

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Pharmakologie und Toxikologie

**Rolle der cGMP-abhängigen Proteinkinase Typ II
bei der synaptischen Plastizität und beim Angslernen
in der lateralen Amygdala**

Florian Helmut Sebastian Schöberl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Th. Kleppisch
2. Univ.-Prof. Dr. A. Konnerth

Die Dissertation wurde am 04.08.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.12.2010 angenommen.

Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel „Rolle der cGMP-abhängigen Proteinkinase Typ II bei der synaptischen Plastizität und beim Angstlernen in der lateralen Amygdala“ in dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU München unter der Anleitung und Betreuung durch Prof. Dr. Thomas Kleppisch ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

München, den 04.08.2010

Florian Schöberl

Meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Die Amygdala und ihre Bedeutung beim emotionalen Lernen	3
1.2	Angstkonditionierung als bewährtes in vivo Modell für Amygdala abhängige Lernvorgänge	6
1.3	LTP als zellulärer Mechanismus für Lernvorgänge bei der Angstkonditionierung	10
1.4	Molekulare Grundlagen und Lokalisation der LTP in der Amygdala	12
1.5	Der NO/cGMP/cGK-Signalweg und seine Bedeutung für Lernvorgänge und synaptische Plastizität	16
1.6	Bau und Funktion der cGMP-Kinasen im ZNS	19
1.7	Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit	22
2	Material und Methoden	25
2.1	Versuchstiere	25
2.1.1	C57BL/6J Wildtypmäuse	25
2.1.2	cGKII knock-out Mäuse	25
2.1.3	Genotypisierung	26
2.2	Immunhistochemische Methoden	28
2.3	Western Blots	32
2.4	Extrazelluläre Ableitung von Feldpotentialen in der lateralen Amygdala	37
2.5	Verhaltenstests	42
2.5.1	Konditionierung	42
2.5.2	Grundcharakterisierung	47
2.6	Statistische Auswertung	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Expression der cGKII im Gehirn	50
3.1.1	Immunhistochemischer Nachweis	50
3.1.2	Nachweis mittels Western Blots	51
3.2	Analyse der synaptischen Übertragung und der Langzeitpotenzierung in der Amygdala bei cGKII-defizienten Mäusen	52

3.2.1	Basischarakteristika der synaptischen Transmission	52
3.2.2	LTP nach starkem Tetanus des kortikalen Inputs	53
3.2.3	LTP nach starkem Tetanus des thalamischen Inputs	54
3.3	Angstkonditionierung	55
3.3.1	Klassische Angstkonditionierung	55
3.3.2	Nicht-assoziative Angst nach Fußschock	59
3.4	Grundcharakterisierung der cGKII-KO Mäuse mit Verhaltenstests	62
3.4.1	Bestimmung der Schmerzschwelle	62
3.4.2	Open Field.....	63
4	Diskussion	68
4.1	Expression der cGKII im Gehirn.....	68
4.2	Die Rolle der cGKII für die synaptische Plastizität in der lateralen Amygdala.....	71
4.3	Die Funktion der cGKII für das assoziative Angstlernen.....	73
4.4	Die Funktion der cGKII für basale Verhaltensweisen im Open Field.....	77
5	Zusammenfassung	80
6	Anhang	82
6.1	Tabellenverzeichnis	82
6.2	Abbildungsverzeichnis	83
6.3	Abkürzungsverzeichnis.....	84
6.4	Verwendete Antikörper	88
7	Literaturverzeichnis	89
7.1	Zitierte Veröffentlichungen	89
7.2	Eigene Publikationen	98
8	Danksagung	99
9	Lebenslauf	100

.....

Vorwort

Das letzte Jahrhundert war im Bereich der Hirnforschung im Wesentlichen von zwei unterschiedlichen und strikt voneinander getrennten Epochen geprägt. So beschäftigten sich nahezu alle großen Neurobiologen der ersten Hälfte des vorangegangenen Jahrhunderts wie Sherrington, Cannon, Papez oder Hebb mit den neuronalen Mechanismen emotionalen Verhaltens. Arterhaltende und in allen Lebewesen immanente Verhaltensweisen wie die Reaktion auf drohende Gefahr, die Interaktion mit Sexualpartnern sowie die Auseinandersetzung mit Feinden standen im Mittelpunkt ihres Interesses. Bereits im Jahre 1878 beschrieb der französische Neurologe Paul Broca anatomisch auffällige und sich dadurch vom restlichen Kortex abhebende Strukturen im Bereich des medialen Temporallappens. Aufgrund ihres ringförmigen Verlaufs um das Stammhirn und dadurch gewissermaßen eine Grenze dessen bildend, fasste er den unmittelbar dem Corpus callosum anliegenden Kortexbereich, u. a. bestehend aus Gyrus cinguli und Hippocampus, mit dem lateinischen Wort für Grenze (limbus) als limbischen Kortex zusammen. Bereits im Jahre 1930 hatten sich die Hinweise verdichtet, dass ein großer Anteil dieser limbischen Strukturen in die Generierung und den Ausdruck von Emotionen involviert ist. So postulierte der amerikanische Neurologe James Papez unter Berufung auf Arbeiten vieler Vorgänger wie z. B. Cannon und Brad den nach ihm benannten Papez-Kreis als die emotionale Funktionseinheit schlechthin, welche den Kortex mit dem Hypothalamus verknüpft. Wie auch viele Wissenschaftler der heutigen Zeit vermutete Papez schon damals, dass der Kortex maßgeblich daran beteiligt sei, Emotionen zu erfahren und erfassen. Dies endete schließlich im Konzept des „limbischen Systems“ des amerikanischen Physiologen Paul MacLean im Jahre 1952, in welchem die Strukturen des Gyrus cinguli, Hippocampus, Hypothalamus und der vorderen Thalamuskern zusammengefasst waren. Ausschließlich diesen untereinander verbundenen Strukturen wurde von ihm die Funktion zur Erfahrung und Expression von Emotionen zugeschrieben. In seine Theorie waren alle im letzten halben Jahrhundert gewonnenen Forschungsergebnisse eingeflossen (LeDoux 1987, 1991). So verließ man das Feld der Emotionsforschung und widmete sich fortan hauptsächlich den kognitiven Prozessen. Kognitive Prozesse wie Aufmerksamkeit oder Lernen und Gedächtnis schienen den Forschern aufgrund ihres unbewussten Ablaufs solider und objektiver zu erfassen als die stark subjektiv gefärbten Emotionen und das sich daraus ergebende Verhalten der Tiere (Kihlstrom 1987). Es erscheint als Ironie, dass ausgerechnet die kognitive Neurowissenschaft, welche zunächst das Ende der Forschung um Emotionen und Verhalten bedeutete, dieser entscheidend zur Wiedergeburt verhalf. Konträr zur allgemeinen Vorstellung sind nicht

zwingend bewusste Gefühle notwendig, um emotionale Antworten auszulösen. Die Verarbeitung emotionaler Informationen im Gehirn (z. B. Detektion von und Reaktion auf Gefahr) beinhaltet wie kognitive Prozesse überwiegend unbewusste Mechanismen (Öhman 1992; LeDoux 1996). Gedanken bestehen außerdem sowohl aus kognitiven als auch emotionalen Anteilen. Auch das Konzept des limbischen Systems (MacLean 1949, 1952; Isaacson 1982) offenbarte alsbald viele Mängel. Es verdeutlichte sich nämlich vor allem durch Läsionsstudien an Tieren (bereits 1950-1960) sowie durch fMRI-Studien des menschlichen Gehirns in den 80iger und 90iger Jahren, dass es Bereiche des sogenannten limbischen Systems wie beispielsweise den Hippocampus gibt, welche entscheidend zum Langzeitgedächtnis beitragen. Zudem rückte vor allem die im „limbischen System“ von MacLean kaum berücksichtigte Amygdala immer mehr in den Focus als eine zentrale Struktur bei der Erfahrung von und Reaktion auf Angst. Deshalb gehen führende Wissenschaftler heute nicht mehr von einem starren emotionalen System in Form des limbischen Systems aus (MacLean 1952) und fordern eine Revision des Begriffs (Brodal 1982; LeDoux 1987, 1991; Kotter and Meyer 1992).

Vielmehr geht es heute und in Zukunft darum, die getrennte Betrachtung von kognitiven und emotionalen Vorgängen aufzuheben und diese miteinander zu verknüpfen. So können Emotion und Kognition als zunächst unbewusst ablaufende Prozesse begriffen werden, welche zu bewussten Erfahrungen führen können, jedoch nicht müssen. Und tatsächlich, das „*Fear Conditioning*“ (FC) (siehe Punkt 1.2) leitete im letzten Jahrzehnt eine Renaissance der Forschung um Emotionen einerseits und einen ersten sehr wichtigen Schritt zur Vernetzung von emotionalen und kognitiven Vorgängen andererseits ein. So kann in diesem Versuchssystem eine Operationalisierung, sprich eine objektive Messbarkeit, von Angst erreicht werden. In fMRI-Studien an menschlichen Gehirnen wurde beim FC eine Aktivitätszunahme vor allem in der Amygdala festgestellt (Buchel et al. 1998; LaBar et al. 1998), welche auch bei unterschwelligem Stimuli ausgemacht werden kann (Morris et al. 1998). Daher ist anzunehmen, dass auch beim Menschen diese Gehirnstruktur die entscheidende Rolle fürs Angstlernen spielt.

1 Einleitung

1.1 Die Amygdala und ihre Bedeutung beim emotionalen Lernen

Die Amygdala, ein phylogenetisch älterer Teil des Kortex, weckt im Zusammenhang mit Emotionen und emotionalem Lernen zunehmend das Interesse der modernen Neurobiologie. Sie ist eine bilateral angelegte, symmetrische Hirnstruktur im vorderen, medialen Bereich des *Lobus temporalis* (Abb. 1.1).

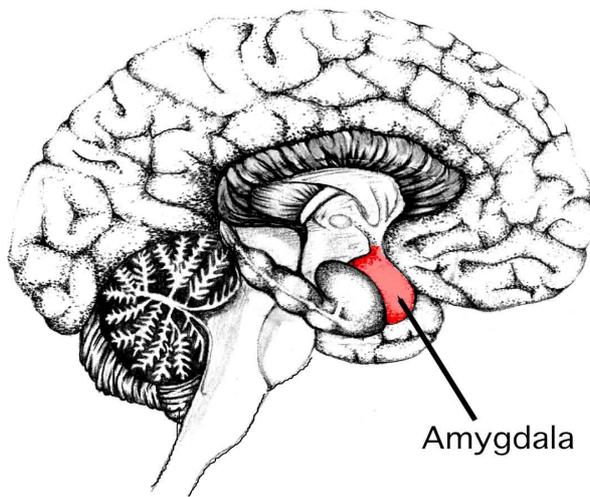


Abb. 1.1: Lage der Amygdala

Gezeigt ist die Amygdala im menschlichen Gehirn, im vorderen medialen Temporallappen.

Der Name „Amygdala“ stammt aus dem Griechischen und bedeutet übersetzt „Mandelkern“. Aufgrund der äußeren Ähnlichkeit mit diesem wurde ihr dieser Name zuteil.

Sie formiert sich aus 12 zum Teil sehr heterogenen Regionen, welche sich wiederum in verschiedene Subregionen unterteilen lassen. Die für die Angstkonditionierung („*Fear Conditioning*“ = FC) und somit für diese Arbeit bedeutendsten Teilbereiche der Amygdala stellen der laterale (LA), basale (B), akzessorisch basale (AB) sowie der zentrale Kern (CE) und die Verbindungen zwischen diesen dar (Abb. 1.2). Neuroanatomische Studien mehrerer Spezies wie Ratten, Katzen und Primaten zeigen übereinstimmende synaptische Verknüpfungen von LA, B, AB und CE (Amaral 1992; Pare et al. 1995; Pitkanen et al. 1997; Cassell et al. 1999). Kurz gesagt projiziert die LA gleichermaßen zur B, AB und CE, und beide sowohl B und AB wiederum projizieren zur CE. Es gilt dabei anzumerken, dass die Verbindungen in diesem

intraamygdalären Netzwerk eher auf dem Level von Subnuclei in jeder dieser Regionen als auf dem Level der Kerngruppen selbst organisiert sind (Pitkanen et al. 1997). Aus Gründen der Einfachheit jedoch werde ich im weiteren Verlauf eher von den Kerngebieten als den einzelnen Subregionen sprechen.

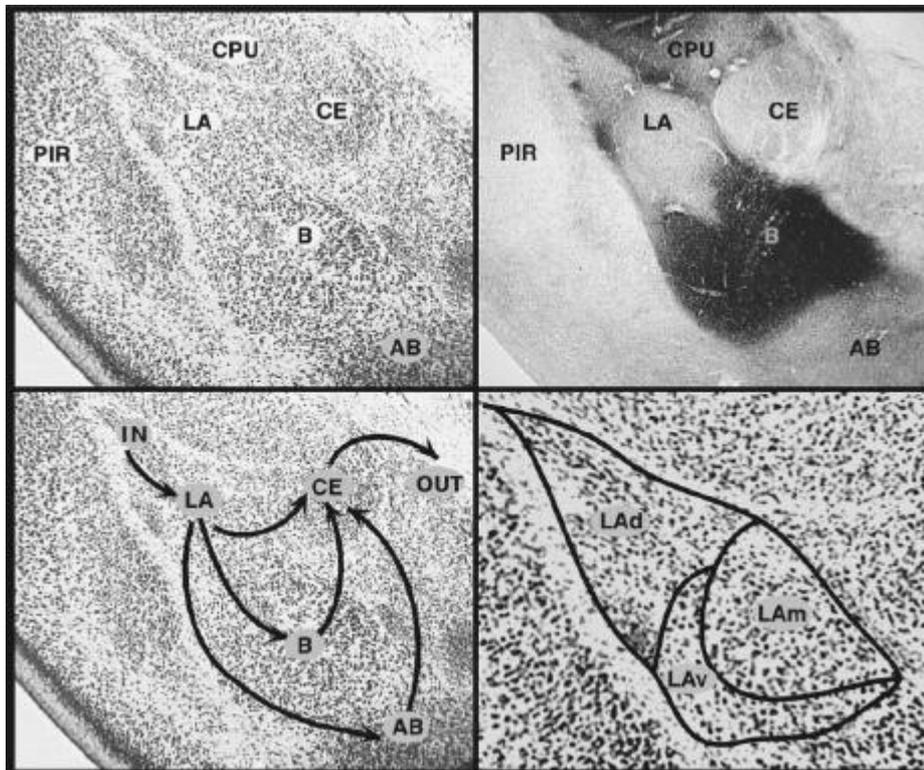


Abb. 1.2: Wichtige Kerngebiete der Amygdala bei der Angstkonditionierung und ihre Verknüpfung

Dargestellt sind der laterale (LA), basale (B), akzessorisch basale (AB) sowie der zentrale Kern (CE) der Amygdala und der lateral angrenzende *Cortex piriformis* (PIR) sowie das dorsal angrenzende *Caudate-Putamen* (CPU) in einer Nissl-Färbung (oben links) sowie einer Acetylcholinesterase-Färbung zur besseren Abgrenzung der einzelnen Kerngebiete (oben rechts).

Beim FC relevante intraamygdaläre Verknüpfungen (unten links) sowie eine Vergrößerung des lateralen Kerns (LA) und seine weitere Unterteilung in den dorsalen (LAd), medialen (LAm) sowie ventralen Subnucleus (LAv) (unten rechts) (LeDoux 2000).

Die Amygdala steht zu einer Vielzahl von Gehirnstrukturen in wechselseitigem Kontakt. So gehen Afferenzen vor allem aus sensorischen Kortexarealen sämtlicher Modalitäten und direkt aus dem Thalamus zu ihr ein. Efferenzen aus der Amygdala projizieren unter anderem in diese Gebiete zurück, sowie zum Hippocampus, Gyrus cinguli, Hypothalamus und den verschiedenen modulatorischen Systemen wie dem cholinergen *Ncl. basalis Meynert* im basalen Vorderhirn und dem noradrenergen *Locus coeruleus* im Hirnstamm (LeDoux 2000). Allein dies lässt vermuten, dass die Amygdala zumindest modulierend an einer Vielzahl von sowohl vegetativen

Vorgängen wie Nahrungsaufnahme, Hormonsekretion oder Kreislaufregulation als auch höheren kognitiven Leistungen wie Aufmerksamkeit und Gedächtnisbildung beteiligt ist.

Zudem gibt es aus Läsionsstudien an Tieren und Menschen zahlreiche Hinweise für eine zentrale Rolle der Amygdala bei der Erfassung und Expression von Emotionen. Bekanntestes Beispiel hierfür ist die 30jährige Patientin S. M., bei welcher es aufgrund des sehr selten vorkommenden, genetisch bedingten Urbach-Wiethe-Syndroms zu einer isolierten, bilateralen Degeneration der Amygdalae kam. Ihre Intelligenz war vollkommen normal und sie zeigte keine kognitiven Einschränkungen. Auch ihre visuelle Wahrnehmung war unbeeinträchtigt und sie konnte den Ausdruck von Freude, Traurigkeit und Ekel auf Gesichtern in Bildern, die ihr vorgelegt wurden, problemlos erkennen. Allerdings hat man bei ihr festgestellt, dass sie keine angstvollen Gesichtsausdrücke erkennen kann und Defizite bei der Pawlowschen Konditionierung, auf welche später noch genauer eingegangen wird, zeigt (Bechara et al. 1995; Tranel et al. 2006). Gleiche Befunde wurden auch bei Patienten beobachtet, bei denen die Amygdala chirurgisch zum Zwecke einer Epilepsie-Behandlung entfernt wurde (LaBar et al. 1995; Phelps et al. 1997).

Die elektrische Stimulation der lateralen Bereiche der Amygdala bei Katzen führte, wie zumindest teilweise zu erwarten, zu einer Kombination von Angst und aggressivem Verhalten. Der gleiche Versuch beim Menschen führte ebenfalls zu gesteigertem Angstverhalten. Unterstützt wird diese These auch von neueren Ergebnissen aus fMRI-Studien an menschlichen Gehirnen, bei denen der Anblick angstvoller Gesichter mit einer erhöhten neuronalen Aktivität in der Amygdala der Probanden einhergeht (Breiter et al. 1996).

Von größter Bedeutung für diese Arbeit jedoch ist die etablierte Rolle der Amygdala beim Angstlernen im Rahmen des „*Fear Conditioning*“ (siehe Punkt 1.2). So steht fest, dass eine Inaktivierung der Amygdala während der Trainingsphase des FC den assoziativen Lernprozess verhindert (Helmstetter and Bellgowan 1994; Muller et al. 1997). Dagegen übt eine Inaktivierung derselben unmittelbar nach der Trainingsphase keinen Einfluss auf die erlernten Gedächtnisinhalte aus (Wilensky et al. 1999). Dadurch ist sichergestellt, dass es sich bei dem von Muller et al. (1997) beobachteten Effekt in der Tat um eine verminderte Gedächtnisbildung und nicht eine mangelhafte Fähigkeit zur Expression der Angst handelte. Gleichzeitig widerlegt dies den Einwand, dass die Amygdala lediglich zur Modulation des anderswo erlernten und abgelegten Gedächtnisinhaltes beitrage und selbst keinen Ort darstelle, an dem synaptische Veränderungen im Sinne des Lernens auftreten können (Cahill and McGaugh 1998; Vazdarjanova and McGaugh 1998). Bei der Vielzahl verschiedener Arten von Gedächtnis, die im Gehirn zu finden sind (Abb. 1.3), wird in der Tat von einem modulierenden Einfluss der Amygdala auf anderswo gespeicherte Informationen wie etwa expliziter Gedächtnisinhalte des

Hippocampus oder habituelles Striatum ausgegangen (Packard et al. 1994). Jedoch schließt dies nicht aus, dass die Amygdala selbst als Ort für synaptische Plastizität und Gedächtnisspeicherung beim Angstlernen fungiert (Fanselow and LeDoux 1999).

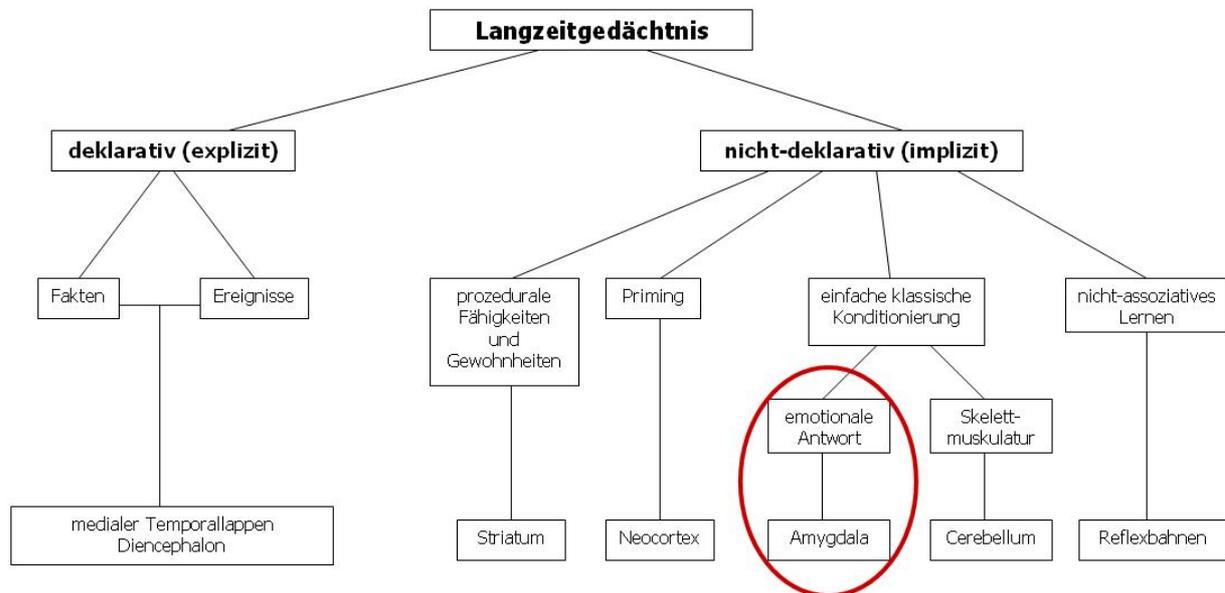


Abb. 1.3: Taxonomisches Schema zum Langzeitgedächtnis von Säugetieren

Dargestellt ist die Verteilung verschiedener Gedächtnisfunktionen auf bestimmte Gehirnregionen. Die Speicherung emotionaler Antworten nach vorheriger klassischer Konditionierung findet in der Amygdala statt (rot hervorgehoben) (Milner et al. 1998).

1.2 Angstkonditionierung als bewährtes in vivo Modell für Amygdala abhängige Lernvorgänge

Seit den Arbeiten des St. Petersburger Physiologen Iwan Pawlow (1927) weiß man, dass ein zunächst neutraler Reiz (CS) dasselbe Verhalten wie ein biologisch bedeutender Reiz (US) hervorrufen kann, vorausgesetzt die beiden Reize werden dem Versuchsobjekt zeitlich überlappend dargeboten. Dies beruht auf assoziativen Lernvorgängen, welche währenddessen stattfinden, und unter dem Begriff der klassischen Konditionierung in die Wissenschaft eingegangen sind. Die in dieser Arbeit verwendete Angstkonditionierung („*Fear Conditioning*“ = FC) ist auch eine typische Form dieses assoziativen Lernens, bei dem ein Versuchstier einen Reiz mit Gefahr und Bedrohung zu verknüpfen lernt. Dabei wird ein zunächst neutraler, konditionierter Stimulus (CS), hier ein Ton, mit einem aversiven, nicht konditionierten Stimulus (US) in Form eines leichten Fußschocks zeitlich gepaart den Tieren verabreicht. Als Resultat

eines erfolgreichen Lernprozesses ruft in Zukunft der konditionierte Reiz (Ton) bei dessen alleiniger Darbietung ähnliche Angstreaktionen wie der unkonditionierte Reiz (Fußschock) bei den Versuchstieren hervor. Wichtig dabei ist, dass bei der Konditionierung die beiden Reize (CS + US) wirklich zeitlich überlappend dargeboten werden (Abb. 1.4).

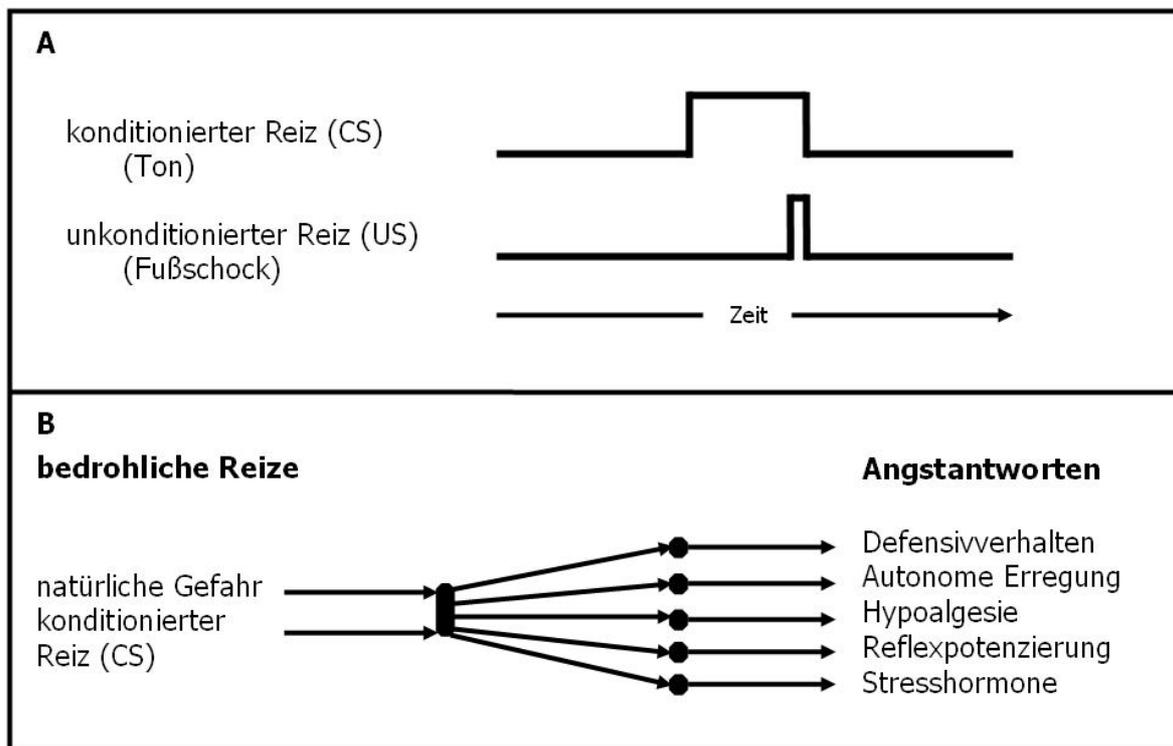


Abb. 1.4: Zeitlicher Ablauf der Angstkonditionierung und Vielfalt der gezeigten Angstreaktionen

Im Zentrum einer erfolgreichen Konditionierung steht die sich zeitlich überlappende Präsentation des aversiven, nicht konditionierten Stimulus (US), hier Fußschock, gegen Ende des neutralen, konditionierten Stimulus (CS), hier Ton (oben). Nach gelungener Konditionierung ruft der konditionierte Reiz (CS) alleine dieselben Angstreaktionen beim Versuchstier hervor wie eine natürliche Gefahr (unten) (LeDoux 2000).

Wenig überraschend ist das FC eine hochkonservierte Form des Lernens, welche in einer Vielzahl verschiedener Arten von Reptilien bis hin zum Menschen vorgefunden werden kann (LeDoux 1994). Schließlich ist sie von eminenter Bedeutung fürs Überleben, indem sie Lebewesen ermöglicht, bedrohliche Situationen zu erahnen und diese deshalb zu meiden. Neben interessanten Gesichtspunkten als Modell für pathologische emotionale Zustände stellt das FC vor allem ein attraktives Modell zum Studium neuronaler Mechanismen von Lernen und Gedächtnis dar. Denn es tritt unmittelbar, meist schon nach einer einzigen CS-US Paarung, auf und produziert sehr langanhaltende Gedächtnisinhalte. Zudem unterliegt die Induktion und Expression der Angst diskreten Reizen (CS, US), welche vom Versuchsleiter gut kontrolliert

werden können. Grundsätzlich können als solche Stimuli verschiedene Modalitäten wie Licht, Gerüche, Töne sowie die unmittelbare Versuchsumgebung, in der die Konditionierung stattfand (Kontext), dienen. In dieser Arbeit wurden zum einen ein Ton sowie der Versuchskontext als konditionierte Reize verwendet.

Im Mittelpunkt des neuronalen Netzwerks beim FC steht die laterale Amygdala (LA). Denn genau dort laufen die Informationen des Tones (CS) sowie Fußschocks (US) sowohl direkt über den Thalamus (LeDoux et al. 1990b; LeDoux et al. 1990a; Doron and LeDoux 2000; Linke et al. 2000) als auch indirekt über somatosensorische Kortexareale (Mascagni et al. 1993; Romanski and LeDoux 1993; Shi and Cassell 1997; McDonald 1998) parallel ein. Der Schmerzreiz wird dann von der LA einerseits direkt, andererseits indirekt über die Zwischenstationen des basalen (B), akzessorisch basalen (AB) und der interkalierenden Kerngebiete der Amygdala an den zentralen Kern (CE) weitergeleitet (Royer et al. 1999; Pitkanen 2000). Der zentrale Kern wiederum bildet den Hauptausgang der integrierten Signale aus der Amygdala und projiziert zu nachgeschalteten Hirnregionen wie Hypothalamus und Hypophyse, welche autonome (z. B. Anstieg von Blutdruck und Herzfrequenz) und endokrine Angstreaktionen (z. B. Ausschüttung des Stresshormons Cortisol) auslösen können (Abb. 1.5). Die wichtigste zu beobachtende Reaktion nach der Konditionierung beim FC mit Nagetieren stellt für den Experimentator jedoch das „freezing“ (Angststarre) dar. Es dient als Parameter bei der Auswertung für das Angstlernen. Denn dieses arttypische Angstverhalten zeigt sich durch ein Erstarren des Versuchstieres in vollkommener Bewegungslosigkeit und ist daher für den Experimentator gut auszuwerten. Außerdem kann dadurch die Angstreaktion beim FC quantifiziert werden. Vermittelt wird die Freezing-Reaktion über das periaquäduktale Grau (PAG, lat. *Substantia grisea periaqueductalis*), welches Angst- und Fluchtreaktionen steuert.

