

Aus dem Institut für Neurophysiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Der Einfluss von NMDA-Rezeptoruntereinheiten auf synaptische
Plastizität in der lateralen Amygdala**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Tobias Müller
aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. D. Albrecht

2. Prof. Dr. R. W. Veh

3. Prof. Dr. D. Balschun

Datum der Promotion: 05. Juni 2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1. Einleitung	4
1.1. Die Amygdala, Bedeutung.....	4
1.2. Die Amygdala, Anatomie.....	6
1.3. Afferente und efferente Verbindungen.....	8
1.4. Furchtkonditionierung.....	9
1.5. Langzeitpotenzierung im lateralen Kern der Amygdala.....	10
1.6. Langzeitdepression im lateralen Kern der Amygdala.....	12
1.7. Das Paired-Pulse-Verhalten.....	14
1.8. Der NMDA-Rezeptor	15
1.9. Ziel- und Fragestellung.....	17
2. Methoden	19
2.1. Versuchstiere.....	19
2.2. Narkose und Präparation.....	19
2.3. Versuchsaufbau.....	21
2.3.1. Messkammer.....	21
2.3.2. Messplatz.....	23
2.4. Reiz- und Ableitorte.....	24
2.5. Versuchsablauf und Protokolle.....	24
2.5.1. Input/Output-Kurve.....	25
2.5.2. Basale Aktivität.....	25
2.5.3. HFS.....	26
2.5.4. LFS / PP-LFS.....	26
2.5.5. Paired-pulse.....	27
2.5.6. Kontrollmessungen.....	27
2.5.7. Messungen unter pharmakologischem Einfluss.....	27
2.6. Substanzen und Konzentrationen.....	28
2.6.1. Carbogengas.....	28
2.6.2. ACSF-Lösung.....	28

2.6.3.	Co 101244.....	28
2.6.4.	Ro 04-5595.....	29
2.6.5.	NVP AAM077.....	29
2.6.6.	Übersicht über die Pharmaka.....	29
2.7.	Datenauswertung.....	30
2.8.	Statistik.....	30
2.9.	Methodenkritik.....	31
3.	Ergebnisse.....	34
3.1.	Input-Output-Kurven.....	34
3.1.1.	Input-Output-Kurven bei IN-Reizung.....	34
3.1.2.	Input-Output-Kurven bei EC-Reizung.....	36
3.1.3.	Vergleich der Input-Output-Kurven beider Reizpositionen.....	37
3.2.	Langzeitpotenzierung.....	38
3.2.1.1.	Langzeitpotenzierung bei intranukleärer Reizung.....	38
3.2.1.2.	Paired-Pulse-Verhalten bei Langzeitpotenzierung durch intranukleäre Reizung.....	40
3.2.2.1.	Langzeitpotenzierung bei Reizung der externen Kapsel.....	41
3.2.2.2.	Paired-Pulse-Verhalten bei Langzeitpotenzierung durch EC-Reizung.....	43
3.2.3.	Langzeitpotenzierung im Vergleich beider Reizpositionen.....	47
3.3.	Langzeitdepression durch LFS.....	50
3.3.1.	Langzeitdepression bei intranukleärer Reizung.....	50
3.4.	Langzeitdepression durch Doppelpuls-LFS.....	53
3.4.1.1.	Langzeitdepression bei intranukleärer Reizung.....	53
3.4.1.2.	Paired-Pulse-Verhalten bei Langzeitdepression durch PP-LFS.....	59
3.4.2.1.	Langzeitdepression bei intranukleärer Reizung einjähriger Tiere.....	61
3.4.2.2.	Paired-Pulse-Verhalten bei einjährigen Tieren.....	62
3.4.3.	Langzeitdepression bei Reizung der externen Kapsel.....	63
3.4.4.	Doppelpuls-Langzeitdepression im Vergleich beider Reizpositionen.....	65

4. Diskussion	68
4.1. Kurzzusammenfassung der Ergebnisse.....	68
4.2. Die horizontale Schnittebene.....	69
4.3. NMDA-Subtypen und die basale synaptische Übertragung.....	70
4.4. NMDA-Subtypen und das Paired-Pulse-Verhalten.....	73
4.5. NMDA-Subtypen und LTP.....	75
4.6. NMDA-Subtypen und LTD.....	77
4.7. Plastizität im Alter.....	80
4.8. Ausblick.....	81
5. Zusammenfassung	83
6. Abstract	85
7. Literaturverzeichnis	86
8. Anhang	98
8.1. Abkürzungsverzeichnis.....	98
8.2. Veröffentlichungsverzeichnis.....	102
8.3. Eidesstattliche Erklärung.....	103
8.4. Lebenslauf.....	104
8.5. Danksagung.....	105

1. Einleitung

1.1. Die Amygdala, Bedeutung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Untersuchungen von Funktionen der Amygdala (Mandelkern), einer Struktur im Gehirn, die wesentlich an der Entstehung von Angst und erlernter Furcht beteiligt ist. In den vergangenen Jahren konnte gerade durch Fortschritte im Bereich der Neuroradiologie sowie durch neuropsychologische Studien die Bedeutung der Amygdala im menschlichen Gehirn näher untersucht werden. Tierversuchsstudien zeigten die wesentliche Beteiligung der Amygdala in Bezug auf emotionales und soziales Verhalten unter dem Aspekt von Furcht und Aggression (LeDoux, 2000). Verschiedene Studien konnten die Beteiligung der Amygdala an der Erkennung und Wahrnehmung emotionaler Gesichtsausdrücke auch beim Menschen aufzeigen (Adolphs et al., 1994; Rasia-Filho et al., 2000).

Es ist bekannt, dass angenehme oder unangenehme Ereignisse sich besser in Erinnerung rufen lassen als neutrale. Die Aktivität des Mandelkerns zeigt eine enge Korrelation mit sowohl den angenehmen als auch den unangenehmen Stimuli (LeDoux & Muller, 1997; Hamann et al., 1999). Es scheint jedoch weniger so zu sein, dass die Amygdala der zentrale Speicherort solcher Informationen wäre. Vielmehr scheint ihre Aufgabe im Zusammenführen der Gedächtnisinformation aus verschiedenen anderen Regionen des Gehirns zu bestehen (McGaugh, 2002).

Die Amygdala erhält Afferenzen aus verschiedenen sensorischen Systemen, verarbeitet diese und steuert das emotional geprägte Angst- und Abwehrverhalten. So ist beispielsweise die emotionale Beurteilung und Erkennung trauriger oder angsteinflößender Musik, einem generell sehr potenten emotionalem Stimulus, bei Patienten mit bilateralen amygdalären Läsionen nur vermindert möglich (Gosselin et al., 2007). Die Beteiligung der Amygdala an bewusster und unbewusster visueller Verarbeitung ängstlicher Gesichtsausdrücke konnte auch bei Probanden mittels PET (Positronenemissionstomographie) (Morris et al., 1998) und funktioneller Magnetresonanztomographie nachgewiesen werden (Morris et al., 2002).

Läsionen des Mandelkerns zeigen außerdem ein vermindertes Aufsuchen der Augenregion in Gesichtern, was sich in der sozialen Missinterpretation verschiedener

Gesichtsausdrücke äußern kann (Adolphs et al., 1998). Die bilateralen Schädigungen resultieren in einer beeinträchtigten Wahrnehmung von Angstexpressionen und deren biologischer Relevanzbewertung (Adolphs, 2008).

Die im Tierversuch untersuchten Affen mit selektiven amygdalären Läsionen zeigten vor allem ein schwächer ausgeprägtes passives Abwehrverhalten in Form von Erstarren als Reaktion auf Bedrohung. Diese Studie konnte an den gleichen Tieren eine erniedrigte Kortisolkonzentrationen nach vorübergehender Isolation von den Artgenossen nachweisen (Machado & Bachevalier, 2008) und lässt damit möglicherweise auf eine geringere emotionale Stressreaktion der Tiere schließen.

Erst vor kurzem konnte gezeigt werden, dass vollständige amygdaläre Läsionen zu einem deutlich reduzierten Augenkontakt während der Konversation mit anderen Menschen führt (Spezio et al., 2007). Diese neuen Erkenntnisse über die Auswirkung auf humane soziale Interaktionen bekräftigen Hypothesen über die Rolle der Amygdala bei autistischen Erkrankungen (Baron-Cohen et al., 2000; Sweeten et al., 2002). Bildgebende Studien konnten eine veränderte amygdaläre Aktivität bei Schizophreniepatienten aufzeigen (Kosaka et al., 2002). Eine kürzlich veröffentlichte Untersuchung konnte eine Beteiligung der genetischen Expression cytomatrix active zone betreffender Proteine in der Amygdala bei Schizophreniepatienten nachweisen (Weidenhofer et al., 2008).

Die Temporallappenepilepsie (TLE) betrifft in vielen Fällen auch die Amygdala. TLE-Patienten zeigen regelmäßig verschiedene emotionale Beeinträchtigungen, von mittlerem Angstverhalten bis hin zu schweren pathologischen Furchtattacken und Depressionen, gelegentlich assoziiert mit zusätzlichen Gedächtnisstörungen (Kalynchuk, 2000).

Die Bedeutung der Amygdala lässt sich auch im Zusammenhang mit der chirurgischen Resektion der Amygdala bei Patienten mit Temporallappenepilepsie verdeutlichen, wobei anschließend häufig Konditionierungsschwierigkeiten (LaBar et al., 1995) sowie Probleme bei der korrekten Zuordnung emotionaler Gesichtsausdrücke (Adolphs et al., 1995; LaBar et al., 1995) oder deren Erinnerung (Carvajal et al., 2008) zu beobachten waren.

Emotionen stellen eine wesentliche Qualität der alltäglichen menschlichen Erfahrungen dar.

Bei Patienten mit einem Urbach-Wiethe-Syndrom, einer sehr seltenen, angeborenen Erkrankung, kommt es durch Mutationen des extracellular matrix protein 1 Gens zu

beidseitigen pathologischen Veränderungen der Amygdala (Hamada et al., 2002). Diese Patienten zeigen kaum kognitive Einschränkungen, haben jedoch Schwierigkeiten in der Beurteilung emotionaler Gesichtsausdrücke sowie im Erinnern positiver oder negativer Bilder (Siebert et al., 2003). Durch Untersuchungen an zwei Patienten mit lokalisiertem Urbach-Wiethe-Syndrom im Bereich des basolateralen Kerns der Amygdala (BLA) konnte gezeigt werden, dass die bidirektionale Verarbeitung von Emotionen von der Unversehrtheit der Amygdala abhängig sind, da bei den beiden Patienten keine retrograde oder anterograde Emotionsausbildung möglich war (Hurlemann et al., 2007).

An dieser Stelle sei auch das beim Menschen ebenfalls selten auftretende Klüver-Bucy-Syndrom erwähnt, das durch bilaterale Temporallappenläsionen mit Einbeziehung der Amygdala gekennzeichnet ist und zunächst am Rhesusaffen erforscht wurde (Klüver & Bucy, 1997). Klinisch imponiert es durch starke affektive Verhaltensänderungen, auch als emotionale Blindheit (psychic blindness) bezeichnet, mit Symptomanifestationen wie Angstmangel, Hypersexualität, veränderte Ernährungsgewohnheiten, visuelle Agnosie, fehlende emotionale Empathie und gravierende orale Tendenzen. Aber auch von Aphasie, Amnesie und Demenz bis hin zu gehäuften Krampfanfällen wurde in diesem Zusammenhang berichtet (Lilly et al., 1983; Rasia-Filho et al., 2000; Gaul et al., 2007). Die motorische Hyperaktivität und die Gedächtnisdefizite können dabei dem Hippocampus zugeordnet werden, während die Amygdala beim Fress- und Sexualtrieb sowie der abnormen Gelassenheit („amygdala hangover“) im Vordergrund steht (Gaul et al., 2007).

1.2. Die Amygdala, Anatomie

Die Amygdala (Corpus amygdaloideum, Mandelkern) befindet sich im anteromedialen Bereich des Temporallappens. Sie besteht aus 13 Einzelkernen, die sich in tiefe, oberflächliche und die übrigen Kerne gruppieren lassen (Sah et al., 2003).

Da verschiedene Klassifikationen die Amygdala betreffend existieren, soll hier die verbreitete, von Pitkänen (2000) modifizierte Nomenklatur (Price et al., 1987) verwendet werden.

Die tiefen Kerne werden auch als basolaterale Gruppe zusammengefasst und bestehen aus dem lateralen Kern (Nucleus lateralis, LA), dem basalen Kern (Nucleus basalis, B) sowie dem akzessorischen basalen Nucleus (AB). LA und B werden gelegentlich als basolateraler Kern oder auch als basolaterale Amygdala zusammengefasst. Alle drei Kerne, LA, B und AB, schließt die Bezeichnung basolateraler Kernkomplex ein.

Die zweite Gruppe wird von den oberflächlichen Kernen gebildet, die sich aus dem Nucleus des lateralen olfaktorischen Traktes (NLOT), dem Bed Nucleus des akzessorischen olfaktorischen Traktes (BAOT), dem Nucleus corticalis anterior und posterior (CoA, CoP), dem Nucleus medialis (M) sowie dem periamygdaloiden Kortex zusammensetzen. Der Nucleus medialis kann aufgrund seiner histochemischen sowie entwicklungsbedingten Eigenschaften auch gemeinsam mit dem zentralen Kern und dem Bed Nucleus der Stria terminalis (BNST) von der oberflächlichen kortikalen Gruppe abgegrenzt werden (McDonald, 1998).

Die verbleibenden Kerne werden nicht in einer bestimmten Gruppe zusammengefasst. Zu ihnen gehören die anteriore amygdaläre Region (AAA), der Nucleus centralis (CE), die amygdalo-hippocampale Region (AHA) und die zwischen verschiedenen Kernen der Amygdala liegenden Nuclei intercalati (I).

Der laterale Kern der Amygdala (LA) ist vor allem als sensorische Schnittstelle und damit für die Steuerung von angstkonditioniertem Verhalten von Bedeutung (Amorapanth et al., 2000) und befindet sich als Teil des basolateralen Kernkomplexes in der dorsalen Seite der Amygdala. Medial grenzt er an den zentralen Kern, lateral an die externe Kapsel sowie rostral an den basalen Kern (Sah et al., 2003). Der LA besteht aus drei Untereinheiten: die dorsolaterale, die ventrolaterale und die mediale (Pitkanen, 2000).

Stereologische Zellzählungen schätzen die Zahl der Neurone in der lateralen Amygdala der Ratte auf etwa 60 000, während die Anzahl der Neurone in der gesamten Amygdala adulter Ratten auf 600 000 geschätzt wird (Tuunanen & Pitkanen, 2000).

Zunächst wurden hauptsächlich zwei, später drei Arten von Neuronen in der lateralen Amygdala beschrieben. Die Pyramidenzellen, mit einem Durchmesser von 20-30 µm (Millhouse & DeOlmos, 1983), auch als Projektionsneurone der Klasse-I bezeichnet, stellen mit 70% den Großteil der Zellpopulation dar (Hall, 1972; Sah et al., 2003). Auch wenn diese Zellen als Pyramidenzellen bezeichnet werden, so unterscheiden sie sich doch stark, allein von der eher zufällig erscheinenden Anordnung her, von den

gleichnamigen kortikalen Zellen im Bereich des Kortex oder des Hippocampus. Die Dendriten laufen früher zusammen und ihnen fehlen im distalen Bereich terminale Verzweigung sowie die feste Anordnung in einer Ebene (Pare et al., 1995; Faber et al., 2001; Sah et al., 2003).

Die zweite große Gruppe von Zellen in der lateralen Amygdala stellen mit etwa 25% die GABAergen Interneurone (Klasse-II) mit einem Durchmesser von 10-15 μm dar (McDonald & Augustine, 1993). Die verbleibenden Neurone werden von Neuroglia (Klasse-III-Zellen) gebildet.

Die morphologische Anordnung der Zellen im lateralen Kern erscheint eher zufällig und folgt keiner klaren Anordnung wie in klar laminierten Strukturen wie dem Kortex oder dem Hippocampus (Faber et al., 2001).

1.3. Afferente und efferente Verbindungen

Die Daten zu afferenten und efferenten Verbindungen stammen aus verschiedenen Studien, in denen anterograde und retrograde Tracer verwendet wurden. Diese Untersuchungen zeigen, dass jeder Kern der Amygdala multiple Eingänge verschiedener Hirnregionen erhält (McDonald, 1998; Sah et al., 2003). Die efferenten Ausgänge sind ebenfalls weitverteilt und beinhalten sowohl kortikale als auch subkortikale Regionen (Pitkanen, 2000).

Die Afferenzen können in zwei Gruppen unterteilt werden. Zum einen in die kortikalen und thalamischen Eingänge, während die anderen Fasern ihren Ursprung im Bereich des Hypothalamus und des Hirnstamms haben. Letztgenannte entspringen vor allem Regionen, die mit Verhalten, aber auch dem autonomen Nervensystem verknüpft sind. Die thalamischen und kortikalen Eingänge hingegen stellen Informationen aus den sensorischen Gebieten, aber auch aus gedächtnisassoziierten Strukturen zur Verfügung, wobei die Amygdala den größten Anteil sensorischer Informationen aus dem zerebralen Kortex erhält (McDonald, 1998).

Neben den sensorischen Informationen erhält die Amygdala auch polymodale Eingänge aus den Bereichen des präfrontalen und perirhinalen Kortex sowie des Hippocampus. In den präfrontalen Kortex konvergieren Informationen aller sensorischen Modalitäten, die insbesondere für das Belohnungsverhalten von Bedeutung sind (Ray & Price, 1992).

Weitere Eingänge aus Regionen, die mit dem deklarativen Langzeitgedächtnis in Verbindung gebracht werden, stammen aus dem Hippocampus, dem perirhinalen, dem entorhinalen und dem parahippocampalen Kortex (Milner et al., 1998).

Die efferenten Verbindungen der Amygdala projizieren in kortikale, hypothalamische aber auch in Stammhirnregionen. Hinzu kommen zahlreiche reziproke Verbindungen in nahezu alle Bereiche, aus denen die Amygdala Afferenzen erhält (Pitkanen, 2000; Sah et al., 2003).

Zu den zahlreichen reziproken Verbindungen kommt eine Vielzahl an intraamygdalären Verbindungen hinzu (Krettek & Price, 1978; Sah et al., 2003). Durch diese Verbindungen können die sensorischen Informationen, die durch den basolateralen Komplex die Amygdala erreichen, lokal verarbeitet und dann von lateral nach medial zum zentralen Kern, der als Ausgabestation agiert, weitergeleitet werden, wobei je nach Modalität entweder die laterale Amygdala, beispielsweise bei akustischen Signalen, oder die basalen Kerne, bei möglichen kontextuellen Stimuli, als Eintrittspforte in die Amygdala dienen (Canteras & Swanson, 1992; Sah et al., 2003).

1.4. Furchtkonditionierung

Die Furchtkonditionierung stellt eine spezielle Unterform der klassischen Konditionierung dar, bei der ein neutraler sensorischer Stimulus (NS) mit der Präsentation eines aversiven Ereignisses (unbedingter Reiz, US) zeitlich gekoppelt wird. Durch den engen zeitlichen Rahmen wird bei der wiederholten gekoppelten Präsentation beider Ereignisse auf den ursprünglich neutralen sensorischen Reiz ein bedingtes Angst- und Abwehrverhalten initialisiert. Dieser Reiz wird durch die biologische Bedeutung zum konditionierten Reiz (CS). Als sensorische Reize dienen beispielsweise Töne (LeDoux, 2000), aber auch eine Konditionierung mittels visuellen Reizen wurde in der Literatur beschrieben (Shi & Davis, 2001).

Durch verschiedene Arbeiten konnte die Amygdala als ein zentraler Bestandteil zum Erlernen, zum Speichern und zur Expression von Furcht bzw. Furchtkonditionierung ausgemacht werden, wobei insbesondere der laterale Kern bzw. der basolaterale Kern der Amygdala eine dominierende Rolle in den assoziativen Prozessen der Furchtkonditionierung inne hat (Blair et al., 2001; Maren, 2003). Der laterale Kern der

Amygdala dient als primäre Eingangsstation für sensorische Signale des CS, die über thalamische oder kortikale Afferenzen die Amygdala erreichen. Kontextuelle Stimuli werden aus dem Hippocampus (CA1 und Subiculum) in die basalen Kerne der Amygdala projiziert (Canteras & Swanson, 1992; LeDoux, 2000). US und CS werden insbesondere im dorsalen Anteil der LA assoziativ verknüpft. Die Schnittstelle hin zu furchtspezifischen Reaktionen verschiedener Modalitäten (Verhalten, autonom, endokrin) stellt der zentrale Kern der Amygdala dar, der wiederum Hirnstamm und Hypothalamus ansteuert (LeDoux & Muller, 1997).

Zur Untersuchung neurobiologischer Plastizität ist die Pawlowsche Furchtkonditionierung ein geeigneter und verbreiteter experimenteller Ansatz (LeDoux & Muller, 1997). Allein in Erwartungshaltung des aversiven Reizes konnte eine erhöhte Entladungsrate der Neurone des lateralen Kerns aber auch eine Verstärkung der intra-amygdalären Verbindungen beobachtet werden (Quirk et al., 1995; Pare & Collins, 2000).

1.5. Langzeitpotenzierung im lateralen Kern der Amygdala

Die amygdaläre Langzeitpotenzierung (LTP) stellt neben der Langzeitdepression (LTD, siehe auch 1.6.) eine Form neuronaler Plastizität dar, die als physiologische Grundlage für die Angstkonditionierung ein wahrscheinliches und weit verbreitetes Erklärungsmodell liefert. LTP bezeichnet die dauerhafte Erhöhung synaptischer Effizienz, setzt zudem die Assoziation prä- und postsynaptischer Zellen voraus, verhält sich inputspezifisch und erfordert die Kooperation einer Mindestanzahl an Synapsen (Martin et al., 2000). Es existiert eine Vielzahl von Studien, die gemeinsame Mechanismen für sowohl durch Angstkonditionierung induzierte neuronale Plastizität als auch für LTP in den amygdalären Synapsen nahelegen (Sah et al., 2008). Es ließ sich zeigen, dass Furchtkonditionierung die Amplitude synaptischer Ströme im lateralen Kern der Amygdala (LA) verstärkt (McKernan & Shinnick-Gallagher, 1997). Zudem gibt es starke Hinweise darauf, dass Furchtkonditionierung eine vermehrte Transmitterfreisetzung in den thalamischen Afferenzen des LA zur Folge hat (Rogan et al., 1997). Auch für kortikale Eingänge konnte eine LTP-artige Erhöhung der Freisetzung von Transmittern beobachtet werden (Tsvetkov et al., 2002). Ein weiterer

Hinweis für Gemeinsamkeiten ergibt sich aus der Tatsache, dass die pharmakologische Blockade des NMDA-Rezeptors das Erlernen von Furcht und LA-LTP (Langzeitpotenzierung im lateralen Kern der Amygdala) gleichermaßen verhindert (Goosens & Maren, 2004).

In-vivo-Charakterisierungen der LA-LTP an narkotisierten Tieren wurden durch tetanische Stimulation verschiedener Afferenzen durchgeführt (Racine et al., 1983; Clugnet & LeDoux, 1990; Maren & Fanselow, 1995). An wachen Tieren konnten kurzfristig die stärksten Veränderungen nach Reizung kortikaler Fasern beobachtet werden. Die nachhaltigsten traten nach Stimulierung thalamischer Eingänge auf (Doyere et al., 2003).

Das im Hippocampus häufig verwendete Induktionsprotokoll der Thetaburststimulation (TBS) kann in der lateralen Amygdala ebenfalls eine LTP induzieren. TBS zeigt eine bessere Korrelation mit Verhaltensbefunden, jedoch eine schwächere LTP im Vergleich zur Induktion durch hochfrequente Stimulation (HFS) (Pollandt et al., 2003).

Im LA lässt sich mittels HFS sowohl in horizontalen als auch in coronalen Schnitten eine stabile LTP induzieren (Gean et al., 1993; Schubert et al., 2005). Es kann davon ausgegangen werden, dass die inhibitorischen Mechanismen in horizontalen Schnitten geringer als in coronalen sind, sodass dort die HFS-induzierte LA-LTP auch ohne Applikation von GABA-Rezeptorantagonisten möglich ist. Während TBS und HFS intranukleärer Fasern eine stabile LA-LTP hervorrufen, zeigte TBS, im Gegensatz zu HFS, bei Stimulierung der externen Kapsel keine LTP-Induktion (Drephal et al., 2006).

Auch wenn der Prototyp der Langzeitpotenzierung sicherlich die hippocampale LTP in der CA1-Region ist, so konnten in den vergangenen Jahren in Bezug auf die Induktion, Dauer und Mechanismen der LTP starke Gemeinsamkeiten zu der amygdalären Form aufgedeckt werden.

Die stärkere Erregung der präsynaptischen Neurone resultiert in einer im Vergleich zu einem einzelnen Aktionspotenzial stärkeren Freisetzung von Glutamat, und aktiviert dadurch eine größere Anzahl postsynaptischer AMPA-Rezeptoren. Durch die verstärkte Depolarisation verlassen die Mg^{2+} -Ionen den an den NMDA-Rezeptor assoziierten Kanal, woraufhin ein Kalziumeinstrom in die postsynaptische Zelle möglich wird (Nowak et al., 1984; Sah et al., 2008).

Der Induktion einer LTP liegt generell ein Kalziumeinstrom in die postsynaptische Zelle durch Aktivierung von NMDA-Rezeptoren und spannungsabhängigen Kalziumkanälen (voltage gated calcium channels, VGCC) zugrunde. Der Anstieg der

Kalziumkonzentration löst daraufhin als Second Messenger eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die zu einer Erhöhung der synaptischen Übertragung führt. Eine zentrale Rolle scheint hier die Ca^{2+} /calmodulinabhängige Kinase II (CaMKII) zu spielen, die nach Kalziumeinstrom autophosphoryliert und damit aktiviert vorliegt (Rodrigues et al., 2004). CaMKII ist unter anderem für die Phosphorylierung der AMPA-Rezeptoren verantwortlich. Sowohl an synaptischen als auch an extrasynaptischen Membranen kommt es nach LTP-Induktion zu einer Zunahme des Einbaus von AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran. Eine solche Zunahme konnte auch unter Furchtkonditionierung beobachtet werden (Rumpel et al., 2005).

Eine weitere wesentliche Schaltstelle stellt die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) dar, die ebenfalls durch den Kalziumeinstrom aktiviert wird. Sie scheint gemeinsam mit der CaMKII und der Proteinkinase C (PKC) über Aktivierung der MAP-Kinase (mitogen-activated protein kinase) einen Beitrag zur Stabilisierung der LTP zu leisten (Schafe et al., 2000). Es wird vermutet, dass es über diesen Signalweg im Zellkern zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren kommt.

Ein gut untersuchter Transkriptionsfaktor ist in diesem Zusammenhang CREB (cAMP response element-binding protein), der an die CRE-Nucleotidsequenz (cAMP response element) binden kann. Diese Region wirkt als Promotor und die CREB-Bindung bewirkt eine verstärkte Transkription einiger Gene, die mit der Furchtkonditionierung und furchtkonditioniertem Verhalten assoziiert sind (Hall et al., 2001).

Diese Transkriptionsfaktoren könnten zudem direkt oder indirekt an der Produktion von neuen Proteinkinasen sowie AMPA-Rezeptoren beteiligt sein, und damit längerfristige synaptische Veränderungen sicherstellen.

1.6. Langzeitdepression im lateralen Kern der Amygdala

Während es sich bei LTP um eine dauerhafte Erhöhung der synaptischen Effizienz handelt, wird diese bei der Langzeitdepression (LTD) dauerhaft erniedrigt.

Zur Auslösung einer LTD können verschiedene niederfrequente Stimulationsmuster eingesetzt werden, wie TPS (theta pulse stimulation; 5-8 Hz, 150 s) oder LFS (low frequency stimulation; 1 Hz, 15 min) (Kaschel et al., 2004).

Für den lateralen Kern der Amygdala konnte eine Abhängigkeit der LTD von NMDA-Rezeptoren, von metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR) der Gruppe II und von VGCC vom L-Typ nachgewiesen werden (Heinbockel & Pape, 2000; Kaschel et al., 2004; Tchekalarova & Albrecht, 2007). Im basolateralen Kern kann LTD zum einen über den Ca^{2+} -Einstrom durch NMDA-Rezeptoren, zum anderen durch die Aktivierung der metabotropen Glutamatrezeptoren ausgelöst werden (Wang & Gean, 1999; Lin et al., 2000).

Die mGluR-abhängige LTD ist mit einem präsynaptischen Kalziumeinstrom und einer Paired-Pulse-Fazilitierung assoziiert. Ein möglicher intrazellulärer Mechanismus der damit verbundenen LTD-Induktion könnte in der mGluR-vermittelten Abnahme der Ca^{2+} -sensitiven Adenylatzyklase Aktivität bestehen, die dann wiederum zu einer Abnahme der cAMP-Konzentration und der PKA-Aktivität mit einer dauerhaft verminderten Transmitterfreisetzung führt (Lin et al., 2000).

Die NMDA-Rezeptor abhängige Form der LTD scheint jedoch eher postsynaptisch lokalisiert zu sein. Dieser Unterschied wird auch durch die verschiedenen Orte und verschiedenen Einflüsse der Calcineurinaktivierung verdeutlicht. Präsynaptisch verhindert eine erhöhte Calcineurinkonzentration das Zustandekommen einer mGluR-assoziierten LTD, postsynaptisch wird die NMDA-Rezeptor abhängige Form dadurch eher verstärkt (Li et al., 2002).

Bei der NMDA-Rezeptor vermittelten Form der LTD, scheint der Kalziumeinstrom ausschlaggebend für die LTD-Induktion zu sein, auch wenn wie bei der LTP-Induktion das spezifische quantitative Maß des Kalziumeinstroms, das eine LTD auslöst, noch nicht bestimmt worden ist. Der genaue Mechanismus, der letztlich bei der NMDAR-vermittelten Form nach dem Kalziumeinstrom zur Ausbildung einer Langzeitdepression führt, ist zurzeit unbekannt. Dennoch gibt es Belege, dass eine verminderte Anzahl postsynaptisch lokalisierter AMPA-Rezeptoren (AMPA) mit der LA-LTD-Induktion assoziiert ist (Yu et al., 2008).

Die Applikation von Theta Pulse Stimulation (TPS; 8 Hz über 150 s) thalamischer Afferenzen resultierte in 21 % der untersuchten Neurone in einer LA-LTD, während EC-Stimulation keine LTD auslösen konnte (Heinbockel & Pape, 2000). Im Gegensatz zur Induktion durch TPS konnte die niederfrequente Reizung (low frequency stimulation, LFS; 900 Reize, 1 Hz) eine deutlich stärkere LTD hervorrufen (Schubert et al., 2005). Unter partieller Blockade der GABAergen Transmission ist allerdings eine schwache LTD im lateralen Kern durch LFS kortikaler Fasern induzierbar (Kaschel et al., 2004).

Als Modell für Lernmechanismen erfüllt die LTD, wie auch die LTP, die Hebbischen Lernregeln der Inputspezifität (Spezifität), Kooperation und Assoziation der prä- und postsynaptischen Zellen (Kemp & Manahan-Vaughan, 2007).

1.7. Das Paired-Pulse-Verhalten

Das Paired-Pulse-Verhalten (Doppelpulsverhalten) untersucht die synaptische Kurzzeitplastizität. Die Gabe von zwei kurz aufeinander folgenden Stimuli führt zu einer veränderten Antwort des zweiten Reizes gegenüber dem ersten. Dabei wird zwischen Doppelpulspotenzierung (Paired-Pulse-Fazilitierung, PPF) und Doppelpulshemmung (Paired-Pulse-Depression, PPD) unterschieden. Als Ursache dieser veränderten Antwort wird von einem veränderten präsynaptischen Kalziumeinstrom ausgegangen (Commins et al., 1998; Zinebi et al., 2001). Bei der Paired-Pulse Fazilitierung addiert sich zu dem intrazellulären Restkalzium des ersten Stimulus das durch die zweite Erregung einströmende Kalzium, wodurch die Kalziumkonzentration steigt und es zu einer vermehrten Transmitterfreisetzung kommt.

Dem entgegengesetzt kommt es bei der Paired-Pulse-Depression durch einen sehr starken Aktivierungsgrad der Synapse durch den ersten Stimulus zur Freisetzung einer größeren Transmittermenge, sodass der zweite Reiz keine weitere Steigerung bewirken kann. Die Antwort des zweiten Stimulus gegenüber dem ersten ist kleiner (Pena et al., 2002).

Ein wesentlicher Faktor des Paired-Pulse-Verhaltens ist der zeitliche Abstand zwischen erstem und zweitem applizierten Reiz (Interstimulusinterval). Da die maximale Kalziumkonzentration bei mittleren Reizabständen (30 bis 100 ms) vorliegt, kann in diesem Bereich durch den zweiten Stimulus eine Potenzierung erzeugt werden (Stanford et al., 1995). Im Hippocampus konnte nachgewiesen werden, dass die Reduzierung der Antwort durch den zweiten Reiz bei sehr kurzen Reizabständen (10 bis 20 ms) dem Einfluss einer GABA_A-Rezeptoren bedingten Hemmung unterliegt. Die Doppelpulsdepression bei hohen Interstimulusintervallen (200 bis 500 ms) wird auf die Hemmung durch metabotrope GABA_B-Rezeptoren zurückgeführt. Zudem sind auch postsynaptisch lokalisierte NMDA- und AMPA-Rezeptoren mitbestimmend für die

Antwort auf die veränderte Transmitterfreisetzung (McKernan & Shinnick-Gallagher, 1997; Zinebi et al., 2001; Zinebi et al., 2002; Shinnick-Gallagher et al., 2003).

