisch CB1-Rezeptoren aktiviert (Ronesi et al. 2004).

Es besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass die durch Capsaicin ausgelöste, aktivierende Wirkung auf den CB1-Rezeptor durch 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) vermittelt wird. Dieses endogene Cannabinoid ist ein voller Agonist des CB1-Rezeptors und es wird diskutiert, dass 2-AG der intrinsische, physiologische Agonist für den CB1-Rezeptor ist (Sugiura et al. 1999). Es wurde gezeigt, dass 2-AG in Homogenisaten von Gehirngewebe in Abwesenheit von Ca^{2+} gebildet wurde und dass die Konzentration von 2-AG bei Vorhandensein von Kalziumionen signifikant erhöht war. Dieses Ergebnis suggeriert, dass Kalziumionen eine Schlüsselrolle bei der Bildung von 2-AG spielen (Kondo et al. 1998).

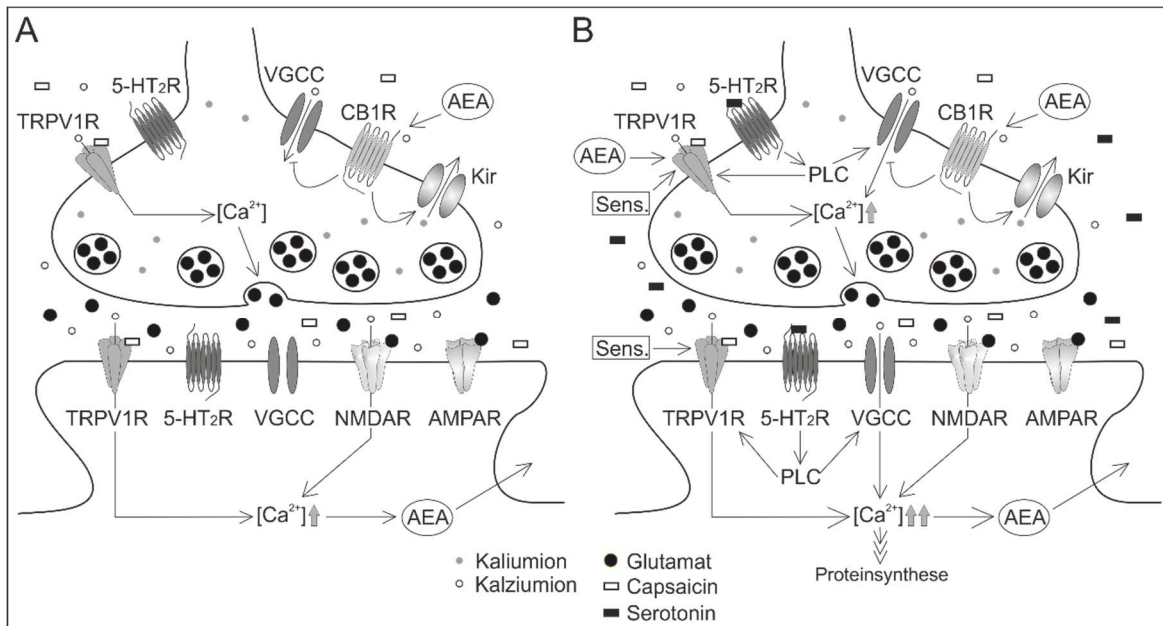


Abbildung 26: Wirkung der TRPV1-Rezeptoraktivierung auf die LA-LTP. (A) In Anwesenheit von Capsaicin (CPS) resultiert nach einer Hochfrequenzstimulation (HFS) eine erhöhte, postsynaptische Kalziumionenkonzentration. Diese führt zur Bildung endogener Cannabinoide wie Anandamid (AEA). Aktiv wird AEA über die Zellmembran transportiert und diffundiert dort frei. CPS bindet auch an präsynaptisch lokalisierte TRPV1-Rezeptoren (TRPV1R). Kalziumionen strömen dadurch in die Zelle, aber durch die retrograde Aktivierung der CB1-Rezeptoren (CB1R) durch Anandamid, weswegen Kaliumionen ausströmen und ein Einstrom von Kalziumionen verringert wird, resultiert nur eine schwache Depolarisation der präsynaptischen Membran. Die Glutamatfreisetzung ist geringfügig erhöht. 60 Minuten nach HFS sind die Feldpotentialamplituden nicht signifikant gegenüber denen vor HFS erhöht. Kainat- und AMPA-Rezeptoren (AMPA) vermitteln den Natriumioneneinstrom. **(B)** Bei zusätzlicher Anwesenheit von Serotonin wird die Phospholipase C (PLC) aktiviert, wodurch sowohl spannungsgesteuerte Kalziumionenkanäle (VGCC) als auch TRPV1-Rezeptoren stimuliert werden. Dies führt zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumionenkonzentration. Präsynaptisch kann verstärkt Glutamat freigesetzt werden und postsynaptisch wird über mehrere Zwischenschritte (vgl. Abschnitt 1.3.2) die Proteinsynthese verstärkt. 60 Minuten nach HFS kann eine LTP aufrechterhalten werden. Auch eine Sensibilisierung der TRPV1-Rezeptoren durch Ethanol oder Isofluran führt prä- und postsynaptisch zu einer erhöhten Kalziumionenkonzentration und zur Etablierung einer LTP. Abkürzungen: 5-HT₂R – Serotoninrezeptor Typ 2; AEA – Anandamid; AMPAR – AMPA-Rezeptor; CB1R – Cannabinoid Rezeptortyp 1; K_{ir} – einwärts gleichrichtender Kaliumionenkanal; NMDAR – NMDA-Rezeptor; PLC – Phospholipase C; TRPV1R – TRPV1-Rezeptor; VGCC – spannungsgesteuerter Kalziumionenkanal (modifiziert und weiterentwickelt nach: Zschenderlein, C., Gebhardt, C., von Bohlen und Halbach, O., Kulisch, C., and Albrecht, D. 2011. Capsaicin-induced changes in LTP in the lateral amygdala are mediated by TRPV1. *PLoS. One.* **6**: e16116.)

Diese Ergebnisse zusammengenommen kann die Hypothese zur Ereigniskaskade aufgestellt werden, dass eine Aktivierung der TRPV1-Rezeptoren zu einem verstärkten Ca²⁺-Einstrom in die präsynaptische Membran führt, wodurch die Fusion der synaptischen

Vesikel mit der Zellmembran erleichtert wird. Aus den Vesikeln wird verstärkt Glutamat freigesetzt, was postsynaptisch zu einem verstärkten Ca^{2+} -Einstrom führt. Die Kalziumionen binden an Calmodulin, welches daraufhin die neuronale Stickstoffmonoxidsynthase aktiviert. Das daraufhin gebildete NO wirkt retrograd und induziert an der präsynaptischen Membran eine Verstärkung des Ca^{2+} -Einstroms (Yoshida et al. 2006), wodurch die Glutamatfreisetzung weiter verstärkt wird. Wenn es durch eine starke Stimulation zu einem massiven Anstieg der Glutamatfreisetzung kommt, wird postsynaptisch durch den weiteren Ca^{2+} -Anstieg zusätzlich die Bildung von endogenen Cannabinoiden wesentlich verstärkt (Azad et al. 2005). Diese wirken als retrograde Botenstoffe und aktivieren sehr effektiv die präsynaptisch lokalisierten CB1-Rezeptoren, wodurch präsynaptisch der Ca^{2+} -Einstrom vermindert (Albrecht and von Bohlen und Halbach 2008) und Kaliumionenkanäle geöffnet werden. Die Glutamatfreisetzung nimmt sehr stark ab und die NO-Synthese sinkt. Da Anandamid auch an die TRPV1-Rezeptoren bindet und diese aktiviert (Akerman et al. 2004; Zygmunt et al. 1999), jedoch nicht so effektiv wie Capsaicin ist (Ross 2003), wird der Einstrom an Ca^{2+} und damit die synaptische Aktivität des Neurons nicht zu stark reduziert. Die LA-LTP könnte durch diese Vorgänge supprimiert werden. Dies ist in Abbildung 26A dargestellt.

Bei einer Narkose mit hohen Dosen an Isofluran sowie bei einer Koapplikation von CPS mit Ethanol oder Serotonin nach Diethylethernarkosen vor der Dekapitation wurde eine Erhöhung der LA-LTP verglichen zu Messungen mit Capsaicin nach Diethylethernarkose festgestellt. Aus der Literatur ist eine sensibilisierende Wirkung sowohl von Isofluran (Cornett et al. 2008; Harrison and Nau 2008; Matta et al. 2008) als auch von Ethanol (Blednov and Harris 2009; Ellingson et al. 2009; Trevisani et al. 2002) auf den TRPV1-Rezeptor bekannt. Die Patch-Clamp-Ergebnisse zeigen an, dass die $5\text{-HT}_{2B/2C}$ -Rezeptoren eine Sensibilisierung der TRPV1-Rezeptoren auslösen könnten. Diese Sensibilisierung könnte durch die rezeptorvermittelte Aktivierung der Phospholipase C und durch diese verstärkt gebildeten Produkte vermittelt werden (Ahern et al. 2005; Amadesi et al. 2004; Hoyer et al. 1994).

Eine Sensibilisierung der prä- und wahrscheinlich auch postsynaptisch lokalisierten TRPV1-Kanäle würde zu einer verstärkten Aktivierung nach HFS führen, wodurch vermehrt Kalziumionen in die Zelle strömen könnten. Daraus würde eine Progression der LA-LTP im Vergleich zu der oben beschriebenen resultieren. Die erhöhte postsynaptische Kalziumionenkonzentration würde zu einer vermehrten Bildung von Anandamid führen, welches in erhöhten Konzentrationen auch die TRPV1-Rezeptoren aktivieren würde.

