

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

DISSERTATION

**Die geschlechtsspezifische Bedeutung von Isoformen der NO-
Synthase für die Ang-(1-7) modifizierte Langzeitpotenzierung in
der lateralen Amygdala**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jörg Staschewski

aus Lauchhammer

Datum der Promotion: 05.06.2016

Für Lola

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
Abstrakt, Zusammenfassung	XIII
Abstract	XV
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Amygdala, Bedeutung	1
1.2 Die Amygdala, Anatomie.....	3
1.3 Afferente und efferente Verbindungen.....	5
1.4 Furchtkonditionierung.....	6
1.5 LTP	9
1.6 ZNS Renin-Angiotensin-System.....	12
1.7 NO-System	15
1.7.1 Verteilungsmuster der nNOS und eNOS	16
1.7.2 Molekulare Signaltransduktion NO-vermittelter Effekte.....	17
1.7.3 Kooperative Verbindung zwischen NO und Ang-(1-7)	21
1.7.4 Forschungsergebnisse zum NO-System und ihre Abhängigkeit vom	
experimentellen Paradigma	22
1.8 Geschlechtsdimorphismus in der neuronalen Architektur und dessen Bedeutung	
für die Forschung	23
1.9 Ziel- und Fragestellung	26
2 Methoden	31
2.1 Versuchstiere	31
2.2 Narkose und Präparation	31
2.3 Versuchsaufbau	32
2.3.1 Messkammer	32

2.3.2	Messplatz.....	33
2.3.3	Elektrodenpositionierung	34
2.4	Reizparadigmen.....	35
2.4.1	Input/Output-Kurve	35
2.4.2	Basale Aktivität	36
2.4.3	HFS	36
2.4.4	TBS	36
2.4.5	Paired-Pulse.....	37
2.4.6	Kontrollmessungen.....	37
2.4.7	Messungen unter Pharmakon-Applikation.....	37
2.5	Substanzen und Pharmakologie	37
2.5.1	Carbogengas	38
2.5.2	L-NAME	38
2.5.3	Ang-(1-7).....	38
2.6	Datenauswertung	38
2.7	Statistik.....	41
3	Ergebnisse.....	43
3.1	Input/Output-Kurven	43
3.1.1	Vergleich der Input/Output-Kurven homozygoter nNOS ^{-/-} und eNOS ^{-/-} -Mäuse	43
	mit dem Wildtyp.....	
3.2	Langzeitpotenzierung	45
3.2.1	LTP bei NOS gendefizienten Mäusen.....	45
3.2.2	LTP unter pharmakologischer NOS Inhibition durch L-NAME	47
3.2.3	Einfluss von Ang-(1-7) auf die LTP in der lateralen Amygdala.....	49
3.2.4	Wirkung von Ang-(1-7) auf die neuronale Plastizität bei nNOS-Knockout-.....	
	Mäusen	50
3.2.5	Wirkung von Ang-(1-7) auf die neuronale Plastizität bei eNOS-Knockout-.....	
	Mäusen	51

3.2.6	Zusammenfassung der Ergebnisse zur LTP der weiblichen und männlichen Knockoutreihe unter Einfluss von Ang-(1-7).....	52
3.2.7	Wirkung von Ang-(1-7) auf die neuronale Plastizität unter L-NAME-Applikation...	53
3.3	Doppelpulsreizung (Paired-Pulse).....	55
3.3.1	Paired-Pulse-Verhalten bei männlichen und weiblichen Wildtyp-Mäusen	55
3.3.2	Paired-Pulse-Verhalten bei männlichen und weiblichen eNOS-Knockout-Mäusen	56
3.3.3	Paired-Pulse-Verhalten bei männlichen Wildtyp-Mäusen unter Ang-(1-7)	57
3.3.4	Paired-Pulse-Verhalten bei weiblichen Wildtyp-Mäusen unter Ang-(1-7).....	58
3.3.5	Paired-Pulse-Verhalten bei weiblichen nNOS-Knockout-Mäusen unter Ang-(1-7).....	59
4	Diskussion	63
4.1	LA-LTP bei nNOS-Knockout-Mäusen	63
4.2	LA-LTP bei eNOS-Knockout-Mäusen	64
4.3	Vergleich zwischen beiden Stämmen	64
4.4	NO-abhängige LA-LTP im horizontalen, nicht im coronalen Schnittpräparat	65
4.5	Funktion und Zusammenspiel von nNOS und eNOS	66
4.6	Einfluss des Reizparadigmas auf die potenzielle Geschlechtsspezifität der LA-LTP	68
4.7	Afferenz-abhängige NO-Signalübertragung für die LA-LTP	69
4.8	Ang-(1-7) induziert geschlechtsspezifisch eine Suppression der Paired-Pulse-Fazilitierung	70
4.9	Aufschlüsselung der Sexualhormonempfindlichkeit relevanter molekularer und anatomischer Protagonisten der LA-LTP in der Funktion eines Erklärungsmodells geschlechtsspezifischer Ang-(1-7)-Wirkung	72
4.9.1	RAS unter dem Aspekt der Geschlechtsspezifität.....	72
4.9.2	Estrogen-Rezeptor Distribution in der Amygdala.....	74
4.9.3	Zyklusabhängige Estrogen-Fluktuationen beeinflussen die LA-LTP und Synaptogenese	75

4.9.4	Estrogeneinfluss auf Isoenzyme der NO-Synthase	79
4.9.5	Zusammenschau molekulare Mechanismen der LA-LTP unter Einfluss von Ang-(1-7) und Estrogen	80
4.10	Ausblick: Gender-abhängige Mediation der Ang-(1-7)-Effekte über nNOS und..... eNOS datierend für neue Therapieansätze zerebraler Erkrankungen?.....	83
5	Literaturverzeichnis	89
6	Anhang.....	121
6.1	Abbildungsverzeichnis	121
6.2	Veröffentlichungsverzeichnis.....	125
6.3	Eidesstattliche Versicherung	127
6.5	Lebenslauf	129
6.7	Danksagung	135

Abkürzungsverzeichnis

AAA	anteriore amygdaläre Region
AB	akzessorischer basaler Nucleus der Amygdala
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-converting enzyme
ACE2	Angiotensin-converting enzyme 2
ACSF	artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit, artificial cerebrospinal fluid
ADH	antidiuretisches Hormon
AHA	amygdalo-hippocampale Region
AMP A	Aminopeptidase A
AMP N	Aminopeptidase N
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin-(1-8) - Angiotensin II
Ang IV	Angiotensin-(3-8) - Angiotensin IV
Ang-(1-7)	Angiotensin-(1-7)
AP	Aktionspotenzial
AT ₁ -Rezeptor	Angiotensin 1-Rezeptor
AT ₂ -Rezeptor	Angiotensin 2-Rezeptor
AT ₄ -Rezeptor	Angiotensin 4-Rezeptor
B	Nucleus basalis
BDNF	brain derived neurotrophic factor
BK _{Ca} -Kanal	big potassium Kanal
BLA	basolateraler Nucleus
BNST	Bed Nucleus der Stria terminalis
BOAT	Bed Nucleus des akzessorischen olfaktorischen Traktes
CA1	anatomische Region im Hippocampus; Cornus ammonis
Ca ²⁺	Kalzium
Ca ²⁺ N	N-Typ Kalzium-Kanal
CA3	anatomische Region im Hippocampus; Cornus ammonis
CaMKII α	Ca ²⁺ /calmodulinabhängige Kinase alpha

CE	Nucleus centralis
CEl	lateraler Anteil des Nucleus centralis
CEm	medialer Anteil des Nucleus centralis
cGMP	zyklisches Guanosine-3 5-monophosphat
CO ₂	Kohlenmonoxid
CoA	Nucleus corticalis anterior
CoP	Nucleus corticalis posterior
COX-2	Cyclooxygenase-2
CP P	Carboxypeptidase P
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element binding protein
CS	konditionierter Reiz
DD	homozygoter Deletions-Polymorphismus
DHT	5 α -Dihydrotestosteron
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EC	externe Kapsel
eNOS	endothelialen NO-Synthase
eNOS ^{-/-}	eNOS-Knockout-Mäuse
eNOS ^{-/-} -Mäuse	eNOS-Knockout-Mäuse
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potenzial
ERK	Extracellular-signal regulated Kinase
ER- α	Estrogen Rezeptor alpha
ER- β	Estrogen Rezeptor beta
f	weiblich
fEPSP	Feldpotential, field excitatory postsynaptic potential
fMRT	Funktionelle Magnetresonanztomographie
FP	Feldpotenzial
GABA	γ -Aminobuttersäure
GABA _A	GABA _A -Rezeptor
GABA _B	GABA _B -Rezeptor
GLUR _{K5}	Kainat-Rezeptor
HCN-Kanäle	Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels
HFS	hochfrequente Stimulation

Hz	Frequenz in Hertz
I	Nuclei intercalati
I/D	Insertions /Deletionsdimorphismus
I/O-Kurve	Input/Output-Kurve
ID	heterozygoter Instertion/Deletions Polymorphismus
II	homozygoter Insertion-Polymorphismus
in vitro	außerhalb des lebenden Organismus
in vivo	im lebendigen Organismus
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potenzial
LA	Nucleus lateralis der Amygdala, lateraler Kern der Amygdala
LA-LTP	Langzeitpotenzierung im lateralen Kern Amygdala
LH	Luteinisierendes Hormon
LTP	Langzeitpotenzierung
M	Nucleus medialis
m	männlich
MAPK	mitogen-activated protein kinase, MAP-Kinase
mEPSCs	Miniatur-exzitatorische postsynaptischen Ströme, miniature excitatory postsynaptic currents
mEPSPs	exzitatorische postsynaptische Miniatur-Potenziale, miniature excitatory postsynaptic potentials
Mg ²⁺	Magnesium
mGLURs	metabotrope Glutamatrezeptoren
Micro-CED	Analog-Digital-Wandler
min	Zeit in Minuten
ml	Milliliter
ml/min	Flußgeschwindigkeit in Milliliter pro Minute
mM	Konzentration in Millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Zeit in Millisekunden
mV	Feldpotenzialamplitude in Millivolt
n	Stichprobenzahl

NaCl	Natriumchlorid
NEP	neutrale Endopeptidase
NF- κ B	nukleärer Faktor, der an den Promotor leichter κ -Ketten (Kappa-Kette) von B-Lymphozyten bindet
NLOT	Nucleus des lateralen olfaktorischen Traktes
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	neuronale NO-Synthase
nNOS ^{-/-}	nNOS-Knockout-Mäuse
nNOS ^{-/-} -Mäuse	nNOS-Knockout-Mäuse
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NR1	NMDA-Untereinheit 1
NR2	NMDA-Untereinheit 2
NS	neutraler sensorischer Stimulus
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive-fusion protein
O ₂	Sauerstoff
PEP	Propyl-Endopeptidase
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
PKG	cGMP-abhängige Protein Kinase
PP	Doppelpulsreizung, Paired-Pulse
PPD	Paired-Pulse-Depression
PPF	Paired-Pulse-Fazilitierung
(P)RR	zerebraler (Pro)renin Rezeptor
PSDP95	postsynaptisches density Protein 95
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	Ribonukleinsäure
RRP	readily releasable Pool
s	Zeit in Sekunden
sGC	lösliche Guanylyl-Cyclase
SNAP25	soluble NSF attachment protein

SNARE-Komplex	engl. für soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive-fusion protein) attachment receptor
TBS	Thetaburststimulation
US	unbedingter, konditionierter Reiz
V	Spannung in Volt
VAMP	vesikel-assoziiertes Membranprotein
VGCCs	spannungsabhängige Kalziumkanäle - voltage gate calcium channels
VEGF	vascular endothelial growth factor
Wt	Wildtyp-Mäuse
Wt-Mäuse	Wildtyp-Mäuse
ZNS	Zentrales Nervensystem
°C	Temperatur in Grad Celsius
μA	Reizintensität in Mikroampere
μM	Konzentration in Mikromolar
μm	Länge in Mikrometern

Abstrakt, Zusammenfassung

Der laterale Kern der Amygdala (LA) ist als Bestandteil des limbischen Systems von zentraler Bedeutung für die Furchtkonditionierung, für die Steuerung von emotionalem und furchtrelevantem Verhalten sowie für die assoziative Kopplung und Konsolidierung des jeweiligen Gedächtnisinhaltes im Rahmen des emotionalen Kontexts.

Die Voraussetzung für die Beschreibung und Analyse dieser synaptischen Plastizität in der LA schafft das anerkannte experimentelle Modell der Langzeitpotenzierung (LTP). Relativ neu ist die Erkenntnis, dass Angiotensine neben ihren substanziellen Aufgaben für den Elektrolythaushalt und die Blutdrucksteuerung auch eine bedeutende Rolle für Lern- und Gedächtnisprozesse spielen, wobei hierfür die Amygdala die zentrale Schnittstelle und Verarbeitungsstruktur repräsentiert. So konnten wir zeigen, dass Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] die Amplitude der Langzeitpotenzierung im lateralen Kern der Amygdala (LA-LTP) signifikant über die Aktivierung des Mas-Rezeptors erhöht. Dabei scheint Stickstoffmonoxid (NO) der entscheidende retrograde Messenger dieser Ang-(1-7)-vermittelten neuronalen Plastizität zu sein, wobei die Rolle der unterschiedlichen NO-Synthase Isoformen, darunter die endotheliale (eNOS) und die neuronale (nNOS) NO-Synthase, für die Etablierung einer LA-LTP nicht abschließend geklärt ist. Es existiert unseres Wissens kein Diskurs über geschlechtsspezifische Unterschiede in dem genannten Forschungsfeld.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Ang-(1-7), NOs, der eNOS sowie der nNOS auf die LA-LTP erstmalig auch unter dem Aspekt der Geschlechtsspezifität durch die Messung extrazellulärer Feldpotenzialamplituden nach Hochfrequenzreizung (HFS) der externen Kapsel (EC) an 400 µm dicken horizontalen Schnittpräparaten adulter weiblicher und männlicher Wildtyp-, eNOS-Knockout- und nNOS-Knockout-Mäuse sowohl ohne pharmakologische Intervention als auch unter Applikation von Ang-(1-7) und unter Einfluss des unspezifischen NO-Synthase-Inhibitors L-NAME untersucht.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine deutliche NO-Abhängigkeit der LA-LTP, da L-NAME die LA-LTP signifikant reduzierte. Des Weiteren zeigte sich eine signifikante Amplitudenminderung der LA-LTP in weiblichen als auch männlichen eNOS- und nNOS-Knockout-Stämmen.

Bezüglich der enzymatischen Lokalisation der NO-Synthese gelang es uns erstmalig eine geschlechtsspezifische Aktivierung von Isoformen der NO-Synthase für die Ang-(1-7) modifizierte Langzeitpotenzierung im lateralen Kern der Amygdala aufzuzeigen. Während Ang-

(1-7) bei männlichen eNOS-Knockout-Mäusen eine signifikante Steigerung der LA-LTP induzierte, blieb dieser LTP-Fazilitierungseffekt von Ang-(1-7) bei weiblichen eNOS-Knockout-Mäusen aus. Entsprechend lässt sich schlussfolgern, dass die LTP-potenzierenden Effekte von Ang-(1-7) beim weiblichen Geschlecht über die eNOS vermittelt werden. Andererseits ließ sich bei weiblichen nNOS-Knockout-Mäusen eine deutliche Ang-(1-7)-vermittelte Stärkung der LA-LTP nachweisen, während dieser LTP-Fazilitierungseffekt von Ang-(1-7) in der männlichen nNOS-Knockout-Reihe wiederum ausblieb. Folglich werden die LTP-potenzierenden Effekte von Ang-(1-7) beim männlichen Geschlecht über die nNOS vermittelt. Dieser Geschlechtsdimorphismus für Ang-(1-7) im LA lässt sich am ehesten als ein Resultat eines mehrere molekulare Ebenen umfassenden, multifaktoriellen Sexualhormeinflusses verstehen.

Schlagwörter:

Angiotensin-(1-7), Stickstoffmonoxid (NO), neuronale und endotheliale NO-Synthase, Knockout-Mäuse, Geschlechtsspezifität, Langzeitpotenzierung, Amygdala

Abstract

The lateral nucleus of the amygdala (LA) as a part of the limbic system plays a central role in fear conditioning, in the regulation of emotional and fear concerning behavior as well as in coupling a distinct memory content with the associative emotion during memory formation.

The experimental model of long-term potentiation (LTP) represents a great instrument for describing and analyzing changes in synaptic plasticity. Apart from maintaining electrolyte balance and blood pressure control angiotensins act on and through the amygdala seem to modulate cognition and learning mechanisms. Recently, we showed that angiotensin-(1-7) (Ang-(1-7)) enhances the magnitude of LTP in the LA (LA-LTP) via the Mas receptor. Nitric oxide (NO) seems to be the essential retrograde messenger mediating the Ang-(1-7) effect on neuronal plasticity, whereas the role of the different isoforms of nitric oxide synthase (NOS), respectively the endothelial (eNOS) and the neuronal NO synthase (nNOS), is yet to be clarified regarding LA-LTP. To the best of our knowledge, no studies have evaluated sex-dependent differences in the action of Ang-(1-7) and the involvement of NO in plasticity changes in the amygdala.

In the present study the influence of Ang-(1-7), NO, eNOS and nNOS on LA-LTP has been assessed for the first time from a gender perspective. Extracellular field potentials were measured in the LA of 400 μm brain slices of adult wild-type mice as well as nNOS (nNOS^{-/-}) and eNOS (eNOS^{-/-}) knockout mice after high frequency stimulation (HFS) delivered via the external capsule (EC).

LA-LTP induced by stimulation of the EC was NO-dependent because the NOS inhibitor L-NAME reduced LA-LTP. The LA-LTP was also reduced in both male and female nNOS^{-/-} and eNOS^{-/-}. In male eNOS^{-/-} mice, Ang-(1-7) enhanced LA-LTP, whereas the LTP-enhancing effect of Ang-(1-7) was missing in female eNOS^{-/-} mice. Therefore, the LTP-enhancing effect of Ang-(1-7) was mediated by eNOS in females. In contrast, Ang-(1-7) strongly enhanced the LTP in nNOS^{-/-} females, whereas the effect of Ang-(1-7) was missing in nNOS^{-/-} males. Thus, Ang-(1-7) induced an increase in the magnitude of LTP via the involvement of nNOS in males.

Our data support not only the hypothesis that NO contributes to plasticity changes in the LA, but also show for the first time a gender-dependent involvement of different isoforms of NOS in the

mediation of Ang-(1-7) on LA-LTP.

Key Words:

Angiotensin-(1-7), Nitric oxide, Neuronal and endothelial nitric oxide synthase, Knockout mice, Gender, Long-term potentiation, Amygdala

1 Einleitung

1.1 Die Amygdala, Bedeutung

Als Schnittstelle für die Genese von Emotionen und Furcht ist die Amygdala Bestandteil des limbischen Systems, das aus funktionell eng kooperierenden zerebralen Kern- und Kortexregionen aufgebaut ist, um die Steuerung von Emotionen und Verhalten maßgeblich zu beeinflussen, d. h. das Verwirklichen von Affekten, Gefühlen, Trieben, etc in Verhaltensmuster. Dazu unterhält die Amygdala reziproke Verbindungen zu limbischen, hypothalamischen und präfrontalen Hirnarealen, womit in erste Linie Erregungsmuster mit emotionaler Komponente vermittelt werden. Zum anderen wird sie über hippocampale Verbindungen in Konsolidierungsprozesse des deklarativen Langzeitgedächtnisses einbezogen, was durch ein Fehlen von emotionalen Assoziationen beim deklarativen Gedächtnisabruf nach Läsionen in diesem System verdeutlicht wird (z. B. Trauer bei der Erinnerung an den Verlust eines Haustieres) (Diehl, 2011).

Traditionell umfasst die Rolle der Amygdala emotionale, furchtrelevante Prozesse. Klassische amygdaläre Läsionsstudien an Mensch und Tier konnten sie als dominierende Hirnstruktur für Expression wie Perzeption von Furcht und für die Entwicklung furchtkonditionierten Verhaltens identifizieren (LeDoux, 1993b; LeDoux, 1993a; Adolphs *et al.*, 1994). Weitergehend zeigte sich bei Primaten mit selektiver Amygdalaläsion ein verändertes Sozial-, Furcht- und ein vermindertes Angstverhalten (Amaral *et al.*, 2003), wobei bilaterale Läsionen der humanen Amygdala nicht nur einen Funktionsverlust für das Verarbeiten emotionaler Gesichtsausdrücke zur Folge hatte (Rasia-Filho *et al.*, 2000), sondern zusätzlich die Initiierung einer Furchtantwort auf der Ebene jeglicher Modalität neutralisierte (Feinstein *et al.*, 2011), was bei den Betroffenen in einer Insuffizienz für das subjektive Empfinden von Furcht mündete (Anderson & Phelps, 2002). Für diese Furchtwahrnehmung scheint hauptsächlich der basolaterale Komplex von Bedeutung zu sein (Dellacherie *et al.*, 2011). Dabei stellt die Amygdala im Grunde anatomisch wie funktionell eine heterogene Struktur dar, was sich darin widerspiegelt, dass einzelne Kerne der Amygdala Furcht-, Emotions- und Gedächtnisprozesse in unterschiedlicher Art und Weise modulatorisch beeinflussen. Es ist entsprechend festzuhalten, dass die Amygdala von großer Bedeutung für die assoziative Kopplung von bedingten und unbedingten Reizen ist (Gupta *et al.*, 2011).

Neuere Untersuchungen unter anderem bedingt durch Fortschritte in der Neuroradiologie bringen die in enger Wechselwirkung mit dem präfrontalen Kortex stehende Amygdala überdies mit komplexeren Prozessen in Zusammenhang: der sozialen Interaktion (Tranel & Hyman, 1990;Spezio *et al.*, 2007;Gupta *et al.*, 2009), dem sozialen Urteilsvermögen (z. B. Vertrauenswürdigkeit, Stereotypisieren) (Adolphs *et al.*, 1998;Winston *et al.*, 2002;Phelps *et al.*, 2000) und der Entscheidungsfindung (Gupta *et al.*, 2011). Dabei geht die Theorie der somatischen Marker davon aus, dass autonome Antworten auf bestimmte Stimuli oder Ereignisse bei erneuter Konfrontation reaktiviert werden und so Entscheidungsfindung und Verhalten beeinflussen (als mögliches Korrelat für die Intuition) (Damasio, 1996;Dunn *et al.*, 2006). So triggert die Amygdala in Reaktion auf emotionale Stimuli autonome Reaktionsmuster, z.B. im Rahmen des monetären Belohnungs- und Bestrafungssystems und vermittelt „impulsive“ Entscheidungen. Folglich waren Patienten mit amygdalären Läsionen in Entscheidungsfindungsprozessen eingeschränkt, da ihnen diese „somatischen Marker“ fehlten (Gupta *et al.*, 2011). Im Rahmen dieser Kausalität weisen wir in dieser Arbeit einleitend auf funktionelle wie morphologische Geschlechtsdimorphismen in der Amygdala hin: einseitige Läsionen der rechtshemiphariellen Amygdala führten eher bei Männern zu Defiziten in Entscheidungsprozessen und Verhalten, während die Läsionen der linkshemiphariellen Amygdala diesbezüglich vermehrte Defizite bei Frauen hervorrief (Gupta *et al.*, 2011).

Des Weiteren erfährt die Amygdala, dank des technischen Fortschritts im radiologischen Monitoring zerebraler Stoffwechselprozesse (z.B. Blutfluss, -Oxygenierungsgrad, Glukosestoffwechsel) eine Art Renaissance in der psychiatrischen Grundlagenforschung. So stehen volumetrische Untersuchungen der Amygdala im Blickpunkt der Erklärungsmodelle zur Borderline Persönlichkeitsstörung. Dabei erwies sich eine Volumenreduktion als relativ pathognomonisch, wobei zusätzlich prinzipielle Normabweichungen unterschiedliche Ausprägungsgrade sowie Zusatzsymptome erklärbar machen (O'Neill & Frodl, 2012). Dazukommend wird eine Hyperaktivität der Amygdala und ihrer Projektionen als Risikofaktor für die Entwicklung einer Panikstörung angesehen (Mathew *et al.*, 2008). So überrascht es nicht, dass eine gesteigerte neuronale Exzitabilität der Amygdala gleichermaßen für die Posttraumatische Belastungsstörung gefunden wurde (Villarreal & King, 2001;Rauch *et al.*, 2000). In diesem Sinne konnte ebenfalls bei Schizophreniepatienten eine gesteigerte Amygdalaaktivierung gemessen werden, was am ehesten die eingeschränkte Filterfunktion für emotionale Stimuli abbildet (Kosaka *et al.*, 2002). Eine mit Angststörungen eng verwandte psychische Erkrankung stellt die Depression dar. Hierfür konnte eine Korrelation zwischen

Amygdalavolumen und Erkrankungsphase bzw. –dauer und interessanterweise eine Korrelation zwischen dem amygdalären Volumen und dem Geschlecht beschrieben werden (Lorenzetti *et al.*, 2009).

80-90% der im medialen Temporallappen initiierten komplex-fokalen Anfälle gehen einher mit einer Beteiligung von Hippocampus und Amygdala (Tettenborn, 2011). Man kann also schlussfolgern, dass die Amygdala maßgeblich an der Ätiologie der Temporallapenepilepsie beteiligt ist (Pitkanen *et al.*, 1998). In diesem Zusammenhang ist vornehmlich die basolaterale Kerngruppe der Amygdala (siehe Anatomie) für die epileptogene Ausbreitung der zerebralen Streudepolarisation verantwortlich (White & Price, 1993), die sich bei Menschen in einem limbischen Status epilepticus äußert. Zusätzlich werden pathologische Veränderungen der Amygdala als ursächlich für das erhöhte Risiko des Auftretens von Angststörungen bei Epilepsiepatienten gesehen (Bonelli *et al.*, 2009; Satishchandra *et al.*, 2003).

Abschließend ist die Beteiligung der Amygdala, respektive der lateralen Amygdala, an der Modulation von Prozessen der Gedächtniskonsolidierung hervorzuheben. So wird ermöglicht, emotional signifikante Erfahrungen in Form synaptogener Prozesse zu kodieren (McGaugh, 2004; McGaugh, 2002) und beispielsweise kortikal zu erhalten (Chavez *et al.*, 2009). Überdies wird die Festigung des episodischen Gedächtnisses unterstützt (Barsegyan *et al.*, 2014).

Dieser kurze Überblick zu klinischen Pathologien illustriert die Notwendigkeit weitergehender Grundlagenforschung zum Verständnis der komplexen Rolle der Amygdala im neuronalen Gefüge, um aus der Möglichkeit schöpfen zu können, die gewonnenen Erkenntnissen nutzbar für die Entwicklung neuer klinischer Therapiestrategien zu machen.

1.2 Die Amygdala, Anatomie

Der Terminus Amygdala (Corpus amygdaloideum, Mandelkern) lässt sich in Anlehnung an ihre Form etymologisch aus dem griechischen Wort für Mandel herleiten. Sie ist eine im anteromedialen Teil des Temporallappens bihemisphärisch lokalisierte, limbische Struktur. Es existieren, historisch begründet, unterschiedliche nomenklatorische Klassifikationssysteme, wobei in dieser Arbeit die durch (Pitkanen *et al.*, 1997) modifizierten, zuvor von (Price *et al.*, 1987) eingeführten anatomischen Termini verwendet werden. Hierauf basierend lassen sich die 13 inter- und intranukleär kommunizierenden, singulären Amygdalakernkomplexe in eine Übersicht bringen, die sich in tiefe, oberflächliche, sowie darunter nicht zusammenfassbare amygdaloide Regionen gliedert (Sah *et al.*, 2003).

Terminologisch sind die tiefen Kerne und die basolaterale Gruppe synonym zu gebrauchen und setzen sich aus dem lateralen Kern (Nucleus lateralis, LA), dem basalen Kern (Nucleus basalis, B) sowie dem akzessorischen basalen Nucleus (AB) zusammen. Weiterhin werden der LA und B z.T. unter dem Begriff basolateraler Nucleus (BLA) und alle 3 Kerne (LA, B und AB) unter basolateralem Kernkomplex subsumiert.

Die oberflächlich bzw. kortikal lokalisierten Kerne umfassen den Nucleus des lateralen olfaktorischen Traktes (NLOT), den Bed Nucleus des akzessorischen olfaktorischen Traktes (BOAT), den Nucleus corticalis anterior und posterior (CoA, CoP), den Nucleus medialis (M) sowie den periamygdaloiden Kortex. Mit Bezug auf histochemische sowie entwicklungsgeschichtliche Merkmale ist (McDonald, 1998) zufolge der Bed Nucleus der Stria terminalis (BNST) und der Nucleus medialis von der oberflächlichen Gruppe abzugrenzen. Zu den übrigen, nicht gruppierten Kernen zählen die anteriore amygdaläre Region (AAA), der Nucleus centralis (CE) mit einem medialen (CEm) und lateralem (CEl) Anteil, die amygdalo-hippocampale Region (AHA) und die Nuclei intercalati (I) (Pitkanen *et al.*, 2000). Der laterale Kern der Amygdala (LA) fungiert als sensorische Schnittstelle für die Integration furchtkonditionierten Verhaltens (LeDoux *et al.*, 1990). Anatomisch dem dorsal gelegenen basolateralen Kernkomplex zugehörig, wird er lateral durch die externe Kapsel, medial durch den Nucleus centralis und rostral durch den basalen Kern begrenzt (Sah *et al.*, 2003).

Die Zytoarchitektur der lateralen Amygdala umfasst 3 Zellklassen. Mit rund 70% dominieren hauptsächlich glutamaterge Pyramidenzellen (Klasse I) die Neuronenpopulation, die sich durch lange Axone und dornfortsatzreiche Dendriten auszeichnen (Sah *et al.*, 2003; Smith & Pare, 1994; Carlsen, 1988; McDonald, 1992). Im Gegensatz zu den gleichnamigen hippocampalen und kortikalen Pyramidenzellen sind sie allerdings nicht in definierten Zellschichten angeordnet, sondern diffus verteilt und grenzen sich zusätzlich durch ihre Dendritenmorphologie und dessen nicht einheitlich an einer Ebene orientierte Ausrichtung von diesen ab (Sah *et al.*, 2003; Faber *et al.*, 2001). Folgerichtig sind die amygdaloiden Pyramidenzellen präziser als Projektionsneurone zu bezeichnen.

Die zweitgrößte Zellpopulation bilden mit etwa 25% GABAerge Interneurone (Klasse II) (McDonald & Augustine, 1993), die sich anhand ihres unterschiedlichen Expressionsmusters von Kalziumbindungsstellen in weitere Untergruppen aufteilen lassen (Pape & Pare, 2010) und sich morphologisch inhomogen aber gegenüber den Projektionsneuronen deutlich kleiner und mit einem geringen bis inexistenten dendritischen Dornfortsatzbesatz präsentieren (McDonald, 1992; Sah *et al.*, 2003). Die übrigen Klasse III-Zellen setzen sich aus Neuroglia zusammen.

Als morphologische Besonderheit ist die im Unterschied zum Hippocampus und Kortex nicht laminar geschichtete Anordnung der Neurone in der lateralen Amygdala hervorzuheben (Faber *et al.*, 2001). Diese Eigenart mit ihren Folgen für die elektrophysiologische Befundinterpretation wird in der Methodik näher diskutiert.

1.3 Afferente und efferente Verbindungen

Die Verwendung von anterograden und retrograden Tracern ermöglichte es, die Integration der Amygdala ins Netzwerk kortikaler und subkortikaler Bahnsysteme empirisch zu erfassen. So unterhalten sämtliche amygdaläre Nuklei multiple afferente Verbindungen zu unterschiedlichsten Teilen des Zentralnervensystems (Sah *et al.*, 2003), während die efferenten Fasern gleichermaßen intensiv ausgebildet sind, um mitunter kortikale und subkortikale Regionen anzusteuern (Pitkanen, 2000).

Afferenzen werden gemäß ihres Ursprungs einerseits in kortikale und thalamische Zuflüsse, andererseits in solche dem Hypothalamus und Hirnstamm originär, unterteilt. Die erste Gruppe enthält Informationen aus sensorischen Gebieten sowie aus Hirnstrukturen der verschiedenen Gedächtnissysteme. Genau genommen empfängt der Mandelkern den Hauptteil seiner sensorischen Informationen aus dem zerebralen Kortex (McDonald, 1998), wobei diese ihn ipsilateral über die externe Kapsel (EC) erreichen (Mascagni *et al.*, 1993). Die zweite Gruppe leitet Informationen aus Regionen, die an der Informationsverarbeitung von Verhalten und Prozessen des vegetativen Nervensystems beteiligt sind.

Qualitativ unterscheidet man modal-spezifische, polymodale und Eingänge aus den Schaltzentren des deklarativen Gedächtnisses im medialen Temporallappen. Ob olfaktorisch, ob somatosensorisch, ob gustatorisch, ob viszeral, ob auditorisch oder visuell, jegliche Art von Sinnesmodalität wird von der Amygdala verarbeitet, was beispielhaft das Ausmaß ihrer strukturellen Komplexität demonstriert.

Zusätzlich zu den genannten modal-spezifischen stammen die polymodalen Informationen sowohl aus dem präfrontalen und perirhinalen Kortex als auch aus dem Hippocampus. Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass Informationen aller sensorischen Modalitäten, besonders jene mitverantwortlich für das Belohnungsverhalten, im präfrontalen Kortex konvergieren (Ray & Price, 1992).

Außerdem projizieren der Hippocampus, der perirhinale, der entorhinale und der parahippocampale Kortex als Vertreter des deklarativen Langzeitgedächtnisses in den Mandelkern (Milner *et al.*, 1998).

Die efferenten Ausgänge der Amygdala innervieren den Kortex, den Hypothalamus und den Hirnstamm. Vor allem die Verbindung mit dem Hypothalamus und dem Hirnstamm ermöglichen es der Amygdala Einfluss auf emotional gesteuerte vegetative Prozesse wie Blutdruckanstieg und Aufmerksamkeit zu üben (Davern & Head, 2011; Koelsch *et al.*, 2013; LeDoux *et al.*, 1988). Angesichts der erwähnten Afferenzen unterhält der LA auch efferente Verbindungen zum Hippocampus und zum perirhinalen Kortex, die wesentliche Strukturen des mnestischen Systems im medialen Temporallappen repräsentieren. Überdies entsendet das Corpus amygdaloideum Efferenzen in beinahe alle Regionen aus denen sie afferente Informationen übermittelt bekommt (Pitkanen, 2000).

Abgesehen von diesen zahllosen reziproken Verbindungen verdeutlicht die Menge an intraamygdalären Verbindungen zusätzlich die Vielschichtigkeit der Verschaltung (Krettek & Price, 1978; Sah *et al.*, 2003). Generell erreichen die sensorischen und die Kontextinformationen den basolateralen Komplex, werden unter Beteiligung anderer Unterkerne prozessiert und lösen die Innervation des Hirnstamms und des Hypothalamus über den zentralen Kern aus. Im Folgenden sollen einzelne Schaltkreise näher betrachtet werden.

1.4 Furchtkonditionierung

Die Verarbeitung und Speicherung von Emotionen stellt einen vielschichtigen Prozess dar. Die Untersuchung von furchtkonditioniertem Verhalten im Tiermodell basiert allerdings auf der hypothetischen Deutung bestimmter tierischer Verhaltensmuster als Korrelat von Emotionen. Im Gegensatz hierzu lassen sich beim Menschen Emotionen besser explorieren, jedoch stellen hereditäre oder erworbene Pathologien, die zu bilateralen Läsionen in der menschlichen Amygdala führen, eine derartig extreme Rarität dar, die sie groß angelegten klinischen Studien kaum zugänglich macht (Sah *et al.*, 2003). Viel von unserem heutigem Verständnis über die Rolle der Amygdala im Forschungsfeld für Emotionen stützt sich daher auf Tierstudien zum Thema Furchtverhalten und Furchtkonditionierung (LeDoux, 1998).

Methodisch repräsentiert die Furchtkonditionierung eine bestimmte Unterform der klassischen Konditionierung. Hierbei kommt es zu einer Ausbildung einer Assoziation, in dem ein neutraler sensorischer Stimulus (NS), z.B. Töne (LeDoux, 2000), mit einer aversiven Bekräftigung (unbedingter, -konditionierter Reiz, US) zeitlich gekoppelt wird. Die wiederholte, zeitlich eng verknüpfte Darbietung beider Ereignisse, wobei der sensorische Reiz der Bekräftigung vorangehen muss, führt zu einer emotionalen Neubewertung des anfangs neutralen sensorischen Reizes. Dieser wirkt nun reaktionsauslösend für Furcht- und Abwehrverhalten und wird damit im

Rahmen einer biologischen Anpassung zum konditionierten Reiz (CS).

Es existiert ein großer Fundus an Fachliteratur, der eine maßgebliche Beteiligung der Amygdala am Erlernen, Abrufen und eventuell sogar Speichern (wird diskutiert) von konditionierter Furcht und dessen Löschung (Extinktion) beschreibt (LeDoux, 1995; Herry *et al.*, 2008; Pape & Pare, 2010; Sah *et al.*, 2003). Der laterale Kern spielt bei diesen Prozessen eine wesentliche Rolle (LeDoux, 2000; Maren, 2003), indem er wie oben schon erwähnt, unimodale sensorische Signale aus dem Thalamus und dem Kortex verarbeitet. Komplexe, kontextuelle Reize, in Form von Efferenzen aus dem Hippocampus (CA1, Subiculum), projizieren hingegen in den basolateralen Komplex (Canteras & Swanson, 1992; Yaniv *et al.*, 2004; LeDoux, 2000; Maren & Fanselow, 1995). Während die verschiedenen CS Modalitäten über jeweils unterschiedliche Afferenzen in die Amygdala projizieren, existieren auch für den unkonditionierten Stimulus verschiedene Informationswege (Pape & Pare, 2010).

Nach gegenwärtiger Auffassung gelangen eingehende sensorische Informationen zum basolateralen Komplex über den lateralen Kern, wo die Assoziation des CS mit US erfolgt. Die prozessierten Informationen werden unter Kontrolle des basolateralen Komplex entweder direkt an den CE übermittelt oder vorherig im B und AB weiterverarbeitet und assoziativ integriert. Anschließend vermitteln die CE-Projektionen zum Hirnstamm und Hypothalamus die physiologischen Korrelate für Emotionen des Organismus (Sah *et al.*, 2003), wie z. B. endokrine und autonome Verhaltensreaktionen, die Potenzierung somatischer Reflexe und eine reduzierte Algesie (LeDoux & Muller, 1997). Ferner moduliert der CE Aufmerksamkeit und Vigilanz während der Furchtkonditionierung (Davis & Whalen, 2001).

Auf synaptischer Ebene konvergieren sensorische Informationen des CS und des US auf einzelne amygdaläre Neurone (Abb. 1.1), was in einer Verstärkung (Langzeitpotenzierung) der exzitatorischen postsynaptischen Potenziale (EPSPs) resultiert. Diese verstärkte synaptische Übertragung erhöht die Entladungsrate der Projektionsneurone im LA, was wiederum bahndend auf die Informationsweiterleitung zum CE wirkt (Sah *et al.*, 2003). Der beschriebene Schaltkreis wird über lokale GABAerge Interneurone, die inhibitorische postsynaptische Potenziale (IPSPs) an den Projektionsneuronen auslösen, moduliert (Rainnie *et al.*, 1991).

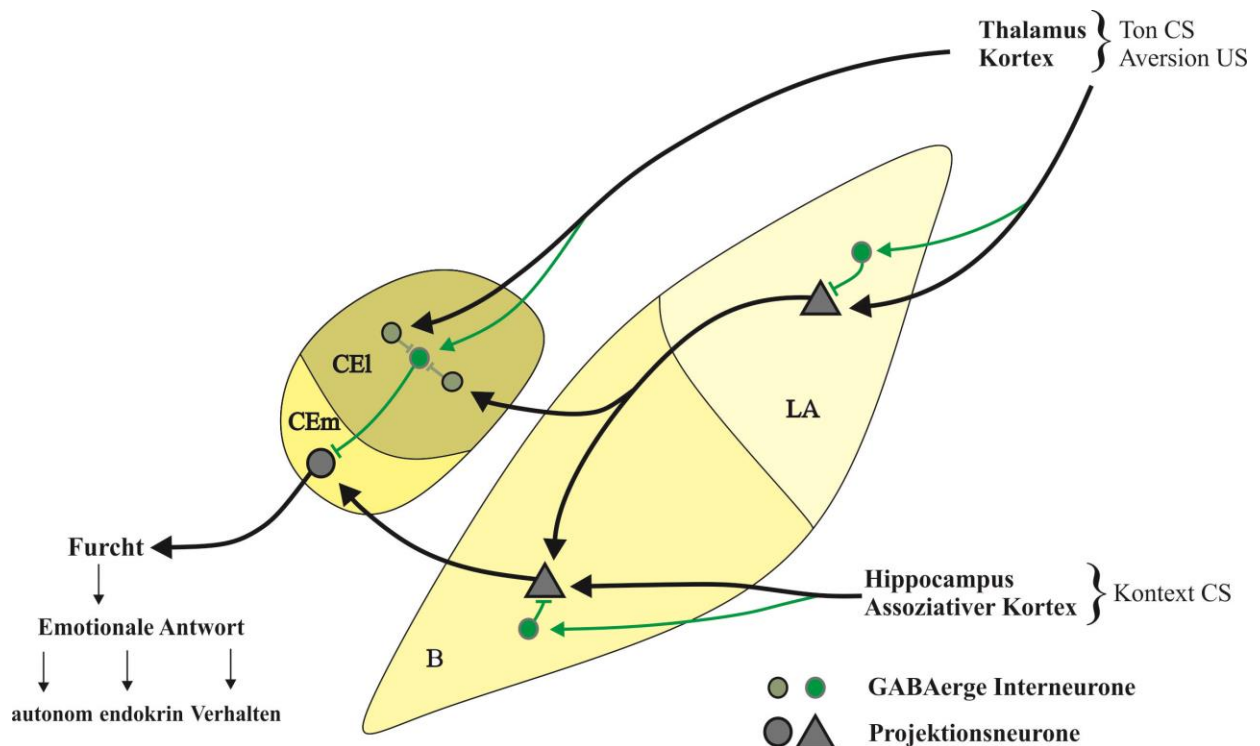


Abb. 1.1 Mechanismus der Furchtkonditionierung in der Amygdala
 Für die Entstehung einer LTP an glutamatergen Projektionsneuronen ist neben der Aktivierung der Zellen durch thalamischer und kortikaler Afferenzen gleichzeitig eine reduzierte Hemmung der GABAergen Interneurone erforderlich, so dass die erhöhte Freisetzungswahrscheinlichkeit der postsynaptischen Depolarisation zeitlich vorangeht. (modifiziert nach Ehrlich *et al.*, 2009)

Die molekulare Basis bilden glutamaterge thalamische wie auch kortikale Afferenzen, indem sie postsynaptische α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure (AMPA) und N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptoren aktivieren (Sah *et al.*, 2003), wobei an thalamo-LA Synapsen die Induktion und Expression einer Langzeitpotenzierung (LTP) überwiegend postsynaptisch unter maßgeblicher Beteiligung von NMDA-Rezeptoren vermittelt wird, während eine LTP an kortiko-LA Synapsen auf unterschiedlichen Mechanismen (gleichzeitige Aktivierung von Prä- und Postsynapse bzw. von thalamo- und kortiko-LA Afferenzen) beruht (Humeau *et al.*, 2005). In Anbetracht aktueller Studien über grundlegende synaptische Prozesse der Furchtkonditionierung, ist gleichermaßen die Bedeutung der inhibitorischen Neurotransmission durch γ -Aminobuttersäure (GABA) produzierende Interneurone in der lateralen Amygdala hervorzuheben, da sie über Feedback- und Feedforward Mechanismen die Aktivität der LA-Projektionsneurone modulieren. An thalamischen Afferenzen erfolgt die Kontrolle vorwiegend postsynaptisch über GABA_A-Rezeptoren, wogegen an kortikalen Afferenzen präsynaptische GABA_B-Rezeptoren verantwortlich sind (Ehrlich *et al.*, 2009). Die GABAerge Transmission

wird wiederum über Neuromodulatoren wie Serotonin reguliert (Abb. 1.2).