Auch wenn die exakte physiologische Funktion noch unklar ist (Zucker, 1989), so gibt es Vermutungen, dass die Effekte des Paired-Pulse-Verhaltens eine Schutzfunktion bzw. die Funktion eines Filters innehaben (Li et al., 2000; Gemmell & O'Mara, 2002). So könnten schnell aufeinanderfolgende Reize im Sinne einer Doppelpulspotenzierung verstärkt weitergeleitet werden (Gemmell & O'Mara, 2002), während unregelmäßig oder zufällig eintreffende Reize durch die Doppelpulshemmung in ihrer synaptischen Weiterleitung eher unterdrückt werden (Li et al., 2000).

1.8. Der NMDA-Rezeptor

Die NMDA-Rezeptoren (NMDAR) zählen zu den ionotropen Glutamatrezeptoren. In die gleiche Untergruppe gehören ebenfalls die AMPA- und die Kainatrezeptoren. Die Namensgebung erfolgte nach den spezifischen Agonisten NMDA (N-Methyl-D-Aspartat), AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure) beziehungsweise Kainat (Watkins & Evans, 1981). AMPA- und Kainatrezeptoren werden auch als non-NMDA-Rezeptoren zusammengefasst.

NMDA-Rezeptoren setzen sich aus verschiedenen Untereinheiten zusammen, im Wesentlichen aus zwei NR1- und zwei NR2-Untereinheiten, von denen wiederum vier verschiedene genetische Typen existieren (NR2A-D) (Bartlett et al., 2007).

Neben der molekularen Vielfalt durch die verschiedenen NR2-Untereinheiten existieren für die NR1-Untereinheit multiple Varianten, die durch alternatives Splicen der mRNA eines einzelnen Genes entstehen (Yamakura & Shimoji, 1999).

Zudem konnte mit der NR3A Untereinheit ein weiteres, vorher als NMDAR-L bekanntes Protein, als Bestandteil des NMDA-Rezeptors ausgemacht werden (Ciabarra et al., 1995; Sucher et al., 1995). Die NR1-Untereinheit ist obligater Rezeptorbestandteil, während die NR2- und NR3-Untereinheiten komplexe Veränderungen in den Expressionsmustern während der Entwicklung zeigen (Yao et al., 2008). Die Expression verschiedener Untereinheiten ist zur Bildung eines funktionsfähigen Kanals notwendig, da sich die Bindungsstelle für Glutamat am Übergang zwischen NR1- und NR2-

Untereinheit befindet. Im Bereich der NR1- und NR3-Untereinheiten befinden sich die Bindungsstellen für D-Serin und den Co-Agonisten Glyzin (Yao et al., 2008), welches für die Hypothese spricht, dass die NR3A-Untereinheit eine der beiden NR1-Untereinheiten in nativen NMDA-Rezeptoren ersetzen kann (Eriksson et al., 2007). Die NR2B-Untereinheit besitzt weitere Bindungsstellen für verschiedene Polyamine, die die Funktionsfähigkeit des NMDA-Rezeptors beeinflussen. So können beispielsweise extrazelluläres Spermin und Sperminderivate wie N¹-dansyl-spermine (N¹-DnsSpm) über die Bindung an die NR2B-Untereinheit inhibitorische Effekte ausüben (Kashiwagi et al., 1997; Yamakura & Shimoji, 1999).

Unter Ruhemembranpotenzialbedingungen sind NMDA-Rezeptoren aufgrund einer spannungsabhängigen Magnesiumionenblockade inaktiv. Durch Bindung von Glutamat und Glyzin sowie Depolarisation der Zellmembran, beispielsweise durch aktivierte AMPA-Rezeptoren, wodurch die Magnesiumionen abdiffundieren, kommt es zu einer Aktivierung der NMDA-Rezeptoren und damit zu einem Natrium- und Kalziumeinstrom in die Zelle. Dieser Kalziumeinstrom scheint das entscheidende Signal für die Induktion NMDA-abhängiger LTP wie auch LTD zu sein.

Sowohl für kortikale als auch für thalamische Afferenzen der Amygdala konnte die anatomische Existenz von NMDA-Rezeptoren (Farb & LeDoux, 1997; Farb & LeDoux, 1999) und deren Co-Lokalisation mit AMPA- und Kainatrezeptoren nachgewiesen werden (Mahanty & Sah, 1999).

Die Beteiligung des NMDAR an der basalen synaptischen Übertragung scheint möglicherweise altersabhängig zu sein, da in jungen Tieren eine NMDAR-Beteiligung an den EPSPs und Feldpotentialen aufgezeigt werden konnte (Mahanty & Sah, 1999; Weisskopf & LeDoux, 1999), die in adulten Tieren nicht nachgewiesen werden konnte (Drephal et al., 2006).

Eine NMDAR-Beteiligung an der HFS- und TBS-induzierten LA-LTP konnte sowohl in coronalen als auch in horizontalen Hirnschnitten nachgewiesen werden (Tsvetkov et al., 2002; Schroeder & Shinnick-Gallagher, 2004; Drephal et al., 2006).

Durch die spezifische Blockade des NMDA-Rezeptors konnte gezeigt werden, dass auch die LFS-induzierte LTD in der lateralen Amygdala neben metabotropen Glutamatrezeptoren der Gruppe II auch vom NMDA-Rezeptor abhängig ist (Kaschel et al., 2004).

AMPA-Rezeptoren setzen sich aus den Untereinheiten GluR1-4 zusammen (Keinanen et al., 1990). Sie sind kalziumundurchlässig und vermitteln unter Ruhemembranbedingungen die basale synaptische Aktivität in der basolateralen Amygdala (Rainnie et al., 1991).

Eine Beteiligung an den Vorgängen synaptischer Plastizität konnte für Kainatrezeptoren sowohl in prä- als auch in postsynaptischer Lokalisation nachgewiesen werden (Contractor et al., 2000; Mayer, 2005; Schubert et al., 2008). Die basale synaptische Aktivität wird in der basolateralen Amygdala (Rainnie et al., 1991), aber auch im Bereich des Hippocampus (Nicoll & Malenka, 1995), entscheidend durch AMPA- und Kainatrezeptoren vermittelt. Für die Amygdala konnte gezeigt werden, dass geringe Konzentrationen des Kainat-Agonisten ATPA genügen, um die basale Aktivität und bei männlichen Tieren die Langzeitpotenzierung zu vermindern (Schubert et al., 2008). Die GLU_{K5} -Untereinheit dieser Rezeptoren ist auch an amygdalärer Plastizität beteiligt, die mit Kindling, einem Modell der Epileptogenese, assoziiert ist (Schubert & Albrecht, 2008).

1.9. Ziel- und Fragestellung

Es existieren verschiedene, kürzlich erschienene Arbeiten zum Einfluss der NR2-Untereinheiten in Bezug auf synaptische Plastizität in Form von LTP und LTD, in denen die These aufgestellt wurde, dass zumindest im Bereich des Hippocampus und des Kortex die NR2A-Untereinheit für die LTP-Induktion verantwortlich sei, während die LTD durch die NR2B-Untereinheit vermittelt würde (Liu et al., 2004; Massey et al., 2004). Für die Amygdala konnte bisher gezeigt werden, dass der NR2B-Antagonist Ifenprodil eine Induktion der LA-LTP zuverlässig verhinderte (Bauer et al., 2002).

In der vorliegenden Untersuchung sollen nun diese Befunde für die Amygdala komplettiert und überprüft werden, in dem zum einen der Einfluss der NR2A-Untereinheit auf die Induktion einer LTP, zum anderen die Beteiligung der NR2A- und NR2B-Untereinheiten des NMDA-Rezeptors an der amygdalären Langzeitdepression ermittelt werden. Um Hinweise für eine Inputspezifität zu finden, sollen dabei sowohl

kortikale Eingänge durch EC-Stimulation, als auch intraamygdaläre Eingänge durch Reizung von Fasern, die den lateralen Kern durchziehen, untersucht werden.

In diesem Zusammenhang soll gleichzeitig durch die Erstellung von Input-Output-Kurven der Einfluss der NR2-Untereinheiten auf die basale synaptische Transmission ermittelt werden, da es diesbezüglich in der Literatur unterschiedliche Ergebnisse gibt (Mahanty & Sah, 1999; Weisskopf & LeDoux, 1999; Drephal et al., 2006).

Weiterhin soll durch die Applikation der Doppelpulsreizung die synaptische Kurzzeitplastizität und damit die prä- oder postsynaptische Lokalisation synaptischer Plastizitätsprozesse näher betrachtet werden.

Eine weitere Zielsetzung der folgenden Untersuchungen besteht in der möglichen Induktion einer Langzeitdepression durch ein verändertes LFS-Protokoll. Durch die Applikation von Doppelpuls-LFS (PP-LFS) ist zu vermuten, dass mehr Kalzium in die Zelle einströmt. Zunächst soll durch Reizung von intranukleär verlaufenden Fasern der lateralen Amygdala ermittelt werden, ob eine LTD-Induktion durch dieses Reizmuster generell möglich ist, bei welchem Interstimulusintervall sich die stärkste LTD erzielen lässt und, durch Einwaschen spezifischer NR2-Antagonisten, zu welchem Anteil die Untereinheiten des NMDA-Rezeptors daran beteiligt sind. Ist dieses Protokoll intranukleär in der Lage eine LTD auszulösen, so soll durch Reizung der Fasern innerhalb der externen Kapsel geprüft werden, ob dadurch ebenfalls eine LTD in der lateralen Amygdala induzierbar ist, und, falls erfolgreich, so kann auch hier die Beteiligung der NR2A- und der NR2B-Untereinheit ermittelt werden.

Um eine Aussage über synaptische Plastizität im Alter treffen zu können, soll schließlich die Induktion einer Langzeitdepression an einjährigen Tieren überprüft werden.

2. Methoden

2.1. Versuchstiere

Es wurden insgesamt 264 elektrophysiologische Ableitungen, davon 243 erfolgreich, an 50 männlichen Mäusen durchgeführt. 47 dieser Tiere waren C57Bl/6-Mäuse vom Züchter Harlan Winkelmann, die zum Zeitpunkt der Experimente zwischen 8 und 10 Wochen alt waren. Drei weitere Tiere waren vom gleichen C57-Typ und bei Durchführung der Experimente bereits ein Jahr alt.

Die Messungen erfolgten ausschließlich an männlichen Tieren, da Drephal et al. (2006) zeigen konnten, dass bei HFS-induzierter LTP in der lateralen Amygdala keine signifikanten Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Ratten im Alter von 6-8 Wochen bestehen. Kaschel et al. (2004) konnten auch bei LFS-induzierter LTD keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedengeschlechtlichen Ratten feststellen. Daher wurde hier davon ausgegangen, dass auch bei Mäusen keine geschlechtsspezifischen Unterschiede auftreten.

Futter und Wasser erhielten die Tiere ad libitum. Die Mäuse wurden bei einer Raumtemperatur von ca. 23° Celsius und einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Das Gewicht der Mäuse variierte bei den 8-10 Wochen alten Tieren von 21 bis 33 Gramm. Die einjährigen Tiere wogen zwischen 31 und 41 Gramm.

2.2. Narkose und Präparation

Die Narkose wurde in einem Glaszylinder, dessen Boden mit weichem Handtuchpapier bedeckt wurde, mit Äther durchgeführt. Anschließend wurde das Tier dekapitiert, das Gehirn zügig freipräpariert und das Präparat danach in ein 4° Celsius kaltes, carbogengesättigtes ACSF-Bad (pH: 7,4; ACSF: artificial cerebrospinal fluid, künstliche Nährlösung) überführt und für einige Minuten darin aufbewahrt.

Bei der Narkose wurde folgendermaßen vorgegangen. Zunächst wurden 2 ml Äther mittels einer 5 ml Metallmehrfachspritze in den Glaszylinder gegeben und kurz

gewartet. Während dieser Zeit sollte sich der Äther möglichst gleichmäßig im Gefäß verteilen. Die Maus wurde dann in den so vorbereiteten Glaszylinder überführt und beobachtet. Um eine ausreichende, jedoch nicht zu tiefe Narkose zu erreichen, wurde durch Rütteln am Gefäß festgestellt, in welchem Narkosestadium sich das Tier in etwa befand. Trat keine Reaktion auf, so konnte davon ausgegangen werden, dass eine ausreichende Narkosetiefe erreicht war, und mit der Dekapitation begonnen werden.

Die beiden Hemisphären wurden auf einer gekühlten Petrischale mittels einer Rasierklinge in der Medianlinie geteilt und anschließend auf der Halterung des Schnittgerätes (Motorized Advanced Vibroslice, World Precision Instruments, Inc., USA) mit Zyanoacrylat-Kleber (Patex®) befestigt. Die Schnittkammer wurde mit 4° Celsius kalter, carbogengesättigter ACSF-Lösung aufgefüllt. Es wurden 400 µm dicke horizontale Hirnschnitte angefertigt. Dabei wurden die ersten 2 Schnitte verworfen, da erst die darauf folgenden Schnitte den lateralen Kern der Amygdala, den Hippocampus, die basale und mediale Amygdala, den entorhinalen und perirhinalen Cortex sowie die externe Kapsel beinhalteten. Jeder Hirnschnitt wurde zügig in die vorbereitete Meßkammer überführt, und auf dreilagigem Linsenpapier mit carbogenisierter ACSF-Lösung bei 35° Celsius perfundiert. Die Flussrate betrug dabei 1,5 ml/min (Heizgerät: Eigenbau; Schlauchpumpe: Gilson® Minipuls 3, Frankreich).

Nach einer mindestens zweistündigen Ruhepause konnte mit den Experimenten begonnen werden.

Es wurde stets auf eine zügige, sorgfältige und möglichst atraumatische Präparationstechnik geachtet. Gerade im Bereich des Temporallappens führten unbeabsichtigte Traumata dazu, dass erfolgreiches Experimentieren nicht mehr möglich war. Zur Vermeidung ischämischer Hirnschäden, wurde das Zeitfenster möglichst gering gehalten. Es wurde stets eine Präparationszeit von unter 3 Minuten angestrebt.

Alle Experimente wurden entsprechend den Bestimmungen des European Communities Council Directive vom 24. November 1986 (86/609/EEC) und der Richtlinien zur Umsetzung des Tierschutzgesetzes an der Charité – Universitätsmedizin Berlin (Stand: September 2006) sowie nach Genehmigung durch das Berliner Ethikkomitee (T0344/05) durchgeführt. Es wurde versucht, dass Leiden der Tiere und die Anzahl der Mäuse so gering wie möglich zu halten.

2.3. Versuchsaufbau

Sämtliche Messungen erfolgten an zwei identisch aufgebauten Arbeitsplätzen. Die Experimente konnten somit simultan durchgeführt werden. Zum einen konnte so der zeitliche Rahmen gesenkt werden, zum anderen wurde dadurch auch die Anzahl der Versuchstiere geringer gehalten.

2.3.1. Messkammer

Alle Messungen erfolgten in einer Messeinheit, welche aus einem Plexiglaskörper mit je zwei Messkammern bestanden. In diesen Kammern wurden die Schnitte nach dem Schneiden auf dreilagigem Linsenpapier (KODAK®) platziert. Die Kammern wurden durch Plastikdeckel abgedeckt, die mit einer rechteckigen Öffnung zum Einführen der Reiz- und Ableitelektrode versehen waren.

Neben den Kammern befanden sich rechts und links zwei längliche Öffnungen, die in den Hohlraum des Plexiglaskörpers führten. Dieser war mit ca. 500 ml Aqua destillata gefüllt. Im Inneren des Körpers befand sich zudem ein Heizelement, der mit einem Thermosensor gekoppelt war, und über den das Wasser bei einer Temperatur von 35° Celsius konstant gehalten wurde.

Die Kammern wurden dauerhaft mit einer carbogengesättigten ACSF-Lösung perfundiert, die ebenfalls eine Temperatur von 35° Celsius aufwies. Die Flussgeschwindigkeit von 1,5 ml/min wurde durch eine Schlauchpumpe gewährleistet.

Zur Feinregulation des Flusses innerhalb der Kammer diente pro Kammer ein Strumpfband, das durch manuelle Reposition die ACSF-Lösung schneller oder langsamer in die abführenden Schlauchsysteme und in den Auffangbehälter überführte. Je größer der Anteil des Bandes innerhalb der Kammer war, desto schneller erfolgte der Abfluss aus der Kammer.

Die Kammern waren geerdet, wobei darauf geachtet wurde, dass der Kontakt immer gut von der ACSF-Lösung umspült wurde, um den Widerstand so gering wie möglich zu halten und somit auch das Störgeräuschen der Aufzeichnungen zu minimieren.

Beide Arbeitsplätze waren schwingungsarm durch spezielle Vorrichtungen an den Tischen gelagert.

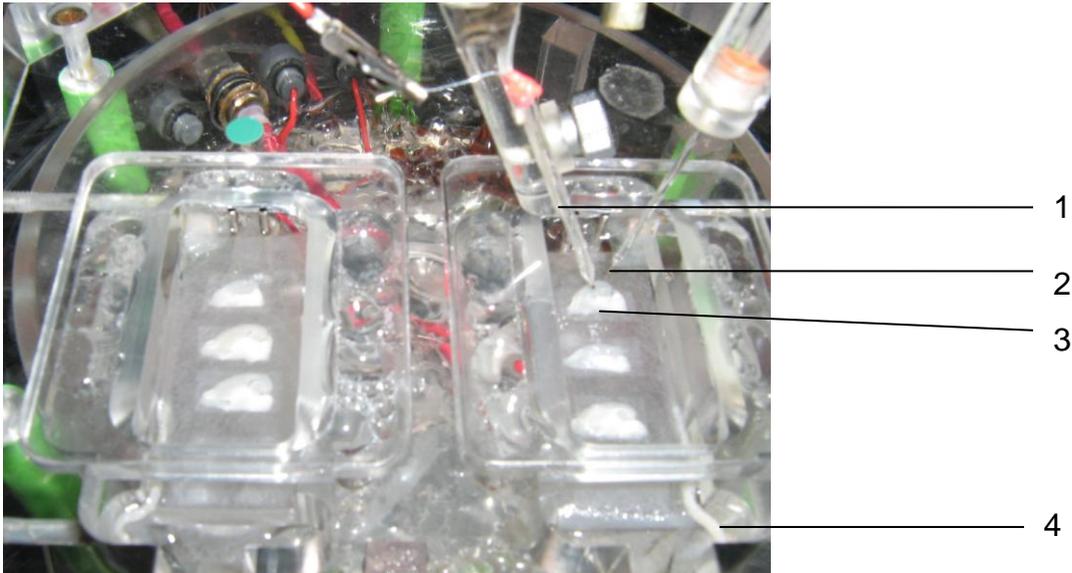


Abb. 2.1.: Aufbau einer Meßvorrichtung

1: Reizelektrode; 2: Ableitelektrode; 3: Schnittpräparat; 4: Strumpfband

Die Reizelektroden bestanden aus einer doppelumigen Glaskapillare (Thetaglas) von etwa 4 - 5 cm Länge. In jedes Lumen wurde ein ca. 6 cm langer Silberdraht eingeführt. Dieser war an der Spitze mit einem 0,5 cm langem Platindraht (Durchmesser 50 μm) verlötet und so eingeführt, dass am oberen Ende der Silberdraht und am unteren spitzen Ende der Platindraht hervortrat. Die beiden Platindrähte wurden durch erhitzten Schellack in einem Abstand von etwa 500 μm (\pm 100 μm) fixiert. Gleichzeitig wurde dadurch das untere Ende der Glaskapillare verschlossen. Das obere Ende der Kapillare wurde mit Dentalwachs abgedichtet, um einen Kontakt zwischen den beiden Drähten zu vermeiden.

Zur Herstellung der Ableitelektroden dienten Borosilikatkapillaren (Borosilicate Glass Capillaries, World Precision Instruments, Inc., USA). Diese wurden durch Erhitzen eines Platinbleches an einem Ziehgerät (Flaming/Brown Micropipette Puller Model P-87, Sutter Instruments Co., USA) gezogen. Die Ableitelektroden wurden mit ACSF-Lösung befüllt. Sie besaßen jedoch einen Widerstand von 10-15 $\text{M}\Omega$, so dass durch visuell kontrolliertes Abbrechen der Elektrodenspitze der Widerstand auf etwa 3 $\text{M}\Omega$ gesenkt wurde. Zu große Widerstände der Ableitelektrode begünstigen das Aufzeichnen von Störgeräuschen, so dass hier geringere Widerstände gewählt wurden, um Potenziale sicher zu identifizieren, aufzuzeichnen und auswerten zu können.

In das Lumen der Ableitelektrode wurde ein Silberdraht eingeführt, der die elektrische Ankopplung an den Verstärker ermöglichte.

2.3.2. Messplatz

Die Elektroden wurden an Magnet-Manipulatoren befestigt. Über diese war eine im Mikrometerbereich genaue Steuerung und Platzierung der Elektroden möglich. Die exakte Positionierung der Elektroden geschah mit Hilfe einer Stereolupe mit bis zu 40-facher Vergrößerung. Es wurde darauf geachtet, dass sich Reiz- und Ableitelektrode an keinem Punkt berühren. Um das Zellgewebe möglichst wenig zu schädigen, wurden die Elektroden nur wenige Mikrometer in den Hirnschnitt gesenkt.

Die von den Ableitelektroden erfassten Signale wurden über einen Verstärker 10-fach verstärkt und das Signal dann einem Nachverstärker mit variabler Verstärkung zugeführt. Das Signal wurde insgesamt um das 1000-fache verstärkt und über einen Analog-Digital-Wandler (Micro-CED, Science Park, Cambridge, England) an einen Windows-XP-fähigen Computer übermittelt. Hier folgte die Datenaufzeichnung durch das Program Signal® Version 3.01 der Firma Cambridge Electronic Design.

Die Reizungen erfolgten durch einen Isostimulator, der durch das Micro-CED gesteuert wurde. Zur Reizung wurden Ströme von 50 μA bis 800 μA verwendet. Größere Ströme wurden nicht angelegt, da eine Schädigung der Zellen mit zunehmender Stromstärke wahrscheinlicher wird.

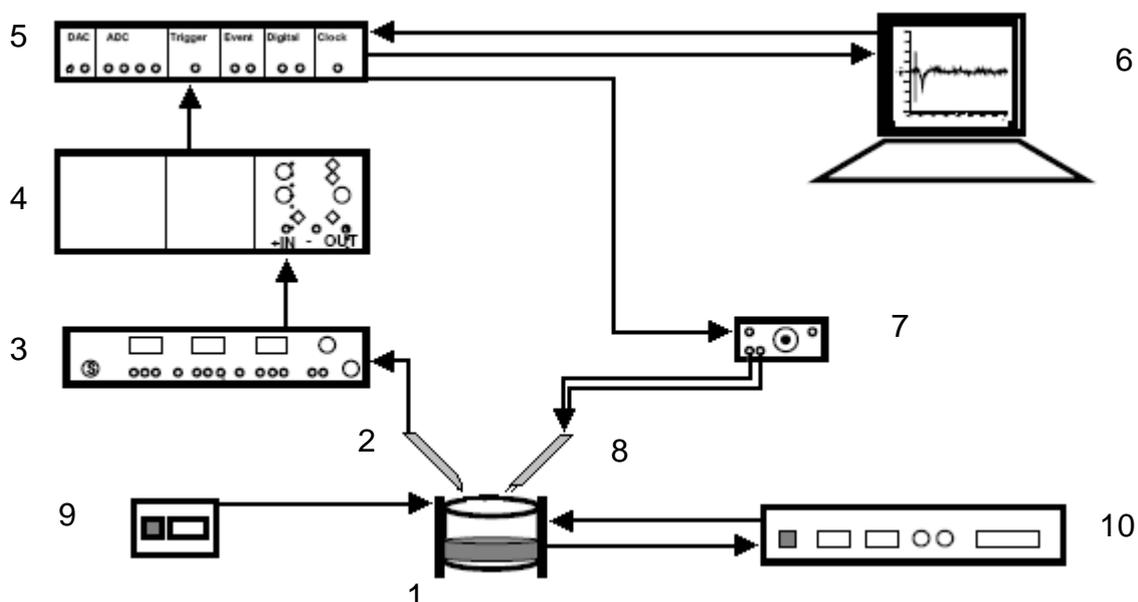


Abb. 2.2.: Schematischer Aufbau des Messplatzes: 1: Interfacekammer mit horizontalem Hirnschnitt, unterer Bereich Plexiglaskörper mit Aqua destillata 2: Ableitelektrode 3: Vorverstärker 4: Nachverstärker 5: Analog-Digital-Wandler (Micro-CED) 6: Computer 7: Isostimulator 8: Doppellumige Reizelektrode 9: Wasserbad für Perfusionslösungen 10: Heizgerät

2.4. Reiz- und Ableitorte

Bei dieser Arbeit wurde die Ableitelektrode stets innerhalb des lateralen Kerns der Amygdala platziert. Die Position der Reizelektrode variierte jedoch in Abhängigkeit von dem zugrundeliegenden Versuchsprotokoll. Bei einem Teil der Experimente wurden die Fasern im Bereich der externen Kapsel gereizt. Zum anderen wurden die Elektroden ebenfalls im lateralen Kern der Amygdala platziert, sodass hier intranukleär gereizt und auch abgeleitet wurde.

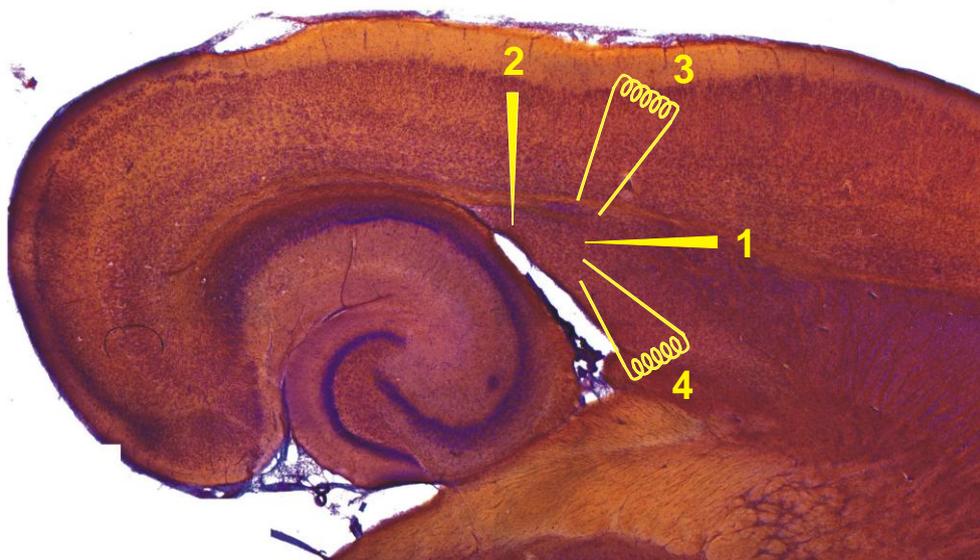


Abb. 2.3.: Horizontalschnitt

Dargestellt sind die Positionen der Reiz- und Ableitelektroden. Bei intranukleärer Reizung (4) wurde die Ableitelektrode stets im dorsoventralen Anteil des lateralen Kerns (LA) positioniert (2). Bei Stimulierung der externen Kapsel (EC-Reizung, 3), ließen sich die Potenziale am besten in Position 1 ableiten.

2.5. Versuchsablauf und Protokolle

Die Reizdauer der Einzelstimuli betrug 0,1 Millisekunden. Über das Micro-CED wurde alle zehn Sekunden ein Einzelstimulus ausgelöst. Off-line wurden dann jeweils 6 Reizantworten gemittelt. Die zur Induktion von LTP und LTD sowie für Messungen des Paired-pulse verwendeten Paradigmen wurden entsprechend programmiert und auch über das Micro-CED ausgelöst.

2.5.1. Input/Output-Kurve

Zu Beginn einer jeden Messung wurde mit Hilfe der Signal-Software ein Feldpotenzial aufgesucht. Dieses ließ sich im Arbeitsfenster des Programmes graphisch darstellen. Bei entsprechender Lokalisation der Reizelektrode konnten in der Regel Feldpotenziale zwischen 1 mV und 2 mV aufgefunden werden. Bei jeder Versuchsreihe wurde damit begonnen, eine Input/Output-Kurve (I/O-Kurve) zu erstellen. Ein definierter Reiz (Input) zwischen 1-8 Volt wurde alle 10 Sekunden appliziert und anschließend die Amplitude (Output) des Potenzials mit Hilfe der Signal-Software aufgezeichnet und ein Mittelwert aus jeweils 6 Werten für eine Spannung ermittelt. Die Spannung wurde nun schrittweise um 0,5 Volt erhöht, bis die maximale Feldpotenzialamplitude erreicht war. Auf eine weitere Erhöhung der Spannung folgte nun keine Vergrößerung der Amplitude des Potenzials.

Bei sämtlichen Experimenten, die die Induktion von LTP untersuchten, wurde eine Reizstärke gewählt, bei der die Feldpotenzialamplitude den Wert von 50% des zuvor ermittelten Maximums hatte.

Für alle Experimente, die sich mit der Langzeitdepression (LTD) beschäftigten, wurde eine Reizintensität gewählt, bei der die Amplitude des Potenzials 60% des Maximums betrug.

Aufgrund der weitgehend unverstandenen zellulären Struktur und Architektur der Amygdala waren diese willkürlich festgelegten Prozentwerte von uns gewählt worden, zum einen zur statistischen Vergleichbarkeit, zum anderen ausgehend von der Idee, dass bei 50% der maximalen Amplitude eine ausreichende Depolarisation der amygdalären Neurone erzielt werde. Gleiches gilt für die 60% zur LTD-Induktion. Hinzu kommt, dass hier eine Amplitudenreduktion im Verlauf des Experiments exakter festgehalten werden kann als bei 50%.

2.5.2. Basale Aktivität

Bei sämtlichen Messungen wurde zunächst die basale Aktivität (Baseline) bei oben erwähnten 50% bzw. 60% erstellt. Gereizt wurde alle 10 Sekunden mit der ermittelten Reizstärke, und jeweils 6 Reizantworten auf eine Minute gemittelt. Die Baseline wurde

für mindestens 15 Minuten (90 Einzelreize) bei Kontrollmessungen aufgezeichnet. Bei Messungen unter pharmakologischem Einfluss für mindestens 30 Minuten (180 Einzelreize). Die Bestimmung der basalen Aktivität diente zum einen dazu, die Stabilität des Feldpotenzials zu beurteilen, zum anderen aber auch, um einen eventuellen Einfluss des Pharmakons auf die Baseline beim Einwaschen aufzudecken und schließlich auch zur Beurteilbarkeit der Amplitudenveränderung im Verlauf der Messung.

2.5.3. HFS

Zur Induktion einer Langzeitpotenzierung (LTP) wurde ein starker Hochfrequenzstimulus (HFS) verwendet. Der HFS stellte eine Impulsserie von 100 Reizen im Abstand von 10 Millisekunden dar, die nach einem Intervall von 30 Sekunden wiederholt wurde (2x100 Hz). Eine Messung wurde als Langzeitpotenzierung gewertet, wenn eine Vergrößerung der Feldpotenzialamplitude um mindestens 20% zum Baseline-Wert über einen Zeitraum von 20 Minuten (Watanabe et al., 1995) erreicht wurde. Über mindestens 60 Minuten wurden dann die Veränderungen der Amplitude registriert und anschließend mit der Baseline verglichen und ausgewertet.

2.5.4. LFS / PP-LFS

Zum Auslösen der Langzeitdepression (LTD) wurden zwei niederfrequente Reizungen verwendet: erstens die 15-minütige Niederfrequenzreizung (LFS), die aus 900 Reizen (1 Hz) bestand, zweitens die ebenfalls 15-minütige gepaarte Niederfrequenzreizung (PP-LFS), bei der zwei Reize zeitlich dicht aufeinanderfolgend appliziert wurden. Es wurden verschiedene Intervallzeiten zwischen erstem und zweitem Reiz gewählt (30ms, 40ms, 50ms, 60ms) und deren unterschiedliche Effekte miteinander verglichen.

2.5.5. Paired-pulse

Paired-pulse-Stimulierung (PP, sog. Doppelpulsreizung) erfolgt durch Reizung mittels zwei dicht aufeinanderfolgender Stimuli. Das Interstimulusintervall wird nach sechs Doppelreizungen jeweils um 10 ms erhöht (10, 20,..., 100 Millisekunden). Zusätzlich wurde das Antwortverhalten auch bei Interstimulusintervallen von 200 und 500 ms bestimmt. Zur Auswertung wurden je sechs Doppelreizungen bei gleichem Intervall gemittelt und die ermittelte Amplitude des zweiten Potentials durch die des ersten dividiert. Werte größer 1 wurden als Paired-Pulse-Fazilitierung (PPF), Werte kleiner 1 als Paired-Pulse-Depression (PPD) gewertet. Die Messungen erfolgten vor und nach LFS oder HFS bzw. vor und nach Einwaschen eines Pharmakons immer am selben Präparat.

2.5.6. Kontrollmessungen

Der Ablauf von Kontrollmessungen ohne pharmakologischen Einfluss erfolgte immer auf folgende Weise: Nach Auffinden eines Potentials wurde eine Input/Output-Kurve erstellt, PP-Stimulierung durchgeführt, eine 20-minütige Baseline erstellt, daraufhin HFS/LFS appliziert und 60 Minuten gemessen. Schließlich erfolgte eine PP-Stimulierung.