5. Zusammenfassung

Bei dieser Arbeit stand die Wirkung des TRPV1-Rezeptors auf erregende Projektionsneuronen im Mittelpunkt. Es sollte geklärt werden, wie sie die synaptische Plastizität modulieren können und ob Sensibilisatoren die Ergebnisse beeinflussen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass der TRPV1-Rezeptor hauptsächlich an der präsynaptischen Membran von Projektionsneuronen lokalisiert ist. Capsaicin hat eine gesteigerte Glutamatfreisetzung bewirkt, wodurch die Kurzzeitplastizität beeinflusst sein kann. Die TRPV1-Rezeptoraktivierung hat einen signifikanten, hemmenden Einfluss auf die Stärke einer LTP. In TRPV1-knockout-Mäusen ist die Stärke der LTP ebenfalls signifikant reduziert.

Innerhalb dieser Arbeit konnte erstmalig bewiesen werden, dass durch eine Hochfrequenzstimulation die Synthese von Stickstoffmonoxid in Gehirnschnitten des lateralen Kerns der Amygdala erhöht wird. Es ist zu beachten, dass die NO-Produktion auch schon vor einer HFS konstant stattfindet.

Es konnte eine Sensibilisierung des TRPV1-Rezeptors durch Isofluran, Ethanol und Serotonin nachgewiesen werden. Ethanol und Serotonin wirken supprimierend auf die LA-LTP. Bei Koapplikation mit Capsaicin ist die LA-LTP erhöht. Bei Narkosen sollte eine Isoflurankonzentrationen von unter 4 % verwendet werden, um die Messergebnisse nicht zu beeinflussen. Die durch Serotonin verursachte Sensibilisierung des TRPV1-Rezeptors wird möglicherweise durch den 5-HT_{2B}- und/oder 5-HT_{2C}-Rezeptor vermittelt.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte erstmalig gezeigt werden, dass der Forced Swimming Test einen suppressiven Effekt auf die LA-LTP hat. Dies unterstützt andere Stresstudien von Amygdala und Hippokampus. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Rezeptors diesen stressinduzierten, suppressiven Effekten entgegen wirkt.

Da der TRPV1-Rezeptor ein mögliches Ziel bei der Behandlung von Angststörungen ist, ist es notwendig dessen Wirkungsweise zu kennen, um geeignete Pharmaka für die Behandlung von Patientinnen und Patienten herstellen zu können. Weiterhin könnte eine gezielte pharmakologische Beeinflussung von TRPV1-Ionenkanälen eine praktikable Methode zur Behandlung von durch Stress verursachten, krankhaften Hyperaktivitäten der Amygdala mit daraus resultierenden Verhaltensstörungen sein.

6. Summary

The focus of this work was on the effect of the TRPV1 receptors at glutamatergic excitatory projection neurons. It was of interest how their activation modulates the synaptic plasticity and how possible sensitizers would change the outcome.

In the framework of this doctoral thesis it could be shown that the TRPV1 receptors are mainly localized at the presynaptic membrane of projection neurons. This receptor type can modulate the short term plasticity. TRPV1 activation leads to an increased release of glutamate. The strength of the LTP is significantly influenced when these receptor types are activated. Since the strength of LTP is reduced in TRPV1 knockout mice the influence without activation is significant as well.

Within this work the first evidence could be reported that high frequency stimulation leads to an increase in the production of nitric oxide in horizontal brain slices of the lateral nucleus of the amygdala. It is to recognize that NO is produced continuously before the HFS as well. TRPV1 activation increases the NO production.

It could be shown that the TRPV1 receptor can be sensitized by isoflurane, ethanol, and serotonin. Ethanol and serotonin cause a reduction of LA-LTP. In co application with capsaicin they increase LA-LTP. To not influence the experimental results isoflurane should be used in a concentration of 4 % or less for anaesthesia. The sensitization of the TRPV1 receptor caused by serotonin is presumably mediated by the 5-HT_{2B}, the 5-HT_{2C} receptor, or both.

In the context of this dissertation it could be shown for the first time that the forced swimming test has a suppressive effect on the LTP in the LA. This finding supports other stress studies in the amygdala and the hippocampus. Further it can be reported that an activation of the TRPV1 receptor can counteract this stress induced suppressive effect.

Since the TRPV1 receptor is a possible target in the treatment of fear disorders it is essential to know its way of action in order to develop suitable pharmaceuticals for the treatment of patients. Additionally, pharmacological manipulation of the TRPV1 receptor could be a method for treating stress induced pathological hyperactivities in the amygdala with its resulting behaviour disorders.

7. Literaturverzeichnis

Reference List

1. Abi-Dargham, A., Laruelle, M., Wong, D.T., Robertson, D.W., Weinberger, D.R., and Kleinman, J.E. 1993. Pharmacological and regional characterization of [3H]LY278584 binding sites in human brain. *J. Neurochem.* **60**: 730-737.
2. Ahern, G.P., Brooks, I.M., Miyares, R.L., and Wang, X.B. 2005. Extracellular cations sensitize and gate capsaicin receptor TRPV1 modulating pain signaling. *J. Neurosci.* **25**: 5109-5116.
3. Ahmari, S.E., Spellman, T., Douglass, N.L., Kheirbek, M.A., Simpson, H.B., Deisseroth, K., Gordon, J.A., and Hen, R. 2013. Repeated cortico-striatal stimulation generates persistent OCD-like behavior. *Science* **340**: 1234-1239.
4. Ahmed, T., Frey, J.U., and Korz, V. 2006. Long-term effects of brief acute stress on cellular signaling and hippocampal LTP. *J. Neurosci.* **26**: 3951-3958.
5. Akerman, S., Kaube, H., and Goadsby, P.J. 2004. Anandamide acts as a vasodilator of dural blood vessels in vivo by activating TRPV1 receptors. *Br. J. Pharmacol.* **142**: 1354-1360.
6. Al-Hayani, A., Wease, K.N., Ross, R.A., Pertwee, R.G., and Davies, S.N. 2001. The endogenous cannabinoid anandamide activates vanilloid receptors in the rat hippocampal slice. *Neuropharmacology* **41**: 1000-1005.
7. Albrecht, D. 2007. Angiotensin-(1-7)-induced plasticity changes in the lateral amygdala are mediated by COX-2 and NO. *Learn. Mem.* **14**: 177-184.
8. Albrecht, D. and von Bohlen und Halbach, O. 2008. Cellular Cognition: A Focus on LTP and LTD in the Lateral Nucleus of the Amygdala. In *Synaptic Plasticity: New Research* (eds. Tim F.Kaiser and Felix J.Peters), pp. 269-308. Nova Science Publishers, Inc.
9. Alle, H. and Geiger, J.R. 2007. GABAergic spill-over transmission onto hippocampal mossy fiber boutons. *J. Neurosci.* **27**: 942-950.
10. Amadesi, S., Nie, J., Vergnolle, N., Cottrell, G.S., Grady, E.F., Trevisani, M., Manni, C., Geppetti, P., McRoberts, J.A., Ennes, H., Davis, J.B., Mayer, E.A., and Bunnett, N.W. 2004. Protease-activated receptor 2 sensitizes the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid receptor 1 to induce hyperalgesia. *J. Neurosci.* **24**: 4300-4312.
11. Amat, J., Matus-Amat, P., Watkins, L.R., and Maier, S.F. 1998. Escapable and inescapable stress differentially alter extracellular levels of 5-HT in the basolateral amygdala of the rat. *Brain Res.* **812**: 113-120.

12. Andrade, R., Barnes, N.M., Baxter, G., Bockaert, J., Branchek, T., Cohen, M.L., Dumuis, A., Eglen, R.M., Göthert, M., Hamblin, M., Hamon, M., Hartig, P.R., Hen, R., Herrick-Davis, K., Hills, R., Hoyer, D., Humphrey, P.P.A., Latté, K.P., Maroteaux, L., Martin, G.R., Middlemiss, D.N., Mylecharane, E., Peroutka, S.J., Saxena, P.R., Sleight, A., Villalon, C.M., and Yocca, F. 2013a. 5-Hydroxytryptamine receptors: 5-HT1A receptor. In . IUPHAR database.
13. Andrade, R., Barnes, N.M., Baxter, G., Bockaert, J., Branchek, T., Cohen, M.L., Dumuis, A., Eglen, R.M., Göthert, M., Hamblin, M., Hamon, M., Hartig, P.R., Hen, R., Herrick-Davis, K., Hills, R., Hoyer, D., Humphrey, P.P.A., Latté, K.P., Maroteaux, L., Martin, G.R., Middlemiss, D.N., Mylecharane, E., Peroutka, S.J., Saxena, P.R., Sleight, A., Villalon, C.M., and Yocca, F. 2013b. 5-Hydroxytryptamine receptors: 5-HT2B receptor. In . IUPHAR database.
14. Andrade, R., Barnes, N.M., Baxter, G., Bockaert, J., Branchek, T., Cohen, M.L., Dumuis, A., Eglen, R.M., Göthert, M., Hamblin, M., Hamon, M., Hartig, P.R., Hen, R., Herrick-Davis, K., Hills, R., Hoyer, D., Humphrey, P.P.A., Latté, K.P., Maroteaux, L., Martin, G.R., Middlemiss, D.N., Mylecharane, E., Peroutka, S.J., Saxena, P.R., Sleight, A., Villalon, C.M., and Yocca, F. 2013c. 5-Hydroxytryptamine receptors: 5-HT2C receptor. In . IUPHAR database.
15. Antkowiak, B. and Hentschke, H. 1997. Cellular mechanisms of gamma rhythms in rat neocortical brain slices probed by the volatile anaesthetic isoflurane. *Neurosci. Lett.* **231**: 87-90.
16. Ariano, M.A., Wang, J., Noblett, K.L., Larson, E.R., and Sibley, D.R. 1997. Cellular distribution of the rat D4 dopamine receptor protein in the CNS using anti-receptor antisera. *Brain Res.* **752**: 26-34.
17. Arnold, U., Mailahn, M., Nagl, B., Vettin, J., and Wilck, A. 2011. *Pschyrembel klinisches Wörterbuch 2012*. De Gruyter.
18. Azad, S.C., Hüge, V., Schops, P., Hilf, C., Dodt, H.U., Rammes, G., and Zieglgansberger, W. 2005. Endogenes Cannabinoidsystem: Einfluss auf neuronale Plastizität und Schmerzgedächtnis. *Schmerz* **19**: 521-527.
19. Azad, S.C., Monory, K., Marsicano, G., Cravatt, B.F., Lutz, B., Zieglgansberger, W., and Rammes, G. 2004. Circuitry for associative plasticity in the amygdala involves endocannabinoid signaling. *J. Neurosci.* **24**: 9953-9961.
20. Azmitia, E.C. and Gannon, P.J. 1986. The primate serotonergic system: a review of human and animal studies and a report on *Macaca fascicularis*. *Adv. Neurol.* **43**: 407-468.
21. Barker, E.L., Westphal, R.S., Schmidt, D., and Sanders-Bush, E. 1994. Constitutively active 5-hydroxytryptamine2C receptors reveal novel inverse agonist activity of receptor ligands. *J. Biol. Chem.* **269**: 11687-11690.

