

1 Einleitung

Angst oder Furcht als gerichtete Angst sind Emotionen, die für das Überleben eines Tieres oder des Menschen wesentlich sind. Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung von Funktionen der Amygdala, einer Hirnstruktur, die für die Entstehung von Angst, insbesondere von erlernter Furcht ausschlaggebend ist. Im Unterschied zum Hippocampus, der für die räumliche Orientierung und das deklarative Gedächtnis entscheidend ist, wird die Amygdala als neuronales Substrat der Emotionen angesehen. Sie gehört zu den Strukturen, welche für die Bildung des nicht-deklarativen Gedächtnisses, über das auch Tiere verfügen, verantwortlich sind.

1.1 Die Amygdala

Die Amygdala hat ihren Namen nach ihrem mandelförmigen Aussehen und ist im anterioren medialen Teil jedes Temporallappens lokalisiert. Sie besteht aus mehr als 10 Substrukturen, welche die neuere Forschung nach ihrer Funktion, Zytoarchitektur und Afferentierung inzwischen noch weiter untergliedert (Pitkänen et al., 2000a; Zirlinger et al., 2001). Viele ihrer Subregionen erinnern an kortikale Strukturen, insbesondere der basolaterale Komplex, der sich aus lateralem, basolateralem und basomedialem Kern zusammensetzt. Die Amygdala kann weiter durch eine große Anzahl intranukleärer Verschaltungen sowie durch das Vorkommen einer immensen Zahl von Neurotransmittern und Neuropeptiden charakterisiert werden. Sie erhält direkte Eingänge vom visuellen, auditiven und somato-sensorischen Kortex. Thalamische glutamaterge Afferenzen kommen vor allem aus dem medialen Corpus geniculatum und den supragenikulären Kernen. Zusätzlich erreichen die Amygdala viele, meist polysensorische Afferenzen aus kortikalen und limbischen Assoziationsfeldern, so vom Gyrus cinguli, der Insel, dem Hippocampus, dem temporalen, frontalen und perirhinalen Kortex (Pitkänen et al., 2000b; Pitkänen et al., 2002; Price, 2003). Ausgänge gehen vor allem zu den verschiedenen vegetativen Zentren im Hypothalamus, zum Hirnstamm, zur Substantia innominata und zum ventralen Striatum. Der zentrale Kern kann als Hauptausgangsstation betrachtet werden. Somit stellt die Amygdala ein Interface dar, durch das externe Reize die Emotionen beeinflussen oder aktivieren können, wobei dann vegetative und hormonelle

Änderungen über den Hypothalamus und Verhaltensreaktionen durch Innervation des Hirnstammes realisiert werden. Die Amygdala ist somit dem Hypothalamus übergeordnet, der selbst autonome Reaktionen steuert, diese jedoch nicht an die jeweilige Umweltsituation adäquat anpassen kann. Durch die erst in den letzten Jahren aufgezeigte sehr enge reziproke Verschaltung mit verschiedenen kortikalen Arealen wird der Amygdala ermöglicht, die sensorische Verarbeitung in relevanten Situationen zu modifizieren. Das Fehlen von Verbindungen zwischen dem parietalen Kortex und der Amygdala suggeriert, daß die Amygdala nicht der Reizlokalisierung dient. Da die Amygdala sowohl beim Lernen aversiver (Fendt and Fanselow, 1999; Davis and Shi, 2000; LeDoux, 2000; McGaugh, 2000) als auch appetitiver Assoziationen (Everitt and Robbins, 2000) involviert ist, könnte sie der Ort der Reizidentifikation sein. Die unterschiedlichen Funktionsweisen der einzelnen Subregionen ermöglichen der Amygdala, den sensorischen Signalen eine emotionale Signifikanz zu verleihen und Gedächtnisprozesse bzw. -mechanismen zu modulieren (Holland et al., 2000; Schafe et al., 2001; McGaugh, 2002). Die Amygdala ist demzufolge in der Lage, die Sinneseindrücke während eines Lernprozesses mit positiven (Freude, Zuneigung) oder negativen (Angst, Furcht, Aggression) Gefühlen zu assoziieren (Squire and Kandel, 1999). Kommt es zu Verletzungen oder zu funktionellen Störungen der Amygdala oder einzelner Unterkerne wird die Bewertung sozialer Signale, wie z.B. die soziale Kognition (Pitkänen et al., 1997; Adolphs, 2001; Adolphs, 2002) erschwert und das emotionale Verhalten bzw. Gedächtnis (Pawlowsche-Furchtkonditionierung) kann Veränderungen aufzeigen (Pitkänen et al., 1997; Adolphs, 2001; Adolphs, 2002; Fanselow and Gale, 2003). Neben zahlreichen Verhaltensstudien und Lernexperimenten, welche insbesondere die Beteiligung der Amygdala bei der Furchtkonditionierung nachweisen, werden in der letzten Zeit auch Studien zur Langzeitpotenzierung (LTP) als mögliches Gedächtnismodell in der Amygdala durchgeführt. Da die der LTP zugrundeliegenden Mechanismen in der Amygdala noch weitgehend ungeklärt sind, soll in dieser Studie mit Hilfe elektrophysiologischer Untersuchungen geprüft werden, inwieweit Veränderungen des Verhaltens, welches durch Kindling bzw. durch Alkoholentzug verursacht wurden, die plastischen Eigenschaften der Amygdala-Neurone beeinflussen und welche Mechanismen für eine veränderte Plastizität verantwortlich sein könnten. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf den lateralen Kern der Amygdala. Neben dem basolateralen Kern (BLA) ist der laterale Kern der Amygdala (LA) die Eingangsstation der Afferenzen zum Amygdala-Komplex. Die laterale Amygdala hat zahlreiche intraamygdaläre Verbindungen, sowie Verbindungen zu den anderen limbischen Strukturen wie dem Hippocampus und dem

perirhinalen und entorhinalen Kortex. In den Abbildungen 1.1 (horizontaler Hirnschnitt), 1.2 (coronaler Hirnschnitt) und in den nachfolgenden Kapiteln wird die Komplexität der Projektionen von und zum LA, die durch diverse Arbeitsgruppen analysiert wurden, verdeutlicht.

1.2 Die horizontale Hirnschnittpräparation

In der hier vorgestellten Studie wurden horizontale Hirnschnittpräparate der Ratte verwendet. Ein großer Vorteil dieser Methodik der Hirnschnittpräparation ist, daß die zu untersuchenden Strukturen klar voneinander abzugrenzen und deshalb leicht aufzufinden sind. Im Vergleich zu *in-vivo*-Experimenten ergibt sich auf diese Weise eine hohe Sicherheit genau die Region zu untersuchen, die von Interesse ist (Shinnick-Gallagher et al., 2003).

Bei dieser Präparationstechnik stellt sich der laterale Kern in rostrocaudaler Richtung in seiner größten Ausdehnung dar und liegt mit dem Hippocampus, dem entorhinalen und perirhinalen Kortex sowie der zentralen, basalen und medialen Amygdala in einer Ebene. Die Verbindungen zwischen diesen epilepsie- und lernrelevanten Strukturen bleiben zu großen Teilen erhalten (von Bohlen und Halbach and Albrecht, 1998b; von Bohlen und Halbach and Albrecht, 2002). So konnten in der horizontalen Schnittebene durch Tracerstudien Projektionen aus dem lateralen entorhinalen und dem perirhinalen Kortex nachgewiesen werden, die den lateralen Kern der Amygdala über die externe Kapsel erreichen. Ferner bleiben Fasern aus der CA1-Region des Hippocampus in die laterale Amygdala erhalten (von Bohlen und Halbach and Albrecht, 2002). Aus Abbildung 1.1. wird ersichtlich, daß ein Großteil dieser extraamygdalären Eingänge bei Verwendung dieser Präparationstechnik durch reziproke Fasern erwidert wird. Innerhalb der Amygdala lassen sich Fasern vom LA zum basalen, medialen und zentralen Kern darstellen. Afferenzen erhält der laterale Kern vor allem aus dem basolateralen und dem medialen Kern (von Bohlen und Halbach and Albrecht, 2002). Im Gegensatz zur coronalen Schnittebene können in der horizontalen Schnittebene die thalamischen Verbindungen zum lateralen Kern der Amygdala nicht erhalten werden.