2.5.7. Messungen unter pharmakologischem Einfluss

Bei Messungen unter pharmakologischem Einfluss wurde zunächst ebenfalls eine Input/Output-Kurve aufgezeichnet, die PP-Stimulierung untersucht und dann unter 30 minütiger Messung das Pharmakon eingewaschen. Es erfolgte ein erneutes Erstellen einer Input/Output-Kurve, PP-Stimulierung, das Erstellen der Baseline, sowie das Applizieren von HFS/LFS. Nach 60-minütiger Messung wurde eine letzte PP-Stimulierung durchgeführt.

2.6. Substanzen und Konzentrationen

2.6.1. Carbogengas

Das Wasserbad unterhalb der Messplätze wurde kontinuierlich mit einem 95-prozentigem O₂ und 5-prozentigem CO₂ Carbogengasgemisch begast. Dadurch entstand eine gesättigte Atmosphäre die über die beiden Öffnungen die Hirnschnitte erreichte.

Das Carbogengas wurde auch zur Aufrechterhaltung eines pH-Werts von 7,4 verwendet.

2.6.2. ACSF-Lösung

ACSF (artificial cerebrospinal fluid) diente als Nährlösung und hatte folgende Zusammensetzung: 124 mM NaCl; 3 mM KCl; 1,6 mM CaCl₂; 1,8 mM MgSO₄; 1,25 mM NaH₂PO₄; 10mM Glukose und 26 mM NaHCO₃. Bei 35° Celsius wurde diese mit Carbogengas gesättigt und mit einer Flussgeschwindigkeit von 1,5 ml/min dauerhaft den Kammern und damit den Schnitten zugeführt. Die Applikation sämtlicher Pharmaka erfolgte nach Verdünnung in ACSF-Lösung.

2.6.3. Co 101244

Co 101244 Hydrochlorid (1-[2-(4-hydroxy-phenoxy)-ethyl]-4-(4-methyl-benzyl)-piperidin-4-ol) ist ein selektiver NR2B-Antagonist (Zhou et al.,1999) mit einem relativen Molekulargewicht von 382,41. Diese Substanz wurde in einer Konzentration von 1 µM verwendet.

2.6.4. Ro 04-5595

Ebenfalls als NR2B Antagonist wurde Ro 04-5595 (1-[2-(4- Chlorophenyl)ethyl]-1,2,3,4-tetrahydro-6-methoxy-2-methyl-7-isoquinolinol hydrochlorid; K_i 31nM) in einer Konzentration von 10 μ M verwendet (Mutel et al., 1998).

2.6.5. NVP AAM077

NVP AAM077 ([R-[(S)-1-(4-bromo-phenyl)-ethylamino]-2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalin-5-yl]-methyl)-Phosphonsäure; NVP) diente als NR2A-spezifischer Antagonist. Gegenüber rekombinanten Rezeptoren in HEK293 Zellen zeigte NVP AAM077 eine etwa 14-fach höhere Selektivität für NR2A als für NR2B-Rezeptoren (Bartlett et al., 2007). Um NR2A- von möglichen NR2B-Effekten zu differenzieren, wurde NVP AAM077 in verschiedenen Konzentrationen getestet (0,05 μ M; 0,1 μ M; 0,4 μ M NVP).

2.6.6. Übersicht über die Pharmaka

Substanz	Relatives Molekulargewicht	Konzentration in μ M	Rezeptorselektivität	Hersteller
Co	382,41	1	selektiver NR2B-Antagonist	Tocris Bioscience (Bristol, UK)
Ro	368.3	10	selektiver NR2B-Antagonist	Tocris Bioscience (Bristol, UK)
NVP	454	0,05; 0,1; 0,4	NR2A- Antagonist (konzentrations-abhängig auch NR2B- Antagonist)	Novartis Pharma (Basel, Switzerland)

Tabelle 2.1.: Name und wichtige Eigenschaften der verwendeten Substanzen

2.7. Datenauswertung

Aufgezeichnet wurden sämtliche Daten mit Hilfe des Programms Signal® 3.1 (Cambridge Electronic Design Ltd, UK) und auf den Festplatten gespeichert. Während der Aufzeichnungen wurden sämtliche Ereignisse auf dem Monitor dargestellt, sodass schon während des Messens eine visuelle Abschätzung erfolgen konnte.

Für die exakte Auswertung der Daten wurden diese zunächst offline in das Programm Signal® geladen. Mittels zweier von Herrn Dr. Siegmund erstellten Scriptfiles, konnte hier die tangentielle Amplitude (mV) der auf jeweils eine Minute gemittelten Feldpotenziale unter Sichtkontrolle offline ermittelt werden.

Die erste Auswertung der so gewonnenen Rohdaten erfolgte mit dem Datenkalkulationsprogramm Microsoft Excel®. Hier wurde die prozentuale Änderung der Feldpotenzialamplitude nach LFS/HFS-Reizung im Vergleich zur basalen Aktivität bestimmt. Für die Paired-Pulse-Analyse wurde das Verhältnis aus der Amplitude des zweiten und des ersten Feldpotenzials gebildet.

Die Zusammenfassung, graphische Darstellung und statistische Auswertung wurde anschließend mit dem Programm GraphPad Prism 4® durchgeführt.

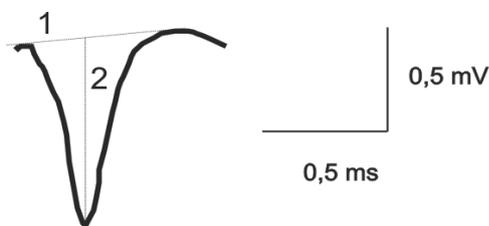


Abbildung 2.4.: Beispielpotenzial

Für die tangentielle Amplitudenbestimmung wurde die Tangente zwischen den beiden Maxima eines Potentials gewählt (1). Anschließend wurde ein Lot (2) zum Potenzialminimum gefällt und die Strecke gemessen. Sie entspricht der Amplitudengröße in mV.

2.8. Statistik

Es wurden jeweils die letzten 12 Minuten vor HFS/LFS gemittelt und prozentual zu den Werten nach HFS/LFS in Relation gesetzt. Um verschiedene Kurven statistisch vergleichen zu können, wurde der Mittelwert von der 57.- 60. Minute nach HFS/LFS berechnet. Neben dem Mittelwert wurde auch der Fehler berechnet. Da bei dem geringen Stichprobenumfang nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte, wurden nichtparametrische Tests bei der statistischen Analyse gewählt. Der

Wilcoxon-Test diente zur Analyse verbundener Stichproben, wie der Analyse des Paired-Pulse-Verhaltens vor und nach Einwaschen eines Pharmakons und der Amplitude vor und nach LFS bzw. HFS, da diese Messungen im selben Hirnschnitt in einer Ableitung durchgeführt wurden. Für die Betrachtung zweier unabhängiger Stichproben, wie LFS bzw. HFS unter Kontrollbedingungen im Vergleich zu Messungen unter pharmakologischem Einfluss, wurde der Mann-Whitney-U-Test gewählt; hier wurden Ergebnisse aus verschiedenen Hirnschnitten miteinander verglichen. Wie bei biologischen Prozessen üblich, wurde das Signifikanzniveau bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p < 0,05$) gewählt. Wenn also Werte von $p < 0,05$ bestimmt wurden, konnte von einer Signifikanz ausgegangen werden.

2.9. Methodenkritik

Von insgesamt 264 durchgeführten Messungen wurden 243 als erfolgreich angesehen und deren Ergebnisse hier verwendet. Hauptursache für den Abbruch einer Messung war die Erschütterung, die ausgelöst wurde, wenn sich Kondenswasser in Form eines Tropfens an den Reiz- oder Ableitelektroden absetzte, nach einiger Zeit löste und auf den Schnitt traf. Die Erschütterung führte meist zur Delokalisation der exakten Elektrodenpositionierung und damit zum Verlust des Potenzials. Es wurde jedoch verstärkt auf diese Tropfenbildung geachtet und dieser, ohne eine Erschütterung auszulösen, regelmäßig von den Elektroden mittels eines Wattestäbchens entfernt. Dabei kam es gerade in der Anfangsphase jedoch auch zu einigen wenigen Abbrüchen. Zu erwähnen ist weiterhin, dass die Präparation des Gehirns einige Übung und Zügigkeit erfordert, um hypoxiebedingte zelluläre Schäden zu vermeiden, sodass die ersten 5 Versuchstage kaum qualitativ verwertbare Ergebnisse förderten. Von besonderer Bedeutung waren akzidentelle Verletzungen im Bereich des ento- und perirhinalen Kortex. Diese konnten dazu führen, dass ein erfolgreiches Messen verhindert wurde, da in diesen Arealen Projektionen verlaufen, die die laterale Amygdala über die externe Kapsel erreichen (von Bohlen und Halbach & Albrecht, 2002). Ein weiteres Problem der Präparation ergibt sich aus der Stressreaktion und der damit bedingten Veränderungen in Bezug auf Mediatoren aber auch Zellstruktur, die durch die Traumatisierung zwangsläufig hervorgerufen wird. Es wurde versucht, diesen

Einfluss durch ein zweistündiges Zeitfenster zwischen Präparation und der ersten Messung zu minimieren, ganz auszuschließen ist er jedoch nicht.

Die Amygdala ist sowohl in ihrer makroskopischen als auch in der mikroskopischen Struktur eher inhomogen und gleicht beispielsweise nicht der klaren strukturellen Anordnung des Hippocampus. Dies birgt einige Unklarheiten bei der Untersuchung von Feldpotenzialen sowie deren Interpretation.

Die Entstehung evozierter Feldpotenziale beruht auf der Auslösung transmembranaler Ladungsverschiebungen durch verschiedene membranständige Ionenkanäle, wodurch extrazellulär Ausgleichsströme hervorgerufen werden. Im Extrazellulärraum befindet sich ein gewisser Widerstand, durch den es zu einem Spannungsabfall kommt, der sich als Feldpotenzial messen lässt. Durch dieses Feldpotenzial kann, auch ohne intrazelluläre Ableitung, auf die bei einer synaptischen Aktivierung ablaufenden Membranprozesse geschlossen werden. Im Bereich der Amygdala zeigen die Feldpotenziale (fEPSP, **F**ield **E**xcitatory **P**ost **S**ynaptic **P**otential) nach einem auslösenden Reizartefakt mit einer Latenzzeit um 5 ms eine negative Komponente des aufgezeichneten Potenzials.

Diese sind jedoch abzugrenzen von Populationsspikes (Pop-Spikes), die bei einer überschwelligem Reizung auftreten und eine Entladung synaptisch-aktivierter Neurone einer Neuronenpopulation darstellt. Graphisch zeichnet sich dieses eher durch einen biphasischen Charakter aus, bestehend aus einer negativen und einer sich anschließenden positiven Komponente.

Die Größenveränderungen, die während einer LTP oder LTD am Potenzial auftreten, können auf verschiedenen strukturellen Korrelaten beruhen.

So ist beispielsweise die Vergrößerung der Amplitude des fEPSPs Ausdruck von Veränderungen der Rezeptoren und Ionenkanäle, während die Größenzunahme eines Pop-Spikes zum einen an einer stärkeren Rekrutierung der auf einen Reiz antwortenden Neurone liegen kann, zum anderen auch auf einer Zunahme der Entladungen einer gleichbleibenden Neuronenpopulation beruhen kann.

Aufgrund der inhomogenen Struktur der Amygdala, ist eine strikte Trennung der beiden Phänomene hier nicht möglich, sodass die Potenziale meist beide Charakteristiken enthielten: ein negatives fEPSP Ereignis gefolgt von einer positiven Pop-Spike Komponente.

Generelle Probleme der in-vitro Untersuchung treffen auch auf unsere Methode zu. Die Narkose des Tieres, die Hypoxie bei der Präparation, die Traumatisierung des

Gewebes sowie das veränderte Milieu in Bezug auf Hormone und Mediatoren stellen klare Nachteile der in-vitro-Technik dar. Jedoch sind im Gegensatz zu in-vivo-Techniken eine exakte Platzierung der Elektroden unter lupenvisueller Kontrolle, sowie die Badapplikation eines Pharmakons mit bekannter Konzentration direkt an die Zellen möglich. Weiterhin lässt sich mit sehr geringen Reizstärken arbeiten (0,5 V bis 7 V). Auch das individuelle Anfertigen der Reiz- und Ableitelektroden stellt eine potentielle Fehlerquelle dar. Dem wurde jedoch versucht zu begegnen, in dem sämtliche Reizelektroden von einem Untersucher hergestellt wurden und regelmäßig der Widerstand der Elektroden überprüft wurde.

3. Ergebnisse

3.1. Input-Output-Kurven

Um Aussagen zur basalen Erregbarkeit treffen zu können, werden nachfolgend sämtliche Input-Output-Kurven dargestellt, die während der Experimente aufgezeichnet wurden. Diese Kurven dienen einerseits zur Ermittlung der optimalen Reizstärke für nachfolgende LTP- und LTD-Messungen, andererseits wurden sie aufgezeichnet, um den Einfluss der Pharmaka auf die basale Transmission abzuschätzen. Die Input-Output-Kurven werden zunächst nach Reizort sortiert, um dann die Einflüsse der verwendeten Pharmaka zu betrachten. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Wilcoxon-Test, da es sich um abhängige Stichproben handelt, d.h. bei einer Ableitung wurde die Input/Output-Kurve jeweils vor und nach Einwaschen der entsprechenden Substanz analysiert. Nur beim Vergleich der Inputspezifität (I/O-Kurven bei Reizung der Fasern innerhalb des lateralen Kerns (IN) versus Reizung der externen Kapsel (EC)) wurde der Mann-Whitney-Test verwendet.

3.1.1. Input-Output-Kurven bei IN-Reizung

Bei intranukleärer Reizung konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollmessungen und denen unter Co 101244 (Co) Applikation ermittelt werden ($n = 24$; $p > 0,05$). Bei Verwendung eines alternativen NR2B-Antagonisten (Ro 04-5595) konnten ebenfalls keine statistisch signifikanten Veränderungen festgestellt werden ($n = 18$; $p > 0,05$).

Ähnlich verhält es sich auch nach Applikation des NR2A-Antagonisten NVP AAM077 in verschiedenen Konzentrationen. Bei Verwendung von $0,05 \mu\text{M}$ konnten keine signifikanten Veränderungen ermittelt werden ($n = 20$; $p > 0,05$); insignifikante Ergebnisse wurden auch nach Einwaschen von $0,1 \mu\text{M}$ NVP AAM077 ($n = 28$; $p > 0,05$) erzielt. In der höheren Konzentration von $0,4 \mu\text{M}$ konnten auch in einer großen Stichprobe keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden ($n = 60$; $p > 0,05$).

Die basale Transmission der Neurone der lateralen Amygdala ist somit bei intranukleärer Stimulierung weder von der NR2A- noch von der NR2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors abhängig.

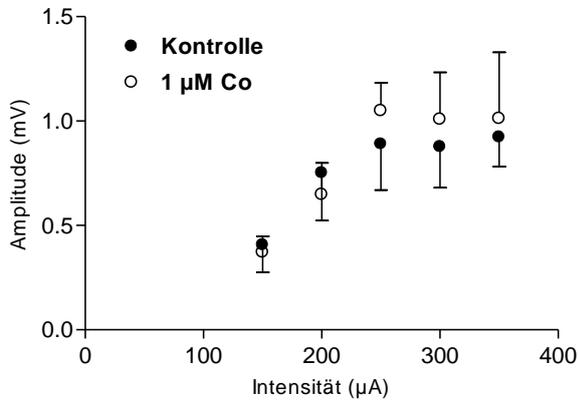


Abb. 3.1.: Vergleich der Input-Output-Kurven unter Kontrollbedingungen und unter Applikation von 1 µM Co 101244 bei intranukleärer Reizung (n = 24; p > 0,05).

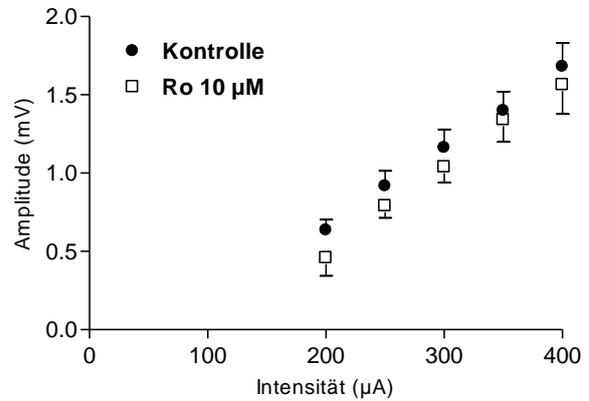


Abb. 3.2.: Vergleich der Input-Output-Kurven unter Kontrollbedingungen und unter Applikation von 10 µM Ro 04-5595 bei intranukleärer Reizung (n = 18; p > 0,05).

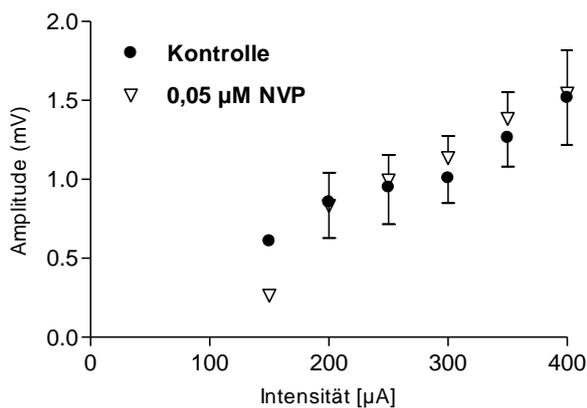


Abb. 3.3.: Vergleich der Input-Output-Kurven unter Kontrollbedingungen und unter Applikation NVP AAM077 (0,05 µM) bei intranukleärer Reizung (n = 20; p > 0,05).

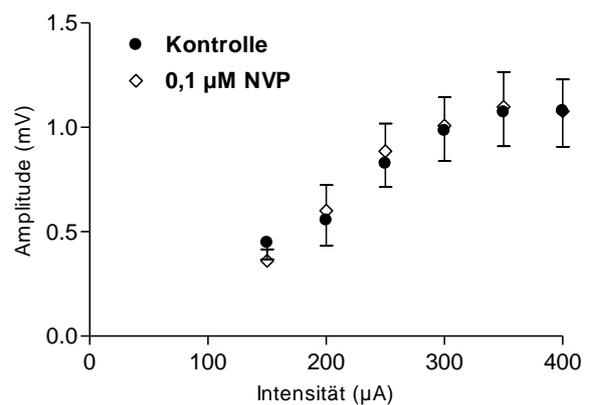


Abb. 3.4.: Vergleich der Input-Output-Kurven unter Kontrollbedingungen und unter Applikation NVP AAM077 (0,1 µM) bei intranukleärer Reizung (n = 28; p > 0,05).

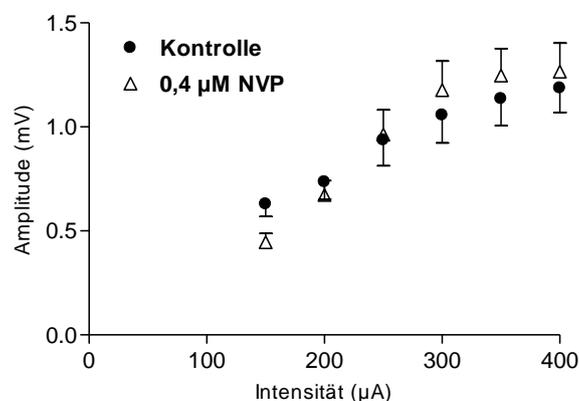


Abb. 3.5.: Vergleich der Input-Output-Kurven unter Kontrollbedingungen und unter Applikation NVP AAM077 (0,05 µM) bei intranukleärer Reizung (n = 60; p > 0,05).

3.1.2. Input-Output-Kurven bei EC-Reizung

Bei Reizung der externen Kapsel konnte die Gegenüberstellung der Input-Output-Kurven von Kontrollmessungen und unter Co 101244 Applikation ähnlich wie bei intranukleärer Stimulierung keine signifikanten Unterschiede zeigen ($n = 20$; $p > 0,05$).

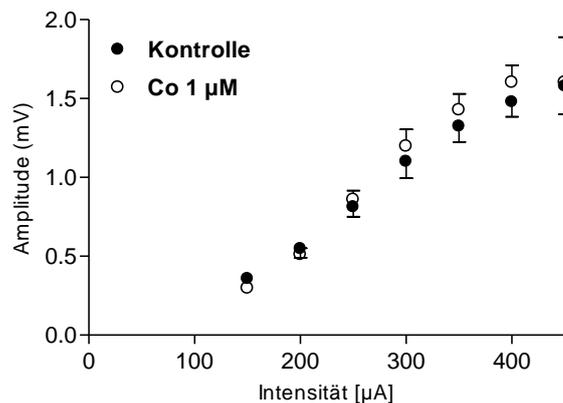


Abb. 3.6.: Vergleich der Input-Output-Kurven unter Kontrollbedingungen und unter 1 µM Co 101244-Applikation bei Stimulierung der externen Kapsel ($n = 20$; $p > 0,05$).

Auch bei Perfusion mit NVP AAM077 kam es zu keiner Beeinflussung der basalen Erregbarkeit. Weder eine Konzentration von 0,05 µM des NR2A-Antagonisten ($n = 24$; $p > 0,05$) noch eine Konzentration von 0,4 µM ($n = 18$; $p > 0,05$) führte zu einer signifikanten Verschiebung der I/O-Kurve.

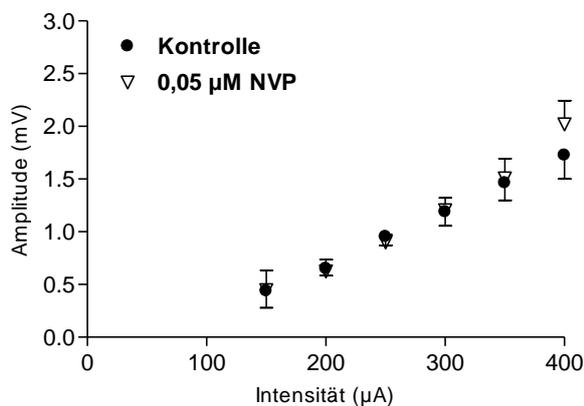


Abb. 3.7.: Vergleich der Input-Output-Kurven unter Kontrollbedingungen und unter Applikation von NVP AAM077 in einer Konzentration von 0,05 µM bei Stimulierung der externen Kapsel ($n = 24$; $p > 0,05$).

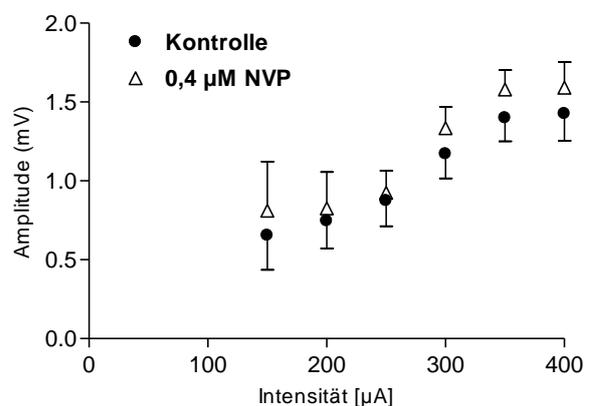


Abb. 3.8.: Vergleich der Input-Output-Kurven unter Kontrollbedingungen und unter Applikation von NVP AAM077 in einer Konzentration von 0,4 µM bei Stimulierung der externen Kapsel ($n = 18$; $p > 0,05$).

Die basale Transmission ist somit zumindest beim adulten Tier auch bei Stimulation von Fasern aus dem entorhinalen und perirhinalen Kortex, die den lateralen Kern durch die externe Kapsel erreichen, weder von der NR2A- noch von der NR2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors abhängig.

3.1.3. Vergleich der Input-Output-Kurven beider Reizpositionen

Die Gegenüberstellung der beiden Reizpositionen beim Vergleich der Input-Output-Kurven ergab keine signifikanten Unterschiede (IN: n = 46; EC: n = 10; $p > 0,05$). Die basale Transmission und die Größe der Feldpotenzialamplituden zeigen demnach keine Differenzen in Abhängigkeit von intranukleärer Reizung oder Stimulierung der externen Kapsel. Der schnittpunktartige Verlauf der Kurven lässt auf eventuelle unterschiedliche Einflüsse niedriger (100 - 250 μA) und hoher (300 - 450 μA) Reizintensitäten schließen. Die separate Gegenüberstellung der niedrigen Reizintensitäten zeigte mit einem p-Wert von über 0,05 jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede, während bei höheren Reizintensitäten (300 - 450 μA) die Unterschiede signifikant waren ($p < 0,05$), was vermutlich mit einer unterschiedlichen Aktivierung in der Nähe gelegener GABAerger Interneurone im Zusammenhang steht.

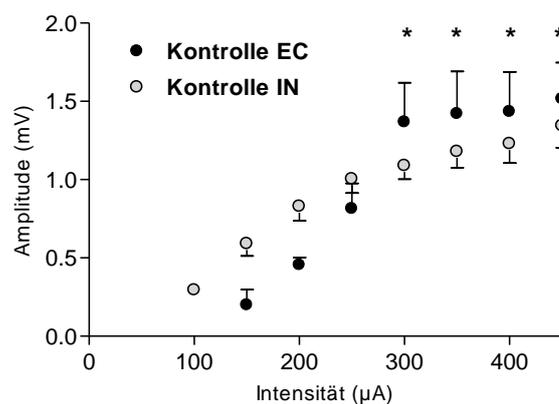


Abb. 3.9.: Vergleich der Input-Output-Kurven unter Kontrollbedingungen bei Reizung der externen Kapsel bzw. bei intranukleärer Stimulation (IN: n = 46; EC: n = 10; 100 - 250 μA : $p > 0,05$; 300 - 450 μA : $p < 0,05$).
* = signifikanter Unterschied $p < 0,05$

3.2. Langzeitpotenzierung

Die Darstellung der Ergebnisse der Experimente zur Untersuchung der Langzeitpotenzierung (LTP) erfolgt, ähnlich der Demonstration der Input-Output-Kurven, zunächst gegliedert nach Reizort, um dann den Einfluss der jeweiligen Pharmaka zu betrachten.

3.2.1.1. Langzeitpotenzierung bei intranukleärer Reizung

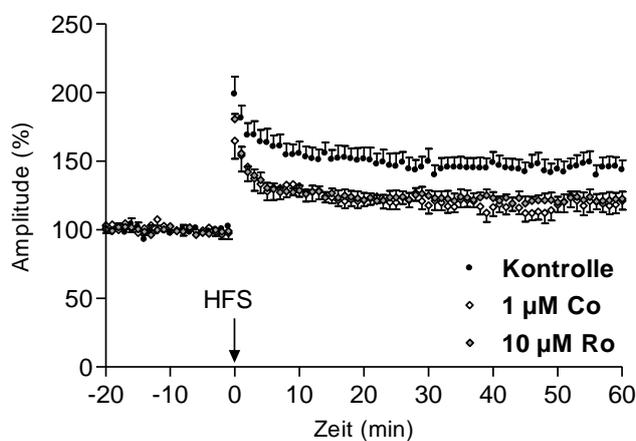


Abb. 3.10.: Vergleich der Langzeitpotenzierung unter Kontrollbedingungen und unter Gabe von 1 μM Co 101244 und 10 μM Ro 04-5595 bei intranukleärer Reizung.

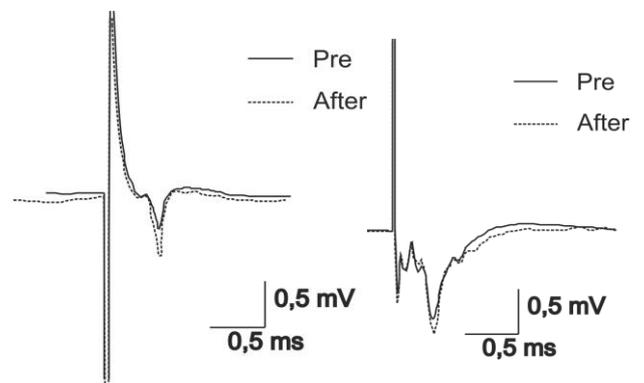


Abb. 3.11.: Beispielpotenzial unter Kontrollbedingungen (durchgezogene Linie: 5 min vor Induktion des HFS; gestrichelte Linie: 60 min nach HFS).

Abb. 3.12.: Beispielpotenzial unter Wirkung von Co 101244.

Erste Kontrollmessungen zeigten 60 Minuten nach der hochfrequenten Stimulation (HFS) bei intranukleärer Applikation eine stabile LTP mit reproduzierbarer Steigerung der Feldpotenzialamplituden um ca. 50 %. Unter allen verwendeten Pharmaka konnte eine LTP-Induktion beobachtet werden. Es kam allerdings zu einer Reduzierung der Feldpotenzialamplituden.

Die Blockierung der NR2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors wurde zuerst durch Badapplikation von 1 μM Co 101244 realisiert. Hier zeigte sich 60 Minuten nach der hochfrequenten Stimulation eine LTP mit signifikant geringerer Feldpotenzialamplitude

im Vergleich zu den Kontrollbedingungen. Auch ein zweiter NR2B Antagonist, Ro 04-5595, in einer Konzentration von 10 μM appliziert, löste eine reduzierte LTP aus (Kontrolle: $145,3 \pm 7,2\%$ [$n = 6$] vs. 10 μM Ro: $121,9 \pm 5,2\%$ [$n = 7$] und 1 μM Co: $119,1 \pm 6,1\%$ [$n = 8$]; $p < 0,05$; Abb.: 3.10.).

Die Größe der Potenzialamplitude unter Einfluss von Ro unterschied sich 60 Minuten nach HFS nicht signifikant von der unter dem Einwirken von Co ($p > 0,05$).

Unter den verschiedenen Kontrollmessungen fanden sich ebenfalls nur insignifikante Unterschiede ($145,3 \pm 7,2\%$ [$n = 6$] vs. $151,8 \pm 6,7\%$ [$n = 7$]; $p > 0,05$).

Die Blockade der NR2A-Untereinheit erfolgte durch NVP AAM077 in den Konzentrationen 0,1 μM sowie 0,4 μM . Unter diesen Bedingungen erzeugte die hochfrequente Stimulation zwar eine LTP, jedoch mit signifikant kleinerer Feldpotenzialamplitude als unter Kontrollbedingungen (Kontrolle: $151,8 \pm 6,7\%$ [$n = 7$] vs. 0,1 μM NVP: $127,5 \pm 2,5\%$ [$n = 7$] und 0,4 μM NVP: $125,1 \pm 4,1\%$ [$n = 12$]; $p < 0,05$; Abb.: 3.13.).

Die Abbildung 3.16. zeigt sämtliche LTP-Messungen 60 Minuten nach intranukleärer hochfrequenter Stimulation (HFS) im Vergleich zwischen Kontrollbedingungen und nach Applikation der verschiedenen Antagonisten der NMDA-Rezeptoruntereinheiten.

Daraus wird deutlich, dass sowohl die Blockade des NR2A als auch die der NR2B Untereinheit zu einer deutlich geringeren LTP führt als unter Kontrollbedingungen. Demnach ist das Vorhandensein beider Untereinheiten eine Voraussetzung für eine optimale Langzeitpotenzierung durch hochfrequente intranukleäre Stimulierung.

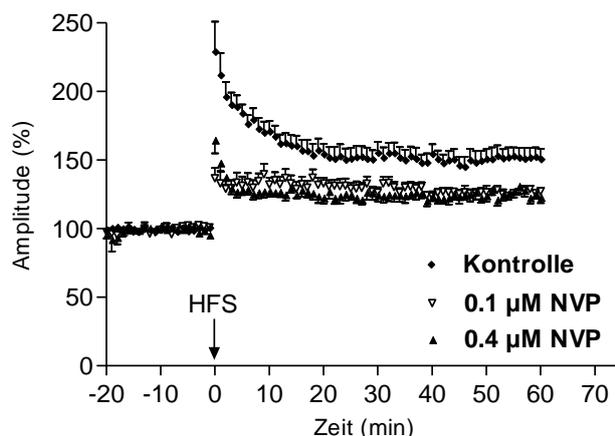


Abb. 3.13.: Vergleich der Langzeitpotenzierung unter Kontrollbedingungen und unter Gabe von NVP AAM077 in den Konzentrationen 0,1 μM und 0,4 μM .

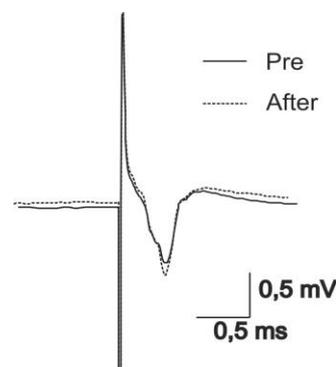


Abb. 3.14.: Beispielpotenzial unter 0,1 μM NVP AAM077 Einfluss.

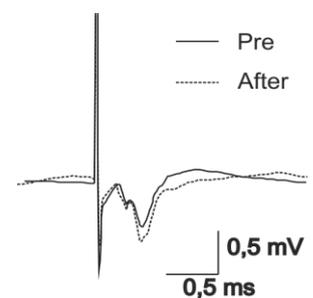


Abb. 3.15.: Beispielpotenzial unter 0,4 μM NVP AAM077 Einfluss.

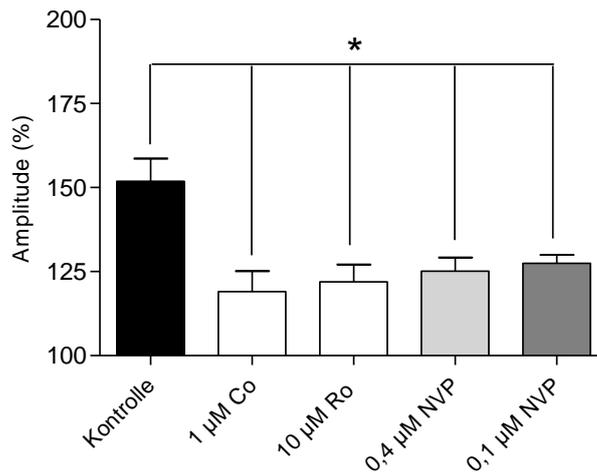


Abb. 3.16.: Das Balkendiagramm stellt die durchschnittlichen Veränderungen nach Induktion von LTP unter dem Einfluss verschiedener Pharmaka dar.