22. Barna, I., Zelena, D., Arszovszki, A.C., and Ledent, C. 2004. The role of endogenous cannabinoids in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis regulation: in vivo and in vitro studies in CB1 receptor knockout mice. *Life Sci.* **75**: 2959-2970.
23. Barnes, N.M., Hales, T.G., Lummis, S.C.R., Niesler, B., and Peters, J.A. 2013. 5-HT3 receptors: 5-HT3A. In . IUPHAR database.
24. Barnes, N.M. and Neumaier, J. 2011. Neuronal 5-HT Receptors and SERT. In . TOCRIS bioscience.
25. Barnes, N.M. and Sharp, T. 1999. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* **38**: 1083-1152.
26. Bauer, E.P., Schafe, G.E., and LeDoux, J.E. 2002. NMDA receptors and L-type voltage-gated calcium channels contribute to long-term potentiation and different components of fear memory formation in the lateral amygdala. *J. Neurosci.* **22**: 5239-5249.
27. Baxter, G., Kennett, G., Blaney, F., and Blackburn, T. 1995. 5-HT2 receptor subtypes: a family re-united? *Trends Pharmacol. Sci.* **16**: 105-110.
28. Baxter, M.G. and Murray, E.A. 2002. The amygdala and reward. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**: 563-573.
29. Bear, M.F. and Malenka, R.C. 1994. Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr. Opin. Neurobiol.* **4**: 389-399.
30. Beattie, D.T., Smith, J.A., Marquess, D., Vickery, R.G., Armstrong, S.R., Pulido-Rios, T., McCullough, J.L., Sandlund, C., Richardson, C., Mai, N., and Humphrey, P.P. 2004. The 5-HT4 receptor agonist, tegaserod, is a potent 5-HT2B receptor antagonist in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol.* **143**: 549-560.
31. Beckley, E.H. and Finn, D.A. 2007. Inhibition of progesterone metabolism mimics the effect of progesterone withdrawal on forced swim test immobility. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **87**: 412-419.
32. Bekkers, J.M. and Stevens, C.F. 1993. NMDA receptors at excitatory synapses in the hippocampus: test of a theory of magnesium block. *Neurosci. Lett.* **156**: 73-77.
33. Bellani, M., Baiano, M., and Brambilla, P. 2011. Brain anatomy of major depression II. Focus on amygdala. *Epidemiol. Psychiatr. Sci.* **20**: 33-36.
34. Benke, T.A., Luthi, A., Isaac, J.T., and Collingridge, G.L. 1998. Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature* **393**: 793-797.
35. Bettler, B., Kaupmann, K., Mosbacher, J., and Gassmann, M. 2004. Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev.* **84**: 835-867.

36. Bieda, M.C., Su, H., and Maciver, M.B. 2009. Anesthetics discriminate between tonic and phasic gamma-aminobutyric acid receptors on hippocampal CA1 neurons. *Anesth. Analg.* **108**: 484-490.
37. Blednov, Y.A. and Harris, R.A. 2009. Deletion of vanilloid receptor (TRPV1) in mice alters behavioral effects of ethanol. *Neuropharmacology* **56**: 814-820.
38. Boess, F.G., Beroukhim, R., and Martin, I.L. 1995. Ultrastructure of the 5-hydroxytryptamine₃ receptor. *J. Neurochem.* **64**: 1401-1405.
39. Boess, F.G. and Martin, I.L. 1994. Molecular biology of 5-HT receptors. *Neuropharmacology* **33**: 275-317.
40. Bon, C.L. and Garthwaite, J. 2003. On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci.* **23**: 1941-1948.
41. Bourgeois, L., Gauriau, C., and Bernard, J.F. 2001. Projections from the nociceptive area of the central nucleus of the amygdala to the forebrain: a PHA-L study in the rat. *Eur. J. Neurosci.* **14**: 229-255.
42. Brecht, D.S. and Snyder, S.H. 1989. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**: 9030-9033.
43. Brecht, D.S. and Snyder, S.H. 1992. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* **8**: 3-11.
44. Brecht, D.S. and Snyder, S.H. 1994. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 175-195.
45. Brown, T.H., Chapman, P.F., Kairiss, E.W., and Keenan, C.L. 1988. Long-term synaptic potentiation. *Science* **242**: 724-728.
46. Bufton, K.E., Steward, L.J., Barber, P.C., and Barnes, N.M. 1993. Distribution and characterization of the [³H]granisetron-labelled 5-HT₃ receptor in the human forebrain. *Neuropharmacology* **32**: 1325-1331.
47. Bzdok, D., Laird, A.R., Zilles, K., Fox, P.T., and Eickhoff, S.B. 2012. An investigation of the structural, connectional, and functional subspecialization in the human amygdala. *Hum. Brain Mapp.*
48. Calvino, B., Levesque, G., and Besson, J.M. 1982. Possible involvement of the amygdaloid complex in morphine analgesia as studied by electrolytic lesions in rats. *Brain Res.* **233**: 221-226.
49. Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., and Julius, D. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**: 816-824.
50. Cederquist, G.Y., Azim, E., Shnider, S.J., Padmanabhan, H., and Macklis, J.D. 2013. Lmo4 establishes rostral motor cortex projection neuron subtype diversity. *J. Neurosci.* **33**: 6321-6332.

51. Cella, M., Leguizamon, G.F., Sordelli, M.S., Cervini, M., Guadagnoli, T., Ribeiro, M.L., Franchi, A.M., and Farina, M.G. 2008. Dual effect of anandamide on rat placenta nitric oxide synthesis. *Placenta* **29**: 699-707.
52. Chapman, P.F., Kairiss, E.W., Keenan, C.L., and Brown, T.H. 1990. Long-term synaptic potentiation in the amygdala. *Synapse* **6**: 271-278.
53. Chemel, B.R., Roth, B.L., Armbruster, B., Watts, V.J., and Nichols, D.E. 2006. WAY-100635 is a potent dopamine D4 receptor agonist. *Psychopharmacology (Berl)* **188**: 244-251.
54. Chen, C. and Bazan, N.G. 2003. Acetaminophen modifies hippocampal synaptic plasticity via a presynaptic 5-HT2 receptor. *Neuroreport* **14**: 743-747.
55. Chen, G.L. and Miller, G.M. 2012. Advances in tryptophan hydroxylase-2 gene expression regulation: new insights into serotonin-stress interaction and clinical implications. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* **159B**: 152-171.
56. Chortkoff, B.S., Eger, E.I., Crankshaw, D.P., Gonsowski, C.T., Dutton, R.C., and Ionescu, P. 1995a. Concentrations of desflurane and propofol that suppress response to command in humans. *Anesth. Analg.* **81**: 737-743.
57. Chortkoff, B.S., Gonsowski, C.T., Bennett, H.L., Levinson, B., Crankshaw, D.P., Dutton, R.C., Ionescu, P., Block, R.I., and Eger, E.I. 1995b. Subanesthetic concentrations of desflurane and propofol suppress recall of emotionally charged information. *Anesth. Analg.* **81**: 728-736.
58. Chu, C.J., Huang, S.M., De, P.L., Bisogno, T., Ewing, S.A., Miller, J.D., Zipkin, R.E., Daddario, N., Appendino, G., Di, M., V, and Walker, J.M. 2003. N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. *J. Biol. Chem.* **278**: 13633-13639.
59. Collingridge, G.L. and Singer, W. 1990. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**: 290-296.
60. Cormier, R.J. and Kelly, P.T. 1996. Glutamate-induced long-term potentiation enhances spontaneous EPSC amplitude but not frequency. *J. Neurophysiol.* **75**: 1909-1918.
61. Cornett, P.M., Matta, J.A., and Ahern, G.P. 2008. General anesthetics sensitize the capsaicin receptor transient receptor potential V1. *Mol. Pharmacol.* **74**: 1261-1268.
62. Corradetti, R., Ballerini, L., Pugliese, A.M., and Pepeu, G. 1992. Serotonin blocks the long-term potentiation induced by primed burst stimulation in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Neuroscience* **46**: 511-518.
63. Costagliola, C., Parmeggiani, F., Semeraro, F., and Sebastiani, A. 2008. Selective serotonin reuptake inhibitors: a review of its effects on intraocular pressure. *Curr. Neuropharmacol.* **6**: 293-310.