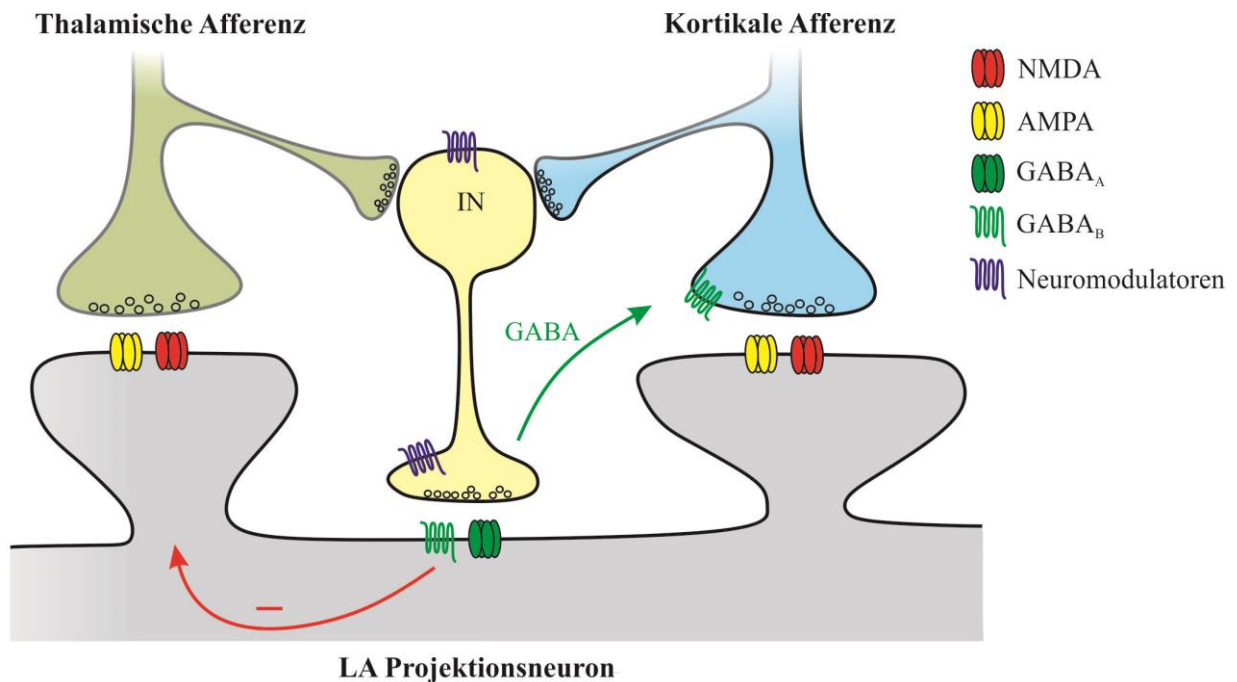


Abb. 1.2 Interneurone der lateralen Amygdala
 Auf LA Projektionsneurone (grau) konvergieren thalamische und kortikale sensorische Afferenzen, dessen Aktivität über GABAerge Interneurone (gelb) reguliert wird. An thalamischen Afferenzen erfolgt dies vorwiegend postsynaptisch über GABA_A-Rezeptoren, an kortikalen Afferenzen präsynaptisch über GABA_B-Rezeptoren. Weiterhin wird die Transmitterfreisetzungsrates der Interneurone über Neuromodulatoren modifiziert. Dieser Prozess bahnt die Induktion der glutamatergen LTP über transiente Veränderungen der prä- und postsynaptischen inhibitorischen Signale. (modifiziert nach Ehrlich *et al.*, 2009)

1.5 LTP

Das Gedächtnismodell der Langzeitpotenzierung (LTP) beruht auf der Vorstellung, dass bestimmte Aktivitätsmuster eintreffender exzitatorischer Bahnen (als Korrelat der Lernerfahrung) eine dauerhafte Verstärkung der Kommunikation zwischen der involvierten Prä- und Postsynapse (als Korrelat des Gedächtnisses) induzieren (Richter-Levin & Yaniv, 2001). Messbar wird dies über die Amplitudenzunahme exzitatorischer postsynaptischer Potenziale (EPSPs). Folglich liegt der wissenschaftliche Nutzen von LTP-Untersuchungen in der Analyse synaptischer Plastizität, insbesondere der ihr zugrunde liegenden zellulären und molekularen Mechanismen. So haben Fortschritt und Kenntnis darüber umfassend den Weg in aktuelle Bücher der Physiologie gefunden, was vornehmlich LTP-Studien an der in diesem Forschungsfeld etabliertesten und am weitesten untersuchten Hirnstruktur, der CA1-Region des Hippocampus, zu verdanken ist. Hieran orientierend, erbrachte die Klassifizierung der

Langzeitpotenzierung in der lateralen Amygdala (LA-LTP) sowohl Homologien aber auch amygdaläre Besonderheiten, die sich in differierenden Mechanismen u.a. für die LTP-Induktion und -Persistenz widerspiegeln.

Der LA-LTP, also eine persistierende Erhöhung der synaptischen Effizienz, werden verschiedene Eigenschaften zugemessen: Sie ist schnell induzierbar und inputspezifisch. Überdies bedarf ihre Induktion der Kooperation einer Mindestzahl an Synapsen (Martin *et al.*, 2000). Als Form neuronaler Plastizität gilt die LA-LTP als physiologisches Korrelat und Erklärungsmodell der Furchtkonditionierung (Maren, 2001;Walker & Davis, 2002). So werden in der Literatur detailliert übereinstimmende Mechanismen für die Synaptogenese während der Furchtkonditionierung und für die Etablierung einer LA-LTP beschrieben (Sah *et al.*, 2008).

Obwohl der erste Nachweis einer LA-LTP in-vitro an horizontalen Hirnschnitten erfolgte (Chapman *et al.*, 1990), wurden im Weiteren die Mechanismen der LA-LTP überwiegend in coronalen Hirnschnitten untersucht, wodurch eine simultane Stimulation von thalamischen und kortikalen Afferenzen möglich ist. Im horizontalen Schnittpräparat werden nicht die Fasern von sensorischen Kortexarealen, sondern vom entorhinalen und perirhinalen Kortex stimuliert. Die Applikation von kurzen tetanischen Stimuli (hochfrequente Stimulation – HFS) verursacht die Induktion einer stabilen LTP sowohl im coronalen als auch im horizontalen Schnitt (Gean *et al.*, 1993;Schubert *et al.*, 2005). Dabei wurde Glutamat als Transmitter exzitatorischer Synapsen in der lateralen Amygdala identifiziert (Weisskopf & LeDoux, 1999;Huang *et al.*, 2000), wobei die angesprochene glutamaterge synaptische Transmission über ionotrope (Kainat-, AMPA- und NMDA-Rezeptoren) und metabotrope (mGLURs) Glutamatrezeptoren vermittelt wird. Als verantwortlich für den Ablauf synaptischer Prozesse, d. h. von Akquisition bis Konsolidierung einer LA-LTP, sind präsynaptisch NMDA-Rezeptoren und spannungsabhängige Kalziumkanäle (voltage gate calcium channels – VGCCs) von Bedeutung und postsynaptisch NMDA-Rezeptoren, AMPA-Rezeptoren, mGLUR5 sowie VGCCs zu nennen (Rodrigues *et al.*, 2004;Fourcaudot *et al.*, 2009). Der Kalziumeinstrom in die Postsynapse in Folge aktivierter, postsynaptischer NMDA-Rezeptoren und VGCCs stellt dabei das Grundprinzip der LTP-Induktion dar.

Im Zuge vermehrter präsynaptischer Aktivierung wird verstärkt Glutamat in den synaptischen Spalt abgegeben, so dass korrelativ mit der Zahl aktivierter, postsynaptischer AMPA-Rezeptoren der Depolarisierungsgrad der postsynaptischen Membran ausreichend zunimmt, um die Mg^{2+} -Ionen aus den NMDA-Rezeptoren zu lösen und dadurch den Kalziumeinstrom in die Postsynapse zu faszilitieren (Sah *et al.*, 2008). Anschließend aktiviert dieser Kalziumeinstrom die

Ca²⁺/calmodulinabhängige Kinase alpha (CaMKII α), die via Phosphorylierung die Offenwahrscheinlichkeit der AMPA-Rezeptoren erhöht und dessen synaptischen Neueinbau bewirkt (frühe LTP).

Parallel zur CaMKII α wird die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) in gleicher Weise durch den Kalziumeinstrom aktiviert, wobei beide Kinasen gemeinsam die MAP-Kinase (mitogen-activated protein kinase) mobilisieren. Eine weitere Signalkaskade wird initiiert von mGLUR5 und mündet in der Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), was ebenfalls die MAP-Kinase Aktivität erhöht. An diesem Punkt soll eine für die LA-LTP wesentliche Subgruppe von MAP-Kinasen Erwähnung finden: die Extracellular-signal regulated Kinasen (ERK) (Schafe *et al.*, 2000). Diese leiten nun mittels Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren darunter CREB (cAMP response element binding protein) die Proteinneusynthese ein, um die Konsolidierung der LA-LTP dauerhaft (späte LTP) zu gewährleisten (Hall *et al.*, 2001; Schafe *et al.*, 2000). Als Bindeglied zum weiterführenden strukturellen Umbau im Rahmen der Synaptogenese wird der BDNF (brain derived neurotrophic factor) diskutiert (Albrecht & von Bohlen und Halbach, 2008; Meis *et al.*, 2012).

Wie aufgeführt liegt der Triggerpunkt der LA-LTP postsynaptisch, doch unterliegt dessen Expression gleichermaßen präsynaptischen Prozessen (Humeau *et al.*, 2003). So sind verschiedene retrograde Messenger im Hippocampus identifiziert worden, die von postsynaptischen Dendriten freigesetzt werden und nach Diffusion durch den synaptischen Spalt in der Präsynapse die Transmitterausschüttung erhöhen. Ins Blickfeld der aktuellen Forschung sind dabei zum einen die Arachidonsäure bzw. einer ihrer Lipoxygenase-Metabolite, der Plättchenaktivierende Faktor, zum anderen die neuroaktiven gasförmigen Überträgerstoffe wie Kohlenstoffmonoxid und vor allem das Stickstoffmonoxid (NO) gerückt (Medina & Izquierdo, 1995). Letzterem wird ein besonders hoher Stellenwert in der lateralen Amygdala zugesprochen, da es wesentlichen Einfluss auf die Etablierung einer LA-LTP ausübt und gleichermaßen glutamaterge Synapsen moduliert (Schafe *et al.*, 2005). Hiermit eng verknüpft, scheint auch die Cyclooxygenase-2 (COX-2) bzw. ihre Metabolite für Prozesse präsynaptisch induzierter Plastizität mitverantwortlich (Albrecht, 2007). Außerdem werden Alterationen der präsynaptischen Transmitterfreisetzung über endocannabinoide Neuromodulatoren vermittelt (Zhu & Lovinger, 2005).

1.6 ZNS Renin-Angiotensin-System

Die Funktion des Renin-Angiotensin-System (RAS) geht bei Weitem über seine Schlüsselrolle für die Blutdruckregulation und den Elektrolythaushalt hinaus. So ist es beteiligt an der Verarbeitung sämtlicher sensorischer Modalitäten, prozessiert Lern- und Gedächtnisinhalte und bewertet diese emotional wie kontextuell (Albrecht, 2010; von Bohlen und & Albrecht, 2006; Wright *et al.*, 2008). Des Weiteren rücken klinische Aspekte in den Vordergrund, die es ätiologisch mit neurovaskulären und neurodegenerativen Krankheiten assoziieren (Wright *et al.*, 2013; Mertens *et al.*, 2010; Ciobica *et al.*, 2009). Es ist folglich nicht überraschend, dass es eines der bestuntersuchteten Enzyme-Neuropeptid Systeme des Gehirns darstellt, dessen Vielfalt an biologisch aktiven Neuropeptiden auf gemeinsamen Vorstufen basiert. In diesem Sinne hat sich die Existenz eines hirnspezifischen RAS etabliert, das völlig getrennt und autonom vom peripheren RAS operiert, da es über die nötigen Vorstufen und Enzyme für Synthese und Metabolismus von biologisch aktiven Angiotensinen verfügt (Abb. 1.3). Dabei sind als wichtige neuroaktive Vertreter Angiotensin-(1-8) [Ang II], Angiotensin-(3-8) [Ang IV] und Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] zu nennen, wobei dessen Synthesewege nachfolgend abgebildet werden.

Das proteolytische Enzym Renin spaltet aus Angiotensinogen das Dekapeptid Angiotensin I (Ang I) ab, aus dem mittels erneuter enzymatischer Hydrolyse durch Angiotensin-converting enzyme (ACE) das Oktapeptid Ang II entsteht. Der zerebrale (Pro)renin receptor [(P)RR] (Shan *et al.*, 2008; Contrepas *et al.*, 2009) bindet Renin als auch Prorenin und bewirkt über eine Aktivitätssteigerung beider Enzyme eine vermehrte Ang I-Synthese. Das ACE metabolisiert außerdem Bradykinin und Substanz P. Neben dem klassischen Syntheseweg kann Ang II aus Angiotensinogen durch Kathepsin G und Tonin entstehen (Lippoldt *et al.*, 1995).

Die Aminopeptidase A (AMP A) transformiert Ang II in ein 2-8 Fragment, Ang III, aus dem nach Entfernung der Aminosäure Arginin durch die AMP N Ang IV hervorgeht (Lavoie & Sigmund, 2003). Auf anderem Wege resultiert Ang IV via AMPs aus Angiotensin I (Hallberg & Nyberg, 2003; Ardaillou & Chansel, 1997) sowie direkt aus Ang II katalysiert mit Hilfe der AMP A und AMP N (Lavoie & Sigmund, 2003).

Als bedeutendes neuroaktives Peptidfragment wird Ang-(1-7) entweder durch enzymatische Spaltung aus Ang I mittels Propyl-Endopeptidasen (PEP) (Chappell *et al.*, 1990; Hallberg & Nyberg, 2003) oder aus Ang III via Carboxypeptidase P (CP P) unter Abspaltung des Phenylalaninrestes gebildet. Alternative Synthesewege kristallisierten sich um die Jahrtausendwende nach der Entdeckung des ACE-Homologes ACE2 heraus. Studien sprechen

ACE2 eine höhere Gehirnaktivität gegenüber ACE aus (Elased *et al.*, 2008). ACE2 metabolisiert Ang II zu Ang-(1-7). Als weitere Option kann Neprilysin [neutrale Endopeptidase (NEP)] Ang-(1-7) aus Ang I generieren.

Die genannten Vorstufen und Enzyme des RAS konnten in neuronalem Gewebe zahlreicher Strukturen unter Einschluss der Amygdala nachgewiesen werden, wobei die Aufschlüsselung des zytologischen Verteilungsmusters ausgiebig in Übersichtsarbeiten dargestellt und diskutiert wurde (McKinley *et al.*, 2003; von Bohlen und, 2005; Wright & Harding, 1994). Bislang konnte jedoch kein Neuron identifiziert werden, das das komplette RAS exprimiert. Vielmehr sind einzelne Komponenten z.T. ubiquitär vorkommend, während andere eher lokal konzentriert vorliegen (Davisson, 2003), was die Existenz alternativer Synthesewege vermuten lässt (Saavedra, 2005).

Die neuroaktiven Angiotensinformen entfalten ihre Wirkung über 4 spezifische Rezeptoren, dessen Subtypen an dieser Stelle nicht näher erläutert werden. Es ist aber festzuhalten, dass AT₁-, AT₂- sowie AT₄-Rezeptoren sich in der Amygdala und anderen gedächtnisrelevanten Strukturen nachweisen ließen (von Bohlen und & Albrecht, 2006).

So kommuniziert Ang II über den AT₁- und AT₂-Rezeptor. Der neuronale G-protein-gekoppelte AT₁-Rezeptor vermittelt u.a. eine Vasokonstriktion, eine vermehrte ADH-Sekretion und ist an Umbauprozesse des Gefäßsystems beteiligt. Des Weiteren greift er über die Amygdala in Regelkreise für Durst und NaCl-Appetit (Johnson & Thunhorst, 1997; Stellar, 1993) ein. Demgegenüber vermittelt der AT₂-Rezeptor eine Vasodilatation und ist an Prozessen der Apoptoseeinleitung und Zelldifferenzierung beteiligt.

Im Vergleich dazu wirkt Ang-(1-7) den Einflüssen von Ang II entgegen und limitiert somit dessen proliferative, angiogene und blutdrucksteigernde Wirkung (Ferrario *et al.*, 1997; Freeman *et al.*, 1996; Machado *et al.*, 2001). Als entscheidender Faktor für den Expressionsgrad der entgegengesetzt wirkenden Angiotensine wird das ACE2 diskutiert (Lazartigues *et al.*, 2007), da es unter pathophysiologischen Bedingungen das Gewebe durch lokalen Abbau von Ang II zu Ang-(1-7) schützt (Alenina *et al.*, 2008) und somit in der Lage ist, das Ang II/Ang-(1-7)-Verhältnis sowohl stabil zu halten als auch patho- bzw. physiologischen Bedingungen anzupassen. Diese antihypertensive und vasoprotektive Wirkung des Ang-(1-7) beruht vor allem auf der Freisetzung von Stickstoffmonoxid (Santos *et al.*, 2000), was durch die gesteigerte Synthese und Freisetzung vasodilatatorischer Prostaglandine sowie vom hypotensiv-wirkenden Bradykinin synergistisch unterstützt wird.

Wie für Ang II wird gleichermaßen für Ang-(1-7) zunehmend eine Rolle als Neurotransmitter postuliert (Allen *et al.*, 2009; Pickel & Chan, 1995; Ferrario *et al.*, 1990). Für Erstaunen sorgte die

neuentdeckte Rolle von Ang-(1-7) für Lern- und Gedächtnisprozesse. So fand man einen spezifischen zerebral wie peripher vorkommenden Ang-(1-7) Rezeptor, den G-Proteingekoppelte Rezeptor Mas; kodiert durch das Mas Protoonkogen. Dieser Mas Rezeptor konnte überwiegend in Neuronen zahlreicher Hirnregionen identifiziert werden; darunter im Hippocampus, in der Amygdala, im anterodorsalen thalamischen Nucleus und im Kortex (Becker *et al.*, 2007). Das Heptapeptid war zuvor als Ligand für den peripheren Mas Rezeptor identifiziert worden (Santos *et al.*, 2003). Interessanterweise führt Mas nach Hetero-Oligomerisierung mit dem AT₁-Rezeptor zu einer Hemmung von Ang II (Kostenis *et al.*, 2005). Dies ist vereinbar mit Studiendaten über den Effekt von Ang II auf die Feldpotenzialamplitude in der Amygdala, aus denen sich neben der Ko-Lokalisation beider (Santos *et al.*, 2007) eine funktionelle Interaktion zwischen dem Mas und AT₁-Rezeptor schlussfolgern ließ (von Bohlen und *et al.*, 2000).

Die Amygdala und der Hippocampus werden von angiotensinergen Synapsen angesteuert, die dazu fähig sind die Expression bzw. Induktion neuronaler Langzeit-Plastizität nicht nur zu stimulieren, sondern gleichermaßen zu limitieren. Über den AT₁-Rezeptor löst Ang II eine Hemmung einer HFS-induzierten LA-LTP aus, was sich auch in dem Ausbleiben dieser Suppression in AT₁-defizienten Mäusen widerspiegelte (von Bohlen und & Albrecht, 1998b). Prüft man gleichzeitig die Studienlage über Ang IV (Wright *et al.*, 2003;Wayner *et al.*, 2001;Davis *et al.*, 2006;Kramar *et al.*, 2001), lässt sich für Ang II ein hemmender, für Ang IV ein bahnender Einfluss auf die LTP in gedächtnisrelevanten Strukturen vermuten. Die Ang II vermittelte Hemmung der LA-LTP lässt sich durch präsynaptische Alteration an glutamatergen Synapsen bzw. durch die Interaktion mit postsynaptischen NMDA-Rezeptoren erklären (von Bohlen und & Albrecht, 2006). Im Gegensatz hierzu steigert Ang-(1-7) im Hippocampus und im lateralen Kern der Amygdala die LTP über den Mas Rezeptor. Diese Fazilitierung konnte bei Mas-Rezeptor-Knockout Stämmen nicht beobachtet werden (Hellner *et al.*, 2005). Essentiell für beschriebenen Vorgänge der LA-LTP Potenzierung sind sowohl NO als auch die Cyclooxygenase 2 (COX 2) (Albrecht, 2007).

Der Brückenschlag zur Furchtkonditionierung unterstreicht die Bedeutung von Ang-(1-7) für emotionales Verhalten, da Mas-defiziente Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe ein höheres Angstniveau aufwiesen (Walther *et al.*, 1998). Detaillierte Untersuchungen hierzu sind zurzeit noch ausstehend.

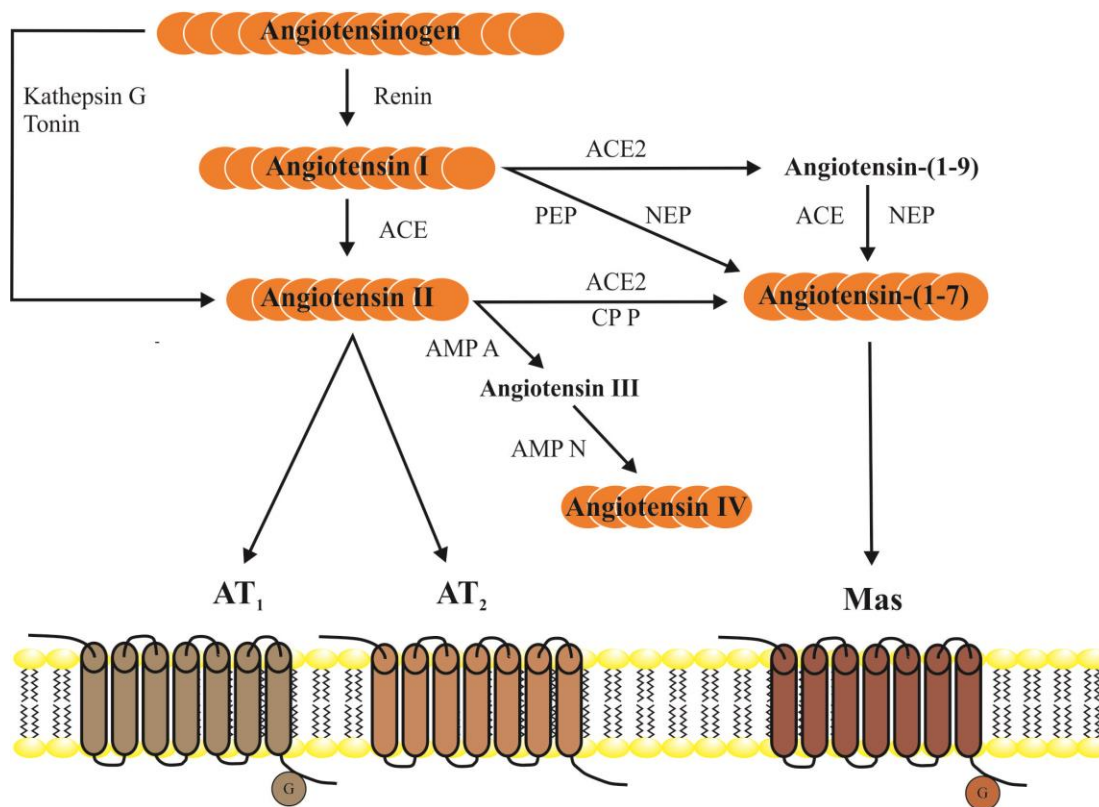


Abb. 1.3 RAS des ZNS
Vereinfachte, schematische Darstellung, die den Syntheseweg der neuroaktiven Angiotensine mit einer Auswahl beteiligter Rezeptoren illustriert (AT_4 -Rezeptor sowie Ang III Wirkung auf AT_1/AT_2 nicht gezeigt). (modifiziert nach Albrecht, 2010)

1.7 NO-System

Stickstoffmonoxid ist ein ubiquitär vorkommendes Signalmolekül sowohl im Gehirn wie auch in anderen Organsystemen, das als primär physiologisches Radikal mit kurzer Halbwertszeit (wird in biologischen Flüssigkeiten zu anorganischem Nitrit und Nitrat oxidiert und damit inaktiviert) zur Zielzelle diffundiert, um dort ein weitreichendes Spektrum an Funktionen zu übernehmen. So greift NO in Regelkreise unterschiedlichster Zelltypen ein: Es beeinflusst das Wachstum von glatten Muskelzellen, moduliert gleichermaßen die Thrombozytenadhäsion bzw. -aggregation und nimmt Einfluss auf das Anheften und Migrieren von Leukozyten und Monozyten am Endothel. Diese Vielfalt komplettiert die aussichtsreiche Fähigkeit Stickstoffmonoxids synaptische Plastizität und Verhaltensprozesse zu beeinflussen (Schafe *et al.*, 2005; Prast & Philippu, 2001), denn NO gilt in neuronalen Strukturen als retrograder interzellulärer Messenger, der getriggert durch Glutamat, die Neurotransmitterfreisetzung präsynaptisch moduliert. Dieser Einfluss auf die Transmitterfreisetzungswahrscheinlichkeit erfolgt präsynaptisch sowohl an glutamatergen wie auch GABAergen Synapsen (Hardingham *et al.*, 2013).

Als kleinstes bio-aktives Molekül wird NO enzymatisch aus der Aminosäure L-Arginin durch drei Isoformen der NO-Synthase (NOS) gebildet: der endothelialen NOS (eNOS), der neuronalen NOS (nNOS) und der induzierbaren NOS (iNOS). Die NOS ist als Ca^{2+} -calmodulin-abhängiges Enzym in der Amygdala sowie ubiquitär in Strukturen des ZNS vertreten (Barjavel & Bhargava, 1995). Calmodulin wird durch Ca^{2+} -Einstrom aktiviert, was zumindest teilweise als Antwort auf die Stimulation von Glutamat Rezeptoren zu sehen ist (Pogun, 2001). Hauptaugenmerk soll in dieser Arbeit auf die beiden konstitutiv exprimierten NOS Isoformen gelegt werden: eNOS und nNOS.

1.7.1 Verteilungsmuster der nNOS und eNOS

Die nNOS ist in hoher Konzentration in neuronalem Gewebe und im Skelettmuskel lokalisiert. Die eNOS liegt vor allem in Endothelzellen von Blutgefäßen vor. Während die eNOS wie die nNOS und iNOS im Zytosol gelöst sind, liegt sie zusätzlich membrangebunden vor (Knowles & Moncada, 1994). Zerebral konnten nNOS und eNOS in Neuronen, Glia und Gefäßendothel identifiziert werden (Faraci & Heistad, 1998). Die Induktion der iNOS in Astrozyten, Mikrogliazellen (Park *et al.*, 1994; Simmons & Murphy, 1992) und Neuronen (Sato *et al.*, 1996) ist charakteristisch nach inflammatorischer Stimulation.

Wie erwähnt, lässt sich die eNOS im gesamten Organismus primär im Endothel von Blutgefäßen lokalisieren. Dabei führt das gebildete NO zu einer Vasodilatation durch die Aktivierung von zyklischem Guanosine-3', 5'-monophosphat (cGMP) abhängiger Proteinkinasen (Faraci & Heistad, 1998). Frühere Untersuchungen zur Ortsspezifität der eNOS zeigten widersprüchliche Ergebnisse. So ließ sie sich außerdem in Neuronenpopulationen nachweisen (Dinerman *et al.*, 1994; Doyle & Slater, 1997). Limitiert wurde die hier verwendete Immunhistochemie am ehesten durch eine Kreuzreaktion zwischen Antikörpern der eNOS und anderen NOS Isoformen respektive weiteren nicht bekannten Antigenen. RNA-Untersuchungen widerlegten diese Ergebnisse und konnten eNOS-RNA ausschließlich im zerebralen Gefäßendothel, einschließlich amygdalärer Blutgefäße, detektieren (Demas *et al.*, 1999).

Die Betrachtung des Verteilungsmusters der nNOS zeigte, dass sie im limbischen System stark exprimiert wird und dort dynamischen Expressionsvorgängen unterliegt. So genügte eine einzige Stressphase, um einen akuten Dichteanstieg von nNOS-positiven Neuronenverbänden in der Amygdala und im Hippocampus auszulösen (Echeverry *et al.*, 2004). Dabei liegt die nNOS auf molekularer Ebene in Neuronen des lateralen Kerns der Amygdala vor, d.h. sie wird postsynaptisch an exzitatorischen Synapsen exprimiert (Schafe *et al.*, 2005). In Anlehnung an die

zuvor geäußert Assoziation zum limbischen System, unterstrich diese Arbeitsgruppe weiterhin die Wichtigkeit der NO-Signaltransmission für die Gedächtnisformation während auditiver Furchtkonditionierung. Dies konnte in vivo durch die Entdeckung erhöhter NO-Spiegel während der Pawlowschen Furchtkonditionierung bekräftigt werden (Izquierdo *et al.*, 2006). Für das Verständnis des NO-Systems ist es wichtig sich zu vergegenwärtigen, dass den einzelnen NO-Synthesen unterschiedliche funktionelle Systeme und Aufgabenfelder zuteilwerden. So wird unter auditiver Furchtkonditionierung und konditioniertem Stress die amygdaläre eNOS verstärkt exprimiert (Sato *et al.*, 2006), wohingegen die Genexpression der nNOS eher für die kontextspezifische als für die signalspezifische Furchtkonditionierung verstärkt wird (Kelley *et al.*, 2009).

1.7.2 Molekulare Signaltransduktion NO-vermittelter Effekte

Mehrere Studien zeigten eine NO-Abhängigkeit für die Persistenz einer LTP in der CA1-Region des Hippocampus (Bon & Garthwaite, 2003). Dies wurde in folgenden Untersuchungen bestätigt und durch die Tatsache erweitert, dass auch präsynaptische Plastizitätsprozesse mit darauffolgender Proteinneusynthese abhängig von NO sind (Johnstone & Raymond, 2011). NO, eNOS und nNOS sind somit wesentliche Bestandteile der LTP im Hippocampus (Son *et al.*, 1996).

Allgemein herrscht Einigkeit darüber, dass während der beschriebenen hippocampalen LTP ein Ca^{2+} -Einstrom über geöffnete NMDA-Rezeptoren erfolgt, was die NOS-Aktivität und somit die NO-Synthese steigert. Somit kann die NO-Produktion als Antwort auf die NMDA Rezeptor Aktivierung archetypisch für die Neurotransmitter-induzierte NO-Synthese gesehen werden, was durch die physikalische Assoziation von nNOS und der NR2B NMDA Rezeptoruntereinheit über das postsynaptische density Protein 95 (PSDP95) unterstrichen wird (Christopherson *et al.*, 1999). Das gebildete Stickstoffmonoxid diffundiert anschließend aus der Postsynapse (Abb. 1.4), um am präsynaptischen Neuron cGMP, cGMP-abhängigen Proteinkinasen und die Nitrosothiolsnythese zu aktivieren (Garthwaite, 2008;Hardingham *et al.*, 2013).

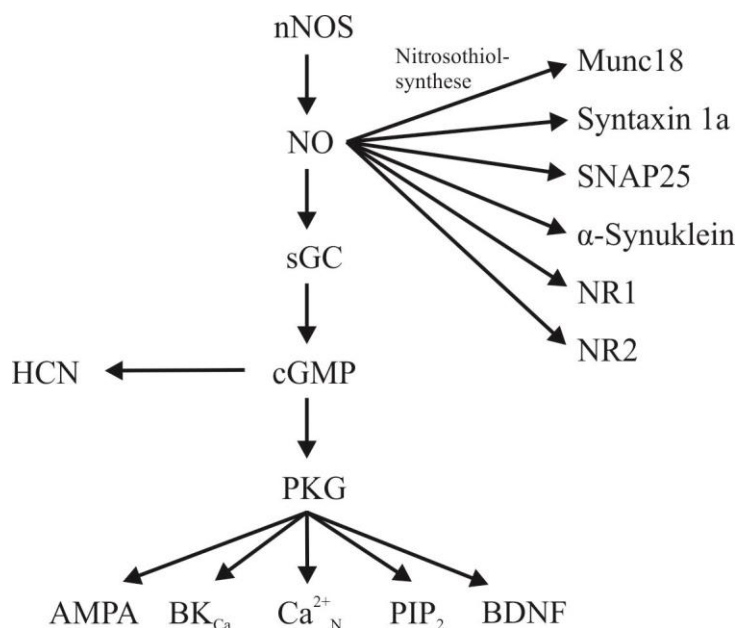


Abb. 1.4 Molekulare NO Signalwege
Darstellung der im Text beschriebenen Hauptsignalwege der nNOS und ihrer Effektormoleküle. NO verfügt über 3 Hauptwege: Nitrosothiol, cGMP und PKG. (modifiziert nach Hardingham *et al.*, 2013)

Zum einen übt NO daher sein Potenzial zur Stimulierung synaptogener Prozesse als LTP-intensivierender retrograder Messenger über den cGMP-abhängigen Protein Kinase (PKG) Signalweg aus (NO-cGMP-PKG Signaltransduktion). So kann cGMP entweder durch die Bindung von Stickstoffmonoxid an Guanylyl-Cyclase gekoppelte NO-Rezeptoren, zum anderen über die pharmakologische Sensitivierung der löslichen Guanylyl-Cyclase (sGC) synthetisiert werden. Dies führt dazu, dass die cGMP-abhängige PKG, als molekularer Hebelarm NOs, aktiviert wird und so eine beträchtlichen Potenzierung der LA-LTP (Feil *et al.*, 2005;Chien *et al.*, 2003) resultiert. Auf molekularer Ebene fußt dieses Modell teilweise auf der Aktivierung bestimmter Phosphatasen, die somit indirekt zu einem verändertem Phosphorylierungsgrad ihrer Effektorproteine führen (Schlossmann & Hofmann, 2005). Weitergehende Untersuchungen, darunter das Infundieren von Aktivatoren und Inhibitoren der PKG in den lateralen Kern der Amygdala, bewiesen eine deutliche Beteiligung der PKG an der Konsolidierung des Furchtgedächtnisses (Ota *et al.*, 2008). In diesem Sinne fanden Studien über das Exprimierungsmuster der verschiedenen Isoformen der cGMP-abhängigen Proteinkinase, dass die I β -Isoform sowohl für die Vermittlung synaptischer Transmissionsvorgänge im LA als auch für Konsolidierungsprozesse des Furchtgedächtnisses entscheidend ist (Paul *et al.*, 2008). Dabei sind die PKGs, vor allem die MAP-Kinase, bemerkenswerterweise fähig, das NO-Signal in eine neuronale Proteinneusynthese zu transformieren, d. h. neurotrophe Prozesse einzuleiten. Als unabdingbar für diesen Vorgang wird das cAMP response element-binding protein (CREB) (Lu

& Hawkins, 2002; Nagai-Kusuhara *et al.*, 2007) angesehen, da es als wichtiger Transkriptionsfaktor für induzierte neuromolekulare Umbauprozesse während der Akquirierung, Festigung und Erhaltung von Gedächtnisinhalten identifiziert wurde (Izquierdo *et al.*, 2006). Darüber hinaus verdichten sich die Hinweise über eine mögliche Kooperation unter den BDNF- bzw. NO-induzierten Signalkaskaden (Lessmann *et al.*, 2011).

Neben der Aktivierung der PKG ist cGMP zusätzlich in der Lage die Offenwahrscheinlichkeit neuronaler Ionenkanäle zu modifizieren. Demzufolge konnte cGMP die Glutamatfreisetzung an Präsynapsen hippocampaler CA1-Neurone durch die Aktivierung von HCN-Kanälen (Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels) potenzieren (Neitz *et al.*, 2011). Außerdem wird präsynaptisch die Aktivität Ca^{2+} -abhängiger Ionenkanäle, wie z. B. des BK_{Ca} -Kanals (big potassium), indirekt über die PKG beeinflusst. Diese durch N-Typ Ca^{2+} -Kanäle ($\text{Ca}^{2+}_{\text{N}}$) aktivierbaren Kaliumkanäle tragen zur Repolarisierung nach einem Aktionspotenzial (AP) sowie zum schnellen hyperpolarisierenden Nachpotenzial bei (Sah, 1996). Angesichts andauernder AP-Serien bewirkt die BK_{Ca} -Kanal vermittelte Intensivierung der Hyperpolarisation eine schnelle Erholung der inaktivierten Natriumkanäle, was in einer stabileren AP-Fortleitung mit erhöhter Feuerrate und vermehrtem Kalziumeinstrom mündet (Klyachko *et al.*, 2001).

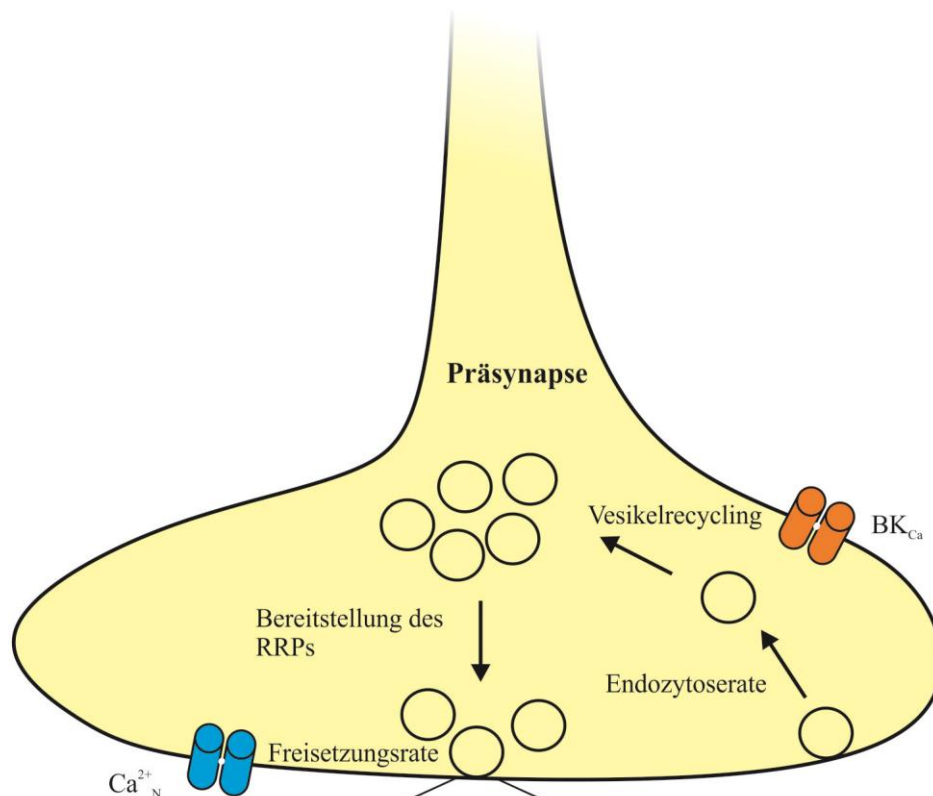
Abschließend ist auf die präsynaptische Nitrosothiolproduktion einzugehen, die vermutlich auf einer NO bedingten Veränderung der Proteinstruktur an Thiolgruppen von Cysteinresten beruht (Heinrich *et al.*, 2013), wobei dieses Anhängen von Nitrosothiol-Gruppen (S-Nitrosylation) höhere NO-Konzentrationen erfordert als für die Aktivierung der sGC nötig ist. So wurden zahlreiche präsynaptische Proteine als NO-Zielstrukturen identifiziert, die das Ausmaß der präsynaptischen Transmission modifizieren (Abb. 1.5). Beteiligt sind vor allem Bestandteile des SNARE-Komplexes [engl. für soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive-fusion protein) attachment receptor], der intrazellulär in Vesikeln gespeicherten Neurotransmittern die extrazelluläre Freisetzung ermöglicht. Dazu gehören Syntaxin 1a und Munc18 (Palmer *et al.*, 2008) und aller Voraussicht nach SNAP25 (soluble NSF attachment protein) und alpha Synuklein, während Synaptobrevin nicht durch NO beeinflusst wird (Hardingham *et al.*, 2013). Dahingehend bewirkt die Nitrosothiolproduktion beispielsweise die Strukturveränderung von Syntaxin 1a, wodurch Munc18 daran gehindert wird, dieses in der gefalteten Form zu fixieren, so dass entfaltetes Syntaxin 1a befähigt wird VAMP (vesikel-assoziiertes Membranprotein) an der Vesikelseite und SNAP25 an der Freisetzungsstelle zu binden, somit das Andocken und Fusionieren des Vesikels mit der präsynaptischen Membran zu ermöglichen und damit einhergehend die Transmitterfreisetzung zu bahnen (Palmer *et al.*, 2008). Die Zweckmäßigkeit

dieser Adjustierungsstellen lässt sich über die für eine bestimmte Zeitperiode notwendige Aufrechterhaltung der synaptischen Transmitterfreisetzung erklären, da die Rate der recycelten Vesikel zumindest der Vesikel-Exozytoserate entsprechen muss. Um dies an hohe Transmitterfreisetzungsraten anzupassen, wird beispielhaft im Hippocampus das präsynaptische Vesikelrecycling über die NMDA-Rezeptor-abhängige, retrograde NO-Freisetzung aus der Postsynapse gesteuert, in dem es nach Diffusion in der Präsynapse die cGMP-Produktion und folglich die PKG-Aktivität erhöht, wodurch über PIP₂ (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat) die Endozytoserate der synaptischen Vesikel erhöht wird (Micheva *et al.*, 2003). Gleichzeitig kann NO im Rahmen einer LTP-Etablierung nicht nur die Transmitterfreisetzungsraten, sondern auch den Anteil sofort verfügbarer Vesikel [readily releasable Pool (RRP)] NMDA-abhängig steigern (Ratnayaka *et al.*, 2012). Neben dem Einfluss auf das Vesikelsystem kann die Nitrosothiolbildung gleichermaßen auf die NR1- und NR2-Untereinheit von NMDA-Rezeptoren modulatorisch wirksam werden (Jaffrey *et al.*, 2001).

Abgesehen von den beschriebenen präsynaptischen Effekten, finden sich natürlich ebenfalls postsynaptische NO Ansatzpunkte in der Literatur. In diesem Sinne beeinflusst NO die Expression membranständiger AMPA Rezeptoren. Hieran mitwirkend ist erneut die NMDA-abhängige Neurotransmission, die mit Hilfe der nNOS NO generiert, das wiederum über S-Nitrosylation NSF aktiviert, wodurch AMPA Rezeptoruntereinheiten daran binden und an der Synapsenoberfläche vermehrt exprimiert werden können (Huang *et al.*, 2005).

Die Bedeutung NOs für die Genese synaptischer Plastizität ist allerdings nicht auf das glutamaterge Transmittersystem begrenzt. Demzufolge wird NO ein regulativer Einfluss auf die Transmitterfreisetzung an GABAergen, dopaminergen und noradrenergen Synapsen zugesprochen (Hardingham *et al.*, 2013). In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass die LTP an inhibitorischen GABAergen Synapsen im lateralen Kern der Amygdala mit Hilfe glutamaterger Transmission und darauffolgenden NO-Signalen verstärkt werden kann (Lange *et al.*, 2012).