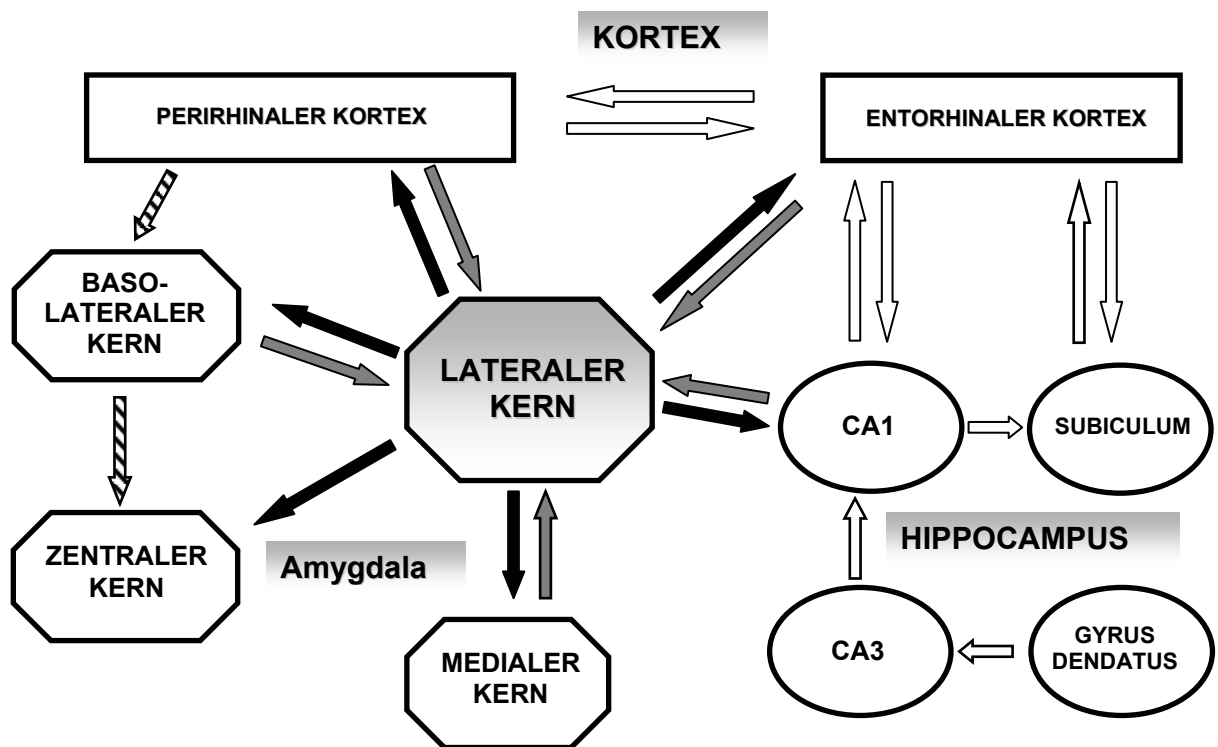


Abbildung 1.1: Horizontales Hirnschnittpräparat

Detaillierte Darstellung der intra- und extraamygdalären Afferenzen und Efferenzen des lateralen Kerns der Amygdala im horizontalen Hirnschnittpräparat, modifiziert nach von Bohlen und Halbach and Albrecht (2002). graue Pfeile: Afferenzen zum lateralen Kern der Amygdala, schwarze Pfeile: Afferenzen vom lateralen Kern der Amygdala zu den anderen Kernen der Amygdala, Kortex und Hippocampus, weiße Pfeile: Afferenzen der kortikalen und Hippocampusstrukturen untereinander, gestreifte Pfeile: Faserverbindung zwischen dem perirhinalen Kortex und dem basolateralen Kern der Amygdala bzw. dem basolateralen und zentralen Kern der Amygdala

1.3 Neurotransmission in der Amygdala

Das Transmittersystem ist entscheidend für die Kommunikation zwischen den Nervenzellen und bestimmt somit auch die synaptische Plastizität einer Struktur. Die Kommunikation der Nervenzellen erfolgt über chemische und elektrische Synapsen (*Gap junctions*). Die chemischen Synapsen können in ihrer Wirkung hemmend oder erregend sein. In hemmenden Interneuronen der Amygdala ist **Gamma-amino-butteracid** (säure) (*GABA*) der wichtigste Transmitter, während Glutamat (NMDA, non-NMDA) in erregenden Synapsen der bedeutendste Überträgerstoff ist. Neben diesen existieren noch eine Reihe

weiterer wichtiger Botenstoffe wie Serotonin, Dopamin und Azetylcholin sowie verschiedene Peptide, die sowohl hemmend als auch erregend wirken können.

Die synaptische Übertragung kann kurzzeitig oder langfristig verändert werden, wobei sowohl Verbesserung (Potenzierung) als auch Verschlechterung (Inhibition) möglich sind. Man spricht in diesem Zusammenhang von Kurz- und Langzeitplastizität sowie von Potenzierung und Depression.

1.3.1 γ -Aminobuttersäure – GABA-Rezeptoren

GABA (γ -Aminobuttersäure) ist der wesentliche hemmende Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (ZNS). Die hemmende Aktion von GABA wird durch die Anwesenheit von Rezeptoren in der Zellmembran vermittelt und führt zu einer Reduktion der neuronalen Erregbarkeit. Es konnten bis jetzt folgende drei Typen von GABA-Rezeptoren charakterisiert werden: GABA_A, GABA_B und GABA_C. GABA_A-Rezeptoren sind Liganden-gesteuerte Chlorid-Kanäle. Sie vermitteln schnelle Hemmungen und sind im ZNS weit verbreitet. GABA_A-Rezeptoren weisen eine unterschiedliche molekulare Zusammensetzung auf. Bis jetzt konnten 16 Untereinheiten in 6 Gruppen ($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon, \pi$) identifiziert werden. Bicucullin, Picrotoxin und SR95531 sind unterschiedlich spezifische Rezeptorantagonisten. An den GABA_A-Rezeptor bindet neben Barbituraten und Diazepam auch Alkohol. GABA_B-Rezeptoren gehören zu G-Protein gekoppelten Rezeptoren und setzen sich aus den Untereinheiten GBR1 und GBR2 zusammen. Die Aktivierung der GABA_B-Rezeptoren verstärkt die Kaliumleitfähigkeit. GABA_C-Rezeptoren sind wie GABA_AR Liganden-gesteuerte Chlorid-Kanäle. Sie vermitteln jedoch langsame und anhaltende Hemmungen. Pharmakologisch sind GABA_C-Rezeptoren zu Bicucullin und Baclofen insensitiv und werden auch nicht durch viele GABA_A-Modulatoren wie z.B. Benzodiazepin oder Barbiturate moduliert. Bis jetzt konnte nur eine Untereinheit ρ der GABA_C-Rezeptoren in neuronalen Membranen exakt molekular bestimmt werden. GABA_C-Rezeptoren sind in vielen Gehirngebieten exprimiert, insbesondere jedoch in retinalen Neuronen.

Der basolaterale Komplex der Amygdala enthält etwa 25% GABAerge Interneurone (McDonald and Augustine, 1993), die schnelle und langsame inhibitorische postsynaptische Potentiale (IPSPs) an den amygdalären Projektionszellen auslösen können (Rainnie et al., 1991b). Die mittleren und kleinen Dendriten von GABAergen Neuronen empfangen sowohl Synapsen von GABAergen Axonterminalen als auch erregende Synapsen.

Der starke Einfluß der GABAergen Neurone zeigt sich unter anderem darin, daß die spontane Feuerungsrate der lateralen Amygdala mit die niedrigste im Gehirns ist (Quirk et al., 1995; Pare and Collins, 2000). Die Stärke dieser GABAergen synaptischen Transmission wird durch den erregenden Einfluß des noradrenergen Systems (Li et al., 2002), des serotonineren Systems (Stutzmann and LeDoux, 1999; Stein et al., 2000), aber auch durch die Aktivierung von Kainatrezeptoren bestimmt (Braga et al., 2003).

Verschiedene Studien haben gezeigt, daß eine GABA_A-Rezeptorblockade zu einer Dosis-abhängigen Reduktion der sozialen Wechselwirkungen führt (Sanders and Shekhar, 1995) und Panik-Attacken auslösen kann (Sajdyk and Shekhar, 2000; Shekhar et al., 2003). Interessanterweise wurden solche Verhaltensänderungen auch bei wiederholter Stimulation der basolateralen Amygdala beobachtet (Sanders et al., 1995; Sajdyk and Shekhar, 2000), welches im Kontext unserer Kindlingexperimente zu sehen ist. Andere Studien ermittelten, daß eine Erhöhung der GABAergen Neurotransmission die Entwicklung epileptischer Entladungen in der Amygdala verzögern, sofern sie vor den ersten epileptischen Entladungen stattfand (Halonen et al., 2001). Eine reduzierte GABAerge Hemmung verstärkt konditionierte Furchtantworten und scheint relevant bei Phobien und Suchtverhalten (Quirk and Gehlert, 2003).

In dieser Arbeit galt die Konzentration dem GABA_A-Rezeptor. Die Beteiligung des GABA_A-Rezeptors an der Plastizität des lateralen Kern der Amygdala wurde mit Hilfe des hoch selektiven, kompetitiven Antagonisten SR95531, ein Pyridazinyl GABA Derivat, untersucht (Zimmermann et al., 1989)

1.3.2 Glutamatrezeptoren

Die glutamaterge Neurotransmission vermitteln viele Formen der synaptischen Plastizität im ZNS. Als Beispiel wären Langzeitpotenzierung und Kindling, d.h. die repetitive elektrische Stimulation in der Amygdala, zu nennen (Baudry, 1986; Allison and Pratt, 2003).

Durch die Entwicklung von selektiven Glutamatanaloga (z.B. NMDA, AMPA, Kainat) und Glutamatrezeptorantagonisten (z.B. D-APV, CNQX) ist eine spezifische Untersuchung der funktionellen Bedeutung einzelner Glutamatrezeptoren möglich (Clarke et al., 1997; Bleakman, 1999; Bortolotto et al., 1999).