64. Costall, B., Kelly, M.E., Naylor, R.J., Onaivi, E.S., and Tyers, M.B. 1989. Neuroanatomical sites of action of 5-HT₃ receptor agonist and antagonists for alteration of aversive behaviour in the mouse. *Br. J. Pharmacol.* **96**: 325-332.
65. Coutureau, E. and Di Scala, G. 2009. Entorhinal cortex and cognition. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **33**: 753-761.
66. Crawford, L.K., Rahman, S.F., and Beck, S.G. 2013. Social stress alters inhibitory synaptic input to distinct subpopulations of raphe serotonin neurons. *ACS Chem. Neurosci.* **4**: 200-209.
67. Cristino, L., De, P.L., Pryce, G., Baker, D., Guglielmotti, V., and Di, M., V. 2006. Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience* **139**: 1405-1415.
68. Cummings, D.D., Wilcox, K.S., and Dichter, M.A. 1996. Calcium-dependent paired-pulse facilitation of miniature EPSC frequency accompanies depression of EPSCs at hippocampal synapses in culture. *J. Neurosci.* **16**: 5312-5323.
69. Davies, P.A., Pistis, M., Hanna, M.C., Peters, J.A., Lambert, J.J., Hales, T.G., and Kirkness, E.F. 1999. The 5-HT_{3B} subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Nature* **397**: 359-363.
70. de Olmos, J.S. 2004. Amygdala. In *The Human Nervous System* (eds. George Paxinos and Jürgen K.Mai), pp. 739-868.
71. de Quervain, D.J., Aerni, A., Schelling, G., and Roozendaal, B. 2009. Glucocorticoids and the regulation of memory in health and disease. *Front Neuroendocrinol.* **30**: 358-370.
72. Deisz, R.A., Billard, J.M., and Zieglgansberger, W. 1993. Pre- and postsynaptic GABAB receptors of rat neocortical neurons differ in their pharmacological properties. *Neurosci. Lett.* **154**: 209-212.
73. Derkach, V., Surprenant, A., and North, R.A. 1989. 5-HT₃ receptors are membrane ion channels. *Nature* **339**: 706-709.
74. Drephal, C., Schubert, M., and Albrecht, D. 2006. Input-specific long-term potentiation in the rat lateral amygdala of horizontal slices. *Neurobiol. Learn. Mem.* **85**: 272-282.
75. Duvarci, S. and Pare, D. 2007. Glucocorticoids enhance the excitability of principal basolateral amygdala neurons. *J. Neurosci.* **27**: 4482-4491.
76. Echeverry, M.B., Guimaraes, F.S., and Del Bel, E.A. 2004. Acute and delayed restraint stress-induced changes in nitric oxide producing neurons in limbic regions. *Neuroscience* **125**: 981-993.
77. Eggers, A.E. 2013. A serotonin hypothesis of schizophrenia. *Med. Hypotheses* **80**: 791-794.

78. Ellingson, J.M., Silbaugh, B.C., and Brassler, S.M. 2009. Reduced oral ethanol avoidance in mice lacking transient receptor potential channel vanilloid receptor 1. *Behav. Genet.* **39**: 62-72.
79. Farb, C.R. and LeDoux, J.E. 1997. NMDA and AMPA receptors in the lateral nucleus of the amygdala are postsynaptic to auditory thalamic afferents. *Synapse* **27**: 106-121.
80. Farb, C.R. and LeDoux, J.E. 1999. Afferents from rat temporal cortex synapse on lateral amygdala neurons that express NMDA and AMPA receptors. *Synapse* **33**: 218-229.
81. Fendt, M., Imobersteg, S., Peterlik, D., Chaperon, F., Mattes, C., Wittmann, C., Olpe, H.R., Mosbacher, J., Vranesic, I., van der Putten, H., McAllister, K.H., Flor, P.J., and Gee, C.E. 2013. Differential roles of mGlu(7) and mGlu(8) in amygdala-dependent behavior and physiology. *Neuropharmacology* **72**: 215-223.
82. Fields, H.L. 2000. Pain modulation: expectation, opioid analgesia and virtual pain. *Prog. Brain Res.* **122**: 245-253.
83. Fortune, E.S. and Rose, G.J. 2001. Short-term synaptic plasticity as a temporal filter. *Trends Neurosci.* **24**: 381-385.
84. Fortune, E.S. and Rose, G.J. 2002. Roles for short-term synaptic plasticity in behavior. *J. Physiol Paris* **96**: 539-545.
85. Fraser, G.A. 2009. The use of a synthetic cannabinoid in the management of treatment-resistant nightmares in posttraumatic stress disorder (PTSD). *CNS. Neurosci. Ther.* **15**: 84-88.
86. Frey, U., Krug, M., Reymann, K.G., and Matthies, H. 1988. Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro. *Brain Res.* **452**: 57-65.
87. Ganon-Elazar, E. and Akirav, I. 2012. Cannabinoids prevent the development of behavioral and endocrine alterations in a rat model of intense stress. *Neuropsychopharmacology* **37**: 456-466.
88. Garthwaite, J., Charles, S.L., and Chess-Williams, R. 1988. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* **336**: 385-388.
89. Gavva, N.R., Tamir, R., Qu, Y., Klionsky, L., Zhang, T.J., Immke, D., Wang, J., Zhu, D., Vanderah, T.W., Porreca, F., Doherty, E.M., Norman, M.H., Wild, K.D., Bannon, A.W., Louis, J.C., and Treanor, J.J. 2005. AMG 9810 [(E)-3-(4-t-butylphenyl)-N-(2,3-dihydrobenzo[b][1,4] dioxin-6-yl)acrylamide], a novel vanilloid receptor 1 (TRPV1) antagonist with antihyperalgesic properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **313**: 474-484.
90. Gerdeman, G.L. and Lovinger, D.M. 2003. Emerging roles for endocannabinoids in long-term synaptic plasticity. *Br. J. Pharmacol.* **140**: 781-789.

91. Gerrig, R.J. and Zimbardo, P.G. 2008. *Psychologie*. Pearson.
92. Gomes, A., Fernandes, E., and Lima, J.L. 2006. Use of fluorescence probes for detection of reactive nitrogen species: a review. *J. Fluoresc.* **16**: 119-139.
93. Gordon, J.A. and Hen, R. 2004. The serotonergic system and anxiety. *Neuromolecular. Med.* **5**: 27-40.
94. Goswami, C., Rademacher, N., Smalla, K.H., Kalscheuer, V., Ropers, H.H., Gundelfinger, E.D., and Hucho, T. 2010. TRPV1 acts as a synaptic protein and regulates vesicle recycling. *J. Cell Sci.* **123**: 2045-2057.
95. Gould, T.D., O'Donnell, K.C., Dow, E.R., Du, J., Chen, G., and Manji, H.K. 2008. Involvement of AMPA receptors in the antidepressant-like effects of lithium in the mouse tail suspension test and forced swim test. *Neuropharmacology* **54**: 577-587.
96. Gracy, K.N. and Pickel, V.M. 1995. Comparative ultrastructural localization of the NMDAR1 glutamate receptor in the rat basolateral amygdala and bed nucleus of the stria terminalis. *J. Comp Neurol.* **362**: 71-85.
97. Graeff, F.G., Viana, M.B., and Mora, P.O. 1997. Dual role of 5-HT in defense and anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **21**: 791-799.
98. Gray, C.M., Maldonado, P.E., Wilson, M., and McNaughton, B. 1995. Tetrodes markedly improve the reliability and yield of multiple single-unit isolation from multi-unit recordings in cat striate cortex. *J. Neurosci. Methods* **63**: 43-54.
99. Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* **391**: 85-100.
100. Hariri, A.R., Mattay, V.S., Tessitore, A., Kolachana, B., Fera, F., Goldman, D., Egan, M.F., and Weinberger, D.R. 2002. Serotonin transporter genetic variation and the response of the human amygdala. *Science* **297**: 400-403.
101. Harris, L.T. and Fiske, S.T. 2006. Dehumanizing the lowest of the low: neuroimaging responses to extreme out-groups. *Psychol. Sci.* **17**: 847-853.
102. Harrison, N. and Nau, C. 2008. Sensitization of nociceptive ion channels by inhaled anesthetics--a pain in the gas? *Mol. Pharmacol.* **74**: 1180-1182.
103. Hayashi, Y., Shi, S.H., Esteban, J.A., Piccini, A., Poncer, J.C., and Malinow, R. 2000. Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* **287**: 2262-2267.
104. Heiduschka, P. and Thanos, S. 1998. NO production during neuronal cell death can be directly assessed by a chemical reaction in vivo. *Neuroreport* **9**: 4051-4057.

105. Henzen, C. 2003. Therapie mit Glukokortikoiden: Risiken und Nebenwirkungen. *Schweiz Med Forum* **19**: 442-446.
106. Hevner, R.F. 2006. From radial glia to pyramidal-projection neuron: transcription factor cascades in cerebral cortex development. *Mol. Neurobiol.* **33**: 33-50.
107. Hickie, I.B., Naismith, S.L., Ward, P.B., Scott, E.M., Mitchell, P.B., Schofield, P.R., Scimone, A., Wilhelm, K., and Parker, G. 2007. Serotonin transporter gene status predicts caudate nucleus but not amygdala or hippocampal volumes in older persons with major depression. *J. Affect. Disord.* **98**: 137-142.
108. Hill, M.N., McLaughlin, R.J., Morrish, A.C., Viau, V., Floresco, S.B., Hillard, C.J., and Gorzalka, B.B. 2009. Suppression of amygdalar endocannabinoid signaling by stress contributes to activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuropsychopharmacology* **34**: 2733-2745.
109. Hong, S., Fan, J., Kemmerer, E.S., Evans, S., Li, Y., and Wiley, J.W. 2009. Reciprocal changes in vanilloid (TRPV1) and endocannabinoid (CB1) receptors contribute to visceral hyperalgesia in the water avoidance stressed rat. *Gut* **58**: 202-210.
110. Hong, S., Zheng, G., Wu, X., Snider, N.T., Owyang, C., and Wiley, J.W. 2011. Corticosterone mediates reciprocal changes in CB 1 and TRPV1 receptors in primary sensory neurons in the chronically stressed rat. *Gastroenterology* **140**: 627-637.
111. Hoyer, D., Clarke, D.E., Fozard, J.R., Hartig, P.R., Martin, G.R., Mylecharane, E.J., Saxena, P.R., and Humphrey, P.P. 1994. International Union of Pharmacology Classification of Receptors for 5-Hydroxytryptamin (Serotonin). *Pharmacological Reviews* **46**: 157-203.
112. Huang, Y.Y. and Kandel, E.R. 1998. Postsynaptic induction and PKA-dependent expression of LTP in the lateral amygdala. *Neuron* **21**: 169-178.
113. Huang, Y.Y. and Kandel, E.R. 2007. 5-Hydroxytryptamine induces a protein kinase A/mitogen-activated protein kinase-mediated and macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation in the amygdala. *J. Neurosci.* **27**: 3111-3119.
114. Huang, Y.Y., Martin, K.C., and Kandel, E.R. 2000. Both protein kinase A and mitogen-activated protein kinase are required in the amygdala for the macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation. *J. Neurosci.* **20**: 6317-6325.
115. Hudetz, A.G. 2012. General anesthesia and human brain connectivity. *Brain Connect.* **2**: 291-302.
116. Humeau, Y., Reisel, D., Johnson, A.W., Borchardt, T., Jensen, V., Gebhardt, C., Bosch, V., Gass, P., Bannerman, D.M., Good, M.A., Hvalby, O., Sprengel, R., and Luthi, A. 2007. A pathway-specific function for different AMPA receptor subunits in amygdala long-term potentiation and fear conditioning. *J. Neurosci.* **27**: 10947-10956.