A



B

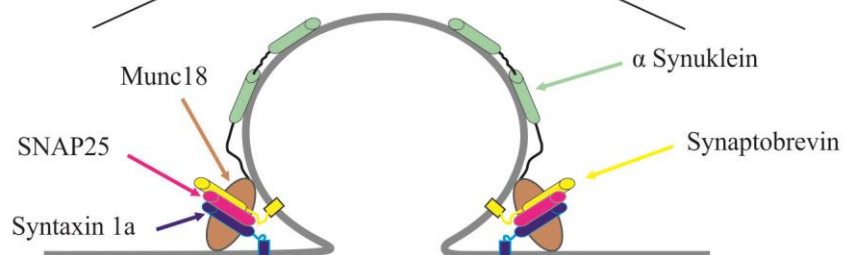


Abb. 1.5 Einfluss NOs auf die präsynaptische Endigung
A: NO beeinflusst die Transmitterfreisetzungsrates über unterschiedliche Signalwege: Es verstärkt vermittelt durch PKG die Leitfähigkeit von N-Typ Kalziumkanälen ($\text{Ca}^{2+}_{\text{N}}$), erhöht die Endozytoserates, beschleunigt das Vesikelrecycling und steuert durch das Zusammenspiel von PKG und PIP_2 die Verfügbarkeit des readily releasable pools (RRPs). Der Einfluss auf die BK_{Ca} -Kanäle zur Stabilisierung der AP-Fortleitung
B: NO Einfluss auf zahlreiche SNARE-Proteinen. Syntaxin 1a und SNAP25 können Nitrosothiolgruppen ausbilden. Die Nitrosylierung von Munc18 hebt dessen hemmenden Einfluss auf Syntaxin 1a auf, so dass sich ein SNARE-Komplex für die Exozytose von Neurotransmittern ausbilden kann. Während α Synuklein durch NO moduliert wird, wird Synaptobrevin nicht durch NO beeinflusst. (modifiziert nach Hardingham *et al.*, 2013)

1.7.3 Kooperative Verbindung zwischen NO und Ang-(1-7)

In der aktuellen Forschung rückt die Kooperation von Ang-(1-7) und NO weiter in den Kontext der synaptischen Plastizität. So lässt sich die Ang-(1-7)-induzierte Potenzierung der LA-LTP nur

unter der Beteiligung NO-abhängiger Mechanismen realisieren (Fraga-Silva *et al.*, 2008; Heitsch *et al.*, 2001; Brosnihan *et al.*, 1996). Darüber hinaus greift das NO-System regulierend in tangierende Signalkaskaden ein. Entsprechend ließ sich ein modulatorischer NO-Einfluss auf die COX-2 nachweisen, welches ein essenzielles Enzym für die Prostaglandinsynthese aus Arachidonsäure (Salvemini *et al.*, 1993) repräsentiert und auf synaptischer Ebene die inhibitorische GABAerge Transmission limitiert (Vaughan, 1998). Folglich ist NO fähig, den COX-Signalweg u.a. abhängig von der basaler NO-Konzentration und dem Prostaglandin-synthetisierenden Zelltyp ein- bzw. auszuschalten (Mollace *et al.*, 2005). In diesem Zusammenhang ist neben der COX-2-abhängigen LA-LTP, vor allem ihr Mitwirken an der Ang-(1-7)-vermittelten Verstärkung der LA-LTP (Albrecht, 2007) hervorzuheben, wobei am ehesten präsynaptische Plastizitätsprozesse dem zugrunde liegen.

1.7.4 Forschungsergebnisse zum NO-System und ihre Abhängigkeit vom experimentellen Paradigma

In der Erstellung von Übersichtsarbeiten zur exakten Rolle von NO und beider Isoformen für die NO-abhängige LTP kristallisierten sich bedauerlicherweise je nach Tiermodell und experimentellen Paradigma widersprüchliche Daten heraus (Blackshaw *et al.*, 2003). Während einige Arbeitsgruppen die LTP im Hippocampus durch NOS-Inhibitoren komplett blockieren konnten, fanden andere lediglich eine partielle Blockierung vor, was darin kulminierte, dass NO in manchen Studien kein LTP-Einfluss zugesprochen wurde (Holscher, 2002). Als ursächlich werden neben Spezies- bzw. altersabhängigen Expressionsmustern der NOS (siehe Diskussion) vor allem die in den Untersuchungen verwendeten Reizparadimen verantwortlich gemacht. So konnte die Induktion einer LTP unter Anwendung von stärkeren Stimulationsprotokollen (HFS mit höherer Frequenz und Pulszahl) durch NO-Inhibitoren in manchen Arbeitsgruppen blockiert werden, wohingegen dieser Effekt bei schwach hochfrequenten Stimulationsprotokollen ausblieb. Irritierenderweise stellten andere Arbeitsgruppen exakt gegenläufige Effekte fest (Holscher, 1997). Eine mögliche Erklärung liegt unter Umständen in der nicht genormten Definition der sogenannten schwachen und starken Hochfrequenzprotokolle, was das Vergleichen dieser Studien unmöglich macht (Holscher, 2002). Als elektrophysiologisches Erklärungsmodell zeigte sich in der CA3 Region des Hippocampus, dass die durch ein schwaches bis moderates Protokoll induzierte NO-Freisetzung eine leichte EPSP-Depression zur Folge hatte, während die EPSPs auf der Basis starker Stimulationsprotolle durch NO nicht beeinflussbar waren. Wurde NO allerdings fortlaufend appliziert, konnte der reduzierende

Einfluss des schwachen Protokolls durch ein starkes aufgehoben werden, wodurch höhere EPSP registriert wurden, was sich am ehesten durch eine NO-vermittelte Änderung der Gentranskription erklären lässt (Wulfert & Margineanu, 1996). Die genannten Unterschiede konnten jedoch nicht alle Widersprüche schlüssig klären, so dass fortgesetzte Untersuchungen bemerkenswerterweise eine zwischen einzelnen Rattenstämmen differierende Sensibilität für NOS-Inhibitoren feststellten (Holscher, 2002).

1.8 Geschlechtsdimorphismus in der neuronalen Architektur und dessen Bedeutung für die Forschung

In diesem Abschnitt werden geschlechtsspezifische Unterschiede für das ZNS allgemein, für den Hippocampus, für das RAS, für die Amygdala und für die Prozesse einer Langzeitpotenzierung aufgeführt, um weiterführend die Unterrepräsentation der Forschung an weiblichen Versuchstieren zu diskutieren.

Funktionelle wie strukturelle Geschlechtsdimorphismen finden sich in zahlreichen, vor allem „kognitiven“ Hirnregionen wie im Hippocampus, in der Amygdala und im Kortex (Juraska, 1991). Übersichtsarbeiten zerebraler MRT-Untersuchungen zeigen das Ausmaß geschlechtsspezifischer Anatomie (Luders & Toga, 2010). So sind Teile des Kortex bei Frauen signifikant stärker ausgedehnt als bei Männern, was durch signifikante Abweichungen im Verhältnis weißer zu grauer Substanz ergänzt wird (Luders *et al.*, 2006). Dazu differieren Frauen und Männer funktionell in der zur Informationsverarbeitung genutzten neuronalen Architektur und verwenden unterschiedliche Problemlösungsstrategien (Bao & Swaab, 2010; Zald, 2003; Hines, 2010). Im Hinblick auf kognitive Funktionen demonstrierten exempli causa präpubertäre Jungen deutlich bessere Leistungen des räumlichen Lernvermögens als gleichaltrige Mädchen (Newhouse *et al.*, 2007). Ätiologisch sind Einflüsse von Sexualhormonen auf die Morphologie von Nervenzellen und dessen synaptischer Spindichte wie -architektur anzuführen (Leranth *et al.*, 2003; Isgor & Sengelaub, 2003).

Als für Mnestik und Kognition unverzichtbare Struktur, ist der Hippocampus, bezogen auf die zerebrale Gesamtmasse, bei Frauen relativ größer (Goldstein *et al.*, 2001). Weiterhin existieren Hinweise für Geschlechtsunterschiede für diverse im Hippocampus vorkommende Neurotransmittersysteme (Madeira & Lieberman, 1995). Diese Unterschiede tangieren auch hippocampale Lernprozesse. Dahingehend zeigten sich verschiedene Enzymaktivitäten während der Konsolidierung von erlerntem Vermeidungsverhalten (Rucker *et al.*, 2004). Bei männlichen Ratten, die einer akuten Stresssituation ausgesetzt waren, nahm mit der Lernleistung im

Anschluss auch die Dendritendichte zu, wohingegen diese bei weiblichen Tiere eingeschränkt wurden (Shors, 2002). Ähnlich gegensätzliche Reaktionen auf Stress sind ebenfalls auf Prozesse der Furchtkonditionierung anwendbar: Stress bahnte diese bei Männern und inhibierte diese bei Frauen (Jackson *et al.*, 2006).

In diesem Zusammenhang fand man in der Amygdala bei Ratten neben sexuell dimorphen Subnuklei (Stefanova & Ovtcharoff, 2000) entsprechende intraamygdaläre Unterschiede in Neuronenzahl, -größe und -dornfortsatzdichte (Gliazellen eingeschlossen) (Johnson *et al.*, 2008b; Morris *et al.*, 2008; Rasia-Filho *et al.*, 2004). Dazu ist das Volumen der Amygdala bei Männern relativ zum Gesamthirnvolumen größer (Goldstein *et al.*, 2001). Wie im Hippocampus gezeigt, induziert Stress gleichermaßen in der Amygdala geschlechtsspezifische Prozesse. Während die Serotonin-Rezeptordichte nach Exposition von Stress bei männlichen Tieren hochreguliert wurde, sank die Rezeptorkonzentration bei weiblichen Tieren ab (Ziabreva *et al.*, 2003). Im Übrigen offenbarten fMRT-Untersuchungen ein je nach Geschlecht hemisphäriell unterschiedlich lateralisiertes Verteilungsmuster für amygdaläre Prozesse zur Emotions-assoziierten Gedächtniskonsolidierung (Cahill *et al.*, 2004). Dabei prozessiert bevorzugt die linkshemisphärielle Amygdala bei Frauen emotional bewertete Gedächtnisinhalte, wobei diese bei Männern vom rechthemisphäriell lokalisierten Mandelkern verarbeitet werden. Dieser hemisphärielle Geschlechtsdimorphismus bestätigte sich auch in der funktionellen Konnektivität der Amygdala mit anderen Hirnregionen unter Ruhebedingungen, d. h. ohne emotionale Stimuli (Kilpatrick *et al.*, 2006).

Mit Hilfe des Gedächtnismodells der Langzeitpotenzierung konnten Plastizitätsvorgänge sowohl im Hippocampus als auch der Amygdala charakterisiert werden. LTP-Studien im Hippocampus belegen einen Geschlechtsdimorphismus sowohl für die Induktion einer LTP als auch für relevante molekulare Korrelate, wie beispielsweise dem Grad der NMDA-Rezeptor Aktivierung (Mizuno *et al.*, 2007; Maren *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 2004). Dies beinhaltete bei induzierten multiplen Serien tetanischer Reizung eher eine LTP bei männlichen als bei weiblichen Versuchstieren, was dafür spricht, dass männliche Tiere auf eine größere Bandbreite tetanischer Stimuli reagieren können. Als Erklärungsmodell wurden gonadotrope Interaktionen mit Ca^{2+} -respektive NMDA-Rezeptoren und der darauffolgenden Aktivierung der MAP-Kinase aufgeführt (Yang *et al.*, 2004). Ein geschlechtsabhängiger NMDA-Rezeptor Aktivierungsgrad konnte bereits zuvor in stabiler Korrelation mit ebenfalls geschlechtsspezifischen LTP-Amplituden verzeichnet werden, wobei diese vom Versuchstieralter abhingen (Maren *et al.*, 1994). Die Arbeitsgruppe fand außerdem Geschlechtsunterschiede während der Furchtkonditionierung: Unabhängig von der Intensität des US reagierten männliche Versuchstiere in höherem Maße auf

den kontextuellen CS, was sich durch stärkeres Freezing äußerte, d.h. dem Sistieren jeglicher Körperbewegung inklusive der Atemexkursion (Fendt & Fanselow, 1999). Zusätzlich sorgten Ergebnisse aus der LA-LTP für Verwunderung, da im Rahmen der LA-LTP eine gender-abhängige Wirkungsweise des Kainat-Rezeptors GLU_{K5} demonstriert werden konnte (Schubert *et al.*, 2008).

Das RAS des ZNS weist ebenfalls Geschlechtsdimorphismen auf. Zunächst wurden Geschlechtsunterschiede in den Blutdruckwerten im Tiermodell sowie am Menschen belegt; doch bleiben die zugrunde liegenden Mechanismen unklar (Hinojosa-Laborde *et al.*, 1999; Oparil & Miller, 2005; Johns, 2003). Für mehr Klarheit wurden experimentelle Studiendesigns gewählt, die gezielt die Rolle des RAS für die Entstehung der Hypertonie beleuchteten (Pretorius *et al.*, 2005; Reyes-Engel *et al.*, 2006), wodurch man in der Lage war zu schlussfolgern, dass dem RAS eine entscheidende Rolle in der Genese des Geschlechtsdimorphismus zukommt (Maric-Bilkan & Manigrasso, 2012). Beispielsweise zeigte sich ein geschlechtlich dimorphes Ansprechen auf AT_1 -Rezeptor Antagonisten. Dabei war die antihypertensive Wirkung von Losartan (AT_1 -Rezeptor Antagonist) bei 16 Monate alten weiblichen SHR-Ratten (Spontaneous Hypertension Rat) signifikant geringer als bei gleichaltrigen männlichen Tieren (Yanes *et al.*, 2006). Dieser Geschlechtsdimorphismus fand sich nicht bei jüngeren Tieren. Entsprechend scheinen die pathophysiologischen Prozesse, die zur arteriellen Hypertonie führen, beim männlichen Geschlecht stärker vom RAS abhängig zu sein als beim weiblichen Geschlecht.

Für das zentrale RAS wurde ein sexuell unterschiedliches Verteilungsmuster von AT_1 -Rezeptoren in Dendriten der rostroventralen Medulla oblongata gefunden (Pierce *et al.*, 2009).

Die zuvor genannten Schnittmengen des zentralen RAS und NO-Systems enttäuschen auch für diese Thematik nicht: die Funktion der NOS für kortikale Plastizitätsänderungen differierten zwischen den Geschlechtern auf synaptischer Ebene (Dachtler *et al.*, 2012). In diesem Sinne erbrachten LTP-Messungen im somatosensorischen Kortex, dass die genetische Deletion der nNOS bei männlichen Versuchstieren eine verminderten LTP bedingte, während die weibliche LTP-Amplitude nicht beeinflusst und dazukommend als NO-unabhängig charakterisiert wurde. Der in derselben Studie untersuchte Einfluss der nNOS-Deletion auf die neuronale Entwicklung erbrachte keine Geschlechtsspezifität, so dass die Unterschiede am ehesten auf synaptischer Ebene zu finden sind und dort entweder in grundlegenden Induktionssignalwegen oder in deren Kompensationsmechanismus für die nNOS (Dachtler *et al.*, 2012).

Diese umfassende Datenlage zu funktionellen wie morphologischen Geschlechtsdimorphismen prädisponiert die Amygdala für weitergehende Untersuchung unter diesem spannenden Aspekt.

An dieser Stelle sei auf die Besonderheit dieser Arbeit hingewiesen, da wir zu den wenigen gehören, die sowohl männliche als auch weibliche Tiergruppen analysieren. In der Forschung herrscht generell eine Unterrepräsentation an weiblichen Versuchstieren vor (Beery & Zucker, 2011;Prendergast *et al.*, 2014). Die Vernachlässigung dieses Forschungsfeldes wird aktuell vehement diskutiert. Als Grund wird unter anderem angeführt, dass der weibliche Zyklus eine höhere, sogenannte intrinsische Variabilität bedingt, mit dem Ergebnis dass gezielte Testungen in jeder Zyklusphase nötig sind, um eine verlässliche statistische Auswertung zu gewährleisten. Dies würde parallel neben einer höheren Zahl von Tierversuchen, eine Mehrinvestition in Geräte, Zeit und Statistik voraussetzen, was Arbeitsgruppen dazu bewegt, bevorzugt männliche Gruppen auszuwählen. Die eben genannten Thesen sind allerdings empirisch nicht belegt. Im Gegenteil: (Prendergast *et al.*, 2014) führten eine Meta-Analyse von 293 wissenschaftlichen Arbeiten durch und verglichen die Variabilität von morphologischen, molekularen, physiologischen und Verhaltenseigenschaften bei männlichen und weiblichen Mäusen ohne die Zyklusphasen zu erfassen. Dabei konnte keine signifikante höhere Variabilität in der weiblichen Gruppe festgestellt werden. Interessanterweise war die Variabilität diverser Eigenschaften in der männlichen Gruppe sogar höher. Man kann entsprechend der vorgelegten Ergebnisse postulieren, dass neurowissenschaftliche Untersuchungen an weiblichen Tiergruppen keine Überwachung der Zyklusphasen erfordern. Die Studie führte zusätzlich ein weiteres zu beachtendes Detail zu Tage: Wurden männliche und weibliche Gruppen zusammen gehalten, so erhöhte sich die Variabilität in beiden um 37% verglichen zur getrennten Haltung beider Geschlechter (Prendergast *et al.*, 2014). Die Prävalenz von Geschlechtsdimorphismen auf fast jeder strukturell-biologischen Ebene und der nicht mehr begründbare Ausschluss weiblicher Gruppen, sollten zum standardisierten Einschluss weibliche Tiergruppen in die Versuchsprotokolle neurowissenschaftlicher Forschung führen. Dabei sollte ebenfalls aufgeführt werden, ob die Geschlechter getrennt oder gruppiert gehalten wurden.

1.9 Ziel- und Fragestellung

Es existieren diverse aktuelle Forschungsarbeiten, welche die zentrale Bedeutung des zerebralen Renin-Angiotensin-Systems für die Prozesse neuronale Plastizität sowohl im Hippocampus als auch im lateralen Kern der Amygdala unterstreichen. Dabei bahnte Ang-(1-7) in beiden Strukturen die LTP (Albrecht, 2007;Hellner *et al.*, 2005), wobei die These aufgestellt wurde, dass diese Mechanismen an erhöhte NO-Spiegel gekoppelt sind. Dies bestätigte sich in folgenden Untersuchungen und wurde weiter spezifiziert: unter der Ang-(1-7)-vermittelten

LA-LTP Fazilitierung wird über den G-protein-gekoppelten Rezeptor Mas die NO-Synthese gesteigert. Dabei konnte der unspezifische NOS-Inhibitor L-NAME nicht nur im Hippocampus, sondern auch im lateralen Amygdalakern die beschriebene Ang-(1-7)-induzierte LTP-Verstärkung blockieren (Albrecht, 2007; von Bohlen und & Albrecht, 2002), was für eine Mitbeteiligung der verschiedenen NO-Synthase Isoformen spricht.

In der vorliegenden Arbeit sollen die beschriebenen Befunde in der lateralen Amygdala überprüft, sowie detaillierter aufgeschlüsselt werden. Dabei interessiert uns vor allem die Rolle zweier Isoformen der NO-Synthase, nämlich der nNOS und der eNOS, in der Induktion einer LA-LTP. Da kein spezifischer pharmakologischer Inhibitor der neuronalen wie endothelialen NO-Synthase existiert, wurden für die Beantwortung unserer Fragestellung Tiere verwendet, dessen nNOS bzw. eNOS codierende DNS-Abschnitte durch gezielte Genmodifikation, sog. Gene-Targeting, deaktiviert wurden. Weiterhin soll an dieser Stelle erstmalig unter dem Aspekt der Geschlechtsspezifität untersucht werden. Hinweise für einen möglichen Geschlechtsdimorphismus in diesem Feld wurden ausführlich im vorangegangenen Kapitel behandelt. Allerdings muss an dieser Stelle durchaus rekapituliert werden, dass die LTP im Hippocampus und im lateralen Kern der Amygdala strukturell geschlechtsdimorphe Facetten aufzeigt (Mizuno & Giese, 2010; Schubert *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2004), die sich gleichermaßen auf Prozesse der Furchtkonditionierung projizieren (Maren *et al.*, 1994) und sogar auf das zerebrale RAS/NO-System anwendbar sind (Dachtler *et al.*, 2012; Yanes *et al.*, 2006).

Um die beschriebenen Kriterien zu realisieren, erfolgen alle in dieser Arbeit durchgeführten Messungen getrennt an weiblichen Wildtyp und weiblichen nNOS- und eNOS gen-defizienten Mäusen (nNOS- bzw. eNOS-Knockoutmäuse) sowie an männlichen Wildtyp und männlichen nNOS- und eNOS-Knockoutmäusen, so dass unser Versuchsprotokoll den zuvor für notwendig erklärten Einschluss weiblicher Tiergruppen, als Kriterium zeitgemäßer Forschung erfüllt. An diesen Gruppen soll entsprechend die Induktion einer LA-LTP, die Kurzzeitplastizität (Paired-Pulse) und die synaptische Transmission (Erregbarkeit) in horizontalen Schnittpräparaten mittels Reizung der externen Kapsel (EC) untersucht und verglichen werden.

In diesem Sinne soll durch die Erstellung von geschlechtsspezifischen Input/Output-Kurven bei homozygoten nNOS- bzw. eNOS-Knockout- und Wildtyp-Mäusen der Einfluss der jeweiligen NO-Synthase auf die synaptische Transmission im lateralen Kern der Amygdala analysiert werden.

Im Weiteren soll durch Anwendung der Doppelpulsreizung (Paired-Pulse, PP) die synaptische Kurzzeitplastizität und somit gleichermaßen die prä- oder postsynaptische Lokalisation genauer spezifiziert werden. Ausgehend von der präsentierten Literatur wird postuliert, dass in NOS-

Knockouttieren die Glutamatfreisetzung reduziert ist.

Unsere Zielvorstellungen werden durch Untersuchungen des Einflusses der jeweiligen NO-Synthase auf die LA-LTP fortgeführt. Dazu reizen wir beide unbehandelten Knockoutgruppen des jeweiligen Geschlechts mit einem Hochfrequenzstimulus und beobachten, ob sich die LA-LTP verändert. Im nächsten Schritte soll nochmals der Stellenwert von Stickstoffmonoxid für Prozesse neuronaler Plastizität in der lateralen Amygdala unterstrichen werden. Dafür werden LTP-Messungen unter pharmakologischer Deaktivierung sowohl der neuronalen wie auch der endothelialen NO-Synthase durchgeführt (unspezifische Enzyminhibition durch die Substanz L-NAME). In diesem Zusammenhang soll gleichzeitig die LTP-Induktion mittels Thetaburststimulation untersucht werden, um eine potenzielle Abhängigkeit vom Reizparadigma erfassen zu können. Auch hier, ausgehend von der Literatur, erwarte ich eine reduzierte LA-LTP in den NOS-Knockouttieren.

Im weiteren Verlauf sollen molekulare Korrelate der Ang-(1-7)-vermittelten veränderten synaptischen Plastizität herausgearbeitet werden. So konnte in der Amygdala gezeigt werden, dass hierfür die Beteiligung von NO obligat ist (Albrecht, 2007). Aus diesem Grund wollten wir den Beitrag der endothelialen bzw. neuronalen NO-Synthase zur Ang-(1-7)-vermittelten LTP-Erhöhung messen und in diesem Rahmen parallel die Existenz einer Isoform, als prädominante Zielstruktur der Ang-(1-7)-Kaskade prüfen. Um mögliche NO-unabhängige Kompensationsmechanismen bzw. eine Beteiligung der iNOS auszuschließen untersuchten wir die Ang-(1-7)-Wirkung auf die LA-LTP zusätzlich unter Maßgabe der enzymatischen Hemmung der NO-Synthasen durch L-NAME.

Unseres Wissens existiert kein Diskurs über die geschlechtsspezifischen Unterschiede in dem genannten Forschungsfeld.

2 Methoden

2.1 Versuchstiere

Pro Fragestellung wurden 4-5 Versuchstiere verwendet. Die Tiere vom Stamm C57BL/6J wurden für Experimente mit L-NAME genutzt. Die nNOS-Knockout-Mäuse (nNOS^{-/-}-Mäuse) des Phylums B6,129S-Nos1^{tm1Plh}, die eNOS-Knockout-Mäuse (eNOS^{-/-}-Mäuse) des Phylums CByl.129P2(B6)-Nos3^{tm1Unc}/J sowie die Wildtyp-Mäuse (Wt-Mäuse) des Phylums C57BL/6J entstammen dem Jackson Laboratory (Bar Harbor, Me., USA), zur Verfügung gestellt von Prof. Patzak (Institut für Vegetative Physiologie). Aus der Kreuzung der heterozygoten Mäuse (+/-) gingen die nNOS^{-/-} hervor. Der Wildtyp dieser Zucht diente als Kontrolle. Zum Zeitpunkt der elektrophysiologischen Messungen waren Wildtyp und NOS^{-/-} zwischen 8 und 9 Monate alt. Der Züchtungsfortschritt wurde fortlaufend mittels PCR zur Bestimmung des genetischen Status der Tiere sichergestellt. Hierzu wurden die Caudaspitzen der Mäuse gemäß des Jackson Laboratory Protokolls genetisch analysiert.

Wasser und Futter erhielten die Tiere ad libitum. Sie wurden standardisiert bei einer Raumtemperatur von ca. 22 ° Celsius (°C), einer Luftfeuchte von ca. 80% und einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Der Serum Estrogen-Spiegel wurde nicht erfasst.

2.2 Narkose und Präparation

Die Tiere erhielten in einem auf Zellstoff gebettetem Glaszylinder eine Äther-Narkose, wurden dekapitiert und ihr Gehirn mit geringstmöglichem Zeitaufwand akribisch freipräpariert. Sämtliche Präparierschritte geschahen dementsprechend zügig, um Hypoxie bedingte zelluläre Schäden zu minimieren, und gleichzeitig unter höchster Vorsicht, d. h. strukturerhaltend, um Gewebetraumatisierungen so gering wie möglich zu halten. Das gewonnene Präparat wurde für wenige Minuten (min) in eine auf 4 °C temperierte, carbongesättigte artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit [artificial cerebrospinal fluid (ACSF); künstlicher Liquor; pH: 7,4; 95% O₂, 5% CO₂] überführt. Die ACSF Nährlösung enthielt: 124 mM NaCl; 3 mM KCl; 1,6 mM CaCl₂; 1,8 mM MgSO₄; 1,25 mM NaH₂PO₄; 10 mM Glukose und 26 mM NaHCO₃. Die Verabreichung jeglicher Pharmaka erfolgte in Lösung mit ACSF.

Platziert auf einer gekühlten Petrischale erfolgte die Hemisektion des Zerebrums in der Medianlinie mit einer Rasierklinge. Die Hemisphären wurden im Anschluss mittels Zyanoacrylat-Kleber (Patex®) auf der Halterung des Schnittinstrumentes (Motorized Advanced Vibroslice, World Precision Instruments) fixiert und die Schnittkammer mit gekühlter, sauerstoffgesättigter ACSF-Lösung gefüllt. Bei der umgehenden Anfertigung 400 µm dicker, horizontaler Hirnschnitte wurden die ersten 2 zur Wahrung der korrekten sich im Schnitt befindlichen anatomischen Strukturen (LA, EC) verworfen (von Bohlen und & Albrecht, 1998a). Jeder Slice wurde zügig in die mit dreilagigem Linsenpapier vorpräparierte Messkammer überführt und bei einer Flussrate von 1,5 ml/min mit sauerstoffgesättigter, 35 °C warmer ACSF perfundiert (Heizgerät:Eigenbau; Schlauchpumpe: Gilson® Minipuls, F). Bis zum Beginn der extrazellulären Ableitung wurde eine mindestens zweistündige Ruheperiode eingehalten, um einen möglichen Überhang des Hypnotikums zu vermeiden und gleichermaßen durch das Präparieren entstanden Stressreaktionen des Parenchyms abzumildern.

Alle Experimente erfolgten gemäß den Bestimmungen des European Communities Council Directive vom 24. November 1986 (86/609/EEC) sowie der Richtlinien zur Umsetzung des Tierschutzes an der Charité – Universitätsmedizin Berlin (Stand: Mai 2014) und nach Genehmigung durch die Berliner Tierversuchskommission [Geschäftsführung: Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (LAGeSo)] (T0344/05). Wir waren stets bemüht, das Leiden der Tiere und die Anzahl der Tiere auf ein Minimum zu beschränken. Weiterhin wurden in der gesamten Entstehungszeit dieser Arbeit die „Grundsätze der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ eingehalten.

2.3 Versuchsaufbau

Die Datenerhebung fand an zwei identischen Messplätzen statt, um synchron zu experimentieren, zeitökonomisch zu arbeiten und vor allem die Zahl der Versuchstiere zu minimieren. Die Arbeitsplätze waren geerdet und schwingungsarm an den Tischen gelagert.

2.3.1 Messkammer

Ein Messplatz umfasste einen Plexiglaskörper, der aus zwei Messkammern aufgebaut war, in denen die Schnitte wie beschrieben platziert wurden. Die Kammern wurden von Plastikdeckeln abgedeckt, die mit einer rechteckigen Öffnung zum Einführen der Reiz- und Ableitelektroden ausgestattet waren. Zwei weitere Öffnungen lagen beidseits der Kammern als Verbindung zum

Hohlraum des Plexiglaskörpers, der mit ca. 500 ml aq. dest. gefüllt war. Dieser beinhaltete ein Heizelement, das über die Verbindung mit einem elektrischen Thermofühler die Wassertemperatur konstant auf 35 °C hielt.

Durch die Basisperfusion und -begasung der Messkammern (wurde in Kapitel 2.2 beschrieben) wurde eine gas- und wasserdampfgesättigte Atmosphäre geschaffen, die über die beiden Öffnungen die Hirnschnitte umgab. Durch Alternieren der Position eines Strumpfbandes wurde bedarfsweise eine manuelle Feinjustierung der Flussrate erreicht.

Zur Fertigung der Reizelektroden wurde eine doppelumige Glaskapillare (Thetaglas) verwendet, in dessen Lumina je ein ca. 6 cm langer Silberdraht positioniert wurde. Apikal war dieser mit einem 0,5 cm langen Platindraht (Durchmesser 50 µm) verlötet, der aus der Spitze hervortrat. Die Anordnung der beiden Platindrähte erforderte dessen parallele Fixierung mittels erhitzten Schellacks in einem Abstand von etwa 500 µm, um Kurzschlüsse zu verhüten. Die Gegenseite der Kapillare wurde entsprechend mit Dentalwachs elektrisch isoliert.

Die Ableitelektroden wurden aus Borosilikatglaskapillaren (Borosilicate Glass Capillaries, World Precision Instrument, Inc., USA) mit Hilfe eines Ziehgerätes (Flamming/Brown Micropipette Puller Model P-87, Sutter Instruments Co., USA) durch Erhitzen eines Platinbleches gefertigt. Der hochohmige Widerstand von 10 – 15 MΩ der so produzierten Ableitelektroden bedurfte einer Reduktion auf etwa 3 MΩ. Dies geschah durch kontrolliertes Abbrechen unter Sicht am Mikroskop. Abschließend erfolgte die Befüllung mit ACSF und zur elektrischen Kopplung an den Verstärker wurde in das Lumen der Elektroden ein chlorierter Silberdraht eingeführt.

2.3.2 Messplatz

Die Elektroden wurden unter Sicht (durch eine 40fach vergrößernde Stereolupe) mit Magnet-Manipulatoren entsprechend positioniert. Diese Versuchsanordnung ermöglichte ein konstantes, mikrometeregenaues und somit Gewebe-protektives Positionieren von Ableit- und Reizelektrode.

Die so abgeleiteten Signale wurden über einen Vor- (10fach) und einen Nachverstärker (100fach) verstärkt und über einen Analog-Digital-Wandler (Micro-CED, Science Park, Cambridge, GB) zu einem Windows-XP®-fähigen Computer transferiert. Dort erfolgte die Datenaufzeichnung durch das Programm Signal® Version 3.01 der Firma Cambridge Electronic Design.

Die Reizsignale mit Strömen von 50 bis 800 μA generierte ein Isostimulator; getriggert vom Micro-CED.

2.3.3 Elektrodenpositionierung

Für diese Arbeit wurde die Ableitelektrode stets innerhalb des lateralen Kerns der Amygdala und die Reizelektrode in der externen Kapsel positioniert (Abb. 2.1).

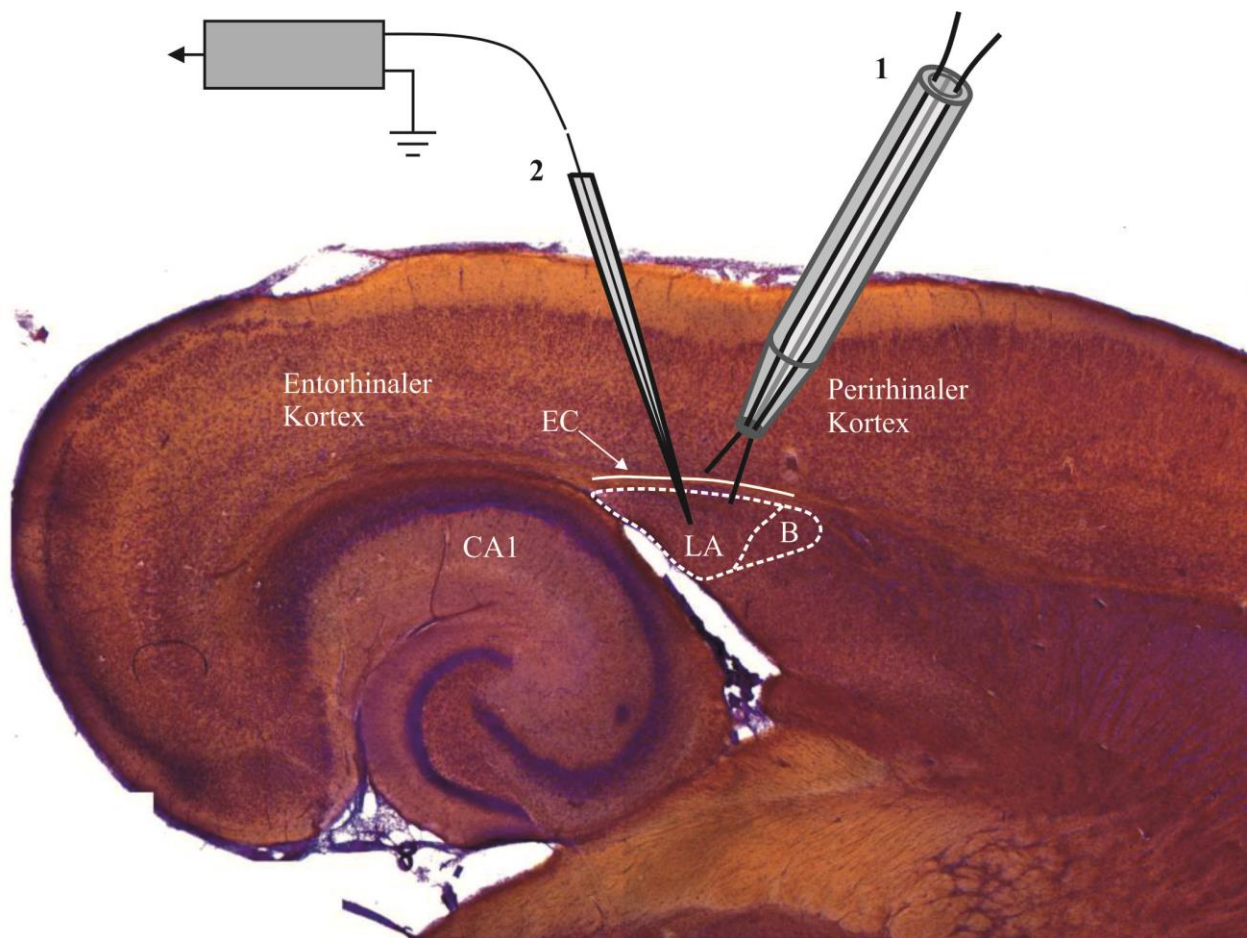


Abb. 2.1 Horizontalschnitt mit Darstellung der Reiz- und Ableitorte
Dargestellt wird die Reizelektrode (1) in der externen Kapsel (EC) und die Ableitelektrode im lateralen Kern der Amygdala (LA) sowie wichtige umgebene Strukturen [Hippocampus (CA1), basaler Kern der Amygdala (B), entorhinaler und perirhinaler Kortex (© Oliver von Bohlen und Halbach (modifiziert))].

2.4 Reizparadigmen

Alle 10 Sekunden (s) löste das Micro-CED einen Einzelstimulus von 0,1 Millisekunden (ms) aus. Je 6 Reizantworten wurden off-line gemittelt. Die Paradigmen für die Induktion der LA-LTP wurden standardisiert programmiert und über das Micro-CED realisiert.

2.4.1 Input/Output-Kurve

Für die Beurteilung der basalen synaptischen Exzitabilität war Ausgangspunkt jeder Messung die Erstellung einer Input/Output-Kurve (I/O-Kurve). Wir begannen mit der Aufsuchung eines Feldpotenzials (FP), das sich durch die Signal-Software am Bildschirm grafisch abbildete und sich bei korrekter Reizelektrodenlage durch Amplituden zwischen 1-2 mV auszeichnete. Im nächsten Schritt wurde ein definierter Reiz (Input) zwischen 1-9 V alle 10 s appliziert, so dass die Spannung der registrierten 6 Feldpotenzialamplituden (Output) über 1 min gemittelt werden konnte. Im Folgenden wurde die Spannung schrittweise (0,5 V) erhöht bis zum Erreichen der maximalen Feldpotenzialamplitude, d.h. ein weiteres Intensivieren der Reizstärke führte zu keinem Amplitudenzuwachs des Potenzials.

Für alle elektrophysiologischen Untersuchungen zur Induktion einer LTP entsprach die verwendete Reizintensität, der Reizintensität die zur Generierung von 50% der vorhergehend ermittelten maximalen Feldpotenzialamplitude notwendig war. Auf diese Weise konnten wir mit erhöhter Wahrscheinlichkeit eine ausreichende Depolarisation an der synaptischen Membran sicherstellen, um Mg^{2+} -Ionen aus NMDA-Rezeptoren zu lösen und so eine LTP induzieren zu können. Andererseits ermöglichte die Stimulation bei 50% der maximalen Amplitude ein statistisch standardisiertes Vorgehen im Angesicht der nichtlaminar geschichteten Zellanordnung im lateralen Kern der Amygdala. So zeichnet sich die amygdaläre Zytoarchitektur weder durch eine geordnete Schichtung, noch durch eine einheitlich gerichtete räumliche Zellorientierung z. B. ihrer Efferenzen aus. Diese Unterschiede zur kortikalen und hippocampalen Anordnung bedingen ein entsprechend differierendes funktionelles Gefüge in der Amygdala, das nicht maßgeblich von der Zytoarchitektur beeinflusst wird. Demzufolge werden ein- und ausgehende sensorischen Informationen eher über variable synaptische Membranströme und –leitfähigkeiten reguliert, als über zytoarchitektonische bzw. zellmorphologische Unterschiede (Faber *et al.*, 2001). Der mögliche Einfluss auf die Registrierung von Feldpotenzialen und die elektrophysiologisch Auswertung wird im Kapitel Datenauswertung diskutiert.

2.4.2 Basale Aktivität

Die Erfassung der basalen Aktivität (Baseline) ermöglichte die Begutachtung der Stabilität des Feldpotenzials sowie ein konstantes Monitoring der Amplitudenveränderung, auch unter pharmakologischem Einfluss. Alle 10 s wurde mit 50% der maximalen Amplitude gereizt und je 6 Stimulusantworten auf eine Minute gemittelt. Bei Kontrollmessungen wurden mindestens 15 min (90 Einzelreize), bei Messungen mit appliziertem Pharmakon mindestens 30 min (180 Einzelreize) aufgenommen.

2.4.3 HFS

Zur Etablierung einer LTP wurde ein starker Hochfrequenzstimulus (HFS) gesetzt, d. h. eine Impulsserie von 100 Stimuli im Abstand von 10 ms, die nach einem 30 s Intervall wiederholt wurde (2x100 Hz). Eine Zunahme der Feldpotenzialamplitude um mindestens 20% des Baseline-Wertes über einen Zeitraum von 20 min wurde als LTP identifiziert bzw. gewertet (Watanabe *et al.*, 1995). Die LTP wurde insgesamt für mindestens 60 min aufgezeichnet und die Differenz zur Baseline evaluiert.

2.4.4 TBS

Abgesehen von der klassischen HFS, dessen Intensität für die gleichsame Aktivierung der prä- und postsynaptischen Zelle ausreicht, existieren weitere Induktionsparadigmen zur Etablierung einer LTP. Die schwächere Thetaburststimulation (TBS) repräsentiert ein typisches hippocampales Induktionsprotokoll, welches eine LA-LTP auslöst, obwohl der tetanische Stimulus nicht immer für die Aktivierung der Prä- und Postsynapse ausreicht. Die LTP-Induktion fällt allerdings im Vergleich zur HFS-getriggerten LTP im LA geringer aus (Pollandt *et al.*, 2003). Im Vergleich zur HFS zeigte eine Applikation eines TBS von Schaffer-kollateralen in der CA1-Region des Hippocampus eine bessere Korrelation der elektrophysiologischen Daten mit Verhaltensbefunden.

Als TBS werden zwei Impulsserien im Abstand von 30 s ausgelöst, wobei konträr zum HFS pro Reizfolge 5 Bursts à 4 singulärer Stimuli mit einem Interburstintervall von 200 ms und einem Stimulusintervall von 10 ms verabreicht wurden. Die Feldpotenzialamplituden nach TBS wurden insgesamt für mindestens 60 min aufgezeichnet und die Differenz zur Baseline evaluiert.

2.4.5 Paired-Pulse

Die Paired-Pulse-Reizung (PP, Doppelpulsreizung) erfolgt durch die Applikation einer Serie von zwei gekoppelten Stimuli mit variablem Interstimulusintervall, das nach 6 Doppelreizungen um je 10 ms verlängert wird (10, 20, ..., 100 ms). Außerdem wurden die Reizantworten bei Interstimulusintervallen von 200 und 500 ms registriert. Weitergehend wurden die beiden Stimulusantworten pro Doppelpuls getrennt ausgewertet, d. h. zur Amplitudenermittlung wurden je sechs Doppelpulse von gleicher Intervalllänge gemittelt. Die weitere Analyse erforderte nun für jedes Reizintervall die gemittelte Potenzialamplitude des zweiten durch die des ersten zu dividieren (Berechnung der Ratio vom zweiten und ersten Amplitudenwert). Resultate größer 1 entsprechen einer Paired-Pulse-Fazilitierung (PPF), Werte kleiner 1 einer Paired-Pulse-Depression (PPD).

2.4.6 Kontrollmessungen

Ohne pharmakologische Intervention wurde nach folgendem Schema gemessen: Es wurde initial eine Input/Output-Kurve erhoben, das PP-Paradigma absolviert, eine 20 minütige Baseline registriert, daraufhin der HFS appliziert und weitere 60 Minuten aufgezeichnet.

2.4.7 Messungen unter Pharmakon-Applikation

Mit pharmakologischer Intervention wurde gleichermaßen eine Input/Output-Kurve erstellt, die PP-Stimulation aufgezeichnet und anschließend während 30 minütiger Messung das Pharmakon eingewaschen. Im nächsten Schritt wiederholten sich die Erfassung einer Input/Output-Kurve, die PP-Stimulierung, die Baseline-Registrierung und das Setzen des HFS mit folgender 60 minütiger Aufzeichnung.

2.5 Substanzen und Pharmakologie

Im nachfolgenden Kapitel erfolgt die Aufarbeitung der pharmakologischen Substanzen, die zur experimentellen Durchführung der jeweiligen Versuchsreihe bzw. Fragestellung notwendig waren, um den Einfluss auf die Feldpotenziale beziehungsweise EPSPs zu analysieren.

Die mit Lösungsmittel versetzten Pharmaka wurden tiefgekühlt bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 1 ml

Eppendorfgeläßen gelagert und erst bei ihrer Verwendung aufgetaut. Anschließend wurden 100 ml ACSF dazupipettiert, wodurch die definitive Substanzkonzentration hergestellt wurde. Die Pumpgeschwindigkeit wurde auf 1,5 ml/min reguliert, so dass die für die jeweilige Fragestellung genutzte Substanz die beiden Perfusionskammern in durchschnittlich 10 min erreichte.

2.5.1 Carbogengas

Das aus 95% O₂ und 5% CO₂ bestehende Carbogengasgemisch sättigte das Wasserbad unter den Messplätzen auf und der pH-Wert konnte hierdurch konstant bei 7,4 gehalten werden.

2.5.2 L-NAME

L-NAME ist ein unspezifischer NOS Inhibitor vom Hersteller Tocris Bioscience, Bristol, UK. Die Substanz wurde via Badapplikation in einer Konzentration von 200 µM verwendet.

2.5.3 Ang-(1-7)

Ang-(1-7) stammte von der Firma Bachem, Weil am Rhein, Germany. Das Pharmakon wurde via Badapplikation in einer Konzentration von 0,05 µM verwendet. Höhere Konzentrationen führen zu einer agonistischen Aktivierung des AT₁-Rezeptors (Hellner *et al.*, 2005).