* = signifikanter Unterschied $p < 0,05$

3.2.1.2. Paired-Pulse-Verhalten bei Langzeitpotenzierung durch intranukleäre Reizung

Um Hinweise auf eine mögliche präsynaptische Induktion der LA-LTP durch intranukleäre Reizung zu finden, untersuchten wir die Antworten auf gepaarte Reizungen mit verschiedenen Instimulusintervallen. Bei Zusammenfassung aller unter Kontrollbedingungen aufgezeichneten Paired-Pulse-Messungen bei intranukleärer Reizung vor HFS, ergab sich eine Paired-Pulse-Fazilitierung (Ratio > 1) bei den Reizintervallen zwischen 20 und 70 ms. Bei Abständen von 10 ms sowie größer gleich 80 ms konnte hingegen eine Paired-Pulse-Depression (Ratio < 1) beobachtet werden. Das Maximum des Verhältnisses konnte bei einem Reizintervall von 30 ms mit $1,22 \pm 0,08$ beobachtet werden, während das Minimum bei 200 ms mit $0,79 \pm 0,06$ lag ($n = 52$; Abb.3.17.).

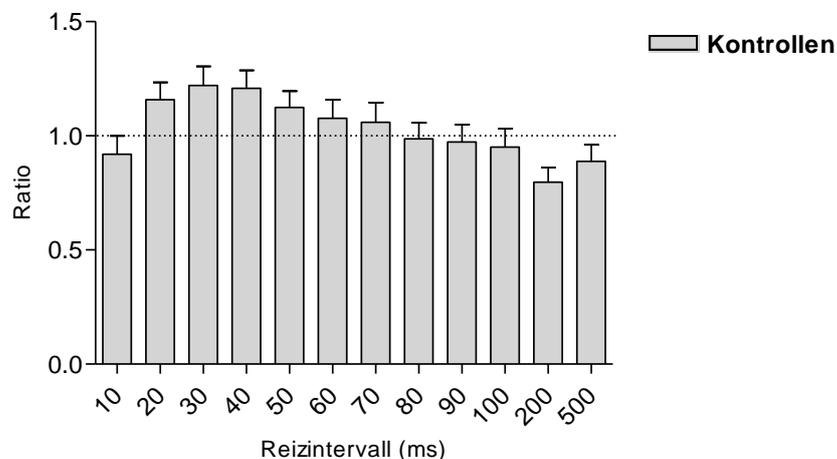


Abb. 3.17.: Darstellung des Paired-Pulse-Verhaltens im lateralen Kern der Amygdala bei intranukleärer Reizung unter Kontrollbedingungen ($n = 52$).

60 Minuten nach HFS-induzierter LTP zeigten sich bei intranukleärer Reizung unter Kontrollbedingungen im Vergleich zur Ausgangssituation keine signifikanten Veränderungen des Doppelpulsverhaltens ($n = 6$, $p > 0,05$; Abb.: 3.18.).

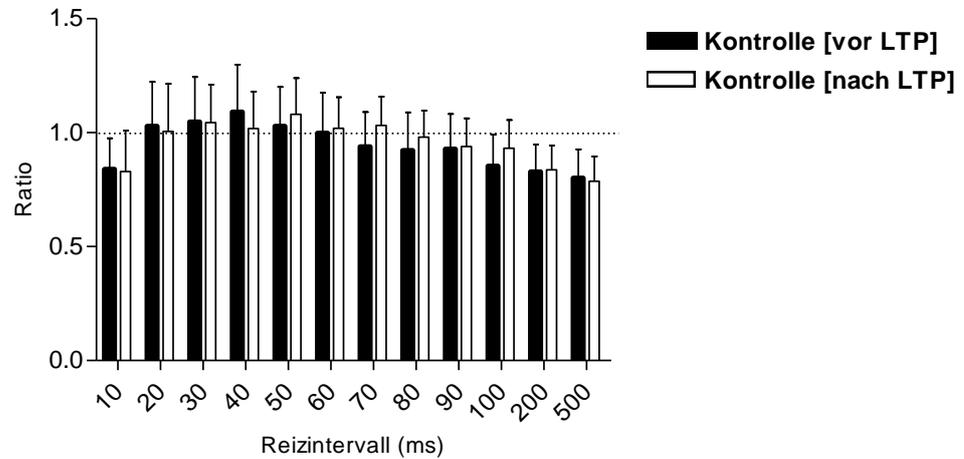


Abb. 3.18.: Vergleich des Paired-Pulse-Verhaltens vor Induktion einer LTP unter Kontrollbedingungen und 60 Minuten danach.

3.2.2.1. Langzeitpotenzierung bei Reizung der externen Kapsel

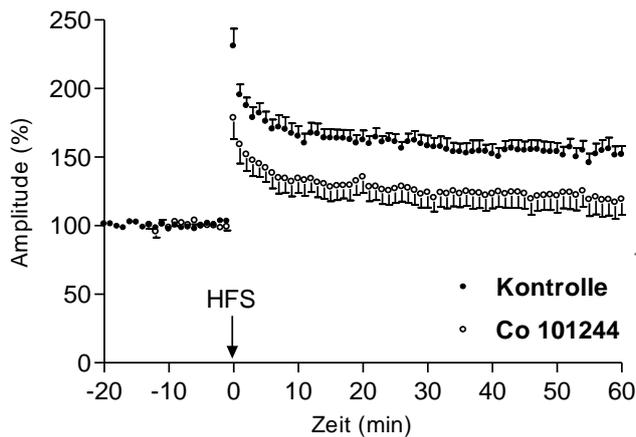


Abb. 3.19.: Vergleich der Langzeitpotenzierung unter Kontrollbedingungen und unter Gabe von Co 101244.

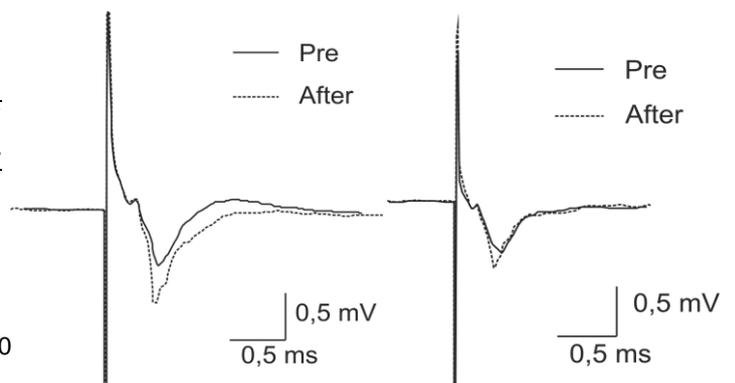


Abb. 3.20.: Beispielpotenzial unter Kontrollbedingungen.

Abb. 3.21.: Beispielpotenzial unter Co 101244.

Die Kontrollmessungen zeigten 60 Minuten nach HFS der Fasern der externen Kapsel eine signifikante LTP ($153,3 \pm 7,2\%$ [$n = 7$]). Auch für diesen Reizort konnte ähnlich wie bei den Messungen nach intranukleärer Stimulation unter allen applizierten Pharmaka eine LTP in verschiedenem Ausmaß aufgezeichnet werden.

Zunächst wurde die NR2B-Untereinheit durch $1 \mu\text{M}$ Co 101244 blockiert und ebenfalls eine LTP durch HFS appliziert. Dabei war die Größe der Feldpotenzialamplitude 60 Minuten nach HFS signifikant kleiner als unter Kontrollbedingungen (Co: $118,4 \pm 11,6\%$ [$n = 10$]; $p < 0,05$; Abb. 3.19.).

Unter dem Einfluss von NVP AAM077 war ebenfalls eine LTP zu beobachten. Es zeigte sich jedoch eine konzentrationsabhängige signifikante Reduktion der Feldpotenzialamplitude im Vergleich zu LTP-Messungen unter Kontrollbedingungen. Geringe Konzentrationen von NVP verursachten eine geringere Hemmung der LTP als unter Blockade der NR2B-Untereinheit (NVP $0,05 \mu\text{M}$: $139 \pm 8,7\%$ [$n = 12$]; $p < 0,05$; Abb. 3.22.).

Die Konzentrationserhöhung von NVP AAM077 auf $0,4 \mu\text{M}$ führte zu einer noch stärkeren Reduktion der Feldpotenzialamplitude im Vergleich zu den Kontrollmessungen der EC-LTP (NVP $0,4 \mu\text{M}$: $128,8 \pm 10,4\%$ [$n = 10$]; $p < 0,05$). Auch im Vergleich zwischen den Messungen unter dem Einfluss des gleichen NR2A-Antagonisten in einer Konzentration von $0,4 \mu\text{M}$ und $0,05 \mu\text{M}$ wurden die Unterschiede signifikant ($p < 0,05$).

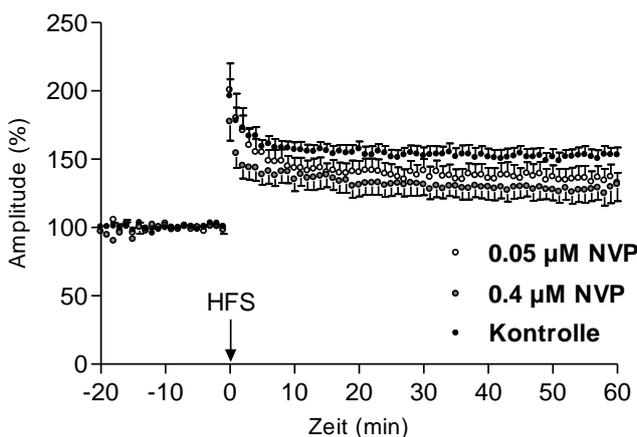


Abb. 3.22.: Vergleich der Langzeitpotenzierung unter Kontrollbedingungen und unter Gabe von NVP AAM077 in den Konzentrationen $0,05 \mu\text{M}$ und $0,4 \mu\text{M}$.

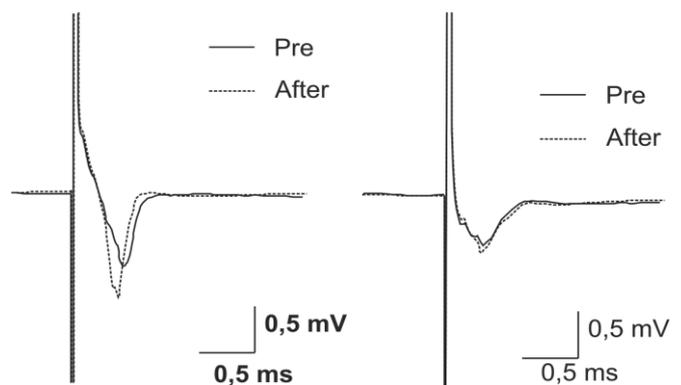


Abb. 3.23.: Beispielpotenzial unter $0,4 \mu\text{M}$ NVP AAM077 Einfluss.

Abb. 3.24.: Beispielpotenzial unter $0,05 \mu\text{M}$ NVP AAM077 Einfluss.

Sowohl die Blockade der NR2A-Untereinheit, als auch die NR2B-Blockierung resultieren somit in einer signifikanten Verminderung der LTP, wobei die Blockade der NR2B-Untereinheit einen stärkeren hemmenden Effekt auslöst (Abb. 3.25.). Auch bei kortikaler Reizung der Neurone in der lateralen Amygdala ist davon auszugehen, dass für die LTP nach HFS unter Kontrollbedingungen beide Untereinheiten vorhanden sein müssen.

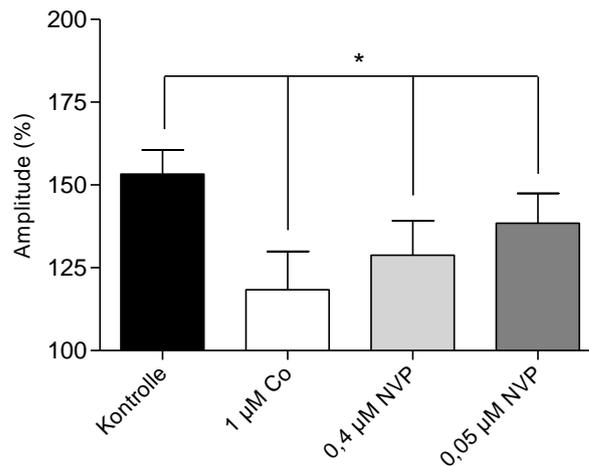


Abb. 3.25.: Das Balkendiagramm stellt die durchschnittlichen Veränderungen während der LTP unter dem Einfluss verschiedener Pharmaka dar.

* = signifikanter Unterschied $p < 0,05$

3.2.2.2. Paired-Pulse-Verhalten bei Langzeitpotenzierung durch EC-Reizung

Bei Zusammenfassung aller unter Kontrollbedingungen aufgezeichneten Paired-Pulse-Messungen bei Reizung der externen Kapsel ergab sich eine Paired-Pulse-Fazilitierung bei den Reizintervallen zwischen 20 und 80 ms. Bei Abständen von 10 ms sowie größer als 90 ms konnte hingegen eine Paired-Pulse-Depression beobachtet werden. Das Maximum der Ratio lag mit $1,24 \pm 0,06$ bei 40 ms. Das Minimum wurde bei einem Reizintervall von 10 ms mit $0,79 \pm 0,05$ beobachtet ($n = 36$; Abb.: 3.26.).

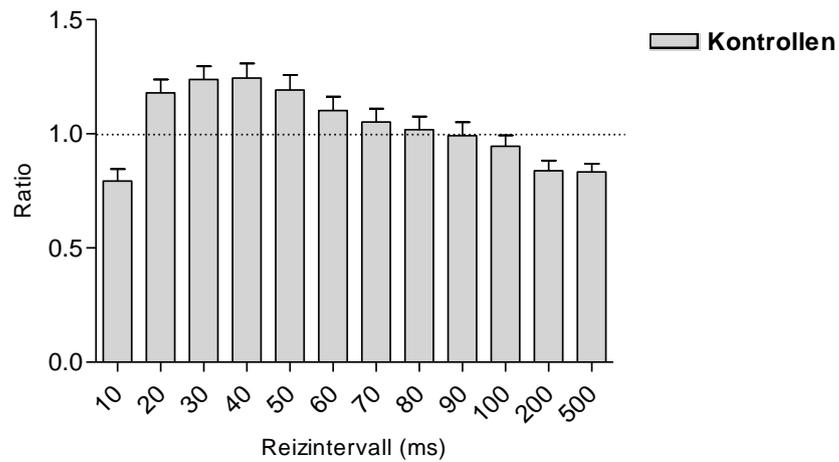


Abb. 3.26.: Darstellung des Paired-Pulse-Verhaltens im lateralen Kern der Amygdala bei Reizung der externen Kapsel unter Kontrollbedingungen (n = 36).

Die Abbildung 3.27. zeigt das Paired-Pulse-Verhalten unter Kontrollbedingungen vor der Applikation der HFS im Vergleich zu dem 60 Minuten nach HFS bei Reizung der externen Kapsel, wobei es hier keine statistisch signifikante Veränderung gab (n = 5, p > 0,05). Die maximale Potenzierung wurde mit $1,21 \pm 0,13$ bei 40 ms aufgezeichnet, die stärkste Depression mit $0,82 \pm 0,18$ bei 10 ms.

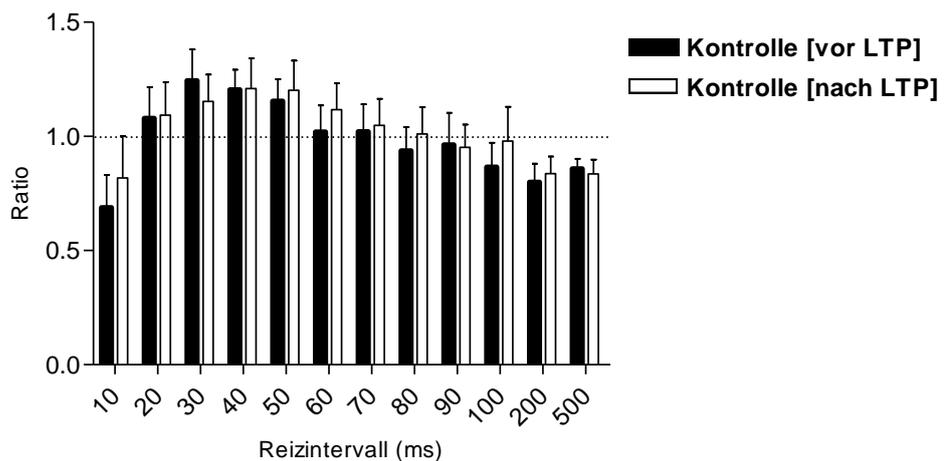


Abb. 3.27.: Vergleich des Paired-Pulse-Verhaltens vor Induktion einer LTP unter Kontrollbedingungen und 60 Minuten danach.

Wie in Abbildung 3.27 dargestellt, zeigten die Kontrollmessungen nach der LTP durch HFS keine Beeinflussung des Paired-Pulse-Verhaltens. Dieses Ergebnis manifestierte sich auch unter der Blockade der jeweiligen Untereinheiten des NMDA-Rezeptors. Nachfolgend sind die entsprechenden Daten dargestellt.

Unter dem Einfluss des NR2B-Antagonisten Co 101244 ergaben sich im Vergleich zu den Kontrollmessungen keine signifikanten Unterschiede zum unbehandelten Schnitt, zumindest in Bezug auf das Doppelpulsverhalten ($n = 10$, $p > 0,05$). Die stärkste Potenzierung betrug $1,34 \pm 0,10$ und lag bei 30 ms, während das Minimum der Ratio mit $0,92 \pm 0,09$ bei 500 ms lag (Abb.: 3.28.).

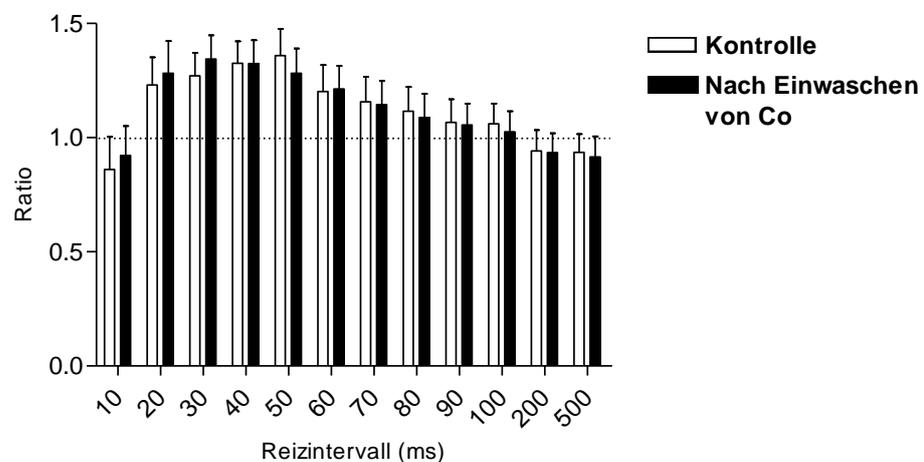


Abb. 3.28.: Vergleich des Paired-Pulse-Verhaltens unter Kontrollbedingungen und nach dem Einwaschen von Co 101244.

Die Applikation von NVP AAM077 erfolgte wieder in zwei verschiedenen Konzentrationen. Zunächst wurden $0,05 \mu\text{M}$ NVP eingewaschen, wobei sich keine signifikanten Veränderungen der Paired-Pulse-Ratio feststellen ließen ($n = 11$, $p > 0,05$). Das Maximum der Fazilitierung lag bei 30 ms und betrug $1,27 \pm 0,09$; die stärkste Reduzierung der Feldpotenzialamplituden auf den zweiten Reiz im Verhältnis zum ersten wurde für ein Interstimulusintervall von 200 ms bestimmt ($0,74 \pm 0,09$; Abb.: 3.29.).

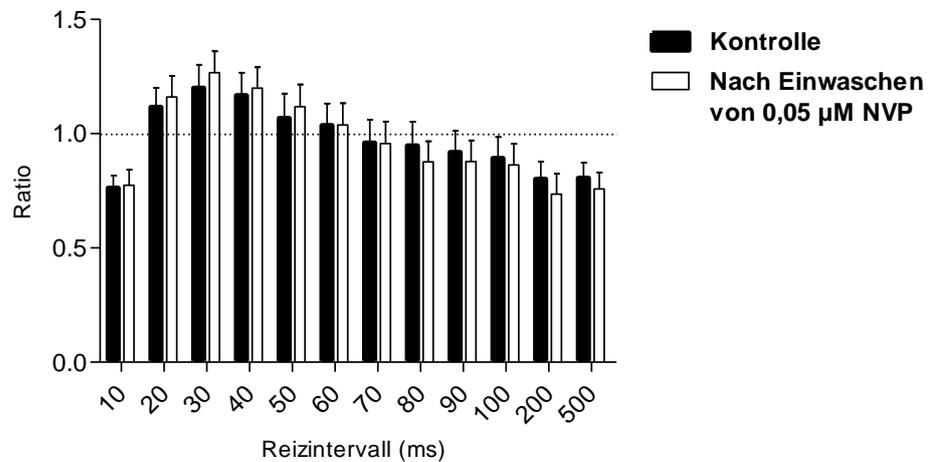


Abb. 3.29.: Vergleich des Paired-Pulse-Verhaltens unter Kontrollbedingungen und nach dem Einwaschen von NVP AAM077 0,05 µM.

Auch die Erhöhung der Konzentration von 0,05 µM auf 0,4 µM NVP AAM077 zeigte keine signifikanten Unterschiede im Paired-Pulse-Verhalten im Vergleich zum selben Hirnschnitt vor dem Einwaschen des NR2A-Antagonisten (n = 10, p > 0,05).

Die Werte der Ratio schwankten zwischen minimal $0,77 \pm 0,07$ bei 500 ms und maximal $1,28 \pm 0,14$ bei 30 ms (Abb.: 3.30.).

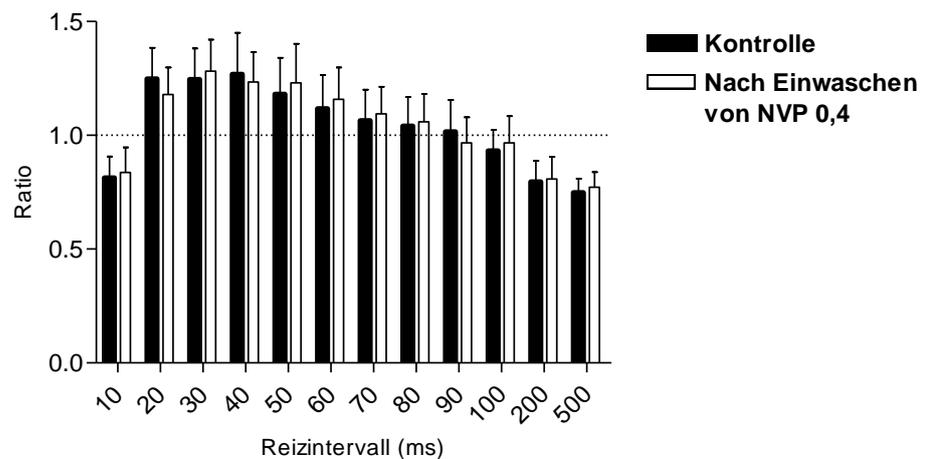


Abb. 3.30.: Vergleich des Paired-Pulse-Verhaltens unter Kontrollbedingungen und nach dem Einwaschen von NVP AAM077 0,4 µM.

3.2.3. Langzeitpotenzierung im Vergleich beider Reizpositionen

Es konnte zunächst gezeigt werden, dass sowohl durch Stimulierung der Fasern der externen Kapsel, als auch durch intranukleäre Reizung die Induktion einer LTP im lateralen Kern der Amygdala durch hochfrequente Stimulierung (HFS) möglich ist.

Bei Betrachtung der Kontrollmessungen konnten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Größe der Feldpotenzialamplitude 60 Minuten nach HFS ermittelt werden. ($p > 0,05$; Abb.: 3.31., 3.32.)

Die Amplitude betrug bei intranukleärer Stimulation nach 60 Minuten durchschnittlich $151,84 \pm 6,75\%$ ($n = 7$) der Ausgangsamplituden vor HFS (Baselineamplituden) derselben Schnitte bei Reizung der externen Kapsel $153,29 \pm 7,22\%$ ($n = 7$).

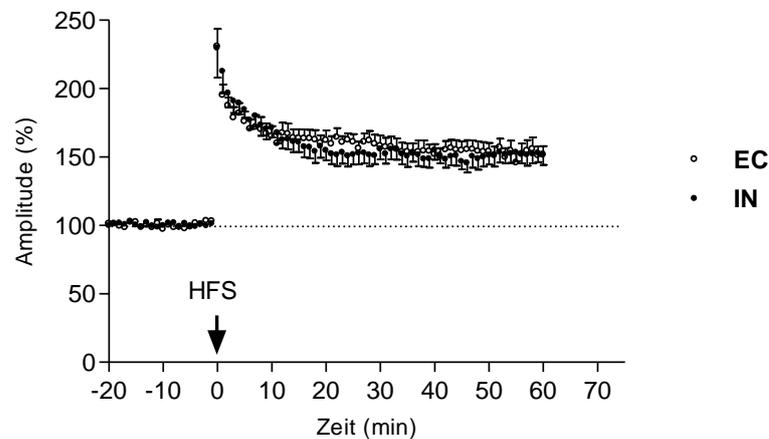


Abb. 3.31.: Vergleich der Langzeitpotenzierung bei Reizung der externen Kapsel und intranukleärer Stimulation.

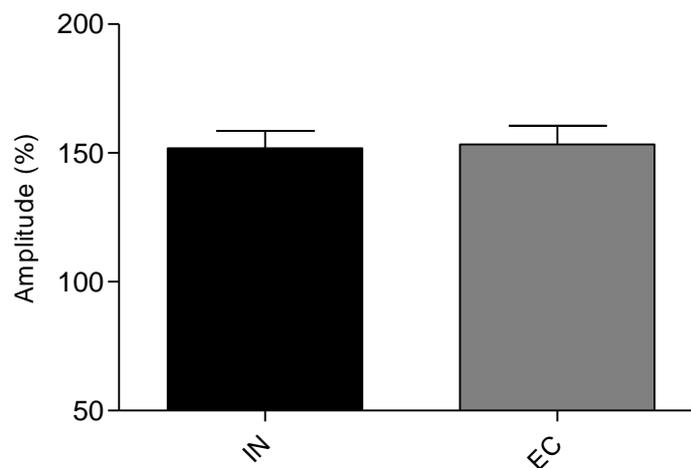


Abb. 3.32.: Das Balkendiagramm stellt die durchschnittlichen Veränderungen während der LTP 60 Minuten nach HFS in Abhängigkeit vom gewählten Reizort dar.

Die Blockierung der NR2B-Untereinheit durch Badapplikation von Co 101244 und Ro 04-5595 zeigte nach intranukleärer Reizung bei beiden verwendeten Pharmaka eine signifikante Abschwächung der LTP ($p < 0,05$). Die beiden Substanzen glichen sich sehr stark in ihren Effekten, sodass zwischen den beiden auch kein Unterschied festgestellt werden konnte ($p > 0,05$). Im Folgenden wurde daher nur noch eine der beiden Substanzen zur Antagonisierung der NR2B-Untereinheit verwendet.

Im Vergleich zwischen intranukleärer Reizung unter Co 101244 Applikation und Stimulierung der externen Kapsel, ließ sich ebenfalls kein Unterschied und damit keine Inputspezifität nachweisen ($p > 0,5$; Abb.: 3.33.).

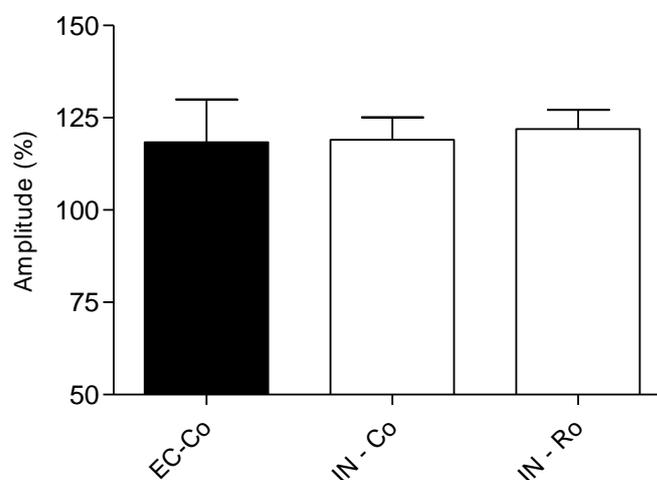


Abb. 3.33.: Das Balkendiagramm stellt die durchschnittlichen Veränderungen nach der LTP 60 Minuten nach HFS unter NR2B-Antagonisierung entweder durch Co 101244 oder durch Ro 04-5595 in Abhängigkeit vom gewählten Reizort dar.

Die Applikation von NVP AAM077 führte ebenfalls zu einer Abschwächung der Amplitude nach LTP. Im direkten Vergleich zeigte das Einwaschen von NVP in der Konzentration $0,4 \mu\text{M}$ bei beiden Reizlokalisationen etwa die gleiche Beeinflussung der LTP ($p > 0,05$; Abb.: 3.35.).

Ebenso verhält sich der Vergleich zwischen dem Einfluss von NVP AAM077 in den niedrigen Konzentrationen $0,1 \mu\text{M}$ bei intranukleärer Reizung und $0,05 \mu\text{M}$ bei EC-Stimulierung ($p > 0,5$; Abb.: 3.34.), auch wenn die direkte Vergleichbarkeit durch die unterschiedlichen Konzentrationen eingeschränkt ist.

Unter Blockade der NR2A-Untereinheit ließ sich keine Inputspezifität nachweisen.

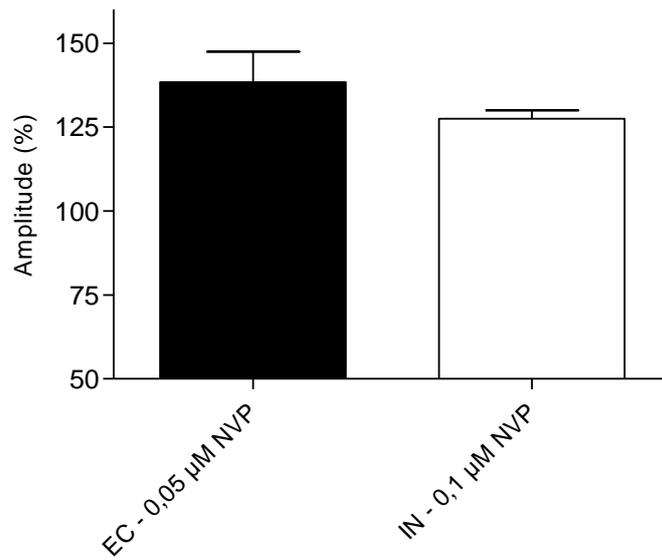


Abb. 3.34.: Das Balkendiagramm stellt die durchschnittlichen Veränderungen 60 Minuten nach HFS induzierter LTP unter NR2A-Blockade durch NVP AAM077 in niedrigen Konzentrationen in Abhängigkeit von dem gewählten Reizersort dar.

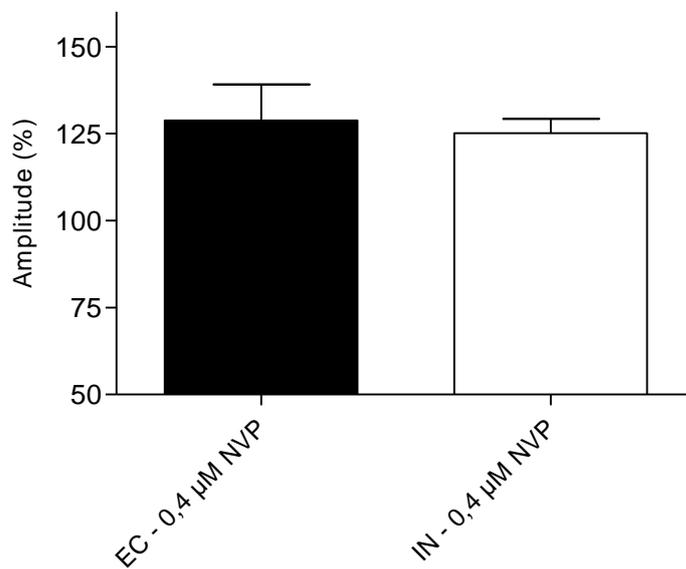


Abb. 3.35.: Das Balkendiagramm stellt die durchschnittlichen Veränderungen 60 Minuten nach HFS induzierter LTP unter NR2A-Blockade durch NVP AAM077 in der höheren Konzentration von 0,4 μM in Abhängigkeit von dem gewählten Reizersort dar.

3.3. Langzeitdepression durch LFS

Aus der Literatur ist bekannt, dass in der Amygdala die Induktion einer LTD durch LFS nur durch intranukleäre Reizung, jedoch nicht durch Applikation der LFS im Bereich der externen Kapsel möglich ist (Kaschel et al., 2004). Aus diesem Grund beschränkt sich die Untersuchung der Einflüsse der NR2A- und NR2B-Untereinheiten des NMDA-Rezeptors in Bezug auf die Langzeitdepression durch LFS sowie das Paired-Pulse-Verhalten nur auf intranukleäre Stimulation.