In erster Linie ist hierbei zwischen zwei Arten von Glutamatrezeptoren zu unterscheiden: (1) den schnellen, ligandenbindenden ionotropen Rezeptoren, die vor allem für die basale synaptische Transmission verantwortlich zu machen sind, aber auch

erfahrungsabhängige Prozesse steuern und (2) den langsamen G-Protein gekoppelten metabotropen Rezeptoren, die besonders für die amygdaläre Plastizität eine Rolle spielen.

Die ionotropen Glutamaterezeptoren lassen sich in NMDA-Rezeptoren und non-NMDA-Rezeptoren unterteilen. Die non-NMDA-Rezeptoren werden weiter in AMPA- und Kainatrezeptoren untergliedert. Die Namensgebung der Rezeptoren erfolgte nach den spezifischen Agonisten **N-methyl-D-aspartat** (*NMDA*), α -**amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionacid** (säure) (*AMPA*) und Kainat (Watkins and Evans, 1981). Sie bestehen aus vier oder fünf Untereinheiten und besitzen untereinander strukturelle Ähnlichkeiten. So weist jede dieser Einheiten drei Transmembrandomänen (M1, M3 und M4), eine Efferentloop-Einheit (M2), sowie ein extrazelluläres N- und ein intrazelluläres C-Terminal auf (www.bris.ac.uk/synaptic/info/glutamate.html, 2003). Bedingt durch Gentranskription, mRNA-Modifikationen und alternatives Splicen ergibt sich trotz grundlegender Ähnlichkeiten eine erhebliche Variationsbreite in bezug auf Struktur und Funktion.

Anfang der 90er Jahre konnte gezeigt werden, daß die Projektionsneurone in der lateralen Amygdala schnelle exzitatorische postsynaptische Potentiale (EPSPs) (vermittelt durch non-NMDAR) und langsame EPSPs (vermittelt durch NMDAR) bei synaptischer Stimulation generieren können (Rainnie et al., 1991a; Rainnie et al., 1991b).

In dieser Arbeit galt unser besonderes Interesse der Bedeutung des ionotropen Kainatrezeptors GluR5.

1.3.2.1 NMDA-Rezeptoren

NMDA-Rezeptoren setzen sich aus einer Verbindung von NR1- und NR2-Untereinheiten zusammen, welche eine von vier separaten Genprodukten (NR2A-D) sein kann. Die Expression beider Untereinheiten wird benötigt, um funktionelle Kanäle zu formen.

Beim Ruhemembranpotential sind NMDA-Rezeptoren inaktiv, da eine spannungsabhängige Blockade der Kanalporen durch Magnesiumionen vorliegt. Nach starker Depolarisation wird diese Blockade aufgehoben und der NMDA-Rezeptor somit aktiviert. Diese NMDA-Rezeptoraktivierung führt postsynaptisch zu einem Kalziumeinstrom, wodurch sich die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöht und damit NMDA-abhängige Langzeitpotenzierung oder –depression vermittelt werden kann (Maren, 1996; Weisskopf et al., 1999; Royer and Pare, 2002).

1.3.2.2 AMPA-Rezeptoren

AMPA-Rezeptoren sind aus den Untereinheiten GluR1-4 zusammengesetzt (Keinanen et al., 1990), welche durch separate Gene entstehen. AMPA-Rezeptorkanäle sind impermeabel für Kalzium. Unter Ruhemembranbedingungen vermitteln AMPA-Rezeptoren durch einen Einstrom von monovalenten Kationen (Na^+ und K^+) die basale synaptische Aktivität in der basolateralen Amygdala (Rainnie et al., 1991a).

1.3.2.3 Kainatrezeptoren

Kainatrezeptoren bestehen aus verschiedenen Untereinheiten (GluR5-7; KA-1-2). KA1 und KA2 sind untereinander zu 70% und mit GluR1-4 zu 40% sequenzhomolog (Bleakman and Lodge, 1998) und GluR5-7 sind zu 75-80 % untereinander sequenzhomolog (Hollmann and Heinemann, 1994). Die GluR5-, GluR6- und GluR7-Einheiten können untereinander homomere Komplexe und mit KA1 und KA2 heteromere Ionenkanäle formen (Lerma, 1997). GluR5 und GluR7 Kainatrezeptoruntereinheiten existieren in verschiedenen „*Splice*“-Variationen. GluR5 Rezeptoren können in der Form GluR5-1 und GluR5-2 auftreten (Bettler et al., 1990), wobei die GluR5-2 Einheit nochmalig in 3 „*Splice*“-Variationen 2a, 2b, und 2c untergliedert werden kann aufgrund von Unterschieden in den C- Terminalsequenzen (Sommer et al., 1992).

Die Kainatrezeptoren, vor allem die GluR5- (Sander et al., 1997) und GluR6-Einheiten (Contractor et al., 2000), stehen im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses bei der Entstehung der Epilepsie (Watkins and Evans, 1981). Die GluR5- und GluR6-Untereinheiten werden in der Amygdala stark exprimiert (Bettler et al., 1990; Li et al., 2001; Braga et al., 2003). Die Kainatkanäle, die die GluR5-Einheit enthalten, scheinen eine modulierende Funktion auf die Transmitterausschüttung zu besitzen (Clarke et al., 1997), d.h. sie können die synaptische Transmission modulieren (Li and Rogawski, 1998) bzw. in Mechanismen der Plastizität eingreifen (Li et al., 2001; Rogawski et al., 2003). Außerdem scheinen NMDA-Rezeptor-unabhängige Formen der Langzeitpotenzierung im Hippocampus (Clarke et al., 1997; Vignes et al., 1998; Bleakman, 1999; Bortolotto et al., 1999; Lauri et al., 2001) und in der Amygdala (eingangsspezifisch) (Li et al., 2001) durch diese Einheit vermittelt zu werden. Dank der Fortschritte auf dem Gebiet der Pharmakologie ist es möglich, einzelne Untereinheiten selektiv zu beeinflussen und ihre Funktion auf diese Weise genauer zu analysieren.

Erschwerend wirkt jedoch, daß die Kainatrezeptoren je nach Hirnregion aus einem unbekanntem stöchiometrischen Verhältnis von Untereinheiten aufgebaut sein können. Blockade einer Einheit durch Pharmaka oder deren Fehlen bei Knockout-Tieren schließt eine Restaktivität der anderen Untereinheiten nicht aus.

Darausfolgend ist das Bild von der Funktion, der genauen Zusammensetzung und Verteilung vor allem in der Physiologie der Amygdala noch lückenhaft. Im Rahmen dieser Studie wurde die Rolle der GluR5-Einheit des Kainatrezeptors bei der Langzeitpotenzierung in der lateralen Amygdala nicht nur erstmalig in adulten Kontrollen, sondern auch im „Kindlingmodell“ und in Pilocarpin-behandelten Tieren untersucht.

1.4 Erscheinungsform und Modelle der synaptischen Plastizität

In dieser Arbeit wurde die synaptische Plastizität des lateralen Kerns der Amygdala mit Hilfe des Modells der Langzeitpotenzierung (LTP) bzw. -depression (LTD) und des Paired-Pulse-Verhalten unter normalen Bedingungen sowie nach BLA-Kindling, nach Pilocarpinbehandlung oder Alkoholentzug untersucht. Zur Einordnung der hier vorgestellten Studie soll kurz auf bisher bekannte Ergebnisse zum besseren Verständnis von Lern- und Gedächtnismechanismen und der besonderen Rolle der Amygdala eingegangen werden.

1.4.1 Die Langzeitpotenzierung (LTP) und Langzeitdepression (LTD)

Als synaptische Modelle für die Untersuchung von Lernprozessen werden Langzeitpotenzierung (*long-term potentiation, LTP*) und Langzeitdepression (*long-term depression, LTD*) angesehen (Bliss and Collingridge, 1993; Nicoll and Malenka, 1995).

Bei LTP handelt es sich um eine langfristige Erhöhung, bei LTD um eine dauerhafte Erniedrigung der synaptischen Effizienz. Synapsen sind meist bidirektional beeinflussbar und können in Abhängigkeit von Lokalisation und Afferenz sowohl LTP als auch LTD ausbilden (Bear and Malenka, 1994).

Die Langzeitpotenzierung besitzt die drei wesentlichen Eigenschaften: (1) Kooperation - es muß eine Mindestanzahl von Synapsen zur Induktion der Potenzierung kooperativ tätig sein, (2) Assoziation - gleichzeitige Aktivierung der prä- und postsynaptischen Zelle und (3) Spezifität - LTP bleibt meist auf die erregten Synapsen beschränkt (Schmidt, 1999). Weitere Charakteristika wie die langanhaltende Erhöhung der synaptischen Aktivität und

die schnelle Induzierbarkeit machen die Langzeitpotenzierung zu einem attraktiven Modell für die Verschlüsselung von Lernprozessen (Rogan and LeDoux, 1996; Maren, 1999).

Aufgrund von *in-vivo*- und *in-vitro*-Experimente vermutet man, daß die zugrundeliegenden Veränderungen von Langzeitpotenzierung und Gedächtnisspeicherung ähnlich sind (Morris et al., 1986) .