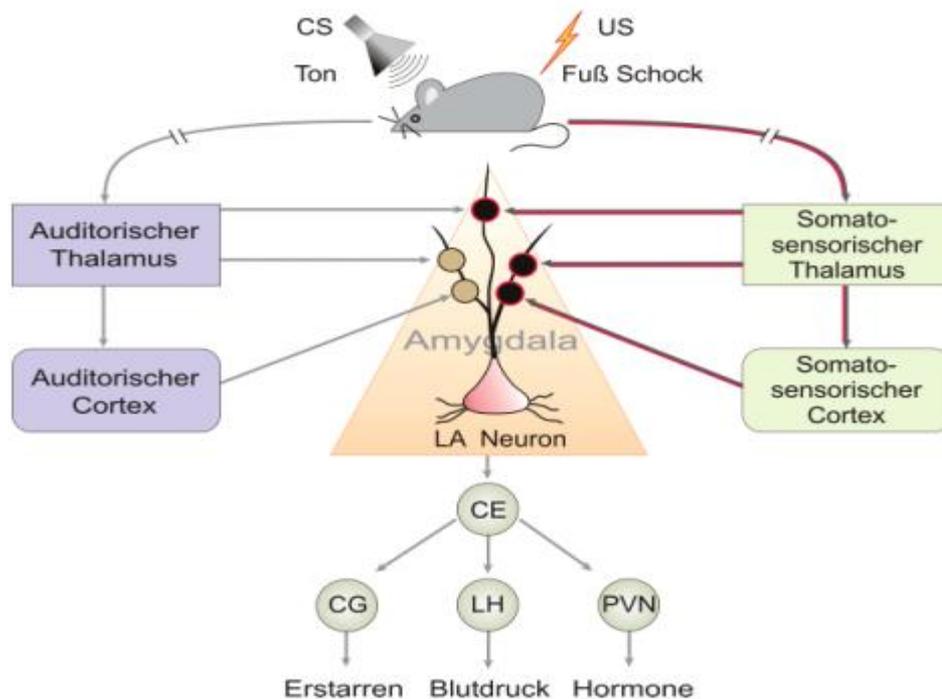


Abb. 1.5: Neuroanatomischer Schaltkreis während der auditorischen Angstkonditionierung

Dargestellt sind die wesentlichen Stationen der Verarbeitung des neutralen, konditionierten (CS) und aversiven, nicht konditionierten (US) Stimulus. Entscheidend ist die Konvergenz und zeitliche Koinzidenz beider Stimuli auf einzelne Nervenzellen in der lateralen Amygdala (LA). Diese projizieren wiederum direkt zum zentralen Kern (CE), welcher über seine Projektionen zu verschiedenen Hirnregionen wie Hypothalamus und Hypophyse die Expression der Angstantwort maßgeblich steuert. Das „freezing“, d. h. das Erstarren, der Versuchstiere mediiert das periaquäduktale Grau (CG), den Anstieg von Blutdruck und Herzfrequenz der laterale Hypothalamus (LH) und die vermehrte Ausschüttung vor allem des Stresshormons Cortisol der paraventriculäre Hypothalamus (PVN).

Nach erfolgreicher Konditionierung können alle diese Angstreaktionen durch alleinige Präsentation des CS ausgelöst werden. Denn durch die oben im Text erwähnte Konvergenz und zeitliche Koinzidenz von CS und US auf Prinzipalneurone in der LA kommt es zu einer maßgeblichen, dauerhaften Potenzierung der Antwort auf den CS im Sinne des assoziativen Lernens (Sigurdsson et al. 2007).

Wie schon erwähnt, erhält die LA beim FC zwei verschiedene auditorische Inputs, einen vom *Corpus geniculatum mediale* und *posteriores intralaminaren Nucleus* des Thalamus und den anderen vom auditorischen Assoziationskortex *TE3*. Diese beiden innervieren in der LA überlappende Bereiche (LeDoux et al. 1991) und eine Großzahl der Neurone in der LA zeigen Aktivität nach der Stimulation von einem der beiden Inputs (Li et al. 1996). Man nimmt an, dass das zelluläre Korrelat des assoziativen Lernvorgangs während des FC in einer LTP-ähnlichen, dauerhaften Verstärkung der Übertragung an den Synapsen, welche die Information des CS an die Prinzipalneurone in der LA übermitteln, besteht (Rogan and LeDoux 1995; Rogan et al. 1997; LeDoux 2000; Blair et al. 2001; Maren 2001; Rogan 2001). Diese Hypothese geht davon aus, dass die vor der Konditionierung schwachen, auditorischen Afferenzen zur LA im Gegensatz zu den Afferenzen, welche den aversiven Fußschock übermitteln, primär keine

Angstreaktionen auslösen können. Während der Konditionierung treffen diese beiden erregenden Inputs (CS und US) zeitgleich auf dieselben LA-Neurone. Das bedeutet, dass gleichzeitig zu einer starken postsynaptischen Depolarisation der LA-Neuronen durch die Afferenzen des Schmerzreizes auch die Präsynapsen aktiv sind, welche den Ton vermitteln. Durch diese koinzidente Aktivität eines schwachen und eines starken Inputs der LA ist die Voraussetzung gegeben, dass Änderungen der synaptischen Plastizität im Sinne der Hebb'schen Regel (siehe Punkt 1.3) stattfinden. Fortan lässt diese Verstärkung der CS-Synapse die Prinzipalneurone in der LA so stark erregen, dass die Präsentation des Tons alleine eine Angstreaktion hervorrufen kann (Abb. 1.5). Unterstützung erfährt diese Hypothese durch zahlreiche *in vivo* Messungen von z. B. Feldpotentialen, Single-Unit Antworten oder intrazellulären Antworten in der LA während des FC (Quirk et al. 1995; Rogan et al. 1997; Collins and Pare 2000; Repa et al. 2001; Rosenkranz and Grace 2002; Goosens et al. 2003). Denn all diese Studien zeigen einen signifikanten Anstieg der neuronalen Antwort spezifisch auf einen Ton (CS⁺), der mit einem US gepaart wurde, während die Antwort eines ungepaarten Tons (CS⁻) unverändert bleibt. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Plastizität, welche während des FC in der LA auftritt, spezifisch die CS-US Assoziation enkodiert. Auch das zurecht geäußerte Bedenken, dass die verstärkte CS-Antwort die synaptische Plastizität in sensorischen Zentren oberhalb der LA wie beispielsweise im auditorischen Thalamus (CGM/PIN) reflektiert (Cahill et al. 1999), konnte ausgeschlossen werden. Zum einen entwickelt sich die Plastizität der CS-Antwort in der LA wesentlich schneller als etwa im auditorischen Kortex (Repa 2002) oder im auditorischen Thalamus (Quirk et al. 1997), zum zweiten konnte anhand lokaler pharmakologischer Manipulationen der LA, welche das Auftreten einer erfolgreichen Konditionierung verhindern, eine selektive Reduktion in der Verstärkung der CS-Antwort in der LA gezeigt werden (Schafe et al. 2005b). All diese Befunde etablierten das laterale Kerngebiet der Amygdala als den primären Ort, an dem beim FC eine lokale Verstärkung in der synaptischen Übertragung stattfindet, welche die Grundlage zur Ausbildung des Angstgedächtnisses darstellt (Sigurdsson et al. 2007). So stellt das Pawlow'sche FC ein geeignetes *in vivo* Modell zum Studium von Lernvorgängen dar.

1.3 LTP als zellulärer Mechanismus für Lernvorgänge bei der Angstkonditionierung

Bereits im Jahre 1949 stellte der kanadische Physiologe Donald Hebb die Hypothese auf, dass Lernen und Gedächtnis auf einer lang anhaltenden Verstärkung der synaptischen Übertragung im

neuronalen Netzwerk beruhen. Ferner machte er die Annahme, dass diese Verstärkung aktivitätsabhängig auftrete, z. B. durch die gleichzeitige Aktivierung benachbarter Neurone bzw. Inputs. Anfang der 70er Jahre beobachteten Bliss and Lomo (1973) in elektrophysiologischen Untersuchungen am Hippocampus anästhesierter Kaninchen, dass die synaptische Übertragung nach vorheriger hochfrequenter elektrischer Stimulation afferenter Fasern persistent erhöht war. Die von diesen Autoren zunächst im *Tractus perforans* beobachtete aktivitätsabhängige und langanhaltende Verstärkung der synaptischen Übertragung ging als Langzeitpotenzierung (LTP) in die Literatur ein (Bliss and Collingridge 1993). Durch die intensive Forschung in diesem Gebiet ist bekannt, dass es verschiedene Formen der synaptischen Plastizität gibt, welche in diversen neuronalen Schaltkreisen zu beobachten sind (Citri and Malenka 2008). Ein wichtiges Kriterium der synaptischen Plastizität besteht darin, dass sie bidirektional ist, das bedeutet, dass die Effizienz an den Synapsen in Abhängigkeit vom Aktivitätsmuster einerseits gesteigert, andererseits gedrosselt werden kann. Sinngemäß bezeichnet man die beiden Phänomene als Langzeitpotenzierung (LTP) und Langzeitdepression (LTD). Für die exponentielle Auslösung von LTP verwendet man in der Regel einen hochfrequenten Tetanus (meist 100 Hz). LTD kann hingegen durch eine niederfrequente tetanische Reizung (900 Pulse mit 1-5 Hz) ausgelöst werden. Da in dieser Arbeit ausschließlich Untersuchungen zur LTP gemacht wurden, wird im Folgenden nur auf diese genauer eingegangen. Man weiß heute, dass die LTP als ein universelles Phänomen der synaptischen Übertragung neben vielen anderen Gehirnregionen (z. B. Hippocampus, Kortex) auch in der Amygdala vorhanden ist. So kann dort *in vitro* LTP sowohl durch die alleinige hochfrequente, elektrische Reizung präsynaptischer Fasern in Form des thalamischen und kortikalen Inputs (Chapman and Bellavance 1992; Huang and Gean 1994; Watanabe et al. 1995; Huang and Kandel 1998; Weisskopf et al. 1999; Weisskopf and LeDoux 1999) als auch durch die Paarung einer schwachen präsynaptischen Stimulation mit einer starken postsynaptischen Depolarisation (Weisskopf and LeDoux 1999; Huang et al. 2000; Tsvetkov et al. 2004; Humeau et al. 2005) induziert werden. Auch *in vivo* bei anästhesierten Tieren konnte durch die tetanische Stimulation der thalamischen Afferenzen zur LA mehrfach LTP demonstriert werden (Clugnet and LeDoux 1990; Rogan and LeDoux 1995; Yaniv et al. 2001). Doyere et al. (2003) konnten LTP der beiden Inputs (thalamischer und kortikaler) sogar an wachen, frei beweglichen Tieren zeigen.

Allgemein wird postuliert, dass die kognitiven Phänomene Lernen und Gedächtnis auf der Plastizität von Neuronen bzw. deren Verschaltungen im neuronalen Netzwerk beruhen, so auch beim FC in der LA (siehe Punkt 1.2). Zur Übersicht die Fakten dazu: 1) Beides, sowohl LTP als auch Gedächtnisfunktionen beim FC sind eng mit der LA assoziiert. 2) Die LTP in der LA wird

ebenso wie das konditionierte Angstgedächtnis schnell induziert bzw. gebildet, hängt von der Assoziation bestimmter Stimuli ab und ist langandauernd. So konnte bei elektrophysiologischen Messungen *in vivo* eine Potenzierung der synaptischen Übertragung beobachtet werden, welche 6 Tage anhielt (Doyere et al. 2003). 3) Ein weiteres gewichtiges Argument liefert die anhand pharmakologischer Manipulationen und in verschiedenen Tiermodellen häufig beobachtete Korrelation von gestörter amygdalärer LTP und selektiven Defiziten im von der LA initiierten Angstlernen (Schafe et al. 2001; Rodrigues et al. 2004). 4) Letztlich induziert das FC eine Verstärkung der synaptischen Transmission derart, dass danach eine weitere Auslösung von LTP *in vitro* mittels der üblichen hochfrequenten elektrischen Stimulation an Amygdalaschnitten nicht mehr möglich ist (McKernan and Shinnick-Gallagher 1997; Rogan et al. 1997; Tsvetkov et al. 2002).

1.4 Molekulare Grundlagen und Lokalisation der LTP in der Amygdala

Wie die LTP in der CA1 Region des Hippocampus ist die in der lateralen Amygdala auch durch Kooperativität, Assoziativität und Inputspezifität gekennzeichnet. Kooperativität heißt, dass zur Induktion von LTP eine ausreichend große Anzahl präsynaptischer Fasern aktiviert werden muss, um eine bestimmte Aktivitätsschwelle zu überschreiten. Aktivierung nur einer einzelnen Faser kann vermutlich aufgrund unzureichender postsynaptischer Depolarisation keine Langzeitpotenzierung auslösen (McNaughton et al. 1978). Diese kooperative Aktivität trägt assoziative Merkmale, d. h. ein starker Input kann einen benachbarten schwachen Input an der gleichen Zelle potenzieren, vorausgesetzt, beide Inputs werden zeitgleich aktiviert. *In vitro* wird dieses Aktivitätsmuster am besten durch ein sogenanntes „*pairing protocol*“ simuliert, bei dem die präsynaptische Stimulation gewissermaßen den zunächst schwachen Input des konditionierten Tons darstellt, welcher durch die zeitgleiche postsynaptische Depolarisation als Modell für den starken Input des Schmerzreizes eine dauerhafte Verstärkung erfährt (Blair et al. 2001). Die Tatsache, dass durch „*pairing*“ von präsynaptischer Aktivität und einer Depolarisation der postsynaptischen Membran zuverlässig LTP zu induzieren ist, macht es zu einem besonders attraktiven *in vitro* Modell für den Ablauf der CS-US Assoziation beim FC. Eine wichtige Rolle beim FC nimmt auch das Merkmal der Inputspezifität der LTP in der LA ein. Dies bedeutet, dass es zu einer selektiven Verstärkung in der Übertragung nur derjenigen Inputs kommt, deren Aktivierung mit einer postsynaptischen Depolarisation (Weisskopf and LeDoux 1999; Tsvetkov et al. 2004; Humeau et al. 2005) oder der Aktivierung anderer Inputs

(Humeau et al. 2003) einhergeht. Diese Eigenschaft der LTP in der LA erlangt für das FC insofern große Bedeutung, da es synaptische Veränderungen gezielt auf Afferenzen zur LA begrenzt, welche den konditionierten Ton prozessieren. Konträr dazu werden die Inputs, welche Informationen über nicht mit dem Fußschock zeitlich verknüpfte Sinnesreize vermitteln (z. B. Präsentation eines nicht konditionierten Tons) nicht in ihrer Übertragung potenziert. So kann eine biologisch nicht sinnvolle Generalisierung der Angstantwort effektiv verhindert werden. Eine solche wird als pathologisches Phänomen unter anderem als Ursache für die generalisierte Angststörung angenommen und wird bei Abwesenheit präsynaptischer Hemmung evident, wie eine GABA_{B1a}-Rezeptor defiziente Mauslinie zeigt (Shaban et al. 2006). Das selektive Fehlen dieses bestimmten Subtyps eines präsynaptischen GABA_B-Rezeptors im dorsalen Bereich der LA hat nämlich eine mangelnde Diskrimination von dargebotenen akustischen Reizen zur Folge und mündet in einer Generalisierung der Angstreaktion. In Übereinstimmung dazu wurde bei diesem Mausmodell in elektrophysiologischen Untersuchungen *in vitro* eine Form von *nicht-assoziativer*, NMDA-Rezeptor unabhängiger LTP der kortikalen Afferenzen zur LA detektiert.

Die Langzeitpotenzierung in der LA und die assoziativen Lernprozesse, die während des FC auftreten und zur Ausbildung von Langzeitgedächtnis führen, zeigen Kongruenz in einer Vielzahl von molekularen Mechanismen. Das primäre und essentielle Ereignis für beide Phänomene besteht in einem massiven Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration ([Ca²⁺]_i) in der Postsynapse (Rodrigues et al. 2004). Dieser beruht im Wesentlichen auf einem ausgeprägten Ca²⁺-Einstrom über postsynaptische Ionenkanäle. Abhängig vom Tetanusprotokoll und den Versuchsbedingungen spielen dabei entweder sogenannte N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDAR) oder spannungsgesteuerte Ca²⁺-Kanäle vom L-Typ (L-VGCC) die dominierende Rolle (Abb. 1.6). Bei synaptischen Veränderungen, wie sie *in vivo* beim *Fear Conditioning* auftreten, geht man von einem Zusammenspiel dieser beiden Ca²⁺-permeablen Kanäle aus (Rodrigues et al. 2004). NMDA-Rezeptoren fungieren dabei entsprechend einer erstmals von Hebb (1949) formulierten Hypothese als Koinzidenzdetektoren. So kommt es während der Präsentation des konditionierten Tons (CS) zu einer Glutamatfreisetzung in der LA aus den präsynaptischen Endigungen der auditorischen Afferenzen. Dieser Neurotransmitter bindet an der postsynaptischen Seite sowohl an sogenannte α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure-Rezeptoren (AMPA), einem anderen Typ postsynaptischer, ionotroper Rezeptoren, welche für Ca²⁺-Ionen nicht durchlässig sind, aber einzelne durch Na⁺-Einstrom vermittelte erregende postsynaptische Potentiale auslösen können, als auch an die zuvor erwähnten NMDA-Rezeptoren (Farb and LeDoux 1997). In der Regel sind die NMDA-Rezeptoren trotz der Anwesenheit des Transmitters Glutamat nicht leitend, weil die Kanalpore

durch einen spannungsabhängigen Mg^{2+} -Block verlegt ist. Erst die durch den Fußschock (US) hervorgerufene starke Depolarisation der postsynaptischen Membran führt dazu, dass sich das extrazelluläre Mg^{2+} aus der Kanalpore der mit Glutamat besetzten NMDA-Rezeptoren löst und Ca^{2+} -Ionen über diese in die Postsynapse eintreten können (Blair et al. 2001). Somit können NMDA-Rezeptoren im Sinne einer aktivitätsabhängigen Informationsverarbeitung bzw. -speicherung operieren und entscheidend zur Ausbildung einer Synapsen-spezifischen Langzeitpotenzierung beim FC beitragen (Weisskopf et al. 1999). Dennoch scheint dieser Ca^{2+} -Einstrom nur die unmittelbar einsetzende und kurzfristige Verstärkung der synaptischen Übertragung (E-LTP), wie sie beim FC während der Akquisition und dem STM, d. h. der Aneignung und kurzfristigen Speicherung des assoziativen Lerninhalts auftritt, zur Folge zu haben. Für eine längeranhaltende Verstärkung (L-LTP) im Sinne der Ausbildung langandauernder und solider Gedächtnisinhalte (LTM) jedoch ist dieser Ca^{2+} -Einstrom alleine nicht ausreichend. Das für die Überführung von der E-LTP zur L-LTP notwendige, deutlich höhere Ca^{2+} -Signal in der Postsynapse kann vermutlich nur durch einen Einstrom über spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle (L-VGCC) zustande kommen, wie er ebenfalls durch die starke postsynaptische Erregung in Folge des US beim FC in der LA auftritt (Bauer et al. 2002). Die neben dem Ca^{2+} -Einstrom via NMDAR und spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ an der Ausprägung bzw. Aufrechterhaltung von LTP in der LA beteiligten Mechanismen sind mannigfaltig und ihrer Bedeutung noch nicht vollkommen verstanden. Auf eine umfassende Beschreibung muss hier verzichtet werden, es soll nur kurz das Spektrum von relevanten Faktoren umrissen werden.

Für die E-LTP in der LA und dazu korrelierend die Phasen der Akquisition und des STM beim FC scheint neben dem primären durch NMDA-Rezeptoren vermittelten Ca^{2+} -Anstieg die Rolle postsynaptischer metabotroper Glutamatrezeptoren (mGluR5) und der Ca^{2+} -Calmodulin abhängigen Kinase Typ II (CaMKII) gesichert (Walker and Davis 2000; Rodrigues et al. 2001; Bauer et al. 2002; Rodrigues et al. 2002; Rodrigues et al. 2004).

Für die langanhaltende Potenzierung der synaptischen Übertragung, die für die langfristige Konsolidierung des beim FC erworbenen assoziativen Gedächtnisses notwendig ist und deren initiales Ereignis ein durch postsynaptische L-VGCCs vermittelter, erheblicher Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) darstellt, sind weitere verschiedene Proteinkinasen wie die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA), die Proteinkinase C (PKC), die CaMKIV oder *extracellular related-signal protein kinase/mitogen-activated proteinkinase* (ERK/MAPK) sowie der Transkriptionsfaktor CREB und die damit verbundene Neusynthese von RNA und Proteinen von

Bedeutung. Wie auch im Hippocampus kann zusätzlich eine Rolle neurotropher Faktoren (BDNF) und deren Rezeptoren (TrkB) in Betracht gezogen werden (Abb. 1.6).

Neben der für die LTP relevanten Mechanismen steht insbesondere die Frage nach dem Locus der resultierenden persistenten Modifikation der synaptischen Übertragung im Focus. Kurz gefasst: Beruht die LTP beim FC in der LA auf prä- oder postsynaptischen Veränderungen? Diese Frage wurde in der Vergangenheit bereits für die LTP in der CA1 Region des Hippocampus sehr kontrovers diskutiert (Bliss and Collingridge 1993; Kullmann and Siegelbaum 1995; Malinow 1998). Potenzielle postsynaptische Mechanismen sind z. B. die Erhöhung der Leitfähigkeit einzelner AMPA-Rezeptoren aufgrund einer vorangegangenen Phosphorylierung bzw. eine Zunahme der Anzahl von postsynaptischen Rezeptoren (v. a. AMPA-Rezeptoren), ihre Gruppierung, die Hinzufügung von AMPA-Rezeptoren zu reinen NMDA-Rezeptor Synapsen (sogenannte AMPAifizierung und dadurch „*unsilencing*“ von „*silent synapses*“) oder das *Splitting* einzelner dendritischer Spines in zwei funktionelle Synapsen (Bliss and Collingridge 1993; Kullmann and Siegelbaum 1995; Malinow and Mainen 1996; Citri and Malenka 2008). Im Gegensatz dazu führt die LTD zu einer Reduktion der postsynaptischen Dichte von AMPA-Rezeptoren (Sheng and Lee 2001; Barry and Ziff 2002; Malinow and Malenka 2002; Song and Huganir 2002; Bredt and Nicoll 2003). Bei der durch AMPA-Rezeptoren vermittelten LTP scheint besonders die GluR1-Untereinheit eine zentrale Rolle einzunehmen. So wird während der LTP vor allem diese vermehrt in die postsynaptische Membran eingebaut. Korrelierend dazu zeigt eine Mauslinie mit selektivem Knock-out der GluR1-Subunit (GluR1^{-/-}) keine LTP in der CA1 Region des Hippocampus (Zamanillo et al. 1999). Parallel dazu treten auch strukturelle Veränderungen an den Synapsen auf, welche über eine Größenzunahme der dendritischen Spines und die dadurch initiierte Vergrößerung der aktiven Zone der Präsynapse letztlich zu einer permanenten Vergrößerung der potenzierten Synapsen im Gesamten führen. Der dauerhafte Erhalt dieser morphologischen Änderungen erfordert sowohl die *de novo* Transkription von Genen im Zellkern als auch eine lokale Proteinsynthese in den Dendriten (Citri and Malenka 2008).

Als präsynaptischer Mechanismus für die LTP wird eine Erhöhung der Transmitterfreisetzung angenommen. Gestützt wird diese Annahme vor allem durch Befunde aus Untersuchungen, in denen exzitatorische, postsynaptische Ströme (EPSCs) bei Stimulation einer einzelnen bzw. einer geringen Anzahl präsynaptischer Fasern gemessen wurden. Unter diesen Bedingungen beobachtet man eine charakteristische Verteilung der Amplituden von EPSCs am nachgeschalteten Neuron (Malinow 1991; Bolshakov and Siegelbaum 1995). Erklären lässt sich diese Verteilung dadurch, dass am präsynaptischen Terminal einlaufende Aktionspotentiale die

Freisetzung eines Transmitter-Quantums nach dem Alles oder Nichts Prinzip auslösen. Dementsprechend ist die synaptische Übertragung durch sogenannte „failures“ (keine postsynaptische Antwort) und „successes“ (als EPSCs von definierter Amplitude messbar) charakterisiert. Da die Erfolgsrate der synaptischen Transmission durch die Wahrscheinlichkeit der Transmitterfreisetzung (P_T) determiniert ist, kann man nun unter LTP eine Zunahme der „successes“ im Sinne einer erhöhten P_T beobachten, während die mittlere Amplitude der EPSCs unverändert bleibt (Malinow and Tsien 1990; Malinow 1991; Bolshakov and Siegelbaum 1995). Eine alternative Erklärung für die erhöhte Erfolgsrate der synaptischen Übertragung bei der LTP könnte die AMPAifizierung von „silent synapses“ (siehe oben) bieten. Sehr wahrscheinlich ist die Induktion und Aufrechterhaltung der Langzeitpotenzierung sowohl von prä- als auch postsynaptischen Mechanismen geprägt (Lisman and Raghavachari 2006).

1.5 Der NO/cGMP/cGK-Signalweg und seine Bedeutung für Lernvorgänge und synaptische Plastizität

Damit derartige Veränderungen an der Präsynapse nach postsynaptischer LTP-Induktion stattfinden können, ist das Vorhandensein eines retrograden Botenstoffs (*messenger*), welcher postsynaptisch gebildet wird, aber auch präsynaptisch wirken kann, zwingend notwendig. Als geeigneter Kandidat hierfür gilt das diffusible Molekül Stickstoffmonoxid (NO). Durch einen postsynaptischen Anstieg der $[Ca^{2+}]$ -Konzentration wird die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige NO-Synthase (NOS) aktiviert. Diese setzt bei der enzymatischen Umwandlung von Arginin in Citrullin NO in der Postsynapse frei. NO spielt eine wichtige Rolle bei verschiedenen Formen von synaptischer Plastizität und Lernen in mehreren Gehirnbereichen (Schuman and Madison 1994; Feil and Kleppisch 2008). So ist NO beispielsweise an der LTD im Cerebellum und Corpus Striatum ebenso wie an der LTP im Hippocampus, verschiedenen Kortexarealen und der Amygdala beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass die LTP in der CA1 Region in hippocampalen Schnitten durch NO-Scavenger, die extrazellulär vorkommendes NO abfangen, gehemmt wird sowie durch die Applikation von NO erhöht werden kann (Zhuo et al. 1993; Hawkins et al. 1994; Huang 1997; Lu et al. 1999). Auch durch genetische Modelle mit NOS-knock-out Tieren konnten übereinstimmende Ergebnisse erzielt werden. So zeigen knock-out Mäuse, bei denen sowohl die endotheliale als auch die neuronale NOS fehlen, eine verminderte LTP im Hippocampus (Son et al. 1996).

Eine Expression der neuronalen NO-Synthase (nNOS) in der lateralen Amygdala (LA) und benachbarten Regionen wie dem basal akzessorischen Kerngebiet (BA), der amygdala-striatalen-Übergangszone (TA) und dem zentralen Kern (CE) deckte eine immunhistochemische Untersuchung auf (Schafe et al. 2005b). Dabei erfolgte mit Hilfe von Elektronenmikroskopie ein Nachweis der nNOS sowohl in den Somata von Interneuronen und exzitatorischen Prinzipalneuronen als auch in dendritischen Spines, Dendriten und terminalen Axonendigungen. Besonders erwähnenswert ist der Befund, dass in den dendritischen Spines und den Dendriten in der LA die nNOS mit der Ca^{2+} -Calmodulin abhängigen Kinase II (CaMKII) eine Kolokalisation aufweist (Schafe et al. 2005b). Dies könnte auch für eine funktionelle Interaktion der beiden Enzyme in der LA sprechen. Die Applikation eines NO-Scavengers oder eines NOS-Inhibitors bei elektrophysiologischen Untersuchungen an Gehirnschnitten führte zu einer deutlichen Reduktion der LTP durch vorherige hochfrequente Reizung des thalamischen Inputs zur LA. Dazu korrelierend zeigte die intraamygdaläre Injektion eines NOS-Inhibitors gleichsam der eines selektiven NO-Scavengers eine massive Beeinträchtigung der Konsolidierung des Angstgedächtnisses, während der Erwerb des Angstgedächtnisses (Akquisition) und die Ablage im Kurzzeitspeicher (STM) nicht signifikant verändert waren (Schafe et al. 2005b). Übereinstimmend dazu konnte durch andere Arbeitsgruppen eine Induktion der NO-Produktion in der Amygdala während der Angstkonditionierung beobachtet werden, welche eine Korrelation zum Freezing-Verhalten der Tiere zeigte (Izquierdo et al. 2006; Sato et al. 2006). Demgegenüber steht eine Studie von Watanabe et al. (1995), der keine Rolle von NO für die Langzeitpotenzierung nach tetanischer Stimulation des kortikalen Inputs ausmachen konnte. Zusammengenommen weisen all diese Ergebnisse zumindest auf eine bedeutende Rolle von NO als *messenger* bei der Induktion und Aufrechterhaltung von LTP des thalamischen Inputs zur LA sowie bei einer dauerhaften Speicherung des beim FC angestoßenen Lerninhalts hin. Andererseits erhärten diese Befunde die Hypothese, dass dem *Fear Conditioning* in der LA eine LTP-hafte Verstärkung der synaptischen Übertragung zugrunde liegt (siehe Punkte 1.2; 1.3).

Man nimmt an, dass NO als retrograder Botenstoff durch den synaptischen Spalt diffundiert und dort konform zur bereits beschriebenen Quantum-Theorie (Kullmann and Siegelbaum 1995) die präsynaptische Transmitterfreisetzung erhöht (Arancio et al. 1995). Dazu passen Befunde der auch in der LA beobachteten „*paired pulse facilitation*“ (PPF), bei der es durch die Paarung zweier identischer Reize in kurzem zeitlichem Abstand (20 - 150 ms) zu einer Verstärkung der zweiten synaptischen Antwort kommt. Man erklärt dies mit einer erleichterten und damit kurzzeitig erhöhten präsynaptischen Transmitterfreisetzung. Schafe et al. (2005b) zeigten, dass diese signifikante Erhöhung der synaptischen Antwort im thalamischen Input nur vor der

Induktion von LTP zu erzielen war, während sie nach erfolgreicher Induktion von LTP ausblieb. Diese Beobachtung weist auf die Beteiligung präsynaptischer Mechanismen bei der LTP in der LA hin, die bereits eine Sättigung der Freisetzungswahrscheinlichkeit auslöst.

Generell als mögliche präsynaptische Effektoren von NO bei der LTP und LTD werden beispielsweise die ADP-Ribosyltransferase (ADPRTF), die ADP-Ribosylzyklase, durch zyklische Nukleotide gesteuerte Kationenkanäle (CNG-Kanäle), durch Hyperpolarisation und zyklische Nukleotide aktivierbare Kationenkanäle (HCN) und Ryanodinrezeptoren diskutiert (Schuman et al. 1994; Leinders-Zufall et al. 1995; Bradley et al. 1997; Savchenko et al. 1997; Kleppisch et al. 1999b; Feil and Kleppisch 2008).