3.3.1. Langzeitdepression bei intranukleärer Reizung

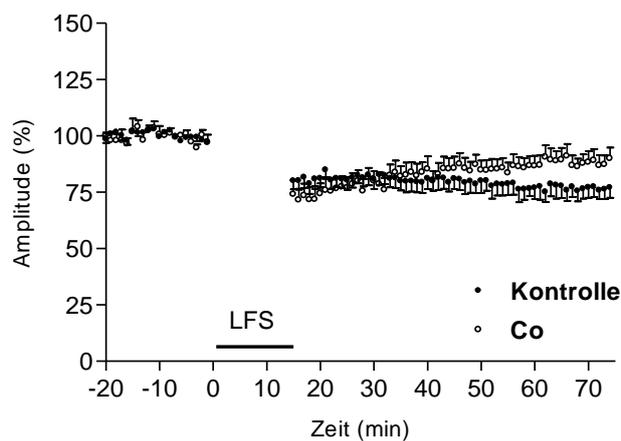


Abb. 3.36.: Vergleich der Langzeitdepression unter Kontrollbedingungen und unter Gabe von 1 μ M Co 101244 bei intranukleärer LFS.

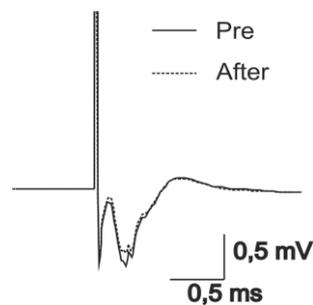


Abb. 3.37.: Beispielpotenzial unter Kontrollbedingungen.

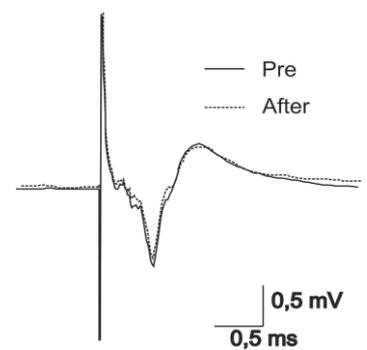


Abb. 3.38.: Beispielpotenzial unter Co 101244 .

Die Kontrollmessungen zeigten 60 Minuten nach einer Low-Frequency-Reizung (LFS) eine statistisch signifikante Depression der Feldpotenzialamplitude ($76,55 \pm 0,36\%$; $n = 8$; $p < 0,05$; Abb.: 3.36.). Auch unter dem Einfluss der applizierten Pharmaka war eine LTD-Induktion durch LFS prinzipiell möglich.

Unter 1 μ M Co 101244 zeigte sich eine stärkere Annäherung der Amplitudengröße hin zum Ausgangspotenzial ($88,25 \pm 0,76\%$; $n = 11$; $p < 0,05$; Abb.: 3.36.).

Eine Blockade der NR2B-Untereinheit verursachte im Vergleich zu den Kontrollmessungen eine signifikante Abnahme der Amplitudendepression nach LFS ($p < 0,05$).

Die Abbildungen 3.37. und 3.38. zeigen beispielhaft die Veränderungen am Einzelpotenzial vor und nach LFS im Vergleich zwischen Kontrollmessungen und unter Einfluss von Co 101244.

Unter Badapplikation von NVP AAM077 konnte jedoch keine LTD beobachtet und auch nicht statistisch nachgewiesen werden. Es zeigte sich keine Konzentrationsabhängigkeit des NR2A-Antagonisten in Bezug auf die Größe der Feldamplitude im Verlauf von 60 Minuten nach LFS ($0,1 \mu\text{M}$ NVP: $95,92 \pm 2,32\%$; $n = 10$; $p > 0,05$; $0,4 \mu\text{M}$ NVP: $95,25 \pm 4,78\%$; $n = 16$; $p > 0,05$; Abb.: 3.39.).

Im Vergleich zu den Kontrollmessungen fanden sich bei beiden verwendeten Konzentrationen des NR2A-Antagonisten die gleichen statistisch signifikanten Unterschiede in der Amplitudengröße 60 Minuten nach LFS ($p < 0,05$).

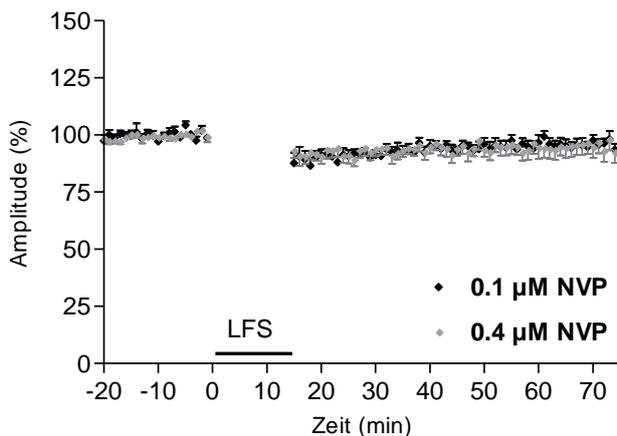


Abb. 3.39.: Vergleich der Langzeitdepression unter Applikation von NVP AAM077 in den Konzentrationen $0,1 \mu\text{M}$ und $0,4 \mu\text{M}$ bei intranukleärer LFS.

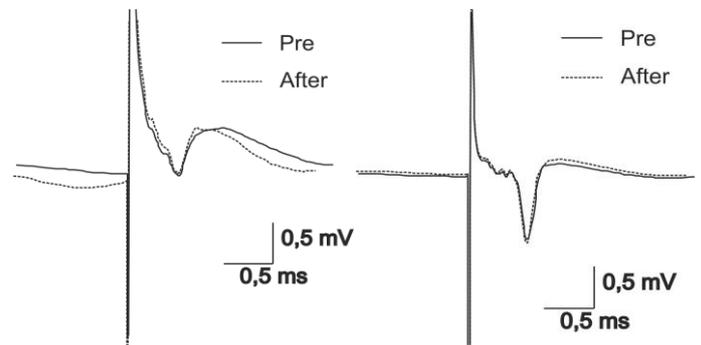


Abb. 3.40.: Beispielpotenzial unter dem Einfluss von $0,1 \mu\text{M}$ NVP AAM077.

Abb. 3.41.: Beispielpotenzial unter dem Einfluss von $0,4 \mu\text{M}$ NVP AAM077.

An der Vermittlung der LFS-induzierten LTD sind sowohl die NR2A- als auch die NR2B-Untereinheit wesentlich beteiligt, da sich bei der jeweiligen Blockade eine signifikante Zunahme der Größe der Feldpotenziale und damit eine Abschwächung der LTD nachweisen ließ. Dabei fiel auf, dass es unter NR2B-Blockade nur zu einer

Abschwächung der LTD kam, während sie unter NVP AAM077 Einfluss gänzlich verhindert wurde.

Das Vorhandensein beider Rezeptoruntereinheiten liefert hier in Form der Kontrollmessungen die stärkste Depression der Amplituden (Abb.: 3.51.).

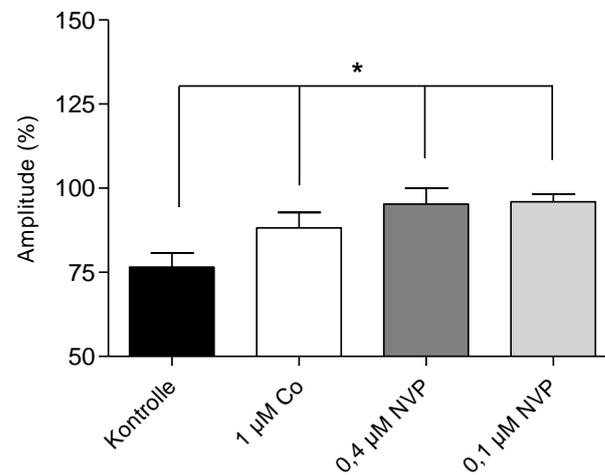


Abb. 3.42.: Das Balkendiagramm stellt die durchschnittlichen Veränderungen während der LTD nach LFS unter dem Einfluss verschiedener Pharmaka im Vergleich zu den Kontrollmessungen dar.

* = signifikanter Unterschied $p < 0,05$

3.4. Langzeitdepression durch Doppelpuls-LFS

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse zur Untersuchung der Doppelpuls-LFS dargestellt, ein vom Hippocampus her bekanntes Reizschema (Kemp & Bashir, 1999), zudem es bisher noch keine uns bekannten Vergleichsdaten in Bezug auf die Amygdala aus der Literatur gibt. Da Kaschel et al. (2004) zeigen konnten, dass durch intranukleäre Reizung generell eine LTD-Erzeugung möglich ist, wurde zunächst mittels intranukleärer Reizapplikation ein optimales Stimulationsmuster ermittelt, pharmakologische Einflüsse untersucht und anschließend die Doppelpuls-LFS auch im Bereich der externen Kapsel erprobt, hier mit der Zielsetzung, erstmals eine stabile Langzeitdepression induzieren zu können.

3.4.1.1. Langzeitdepression bei intranukleärer Reizung

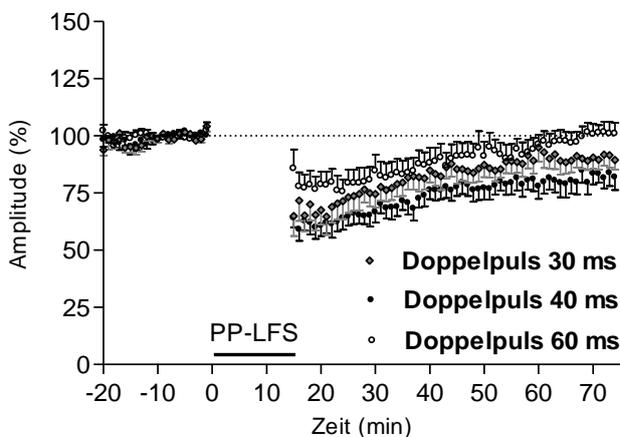


Abb. 3.43.: Vergleich der Langzeitdepression nach Applikation von Doppelpuls-LFS mit den Interstimulusintervallen von 30 ms, 40 ms und 60 ms.

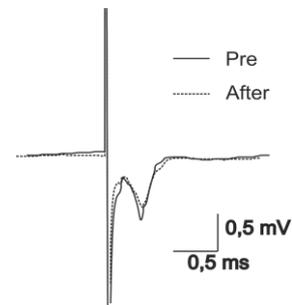


Abb. 3.44.: Beispielpotential vor und nach Applikation von PP-LFS mit einem Reizintervall von 30 ms.

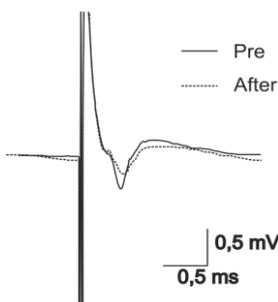


Abb. 3.45.: Beispielpotential vor und nach Applikation von PP-LFS mit einem Reizintervall von 40 ms.

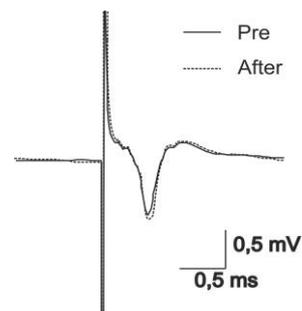


Abb. 3.46.: Beispielpotential vor und nach Applikation von PP-LFS mit einem Reizintervall von 60 ms.

Die stärkste LTD konnte durch eine Doppelpuls-LFS (PP-LFS) mit einem Reizabstand von 40 ms erzielt werden. ($82,71 \pm 0,57\%$; $p < 0,05$; $n = 8$). 60 Minuten nach Stimulierung durch eine PP-LFS mit einem Reizintervall von 30 ms konnte eine durchschnittliche Amplitudenverringerng auf $90,60 \pm 0,63\%$ ($p < 0,05$; $n = 9$) gegenüber der Potenziale der Baseline nachgewiesen werden. Die Verwendung eines Reizabstands von 60 ms zeigte 60 Minuten nach Stimulierung keine nachweisbare Veränderung der Feldpotenzialamplitude ($101,2 \pm 0,13\%$; $p > 0,05$; $n = 10$; Abb.: 3.43.). Die Verwendung einer Doppelpuls-LFS mit 40 ms ergab eine ähnlich starke LTD wie die Applikation der bekannten LFS (Kontrolle: $76,55 \pm 0,36\%$; PP-LFS: $82,71 \pm 0,57\%$; Abb.: 3.47.).

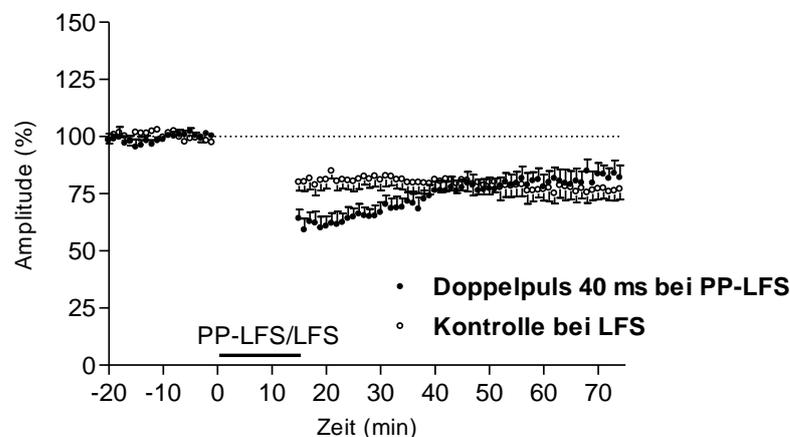


Abb. 3.47.: Langzeitdepression im Vergleich nach Reizung durch LFS (Kontrolle) und durch Doppelpuls-LFS mit einem Reizintervall von 40 ms.

Die Abbildung 3.48. zeigt die durchschnittlichen Veränderungen bei Verwendung der verschiedenen Reizintervalle im direkten Vergleich. Hierbei konnten signifikante Unterschiede zwischen den durchschnittlichen Amplitudenveränderungen nach PP-LFS mit 40 ms im Vergleich zu den Messungen, bei denen PP-LFS mit 30 ms oder 60 ms verwendet wurde, beobachtet werden ($p < 0,05$).

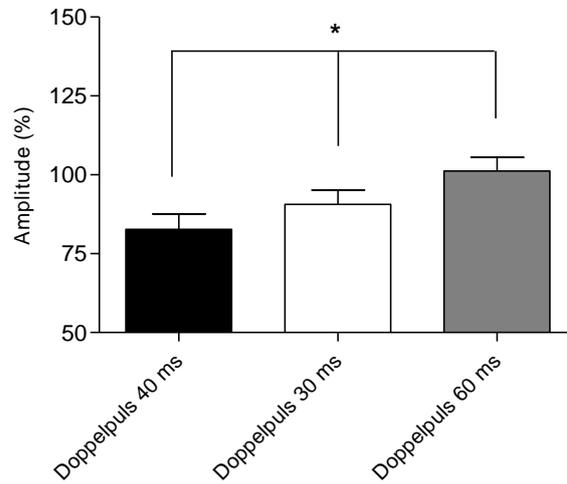


Abb. 3.48.: Das Balkendiagramm zeigt die durchschnittlichen Veränderungen in Abhängigkeit vom Reizintervall der PP-LFS im Vergleich.

* = signifikanter Unterschied $p < 0,05$

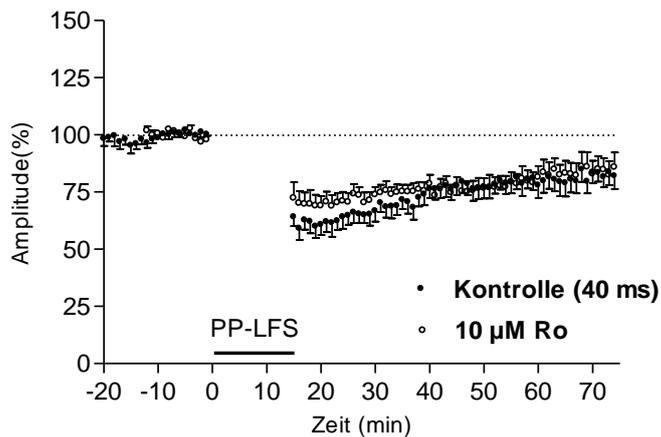


Abb. 3.49.: Vergleich der Langzeitdepression nach Doppelpuls-LFS unter Kontrollbedingungen (40 ms) und unter 10 µM Ro 04-5595 Badapplikation.

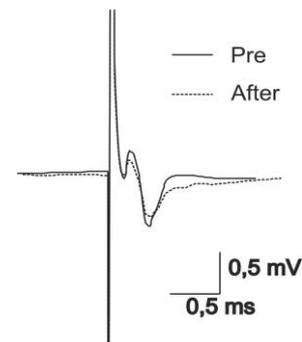


Abb. 3.50.: Beispielpotenzial unter 10 µM Ro 04-5595 Einfluss.

Nachdem nun die Kontrollmessungen eine optimale LTD-Induktion durch PP-LFS mit 40 ms zeigen konnten, wurde dieses Reizschema für die folgenden Messungen unter pharmakologischer Blockade der NR2A- bzw. NR2B- Untereinheit übernommen. Unter allen verwendeten Pharmaka war eine LTD-Induktion möglich.

Die Verwendung von 10 µM Ro 04-5595 führte 60 Minuten nach PP-LFS mit einer durchschnittlichen Amplitude von $84,49 \pm 0,72\%$ ($n = 8$; $p > 0,05$) zu keiner signifikant abgeschwächten LTD verglichen mit den Kontrollmessungen ($82,71 \pm 0,57\%$; Abb.: 3.49.).

Die Blockierung der NR2B-Untereinheit erfolgte bei der LFS-induzierten LTD durch Co 101244. Im Vergleich zur durch Co 101244 blockierten LFS-induzierten LTD, zeigte sich 60 Minuten nach PP-LFS unter Ro 04-5595 Einfluss eine nicht signifikant ($p > 0,05$) unterschiedliche LTD (Abb.: 3.51.).

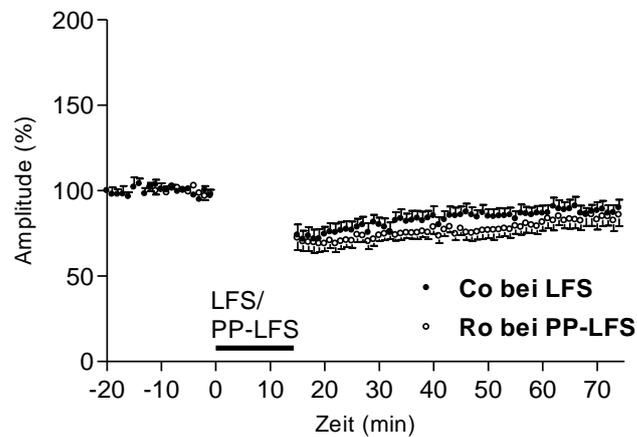


Abb. 3.51.: Vergleich der Reizschemata LFS und PP-LFS unter NR2B-Blockade.

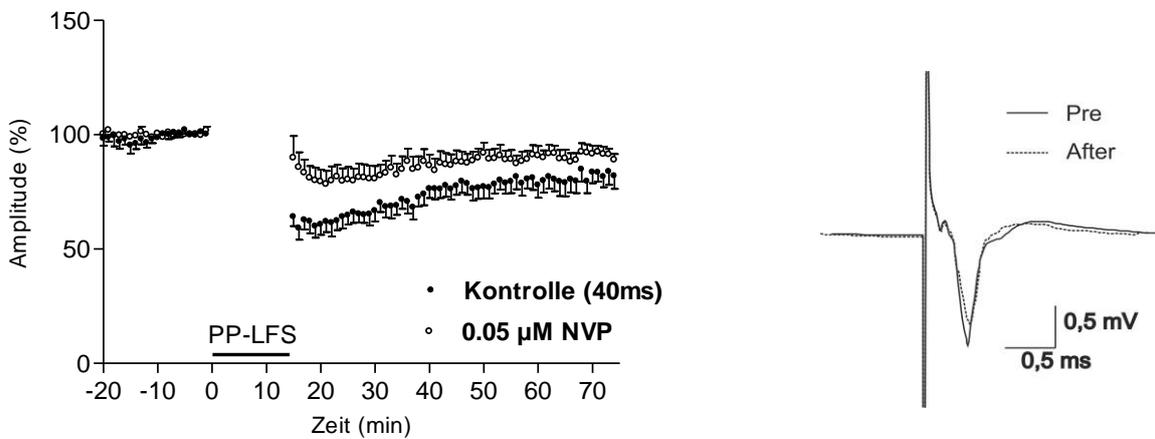


Abb. 3.52.: Vergleich der Langzeitdepression nach Doppelpuls-LFS unter Kontrollbedingungen (40 ms) und unter Badapplikation von 0,05 μM NVP AAM077.

Abb. 3.53.: Beispielpotential unter Einfluss von 0,05 μM NVP AAM077.

Die Blockade der NR2A-Untereinheit erfolgte auch hier wieder in zwei verschiedenen Konzentrationen, 0,05 μM und 0,4 μM NVP AAM077. Beide führten zu einer deutlich schwächeren LTD als unter Kontrollbedingungen (PP-LFS, ohne pharmakologischen Einfluss).

Unter der Badapplikation von 0,05 μM NVP AAM077, ließ sich 60 Minuten nach PP-LFS durchschnittlich eine LTD mit $91,03 \pm 2,57\%$ ($p < 0,05$) der basalen Amplitude nachweisen. Dieser Unterschied ist im Vergleich zu den Kontrollmessungen statistisch signifikant ($p < 0,05$; Abb.: 3.52).

Auch in der Konzentration von 0,4 μM zeigte NVP AAM077 60 Minuten nach PP-LFS eine LTD, wenn auch schwächer als bei 0,05 μM der gleichen Substanz. Die Amplitudengröße betrug in der höheren Konzentration durchschnittlich $94,80 \pm 5,22\%$ ($p < 0,05$) der basalen Potenziale (Abb.: 3.54.).

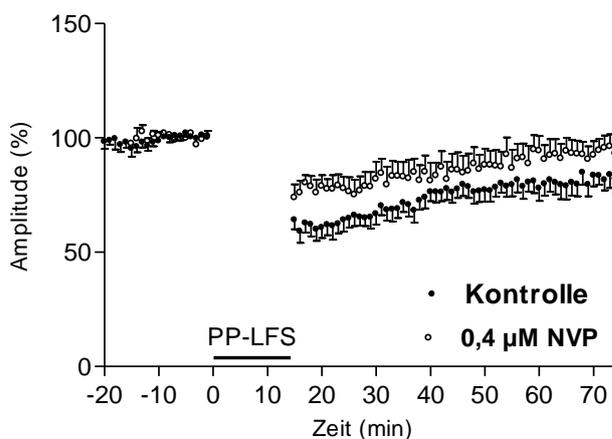


Abb. 3.54.: Vergleich der Langzeitdepression nach Doppelpuls-LFS unter Kontrollbedingungen (40 ms) und unter Badapplikation von 0,4 μM NVP AAM077.

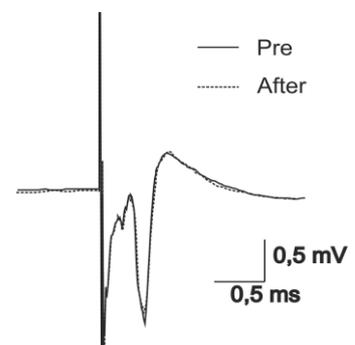


Abb. 3.55.: Beispielpotenzial unter Einfluss von 0,4 μM NVP AAM077.

Sowohl bei Untersuchung der LTD durch LFS als auch durch PP-LFS wurde der NR2A-Antagonist in einer Konzentration von 0,4 μM verwendet, was die direkte Vergleichbarkeit erlaubt. Unter Blockade der NR2A-Untereinheit erreichte die Amplitude nach LFS einen durchschnittlichen Wert von $95,25 \pm 4,78\%$ der Baselinepotenziale, nach PP-LFS $94,80 \pm 5,22\%$. Signifikant war dieser Unterschied jedoch nicht ($p > 0,05$; Abb.: 3.56.).

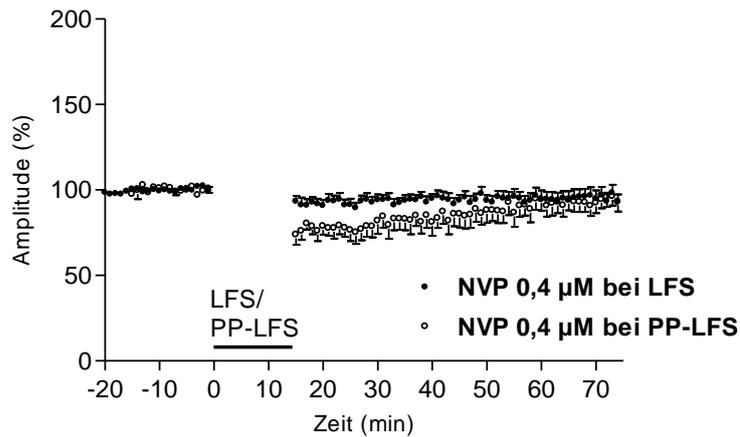


Abb. 3.56.: Vergleich der Reizschemata LFS und PP-LFS unter NR2A-Blockade durch NVP AAM077 in hoher Konzentration (0,4 µM).

Ähnlich wie bei der LFS induzierten LTD, verhinderte auch bei der PP-LFS (Reizintervall: 40 ms) induzierten Langzeitdepression die Blockade der NR2A-Untereinheit durch NVP in beiden verwendeten Konzentrationen die Induktion einer LTD, während nach Blockade durch den NR2B-Antagonisten eine LTD, wenn auch schwächer im Vergleich zu den Kontrollmessungen, beobachtet werden konnte. Es scheinen die NR2A-vermittelten Effekte bei der Induktion einer LTD durch intranukleäre Doppelpuls-Stimulation einen stärkeren Einfluss zu haben als die NR2B-vermittelten. Dennoch zeigten sich die stärksten Langzeitdepressionen bei Kontrollmessungen ohne Blockierung einer Untereinheit (Abb.: 3.57.).

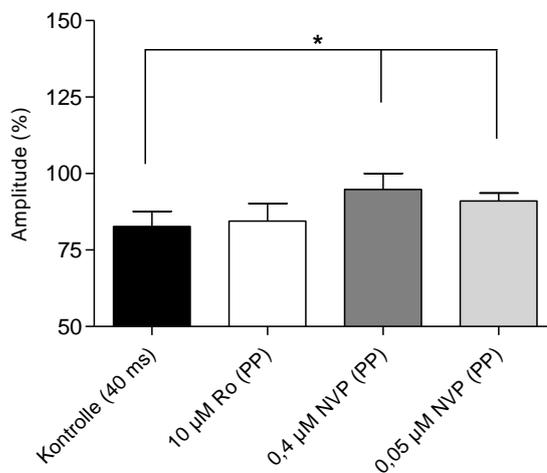


Abb. 3.57.: Das Balkendiagramm stellt die durchschnittlichen Veränderungen während der LTD nach Doppelpuls-LFS (40 ms) unter dem Einfluss verschiedener Pharmaka dar.
* = signifikanter Unterschied $p < 0,05$

3.4.1.2. Paired-Pulse-Verhalten bei Langzeitdepression durch PP-LFS

Zunächst wurde geprüft, welchen Einfluss die PP-LFS auf das Paired-Pulse-Verhalten ausübt. Dazu wurde vor und nach der Applikation von PP-LFS mit den verschiedenen Reizintervallen das Doppelpulsverhalten aufgezeichnet.

60 Minuten nach der Anwendung von PP-LFS mit einem Reizintervall von 30 ms zeigte sich eine signifikante Zunahme der Paired-Pulse-Ratio ($n = 6, p < 0,05$). Die maximale Fazilitierung lag nach PP-LFS mit $1,17 \pm 0,13$ bei 40 ms, während die minimale mit $0,72 \pm 0,12$ bei 200 ms zu finden war (Abb.: 3.58.).

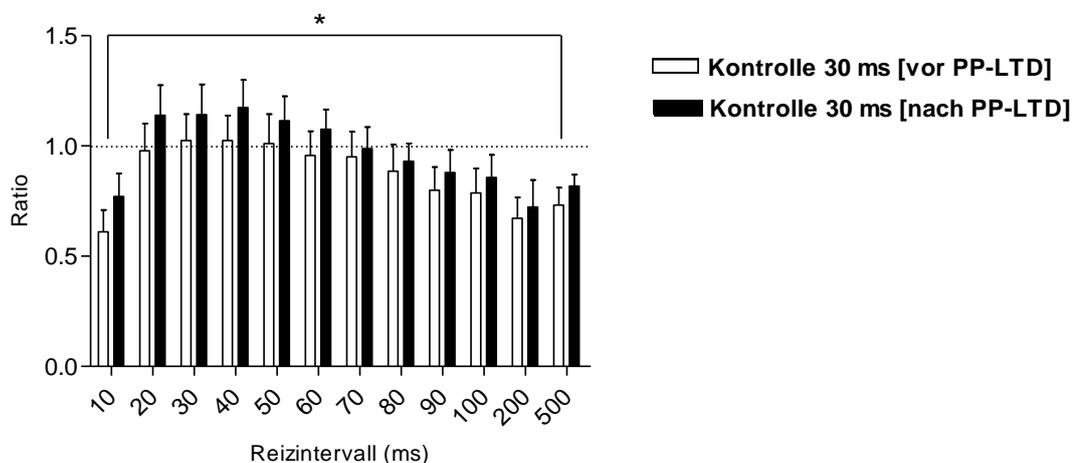


Abb. 3.58.: Vergleich des Paired-Pulse-Verhaltens vor Induktion einer LTD durch PP-LFS bei 30 ms und danach.

* = signifikanter Unterschied $p < 0,05$

Ein ähnliches Verhalten konnte auch bei der Vergrößerung des Reizintervalls auf 40 ms der PP-LFS beobachtet werden. Hier zeigte sich ebenfalls eine über alle Reizintervalle anhaltende signifikante Vergrößerung der Ratio ($n = 7, p < 0,05$). Die stärkste Potenzierung lag 60 Minuten nach PP-LFS mit $1,23 \pm 0,17$ bei 40 ms, die geringste mit $0,70 \pm 0,09$ bei 200 ms (Abb.: 3.59.).

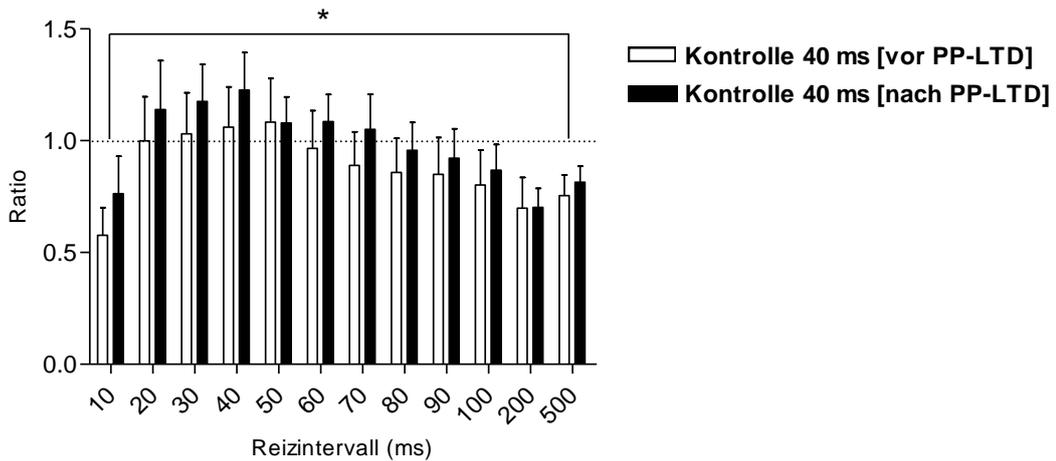


Abb. 3.59.: Vergleich des Paired-Pulse-Verhaltens vor Induktion einer LTD durch PP-LFS bei 40 ms und danach.

* = signifikanter Unterschied $p < 0,05$

Auch die Erhöhung des Reizintervalls auf 60 ms bei der PP-LFS führte zu einer signifikanten Erhöhung der Ratio ($n = 10$, $p < 0,05$; Abb.: 3.60.), auch wenn diese etwas schwächer als im Vergleich zu den Ergebnissen nach PP-LFS mit 30 ms oder 40 ms ausfiel. Das Maximum befand sich hier bei 40 ms ($1,20 \pm 0,11$), das Minimum bei 200 ms ($0,75 \pm 0,09$).

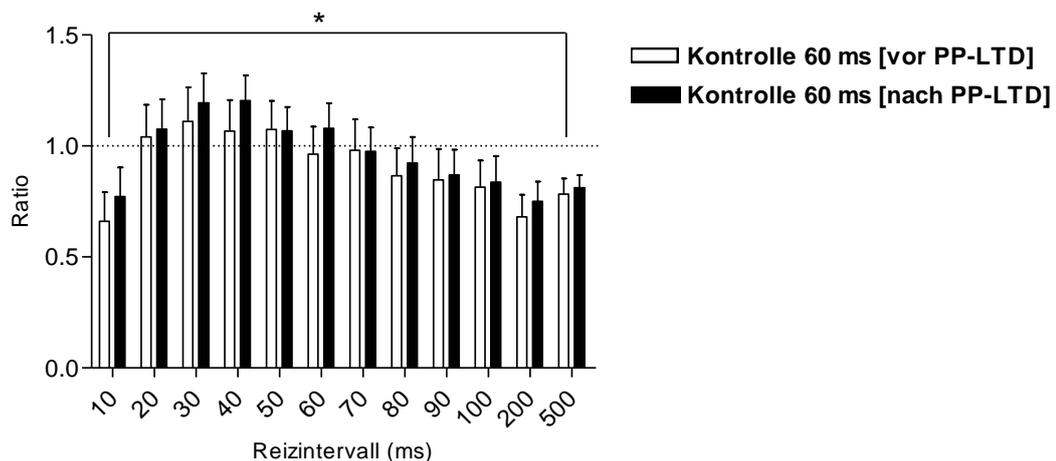


Abb. 3.60.: Vergleich des Paired-Pulse-Verhaltens vor Induktion einer LTD durch PP-LFS bei 60 ms und danach.