An kortikoamygdalären (Li et al., 2001) und thalamoamygdalären (Tsvetkov et al., 2004) Synapsen konnten LTP-Formen nachgewiesen werden, die in ihrer Ausdehnung nicht spezifisch waren. Auch Synapsen der Umgebung wiesen nach Induktion eine erhöhte synaptische Aktivität auf. Tsvetkov und Kollegen (2004) postuliert, daß neben der Möglichkeit der Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern und der Aktivierung sogenannter stiller Synapsen ein Überlaufen (*spillover*) von Glutamat aus dem synaptischen Spalt in benachbarte Regionen dieser heterosynaptischen Form der Plastizität zugrunde zu liegen scheint. Im wesentlichen sollen für diese Spezifität der LTP an thalamoamygdalären Synapsen Mechanismen des Glutamatclearance (z.B. Glutamatwiederaufnahme und –deaktivierung) verantwortlich sein (Tsvetkov et al., 2004). Die Wiederaufnahmeprozesse sind bei starker synaptischer Aktivierung und entsprechend ausgeprägter Freisetzung von Glutamat nicht mehr ausreichend, so daß der Transmitter den synaptischen Spalt verläßt, in die unmittelbare Nachbarschaft diffundiert und bei ausreichender Konzentration dortige AMPA-, NMDA- und Kainatrezeptoren aktiviert. Im Falle einer synaptischen „Kreuzaktivität“, beispielsweise durch Depolarisierung der postsynaptischen Zelle (Assoziativität) könnte es an diesen fernen Synapsen zu einer LTP-Induktion kommen (Kullmann et al., 1996). Dieses Modell des „übertretenden“ Glutamats böte die Möglichkeit, das toxische Potential hoher Glutamatkonzentrationen (übermäßig starke synaptische Tätigkeit wie z.B. bei epileptischen Anfällen) zu erklären.

Seit der Entdeckung im Jahre 1973 an Neuronen des Hippocampus (Bliss and Gardner-Medwin, 1973; Bliss and Lomo, 1973) konnte das Phänomen der LTP in vielen anderen Strukturen des ZNS, unter anderem auch in der Amygdala *in-vivo* und *in-vitro* nachgewiesen werden (Racine et al., 1983; Chapman et al., 1990; Clugnet and LeDoux, 1990; Gean et al., 1993; Maren and Fanselow, 1995; Huang and Kandel, 1998). Die erste *in-vivo* Studie zur Langzeitpotenzierung in der Amygdala stammt von Racine und Kollegen (1983). Hier wurden ohne genauere Zuordnung der Substrukturen in der Amygdala Feldpotentialamplitudenänderungen abgeleitet, die durch Reizung der CA1-Region, des piriformen Kortex, des lateralen olfaktorischen Traktes und der septalen Kerne zustande kamen (Racine et al., 1983). Die erste Arbeit, die unter *in-vivo*-Bedingungen LTP im lateralen Kern der Amygdala zeigte, führte durch Stimulation des

Corpus geniculatum mediale zu einer LTP in der lateralen Amygdala (Clugnet and LeDoux, 1990). Im gleichen Jahr konnte in der horizontalen Schnittebene durch Reizung der externen Kapsel und Verwendung von intrazellulären Ableitungen an männlichen Sprague-Dawley Ratten erstmalig LTP im lateralen Kern *in-vitro* gezeigt werden (Chapman et al., 1990). Seither haben verschiedene Studien, mit Ausnahme von Chapman und Bellavance (1992), ausschließlich unter Verwendung der coronalen Schnittebene das Phänomen der Langzeitpotenzierung im lateralen Kern der Amygdala durch Reizung thalamischer (Weisskopf et al., 1999; Bauer et al., 2002) oder kortikaler Afferenzen (Watanabe et al., 1995; Huang and Kandel, 1998) untersucht.

Die meisten dieser *in-vitro* Studien verwenden die klassische Hochfrequenzreizung (*high frequency stimulation, HFS*) (Chapman et al., 1990; Gean et al., 1993; Watanabe et al., 1995; von Bohlen und Halbach and Albrecht, 1998a) bzw. eine gepaarte Stimulation (Weisskopf et al., 1999; Bauer et al., 2002), wobei niederfrequente präsynaptische Stimulation mit postsynaptischer Reizung durch Stromapplikation durch die scharfe Mikroelektrode gekoppelt wurden (z.B. durch eine Stromapplikation von 1 – 4 nA für 5 – 50 ms) (Weisskopf et al., 1999; Bauer et al., 2001; Blair et al., 2001).

Neben der klassischen HFS (Bliss and Lomo, 1973), die so stark ist, daß prä- und postsynaptische Zelle gleichzeitig aktiviert werden, kann mit einer Reihe von weiteren Induktionsparadigmen assoziative LTP induziert werden. So ist es möglich, mit Hilfe der schwächeren TBS (*theta burst stimulation*) in der laminierten Struktur des Hippocampus die physiologische Thetafrequenz nachzuahmen, die Hemmung durch Interneurone zu vermindern und eine erhöhte synaptische Aktivität zu erzeugen. In unserer Arbeitsgruppe konnte erstmalig gezeigt werden, daß TBS unter *in-vitro*-Bedingungen LA-LTP verursachen kann (Albrecht et al., 2003; Pollandt et al., 2003). Das gleiche Paradigma löst auch *in-vivo* LA-LTP aus (Yaniv et al., 2001).

Da anzunehmen ist, daß durch die unterschiedlichen Arten der Reizung verschiedene Mechanismen und unter Umständen unterschiedliche Formen der Langzeitpotenzierung aktiviert werden können, macht es diese Vielfältigkeit schwer, klare Aussagen über die zugrundeliegenden Abläufe zu treffen.

Die Langzeitpotenzierung kann in ein frühes und ein spätes Stadium eingeteilt werden (Bliss and Collingridge, 1993). Das frühe Stadium startet mit der Induktion und der sich anschließenden Kurzzeitpotenzierung (*short-term potentiation, STP und E-LTP, early-LTP*). Etwa 30-60 Minuten später beginnt das späte Stadium der LTP (*L-LTP, late-LTP*), welches wiederum in drei Abschnitte unterteilt werden kann: LTP1 (0,5 - 3 Stunden nach

der Induktion), LTP2 (3 - 6h nach dem Tetanus) und LTP3 (Tage bis Monate nach dem Tetanus).

In der hier vorgestellten Studie wurde die LTP1 untersucht. Jeder Phase liegen in Abhängigkeit von der Zeit verschiedene, zum Teil noch unverstandene Mechanismen zugrunde. Neuere Studien gehen davon aus, daß STP und LTP zwei voneinander unabhängige Prozesse sind (Schulz and Fitzgibbons, 1997). Weiterhin ist bekannt, daß die frühen Stadien, anders als die späten Abschnitte, unabhängig von RNA-Transkription und Proteinsynthese sind. Die späten Zeiträume führen darüber hinaus zu elektronenmikroskopisch sichtbaren strukturellen Veränderungen an den Synapsen (Bliss and Collingridge, 1993; Kandel, 1997; Blair et al., 2001).

Zur Auslösung einer LTD werden niederfrequente Stimuli wie TPS (*theta pulse stimulation*; 5-8 Hz, 150 s) (Cousens and Otto, 1998; Brown et al., 2000; Kaschel et al., 2004) oder LFS (*low frequency stimulation*; 15min 1 Hz) z.B. im Hippocampus (Mockett et al., 2002), der BLA von Mäusen (Rammes et al., 2000) oder der LA von Ratten (Kaschel et al., 2004) eingesetzt. Lin et al. (2003) konnten nachweisen, daß die *in-vitro* gefundenen Ergebnisse zur Induktion einer LTD mit *in-vivo* beobachteten Befunden korrelieren, d.h. LFS reduzierte auch die konditionierte Furcht (Yasuda and Tsumoto, 1996).

Man vermutet, daß sowohl der Potenzierung als auch der Depotenzierung NMDAR- bzw. L-Typ-VGCC (*voltage gated calcium channels*)-vermittelte Mechanismen zugrundeliegen. In Abhängigkeit von den verwendeten Reizparadigmen (HFS, TPS, LFS) ergibt sich ein unterschiedlich starker Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels. Während höhere Anstiege der intrazellulären Kalziumkonzentration LTP (z.B. nach HFS) bzw. ein Auslöschen der LTD (Reversal) induzieren, bewirken geringere Anstiege LTD oder Depotenzierung (z.B. nach TPS).

1.4.2 Das Paired-Pulse-Verhalten (Doppelreizverhalten)

Zwei sehr wichtige Formen von synaptischer Kurzzeitplastizität sind *paired pulse facilitation* (PPF, PP-Fazilitierung) und *paired pulse depression* (PPD). Die Applikation von zwei kurz aufeinander folgenden Stimuli (wenige Millisekunden bis einige Sekunden) führt zu einer veränderten Antwort des zweiten Reizes gegenüber dem ersten. Eine präsynaptisch veränderte Kalziumkonzentration wird allgemein als Ursache dieses Effektes angenommen (Katz and Miledi, 1968; Zucker, 1989; Commins et al., 1998; Zinebi et al., 2001; Zinebi et al., 2002).

Bei der Paired-Pulse-Fazilitierung führt ein Aktionspotential zu einem Kalziumeinstrom in das präsynaptische Terminal mit nachfolgender Transmitterfreisetzung. Folgt in einem engen zeitlichen Rahmen eine zweite Erregung, so strömt erneut Kalzium in die Präsynapse ein und summiert sich zum restlichen Kalzium des ersten Reizes. Die Folge ist eine vermehrte Transmitterfreisetzung.