Der bedeutendste Effektor von NO jedoch scheint die lösliche Guanylylzyklase (sGC) zu sein, welche nach ihrer Aktivierung durch NO den intrazellulären Botenstoff cGMP bildet. Ähnlich wie NO nimmt auch das Signalmolekül cGMP eine zentrale Rolle für Lernvorgänge im Cerebellum, verschiedenen Kortextbereichen, im Hippocampus und in der Amygdala ein (Ito and Karachot 1990; Shibuki and Okada 1991; Hawkins et al. 1998). Chien et al. (2003) konnten zeigen, dass der sGC-Aktivator YC-1 zu einer erhöhten LTP im Hippocampus und in der Amygdala führt. In Übereinstimmung dazu verbessert eine pharmakologische Manipulation mit YC-1 das Lernverhalten von Ratten *in vivo* bei verschiedenen Verhaltenstests. So führte die Injektion von YC-1 in die Seitenventrikel der Versuchstiere unmittelbar vor dem „*Morris water maze*“ zu einer verbesserten Suchstrategie und deutlich verminderten „*escape latencies*“, beides Hinweise auf eine Verbesserung des räumlichen Lernens im Hippocampus. Ein signifikant besseres Abschneiden von Versuchstieren im „*passive and active avoidance task*“, einer Form von konditioniertem Lernen, bei welcher besonders auch die Amygdala und der Hippocampus beteiligt sind, spricht für einen gesteigerte Lernleistung in diesen Bereichen (Chien et al. 2005). Nivelliert wurden die positiven Effekte auf LTP und Gedächtnisbildung von YC-1 durch zeitgleiche Applikation von Hemmsubstanzen der cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKGs oder cGKs) wie KT5823 oder Rp-8-Br-PET-cGMPS. So scheint cGMP seine stimulierenden Effekte für die LTP und Gedächtnisbildung in der LA besonders über die cGKs zu vermitteln, deren Bau und unterschiedliche Funktionen im ZNS im folgenden Punkt 1.6 beschrieben werden.

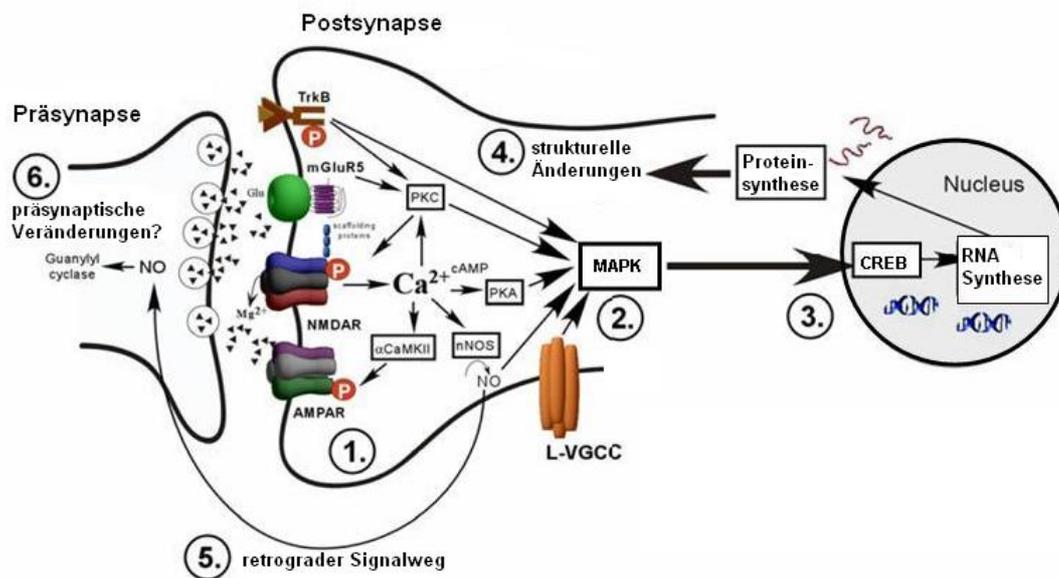


Abb. 1.6: Bei der Angstkonditionierung und der LTP in der lateralen Amygdala involvierte Signalmoleküle und Signalwege

Ausgangspunkt einer verstärkten synaptischen Übertragung in der LA ist ein Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ in der Postsynapse. Die nachfolgende Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalmoleküle (CaMKII; PKA; PKC; nNOS) führt zu einer Phosphorylierung von postsynaptischen Rezeptoren (z. B. AMPA) (1.) sowie zur gemeinsamen Aktivierung von MAPK (2.). Diese mündet in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB (3.), welche schließlich zur Neusynthese von mRNA und Proteinen führt. Eine solche Neusynthese bildet die Grundlage für persistierende Veränderungen in der Struktur der Synapse (4.). Parallel dazu existiert ein retrograder Signalweg (5.). Dabei diffundiert das Molekül Stickstoffmonoxid (NO), gebildet in der Postsynapse durch nNOS, zur Präsynapse. Welche Veränderungen dort durch NO über welche Signalwege induziert werden, ist noch nicht hinreichend geklärt (6.). (Schema abgewandelt von www.scholarpedia.org/wiki/images/7/7d/Amygdala_Figure_8.jpg).

1.6 Bau und Funktion der cGMP-Kinasen im ZNS

Ein für eine Vielzahl zellulärer Funktionen sehr bedeutsamer Signalüberträger des *second messenger* cGMP ist die cGMP-abhängige Proteinkinase (cGMP-Kinase oder PKG), ein Enzym aus der Klasse der Serin-/Threonin-Kinasen. In Vertebraten wurden bislang zwei verschiedene Gene des Enzyms, *prkg1* und *prkg2*, identifiziert und kloniert (Wernet et al. 1989; Ruth et al. 1991; Uhler 1993; Jarchau et al. 1994). Alternatives „*Splicing*“ im aminoterminalen Bereich der cGKI resultiert in zwei zusätzlichen Isoformen, cGKI α und cGKI β . Die beiden für die cGKI bzw. cGKII kodierenden Gene liegen beim Menschen auf zwei separaten Chromosomen (Feil et al. 2005; Hofmann et al. 2006). Die cGMP-Kinase liegt als Dimer aus identischen Untereinheiten vor. Die Molekularmasse der Monomere für Typ I und II beträgt ca. 75 kDa bzw. 85 kDa. Während die cGKI im Zytosol lokalisiert ist, ist die cGKII mit ihrem N-Terminus in der

Plasmamembran verankert. Es lassen sich sechs verschiedene funktionelle Domänen der cGMP-abhängigen Kinase Typ II unterscheiden (Pfeifer et al. 1999) (Abb. 1.7). In der aminoterminalen Hälfte liegen die Dimerisierungsregion, die autoinhibitorische Region und eine flexible Region, welche den Aminoterminus mit den cGMP-Bindungsdomänen II und I verbindet. Diesem gesamten Abschnitt mit regulatorischer Funktion schließt sich ein katalytischer Bereich mit der ATP- und der Substrat-Bindungsdomäne sowie einer karboxyterminalen Region an. Die cGMP-abhängigen Kinasen sind *in vitro* durch eine submikromolare Konzentration von cGMP aktivierbar (Ruth et al. 1991). Die zeitgleiche Bindung von 4 cGMP-Molekülen induziert eine Konformationsänderung, bei der die Autoinhibition durch den Aminoterminus aufgehoben und dadurch der Zugang des umzusetzenden Substrats zur katalytischen Domäne ermöglicht wird (Abb. 1.7). Dann kann eine Phosphorylierung des Substrats erfolgen.

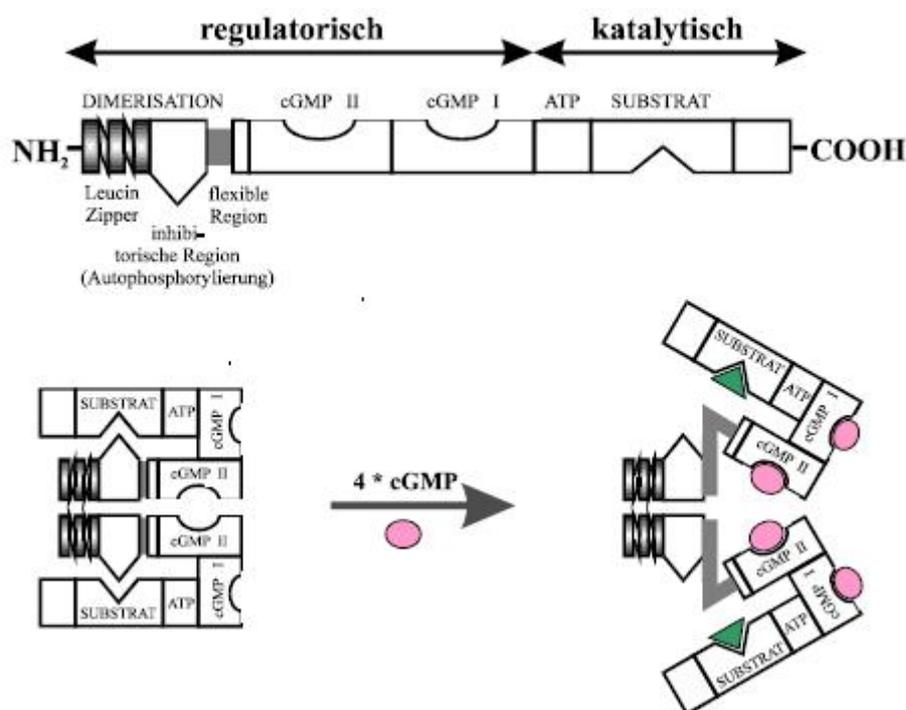


Abb. 1.7: Schematisches Modell der Struktur der cGK II

Gezeigt ist die schematische Struktur der cGKII sowie ihre Konformationsänderung nach cGMP-Bindung mit Freilegung der katalytischen Region zur Substratbindung.

Die in den vergangenen Jahren eingehender untersuchte cGKI scheint an einer Reihe von ZNS-Funktionen beteiligt zu sein. So nimmt sie eine wichtige Rolle in der korrekten und planmäßig verlaufenden Entwicklung des ZNS dadurch ein, dass ihr Fehlen (konventioneller cGKI knock-out) eine fehlerhafte Axonenwanderung sowie eine mangelhafte Verknüpfung sensorischer

Axone zur Folge hat (Schmidt et al. 2002). Auch von Bedeutung scheint sie für die Entstehung des inflammatorischen Schmerzes, da entsprechende Untersuchungen an Mäusen mit globalem Knock-out des Gens der cGKI selektiv eine Reduktion der durch Inflammation ausgelösten Hyperalgesie ergaben (Tegeeder et al. 2004). Weitere Untersuchungen an Mausmodellen mit konditionalem Knock-out des Gens für die cGKI offenbarten zudem Funktionen des Enzyms für verschiedene Formen von Lernen und synaptischer Plastizität. So demonstrierten Feldpotentialmessungen an Hippocampus spezifischen knock-out Mäusen (cGKI^{hko}) eine selektive Rolle der Proteinkinase für die Induktion der Proteinsynthese abhängigen L-LTP in der CA1 Region des Hippocampus, während sich in den dazu korrelierenden, Hippocampus spezifischen Verhaltenstests (*Morris water maze*, FC) keine Unterschiede zu den Kontrolltieren zeigten (Kleppisch et al. 2003). Eine selektive Ablation der cGKI in den Purkinje Zellen des Kleinhirns resultiert in einer signifikant beeinträchtigten zerebellären LTD (Feil et al. 2003). Übereinstimmend dazu offenbarten diese Mäuse auch eine mangelhafte Adaptation des vestibulo-okulären Reflexes (VOR), einer Kleinhirn spezifischen Form des motorischen Lernens. Die in der Vergangenheit weniger beforschte cGMP-abhängige Kinase Typ II scheint eine funktionelle Rolle bei der Regelung des zirkadianen Rhythmus bei Mäusen zu besitzen. Entsprechende Untersuchungen an konventionellen cGKII knock-out Mäusen legten offen, dass ein Fehlen der cGKII zu einem reduzierten Zurücksetzen des zirkadianen Rhythmus durch einen während der frühen Nachtphase verabreichten Lichtpuls führt. Parallel dazu konnte auf molekularer Ebene eine deutliche Hochregulation von *mPer1* bei gleichzeitig verminderter *mPer2* Expression während der frühen Nachtphase in den cGKII-defizienten Mäusen nachgewiesen werden (Oster et al. 2003; Tischkau et al. 2004). Man vermutet, dass die Auffälligkeit im Phänotyp durch dieses bei den knock-out Tieren veränderte Expressionsmuster dieser beiden „Clock Genes“ (*mPer1* und *mPer2*) zustande kommt. Werner et al. (2004) fanden bei Untersuchungen an diesen Mäusen (cGKII KO) ein erhöhtes Angstverhalten sowie einen gesteigerten freiwilligen Konsum von Ethanol verbunden mit einer signifikant reduzierten Sensitivität gegenüber hypnotischen Dosen von Ethanol. Aufgrund der in dieser Studie mittels *in situ hybridization* bei Kontrolltieren festgestellten Expression der cGKII mRNA in der Amygdala deklarierten sie zumindest die gesteigerte Angst der cGKII-defizienten Tiere als Folge eines Fehlens des Enzyms in der Amygdala.

Interessant im Zusammenhang mit der hier vorliegenden Arbeit sind die kürzlich veröffentlichten Befunde von Serulle et al. (2007). Beruhend auf der zentralen Rolle der GluR1-Subunit des ionotropen AMPA-Rezeptors als postsynaptischen Mechanismus für die LTP (siehe Punkt 1.4) konnte die Arbeitsgruppe in kultivierten hippocampalen Pyramidenzellen eine

Kolokalisation und Interaktion der cGKII mit der GluR1-Untereinheit nachweisen. Die membranständige cGKII bindet die C-terminale Domäne (CTD) der GluR1 und kann diese ebenso wie die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) an Serin 845 phosphorylieren. Folge dieser Phosphorylierung ist ein erhöhtes Level von GluR1 in der postsynaptischen Membran, wie es bei der LTP auftritt (siehe Punkt 1.4). Wie diese Erhöhung genau zustande kommt, ist bislang noch ungeklärt. Diskutiert wird einerseits ein vermehrter Einbau in die Plasmamembran aus einem Pool von GluR1 im Zytoplasma, andererseits könnte die Phosphorylierung durch cGKII eine Stabilisierung ohnehin schon membrangebundener GluR1-Untereinheiten zur Folge haben. Pharmakologische Manipulationen an den kultivierten Pyramidenzellen aus dem Hippocampus mit einem NO-Donor sowie dem membranpermeablen cGMP-Analogon 8-Br-cGMP führten ebenfalls zu einer verstärkten Phosphorylierung von GluR1 an Serin 845. Durch eine zeitgleiche pharmakologische Hemmung der cGKII mit KT5823 war dieser Effekt nicht zu beobachten. Passend dazu resultierte die Blockade der nNOS, sGC und die direkte Hemmung der cGKII mit pharmakologischen Substanzen in einer signifikant verminderten hippocampalen LTP bei Gehirnschnitten an Mäusen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der NO/cGMP/cGKII-Signalweg eine wichtige Rolle bei der LTP im Hippocampus einnimmt und diese Effekte über die verstärkte Phosphorylierung der GluR1-Subunits von AMPA-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran vermittelt werden.

Ein ähnlicher Mechanismus wäre durchaus auch bei der Induktion von LTP in der lateralen Amygdala (LA) denkbar. Zumal eine wichtige Rolle von NO, sGC und cGMP für die LTP und Gedächtnisbildung in der LA durch die Ergebnisse von anderen Arbeitsgruppen gesichert scheint (Chien et al. 2003, 2005; Schafe et al. 2005b). Darauf basierend wurde auch eine Rolle der cGKs für LTP und Lernen in der Amygdala schon durch andere Arbeitsgruppen vorgeschlagen (Chien et al. 2005, Ota et al. 2008). Es bleibt jedoch die Frage, welche Isoform der cGMP-abhängigen Proteinkinasen für diese Vorgänge in der Amygdala funktionell bedeutsam ist.

1.7 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

In der Literatur wird der NO/cGMP-Signalweg als wichtiger Mechanismus mit einer tragenden Rolle für die LTP und das assoziative Angstgedächtnis beschrieben. Ota et al. (2008) demonstrierten in ihrer Arbeit, dass durch cGK-Inhibitoren und Aktivatoren sowohl die LTP als auch die Ausbildung des Langzeitgedächtnisses über den thalamischen Input zur LA beeinflusst werden können.

Ziel der hier vorgelegten Arbeit war die detaillierte Aufklärung der Funktion der cGMP-abhängigen Kinase Typ II bei der synaptischen Plastizität in der lateralen Amygdala (LA) sowie ihre Relevanz für ein wichtiges Verhaltenskorrelat, das Angstlernen. Da keine adäquaten pharmakologischen Tools mit der erforderlichen Spezifität ihres Angriffsortes zur Bearbeitung der Fragestellung zur Verfügung stehen, sollte sie am Modell einer gentechnisch modifizierten Mauslinie mit einem selektiven Verlust der cGKII untersucht werden.

In der Vergangenheit konnte mittels *in situ hybridization* der Nachweis einer mäßigen bis starken Expression der mRNA der cGKII in der lateralen Amygdala von Wildtypmäusen erbracht werden (El-Husseini et al. 1995; 1999; Werner et al. 2004). Die Expression des hiesigen Enzyms auf Proteinebene ist bisher jedoch weder in der LA noch in anderen Gehirnregionen ausreichend charakterisiert. Deshalb sollte zunächst mittels Immunoblots und immunhistochemischen Methoden eine detaillierte Expressionsanalyse der cGKII in für das Angstlernen wichtigen Hirnregionen mit dem Hauptaugenmerk auf der Amygdala erfolgen.

Ihre funktionelle Bedeutung für die LTP in der lateralen Amygdala sollte durch elektrophysiologische Untersuchungen der synaptischen Aktivität an Amygdalaschnitten von Wildtyp- bzw. cGMP-Kinase II-defizienten Mäusen charakterisiert werden. Dabei wurde in zwei Messdurchläufen die LTP in der LA sowohl nach tetanischer Stimulation des direkten Inputs zur LA in Form thalamischer Afferenzen als auch des indirekten Inputs in Form von kortikalen Afferenzen untersucht.

Diese Befunde sollten durch Tests zum konditionierten Angstlernen der Mäuse kombiniert werden, um eine eventuelle Korrelation von Defiziten in der LTP und des amygdalären Angstlernens aufzudecken. Als adäquates Paradigma für das von der Amygdala abhängige Angstlernen sollten Wildtyp- und cGKII-defiziente Mäuse beim „*Fear Conditioning*“ (FC), einer Variante der klassischen Konditionierung nach Pawlow, getestet werden.

Desweiteren wurde eine Grundcharakterisierung der cGKII-defizienten Mäuse durchgeführt. Im sogenannten „*Open Field*“-Test wurden grundlegende Verhaltensparameter bei den Tieren untersucht. Es wurden für beide Mausgruppen (cGKII^{-/-}, WT) die Bewegungen sowohl in der horizontalen als auch in der vertikalen Ebene aufgezeichnet. Damit wurden die Aktivität, die zurückgelegte Wegstrecke, mittlere Geschwindigkeit und die „*Rearings*“ (Aufrichten mit Stand auf Hinterbeinen) der Tiere analysiert. Außerdem wurde für beide Gruppen die Thigmotaxis (Aufenthaltsdauer im Randbereich des *Open Field*) untersucht. Damit wurde zum einen eine weiterführende Charakterisierung des Phänotyps der cGKII-defizienten Mäuse hinsichtlich basaler Verhaltensweisen wie Lokomotion, Exploration und angeborenes Angstverhalten verfolgt, um die erhaltenen Befunde mit ähnlichen vorangegangenen Untersuchungen zu

vergleichen (Werner et al. 2004). Zum anderen sollte damit der Ausschluss von Fehlinterpretationen der Ergebnisse beim FC gelingen. Denn signifikante Befunde im Angstlernen beispielsweise könnten die Folge eines veränderten, angeborenen Angstverhaltens der knock-out Mäuse sein. So sind die Ergebnisse des „*Open Field*“-Tests eine wichtige Voraussetzung dafür, um aus den beim FC ermittelten Befunden sinnvolle und richtige Schlussfolgerungen ziehen zu können.

2 Material und Methoden

Um eine mögliche subjektive Bewertung der Messergebnisse auszuschließen, wurden alle hier vorgestellten Versuche unter Verblindung durchgeführt und ausgewertet, d. h. ohne Kenntnis des Genotyps der Versuchstiere durch den Experimentator.

2.1 Versuchstiere

Alle Versuche wurden gemäß den Tierschutzrichtlinien durchgeführt und von der Regierung Oberbayern genehmigt. Die verwendeten Versuchstiere entstammen der Mauszucht des Instituts der Pharmakologie und Toxikologie des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München.

2.1.1 C57BL/6J Wildtypmäuse

Bei den Verhaltensversuchen zum „*Fear Conditioning*“ (FC) wurden für die Vorversuche und das Etablieren der Versuchsprotokolle homozygote Wildtypmäuse des Stammes C57BL/6J verwendet.

2.1.2 cGKII knock-out Mäuse

Um die Rolle der cGKII zu untersuchen, wurden konventionelle cGMP-Kinase Typ II knock-out Mäuse der cGKII-Zucht verwendet. Diese Mäuse mit einem selektiven Verlust der cGKII wurden im Institut für Pharmakologie und Toxikologie mit Hilfe der konventionellen knock-out Technik etabliert (Pfeifer et al. 1996; 1998). Um die Deletion aller möglicherweise für die cGKII vorkommenden aminoterminalen Spleißvarianten abzusichern, wurde ein Bereich als Zielregion für den knock-out Vektor ausgewählt, der für die cGMP-Bindungstasche A (Exon II und folgendes Intron) der cGMP-Kinase Typ II kodiert. Zur Blastozysteninjektion wurden dabei ES-Zellen von 129/Sv Mäusen verwendet. Die gewonnenen Chimären wurden mit C57BL/6J Mäusen gekreuzt (sogenannte Outbred-Zucht). Homozygot mutante Mäuse (cGKII^{-/-}) sind sowohl durch einen kompletten Verlust der korrespondierenden mRNA als auch des Proteins charakterisiert.

Die heterozygoten cGKII^{+/-} und die homozygoten cGMP-Kinase Typ II knock-out Mäuse (cGKII^{-/-}) waren nach der Geburt gleichermaßen überlebensfähig. Auch bezüglich der

Überlebensdauer der cGKII knock-out Mäuse sind bisher in der Literatur keine Unterschiede zu den Wildtypmäusen beschrieben.

2.1.3 Genotypisierung

1) Gewinnung der DNS

Die dafür benötigte DNS wurde aus Schwanzgewebe von 10-14 Tage alten Tieren gewonnen. Ca. 2 mm lange Schwanzspitzen wurden über Nacht bei 55°C in 50 µl Proteinase K-Puffer (Tab. 2.1) inkubiert. Danach wurde bei 18.000 x g für 1 min. zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Proteinase K bei 95°C (15 min.) inaktiviert. Die Lösung kann bei -20°C gelagert werden.

Proteinase K-Puffer	Stocklösung	Endkonzentration
Proteinase K	50 mg/ml	1 mg/ml
Taq DNS Polymerase Puffer	10 x	1 x

Tab. 2.1: Proteinase K-Puffer

2) Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*) ist eine *in vitro* Methode, mit welcher man mit Hilfe von Enzymen gezielt Nukleotid-Sequenzen amplifizieren kann. Im Falle der Genotypisierung dient die gewonnene genomische DNS als Matrize, welche zunächst bei 94°C (Denaturierung) in die jeweiligen Einzelstränge aufgeschmolzen wird. An diese können nun spezifische Oligonukleotid-Primer binden (Annealing bei 55°C). Die komplementäre Bindung des *forward*-Primers an die Matrize legt den Startpunkt der Elongation (72°C) durch die hitzestabile Taq-Polymerase fest. Durch einen zweiten Primer wird die Länge des Amplifikats bestimmt. Durch Wiederholung der Zyklen reichert sich die gewünschte DNS-Sequenz an.

10 x PCR-Puffer	Stocklösung	Endkonzentration
KCl	1 M	500 mM
Tris/HCl pH 8,0	1 M	100 mM
MgCl ₂	1 M	15 mM
dNTPs	100 mM	2 mM

Tab. 2.2: 10 x PCR-Puffer

Primer für cGKII-KO Mäuse	Sequenz
RF	5'-ggg gaa gtt tag gtg aac caa gaa -3'
RF	5'-gcc tgc tet tta ctg aag gct ct -3'
RF	5'-cac cat gtc ctt gat ctg ct -3'

Tab. 2.3: Primersequenzen für cGKII-KO-Genotypisierung

Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler der Firma Biometra durchgeführt, welcher wie folgt programmiert wurde:

Phase	cGKII-KO	
Initiale Denaturierung	94°C, 5 min.	
Denaturierung	94°C, 15 s	35 x
Annealing	55°C, 30 s	
Elongation	72°C, 30 s	
Finale Elongation	72°C, 5 min.	

Tab. 2.4: PCR-Programm für Genotypisierung

3) Agarose-Gel-Elektrophorese

Zur Auftrennung der unterschiedlichen DNS-Fragmente, die als PCR-Produkt entstanden sind, diente die Elektrophorese im Agarose-Gel. Da Nukleinsäuren aufgrund ihrer Phosphatreste eine negative Ladung tragen, können sie im elektrischen Feld wandern und lassen sich so nach ihrer Masse auftrennen. Durch Interkalation von Ethidiumbromid, welches mit in das Gel eingegossen wurde, in den DNS-Doppelstrang konnten die DNS-Banden durch Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Die PCR-Amplifikate wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 6 x DNS-Auftragspuffer versetzt. Das Agarose-Gel wurde in einer Konzentration von 2 % Agarose (SeaKem LE Agarose, Biozym) in 1 x TBE gegossen und mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml Gel, Sigma) versetzt. Als Laufpuffer diente 1 x TBE. Zum Größenvergleich der DNS-Banden wurde ein Standard (1 kb DNA ladder, Gibco-BRL) mit auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 150 V ca. 30-45 Minuten durchgeführt.

10 x TBE-Puffer	Endkonzentration 10 x
Tris-Cl (ICN)	0,9 M
EDTA, pH 8,0	20 mM
Borsäure	0,9 mM

Tab. 2.5: 10 x TBE-Puffer

6 x DNS-Auftragspuffer	Endkonzentration
Ficoll Typ 400 (Sigma)	18 %
EDTA, pH 8,0	120 mM
10 x TBE	6 %
Bromphenolblau	0,1 %
Xylencyanol FF	0,1 %

Tab. 2.6: 6 x DNS-Auftragspuffer

2.2 Immunhistochemische Methoden

Sie ermöglichen den Nachweis von Proteinen in Gewebeschnitten mit Hilfe von Antikörpern. Durch die spezifische Antikörperbindung an das Zielprotein kann dessen Vorkommen und die zelluläre Verteilung in einem bestimmten Gewebe untersucht werden. Dies kann direkt mittels Farbstoff-konjugierter Antikörper oder indirekt durch Farbreaktionen erfolgen.

Hier sollte an koronaren Paraffinschnitten das Expressionsmuster der cGKII im Gehirn der Maus untersucht werden.

1) Paraffinschnitte

Zunächst fand die Gewebefixierung mit Formaldehyd (FA) statt, bei der wie folgt vorgegangen wurde:

- Nach tiefer Anästhesie der Tiere mit Diethylether wurden sie transkardial über die linke Herzkammer ca. 10 min. mit 4 % FA/PBS perfundiert.
- Gehirnentnahme und Nachfixierung für 4 h in 4 % FA/PBS auf dem Schüttler bei Raumtemperatur (RT)
- 3 x 1 h waschen mit PBS
- Gewebedehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe bei RT auf dem Schüttler:
 - EtOH 50 % 1 h

- EtOH 60 % 1 h
 - EtOH 70 % 1 h
 - EtOH 80 % 1 h
 - EtOH 90 % 1 h
 - 2 x EtOH 100 % 30 min.
 - 1 x EtOH 50 %/Toluol 50 % 30 min.
 - 2 x Toluol 100 % 30 min.
 - Geschmolzenes Paraffin I, II und III (Paraplast X-tra, Sigma) für mindestens 1 h oder über Nacht bei 60°C
- Einbettung des Gewebes in Paraffin in eine Gießform und erstarren lassen
 - Anfertigen von koronaren Gewebeschnitten (10 µm) mit einem Microtom (Microm HM 335 E) und Aufziehen der Schnitte auf polylysinierte Objektträger (Menzel)
 - Trocknen der Schnitte bei RT für 1 Tag

PBS, pH 7,4	Einsatz	Endkonzentration
NaCl	8 g	135 mM
KCl	0,2 g	3 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	1,44 g	8 mM
KH ₂ PO ₄	0,24 g	2 mM
H ₂ O	ad 1000 ml	

Tab. 2.7: PBS, pH 7,4

Fixierlösung 4 % FA/PBS	Einsatz	Endkonzentration
Formalin 37 % (Carl Roth)	10,8 ml	4 %
PBS	Ad 100 ml	

Tab. 2.8: Fixierlösung

2) Immunhistochemische Färbung

Um das Expressionsmuster der cGKII in der Amygdala zu untersuchen, wurden für die Färbung nur Koronarschnitte aus der Schnittebene ausgewählt, auf welchen die Amygdala gut zu erkennen war. Zur Orientierung diente eine Nissl-Färbung eines Parallelschnittes und der Vergleich mit Nissl-Färbungen aus dem Atlas „*The Mouse Brain*“ von Paxinos und Franklin (2004, Elsevier).

Bevor man einen Paraffinschnitt färben kann, muss dieser zunächst entparaffinisiert und rehydriert werden. Dies wurde mit Toluol und einer absteigenden Alkoholreihe durchgeführt. Im Anschluss daran wurde ein hitzeinduziertes *Antigen-Retrieval* durchgeführt. Durch diese Hitzebehandlung werden die Vernetzungen, die bei der Polymerisation des FA entstanden sind, teilweise wieder aufgebrochen. Dadurch wird das Epitop freigelegt, welches der Antikörper erkennt. Auf diese Weise konnte die Immunfärbung mit dem cGKII-Antikörper intensiviert werden. Danach folgten die Blockierung der unspezifischen Bindestellen mit Serum und die Inkubation mit dem Primärantikörper, welcher gegen das Zielprotein gerichtet ist. Zur Detektion des Primärantikörpers wurde die ABC-Methode („*avidin-biotin-complex*“, Vectastatin ABC AP-kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) gewählt. Diese beruht auf der hohen Affinität der beiden Proteine Avidin und Biotin. Diese indirekte Nachweismethode erfolgte in drei Schritten. Als erstes wurde ein sekundärer anti-rabbit Antikörper hinzugegeben, welcher gegen den primären Antikörper gerichtet ist und biotinylierte Stellen besitzt. Danach wurde ein Komplex aus Avidin und Biotin-konjugiertem Enzym, hier alkalische Phosphatase, hinzugegeben, welcher an die freien biotinylierten Stellen des sekundären Antikörpers binden kann. Letztendlich wurde durch die enzymatische Umsetzung eines zugegebenen Substrats der alkalischen Phosphatase eine Farbreaktion hervorgerufen.

Gefärbte Paraffinschnitte wurden unter dem Mikroskop (Zeiss, Axioskop) betrachtet und mit einer digitalen Kamera (Nikon, DX1) fotografiert.

Protokoll:

- Entparaffinisieren:

Toluol I:	10 min.
Toluol II:	10 min.
EtOH 100 % I:	5 min.
EtOH 100 % II:	5 min.
EtOH 90 %:	5 min.
EtOH 70 %:	5 min.
EtOH 50 %:	5 min.
PBS:	5 min.