2.6 Datenauswertung

Die Auswertung der extrazellulär erfassten Daten fand direkt nach Beendigung der jeweiligen Messung statt (offline). Zur notwendigen Reduktion der Amplitudenvariabilität wurde der errechnete Mittelwert aus je sechs Feldpotenzialen für die weitergehende Datenanalyse benutzt. Die auf diese Art entstandenen Feldpotenziale waren durch zwei Maximalstellen und durch eine Minimalstelle gekennzeichnet, die für die weitergehende Berechnung der Potenzialamplitude entscheidend waren. Dafür wurden die beiden Maximalstellen tangential verbunden und gleichzeitig eine Senkrechte durch die Minimalstelle gelegt. Die Koordinatendifferenz des so entstandenen Schnittpunktes beider Linien und der Minimalstelle wurde von uns als größter Amplitudenausschlag gewertet und entsprechend berechnet (Abb. 2.2).

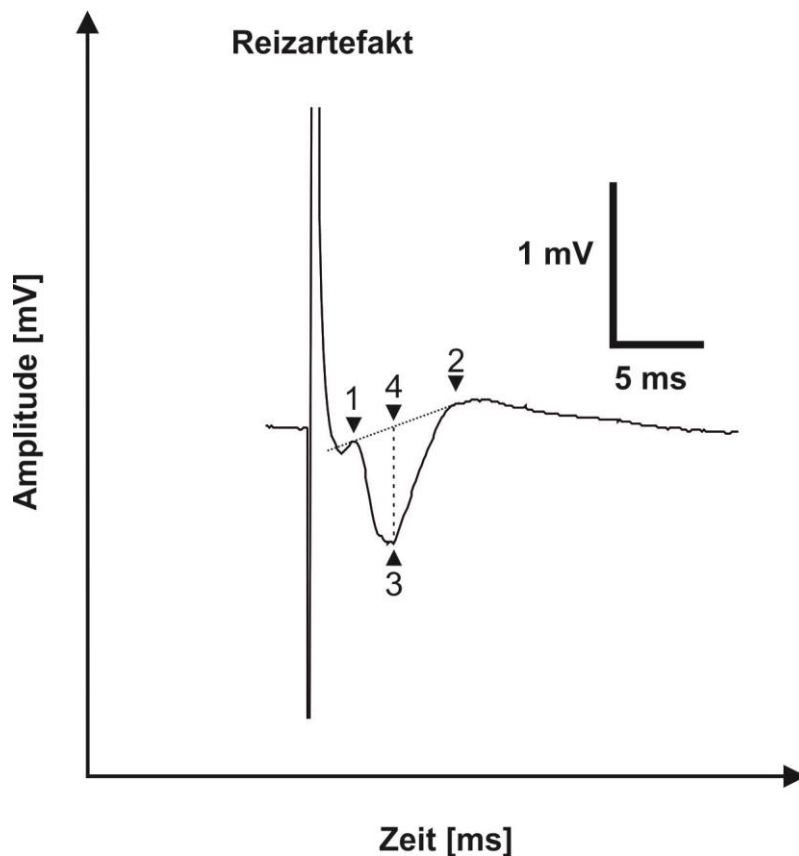


Abb. 2.2 Darstellung eines Feldpotenzials
 Die Maximalstellen 1 und 2 werden durch eine Tangente verbunden. Die Senkrechte durch die Minimalstelle 3 schneidet im Schnittpunkt 4 die Tangente. Zur Berechnung der Amplitudengröße wird die Differenz zwischen 4 und 3 gebildet.

Die Umsetzung der beschriebenen Auswertung erfolgte über das Programm Signal® 3.1 (Cambridge Electronic Design Ltd, UK), welches einerseits eine computerisierte respektive in Echtzeit am Kontrollbildschirm visualisierte Darstellung der Versuchsdaten ermöglichte und uns andererseits erlaubte, den tangentialen Amplitudenausschlag (mV) mit Hilfe zweier integrierter Skriptfiles von Herrn Dr. Siegmund offline zu berechnen (unter Sichtkontrolle, mit Hilfe des aus einer Minute errechneten Mittelwertes der Feldpotenziale). Neben dieser Berechnung der Potenzialamplituden existiert noch die sogenannte Slope-Auswertung als eine weitere Auswertungsvariante. Hierbei wird der Grad (Anstieg) der ersten negativen Auslenkung des Feldpotenzials als Messgröße bestimmt. Unser Vergleich beider Verfahren erbrachte zwar übereinstimmende Werte, es zeigte sich jedoch bei der Slope-Auswertung, dass die Feldpotenziale deutlich anfälliger gegenüber Rauschphänomenen in der Signalverarbeitung waren und somit die Slope-Werte extremen Schwankungen unterlagen (Doyere *et al.*, 2003). Die Problematik dieser stärkeren Streuung in der Slope-Auswertung ist beinahe charakteristisch für extrazelluläre Ableitungen in der Amygdala, so dass der Großteil der Studien die

Amplitudenauswertung bevorzugt (Doyere *et al.*, 2003). Erklären lässt sich diese Diskrepanz dadurch, dass sich je nach Position der Reizelektrode und bedingt durch die nichtlamellierte Zytoarchitektur der Amygdala neben fEPSPs (Feldpotential, field excitatory postsynaptic potential) alternativ Population-Spikes nachweisen lassen, die sich allerdings im Gegensatz zur CA1-Region in ihren Amplituden von den Amplituden der fEPSPs nicht maßgeblich unterscheiden.

Die unregelmäßige Schichtung der Amygdala bedingt ebenfalls Diskussionen über den Ursprung der abgeleiteten Summenpotenziale: Werden diese in amygdalären Nervenzellen generiert oder stammen sie aus umliegenden Strukturen wie beispielsweise dem perirhinalen Kortex?

Elektrische Hirnströme, die durch den Ionentransport entlang der Neuriten generiert werden, erzeugen elektromagnetische Felder, die sich im Raum ausbreiten und in unserem Fall auf der horizontalen Schnittoberfläche abgeleitet werden. Zur Interpretation dieser Ausbreitung werden physikalische Volumenleitermodelle verwendet, die von der elektrischen Leitfähigkeit des durchströmten Mediums abhängen (Hallez *et al.*, 2007). Dabei ist der spezifische Widerstand (Kehrwert der elektrischen Leitfähigkeit), der auf geladene Teilchen einwirkt, während sie das neuronale Parenchym passieren, abhängig von der Richtung des Teilchenstroms (Jackson, 1998). Eine isotrope Leitfähigkeit lässt sich so erklären, dass die Richtung der Stromleitung im Medium mit der Ausrichtung des den Strom erzeugenden elektrischen Feldes übereinstimmt; also entsprechend in allen Richtungen identisch ist, was u. a. für die zerebrospinale Flüssigkeit zutrifft (Gutierrez *et al.*, 2004). In Geweben, die wie der Hippocampus eine geschichtete Struktur aufweisen, wird folglich über die einzelnen Schichten gemittelt. Wenn also die parenchymatöse Mikrostruktur (Zellanordnung) eine Orientierung aufweist, kann eine anisotrope elektrische Leitfähigkeit beobachtet werden (Tuch *et al.*, 2001). Demzufolge kann der ungeordneten strukturellen Organisation der Amygdala diese Form der Leitfähigkeit nicht zugesprochen werden (Logothetis & Wandell, 2004; Johnson *et al.*, 2008a), so dass die Feldpotenzialantwort hier vermutlich weniger durch die Dendritenanordnung als durch lokale synaptische Aktivität beeinflusst wird (Johnson *et al.*, 2008a). Ein Feldpotenzial repräsentiert die Summe der transmembranösen Ströme in unmittelbarer Nähe zur Ableitelektrode und spiegelt somit die synaptischen Potenziale als gemittelte Aktivität eines mikroskopischen Areal wider (Pesaran, 2009). Neue Untersuchungen zeigten, dass die Ableitung der Feldpotenzialaktivität ein sehr exaktes Verfahren repräsentiert, dem mitunter der Status einer gleichwertigen bis genaueren Methode als die Ableitungen an einzelnen Neuronen zugeschrieben wird (Pesaran *et al.*, 2002; Logothetis & Wandell, 2004), obwohl paradoxerweise gemittelte Aktivitäten betrachtet werden. So bilden Feldpotenziale Prozesse lokaler neuronaler Netzwerke detaillierter ab, als

zuvor angenommen wurde (Katzner *et al.*, 2009). Man kann demgemäß behaupten, dass an dem Ort der Elektrodenplatzierung auch tatsächlich das registrierte Feldpotenzial entsteht.

Demzufolge verwenden wir in dieser Arbeit die Amplitudenberechnung für die Interpretation der Input/Output-Kurven, der Paired-Pulse-Fazilitierung und der LTP-Induktionsparadigmen (mit bzw. ohne pharmakologische Intervention).

So wurden für die Input/Output-Kurven und die Paired-Pulse-Fazilitierung absolute Amplitudenwerte berechnet. Für die Paired-Pulse-Fazilitierung wurde der Amplitudenwert des Feldpotenzials auf den zweiten Puls durch den Amplitudenwert in Reaktion auf den ersten Puls geteilt und grafisch umgesetzt. Nach Ermittlung der Amplitudengrößen für die LTP-Messungen wurden diese so erarbeiteten Primärdaten mit Hilfe der Tabellenkalkulationssoftware Microsoft® Excel weiter in Sekundärdaten überführt, indem der Prozentpunkt anhand der Amplitudenveränderung der Feldpotenziale nach HFS-Gabe im Verhältnis zur Baseline berechnet wurde (100% entsprach dem Mittelwert der in den letzten 12 Minuten registrierten Einzelwerte der Baseline).

2.7 Statistik

Die Sekundärdaten flossen im Programm GraphPad Prism 5® zusammen, wurden hier der statistischen Analyse unterzogen sowie grafisch umgesetzt.

Zur statistischen Kalkulation diente die prozentuale Beziehung zwischen dem Average der letzten 12 Aufnahmeminuten der Baseline und den nach HFS registrierten Werten. Um die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Kurven herzustellen, wurde das arithmetische Mittel der 57. bis 60. Minute post HFS bestimmt. Diese letzten 4 min dienten demzufolge zur Ermittlung des Signifikanzniveaus. Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs kann eine Normalverteilung nicht vorausgesetzt werden, sodass verteilungsfreie oder nicht-parametrische Tests, die keine bestimmte Verteilungsform voraussetzten, für die statistische Auswertung verwendet wurden. Die Entitäten des HFS der Kontrollmessungen gegenüber denen mit pharmakologischer Intervention wurden als unverbundene Stichproben eingestuft, da die Resultate aus unterschiedlichen Slices stammten. Verwendet wurde hierfür der *U*-Test von Mann und Whitney. Der in Biowissenschaften gemeinhin gebräuchlich Schwellenwert von 5% ($p < 0,05$) wurde in dieser Arbeit als Signifikanzniveau festgelegt. Alle Daten sind durch Mittelwert \pm Standardfehler mit Nennung der Stichprobenzahl (*n*) angeführt. Dabei bezieht sich die Stichprobenzahlangabe (*n*) auf die verwendete Zahl von Hirnschnitten und nicht auf die Anzahl der untersuchten Versuchstiere.

3 Ergebnisse

3.1 Input/Output-Kurven

Zu Beginn wurde der Einfluss der jeweiligen NO-Synthase auf die basale synaptische Transmission in der lateralen Amygdala geschlechtsspezifisch untersucht. Dafür werden die Input/Output-Kurven, die während der Experimente aufgezeichnet wurden, zur Darstellung gebracht und einer statistischen Analyse unterzogen.

3.1.1 Vergleich der Input/Output-Kurven homozygoter $nNOS^{-/-}$ und $eNOS^{-/-}$ -Mäuse mit dem Wildtyp

Es wurden die Input/Output-Kurven von unbehandelten männlichen (m) $nNOS$ -Knockout-Mäusen [$nNOS^{-/-}$, (n = 17)], $eNOS$ -Knockout-Mäusen [$eNOS^{-/-}$, (n = 18)] und Wildtyp-Mäusen [Wt, (n = 20)] (Abb. 3.1 A) und die Input/Output-Kurven von unbehandelten weiblichen (f) $nNOS$ -Knockout-Mäusen [$nNOS^{-/-}$, (n = 14)], $eNOS$ -Knockout-Mäusen [$eNOS^{-/-}$, (n = 14)] und Wildtyp-Mäusen [Wt, (n = 16)] (Abb. 3.1 B) analysiert. Dabei wurden die Tiergruppen untereinander sowie weibliche mit männlichen Tieren verglichen. Innerhalb der männlichen als auch der weiblichen Versuchstierreihe ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen ($p > 0,05$). Die Synopsis der Geschlechter ergab ebenfalls keine statistisch signifikante Verschiebung der I/O-Kurven ($p > 0,05$). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test, da es sich um eine unabhängige Stichprobe handelte.

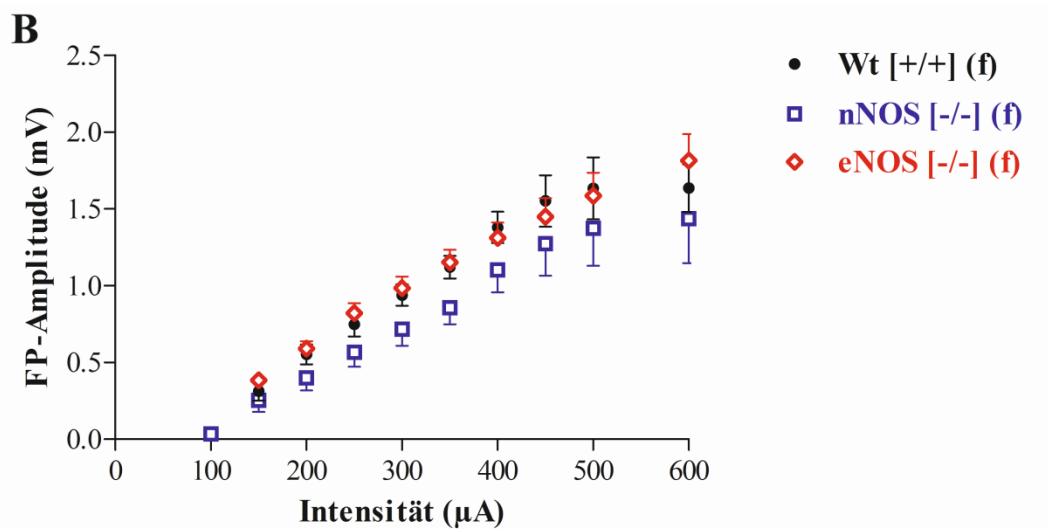
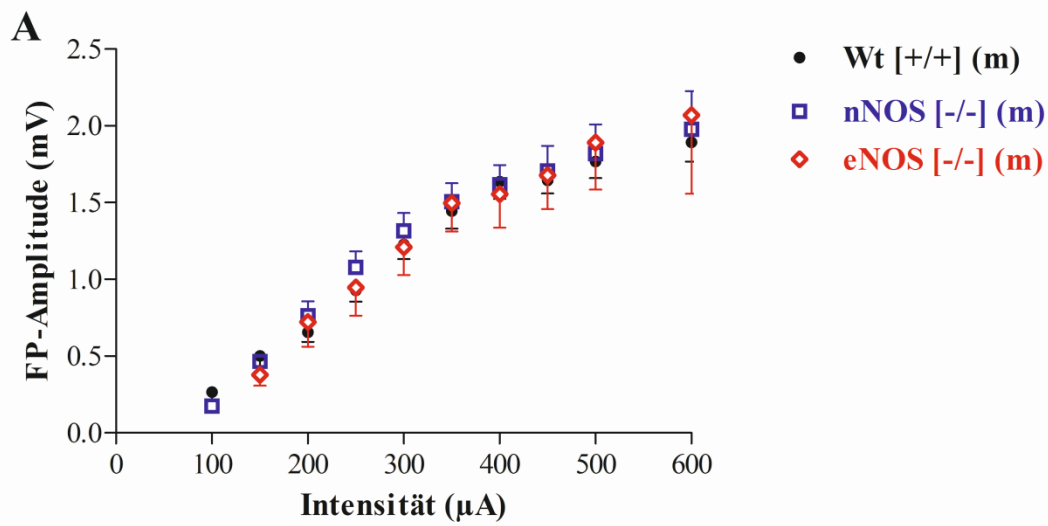


Abb. 3.1 **A:** Vergleich der Input/Output-Kurven männlicher (m) nNOS-Knockout-Mäuse [nNOS^{-/-}, (n = 17)], eNOS-Knockout-Mäuse [eNOS^{-/-}, (n = 18)] und Wildtyp-Mäuse [Wt, (n = 20)].
B: Vergleich der Input/Output-Kurven weiblicher (f) nNOS-Knockout-Mäuse [nNOS^{-/-}, (n = 14)], eNOS-Knockout-Mäuse [eNOS^{-/-}, (n = 14)] und Wildtyp-Mäuse [Wt, (n = 16)].

3.2 Langzeitpotenzierung

Im Folgenden werden die experimentell erhobenen Ergebnisse der Langzeitpotenzierung zur Analyse der Plastizität im lateralen Kern der Amygdala präsentiert.

3.2.1 LTP bei NOS gendefizienten Mäusen

Die Kontrollmessungen von beiden Geschlechtern des Wildtyps ließen 60 Minuten nach hochfrequenter Stimulation der externen Kapsel eine stabile LTP mit reproduzierbarer Zunahme der Feldpotenzialamplitude um ca. 50% erkennen (m: $150,6 \pm 11,4\%$, n = 9; f: $154,4 \pm 3,5\%$, n = 10). Das Ausmaß der LTP-Erhöhung wies keine signifikante Geschlechtsspezifität auf ($p > 0,05$).

Es folgte die LTP-Messung an nNOS- bzw. eNOS-Knockouttieren. In nNOS-Knockout-Mäusen zeigten sich nach HFS-Applikation keine differierenden Potenzialamplitudengrößen zwischen den Geschlechtern. Wir konnten allerdings eine signifikante Intensitätsminderung der LA-LTP (m: $131,2 \pm 5,9\%$, n = 7; f: $133,7 \pm 6,2\%$, n = 9; $p < 0,05$; Abb.3.2 A) im Vergleich zum Wildtyp feststellen. Entsprechend bewirkte die Ausschaltung der neuronalen NO-Synthase eine geschlechtsunabhängig verminderte LTP im lateralen Kern der Amygdala. Entsprechend führte das Fehlen der endothelialen NO-Synthase zu vergleichbaren Veränderung der Langzeitpotenzierung in der lateralen Amygdala: Die Feldpotenzialamplitude bei eNOS-Knockout-Mäusen war 60 Minuten nach HFS signifikant kleiner als bei Kontrollmessungen des Wildtyps (m: $121,4 \pm 6,3\%$, n = 8; f: $129,8 \pm 6,5\%$, n = 7; $p < 0,05$; Abb.3.2 B). Auch hier lässt sich feststellen, dass die eNOS für beide Geschlechter einen wesentlicher Faktor für die Etablierung einer LA-LTP darstellt, da dessen genetische Deletion zu einer abgeschwächten LTP im lateralen Kern der Amygdala führte. Wie für die nNOS-Knockoutgruppe beschrieben, konnten bei den eNOS-Knockouttieren ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Feldpotenzialamplitude der LA-LTP zwischen den Geschlechtern aufgezeigt werden.

Es lässt sich rekapitulieren, dass die Langzeitpotenzierung in horizontalen Hirnschnitten des lateralen Kerns der Amygdala bei nNOS- bzw. eNOS-Knockout-Mäusen supprimiert wurde und demzufolge sowohl die nNOS und eNOS als auch Stickstoffmonoxid an der Etablierung einer LTP in der lateralen Amygdala involviert sind. Andererseits ließen sich innerhalb beider Knockoutgruppen keine signifikanten Unterschiede in der Höhe der Langzeitpotenzierung

zwischen männlichen und weiblichen Versuchstieren nachweisen.

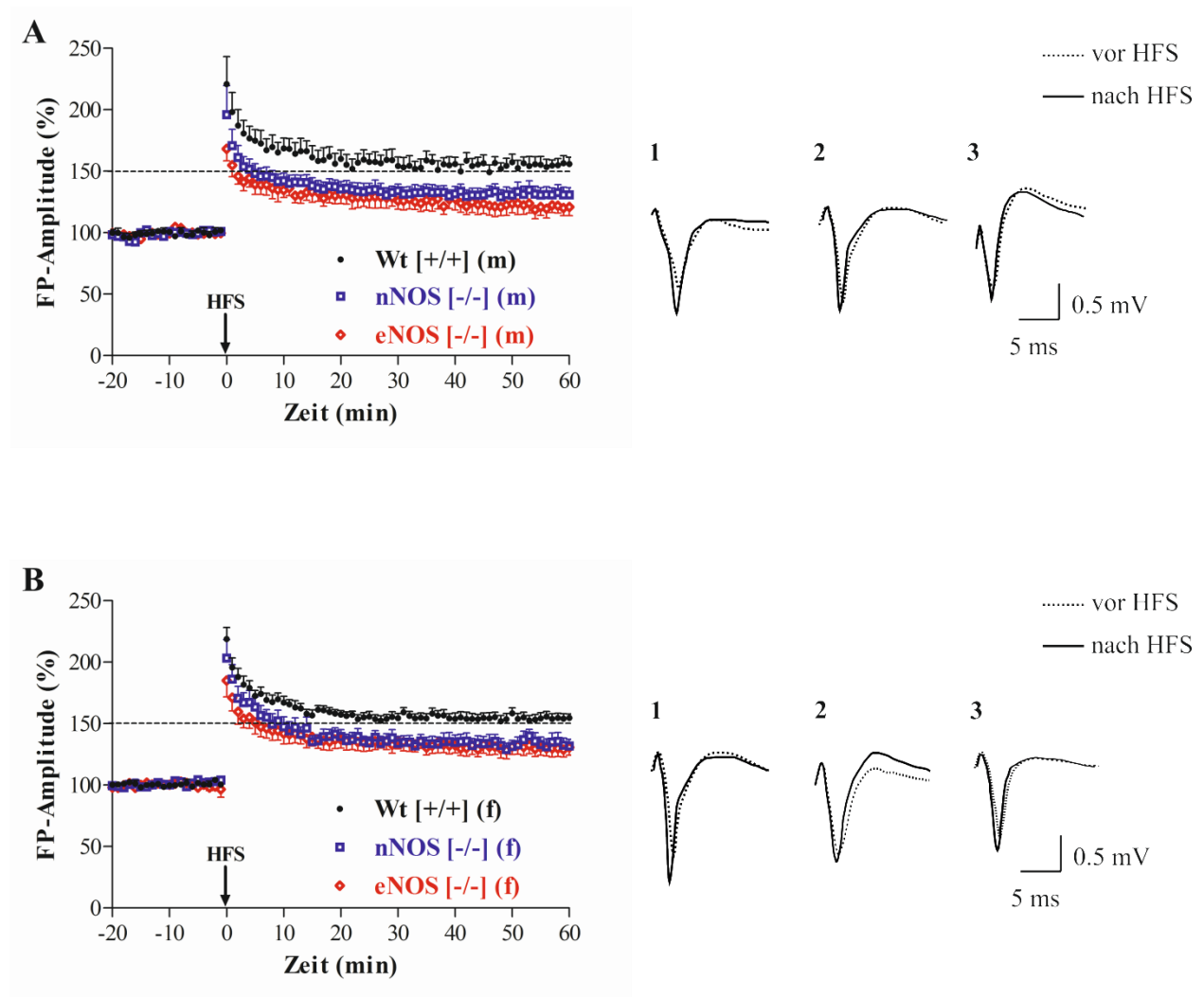


Abb. 3.2 **A:** Vergleich der Langzeitpotenzierung von männlichen (m) Wildtyp-Mäusen (Wt), nNOS-Knockout-Mäusen (nNOS^{-/-}) und eNOS-Knockout-Mäusen (eNOS^{-/-}).
B: Vergleich der Langzeitpotenzierung von weiblichen (f) Wildtyp-Mäusen (Wt), nNOS-Knockout-Mäusen (nNOS^{-/-}) und eNOS-Knockout-Mäusen (eNOS^{-/-}).

Nummeriert sind Beispielpotenziale der untersuchten Gruppen, wobei die gepunktete Linie die FP-Form vor und die durchgezogene Linie die FP-Form nach HFS illustriert (1 Wildtyp; 2 nNOS-Knockout-Maus; 3 eNOS-Knockout-Maus).

3.2.2 LTP unter pharmakologischer NOS Inhibition durch L-NAME

Initial wurden horizontale Schnitte männlicher C57BL/6J-Mäuse 30 Minuten vor HFS mit dem unspezifischen nNOS- bzw. eNOS-Inhibitor L-NAME (200 μ M) vorbehandelt (Abb. 3.3.A). Bei diesem Versuchsaufbau wurde 60 Minuten nach der hochfrequenten Stimulation eine LTP mit signifikant geringerer Feldpotenzialamplitude im Vergleich zur Kontrollgruppe aufgezeichnet (Kontrolle: $155,5 \pm 5,2\%$, n = 9; L-NAME: $133,4 \pm 3,4\%$, n = 5). Das schwache TBS-Paradigma mündet in einer verminderten LTP in der unbehandelten männlichen Kontrollmessreihe ($125,0 \pm 3,2\%$, n = 8; Abb.3.3 A), während das Einwaschen von L-NAME (200 μ M) die vollständige Suppression der TBS-induzierten LA-LTP bedingte ($103,7 \pm 1,4\%$, n = 6; Abb. 3.3 B). Es ist bekannt, dass der TBS-Reiz nicht immer für die Aktivierung der Prä- und Postsynapse ausreicht. Entsprechend basiert die L-NAME bedingte komplette Unterdrückung der Langzeitpotenzierung im lateralen Kern der Amygdala vermutlich auf der Hemmung TBS induzierter plastischer Prozesse, die präsynaptisch durch NO vermittelt werden.

Die durchgeführten Experimente konnten erfolgreich eine Beteiligung Stickstoffmonoxids an der Etablierung der LA-LTP nachweisen. Sowohl das HFS- also auch das TBS-Paradigma zeigten eine deutliche NO-Abhängigkeit, wobei diese bei letzterem stärker ausgeprägt war. Zusammengefasst sprechen die Ergebnisse somit für eine wesentliche Rolle von Stickstoffmonoxid für die Regulation von Mechanismen synaptischer Plastizität in der lateralen Amygdala. Es ist allerdings festzuhalten, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchstieren der nNOS-Knockoutgruppe und der eNOS-Knockoutgruppe in der Beeinflussung der Langzeitpotenzierung in der lateralen Amygdala nachgewiesen wurde.

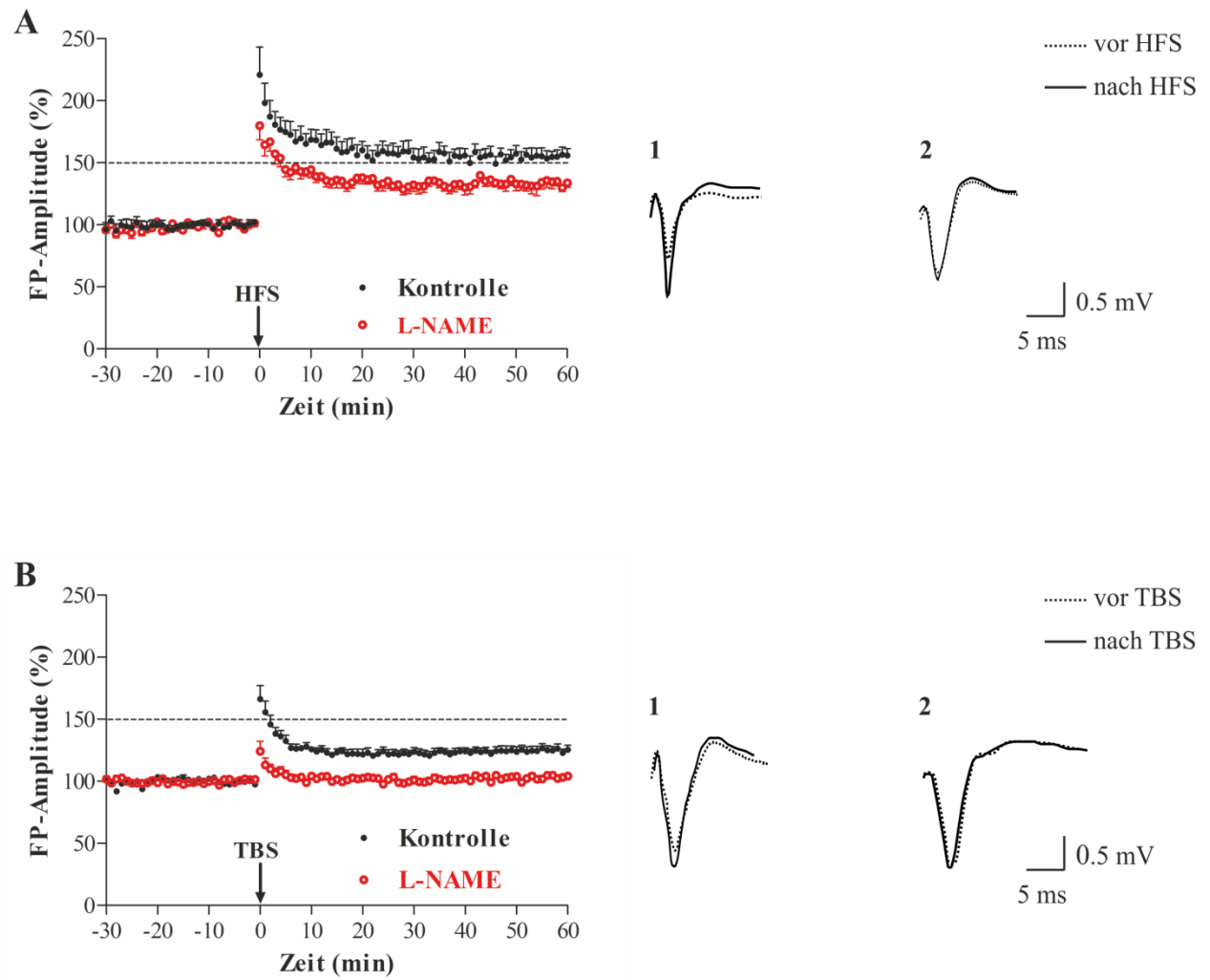


Abb. 3.3 **A:** Vergleich der Langzeitpotenzierung nach HFS-Applikation bei C57BL/6J-Mäusen unter Kontrollbedingungen und unter Gabe von L-NAME in der Konzentration von 200 μ M. **B:** Vergleich der Langzeitpotenzierung nach TBS-Applikation bei C57BL/6J-Mäusen unter Kontrollbedingungen und unter Gabe von L-NAME in der Konzentration von 200 μ M.

Nummeriert sind Beispielpotenziale der untersuchten Gruppen, wobei die gepunktete Linie die FP-Form vor und die durchgezogene Linie die FP-Form nach TBS illustriert (Kontrolle=1; L-NAME=2).

3.2.3 Einfluss von Ang-(1-7) auf die LTP in der lateralen Amygdala

Die Hirnschnitte des Wildtyps sowie die von nNOS- und eNOS-Knockout-Mäusen wurden mit $0,025 \mu\text{M}$ Ang-(1-7) vorbehandelt. Es zeigte sich 60 Minuten nach HFS eine signifikante Steigerung der Feldpotenzialamplitude der männlichen Wildtyp-Mäuse im Vergleich zu den Kontrollbedingungen ($m: 173,3 \pm 8,8\%$, $n = 6$; $p < 0,05$, Abb. 3.4 A). Dieses Resultat bestätigte die zuvor genannten Ergebnisse in puncto des Effektes von Ang-(1-7) auf die LA-LTP (Albrecht, 2007), so dass in dieser Arbeit die fazilitierende Ang-(1-7) Wirkung auf die Langzeitpotenzierung im lateralen Kern der Amygdala für männliche Tiere nachgewiesen werden konnte.

In der weiblichen Wildtyp-Versuchsreihe konnte ebenfalls eine signifikante Zunahme der Potenzialamplitude gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe verzeichnet werden ($173,3 \pm 4,8\%$, $n = 9$; $p < 0,05$, Abb. 3.4 B). Entsprechend bestätigt sich gleichermaßen der fazilitierende Effekt von Ang-(1-7) auf die Langzeitpotenzierung der lateralen Amygdala für weibliche Tiere. Eine geschlechtsspezifische Wirkung von Ang-(1-7) konnte nicht festgestellt werden.

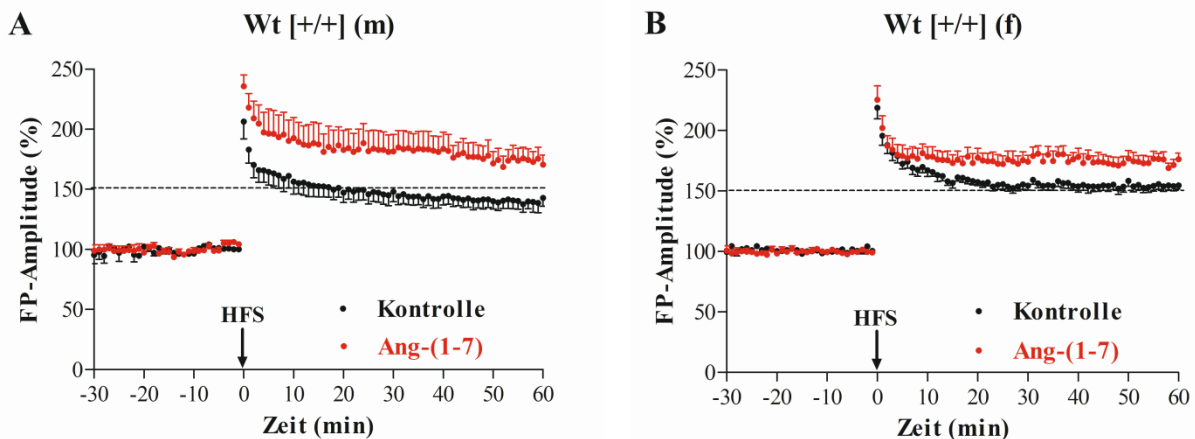


Abb. 3.4 **A:** Vergleich der Langzeitpotenzierung nach HFS-Applikation bei männlichen (m) Wildtyp-Mäusen (Wt) unter Kontrollbedingungen (schwarz) und unter Gabe von Ang-(1-7) in der Konzentration von $0,05 \mu\text{M}$ (rot).
B: Vergleich der Langzeitpotenzierung nach HFS-Applikation bei weiblichen (f) Wildtyp-Mäusen (Wt) unter Kontrollbedingungen (schwarz) und unter Gabe von Ang-(1-7) in der Konzentration von $0,05 \mu\text{M}$ (rot).

3.2.4 Wirkung von Ang-(1-7) auf die neuronale Plastizität bei nNOS-Knockout-Mäusen

In nNOS-Knockout-Tieren ließ sich die zuvor nachgewiesene Wirkung von Ang-(1-7) auf die Langzeitpotenzierung im lateralen Kern in der männlichen Versuchsreihe nicht nachweisen. Im Vergleich zur unbehandelten männlichen Knockoutgruppe traten keine signifikanten Änderungen der Potenzialamplitude durch Applikation von Ang-(1-7) bei männlichen nNOS-Knockout-Mäusen auf ($m: 128,5 \pm 7,4\%$, $n = 8$; $p > 0,05$; Abb. 3.5 A). Die

neuronale NO-Synthase erscheint somit maßgeblich an den Ang-(1-7) vermittelten Prozessen synaptischer Plastizität beim männlichen Geschlecht beteiligt zu sein.

Die Betrachtung der weiblichen Versuchstierreihe förderte ein überraschendes Ergebnis zutage. Der bahnende Effekt von Ang-(1-7) auf die amygdaläre Langzeitpotenzierung blieb bei den weiblichen nNOS-Knockout-Mäusen erhalten: Gegenüber der unbehandelten Kontrollreihe imponierte 60 Minuten nach HFS ein signifikanter Anstieg der Feldpotenzialamplitude ($f: 169,4 \pm 13,5\%$, $n = 9$; $p < 0,05$; Abb.3.5 B). Entsprechend kann die Ang-(1-7)

vermittelte Fazilitierung der LA-LTP beim weiblichen Geschlecht als ein von der neuronalen NO-Synthase unabhängiger Signalweg angesehen werden.

In der Rekapitulation dieser Daten lässt sich zumindest für die männlichen Versuchstiere schlussfolgern, dass das für die Ang-(1-7)-vermittelte Stärkung der Langzeitpotenzierung im lateralen Kern der Amygdala notwendige Stickstoffmonoxid in hohem Maße von der neuronalen NO-Synthase stammt, während die Stickstoffmonoxidsynthese beim weiblichem Geschlecht an einem anderen Ort lokalisiert zu sein scheint.

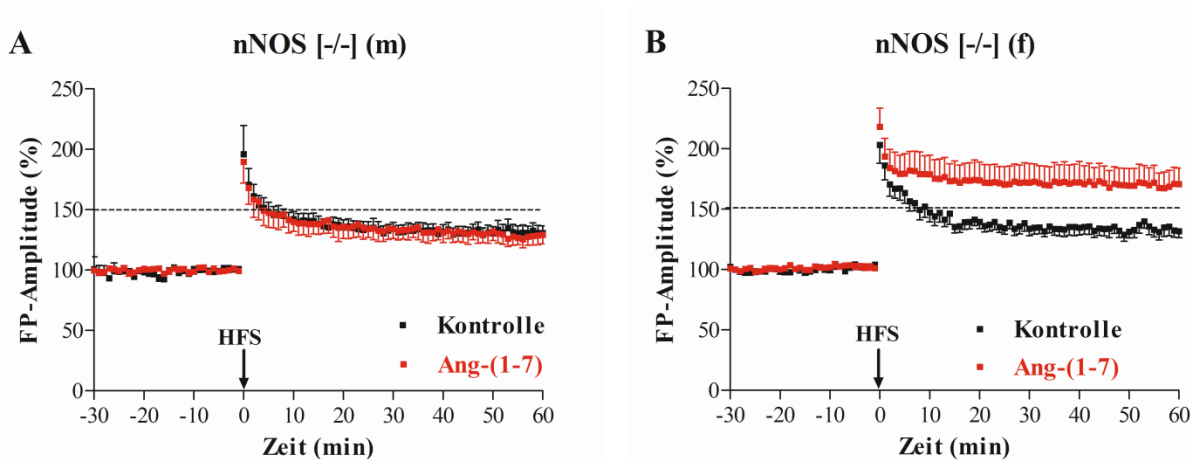


Abb. 3.5 **A:** Vergleich der Langzeitpotenzierung nach HFS-Applikation bei männlichen (m) nNOS-Knockout-Mäusen (nNOS^{-/-}) unter Kontrollbedingungen (schwarz) und unter Gabe von Ang-(1-7) in der Konzentration von 0,05 μ M (rot).
B: Vergleich der Langzeitpotenzierung nach HFS-Applikation bei weiblichen (f) nNOS-Knockout-Mäusen (nNOS^{-/-}) unter Kontrollbedingungen (schwarz) und unter Gabe von Ang-(1-7) in der Konzentration von 0,05 μ M (rot).

3.2.5 Wirkung von Ang-(1-7) auf die neuronale Plastizität bei eNOS-Knockout-Mäusen

Nach Analyse der nNOS-Knockout-Reihe soll nun dessen Pendant im Blickpunkt stehen: die eNOS-Knockout-Mäuse unter Vorbehandlung mit Ang-(1-7). Dabei führte die hochfrequente Stimulation bei männlichen eNOS-Knockout-Mäusen zu einer signifikanten Potenzierung der Feldpotenzialamplitude im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (m: $141,2 \pm 9,8\%$, $n = 10$; $p < 0,05$; Abb.3.6 A). Die verschiedenen Ergebnisse der beiden männlichen Knockoutreihen polarisieren sich deutlich: während das Fehlen der neuronalen NO-Synthase die potenzierenden Effekte von Ang-(1-7) blockierte, blieben diese durch die Abwesenheit der endothelialen NO-Synthase unbeeinflusst. Dies liefert einen weiteren deutlichen Hinweis darauf, dass Ang-(1-7) bei männlichen Mäusen die für die Fazilitierung notwendige vermehrte NO-Synthase über die neuronale NO-Synthase steuert, während die endotheliale NO-Synthase hierfür beim männlichen Geschlecht vernachlässigbar erscheint.

Umgekehrt präsentieren sich die Ergebnisse der beiden weiblichen Knockoutreihen: Bei weiblichen eNOS-Knockout-Mäusen betrug die Amplitude unter Wirkung von Ang-(1-7) nach 60 Minuten durchschnittlich $137,8 \pm 8,3\%$ ($n = 9$) der Ausgangsamplituden vor HFS (Baselineamplituden) von Hirnschnitten ohne pharmakologische Intervention ($p > 0,05$; Abb.3.6 B). Sie waren somit im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant unterschiedlich. Parallel zu beiden männlichen Knockoutversuchsreihen treten somit auch

innerhalb der weiblichen deutliche Gegensätzlichkeiten bezüglich der Resultate hervor: während die Abwesenheit der neuronalen NO-Synthase die potenzierenden Effekte von Ang-(1-7) unbeeinflusst ließ, wurden diese durch das Fehlen der endothelialen NO-Synthase blockiert. Entsprechend erweist sich der Ang-(1-7)-vermittelte Ursprung der NO-Synthase beim weiblichen Geschlecht bei der endothelialen NO-Synthase lokalisiert, während die neuronale NO-Synthase hierfür nur unwesentlich beizutragen scheint.

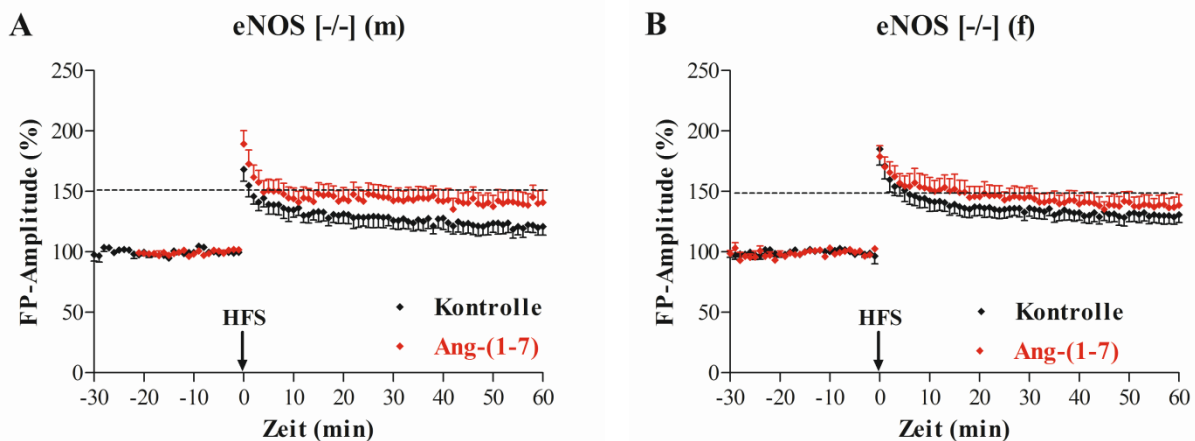


Abb. 3.6 **A:** Vergleich der Langzeitpotenzierung nach HFS-Applikation bei männlichen (m) eNOS-Knockout-Mäusen (eNOS^{-/-}) unter Kontrollbedingungen (schwarz) und unter Gabe von Ang-(1-7) in der Konzentration von 0,05 μ M (rot). **B:** Vergleich der Langzeitpotenzierung nach HFS-Applikation bei weiblichen (f) eNOS-Knockout-Mäusen (eNOS^{-/-}) unter Kontrollbedingungen (schwarz) und unter Gabe von Ang-(1-7) in der Konzentration von 0,05 μ M (rot).

3.2.6 Zusammenfassung der Ergebnisse zur LTP der weiblichen und männlichen Knockoutreihe unter Einfluss von Ang-(1-7)

In Abbildung 3.7 werden die Daten unserer Versuchsreihen zusammengefasst. Ang-(1-7) führt in der männlichen und weiblichen Versuchstierreihe über unterschiedliche Mechanismen zu einer Intensivierung der Langzeitpotenzierung im lateralen Kern der Amygdala. Diese Augmentation basiert bei männlichen Versuchstieren auf der enzymatischen Bereitstellung Stickstoffmonoxids durch die neuronale NO-Synthase. Die weiblichen Versuchstiere kontrastieren, in dem für die Zunahme der LTP unter Ang-(1-7) das von der endothelialen NO-Synthase zur Verfügung gestellte Stickstoffmonoxid verantwortlich ist. In der Zusammenschau kann somit von einer geschlechtsspezifischen Aktivierung der neuronalen und endothelialen NO-Synthase durch Ang-(1-7) ausgegangen werden.