Der Aktivitätsgrad der Synapse bestimmt die Transmitterfreisetzungswahrscheinlichkeit (*Release probability*). Besitzt eine Synapse einen sehr hohen Aktivitätsgrad, wird bereits nach dem ersten Reiz eine große Transmittermenge freigesetzt, so daß bei Ankunft des zweiten Reizes keine weitere Steigerung stattfinden kann (Pena et al., 2002). Die Antwort des zweiten Reizes ist gegenüber dem ersten nun kleiner. Dieses Verhalten wird als Paired-Pulse-Depression bezeichnet.

Verschiedene Studien konnten nach LTP-Induktion in der Amygdala (Huang and Kandel, 1998; Tsvetkov et al., 2002) und nach Angstkonditionierung (McKernan and Shinnick-Gallagher, 1997; Shinnick-Gallagher et al., 2003) eine reduzierte Paired-Pulse-Fazilitierung nachweisen. Dies wird gemeinhin als Zeichen eines präsynaptischen Teilmechanismus im Sinne einer erhöhten Transmitterfreisetzung gedeutet (Harris and Cotman, 1985; Son and Carpenter, 1996).

Die Paired-Pulse-Fazilitierung bzw. -Depression wird durch den zeitlichen Abstand der beiden Reize (Interstimulusintervall) und von den GABAergen Einflüssen mitbestimmt. Bei mittleren Reizabständen, d.h. bei 30 bis 100 Millisekunden, liegt eine maximale Kalziumkonzentration vor, welche in einer Potenzierung des zweiten Potentials resultiert (Stanford et al., 1995). Aus Studien im Hippocampus ist bekannt, daß es bei sehr kurzen Reizabständen (10 bis 20 Millisekunden) zu einer Reduzierung der Antwort auf den zweiten Reizes kommt, woran GABA_A-Rezeptoren beteiligt sind. Sehr lange Reizabstände (ab 200 Millisekunden) zeigen ebenfalls eine Paired-Pulse-Depression, die über langsamer aktivierte, metabotrope GABA_B-Rezeptoren vermittelt wird. Daneben wird die Antwort auf die veränderte Transmitterfreisetzung auch über postsynaptische NMDA- und AMPA-Rezeptoren vermittelt (McKernan and Shinnick-Gallagher, 1997; Zinebi et al., 2001; Akopian and Walsh, 2002; Zinebi et al., 2002; Shinnick-Gallagher et al., 2003). Über die physiologische Bedeutung des künstlich erzeugten Paired-Pulse-Verhaltens herrscht noch weitestgehend Unklarheit (Zucker, 1989). Es wird vermutet, daß es sich hierbei um eine Art von synaptischer Filterfunktion handeln könnte (Commins et al., 1998; Li et al., 2000; Gemmell and O'Mara, 2002). Schnell und kontinuierlich eintreffende Reize könnten im Sinne einer Paired-Pulse-Fazilitierung verstärkt weitergeleitet werden und die Verlässlichkeit der synaptischen Übertragung erhöhen (Gemmell and O'Mara, 2002).

Zufällige Erregungen mit inkonstanten Reizabständen würden dagegen in Form einer Paired-Pulse-Depression behindert werden (Commins et al., 1998; Li et al., 2000).

1.4.3 Pawlowsche Furchtkonditionierung

Ein gut etabliertes experimentelles Modell, um neurobiologischen Mechanismen des Lernens und emotionales Verhalten zu studieren, ist die Pawlowsche Furchtkonditionierung (LeDoux and Muller, 1997; Schafe et al., 2001). Die Furchtkonditionierung ist eine Form des assoziativen Lernens, wobei ein neutraler, sensorischer Reiz mit einer aversiven Bekräftigung (unbedingter Reiz, US, z.B. Fußschock) zeitlich gekoppelt wird. Durch diese zeitliche Kopplung erlangt der sensorische Reiz eine biologische Bedeutung (konditionierter Reiz, CS), dessen alleinige Gabe nach Konditionierung das aversive Verhalten auslöst. Einige der Arbeiten zur Furchtkonditionierung benutzten als sensorischen Reiz vor allem Töne oder Stimulation auditorischer Hirnstrukturen (LeDoux, 2000), während andere eine Konditionierung mit visuellen Reizen erzielten, bzw. die für die visuell evozierte Furchtkonditionierung verantwortlichen Afferenzen bestimmten (Miserendino et al., 1990; Linke et al., 1999; Shi and Davis, 2001).

Die Amygdala wird als eine Schlüsselkomponente beim Erwerb der Pawlowschen Furchtkonditionierung betrachtet. Insbesondere der laterale Kern der Amygdala (Rogan et al., 1997; Blair et al., 2001) bzw. der basolaterale Komplex der Amygdala scheint eine dominierende Rolle in den assoziativen Prozessen der Furchtkonditionierung zu spielen (Maren, 2003). Zahlreiche Studien haben ermittelt, daß der laterale Kern der Amygdala die primäre Eingangsstation für sensorische Signale des CS ist, die über eine thalamische und eine kortikale Route übertragen werden können. Der langsamere kortikale Weg scheint dabei komplexe Reizanalysen durchzuführen (Pitkänen, 1998; LeDoux, 2000).

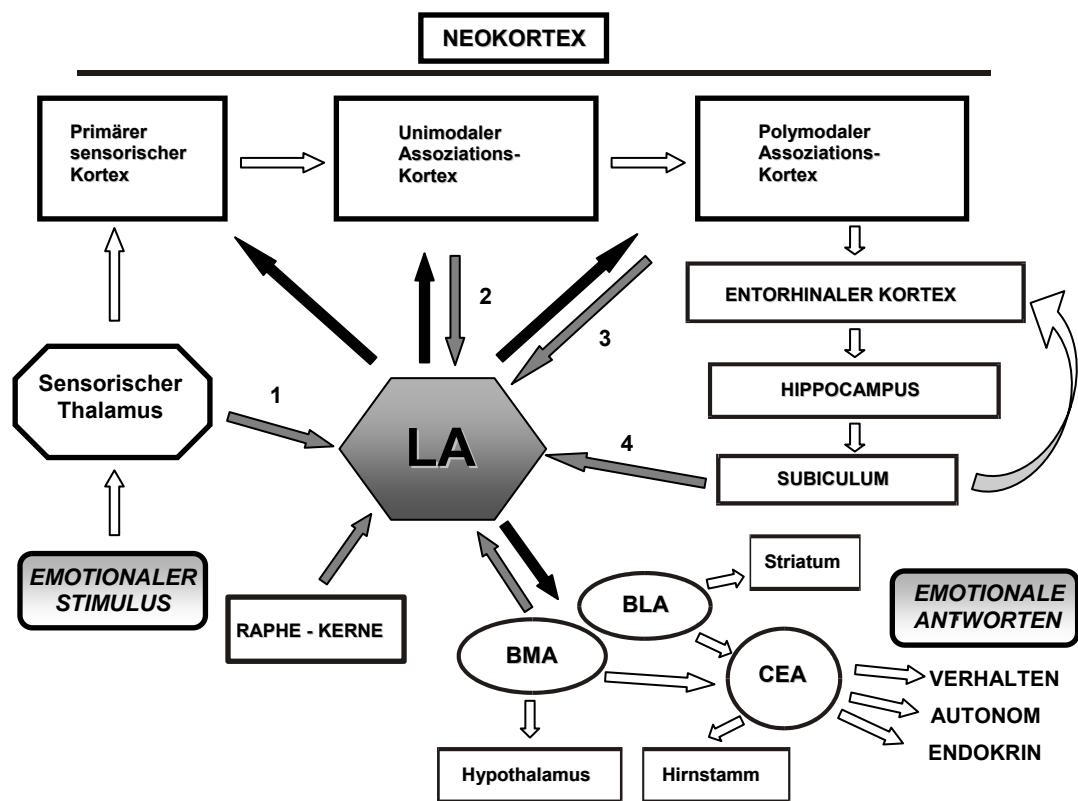


Abbildung 1.2: Bedeutung der lateralen Amygdala für die Furchtkonditionierung

modifiziert nach Pitkänen et al. (1997a). LA: lateraler Kern der Amygdala; BMA: basomedialer Kern der Amygdala; BLA: basolateraler Kern der Amygdala; CEA: zentraler Kern der Amygdala; schwarze Pfeile: Reizausgänge und graue Pfeile: Reizeingänge des lateralen Kerns der Amygdala, weiße Pfeile: Weiterleitung und Verarbeitung der Afferenzen, Ziffern 1-4: Reizeigenschaften 1: Umrisse, 2: Objekte, 3: Konzepte, 4: Kontexte

Der zentrale Kern der Amygdala (CEA) ist das Interface der Systemkontrolle für spezifische Furchtantworten (Abbildung 1.2; Verhalten, vegetativ, endokrin) (LeDoux and Muller, 1997). Es kommt somit zu einer assoziativen Verknüpfung von US und CS insbesondere im dorsalen Anteil der LA. Weitere Untersuchungen ergaben, daß die Furchtkonditionierung auch die Entladungsrate der Neurone in der lateralen Amygdala in Erwartung des aversiven Reizes (Schock) erhöhen kann (Pare and Collins, 2000) und die intra-amygdalären Verbindungen verstärkt werden (Quirk et al., 1995). Die erlernte Furcht ist somit mit einer Zunahme der Erregbarkeit in der lateralen Amygdala assoziiert. Durch Assoziation von bedingtem (CS) und unbedingtem Reiz (US) im basolateralen Komplex der Amygdala wird nach intranukleärer Verarbeitung über den zentralen Kern Hirnstamm und Hypothalamus angesteuert, um so die entsprechenden Verhaltensantworten auszulösen (Amorapanth et al., 2000) (s. Überblick Abb.1.2).