- Antigen Retrieval:

Inkubation in Antigen Retrieval-Puffer	15 min. bei RT
3 x 3 min. aufkochen in der Mikrowelle, in demselben Puffer abkühlen bis RT	
3 x 10 min. waschen mit PBS	

- Blocken: 1 h Inkubation mit 2 % Normal Goat Serum (NGS, Vector Laboratories)/PBS
- Inkubation mit Primärantikörper (in 2 % NGS/PBS) ü. N. bei 4°C
- 3 x 10 min. waschen mit PBS
- Inkubation mit biotinyliertem goat anti-rabbit Sekundärantikörper 1:200 in 1 % NGS/PBS für 1 h
- 3 x 10 min. waschen mit PBS
- Inkubation mit ABC-Komplex 45 min. bei RT (30 min. Vorinkubation der Komponente A 1:100 und Komponente B 1:100 in PBS, lichtgeschützt), ab jetzt alle Schritte lichtgeschützt durchführen
- 3 x 10 min. waschen mit PBS
- Zugabe des Substrats bis zum Erreichen der gewünschten Farbintensität
- 3 x 5 min. waschen mit PBS
- Eindeckeln mit Aquatex (Merck, Darmstadt)

Antigen-Retrieval-Puffer pH 6,0	Einsatz	Endkonzentration
Trinatriumcitrat-Dihydrat	2,94 g	10 mM
Tween 20	0,5 ml	0,05 %
H ₂ O	ad 1000 ml	auf pH 6,0 einstellen

Tab. 2.9: Antigen-Retrieval-Puffer pH 6,0

3) Nissl-Färbung

Die Nissl-Färbung ist eine gut geeignete Technik zur Darstellung von Nervengewebe. Das Gewebe wird mit Cresylviolett behandelt, welches an basophile Strukturen bindet. So werden bei der Nissl-Färbung alle Strukturen, die DNS und RNS enthalten wie Zellkern, endoplasmatisches Retikulum oder Mitochondrien, blau gefärbt. Da sich diese Organellen nur im Zellkörper der Neuronen befinden, wird selektiv nur dieser gefärbt. Damit lassen sich histologische Strukturen sichtbar machen.

Protokoll:

- Entparaffinisieren (siehe oben)
- Letzter Schritt der absteigenden Alkoholreihe mit H₂O statt PBS
- 2 min. in 1 % Cresylviolett-Lösung tauchen

- Kurz schwenken in H₂O
- Kurz in 70 % EtOH tauchen
- Kurz spülen mit 90 % EtOH, dann 100 % EtOH
- 2 min. in 100 % Toluol
- Eindeckeln mit DePeX-Harz (Serva)

2.3 Western Blots

1) Probengewinnung

Für die Western Blot Analysen wurde Gehirngewebe von cGKII knock-outs und Kontrolltieren verwendet. Die Tiere wurden mit Diethylether anästhesiert und enthauptet. Das Gehirn wurde entnommen und Schnitte angefertigt (siehe Punkt 2.4). Danach wurde aus den Schnitten, welche Bereiche der Amygdala enthielten, die Region der Amygdala mit Hilfe eines feinen Skalpells unter einem Mikroskop ausgeschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das gefrorene Gewebe wurde mit Hilfe einer Fast-Prep24-Maschine (MP Biomedicals, Solon, OH) in Lysispuffer homogenisiert. Das Lysat wurde 10 min. bei 95°C erhitzt und danach 5 min. bei 13.000 x g zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wurde abgenommen und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert. Vor dem Auftragen auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE) wurden die Proben mit einer entsprechenden Menge 6 x SDS-Proben-Puffer versetzt, erneut 10 min. bei 95°C erhitzt und dann nach dem Abkühlen in die Taschen des Gels gefüllt.

Lysis-Puffer, pH 7,4	Stocklösung	Endkonzentration
Tris-HCL, pH 8,0	1 mM	21 mM
SDS	10 %	0,7 %
β-Mercaptoethanol	-	1,7 %
PMSF	100 mM	0,2 mM

Tab. 2.10: Lysis-Puffer, pH 7,4

2) Auftrennung

Mit der SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) ist es möglich, Proteine nach ihrer Größe im elektrischen Feld aufzutrennen und anschließend zu detektieren. Für die Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht spielt das SDS die entscheidende Rolle. Da SDS die Eigenschaften eines Detergens besitzt, ist es in der Lage, Proteine zu denaturieren, indem es

nicht kovalente Bindungen der Proteine unterbricht und die Quartär- und Tertiärstruktur der Proteine auflöst. Außerdem lagert sich SDS an die Oberfläche der Proteine in einem konstanten Verhältnis (2 Moleküle SDS pro Aminosäure) an, was dazu führt, dass die Proteine eine konstante Ladungsverteilung aufweisen und somit nicht nach ihrer Ladung, sondern nur nach ihrer Masse im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Für die Trennung im Gel ist der Molekularsieb-Effekt verantwortlich, das heißt, dass der Vernetzungsgrad des Polyacrylamid-Gels die Trenneigenschaften des Trenngels beeinflusst. Die Polymerisation erfolgt durch Quervernetzung von Acrylamid und Bisacrylamid zu einem festen Gel mit Hilfe von Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalstarter und Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator. Das SDS-Polyacrylamidgel besteht aus zwei Schichten, einem Sammelgel, in welchem die Proteine focussiert werden, und aus einem Trenngel, in welchem die eigentliche Trennung stattfindet. Daher wurde mit Hilfe einer Gießvorrichtung zunächst das Trenngel gegossen, mit Ethanol bis zur Polymerisation überschichtet und dann mit dem Sammelgel abgeschlossen, in welchem sich die Probenaschen befinden. Nach dem Befüllen der Taschen wurden die Gele in eine Elektrophoresekammer gespannt, mit SDS-Laufpuffer gefüllt und eine Spannung angelegt. Zum Durchlaufen der Proben im Sammelgel wurde eine Spannung von 100 Volt verwendet, zum Auftrennen der Proben im Trenngel eine Spannung von 150 Volt.

4 xTris-HCl/SDS, pH 6,8	
Tris	6 g
SDS	0,4 g
Ad 100 ml H ₂ O, pH 6,8 einstellen, steril filtrieren	

Tab. 2.11: 4 x Tris-HCl/SDS, pH 6,8

4 xTris-HCl/SDS, pH 8,8	
Tris	18,2 g
SDS	0,4 g
Ad 100 ml H ₂ O, pH 8,8 einstellen, steril filtrieren	

Tab. 2.12: 4 x Tris-HCl/SDS pH 8,8

Trenngel 10 %	
30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid (Rothiphorese® Gel30, Carl Roth)	5 ml
4 x Tris-HCl/SDS, pH 8,8	3,75 ml
H ₂ O	6,25 ml
Ammoniumpersulfat (APS) 10 %	50 µl
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	10 µl

Tab. 2.13: Polyacrylamid-Trenngel 10%

Sammelgel	
30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid	0,65 ml
4 x Tris-HCl/SDS, pH 6,8	1,25 ml
H ₂ O	3,05 ml
Ammoniumpersulfat (APS) 10 %	12,5 µl
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	5 µl

Tab. 2.14: Polyacrylamid-Sammelgel

10 x SDS-Elektrophorese-Laufpuffer	
4 x Tris-HCl/SDS, pH 8,3	250 mM
Glycin	1,92 mM
SDS	1 %

Tab. 2.15: 10 x SDS-Elektrophorese-Laufpuffer

6 x SDS-Probenpuffer	
4 x Tris-HCl/SDS, pH 6,8	7 ml
Glycerol	3,6 g
SDS	1 g
1,4 Dithiothreitol (DTT)	0,93 g
Bromphenolblau	1,2 mg

Tab. 2.16: 6 x SDS-Probenpuffer

3) Elektrolot

Nach der Trennung im SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proteine auf ein Trägermaterial, eine Polyvinylidenfluoridmembran (PVDF-Membran) übertragen mit Hilfe des Semi-Dry-Verfahrens

im elektrischen Feld einer Blotting-Apparatur. Die aufgetrennten Proteinbanden bleiben in ihrer Form erhalten und sind so für eine Immunodetektion zugänglich.

Für das Semi-Dry-Verfahren ist folgender Aufbau notwendig:

- Anode
- 4 Lagen Filterpapier, getränkt in Anodenlösung I
- 4 Lagen Filterpapier, getränkt in Anodenlösung II
- PVDF-Membran, in Methanol befeuchtet, getränkt in Anodenlösung II
- SDS-Polyacrylamidgel
- 8 Lagen Filterpapier, getränkt in Kathodenlösung
- Kathode

Nach diesem Schema wurde der Blot luftblasenfrei in einer Blotting-Apparatur aufgebaut und die Proteine 1 h bei 50 μ A pro Gel auf die Membran transferiert.

Blotting-Lösungen	Anodenlösung I pH 10,4	Anodenlösung II pH 10,4	Kathodenlösung pH 7,6
Tris/HCl	300 mM	20 mM	20 mM
Methanol	20 %	20 %	20 %
6-Aminocaprinsäure	-	-	40 mM

Tab. 2.17: Blotting-Lösungen

4) Immundetektion

Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern ist es möglich, Proteine zu identifizieren und sichtbar zu machen. Da das Vorhandensein der cGKII in der Amygdala untersucht wurde, wurde zur Detektion ein anti-cGKII-Antikörper verwendet und als Ladungskontrolle ein anti- β -actin-Antikörper.

Um unspezifische Bindungen des Antikörpers auf der Membran zu verhindern, wurde die Membran in 5 % Milchpulver / 1 x TBST für 1 h inkubiert. Danach wurde die Membran gewaschen (3 x 10 min. mit 1 x TBST) und über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran nach dem Waschen mit dem sekundären Antikörper inkubiert für 1 h bei Raumtemperatur. Da dieser sekundäre Antikörper mit der Meerrettich-Peroxidase (*Horse-radish*, HRP) gekoppelt ist, ist eine Sichtbarmachung mit Hilfe einer Chemilumineszenz-Reaktion möglich. Bei dieser Reaktion wird Luminol in Gegenwart von Wasserstoffperoxid durch die Peroxidase oxidiert und in einen angeregten Zustand versetzt,

welcher nach Auflegen eines Röntgenfilms eine Schwärzung des Films verursacht. Daher wurde nach erneutem Waschen die Membran mit einer ECL (*enhanced chemiluminescent*)-Lösung versetzt, mit Klarsichtfolie abgedeckt und ein Film zur Belichtung aufgelegt. Nach einer Belichtungszeit zwischen 1 und 30 min. wurde der Film in einer Entwicklermaschine (Agfa Curix60) entwickelt.

10 x TBS, pH 8,2	
Tris/HCl	50 mM
NaCl	750 mM
Methanol	20 %

Tab. 2.18: 10 x TBS, pH 8,2

1 x TBST	
10 x TBS, pH 8,2	100 ml
Tween 20	1 ml
H ₂ O	Ad 1000 ml

Tab. 2.19: 1 x TBST

4) Proteinbestimmung

Die BCA (Bicinchoninsäure = *bicinchonone acid*)-Methode ist eine Möglichkeit, die Gesamtkonzentration von Proteinen in einer Lösung zu bestimmen. Die Konzentration kann photometrisch gemessen werden, da es zu einem Farbumschlag von blau zu violett kommt. Die Methode beruht auf der Kombination von zwei aufeinanderfolgenden Reaktionsschritten:

1. Schritt: Biuret-Reaktion: In alkalischer Lösung kommt es in Anwesenheit von Natrium-Kalium-Tartrat zur Bildung eines blaugefärbten Chelatkomplexes zwischen zweiwertigen Kupfer (Cu^{2+})-Ionen und den Peptidbindungen innerhalb der Proteine. Die Intensität der Färbung korreliert mit der Anzahl der vorliegenden Peptidbindungen.
2. Schritt: BCA-Reaktion: Zunächst findet eine Reduktion der Cu^{2+} -Ionen zu einwertigen Kupfer (Cu^+)-Ionen statt. Diese Reduktionsreaktion wird durch die Aminosäurereste der Aminosäuren Cystein, Cystin, Tyrosin und Tryptophan, die in den Proteinen enthalten sind, vermittelt. Die entstandenen Cu^+ -Ionen werden dann durch jeweils zwei Moleküle des spezifischen Nachweisreagenzes Bicinchoninsäure komplexiert. Dadurch findet ein violetter Farbumschlag statt. Dann erfolgt die photometrische Konzentrationsbestimmung.

Da die Farbreaktion von der Inkubationsdauer und Temperatur abhängt, ist es notwendig, für jede Proteinbestimmung eine Eichgerade mit einem Standard zu erstellen. Als Proteinstandard wurde eine BSA (*bovine serum albumin*)-Verdünnungsreihe (10, 20, 40, 60, 80, 100 ng/ μ l) verwendet.

Vorgehen:

- Proteinproben 1:100 und 1:200 verdünnen
- Jeweils 50 μ l der verdünnten Proteinproben und der BSA-Standardreihe sowie 50 μ l H₂O als Leerwert vorlegen und 200 μ l des BCA-Reagenzes (Lösung I:Lösung II = 50:1, BC Assay, Interchim) hinzugeben.
- Inkubation für 45 min. bei 60°C
- Extinktion der Proben bei 540 nm photometrisch messen (in 96-well-Platte im Titertek Multiskan® MCC/340)
- Anhand der Extinktionswerte eine Eichgerade erstellen und mit dieser die Proteinkonzentration der Proben berechnen.

2.4 Extrazelluläre Ableitung von Feldpotentialen in der lateralen Amygdala

Die extrazelluläre Ableitung von Feldpotentialen (FP) ist eine vielfach angewandte *in vitro* Methode zur Erfassung neuronaler Erregung. Der Verlauf eines extrazellulären FP spiegelt die Vorgänge an der postsynaptischen Membran wider. Bei einer Erregung von Neuronen kommt es zum Öffnen liganden- und spannungsgesteuerter Ionenkanäle an der postsynaptischen Membran. Durch diesen transmembranalen Ionenstrom kommt es auch im Extrazellularraum zu Potentialdifferenzen. Diese kann man mit der Mikroelektrode ableiten und sie sind ein Maß für die synaptische Übertragung. Bei solchen extrazellulären Messungen werden die Potentiale der postsynaptischen Membran des gesamten Dendritenbaums einer größeren Anzahl von Neuronen erfasst. Daher handelt es sich beim extrazellulären FP um ein Summenpotential, entstanden aus der räumlichen und zeitlichen Überlagerung vieler postsynaptischer Potentiale.

1) Präparation

Es wurden ausschließlich Mäuse im Alter von 4-8 Wochen als Versuchstiere verwendet. Sie alle entstammten der cGKII-Zucht. Nach tiefer Anästhesie der Tiere mit Diethylether wurden sie dekapitiert, das Gehirn rasch entnommen und in eisgekühlte, mit Carbogen (95 % Sauerstoff, 5

% Kohlenstoffdioxid) begaster Nährstofflösung (ACSF: *artificial cerebrospinal fluid*, Zusammensetzung in mM: NaCl 124; KCl 3; KH₂PO₄ 1,25; MgSO₄·7H₂O 2; CaCl₂ 2,5; NaHCO₃ 26; Glucose 10) getaucht. Die akuten koronaren Hirnschnitte wurden mit einem Vibrationsmikrotom (Microm Typ HM 650 V, Walldorf, Deutschland) auch in eisgekühlter ACSF mit einer Schnittdicke von 350 µm angefertigt. Danach wurden die Gehirnschnitte, die Bereiche der Amygdala enthielten, in eine begaste Kammer mit ACSF bei RT überführt. Dort ruhten sie bis Versuchsbeginn 1-2 Stunden.

2) Messung und Aufzeichnung

Für die Messung wurden die Schnitte in eine submerged-Messkammer transferiert. Über ein Temperatur-Kontroll-System (LN Temperatur control system) wurde die Temperatur in der Messkammer bei allen Messungen konstant bei 30°C gehalten und die Messkammer wurde mit begaster, vorgewärmter ACSF mit 10 ml/min. perfundiert. Die Schnitte wurden mit einem harfenähnlichen Netz („Slice anchor kit for RC-22“, SHD-22 KIT, Warner Instruments) beschwert und somit fixiert. Zum Ableiten der Potentiale im Hirnschnitt wurden Glaspipetten aus Borosilikatglas (Länge 10 cm, Außendurchmesser 1 mm, Innendurchmesser 0,78 mm, Bio-Medicals Instruments, Warren, MI, USA) verwendet. Mit Hilfe eines horizontalen Pullers (Flaming/Brown Micropipette Puller, Model p-97, Sutter Instruments, CA, USA) wurden diese zu einem Widerstand von 3-7 Mega-Ohm ausgezogen. Die Ableitelektroden wurden mit ACSF gefüllt, in einen Ag-AgCl Elektrodenhalter (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) gespannt und mit einem Mikromanipulator positioniert. Als Reizelektrode wurde eine bipolare Wolframelektrode (TM53CCINS, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) verwendet. Die Reizausgabe erfolgte über einen Stimulus-Isolator (Stimulus Isolator A360, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) mit Strom-konstanter Reizausgabe. Die räumliche Anordnung der Elektroden zur Ableitung der FP durch Stimulation des kortikalen Inputs in der einen Messreihe und des thalamischen Inputs in der anderen Messreihe ist in Abb. 2.1 dargestellt.

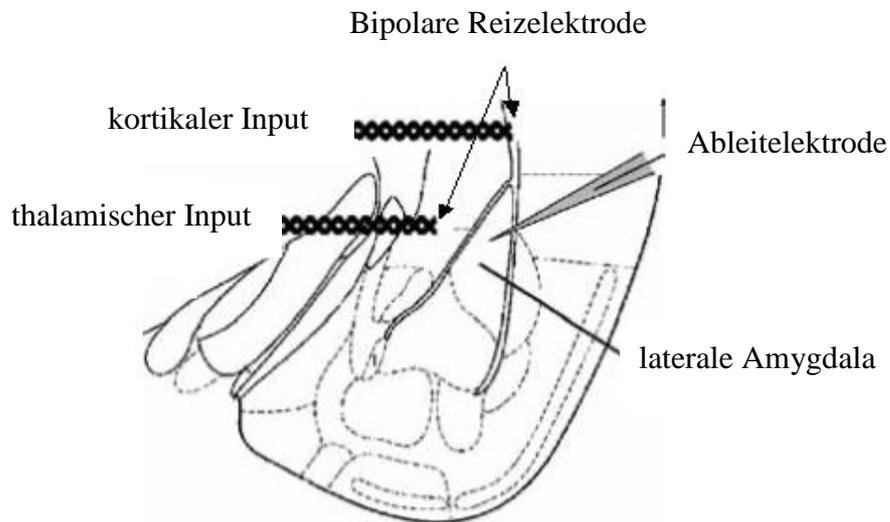


Abb. 2.1: Anordnung der Reiz- und Ableitelektrode bei Feldpotentialmessungen in der lateralen Amygdala

Die Reizelektrode zur Stimulation kortikaler Afferenzen wird oberhalb der LA im Verlauf der Capsula externa (kortikaler Input) platziert. Bei der Stimulation thalamischer Afferenzen zur LA in der zweiten Messreihe wird sie medial der LA im Verlauf der Capsula interna in der sog. „Transit Area“ angeordnet (thalamischer Input). Die Ableitelektrode wird im dorsolateralen Bereich der LA positioniert.

Die an der Ableitelektrode anliegenden Potentiale wurden mittels eines AxoClamp 2B Verstärker (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) erfasst und routinemäßig mit 3 kHz Tiefpass-gefiltert. Anschließend wurden die analogen Signale computergestützt mit Hilfe der PULSE Software (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Deutschland) und eines ITC-16 Interfaces (Instrutech, Port Washington, NY, USA) digitalisiert.

Zu Beginn jeder Messung wurde mit einer IOR (*input-output relation*)-Kurve die maximale Reizantwort ermittelt. Danach wurde die Baseline mit einer Reizstärke von 30-50 % der zuvor ermittelten maximalen Reizantwort aufgezeichnet. Diese Baseline entspricht der basalen synaptischen Übertragung. Die Reizfrequenz betrug 0,066 Hz, d. h. alle 15 Sekunden wurde ein Stromimpuls mit einer Reizdauer von 100 μ s abgegeben. Die Reizstärke betrug bei allen Messungen 30-100 μ A. Nach Aufnahme einer stabilen Baseline für 20 Minuten wurde über die bipolare Reizelektrode bei unveränderter Reizdauer und Reizstärke ein hochfrequenter Tetanus gesetzt (1 Sekunde mit einer Frequenz von 100 Hz). Dieser Tetanus wurde insgesamt 4 mal im Abstand von jeweils 90 Sekunden gegeben (siehe Abb. 2.2). Dieses bei allen Messungen verwendete Reizprotokoll ist ein gängiges zur Induktion einer langanhaltenden Potenzierung der synaptischen Antwort in der Amygdala (Huang and Kandel 1998). Nach Applikation des

Tetanus zum Zeitpunkt 0 wurde die LTP für 60 Minuten aufgezeichnet. Da in der Amygdala die Amplitude des FP die am zuverlässigsten zu bestimmende und besten reproduzierbare Größe darstellt, wurde die prozentuale Änderung von Minute 51-60 nach LTP-Induktion durch den Tetanus im Vergleich zur Baseline angegeben.

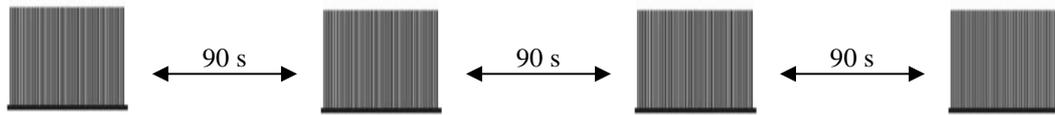


Abb. 2.2: Verwendeter 100 Hz-Tetanus zur Induktion der Langzeitpotenzierung in der LA

Über die bipolare Reizelektrode wurden 100 Pulse mit einer Dauer von jeweils 100 μ s und einer Frequenz von 100 Hz gegeben. Dieser 1 s andauernde Tetanus wurde insgesamt 4 mal mit einem Interstimulusintervall von jeweils 90 s appliziert.

3) Auswertung

Dieses extrazelluläre Feldpotential setzt sich typischerweise aus drei Teilen zusammen:

Der Stimulusartefakt als erste und zugleich größte Komponente stellt eine kurze, biphasische Welle dar, die unmittelbar nach der Reizung auftritt. Sodann folgt in Form einer kleinen negativ orientierten Welle das sogenannte „*fiber volley*“, welches als Ausdruck der Erregung präsynaptischer Fasern angesehen wird. Dem folgt dann als größere negative Welle das eigentliche postsynaptische Potential, welches synaptische Erregungsabläufe und somit die eigentliche synaptische Transmission reflektiert (siehe Abb. 2.3). Dessen Größe lässt sich durch die Reizintensität beeinflussen.

Wie schon oben erwähnt, stellt in der Amygdala die Amplitude des FP die zur Auswertung relevante Größe dar. Zur Bestimmung der Amplitude wurden für die digitalisierten Signale (FP) drei wählbare Fenster bestimmt. Das erste Fenster enthält den maximal positiven Ausschlag nach dem „*fiber volley*“ und vor dem eigentlichen postsynaptischen Potential, das zweite umfasst die gesamte negative Auslenkung des FP und das dritte wiederum die maximale Auslenkung nach oben ins Positive unmittelbar nach dem FP (siehe Abb. 2.3). Aus den Differenzbeträgen dieser drei Fenster (Fenster 1, 2, 3) errechnet sich schließlich die Amplitude des FP. Die Auswertung erfolgte mit der Software Microcal Origin (Origin Lab, Northampton, CA, USA). Hierfür wurden maßgeschneiderte Makros mit der Skriptsprache Labtalk verwendet.

Bei allen Messungen wurde zur ACSF der GABA_A-Rezeptor Blocker Picrotoxin (20 μ M) hinzugegeben, um die durch GABAerge Interneurone in der Amygdala stark ausgeprägte Inhibition zu hemmen. Denn die eben genannten inhibitorischen Interneurone machen ca. 25 %

aller LA-Neurone aus (McDonald and Augustine 1993) und sowohl „*feedforward*“- als auch „*feedback*“-Hemmung durch diese spielen eine wichtige Rolle bei der synaptischen Transmission in der LA (Sigurdsson et al. 2007). Abb. 2.4 zeigt beispielhaft im Zeitverlauf die Entwicklung des FP nach dem Einwaschen von 20 μM Picrotoxin.



Abb. 2.3: Form und Verlauf eines extrazellulär abgeleiteten Feldpotentials (FP)

Zunächst der Reizartefakt, dann die verschiedenen Phasen des Feldpotentials, welches in der lateralen Amygdala abgeleitet wurde. Durch vertikale Linien abgegrenzt die Bereiche, welche zur Ermittlung der mittleren Amplitude des FP in der Auswertung herangezogen wurden. Innerhalb der Fenster 1 und 3 wurde jeweils der maximale, innerhalb Fenster 2 der minimale Wert verwendet.

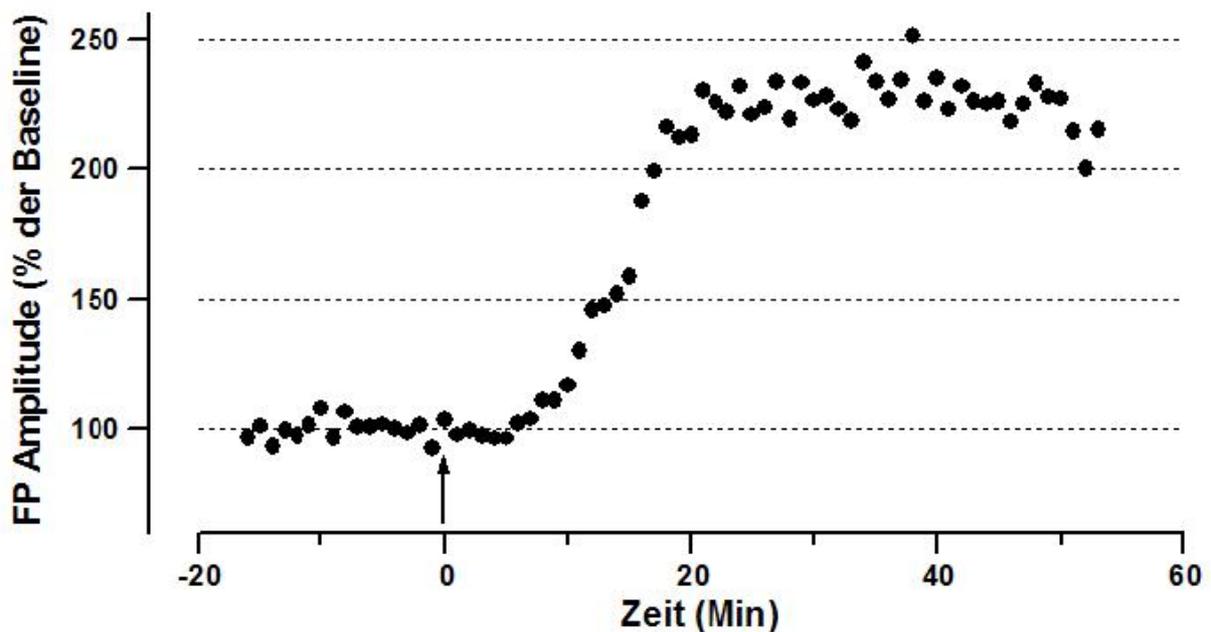


Abb. 2.4: Beispielhafter Anstieg des Feldpotentials nach Einwaschen von Picrotoxin (20 μM)

Zum Zeitpunkt 0 Minuten (\uparrow) wurden 20 μM Picrotoxin (in ACSF) dem Gehirnschnitt perfundiert. Das Feldpotential in der lateralen Amygdala hat sich daraufhin mehr als verdoppelt.

2.5 Verhaltenstests

Verhaltenstests wurden sowohl an Wildtypmäusen des Stammes C57BL/6J als auch an Mäusen der cGKII-Zucht (cGKII^{-/-} und gematchte cGKII^{+/+}) durchgeführt. Alle Versuchstiere waren männliche, 10-16 Wochen alte Geschwistertiere. Sie wurden einzeln in Käfigen mit Futter und Wasser *ad libitum* gehalten und 2 Wochen vor Versuchsbeginn in einen inversen Tag-Nacht-Rhythmus gesetzt. Alle Versuche wurden in der Dunkelphase, d. h. in der aktiven Phase der Tiere durchgeführt.

Es wurden zum einen Konditionierungsversuche („*Fear Conditioning*“ = FC), zum anderen Versuche zur Grundcharakterisierung bei den Mäusen der cGKII-Zucht gemacht.

2.5.1 Konditionierung

2.5.1.1 Klassische Angstkonditionierung

Die Bedeutung dieser Form des Verhaltenstests sowie der prinzipielle Ablauf wurden bereits eingehend in der Einleitung (siehe Punkt 1.2) beschrieben.

Zur Durchführung der Versuche waren folgende Bestandteile notwendig: ein Fear Conditioning System (TSE Systems, Bad Homburg), bestehend aus einer schallisolierten C-fear-Box mit Lautsprecher und Licht, in dem die Konditionierung der Versuchstiere stattfand, sowie einer C-fear-Steuerungseinheit, mit der die Versuchsparameter wie Licht, Ton und die Spannung des applizierten Fußschocks geregelt werden konnten, ein Personal Computer (Sony), auf dem die Testsitzung mit dem jeweiligen Versuchsprotokoll gestartet wurde, eine CCD B/W Kamera (Eneo), mit deren Hilfe sämtliche Bewegungen der Maus während der gesamten Testung aufgezeichnet wurden, ein Super Drive Video Recording System (Panasonic) mit Bildschirm, durch das die Maus während des Versuchs beobachtet werden konnte und ihre Performance für die spätere Auswertung auf Videokassette festgehalten werden konnte. Zur Veranschaulichung der schematische Versuchsaufbau in Abb. 2.5.

In allen Versuchen wurden stets zwei verschiedene Kontext-Konstellationen (Kontext A und B) verwendet, welche sich in der räumlichen Konfiguration, der Lichtintensität sowie dem Geruch (verschiedene Reinigungsmittel) unterschieden.

Kontext A:

- Box: transparenter quadratischer Plexiglaskörper (22 x 22 cm)
- Lichtintensität: 2,5
- Boden: Metallgitter, kein Streu

- Reinigungsmittel: Ethanol (70 %)

Kontext B:

- Box: dunkler, nicht transparenter Plastikzylinder
- Lichtintensität: 5,0
- Boden: weiße Hartplastikplatte mit Streu bedeckt
- Reinigungsmittel: Essigsäure (1 %)

Der den Mäusen eingespielte Ton besaß einen Schalldruckpegel von 80 dB (Sinus 4 auf der Steuerungseinheit) und eine Frequenz von 9 kHz (70 auf der Steuerungseinheit). Die Stromstärke des Fußschocks während der Konditionierung betrug 0,7 mA.