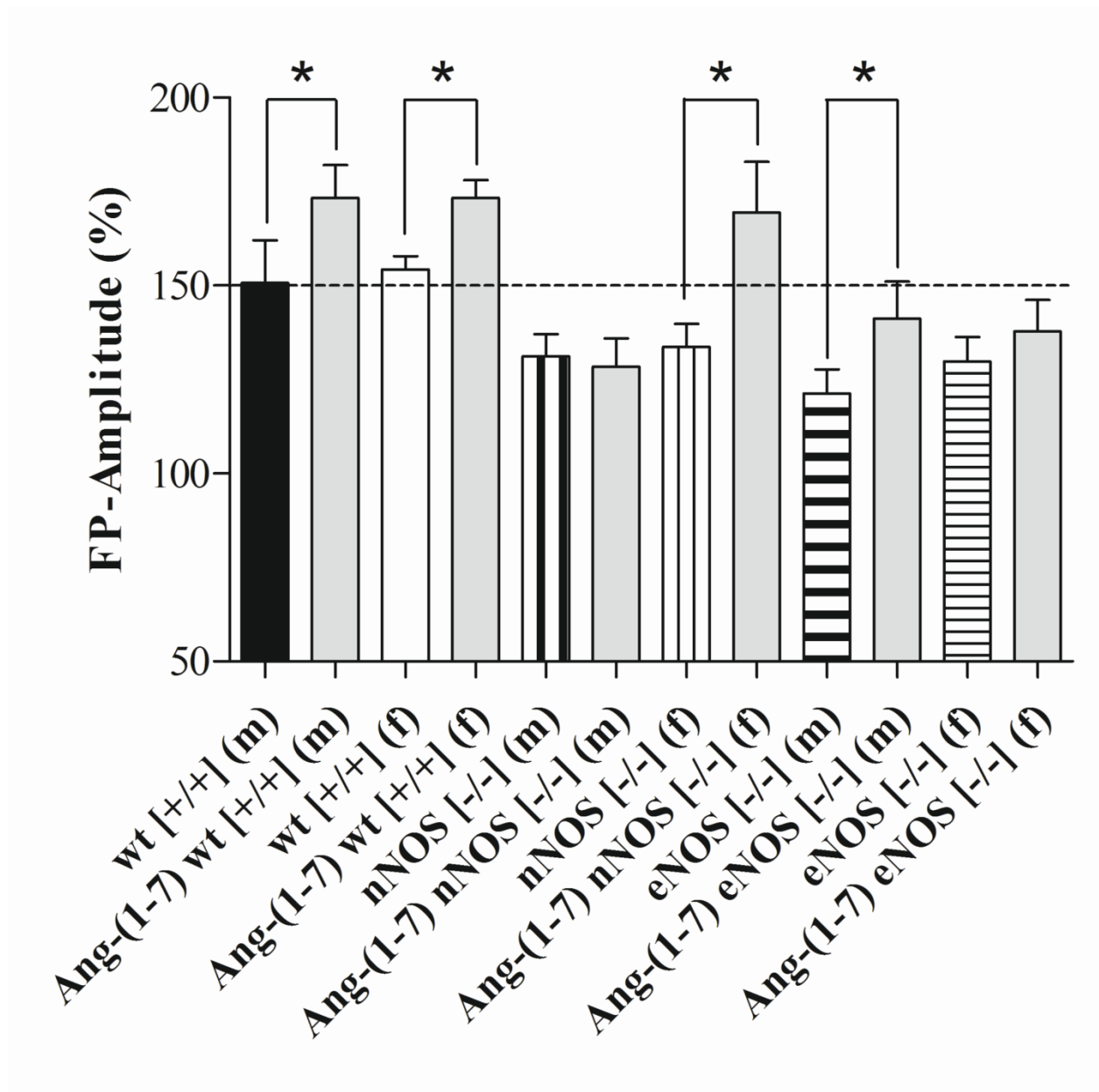


Abb. 3.7 Das Balkendiagramm stellt die durchschnittlichen Veränderungen während der Langzeitpotenzierung im lateralen Kern der Amygdala unter den bisher genannten Fragestellungen dar (* = signifikanter Unterschied, $p < 0,05$).

3.2.7 Wirkung von Ang-(1-7) auf die neuronale Plastizität unter L-NAME-Applikation

Neben den Untersuchungen dessen Fokus auf Versuchstieren mit genetisch veränderter Enzymausstattung lag, soll im Anschluss sowohl die neuronale als auch die endotheliale NO-Synthase durch L-NAME (200 μM) unspezifisch blockiert werden. Im Vergleich zur ausschließlich mit Ang-(1-7) vorbehandelten männlichen Versuchsgruppe (C57BL/6J-Mäuse) ($m: 171,7 \pm 6,9\%$, $n = 8$ Abb.3.8) führte die gleichzeitige Applikation von Ang-(1-7) (0,05 μM) und L-NAME bei männlichen Versuchstieren zu einer kompletten Blockierung der Ang-(1-7)-

induzierten LTP-Verstärkung in der lateralen Amygdala ($m: 145,2 \pm 9,8\%$, $n = 7$; Abb.3.8 A). Dabei entsprachen die Werte dieser Hemmung in etwa denen von unbehandelten männlichen Kontrollen nach HFS ($m: 151,0 \pm 3,0\%$, $n = 8$). Die Amplitudenwerte dieser gerade erwähnten Hemmung nach Ko-Applikation von L-NAME und Ang-(1-7) waren in etwa der Vergrößerung der Feldpotenzialamplitude von komplett unbehandelten männlichen Kontrollen 60 Minuten nach HFS gleichzusetzen ($m: 151,0 \pm 3,0\%$, $n = 8$). Entsprechend konnte bei Mäusen, die mit Ang-(1-7) und L-NAME behandelt ($m: 145,2 \pm 9,8\%$, $n = 7$) wurden, der hemmenden Effekt von L-NAME auf die Langzeitpotenzierung im lateralen Kern der Amygdala gegenüber ausschließlich mit L-NAME behandelten Mäusen verringert werden ($m: 133,4 \pm 3,4\%$, $n = 5$) (Abb. 3.8 B). Folglich kann der Verstärkungseffekt von Ang-(1-7) auf die LA-LTP durch L-NAME zwar gehemmt werden, doch scheint eine ausreichende NO-Synthese gewährleistet zu sein, um die Etablierung einer normalwertigen LA-LTP sicherzustellen.

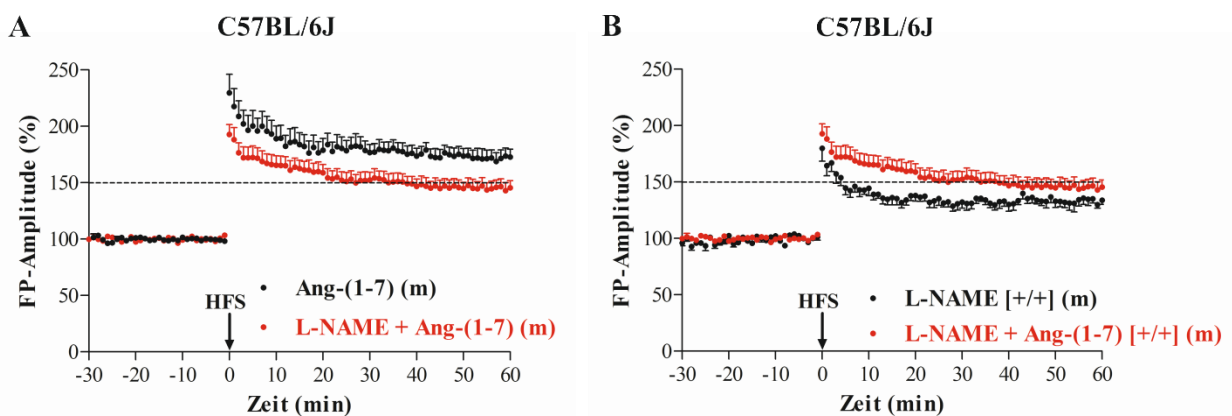


Abb. 3.8 **A:** Vergleich der Langzeitpotenzierung nach HFS-Applikation bei männlichen (m) C57BL/6J-Mäusen unter Gabe von Ang-(1-7) in der Konzentration von $0,05 \mu\text{M}$ (schwarz) und unter Gabe von L-NAME in der Konzentration von $200 \mu\text{M}$ zusammen mit Ang-(1-7) in der Konzentrationen von $0,05 \mu\text{M}$ (rot).
B: Vergleich der Langzeitpotenzierung nach HFS-Applikation bei männlichen (m) C57BL/6J-Mäusen unter Gabe von L-NAME in der Konzentration von $200 \mu\text{M}$ (schwarz) und unter Gabe von L-NAME in der Konzentration von $200 \mu\text{M}$ zusammen mit Ang-(1-7) in der Konzentrationen von $0,05 \mu\text{M}$ (rot).

3.3 Doppelpulsreizung (Paired-Pulse)

Neben den mittels LTP-Analysen getroffenen Aussagen über persistierende Plastizitätsveränderungen sollen Paired-Pulse-Untersuchungen es uns ermöglichen, unsere Fragestellung auch auf die synaptische Kurzzeitplastizität anzuwenden.

Entsprechend erfolgten zunächst Paired-Pulse-Messungen an männlichen und weiblichen Wildtyp-Mäusen. Im Anschluss wurde untersucht, ob die zuvor postulierte geschlechtsspezifische Wirkung von Ang-(1-7) auf die Langzeitpotenzierung in der lateralen Amygdala auch für das Paired-Pulse-Paradigma Gültigkeit besitzt. Hierfür wurden das Paired-Pulse-Verhalten von unbehandelten männlichen bzw. weiblichen Hirnschnitten mit weiblichen und männlichen Präparaten nach Einwaschung von Ang-(1-7) verglichen. Letztlich galt die Aufmerksamkeit erneut beider Knockoutgruppen: mit Ang-(1-7) behandelte und unbehandelte weibliche nNOS-Knockout und eNOS-Knockout-Mäuse wurden unter Paired-Pulse-Applikation gemessen.

3.3.1 Paired-Pulse-Verhalten bei männlichen und weiblichen Wildtyp-Mäusen

Beim unbehandelten weiblichen und männlichen Wildtyp untersuchten wir die Antworten auf gepaarte Reizungen mit verschiedenen Interstimulusintervallen (Abb. 3.9). Die Zusammenfassung aller unter diesen Kontrollbedingungen erfassten Paired-Pulse-Messungen beim männlichen Wildtyp ergab eine Paired-Pulse-Fazilitierung (Ratio > 1) bei den Reizintervallen zwischen 20 bis 90 ms. Die Abstände von 10 ms sowie größer gleich 100 ms resultierten dagegen in einer Paired-Pulse-Depression (Ratio < 1). Das Maximum des Verhältnisses wurde bei einem Reizintervall von 30 ms mit $1,44 \pm 0,1$ dokumentiert, während sich das Minimum bei 10 ms mit $0,74 \pm 0,1$ befand.

Die Zusammenschau der gesamten Paired-Pulse-Messungen unter Kontrollbedingungen des weiblichen Wildtyps zeigte eine Fazilitierung (Ratio > 1) bei den Reizintervallen zwischen 20 und 80 ms. Das Intervall von 10 ms sowie größer gleich 90 ms wurde als Paired-Pulse-Depression gewertet (Ratio < 1). Bei 30 ms mit $1,45 \pm 0,1$ lag das Höchstmaß der Fazilitierung, wohingegen der niedrigste Wert mit $0,83 \pm 0,07$ bei 200 ms dargestellt wurde.

Stellt man beide Kontrollgruppen mittels Mann-Whitney-U-Test statistisch gegenüber manifestierten sich keine signifikante Unterschiede im Doppelpulsverhalten bezüglich der

Paired-Pulse-Fazilitierung zwischen männlichen (n = 10) und weiblichen (n = 15) Wildtyp-Mäusen ($p > 0,05$). Demnach finden sich keine Hinweise für geschlechtsspezifische Unterschiede in der präsynaptischen Glutamatfreisetzung beim Wildtyp.

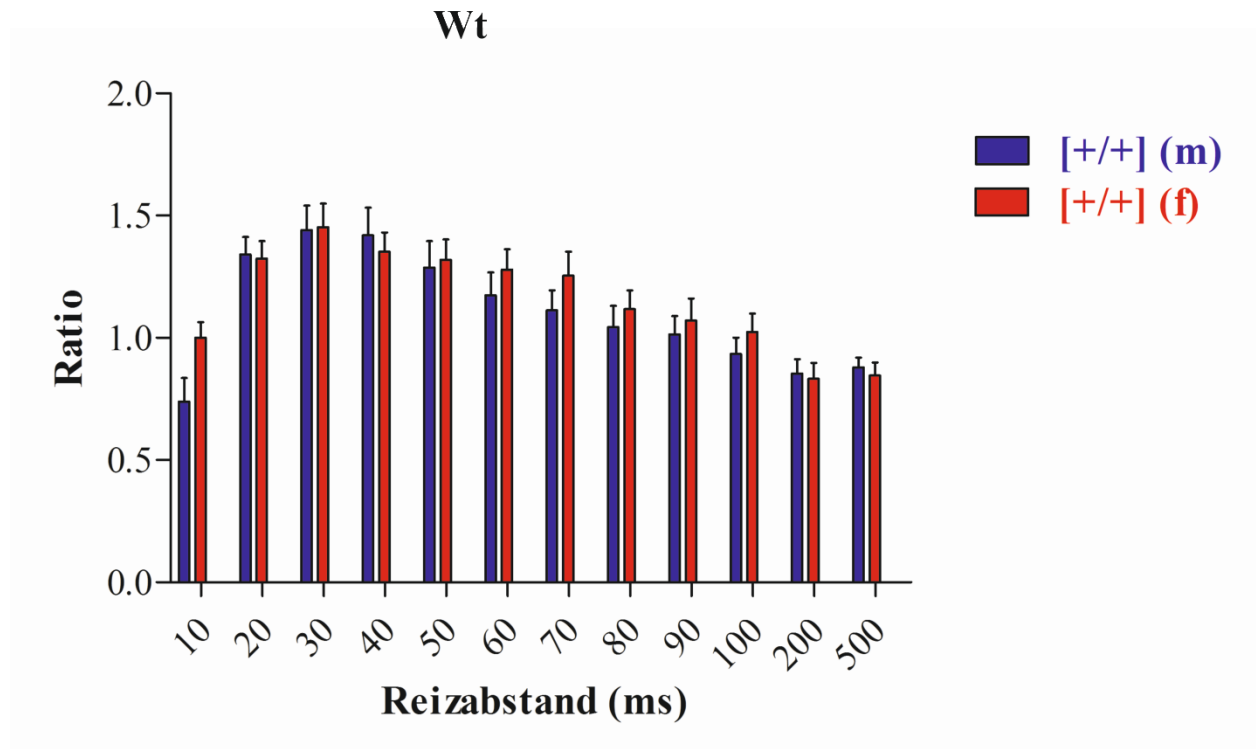


Abb. 3.9 Darstellung des Paired-Pulse-Verhaltens von Wildtyp-Mäusen (Wt) im lateralen Kern der Amygdala nach Reizung der externen Kapsel in Abhängigkeit vom Geschlecht. Männliche Tiere (m) sind blau, weibliche Tiere (f) sind rot illustriert.

3.3.2 Paired-Pulse-Verhalten bei männlichen und weiblichen eNOS-Knockout-Mäusen

Die Effekte der Doppelpulsreizung wurden bei unbehandelten weiblichen und männlichen eNOS-Knockout-Mäusen untersucht (Abb. 3.10). Die Zusammenfassung der erfassten Paired-Pulse-Messungen bei männlichen eNOS-Knockout-Mäusen ergab eine Paired-Pulse-Fazilitierung (Ratio > 1) bei den Reizintervallen zwischen 20 und 80 ms. Das Intervall von 10 ms sowie größer gleich 90 ms resultierte dagegen in einer Paired-Pulse-Depression (Ratio < 1). Das Maximum des Verhältnisses lag bei einem Reizintervall von 30 ms mit $1,34 \pm 0,1$, während sich das Minimum bei 200 ms mit $0,8 \pm 0,07$ befand.

Die Zusammenschau der weiblichen eNOS-Knockout-Mäuse ergab eine Paired-Pulse-Fazilitierung (Ratio > 1) bei den Reizintervallen zwischen 20 und 80 ms. Das

Intervall von 10 ms sowie größer gleich 90 ms resultierte hingegen in einer Paired-Pulse-Depression (Ratio < 1). Bei einem Reizintervall von 30 ms mit $1,38 \pm 0,08$ ergab sich die höchste Ratio, während sich der niedrigste Wert bei 200 ms mit $0,78 \pm 0,06$ befand.

Es wurden keine signifikanten Veränderungen der Paired-Pulse-Fazilitierung des synaptischen Potenzials im Gruppenvergleich der weiblichen (n = 26) und männlichen (n = 15) eNOS-Knockout-Mäuse ermittelt (p > 0,05). Entsprechend konnten wir für eNOS-Knockout-Mäuse keine geschlechtsspezifischen Änderungen der präsynaptischen Glutamatfreisetzung dokumentieren.

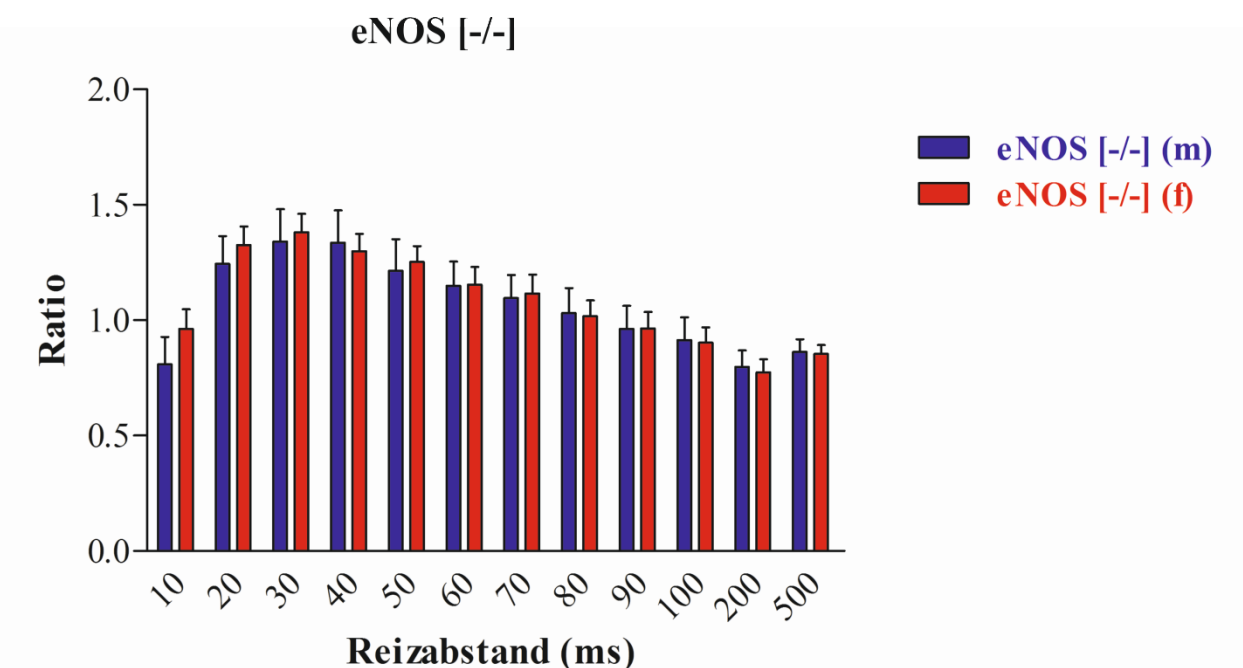


Abb. 3.10 Darstellung des Paired-Pulse-Verhaltens von eNOS-Knockout-Mäusen (eNOS^{-/-}) im lateralen Kern der Amygdala nach Reizung der externen Kapsel in Abhängigkeit vom Geschlecht. Männliche Tiere (m) sind blau, weibliche Tiere (f) sind rot illustriert.

3.3.3 Paired-Pulse-Verhalten bei männlichen Wildtyp-Mäusen unter Ang-(1-7)

Unter dem Einfluss von $0,05 \mu\text{M}$ Ang-(1-7) konnten folgende Paired-Pulse-Ergebnisse erfasst werden:

Der Blick auf die Abb. 3.11 zeigt eine Paired-Pulse-Fazilitierung zwischen den Stimulusintervallen von 20 und 80 ms. Demgegenüber fällt die Paired-Pulse-Depression auf die Marge von 10 ms und größer 90 ms. Das Maximum der Fazilitierung befand sich bei 20 ms und

belief sich auf $1,32 \pm 0,14$, während der größte Rückgang der Feldpotenzialamplitude auf den zweiten Reiz im Verhältnis zum ersten für ein Interstimulusintervall von 200 ms beziffert wurde ($0,83 \pm 0,1$).

Mit Hilfe des Wilcoxon-Tests für verbundene Stichproben konnte unter der Applikation von Ang-(1-7) eine signifikante Reduktion der Paired-Pulse-Fazilitierung im lateralen Kern der Amygdala von männlichen Wildtyp-Mäusen ($n = 10$; $p < 0,05$) festgestellt werden. Es lässt sich daraus ableiten, dass die präsynaptische Glutamatfreisetzung bei männlichen Versuchstieren durch Ang-(1-7) gesteigert wird.

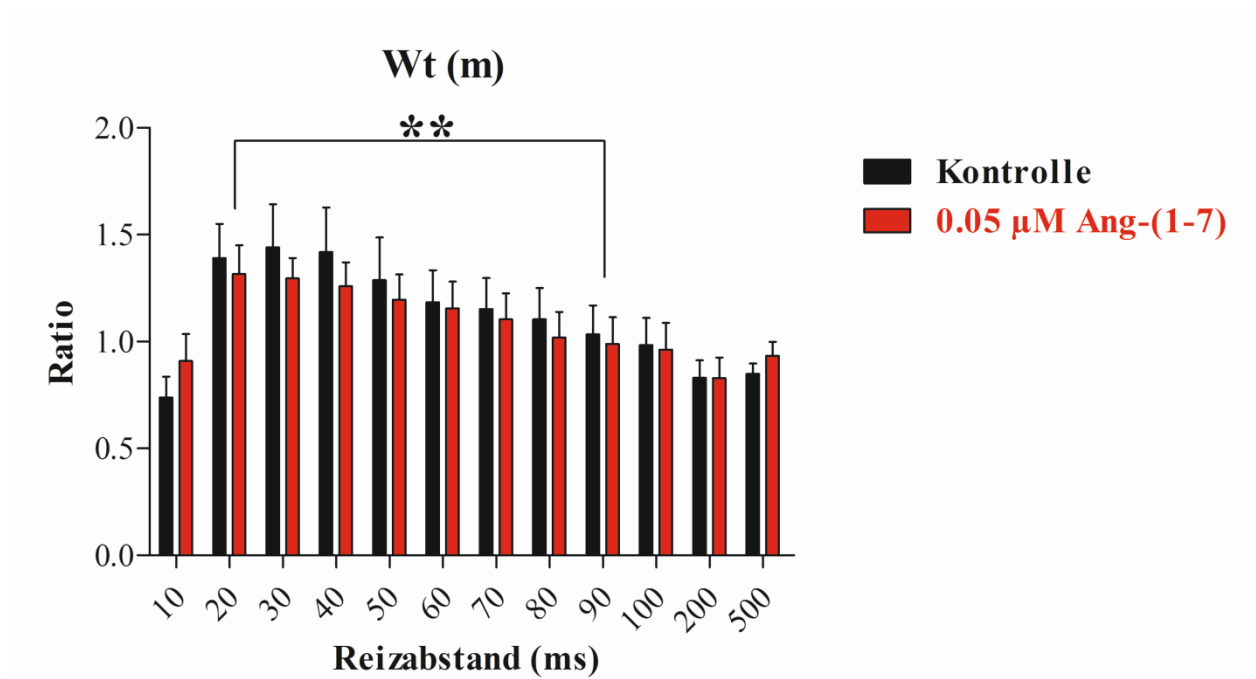


Abb. 3.11 Vergleich des Paired-Pulse-Verhaltens von männlichen Wildtyp-Mäusen (Wt) nach Stimulation der externen Kapsel unter Kontrollbedingungen (schwarz) und unter Gabe von Ang-(1-7) in der Konzentration von $0,05 \mu\text{M}$. (* = signifikanter Unterschied, $p < 0,05$)

3.3.4 Paired-Pulse-Verhalten bei weiblichen Wildtyp-Mäusen unter Ang-(1-7)

Um die Kontinuität nach der Frage über mögliche Geschlechtsunterschiede zu wahren, erfolgten parallel zu den vorangegangenen Untersuchungen über den Einfluss von Ang-(1-7) auf das Paired-Pulse-Verhalten beim männlichen Wildtyp entsprechende Versuche, die den Effekt auf das Paired-Pulse-Verhalten bei weiblichen Wildtyp-Mäusen nach der Applikation von Ang-(1-7) demonstrieren sollten (Abb. 3.12).

Die Zusammenschau der gewonnenen Daten lässt eine Paired-Pulse-Fazilitierung der Intervalle

zwischen 20 und 80 ms und eine Paired-Pulse-Depression jener bei 10 ms sowie größer 90 ms erkennen. Das Maximum der Paired-Pulse-Ratio konnte bei 20 ms mit $1,35 \pm 0,09$ abgelesen werden. Das Minimum fiel bei 200 ms auf die Werte $0,77 \pm 0,06$.

Die statistische Auswertung unter Anwendung des Wilcoxon-Tests ergab allerdings keinen signifikanten Einfluss von Ang-(1-7) bei weiblichen Wildtyp-Mäusen ($n = 18$; $p > 0,05$). Wir konnten demzufolge zur männlichen Versuchsgruppe gegensätzliche Daten erfassen: Beim weiblichen Wildtyp veränderte Ang-(1-7) die präsynaptische Glutamatfreisetzung nicht signifikant, während dies beim männlichen Geschlecht zutraf.

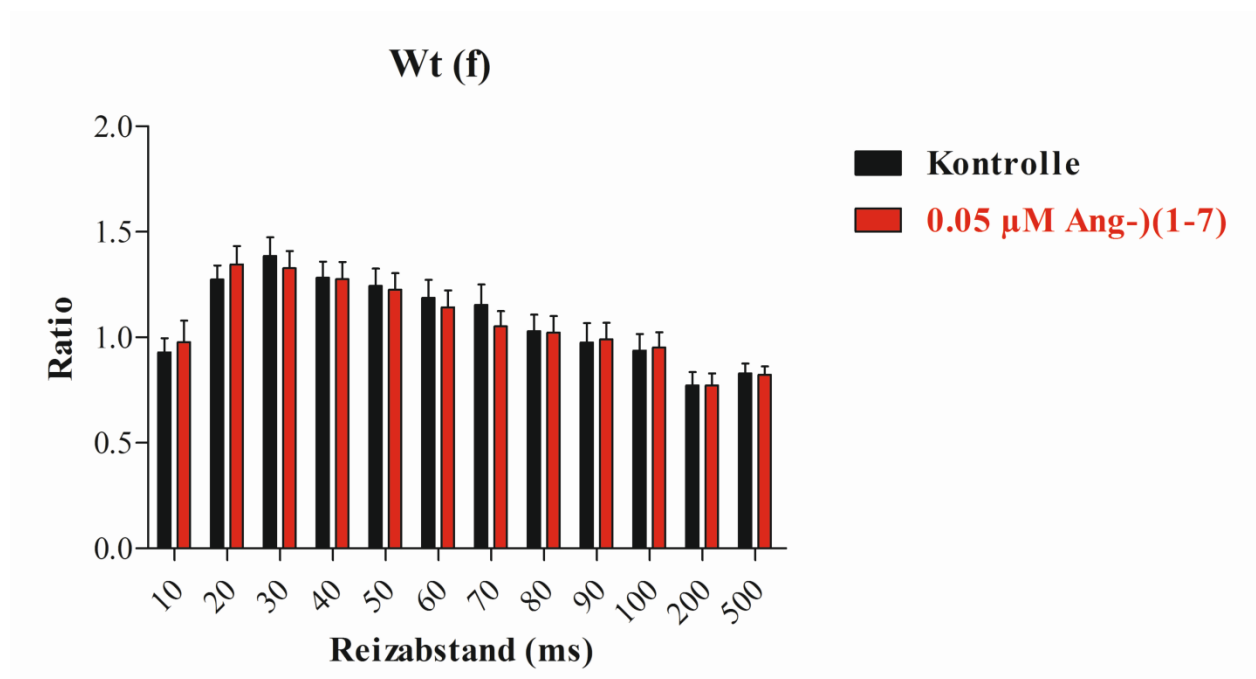


Abb. 3.12 Vergleich des Paired-Pulse-Verhaltens von weiblichen Wildtyp-Mäusen (Wt) nach Stimulation der externen Kapsel unter Kontrollbedingungen (schwarz) und unter Gabe von Ang-(1-7) in der Konzentration von $0,05 \mu\text{M}$.

3.3.5 Paired-Pulse-Verhalten bei weiblichen nNOS-Knockout-Mäusen unter Ang-(1-7)

Die Untersuchung des Paired-Pulse-Verhaltens sollte durch Messungen an weiblichen nNOS-Knockout-Mäusen komplettiert werden (Abb. 3.13). Zusammenfassend konnte eine Paired-Pulse-Fazilitierung bei den Interstimulusintervallen zwischen 30 und 100 ms beobachtet werden. Die Zeitabstände von kleiner 20 sowie größer 200 ms wiesen eine Paired-Pulse-Depression auf. Der Höchstwert der Paired-Pulse-Ratio belief sich bei 50 ms auf $1,78 \pm 0,09$, das Minimum bei 10 ms auf $0,74 \pm 0,12$.

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle schwächte Ang-(1-7) signifikant die Paired-Pulse-Fazilitierung bei weiblichen nNOS-Knockout-Mäusen ($n = 7$; $p < 0,05$; Wilcoxon-Test). Folglich kann hier von einem Ang-(1-7) vermittelten Anstieg der Glutamatfreisetzung bei weiblichen nNOS-Knockout-Mäusen ausgegangen werden. Diese gesteigerte präsynaptische Glutamatfreisetzung bei weiblichen nNOS-Knockout-Tieren lässt sich daher am ehesten auf die erhöhte Stimulation der eNOS durch Ang-(1-7) und der daraus resultierenden vermehrten präsynaptischen Wirkung von Stickstoffmonoxid zurückführen.

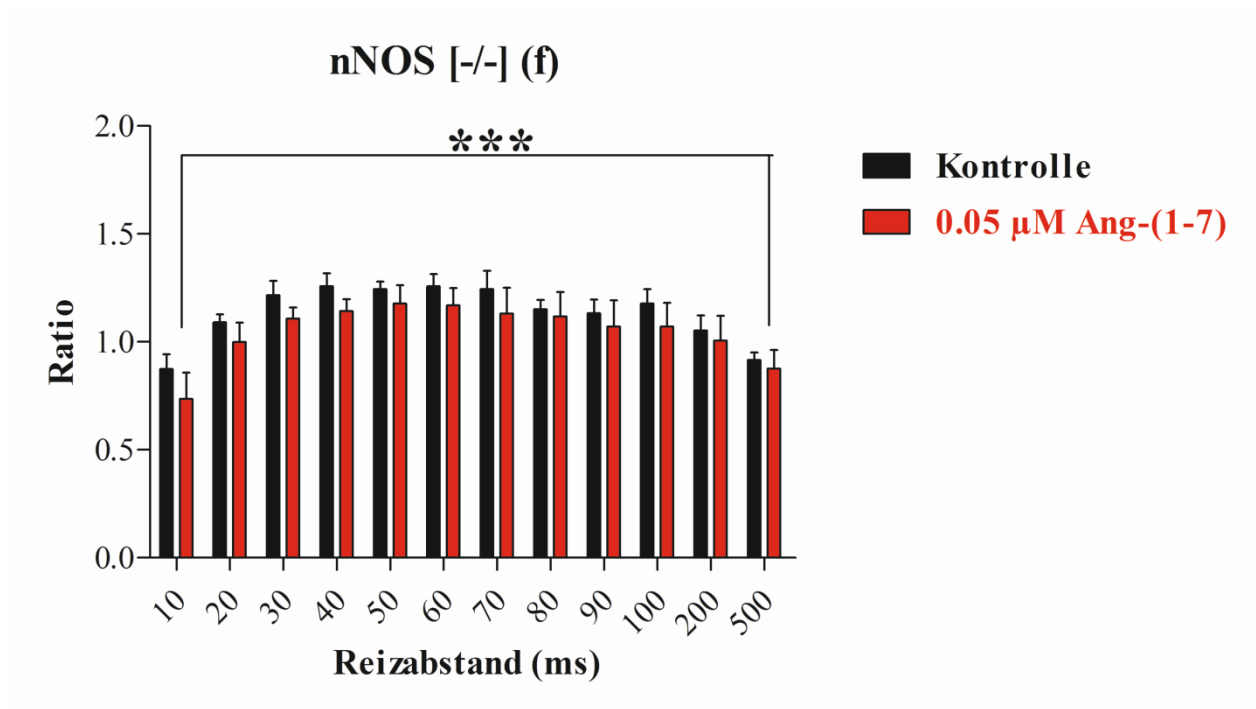


Abb. 3.13 Vergleich des Paired-Pulse-Verhaltens von weiblichen nNOS-Knockout-Mäusen ($nNOS^{-/-}$) nach Stimulation der externen Kapsel unter Kontrollbedingungen (schwarz) und unter Gabe von Ang-(1-7) in der Konzentration von $0,05 \mu\text{M}$. (* = signifikanter Unterschied, $p < 0,05$)

4 Diskussion

4.1 LA-LTP bei nNOS-Knockout-Mäusen

Die Forschung zur Langzeitpotenzierung in der CA1-Region des Hippocampus kann als Prototyp der LTP in der lateralen Amygdala angesehen werden. Diese umfangreichen Parallelen zu im Hippocampus erfassten Daten weisen jedoch vereinzelt Lücken auf. Hippocampale Hirnschnitte von nNOS-Knockout-Mäusen zeigten abgesehen von einer geringen Reduktion eine normale LTP im Verhältnis zur Feldpotenzialamplitude nach HFS bei Wildtyp-Mäusen (O'Dell *et al.*, 1994; Son *et al.*, 1996). Diese in der CA1-Region erfolgten Untersuchungsergebnisse kontrastieren deutlich mit den hier erhobenen amygdalären Befunden. Obwohl die Baseline-Aktivität der beiden NOS-Knockout-Reihen nicht von denen der Wildtyp-Mäuse abwich, belegen unsere Resultate eine signifikante Minderung der Feldpotenzialamplitude nach HFS in Hirnschnitten von nNOS-Knockout-Mäuse gegenüber dem Wildtyp.

In vielen Studien über NO-abhängige Langzeitpotenzierung wurden hippocampale Hirnschnitte von erwachsenen Ratten untersucht. Es konnte in diesem Zusammenhang interessanterweise gezeigt werden, dass eine beträchtliche Varianz zwischen den Spezies bezüglich der Expressionsdichte und -lokalisierung der neuronale NO-Synthase vorherrscht (Blackshaw *et al.*, 2003). So ist die nNOS in den Pyramidenzellen der CA1-Region des Hippocampus bei Ratten signifikant geringer repräsentiert als in den CA1-Pyramidenzellen des Ammonshorns bei Mäusen. Zur Beurteilung der Übertragbarkeit unserer Ergebnisse im Mausmodell auf die Prozesse menschlicher neuronaler Plastizität soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass es bezüglich der nNOS Expressionsdichte und Lokalisation zwischen Menschen und Mäusen stärkere Übereinstimmungen gibt, als beispielsweise in Tierversuchsmodellen von Ratten (Blackshaw *et al.*, 2003). Hieraus lässt sich ableiten, dass die Forschung an Mäusen über den Stellenwert Stickstoffmonoxids für die Langzeitpotenzierung ein auf den Menschen übertragbares Werkzeug darstellt, um die Prozesse menschlicher synaptischer Plastizität besser verstehen zu können (Blackshaw *et al.*, 2003).

4.2 LA-LTP bei eNOS-Knockout-Mäusen

Für die endotheliale NO-Synthase konnte keine Abweichung in der Lokalisation und dem Maß ihrer Expression in Strukturen des Hippocampus festgestellt werden. Entsprechend ließ sich ausschließlich im hippocampalen Gefäßendothel eNOS-RNA bestimmen (Blackshaw *et al.*, 2003). Analog beschränkt sich die zerebrale Gesamtverteilung der eNOS gleichsam auf das Gefäßendothel (Stanarius *et al.*, 1997; Seidel *et al.*, 1997; Topel *et al.*, 1998; Blackshaw *et al.*, 2003). So verwundert es nicht, dass übereinstimmend mit Experimenten im Hippocampus, Kortex und Striatum sich in unserem Versuchsaufbau ebenso eine signifikant schwächere LA-LTP bei eNOS-Knockout-Mäusen demonstrierte. Dies suggeriert in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus dem Hippocampus, dass das im amygdalären Kapillarnetz über die eNOS synthetisierte Stickstoffmonoxid, aufgrund der nur maximal ca. 25 µm umfassenden Entfernung zu Neuronen und Gliazellen (Pawlik *et al.*, 1981), in das neuronale Parenchym hinein diffundiert, um auf Synapsenebene die Langzeitpotenzierung zu modulieren. Die Verbindung zwischen der Modulation neuronaler Aktivität und der Stimulation der eNOS lässt sich über das abundant innervierte zerebrale Gefäßendothel herstellen (Wahl & Schilling, 1993).

4.3 Vergleich zwischen beiden Stämmen

Es lässt sich insofern formulieren, dass die Feldpotenzialamplitude nach HFS bei beiden erwachsenen Knockout-Stämmen zwar deutlich beeinträchtigt, jedoch nicht absolut unterdrückt war. Im Einklang hiermit ließ sich die Amplitude der LA-LTP durch L-NAME reduzieren und unter Anwendung des TBS-Reizparadigmas vollständig unterdrücken.

In Bezug auf das eben Gesagte ist zu bedenken, dass Forschungsarbeiten sogar über nNOS-Knockout-Mäuse berichteten, die nachweislich Splice-Varianten der neuronalen NO-Synthase trugen (Eliasson *et al.*, 1997). Die Möglichkeit einer dadurch vorhandenen Restaktivität des Enzyms lässt sich de facto nicht ausschließen.

Weiterhin ist näher auszuführen, dass die neurophysiologischen Versuche mit L-NAME an 8 - 12 Wochen alten Mäusen erfolgten. Hiervon abweichend waren die beiden Knockout-Stämmen zum Versuchszeitpunkt 8 – 9 Monate alt. Begründen lässt sich dieser gegebene Umstand durch eine altersabhängige Heterogenität in der Suszeptibilität einer NO-abhängigen LTP. Dahin gehend fanden einige Arbeitsgruppen in der CA1-Region neonataler Ratten eine ersichtlich Stickstoffmonoxid-sensiblere LTP im Vergleich zum erwachsenen Äquivalent (Williams *et al.*, 1993; Son *et al.*, 1996). Diese Beschreibung lässt eine

entwicklungsbedingte Verminderung der NO-Synthase-Aktivität sowie –Expression vermuten. In Analogie hierzu ließen sich beträchtlichen Mengen von nNOS-RNA in hippocampalen CA1-Pyramindenzellen neonataler Ratten nachweisen, während die nNOS-RNA-Menge erwachsener Ratten vernachlässigbar gering und vor allem auf Interneurone begrenzt war (Blackshaw *et al.*, 2003). Im Übrigen korreliert die Aktivität der hippocampalen neuronalen NO-Synthase negativ mit dem fortschreitenden Alter (Colas *et al.*, 2006). Entsprechungen in der Amygdala belegen die genannte These. Wie immunhistochemische Färbungen der Amygdala veranschaulichten, konnte eine signifikant reduzierte Menge an nNOS-immunreaktiven Neuronen in nahezu allen Regionen der Amygdala adulter Ratten verglichen mit juvenilen Versuchstieren nachgewiesen werden (Joo *et al.*, 2004). Die Gesamtzahl der Nervenzellen in der Amygdala ist hingegen durch Alterungsprozesse nicht signifikant beeinträchtigt (von Bohlen und Unsicker, 2002).

4.4 NO-abhängige LA-LTP im horizontalen, nicht im coronalen Schnittpräparat

Die Induktion einer Langzeitpotenzierung bei Ratten über kortikale Eingänge zum lateralen Kerngebiet der Amygdala wurde im coronalen Schnittpräparat durch Hemmung des NO-cGMP-PKG Signalweges nicht negativ beeinflusst (Ota *et al.*, 2008). Demgegenüber fanden wir, dass die über kortikale Zuflüsse zum lateralen Amygdalakern evozierte LTP im horizontalen Mausschnitt-Präparat eine NO-Abhängigkeit zeigt. Im horizontalen Schnittpräparat führt die Stimulation von EC-Fasern zu einer Aktivierung von erregenden, kortikalen Afferenzen; darunter Afferenzen vom lateralen entorhinalen und perirhinalen Kortex. Diese Afferenzen entsprechen somit einem Teil der Fasern, die den Nucleus lateralis und basolateralen Nucleus der Amygdala durch die externe Kapsel erreichen und hier Synapsen formen (von Bohlen und Albrecht, 2002). Die coronale Schnittebene öffnet dagegen allein den Nervenfasern aus dem übergeordneten sensorischen Kortex stammend den Weg durch die externe Kapsel zur Amygdala mit ihrem neuronalen Netzwerk. Es ist also zu vermuten, dass die sich aufgrund unterschiedlicher Schnittebenen unterscheidenden Inputs auch durch separate molekulare Vorgänge an den neuronalen Dornfortsätzen auszeichnen. Dieses auf der Hebb'schen Regel basierende Forschungsfeld erweitern Studien, die den Ursachen für die Afferenzspezifität einer LA-LTP auf den Grund gehen. So konvergieren thalamische und kortikale Afferenzen zwar an den gleichen Dendriten, kontaktieren aber postsynaptisch funktionell als auch morphologisch unterschiedliche Dornfortsätze (Humeau *et al.*, 2005).

Es ist somit hervorzuheben, dass die Ausrichtung der Schnittachse sowohl Qualität als auch

Ursprung der afferenten Bahnen (de Olmos *et al.*, 1985) nachhaltig prägt und somit Einfluss auf die LA-LTP nimmt.

Um die Schnittebenenabhängigkeit der Informationsverarbeitung im lateralen Kern der Amygdala besser zu verstehen, wurde in Studien die zugrunde liegende räumliche Organisation exzitatorischer und inhibitorischer Verbindungen näher untersucht. In diesem Rahmen konnte man je nach Schnittebene unterschiedlich starke Signale GABAerger Interneurone ableiten. So waren inhibitorische Mechanismen in coronalen Schnitten deutlich stärker ausgeprägt, wobei dies auf der verstärkten Aktivierung von GABAergen Feedback-Interneurone basiert, was entsprechend höhere IPSP-Amplituden im Vergleich zum horizontalen Schnittpräparat bestätigten (Samson *et al.*, 2003). Demgegenüber evozierten Stimuli in horizontalen Schnitten hauptsächlich EPSPs, so dass zusammengefasst hemmende Einflüsse in der coronalen Schnittebene überwiegen bzw. sich in der horizontalen Ebene schwächer manifestieren. Dabei sind die inhibitorischen Interneurone bevorzugt in der ventrodorsalen Ebene und in geringerem Maße in der rostrocaudalen Ebene lokalisiert (Samson *et al.*, 2003). Dies impliziert, dass die Axonkollaterale der Projektionsneurone unterschiedliche Projektionsziele abhängig von ihrer rostrocaudalen Ausrichtung ansteuern: hemmende Interneurone mehr proximal und Projektionsneurone mehr distal. In einer darauffolgenden Studie konnte diese räumliche Heterogenität des neuronalen Netzwerkes der Amygdala auch auf andere Interneurontypen übertragen werden (Samson & Pare, 2006). In bestimmtem Abstand zum abgeleiteten Projektionsneuron appliziertes Glutamat bewirkte ausschließlich hemmende Antworten in coronalen Schnitten, während die Antwort in horizontalen Schnitten zusätzlich davon abhängig war, ob die Glutamatapplikationsstelle lateral (Exzitation) oder medial (Inhibition) von der registrierten Zelle lag.