1.4.4 Ist die Langzeitpotenzierung ein Gedächtniskorrelat?

Über Jahre hat sich in der Forschung die Langzeitpotenzierung (LTP) als Modell zur Untersuchung der synaptischen Plastizität und Modell der Gedächtnisbildung *in-vitro* (Chapman et al., 1990; Chapman and Bellavance, 1992) und *in-vivo* (Clugnet and LeDoux, 1990) in der Amygdala, insbesondere im basolateralen (BLA) und lateralen Kern (LA) der Amygdala (Maren, 1999) allein oder in Kombination mit anderen Versuchsmodellen, wie zum Beispiel der Furchtkonditionierung (McKernan and Shinnick-Gallagher, 1997; Rogan et al., 1997; Shinnick-Gallagher et al., 2003) etabliert. Dabei konnten die neuronalen Schaltkreise der LTP und der Furchtkonditionierung aufgeklärt, die beteiligten Transmittersysteme analysiert und Veränderungen der synaptischen Transmission nachgewiesen werden (Blair et al., 2001; Schafe et al., 2001). In dem nachfolgenden Kapitel soll nun die Bedeutung der LTP bei Lernen und Gedächtnis aufgezeigt werden.

Während im Hippocampus Befunde existieren, die paradigmatisch nach pharmakologischer Intervention zeigen, daß LTP noch auslösbar ist, nicht aber das konditionierte Verhalten, gibt es in der Amygdala eine enge Korrelation zwischen dem Auftreten von LTP und erlerntem Verhalten. Injektionen von NMDA-Antagonisten in den BLA blockieren nicht nur den Erwerb von konditioniertem Furchtgedächtnis (Miserendino et al., 1990; Royer and Pare, 2002), sondern blockieren auch die LTP im LA (Maren, 1999; Walker and Davis, 2002; Davis et al., 2003). Die bilaterale Injektion von NMDAR-Antagonisten in die laterale Amygdala verschlechterte sowohl das Kurzzeit- als auch das

Langzeitgedächtnis der Furchtkonditionierung, wohingegen Blockade der spannungsgesteuerten Kalziumkanäle (VGCC) selektiv die Langzeitgedächtnisbildung verschlechterte (Bauer et al., 2002).

Die Induktion der LA-LTP ist einerseits von den verwendeten Paradigmen und Afferenzen und andererseits von der Aktivierung der spannungsgesteuerten Kalziumkanäle und/oder NMDA-Rezeptoren abhängig. In manchen Fällen benötigt man sowohl die Öffnung der spannungsgesteuerten Kalziumkanäle als auch die Aktivierung der NMDA-Rezeptoren, um LTP in der Amygdala zu induzieren (Weisskopf et al., 1999; Bauer et al., 2002; Lee et al., 2002). Eine Reihe von Studien zeigten, daß es während Furchtkonditionierung zu LTP-ähnlichen Änderungen in den Synapsen des lateralen Kerns nach thalamischer oder kortikaler Stimulation kommt (Rogan et al., 1997; Weisskopf et al., 1999; Doyere et al., 2003).

Diese Beziehungen zwischen LTP und Gedächtnis bei Furchtkonditionierung wurde erstmalig von Rogan und Kollegen (1997) untersucht. Sie leiteten auditorisch-induzierte Feldpotentiale im LA ab und bestimmten Furchtverhalten vor CS-US-Kopplung, während und nach Furchtkonditionierung in freibeweglichen Ratten. Es konnte nachgewiesen werden, daß nur die zeitlich gepaarte Präsentation von CS und US zu einer Vergrößerung der CS-vermittelten Feldpotentialamplitude in den konditionierten Tieren führte. Die Furchtkonditionierung veränderte also die auditorischen Antworten im LA in gleicher Art und Weise wie eine LTP-Induktion. Diese dauerhaften Änderungen parallel zum Erwerb des CS-geförderten Furchtverhaltens wurde aber nicht beobachtet, wenn CS und US ungepaart angewandt wurde (Pseudokonditionierung). So wurden also LTP-ähnliche assoziative Prozesse während der Furchtkonditionierung beobachtet, die vermutlich der assoziativen Langzeitplastizität unterliegen (Rogan et al., 1997).

Man kann davon ausgehen, daß die CS-Afferenzen ziemlich zeitgleich mit der Depolarisation der postsynaptischen Membran durch den US eine Erregung des LA-Neurons auslösen, welche stark genug ist, den NMDA-Kanal zu öffnen. Die am Initialsegment entstehenden Aktionspotentiale pflanzen sich auch über den Dendritenbaum rückwärts fort und kollidieren dort mit den CS-vermittelten EPSPs. Unter Einbeziehung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen kommt es zu einem starken Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration und einer langandauernden erhöhten synaptischen Transmission, welche wiederum in Veränderungen der Genexpression und morphologischen Modifikationen der synaptischen Spines münden. Damit wären die Voraussetzungen für die Konsolidierung geschaffen (Blair et al., 2001). Diese Theorie findet seine praktische Anwendung in LTP-Induktionsparadigmen, wobei eine schwache

präsynaptische Stimulation mit einer starken postsynaptischen Depolarisation gepaart wird (Stromapplikation durch die intrazellulär lokalisierte Mikroelektrode).

Es hat sich somit gezeigt, daß Furcht-Gedächtnis-Konsolidierung in der Amygdala wesentliche biochemische Eigenschaften von Zellen und Synapsen mit der LTP teilt und somit die Untersuchung der Mechanismen der LTP auch geeignet ist, wichtige Mechanismen des Lernens und der Gedächtnisbildung zu verstehen (LeDoux and Muller, 1997; Schafe et al., 2001). Insgesamt liefern diese Resultate überzeugende Beweise, daß LTP-ähnliche Mechanismen für Amygdala-abhängige Lernprozesse relevant sind.

1.5 Kindling

Die aversive Konditionierung ist nur eine Möglichkeit, um synaptische Plastizität zu verstehen. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung des „Kindlingmodells“. Seit seiner Entdeckung 1969 (Goddard et al., 1969) wird Kindling sowohl als ein Modell der Neuroplastizität, insbesondere von Lernen und Gedächtnis, als auch als Modell zur Epileptogenese genutzt.

Kindling verursacht eine Folge von Prozessen, wie (1) Aktivierung von Glutamatrezeptoren, (2) Aktivierung verschiedener sekundärer Botenstoffe, (3) Genexpression, Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, (4) Aktivierung neurotrophischer Faktoren, (5) Aktivierung von Faktoren, die für das Aussprossen der Axone verantwortlich sind (6) Proteinsynthese, (7) Neurogenese (Gyrus dentatus) und (8) Synaptogenese (Morimoto et al., 2004). Alle diese Prozesse führen zu zeitlich andauernden, transsynaptischen, bahn-spezifischen und plastischen Veränderungen von Gehirnfunktionen und lassen sich besonders gut in den Gebieten des limbischen Systems auslösen. Letztendlich führt Kindling zu Veränderungen im emotionellen und sozialen Verhalten und geht mit Gedächtnisveränderungen einher.

Kindling kann auf zwei Wegen durchgeführt werden: (1) elektrisch, wobei wiederholte elektrische Reizung von limbischen Strukturen epileptische Anfälle in Ratten induzieren kann oder (2) chemisch (Kainat) (Letty et al., 1995).

In beiden Modellen werden ähnliche Mechanismen vermutet, da Antikonvulsiva, die elektrisches Kindling blockieren, auch chemisches Kindling hemmen (Wasterlain et al., 1986). In dieser Arbeit wurde das elektrische Kindlingmodell genutzt. Der große Vorteil des elektrischen Kindlings in der Amygdala und im hippocampalen System liegt: (1) in der sehr präzisen Steuerung, d.h. die Anfallsanzahl kann genau festgelegt werden und (2)

kommt es je nach Anfallsanzahl zu keiner oder nur minimalen Umstrukturierung der involvierten neuronalen Netze (Uno and Ozawa, 1991; Scott et al., 1998; Maru, 2001; McIntyre et al., 2002).

Die nachfolgenden Kapitel sollen einen Überblick der bisher bekannten Fakten zum Einfluß spezifischer Kindlingparadigmen auf Verhalten (Kap. 1.5.1), Morphologie (Kap. 1.5.2) sowie auf synaptischen Plastizität (Kap. 1.5.3) geben.

1.5.1 Einfluß des elektrischen Kindlings auf das Verhalten

Bei der Betrachtung der Literatur zu Kindling und Verhalten stellt man sehr schnell fest, daß eine Vielzahl von Faktoren bei den Verhaltensänderungen, die durch Kindling verursacht wurden, involviert sind.