* = signifikanter Unterschied $p < 0,05$

3.4.2.1. Langzeitdepression bei intranukleärer Reizung einjähriger Tiere

Die Messungen bezogen auch adulte, einjährige Tiere mit ein, um eine Aussage über die synaptische Plastizität, genauer die Langzeitdepression bei adulten Tieren im Vergleich zu juvenilen treffen zu können.

Die Kontrollmessungen mittels PP-LFS (Reizintervall: 40 ms) zeigten nach einem Jahr keine erfolgreiche LTD-Induktion. 60 Minuten nach PP-LFS betrug die durchschnittliche Amplitudengröße $104,2 \pm 7,77\%$. Die Abbildung 3.61. zeigt die Kurve im Vergleich zur Kontrollmessung bei 8 Wochen alten Tieren.

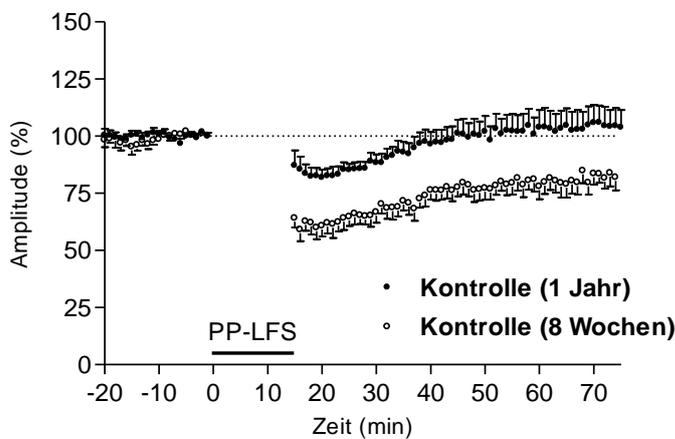


Abb. 3.61.: Langzeitdepression nach Doppelpuls-LFS (40 ms) im Vergleich zwischen 8 Wochen alten Tieren und einjährigen, adulten Mäusen.

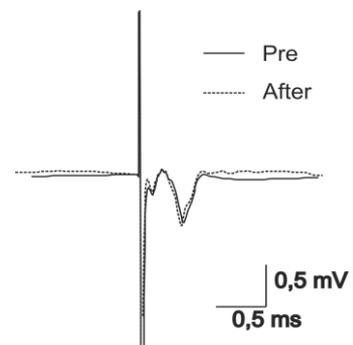


Abb. 3.62.: Beispielpotenzial unter Kontrollbedingungen bei einjährigen Tieren.

Die Abbildung 3.63. zeigt deutlich die signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) der PP-LFS assoziierten LTD zwischen juvenilen und adulten Tieren 60 Minuten nach PP-LFS.

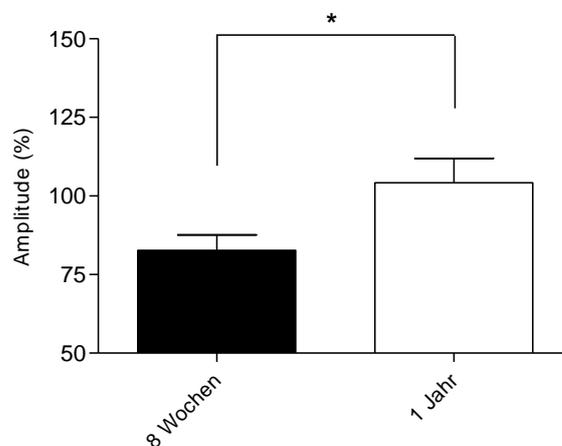


Abb. 3.63.: Das Balkendiagramm stellt die durchschnittlichen Veränderungen während der PP-LTD (40 ms) im Vergleich zwischen 8 Wochen alten und einjährigen Tieren dar.

* = signifikanter Unterschied $p < 0,05$

3.4.2.2. Paired-Pulse-Verhalten bei einjährigen Tieren

Auch bei den Messungen an einjährigen Tieren wurde das Paired-Pulse-Verhalten untersucht. Dabei fällt auf, dass über sämtliche Reizintervalle die Doppelpulsratio geringer auszufallen scheint als bei den Kontrollmessungen an juvenilen Tieren (vgl. Abb. 3.59 und 3.64.)

60 Minuten nach PP-LFS induzierter LTD zeigte sich eine über alle Reizintervalle anhaltende, wenn auch geringe, jedoch statistisch signifikante Zunahme der Doppelpulsratio ($n = 9$, $p < 0,05$). Die maximale Potenzierung lag mit $0,99 \pm 0,06$ bei 30 ms, die minimale mit $0,66 \pm 0,05$ bei 200 ms (Abb. 3.64.).

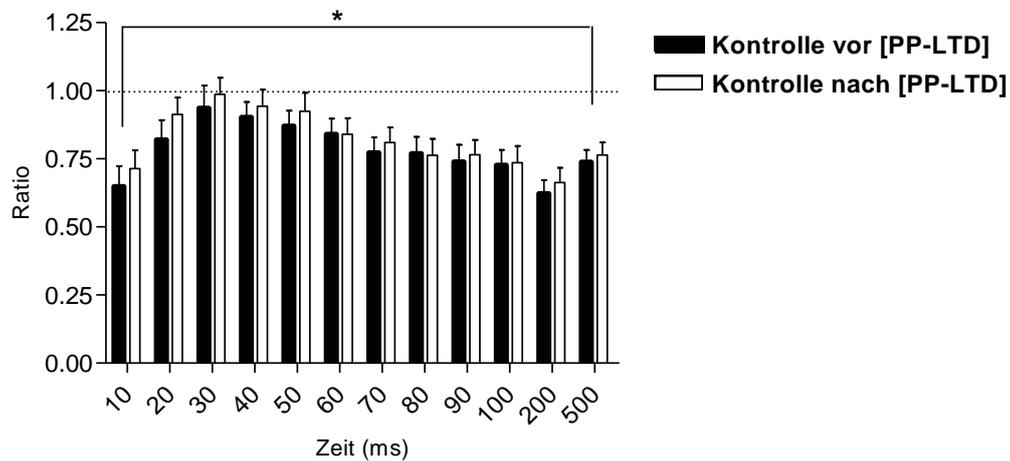


Abb. 3.64.: Vergleich des Paired-Pulse-Verhaltens unter Kontrollbedingungen vor und nach der Applikation von PP-LFS (40 ms) bei einjährigen Tieren ($n = 9$).

* = signifikanter Unterschied $p < 0,05$

3.4.3. Langzeitdepression bei Reizung der externen Kapsel

Obwohl die Applikation von gepaarten Reizen (PP-LFS) bei intranukleärer Stimulation keine Zunahme der LTD im Vergleich zur LFS-induzierten Langzeitdepression ergab, soll das Reizschema der Doppelpulsstimulation dennoch auf die externe Kapsel angewendet werden. Geprüft werden sollen dabei die Möglichkeit einer LTD-Induktion durch dieses Reizschema und die Folgen pharmakologischer Blockade der NMDA Rezeptoruntereinheiten.

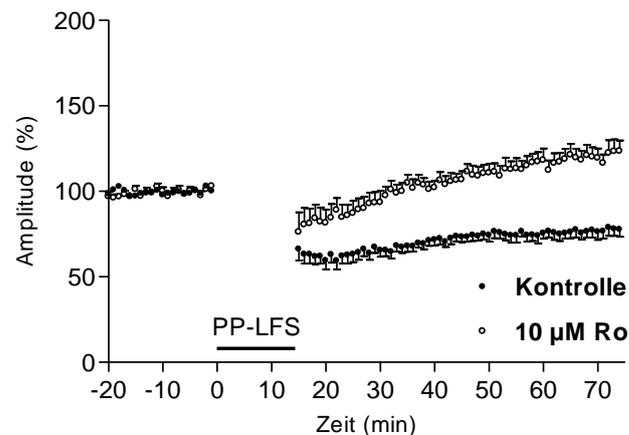


Abb. 3.65.: Vergleich der Langzeitdepression nach Doppelpuls-LFS (40 ms) unter Kontrollbedingungen und unter Badapplikation von 10 µM Ro 04-5595 bei Stimulierung der externen Kapsel.

Die Applikation von PP-LFS mit einem Interstimulusintervall von 40 ms zeigte nach 60 Minuten eine konstante, signifikante Reduktion der durchschnittlichen Feldpotenzialamplitude auf $77,76 \pm 4,19\%$ ($n = 9$) im Vergleich zu den Amplituden der basalen Potenziale ($p < 0,05$) und kann damit als LTD gewertet werden (Abb. 3.65.).

Unter dem Einfluss von 10 µM Ro 04-5595 hingegen, konnte keine LTD nachgewiesen werden. Die Amplitudengrößen lagen 60 Minuten nach PP-LFS im Mittel bei $121,3 \pm 6,40\%$ ($n = 7$) und waren damit nicht als LTD zu betrachten. Der Unterschied zur Kontrollmessung war mit einem p-Wert unter 0,05 signifikant.

Auch die Blockade der NR2A-Untereinheit verhinderte in beiden verwendeten Konzentrationen die Induktion einer LTD. Unter Verwendung von 0,1 µM zeigte sich eine Potenzialgröße von durchschnittlich $101,8 \pm 2,60\%$ ($n = 5$) der basalen Amplituden.

Auch diese Werte waren im Vergleich zu den pharmakonfreien Kontrollmessungen signifikant ($p < 0,05$).

Die Nutzung des NR2A-Antagonisten NVP AAM077 in der höheren Konzentration von $0,4 \mu\text{M}$ zeigte 60 Minuten nach PP-LFS eine durchschnittliche Amplitudengröße von $111,9 \pm 6,59\%$ ($n = 7$) und erfüllte damit nicht die Kriterien einer stabilen Langzeitdepression. NVP AAM077 in der Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ verhinderte ebenfalls die Induktion einer LTD, wenn auch die Feldpotenziale im Durchschnitt mit $101,8 \pm 2,60\%$ ($n = 5$) etwas kleiner waren als unter Blockade durch die höhere Konzentration des NR2A-Antagonisten. (Abb. 3.66.)

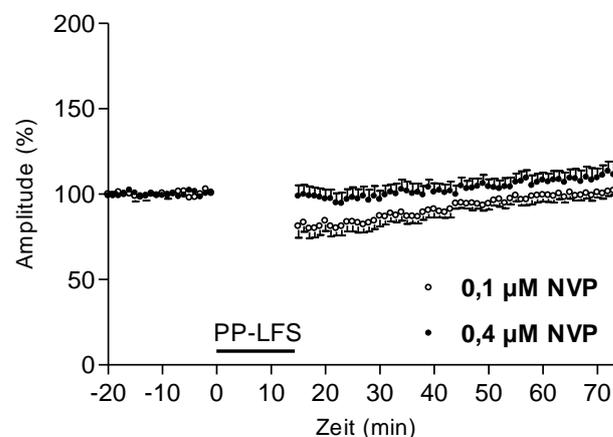


Abb. 3.66.: Vergleich der Langzeitdepression nach Doppelpuls-LFS (40 ms) unter Applikation von NVP AAM077 in den Konzentrationen $0,1 \mu\text{M}$ und $0,4 \mu\text{M}$ bei Stimulierung der externen Kapsel.

Für die Induktion einer optimalen LTD durch ein PP-LFS-Stimulationsprotokoll im Bereich der externen Kapsel ist demnach das Vorhandensein beider Untereinheiten eine wesentliche Voraussetzung, da sowohl die Blockade der NR2A- als auch die der NR2B-Untereinheit in beiden Fällen eine LTD wirksam verhinderte. Keine der beiden Untereinheiten zeigte hier einen stärkeren Einfluss zu Gunsten einer LTD. Die genauen Veränderungen stellt die Abbildung 3.67. noch einmal im direkten Vergleich dar, wobei diese mit einem p -Wert von unter $0,05$ als statistisch signifikant zu betrachten sind.

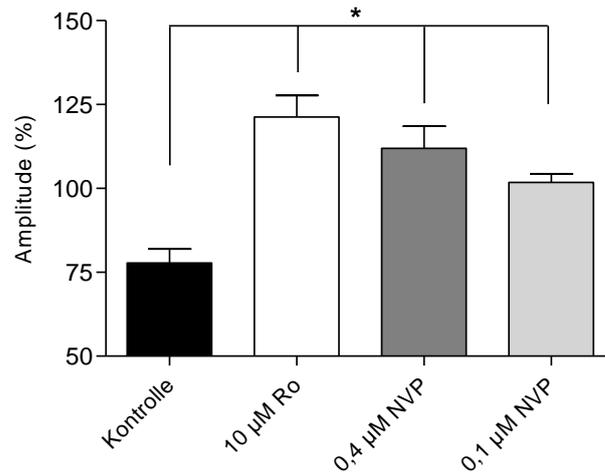


Abb. 3.67.: Das Balkendiagramm stellt die durchschnittlichen Veränderungen während der PP-LTD (40 ms) unter Kontrollbedingungen und im Vergleich zur Applikation verschiedener Pharmaka bei Stimulierung der externen Kapsel dar.

* = signifikanter Unterschied $p < 0,05$

3.4.4. Doppelpuls-Langzeitdepression im Vergleich beider Reizpositionen

Mit Hilfe des Protokolls der niedrigfrequenten Doppelpulsstimulierung (PP-LFS) ließ sich sowohl durch intranukleäre Reizung als auch durch Stimulierung der Fasern der externen Kapsel eine stabile und signifikante LTD induzieren. Die Feldpotenzialamplituden zeigten eine ähnliche Reduktion in beiden Reizlokalisationen. Bei intranukleärer Reizung waren es $82,71 \pm 0,57\%$, bei Stimulation der externen Kapsel $77,76 \pm 4,19\%$ der jeweiligen Amplituden der basalen Potenziale (Abb. 3.68., 3.69.).

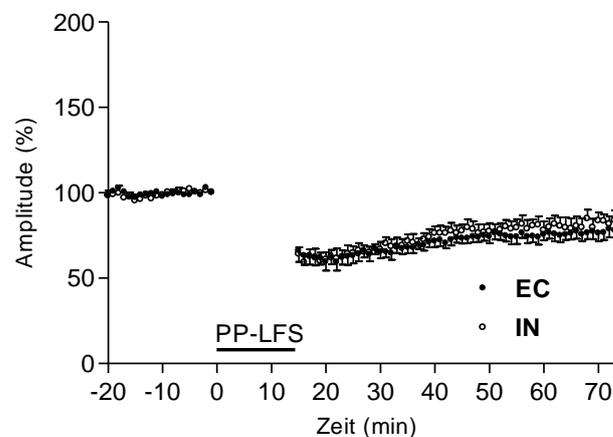


Abb. 3.68.: Vergleich der Langzeitdepression nach Doppelpuls-LFS (40 ms) in Abhängigkeit vom gewählten Reizort.

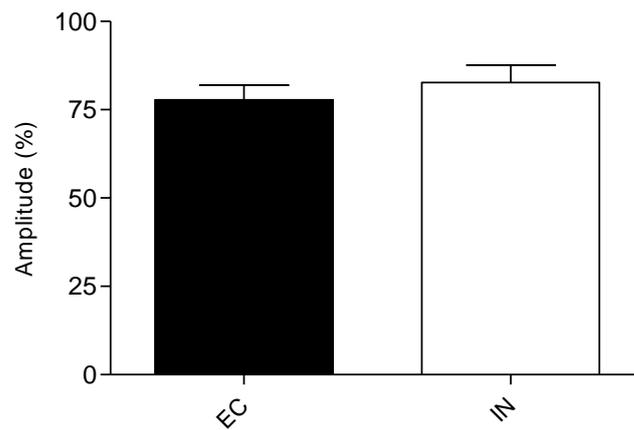


Abb. 3.69.: Das Balkendiagramm stellt die durchschnittlichen Veränderungen während der PP-LTD (40 ms) in Abhängigkeit vom gewählten Reizort dar.

In beiden gewählten Reizorten ließen sich die Messungen pharmakologisch ähnlich beeinflussen.

Die Applikation des NR2B-Antagonisten Ro 04-5595 führte in beiden Fällen zu einer Zunahme der Feldpotenzialamplitude und damit zu einer Abnahme der LTD, wobei die Langzeitdepression durch EC-Stimulation deutlich stärker von der NR2B-Untereinheit abhängig zu sein scheint. Das Einwaschen des NR2B-Antagonisten bei Stimulierung innerhalb des lateralen Kerns zeigte eine signifikant geringere Blockade der LTD als dies bei Reizungen im Bereich der externen Kapsel der Fall war ($p < 0,05$; Abb.: 3.70.).

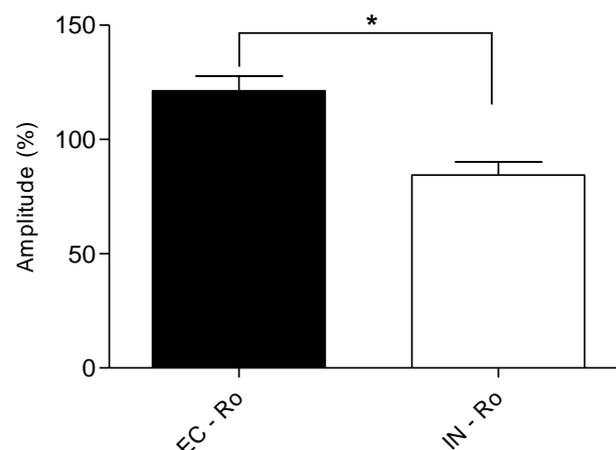


Abb. 3.70.: Das Balkendiagramm stellt die durchschnittlichen Veränderungen 60 min nach PP-LFS unter NR2B-Antagonisierung durch Ro 04-5595 in Abhängigkeit vom gewählten Reizort dar.

* = signifikanter Unterschied $p < 0,05$

Die Applikation von 0,4 μ M NVP AAM077 zog ebenfalls eine Zunahme der Amplitude nach sich und verhinderte sowohl bei Reizung der externen Kapsel als auch bei intranukleärer Stimulation erfolgreich eine Langzeitdepression. Die Blockade der NR2A-Untereinheit zeigte bei intranukleärer Reizung eine signifikant geringere Hemmung der Langzeitdepression als bei Stimulierung der externen Kapsel ($p < 0,05$; Abb.: 3.72.). Aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen (0,05 und 0,1 μ M), die bei IN- und EC-Stimulation verwendet wurden, lässt sich zur Inputspezifität der PP-LFS-induzierten LTD unter niedrigkonzentrierter NR2A-Blockade keine Aussage treffen.

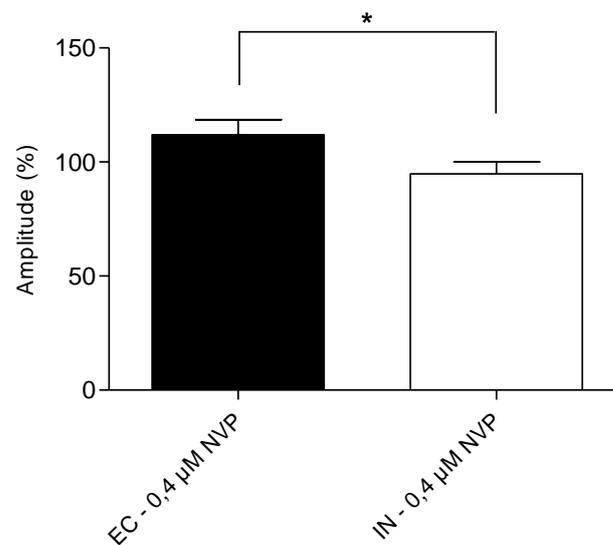


Abb. 3.71.: Das Balkendiagramm stellt die durchschnittlichen Veränderungen 60 Minuten nach PP-LFS Reizung unter NR2A-Blockade in Abhängigkeit von der NVP AAM 077 Konzentration und gewähltem Reizort dar.

* = signifikanter Unterschied $p < 0,05$

4. Diskussion

4.1. Kurzzusammenfassung der Ergebnisse

Die Versuche dieser Studie zeigten die folgenden Ergebnisse:

1. Sowohl bei intranukleärer Reizung als auch bei Stimulation der externen Kapsel zeigte die Blockade der NMDA-Rezeptoruntereinheiten keine Beeinflussung der basalen Transmission im lateralen Kern der Amygdala adulter Tiere. Diese ist nicht von der Aktivität der NR2A- und NR2B-Untereinheiten des NMDA-Rezeptors abhängig.
2. Die Feldpotenzialamplituden waren bei niedrig gewählten Reizintensitäten bei Stimulierung der intranukleären Fasern größer, bei höheren Intensitäten waren sie bei Stimulierung der externen Kapsel größer.
3. Hochfrequenzstimulation (HFS) ist ein geeignetes Reizschema zur Induktion einer stabilen Langzeitpotenzierung (LTP) im lateralen Kern der Amygdala. Intranukleäre Applikation und Reizung der externen Kapsel zeigten eine etwa gleichstarke LTP.
4. Die Blockade der NR2A- und NR2B-Untereinheiten führte sowohl bei intranukleärer als auch bei EC-Reizung zur Abschwächung der LTP. Die LTP-Induktion ist damit von beiden Untereinheiten des NMDA-Rezeptors abhängig.
5. Das Paired-Pulse-Verhalten zeigte sich nach LTP-Induktion unter Kontrollbedingungen unverändert.
6. Das Einwaschen der NR2A- und NR2B-Antagonisten führte zu keiner Veränderung des Paired-Pulse-Verhaltens.
7. Die Niederfrequenzreizung (LFS) ist intranukleär appliziert ein geeignetes Reizschema zur Erzeugung einer Langzeitdepression (LTD) im LA.
8. Die Antagonisierung der NR2A-Untereinheit führt zu einer kompletten Blockierung einer LTD, während die Blockade der NR2B-Untereinheit eine abgeschwächte LTD zulässt.
9. Das optimale Reizintervall zur LTD-Induktion durch Doppelpuls-LFS (PP-LFS) liegt bei 40 ms. Die Doppelpuls-LFS mit einem Reizabstand von 40 ms zeigte bei

intranukleärer Stimulation eine stabile, wenn auch geringere Langzeitdepression als die durch LFS induzierte LTD.

10. In höherer Konzentration (0,4 μM) verhinderte der NR2A-Antagonist zuverlässig das Zustandekommen der Doppelpuls-LFS induzierten LTD durch intranukleäre Reizung. Unter dem Einfluss der niedrigeren Konzentration (0,05 μM) ließ sich eine abgeschwächte LTD beobachten, ebenso wie das Einwaschen des NR2B-Antagonisten das Zustandekommen einer geringen LTD zuließ.
11. Die NR2A-Blockade zeigte bei intranukleärer Reizapplikation die gleichen Effekte bei LFS und PP-LFS. Auch die Effekte der NR2B-Blockade waren bei beiden verwendeten Reizmustern nach intranukleärer Stimulation die gleichen.
12. Das Paired-Pulse-Verhalten zeigte nach PP-LFS ohne pharmakologische Beeinflussung über alle verwendeten Reizintervalle (30 ms, 40 ms, 60 ms) eine Verstärkung der Paired-Pulse-Fazilitierung.
13. Bei einjährigen Tieren konnte nach intranukleärer PP-LFS Applikation keine LTD beobachtet werden. Die Paired-Pulse-Ratio zeigte jedoch eine signifikante Zunahme.
14. Nach Doppelpuls-LFS im Bereich der externen Kapsel konnte erstmals eine stabile EC-induzierte LTD beobachtet werden.
15. Sowohl die NR2A- als auch die NR2B-Antagonisten konnten eine Langzeitdepression zuverlässig verhindern.
16. PP-LFS zeigte bei intranukleärer Reizung und EC-Stimulation eine gleich starke LTD.
17. Die NR2A-Antagonisierung führte sowohl EC als auch IN zu einer kompletten Blockade der LTD. Das Einwaschen der NR2B-Antagonisten zeigte intranukleär eine schwächere LTD, im Bereich der externen Kapsel jedoch keine Langzeitdepression.

4.2. Die horizontale Schnittebene

Im Vergleich zur weit verbreiteten coronalen Schnitfführung zur Untersuchung der Funktionen der Amygdala, zeigt die horizontale Schnittpräparation einige Unterschiede. So konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass bei der horizontalen Technik vor

allem die internukleären Verbindungen (von Bohlen und Halbach & Albrecht, 1998) der lateralen Amygdala zum Cortex und zum Hippocampus erhalten bleiben (von Bohlen und Halbach & Albrecht, 2002). Durch die Stimulation der externen Kapsel werden hier hauptsächlich die Afferenzen aus den entorhinalen und perirhinalen kortikalen Arealen gereizt. Die intranukleäre Reizung betrifft überwiegend Verbindungen aus anderen amygdalären Strukturen, Afferenzen der basalen und medialen Amygdala. Der klare Vorteil des horizontalen Hirnschnittes liegt darin, dass die Verbindungen zu Hippocampus und entorhinalem Cortex erhalten bleiben, was gerade in der Erforschung der Epilepsie von Bedeutung ist (Klueva et al., 2003).

Das coronale Schnittpräparat hingegen bietet Vorteile in der Untersuchung der Angstkonditionierung, da die Afferenzen aus Thalamus und Kortex intakt bleiben (Li et al., 1996). Die Stimulation der externen Kapsel ist hier mit den Eingängen aus sensorischen kortikalen Arealen assoziiert (Doron & LeDoux, 1999).

Ein weiterer Unterschied zwischen coronaler und horizontaler Schnitfführung liegt in der unterschiedlichen Aktivität GABAerger Interneurone. Diese hemmenden Interneurone liegen vorwiegend in ventrodorsaler, weniger in rostrocaudaler Richtung (Samson et al., 2003). So ist es im coronalen Schnitt häufig nur unter GABA_A-Antagonisierung durch Picrotoxin oder Bicucullin möglich, eine Langzeitpotenzierung zu induzieren (Watanabe et al., 1995; Bauer et al., 2002b; Lin et al., 2003). Im hier verwendeten horizontalen Schnitt konnte auf das Einwaschen dieser Pharmaka verzichtet werden, da sich LTP auch ohne GABA_A-Blockade beobachten ließ (Drephal et al., 2006); die LFS induzierte LTD hingegen zeigte unter Picrotoxin-Einfluss im horizontalen Schnitt der Ratte eine schwächere Langzeitdepression als unter Kontrollbedingungen (Kaschel et al., 2004).

4.3. NMDA-Subtypen und die basale synaptische Übertragung

Die basale Transmission blieb in den vorliegenden Experimenten sowohl bei Blockierung der NR2A- als auch der NR2B-Untereinheit unbeeinflusst. Andere Arbeitsgruppen fanden jedoch abweichende Ergebnisse. So konnte bei Messungen unter Verwendung von Ifenprodil, als alternativem NR2B-Rezeptorantagonisten, in etwa eine Halbierung der Amplitude beobachtet werden (Szinyei et al., 2003). Einwaschen von

NVP AAM077 in einer Konzentration von 0,5 μM führte zu einer Reduktion der Amplituden um 65-72 % (Shin et al., 2006). Von den hier verwendeten Versuchsparadigmen abweichend, wurden in beiden Fällen 3-4 Wochen alte Ratten verwendet, es wurde mittels Patch-Clamp-Methodik abgeleitet und coronale Schnitte angefertigt. Aber auch 2-Amino-5-phosphonovaleriansäure (APV), ein selektiver NMDA-Rezeptor-Antagonist, zeigte in Untersuchungen an coronalen Schnitten 3-5 Wochen alter Ratten eine deutliche Abschwächung der Amplituden (Weisskopf & LeDoux, 1999). Ähnliche Ergebnisse konnten auch in anderen Untersuchungen an vergleichbar jungen Tieren festgestellt werden (Mahanty & Sah, 1999; Aroniadou-Anderjaska et al., 2001). Da in der vorliegenden Arbeit mit Mäusen gearbeitet wurde und sich die oben zitierten Veröffentlichungen auf Untersuchungen an Ratten beziehen, könnte dies eine mögliche Ursache für die Unterschiede darstellen. Jedoch ließ sich auch an adulten Ratten ebenfalls keine NMDA-Abhängigkeit für die basale Transmission nachweisen (Drephal et al., 2006), sodass die Begründung für die Unterschiede weniger an der anderen Tierart zu liegen scheint. Die Unterschiede könnten auf die Stimulierung verschiedener Afferenzen, das unterschiedliche Alter aber auch die experimentellen Bedingungen zurückgeführt werden. Gerade neuere Studien konnten eine Temperaturabhängigkeit der Bindungseigenschaften für Glutamat am NMDA-Rezeptor nachweisen (Cais et al., 2008). Zumindest bei 25-27° Celsius konnte durch Patch-Clamp-Untersuchungen im Bereich der thalamischen Eingänge der lateralen Amygdala an 6-10 Wochen alten, coronalen Mäusehirnschnitten eine Verringerung NMDA-abhängiger EPSCs durch Ifenprodil, einem selektiven NR2B-Antagonisten, beobachtet werden (Miwa et al., 2008).

Auch für die Altersabhängigkeit der Einbeziehung des NMDA-Rezeptors in die basale Transmission gibt es Indizien. Schon in 4-5 Wochen alten Ratten konnte im coronalen Hirnschnitt keine Beeinflussung der basalen synaptischen Übertragung durch APV festgestellt werden (Huang & Kandel, 1998) ebenso wie bei Untersuchungen an coronalen Hirnschnitten 4-6 Wochen alter Ratten (Schroeder & Shinnick-Gallagher, 2004). Der altersabhängige Wechsel von NMDA-beeinflusst basaler Aktivität und NMDA-unabhängiger, scheint zeitlich zwischen der dritten und fünften Lebenswoche der Ratten, bei Mäusen eventuell auch früher, stattzufinden.

Die basale synaptische Transmission in der lateralen Amygdala adulter Tiere scheint sowohl im horizontalen Schnittpräparat (Pollandt et al., 2003) als auch in coronalen (Rainnie et al., 1991; Li et al., 1996) im wesentlichen durch AMPA- und

Kainatrezeptoren vermittelt zu werden. Weitere Unterschiede in Bezug auf die NMDA-Beteiligung an der basalen Transmission scheinen in der Reizlokalisierung zu liegen, da wir bei intranukleärer Reizung und Stimulierung der externen Kapsel keine NMDA-Beteiligung nachweisen konnten, jedoch die EPSPs im lateralen Kern bei thalamischer Reizung auch an die Aktivität von NMDA-Rezeptoren gebunden sind (Li et al., 1996). In einer kürzlich erschienenen Studie konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität der NMDA-abhängigen exzitatorischen postsynaptischen Ströme (EPSCs) bei einer extrazellulären Mg^{2+} Konzentration von 1,3 mM in der lateralen Amygdala signifikant kleiner sind als in der CA1-Region des Hippocampus (Miwa et al., 2008). Auch wenn dieser Befund die zugrunde liegenden Mechanismen nicht erklärt, so könnte die Schwelle für einen Kalziumeinstrom und damit für mögliche synaptische Plastizität in der lateralen Amygdala niedriger als in der CA1-Region sein.

Aufgrund dieser insgesamt sehr verschiedenen Ergebnisse wurden auch in unserer Arbeitsgruppe zusätzliche Patch-Clamp-Untersuchungen durchgeführt, um die Beteiligung der NMDAR-Untereinheiten an den Aktionspotenzialen evozierter EPSPs zu bestimmen (Müller et al., 2009). Die Applikation von NVP AAM077 (0,05 μ M) führte ebenso wie die von Ifenprodil (10 μ M) zu einer Abnahme der Amplitude der isolierten NMDA-Rezeptor vermittelten EPSC, die bei einem festgesetzten Membranpotenzial von +40 mV unter CNQX-Einfluss (einem AMPA-Rezeptor-Antagonisten) aufgezeichnet worden sind. Im Gegensatz zu den Patch-Clamp-Messungen in coronalen Hirnschnitten (Mahanty & Sah, 1999; Weisskopf & LeDoux, 1999), aber auch im Gegensatz zu den Patch-Clamp-Messungen unserer eigenen Arbeitsgruppe, zeigten die extrazellulär aufgezeichneten Input-Output-Kurven keine Beeinflussung durch NR2A- oder NR2B-Antagonisten. Die extrazellulären Messungen wurden unter fast der gleichen experimentellen Umgebung durchgeführt wie auch die Patch-Clamp-Untersuchungen (horizontaler Hirnschnitt, gleiches Alter, gleiche Reizelektrode). AMPA- und Kainat-Rezeptoren wurden bei den extrazellulären Aufnahmen jedoch nicht geblockt und durch die Einzelpulsstimulation die Magnesiumblockade der NMDA Rezeptoren vermutlich nicht aufgehoben.

Daher scheint das Ausmaß der NMDA-Beteiligung an der basalen synaptischen Übertragung nicht nur von den unterschiedlichen Afferenzen, die stimuliert wurden, von der untersuchten Tierart, von dem Alter der Tiere und von den experimentellen Rahmenbedingungen, wie beispielsweise von der Temperatur, abhängig zu sein,

sondern ebenfalls von der eigentlichen experimentellen Methode. Sämtliche Patch-Clamp-Untersuchungen wurden bei positivem Membranpotenzial, bei dem eine Magnesiumfreisetzung erwartet werden kann, durchgeführt. Unter diesen Umständen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die an den veränderten EPSCs beteiligten NMDA-Rezeptoren außerhalb der Synapse lokalisiert sind und deren Beteiligung an normaler synaptischer Übertragung damit unklar bleibt.