Funktionell ergeben sich hieraus im lateralen Kern der Amygdala transversal angeordnete Informationsverarbeitungsmodule, die die assoziative Verarbeitung sensorischer Information in der rostrocaudalen Ebene zulassen, während exzitatorisch Streuungen innerhalb der Module lokal unterdrückt werden (Samson & Pare, 2006; Samson *et al.*, 2003).

4.5 Funktion und Zusammenspiel von nNOS und eNOS

Unsere Daten zeigen deutlich, dass das durch die nNOS respektive eNOS frei werdende Stickstoffmonoxid einen eminent wichtigen Schlüssel zur LA-LTP symbolisiert. Die exakte Rolle der jeweiligen NO-Synthase für die einzelnen molekularen LTP-Vorgänge ist noch nicht vollständig untersucht und Teil eines fortlaufenden Diskurses.

Die Applikation von exogenem Stickstoffmonoxid kombiniert mit einem schwachen tetanischen Impuls afferenter Fasern erzeugte eine NMDA-Rezeptor-unabhängige LTP (Malen & Chapman, 1997; Zhuo *et al.*, 1993). Diese postulierte NMDA-Rezeptor-Unabhängigkeit konnte inzwischen in unserem Labor widerlegt werden: die HFS- wie auch TBS-induzierte LA-LTP ist NMDA-Rezeptor-abhängig (Drephal *et al.*, 2006). Auf der Suche nach dem Ursprung des endogenen Stickstoffmonoxids fand man Hinweise auf eine mögliche konstitutive, sog. tonische und eine reizbedingte, phasische NO-Synthese (Bon & Garthwaite, 2003). Die Relevanz dieser Entdeckung spiegelt sich in ihrer Bedeutsamkeit für das Verständnis grundlegender Mechanismen der Langzeitpotenzierung wider. So konnten LTP-Studien in der CA1-Region des Hippocampus nachweisen, dass sowohl die tonischen als auch die phasischen NO-Signale für die Ausbildung einer stabilen LTP von beträchtlicher Bedeutung sind. Die beiden notwendigen NO-Signale werden über die nNOS in Neuronen und über die eNOS im Gefäßendothel generiert. Dabei deutet die Befundinterpretation auf die eNOS als die verantwortliche Isoform für die tonischen NO-Synthese (Hopper & Garthwaite, 2006). Dies erklärt sich durch die Fähigkeit des Enzyms nicht nur Ca^{2+} -abhängig, sondern parallel über Phosphorylierung aktivierbar zu sein (Fulton *et al.*, 2001), d.h. trotz zytosolischem Ruhe-Kalziumspiegel erlauben Phosphorylierungsstellen die eNOS-Synthase-Aktivität um das 15-20fache gegenüber dem unphosphorylierten Zustand zu steigern. Als wichtiger Mechanismus im Gefäßendothel sei an dieser Stelle exemplarisch die Kinase Akt, als Mündung des PI3-Kinase (Phosphoinositid-3-Kinase) Signalweges genannt. Diese Signalkaskade stellt eine erwähnenswerte Schnittmenge zum zerebralen PI3-/Akt-Signaltransduktionsweges dar, dessen Rolle nicht einzig für die hippocampale LTP intensiv diskutiert und erforscht wird (Sui *et al.*, 2008). Eine kaum mindere Bedeutung erfährt die PI3-Kinase in der Amygdala als potenzielle Prämisse synaptischer Plastizität und mnestischer Konsolidierungsleistung in der Funktion eines Zuflusses zur mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) (Lin *et al.*, 2001; Albrecht & von Bohlen und Halbach, 2008).

Das phasische NO-Signal wird im Hippocampus über die nNOS in Assoziation mit NMDA-Rezeptor-Stimulation bereitgestellt. Im Diskurs über Sinn und Nutzen wird spekulativ für die tonische NO-Synthese eine Art Priming-Effekt für prä- und ggf. postsynaptische Strukturalterationen (Matus, 2000) und für die phasische NO-Freisetzung eine eher synapsenspezifische Rolle reklamiert (Garthwaite, 2005).

4.6 Einfluss des Reizparadigmas auf die potenzielle Geschlechtsspezifität der LA-LTP

Nehmen wir die Beteiligung von tonischem, aus dem Gefäßendothel stammenden Stickstoffmonoxid an bestimmten Formen synaptischen Plastizität als gegeben, ist anzunehmen, dass die Unterbrechung im NO-Signalweg zu Einschränkungen in der Konsolidierung unterschiedlicher Gedächtnisformen führt. Diese These stützen Verhaltensstudien zahlreicher Spezies, die demonstrierten, dass die tonische NO-Freisetzung als auch cGMP zur Gedächtniskonstituierung beitragen; Übersicht in (Bon & Garthwaite, 2003). Ungeachtet der Tatsache, dass unsere Untersuchungen keine Geschlechtsunterschiede in den Dimensionen der HFS-induzierten LA-LTP abbilden konnten, verweisen Studien über nNOS-Knockout-Mäuse auf wesentliche Verhaltensunterschiede zwischen dem weiblichen und männlichen Geschlecht. Eine signifikant inadäquat gesteigerte Aggressivität und Sexualität demonstrierten ausnahmslos männliche nNOS-Knockout-Mäuse, während das weibliche Pendant unabhängig vom Versuchsaufbau kein aggressives Verhalten darbot (Nelson *et al.*, 1995). Da die erhöhte Bereitschaft zu aggressivem Auftreten mit einem hohen Testosteronspiegel korreliert, verglich die genannte Forschungsgruppe die hormonellen Blutspiegel des Wildtyps mit dem der nNOS-Knockout-Mäuse. Es ergaben sich jedoch keine signifikant unterschiedlichen Blutplasmaspiegel. Bemüht um ein Erklärungsmodell hinsichtlich des erfolglosen Nachweises eines Geschlechtsdimorphismus für die LTP in der lateralen Amygdala, zog das zur LTP-Induktion verwendete Reizparadigma unsere Aufmerksamkeit auf sich. Diesbezügliche Nachforschungen charakterisierten das angewandte Reizparadigma als einen ausschlaggebenden Faktor für die LA-LTP. Analog zu unseren Ergebnissen ließen sich keine gender-spezifischen Unterschiede in der LA-LTP nach Hochfrequenzstimulation erkennen (Drephal *et al.*, 2006). Wurde jedoch die LA-LTP durch eine Thetaburststimulation induziert, zeigte sich übereinstimmend mit Resultaten, erhoben im Gyrus dentatus von Urethan-narkotisierter Ratten (Maren, 1995; Maren *et al.*, 1994), dass die Amplitudengröße der LA-LTP zwischen weiblichen und männlichen Versuchstieren differierte (Drephal *et al.*, 2006). Diese nach TBS-Applikation registrierte geringgradig, aber signifikant erhöhte Feldpotenzialamplitude in der weiblichen gegenüber der männlichen Versuchsreihe, konnte auch im basolateralen Kern der Amygdala reproduziert werden (Krezel *et al.*, 2001). Es ist unter anderem bekannt, dass TBS empfindlicher auf pharmakologische und altersabhängige Einflüsse reagiert (Diamond *et al.*, 1996; Hellner *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 1993). Diese Eigenschaft bestätigen unsere Messungen. Die TBS-induzierte LA-LTP ließ sich durch L-NAME vollständig unterdrücken, während die HFS-induzierte LA-LTP durch den unselektiven NO-Synthase Inhibitor lediglich supprimiert wurde.

4.7 Afferenz-abhängige NO-Signalübertragung für die LA-LTP

Da der NO-cGMP-PKG-Signalweg an der Etablierung einer LTP im LA beteiligt ist, lässt sich schlussfolgern, dass an den thalamo-amygdalären Synapsen sowohl eine prä- als auch postsynaptische Modulation der Genexpression und der strukturellen Plastizität vonstattengeht (Ota *et al.*, 2010a; Ota *et al.*, 2010b; Overeem *et al.*, 2010). Dieser Aspekt wird unten weiter ausgeführt. Insgesamt stützen unsere die Untersuchungsergebnisse früherer Arbeitsgruppen bezüglich der NO-Abhängigkeit der LA-LTP bei männlichen Versuchstieren, dessen Reizung über thalamische Afferenzen erfolgte (Schafe *et al.*, 2005). Allerdings unterschieden sich die von uns genutzten Afferenzen. In den verwendeten horizontalen Schnittpräparaten wurden kortikale Bahnen durch die Reizung der externen Kapsel stimuliert und eine NO-abhängige LA-LTP beobachtet. Überdies konnten wir eine NO-Abhängigkeit der EC-induzierten LA-LTP auch bei weiblichen Versuchstieren feststellen.

Die bedeutsame Verknüpfung der unterschiedlichen Eingänge mit den resultierenden molekularen Vorgängen der LA-LTP, stellten detaillierte Untersuchungen der cGMP-abhängigen Proteinkinase her. So führte die Deletion der genetischen Information für die Proteinkinase sowohl bei thalamischen als auch bei kortikalen Zugängen zu einer abgeschwächten LTP im lateralen Nucleus der Amygdala (Paul *et al.*, 2008). Isoformen der cGMP-abhängigen Proteinkinasen sind funktionell mit den Prozessen synaptischer Plastizität als auch des Furchtgedächtnisses in der LA verknüpft. Geht man von der Funktion Stickstoffmonoxids als retrograder Botenstoff aus, so ist zu erwarten, dass der verantwortliche Subtyp der cGMP-abhängigen Proteinkinase sich präsynaptisch lokalisieren lässt. Tatsächlich war ein präsynaptisches und axonales Expressionsmuster im lateralen Kern detektierbar. Überraschenderweise waren die Ergebnisse auch im Zytosol postsynaptischer Nervenzellen positiv, was für eine Beteiligung prä- und postsynaptischer Mechanismen spricht (Paul *et al.*, 2008). Daten aus Forschungsarbeiten über die geschlechtsspezifische Regulation des Gefäßtonus suggerieren bezüglich der Reaktivität der glatten Gefäßmuskulatur auf NO einen Geschlechtsdimorphismus über mögliche hormonelle Einflüsse auf cGMP-abhängige Proteinkinasen (Kahonen *et al.*, 1998). Obwohl ein geschlechtlicher und hormoneller Einfluss die Produktion und Bioaktivität Stickstoffmonoxids höchstwahrscheinlich alteriert, herrscht für Faktoren die in der Signalkaskade NO nachgeschaltet sind weitgehend Unklarheit (Orshal & Khalil, 2004).

4.8 Ang-(1-7) induziert geschlechtsspezifisch eine Suppression der Paired-Pulse-Fazilitierung

Über die Paired-Pulse Methode konnten wir die synaptische Kurzzeitplastizität im lateralen Kern der Amygdala näher analysieren. Das Setzen zweier zeitlich hintereinander gekoppelter Reize bedingt, in Abhängigkeit vom Interstimulusintervall und bezogen auf den ersten Stimulus, eine veränderte Antwortamplitude auf den zweiten Reiz, wobei dessen Relation zueinander die Interpretation der Ergebnisse als Paired-Pulse-Fazilitierung respektive Paired-Pulse-Depression erlaubt. Dieses konstant differierende Antwortverhalten gegenüber zweier zeitlich versetzter Stimuli, beruht am ehesten auf einer präsynaptisch veränderten Kalziumkonzentration (Zinebi *et al.*, 2001; Commins *et al.*, 1998): Bei der Paired-Pulse-Fazilitierung geht man davon aus, dass sich zusätzlich zu dem durch den 1. Reiz intrazellulär verbliebenen Kalziumspiegel, das durch den 2. Reiz in das Neuron strömende Kalzium aufsummiert und somit, basierend auf der hierdurch erhöhten Kalziumkonzentration, die Transmitterfreisetzungsrates steigt. Demgegenüber wird bei der Paired-Pulse-Depression die Präsynapse derartig stark aktiviert, dass der Großteil der Transmittermenge (auch aus dem readily releasable Pool) freigesetzt wird, so dass der eintreffende zweite Reiz diese nicht weiter potenzieren kann und entsprechend eine geringere Antwort bewirkt (Pena *et al.*, 2002). Zusammengefasst moduliert die PPF kurzfristig die Wirksamkeit der synaptischen Transmission.

Wir konnten analog zu den Befunden der Langzeitpotenzierung keine Unterschiede im Paired-Pulse-Verhalten zwischen unbehandelten männlichen und weiblichen Wildtyp-Mäuse feststellen. Gleichermäßen konnte die PPF in der Gruppe unbehandelter eNOS-Knockout-Mäuse interpretiert werden. Allerdings bewirkte Ang-(1-7) bei männlichen Wildtyp Mäusen eine signifikante Paired-Pulse-Depression im lateralen Kern der Amygdala. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass der Grad der initialen Transmitterfreisetzung durch die präsynaptische Transmitterfreisetzungswahrscheinlichkeit definiert wird (Asztely *et al.*, 1996). Verfügt eine präsynaptische Endigung über eine hohe Freisetzungswahrscheinlichkeit, initiiert der erste Reiz bereits eine derartig hohe Transmitterfreisetzung, so dass auf den zweiten Stimulus eine Reduktion der freigesetzten Transmitter registriert werden kann (Paired-Pulse-Depression). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sich das Ausmaß der PPF invers zur initialen Freisetzungswahrscheinlichkeit verhält (Dobrunz & Stevens, 1997). Auf dieser Grundlage lässt sich aus unseren Ergebnissen der Schluss ziehen, dass Ang-(1-7) die Transmitterfreisetzungswahrscheinlichkeit von Glutamat bei männlichen Wildtyp Mäusen steigert, während diese, aufgrund des durch Ang-(1-7) nicht signifikant veränderten Paired-

Pulse-Verhaltens, beim weiblichen Wildtyp unbeeinflusst blieb. Neben diesem Geschlechtsdimorphismus ließ sich interessanterweise bei weiblichen nNOS-Knockout-Mäusen eine signifikant geringere PPF gegenüber der Kontrollgruppe beobachten. In diesem Sinne lässt sich ableiten, dass Ang-(1-7) über die vermehrte Aktivierung der eNOS bei weiblichen Tieren die gesteigerte Glutamatfreisetzung verursacht. Weiterführend bedingt Stickstoffmonoxid, als Produkt der eNOS, diese geschlechtsspezifische Modulation an der präsynaptischen Endigung, die letztlich die Menge an freigesetztem Glutamat in den synaptischen Spalt wesentlich mitbestimmt (Mechanismen sind im Kapitel 1.7.3 ausgeführt).

Neben des hier von uns postulierten Einflusses von Ang-(1-7) respektive NOs auf die glutamaterge Transmission, sind in der Literatur weitere Faktoren für die Paired-Pulse-Depression nachgewiesen. So zeigt sich im Hippocampus, dass das Ausmaß der Doppelpulshemmung bei extrem geringen Interstimulusintervallen (10 bis 20 ms) durch inhibitorische GABA_A-Rezeptoren und bei hohen Stimulusabständen (200 bis 500 ms) durch inhibitorische GABA_B-Rezeptoren moduliert wird. Entsprechend könnte die von uns registrierte Doppelpulshemmung in den ersten 10 ms auch über GABA_A-Rezeptoren vermittelt worden sein, dessen Bedeutung für die Befundinterpretation unten weiter ausgeführt wird. Weitergehend können Prozesse der Paired-Pulse-Hemmung mit einer Depletion des readily releasable pools (Jensen *et al.*, 1999) sowie mit einer Desensibilisierung postsynaptischer Rezeptoren assoziiert sein (Neher, 1998; Kravchenko *et al.*, 2006). Eine zusätzliche Mitbeteiligung wurde gleichermaßen für postsynaptische und NMDA- und AMPA-Rezeptoren nachgewiesen (Shinnick-Gallagher *et al.*, 2003; McKernan & Shinnick-Gallagher, 1997; Zinebi *et al.*, 2001; Zinebi *et al.*, 2002), wobei letztere in ihrer Expressionsdichte bzw. in ihrem Phosphorylierungsgrad modifiziert werden (Carroll *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2000).

Welche neurophysiologische Funktion die durch die PPF hervorgerufene Änderung der Transmitterfreisetzungswahrscheinlichkeit besitzt, wird derzeit noch diskutiert. Dass sich das Paired-Pulse-Verhalten nach Induktion einer LTP ändert, lässt einen präsynaptischen Mechanismus zur Expression einer LTP vermuten. Dabei konnte ebenfalls eine inverse Korrelation zwischen der initialen PPF Amplitude und dem Paired-Pulse-Verhalten festgestellt werden, d. h. initial hohe Amplituden mündeten in einer Paired-Pulse-Depression und geringe in einer Paired-Pulse-Fazilitierung (Schulz *et al.*, 1994). So wird die zuverlässige Funktion der synaptischen Transmission gewährleistet, indem Stimuli mit einer kurzen Reizfolge über die Paired-Pulse-Fazilitierung mit höherer Wahrscheinlichkeit weitergeleitet und amplifiziert werden. Dabei kann das Paired-Pulse-Verhalten das Signal/Rausch-Verhältnis eines Inputs erhöhen. Weiterhin reduziert dieses vom Stimulusintervall abhängige Antwortverhalten die

Wahrscheinlichkeit, dass zufällig generierte Entladungen an die Postsynapse weitergeleitet werden, indem die Paired-Pulse-Depression diese supprimiert (Commins *et al.*, 1998).

Für die valide Interpretation von Paired-Pulse-Befunden ist es folglich immanent wichtig sich zu verdeutlichen, dass wir beim Paired-Pulse-Verhalten ausschließlich indirekten Hinweisen für eine potenziell präsynaptisch beeinflusste Transmitterfreisetzung folgen. Größere Gültigkeit hätten Untersuchungen, die Amplitude und Frequenz von Miniatur(m)-EPSPs bzw. von Miniatur-exzitatorischen postsynaptischen Strömen (mEPSCs) aufzeichnen würden.

So wurde im Gegensatz zu den hier vorgestellten Geschlechtsunterschieden im Paired-Pulse-Verhalten, keine Analogie im medialen Kern der Amygdala nachgewiesen, obwohl hier die Frequenz der mEPSCs bei männlichen präpubertären Tieren signifikant höher war (Cooke & Woolley, 2005b), was vermutlich über eine je nach Geschlecht differierende Synapsenzahl bzw. -organisation vermittelt wird. Nach Entfernung der Hoden ließ sich eine im Vergleich zur Kontrolle signifikant geringere mEPSC-Frequenz registrieren, während das Paired-Pulse-Verhalten keine Unterschiede aufzeigte (Cooke & Woolley, 2009). Die PPF ließ sich in der CA1-Region des Hippocampus weder durch Androgen- noch durch Estrogen-Rezeptorblockade beeinflussen (Pettorossi *et al.*, 2013). In diesem Sinne zeigte sich in der induziert-ischämischen CA1-Region kein Hinweis auf ER- α -vermittelte Effekte auf präsynaptische Prozesse, so dass dessen postulierte protektive Wirkung eher postsynaptisch lokalisiert ist (Dai *et al.*, 2007). Allerdings konnte die Paired-Pulse-Depression im Gyrus Dentatus nach einem Status epilepticus durch Estradiolapplikation vermutlich unter der Vermittlung von GABA_B-Rezeptoren aufrechterhalten werden (Velisek & Veliskova, 2002).

4.9 Aufschlüsselung der Sexualhormonempfindlichkeit relevanter molekularer und anatomischer Protagonisten der LA-LTP in der Funktion eines Erklärungsmodells geschlechtsspezifischer Ang-(1-7)-Wirkung

4.9.1 RAS unter dem Aspekt der Geschlechtsspezifität

Ausgangspunkt für den Diskurs des von uns entdeckten Geschlechtsdimorphismus soll die genauere Betrachtung von Ang-(1-7) und des RAS sein. Die Plasmaspiegel des Peptides Ang-(1-7) sind bei Männern signifikant höher als bei Frauen (Reyes-Engel *et al.*, 2006). Im Rahmen von Analysen der arteriellen Hypertonie fanden sich in der Nierenrinde von weiblichen

Ratten eine höhere ACE-Aktivität sowie ein vermehrtes Vorkommen von Ang-(1-7) im Vergleich zu männlichen Tieren (Bhatia *et al.*, 2013). Kontrovers wird thematisch der Einfluss des Geschlechts auf die therapeutische Wirksamkeit von ACE-Hemmern diskutiert. Wenn auch die basale ACE-Plasmaaktivität von jungen, gesunden Frauen geringer ausfiel als bei vergleichbaren Männern, entsprach sich die Disposition beider Geschlechter für ACE-Inhibitoren (Edeki *et al.*, 1994; Zapater *et al.*, 2004). In der Rede stehende Disparitäten innerhalb des RAS zwischen den Geschlechtern scheinen zumindest teilweise in Zusammenhang mit der Wirkung von Sexualhormonen wie Estrogen und Testosteron zu stehen. Oral verabreichtes Estrogen steigerte den Plasma-Angiotensinogen Spiegel, regulierte das ACE und den AT-1-Rezeptor herab (Fischer *et al.*, 2002) und interagiert mit der Blutkonzentration von Ang-(1-7) (Brosnihan *et al.*, 1999) (Abb. 4.1). Es ergeben sich hieraus entsprechende Hinweise auf eine regulative Interaktion zwischen den Estrogenplasmaspiegeln und der Plasmakonzentration von ACE2 und von Ang-(1-7). Dabei erhöht Estrogen die Plasmakonzentration von ACE2 und entsprechend von Ang-(1-7). Der gerade beschriebene Einfluss wäre bei Frauen entsprechend ihrer höheren Blutplasmaestrogenspiegel stärker ausgeprägt als beim männlichen Geschlecht, so dass dieser konstitutiv höhere Estrogenspiegel möglicherweise für die Ausbildung geschlechtsspezifischer Signalwege prädisponiert, was die von uns beobachtete geschlechtsspezifische Wirkung von Ang-(1-7) auf die neuronale bzw. endotheliale NO-Synthese in gewissem Grade erklärbar macht.

Für das RAS wurde weiterhin ein Androgen-abhängiges Expressionsmuster seiner Bestandteile beschrieben (Chen *et al.*, 1992). Die Ergebnisse geben Hinweise auf einen möglichen organspezifischen Geschlechtsdimorphismus, woraufhin sich die Frage nach dessen Korrelat hinsichtlich der neuroaktiven Angiotensine stellt.

Die Deletion des Angiotensin-Rezeptors Typ 2 (AT₂, AT₂-Rezeptor) zeigte unterschiedliche Konsequenzen bei weiblichen und männlichen Mäusen im Hinblick auf die Themen kognitive Funktion und zerebrale Ischämie (Sakata *et al.*, 2009). Beim weiblichen Geschlecht wurden beträchtliche Einschränkungen der kognitiven Leistungen beobachtet, während das Ausmaß des ischämisch untergegangenen Hirnparenchyms bei männlichen Versuchstieren entsprechend stärker ausgeprägt war.

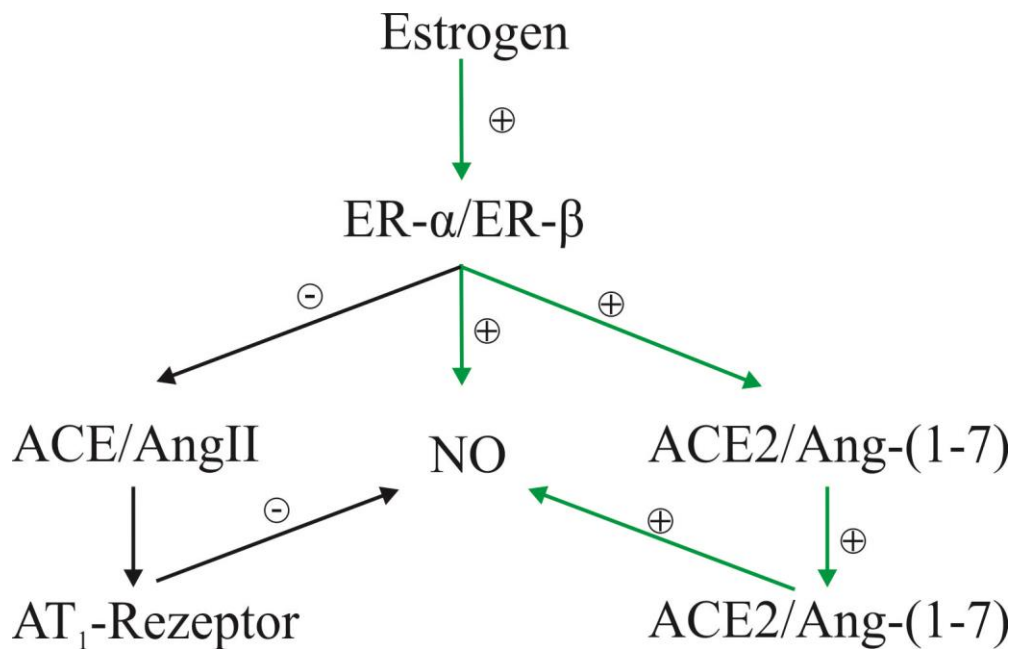


Abb. 4.1 Einfluss von Estrogenrezeptoren auf Bestandteile des RAS
 Estrogen beeinflusst über die Estrogen-Rezeptoren α und β (ER- α , ER- β) das Renin-Angiotensin-System (RAS). Aktivierende Signalwege sind grün, während hemmende schwarz illustriert sind. (modifiziert nach Xue *et al.*, 2013)

4.9.2 Estrogen-Rezeptor Distribution in der Amygdala

Stickstoffmonoxid ist bekanntermaßen involviert in AT_2 -vermittelte synaptische Reaktionen (Carey *et al.*, 2000). Der Regulation des globalen NO-Systems attribuiert man ein Mitwirken von Sexualhormonen. Estrogene sind Steroidhormone, die über nukleäre wie nicht-nukleäre Estrogen-Rezeptoren vom Typ alpha (ER- α) und beta (ER- β) ihre Wirkung u. a. im limbischen System entfalten; in ihrer Distribution je nach Studiendesign hingegen deutlich variieren. Immunhistochemisch wie autoradiografisch konnte im ZNS von Mäusen im basolateralen Kern, inklusive des LA, sowie des basomedialen Nucleus der Amygdala eine geringe Zellzahl und entsprechende Rezeptordichte vom ER- α nachgewiesen werden, während ER- β nicht exprimiert war. Bemerkenswert war die hohe Zellzahl und vor allem die ER- α - und ER- β -Dichte im zentralen und medialen Kernkomplex, wobei die gemessene Estrogen-Rezeptordichte eine der höchsten im gesamten ZNS darstellt (Merchenthaler *et al.*, 2004). Die weitreichende Estrogen-Rezeptor-Expression im Mandelkern lässt demzufolge einen regulativen Einfluss auf synaptogene Prozesse vermuten. Bei Ratten ließen sich dagegen immunhistochemisch geringe Expressionsmuster beider Rezeptortypen im lateralen Kerngebiet anfärben (Blurton-Jones *et al.*, 2004). Das unterschiedliche Rezeptorverteilungsmuster indiziert zusätzlich ein separates zerebrales Aufgabenfeld von ER- α und ER- β in der Vermittlung estrogen-abhängiger

Prozesse. Des Weiteren müssen Speziesunterschiede in der Estrogen-Rezeptor-Verteilung festgehalten und entsprechend gewertet werden.

In diesem Sinne zeigte sich, dass die neonatale Estrogenexposition und das Estrogenrezeptorexpressionsmuster wesentlich beteiligt sind an der Ausbildung struktureller Geschlechtsdimorphismen in der Amygdala (Cao & Patisaul, 2013; Hines *et al.*, 1992). Dabei sind Estrogenrezeptoren bedeutend für die funktionelle wie zytoarchitektonische Entwicklung der Kerngruppen in der Amygdala (siehe Kapitel 4.9.3.2). Interessanterweise konnte zeitlich begrenzt auf den ersten Lebenstag sowohl eine sexuell dimorphe Expression des ER- α in der amygdalo-hippocampalen Region als auch eine sexuell dimorphe Expression des ER- β im dorsolateralen Anteil des medialen Nucleus der Amygdala registriert werden (Cao & Patisaul, 2013). Diese Geschlechtsdimorphismen in der zeitlichen wie räumlichen Estrogenrezeptorexpression während der neonatalen Entwicklung könnten ebenfalls die Grundlage der von uns beschriebenen Geschlechtsunterschiede in der Ang-(1-7)-vermittelten Wirkung auf die LA-LTP darstellen.

4.9.3 Zyklusabhängige Estrogen-Fluktuationen beeinflussen die LA-LTP und Synaptogenese

4.9.3.1 Betrachtung der Hormonspiegel

Die postulierte endokrine Abhängigkeit verpflichtet bei der Dateninterpretation zur Beherrschung der Zyklusphasen des weiblichen Geschlechts. Es beeindruckte, dass die Feldpotenzialamplitude nach HFS-Stimulation der lateralen Amygdala von Ratten im Proöstrus und Östrus höher ausfiel als ihre Entsprechung im Diöstrus (Schubert *et al.*, 2008). Ein potenzielles Erklärungsmodell liefern die hormonellen Schwankungen entsprechend der ablaufenden Zyklusphase. In diesem Sinne steigt im mittleren Proöstrus der Estradiolspiegel steil an, erreicht seinen Höhepunkt, um gleichsam rapide abzufallen. Dieser Peak löst über das Gonadotropin-Releasing Hormon ein Anfluten des Luteinisierenden Hormons (LH) aus, was wiederum einen Anstieg des Progesteronspiegels induziert. Im sich anschließenden frühen Östrus erfolgt die Ovulation und die genannten Hormone fallen auf ihre Basalwerte ab. Im Diöstrus erfolgt ein erneuter Progesteronanstieg, während die Estrogenwerte niedrig bleiben. Neben der deutlich kürzeren Zyklusdauer überlappen sich die Estrogen- und Progesteron-Peaks bei Ratten, während bei der menschlichen Menstruation separate Höchstspiegel auftreten (Radi *et al.*, 2009). Der Erörterung

zyklusabhängiger LA-LTP Unterschiede soll nun die Eruierung der molekularen Signaltransduktion synaptischer Plastizität dienen.

4.9.3.2 Analyse Estrogen-abhängiger Expressionsmuster von Korrelaten molekularer, neurophysiologischer Plastizität

Untersuchungen zeigen, dass Sexualhormone eminenten Einfluss auf Dendritenmorphologie und Muster synaptischer Konnektivität ausüben (Romeo *et al.*, 2005a;Cooke & Woolley, 2005a). Ex abrupto kommt diese Entdeckung nicht, ist die Varianz der Hormonspiegel zu bestimmten Zeitpunkten parallel zur modifizierbaren Geweberezeptibilität doch verantwortlich für die Geschlechtsdifferenzierung bei Säugetieren. So sind sie unerlässlich für Entwicklung und Organisation der Gehirnarhitektur und verantworten folgerichtig Genderunterschiede in den Volumina einzelner Kernstrukturen, der Neuronenzahl und -dichte, der Komplexität dendritischer und synaptischer Verbindungen bis hin zur Expression von Neuropeptiden (De Vries & Simerly, 2002). Vereinfacht gesagt, beeinflussen Estrogene maßgeblich die Entwicklung der neuronalen Zytoarchitektur, d.h. das neuronale Kapital, um dieses kontinuierlich bis phasisch durch aktives Eingreifen in induzierbare Prozesse neuronaler Plastizität zu modulieren. Beispielhaft für den geschlechtsspezifischen Estrogeneinfluss auf die neuronale Entwicklung (als Entsprechung des strukturellen Ausgangskapitals) wurde im Kapitel 4.9.2 eine sexuell dimorphe Estrogenrezeptorexpression für einzelne Kerngruppe der Amygdala beschrieben, die mitverantwortlich ist für funktionelle Geschlechtsdimorphismen innerhalb der Amygdala und somit auch möglicherweise für die von uns beobachteten geschlechtsspezifischen Signalwege im Rahmen der Etablierung einer Langzeitpotenzierung im lateralen Kern der Amygdala.

Als Beispiel für den phasischen bzw. diskontinuierlichen Estrogeneinfluss stellte sich bei Ratten das uterine Expressionsmuster des ER- α im Proöstrus am dichtesten dar, nimmt im Östrus stetig ab und lichtet sich am stärksten im Diöstrus. Auch die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) war im Proöstrus und Östrus hochreguliert. Uterin lassen sich folglich kooperative wie interaktive Prozesse zwischen Estrogenrezeptoren und der MAPK konstatieren (Radi *et al.*, 2009), dessen Korrelat womöglich auch dem ZNS innewohnt. Unter diesem Gesichtspunkt fand sich innerhalb des Hippocampus abhängig von der Zyklusphase ein regional differenziertes ER- α - und ER- β -Expressions- wie Verteilungsmuster (Mendoza-Garces *et al.*, 2011). Die zumindest partielle Modulation amygdalär-gesteuerter Hirnfunktionen durch Estrogene basiert auf der Fähigkeit ihr Rezeptorexpressionsmuster estrogenspiegelabhängig und ortsspezifisch hoch bzw. herab zu regulieren (Osterlund *et al.*, 1998). Weiterhin erhöht sich die Komplexität

der Regulationsmechanismen durch die Kompetenz beider Rezeptoren zur Fusion zu Homodimer unter- bzw. Heterodimeren zwischeneinander. Somit führte die externe Estrogenzufuhr auf physiologische Proöstrusspiegel im lateralen, medialen und basolateralen Kerngebiet der Amygdala weiblicher Ratten zu einer reduzierten Expression von ER- β -mRNA (Shima *et al.*, 2003). In diesem Sinnen bedingen physiologisch hohe Estrogenspiegel im Hippocampus die Drosselung der ER- β -Expression, was wiederum eine Verdichtung neuronaler Dornfortsätze verursacht, so dass von einem inhibitorischer Effekt von ER- β auf die Ausbildung synaptischer Verbindungen ausgegangen werden kann (Szymczak *et al.*, 2006). Als potenzieller Apoptoseinduktor wird die verstärkte ER- β -Expression bei Alzheimerpatienten ätiologisch diskutiert (Savaskan *et al.*, 2001). In der hippocampalen Immunhistochemie offenbarte sich ein statistisch signifikanter Intensitätsanstieg ER- α -markierter Dornfortsätze im Verlauf des Proöstrus gegenüber dem Diöstrus und gesunden männlichen Kontrollen. Dabei hängt die Estrogen-induzierte Synaptogenese, zusätzlich zur Expressionsdichte nicht-nukleärer Estrogen-Rezeptoren, von hochregulierten NMDA-Rezeptoren ab. Schlussfolgernd kann dem inexistenten Estrogeneinfluss auf die männliche Dornfortsatzplastizität ursächlich die insuffiziente NMDA-Rezeptor-Multiplikation und die mangelnde ER- α -Expression zugesprochen werden (Romeo *et al.*, 2005a). Interessanterweise bewirkte 5 α -Dihydrotestosteron (DHT), als Metabolit des Testosteronstoffwechsels, einen signifikanten Dichteanstieg der NMDA-Rezeptoren in der CA1-Region männlicher Ratten (Romeo *et al.*, 2005b); ein Resultat im Einklang mit Androgeneinflüssen auf die Dornfortsatzgenese beider Geschlechter: Testosteron und DHT sind als entsprechende Induktoren identifiziert worden. Minder irritiert darum die geschlechtsneutrale Verbindung zwischen einem altersabhängig sinkenden Androgenspiegel und der korrelativ steigenden Prävalenz neurodegenerativer Erkrankungen, obwohl die Androgen- und Estrogen-Rezeptordistribution einem Geschlechtsdimorphismus unterliegt (Leranth *et al.*, 2004). Wenngleich der Schwerpunkt dieser Diskussion über die geschlechtsspezifische Bedeutung von Isoformen der NO-Synthase für die Ang-(1-7) modifizierte Langzeitpotenzierung in der lateralen Amygdala auf der Erläuterung von Estrogeneinflüssen liegt, sei an dieser Stelle auch auf die Vermittlung von Geschlechtsdimorphismen durch Androgenwirkung hingewiesen. So werden Geschlechtsunterschiede in der Synaptogenese der Amygdala vermutlich ebenfalls durch einen direkten Androgeneinfluss über Androgenrezeptoren in den ersten zwei Lebenswochen vermittelt, was potenziell auch die in dieser Arbeit observierte Ang-(1-7)-Wirkung auf die nNOS beim männlichen Geschlecht mitverantworten könnte (Morys *et al.*, 1998;Cao & Patisaul, 2013).

4.9.3.3 Estrogen-abhängige Signaltransduktion zur Etablierung einer LA-LTP

Der Rekurs von der Synaptogenese zurück zur LA-LTP führt über die MAPK. Als intrazelluläre Signaltransduktionsweg ist die MAPK-Kaskade an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt, darunter Entzündungsmodulation, Zelldifferenzierung und -wachstum (Ono & Han, 2000) sowie an neuronalen Plastizitätsveränderung in der Amygdala (Schafe *et al.*, 2000). Auch eine Phosphorylierung der NR2-Untereinheit von postsynaptischen NMDA-Rezeptoren wurde beschrieben (Bi *et al.*, 2001). Die MAPK-Kaskade kann als ein Archetyp des Einflusses zyklusabhängiger Estrogenschwankungen auf die Ausprägung einer hippocampalen wie amygdalären LTP interpretiert werden (Schubert *et al.*, 2008). Die MAPK verkörpert einen fundamentalen Baustein der frühen BLA-LTP (Merino & Maren, 2006), der Rekonsolidierung des auditiven Furchtgedächtnisses (Duvarci *et al.*, 2005) sowie der Spätphase der LA-LTP (Huang *et al.*, 2000). Dazukommend repräsentiert die Extracellular-signal regulated Kinase (ERK) als Untergruppe der MAPK einen wesentlichen Faktor in der Etablierung der LA-LTP, da sie gleichermaßen über Phosphorylierung in intrazelluläre wie intranukleäre Signalwege eingreift (z.B. CREB) und dadurch sowohl prä- als auch postsynaptisch synaptogene Prozesse moduliert (Schafe *et al.*, 2000). Interessanterweise zeigte sich eine Stunden nach dem Beginn der Furchtkonditionierung im ventralen Hippocampus eine höherer Konzentration aktivierter ERKs bei männlichen Tieren (Gresack *et al.*, 2009). Neben diesem Geschlechtsdimorphismus ist besonders die postulierte Verbindung zwischen $GLUR_{K5}$ -Rezeptoragonisten und der MAP-Kinase in der lateralen Amygdala hervorzuheben, da diese spezifische Rezeptoraktivierung die LA-LTP in der männlichen Kohorte supprimierte und in der weiblichen fasilitierte (Schubert *et al.*, 2008). Gleichzeitig kann hierdurch ein Estrogeneinfluss auch auf nicht NMDA-Rezeptoren, sog. Kainat-Rezeptoren vermutet werden, wie es für die Modulation hippocampaler AMPA- und Kainat-Rezeporen über eine augmentierte glutamaterge Transmission durch Aktivierung der cAMP-PKA-Kaskade beschrieben ist (Gu & Moss, 1998).

Für die LTP-Forschung sollte die beschriebene Existenz des Estrogen-gebundenen Signalweges allerdings nicht als Einzelfall archiviert werden, vielmehr sind weitere Korrelate zu identifizieren. C-fos, CREB und brain derived neurotrophic factor (BDNF) repräsentieren weitere durch zyklische Estrogenschwankungen beeinflussbare, für Signaltransduktionsprozesse der LA-LTP als elementar diskutierte Mosaik (Radi *et al.*, 2009). Dabei wurde additional zum koexistenten Expressionsmuster von ER- α und BDNF in der lateralen Amygdala der regulative Estrogeneinfluss, vermutlich über die Hemmung GABAerger Afferenzen, auf die BDNF-Expression charakterisiert (Blurton-Jones *et al.*, 2004), was die postulierte Relation

zwischen amygdaloider synaptischer Plastizität und BDNF weiter konsolidiert (Albrecht & von Bohlen und Halbach, 2008). CREB ist ebenfalls Estrogen-abhängig modulierbar, bindet phosphoryliert an BDNF-Promotoren und potenziert die BDNF-Expression in der Amygdala zur Unterstützung der Konsolidierung des Furchtgedächtnisses (Rasia-Filho *et al.*, 2012; Ou & Gean, 2007). In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass im Rahmen der Furchtkonditionierung das Expressionsmuster von BDNF-mRNA CaMKII α -abhängig in der CA1-Region ausschließlich bei männlichen Tieren hochreguliert war, während die BDNF-mRNA bei weiblichen Tieren CaMKII α -unabhängig herabreguliert war (Mizuno *et al.*, 2006). Außer CREB binden auch weitere Kofaktoren, wie c-fos, zur Genregulation an die spezifische DNS-Sequenz des cAMP response element (CRE). Dabei verhielt sich das c-fos-Expressionsmuster während der Konsolidierung von räumlichen Gedächtnisinhalten beispielsweise im Hippocampus sexspezifisch, indem es nur bei weiblichen Tieren vermehrt exprimiert wurde (Mendez-Lopez *et al.*, 2009). Die beschriebenen Estrogeneinflüsse auf die einzelnen Komponenten der LA-LTP sollen die potenzielle Estrogenwirkung auf unmittelbar induzierte Prozesse synaptischer Plastizität verdeutlichen, da diese womöglich auch die Expression der unterschiedlichen NO-Synthasen bzw. dessen Ansprechen auf Ang-(1-7) im Rahmen der Ausbildung einer LA-LTP mitbeeinflusst.

4.9.4 Estrogeneinfluss auf Isoenzyme der NO-Synthase

Die Aktivierung von Estrogen-Rezeptoren vom Typ alpha durch 17 β -Estradiol (Hodgin *et al.*, 2001) mündete zum einen in einer verstärkten Expression der eNOS in Endothelzellen (Hodgin *et al.*, 2002), zum anderen konnte die nNOS-Aktivität im ZNS hochreguliert werden (Scordalakes *et al.*, 2002; Ceccatelli *et al.*, 1996; Rachman *et al.*, 1998). Zumindest diese verstärkte eNOS-Expression, vermittelt durch den ER- α , könnte das alleinige Ansprechen der eNOS auf Ang-(1-7) bei weiblichen Mäusen mitbeeinflussen. Parallel führte die Orchidektomie (Hodenentfernung) zu einer signifikanten Aktivitätssteigerung der nNOS im Kleinhirn, Hypothalamus und Amygdala, jedoch nicht in Kortexarealen. Der stärkste Anstieg ließ sich in der Amygdala und im Hypothalamus messen. Androgene wiederum verringerten die nNOS-Aktivität je nach Hirnregion in unterschiedlichem Ausmaß (Singh *et al.*, 2000). Vergleichbares ergaben immunhistochemische Verfahren, die eine Interaktion zwischen Estrogen- und Androgenrezeptoren für eine ortsspezifischen Regulation der nNOS im Hirnparenchym verantwortlich sehen (Scordalakes *et al.*, 2002). Dies könnte unter Umständen die geschlechtsspezifische Wirkung von Ang-(1-7) auf die nNOS-Aktivität mitbeeinflussen. Die

genannte Arbeitsgruppe fand außerdem ein geschlechtsspezifisches Immunreaktivitätsmuster in der Area preoptica. Zusammengefasst ergänzen die Befunde frühere Daten über hormonelle Einflüsse von Steroidhormonen, die ein divergierendes nNOS-Expressionsmuster der Geschlechter im Kleinhirn und Hypophysenvorderlappen beschreiben (Gonzalez-Hernandez & Gonzalez, 2000; Weiner *et al.*, 1994).

Neurophysiologisch evident gestaltet sich die stimulierende Estrogenwirkung auf die neuronale NO-Produktion *in vitro* über eine Estrogenrezeptor-abhängige Kopplung der nNOS an die NR2B-Untereinheit von NMDA-Rezeptoren, was dadurch parallel nicht genomische Estrogeneinflüsse auf die NO-Synthese über die Alteration glutamaterger Ionenströme demonstriert (d'Anglemont, X *et al.*, 2009). Möglicherweise spielt diese Interaktion gleichermaßen eine Rolle für die vermehrte Glutamatfreisetzung durch Ang-(1-7) bei männlichen Mäusen.