Der erste Faktor ist die Dauer des Kindlings. Es werden verschiedene Kindlinggrade definiert, (1) - partielles Kindling, d.h. Status 3 der Racine-Skala (Racine, 1972). Die Ratten heben nur die rechte Pfote (partieller motorischer Anfall), (2) Kurzzeitkindling: 4-7 Anfälle von Krampfaktivität mit den entsprechenden motorischen Begleiterscheinungen bis zum Umfallen der Tiere, Status 5 der Racine-Skala und (3) Langzeitkindling (LTK) > 60 Status-5-Anfälle. Beim Langzeitkindling treten auch spontane Anfälle auf. Die Verhaltensänderungen können bei partiellem Kindling ca. 1 Woche (Helfer et al., 1996), bei Kurzzeitkindling einen Monat (Adamec and Young, 2000) und bei Langzeitkindling mehr als 2 Monate (Kalynchuk et al., 1998b) beobachtet werden. Es konnte gezeigt werden, daß das Spektrum erzeugter Verhaltensänderungen durch partielles limbisches Kindling sowie Stress (Raubtierstress Katze/Maus) von Änderungen in einer Reihe neuronaler Schaltkreise abhängig ist. Außerdem fand man heraus, daß efferente Beeinflussungen anderer Hirnstrukturen durch die Amygdala Änderungen im defensiven Verhalten, aber nicht im räuberischen Angriffsverhalten verursachten (Adamec, 1994; Adamec, 1997; Adamec, 1999).

Nieminen et al. (1992) zeigte, daß in der Amygdala Kurzzeitkindling die Explorationsaktivität vermindert, d.h. es erfolgte ein scheueres, vorsichtigeres Vorgehen, wobei die räumlich orientierten Gedächtnisaufgaben nur unwesentlich betroffen waren. Kurzzeitkindling in der Amygdala verändert also die normale Furchtreaktion der Tiere, insbesondere ihre Furchtexpression (Nieminen et al., 1992) und zeigte keine geschlechtsabhängigen Wirkungen (Wintink et al., 2003). Außerdem konnte beobachtet werden, das Kurzzeitkindling im linken BLA zu einem verringerten Angstverhalten führte

(Adamec and Morgan, 1994), während Langzeitkindling die Angst verstärkte (Kalynchuk et al., 1997).

Der zweite Faktor ist die neuronale Hirnstruktur, in welcher gereizt wird. Linksseitiges partielles Kindling (Reizung Grenze mediale Amygdala/basolaterale Amygdala) verminderte die Angst im Gegensatz zum rechtsseitigen. Wenn in der rechten Hemisphäre gereizt wurde, konnte eine Angststeigerung beobachtet werden (Adamec and Morgan, 1994), die jedoch mit keiner Veränderung bei Exploration (offener Arm) und motorischer Aktivität einherging (Adamec and Shallow, 2000a). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Kurzzeitkindling (nach 4 Status-5-Anfällen) des rechten posterioren zentralen Kerns der Amygdala die Exploration verminderte. Das gleiche Paradigma, angewendet in der medialen Amygdala, führte zu keinen Verhaltensänderungen der Tiere. Kurzzeitkindling des anterioren zentralen Kerns wirkte anxiolytisch (Adamec and Shallow, 2000b). Diese Daten zeigen somit eine deutliche Abhängigkeit der Verhaltensänderungen (kein Effekt, anxiogene oder anxiolytische Wirkung) von gereizter Hemisphäre und Hirnstruktur.

Der dritte Faktor ist der benutzte Rattenstamm. Wistarratten zeigen anhaltende angstverstärkende Effekte bei partiellem und Kurzzeitkindling der Amygdala, während Lister-hooded Ratten bedeutend mehr Kindling-Anfälle benötigen, um gleichartige Verhaltensänderungen zu zeigen (Adamec, 1990; Adamec and McKay, 1993; Adamec and Morgan, 1994; Kalynchuk et al., 1997; Kalynchuk et al., 1998a).

Kindling stellt demnach ein Modell dar, welches zur Untersuchung des Angstverhaltens geeignet ist (Kalynchuk et al., 2001; Kalynchuk and Meaney, 2003) dessen elektrophysiologische Grundlagen aber noch völlig ungeklärt sind. Man vermutet, daß die durch Kindling ausgelösten Verhaltensänderungen sowohl auf molekularen als auch auf zellulären Umorganisationen basieren und dem Kindling ähnliche Mechanismen wie der LTP zugrundeliegen (Baudry, 1986).

1.5.2 Strukturveränderungen im limbischen System durch Kindling

Der piriforme und der perirhinale Kortex sind bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung partieller bis genereller epileptischer Anfälle beteiligt (Löscher and Ebert, 1996; Sato et al., 1998; Gernert et al., 2002) und beeinflussen die synaptische Transmission in der Amygdala. Bei vergleichbaren Versuchsbedingungen wie sie hier in dieser Studie verwendet wurden, konnte von Bohlen und Halbach und Kollegen (2004) nachweisen, daß Kindling, welches 15 Status-5- Anfälle in Wistarratten induzierte, eine signifikante Verringerung der neuronalen Dichte in verschiedenen amygdalären Strukturen im Vergleich zu den implantierten, nicht-stimulierten Tieren verursacht. Gleichzeitig war die Zahl der degenerierten Fasern nicht nur in Substrukturen der Amygdala, sondern auch in kortikalen Strukturen in den Kindlingtieren größer als in den implantierten Kontrollen. Am wenigsten war die mediale Amygdala hinsichtlich morphologischer Änderungen betroffen (von Bohlen und Halbach et al., 2004). Der Zellverlust war in der Hemisphäre am größten, in welche die BLA-Kindlingelektrode implantiert wurde (von Bohlen und Halbach et al., 2004). Weitere anatomische Untersuchungen der Amygdala in kurzzeitig gekindelten Ratten zeigten einen Verlust von GABAergen Neuronen nicht nur in der Amygdala, sondern auch in den umliegenden Gebieten (Löscher and Ebert, 1996; Pitkänen et al., 1998).

1.5.3 Der Einfluß von Kindling auf die LTP/LTD

Es herrscht weitgehend Übereinstimmung darüber, daß zumindest die GABAerge (Pitkänen et al., 1998) und/oder die glutamaterge Transmission durch Kindling Veränderungen unterworfen ist (Baudry, 1986; Rainnie et al., 1992; Pitkänen et al., 1998; Allison and Pratt, 2003). Unter den Kindling-verursachten Krampfanfällen wurde die Induktion einer LTP im Hippocampus potenziert (Gilbert and Mack, 1990; Racine et al., 1983), wobei die sogenannte Kurzzeitplastizität (0-20 min nach LTP-Induktion) nur wenig betroffen war. Man vermutet, daß den Kindling-induzierten Veränderungen auf zellulärer Ebene und den langfristigen Änderungen der synaptischen Transmission durch tetanische Reizung ähnliche Mechanismen zugrundeliegen (Racine et al., 1983).

Anfälle, die durch limbisches Kindling in Ratten ausgelöst wurden, führten zu einer NMDA-abhängigen LTP in efferenten Bahnen der Amygdala, die gleichzeitig mit Veränderungen des Verhaltens einhergingen (Adamec, 1994; Adamec, 1997; Adamec,

1999; Adamec and Young, 2000). Diese Potenzierung der Transmission war nur in der rechten Hemisphäre von Dauer (Adamec, 1994). Eine ähnliche Abhängigkeit von NMDA-vermittelten Prozessen wird auch für die langanhaltende Zunahme des Nagetier-Furchtverhaltens nach Raubtierstress beschrieben (Adamec, 1997). Als primäre Ursache werden Änderungen der Glutamatrezeptordichte und/oder Spineveränderungen diskutiert (Adamec and Young, 2000).

Unter Nutzung niederfrequenten Reizung (*low frequency stimulation*, LFS) in der Amygdala konnte eine Depotenzierung dieser LTP in gekindelten Katzen und Ratten erzielt werden (Adamec, 1999). Niederfrequente Reizung in der Amygdala reduziert in Ratten auch das durch Kindling-induzierte verstärkte Angstverhalten. LFS kann auch die Generierung von Nachentladungen sowie Kindling-induzierte Anfälle blockieren bei gleichzeitiger Erhöhung der Schwelle für die Krampfanfälle (Weiss et al., 1995).

Alle Daten, welche sich auf Kindling und LTP beziehen, betreffen vor allem die elektrophysiologischen Veränderungen, welche direkt unter den Krampfanfällen auftreten. Sie werden genutzt, um Mechanismen des Kindlings aufzuklären. In dieser hier vorgestellten Studie sollen nicht die LTP-ähnliche Veränderungen während der Anfallsaktivität, sondern die Konsequenzen 48 Stunden nach einer Kindlingprozedur in den neuronalen Strukturen untersucht werden.