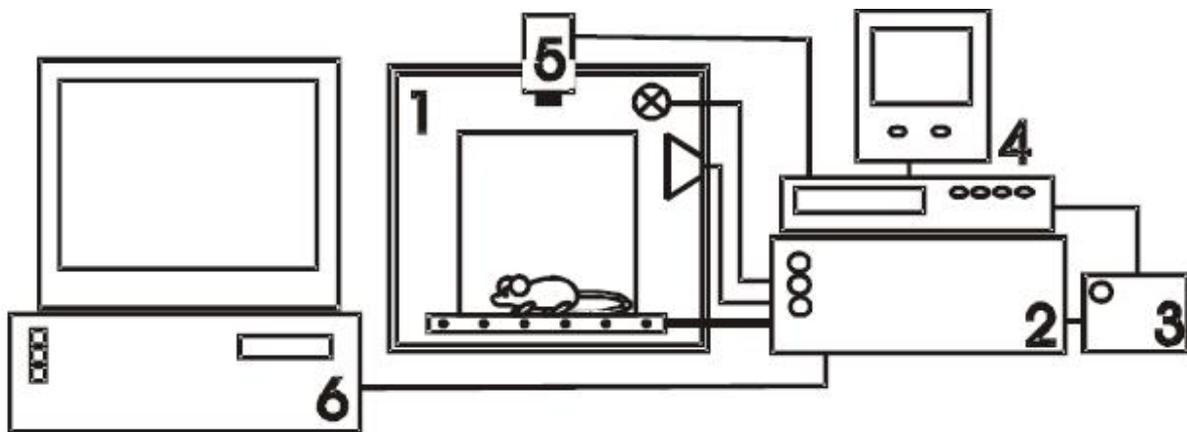


Abb. 2.5: Versuchsaufbau bei den Konditionierungsversuchen

- 1: C-fear-box mit Licht und Lautsprecher
- 2: C-fear-Steuerungseinheit: Licht, Ton und Spannungssteuerung
- 3: C-fear-Steuerungseinheit: Steuerung des Videorecorders
- 4: Videorecorder mit Bildschirm
- 5: CCD Kamera
- 6: Personal Computer

(Abbildung zur Verfügung gestellt von Carl Christel)

Versuchsablauf (siehe Tab. 2.20): Erst unmittelbar vor Beginn des Versuches wurden die Tiere, jedes einzeln der Reihe nach, in den abgedunkelten und geräuscharmen Versuchsraum gebracht und sogleich in die schallisolierte Versuchskammer übersetzt. Zwischen jeder Einzelmessung wurde die C-fear-Box mit dem für den jeweiligen Kontext vorgesehenen Putzmittel (Ethanol oder Essigsäure) gereinigt. Um mögliche Störfaktoren durch konditionierende Reize aus der Umgebung so gering als möglich zu halten, wurde strengstens darauf geachtet, dass die Tiere keine überflüssig langen Zeiten im Versuchsraum verbrachten. Außerdem wurden sie allesamt

mit Handschuhen angefasst, welche mit dem für den Kontext verwendeten Reinigungsmittel benetzt waren. Auf diese Weise wurde versucht, bei der Handhabung den Einfluss von Geruchsfaktoren zu minimieren.

Für die Konditionierungsversuche kamen zwei verschiedene Protokolle zur Anwendung.

An Tag 0 fand die Konditionierung statt. Nach einer Explorationsphase von 3 Minuten, in welcher die Versuchstiere den Kontext kennenlernen konnten, erfolgte anschließend die Tonpräsentation für 30 Sekunden, welche mit einem 2 s-Fußschock abschloss. Nach einer Regenerationsphase von 30 Sekunden wurden die Tiere wieder in ihren Käfig zurückgesetzt. Zur Untersuchung des kontextuellen Gedächtnisses wurden die Tiere wieder dem Kontext A ausgesetzt und ihr Freezing-Verhalten für 3 Minuten beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde das auditorische Angstgedächtnis in dem neutralen Kontext B getestet. Nach 3-minütiger Gewöhnungszeit erfolgte die Präsentation des konditionierten Tons für 3 Minuten. Währenddessen wurde das *freezing* der Tiere beobachtet.

Abhängig vom Protokoll wurde das Lernverhalten der Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht, d. h. die Zeitintervalle zwischen der Konditionierung und den Testphasen waren unterschiedlich (siehe Tab. 2.20). So wurde in Protokoll 1, welches sowohl an einer Gruppe von C57BL/6J Wildtypmäusen als auch an Mäusen der cGKII-Zucht durchgeführt wurde, das auditorische Angstlernen an Tag 1 und 7 nach der Konditionierung untersucht. Damit kann das Langzeitgedächtnis (Tag 1) und die Gedächtniskonsolidierung (Tag 7) getestet werden. Mit Protokoll 2 sollte der zeitliche Verlauf der Gedächtnisbildung beim FC näher beleuchtet werden. So wurde zusätzlich schon nach 2 h und 4 h das auditorische Angstgedächtnis abgefragt (siehe Tab. 2.20). So konnte auch das Kurzzeitgedächtnis untersucht werden. Bei diesem Protokoll wurde auf die Testung des kontextuellen Angstgedächtnisses verzichtet. Durchgeführt wurde das Protokoll an einer Gruppe Wildtypmäuse des Stammes C57BL/6J. Generell war bei den Konditionierungsversuchen das Hauptaugenmerk auf die wesentlich von der Amygdala abhängige Tonassoziation gerichtet, die maßgeblich durch den Hippocampus beeinflusste Kontextpräsentation war zweitrangig.

Während des gesamten Versuchs wurde das Verhalten der Mäuse mit einer in der C-fear-Box integrierten CCD-Kamera aufgezeichnet. Das dadurch gewonnene Videomaterial wurde schließlich mit Hilfe des Softwareprogramms *Winrat* (freundlicherweise von Carsten Wotjak, MPI für Psychiatrie, München, zur Verfügung gestellt) manuell ausgewertet. Analysiert wurde das *freezing* der Mäuse, jene Zeit, in der die Mäuse absolut ohne Regung erstarrt waren. Denn das Freezing-Verhalten gilt als anerkannter Marker für Angstverhalten bei Nagetieren,

insbesondere den Mäusen (siehe Punkt 1.2). Nicht als Bewegung gewertet wurden Atembewegungen.

Phase	Ablauf	Protokoll
Konditionierung	180 s Pause (prä-kond.) 28 s Ton 2 s Ton + Fußschock 30 s Pause	gleich für Protokoll 1 und 2
Test: auditorisch	180 s Pause 180 s konditionierter Ton im neutralen Kontext B	Protokoll 1: an Tag 1 und 7 Protokoll 2 : zusätzlich nach 2 h und 4 h
Test : kontextuell	180 s im konditionierten Kontext A	nur bei Protokoll 1

Tab. 2.20: Phasen der Angstkonditionierung („Fear Conditioning“ = FC)

Ablauf der verschiedenen Phasen der Konditionierung und der Testphasen für die beiden Protokolle 1 und 2. Eine genaue Beschreibung der Parameter Ton und Kontext A und B oben im Text 2.5.1.1.

2.5.1.2 Sensitisierung

Die Sensitisierung dient dazu, die Anteile der *nicht-assoziativen* Angst nach einer Fußschock-Applikation quantitativ zu bestimmen. Das *freezing* nach der zeitlichen Paarung eines Tons (konditionierter Stimulus = CS⁺) mit einem Fußschock (unkonditionierter Stimulus = US) kann als Parameter für die Assoziationsstärke der beiden Stimuli verwendet werden. Laut Kamprath and Wotjak (2004) wird das Ausmaß dieser Angstreaktion jedoch durch mindestens drei verschiedene neuronale Komponenten bestimmt. So löst einerseits der Ton alleine bei den Tieren schon reflexartig eine Angstreaktion auf direktem Wege aus. Andererseits bewirkt der Fußschock per se eine *nicht-assoziative* Komponente, die sich in Zukunft generell auf das Verhalten des Versuchstieres auswirken wird. Man bezeichnet Tiere, die einen Fußschock erhalten haben, als sensitisierte Tiere. Als Folge dieser Sensitisierung zeigen die Tiere ein allgemein erhöhtes Angstverhalten in basalen Verhaltenstests wie dem *Open Field*. Die dritte Komponente ist diejenige, welcher bei der Angstkonditionierung unser Hauptaugenmerk gilt, nämlich die *assoziative* Komponente. Mit Hilfe dieser kann der stattfindende Lernprozess nach dem FC qualitativ und quantitativ bestimmt werden. Alle drei Komponenten haben Einfluss auf das Verhalten des Tieres.

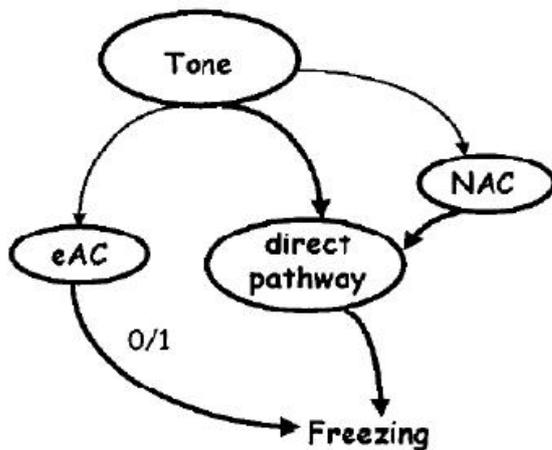


Abb. 2.6: Modell der 2-Komponenten-Theorie bei der Angstkonditionierung

Dargestellt die verschiedenen Komponenten mit Einfluss auf das *freezing* eines konditionierten Tieres. Der Ton an sich löst reflexartig *freezing* aus („*direct pathway*“). Durch den Fußschock entstehen zusätzlich *nicht-assoziative* Anteile (NAC). Als dritte Komponente die Assoziation zwischen Ton und Fußschock (*eAC* = *excitatory associative component*). (Kamprath and Wotjak 2004)

Zur Untersuchung des Anteils der *nicht-assoziativen* Komponente beim *freezing* wurden 2 verschiedene, sog. Sensitierungsprotokolle, an Wildtypmäusen der Linie C57BL/6J durchgeführt. Beim Protokoll 1 wurde den Versuchstieren in Kontext A ein Fußschock ohne die Präsentation eines Tons appliziert. Tags darauf wurde das Freezing-Verhalten der Tiere während der Tonpräsentation im neutralen Kontext B bestimmt. Vergleichend dazu wurde bei den Tieren das kontextuelle Angstgedächtnis ausgewertet (siehe Tab. 2.21).

Phase	Ablauf	Parameter
Sensitisierung mit Fußschock	180 s Pause 2 s Fußschock (0,7 mA)	an Tag 0, Kontext A
Test <i>nicht-assoziativer</i> Anteil	180 s Pause 180 s Ton	an Tag 1, nicht kond. Kontext B
Test: kontextuelle Angst	180 s Pause	an Tag 1, kond. Kontext A

Tab. 2.21: Sensitierungsprotokoll 1

Alleinige Fußschockapplikation an Tag 0 ohne Tonpräsentation. An Tag 1 wurde *freezing* auf einen Ton in nicht konditioniertem Kontext geprüft. Vergleichend dazu wurde ebenfalls an Tag 1 das kontextuelle Angstgedächtnis getestet.

In Anlehnung an dieses Protokoll und die Experimente von Shaban et al. (2006) wurde ein weiteres Protokoll angewendet, um den Anteil des *nicht-assoziativen* Freezing-Anteils bei der Angstkonditionierung zu ermitteln. Es wurde ebenfalls an einer Gruppe Wildtypmäuse mit C57BL/6J-Hintergrund durchgeführt. Grundlage dieses Protokolls war die Präsentation zweier in der Frequenz unterschiedlicher Töne, eines nicht konditionierten (CS^-), der nicht mit einem Fußschock kombiniert war, sowie eines konditionierten (CS^+) in Kombination mit einem zeitlich überlappenden Fußschock (siehe Tab. 2.22). An Tag 0 wurde der CS^- (Frequenz 2,5 kHz; 80 dB)

den Versuchstieren 3 mal im Abstand von 45 min. in Kontext A präsentiert. Der CS⁺ (Frequenz 9,0 kHz; 80 dB) wurde den Mäusen hingegen 1 mal dargeboten und dabei mit einem Fußschock (0,7 mA) gepaart. An Tag 1 und 7 dann wurde das *freezing* der Mäuse auf die beiden unterschiedlichen Töne (CS⁺, CS⁻) im neutralen Kontext B untersucht. Dafür wurden die Versuchstiere auf zwei gleichstarke Gruppen aufgeteilt. Die eine Gruppe erhielt vormittags den CS⁺ und nachmittags den CS⁻, bei der anderen Gruppe wurde geradewegs umgekehrt verfahren. Dadurch sollte verhindert werden, dass die Freezing-Reaktion der Mäuse durch den kürzeren Zeitabstand zu einem der beiden Töne beeinflusst werden könnte oder der an den Testtagen jeweils zuerst präsentierte Ton die Reaktion auf den später dargebotenen einseitig beeinflussen könnte.

Aufzeichnung und Auswertung der Daten erfolgte bei diesen beiden Sensitiserungsversuchen auf dieselbe Weise wie bei den Konditionierungsversuchen.

Phase	Ablauf	Parameter
Sensitisierung (Ton ohne Fußschock)	180 s Pause 30 s Ton (2,5 kHz; 80 dB)	an Tag 0, Kontext A, 3 mal im Abstand von 45 min.
Konditionierung	180 s Pause 28 s Ton (9,0 kHz; 80 dB) 2 s Ton + Fußschock (0,7 mA)	an Tag 0, Kontext A, 1 mal
Test: auditorisch	180 s Pause 180 s kond. Ton (9,0 kHz)	an Tag 1 und 7, Kontext B
Test: Sensitisierung	180 s Pause 180 s nicht kond. Ton (2,5 kHz)	an Tag 1 und 7, Kontext B

Tab. 2.22: Sensitiserungsprotokoll 2

Getestet wurde Sensitisierung auf nicht konditionierten Ton (CS⁻) im Vergleich zum auditorischen Angstlernen auf konditionierten Ton (CS⁺). An Tag 0 3-malige Applikation von CS⁻ (jeweils Kontext A, Abstand 45 min.) und 1-malige Applikation von CS⁺ (auch Kontext A). An Tag 1 und 7 Test der Freezing-Rate bei Präsentation von CS⁻ (Sensitisierung) im Vergleich zur Freezing-Rate beim Test des auditorischen Angstgedächtnisses (Präsentation von CS⁺).

2.5.2 Grundcharakterisierung

Zur Charakterisierung grundlegender Verhaltensweisen wurde an Mäusen der cGKII-Zucht der Open Field-Test durchgeführt und die Schmerzschwelle nach Applikation eines Fußschocks bestimmt. Dadurch sollte ausgeschlossen werden, evtl. auffällige Befunde in den

Konditionierungsversuchen bei den cGKII-KO-Tieren falsch zu deuten. Denn diese Unterschiede könnten an Unterschieden im Grundverhalten der Knock-outs liegen und somit wären sie nicht spezifisch für die Konditionierungsversuche. Zum Beispiel könnte ein erhöhtes generelles Angstlevel zu einer Zunahme im *freezing* führen, ohne spezifischer Ausdruck der Assoziationsstärke zu sein. Auch Unterschiede in der Schmerzschwelle könnten einen solchen Effekt haben.

2.5.2.1 Open Field

Mit diesem Test wird das explorative Verhalten der Versuchstiere in einer unbekanntem Umgebung untersucht. Solch eine Situation führt bei den Tieren zu dem inneren Konflikt, sich entweder in eine sichere Ecke zurückzuziehen oder sich einem Risiko auszusetzen und die neue Umgebung zu erkunden. Somit sind durch das Verhalten eines Tieres in neuer Umgebung Aufschlüsse über das generelle Angstlevel zu erzielen. Die Analyse wurde ebenfalls mittels der TSE-Apparatur durchgeführt. Das *Open Field* bestand aus einer quadratischen Plexiglasbox und einem glatten Kunststoffboden. In der Versuchsdauer von 10 Minuten, welche zur Auswertung des Zeitverlaufs jeweils in Intervalle von je 2 Minuten aufgeteilt wurde, konnten die Tiere die neue Umgebung im Dunkeln erkunden. Dabei wurde durch Infrarotsensoren, welche die Box umgaben, jede Bewegung der Tiere erfasst. Anhand der gesammelten Daten konnten mit Hilfe der TSE-Software verschiedene Parameter wie Aktivität, zurückgelegte Wegstrecke, mittlere Geschwindigkeit und die „*Rearings*“ (Aufrichten der Tiere) berechnet werden. Zusätzlich wurde die Thigmotaxis ausgewertet. Per definitionem handelt es sich dabei um Orientierungsbewegungen der Tiere aufgrund von Berührungsreizen, im speziellen Fall hier um Berührungen mit der Wand des *Open Field*. Für die Auswertung wurde das gesamte *Open Field* (22 x 22 cm) in eine Innenzone (11 x 11 cm) und eine Randzone (Breite 5,5 cm) unterteilt und die Aufenthaltsdauer in den einzelnen Bereichen berechnet. Als Größe für generelles Angstverhalten diente die Aufenthaltsdauer im Randbereich (Thigmotaxis).

2.5.2.2 Schmerzschwelle

Dabei sollte die Schmerzschwelle der Versuchstiere für einen elektrischen Fußschock bestimmt werden. Da die Tiere zur Angstkonditionierung einen Fußschock erhalten, muss ein Unterschied im akuten Schmerzempfinden für die beiden Genotypen (cGKII+/+, cGKII-/-) ausgeschlossen werden. Denn laut Kamprath and Wotjak (2004) bestimmt die Intensität des Fußschocks das *freezing* der Tiere quantitativ, d. h. eine Gleichheit in der Schmerzschwelle für beide Genotypen ist essentiell für eine korrekte Konditionierung.

Zur Bestimmung der Schmerzschwelle wurde der Konditionierungskontext A mit dem Metallgitterboden verwendet. Nach einer Gewöhnungsphase von 3 Minuten wurden den Mäusen Fußschocks mit steigender Intensität verabreicht. Nach jedem Fußschock gab es eine Pause von 30 Sekunden. Es wurde mit 0,1 mA begonnen und die Reizstärke sukzessive um 0,1 mA gesteigert, bis die Tiere eine Schmerzreaktion zeigten. Als solche wurden *jumping* (Springen oder Zusammenzucken) oder *vocalizing* (helle, quiekende Laute) gewertet.

2.6 Statistische Auswertung

Alle erhobenen Daten wurden als Mittelwerte \pm SEM (*standard error of the mean* = Standardfehler des Mittelwerts) dargestellt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem *Students t-Test*. Das Signifikanzniveau wurde wie folgt definiert: $p > 0,05$ nicht signifikant; $p < 0,05$ statistisch signifikant (*); $0,001 < p < 0,01$ statistisch signifikant (**); $p < 0,001$ statistisch hochsignifikant (***)

3 Ergebnisse

3.1 Expression der cGKII im Gehirn

Obwohl es in der Fachliteratur zahlreiche Hinweise auf eine Expression der cGKII in der Amygdala (El-Husseini et al. 1995; 1999; Werner et al. 2004) gibt, sollte dieser Sachverhalt in dieser Arbeit auf Proteinebene nochmals untersucht werden. Denn dies bildet gewissermaßen die Grundlage für eine mögliche Funktion dieses Enzyms bei der Angstkonditionierung, wenn man die in Fachkreisen gültige, zentrale Bedeutung der Amygdala bei der Assoziationsknüpfung von Ton und Schmerzstimulus zur Grundlage nimmt (siehe Punkt 1.2). Gleiches gilt für die LTP-Induktion an den Synapsen zwischen den beiden beim FC aktiven Inputs (thalamischer und kortikaler) und den LA-Neuronen. Zudem wurde in den bisherigen Expressionsstudien zur cGKII die Verteilung der cGKII-mRNA in Form einer *mRNA in situ hybridization* (El-Husseini et al. 1995; 1999; Werner et al. 2004), nicht aber die Expression des Proteins selbst gezeigt. Diese Fragestellung sollte daher in dieser Arbeit mit Hilfe immunhistologischer Methoden untersucht werden. So wurden einerseits immunhistochemische Färbungen an Gehirnschnitten, andererseits Western Blots an extrahiertem Amygdalagewebe durchgeführt. Für beide Versuche wurde derselbe cGKII-Antikörper verwendet (siehe Punkte 2.2 und 6.4).

3.1.1 Immunhistochemischer Nachweis

Die immunhistochemische Färbung mit dem cGKII-Antikörper zeigte allgemein eine weit verteilte Expression der cGKII in vielen Hirnregionen (Abb. 3.1A). Besonders stark exprimiert war die cGKII in der Großhirnrinde, im Hippocampus, Striatum und vor allem in hypothalamischen und thalamischen Kerngebieten. Auch im Übergangsbereich der Amygdala zu den thalamischen Regionen („*transit area*“ = TA) zeigte sich eine deutliche Expression. In der Amygdala selbst war eine moderate Färbung erkennbar. Diese war gleichmäßig in den verschiedenen Subnuclei der Amygdala vorhanden. Diese Befunde decken sich größtenteils mit den Ergebnissen der bisherigen Expressionsstudien zur cGKII (El-Husseini et al. 1995; 1999; Werner et al. 2004). Relevant ist auch die bestätigte Expression der cGKII im Thalamus und der *transit area* (TA), da dort die thalamischen Afferenzen zur LA verlaufen, über welche bei der Angstkonditionierung der CS zur LA eingeht (siehe Punkt 1.2).

Als Negativkontrolle wurde die gleiche Färbemethode an Gehirnschnitten der cGKII-defizienten Mäuse durchgeführt. Dort war keine Färbung feststellbar (Abb. 3.1B). Daraus kann man schlussfolgern, dass es sich bei der Bindung des cGKII-Antikörpers um eine spezifische Bindung des Zielproteins handelt. D. h. die Färbung mit diesem Antikörper zeigte spezifisch das Vorhandensein der cGKII an.

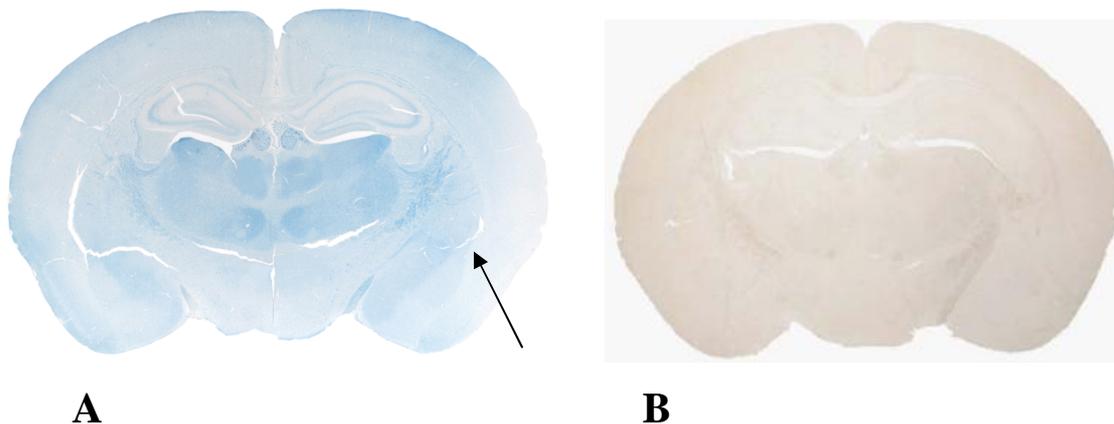


Abb. 3.1: Immunhistochemischer Nachweis der cGKII in der lateralen Amygdala

A: Färbung eines Gehirnschnittes der cGKII-ctr Maus zeigt eine starke Expression der cGKII im Cortex, Hippocampus, Striatum, hypothalamischen und thalamischen Kerngebieten. Ebenfalls eine starke Expression in der *transit area* zwischen Thalamus und der lateralen Amygdala. In der LA selbst eine mäßigstarke Expression (siehe Pfeil).

B: Ein Gehirnschnitt einer cGKII-KO Maus ergibt keine Färbung.

3.1.2 Nachweis mittels Western Blots

Ergänzend dazu wurden auch Western Blots gemacht, um die Expression der cGKII in der Amygdala zu untersuchen. Hierfür wurden Proben aus dem Gewebe der Amygdala (Amy) eingesetzt, welches aus Gehirnschnitten extrahiert wurde. Die Ergebnisse (Abb. 3.2) zeigten, dass im Amygdalagewebe einer Kontrollmaus (WT) die cGKII kräftig exprimiert ist, während sie im cGKII knock-out (II-KO) dort nicht detektierbar ist.

Im Amygdalagewebe der cGKII knock-outs wurde parallel auch die Expression der cGKI-Isoformen untersucht. Denn es könnte zu einer kompensatorischen Hochregulation der cGKI β oder der cGKI α in dieser Mauslinie kommen. Ein solcher Effekt war aber nicht feststellbar (Abb. 3.2).

Umgekehrt zeigte sich im cGKI-knock-out keine kompensatorische Hochregulation der cGKII (Abb. 3.2). Denn die cGKII Bande war in dieser Mauslinie identisch zur cGKII Bande in den Wildtypmäusen. Als Ladungskontrolle diente für diese Experimente β -actin.

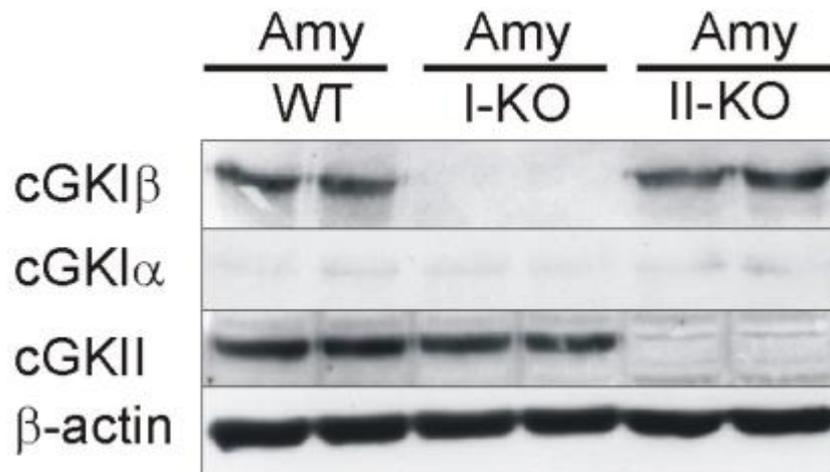


Abb. 3.2: Nachweis der cGKII in der Amygdala mittels Western Blot

Für diese Western Blots wurden ausschließlich Proben aus Amygdala-Gewebe (Amy) verwendet. Es wurde gezeigt, dass die cGKII in der Amygdala sowohl in den Wildtypmäusen (WT) als auch den cGKI-KO Tieren (I-KO) stark exprimiert ist, während in den cGKII-KO Tieren (II-KO), wie erwartet, keine Expression der cGKII in der Amygdala festzustellen war. Zudem konnte demonstriert werden, dass es in den cGKII-KO Tieren im Vergleich zu den Wildtypmäusen zu keiner kompensatorischen Hochregulation der cGKI-Isoformen cGKIβ oder cGKIα kommt. Als Ladungskontrolle diente β-Actin.

3.2 Analyse der synaptischen Übertragung und der Langzeitpotenzierung in der Amygdala bei cGKII-defizienten Mäusen

Nachdem mittels Immunhistochemie und Western Blots eine Expression der cGKII in der lateralen Amygdala bestätigt worden war, sollte nun die funktionelle Rolle der cGKII für die synaptische Übertragung in diesem Bereich geklärt werden. Um diese Frage zu beantworten, wurde zunächst die basale synaptische Transmission als auch die Langzeitpotenzierung in der lateralen Amygdala untersucht. Es wurden beide für die Angstkonditionierung wichtigen afferenten Bahnen (thalamische und kortikale Fasern) zur LA untersucht.

3.2.1 Basischarakteristika der synaptischen Transmission

Das Gehirn cGKII-defizienter Mäuse zeigte keine groben anatomischen Anomalien und auch die Amygdala mit ihren verschiedenen Abschnitten (siehe 1.1) wies keine morphologischen Auffälligkeiten auf. Dennoch ist es notwendig, mögliche generelle Defekte der synaptischen Transmission in der lateralen Amygdala durch die Inaktivierung des Gens für die cGKII auszuschließen. Ein wichtiger Basisparameter der synaptischen Übertragung ist die sogenannte *Input-Output-Relation*, d. h. die Beziehung zwischen der Stärke des präsynaptischen Reizes (*Input*) und der korrespondierenden postsynaptischen Antwort (*Output*). Letztere wurde in allen

hier vorgestellten Untersuchungen anhand der Amplitude des gemessenen Feldpotentials (FP) quantifiziert. Die Abbildung 3.3 macht deutlich, dass die cGKII-KO Mäuse die gleiche IO-Beziehung wie die Kontrolltiere aufwiesen. Sowohl bei der Reizung des kortikalen (Abb. 3.3A) als auch des thalamischen Inputs (Abb. 3.3B) wurden in der untersuchten Reizstärke (20-140 μ A) keine signifikanten Unterschiede der FP-Amplitude zwischen den beiden Genotypen gefunden. Somit können mögliche Unterschiede bei den LTP-Messungen dieser beiden Erregungswege (kortikaler und thalamischer) zwischen den knock-outs und den Wildtypmäusen nicht auf Unterschiede in der basalen synaptischen Übertragung zurückgeführt werden, zumal sich die Reizstärke für diese LTP-Versuche durchweg im Bereich von 30-100 μ A befand.

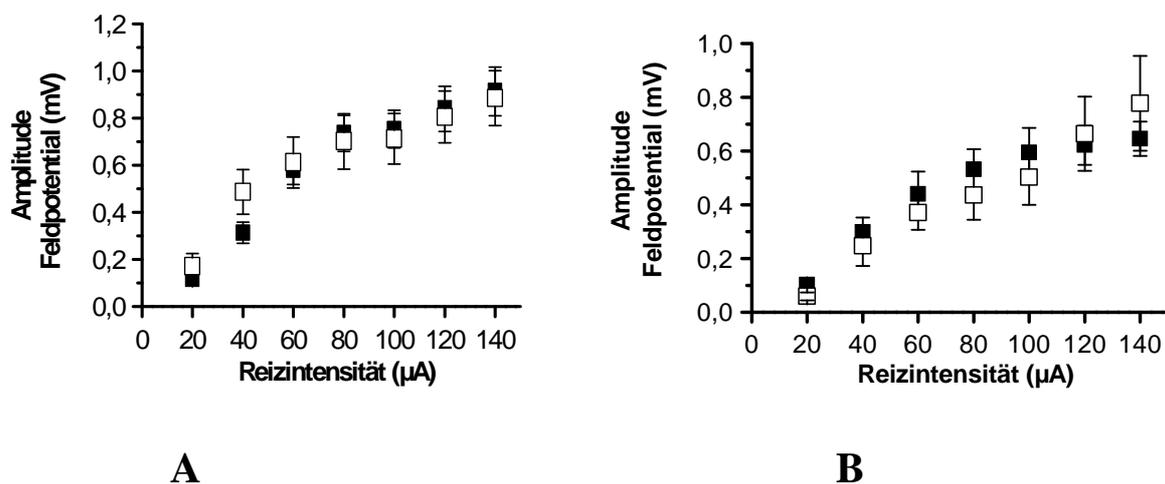


Abb. 3.3: Basale synaptische Transmission in der lateralen Amygdala (LA)

A: IOR-Messung durch Reizung kortikaler Fasern zur LA zeigte keinen Unterschied zwischen cGKII-ctr (schwarz, n = 14 Schnitte, n = 10 Tiere) und cGKII-KO (weiß, n = 12 Schnitte, n = 9 Tiere).

B: IOR-Messung thalamischer Fasern zur LA zeigte ebenfalls keinen Unterschied zwischen cGKII-ctr (schwarz, n = 14 Schnitte, n = 8 Tiere) und cGKII-KO (weiß, n = 10 Schnitte, n = 5 Tiere).

Dargestellt jeweils Mittelwerte \pm SEM.