Unsere Beobachtung, dass bei der Gegenüberstellung der Input-Output-Kurven die Feldpotenzialamplituden bei Stimulierung der intranukleären Fasern mit niedriger Reizintensität größer waren, während bei höheren Intensitäten bei Stimulierung der externen Kapsel die größeren Potenzialantworten zu finden waren, lässt sich wahrscheinlich mit der unterschiedlichen Aktivierung in der Nähe liegender, hemmender GABAerger Interneurone erklären. Diese werden demnach bei höheren Reizintensitäten bei intranukleärer Reizung vermehrt in die synaptische Übertragung mit einbezogen und zeigen dann eine hemmende Wirkung auf die Größe des fEPSPs.

4.4. NMDA-Subtypen und das Paired-Pulse-Verhalten

Unsere Messungen zeigen, dass das Paired-Pulse-Verhalten durch das Einwaschen eines NR2A- oder NR2B-Antagonisten nicht signifikant beeinflusst wird. Dies stimmt mit früheren Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe (Drephal et al., 2006) überein, bei denen APV ebenfalls keinen Einfluss auf das Paired-Pulse-Verhalten zeigen konnte. Die postsynaptische Lokalisation der NMDA-Rezeptoren (Farb & LeDoux, 1997) unterstützt die in dieser Studie dargestellten Befunde. Somit scheinen präsynaptisch lokalisierte NMDA-Rezeptoren im lateralen Kern der Amygdala bei adulten Tieren keinen Einfluss auf die Transmitterfreisetzung auszuüben.

Die HFS-induzierte LTP zeigte sowohl bei intranukleärer Stimulation als auch bei EC-Reizung keine signifikante Veränderung des Paired-Pulse-Verhaltens. Dies steht jedoch im Widerspruch zu verschiedenen anderen Untersuchungen der Paired-Pulse-Fazilitierung nach LTP. So konnte durch Aktivierung präsynaptischer NMDA-Rezeptoren thalamischer Eingänge von kortikalen Axonen eine präsynaptisch vermittelte LTP nachgewiesen werden (Humeau et al., 2003). Ähnliche Beobachtungen

konnten im Bereich der Nuclei intercalati gemacht werden (Royer & Pare, 2002). Da wir jedoch keine präsynaptische Beteiligung von NMDA-Rezeptoren nachweisen konnten, scheint dieser Mechanismus bei adulten Mäusen weniger stark ausgeprägt zu sein.

In Übereinstimmung zu unseren Daten konnte auch bei EC-evozierter LA-LTP bei der Ratte keine präsynaptische Komponente nachgewiesen werden (Drephal et al., 2006). Diese Untersuchung fand ebenfalls am horizontalen Schnitt statt, während gegensätzliche Daten, die der EC-induzierten LA-LTP einen präsynaptischen Einfluss zusprechen, am coronalen Schnittpräparat gewonnen wurden (Tsvetkov et al., 2002). Zudem gibt es Hinweise auf die Beteiligung der präsynaptisch lokalisierten MAP-Kinase an der Ausbildung amygdalärer LTP (Apergis-Schoute et al., 2005).

Wir konnten zeigen, dass LFS eine Zunahme der Paired-Pulse-Fazilitierung induzierte, was auf eine präsynaptische Komponente der LA-LTD hinweist. Andere Daten scheinen dem entgegenzustehen (Wang & Gean, 1999). Die Resultate dieser Arbeit stützen die Hypothese, dass es zwei koexistente verschiedene Formen der LTD in der Amygdala gibt. Eine vorrangig präsynaptisch vermittelte Form, die im wesentlichen von metabotropen Glutamatrezeptoren der Gruppe II (mGluR II) abhängig ist, und eine zweite, die NMDA rezeptorabhängig eher postsynaptisch vermittelt wird (Lin et al., 2000).

Da die LA-LTD neben dem NMDA-Rezeptor auch den mGluR II benötigt (Heinbockel & Pape, 2000; Kaschel et al., 2004), ist die präsynaptische Aktivierung gerade durch diese präsynaptisch lokalisierten Rezeptoren denkbar, da NR2A- und NR2B-Antagonisten keine Veränderung des Paired-Pulse-Verhaltens ergaben.

Unsere Beobachtungen zeigen PP-LFS induzierte Langzeitdepressionen, die mit einer Verstärkung der Paired-Pulse-Fazilitierung (PPF) einhergehen und daher eher präsynaptisch vermittelt zu sein scheinen. Die verstärkte PPF nach LTD-Induktion ist somit ein Hinweis auf eine reduzierte Glutamatfreisetzung. Interessanterweise ist auch bei den einjährigen Tieren eine präsynaptische Beteiligung nach PP-LFS zu beobachten, auch wenn 60 Minuten nach Applikation dieses niedrigfrequenten Doppelpulses keine LTD mehr nachweisbar war.

Generell stehen unsere Messungen im Einklang mit denen anderer Studien. Während bei mittleren Reizabständen eine Paired-Pulse-Fazilitierung beobachtet werden kann (Zinebi et al., 2001), kommt es bei längeren Intervallen zu einer GABA_B-vermittelten Depression (Zinebi et al., 2002).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass sowohl LTP als auch LTD zumindest partiell im lateralen Kern der Amygdala postsynaptisch unter Beteiligung des NMDA-Rezeptors vermittelt werden.

4.5. NMDA-Subtypen und LTP

Die Langzeitpotenzierung in der lateralen Amygdala erfolgte hier einerseits durch Reizung von Afferenzen aus dem Bereich der externen Kapsel und andererseits intranukleär innerhalb des LA. Zwischen beiden Reizlokalisationen bestanden nahezu keine Unterschiede in Bezug auf die Größe der LTP aber auch hinsichtlich des Einflusses der Subtypantagonisten.

Die Blockade der NR2A- oder der NR2B-Untereinheit konnte eine Langzeitpotenzierung zwar nicht vollständig verhindern, sie führte aber zu einer deutlich schwächeren LTP, wenn man die Mittelwerte 60 Minuten nach LTP-Induktion betrachtet.

Eine Studie, in der die NR2B-Untereinheit im Bereich der lateralen Amygdala durch Ifenprodil, einem alternativen NR2B-Antagonisten, blockiert wurde, zeigte bei Reizung thalamischer Afferenzen im coronalen Hirnschnitt nach tetanischer Reizung einen deutlichen Effekt, sodass die LTP-Induktion fast vollständig verhindert werden konnte (Bauer et al., 2002a). Eine weitere kürzlich erschienene Studie zeigt den Einfluss der NR2B-Untereinheit unter Blockade durch Ifenprodil im Vergleich zwischen der CA1-Region des Hippocampus und dem lateralen Kern der Amygdala (Miwa et al., 2008). Auch diese Daten korrelieren mit unseren Ergebnissen, d.h. unter NR2B-Antagonisierung kam es zu einer starken bis vollständigen Reduktion der LTP. Auch durch Studien an genetisch veränderten Mäusen wurde bestätigt, dass die NR2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors zur LTP-Induktion beiträgt. In diesen Untersuchungen wurde die NR2B-Expression hochreguliert (Tang et al., 1999; Wong et al., 2002). Auch die Blockade der NR2B-Untereinheit durch CP-101,606 im Hippocampus zeigte bei LTP-Induktion der von CA3 nach CA1 verlaufenden Synapsen eine Reduktion der Langzeitpotenzierung (Berberich et al., 2005). Die Verwendung von Ro 25-6981, einem weiteren NR2B-Antagonisten, führte in der gleichen hippocampalen Region ebenfalls zu einer Verminderung der LTP um 45% (Bartlett et al., 2007), während eine andere Studie keinen Einfluss des NR2B-Antagonisten Ro 25-6981 auf

die Langzeitpotenzierung im Bereich des adulten perirhinalen Kortex feststellen konnte (Massey et al., 2004). Damit übereinstimmend zeigten Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe an hippocampalen CA1 Synapsen keine Beeinflussung durch die beiden NR2B-Antagonisten Ro25-6981 und Ifenprodil (Liu et al., 2004).

Im präfrontalen Kortex (anterior cingulate cortex, ACC) konnte wiederum eine Beteiligung der NR2B-Untereinheit an der Langzeitpotenzierung nachgewiesen werden (Zhao et al., 2005).

Während es in Bezug auf die NR2B-Untereinheit zwei Studien zum Einfluss auf die Langzeitpotenzierung in der lateralen Amygdala gibt, existiert nach unserem Kenntnisstand zum Einfluss der NR2A-Untereinheit aus der gleichen Region bislang keine Veröffentlichung.

Mit unseren Daten einhergehend zeigt die Applikation des NR2A-Antagonisten NVP AAM077 in den verwendeten Konzentrationen von 0,4 μM und 0,05 μM im Hippocampus eine deutliche Reduktion der Potenzialamplituden, jedoch keine vollständige Blockade der LTP (Berberich et al., 2005). Ähnliche Ergebnisse wurden auch in einer anderen den Hippocampus betreffenden Studie beobachtet (Bartlett et al., 2007).

Eine Untersuchung im Bereich des perirhinalen Kortex beschreibt den Einfluss der NR2A-Untereinheit als entscheidend, da in dieser Studie durch Applikation von NVP AAM077 eine LTP vollständig verhindert werden konnte, während der NR2B-Antagonist keinen Einfluss auf die LTP ausübte (Massey et al., 2004). Ähnliche Beobachtungen stammen aus dem Hippocampus, wobei auch hier NVP AAM077 die LTP vollständig reduzierte, während nach Applikation der NR2B-Antagonisten kein Unterschied der LTP im Vergleich zu den Kontrollmessungen ausgemacht werden konnte (Liu et al., 2004).

Die Daten aus dem präfrontalen Kortex (ACC) zeigen, wiederum mit unseren Daten übereinstimmend, dass die Blockade der NR2A-Untereinheit zu einer Abnahme der Langzeitpotenzierung führte. Aber auch im Hippocampus konnte an NR2A-knock-out-Mäusen eine deutlich schwächere LTP nach tetanischer Stimulation im Vergleich zu Wildtypmäusen beobachtet werden (Sakimura et al., 1995; Kiyama et al., 1998). Ähnliche Beobachtungen wurden vor kurzem von einer anderen Arbeitsgruppe gemacht (Kohr et al., 2003), wobei hier außerdem eine altersabhängige Zunahme der Beteiligung der NR2A-Untereinheit an der LTP in CA3-CA1 Synapsen ausgemacht werden konnte.

Es scheinen also struktur-, spezie- und paradigmenabhängige Unterschiede zu bestehen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die HFS-induzierte LA-LTP somit nicht nur von einer bestimmten Untereinheit des NMDA-Rezeptors abhängig ist. Im Gegensatz dazu stehen Beobachtungen zur LTP-Induktion an NR2A^{-/-} Mäusen, die eine ausschließliche Abhängigkeit der LTP nach wiederholter tetanischer Stimulation vom NR1/NR2B-Rezeptor postulieren (Sakimura et al., 1995; Kiyama et al., 1998).

4.6. NMDA-Subtypen und LTD

Die LTD wurde in der lateralen Amygdala bisher nur in wenigen Arbeiten untersucht. In der ersten Studie zur LA-LTD erfolgte die Induktion durch Theta-Puls-Stimulation (TPS; 8 Hz über 150 s) thalamischer Afferenzen im coronalen Hirnschnitt (Heinbockel & Pape, 2000). Unter diesem Protokoll konnte eine LTD bei 21 % der untersuchten Neurone beobachtet werden. In intrazellulären Ableitungen konnten wir zeigen, dass auch durch das Standardparadigma LFS-intranukleärer Fasern des LA LTD induzierbar ist (Kaschel et al., 2004). In der zweiten Studie unseres Labors an Wistarratten konnte dann festgestellt werden, dass im horizontalen Schnitt durch LFS (900 Pulse, 1 Hz LFS) eine stärkere LTD als durch TPS-Stimulation induziert werden konnte (Schubert et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde mittels intranukleärer niederfrequenter Reizung (LFS) eine LTD um etwa 23 % in Mäusen erreicht, während sich in einer anderen Arbeit eine LTD um 35 % zeigte (Kaschel et al., 2004). Gründe für die Unterschiede könnten in der Verwendung von Mäusen im Gegensatz zu Ratten, unterschiedlichen Haltungsbedingungen der Versuchstiere, bzw. in der Inanspruchnahme verschiedener Züchter liegen. Es ist vor allem zu berücksichtigen, dass auf Grund der unterschiedlichen Hirngröße ein 400 µm dicker Hirnschnitt der Maus eine viel größere Konnektivität besitzt als bei der Ratte. Somit würden mehr Afferenzen bei der Maus mit den gleichen Elektroden gereizt werden und es könnte mehr Kalzium einströmen, was dann zu einer geringeren LTD beitragen könnte. In einer weiteren Untersuchung an horizontalen Schnitten der Maus wurde beispielsweise eine LFS-induzierte LTD von etwa 15 % unter Kontrollbedingungen beschrieben (Tchekalarova & Albrecht, 2007). Für die basolaterale Amygdala ist im coronalen Schnitt nachgewiesen worden, dass die LTD durch APV blockiert wird und damit durch NMDA-Rezeptoren vermittelt wird (Wang

& Gean, 1999). Im lateralen Kern konnte erstmalig bei der Ratte gezeigt werden, dass auch hier NMDA-Rezeptoren an der Vermittlung der LTD beteiligt sind (Kaschel et al., 2004). Befunde zu Untereinheiten des NMDA-Rezeptors in Bezug auf die LTD in der lateralen Amygdala sind bisher nicht bekannt. In Arbeiten über den Hippocampus konnte jedoch ein Einfluss der NMDA-Rezeptoruntereinheiten nachgewiesen werden. So konnte gezeigt werden, dass die Blockade der NR2B-Untereinheit eine LTD verhinderte (Liu et al., 2004), während eine andere Arbeitsgruppe keinen Einfluss eines NR2B-Antagonisten auf die LTD-Induktion im Hippocampus ausmachen konnte, die Applikation eines NR2A-Antagonisten jedoch zu einer deutlich reduzierten LTD führte (Bartlett et al., 2007). Eine Möglichkeit für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte in der Verwendung verschieden alter Tiere liegen, sowie an einer altersabhängigen Expression und Verteilung der NMDA-Rezeptorkonfiguration in juvenilen Tieren.

In Studien zum Kortex konnte gezeigt werden, dass die Blockade von NR2B-Untereinheiten die Induktion einer LTD zuverlässig verhinderte, während ein NR2A-Antagonist keinen Einfluss auf das LTD-Verhalten zeigte (Massey et al., 2004).

In der lateralen Amygdala konnte in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden, dass die Vermittlung der LTD stärker von der NR2A-Untereinheit abhängt, da diese bei Blockierung der NR2B-Untereinheit durch Co 101244 schwach aktivierbar bleibt, während die Blockade der NR2A-Untereinheit eine LTD-Induktion durch LFS zuverlässig verhindert.

Die intranukleäre Reizung durch PP-LFS zeigt wie die LFS-assoziierte LTD eine stärkere Abhängigkeit von den NR2A-Subtypen des NMDA-Rezeptors.

Bisher konnte weder in coronalen (Heinbockel & Pape, 2000) noch in horizontalen Hirnschnitten (Kaschel et al., 2004; Tchekalarova & Albrecht, 2007) durch Reizung der externen Kapsel eine LTD erfolgreich induziert werden. Die Ursache dafür liegt vermutlich in der Verwendung ungeeigneter Stimulationsmuster bzw. -protokolle. Denkbar wäre beispielsweise eine gleichzeitige Aktivierung von hemmenden GABAergen Interneuronen und glutamatergen Projektionsneuronen durch die kortikalen Fasern der externen Kapsel. Der Einfluss der GABAergen Interneurone scheint bei EC-Stimulation stärker als bei intranukleärer Reizung zu sein. Möglich wäre dies durch eine etwas stärkere Hyperpolarisation der kortikalen Projektionsneurone, so dass die Mg^{2+} -Blockade der NMDA-Rezeptoren nicht durch die gleichen Stimulationsmuster wie bei intranukleärer Reizung aufgehoben würde. In der

vorliegenden Arbeit konnte mittels der Stimulation durch PP-LFS mit einem Interstimulusintervall von 40 ms erfolgreich eine LA-LTD induziert werden.

Zuvor konnte intranukleär mit einem Reizabstand von 40 ms die stärkste PP-LFS induzierte LTD erzielt werden, während im Hippocampus ein Paired-Pulse-Intervall von 50 ms verwendet wurde (Kemp et al., 2000).

Durch die Doppelpuls-LFS kommt es intrazellulär zu einem vermehrten Kalziumeinstrom, wodurch daraufhin die LTD initiiert wird. Der Einfluss des NR2B-Signalwegs scheint jedoch bei PP-LFS der kortikalen Fasern über den NR2A-vermittelten Weg zu überwiegen, da die Blockade der LTD nach NR2B-Antagonisierung deutlich stärker als unter Ausschaltung von NR2A war.

Die Wirkung der LTD innerhalb der Amygdala könnte durch den relativen Effekt einer LTP von umgebenen Synapsen durch ein erhöhtes Signal-Rausch-Verhältnis verstärkt werden. Ein solcher Effekt wurde erst kürzlich für Neurone des basolateralen Kerns der Amygdala beschrieben (Royer & Pare, 2003). Dieser Effekt und die Beobachtungen, dass Glutamat extrasynaptisch vor allem an NMDA-Rezeptoren bindet, die eine NR2B-Untereinheit enthalten (Dalby & Mody, 2003; Lozovaya et al., 2004; Scimemi et al., 2004), könnten die Grundlage für ein neues Modell der Speicherung bestimmter Muster und der neuronalen Vernetzung bilden (Rusakov et al., 2004). Nach dieser These könnte eine Erhöhung der umgebenen Glutamatkonzentration von extrasynaptischen NR2B NMDARs registriert werden und daraufhin eine LTD in den umliegenden Arealen auslösen. Dieser These stehen Immunogold-Elektronenmikroskopieuntersuchungen an 6-10 Wochen alten Mäusen entgegen, bei denen die NR2B NMDARs stärker im synaptischen als im extrasynaptischen Bereich lokalisiert sind (Miwa et al., 2008).

Sofern sich dieses Modell dennoch auch auf die EC-induzierte LTD der Amygdala anwenden lässt, ist auch bei der LTD-Induktion eine eher synaptisch lokalisierte NR2A-Beteiligung wahrscheinlich, da deren Blockade zu einer deutlichen Abschwächung der LTD geführt hat.

4.7. Plastizität im Alter

Mehrere Studien konnten eine starke altersabhängige Reduktion der LTP, als Indikator für synaptische Plastizität, im Bereich des Hippocampus nachweisen (Hori et al., 1992; Griffin et al., 2006). Es ist bekannt, dass alte Ratten Defizite des räumlichen Lernens, beispielsweise im Morris-Wasserlabyrinth (Morris Water Maze) aufweisen und damit einhergehend auch die Wechselwirkung von Amygdala und Hippocampus beeinträchtigt ist (Almaguer et al., 2002).

Die schlechtere Leistung im Morris-Wasserlabyrinth korreliert mit einer im Alter herabgesetzten NR2B-Protein-Expression (Clayton et al., 2002). Ein weiteres mögliches Erklärungsmodell in diesem Zusammenhang diskutiert eine verminderte Ansprechbarkeit der NMDA-Rezeptorenbindungsstelle für Glutamat (Peterson & Cotman, 1989; Baskys et al., 1990). Aber auch die vermehrte Expression der Marker für oxidativen und inflammatorischen Stress, beide typischerweise in den Alterungsprozess involviert, zeigt eine entgegengesetzte Korrelation zu der Fähigkeit der Tiere, eine LTP auszubilden (Maher et al., 2005; Watson et al., 2006). Verschiedene, aus der Mikroglia freigesetzte Zytokine, unter anderem IL-1, IL-1 β , IL-4 und IL-18, scheinen hier im Vordergrund zu stehen (Lynch & Lynch, 2002; Griffin et al., 2006). Zusätzlich wird dem Enantiomer D-Serin, als ein aus Astrozyten freigesetzter endogener Co-Agonist des NMDA-Rezeptors, eine wichtige Rolle in der altersassoziierten LTP zugeschrieben (Mothet et al., 2006). Die LTP-Induktion im Alter scheint stark vom Stimulationsprotokoll abhängig zu sein, da HFS kaum, Thetaburststimulation (TBS) hingegen starke Unterschiede zwischen jungen und alten Tieren im Bereich des Hippocampus zeigt (Moore et al., 1993; Lanahan et al., 1997). Im Bereich der Amygdala dient HFS als geeignetes Stimulationsmuster, da TBS bei alten Tieren keine LTP hervorruft (unveröffentlichte Beobachtungen). In 24 Monate alten Mäusen, ist die LA-LTP deutlich herabgesetzt (unveröffentlichte Beobachtungen). In diesem Zusammenhang zeigt die hier vorliegende Arbeit an 12 Monate alten Tieren, dass PP-LFS (40 ms) keine LA-LTD hervorrufen konnte.

4.8. Ausblick

Sehr interessant wäre ein Vergleich der pharmakologischen Blockade mit gendefizienten Mäusen. Problematisch ist hierbei jedoch, dass die Inaktivierung der NR1- sowie der NR2B-Gene zum frühen Tod der Mäuse kurz nach der Geburt führt (Seeburg et al., 2001). Die erst ab postnatalen Stadien exprimierte NR2A-Untereinheit kann ohne ernste Konsequenzen für die Maus genetisch entfernt werden. Gerade im Bereich des Hippocampus wurden mit diesen Tieren verschiedene Untersuchungen durchgeführt. Elektrophysiologisch konnte im Vergleich zu diesen Tieren die konzentrationsabhängige Blockade der NR2A-Untereinheit durch den selektiven Antagonisten NVP AAM077 nachgewiesen werden (Berberich et al., 2005; Bartlett et al., 2007). In verhaltensbiologischen Tests zeigen diese NR2A-knockout-Mäuse interessanterweise keine Beeinflussung des räumlichen Referenzgedächtnisses, das räumliche Kurzzeitgedächtnis war jedoch im Vergleich zu Wild-Typ-Mäusen deutlich verschlechtert (Bannerman et al., 2008).

Eine weitere Untersuchung an NR2A-knockout-Mäusen zeigte in verschiedenen Tests ein herabgesetztes Angstverhalten im Vergleich zu den Wild-Typ-Artgenossen, aber auch eine verminderte emotionale Reaktion, wenn sie mit einem leeren Käfig konfrontiert werden, was als antidepressiver Effekt gedeutet werden kann (Boyce-Rustay & Holmes, 2006).

Obwohl NR2B-gendefiziente Mäuse nicht lebensfähig sind, konnte dennoch gezeigt werden, dass die genetische Überexpression der NR2B-Untereinheit mit einer verstärkten LTP assoziiert war (Tang et al., 1999; Wong et al., 2002).

Für bipolare Störungen und Schizophrenie konnte eine verminderte Expression der NR2A NMDA-Untereinheit im Bereich des Hippocampus nachgewiesen werden (McCullumsmith et al., 2007; Beneyto & Meador-Woodruff, 2008); für die depressive Episode (Major Depression) zeigte sich, dass sowohl die NR2A- als auch die NR2B-Untereinheit vermindert exprimiert wurde (Beneyto et al., 2007).

Aber auch die Entstehung des neurologischen Krankheitsbildes der Epilepsie scheint mit der NR2A-Untereinheit des NMDA-Rezeptors verbunden zu sein, während beide, NR2A und NR2B, Untereinheiten am Untergang der Zellen im epileptischen Anfall beteiligt sind (Chen et al., 2007). Diese Befunde aus dem Bereich des Hippocampus

lassen auf die Entwicklung einer pharmakologischen NMDA-subtypspezifischen Therapie der genannten Krankheitsbilder hoffen. Da unsere Befunde im Bereich der lateralen Amygdala jedoch keine der beiden Untereinheiten als entscheidend für die Induktion einer LTP bzw. LTD ausmachen konnte, vielmehr das Vorhandensein beider Untereinheiten notwendig ist, ist eine gezielte therapeutische, pharmakologische Blockade einer dieser Untereinheiten in der Amygdala eher unwahrscheinlich.

5. Zusammenfassung

Der laterale Kern der Amygdala, als zentrale Schaltstelle für thalamische und kortikale Eingänge, hat eine zentrale Rolle bei der Furchtkonditionierung sowie des emotionalen und sozialen Verhaltens inne. Zur Beschreibung der synaptischen Plastizität, die Lernvorgängen zu Grunde liegt, sind Langzeitpotenzierung (LTP) und Langzeitdepression (LTD) verbreitete experimentelle Modelle. Die Beteiligung von NMDA-Rezeptoren (NMDAR) an lang anhaltenden synaptischen Veränderungen ist eine wesentliche Voraussetzung für die Vermittlung von LTP und LTD. Diese Rezeptoren sind aus NR1- und NR2-Untereinheiten aufgebaut, wobei sich die NR2-Einheit unter anderem weiter aus der NR2A- und der NR2B-Untereinheit zusammensetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der NR2A- und der NR2B-Untereinheit auf LTP und LTD an 400 µm dicken horizontalen Hirnschnitten adulter Mäuse (8-10 Wochen) mittels der Messung von extrazellulären Feldpotentialen untersucht. Diese Untersuchungen betrafen die kortikalen Afferenzen durch Reizung der externen Kapsel, aber auch intraamygdaläre Afferenzen durch intranukleäre Stimulation. Als Reizprotokolle dienten zur LTP-Induktion die Hochfrequenzreizung (HFS) und zur LTD-Induktion zum einen die niedrigfrequente Stimulation (LFS), und erstmalig im Bereich der Amygdala, auch die niedrigfrequente Doppelpulsstimulation (PP-LFS). Zur Blockade der NR2A-Untereinheit wurde NVP AAM077 in den Konzentrationen 0,05 µM, 0,1 µM und 0,4 µM verwendet. Als spezifische NR2B-Antagonisten dienten Co 101244 in einer Konzentration von 1 µM und Ro 04-5595 mit 10 µM.

Zusammengefasst zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass beide, NR2A- und NR2B-Untereinheit, für die Ausbildung von LTP und LTD in der lateralen Amygdala notwendig sind. Die durch die Antagonisten verminderte synaptische Plastizität beruht möglicherweise auf einem geringeren Kalziumeinstrom durch die NMDARs. Auch konnte, dem Stand der aktuellen Literatur nach, erstmalig gezeigt werden, dass sich durch die niedrigfrequente Doppelpulsstimulation mit einem Interstimulusintervall von 40 ms im Bereich der externen Kapsel eine stabile Langzeitdepression initiieren lässt. Die synaptische Plastizität im Bereich der Amygdala scheint weniger von bestimmten

NMDA-Rezeptoruntereinheiten allein als von Stimulationsmustern und den jeweiligen gereizten Afferenzen abhängig zu sein.

Schlagwörter: Amygdala, LTP, LTD, Co 101244, Ro 04-5595, NVP AAM077, Plastizität, NMDA-Rezeptor, NR2A, NR2B, niedrigfrequente Doppelpulsstimulation (PP-LFS), HFS, LFS

6. Abstract

Due to the linking of thalamic and cortical inputs the lateral nucleus of the amygdala appears to play an important role in fear conditioning as well as in emotional and social behavior. Long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) are widely accepted experimental models for describing synaptic plasticity in regard to learning activity. The recruitment of NMDA-Receptors (NMDAR) during long lasting synaptic alterations is a major condition for mediation of LTP and LTD. These receptors consist of NR1 and NR2 subunits, while each of the NR2 subunits is composed of the NR2A or the NR2B subtype. In the current study the contribution of the NR2A and the NR2B subtype on LTP and LTD induction has been assessed in adult mouse brain slices of 400 μm by measuring extracellular field potentials. These experiments were carried out by using different inputs to LA neurons, either cortical inputs through the external capsule (EC) or fibers within the lateral nucleus through intranuclear stimulation (IN). High frequency stimulation (HFS) was used for LTP induction, while LTD was triggered through low frequency stimulation (LFS) and, for the first time in the lateral amygdala, through double pulse low frequency stimulation (PP-LFS). The selective NR2A antagonist NVP AAM 077 was used in concentrations of 0,05 μM , 0,1 μM and 0,4 μM , while the specific NR2B antagonists were used at 1 μM (Co 101244) and 10 μM (Ro 04-5595). In general, our results indicate that both NR2A and NR2B subunits are required for the formation of LTP and LTD in the lateral nucleus of the amygdala. The abolishment or reduction of plasticity changes by these compounds could be due to the reduction in calcium influx via NMDARs.

For the first time it has been shown that paired pulse (interstimulus interval: 40 ms) low frequency stimulation causes stable LA-LTD through fibers running within the external capsule. Rather than resulting from exclusive roles of the NMDAR subtypes, the synaptic plasticity response in the amygdala appears to be directed by the pattern of synaptic activation and the inputs utilized.

Key Words: amygdala, LTP, LTD, Co 101244, Ro 04-5595, NVP AAM077, plasticity, NMDA receptor, NR2A, NR2B, low frequency paired pulse stimulation (PP-LFS), HFS, LFS

7. Literaturverzeichnis

1. Adolphs,R. (2008) Fear, faces, and the human amygdala. *Curr Opin Neurobiol* 18: 166-172.
2. Adolphs,R., Tranel,D., Damasio,H. & Damasio,A. (1994) Impaired recognition of emotion in facial expressions following bilateral damage to the human amygdala. *Nature* 372: 669-672.
3. Adolphs,R., Tranel,D., Damasio,H. & Damasio,A.R. (1995) Fear and the human amygdala. *J Neurosci* 15: 5879-5892.
4. Adolphs,R., Tranel,D., & Damasio,A.R. (1998) The human amygdala in social judgment. *Nature* 393: 470-474.
5. Almaguer,W., Estupinan,B., Uwe,F.J. & Bergado,J.A. (2002) Aging impairs amygdala-hippocampus interactions involved in hippocampal LTP. *Neurobiol Aging* 23: 319-324.
6. Amorapanth,P., LeDoux,J.E. & Nader,K. (2000) Different lateral amygdala outputs mediate reactions and actions elicited by a fear-arousing stimulus. *Nat Neurosci* 3: 74-79.
7. Apergis-Schoute,A.M., Debiec,J., Doyere,V., LeDoux,J.E. & Schafe,G.E. (2005) Auditory fear conditioning and long-term potentiation in the lateral amygdala require ERK/MAP kinase signaling in the auditory thalamus: a role for presynaptic plasticity in the fear system. *J Neurosci* 25: 5730-5739.
8. Aroniadou-Anderjaska,V., Post,R.M., Rogawski,M.A. & Li,H. (2001) Input-specific LTP and depotentiation in the basolateral amygdala. *Neuroreport* 12: 635-640.
9. Bannerman,D.M., Niewoehner,B., Lyon,L., Romberg,C., Schmitt,W.B., Taylor,A. *et al.* (2008) NMDA receptor subunit NR2A is required for rapidly acquired spatial working memory but not incremental spatial reference memory. *J Neurosci* 28: 3623-3630.
10. Baron-Cohen,S., Ring,H.A., Bullmore,E.T., Wheelwright,S., Ashwin,C. & Williams,S.C. (2000) The amygdala theory of autism. *Neurosci Biobehav Rev* 24: 355-364.
11. Bartlett,T.E., Bannister,N.J., Collett,V.J., Dargan,S.L., Massey,P.V., Bortolotto,Z.A. *et al.* (2007) Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in LTP and LTD in the CA1 region of two-week old rat hippocampus. *Neuropharmacology* 52: 60-70.
12. Baskys,A., Reynolds,J.N. & Carlen,P.L. (1990) NMDA depolarizations and long-term potentiation are reduced in the aged rat neocortex. *Brain Res* 530: 142-146.

13. Bauer,E.P., Schafe,G.E. & 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.
14. Beneyto,M., Kristiansen,L.V., Oni-Orisan,A., McCullumsmith,R.E. & Meador-Woodruff,J.H. (2007) Abnormal glutamate receptor expression in the medial temporal lobe in schizophrenia and mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 32: 1888-1902.
15. Beneyto,M. & Meador-Woodruff,J.H. (2008) Lamina-specific abnormalities of NMDA receptor-associated postsynaptic protein transcripts in the prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 33: 2175-2186.
16. Berberich,S., Punnakkal,P., Jensen,V., Pawlak,V., Seeburg,P.H., Hvalby,O. & Kohr,G. (2005) Lack of NMDA receptor subtype selectivity for hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 25: 6907-6910.
17. Blair,H.T., Schafe,G.E., Bauer,E.P., Rodrigues,S.M. & LeDoux,J.E. (2001) Synaptic plasticity in the lateral amygdala: a cellular hypothesis of fear conditioning. *Learn Mem* 8: 229-242.
18. Boyce-Rustay,J.M. & Holmes,A. (2006) Genetic inactivation of the NMDA receptor NR2A subunit has anxiolytic- and antidepressant-like effects in mice. *Neuropsychopharmacology* 31: 2405-2414.
19. Cais,O., Sedlacek,M., Horak,M., Dittert,I. & Vyklicky,L., Jr. (2008) Temperature dependence of NR1/NR2B NMDA receptor channels. *Neuroscience* 151: 428-438.
20. Canteras,N.S. & Swanson,L.W. (1992) Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. *J Comp Neurol* 324: 180-194.
21. Carvajal,F., Rubio,S., Martin,P., Serrano,J.M. & Garcia-Sola,R. (2008) Perception and recall of faces and facial expressions following temporal lobectomy. *Epilepsy Behav.*
22. Chen,Q., He,S., Hu,X.L., Yu,J., Zhou,Y., Zheng,J. *et al.* (2007) Differential roles of NR2A- and NR2B-Containing NMDA Receptors in Activity-Dependent Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene Regulation and Limbic Epileptogenesis. *J Neurosci* 27: 542-552.
23. Ciabarra,A.M., Sullivan,J.M., Gahn,L.G., Pecht,G., Heinemann,S. & Sevarino,K.A. (1995) Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. *J Neurosci* 15: 6498-6508.
24. Clayton,D.A., Mesches,M.H., Alvarez,E., Bickford,P.C. & Browning,M.D. (2002) A hippocampal NR2B deficit can mimic age-related changes in long-term

potentiation and spatial learning in the Fischer 344 rat. *J Neurosci* 22: 3628-3637.