117. Humeau, Y., Shaban, H., Bissiere, S., and Luthi, A. 2003. Presynaptic induction of heterosynaptic associative plasticity in the mammalian brain. *Nature* **426**: 841-845.
118. Hurd, Y.L., McGregor, A., and Ponten, M. 1997. In vivo amygdala dopamine levels modulate cocaine self-administration behaviour in the rat: D1 dopamine receptor involvement. *Eur. J. Neurosci.* **9**: 2541-2548.
119. Istaphanous, G.K., Ward, C.G., Nan, X., Hughes, E.A., McCann, J.C., McAuliffe, J.J., Danzer, S.C., and Loepke, A.W. 2013. Characterization and quantification of isoflurane-induced developmental apoptotic cell death in mouse cerebral cortex. *Anesth. Analg.* **116**: 845-854.
120. Jackson, M.B. and Yakel, J.L. 1995. The 5-HT₃ receptor channel. *Annu. Rev. Physiol* **57**: 447-468.
121. Jiang, X., Xing, G., Yang, C., Verma, A., Zhang, L., and Li, H. 2009. Stress impairs 5-HT_{2A} receptor-mediated serotonergic facilitation of GABA release in juvenile rat basolateral amygdala. *Neuropsychopharmacology* **34**: 410-423.
122. John, E.R. and Prichep, L.S. 2005. The anesthetic cascade: a theory of how anesthesia suppresses consciousness. *Anesthesiology* **102**: 447-471.
123. Joksovic, P.M., Weiergraber, M., Lee, W., Struck, H., Schneider, T., and Todorovic, S.M. 2009. Isoflurane-sensitive presynaptic R-type calcium channels contribute to inhibitory synaptic transmission in the rat thalamus. *J. Neurosci.* **29**: 1434-1445.
124. Kaiser, T.F. and Peters, F.J. 2008. Synaptic Plasticity: New Research. In . Nova Science Publishers, Inc.
125. Kalipatnapu, S., Pucadyil, T.J., Harikumar, K.G., and Chattopadhyay, A. 2004. Ligand binding characteristics of the human serotonin_{1A} receptor heterologously expressed in CHO cells. *Biosci. Rep.* **24**: 101-115.
126. Kalivas, G. and Petralia, S.F. 2012. Short-Term Memory: New Research. In . Nova Science Publishers, Inc.
127. Kamal, A.M. and Tombol, T. 1975. Golgi studies on the amygdaloid nuclei of the cat. *J. Hirnforsch.* **16**: 175-201.
128. Kandel, E.R. 1997. Genes, synapses, and long-term memory. *J. Cell Physiol* **173**: 124-125.
129. Karolewicz, B., Paul, I.A., and Antkiewicz-Michaluk, L. 2001. Effect of NOS inhibitor on forced swim test and neurotransmitters turnover in the mouse brain. *Pol. J. Pharmacol.* **53**: 587-596.
130. Kavushansky, A. and Richter-Levin, G. 2006. Effects of stress and corticosterone on activity and plasticity in the amygdala. *J. Neurosci. Res.* **84**: 1580-1587.

131. Kavushansky, A., Vouimba, R.M., Cohen, H., and Richter-Levin, G. 2006. Activity and plasticity in the CA1, the dentate gyrus, and the amygdala following controllable vs. uncontrollable water stress. *Hippocampus* **16**: 35-42.
132. Keller, J., Shen, L., Gomez, R.G., Garrett, A., Solvason, H.B., Reiss, A., and Schatzberg, A.F. 2008. Hippocampal and amygdalar volumes in psychotic and nonpsychotic unipolar depression. *Am. J. Psychiatry* **165**: 872-880.
133. Kellner, M. 2010. Drug treatment of obsessive-compulsive disorder. *Dialogues. Clin. Neurosci.* **12**: 187-197.
134. Knight, A.R., Misra, A., Quirk, K., Benwell, K., Revell, D., Kennett, G., and Bickerdike, M. 2004. Pharmacological characterisation of the agonist radioligand binding site of 5-HT(2A), 5-HT(2B) and 5-HT(2C) receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **370**: 114-123.
135. Kondo, S., Kondo, H., Nakane, S., Kodaka, T., Tokumura, A., Waku, K., and Sugiura, T. 1998. 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor agonist: identification as one of the major species of monoacylglycerols in various rat tissues, and evidence for its generation through CA2+-dependent and -independent mechanisms. *FEBS Lett.* **429**: 152-156.
136. Korz, V. and Frey, J.U. 2003. Stress-related modulation of hippocampal long-term potentiation in rats: Involvement of adrenal steroid receptors. *J. Neurosci.* **23**: 7281-7287.
137. Kovacs, R., Rabanus, A., Otahal, J., Patzak, A., Kardos, J., Albus, K., Heinemann, U., and Kann, O. 2009. Endogenous nitric oxide is a key promoting factor for initiation of seizure-like events in hippocampal and entorhinal cortex slices. *J. Neurosci.* **29**: 8565-8577.
138. Koyama, S., Matsumoto, N., Murakami, N., Kubo, C., Nabekura, J., and Akaike, N. 2002. Role of presynaptic 5-HT1A and 5-HT3 receptors in modulation of synaptic GABA transmission in dissociated rat basolateral amygdala neurons. *Life Sci.* **72**: 375-387.
139. Kronenberg, G., Tebartz van, E.L., Regen, F., Deuschle, M., Heuser, I., and Colla, M. 2009. Reduced amygdala volume in newly admitted psychiatric in-patients with unipolar major depression. *J. Psychiatr. Res.* **43**: 1112-1117.
140. Krug, M., Lossner, B., and Ott, T. 1984. Anisomycin blocks the late phase of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Brain Res. Bull.* **13**: 39-42.
141. Kulisch, C. and Albrecht, D. 2013. Effects of single swim stress on changes in TRPV1-mediated plasticity in the amygdala. *Behav. Brain Res.* **236**: 344-349.
142. Kulisch, C., Eckers, N., and Albrecht, D. 2011. Method of euthanasia affects amygdala plasticity in horizontal brain slices from mice. *J. Neurosci. Methods* **201**: 340-345.

143. Labrecque, J., Fargin, A., Bouvier, M., Chidiac, P., and Dennis, M. 1995. Serotonergic antagonists differentially inhibit spontaneous activity and decrease ligand binding capacity of the rat 5-hydroxytryptamine type 2C receptor in Sf9 cells. *Mol. Pharmacol.* **48**: 150-159.
144. LeDoux, J. 2007. The amygdala. *Curr. Biol.* **17**: R868-R874.
145. LeDoux, J.E. 2000. Emotion circuits in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* **23**: 155-184.
146. Lee, H.K., Takamiya, K., Han, J.S., Man, H., Kim, C.H., Rumbaugh, G., Yu, S., Ding, L., He, C., Petralia, R.S., Wenthold, R.J., Gallagher, M., and Huganir, R.L. 2003. Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. *Cell* **112**: 631-643.
147. Legatt, A.D., Arezzo, J., and Vaughan, H.G., Jr. 1980. Averaged multiple unit activity as an estimate of phasic changes in local neuronal activity: effects of volume-conducted potentials. *J. Neurosci. Methods* **2**: 203-217.
148. Li, D.P., Chen, S.R., and Pan, H.L. 2004. VR1 receptor activation induces glutamate release and postsynaptic firing in the paraventricular nucleus. *J. Neurophysiol.* **92**: 1807-1816.
149. Li, H.B., Mao, R.R., Zhang, J.C., Yang, Y., Cao, J., and Xu, L. 2008. Antistress effect of TRPV1 channel on synaptic plasticity and spatial memory. *Biol. Psychiatry* **64**: 286-292.
150. Lin, C.H., Yeh, S.H., Lin, C.H., Lu, K.T., Leu, T.H., Chang, W.C., and Gean, P.W. 2001. A role for the PI-3 kinase signaling pathway in fear conditioning and synaptic plasticity in the amygdala. *Neuron* **31**: 841-851.
151. Liston, C., Cichon, J.M., Jeanneteau, F., Jia, Z., Chao, M.V., and Gan, W.B. 2013. Circadian glucocorticoid oscillations promote learning-dependent synapse formation and maintenance. *Nat. Neurosci.* **16**: 698-705.
152. Loyd, D.R., Weiss, G., Henry, M.A., and Hargreaves, K.M. 2011. Serotonin increases the functional activity of capsaicin-sensitive rat trigeminal nociceptors via peripheral serotonin receptors. *Pain* **152**: 2267-2276.
153. Lupien, S.J., Maheu, F., Tu, M., Fiocco, A., and Schramek, T.E. 2007. The effects of stress and stress hormones on human cognition: Implications for the field of brain and cognition. *Brain Cogn* **65**: 209-237.
154. Ma, Q.P., Yin, G.F., Ai, M.K., and Han, J.S. 1991. Serotonergic projections from the nucleus raphe dorsalis to the amygdala in the rat. *Neurosci. Lett.* **134**: 21-24.
155. Maeda, T., Kaneko, S., and Satoh, M. 1994. Inhibitory influence via 5-HT₃ receptors on the induction of LTP in mossy fiber-CA3 system of guinea-pig hippocampal slices. *Neurosci. Res.* **18**: 277-282.