3.2.2 LTP nach starkem Tetanus des kortikalen Inputs

In der ersten Versuchsserie zur funktionellen Rolle der cGKII bei der synaptischen Plastizität in der Amygdala wurden LTP-Messungen in der lateralen Amygdala nach starker tetanischer Reizung (100 Hz) (siehe Punkt 2.4) der kortikalen Afferenzen durchgeführt. Wie schon in der Einleitung beschrieben, gilt die Messung der LTP nach Applikation eines hochfrequenten elektrischen Reizes als bewährtes *in vitro* Modell zur Induktion synaptischer Veränderungen,

wie man sie, wenn auch stark modifiziert, *in vivo* während Lernvorgängen aufzutreten vermutet. Der kortikale Input zur LA mit Fasern, die sensorischen Kortexarealen entstammen (*auditorischer Kortex TE1*), stellt bekanntermaßen den indirekten Weg der Signalverarbeitung beim FC dar (siehe Punkt 1.2). Dieser bei LTP-Messungen im Mandelkern routinemäßig angewandte Stimulus induzierte in beiden Genotypen (cGKII^{+/+}; cGKII^{-/-}) gleichermaßen eine moderate, aber dennoch signifikante Potenzierung der synaptischen Transmission. Die LTP bei den cGKII-defizienten Mäusen betrug 118.8 ± 4.2 % bei $n = 24$, in den dazugehörigen Kontrolltieren 120.8 ± 2.9 % bei $n = 28$ (Abb. 3.4A). Somit war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen 60 Minuten nach LTP-Induktion feststellbar ($p = 0,70$). Auch unmittelbar nach LTP-Induktion und im gesamten Zeitverlauf zeigte sich keine verminderte LTP bei den cGKII-KO Tieren (Abb. 3.4A).

3.2.3 LTP nach starkem Tetanus des thalamischen Inputs

Ähnlich dazu ergaben sich auch im thalamischen Input, dem direkten Erregungsweg zur LA beim FC (siehe Punkt 1.2), bei den LTP-Messungen keine Unterschiede zwischen den Wildtyp- und den cGKII knock-out Mäusen ($p = 0,78$). Während bei den cGKII^{-/-} Mäusen die Potenzierung 119.0 ± 5.1 % ($n = 12$) betrug, wurde bei den Wildtypmäusen eine LTP von 120.8 ± 2.9 % ($n = 24$) gemessen (Abb. 3.4B). Auch zu Beginn der LTP nach Applikation des Tetanus war kein Unterschied in den beiden Gruppen zu erkennen (Abb. 3.4B).

Zusammenfassend kann man also sagen, dass das Fehlen der cGKII keine Auswirkungen auf die in der lateralen Amygdala *in vitro* gemessene LTP hat. Denn weder im kortikalen noch im thalamischen Input zur LA war bei den cGKII-KO Mäusen eine verminderte LTP feststellbar.

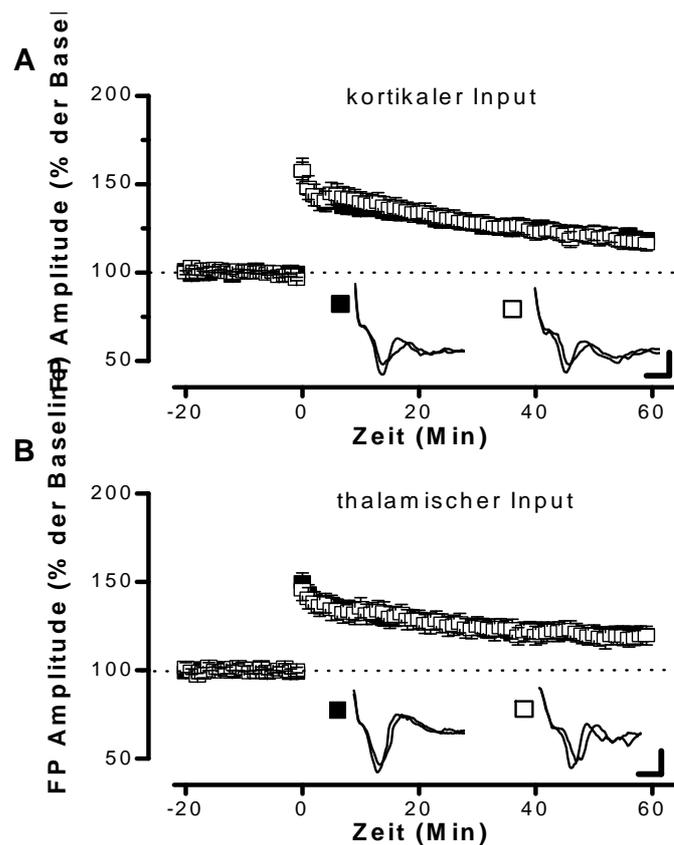


Abb. 3.4: Langzeitpotenzierung in der lateralen Amygdala

A: Induktion der LTP über den kortikalen Input ergab in Hirnschnitten von cGKII-KO Tieren (weiß, n = 24 Schnitte, n = 11 Tiere) und cGKII-ctr Tieren (schwarz, n = 28 Schnitte, n = 17 Tiere) keinen Unterschied.

B: Induktion der LTP über den thalamischen Input ergab in Hirnschnitten von cGKII-KO Tieren (weiß, n = 12 Schnitte, n = 5 Tiere) und cGKII-ctr Tieren (schwarz, n = 24 Schnitte, n = 11 Tiere) ebenfalls keinen Unterschied.

3.3 Angstkonditionierung

3.3.1 Klassische Angstkonditionierung

Die immunhistochemischen Versuche ließen erkennen, dass die cGKII in der lateralen Amygdala exprimiert ist. Eine funktionelle Rolle der cGKII für die LTP *in vitro* konnte mittels Feldpotentialmessungen in der lateralen Amygdala ausgeschlossen werden. Als nächstes sollte die funktionelle Bedeutung der cGKII in der Amygdala *in vivo* untersucht werden. Hierfür wurden verschiedene Verhaltensparadigmen an den knock-out Mäusen getestet. Im Mittelpunkt stand die funktionelle Rolle der cGKII für assoziatives Angstlernen. Deshalb wurde die Angstkonditionierung, eine Form von klassischer Konditionierung nach Pawlow, untersucht.

Das genaue Vorgehen bei der Angstkonditionierung ist in Kapitel 2.5.1 beschrieben. Die Gedächtnisbildung wurde induziert, indem ein harmloser Reiz (Ton) mit einem aversiven (Fußschock) zeitlich gepaart wurde. Um die Stärke der Assoziation zu überprüfen, wurde das

Angstverhalten (*freezing* = Angststarre) bei erneuter Tonpräsentation analysiert. Grundsätzlich können verschiedene Phasen bei der Gedächtnisbildung unterschieden werden, die zeitlich aufeinanderfolgen. Deshalb wurden 2 verschiedene Protokolle angewendet. Protokoll 1 überprüfte das Langzeitgedächtnis bei den Tieren, indem die Assoziation des Tons mit dem Fußschock nach 24 h getestet wurde. Durch einen weiteren Test der Freezing-Reaktion auf den Ton (CS) nach 7 Tagen wurde die Fähigkeit der Konsolidierung des angstvollen Gedächtnisinhalts bei den Tieren untersucht. Darunter versteht man die dauerhafte Festigung des Gedächtnisses.

Mit Protokoll 2 wurde vor allem das Kurzzeitgedächtnis und der Übergang vom Kurzzeit- zum Langzeitgedächtnis untersucht. Es erfolgten hierfür zusätzliche Testungen nach 2 und 4 h.

Protokoll 1: Testung 24 h und 7 Tage nach Konditionierung

Mit diesem Protokoll wurde das Angstlernen der cGKII-KO Mäuse untersucht (siehe Punkt 2.3). Vorher wurde das Protokoll an einer Gruppe von 8 Wildtypmäusen des Stammes C57BL/6J getestet. So sollte sichergestellt werden, dass das Protokoll eine ausreichend starke Assoziation zwischen dem Ton (CS) und dem Fußschock (US) hervorruft. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.5 zusammenfassend dargestellt.

Vor der Konditionierung war das *freezing* mit $0,5 \pm 0,3$ % vernachlässigbar niedrig. Nach der Konditionierung wurde das *freezing* der Tiere in einem neutralen Kontext untersucht. In der Phase ohne Tonpräsentation zeigte sich an beiden Testtagen ein Anstieg im *freezing* auf $26,5 \pm 4,7$ % bzw. $18 \pm 1,2$ %. Dafür war die Sensitisierung der Tiere durch den erhaltenen Fußschock verantwortlich (Kamprath and Wotjak 2004). Die demgegenüber signifikant erhöhte Freezing-Zeit während der Tonpräsentation an beiden Testtagen mit $56,9 \pm 6,9$ % 24 h nach Konditionierung und $55,7 \pm 4$ % 7 Tage danach zeigte, dass die Tiere während der Konditionierung eine Assoziation zwischen dem Ton (CS) und dem Fußschock (US) bildeten. Parallel dazu wurde bei den Versuchstieren auch das kontextuelle Angstgedächtnis getestet, indem die Mäuse sowohl 24 h als auch 7 Tage nach der Konditionierung der Umgebung ausgesetzt wurden, in welcher die Konditionierung stattgefunden hatte. Auch dabei zeigte sich ein Anstieg im *freezing* an beiden Testtagen ($37,6 \pm 4,8$ % bzw. $21,6 \pm 4$ %).

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das Protokoll gut geeignet ist, die von der Amygdala abhängige Tonassoziation bei den konditionierten Versuchstieren zu erfassen. Auch die in anderen Hirnregionen wie basolateraler Amygdala (BLA) und Hippocampus prozessierte Kontextassoziation fand statt, wenngleich diese erwartungsgemäß schwächer ausfiel.

Protokoll 1: C57BL/6J, n = 8, 8-12 Wochen alt

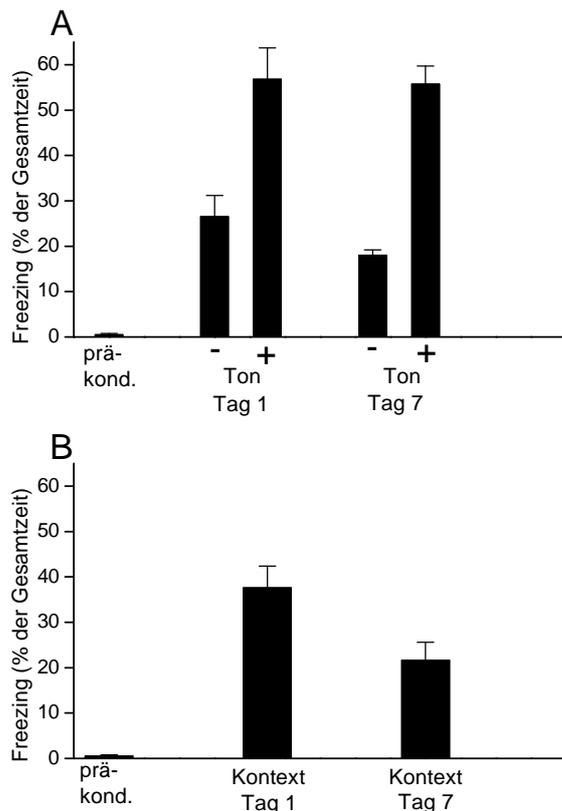


Abb. 3.5: Angstkonditionierung mit Protokoll 1 an Wildtypmäusen (C57BL/6J)

A: Das auditorische Angstgedächtnis in Kontext B wurde 24 h und 7 Tage nach Konditionierung getestet. Signifikanter Anstieg im *freezing* an beiden Tagen bei der Tonpräsentation (+).

B: Das kontextuelle Angstgedächtnis (Kontext A) wurde ebenfalls 24 h und 7 Tage nach Konditionierung getestet. Auch hier signifikanter Anstieg im *freezing* an beiden Tagen. Erwartungsgemäß niedrigere Freezing-Rate als beim auditorischen Angstgedächtnis.

Dargestellt jeweils Mittelwerte \pm SEM.

Mit demselben Protokoll wurde im Anschluss daran das Angstlernen an einer Kohorte von 11 cGKII-KO Tieren und 12 gematchten Kontrolltieren untersucht. Anhand der Freezing-Zeiten sieht man, dass die Tiere vor der Konditionierung eine vernachlässigbar geringe Angstreaktion zeigten ($2,3 \pm 0,5$ % in den Knock-outs vs. $2,5 \pm 0,5$ % in den Kontrollen). Ausgehend von diesen Werten waren auch in den Testphasen für das auditorische Angstlernen in einem neutralen Kontext an beiden Testtagen (Tag 1 und Tag 7) keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen feststellbar (Abb. 3.6A). So betrug das *freezing* für die cGKII-KO Tiere $46,3 \pm 3,3$ % ($n = 11$) und für die cGKII-ctr Tiere $48,4 \pm 3,2$ % ($n = 12$) an Tag 1 nach der Konditionierung. Die entsprechenden Werte 7 Tage nach der Konditionierung waren in beiden Gruppen mit $37,4 \pm 3,3$ % in der KO-Gruppe und $38,1 \pm 5,2$ % in der Kontrollgruppe etwas niedriger. Somit war an beiden Tagen keine signifikante Veränderung des Angstverhaltens in den cGKII-KO Tieren im Vergleich zu den cGKII-ctr Tieren zu erheben. Stattdessen zeigen diese Werte, dass die cGKII-defizienten Mäuse keine Defizite im auditorischen Angstlernen haben. Die ermittelten *p*-Werte für die beiden Gruppen betragen $0,65$ an Tag 1 und $0,91$ an Tag 7. Passend dazu war auch die Freezing-Rate in den beiden 3-minütigen Phasen ohne Tonpräsentation an beiden Testtagen für beide Gruppen ähnlich hoch (24 h nach

Konditionierung: cGKII-KO: $9,6 \pm 1,7$ % vs. cGKII-ctr: $11,1 \pm 1,5$ %; 7 Tage nach Konditionierung: cGKII-KO: $8,5 \pm 1,2$ % vs. cGKII-ctr: $10,3 \pm 1,1$ %). Damit konnte ausgeschlossen werden, dass Unterschiede zwischen beiden Gruppen in der *nicht-assoziativen* Komponente aufgrund der Sensitisierung durch den Fußschock (siehe Abb. 2.7) die Testung des assoziativen Angstlernens, welches in der Verknüpfung des Tons (CS) mit dem Fußschock (US) besteht, beeinflussen.

Auch bei der Testung des kontextuellen Angstlernens ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den beiden Gruppen weder an Tag 1 noch an Tag 7 nach der Konditionierung (Abb. 3.6B). War an Tag 1 zumindest eine Tendenz zu einem leicht vermindertem Freezing-Verhalten bei den cGKII^{-/-} Mäusen erkennbar (cGKII^{-/-}: $23,7 \pm 3,3$ % vs. cGKII^{+/+}: $28,1 \pm 4$ %), war dieser Effekt an Tag 7 fast vollständig verschwunden (cGKII^{-/-}: $15,8 \pm 2,4$ % vs. cGKII^{+/+}: $16,9 \pm 1,8$ %). Die entsprechenden *p*-Werte lagen bei *0,45* (Tag 1) und *0,77* (Tag 7).

Zusätzlich neben den Mittelwerten \pm SEM beim *freezing* auf den konditionierten Ton und den konditionierten Kontext, wurde für beide Gruppen beim auditorischen Angstlernen der Zeitverlauf der Freezing-Antwort in den 6 Minuten (3 min. ohne, 3 min. mit Tonpräsentation) an den beiden Testtagen ausgewertet. Auch dort zeigte sich für beide Gruppen ein identischer Verlauf mit einem gleichermaßen markanten Anstieg der Freezing-Rate (in s/30 s-Intervall) nach Einsetzen des Tons (Abb. 3.6C/D).

Protokoll 1: cGKII-KO (n = 11, 8-12 Wochen alt) und cGKII-ctr (n = 12, 8-12 Wochen alt)

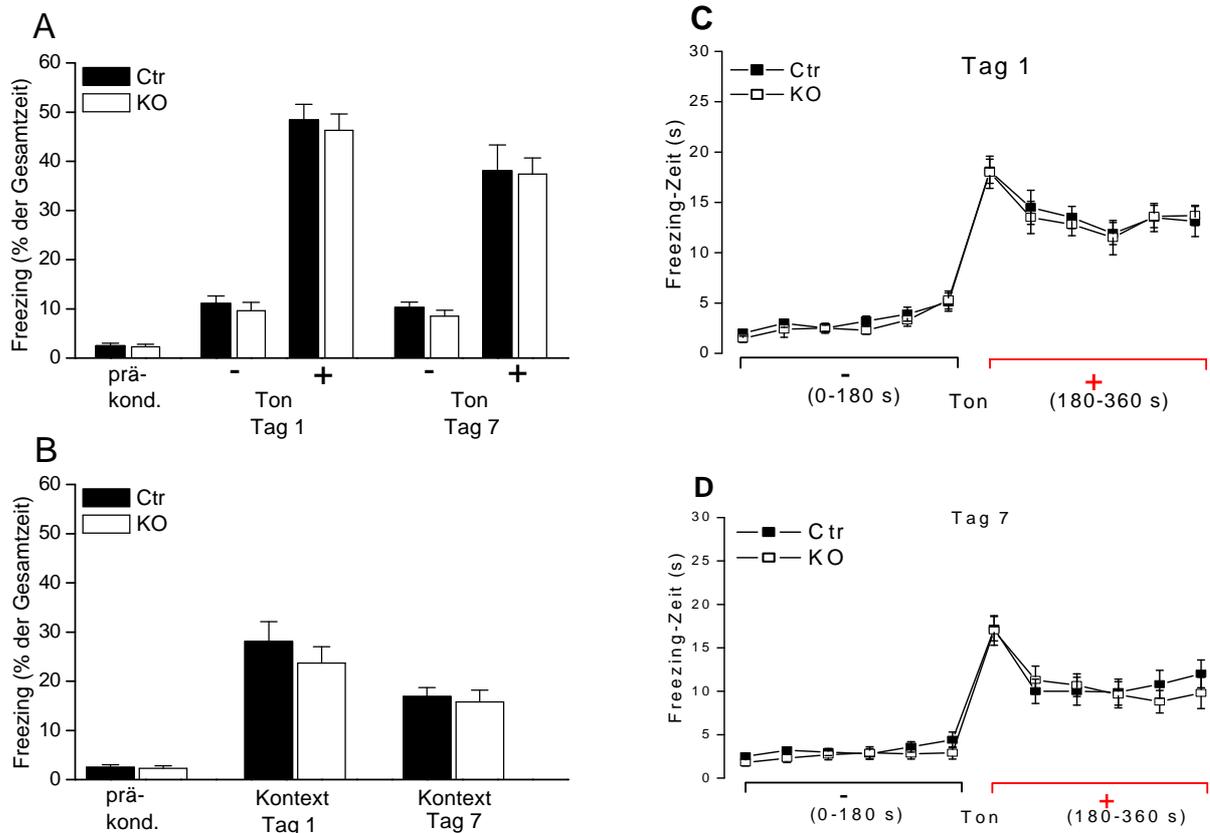


Abb. 3.6: Angstkonditionierung an cGKII-KO Mäusen mit Protokoll 1

A: Das auditorische Angstgedächtnis in einem neutralen Kontext B wurde 24 h und 7 Tage nach Konditionierung getestet. Keine signifikanten Unterschiede im *freezing* zwischen cGKII-KO (weiß, n = 11) und cGKII-ctr (schwarz, n = 12), weder an Tag 1 noch Tag 7.

B: Das kontextuelle Angstgedächtnis wurde im konditionierten Kontext A 24 h und 7 Tage nach Konditionierung getestet. Ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im *freezing* zwischen cGKII-KO (weiß, n = 11) und cGKII-ctr (schwarz, n = 12) an Tag 1 und 7.

Dargestellt jeweils Mittelwerte \pm SEM des *freezing* in % der Gesamtzeit.

C: Auch im zeitlichen Verlauf der Testphase an Tag 1 wurde zu keinem Zeitpunkt, weder vor Tonpräsentation (-) noch während Tonpräsentation (+), ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt.

D: Ebenfalls kein Unterschied vor Tonpräsentation (-) und während Tonpräsentation (+) zwischen den beiden Gruppen an Tag 7.

3.3.2 Nicht-assoziative Angst nach Fußschock

Die schon zuvor kurz angerissene *nicht-assoziative* Komponente, welche bei der Angstkonditionierung auftritt (Kamprath and Wotjak 2004), sollte mit Hilfe von 2 weiteren Protokollen untersucht werden. Damit sollte die Validität von Protokoll 1 weitergehend überprüft werden. Denn dieses wurde bekanntermaßen verwendet, um gezielt mögliche Abweichungen im Angstlernen, nicht einer allgemein gesteigerten Angstbereitschaft, der cGKII-defizienten Mäuse gegenüber den Kontrollmäusen zu entdecken. Beide Protokolle wurden an

Mäusen des Stammes C57BL/6J durchgeführt. Die Durchführung des Protokoll 1 entsprach der Angstkonditionierung bis auf das Fehlen einer Tonpräsentation vor dem Fußschock (siehe Abb. 2.21). Am darauffolgenden Tag dann wurde die Angstreaktion der Tiere ($n = 8$; 8-10 Wochen alt) in einem neutralen Kontext B sowie in der Konditionierungskammer (Kontext A), in welchem die Tiere 24 h zuvor den Fußschock erhalten hatten, untersucht und miteinander verglichen (Abb. 3.7A). Es zeigte sich, dass es aufgrund der Sensitisierung durch den Fußschock zu einer Zunahme des *freezing* von $1 \pm 0,4 \%$ vor Gabe des Fußschocks auf $18,3 \pm 3,7 \%$ in dem neutralen Kontext kam. Wurde den Tieren in diesem neutralen Kontext zusätzlich ein unbekannter Ton präsentiert, stieg die Freezing-Zeit auf $27,2 \pm 4,5 \%$ an. Bei der Testung des kontextuellen Angstgedächtnisses in Kontext A konnte ein deutlicher Anstieg der Freezing-Rate mit $37,3 \pm 7 \%$ bei den Versuchstieren festgestellt werden.

In Übereinstimmung zur 2-Komponenten-Theorie von Kamprath and Wotjak (2004) zeigen diese Ergebnisse, dass der Fußschock per se zu einer Sensitisierung und deshalb zu einem Anstieg des *freezing* bei den Tieren führte. Dieser *nicht-assoziative* Freezing-Anteil erhöhte sich durch die Präsentation eines an sich neutralen Reizes (hier ein Ton) weiter. Dennoch löste die Testung im konditionierten Kontext ein deutlich höheres *freezing* bei den Tieren aus. Dies spricht einerseits dafür, dass bei dem verwendeten Protokoll zur Angstkonditionierung die Freezing-Reaktion der Mäuse überwiegend Ausdruck des assoziativen Angstlernens ist, zumal die Freezing-Werte beim auditorischen Angstgedächtnis noch um einiges höher sind als beim kontextuellen. Andererseits kann der *nicht-assoziative* Anteil, welcher auch dort durch die Gabe des Fußschocks auftritt, zuverlässig in einem neutralen Kontext in der Testphase ohne die Tonpräsentation bestimmt werden.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde an 10 C57BL/6J Mäusen (8-12 Wochen alt) ein weiteres Protokoll durchgeführt. Damit sollte überprüft werden, inwieweit die Mäuse zwischen einem 1-malig konditionierten Ton (CS^+) und einem mehrmals präsentierten nicht konditionierten Ton (CS^-) differenzieren können (siehe Abb. 2.22). Die beiden präsentierten Töne unterschieden sich in ihrer Frequenz (CS^+ : 9,5 kHz, 80 dB vs. CS^- : 2,5 kHz, 80 dB).

Ähnlich wie von Shaban et al. (2006) berichtet, konnten die Tiere zwischen dem CS^+ und CS^- unterscheiden. Denn sowohl an Tag 1 als auch Tag 7 war das *freezing* der Tiere in einem neutralen Kontext bei der Präsentation des CS^+ mit $55,9 \pm 5,2 \%$ (Tag 1) und $41,9 \pm 5,8 \%$ (Tag 7) deutlich höher als während der Präsentation des CS^- mit $15,7 \pm 9,4 \%$ (Tag 1) und $10,4 \pm 3 \%$ (Tag 7) (Abb. 3.7B). Die Freezing-Werte in den anderen Testphasen sowie das basale Freezing-Level vor der Konditionierung unterschieden sich hingegen nur marginal in den beiden Gruppen mit je 5 Mäusen (*prä-kond.*: CS^+ : $1,7 \pm 0,5 \%$ vs. CS^- : $0,4 \pm 0,2 \%$; *kein Ton (-) Tag 1*: CS^+ : $8,4$

$\pm 2,3$ % vs. CS^- : 16 ± 1 %; *kein Ton (-) Tag 7*: CS^+ : $9,1 \pm 2,6$ % vs. CS^- : $11,3 \pm 2,8$ %). Generell wie in anderen Protokollen auch kam es zu einem Rückgang der Freezing-Werte an Tag 7. Dies lag vermutlich auch an Extinktionsvorgängen, die durch die erneute Tonpräsentation bei der 1. Testung 24 h nach Konditionierung parallel zur Rekonsolidierung stattfinden. Eine detaillierte Beschreibung zu diesen Vorgängen erfolgt in der Diskussion. Aber unabhängig davon bekräftigte dieser Befund das Ergebnis des 1. Versuchs zur Sensitisierung und demonstrierte, dass die *assoziative* Komponente bei der Angstkonditionierung den größeren Anteil ausmacht. Ergänzend dazu konnten die Ergebnisse von Shaban et al. (2006) bestätigt werden, dass den Mäusen eine Diskrimination unterschiedlicher Töne möglich ist. Diese Unterscheidungsfähigkeit stellt einen plausiblen biologischen Mechanismus dar, der Lebewesen eine Unterscheidung zwischen bedrohlichen und harmlosen Umweltreizen erlaubt. Von pathologischer Bedeutung scheint eine mangelnde Fähigkeit zur Diskrimination gefährlicher von ungefährlichen Reizen bei der generalisierten Angststörung zu sein. Weiterhin bekräftigte dieser Befund die Hypothese, dass bei der Angstkonditionierung die Übertragung nur derjenigen synaptischen Verbindungen in der LA nachhaltig verstärkt wird, die gleichzeitig zur Gabe des Fußschocks aktiv sind. Die Verstärkung dieser Verbindungen sorgt letztlich für die Assoziationsbildung zwischen dem Fußschock und dem konditionierten Ton.

Protokoll 1: C57BL/6J, n = 8, 8-10 Wochen alt

Protokoll 2: C57BL/6J, n = 10, 8-12 Wo alt

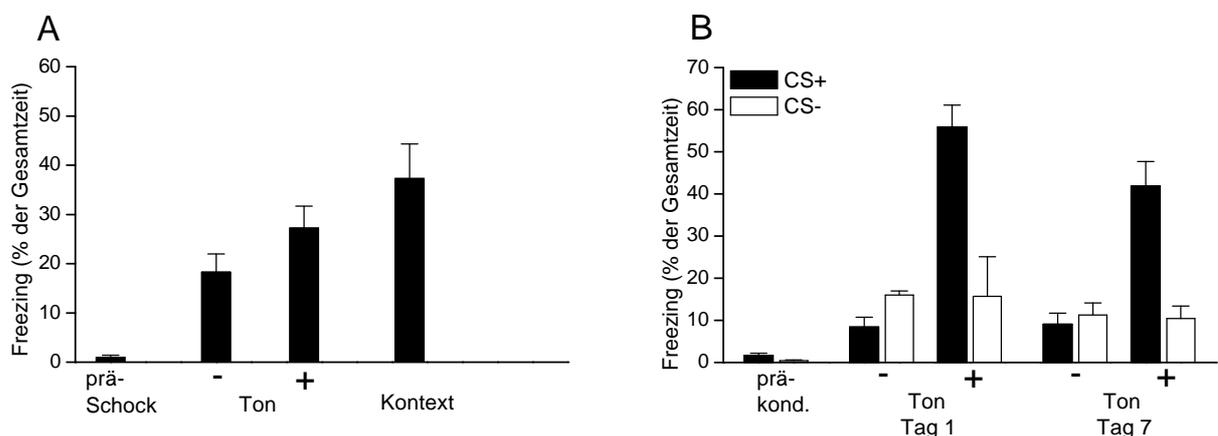


Abb. 3.7: Sensitierungsversuche mit C57BL/6J Mäusen

A: Durch alleinige Gabe eines Fußschocks (0,7 mA, 2 ms) wurden die Tiere sensitisiert. Sie reagierten daraufhin auf die Gabe eines unbekanntem Tons (+) mit einer unspezifischen Angstreaktion. Diese unspezifische Angstreaktion fiel aber deutlich kleiner aus als die spezifische Angstreaktion auf den konditionierten Kontext (Kontext).

B: Deutlich erhöhte spezifische Angstreaktion der Tiere auf den konditionierten Ton (CS^+) verglichen mit unspezifischer Angstreaktion auf einen nicht konditionierten Ton (CS^-) an beiden Testtagen (Tag 1 und Tag 7). Dargestellt jeweils Mittelwerte \pm SEM.

3.4 Grundcharakterisierung der cGKII-KO Mäuse mit Verhaltenstests

Der Befund, dass es durch das Ausschalten des Gens für die cGKII (*prkg2*) in den Mäusen weder zu Defiziten der LTP in der lateralen Amygdala noch zu einer Reduktion im auditorischen Angstlernen kam, lässt die Schlussfolgerung zu, dass die cGKII für Lernvorgänge in der lateralen Amygdala keine zentrale Rolle spielt. Um die Ergebnisse aus den Konditionierungsversuchen weiter abzusichern, wurde als nächstes die Schmerzschwelle bei den cGKII-KO Mäusen bestimmt. Denn ein verändertes akutes Schmerzempfinden bzw. Unterschiede in der Schmerzwahrnehmung hätten Auswirkungen auf die Befunde der Angstkonditionierung gehabt, da bekanntermaßen ein Fußschock dort als aversiver Stimulus verwendet wurde (siehe Punkt 2.5.2.2). Zumal es Hinweise darauf gibt, dass der NO/cGMP-Signalweg für bestimmte Formen der Schmerzwahrnehmung von Bedeutung ist (Schmidtko et al. 2003; Tegeder et al. 2004).

Zusätzlich sollte im *Open Field* eine detaillierte Phänotypisierung der cGKII-defizienten Mäuse bezüglich basaler Verhaltensweisen wie Aktivität, Lokomotion, explorativem und angstassoziiertem Verhalten stattfinden. Denn auch Unterschiede in diesen Verhaltensweisen hätten eventuell Einfluss auf die Ergebnisse der Angstkonditionierung (siehe Punkt 2.5.2.1). Zudem sollten so mögliche Unterschiede im Verhalten der cGKII-KO Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren festgestellt werden.