25. Clugnet, M.C. & LeDoux, J.E. (1990) Synaptic plasticity in fear conditioning circuits: induction of LTP in the lateral nucleus of the amygdala by stimulation of the medial geniculate body. *J Neurosci* 10: 2818-2824.
26. Commins, S., Gigg, J., Anderson, M. & O'Mara, S.M. (1998) Interaction between paired-pulse facilitation and long-term potentiation in the projection from hippocampal area CA1 to the subiculum. *Neuroreport* 9: 4109-4113.
27. Contractor, A., Swanson, G.T., Sailer, A., O'Gorman, S. & Heinemann, S.F. (2000) Identification of the kainate receptor subunits underlying modulation of excitatory synaptic transmission in the CA3 region of the hippocampus. *J Neurosci* 20: 8269-8278.
28. Dalby, N.O. & Mody, I. (2003) Activation of NMDA receptors in rat dentate gyrus granule cells by spontaneous and evoked transmitter release. *J Neurophysiol* 90: 786-797.
29. Doron, N.N. & LeDoux, J.E. (1999) Organization of projections to the lateral amygdala from auditory and visual areas of the thalamus in the rat. *J Comp Neurol* 412: 383-409.
30. Doyere, V., Schafe, G.E., Sigurdsson, T. & LeDoux, J.E. (2003) Long-term potentiation in freely moving rats reveals asymmetries in thalamic and cortical inputs to the lateral amygdala. *Eur J Neurosci* 17: 2703-2715.
31. Drephal, C., Schubert, M. & Albrecht, D. (2006) Input-specific long-term potentiation in the rat lateral amygdala of horizontal slices. *Neurobiol Learn Mem* 85: 272-282.
32. Eriksson, M., Nilsson, A., Samuelsson, H., Samuelsson, E.B., Mo, L., Akesson, E. *et al.* (2007) On the role of NR3A in human NMDA receptors. *Physiol Behav* 92: 54-59.
33. Faber, E.S., Callister, R.J. & Sah, P. (2001) Morphological and electrophysiological properties of principal neurons in the rat lateral amygdala in vitro. *J Neurophysiol* 85: 714-723.
34. Farb, C.R. & LeDoux, J.E. (1999) Afferents from rat temporal cortex synapse on lateral amygdala neurons that express NMDA and AMPA receptors. *Synapse* 33: 218-229.
35. Farb, C.R. & 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.
36. Gaul, C., Jordan, B., Wustmann, T. & Preuss, U.W. (2007) [Klüver-Bucy syndrome in humans]. *Nervenarzt* 78: 821-823.

37. Gean,P.W., Chang,F.C., Huang,C.C., Lin,J.H. & Way,L.J. (1993) Long-term enhancement of EPSP and NMDA receptor-mediated synaptic transmission in the amygdala. *Brain Res Bull* 31: 7-11.
38. Gemmell,C. & O'Mara,S.M. (2002) Plasticity in the projection from the anterior thalamic nuclei to the anterior cingulate cortex in the rat in vivo: paired-pulse facilitation, long-term potentiation and short-term depression. *Neuroscience* 109: 401-406.
39. Goosens,K.A. & Maren,S. (2004) NMDA receptors are essential for the acquisition, but not expression, of conditional fear and associative spike firing in the lateral amygdala. *Eur J Neurosci* 20: 537-548.
40. Gosselin,N., Peretz,I., Johnsen,E. & Adolphs,R. (2007) Amygdala damage impairs emotion recognition from music. *Neuropsychologia* 45: 236-244.
41. Griffin,R., Nally,R., Nolan,Y., McCartney,Y., Linden,J. & Lynch,M.A. (2006) The age-related attenuation in long-term potentiation is associated with microglial activation. *J Neurochem* 99: 1263-1272.
42. Hall,E. (1972) The amygdala of the cat: a Golgi study. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 134: 439-458.
43. Hall,J., Thomas,K.L. & Everitt,B.J. (2001) Fear memory retrieval induces CREB phosphorylation and Fos expression within the amygdala. *Eur J Neurosci* 13: 1453-1458.
44. Hamada,T., McLean,W.H.I., Ramsay,M., Ashton,G.H.S., Nanda,A., Jenkins,T. *et al.* (2002) Lipoid proteinosis maps to 1q21 and is caused by mutations in the extracellular matrix protein 1 gene (ECM1). *Hum Mol Genet* 11: 833-840.
45. Hamann,S.B., Ely,T.D., Grafton,S.T. & Kilts,C.D. (1999) Amygdala activity related to enhanced memory for pleasant and aversive stimuli. *Nat Neurosci* 2: 289-293.
46. Heinbockel,T. & Pape,H.C. (2000) Input-specific long-term depression in the lateral amygdala evoked by theta frequency stimulation. *J Neurosci* 20: RC68.
47. Hori,N., Hirotsu,I., Davis,P.J. & Carpenter,D.O. (1992) Long-term potentiation is lost in aged rats but preserved by calorie restriction. *Neuroreport* 3: 1085-1088.
48. Huang,Y.Y. & Kandel,E.R. (1998) Postsynaptic induction and PKA-dependent expression of LTP in the lateral amygdala. *Neuron* 21: 169-178.
49. Humeau,Y., Shaban,H., Bissiere,S. & Luthi,A. (2003) Presynaptic induction of heterosynaptic associative plasticity in the mammalian brain. *Nature* 426: 841-845.
50. Hurlemann,R., Wagner,M., Hawellek,B., Reich,H., Pieperhoff,P., Amunts,K. *et al.* (2007) Amygdala control of emotion-induced forgetting and remembering: evidence from Urbach-Wiethe disease. *Neuropsychologia* 45: 877-884.

51. Kalynchuk,L.E. (2000) Long-term amygdala kindling in rats as a model for the study of interictal emotionality in temporal lobe epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev* 24: 691-704.
52. Kaschel,T., Schubert,M. & Albrecht,D. (2004) Long-term depression in horizontal slices of the rat lateral amygdala. *Synapse* 53: 141-150.
53. Kashiwagi,K., Pahk,A.J., Masuko,T., Igarashi,K. & Williams,K. (1997) Block and modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by polyamines and protons: role of amino acid residues in the transmembrane and pore-forming regions of NR1 and NR2 subunits. *Mol Pharmacol* 52: 701-713.
54. Keinanen,K., Wisden,W., Sommer,B., Werner,P., Herb,A., Verdoorn,T.A. *et al.* (1990) A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science* 249: 556-560.
55. Kemp,N. & Bashir,Z.I. (1999) Induction of LTD in the adult hippocampus by the synaptic activation of AMPA/kainate and metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* 38: 495-504.
56. Kemp,A. & Manahan-Vaughan,D. (2007) Hippocampal long-term depression: master or minion in declarative memory processes? *Trends Neurosci* 30: 111-118.
57. Kemp,N., McQueen,J., Faulkes,S. & Bashir,Z.I. (2000) Different forms of LTD in the CA1 region of the hippocampus: role of age and stimulus protocol. *Eur J Neurosci* 12: 360-366.
58. Kiyama,Y., Manabe,T., Sakimura,K., Kawakami,F., Mori,H. & Mishina,M. (1998) Increased thresholds for long-term potentiation and contextual learning in mice lacking the NMDA-type glutamate receptor epsilon1 subunit. *J Neurosci* 18: 6704-6712.
59. Klueva,J., Munsch,T., Albrecht,D. & Pape,H.C. (2003) Synaptic and non-synaptic mechanisms of amygdala recruitment into temporolimbic epileptiform activities. *Eur J Neurosci* 18: 2779-2791.
60. Kluver,H. & Bucy,P.C. (1939) Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 9: 606-620.
61. Kohr,G., Jensen,V., Koester,H.J., Mihaljevic,A.L., Utvik,J.K., Kvello,A. *et al.* (2003) Intracellular domains of NMDA receptor subtypes are determinants for long-term potentiation induction. *J Neurosci* 23: 10791-10799.
62. Kosaka,H., Omori,M., Murata,T., Iidaka,T., Yamada,H., Okada,T. *et al.* (2002) Differential amygdala response during facial recognition in patients with schizophrenia: an fMRI study. *Schizophr Res* 57: 87-95.
63. Krettek,J.E. & Price,J.L. (1978) A description of the amygdaloid complex in the rat and cat with observations on intra-amygdaloid axonal connections. *J Comp Neurol* 178: 255-280.

64. LaBar,K.S., LeDoux,J.E., Spencer,D.D. & Phelps,E.A. (1995) Impaired fear conditioning following unilateral temporal lobectomy in humans. *J Neurosci* 15: 6846-6855.
65. Lanahan,A., Lyford,G., Stevenson,G.S., Worley,P.F. & Barnes,C.A. (1997) Selective alteration of long-term potentiation-induced transcriptional response in hippocampus of aged, memory-impaired rats. *J Neurosci* 17: 2876-2885.
66. LeDoux,J.E. (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23: 155-184.
67. LeDoux,J.E. & Muller,J. (1997) Emotional memory and psychopathology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352: 1719-1726.
68. Li,S., Anwyl,R. & Rowan,M.J. (2000) A persistent reduction in short-term facilitation accompanies long-term potentiation in the CA1 area in the intact hippocampus. *Neuroscience* 100: 213-220.
69. Li,S.T., Kato,K., Tomizawa,K., Matsushita,M., Moriwaki,A., Matsui,H. & Mikoshiba,K. (2002) Calcineurin plays different roles in group II metabotropic glutamate receptor- and NMDA receptor-dependent long-term depression. *J Neurosci* 22: 5034-5041.
70. Li,X.F., Stutzmann,G.E. & LeDoux,J.E. (1996) Convergent but temporally separated inputs to lateral amygdala neurons from the auditory thalamus and auditory cortex use different postsynaptic receptors: in vivo intracellular and extracellular recordings in fear conditioning pathways. *Learn Mem* 3: 229-242.
71. Lilly,R., Cummings,J.L., Benson,D.F. & Frankel,M. (1983) The human Kluver-Bucy syndrome. *Neurology* 33: 1141-1145.
72. Lin,C.H., Lee,C.C. & Gean,P.W. (2003) Involvement of a calcineurin cascade in amygdala depotentiation and quenching of fear memory. *Mol Pharmacol* 63: 44-52.
73. Lin,H.C., Wang,S.J., Luo,M.Z. & Gean,P.W. (2000) Activation of group II metabotropic glutamate receptors induces long-term depression of synaptic transmission in the rat amygdala. *J Neurosci* 20: 9017-9024.
74. Liu,L., Wong,T.P., Pozza,M.F., Lingenhoehl,K., Wang,Y., Sheng,M. *et al.* (2004) Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science* 304: 1021-1024.
75. Lozovaya,N.A., Grebenyuk,S.E., Tsintsadze,T.S., Feng,B., Monaghan,D.T. & Krishtal,O.A. (2004) Extrasynaptic NR2B and NR2D subunits of NMDA receptors shape 'superslow' afterburst EPSC in rat hippocampus. *J Physiol* 558: 451-463.
76. Lynch,A.M. & Lynch,M.A. (2002) The age-related increase in IL-1 type I receptor in rat hippocampus is coupled with an increase in caspase-3 activation. *Eur J Neurosci* 15: 1779-1788.

77. Machado,C.J. & Bachevalier,J. (2008) Behavioral and hormonal reactivity to threat: effects of selective amygdala, hippocampal or orbital frontal lesions in monkeys. *Psychoneuroendocrinology* 33: 926-941.
78. Mahanty,N.K. & Sah,P. (1999) Excitatory synaptic inputs to pyramidal neurons of the lateral amygdala. *Eur J Neurosci* 11: 1217-1222.
79. Maher,F.O., Nolan,Y. & Lynch,M.A. (2005) Downregulation of IL-4-induced signalling in hippocampus contributes to deficits in LTP in the aged rat. *Neurobiol Aging* 26: 717-728.
80. Maren,S. (2003) The amygdala, synaptic plasticity, and fear memory. *Ann N Y Acad Sci* 985: 106-113.
81. Maren,S. & Fanselow,M.S. (1995) Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal formation stimulation in vivo. *J Neurosci* 15: 7548-7564.
82. Martin,S.J., Grimwood,P.D. & Morris,R.G. (2000) Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 23: 649-711.
83. Massey,P.V., Johnson,B.E., Moul,P.R., Auberson,Y.P., Brown,M.W., Molnar,E. *et al.* (2004) Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression. *J Neurosci* 24: 7821-7828.
84. Mayer,M.L. (2005) Crystal structures of the GluR5 and GluR6 ligand binding cores: molecular mechanisms underlying kainate receptor selectivity. *Neuron* 45: 539-552.
85. McCullumsmith,R.E., Kristiansen,L.V., Beneyto,M., Scarr,E., Dean,B. & Meador-Woodruff,J.H. (2007) Decreased NR1, NR2A, and SAP102 transcript expression in the hippocampus in bipolar disorder. *Brain Res* 1127: 108-118.
86. McDonald,A.J. (1998) Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol* 55: 257-332.
87. McDonald,A.J. & Augustine,J.R. (1993) Localization of GABA-like immunoreactivity in the monkey amygdala. *Neuroscience* 52: 281-294.
88. McGaugh,J.L. (2002) Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. *Trends Neurosci* 25: 456.
89. McKernan,M.G. & Shinnick-Gallagher,P. (1997) Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro. *Nature* 390: 607-611.
90. Millhouse,O.E. & DeOlmos,J. (1983) Neuronal configurations in lateral and basolateral amygdala. *Neuroscience* 10: 1269-1300.
91. Milner,B., Squire,L.R. & Kandel,E.R. (1998) Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20: 445-468.

92. Miwa,H., Fukaya,M., Watabe,A.M., Watanabe,M. & Manabe,T. (2008) Functional contributions of synaptically localized NR2B subunits of the NMDA receptor to synaptic transmission and long-term potentiation in the adult mouse CNS. *J Physiol* 586: 2539-2550.
93. Moore,C.I., Browning,M.D. & Rose,G.M. (1993) Hippocampal plasticity induced by primed burst, but not long-term potentiation, stimulation is impaired in area CA1 of aged Fischer 344 rats. *Hippocampus* 3: 57-66.
94. Morris,J.S., deBonis,M. & Dolan,R.J. (2002) Human amygdala responses to fearful eyes. *NeuroImage* 17: 214-222.
95. Morris,J.S., Ohman,A. & Dolan,R.J. (1998) Conscious and unconscious emotional learning in the human amygdala. *Nature* 393: 467-470.
96. Mothet,J.P., Rouaud,E., Sinet,P.M., Potier,B., Jouvenceau,A., Dutar,P. *et al.* (2006) A critical role for the glial-derived neuromodulator D-serine in the age-related deficits of cellular mechanisms of learning and memory. *Aging Cell* 5: 267-274.
97. Müller,T., Albrecht,D., & 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.
98. Mutel,V., Buchy,D., Klingelschmidt,A., Messer,J., Bleuel,Z., Kemp,JA. and Richards,J.G. (1998) In vitro binding properties in rat brain of [3H]Ro 25-6981, a potent and selective antagonist of NMDA receptors containing NR2B subunits. *J Neurochem* 70: 2147-55.
99. Nicoll,R.A. & Malenka,R.C. (1995) Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 377: 115-118.
100. Nowak,L., Bregestovski,P., Ascher,P., Herbet,A. & Prochiantz,A. (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307: 462-465.
101. Pare,D. & Collins,D.R. (2000) Neuronal correlates of fear in the lateral amygdala: multiple extracellular recordings in conscious cats. *J Neurosci* 20: 2701-2710.
102. Pare,D., Pape,H.C. & Dong,J. (1995) Bursting and oscillating neurons of the cat basolateral amygdaloid complex in vivo: electrophysiological properties and morphological features. *J Neurophysiol* 74: 1179-1191.
103. Pena,F., Bargas,J. & Tapia,R. (2002) Paired pulse facilitation is turned into paired pulse depression in hippocampal slices after epilepsy induced by 4-aminopyridine in vivo. *Neuropharmacology* 42: 807-812.
104. Peterson,C. & Cotman,C.W. (1989) Strain-dependent decrease in glutamate binding to the N-methyl-D-aspartic acid receptor during aging. *Neurosci Lett* 104: 309-313.

105. Pitkanen, A. 2000. Connectivity in the rat amygdaloid complex. In Aggleton, J.P. (Ed) *The Amygdala: A functional analysis* (pp. 31-116). Oxford: Oxford University Press.
106. Pollandt,S., Drephal,C. & Albrecht,D. (2003) 8-OH-DPAT suppresses the induction of LTP in brain slices of the rat lateral amygdala. *Neuroreport* 14: 895-897.
107. Price, J.L., Russchen, F.T. and Amaral, D.G. (1987) The Limbic Region II: The amygdaloid complex. In Björklund, A., Hökfeld, T. and Swanson, L.W. (Eds) *Handbook of Chemical Neuroanatomy, Vol 5, Integrated Systems of the CNS, Part I* (pp. 279-388). Amsterdam: Elsevier.
108. Quirk,G.J., Repa,C. & LeDoux,J.E. (1995) Fear conditioning enhances short-latency auditory responses of lateral amygdala neurons: parallel recordings in the freely behaving rat. *Neuron* 15: 1029-1039.
109. Racine,R.J., Milgram,N.W. & Hafner,S. (1983) Long-term potentiation phenomena in the rat limbic forebrain. *Brain Res* 260: 217-231.
110. Rainnie,D.G., Asproдини,E.K. & Shinnick-Gallagher,P. (1991) Excitatory transmission in the basolateral amygdala. *J Neurophysiol* 66: 986-998.
111. Rasia-Filho,A.A., Londero,R.G. & Achaval,M. (2000) Functional activities of the amygdala: an overview. *J Psychiatry Neurosci* 25: 14-23.
112. Ray,J.P. & Price,J.L. (1992) The organization of the thalamocortical connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the ventral forebrain-prefrontal cortex topography. *J Comp Neurol* 323: 167-197.
113. Rodrigues,S.M., Farb,C.R., Bauer,E.P., LeDoux,J.E. & Schafe,G.E. (2004) Pavlovian fear conditioning regulates Thr286 autophosphorylation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II at lateral amygdala synapses. *J Neurosci* 24: 3281-3288.
114. Rogan,M.T., Staubli,U.V. & LeDoux,J.E. (1997) Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature* 390: 604-607.
115. Royer,S. & Pare,D. (2002) Bidirectional synaptic plasticity in intercalated amygdala neurons and the extinction of conditioned fear responses. *Neuroscience* 115: 455-462.
116. Royer,S. & Pare,D. (2003) Conservation of total synaptic weight through balanced synaptic depression and potentiation. *Nature* 422: 518-522.
117. Rumpel,S., LeDoux,J., Zador,A. & Malinow,R. (2005) Postsynaptic receptor trafficking underlying a form of associative learning. *Science* 308: 83-88.
118. Rusakov,D.A., Scimemi,A., Walker,M.C. & Kullmann,D.M. (2004) Comment on "Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity". *Science* 305: 1912.

119. Sah,P., Faber,E.S., Lopez De,A.M. & Power,J. (2003) The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev* 83: 803-834.
120. Sah,P., Westbrook,R.F. & Luthi,A. (2008) Fear conditioning and long-term potentiation in the amygdala: what really is the connection? *Ann N Y Acad Sci* 1129: 88-95.
121. Sakimura,K., Kutsuwada,T., Ito,I., Manabe,T., Takayama,C., Kushiya,E. *et al.* (1995) Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Nature* 373: 151-155.
122. Samson,R.D., Dumont,E.C. & Pare,D. (2003) Feedback inhibition defines transverse processing modules in the lateral amygdala. *J Neurosci* 23: 1966-1973.
123. Schafe,G.E., Atkins,C.M., Swank,M.W., Bauer,E.P., Sweatt,J.D. & LeDoux,J.E. (2000) Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning. *J Neurosci* 20: 8177-8187.
124. Schroeder,B.W. & 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.
125. Schubert,M. & Albrecht,D. (2008) Activation of kainate GLU(K5) transmission rescues kindling-induced impairment of LTP in the rat lateral amygdala. *Neuropsychopharmacology* 33: 2524-2535.
126. Schubert,M., Drephal,C. & Albrecht,D. (2008) Gender-dependent ATPA-induced changes in long-term potentiation in the rat lateral amygdala. *FASEB J* 22: 1268-1274.
127. Schubert,M., Siegmund,H., Pape,H.C. & Albrecht,D. (2005) Kindling-induced changes in plasticity of the rat amygdala and hippocampus. *Learn Mem* 12: 520-526.
128. Scimemi,A., Fine,A., Kullmann,D.M. & Rusakov,D.A. (2004) NR2B-containing receptors mediate cross talk among hippocampal synapses. *J Neurosci* 24: 4767-4777.
129. Seeburg,P.H., Single,F., Kuner,T., Higuchi,M. & Sprengel,R. (2001) Genetic manipulation of key determinants of ion flow in glutamate receptor channels in the mouse. *Brain Res* 907: 233-243.
130. Shi,C. & Davis,M. (2001) Visual pathways involved in fear conditioning measured with fear-potentiated startle: behavioral and anatomic studies. *J Neurosci* 21: 9844-9855.
131. Shin,R.M., Tsvetkov,E. & Bolshakov,V.Y. (2006) Spatiotemporal asymmetry of associative synaptic plasticity in fear conditioning pathways. *Neuron* 52: 883-896.

132. Shinnick-Gallagher,P., McKernan,M.G., Xie,J. & Zinebi,F. (2003) L-type voltage-gated calcium channels are involved in the in vivo and in vitro expression of fear conditioning. *Ann N Y Acad Sci* 985: 135-149.
133. Siebert,M., Markowitsch,H.J. & Bartel,P. (2003) Amygdala, affect and cognition: evidence from 10 patients with Urbach-Wiethe disease. *Brain* 126: 2627-2637.
134. Spezio,M.L., Huang,P.Y.S., Castelli,F. & Adolphs,R. (2007) Amygdala Damage Impairs Eye Contact During Conversations with Real People. *J Neurosci* 27: 3994-3997.
135. Stanford,I.M., Wheal,H.V. & Chad,J.E. (1995) Bicuculline enhances the late GABAB receptor-mediated paired-pulse inhibition observed in rat hippocampal slices. *Eur J Pharmacol* 277: 229-234.
136. Sucher,N.J., Akbarian,S., Chi,C.L., Leclerc,C.L., Awobuluyi,M., Deitcher,D.L. et al. (1995) Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain. *J Neurosci* 15: 6509-6520.
137. Sweeten,T.L., Posey,D.J., Shekhar,A. & McDougale,C.J. (2002) The amygdala and related structures in the pathophysiology of autism. *Pharmacol Biochem Behav* 71: 449-455.
138. Szinyei,C., Stork,O. & Pape,H.C. (2003) Contribution of NR2B subunits to synaptic transmission in amygdaloid interneurons. *J Neurosci* 23: 2549-2556.
139. Tang,Y.P., Shimizu,E., Dube,G.R., Rampon,C., Kerchner,G.A., Zhuo,M. et al. (1999) Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401: 63-69.
140. Tchekalarova,J. & Albrecht,D. (2007) Angiotensin II suppresses long-term depression in the lateral amygdala of mice via L-type calcium channels. *Neurosci Lett* 415: 68-72.
141. Tsvetkov,E., Carlezon,W.A., Benes,F.M., Kandel,E.R. & 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.
142. Tuunanen,J. & Pitkanen,A. (2000) Do seizures cause neuronal damage in rat amygdala kindling? *Epilepsy Res* 39: 171-176.
143. von Bohlen und Halbach,O. & 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.
144. von Bohlen und Halbach,O. & 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.
145. Wang,S.J. & Gean,P.W. (1999) Long-term depression of excitatory synaptic transmission in the rat amygdala. *J Neurosci* 19: 10656-10663.

146. Watanabe,Y., Ikegaya,Y., Saito,H. and Abe,K. (1995) Roles of GABAA, NMDA and muscarinic receptors in induction of long-term potentiation in the medial and lateral amygdala in vitro. *Neurosci Res* 21: 317-322.
147. Watkins,J.C. & Evans,R.H. (1981) Excitatory amino acid transmitters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 21: 165-204.
148. Watson,J.B., Arnold,M.M., Ho,Y.S. & O'Dell,T.J. (2006) Age-dependent modulation of hippocampal long-term potentiation by antioxidant enzymes. *J Neurosci Res* 84: 1564-1574.
149. Weidenhofer,J., Scott,R.J. & Tooney,P.A. (2008) Investigation of the expression of genes affecting cytomatrix active zone function in the amygdala in schizophrenia: Effects of antipsychotic drugs. *J Psychiatr Res*.
150. Weisskopf,M.G. & LeDoux,J.E. (1999) Distinct populations of NMDA receptors at subcortical and cortical inputs to principal cells of the lateral amygdala. *J Neurophysiol* 81: 930-934.
151. Wong,R.W., Setou,M., Teng,J., Takei,Y. & Hirokawa,N. (2002) Overexpression of motor protein KIF17 enhances spatial and working memory in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 14500-14505.
152. Yamakura,T. & Shimoji,K. (1999) Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Prog Neurobiol* 59: 279-298.
153. Yao,Y., Harrison,C.B., Freddolino,P.L., Schulten,K. & Mayer,M.L. (2008) Molecular mechanism of ligand recognition by NR3 subtype glutamate receptors. *EMBO J* 27: 2158-2170.
154. Yu,S.Y., Wu,D.C., Liu,L., Ge,Y. & Wang,Y.T. (2008) Role of AMPA receptor trafficking in NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in the rat lateral amygdala. *J Neurochem* 106: 889-899.
155. Zhao,M.G., Toyoda,H., Lee,Y.S., Wu,L.J., Ko,S.W., Zhang,X.H. *et al.* (2005) Roles of NMDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. *Neuron* 47: 859-872.
156. Zinebi,F., McKernan,M. & Shinnick-Gallagher,P. (2002) Expression of fear-conditioning is accompanied by increased paired-pulse depression within the amygdala. *Pharmacol Biochem Behav* 71: 393-400.
157. Zinebi,F., Russell,R.T., McKernan,M. & Shinnick-Gallagher,P. (2001) Comparison of paired-pulse facilitation of AMPA and NMDA synaptic currents in the lateral amygdala. *Synapse* 42: 115-127.
158. Zucker,R.S. (1989) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 12: 13-31.

8. Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

AAA	anteriore amygdaläre Region
AB	akzessorischer basaler Kern der Amygdala
ACC	anteriorer Gyrus cinguli (anterior cingulate cortex), präfrontaler Kortex
ACSF	künstlich hergestellte Nährlösung (artificial cerebrospinal fluid)
AHA	amygdalo-hippocampale Region
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure
AMPAR	AMPA-Rezeptor
APV	2-Amino-5-phosphonovaleriansäure, NMDA-Antagonist
B	basaler Kern der Amygdala
BAOT	Bed Nucleus des akzessorischen olfaktorischen Traktes
BLA	basolateraler Kern der Amygdala
BNST	Bed Nucleus der Stria terminalis
CA1	anatomische Region im Hippocampus; Cornu ammonis
CA3	anatomische Region im Hippocampus; Cornu ammonis
Ca ²⁺	Kalzium
CaMKII	Kalzium/Calmodulinabhängige Kinase II
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CE	Zentraler Kern der Amygdala
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
Co	Co 101244, NR2B-Antagonist
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Nucleus corticalis anterior der Amygdala
CoP	Nucleus corticalis posterior der Amygdala
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element-binding protein
CS	konditionierter Reiz
EC	externe Kapsel
EC-LTD	Langzeitdepression induziert durch Fasern der externen Kapsel

EC-LTP	Langzeitpotenzierung induziert durch Fasern der externen Kapsel
EPSC	exzitatorischer postsynaptischer Strom; Excitatory Postsynaptic Current
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potenzial
fEPSP	Feldpotenzial; Field Excitatory Post Synaptic Potential
GABA	Gammaaminobuttersäure
GABA _A	GABA _A - Rezeptor
GABA _B	GABA _B -Rezeptor
HEK293	Human Embryonic Kidney-Zellen
HFS	hochfrequente Stimulation
I	Nuclei intercalati
I/O-Kurve	Input/Output-Kurve
IL-1	Interleukin-1
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-4	Interleukin-4
IL-18	Interleukin-18
IN	intranukleär (innerhalb des lateralen Kerns der Amygdala)
IN-LTD	Langzeitdepression induziert durch intranukleäre Fasern
IN-LTP	Langzeitpotenzierung induziert durch intranukleäre Fasern
in-vitro	außerhalb des lebenden Organismus
in-vivo	im lebendigen Organismus
ISI	Interstimulusintervall
K ⁺	Kalium
LA	lateraler Kern der Amygdala
LA-LTD	Langzeitdepression im lateralen Kern der Amygdala
LA-LTP	Langzeitpotenzierung im lateralen Kern der Amygdala
LFS	niederfrequente Stimulation
L-LTP	spätes Stadium der LTP
LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung
M	medialer Kern der Amygdala
MAP	mitogen-activated protein
Mg ²⁺	Magnesium
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
mGluR II	metabotroper Glutamatrezeptor der Gruppe 2

Micro-CED	Analog-Digital-Wandler
mRNS	Messenger-RNS
N ¹ -DnsSpm	N ¹ -dansyl-Spermin
Na ⁺	Natrium
NLOT	Kern des lateralen olfaktorischen Trakts
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR	NMDA-Rezeptor
NMDAR-L	frühere Bezeichnung für NR3A
NR1	NMDA-Untereinheit 1
NR2	NMDA-Untereinheit 2
NR2A-D	2 A-D Untereinheiten des NMDA-Rezeptors
NR2A ^{-/-}	NR2A Knock-out-Tiere
NR3	NMDA-Untereinheit 3
NR3A	3 A Untereinheit des NMDA-Rezeptors
NS	neutraler Stimulus
NVP	NVP AAM077, NR2A-Antagonist
PET	Positronenemissionstomographie
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
Pop-Spike	Populationsspike
PP	Doppelpulsreizung (Paired-Pulse)
PP1	Proteinphosphatase I
PPD	Doppelpulshemmung
PPF	Doppelpulspotenzierung
PP-LFS	gepaarte Niederfrequenzreizung, Doppelpuls-LFS
PP-LTD	PP-LFS induzierte Langzeitdepression
Q	Glutamin
R	Argininin
RNS	Ribonukleinsäure
Ro	Ro 04-5595, NR2B-Antagonist
STP	Kurzzeitpotenzierung
TBS	Thetaburststimulation
TLE	Temporallappenepilepsie
TPS	theta pulse stimulation

US	unbedingter Reiz
VGCC	spannungsabhängige Kalziumkanäle
ZNS	zentrales Nervensystem

8.2. Veröffentlichungsverzeichnis

Originalarbeiten

Müller,T., Albrecht,D., & 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.

Kongressbeiträge und Posterpräsentationen

Müller,T., Keichel,S. & Albrecht,D. (2008) Both NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor are critical for the cortical-induced LTP and LTD in the lateral amygdala of horizontal slices of mice. 6th FENS Forum of European Neuroscience. *FENS Abstr* Volume 4, 077.18.

Albrecht,D. & Müller,T. (2008) Both NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor are critical for LTP and LTD in the lateral amygdala of horizontal slices of adult mice. *Abstracts of the International Behavioral Neuroscience Society* Volume 17, June 2008, 114.

Mueller,T. & Albrecht,D. (2008) LTP and LTD in the lateral amygdala of adult mice are dependent on NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor. 19th European Students' Conference. *Eur J Med Res* 13 (Supplement I):124

8.3. Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Tobias Müller, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: ‚Der Einfluss von NMDA-Rezeptoruntereinheiten auf synaptische Plastizität in der lateralen Amygdala‘ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den

Tobias Müller

8.4. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8.5. Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt Frau PD Dr. Doris Albrecht für die exzellente Zusammenarbeit, die geduldige Unterstützung beim Erlernen der Methodik sowie der Planung und Koordination der Experimente und nicht zuletzt dieser Promotion. Ihr fachliches Wissen, die wertvollen Anregungen sowie die präzisen Arbeitstechniken und ihre analytischen wissenschaftlichen Fähigkeiten habe ich in den vergangenen Jahren sehr schätzen gelernt. Weiterhin möchte ich mich für ihre stete Hilfsbereitschaft und Ansprechbarkeit bei Fragen und Problemen bedanken.

Frau Karin Berlin möchte ich für die Einarbeitung in die statistische Auswertung, Herrn Roland Schneider für die technische Hilfe, die Koordination und exakte Hilfestellung bei allen die Messungen betreffenden Problemen und Fragen sowie Herrn Dr. H. Siegmund für das Schreiben der Signal Scriptdateien danken. Sie trugen ebenfalls dazu bei, dass die Experimente erfolgreich durchgeführt werden konnten. Herrn Prof. Dr. Oliver von Bohlen und Halbach danke ich für die Fotografie des horizontalen Hirnschnittes.

Für die fortwährende Unterstützung nicht nur während dieser Zeit der Dissertation empfinde ich meinen Eltern, Beate und Thomas Müller, gegenüber eine ganz besondere Dankbarkeit.

Anna Klöpfer, Andreas Edel und Beate Müller sei herzlich für die Sichtung dieses Manuskriptes hin auf orthographische Fehler und Lesbarkeit gedankt.