156. Mahanty, N.K. and Sah, P. 1999. Excitatory synaptic inputs to pyramidal neurons of the lateral amygdala. *Eur. J. Neurosci.* **11**: 1217-1222.
157. Malenka, R.C. and Bear, M.F. 2004. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* **44**: 5-21.
158. Malenka, R.C., Kauer, J.A., Zucker, R.S., and Nicoll, R.A. 1988. Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission. *Science* **242**: 81-84.
159. Mann, J.J. 1999. Role of the serotonergic system in the pathogenesis of major depression and suicidal behavior. *Neuropsychopharmacology* **21**: 99S-105S.
160. Manning, B.H. 1998. A lateralized deficit in morphine antinociception after unilateral inactivation of the central amygdala. *J. Neurosci.* **18**: 9453-9470.
161. Manning, B.H., Martin, W.J., and Meng, I.D. 2003. The rodent amygdala contributes to the production of cannabinoid-induced antinociception. *Neuroscience* **120**: 1157-1170.
162. Manning, B.H. and Mayer, D.J. 1995a. The central nucleus of the amygdala contributes to the production of morphine antinociception in the formalin test. *Pain* **63**: 141-152.
163. Manning, B.H. and Mayer, D.J. 1995b. The central nucleus of the amygdala contributes to the production of morphine antinociception in the rat tail-flick test. *J. Neurosci.* **15**: 8199-8213.
164. Maren, S. 1999. Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory. *Trends Neurosci.* **22**: 561-567.
165. Maricq, A.V., Peterson, A.S., Brake, A.J., Myers, R.M., and Julius, D. 1991. Primary structure and functional expression of the 5HT₃ receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science* **254**: 432-437.
166. Marinelli, S., Di, M., V, Berretta, N., Matias, I., Maccarrone, M., Bernardi, G., and Mercuri, N.B. 2003. Presynaptic facilitation of glutamatergic synapses to dopaminergic neurons of the rat substantia nigra by endogenous stimulation of vanilloid receptors. *J. Neurosci.* **23**: 3136-3144.
167. Marletta, M.A. 1993. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* **268**: 12231-12234.
168. Maron, E. and Shlik, J. 2006. Serotonin function in panic disorder: important, but why? *Neuropsychopharmacology* **31**: 1-11.
169. Marona-Lewicka, D. and Nichols, D.E. 2009. WAY 100635 produces discriminative stimulus effects in rats mediated by dopamine D(4) receptor activation. *Behav. Pharmacol.* **20**: 114-118.
170. Marsch, R., Foeller, E., Rammes, G., Bunck, M., Kossel, M., Holsboer, F., Ziegler, W., Landgraf, R., Lutz, B., and Wotjak, C.T. 2007.

- Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. *J. Neurosci.* **27**: 832-839.
171. Martel, J.C., Leduc, N., Ormiere, A.M., Faucillon, V., Danty, N., Culie, C., Cussac, D., and Newman-Tancredi, A. 2007. WAY-100635 has high selectivity for serotonin 5-HT(1A) versus dopamine D(4) receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **574**: 15-19.
172. Martin, G.R. and Humphrey, P.P. 1994. Receptors for 5-hydroxytryptamine: current perspectives on classification and nomenclature. *Neuropharmacology* **33**: 261-273.
173. Martina, M. and Bergeron, R. 2008. D1 and D4 dopaminergic receptor interplay mediates coincident G protein-independent and dependent regulation of glutamate NMDA receptors in the lateral amygdala. *J. Neurochem.* **106**: 2421-2435.
174. Mascagni, F. and McDonald, A.J. 2007. A novel subpopulation of 5-HT type 3A receptor subunit immunoreactive interneurons in the rat basolateral amygdala. *Neuroscience* **144**: 1015-1024.
175. Matta, J.A. and Ahern, G.P. 2011. TRPV1 and synaptic transmission. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **12**: 95-101.
176. Matta, J.A., Cornett, P.M., Miyares, R.L., Abe, K., Sahibzada, N., and Ahern, G.P. 2008. General anesthetics activate a nociceptive ion channel to enhance pain and inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**: 8784-8789.
177. Matta, J.A., Miyares, R.L., and Ahern, G.P. 2007. TRPV1 is a novel target for omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Physiol* **578**: 397-411.
178. May, J.A., Chen, H.H., Rusinko, A., Lynch, V.M., Sharif, N.A., and McLaughlin, M.A. 2003. A novel and selective 5-HT2 receptor agonist with ocular hypotensive activity: (S)-(+)-1-(2-aminopropyl)-8,9-dihydropyrano[3,2-e]indole. *J. Med. Chem.* **46**: 4188-4195.
179. Mayer, M.L., Westbrook, G.L., and Guthrie, P.B. 1984. Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* **309**: 261-263.
180. McDonald, A.J. 1992. Projection neurons of the basolateral amygdala: a correlative Golgi and retrograde tract tracing study. *Brain Res. Bull.* **28**: 179-185.
181. McEwen, B.S. 1998. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **840**: 33-44.
182. McGaugh, J.L. 2002. Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. *Trends Neurosci.* **25**: 456.

183. McGaugh, J.L., McIntyre, C.K., and Power, A.E. 2002. Amygdala modulation of memory consolidation: interaction with other brain systems. *Neurobiol. Learn. Mem.* **78**: 539-552.
184. McGaugh, J.L. and Roozendaal, B. 2002. Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* **12**: 205-210.
185. McKernan, M.G. and Shinnick-Gallagher, P. 1997. Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro. *Nature* **390**: 607-611.
186. Meagher, M.W., Arnau, R.C., and Rhudy, J.L. 2001. Pain and emotion: effects of affective picture modulation. *Psychosom. Med.* **63**: 79-90.
187. Merot, Y., Retaux, S., and Heng, J.I. 2009. Molecular mechanisms of projection neuron production and maturation in the developing cerebral cortex. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**: 726-734.
188. Mezey, E., Toth, Z.E., Cortright, D.N., Arzubi, M.K., Krause, J.E., Elde, R., Guo, A., Blumberg, P.M., and Szallasi, A. 2000. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**: 3655-3660.
189. Micale, V., Cristino, L., Tamburella, A., Petrosino, S., Leggio, G.M., Drago, F., and Di, M., V. 2009. Anxiolytic effects in mice of a dual blocker of fatty acid amide hydrolase and transient receptor potential vanilloid type-1 channels. *Neuropsychopharmacology* **34**: 593-606.
190. Milad, M.R. and Rauch, S.L. 2007. The role of the orbitofrontal cortex in anxiety disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1121**: 546-561.
191. Morales, M., Battenberg, E., de, L.L., and Bloom, F.E. 1996. The type 3 serotonin receptor is expressed in a subpopulation of GABAergic neurons in the rat neocortex and hippocampus. *Brain Res.* **731**: 199-202.
192. Morales, M. and Bloom, F.E. 1997. The 5-HT₃ receptor is present in different subpopulations of GABAergic neurons in the rat telencephalon. *J. Neurosci.* **17**: 3157-3167.
193. Muller, J., Corodimas, K.P., Fridel, Z., and LeDoux, J.E. 1997. Functional inactivation of the lateral and basal nuclei of the amygdala by muscimol infusion prevents fear conditioning to an explicit conditioned stimulus and to contextual stimuli. *Behav. Neurosci.* **111**: 683-691.
194. Müller, T., Albrecht, D., and Gebhardt, C. 2009. Both NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor are critical for long-term potentiation and long-term depression in the lateral amygdala of horizontal slices of adult mice. *Learn. Mem.* **16**: 395-405.
195. Neher, E. and Sakmann, B. 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**: 799-802.

196. Neher, E., Sakmann, B., and Steinbach, J.H. 1978. The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflugers Arch.* **375**: 219-228.
197. Newman-Tancredi, A., Gavaudan, S., Conte, C., Chaput, C., Touzard, M., Verrielle, L., Audinot, V., and Millan, M.J. 1998a. Agonist and antagonist actions of antipsychotic agents at 5-HT_{1A} receptors: a [³⁵S]GTPgammaS binding study. *Eur. J. Pharmacol.* **355**: 245-256.
198. Newman-Tancredi, A., Verrielle, L., Chaput, C., and Millan, M.J. 1998b. Labelling of recombinant human and native rat serotonin 5-HT_{1A} receptors by a novel, selective radioligand, [³H]-S 15535: definition of its binding profile using agonists, antagonists and inverse agonists. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **357**: 205-217.
199. Nicoll, R.A., Malenka, R.C., and Kauer, J.A. 1990. Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system. *Physiol Rev.* **70**: 513-565.
200. Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., and Prochiantz, A. 1984. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* **307**: 462-465.
201. O'Leary, D.D. and Koester, S.E. 1993. Development of projection neuron types, axon pathways, and patterned connections of the mammalian cortex. *Neuron* **10**: 991-1006.
202. Okere, C.O., Kaba, H., and Higuchi, T. 2000. Importance of endogenous nitric oxide synthase in the rat hypothalamus and amygdala in mediating the response to capsaicin. *J. Comp Neurol.* **423**: 670-686.
203. Pape, H.C. and Pare, D. 2010. Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. *Physiol Rev.* **90**: 419-463.
204. Parker, R.M., Barnes, J.M., Ge, J., Barber, P.C., and Barnes, N.M. 1996. Autoradiographic distribution of [³H]-(S)-zacopride-labelled 5-HT₃ receptors in human brain. *J. Neurol. Sci.* **144**: 119-127.
205. Passani, M.B., Pugliese, A.M., Azzurrini, M., and Corradetti, R. 1994. Effects of DAU 6215, a novel 5-hydroxytryptamine₃ (5-HT₃) antagonist on electrophysiological properties of the rat hippocampus. *Br. J. Pharmacol.* **112**: 695-703.
206. Patel, S., Roelke, C.T., Rademacher, D.J., Cullinan, W.E., and Hillard, C.J. 2004. Endocannabinoid signaling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* **145**: 5431-5438.
207. Peters, J.A., Malone, H.M., and Lambert, J.J. 1993. An electrophysiological investigation of the properties of 5-HT₃ receptors of rabbit nodose ganglion neurones in culture. *Br. J. Pharmacol.* **110**: 665-676.