3.4.1 Bestimmung der Schmerzschwelle

Für diesen Versuch wurden zwei gleichstarke Gruppen von cGKII-KO ($n = 4$, 8-12 Wochen alt) und cGKII-ctr Mäusen ($n = 4$, 8-12 Wochen alt) verwendet. Die Durchführung erfolgte wie in 2.5.2.2 beschrieben. Als Zielgrößen wurden das Vocalisieren und Springen bei den Tieren bestimmt, beides anerkannte Schmerzreaktionen bei Nagetieren. Wurde eine dieser beiden Reaktionen bei einem Versuchstier beobachtet, wurden dem Tier keine weiteren Fußschocks mehr verabreicht. Der Mittelwert für das Vocalisieren betrug bei den cGKII-KO Tieren $0,33 \pm 0,04$ mA, bei den cGKII-ctr $0,28 \pm 0,05$ mA (Abb. 3.8). Dieser minimale Unterschied war bei einem ermittelten *p*-Wert von $0,59$ nicht signifikant. Ein ähnliches Ergebnis wurde bei den Tieren für das Springen erzielt. Während für diese spezifische Schmerzreaktion bei den Kontrolltieren der Mittelwert $0,33 \pm 0,04$ mA betrug, war dieser bei den Knock-outs mit $0,3 \pm 0,04$ vernachlässigbar geringer ($p = 0,70$) (Abb. 3.8). Damit war ausgeschlossen, dass Unterschiede im akuten Schmerzempfinden bzw. -verarbeitung in den beiden Kohorten (cGKII+/+ vs. cGKII-/-) auf die Ergebnisse der Angstkonditionierung sich hätten auswirken

können. Außerdem belegten diese Daten klar, dass der bei der Konditionierung applizierte Fußschock mit einer Stärke von 0,7 mA bei allen Tieren eine Schmerzreaktion auslöste.

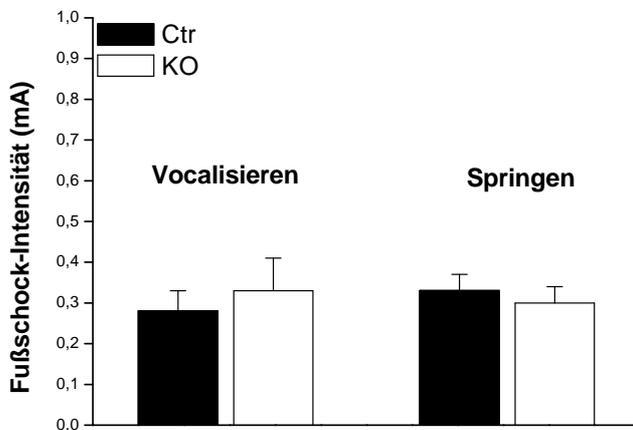


Abb. 3.8: Bestimmung der Schmerzschwelle

Untersucht wurde die Schmerzreaktion einer Gruppe naiver cGKII-KO Mäuse (weiß, n = 4) und gematchter Kontrollen (schwarz, n = 4) auf steigende Stromintensität des Fußschocks. Kein Unterschied in der Schmerzschwelle, weder im Vocalisieren noch beim Springen, zwischen beiden Genotypen. Dargestellt jeweils Mittelwert \pm SEM.

3.4.2 Open Field

Der Zweck dieses Verhaltensparadigmas wurde schon ausführlich in den Punkten 2.5.2.1 und 3.4 beschrieben. Hervorzuheben ist, dass in dieser Arbeit der Open Field-Test als eigenständiger Verhaltenstest betrachtet wurde, durch den eine detaillierte Verhaltensphänotypisierung der cGKII-defizienten Mäuse erreicht werden sollte. Denn Werner et al. (2004) postulierten eine bedeutende Rolle der cGKII für die Kontrolle bestimmter Emotionen (siehe Punkt 1.6). Sie führten dies vor allem auf ein erhöhtes generelles Angstverhalten der cGKII^{-/-} Mäuse zurück, welches sie in ihren Versuchen mit einer signifikant verlängerten Aufenthaltszeit der Tiere zum einen im dunklen Kompartiment während des *Light-dark-box* Tests und zum anderen im offenen Arm des *Elevated-O-maze* im Vergleich zu den Kontrolltieren begründeten. Zumindest ansatzweise konnte diese These einer gesteigerten allgemeinen Angstbereitschaft der cGKII^{-/-} Tiere auch im *Open Field* getestet werden, indem man die sogenannte Thigmotaxis, die Aufenthaltsdauer der Tiere im Randbereich des *Open Field*, ermittelte (siehe Punkt 2.5.2.1).

Als erstes allerdings wurde bei einer Kohorte von cGKII^{-/-} (n = 10, 8-12 Wochen alt) und cGKII^{+/+} (n = 10, 8-12 Wochen alt) das Explorationsverhalten sowie die Aktivität der Tiere im *Open Field* bestimmt. Als zentraler Indikator für das Explorationsverhalten der Tiere wurde das „*Rearing*“, d. h. das Aufrichten auf die Hinterbeine, bei den Mäusen untersucht. Sowohl im Zeitverlauf über die 10 Minuten (5 Intervalle zu je 2 min.) als auch in der Gesamtauswertung des 10-minütigen Aufenthalts im *Open Field* durch Mittelwert \pm SEM war kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellbar (Abb. 3.9A). Die entsprechenden Werte waren für die

cGKII^{-/-} $6,0 \pm 0,5$ % und die cGKII^{+/+} $6,1 \pm 0,5$ % („*Rearing*“ in % der Gesamtzeit). Der ermittelte *p*-Wert lag bei $0,92$.

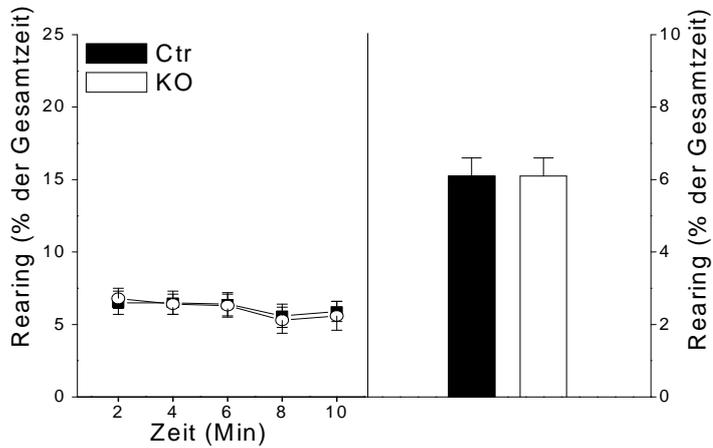
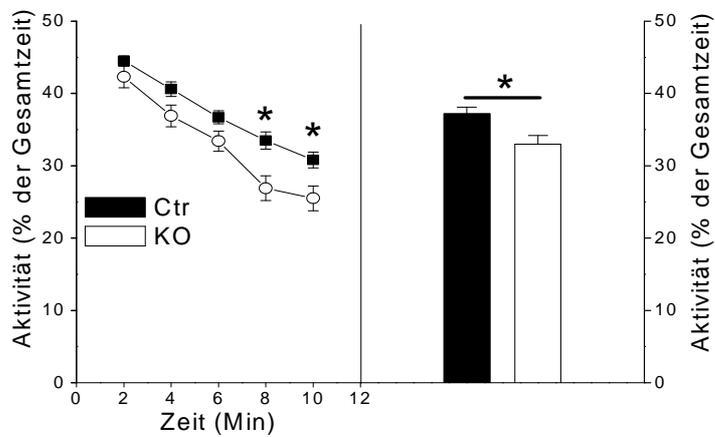
Bei der Aktivität, d. h. den Bewegungen der Tiere auf allen 4 Beinen in der horizontalen Ebene, hingegen stellte sich ein differenziertes Bild dar (Abb. 3.9B). War im Zeitverlauf in den ersten 3 Intervallen (Minuten 0-6) bei *p*-Werten von $0,23$ (Intervall 1); $0,086$ (Intervall 2) und $0,091$ (Intervall 3) kein signifikanter Unterschied bei dem festgelegten Signifikanzlevel von $p < 0,05$ (siehe Punkt 2.6) zwischen den beiden Gruppen zu erheben, so zeigten in den letzten beiden Intervallen die cGKII-KO Tiere gegenüber den Kontrollen eine signifikant verminderte Aktivität (in % der Gesamtzeit) (Intervall 4: $p = 0,012$ und Intervall 5: $p = 0,026$). Dieser in den letzten 4 Minuten gemessene Unterschied hatte auch eine insgesamt verringerte Aktivität der knock-outs gegenüber den Kontrollen über die 10 Minuten zur Folge. Eine Gesamtaktivität von $33,2 \pm 1,2$ % bei den cGKII^{-/-} verglichen mit $37,2 \pm 0,9$ % bei den cGKII^{+/+} führte zu einem *p*-Wert von $0,011$ ($p < 0,05$).

Noch deutlicher war der Unterschied zwischen den beiden Gruppen bei der zurückgelegten Gesamtstrecke (in m) im *Open Field* während der 10 Minuten (Abb. 3.9C) Während die cGKII^{-/-} nur $36,4 \pm 1,6$ m in dieser Zeit zurücklegten, kamen die gematchten cGK^{+/+} insgesamt auf $52,5 \pm 3,1$ m. Der dazu entsprechende *p*-Wert war $0,00021$ ($p < 0,001$). Auch im Zeitverlauf spiegelte sich dieser hochsignifikante Unterschied zu Ungunsten der cGKII^{-/-} Mäuse wider. Bei hochsignifikanten Unterschieden ($p < 0,001$) in den Intervallen 1 ($p = 0,00020$) und 2 ($p = 0,00052$), waren auch in den restlichen Intervallen 3-5 signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) zwischen den beiden Gruppen zu verzeichnen (Intervall 3/4: $p = 0,0033$; Intervall 5: $p = 0,0034$).

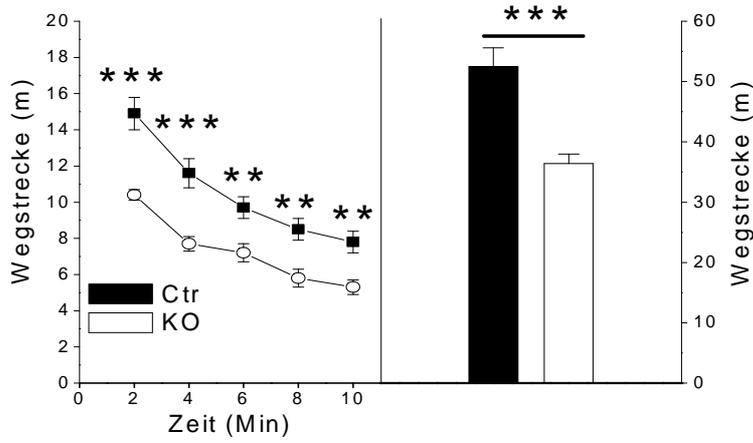
Ein nahezu identisches Ergebnis erbrachte die Berechnung der mittleren Geschwindigkeit (v_{mit} in cm/s) für die beiden Gruppen (Abb. 3.9D). Betrug diese für die Kontrolltiere $8,8 \pm 0,5$ cm/s, so waren die cGKII^{-/-} Mäuse mit $6,4 \pm 0,3$ cm/s über die gesamte Zeit der 10 Minuten deutlich langsamer ($p = 0,00073$). Auch im Zeitverlauf konnte dieser hochsignifikante Unterschied nachvollzogen werden (Intervall 1: $p = 0,00071$; Intervall 2: $p = 0,0025$; Intervall 3: $p = 0,0082$; Intervall 4: $p = 0,0046$; Intervall 5: $p = 0,0098$).

Abschließend wurde im *Open Field* die Thigmotaxis, sprich der Randaufenthalt in % der Gesamtzeit, für die beiden Gruppen ausgewertet (Abb. 3.9E). Dabei zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied in den Mittelwerten, welche für die cGKII^{-/-} und cGKII^{+/+} Tiere über die 10 Minuten, ermittelt wurden. Die Thigmotaxis war bei den Knock-outs mit $56,7 \pm 6,7$ % der Gesamtzeit gegenüber den gemessenen $37,0 \pm 5,9$ % der Kontrollen signifikant erhöht ($p = 0,04$). Dieser Befund war die logische Konsequenz von signifikanten Unterschieden zwischen

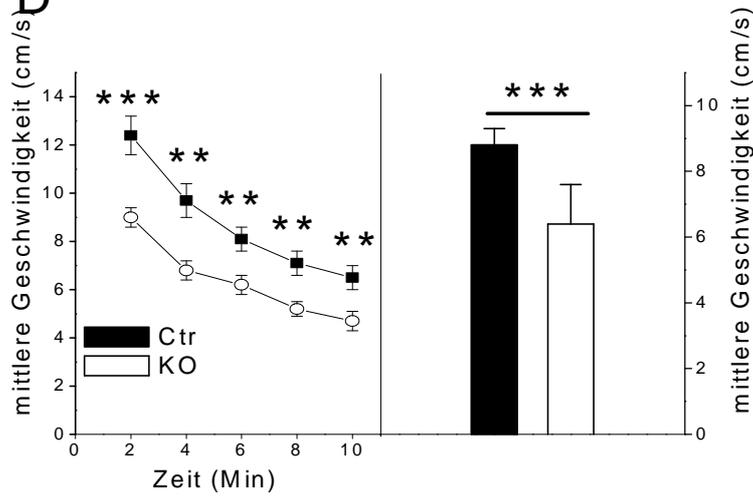
den beiden Gruppen im Zeitverlauf mit *p*-Werten von 0,0062; 0,025; 0,0038 und 0,047 in den Intervallen 1-4. Nur im letzten Zeitintervall war kein Unterschied zwischen den cGKII^{-/-} und cGKII^{+/+} Tieren festzustellen (*p* = 0,17).

A**B**

C



D



E

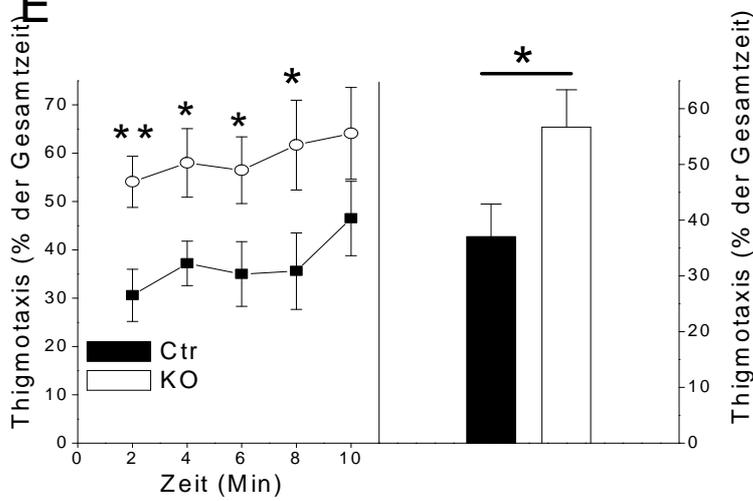


Abb. 3.9: Ergebnisse des Open Field Tests an cGKII-KO Mäusen

Die untersuchten Parameter an den cGKII-ctr (schwarz) und cGKII-KO (weiß) Mäusen sind jeweils links im Zeitverlauf in 2-Minuten-Intervallen und rechts als Mittelwert \pm SEM der gesamten Versuchsdauer dargestellt.

A: Kein Unterschied im *Rearing* zwischen beiden Gruppen.

B: Signifikant verminderte Aktivität der cGKII-KO in den letzten 4 Minuten im Zeitverlauf (links) und insgesamt über die 10 Minuten (rechts).

C: Hochsignifikant verminderte Wegstrecke (m) der cGKII-KO im Zeitverlauf (links) und insgesamt nach 10 Minuten (rechts).

D: Die cGKII-KO sind ebenfalls hochsignifikant langsamer während des Zeitverlaufs (links) und insgesamt nach den 10 Minuten (rechts).

E: Signifikant längere Aufenthaltsdauer im Randbereich des *Open Field* der cGKII-KO während der ersten 8 Minuten im Zeitverlauf (links) sowie insgesamt über die 10 Minuten (rechts).

4 Diskussion

Man weiß, dass Stickstoffmonoxid (NO) ein wichtiges biologisches Signalmolekül ist, welches seine Wirkung in erster Linie über einen durch die sGC vermittelten Anstieg von cGMP in der Zelle vermittelt. Die Eigenschaft der Membranpermeabilität ermöglicht es, dass NO auch in Nachbarzellen seine Wirkung entfalten kann. Auch im ZNS nimmt NO eine zentrale Rolle beim Lernen und bei der Gedächtnisbildung sowie der synaptischen Plastizität, welche das zelluläre Korrelat dieser beiden Vorgänge darstellt, ein (Schuman and Madison 1994; Feil and Kleppisch 2008). So konnte neben vielen anderen Hirnregionen wie Hippocampus, Cortex, Striatum und Cerebellum vor allem auch für die Amygdala gezeigt werden, dass NO dort für die Ausbildung des Angstgedächtnisses und übereinstimmend dazu die LTP-Induktion von Bedeutung ist (Schafe et al. 2005; Sato et al. 2006). Das NO/cGMP-Signal wird vor allem auch durch die cGK Typ I und II weitervermittelt. Diese intrazellulären Proteinkinasen werden von zwei verschiedenen Genen (*prkg 1* und *prkg 2*) codiert und beide in der Amygdala exprimiert (El-Husseini et al. 1999; Feil et al. 2005). Aus früheren Studien gibt es Hinweise, dass ebenso wie NO auch die cGKs für das amygdaläre Angstlernen und die LTP in der lateralen Amygdala wichtig sind (Chien et al. 2003, 2005; Ota et al. 2008). Allerdings konnte aufgrund der unspezifischen Blockade beider cGKs (cGKI und cGKII) durch die in den hiesigen Studien verwendeten pharmakologischen Substanzen keine Aussage darüber getroffen werden, ob diese Effekte hauptsächlich durch die cGKI oder die cGKII vermittelt werden. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit anhand eines konventionellen knock-out Mausmodells die funktionelle Rolle der cGKII für das Angstlernen und die synaptische Plastizität in der Amygdala untersucht.

4.1 Expression der cGKII im Gehirn

Als erstes wurde die Expression der cGKII in den für das Angstlernen relevanten Hirnregionen untersucht. Die Expressionsanalysen (siehe Abb. 3.1) haben ergeben, dass die cGKII in der Amygdala in mittlerer Konzentration vorhanden ist. Jedoch konnte anhand der immunhistochemischen Färbungen in anderen mit der Angstkonditionierung assoziierten Bereichen wie dem Thalamus und der Übergangszone zwischen dem Thalamus und der Amygdala („*transit area*“ = TA), in welcher die thalamischen Afferenzen zur lateralen Amygdala (LA) bei der Angstkonditionierung verlaufen, eine bei weitem stärkere Expression als

in der LA selbst festgestellt werden. Ebenso wie in einer früheren Studie von de Vente et al. (2001), welcher die Expression der cGKII an Rattengehirnen untersuchte, zeigte sich auch in dieser Arbeit eine gewisse Diskrepanz zwischen den Resultaten der Immunoblots und der Immunhistochemie auf cGKII. So war die Färbung in der Immunhistochemie zum Nachweis der cGKII in der lateralen Amygdala wesentlich schwächer, als der in den Western Blots ermittelte hohe cGKII-Gehalt in der Amygdala erwarten ließ. Womöglich liegt die Ursache für diesen Effekt in den unterschiedlichen Protokollen für die beiden Nachweismethoden.

Insgesamt zeigte sich eine weit verteilte Expression der cGKII in vielen verschiedenen Hirnarealen mit besonders hohen Konzentrationen in den äußeren Kortexschichten, thalamischen und hypothalamischen Kerngebieten, dem Striatum und auch im Hippocampus (CA1-CA3 Region, Gyrus dentatus).

Im Wesentlichen sind die in dieser Arbeit ermittelten Expressionsdaten für die cGKII deckungsgleich zu den bisher bekannten Angaben aus der Literatur (El-Husseini et al. 1995; 1999; de Vente et al. 2001; Werner et al. 2004). Minimale Differenzen wie die hier gezeigte ausgeprägte Expression der cGKII im Striatum und im Hippocampus sind vermutlich auf Unterschiede in den Nachweismethoden (*mRNA in situ hybridization* vs. Immunhistochemie) einerseits und unterschiedliche verwendete Spezies (Ratte vs. Maus) andererseits zurückzuführen. Besonders wichtig ist die in dieser Studie demonstrierte Expression der cGKII in der lateralen Amygdala, weil dort während der Angstkonditionierung die verschiedenen Stimuli (Ton und Schmerzreiz) konvergieren und deshalb anscheinend für deren Assoziation verantwortlich sind (Sigurdsson et al. 2007). Auch eine in den Färbungen ermittelte Expression der cGKII im *Corpus geniculatum mediale* (CGM) und dem *posterioeren intralaminaren Nucleus* (PIN) des Thalamus sind sehr relevant, weil über diese beiden Stationen im Thalamus bekanntlich der Ton und der Schmerzreiz bei der Angstkonditionierung einlaufen, um von dort direkt über die „*transit area*“ (TA) zur LA zu gelangen. In Anbetracht dieser Befunde scheint eine funktionelle Rolle der cGKII für das auditorische Angstlernen und die zugrundeliegende synaptische Plastizität in der LA möglich.

Allgemein werden verschiedene sowohl prä- als auch postsynaptische Mechanismen bei der LTP diskutiert. Kürzlich erst wurde von der Arbeitsgruppe um Serulle et al. (2007) eine postsynaptische Rolle der cGKII für die LTP im Hippocampus beschrieben. Sie konnten eine Interaktion der in der postsynaptischen Membran verankerten cGKII mit den GluR1-Untereinheiten von AMPA-Rezeptoren zeigen. Ergebnis dieser Interaktion ist die Phosphorylierung von Serin 845 der GluR1-Untereinheit, welche zu einem vermehrten Einbau in die postsynaptische Membran führt. Ein solcher Anstieg der GluR1-Untereinheiten gilt als

etablierter postsynaptischer Mechanismus bei der LTP (Malenka and Bear 2004). Die Aktivierung der cGKII erfolgt über den folgenden von ihnen postulierten Signalweg: Der durch NMDA-Rezeptoren vermittelte Ca^{2+} -Anstieg in der Postsynapse führt durch die Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen NO-Synthase zur Generierung von NO. Dieses gasförmige Molekül stimuliert unmittelbar in der Postsynapse die sGC. Dadurch kommt es zur Produktion von cGMP, welches schließlich die cGKII aktiviert. Eine solche postsynaptische Rolle der cGKII wäre auch in der Amygdala bei der LTP und bei der Konsolidierung des Angstgedächtnisses denkbar, zumal das Vorhandensein von NO in der lateralen Amygdala und eine funktionelle Rolle für die LTP und das Angstlernen bereits gezeigt worden ist (Schafe et al. 2005; Sato et al. 2006). Passend dazu konnte in einer Studie von Ota et al. (2008) erst kürzlich belegt werden, dass die postsynaptische Injektion eines cGK-Inhibitors die LTP in der LA hemmt. Damit scheint die Annahme bestätigt, dass der NO/cGMP/cGK-Signalweg zumindest teilweise zur postsynaptischen Komponente der LTP in der LA beiträgt. Jedoch konnte aufgrund der unspezifischen pharmakologischen Blockade der cGKs in ihren Experimenten keine Aussage darüber gemacht werden, ob die cGKI oder die cGKII für diesen Effekt verantwortlich ist.

Für eine potentielle präsynaptische Rolle der cGKII für die amygdaläre LTP und das assoziative Angstlernen sprechen die Befunde von de Vente et al. (2001), der durch immunhistochemische Färbungen von Rattengehirnen zeigen konnte, dass die cGKII wie in zahlreichen anderen Hirnarealen auch in der Amygdala ganz überwiegend im „*Neuropil*“, also in den Dendriten und axonalen Endigungen, weniger jedoch in den Neuronensomata lokalisiert ist. Deshalb schlug er schon damals eine eventuelle präsynaptische Rolle der cGKII für neuronale Prozesse wie die synaptische Plastizität vor. Ein möglicher Downstream-Effektor der cGKII in der Amygdala könnte der „*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*“ (CFTR) sein, ein Chloridkanal, dessen Expression mittels „*mRNA in situ hybridization*“ in der Amygdala nachgewiesen werden konnte (Mulberg et al. 1995). Eine Aktivierung dieses Kanals durch die cGKII konnte im Dünndarm gezeigt werden (Vaandrager et al. 1998). Für eine bedeutende Rolle des CFTR bei synaptischen Vorgängen wie der LTP oder der LTD gibt es jedoch bislang keine Hinweise. Ebenso konnte eine funktionelle Interaktion des Kanals mit der cGKII im Gehirn bis dato nicht nachgewiesen werden.

Von funktionellem Einfluss auf die synaptische Plastizität in der LA könnte auch die hochkonzentrierte Expression der cGKII in präsynaptischen Neuronensomata des auditorischen Thalamus sein (siehe Abb. 3.1). Denn als wichtiger präsynaptischer Mechanismus für das Angstgedächtnis und die LTP in der LA wurde in einer früheren Arbeit der ERK/MAP-Kinase Signalweg im auditorischen Thalamus (CGM/PIN) beschrieben (Apergis-Schoute et al. 2005).

Sie postulieren, dass die dadurch initiierte Proteinsynthese für die synaptische Plastizität in der LA notwendig ist. Denkbar wäre, dass die Aktivierung dieses Signalwegs über die cGKII geschieht.

Weder die Ergebnisse aus der Vergangenheit noch die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Befunde lassen allerdings eindeutige Rückschlüsse zu, ob die cGKII in der LA präsynaptisch oder postsynaptisch lokalisiert ist. Um darüber eine klare Aussage treffen zu können, wären Kollokalisierungen mit präsynaptischen und postsynaptischen Markern notwendig. Solche Kollokalisationsstudien sollten jedoch nur dann ins Auge gefasst werden, wenn es tatsächlich Befunde für eine funktionelle Rolle der cGKII für die Lernvorgänge und die synaptische Plastizität in der LA gibt.

4.2 Die Rolle der cGKII für die synaptische Plastizität in der lateralen Amygdala

Bei der Angstkonditionierung kommt es zu einer Konvergenz der verschiedenen sensorischen Informationen, welche durch den Ton und den Fußschock ausgelöst worden sind, auf den Neuronen in der LA. Weil sie einen Ort darstellt, an welchem synaptische Plastizität während der Konditionierung auftritt, hält man die LA für eine Schlüsselkomponente bei der Angstkonditionierung (Blair et al. 2001; Sigurdsson et al. 2007). Bereits seit der Mitte des letzten Jahrhunderts versucht man die Vorgänge des Lernens und der Gedächtnisbildung zu verstehen, indem man die zellulären und molekularen Grundlagen, welche zu diesen Veränderungen an den Synapsen beitragen, erforscht. Ein beliebtes Modell für diese Untersuchungen stellt die LTP dar, da sie sehr viele Parallelen mit den Vorgängen von Lernen und Gedächtnisbildung besitzt (Citri and Malenka 2008). Ein großer Vorteil der LTP besteht darin, dass sie sich durch hochfrequente elektrische Stimulation auch *in vitro* an Hirschnittpräparaten auslösen lässt. Eine Reihe bereits publizierter Daten impliziert eine Rolle des NO/cGMP-Signalwegs sowohl für die LTP als auch das Angstlernen in der LA (Chien et al. 2005; Schafe et al. 2005b; Ota et al. 2008). Die Ergebnisse dieser Arbeiten legen außerdem nahe, dass die cGMP-abhängigen Proteinkinasen als Vermittler des cGMP-Signals fungieren. Aufgrund der fehlenden Selektivität der verwendeten Pharmaka konnte jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, welche der beiden cGKs (cGKI oder cGKII) den beobachteten Effekt auf die LTP und das Angstlernen in der LA vermittelt. Ein Hauptgegenstand der hier vorliegenden Arbeit war deshalb, die funktionelle Bedeutung der cGKII für die Modulation der synaptischen Plastizität in der LA aufzuklären.

Die hier beschriebenen Experimente sprechen gegen eine zentrale Funktion der cGKII für die LTP in der LA. Denn weder die Messung extrazellulärer Feldpotentiale über dem thalamischen noch die über dem kortikalen Input zur LA konnte einen signifikanten Unterschied zwischen den konventionellen cGKII knock-out und den gematchten cGKII-Kontrollmäusen aufdecken. Stattdessen ergaben sich in den beiden Gruppen für beide Inputs über den gesamten Zeitverlauf nahezu identische Werte. Demzufolge waren auch unmittelbar nach der LTP-Induktion durch den tetanischen elektrischen Stimulus (100 Hz) keine unterschiedlichen Werte zwischen den beiden Mauskollektiven (cGKII^{-/-} vs. cGKII^{+/+}) festzustellen. Dies spricht dafür, dass auch in der initialen Phase der LTP, der sogenannten E-LTP („*early LTP*“), welche sich direkt dem LTP-induzierenden Stimulus anschließt, die cGKII in der LA keine zentrale Rolle einnimmt. Wie Studien an Hippocampuspräparaten belegt haben, ist die E-LTP das Resultat einer kurzzeitigen Verstärkung der synaptischen Übertragung aufgrund von biochemischen Veränderungen an der Synapse wie beispielsweise einer erhöhten Leitfähigkeit von bereits in der postsynaptischen Membran befindlichen AMPA-Rezeptoren. Die späte Phase der LTP, die sogenannte L-LTP („*late LTP*“), hingegen führt zu einer dauerhaften Verstärkung der synaptischen Transmission aufgrund von morphologischen Veränderungen der betroffenen Synapsen, welche eine Neusynthese von RNA und Proteinen voraussetzen (Citri and Malenka 2008). Aufgrund der kürzlich erschienenen Veröffentlichung von Serulle et al. (2007) wäre eine Funktion der cGKII sowohl für die E-LTP als auch die L-LTP in der LA denkbar gewesen. Denn die von ihnen gezeigte Kollokalisierung der membrangebundenen cGKII mit den GluR1-Untereinheiten der AMPA-Rezeptoren im Hippocampus wäre auch in der LA eine Möglichkeit gewesen, wie die cGKII eine Verstärkung der synaptischen Übertragung nach einer hochfrequenten Stimulation hervorrufen kann. Durch die unmittelbare Phosphorylierung bereits in der postsynaptischen Membran vorhandener GluR1-Untereinheiten könnte eine kurzzeitige cGKII-vermittelte Potenzierung stattfinden, während durch den Neueinbau zusätzlicher GluR1-Untereinheiten aus einem intrazellulären Pool in die Postsynapse die im Sinne einer L-LTP geforderte strukturelle Veränderung an der potenzierten Synapse geschehen könnte. Zudem wurde eine wichtige Rolle von GluR1-Untereinheiten für das assoziative Angstlernen und korrelierend dazu die LTP in der Amygdala schon durch Befunde aus der Vergangenheit demonstriert (Lee et al. 2003; Rumpel et al. 2005). Die hier erhaltenen Befunde sprechen allerdings gegen eine Funktion der cGKII für die LTP in der LA überhaupt. Infolgedessen ist auch eine Rolle der cGKII im auditorischen Thalamus (CGM/PIN), wo sie in äußerst hoher Konzentration vorkommt (siehe Abb. 3.1), für die LTP in der LA zu verneinen. Ein solcher Mechanismus von präsynaptischer Plastizität im auditorischen Thalamus mit funktioneller

Bedeutung für ein erfolgreiches Angstlernen und suffiziente LTP in der LA gleichermaßen konnte für den ERK/MAP-Kinase Signalweg gezeigt werden (Apergis-Schoute et al. 2005).