Zu dieser Thematik existieren nur sehr wenige Plastizitätsstudien, in denen der Einfluß der Kindlingprozedur als Metaplastizität betrachtet wird. In diesen Studien wurde die sogenannte „Vorgeschichte des Neurons“, welche die Induktion einer LTP beeinflussen kann (Abraham and Tate, 1997; Abraham, 1999) und LTP/LTD **nach** Kindling im Hippocampus untersucht (Anwyl et al., 1987; Leung and Wu, 2003). Mir ist nur eine Studie bekannt, welche amygdaläre Plastizität **nach** Kindling untersuchte und die nachwies, daß nach Kurzzeitkindling im basolateralen Kern der Amygdala (BLA) keine LTD im BLA mehr auslösbar war (Wang and Gean, 1999).

1.6 Pilocarpinmodell

Neben dem Kindlingmodell kann auch das Pilocarpinmodell zur Klärung bestimmter Fragen, welche die Temporallappenepilepsie betreffen, herangezogen werden. Pilocarpin wirkt agonistisch an Azetylcholinrezeptoren des muskarinergen Typs und führt nach einmaliger systemischer Applikation zu einem Status epilepticus (Turski et al., 1983). Die Ausbildung des Status epilepticus, welcher mehrere Stunden anhalten kann und in der

Regel durch Injektion von Benzodiazepinen beendet wird, mündet nach einer Latenz in spontanen Krampfanfällen, wobei große individuelle Unterschiede bestehen (Leite et al., 2002). Die konvulsive Wirkung von Pilocarpin kann durch Injektion eines partiell selektiven Kainatrezeptorantagonisten blockiert werden (Meldrum et al., 1988).

Im Unterschied zum moderaten elektrischen Kindling bewirkt eine einmalige Pilocarpininjektion massive strukturelle Veränderungen, wie z.B. hohe Zellverluste im piriformen Kortex, Amygdala, Hippocampus, Gyrus dentatus und Thalamus (Wall et al., 2000). Der Zellverlust dieser Strukturen geht mit Gedächtnis- und Lerndefiziten sowie reduzierter Angst einher (Leite et al., 1990; Persinger et al., 1993; dos Santos et al., 2000).

1.7 Alkoholentzug

Es wird die Hypothese vertreten, daß Alkoholentzug und Kindling zu ähnlichen molekularen Veränderungen führen. Während des Alkoholentzuges kann es zu Krampfanfällen kommen (Ulrichsen et al., 1998a). Auch wiederholte Episoden von Alkoholentzug führten zu motorischen Anfällen (Stephens et al., 2001).

In Abhängigkeit von der Anzahl der Unterbrechungen der Alkoholaufnahme führte Entzug zu signifikanten EEG-Veränderungen im Hippocampus, die mit Verhaltensstörungen gekoppelt waren (Poldrugo and Snead, III, 1984) und in spontanen Entzugsanfällen gipfelten. Wurde ein NMDA-Rezeptorantagonist verabreicht, so kam es zu einer Hemmung der Anfallsaktivität während des Entzuges (Ripley et al., 2002a). Sowohl bei einmaligem Alkoholentzug als auch bei mehrmaligem war der Erwerb, nicht aber die Expression der konditionierten Furcht verschlechtert (Stephens et al., 2001; Ripley et al., 2003). Zusätzlich zeigte sich, daß Alkoholentzug auch zu Defiziten bei den Verhaltensaufgaben führte. Diese Defizite wurden nicht durch BLA-Läsionen, aber durch Läsionen des zentralen Kerns der Amygdala beeinflusst (Ripley et al., 2004).

Der mehrmalige Alkoholentzug ist ein lang anhaltender und permanent irreversibler Prozeß (Ulrichsen et al., 1998a), die darauf beruhenden Verhaltensänderungen ähneln nur wenig denen, die Konsequenz des Amygdalakindlings sind (Ripley et al., 2002b). Allerdings wird bei rechtsseitigem Amygdalakindling durch Alkoholentzug die Wirkung der Kindlingprozedur auf das Verhalten verstärkt (Savage and Reyes, 1985; Ulrichsen et al., 1998b). Obwohl die Mechanismen des Entzuges bisher nicht vollständig geklärt sind, weiß man doch, welche Wirkung Alkohol im Gehirn hat. Prinzipiell wird durch Gabe von

Alkohol die hemmende Transmission verstärkt, vermittelt vor allem über GABA_A-Rezeptoren, währenddessen die glutamaterge Transmission, vermittelt vor allem durch NMDA-Rezeptoren, verringert wird (Ticku et al., 1986, Grant et al., 1990). Hinsichtlich der Entwicklung von Toleranz bei chronischem Mißbrauch wird eine Hochregulierung glutamaterger Rezeptoren diskutiert (Rossetti and Carboni, 1995; Dahchour et al., 1996).

1.8 Ziele der Arbeit

Im Unterschied zum meist genutzten coronalen Schnittpräparat hat die hier verwendete horizontale Schnittebene den Vorteil, daß Verbindungen zu lern- und epilepsierelevanten limbischen Strukturen wie dem Hippocampus, perirhinalen und entorhinalen Kortex erhalten bleiben und damit optimal zur Untersuchung der synaptischen Plastizität im Lern- und Epilepsiemodell „Kindling“ genutzt werden kann. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe in dieser Schnittebene haben gezeigt, daß die gewählte intranukleäre Stimulation innerhalb des lateralen Kerns sowie die Stimulation der *Capsula externa* gut geeignet sind, um eine LTP im lateralen Kern der Amygdala zu induzieren (von Bohlen und Halbach and Albrecht, 1998a; Albrecht et al., 2002).

Das Ziel der Arbeit war es zu prüfen, inwieweit die intranukleäre Induktion von LTP bzw. LTD, Kurzzeitplastizität (*paired pulse*, PP) und synaptische Transmission (Erregbarkeit) in der lateralen Amygdala im horizontalen Schnitt durch Kindlingelektrodenimplantation, nach Kindling und nach Pilocarpinbehandlung beeinflusst werden. Außerdem sollte im Rahmen einer Kooperationsvereinbarung mit der Universität von Sussex (Großbritannien) die Induktion von LTP, Kurzzeitplastizität (*paired pulse*) und synaptische Transmission (Erregbarkeit) mittels Reizung der externen Kapsel (EC) unter normalen Bedingungen und nach Alkoholentzug geprüft werden. Die Aufklärung von beteiligten Mechanismen, die eine Änderung der Transmission in der lateralen Amygdala verursachen, sollte sich auf das Kindlingmodell konzentrieren in Übereinstimmung mit den Zielen des Teilprojektes D3 im Rahmen des SFB-Transregio-03 „Mesiale Temporallappen-Epilepsie“. Nur in den Tiergruppen, die mit dem Kindlingmodell im Zusammenhang stehen, sollten Pharmaka in die Badflüssigkeit eingewaschen werden, um an Plastizitätsänderungen beteiligte Mechanismen aufzuklären. Das Interesse in dieser Studie sollte sich dabei vor allem auf den GABA_A-Rezeptor und den Kainatrezeptor GluR5 konzentrieren. Durch die teilweise Blockierung des GABA_A-Rezeptors mit Hilfe des spezifischen Antagonisten SR95531 bei den Plastizitätsexperimenten (LTP, PP) und bei der Untersuchung der synaptischen

Übertragung (Input/Outputkurve) sollte analysiert werden, inwieweit die Behandlungen das GABAerge System tangieren. Der Einfluß der GluR5-Einheit des Kainatkanals auf HFS-induzierte LTP, das Paired-Pulse-Verhalten und Erregbarkeit in der lateralen Amygdala sollte in dieser Studie durch Einwaschen des Agonisten ATPA analysiert werden. Sowohl extrazelluläre als auch intrazelluläre Messungen sollten zum Einsatz kommen, um folgende Fragen zu klären:

1. Ist eine vergleichbare LTP und/oder LTD wie sie für sehr jungen Tiere aus der Literatur bekannt ist, auch bei unbehandelten, älteren (4-5 Monate alten) Ratten im LA induzierbar, wenn die intranukleären Afferenzen bzw. die externe Kapsel als Reizort gewählt werden?
2. Welchen Einfluß hat die Kindlingelektrodenimplantation im BLA auf die intranukleär ausgelöste LTP und LTD bzw. PP-Verhalten und Input/Output-Kurve in der lateralen Amygdala?
3. Wie verändert sich Erregbarkeit, Kurzzeitplastizität und HFS-induzierte LTP 48 h nach dem letzten BLA-Kindling-induzierten epileptischen Anfall? Welche Wirkung hat die niederfrequente Stimulation des LA im gekindelten Tier?
4. Inwieweit bewirkt die alternierende zweimalige Gabe von LFS und HFS unterschiedliche Effekte in den nicht implantierten, implantierten und gekindelten Tieren (Sättigungsproblematik)?
5. Wie verändert eine partielle Blockade der GABAergen Transmission Erregbarkeit, PP-Verhalten und LTP in normalen, implantierten und gekindelten Tieren?
6. Welche Wirkung haben Pilocarpin-induzierte gehäufte spontane Anfälle auf Erregbarkeit, PP-Verhalten und LTP?
7. Wie verändert die glutamaterge GluR5 Stimulation Erregbarkeit, PP-Verhalten und LTP in gekindelten und Pilocarpin-behandelten Tieren?
8. Welchen Einfluß hat einmaliger oder mehrmaliger Alkoholzug bei Ratten auf Erregbarkeit, PPF und LTP im LA?
9. Welche Wirkung hat die Reizelektrodenposition auf LTP, Erregbarkeit und PP-Verhalten ?