208. Peters, J.H., McDougall, S.J., Mendelowitz, D., Koop, D.R., and Andresen, M.C. 2008. Isoflurane differentially modulates inhibitory and excitatory synaptic transmission to the solitary tract nucleus. *Anesthesiology* **108**: 675-683.
209. Pfeifer, J.H., Iacoboni, M., Mazziotta, J.C., and Dapretto, M. 2008. Mirroring others' emotions relates to empathy and interpersonal competence in children. *Neuroimage*. **39**: 2076-2085.
210. Pikkarainen, M., Ronkko, S., Savander, V., Insausti, R., and Pitkanen, A. 1999. Projections from the lateral, basal, and accessory basal nuclei of the amygdala to the hippocampal formation in rat. *J. Comp Neurol.* **403**: 229-260.
211. Piotrowska, A., Mlyniec, K., Siwek, A., Dybala, M., Opoka, W., Poleszak, E., and Nowak, G. 2008. Antidepressant-like effect of chromium chloride in the mouse forced swim test: involvement of glutamatergic and serotonergic receptors. *Pharmacol. Rep.* **60**: 991-995.
212. Pitkanen, A. 2000. Connectivity of the rat amygdaloid complex. In *The Amygdala - A functional Analysis* (ed. John P. Aggleton), pp. 31-116. Oxford University Press.
213. Pitkanen, A., Pikkarainen, M., Nurminen, N., and Ylinen, A. 2000. Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **911**: 369-391.
214. Pitkanen, A., Savander, V., and LeDoux, J.E. 1997. Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci.* **20**: 517-523.
215. Pollandt, S., Drephal, C., and Albrecht, D. 2003. 8-OH-DPAT suppresses the induction of LTP in brain slices of the rat lateral amygdala. *Neuroreport* **14**: 895-897.
216. Porsolt, R.D., Bertin, A., and Jalfre, M. 1977a. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **229**: 327-336.
217. Porsolt, R.D., Le, P.M., and Jalfre, M. 1977b. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* **266**: 730-732.
218. Porter, R.H., Benwell, K.R., Lamb, H., Malcolm, C.S., Allen, N.H., Revell, D.F., Adams, D.R., and Sheardown, M.J. 1999. Functional characterization of agonists at recombinant human 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptors in CHO-K1 cells. *Br. J. Pharmacol.* **128**: 13-20.
219. Prast, H. and Philippu, A. 2001. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog. Neurobiol.* **64**: 51-68.
220. Rainnie, D.G. 1999. Serotonergic modulation of neurotransmission in the rat basolateral amygdala. *J. Neurophysiol.* **82**: 69-85.

221. Ranft, A., Kurz, J., Deuringer, M., Haseneder, R., Dodt, H.U., Zieglgansberger, W., Kochs, E., Eder, M., and Hapfelmeier, G. 2004. Isoflurane modulates glutamatergic and GABAergic neurotransmission in the amygdala. *Eur. J. Neurosci.* **20**: 1276-1280.
222. Ris, L., Villers, A., and Godaux, E. 2009. Synaptic capture-mediated long-lasting long-term potentiation is strongly dependent on mRNA translation. *Neuroreport* **20**: 1572-1576.
223. Roberts, A.C., Reekie, Y., and Braesicke, K. 2007. Synergistic and regulatory effects of orbitofrontal cortex on amygdala-dependent appetitive behavior. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1121**: 297-319.
224. Roesler, R., Roozendaal, B., and McGaugh, J.L. 2002. Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of 8-Br-cAMP infused into the entorhinal cortex of rats after training. *Eur. J. Neurosci.* **15**: 905-910.
225. Rollema, H., Guanowsky, V., Mineur, Y.S., Shrikhande, A., Coe, J.W., Seymour, P.A., and Picciotto, M.R. 2009. Varenicline has antidepressant-like activity in the forced swim test and augments sertraline's effect. *Eur. J. Pharmacol.* **605**: 114-116.
226. Ronesi, J., Gerdeman, G.L., and Lovinger, D.M. 2004. Disruption of endocannabinoid release and striatal long-term depression by postsynaptic blockade of endocannabinoid membrane transport. *J. Neurosci.* **24**: 1673-1679.
227. Roozendaal, B., McEwen, B.S., and Chattarji, S. 2009. Stress, memory and the amygdala. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**: 423-433.
228. Roozendaal, B., Portillo-Marquez, G., and McGaugh, J.L. 1996. Basolateral amygdala lesions block glucocorticoid-induced modulation of memory for spatial learning. *Behav. Neurosci.* **110**: 1074-1083.
229. Rosenkranz, J.A., Venheim, E.R., and Padival, M. 2010. Chronic stress causes amygdala hyperexcitability in rodents. *Biol. Psychiatry* **67**: 1128-1136.
230. Ross, R.A. 2003. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br. J. Pharmacol.* **140**: 790-801.
231. Roth, B.L., Willins, D.L., Kristiansen, K., and Kroeze, W.K. 1998. 5-Hydroxytryptamine₂-family receptors (5-hydroxytryptamine_{2A}, 5-hydroxytryptamine_{2B}, 5-hydroxytryptamine_{2C}): where structure meets function. *Pharmacol. Ther.* **79**: 231-257.
232. Rueter, L.E. and Jacobs, B.L. 1996. A microdialysis examination of serotonin release in the rat forebrain induced by behavioral/environmental manipulations. *Brain Res.* **739**: 57-69.
233. Ruhe, H.G., Huyser, J., Swinkels, J.A., and Schene, A.H. 2006. Switching antidepressants after a first selective serotonin reuptake inhibitor in major depressive disorder: a systematic review. *J. Clin. Psychiatry* **67**: 1836-1855.

234. Sanders-Bush, E. 1990. Adaptive regulation of central serotonin receptors linked to phosphoinositide hydrolysis. *Neuropsychopharmacology* **3**: 411-416.
235. Schafe, G.E., Bauer, E.P., Rosis, S., Farb, C.R., Rodrigues, S.M., and LeDoux, J.E. 2005. Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning requires nitric oxide signaling in the lateral amygdala. *Eur. J. Neurosci.* **22**: 201-211.
236. Schlicker, E. and Kathmann, M. 2001. Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**: 565-572.
237. Schmolck, H., Mosnik, D., and Schulz, P. 2007. Rating the approachability of faces in ALS. *Neurology* **69**: 2232-2235.
238. Schneider, G. and Kochs, E.F. 2007. The search for structures and mechanisms controlling anesthesia-induced unconsciousness. *Anesthesiology* **107**: 195-198.
239. Schroeder, B.W. and Shinnick-Gallagher, P. 2004. Fear memories induce a switch in stimulus response and signaling mechanisms for long-term potentiation in the lateral amygdala. *Eur. J. Neurosci.* **20**: 549-556.
240. Schubert, M. and Albrecht, D. 2008. Activation of kainate GLU(K5) transmission rescues kindling-induced impairment of LTP in the rat lateral amygdala. *Neuropsychopharmacology* **33**: 2524-2535.
241. Schubert, M., Siegmund, H., Pape, H.C., and Albrecht, D. 2005. Kindling-induced changes in plasticity of the rat amygdala and hippocampus. *Learn. Mem.* **12**: 520-526.
242. Schuchmann, S., Albrecht, D., Heinemann, U., and von Bohlen und Halbach, O. 2002. Nitric oxide modulates low-Mg²⁺-induced epileptiform activity in rat hippocampal-entorhinal cortex slices. *Neurobiol. Dis.* **11**: 96-105.
243. Scott, S.K., Young, A.W., Calder, A.J., Hellawell, D.J., Aggleton, J.P., and Johnson, M. 1997. Impaired auditory recognition of fear and anger following bilateral amygdala lesions. *Nature* **385**: 254-257.
244. Sheline, Y.I., Gado, M.H., and Price, J.L. 1998. Amygdala core nuclei volumes are decreased in recurrent major depression. *Neuroreport* **9**: 2023-2028.
245. Shen, Y., Heimel, J.A., Kamermans, M., Peachey, N.S., Gregg, R.G., and Nawy, S. 2009. A transient receptor potential potential-like channel mediates synaptic transmission in rod bipolar cells. *J. Neurosci.* **29**: 6088-6093.
246. Shors, T.J., Seib, T.B., Levine, S., and Thompson, R.F. 1989. Inescapable versus escapable shock modulates long-term potentiation in the rat hippocampus. *Science* **244**: 224-226.
247. Simon, W., Hapfelmeier, G., Kochs, E., Zieglgansberger, W., and Rammes, G. 2001. Isoflurane blocks synaptic plasticity in the mouse hippocampus. *Anesthesiology* **94**: 1058-1065.