Argumentativ harmonieren unsere Ergebnisse mit dem Gesagten. So fanden wir in der vorliegenden Arbeit keine Unterschiede in der Amplitudenstärke der LA-LTP zwischen weiblichen und männlichen Versuchstieren. Es ist demzufolge anzunehmen, dass in der weiblichen Stichprobe alle Zyklusphasen erfasst wurden. Dessen ungeachtet ist angesichts des ermittelten enzymatischen Geschlechtsdimorphismus zu vermuten, dass in der weiblichen eNOS-Knockout-Reihe der Wirkungsgrad von Ang-(1-7) innerzyklisch deutlich variiert. Die vaginale Schleimhaut von Ratten mit intaktem Sexualzyklus wies die niedrigste eNOS-Expression im Verlauf des Diöstrus auf, während das stärkste eNOS-Muster im Proöstrus registriert wurde. Die phasischen Expressionsmuster decken sich mit geringen und hohen Estrogenplasmaspiegeln (Berman *et al.*, 1998). Estrogen entfaltet seine regulative Wirkung auf die eNOS zum einen über genomische Prozesse mit verstärkter mRNA Transkription wie Proteinsynthese zum anderen über nicht genomische Mechanismen, die keine Änderung des genetischen Expressionsmusters bedingen (Musicki *et al.*, 2009).

4.9.5 Zusammenschau molekulare Mechanismen der LA-LTP unter Einfluss von Ang-(1-7) und Estrogen

Die Abbildung 4.2 versucht die molekularen Mechanismen der LA-LTP zeitlich geordnet ausgehend von der normalen synaptischen Übertragung zwischen Prä- und Postsynapse (1) über die Realisierung der frühen Phase einer LTP (2) bis hin zur Konsolidierungsphase (späte LTP) (3) grafisch zusammenzufassen. Diese Darstellung konzentriert sich dabei auf Signalkaskaden, die in dieser Arbeit Erwähnung finden und unter Einfluss von Ang-(1-7), Stickstoffmonoxid und

Estrogen stehen, wobei die schwarz markierten (*) Signalstoffe Geschlechtsdimorphismen anderer Hirnregionen hervorheben, während die mit weiß markierten (*) Moleküle Amygdala-spezifisch sind. Die in der Abb. 4.2 (modifiziert nach Fraga-Silva *et al.*, 2013;Gironacci *et al.*, 2014;LeDoux, 2007;Orsini & Maren, 2012;Johansen *et al.*, 2011;Holscher, 1997;Lange *et al.*, 2012;Pape & Pare, 2010;Xu *et al.*, 2011;d'Anglemont, X *et al.*, 2009;Mizuno & Giese, 2010;Albrecht & von Bohlen und Halbach, 2008;Kandel & Schwartz, 2000) verwendeten Abkürzungen werden im Abkürzungsverzeichnis aufgeschlüsselt.

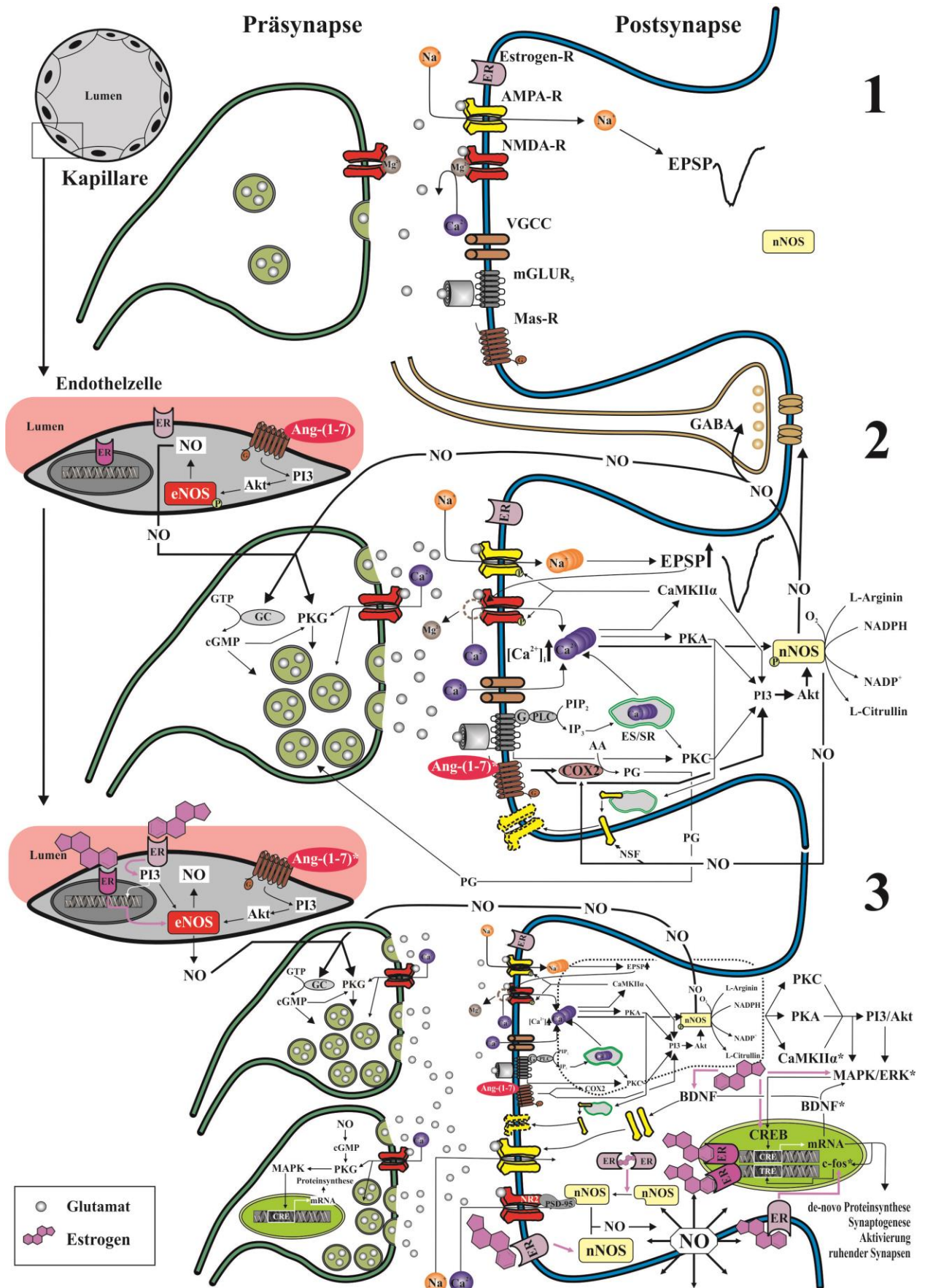


Abb. 4.2 Molekulare Mechanismen der Langzeitpotenzierung in der lateralen Amygdala
Für Erläuterungen siehe Kapitel 4.9.5

4.10 Ausblick: Gender-abhängige Mediation der Ang-(1-7)-Effekte über nNOS und eNOS datierend für neue Therapieansätze zerebraler Erkrankungen?

In dieser Arbeit wird erstmalig ein Geschlechtsdimorphismus grundlegender Ang-(1-7)-vermittelter neurophysiologischer Prozesse nachgewiesen. Wir konnten demonstrieren, dass die eNOS die entscheidende NO-Synthase zur Mediation der Ang-(1-7)-Wirkung beim weiblichen Geschlecht darstellt, während die nNOS die substanzielle NO-Synthase für das männliche Pendant verkörpert.

Ang-(1-7) antwortet auf eine durch Minderperfusion bedingte Ischämie neuronalen Parenchyms initial mit einer Stimulation der lokalen NO-Synthase über eine hochregulierte eNOS-Expression (Zhang *et al.*, 2008). Das via eNOS synthetisierte NO begünstigt die Ausbildung von Kollateralen, verbessert die mikrovaskuläre Perfusion in der Penumbra und ist als neuroprotektiver Faktor etabliert (Veltkamp *et al.*, 2002). Neurophysiologisch wird als übergeordnete Institution der neuronal, aber wie kürzlich erkannt wurde, auch in geringen Anteilen in Endothelzellen zerebraler Blutgefäßwände vorkommende Mas-Rezeptor für die Ang-(1-7)-vermittelte eNOS-Aktivitätssteigerung verantwortlich gemacht (Mecca *et al.*, 2011). Es gibt Hinweise, dass sich die initiierte Kaskade in die kooperative Aktivierung des vascular endothelial growth factor (VEGF) und der Kinase Akt aufzweigt, was über eine gesteigerte eNOS-Phosphorylierung die NO-Syntheseleistung augmentieren soll (Osuka *et al.*, 2004). Es sei daran erinnert, dass der PI3-Kinase/Akt-Pathway wichtige LTP-Zweigstellen, darunter die Aktivierung der PKC, die Verlinkung von NMDA-Rezeptoraktivierung und Extracellular-signal regulated Kinasen (ERK) als auch die Diffusion von AMPA-Rezeptoren, bedient (Sui *et al.*, 2008). Möglicherweise erfolgt die im Rahmen zerebraler Insulte neuroprotektiv wirkende, Ang-(1-7)-vermittelte Hemmung der iNOS (Mecca *et al.*, 2011) auch unter Beteiligung der PI3/Akt-Signaltransduktion.

Hierzu konträr erwies sich die Rolle der nNOS für die reaktiv, einer zerebralen Ischämie folgenden pathophysiologischen Prozesse. So verbesserte die gezielte Inhibition der nNOS das Outcome der zuvor minderperfundierten Hirnareale, was am ehesten mit neurotoxischen Fähigkeiten der nNOS beispielsweise zur Apoptoseinduktion erklärbar ist (Jiang *et al.*, 2002).

Es ist wichtig anzumerken, dass Ang-(1-7) in zwei unabhängigen Studien die Infarktgröße signifikant reduzierte (Regenhardt *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2012). Weitere durch Ang-(1-7) tangierte Entitäten der Signaltransduktion sind Arachidonsäure, Prostaglandine, Vasopressin und endothelium-derived hyperpolarisation factor (EDHF) (Xu *et al.*, 2011), wobei PI3/Akt, ERK,

COX-2 und NO unter der gemeinsamen Ägide der Ang-(1-7)/Mas-Achse etabliert sind (Passos-Silva *et al.*, 2013). Die exakten Mechanismen, auf die sich die neuroprotektiven Effekte von Ang-(1-7) gründen, sind lediglich fragmentarisch verstanden, limitieren jedoch offenbar pro-inflammatorische Zytokine, NF- κ B Expression sowie Apoptoseinduktion und oxidativen Stress unter Aktivierung des Mas-Rezeptors (Jiang *et al.*, 2012;Pena Silva & Heistad, 2014). Diese Ergebnisse suggerieren potenzielle neuroprotektive Eigenschaften von Ang-(1-7) in der Frühphase Ischämie bedingter zerebraler Insulte. Um diesen möglichen Therapieansatz in der Akutphase zerebraler Insulte näher klassifizieren zu können, erfordert es weitergehende Forschungsbemühungen; sicherlich auch unter dem Aspekt der Genderspezifität.

Neuere Studien demonstrierten einen Geschlechtsdimorphismus für den Einfluss der RAS-Genotypen auf die ACE Plasmakonzentration und den Ang II/Ang-(1-7)-Quotienten (Reyes-Engel *et al.*, 2006;Lynch *et al.*, 2007;Danser *et al.*, 1998). Bisher wurde der Insertions-/Deletionsdimorphismus (I/D) des ACE-Gens am präzisesten analysiert: die Deletion einer 287-bp-DNA-Sequenz im Intron 16 führt zu einem Anstieg der Serum-ACE-Konzentration und damit u.a. zu einem potenzierten Myokardinfarkt-Risiko. Der Polymorphismus resultiert in drei Genotypen: homozygot für die Deletion (DD) oder die Insertion (II) und heterozygot (ID), wobei DD die höchsten und II die niedrigsten ACE-Spiegel bedingen. Es gibt Hinweise, dass das D Allel bzw. der DD Genotyp verantwortlich sind für hohe ACE-Konzentrationen bei Frauen, während die Spiegel bei Männern als Genotyp-unabhängig postuliert wurden (Danser *et al.*, 1998). Des Weiteren war die Inzidenz des II Genotyps bei Patientinnen mit zerebraler Ischämie signifikant geringer als bei Patienten (Markoula *et al.*, 2011). Demzufolge geht der Trend des Geschlechtsdimorphismus hin zu eher ungünstigen Effekten des D Allels und DD Genotyps ausschließlich für Patientinnen, nicht für Patienten. Diese Entdeckungen sind von großer Tragweite für das Verständnis der Geschlechtsspezifität in puncto Ang-(1-7). So wird die inverse Relation der Ang II-/Ang-(1-7)-Plasmaspiegel durch den ACE-Genpolymorphismus verfügt (Ocaranza *et al.*, 2006). Diese genetisch determinierte ACE-Aktivität lässt somit auch höhere Ang-(1-7)-Plasmaspiegel bei II und ID als bei DD je nach Geschlecht vermuten und könnte lancierend auf das Verständnis des in dieser Arbeit dargestellten Geschlechtsdimorphismus wirken.

Mas-defiziente Versuchstiere wurden unter dem Aspekt ihrer Variabilität im Angstverhalten in dem Elevated plus maze analysiert (Walther *et al.*, 1998;von Bohlen und & Albrecht, 2006). Das elevated plus maze ist ein erhöht über dem Boden gelegenes, kreuzförmiges Labyrinth bestehend aus zwei „offenen“ und zwei lateral begrenzten, „geschlossenen“ Armen und dient in der Forschung zur Exploration des Angstverhaltens bei Nagetieren, die physiologischerweise den

Aufenthalt in den „geschlossenen“ Armen bevorzugen; eine Präferenz die unter anxiogenen Einflüssen zunimmt. Männliche, Mas-defiziente Mäuse betreten die offenen Arme der Maze signifikant seltener und verbleiben dort nur temporär im Vergleich zur Kontrollgruppe (Walther *et al.*, 1998). Konträr hierzu zeigte das weibliche, Mas-defiziente Pendant keine Abweichungen zur Kontrollreihe auf (Walther *et al.*, 2000). In Bezug auf das eben Gesagte indizieren die Daten der Verhaltensanalyse ein signifikant höheres Angstniveau der männlichen Mas-Defizienz-Stichprobe, was dem Fehlen des Mas-Proteins einen gender-spezifischen Einfluss auf das Angstverhalten zuspricht.

Für weitere klinische Relevanz sorgen Forschungsergebnisse, die für die hypothetische Partizipation der iNOS und nNOS, exklusive der eNOS, an neurodegenerativen Erkrankungen plädieren (Joniec *et al.*, 2009). Anreiz für die genannten Investigationen gab u.a. die weiterhin unverstandene Pathophysiologie, die grundlegend das männliche Geschlecht als Risikofaktor am Morbus Parkinson zu erkranken, charakterisiert (Wooten *et al.*, 2004). Die experimentelle Induktion neurodegenerativer Prozesse konnte Geschlechtsunterschiede in dem reaktiven Expressionsmuster der nNOS und iNOS aufzeigen (Joniec *et al.*, 2009). Zusammenhänge mit möglichen protektiven Estrogeneffekten werden diskutiert, doch detaillierte Modalitäten verbleiben unzureichend.

Die weitgehend unerforschten Genderunterschiede bezüglich der Alzheimer Krankheit und anderer neurodegenerativer Erkrankungen bergen allerdings zukunftssträchtige Perspektiven für die Entwicklung innovativer Leitlinien zu patientenadaptierten Therapien. Erste Schritte in diese Richtung stellen die unter antihypertensiver Therapie mit ACE-Hemmern per accidens beobachtete Verbesserung kognitiver Funktionen bei Älteren und insbesondere Alzheimer-Patienten gegenüber Kontrollen dar und legen die Vermutung nahe, dass die arzneimittelinduzierten höheren Ang-(1-7)-Spiegel als hierfür mitverantwortlich anzusehen sind (von Bohlen und & Albrecht, 2006). AT₁-Rezeptor-Antagonisten (Sartane) konnten im Tiermodell zerebraler Ischämien die Infarktgröße und darauffolgende neurologische Defizite reduzieren (Groth *et al.*, 2003). Diese neuro- und vaskuloprotektiven Effekte der Sartantherapie werden gewiss partiell über die Aktivierung der ACE2-Ang-(1-7)-Mas-Achse ausgelöst, da multiple Studien an Mensch und Tier die gesteigerte ACE2-Expression einhergehend mit vermehrter Produktion von Ang-(1-7) bestätigten (Ferreira *et al.*, 2010). Der klinische Stellenwert manifestiert sich komplettierend in der offenbar zentralen Rolle endothelialer Dysfunktion für die zerebrale Pathophysiologie von Depression und Amyloidablagerung im Rahmen der Alzheimer Krankheit (Isingrini *et al.*, 2009). Die Daten sprechen für sich und lassen

auf die hierauf basierende Entwicklung neuer Therapieansätze in der Behandlung neurodegenerativer, neurovaskulärer und neuroinflammatorischer Erkrankungen hoffen.

5 Literaturverzeichnis

Adolphs R, Tranel D, & Damasio AR (1998). The human amygdala in social judgment. *Nature* **393**, 470-474.

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.

Albrecht D (2007). Angiotensin-(1-7)-induced plasticity changes in the lateral amygdala are mediated by COX-2 and NO. *Learn Mem* **14**, 177-184.

Albrecht D (2010). Physiological and pathophysiological functions of different angiotensins in the brain. *British Journal of Pharmacology* **159**, 1392-1401.

Albrecht D & von Bohlen und Halbach O (2008). Cellular cognition: A focus on LTP and LTD in the lateral nucleus of the amygdala. In *Synaptic Plasticity: New Research*, ed. T.F.Kaiser and F.J.Peters, pp. 271-311. Nova Science Publishers, Inc..

Alenina N, Xu P, Rentzsch B, Patkin EL, & Bader M (2008). Genetically altered animal models for Mas and angiotensin-(1-7). *Exp Physiol* **93**, 528-537.

Allen AM, O'Callaghan EL, Chen D, & Bassi JK (2009). Central neural regulation of cardiovascular function by angiotensin: a focus on the rostral ventrolateral medulla. *Neuroendocrinology* **89**, 361-369.

Amaral DG, Capitanio JP, Jourdain M, Mason WA, Mendoza SP, & Prather M (2003). The amygdala: is it an essential component of the neural network for social cognition? *Neuropsychologia* **41**, 235-240.

Anderson AK & Phelps EA (2002). Is the human amygdala critical for the subjective experience of emotion? Evidence of intact dispositional affect in patients with amygdala lesions. *J Cogn Neurosci* **14**, 709-720.

Ardailou R & Chansel D (1997). Synthesis and effects of active fragments of angiotensin II. *Kidney Int* **52**, 1458-1468.

Asztely F, Xiao MY, & Gustafsson B (1996). Long-term potentiation and paired-pulse facilitation in the hippocampal CA1 region. *Neuroreport* **7**, 1609-1612.

Bao AM & Swaab DF (2010). Sex differences in the brain, behavior, and neuropsychiatric disorders. *Neuroscientist* **16**, 550-565.

Barjavel MJ & Bhargava HN (1995). Nitric oxide synthase activity in brain regions and spinal cord of mice and rats: kinetic analysis. *Pharmacology* **50**, 168-174.

Barsegyan A, McGaugh JL, & Roozendaal B (2014). Noradrenergic activation of the basolateral amygdala modulates the consolidation of object-in-context recognition memory. *Front Behav Neurosci* **8**, 160.

Becker LK, Etelvino GM, Walther T, Santos RA, & Campagnole-Santos MJ (2007). Immunofluorescence localization of the receptor Mas in cardiovascular-related areas of the rat brain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**, H1416-H1424.

Beery AK & Zucker I (2011). Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neurosci Biobehav Rev* **35**, 565-572.

Berman JR, McCarthy MM, & Kyprianou N (1998). Effect of estrogen withdrawal on nitric oxide synthase expression and apoptosis in the rat vagina. *Urology* **51**, 650-656.

Bhatia K, Zimmerman MA, & Sullivan JC (2013). Sex differences in angiotensin-converting enzyme modulation of Ang (1-7) levels in normotensive WKY rats. *Am J Hypertens* **26**, 591-598.

Bi R, Foy MR, Vouimba RM, Thompson RF, & Baudry M (2001). Cyclic changes in estradiol regulate synaptic plasticity through the MAP kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13391-13395.

Blackshaw S, Eliasson MJ, Sawa A, Watkins CC, Krug D, Gupta A, Arai T, Ferrante RJ, & Snyder SH (2003). Species, strain and developmental variations in hippocampal neuronal and endothelial nitric oxide synthase clarify discrepancies in nitric oxide-dependent synaptic plasticity. *Neuroscience* **119**, 979-990.

Blurton-Jones M, Kuan PN, & Tuszynski MH (2004). Anatomical evidence for transsynaptic influences of estrogen on brain-derived neurotrophic factor expression. *J Comp Neurol* **468**, 347-360.

Bon CL & Garthwaite J (2003). On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* **23**, 1941-1948.

Bonelli SB, Powell R, Yogarajah M, Thompson PJ, Symms MR, Koeppe MJ, & Duncan JS (2009). Preoperative amygdala fMRI in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* **50**, 217-227.

Brosnihan KB, Li P, & Ferrario CM (1996). Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension* **27**, 523-528.

Brosnihan KB, Senanayake PS, Li P, & Ferrario CM (1999). Bi-directional actions of estrogen on the renin-angiotensin system. *Braz J Med Biol Res* **32**, 373-381.

Cahill L, Uncapher M, Kilpatrick L, Alkire MT, & Turner J (2004). Sex-related hemispheric lateralization of amygdala function in emotionally influenced memory: an FMRI investigation. *Learn Mem* **11**, 261-266.

Canteras NS & Swanson LW (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.

Cao J & Patisaul HB (2013). Sex-specific expression of estrogen receptors alpha and beta and *Kiss1* in the postnatal rat amygdala. *J Comp Neurol* **521**, 465-478.

Carey RM, Jin X, Wang Z, & Siragy HM (2000). Nitric oxide: a physiological mediator of the type 2 (AT₂) angiotensin receptor. *Acta Physiol Scand* **168**, 65-71.

Carlsen J (1988). Immunocytochemical localization of glutamate decarboxylase in the rat basolateral amygdaloid nucleus, with special reference to GABAergic innervation of amygdalostriatal projection neurons. *J Comp Neurol* **273**, 513-526.

Carroll RC, Beattie EC, von ZM, & Malenka RC (2001). Role of AMPA receptor endocytosis in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* **2**, 315-324.

Ceccatelli S, Grandison L, Scott RE, Pfaff DW, & Kow LM (1996). Estradiol regulation of nitric oxide synthase mRNAs in rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* **64**, 357-363.

Chapman PF, Kairiss EW, Keenan CL, & Brown TH (1990). Long-term synaptic potentiation in the amygdala. *Synapse* **6**, 271-278.

Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, & Ferrario CM (1990). Processing of angiotensin peptides by NG108-15 neuroblastoma x glioma hybrid cell line. *Peptides* **11**, 375-380.

Chavez CM, McGaugh JL, & Weinberger NM (2009). The basolateral amygdala modulates specific sensory memory representations in the cerebral cortex. *Neurobiol Learn Mem* **91**, 382-392.

Chen YF, Naftilan AJ, & Oparil S (1992). Androgen-dependent angiotensinogen and renin messenger RNA expression in hypertensive rats. *Hypertension* **19**, 456-463.

Chien WL, Liang KC, Teng CM, Kuo SC, Lee FY, & Fu WM (2003). Enhancement of long-term potentiation by a potent nitric oxide-guanylyl cyclase activator, 3-(5-hydroxymethyl-2-furyl)-1-benzyl-indazole. *Mol Pharmacol* **63**, 1322-1328.

Christopherson KS, Hillier BJ, Lim WA, & Brecht DS (1999). PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J Biol Chem* **274**, 27467-27473.

Ciobica A, Bild W, Hritcu L, & Haulica I (2009). Brain renin-angiotensin system in cognitive function: pre-clinical findings and implications for prevention and treatment of dementia. *Acta Neurol Belg* **109**, 171-180.

Colas D, Gharib A, Bezin L, Morales A, Guidon G, Cespuglio R, & Sarda N (2006). Regional age-related changes in neuronal nitric oxide synthase (nNOS), messenger RNA levels and activity in SAMP8 brain. *BMC Neurosci* **7**, 81.

Commins S, Gigg J, Anderson M, & O'Mara SM (1998). Interaction between paired-pulse facilitation and long-term potentiation in the projection from hippocampal area CA1 to the subiculum. *Neuroreport* **9**, 4109-4113.

Contrepas A, Walker J, Koulakoff A, Franek KJ, Qadri F, Giaume C, Corvol P, Schwartz CE, & Nguyen G (2009). A role of the (pro)renin receptor in neuronal cell differentiation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **297**, R250-R257.

Cooke BM & Woolley CS (2005a). Gonadal hormone modulation of dendrites in the mammalian CNS. *J Neurobiol* **64**, 34-46.

Cooke BM & Woolley CS (2005b). Sexually dimorphic synaptic organization of the medial amygdala. *J Neurosci* **25**, 10759-10767.

Cooke BM & Woolley CS (2009). Effects of prepubertal gonadectomy on a male-typical behavior and excitatory synaptic transmission in the amygdala. *Dev Neurobiol* **69**, 141-152.

d'Anglemont dT, X, Campagne C, Steculorum S, & Prevot V (2009). Estradiol induces physical association of neuronal nitric oxide synthase with NMDA receptor and promotes nitric oxide formation via estrogen receptor activation in primary neuronal cultures. *J Neurochem* **109**, 214-224.

Dachtler J, Hardingham NR, & Fox K (2012). The role of nitric oxide synthase in cortical plasticity is sex specific. *J Neurosci* **32**, 14994-14999.

Dai X, Chen L, & Sokabe M (2007). Neurosteroid estradiol rescues ischemia-induced deficit in the long-term potentiation of rat hippocampal CA1 neurons. *Neuropharmacology* **52**, 1124-1138.

Damasio AR (1996). The somatic marker hypothesis and the possible functions of the prefrontal cortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **351**, 1413-1420.

Danser AH, Derkx FH, Schalekamp MA, Hense HW, Riegger GA, & Schunkert H (1998). Determinants of interindividual variation of renin and prorenin concentrations: evidence for a sexual dimorphism of (pro)renin levels in humans. *J Hypertens* **16**, 853-862.

Davern PJ & Head GA (2011). Role of the medial amygdala in mediating responses to aversive stimuli leading to hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **38**, 136-143.

Davis CJ, Kramar EA, De A, Meighan PC, Simasko SM, Wright JW, & Harding JW (2006). AT4 receptor activation increases intracellular calcium influx and induces a non-N-methyl-D-aspartate dependent form of long-term potentiation. *Neuroscience* **137**, 1369-1379.

Davis M & Whalen PJ (2001). The amygdala: vigilance and emotion. *Mol Psychiatry* **6**, 13-34.

Davisson RL (2003). Physiological genomic analysis of the brain renin-angiotensin system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **285**, R498-R511.

de Olmos JS, Alheid GF, & Beltraminio CA (1985). Amygdala. In *The Rat Nervous System*, ed. Paxinos G, pp. 223-334. Academic Press, Sydney.

De Vries GJ & Simerly RB (2002). Anatomy, development, and function of sexually dimorphic neural circuits in the mammalian brain. In *Hormones, brain and behavior*, ed. Pfaff DW, pp. 137-191. Elsevier, San Diego.

Dellacherie D, Hasboun D, Baulac M, Belin P, & Samson S (2011). Impaired recognition of fear in voices and reduced anxiety after unilateral temporal lobe resection. *Neuropsychologia* **49**, 618-629.

Demas GE, Kriegsfeld LJ, Blackshaw S, Huang P, Gammie SC, Nelson RJ, & Snyder SH (1999). Elimination of aggressive behavior in male mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *J Neurosci* **19**, RC30.

Diamond DM, Branch BJ, & Fleshner M (1996). The neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) enhances hippocampal primed burst, but not long-term, potentiation. *Neurosci Lett* **202**, 204-208.

Diehl RR (2011). Funktion und Symptomatik einzelner Hirnregionen. In *Klinische Neurologie* pp. 640. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.

Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A, & Snyder SH (1994). Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4214-4218.

Dobrunz LE & Stevens CF (1997). Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron* **18**, 995-1008.

Doyere V, Schafe GE, Sigurdsson T, & LeDoux JE (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.

Doyle CA & Slater P (1997). Localization of neuronal and endothelial nitric oxide synthase isoforms in human hippocampus. *Neuroscience* **76**, 387-395.

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.

Dunn BD, Dalgleish T, & Lawrence AD (2006). The somatic marker hypothesis: a critical evaluation. *Neurosci Biobehav Rev* **30**, 239-271.

Duvarci S, Nader K, & LeDoux JE (2005). Activation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase cascade in the amygdala is required for memory reconsolidation of auditory fear conditioning. *Eur J Neurosci* **21**, 283-289.

Echeverry MB, Guimaraes FS, & Del Bel EA (2004). Acute and delayed restraint stress-induced changes in nitric oxide producing neurons in limbic regions. *Neuroscience* **125**, 981-993.

Edeki T, Johnston A, Li Kam WE, & Turner P (1994). Enalapril pharmacokinetics and ACE inhibition, following single and chronic oral dosing. *Int J Clin Pharmacol Ther* **32**, 142-146.

Ehrlich I, Humeau Y, Grenier F, Ciochi S, Herry C, & Luthi A (2009). Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. *Neuron* **62**, 757-771.

Elased KM, Cunha TS, Marcondes FK, & Morris M (2008). Brain angiotensin-converting enzymes: role of angiotensin-converting enzyme 2 in processing angiotensin II in mice. *Exp Physiol* **93**, 665-675.

Eliasson MJ, Blackshaw S, Schell MJ, & Snyder SH (1997). Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3396-3401.

Faber ES, Callister RJ, & Sah P (2001). Morphological and electrophysiological properties of principal neurons in the rat lateral amygdala in vitro. *J Neurophysiol* **85**, 714-723.

Faraci FM & Heistad DD (1998). Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. *Physiol Rev* **78**, 53-97.

Feil R, Hofmann F, & Kleppisch T (2005). Function of cGMP-dependent protein kinases in the nervous system. *Rev Neurosci* **16**, 23-41.

Feinstein JS, Adolphs R, Damasio A, & Tranel D (2011). The human amygdala and the induction and experience of fear. *Curr Biol* **21**, 34-38.

Fendt M & Fanselow MS (1999). The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev* **23**, 743-760.

Ferrario CM, Barnes KL, Block CH, Brosnihan KB, Diz DI, Khosla MC, & Santos RA (1990). Pathways of angiotensin formation and function in the brain. *Hypertension* **15**, I13-I19.

Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, & Diz DI (1997). Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension* **30**, 535-541.

Ferreira AJ, Santos RA, Bradford CN, Mecca AP, Sumners C, Katovich MJ, & Raizada MK (2010). Therapeutic implications of the vasoprotective axis of the renin-angiotensin system in cardiovascular diseases. *Hypertension* **55**, 207-213.

Fischer M, Baessler A, & Schunkert H (2002). Renin angiotensin system and gender differences in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* **53**, 672-677.

Fourcaudot E, Gambino F, Casassus G, Poulain B, Humeau Y, & Luthi A (2009). L-type voltage-dependent Ca(2+) channels mediate expression of presynaptic LTP in amygdala. *Nat Neurosci* **12**, 1093-1095.

Fraga-Silva RA, Ferreira AJ, & Dos Santos RA (2013). Opportunities for targeting the angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/mas receptor pathway in hypertension. *Curr Hypertens Rep* **15**, 31-38.

Fraga-Silva RA, Pinheiro SV, Goncalves AC, Alenina N, Bader M, & Santos RA (2008). The antithrombotic effect of angiotensin-(1-7) involves mas-mediated NO release from platelets. *Mol Med* **14**, 28-35.

Freeman EJ, Chisolm GM, Ferrario CM, & Tallant EA (1996). Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension* **28**, 104-108.

Fulton D, Gratton JP, & Sessa WC (2001). Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J Pharmacol Exp Ther* **299**, 818-824.

Garthwaite J (2005). Dynamics of cellular NO-cGMP signaling. *Front Biosci* **10**, 1868-1880.

Garthwaite J (2008). Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci* **27**, 2783-2802.

Gean PW, Chang FC, Huang CC, Lin JH, & Way LJ (1993). Long-term enhancement of EPSP and NMDA receptor-mediated synaptic transmission in the amygdala. *Brain Res Bull* **31**, 7-11.

Gironacci MM, Cerniello FM, Longo Carbajosa NA, Goldstein J, & Cerrato BD (2014). Protective axis of the renin-angiotensin system in the brain. *Clin Sci (Lond)* **127**, 295-306.

Goldstein JM, Seidman LJ, Horton NJ, Makris N, Kennedy DN, Caviness VS, Jr., Faraone SV, & Tsuang MT (2001). Normal sexual dimorphism of the adult human brain assessed by in vivo magnetic resonance imaging. *Cereb Cortex* **11**, 490-497.

Gonzalez-Hernandez T & Gonzalez MC (2000). Gender differences and the effect of different endocrine situations on the NOS expression pattern in the anterior pituitary gland. *J Histochem Cytochem* **48**, 1639-1648.

Gresack JE, Schafe GE, Orr PT, & Frick KM (2009). Sex differences in contextual fear conditioning are associated with differential ventral hippocampal extracellular signal-regulated kinase activation. *Neuroscience* **159**, 451-467.

Groth W, Blume A, Gohlke P, Unger T, & Culman J (2003). Chronic pretreatment with candesartan improves recovery from focal cerebral ischaemia in rats. *J Hypertens* **21**, 2175-2182.

Gu Q & Moss RL (1998). Novel mechanism for non-genomic action of 17 beta-oestradiol on kainate-induced currents in isolated rat CA1 hippocampal neurones. *J Physiol* **506** (Pt 3), 745-754.

Gupta R, Duff MC, Denburg NL, Cohen NJ, Bechara A, & Tranel D (2009). Declarative memory is critical for sustained advantageous complex decision-making. *Neuropsychologia* **47**, 1686-1693.

Gupta R, Koscik TR, Bechara A, & Tranel D (2011). The amygdala and decision-making. *Neuropsychologia* **49**, 760-766.

Gutierrez D, Nehorai A, & Muravchik CH (2004). Estimating brain conductivities and dipole source signals with EEG arrays. *IEEE Trans Biomed Eng* **51**, 2113-2122.

Hall J, Thomas KL, & Everitt BJ (2001). Fear memory retrieval induces CREB phosphorylation and Fos expression within the amygdala. *Eur J Neurosci* **13**, 1453-1458.

Hallberg M & Nyberg F (2003). Neuropeptide conversion to bioactive fragments--an important pathway in neuromodulation. *Curr Protein Pept Sci* **4**, 31-44.

Hallez H, Vanrumste B, Grech R, Muscat J, De CW, Vergult A, D'Asseler Y, Camilleri KP, Fabri SG, Van HS, & Lemahieu I (2007). Review on solving the forward problem in EEG source analysis. *J Neuroeng Rehabil* **4**, 46.

Hardingham N, Dachtler J, & Fox K (2013). The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis. *Front Cell Neurosci* **7**, 190.

Heinrich TA, da Silva RS, Miranda KM, Switzer CH, Wink DA, & Fukuto JM (2013). Biological nitric oxide signalling: chemistry and terminology. *Br J Pharmacol* **169**, 1417-1429.

Heitsch H, Brovkovich S, Malinski T, & Wiemer G (2001). Angiotensin-(1-7)-Stimulated Nitric Oxide and Superoxide Release From Endothelial Cells. *Hypertension* **37**, 72-76.

Hellner K, Walther T, Schubert M, & Albrecht D (2005). Angiotensin-(1-7) enhances LTP in the hippocampus through the G-protein-coupled receptor Mas. *Mol Cell Neurosci* **29**, 427-435.

Herry C, Ciocchi S, Senn V, Demmou L, Muller C, & Luthi A (2008). Switching on and off fear by distinct neuronal circuits. *Nature* **454**, 600-606.

Hines M (2010). Sex-related variation in human behavior and the brain. *Trends Cogn Sci* **14**, 448-456.

Hines M, Allen LS, & Gorski RA (1992). Sex differences in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Brain Res* **579**, 321-326.

Hinojosa-Laborde C, Chapa I, Lange D, & Haywood JR (1999). Gender differences in sympathetic nervous system regulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **26**, 122-126.

Hodgin JB, Knowles JW, Kim HS, Smithies O, & Maeda N (2002). Interactions between endothelial nitric oxide synthase and sex hormones in vascular protection in mice. *J Clin Invest* **109**, 541-548.

Hodgin JB, Kregge JH, Reddick RL, Korach KS, Smithies O, & Maeda N (2001). Estrogen receptor alpha is a major mediator of 17beta-estradiol's atheroprotective effects on lesion size in Apoe^{-/-} mice. *J Clin Invest* **107**, 333-340.

Holscher C (1997). Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *Trends Neurosci* **20**, 298-303.

Holscher C (2002). Different strains of rats show different sensitivity to block of long-term potentiation by nitric oxide synthase inhibitors. *Eur J Pharmacol* **457**, 99-106.

Hopper RA & Garthwaite J (2006). Tonic and phasic nitric oxide signals in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* **26**, 11513-11521.

Huang Y, Man HY, Sekine-Aizawa Y, Han Y, Juluri K, Luo H, Cheah J, Lowenstein C, Huganir RL, & Snyder SH (2005). S-nitrosylation of N-ethylmaleimide sensitive factor mediates surface expression of AMPA receptors. *Neuron* **46**, 533-540.

Huang YY, Martin KC, & Kandel ER (2000). Both protein kinase A and mitogen-activated protein kinase are required in the amygdala for the macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation. *J Neurosci* **20**, 6317-6325.

Humeau Y, Herry C, Kemp N, Shaban H, Fourcaudot E, Bissiere S, & Luthi A (2005). Dendritic spine heterogeneity determines afferent-specific Hebbian plasticity in the amygdala. *Neuron* **45**, 119-131.

Humeau Y, Shaban H, Bissiere S, & Luthi A (2003). Presynaptic induction of heterosynaptic associative plasticity in the mammalian brain. *Nature* **426**, 841-845.

Isgor C & Sengelaub DR (2003). Effects of neonatal gonadal steroids on adult CA3 pyramidal neuron dendritic morphology and spatial memory in rats. *J Neurobiol* **55**, 179-190.

Isingrini E, Desmidt T, Belzung C, & Camus V (2009). Endothelial dysfunction: A potential therapeutic target for geriatric depression and brain amyloid deposition in Alzheimer's disease? *Curr Opin Investig Drugs* **10**, 46-55.

Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, & Cammarota M (2006). Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci* **29**, 496-505.

Jackson ED, Payne JD, Nadel L, & Jacobs WJ (2006). Stress differentially modulates fear conditioning in healthy men and women. *Biol Psychiatry* **59**, 516-522.

Jackson J (1998). *Classical Electrodynamics*, 3rd ed. Wiley.

Jaffrey SR, Erdjument-Bromage H, Ferris CD, Tempst P, & Snyder SH (2001). Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat Cell Biol* **3**, 193-197.

Jensen K, Lambert JD, & Jensen MS (1999). Activity-dependent depression of GABAergic IPSCs in cultured hippocampal neurons. *J Neurophysiol* **82**, 42-49.

Jiang MH, Kaku T, Hada J, & Hayashi Y (2002). Different effects of eNOS and nNOS inhibition on transient forebrain ischemia. *Brain Res* **946**, 139-147.

Jiang T, Gao L, Guo J, Lu J, Wang Y, & Zhang Y (2012). Suppressing inflammation by inhibiting the NF-kappaB pathway contributes to the neuroprotective effect of angiotensin-(1-7) in rats with permanent cerebral ischaemia. *Br J Pharmacol* **167**, 1520-1532.

Johansen JP, Cain CK, Ostroff LE, & LeDoux JE (2011). Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell* **147**, 509-524.

Johns EJ (2003). Genes, gender and blood pressure regulation. *J Hypertens* **21**, 1447-1448.

Johnson AK & Thunhorst RL (1997). The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. *Front Neuroendocrinol* **18**, 292-353.

Johnson LR, Hou M, Ponce-Alvarez A, Gribelyuk LM, Alphas HH, Albert L, Brown BL, LeDoux JE, & Doyere V (2008a). A recurrent network in the lateral amygdala: a mechanism for coincidence detection. *Front Neural Circuits* **2**, 3.

Johnson RT, Breedlove SM, & Jordan CL (2008b). Sex differences and laterality in astrocyte number and complexity in the adult rat medial amygdala. *J Comp Neurol* **511**, 599-609.

Johnstone VP & Raymond CR (2011). A protein synthesis and nitric oxide-dependent presynaptic enhancement in persistent forms of long-term potentiation. *Learn Mem* **18**, 625-633.

Joniec I, Ciesielska A, Kurkowska-Jastrzebska I, Przybylkowski A, Czlonkowska A, & Czlonkowski A (2009). Age- and sex-differences in the nitric oxide synthase expression and dopamine concentration in the murine model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Brain Res* **1261**, 7-19.

Joo KM, Chung YH, Shin CM, Lee YJ, & Cha CI (2004). Region-specific alterations of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) expression in the amygdala of the aged rats. *Brain Res* **999**, 231-236.

Juraska JM (1991). Sex differences in "cognitive" regions of the rat brain. *Psychoneuroendocrinology* **16**, 105-109.

Kahonen M, Tolvanen JP, Sallinen K, Wu X, & Porsti I (1998). Influence of gender on control of arterial tone in experimental hypertension. *Am J Physiol* **275**, H15-H22.

Kandel ER & Schwartz JH (2000). *Principles of Neural Science*, 4th ed. McGraw-Hill Publishing Company.

Katzner S, Nauhaus I, Benucci A, Bonin V, Ringach DL, & Carandini M (2009). Local origin of field potentials in visual cortex. *Neuron* **61**, 35-41.

Kelley JB, Balda MA, Anderson KL, & Itzhak Y (2009). Impairments in fear conditioning in mice lacking the nNOS gene. *Learn Mem* **16**, 371-378.

Kilpatrick LA, Zald DH, Pardo JV, & Cahill LF (2006). Sex-related differences in amygdala functional connectivity during resting conditions. *Neuroimage* **30**, 452-461.

Klyachko VA, Ahern GP, & Jackson MB (2001). cGMP-mediated facilitation in nerve terminals by enhancement of the spike afterhyperpolarization. *Neuron* **31**, 1015-1025.

Knowles RG & Moncada S (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* **298** (Pt 2), 249-258.

Koelsch S, Skouras S, Fritz T, Herrera P, Bonhage C, Kussner MB, & Jacobs AM (2013). The roles of superficial amygdala and auditory cortex in music-evoked fear and joy. *Neuroimage* **81**, 49-60.

Kosaka H, Omori M, Murata T, Iidaka T, Yamada H, Okada T, Takahashi T, Sadato N, Itoh H, Yonekura Y, & Wada Y (2002). Differential amygdala response during facial recognition in patients with schizophrenia: an fMRI study. *Schizophr Res* **57**, 87-95.

Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, Sexton PM, Gembardt F, Kellett E, Martini L, Vanderheyden P, Schultheiss HP, & Walther T (2005). G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation* **111**, 1806-1813.

Kramar EA, Armstrong DL, Ikeda S, Wayner MJ, Harding JW, & Wright JW (2001). The effects of angiotensin IV analogs on long-term potentiation within the CA1 region of the hippocampus in vitro. *Brain Res* **897**, 114-121.

Kravchenko MO, Moskalyuk AO, Fedulova SA, & Veselovsky NS (2006). Calcium-dependent changes of paired-pulse modulation at single GABAergic synapses. *Neurosci Lett* **395**, 133-137.

Krettek JE & Price JL (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.

Krezel W, Dupont S, Krust A, Chambon P, & Chapman PF (2001). Increased anxiety and synaptic plasticity in estrogen receptor beta -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12278-12282.

Lange MD, Doengi M, Lesting J, Pape HC, & Jungling K (2012). Heterosynaptic long-term potentiation at interneuron-principal neuron synapses in the amygdala requires nitric oxide signalling. *J Physiol* **590**, 131-143.

Lavoie JL & Sigmund CD (2003). Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system. *Endocrinology* **144**, 2179-2183.

Lazartigues E, Feng Y, & Lavoie JL (2007). The two fACES of the tissue renin-angiotensin systems: implication in cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des* **13**, 1231-1245.

LeDoux J (2007). The amygdala. *Curr Biol* **17**, R868-R874.

LeDoux JE (1993a). Emotional memory systems in the brain. *Behav Brain Res* **58**, 69-79.

LeDoux JE (1993b). Emotional memory: in search of systems and synapses. *Ann N Y Acad Sci* **702**, 149-157.

LeDoux JE (1995). Emotion: clues from the brain. *Annu Rev Psychol* **46**, 209-235.

- LeDoux JE (1998). *The Emotional Brain* Simon & Schuster, New York.
- LeDoux JE (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* **23**, 155-184.
- LeDoux JE, Cicchetti P, Xagoraris A, & Romanski LM (1990). The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J Neurosci* **10**, 1062-1069.
- LeDoux JE, Iwata J, Cicchetti P, & Reis DJ (1988). Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J Neurosci* **8**, 2517-2529.
- LeDoux JE & Muller J (1997). Emotional memory and psychopathology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **352**, 1719-1726.
- Lee HK, Barbarosie M, Kameyama K, Bear MF, & Huganir RL (2000). Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature* **405**, 955-959.
- Leranth C, Hajszan T, & MacLusky NJ (2004). Androgens increase spine synapse density in the CA1 hippocampal subfield of ovariectomized female rats. *J Neurosci* **24**, 495-499.
- Leranth C, Petnehazy O, & MacLusky NJ (2003). Gonadal hormones affect spine synaptic density in the CA1 hippocampal subfield of male rats. *J Neurosci* **23**, 1588-1592.
- Lessmann V, Stroh-Kaffei S, Steinbrecher V, Edelmann E, Brigadski T, Kilb W, & Luhmann HJ (2011). The expression mechanism of the residual LTP in the CA1 region of BDNF k.o. mice is insensitive to NO synthase inhibition. *Brain Res* **1391**, 14-23.
- Lin CH, Yeh SH, Lin CH, Lu KT, Leu TH, Chang WC, & Gean PW (2001). A role for the PI-3 kinase signaling pathway in fear conditioning and synaptic plasticity in the amygdala. *Neuron* **31**, 841-851.
- Lippoldt A, Paul M, Fuxe K, & Ganten D (1995). The brain renin-angiotensin system: molecular mechanisms of cell to cell interactions. *Clin Exp Hypertens* **17**, 251-266.
- Logothetis NK & Wandell BA (2004). Interpreting the BOLD signal. *Annu Rev Physiol* **66**, 735-769.
- Lorenzetti V, Allen NB, Fornito A, & Yucel M (2009). Structural brain abnormalities in major depressive disorder: a selective review of recent MRI studies. *J Affect Disord* **117**, 1-17.

- Lu YF & Hawkins RD (2002). Ryanodine receptors contribute to cGMP-induced late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. *J Neurophysiol* **88**, 1270-1278.
- Luders E, Narr KL, Thompson PM, Rex DE, Woods RP, Deluca H, Jancke L, & Toga AW (2006). Gender effects on cortical thickness and the influence of scaling. *Hum Brain Mapp* **27**, 314-324.
- Luders E & Toga AW (2010). Sex differences in brain anatomy. *Prog Brain Res* **186**, 3-12.
- Lynch AI, Arnett DK, Davis BR, Boerwinkle E, Ford CE, Eckfeldt JH, & Leisencker-Foster C (2007). Sex-specific effects of AGT-6 and ACE I/D on pulse pressure after 6 months on antihypertensive treatment: the GenHAT study. *Ann Hum Genet* **71**, 735-745.
- Machado RD, Santos RA, & Andrade SP (2001). Mechanisms of angiotensin-(1-7)-induced inhibition of angiogenesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **280**, R994-R1000.
- Madeira MD & Lieberman AR (1995). Sexual dimorphism in the mammalian limbic system. *Prog Neurobiol* **45**, 275-333.
- Malen PL & Chapman PF (1997). Nitric oxide facilitates long-term potentiation, but not long-term depression. *J Neurosci* **17**, 2645-2651.
- Maren S (1995). Sexually dimorphic perforant path long-term potentiation (LTP) in urethane-anesthetized rats. *Neurosci Lett* **196**, 177-180.
- Maren S (2001). Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci* **24**, 897-931.
- Maren S (2003). The amygdala, synaptic plasticity, and fear memory. *Ann N Y Acad Sci* **985**, 106-113.
- Maren S, De OB, & Fanselow MS (1994). Sex differences in hippocampal long-term potentiation (LTP) and Pavlovian fear conditioning in rats: positive correlation between LTP and contextual learning. *Brain Res* **661**, 25-34.
- Maren S & Fanselow MS (1995). Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal formation stimulation in vivo. *J Neurosci* **15**, 7548-7564.
- Maric-Bilkan C & Manigrasso MB (2012). Sex differences in hypertension: contribution of the renin-angiotensin system. *Gen Med* **9**, 287-291.

Markoula S, Giannopoulos S, Kostoulas C, Tatsioni A, Bouba I, Maranis S, Georgiou I, & Kyritsis AP (2011). Gender association of the angiotensin-converting enzyme gene with ischaemic stroke. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* **12**, 510-515.

Martin SJ, Grimwood PD, & Morris RG (2000). Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* **23**, 649-711.

Mascagni F, McDonald AJ, & Coleman JR (1993). Corticoamygdaloid and corticocortical projections of the rat temporal cortex: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study. *Neuroscience* **57**, 697-715.

Mathew SJ, Price RB, & Charney DS (2008). Recent advances in the neurobiology of anxiety disorders: implications for novel therapeutics. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **148C**, 89-98.

Matus A (2000). Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science* **290**, 754-758.

McDonald AJ (1992). Projection neurons of the basolateral amygdala: a correlative Golgi and retrograde tract tracing study. *Brain Res Bull* **28**, 179-185.

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

McDonald AJ & Augustine JR (1993). Localization of GABA-like immunoreactivity in the monkey amygdala. *Neuroscience* **52**, 281-294.

McGaugh JL (2002). Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. *Trends Neurosci* **25**, 456.

McGaugh JL (2004). The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci* **27**, 1-28.

McKernan MG & Shinnick-Gallagher P (1997). Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro. *Nature* **390**, 607-611.

McKinley MJ, Albiston AL, Allen AM, Mathai ML, May CN, McAllen RM, Oldfield BJ, Mendelsohn FA, & Chai SY (2003). The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 901-918.

Mecca AP, Regenhardt RW, O'Connor TE, Joseph JP, Raizada MK, Katovich MJ, & Summers C (2011). Cerebroprotection by angiotensin-(1-7) in endothelin-1-induced ischaemic stroke. *Exp Physiol* **96**, 1084-1096.

Medina JH & Izquierdo I (1995). Retrograde messengers, long-term potentiation and memory. *Brain Res Brain Res Rev* **21**, 185-194.

Meis S, Endres T, & Lessmann V (2012). Postsynaptic BDNF signalling regulates long-term potentiation at thalamo-amygdala afferents. *J Physiol* **590**, 193-208.

Mendez-Lopez M, Mendez M, Lopez L, & Arias JL (2009). Sexually dimorphic c-Fos expression following spatial working memory in young and adult rats. *Physiol Behav* **98**, 307-317.

Mendoza-Garcés L, Mendoza-Rodríguez CA, Jiménez-Trejo F, Picazo O, Rodríguez MC, & Cerbon M (2011). Differential expression of estrogen receptors in two hippocampal regions during the estrous cycle of the rat. *Anat Rec (Hoboken)* **294**, 1913-1919.

Merchenthaler I, Lane MV, Numan S, & Dellovade TL (2004). Distribution of estrogen receptor alpha and beta in the mouse central nervous system: in vivo autoradiographic and immunocytochemical analyses. *J Comp Neurol* **473**, 270-291.

Merino SM & Maren S (2006). Hitting Ras where it counts: Ras antagonism in the basolateral amygdala inhibits long-term fear memory. *Eur J Neurosci* **23**, 196-204.

Mertens B, Vanderheyden P, Michotte Y, & Sarre S (2010). The role of the central renin-angiotensin system in Parkinson's disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* **11**, 49-56.

Micheva KD, Buchanan J, Holz RW, & Smith SJ (2003). Retrograde regulation of synaptic vesicle endocytosis and recycling. *Nat Neurosci* **6**, 925-932.

Milner B, Squire LR, & Kandel ER (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* **20**, 445-468.

Mizuno K, Antunes-Martins A, Ris L, Peters M, Godaux E, & Giese KP (2007). Calcium/calmodulin kinase kinase beta has a male-specific role in memory formation. *Neuroscience* **145**, 393-402.

Mizuno K & Giese KP (2010). Towards a molecular understanding of sex differences in memory formation. *Trends Neurosci* **33**, 285-291.

Mizuno K, Ris L, Sanchez-Capelo A, Godaux E, & Giese KP (2006). Ca²⁺/calmodulin kinase kinase alpha is dispensable for brain development but is required for distinct memories in male, though not in female, mice. *Mol Cell Biol* **26**, 9094-9104.

Mollace V, Muscoli C, Masini E, Cuzzocrea S, & Salvemini D (2005). Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol Rev* **57**, 217-252.

Moore CI, Browning MD, & Rose GM (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.

Morris JA, Jordan CL, & Breedlove SM (2008). Sexual dimorphism in neuronal number of the posterodorsal medial amygdala is independent of circulating androgens and regional volume in adult rats. *J Comp Neurol* **506**, 851-859.

Morys J, Berdel B, Kowianski P, & Dziewiatkowski J (1998). The pattern of synaptophysin changes during the maturation of the amygdaloid body and hippocampal hilus in the rat. *Folia Neuropathol* **36**, 15-23.

Musicki B, Liu T, Lagoda GA, Bivalacqua TJ, Strong TD, & Burnett AL (2009). Endothelial nitric oxide synthase regulation in female genital tract structures. *J Sex Med* **6 Suppl 3**, 247-253.

Nagai-Kusuhara A, Nakamura M, Mukuno H, Kanamori A, Negi A, & Seigel GM (2007). cAMP-responsive element binding protein mediates a cGMP/protein kinase G-dependent anti-apoptotic signal induced by nitric oxide in retinal neuro-glial progenitor cells. *Exp Eye Res* **84**, 152-162.

Neher E (1998). Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* **20**, 389-399.

Neitz A, Mergia E, Eysel UT, Koesling D, & Mittmann T (2011). Presynaptic nitric oxide/cGMP facilitates glutamate release via hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in the hippocampus. *Eur J Neurosci* **33**, 1611-1621.

Nelson RJ, Demas GE, Huang PL, Fishman MC, Dawson VL, Dawson TM, & Snyder SH (1995). Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Nature* **378**, 383-386.

Newhouse P, Newhouse C, & Astur RS (2007). Sex differences in visual-spatial learning using a virtual water maze in pre-pubertal children. *Behav Brain Res* **183**, 1-7.

O'Dell TJ, Huang PL, Dawson TM, Dinerman JL, Snyder SH, Kandel ER, & Fishman MC (1994). Endothelial NOS and the blockade of LTP by NOS inhibitors in mice lacking neuronal NOS. *Science* **265**, 542-546.

O'Neill A & Frodl T (2012). Brain structure and function in borderline personality disorder. *Brain Struct Funct* **217**, 767-782.

Ocaranza MP, Palomera C, Roman M, Bargetto J, Lavandero S, & Jalil JE (2006). Effect of hypertension on angiotensin-(1-7) levels in rats with different angiotensin-I converting enzyme polymorphism. *Life Sci* **78**, 1535-1542.

Ono K & Han J (2000). The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* **12**, 1-13.

Oparil S & Miller AP (2005). Gender and blood pressure. *J Clin Hypertens (Greenwich)* **7**, 300-309.

Orshal JM & Khalil RA (2004). Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **286**, R233-R249.

Orsini CA & Maren S (2012). Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. *Neurosci Biobehav Rev* **36**, 1773-1802.

Osterlund M, Kuiper GG, Gustafsson JA, & Hurd YL (1998). Differential distribution and regulation of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA within the female rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* **54**, 175-180.

Osuka K, Watanabe Y, Usuda N, Nakazawa A, Tokuda M, & Yoshida J (2004). Modification of endothelial NO synthase through protein phosphorylation after forebrain cerebral ischemia/reperfusion. *Stroke* **35**, 2582-2586.

Ota KT, Monsey MS, Wu MS, & Schafe GE (2010a). Synaptic plasticity and NO-cGMP-PKG signaling regulate pre- and postsynaptic alterations at rat lateral amygdala synapses following fear conditioning. *PLoS One* **5**, e11236.

Ota KT, Monsey MS, Wu MS, Young GJ, & Schafe GE (2010b). Synaptic plasticity and NO-cGMP-PKG signaling coordinately regulate ERK-driven gene expression in the lateral amygdala and in the auditory thalamus following Pavlovian fear conditioning. *Learn Mem* **17**, 221-235.

Ota KT, Pierre VJ, Ploski JE, Queen K, & Schafe GE (2008). The NO-cGMP-PKG signaling pathway regulates synaptic plasticity and fear memory consolidation in the lateral amygdala via activation of ERK/MAP kinase. *Learn Mem* **15**, 792-805.

Ou LC & Gean PW (2007). Transcriptional regulation of brain-derived neurotrophic factor in the amygdala during consolidation of fear memory. *Mol Pharmacol* **72**, 350-358.

Overeem KA, Ota KT, Monsey MS, Ploski JE, & Schafe GE (2010). A role for nitric oxide-driven retrograde signaling in the consolidation of a fear memory. *Front Behav Neurosci* **4**, 2.

Palmer ZJ, Duncan RR, Johnson JR, Lian LY, Mello LV, Booth D, Barclay JW, Graham ME, Burgoyne RD, Prior IA, & Morgan A (2008). S-nitrosylation of syntaxin 1 at Cys(145) is a regulatory switch controlling Munc18-1 binding. *Biochem J* **413**, 479-491.

Pape HC & Pare D (2010). Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. *Physiol Rev* **90**, 419-463.

Park SK, Grzybicki D, Lin HL, & Murphy S (1994). Modulation of inducible nitric oxide synthase expression in astroglial cells. *Neuropharmacology* **33**, 1419-1423.

Passos-Silva DG, Verano-Braga T, & Santos RA (2013). Angiotensin-(1-7): beyond the cardio-renal actions. *Clin Sci (Lond)* **124**, 443-456.

Paul C, Schoberl F, Weinmeister P, Micale V, Wotjak CT, Hofmann F, & Kleppisch T (2008). Signaling through cGMP-dependent protein kinase I in the amygdala is critical for auditory-cued fear memory and long-term potentiation. *J Neurosci* **28**, 14202-14212.

Pawlik G, Rackl A, & Bing RJ (1981). Quantitative capillary topography and blood flow in the cerebral cortex of cats: an in vivo microscopic study. *Brain Res* **208**, 35-58.

Pena Silva RA & Heistad DD (2014). Promising neuroprotective effects of the angiotensin-(1-7)-angiotensin-converting enzyme 2-Mas axis in stroke. *Exp Physiol* **99**, 342-343.

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.

Pesaran B (2009). Uncovering the mysterious origins of local field potentials. *Neuron* **61**, 1-2.

Pesaran B, Pezaris JS, Sahani M, Mitra PP, & Andersen RA (2002). Temporal structure in neuronal activity during working memory in macaque parietal cortex. *Nat Neurosci* **5**, 805-811.

Pettorossi VE, Di MM, Scarduzio M, Panichi R, Tozzi A, Calabresi P, & Grassi S (2013). Modulatory role of androgenic and estrogenic neurosteroids in determining the direction of synaptic plasticity in the CA1 hippocampal region of male rats. *Physiol Rep* **1**, e00185.

- Phelps EA, O'Connor KJ, Cunningham WA, Funayama ES, Gatenby JC, Gore JC, & Banaji MR (2000). Performance on indirect measures of race evaluation predicts amygdala activation. *J Cogn Neurosci* **12**, 729-738.
- Pickel VM & Chan J (1995). Co-localization of angiotensin II and gamma-aminobutyric acid in axon terminals in the rat subfornical organ. *Neurosci Lett* **193**, 89-92.
- Pierce JP, Kievits J, Graustein B, Speth RC, Iadecola C, & Milner TA (2009). Sex differences in the subcellular distribution of angiotensin type 1 receptors and NADPH oxidase subunits in the dendrites of C1 neurons in the rat rostral ventrolateral medulla. *Neuroscience* **163**, 329-338.
- Pitkanen A (2000). Connectivity of the rat amygdaloid complex. In *The Amygdala: A functional analysis*, ed. Aggleton JP, pp. 31-116. Oxford University Press, New York.
- Pitkanen A, Pikkarainen M, Nurminen N, & Ylinen A (2000). Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann N Y Acad Sci* **911**, 369-391.
- Pitkanen A, Savander V, & LeDoux JE (1997). Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci* **20**, 517-523.
- Pitkanen A, Tuunanen J, Kalviainen R, Partanen K, & Salmenpera T (1998). Amygdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* **32**, 233-253.
- Pogun S (2001). Sex differences in brain and behavior: emphasis on nicotine, nitric oxide and place learning. *Int J Psychophysiol* **42**, 195-208.
- 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.
- Prast H & Philippu A (2001). Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol* **64**, 51-68.
- Prendergast BJ, Onishi KG, & Zucker I (2014). Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. *Neurosci Biobehav Rev* **40**, 1-5.
- Pretorius M, Luther JM, Murphey LJ, Vaughan DE, & Brown NJ (2005). Angiotensin-converting enzyme inhibition increases basal vascular tissue plasminogen activator release in women but not in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 2435-2440.

Price JL, Russchen FT, & Amaral DG (1987). The Limbic Region II: The amygdaloid complex. In *Handbook of Chemical Neuroanatomy, Vol. 5, Integrated Systems of the CNS, Part I, Hypothalamus, Hippocampus, Amygdala, Retina*, eds. Björklund A, Hökfeld T., & Swanson LW, pp. 279-388. Elsevier, Amsterdam.

Rachman IM, Unnerstall JR, Pfaff DW, & Cohen RS (1998). Regulation of neuronal nitric oxide synthase mRNA in lordosis-relevant neurons of the ventromedial hypothalamus following short-term estrogen treatment. *Brain Res Mol Brain Res* **59**, 105-108.

Radi ZA, Marusak RA, & Morris DL (2009). Species Comparison of the Role of p38 MAP Kinase in the Female Reproductive System. *J Toxicol Pathol* **22**, 109-124.

Rainnie DG, Asprodini EK, & Shinnick-Gallagher P (1991). Inhibitory transmission in the basolateral amygdala. *J Neurophysiol* **66**, 999-1009.

Rasia-Filho AA, Dalpian F, Menezes IC, Brusco J, Moreira JE, & Cohen RS (2012). Dendritic spines of the medial amygdala: plasticity, density, shape, and subcellular modulation by sex steroids. *Histol Histopathol* **27**, 985-1011.

Rasia-Filho AA, Fabian C, Rigoti KM, & Achaval M (2004). Influence of sex, estrous cycle and motherhood on dendritic spine density in the rat medial amygdala revealed by the Golgi method. *Neuroscience* **126**, 839-847.

Rasia-Filho AA, Londero RG, & Achaval M (2000). Functional activities of the amygdala: an overview. *J Psychiatry Neurosci* **25**, 14-23.

Ratnayaka A, Marra V, Bush D, Burden JJ, Branco T, & Staras K (2012). Recruitment of resting vesicles into recycling pools supports NMDA receptor-dependent synaptic potentiation in cultured hippocampal neurons. *J Physiol* **590**, 1585-1597.

Rauch SL, Whalen PJ, Shin LM, McInerney SC, Macklin ML, Lasko NB, Orr SP, & Pitman RK (2000). Exaggerated amygdala response to masked facial stimuli in posttraumatic stress disorder: a functional MRI study. *Biol Psychiatry* **47**, 769-776.

Ray JP & Price JL (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.

Regenhardt RW, Desland F, Mecca AP, Pioquinto DJ, Afzal A, Mocco J, & Summers C (2013). Anti-inflammatory effects of angiotensin-(1-7) in ischemic stroke. *Neuropharmacology* **71**, 154-163.

Reyes-Engel A, Morcillo L, Aranda FJ, Ruiz M, Gaitan MJ, Mayor-Olea A, Aranda P, & Ferrario CM (2006). Influence of gender and genetic variability on plasma angiotensin peptides. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* **7**, 92-97.

Richter-Levin G & Yaniv D (2001). Is LTP in the hippocampus a useful model for learning-related alterations in gene expression? *Rev Neurosci* **12**, 289-296.

Rodrigues SM, Schafe GE, & LeDoux JE (2004). Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala. *Neuron* **44**, 75-91.

Romeo RD, McCarthy JB, Wang A, Milner TA, & McEwen BS (2005a). Sex differences in hippocampal estradiol-induced N-methyl-D-aspartic acid binding and ultrastructural localization of estrogen receptor-alpha. *Neuroendocrinology* **81**, 391-399.

Romeo RD, Staub D, Jasnow AM, Karatsoreos IN, Thornton JE, & McEwen BS (2005b). Dihydrotestosterone increases hippocampal N-methyl-D-aspartate binding but does not affect choline acetyltransferase cell number in the forebrain or choline transporter levels in the CA1 region of adult male rats. *Endocrinology* **146**, 2091-2097.

Rucker B, Pereira GS, Furstenau CR, Izquierdo I, Bonan CD, & Sarkis JJ (2004). Inhibitory avoidance task reveals differences in ectonucleotidase activities between male and female rats. *Neurochem Res* **29**, 2231-2237.

Saavedra JM (2005). Brain angiotensin II: new developments, unanswered questions and therapeutic opportunities. *Cell Mol Neurobiol* **25**, 485-512.

Sah P (1996). Ca(2+)-activated K⁺ currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci* **19**, 150-154.

Sah P, Faber ES, Lopez De AM, & Power J (2003). The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev* **83**, 803-834.

Sah P, Westbrook RF, & 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.

Sakata A, Mogi M, Iwanami J, Tsukuda K, Min LJ, Fujita T, Iwai M, Ito M, & Horiuchi M (2009). Sex-different effect of angiotensin II type 2 receptor on ischemic brain injury and cognitive function. *Brain Res* **1300**, 14-23.

Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, & Needleman P (1993). Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7240-7244.

Samson RD, Dumont EC, & Pare D (2003). Feedback inhibition defines transverse processing modules in the lateral amygdala. *J Neurosci* **23**, 1966-1973.

Samson RD & Pare D (2006). A spatially structured network of inhibitory and excitatory connections directs impulse traffic within the lateral amygdala. *Neuroscience* **141**, 1599-1609.

Santos EL, Reis RI, Silva RG, Shimuta SI, Pecher C, Bascands JL, Schanstra JP, Oliveira L, Bader M, Paiva AC, Costa-Neto CM, & Pesquero JB (2007). Functional rescue of a defective angiotensin II AT1 receptor mutant by the Mas protooncogene. *Regul Pept* **141**, 159-167.

Santos RA, Campagnole-Santos MJ, & Andrade SP (2000). Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept* **91**, 45-62.

Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de B, I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, & Walther T (2003). Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8258-8263.

Satishchandra P, Krishnamoorthy ES, van Elst LT, Lemieux L, Koeppe M, Brown RJ, & Trimble MR (2003). Mesial temporal structures and comorbid anxiety in refractory partial epilepsy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **15**, 450-452.

Sato I, Himi T, & Murota S (1996). Lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase activity in cultured cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett* **205**, 45-48.

Sato T, Suzuki E, Yokoyama M, Watanabe S, & Miyaoka H (2006). Auditory fear conditioning and conditioned stress raise NO(3) level in the Amygdala. *Neuropsychobiology* **53**, 142-147.

Savaskan E, Olivieri G, Meier F, Ravid R, & Muller-Spahn F (2001). Hippocampal estrogen beta-receptor immunoreactivity is increased in Alzheimer's disease. *Brain Res* **908**, 113-119.

Schafe GE, Atkins CM, Swank MW, Bauer EP, Sweatt JD, & LeDoux JE (2000). Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning. *J Neurosci* **20**, 8177-8187.

Schafe GE, Bauer EP, Rosis S, Farb CR, Rodrigues SM, & LeDoux JE (2005). Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning requires nitric oxide signaling in the lateral amygdala. *Eur J Neurosci* **22**, 201-211.

Schlossmann J & Hofmann F (2005). cGMP-dependent protein kinases in drug discovery. *Drug Discov Today* **10**, 627-634.

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.

Schubert M, Siegmund H, Pape HC, & Albrecht D (2005). Kindling-induced changes in plasticity of the rat amygdala and hippocampus. *Learn Mem* **12**, 520-526.

Schulz PE, Cook EP, & Johnston D (1994). Changes in paired-pulse facilitation suggest presynaptic involvement in long-term potentiation. *J Neurosci* **14**, 5325-5337.

Scordalakes EM, Shetty SJ, & Rissman EF (2002). Roles of estrogen receptor alpha and androgen receptor in the regulation of neuronal nitric oxide synthase. *J Comp Neurol* **453**, 336-344.

Seidel B, Stanarius A, & Wolf G (1997). Differential expression of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in blood vessels of the rat brain. *Neurosci Lett* **239**, 109-112.

Shan Z, Cuadra AE, Sumners C, & Raizada MK (2008). Characterization of a functional (pro)renin receptor in rat brain neurons. *Exp Physiol* **93**, 701-708.

Shima N, Yamaguchi Y, & Yuri K (2003). Distribution of estrogen receptor beta mRNA-containing cells in ovariectomized and estrogen-treated female rat brain. *Anat Sci Int* **78**, 85-97.

Shinnick-Gallagher P, McKernan MG, 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.

Shors TJ (2002). Opposite effects of stressful experience on memory formation in males versus females. *Dialogues Clin Neurosci* **4**, 139-147.

Simmons ML & Murphy S (1992). Induction of nitric oxide synthase in glial cells. *J Neurochem* **59**, 897-905.

Singh R, Pervin S, Shryne J, Gorski R, & Chaudhuri G (2000). Castration increases and androgens decrease nitric oxide synthase activity in the brain: physiologic implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3672-3677.

Smith Y & Pare D (1994). Intra-amygdaloid projections of the lateral nucleus in the cat: PHA-L anterograde labeling combined with postembedding GABA and glutamate immunocytochemistry. *J Comp Neurol* **342**, 232-248.

Son H, Hawkins RD, Martin K, Kiebler M, Huang PL, Fishman MC, & Kandel ER (1996). Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. *Cell* **87**, 1015-1023.

Spezio ML, Huang PY, Castelli F, & Adolphs R (2007). Amygdala damage impairs eye contact during conversations with real people. *J Neurosci* **27**, 3994-3997.

Stanarius A, Topel I, Schulz S, Noack H, & Wolf G (1997). Immunocytochemistry of endothelial nitric oxide synthase in the rat brain: a light and electron microscopical study using the tyramide signal amplification technique. *Acta Histochem* **99**, 411-429.

Stefanova N & Ovtcharoff W (2000). Sexual dimorphism of the bed nucleus of the stria terminalis and the amygdala. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **158**, III-78.

Stellar E (1993). Salt appetite: its neuroendocrine basis. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **53**, 475-484.

Sui L, Wang J, & Li BM (2008). Role of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of the rapamycin signaling pathway in long-term potentiation and trace fear conditioning memory in rat medial prefrontal cortex. *Learn Mem* **15**, 762-776.

Szymczak S, Kalita K, Jaworski J, Mioduszevska B, Savonenko A, Markowska A, Merchenthaler I, & Kaczmarek L (2006). Increased estrogen receptor beta expression correlates with decreased spine formation in the rat hippocampus. *Hippocampus* **16**, 453-463.

Tettenborn AE (2011). Die Epilepsien. In *Klinische Neurologie* pp. 858. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.

Topel I, Stanarius A, & Wolf G (1998). Distribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase in the developing rat brain: an immunohistochemical study. *Brain Res* **788**, 43-48.

Tranel D & Hyman BT (1990). Neuropsychological correlates of bilateral amygdala damage. *Arch Neurol* **47**, 349-355.

Tuch DS, Wedeen VJ, Dale AM, George JS, & Belliveau JW (2001). Conductivity tensor mapping of the human brain using diffusion tensor MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11697-11701.

Vaughan CW (1998). Enhancement of opioid inhibition of GABAergic synaptic transmission by cyclo-oxygenase inhibitors in rat periaqueductal grey neurones. *Br J Pharmacol* **123**, 1479-1481.

Velisek L & Veliskova J (2002). Estrogen treatment protects GABA(B) inhibition in the dentate gyrus of female rats after kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsia* **43 Suppl 5**, 146-151.

Veltkamp R, Rajapakse N, Robins G, Puskar M, Shimizu K, & Busija D (2002). Transient focal ischemia increases endothelial nitric oxide synthase in cerebral blood vessels. *Stroke* **33**, 2704-2710.

Villarreal G & King CY (2001). Brain imaging in posttraumatic stress disorder. *Semin Clin Neuropsychiatry* **6**, 131-145.

von Bohlen und HO (2005). The renin-angiotensin system in the mammalian central nervous system. *Curr Protein Pept Sci* **6**, 355-371.

von Bohlen und HO & Albrecht D (1998a). 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.

von Bohlen und HO & Albrecht D (1998b). Visualization of specific angiotensin II binding sites in the rat limbic system. *Neuropeptides* **32**, 241-245.

von Bohlen und HO & 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.

von Bohlen und HO & Albrecht D (2006). The CNS renin-angiotensin system. *Cell Tissue Res* **326**, 599-616.

von Bohlen und HO & Unsicker K (2002). Morphological alterations in the amygdala and hippocampus of mice during ageing. *Eur J Neurosci* **16**, 2434-2440.

von Bohlen und HO, Walther T, Bader M, & Albrecht D (2000). Interaction between Mas and the angiotensin AT1 receptor in the amygdala. *J Neurophysiol* **83**, 2012-2021.

Wahl M & Schilling L (1993). Regulation of cerebral blood flow--a brief review. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* **59**, 3-10.

Walker DL & Davis M (2002). The role of amygdala glutamate receptors in fear learning, fear-potentiated startle, and extinction. *Pharmacol Biochem Behav* **71**, 379-392.

Walther T, Balschun D, Voigt JP, Fink H, Zuschratter W, Birchmeier C, Ganten D, & Bader M (1998). Sustained long term potentiation and anxiety in mice lacking the Mas protooncogene. *J Biol Chem* **273**, 11867-11873.

Walther T, Voigt JP, Fink H, & Bader M (2000). Sex specific behavioural alterations in Mas-deficient mice. *Behav Brain Res* **107**, 105-109.

Watanabe Y, Ikegaya Y, Saito H, & Abe K (1995). Roles of GABAA, NMDA and muscarinic receptors in induction of long-term potentiation in the medial and lateral amygdala in vitro. *Neurosci Res* **21**, 317-322.

Wayner MJ, Armstrong DL, Phelix CF, Wright JW, & Harding JW (2001). Angiotensin IV enhances LTP in rat dentate gyrus in vivo. *Peptides* **22**, 1403-1414.

Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, & Moncada S (1994). Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5212-5216.

Weisskopf MG & LeDoux JE (1999). Distinct populations of NMDA receptors at subcortical and cortical inputs to principal cells of the lateral amygdala. *J Neurophysiol* **81**, 930-934.

White LE & Price JL (1993). The functional anatomy of limbic status epilepticus in the rat. II. The effects of focal deactivation. *J Neurosci* **13**, 4810-4830.

Williams JH, Li YG, Nayak A, Errington ML, Murphy KP, & Bliss TV (1993). The suppression of long-term potentiation in rat hippocampus by inhibitors of nitric oxide synthase is temperature and age dependent. *Neuron* **11**, 877-884.

Winston JS, Strange BA, O'Doherty J, & Dolan RJ (2002). Automatic and intentional brain responses during evaluation of trustworthiness of faces. *Nat Neurosci* **5**, 277-283.

Wooten GF, Currie LJ, Bovbjerg VE, Lee JK, & Patrie J (2004). Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **75**, 637-639.

Wright JW & Harding JW (1994). Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses. *Neurosci Biobehav Rev* **18**, 21-53.

Wright JW, Kawas LH, & Harding JW (2013). A Role for the Brain RAS in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)* **4**, 158.

Wright JW, Kramar EA, Myers ED, Davis CJ, & Harding JW (2003). Ethanol-induced suppression of LTP can be attenuated with an angiotensin IV analog. *Regul Pept* **113**, 49-56.

Wright JW, Yamamoto BJ, & Harding JW (2008). Angiotensin receptor subtype mediated physiologies and behaviors: new discoveries and clinical targets. *Prog Neurobiol* **84**, 157-181.

Wulfert E & Margineanu DG (1996). Effects of in situ manipulation of nitric oxide on rat hippocampal CA3 neurone excitability. *Neuroreport* **7**, 2737-2742.

Xu P, Sriramula S, & Lazartigues E (2011). ACE2/ANG-(1-7)/Mas pathway in the brain: the axis of good. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **300**, R804-R817.

Xue B, Johnson AK, & Hay M (2013). Sex differences in angiotensin II- and aldosterone-induced hypertension: the central protective effects of estrogen. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **305**, R459-R463.

Yanes LL, Romero DG, Iles JW, Iliescu R, Gomez-Sanchez C, & Reckelhoff JF (2006). Sexual dimorphism in the renin-angiotensin system in aging spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **291**, R383-R390.

Yang DW, Pan B, Han TZ, & Xie W (2004). Sexual dimorphism in the induction of LTP: critical role of tetanizing stimulation. *Life Sci* **75**, 119-127.

Yaniv D, Desmedt A, Jaffard R, & Richter-Levin G (2004). The amygdala and appraisal processes: stimulus and response complexity as an organizing factor. *Brain Res Brain Res Rev* **44**, 179-186.

Zald DH (2003). The human amygdala and the emotional evaluation of sensory stimuli. *Brain Res Brain Res Rev* **41**, 88-123.

Zapater P, Novalbos J, Gallego-Sandin S, Hernandez FT, & Abad-Santos F (2004). Gender differences in angiotensin-converting enzyme (ACE) activity and inhibition by enalaprilat in healthy volunteers. *J Cardiovasc Pharmacol* **43**, 737-744.

Zhang Y, Lu J, Shi J, Lin X, Dong J, Zhang S, Liu Y, & Tong Q (2008). Central administration of angiotensin-(1-7) stimulates nitric oxide release and upregulates the endothelial nitric oxide synthase expression following focal cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Neuropeptides* **42**, 593-600.

Zhu PJ & Lovinger DM (2005). Retrograde endocannabinoid signaling in a postsynaptic neuron/synaptic bouton preparation from basolateral amygdala. *J Neurosci* **25**, 6199-6207.

Zhuo M, Small SA, Kandel ER, & Hawkins RD (1993). Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus. *Science* **260**, 1946-1950.

Ziabreva I, Poeggel G, Schnabel R, & Braun K (2003). Separation-induced receptor changes in the hippocampus and amygdala of *Octodon degus*: influence of maternal vocalizations. *J Neurosci* **23**, 5329-5336.

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.

Zinebi F, Russell RT, 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.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Mechanismus der Furchtkonditionierung in der Amygdala.....	8
Abb. 1.2	Interneurone der lateralen Amygdala.....	9
Abb. 1.3	RAS des ZNS	15
Abb. 1.4	Molekulare NO Signalwege	18
Abb. 1.5	Einfluss NOs auf die präsynaptische Endigung	21
Abb. 2.1	Horizontalschnitt mit Darstellung der Reiz- und Ableitorte	34
Abb. 2.2	Darstellung eines Feldpotenzials.....	39
Abb. 3.1	A: Vergleich der Input/Output-Kurven männlicher (m) nNOS-Knockout-Mäuse [nNOS ^{-/-} , (n = 17)], eNOS-Knockout-Mäuse [eNOS ^{-/-} , (n = 18)] und Wildtyp-Mäuse [Wt, (n = 20)].....	
	B: Vergleich der Input/Output-Kurven weiblicher (f) nNOS-Knockout-Mäuse [nNOS ^{-/-} , (n = 14)], eNOS-Knockout-Mäuse [eNOS ^{-/-} , (n = 14)] und Wildtyp-Mäuse [Wt, (n = 16)].....	44
Abb. 3.2	A: Vergleich der Langzeitpotenzierung von männlichen (m) Wildtyp-Mäusen (Wt), nNOS-Knockout-Mäusen (nNOS ^{-/-}) und eNOS-Knockout-Mäusen (eNOS ^{-/-}).....	
	B: Vergleich der Langzeitpotenzierung von weiblichen (f) Wildtyp-Mäusen (Wt), nNOS-Knockout-Mäusen (nNOS ^{-/-}) und eNOS-Knockout-Mäusen (eNOS ^{-/-}).	46
Abb. 3.3	A: Vergleich der Langzeitpotenzierung nach HFS-Applikation bei C57BL/6J-Mäusen unter Kontrollbedingungen und unter Gabe von L-NAME in der Konzentration von 200 µM.	
	B: Vergleich der Langzeitpotenzierung nach TBS-Applikation bei C57BL/6J-Mäusen unter Kontrollbedingungen und unter Gabe von L-NAME in der Konzentration von 200 µM.	48
Abb. 3.4	A: Vergleich der Langzeitpotenzierung nach HFS-Applikation bei männlichen (m) Wildtyp-Mäusen (Wt) unter Kontrollbedingungen (schwarz) und unter Gabe von	

	Ang-(1-7) in der Konzentration von 0,05 μM (rot).....	
	B: Vergleich der Langzeitpotenzierung nach HFS-Applikation bei weiblichen (f) Wildtyp-Mäusen (Wt) unter Kontrollbedingungen (schwarz) und unter Gabe von Ang-(1-7) in der Konzentration von 0,05 μM (rot).....	49
Abb. 3.5	A: Vergleich der Langzeitpotenzierung nach HFS-Applikation bei männlichen (m) nNOS-Knockout-Mäusen (nNOS ^{-/-}) unter Kontrollbedingungen (schwarz) und unter Gabe von Ang-(1-7) in der Konzentration von 0,05 μM (rot).	
	B: Vergleich der Langzeitpotenzierung nach HFS-Applikation bei weiblichen (f) nNOS-Knockout-Mäusen (nNOS ^{-/-}) unter Kontrollbedingungen (schwarz) und unter Gabe von Ang-(1-7) in der Konzentration von 0,05 μM (rot).	51
Abb. 3.6	A: Vergleich der Langzeitpotenzierung nach HFS-Applikation bei männlichen (m) eNOS-Knockout-Mäusen (eNOS ^{-/-}) unter Kontrollbedingungen (schwarz) und unter Gabe von Ang-(1-7) in der Konzentration von 0,05 μM (rot).	
	B: Vergleich der Langzeitpotenzierung nach HFS-Applikation bei weiblichen (f) eNOS-Knockout-Mäusen (eNOS ^{-/-}) unter Kontrollbedingungen (schwarz) und unter Gabe von Ang-(1-7) in der Konzentration von 0,05 μM (rot).	52
Abb. 3.7	Das Balkendiagramm stellt die durchschnittlichen Veränderungen während der Langzeitpotenzierung im lateralen Kern der Amygdala unter den bisher genannten Fragestellungen dar (* = signifikanter Unterschied, $p < 0,05$).....	53
Abb. 3.8	A: Vergleich der Langzeitpotenzierung nach HFS-Applikation bei männlichen (m) C57BL/6J-Mäusen unter Gabe von Ang-(1-7) in der Konzentration von 0,05 μM (schwarz) und unter Gabe von L-NAME in der Konzentration von 200 μM zusammen mit Ang-(1-7) in der Konzentrationen von 0,05 μM (rot).....	
	B: Vergleich der Langzeitpotenzierung nach HFS-Applikation bei männlichen (m) C57BL/6J-Mäusen unter Gabe von L-NAME in der Konzentration von 200 μM (schwarz) und unter Gabe von L-NAME in der Konzentration von 200 μM zusammen mit Ang-(1-7) in der Konzentrationen von 0,05 μM (rot).....	54
Abb. 3.9	Darstellung des Paired-Pulse-Verhaltens von Wildtyp-Mäusen (Wt) im lateralen Kern der Amygdala nach Reizung der externen Kapsel in Abhängigkeit vom Geschlecht. Männliche Tiere (m) sind blau, weibliche Tiere (f) sind rot illustriert.	56

Abb. 3.10	Darstellung des Paired-Pulse-Verhaltens von eNOS-Knockout-Mäusen (eNOS ^{-/-}) im lateralen Kern der Amygdala nach Reizung der externen Kapsel in Abhängigkeit vom Geschlecht.	57
Abb. 3.11	Vergleich des Paired-Pulse-Verhaltens von männlichen Wildtyp-Mäusen (Wt) nach Stimulation der externen Kapsel unter Kontrollbedingungen (schwarz) und unter Gabe von Ang-(1-7) in der Konzentration von 0,05 µM.	58
Abb. 3.12	Vergleich des Paired-Pulse-Verhaltens von weiblichen Wildtyp-Mäusen (Wt) nach Stimulation der externen Kapsel unter Kontrollbedingungen (schwarz) und unter Gabe von Ang-(1-7) in der Konzentration von 0,05 µM.	59
Abb. 3.13	Vergleich des Paired-Pulse-Verhaltens von weiblichen nNOS-Knockout-Mäusen (nNOS ^{-/-}) nach Stimulation der externen Kapsel unter Kontrollbedingungen (schwarz) und unter Gabe von Ang-(1-7) in der Konzentration von 0,05 µM.	60
Abb. 4.1	Einfluss von Estrogenrezeptoren auf Bestandteile des RAS.....	74
Abb. 4.2	Molekulare Mechanismen der Langzeitpotenzierung in der lateralen Amygdala	82

6.2 Veröffentlichungsverzeichnis

Staschewski J., Albrecht D. (2009) Gender-dependent involvement of the endothelial and neuronal nitric oxide synthase in the angiotensin-(1-7)-mediated enhancement of LTP in the lateral amygdala. 20th European Students' Conference. Eur J Med Res 14 (Supplement II): 155.

Staschewski J., Kulisch C., Albrecht D. (2011) Different isoforms of nitric oxide synthase are involved in angiotensin-(1-7)-mediated plasticity changes in the amygdala in a gender-dependent manner. Neuroendocrinology 94: 191-199.

6.3 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jörg Staschewski, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die geschlechtsspezifische Bedeutung von Isoformen der NO-Synthase für die Ang-(1-7) modifizierte Langzeitpotenzierung in der lateralen Amygdala" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s. o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s. o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, den 09.09.2015

Jörg Staschewski

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Jörg Staschewski hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Staschewski J., Albrecht D. (2009) Gender-dependent involvement of the endothelial and neuronal nitric oxide synthase in the angiotensin-(1-7)-mediated enhancement of LTP in the lateral amygdala. 20th European Students' Conference. Eur J Med Res 14 (Supplement II): 155.

Beitrag im Einzelnen (ca. 70 %): Mitarbeit Studienkonzept, -vorbereitung, eigenständige Erhebung der Daten, eigenständige statistische Auswertung und Dateninterpretation, Verfassung des Manuskriptentwurfs, Erstellung der Bilder.

Publikation 2: Staschewski J., Kulisch C., Albrecht D. (2011) Different isoforms of nitric oxide synthase are involved in angiotensin-(1-7)-mediated plasticity changes in the amygdala in a gender-dependent manner. Neuroendocrinology 94: 191-199.

Beitrag im Einzelnen (ca 80 %): Mitarbeit Studienkonzept, -vorbereitung (20 %), experimentelle Durchführung und eigenständige Erhebung der Daten (80 %), eigenständige statistische Auswertung und Dateninterpretation (70 %), Verfassung des Manuskriptentwurfs (20 %), Erstellung der Bilder (70 %).

Berlin, den 09.09.2015

Jörg Staschewski

6.5 Lebenslauf

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

6.7 Danksagung

Mein größter Dank gilt meiner Doktormutter PD Dr. Doris Albrecht für die exzellente Betreuung dieser Arbeit. Für ihre Unterstützung und die stets unkomplizierte und hoch qualifizierte Hilfe bin ich ihr über alle Maßen dankbar.

Dem gesamten Team der Arbeitsgruppe Plastizität in der Amygdala am Institut für Neurophysiologie danke ich für die immerwährende Hilfsbereitschaft. Insbesondere Herrn Roland Schneider danke ich für die technische Hilfe und jederzeit verfügbare Unterstützung hinsichtlich aller die Messungen betreffenden Fragen. Ich danke ebenfalls Herrn Dr. Herbert Siegmund für die Programmierung der Signal – Scriptfiles.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Andreas Patzak für das zur Verfügung stellen der nNOS-Knockout-Mäuse, der eNOS-Knockout-Mäuse sowie der Wildtyp-Mäuse.

Besonderer Dank gilt vor allem meiner gesamten Familie, dabei besonders meiner Partnerin, für die liebevolle Unterstützung.

Insbesondere danke auch ich meinen Eltern, die mir nicht nur mein Arztstudium ermöglichten, sondern durch Korrekturlesen dieser Arbeit maßgeblich an dessen Fertigstellung beteiligt waren.