248. Smart, D., Gunthorpe, M.J., Jerman, J.C., Nasir, S., Gray, J., Muir, A.I., Chambers, J.K., Randall, A.D., and Davis, J.B. 2000. The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br. J. Pharmacol.* **129**: 227-230.
249. Soderling, T.R. and Derkach, V.A. 2000. Postsynaptic protein phosphorylation and LTP. *Trends Neurosci.* **23**: 75-80.
250. Soholm, H. and Olsen, N.V. 2013. Volatile anaesthetics' molecular biological course of action. *Ugeskr. Laeger* **175**: 123-127.
251. Song, I. and Huganir, R.L. 2002. Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* **25**: 578-588.
252. Starowicz, K., Cristino, L., and Di, M., V. 2008. TRPV1 receptors in the central nervous system: potential for previously unforeseen therapeutic applications. *Curr. Pharm. Des* **14**: 42-54.
253. Staschewski, J., Kulisch, C., and Albrecht, D. 2011. Different isoforms of nitric oxide synthase are involved in angiotensin-(1-7)-mediated plasticity changes in the amygdala in a gender-dependent manner. *Neuroendocrinology* **94**: 191-199.
254. Staubli, U. and Xu, F.B. 1995. Effects of 5-HT₃ receptor antagonism on hippocampal theta rhythm, memory, and LTP induction in the freely moving rat. *J. Neurosci.* **15**: 2445-2452.
255. Stein, C., Davidowa, H., and Albrecht, D. 2000. 5-HT_{1A} receptor-mediated inhibition and 5-HT₂ as well as 5-HT₃ receptor-mediated excitation in different subdivisions of the rat amygdala. *Synapse* **38**: 328-337.
256. Stevens, C.F. 1992. Just say NO. *Curr. Biol.* **2**: 108-109.
257. Stevens, C.F. 1993. Quantal release of neurotransmitter and long-term potentiation. *Cell* **72 Suppl**: 55-63.
258. Steward, L.J., West, K.E., Kilpatrick, G.J., and Barnes, N.M. 1993. Labelling of 5-HT₃ receptor recognition sites in the rat brain using the agonist radioligand [³H]meta-chlorophenylbiguanide. *Eur. J. Pharmacol.* **243**: 13-18.
259. Stutzmann, G.E., McEwen, B.S., and LeDoux, J.E. 1998. Serotonin modulation of sensory inputs to the lateral amygdala: dependency on corticosterone. *J. Neurosci.* **18**: 9529-9538.
260. Sugiura, T., Kodaka, T., Nakane, S., Miyashita, T., Kondo, S., Suhara, Y., Takayama, H., Waku, K., Seki, C., Baba, N., and Ishima, Y. 1999. Evidence that the cannabinoid CB₁ receptor is a 2-arachidonoylglycerol receptor. Structure-activity relationship of 2-arachidonoylglycerol, ether-linked analogues, and related compounds. *J. Biol. Chem.* **274**: 2794-2801.
261. Szallasi, A. and Blumberg, P.M. 1996. Vanilloid receptors: new insights enhance potential as a therapeutic target. *Pain* **68**: 195-208.

262. Taha, E., Gildish, I., Gal-Ben-Ari, S., and Rosenblum, K. 2013. The role of eEF2 pathway in learning and synaptic plasticity. *Neurobiol. Learn. Mem.*
263. Talmi, D., Seymour, B., Dayan, P., and Dolan, R.J. 2008. Human pavlovian-instrumental transfer. *J. Neurosci.* **28**: 360-368.
264. Tecott, L.H., Maricq, A.V., and Julius, D. 1993. Nervous system distribution of the serotonin 5-HT₃ receptor mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**: 1430-1434.
265. Toth, A., Boczan, J., Kedei, N., Lizanecz, E., Bagi, Z., Papp, Z., Edes, I., Csiba, L., and Blumberg, P.M. 2005. Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **135**: 162-168.
266. Trevisani, M., Smart, D., Gunthorpe, M.J., Tognetto, M., Barbieri, M., Campi, B., Amadesi, S., Gray, J., Jerman, J.C., Brough, S.J., Owen, D., Smith, G.D., Randall, A.D., Harrison, S., Bianchi, A., Davis, J.B., and Geppetti, P. 2002. Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1. *Nat. Neurosci.* **5**: 546-551.
267. Tsoory, M.M., Vouimba, R.M., Akirav, I., Kavushansky, A., Avital, A., and Richter-Levin, G. 2008. Amygdala modulation of memory-related processes in the hippocampus: potential relevance to PTSD. *Prog. Brain Res.* **167**: 35-51.
268. Tsvetkov, E., Carlezon, W.A., Benes, F.M., Kandel, E.R., and Bolshakov, V.Y. 2002. Fear conditioning occludes LTP-induced presynaptic enhancement of synaptic transmission in the cortical pathway to the lateral amygdala. *Neuron* **34**: 289-300.
269. Vertes, R.P. 1991. A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J. Comp Neurol.* **313**: 643-668.
270. von Bohlen und Halbach, O. 2003. Nitric oxide imaging in living neuronal tissues using fluorescent probes. *Nitric. Oxide.* **9**: 217-228.
271. von Bohlen und Halbach, O. and Albrecht, D. 1998. Tracing of axonal connectivities in a combined slice preparation of rat brains--a study by rhodamine-dextran-amine-application in the lateral nucleus of the amygdala. *J. Neurosci. Methods* **81**: 169-175.
272. von Bohlen und Halbach, O. and Albrecht, D. 2002. Reciprocal connections of the hippocampal area CA1, the lateral nucleus of the amygdala and cortical areas in a combined horizontal slice preparation. *Neurosci. Res.* **44**: 91-100.
273. Vouimba, R.M., Yaniv, D., Diamond, D., and Richter-Levin, G. 2004. Effects of inescapable stress on LTP in the amygdala versus the dentate gyrus of freely behaving rats. *Eur. J. Neurosci.* **19**: 1887-1894.
274. Werka, T. 1997. The effects of the medial and cortical amygdala lesions on post-stress analgesia in rats. *Behav. Brain Res.* **86**: 59-65.

275. Westphalen, R.I. and Hemmings, H.C., Jr. 2006. Volatile anesthetic effects on glutamate versus GABA release from isolated rat cortical nerve terminals: basal release. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **316**: 208-215.
276. Wood, J. and Garthwaite, J. 1994. Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties. *Neuropharmacology* **33**: 1235-1244.
277. Yang, K., Kumamoto, E., Furue, H., and Yoshimura, M. 1998. Capsaicin facilitates excitatory but not inhibitory synaptic transmission in substantia gelatinosa of the rat spinal cord. *Neurosci. Lett.* **255**: 135-138.
278. Yilmazer-Hanke, D.M. 2011. Amygdala. In *The Human Nervous System* (eds. Jürgen K.Mai and George Paxinos), pp. 759-834.
279. Yoshida, T., Inoue, R., Morii, T., Takahashi, N., Yamamoto, S., Hara, Y., Tominaga, M., Shimizu, S., Sato, Y., and Mori, Y. 2006. Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nat. Chem. Biol.* **2**: 596-607.
280. You, I.J., Jung, Y.H., Kim, M.J., Kwon, S.H., Hong, S.I., Lee, S.Y., and Jang, C.G. 2012. Alterations in the emotional and memory behavioral phenotypes of transient receptor potential vanilloid type 1-deficient mice are mediated by changes in expression of 5-HT(1)A, GABA(A), and NMDA receptors. *Neuropharmacology* **62**: 1034-1043.
281. Zhong, B. and Wang, D.H. 2008. N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid, protects the heart against ischemia-reperfusion injury via activation of TRPV1. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **295**: H728-H735.
282. Zhu, J.J., Esteban, J.A., Hayashi, Y., and Malinow, R. 2000. Postnatal synaptic potentiation: delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. *Nat. Neurosci.* **3**: 1098-1106.
283. Zschenderlein, C., Gebhardt, C., von Bohlen und Halbach, O., Kulisch, C., and Albrecht, D. 2011. Capsaicin-induced changes in LTP in the lateral amygdala are mediated by TRPV1. *PLoS. One.* **6**: e16116.
284. Zucker, R.S. and Regehr, W.G. 2002. Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol* **64**: 355-405.
285. Zygmunt, P.M., Petersson, J., Andersson, D.A., Chuang, H., Sorgard, M., Di, M., V, Julius, D., and Hogestatt, E.D. 1999. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* **400**: 452-457.

8. Eidesstattliche Erklärung

Mit meiner Unterschrift versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt und ohne unzulässige Hilfe angefertigt habe.

Berlin, 15.01.2014

Christoph Kulisch



9. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei meiner Doktormutter PD Dr. Doris Albrecht für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Dissertation und der Unterstützung bei den vielen Projekten bedanken. Weiterhin möchte ich mich bei ihr für die inspirierenden Gespräche und die Anregungen über die letzten Jahre hinweg bedanken.

Dr. Christine Gebhardt möchte ich für die Einführung in die Patch-Clamp-Technik, der Unterstützung bei den Versuchen sowie für die fachlichen und nicht fachlichen Gespräche bedanken.

Einen großen Dank auch dafür, dass ich die Messplätze von PD Dr. Doris Albrecht, Dr. Christine Gebhardt und Dr. Richard Kovacs voller Vertrauen nutzen durfte.

Bei Prof. Dr. Hans-Joachim Pflüger möchte ich mich für seine freundliche Bereitschaft als Gutachter tätig zu sein und für die dadurch investierte Zeit bedanken.

Allen Kollegen im Institut für Neurophysiologie möchte ich Danke für die schöne und oft humorvolle Zusammenarbeit sagen.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Familie. Sie musste oft auf mich verzichten und hat mich immer unterstützt und mir viel Kraft und Ausdauer gegeben. Danke!



10. Verzeichnis der Publikationen

Tu-Rapp, H., Pu, L., Marques, A., Kulisch, C., Yu, X., Gierer, P., Ibrahim, S.M., Vollmar, B. 2010. Genetic control of leukocyte-endothelial cell interaction in collagen-induced arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **69**: 606-610.

Zschenderlein, C., Gebhardt, C., von Bohlen und Halbach, O., Kulisch, C., and Albrecht, D. 2011. Capsaicin-induced changes in LTP in the lateral amygdala are mediated by TRPV1. *PLoS. One.* **6**: e16116.

Staschewski, J., Kulisch, C., and Albrecht, D. 2011. Different Isoforms of Nitric Oxide Synthase Are Involved in Angiotensin-(1-7)-Mediated Plasticity Changes in the Amygdala in a Gender-Dependent Manner. *Neuroendocrinology* **94**: 191-199

Kulisch, C., Eckers, N., and Albrecht, D. 2011. Method of euthanasia affects amygdala plasticity in horizontal brain slices from mice. *Journal of Neuroscience Methods* **201**: 340-345.

Kulisch, C. and Albrecht, D. 2013. Effects of single swim stress on changes in TRPV1-mediated plasticity in the amygdala. *Behavioural Brain Research* **236**: 344-349