Ein wesentliches Problem bei der Verwendung von genetisch manipulierten Mauslinien stellt die bisweilen beobachtete Tatsache dar, dass die Funktion des durch ein bestimmtes Gen ausgeschalteten Proteins durch andere Proteine ersetzt und damit ausgeglichen wird. So könnte auch bei der hier verwendeten konventionellen cGKII-defizienten Mauslinie eine mögliche Malfunktion der LTP in der LA aufgrund des Fehlens der cGKII durch die kompensatorische Hochregulation anderer an der LTP beteiligter Proteine kompensiert worden sein. Am naheliegendsten aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit wäre eine Hochregulation der cGKI-Isoformen (cGKI β und cGKI α) in der Amygdala. Zumindest eine solche konnte mit Hilfe von immunhistochemischen Nachweismethoden der cGKI in der Amygdala ausgeschlossen werden (siehe Abb. 3.2). Auch der scheinbare Widerspruch der Ergebnisse hier, welche keine funktionelle Rolle der cGKII in der LA zeigen, und den Ergebnissen aus anderen Labors, welche eine postsynaptische Rolle der cGKs für die LTP in der LA proklamieren (Chien et al. 2003, 2005; Ota et al. 2008), lässt sich durch die Entdeckung einer zentralen Funktion der cGKI für die LTP in der LA nach tetanischer Reizung sowohl der thalamischen als auch der kortikalen Afferenzen zur LA auflösen (Paul et al. 2008).

Wie bei der LTP wurde auch bei der Untersuchung der basalen synaptischen Übertragung durch die *IO-Relation* kein Unterschied bei den cGKII-KO Tieren im Vergleich zu den cGKII-ctr festgestellt. An den Gehirnen der cGKII-KO Mäusen wurden auch keine morphologischen Pathologien beobachtet.

Somit konnten grundsätzliche neuroanatomische Defizite und Fehlfunktionen in der basalen synaptischen Signalübertragung, hervorgerufen durch das Fehlen der cGKII, ausgeschlossen werden.

4.3 Die Funktion der cGKII für das assoziative Angstlernen

Man geht davon aus, dass eine LTP-hafte Verstärkung der synaptischen Übertragung in der LA und die daran beteiligten molekularen Mechanismen die Grundlage der assoziativen Lernprozesse während der Angstkonditionierung darstellen (Rogan et al. 1997; Schafe et al. 2001; Maren and Quirk 2004). Deshalb war folgende Fragestellung für diese Arbeit unausweichlich: Korrelieren die bei den cGKII-defizienten Mäusen erhaltenen Befunde aus den *in vitro* LTP-Messungen in der LA mit den Ergebnissen beim assoziativen Angstlernen *in vivo*?

Um dies zu untersuchen, wurden Versuche zur Pawlow'schen Angstkonditionierung an den cGKII-KO Tieren durchgeführt (siehe Tab. 2.20). Wie vermutet, war kein signifikanter Unterschied in der assoziativen Gedächtnisbildung zwischen den cGKII-KO Mäusen und den gematchten cGKII-ctr feststellbar. Weder in der Testphase 24 h nach der Konditionierung noch in einer weiteren Testphase nach 7 Tagen ergaben sich Unterschiede in der Freezing-Rate zwischen den beiden Vergleichsgruppen (cGKII^{-/-} vs. cGKII^{+/+}). Somit führte das Fehlen der cGKII in Übereinstimmung zu den LTP-Befunden auch beim Angstlernen nach Pawlow zu keinem auffälligen Phänotyp bei den Tieren. Dieser Befund bekräftigt auch die in den letzten Jahren gewonnene Annahme, dass das Angstlernen in der LA nach klassischer Konditionierung mit dem Grad an dauerhafter Verstärkung der synaptischen Übertragung in der LA korreliert (zur Übersicht Sigurdsson et al., 2007).

Generell werden bei Lernvorgängen im Zeitverlauf unterschiedliche Phasen beobachtet, so auch beim Angstlernen in der Amygdala: Als erstes und bereits unmittelbar mit der Konditionierung findet die sogenannte Akquisition, gewissermaßen der Erwerb des Gedächtnisinhalts, statt, welcher sich zeitlich überlappend das Kurzzeitgedächtnis („*short term memory*“ = STM), etwa 2-6 h nach der Konditionierung, anschließt. Darauf wiederum folgt das Langzeitgedächtnis („*long term memory*“ = LTM), welches zu einer Konsolidierung, also der weiteren Verfestigung des Gelernten, führt (Tronson and Taylor 2007). In Abb. 4.1 ist dieser zeitliche Ablauf des Lernprozesses, wie er bei der Angstkonditionierung stattfindet, durch einen Versuch an C57BL/6J Wildtypmäusen (n = 7, 9-13 Wochen alt) nochmals graphisch dargestellt.

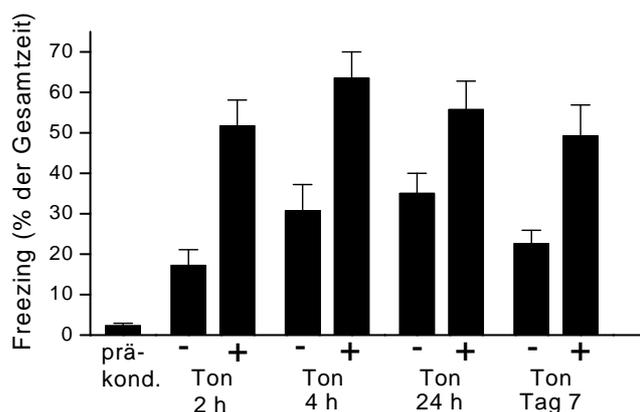


Abb. 4.1: Zeitverlauf des auditorischen Angstlernens an C57BL/6J Mäusen

Das auditorische Angstgedächtnis wurde im Zeitverlauf 2, 4, 24 h sowie 7 Tage nach der Konditionierung getestet (+). Übereinstimmend mit der Literatur sah man die maximale Angstantwort nach 4 h. Wie zu erwarten, war aufgrund von Extinktionsvorgängen bei wiederholter Tonpräsentation ein moderater Abfall des *freezing* an Tag 7 zu verzeichnen.

Gleichzeitig erkennbar war eine starke Zunahme *nicht-assoziativer* Anteile der Freezing-Antwort vor allem 4 und 24 h nach der Konditionierung (-). Ursache hierfür war eine Sensibilisierung der Tiere durch den Fußschock und im speziellen Fall vor allem eine Sensibilisierung durch das wiederholte „*handling*“ der Mäuse innerhalb kurzer Zeit. Dargestellt jeweils Mittelwerte \pm SEM.

Neben einer Bestätigung der bisherigen Literatur insofern, dass die maximale Freezing-Antwort etwa 3-6 h nach der Konditionierung beim Übergang vom STM zum LTM auftritt (Tronson and Taylor 2007), weist die Abbildung zusätzlich auf 2 Phänomene hin, welche bei der klassischen Angstkonditionierung nach Pawlow konstant auftreten und deshalb bei der Interpretation der Konditionierungsexperimente an den cGKII-KO Tieren zu berücksichtigen sind. Zum einen setzt sich das *freezing* aus mehreren verschiedenen Komponenten zusammen. Neben dem *assoziativen* Anteil als Ausdruck der Lernleistung tragen zusätzlich *nicht-assoziative* Elemente zur Gesamtheit der beobachteten Freezing-Reaktion bei (Kamprath and Wotjak 2004). Eine *Stress-Sensitisierung* der Tiere durch den aversiven Fußschock tritt beim Paradigma der Angstkonditionierung konstant als Ursache solcher *nicht-assoziativer* Anteile des *freezing* auf. Die relativ hohen Freezing-Werte hier in den Phasen ohne Tonpräsentation 4 und 24 h nach der Konditionierung (Abb. 4.1) wurden vor allem zusätzlich durch das häufige „*handling*“ der Tiere, d. h. der wiederholte Körperkontakt der Tiere zum Versuchsleiter innerhalb kurzer Zeit, hervorgerufen. Um das Ausmaß der *Stress-Sensitisierung* quantitativ zu bestimmen, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei weitere sogenannte Sensitisierungsprotokolle an C57BL/6J Wildtyp-Tieren durchgeführt. Die Ergebnisse demonstrierten in Ergänzung zu Abb. 4.1 deutlich, dass trotz des Vorhandenseins *nicht-assoziativer* Anteile aufgrund einer *Sensitisierung* durch den Fußschock der *assoziative* Anteil als Produkt einer erfolgreichen Verknüpfung des Tons mit dem Fußschock bei der Angstkonditionierung überwiegt (Abb. 3.7). Somit galt es als gesichert, dass der erhaltene Befund der Angstkonditionierung an den cGKII-defizienten Tieren eine Aussage über ihre assoziative Lernleistung erlaubt.

Das andere Phänomen, welchem bei der Angstkonditionierung Rechnung zu tragen ist, sind weitere Lernphasen, welche während der Messung des auditorischen Angstgedächtnisses in den Testphasen auftreten. Denn durch die Präsentation des konditionierten Tons (CS) kommt es zu einem „*memory retrieval*“, dem Wiedererleben der während der Konditionierungsphase gemachten Erfahrungen. Die klassische Angstkonditionierung zeichnet sich u. a. dadurch aus, dass zur Messung des Angstgedächtnisses ein „*memory retrieval*“ notwendig ist (Garelick and Storm 2005). Das Problem besteht nun darin, dass dieses „*retrieval*“ selbst einen dynamischen Prozess darstellt, bei dem die während der Konditionierung gemachte Assoziation zwischen dem Ton und dem Fußschock in einen labilen Zustand gerät. Basierend darauf laufen während des „*retrieval*“ parallel zwei konkurrierende Prozesse, nämlich die Rekonsolidierung und Extinktion des Angstgedächtnisses, ab. Bei der Rekonsolidierung, welche gleichsam der initialen Konsolidierung die Neusynthese von mRNA und Proteinen erforderlich macht, findet eine erneute Verfestigung des assoziativen Angstgedächtnisses statt. Unter dem Begriff der

Extinktion hingegen versteht man aktive Vorgänge, die zu einer Abschwächung des assoziativen Gedächtnisses führen, indem sich bei den Tieren die ursprüngliche Verknüpfung des Tons mit dem Fußschock wieder lockert (Garelick and Storm 2005). Vor allem für die Bewertung der Freezing-Zeit an Tag 7 müssen diese Gesichtspunkte mitberücksichtigt werden. Erwartungsgemäß zeigte sich hier sowohl in der Gruppe der cGKII^{-/-} als auch der cGKII^{-ctr} Tiere ein moderater Rückgang des *freezing* auf den CS. Man hätte die Einflüsse auf dieses Ergebnis durch das „*memory retrieval*“ während der Testung 24 h nach der Konditionierung umgehen können, indem man bei einer zusätzlichen Versuchskohorte exklusiv 7 Tage nach der Konditionierung das auditorische Angstgedächtnis getestet hätte. Zusätzlich hätte man auch an einer weiteren Kohorte gezielt das STM durch eine Testphase bereits 2 h nach der Konditionierung auswerten können. Es ist allerdings nahezu ausgeschlossen, dass ein Fehlen der cGKII selektiv zu Defiziten des STM bei völlig intakter Gedächtniskonsolidierung führt. Zumal auch bei den Feldpotentialmessungen in der LA keine Defizite in der E-LTP unmittelbar nach der LTP-Induktion bei den cGKII-KO Tieren festgestellt wurden.

Insgesamt bekräftigen die in dieser Arbeit erzielten Befunde das Modell der Pawlow'schen Angstkonditionierung, demzufolge die LA den Ort darstellt, an dem die Bildung des auditorischen Angstgedächtnisses stattfindet. Zelluläre Basis hierfür ist die synaptische Potenzierung der auditorischen Inputs zur LA durch die gleichzeitige Aktivierung eines starken Inputs in Form des Fußschocks (Sigurdsson et al. 2007). Dazu passend leistet die in der LA eher moderat exprimierte cGKII (siehe Abb. 3.1), wie hier gezeigt, keinen wesentlichen Beitrag zur LTP und Angstkonsolidierung in der LA. Die deutlich stärker und bezüglich der Angstkonditionierung vor allem sehr selektiv in der LA vorhandene cGKI hingegen nimmt eine zentrale Rolle sowohl bei der LTP dort als auch beim auditorischen Angstlernen ein (Paul et al. 2008). So scheinen die Effekte von NO und cGMP für Lernprozesse und die LTP in der LA durch die cGKI vermittelt zu werden (Schafe et al. 2005a; Ota et al. 2008).

Auch der berechnete Einwand, dass Unterschiede in der Schmerzwahrnehmung und -verarbeitung bei den cGKII-KO Tieren das Ergebnis der Angstkonditionierung beeinflussen könnten, konnte durch eine Bestimmung der Schmerzschwelle ausgeschlossen werden (siehe Abb. 3.8). Trotz der besonders starken Expression der cGKII in thalamischen Kerngebieten – bekanntlich eine wichtige Region zur Aufnahme und Verarbeitung sensorischer Reize (vor allem auch Schmerzreize) – zeigten sich dort, wie bisherige Daten zu dieser Fragestellung erwarten ließen (Tegeder et al. 2004; Schmidtke et al. 2008), keine Abweichungen zwischen den cGKII^{-/-} und cGKII^{+/+} Tieren.

Auch im kontextuellen Angstgedächtnis, dessen Bildung wesentlich vom Hippocampus und dem basolateralen Kerngebiet der Amygdala (BLA) vermittelt wird, konnte keine Veränderung bei den cGKII-KO gegenüber den cGKII-ctr Tieren festgestellt werden. Dieser Befund steht in Einklang zum Abschneiden der cGKII-KO Tiere beim *Morris water maze* (Kleppisch 1999a).

4.4 Die Funktion der cGKII für basale Verhaltensweisen im Open Field

Es ist durchaus möglich, dass die cGKII einen Einfluss auf das grundlegende Verhalten der Versuchstiere hat. Durch die Analyse der Mäuse im *Open Field* sollte einerseits ausgeschlossen werden, dass signifikante Unterschiede im basalen Verhalten der cGKII-defizienten Tiere erhebliche Auswirkungen auf die Ergebnisse der Angstkonditionierung zur Folge haben (Abb. 3.9). Andererseits sollte auch weitere Einsicht in den Phänotyp der cGKII-KO Tiere gewonnen werden. Die cGKII^{-/-} Tiere zeigten im Vergleich zu den Kontrollen während der letzten 4 Minuten im *Open field* (Minute 6-10) eine verminderte Aktivität (siehe Abb. 3.9B). Dies schlug sich auch in der gemittelten Aktivität über die gesamten 10 Minuten im *Open Field* nieder. Man könnte daraus die Vermutung ableiten, dass ein Teil des *freezing* der cGKII^{-/-} Tiere bei der Angstkonditionierung (auditorisch und kontextuell) die unmittelbare Folge ihrer geringeren Aktivität darstellt und dadurch ein eventuelles Defizit der knock-out Mäuse beim assoziativen Angstlernen maskiert wurde. Folgende Beobachtungen allerdings sprechen gegen diese Hypothese: 1) Bei der Angstkonditionierung gab es keine Unterschiede der Freezing-Rate zwischen beiden Gruppen sowohl in der Phase vor der Konditionierung als auch vor allem in den Phasen ohne die Tonpräsentation (siehe Abb. 3.6). 2) Von Minute 0-6 war im *Open Field* die Aktivität der cGKII^{-/-} Tiere nicht vermindert. Diese Beobachtung ist insofern für die Angstkonditionierung von großer Bedeutung, da dort die Testphasen maximal 6 Minuten dauerten (siehe Tab. 2.20). Man kann deshalb davon ausgehen, dass für die gesamte Testphase bei der Angstkonditionierung die Aktivität der cGKII^{-/-} Tiere nicht vermindert war. 3) Bei der Analyse der „*Rearings*“ (Aufrichten auf die Hinterbeine) als Zeichen von Aktivität in der vertikalen Ebene des *Open Field* war weder zu irgendeinem Zeitpunkt im Zeitverlauf noch über die gesamten 10 Minuten ein Unterschied zwischen beiden Gruppen feststellbar (siehe Abb. 3.9A). In Ergänzung zu der moderaten Expression der cGKII in der LA und keiner funktionellen Rolle für die LTP dort scheint es aufgrund der soeben vorgestellten Argumente ausgeschlossen, dass dieser Phänotyp der cGKII-KO Mäuse im *Open Field* einen relevanten Effekt auf die Ergebnisse der Angstkonditionierung hatte. Für die insgesamt reduzierte Aktivität der cGKII^{-/-}

Mäuse im *Open Field* ist eine neuronale Ursache wie ein Mangel an Antrieb und Motivation und ein dadurch hervorgerufenes Defizit im Explorationsverhalten sehr wahrscheinlich abzulehnen, weil sich dann besonders auch Defizite in der vertikalen Aktivität, den sogenannten „*Rearings*“, bei den cGKII-KO Tieren hätten ergeben müssen, was hier nicht der Fall war. Viel eher ist die zeitabhängige Abnahme der horizontalen Aktivität ab Minute 6 in einer vorzeitigen physischen Erschöpfung und Ermüdung der cGKII-defizienten Mäuse begründet. Unterstützt wird diese Theorie durch zwei weitere auffällige Befunde der Analyse des *Open Field*. Denn die Wegstrecke, welche die cGKII-/- Tiere im *Open Field* zurücklegten, war im Vergleich zu den Kontrolltieren sowohl über die gesamten 10 Minuten als auch zu jedem Zeitpunkt im Zeitverlauf drastisch vermindert. Auch in der daraus ableitbaren mittleren Geschwindigkeit zeigte sich ein identisches Bild (siehe Abb. 3.9C/D). Zurückzuführen sind diese auffälligen Befunde auf den Phänotyp eines verminderten Knochenwachstums sowie den daraus resultierenden Kleinwuchs der cGKII-defizienten Tiere (Pfeifer et al. 1996; Miyazawa et al. 2002; Chikuda et al. 2004). Denn, wie in diesen Veröffentlichungen beschrieben, spielt die cGKII eine wichtige Rolle in der intrazellulären Signalkaskade beim Knochenwachstum. In Übereinstimmung zu den Befunden hier wurde eine verminderte Schwimmstrecke sowie ein reduziertes Schwimmtempo bei den cGKII-KO Tieren im *Morris water maze* festgestellt (Kleppisch 1999a).

Im *Open Field* können auch Rückschlüsse auf das generelle Angstlevel von Nagetieren erzielt werden, indem man die Thigmotaxis, d. h. den Aufenthalt der Versuchstiere im Randgebiet des *Open Field*, analysiert (siehe Punkt 2.5.2.1). Dabei zeigte sich ein signifikant erhöhtes basales Angstniveau der cGKII-KO Tiere. Dieser Befund passt zu einem schlechteren Abschneiden der cGKII-defizienten Mäuse in der „*Light-dark-box*“ und im „*Elevated-O-maze*“, zwei weiteren Verhaltensparadigmen zur Untersuchung des allgemeinen Angstverhaltens von Nagern, in einer früheren Studie (Werner et al. 2004). Damals wurde dieser Phänotyp eines erhöhten generellen Angstlevels mit einem Fehlen der cGKII in der Amygdala in Verbindung gebracht, da mittels *mRNA in situ hybridization* eine mäßig starke Expression des Enzyms in diesem Bereich bei Wildtypmäusen gezeigt werden konnte. Zudem war eine Rolle der Amygdala zur Regulation emotionaler Verhaltensweisen wie Angst durch zahlreiche Veröffentlichungen gesichert (LeDoux 1991, 1994, 1996; LaBar et al. 1998; LeDoux 2000). Außerdem wurde in einer früheren Arbeit beschrieben, dass sich die intraamygdaläre Applikation eines NOS-Inhibitors bei Ratten anxiogen auswirkt (Monzon et al. 2001). Es wäre demnach durchaus vorstellbar, dass der NO/cGMP/cGK-Signalweg an der Regulation des generellen Angstverhaltens durch die Amygdala beteiligt ist. Andererseits wäre es auch möglich, dass dieser beobachtete Phänotyp in den cGKII-KO Mäusen durch eine wesentliche Rolle des Enzyms in anderen, bislang weniger

beforschten Hirnarealen zustande kommt. In diesem Zusammenhang könnte die starke Expression der cGKII in Kerngebieten wie den serotonergen *Nuclei raphe* oder dem noradrenergen *Locus coeruleus* von Bedeutung sein (El-Husseini et al. 1995; 1999; de Vente et al. 2001; Werner et al. 2004). Denn in zahlreichen Veröffentlichungen ist eine modulatorische Funktion dieser im Hirnstamm gelegenen Kerngebiete für basale Verhaltensweisen wie Lokomotion, exploratives Verhalten und vor allem auch das allgemeine Angstlevel bei Nagetieren beschrieben (Stone et al. 2004; Lin et al. 2008; Lowry et al. 2008). Interessanterweise ist für die *Nuclei raphe* auch ein modulierender Einfluss auf limbische Strukturen wie die Amygdala gezeigt worden (Hensler 2006). Somit scheint es nicht ausgeschlossen, dass ein Fehlen der cGKII im *Locus coeruleus* und den *Nuclei raphe* zu dem in dieser Arbeit bestätigten erhöhten basalen Angstlevel bei den cGKII-defizienten Mäusen führt. Auch ein Zusammenspiel des Fehlens der cGKII in diesen Kerngebieten und der Amygdala wäre für den beobachteten Phänotyp gut vorstellbar. Bei Menschen gilt es als gesichert, dass Fehlfunktionen sowohl im *Locus coeruleus* als auch den *Nuclei raphe* eine wesentliche Rolle bei affektiven Störungen wie der Depression spielen können (Harro and Oreland 2001; Hornung 2003). Beruhend auf diesen Erkenntnissen sollte man in der Zukunft vielleicht gezielte Untersuchungen an den cGKII-defizienten Mäusen in diese Richtung anstellen und schauen, ob sie einen *Endophänotyp* der Depression darstellen. Bedingt durch die Unmöglichkeit, die heterogenen Symptome der Depression beim Menschen alle durch ein Mausmodell abzubilden und so „das Mausmodell der Depression“ zu kreieren, bedient man sich des Auswegs, einzelne Leitsymptome dieser Erkrankung bei Nagetieren zu erforschen. Bei der Depression stellt ein erhöhtes generelles Angstlevel einen solchen *Endophänotyp* dar, welcher bei Nagetieren gut messbar ist. Als Verhaltenstest zur Untersuchung depressiven Verhaltens bei Nagetieren mit der besten Reliabilität und Validität ist der sogenannte „*Forced swim Test*“ etabliert, bei welchem die Tiere in einen mit Wasser gefüllten Zylinder gegeben werden und dazu gezwungen sind zu schwimmen (Petit-Demouliere et al. 2005). Man könnte das Verhalten der cGKII-KO Mäuse mit gematchten Kontrolltieren in diesem Test vergleichen, wobei bei einer Interpretation des Ergebnisses die durch den Kleinwuchs hervorgerufenen körperlichen Defizite der cGKII-KO Mäuse zu berücksichtigen sind (Pfeifer et al. 1996; Miyazawa et al. 2002; Chikuda et al. 2004).

5 Zusammenfassung

Durch zahlreiche Arbeiten aus der Vergangenheit ist die Hypothese etabliert, dass die Grundlage von Lernen und Gedächtnis aktivitätsabhängige Veränderungen in der synaptischen Übertragung bilden. Das Paradigma der Pawlow'schen Angstkonditionierung stellt dabei ein geeignetes Modell dar, mit welchem die zugrundeliegenden synaptischen Mechanismen untersucht werden können (Sigurdsson et al. 2007). Die zentrale Rolle für diese assoziative Form des Lernens spielt die Amygdala, in welcher die verschiedenen sensorischen Informationen während der Konditionierung konvergieren (LeDoux 2000; Maren 2001; Maren and Quirk 2004). Als wichtiger molekularer Mechanismus der neuronalen Modulation in vielen verschiedenen Hirnarealen gilt der NO/cGMP-Signalweg (Schuman and Madison 1994; Feil and Kleppisch 2008). Aus vergangenen Veröffentlichungen weiß man, dass die Bildung des Botenstoffs NO auch in der Amygdala in die Bildung eines Angstgedächtnisses involviert ist (Schafe et al. 2005a; Sato et al. 2006). Ein wichtiger Downstream-Effektor des NO/cGMP-Signals ist die cGK. Diese intrazelluläre Serin-/Threoninkinase wird durch zwei verschiedene Gene (*prkg1* und *prkg2*) kodiert, aus welchen die cGK Typ I und II hervorgehen. Während die beiden cGKI-Isoformen cGKI α und cGKI β löslich im Zytosol vorliegen, ist die cGKII mit ihrem N-Terminus in der Plasmamembran verankert. Ziel der hier vorgestellten Arbeit war es, die Rolle der cGKII für die Bildung des assoziativen Angstgedächtnisses in der lateralen Amygdala (LA) sowie die dieser Bildung zugrundeliegende synaptische Plastizität zu untersuchen. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde ein konventionelles cGKII knock-out Mausmodell herangezogen.

Zunächst konnte mit Hilfe von Expressionsanalysen gezeigt werden, dass die cGKII in der LA in mäßig starker Konzentration vorhanden ist. Darüberhinaus konnte eine besonders starke Expression des Enzyms in thalamischen Kerngebieten (CGM/PIN), über welche die sensorischen Inputs bei der Angstkonditionierung zur LA einlaufen, demonstriert werden. Diese Daten ließen sowohl die Möglichkeit einer prä- als auch postsynaptischen Funktion der cGKII bei der Angstkonditionierung offen. Als nächstes wurde die funktionelle Rolle der cGKII für die synaptische Plastizität in der LA mit elektrophysiologischen Methoden analysiert. Dabei wurde weder im thalamischen noch im kortikalen Input zur LA ein Defizit der LTP bei den cGKII-defizienten Tieren festgestellt. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass ein Fehlen der cGKII keine entscheidende Rolle für die synaptische Plastizität in der LA spielt.

Man nimmt an, dass die Bildung eines assoziativen Angstgedächtnisses während der Pawlow'schen Konditionierung das Verhaltenskorrelat der zellulären Veränderungen während

der LTP-Induktion darstellt (Blair et al. 2001; Schafe et al. 2001; Rodrigues et al. 2004; Sigurdsson et al. 2007). In Übereinstimmung dazu waren auch bei den Konditionierungsversuchen keine signifikanten Unterschiede im auditorischen Angstlernen zwischen den cGKII-defizienten Mäusen und den dazugehörigen Kontrolltieren feststellbar. So konnten weder in einem Testdurchlauf 24 h nach der Konditionierung noch in einem weiteren 7 Tage später Lerndefizite bei den cGKII-KO Mäusen ausgemacht werden. Wie erwartet, zeigte sich auch im kontextuellen Angstlernen ein identisches Ergebnis.

Abgerundet wurden die Konditionierungsversuche schließlich durch eine umfangreiche Verhaltenscharakterisierung der verwendeten cGKII knock-out Mäuse im *Open Field*. Dabei wurde bei den cGKII-defizienten Tieren eine zeitabhängige Verminderung der horizontalen Aktivität im Vergleich zu den gematchten Kontrolltieren festgestellt, welche sich auch in der gemittelten Gesamtaktivität nach 10 Minuten niederschlug. Dieser auffällige Befund passt zu einer ebenfalls ermittelten deutlich geringeren zurückgelegten Wegstrecke und einer wiederum daraus ableitbaren reduzierten mittleren Geschwindigkeit der cGKII-KO Tiere im *Open Field*. Die Ursache für diesen Phänotyp ist aller Wahrscheinlichkeit nach in körperlichen Defiziten der cGKII-KO Tiere aufgrund ihres Kleinwuchses zu sehen (Pfeifer et al. 1996; Miyazawa et al. 2002; Chikuda et al. 2004). Außerdem wurde bei den cGKII-KO Tieren in Übereinstimmung zu einer früheren Publikation ein erhöhtes generelles Angstverhalten im *Open Field* mit Hilfe der Auswertung der Thigmotaxis festgestellt (Werner et al. 2004). Für diesen Phänotyp könnte ein Fehlen der cGKII in der Amygdala als Ursache in Frage kommen, wie auch schon in dieser Arbeit vorgeschlagen wurde. Andererseits wäre es auch vorstellbar, dass ein Fehlen der Proteinkinase in neuromodulatorischen Hirnbereichen wie dem *Locus coeruleus* und den *Nuclei raphe* dafür verantwortlich ist und die cGKII-KO Tiere einen *Endophänotyp* depressiven Verhaltens darstellen. Um detaillierte und verlässliche Aussagen darüber treffen zu können, wären weitere Verhaltensversuche wie etwa der *Forced Swim Test* notwendig.

6 Anhang

6.1 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Proteinase K-Puffer
Tab. 2.2:	10 x PCR-Puffer
Tab. 2.3:	Primersequenzen für cGKII-KO-Genotypisierung
Tab. 2.4:	PCR-Programm für Genotypisierung
Tab. 2.5:	10 x TBE-Puffer
Tab. 2.6:	6 x DNA-Auftragspuffer
Tab. 2.7:	PBS, pH 7,4
Tab. 2.8:	Fixierlösung
Tab. 2.9:	Antigen-Retrieval-Puffer, pH 6,0
Tab. 2.10:	Lysis-Puffer, pH 7,4
Tab. 2.11:	4 x Tris-HCl/SDS, pH 6,8
Tab. 2.12:	4 x Tris-HCl/SDS, pH 8,8
Tab. 2.13:	Polyacrylamid-Trenngel 10 %
Tab. 2.14:	Polyacrylamid-Sammelgel
Tab. 2.15:	10 x SDS-Elektrophorese-Laufpuffer
Tab. 2.16:	6 x SDS-Probenpuffer
Tab. 2.17:	Blotting-Lösungen
Tab. 2.18:	10 x TBS, pH 8,2
Tab. 2.19:	1 x TBST
Tab. 2.20:	Phasen der Angstkonditionierung („Fear Conditioning“ = FC)
Tab. 2.21:	Sensibilisierungsprotokoll 1
Tab. 2.22:	Sensibilisierungsprotokoll 2
Tab. 6.1:	Verwendete Antikörper

6.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1: Lage der Amygdala
- Abb. 1.2: Wichtige Kerngebiete der Amygdala bei der Angstkonditionierung und ihre Verknüpfung
- Abb. 1.3: Taxonomisches Schema zum Langzeitgedächtnis von Säugetieren
- Abb. 1.4: Zeitlicher Ablauf der Angstkonditionierung und Vielfalt der gezeigten Angstreaktionen
- Abb. 1.5: Neuroanatomischer Schaltkreis während der auditorischen Angstkonditionierung
- Abb. 1.6: Bei der Angstkonditionierung und der LTP in der lateralen Amygdala involvierte Signalmoleküle und Signalwege
- Abb. 1.7: Schematisches Modell der Struktur der cGKII
- Abb. 2.1: Anordnung der Reiz- und Ableitelektrode bei Feldpotentialmessungen in der lateralen Amygdala
- Abb. 2.2: Verwendeter 100 Hz-Tetanus zur Induktion der Langzeitpotenzierung in der LA
- Abb. 2.3: Form und Verlauf eines extrazellulär abgeleiteten Feldpotentials (FP)
- Abb. 2.4: Beispielhafter Anstieg des Feldpotentials nach Einwaschen von Picrotoxin (20 μ M)
- Abb. 2.5: Versuchsaufbau bei den Konditionierungsversuchen
- Abb. 2.6: Modell der 2-Komponenten-Theorie bei der Angstkonditionierung
- Abb. 3.1: Immunhistochemischer Nachweis der cGKII in der lateralen Amygdala
- Abb. 3.2: Nachweis der cGKII in der Amygdala mittels Western Blot
- Abb. 3.3: Basale synaptische Transmission in der lateralen Amygdala (LA)
- Abb. 3.4: Langzeitpotenzierung in der lateralen Amygdala
- Abb. 3.5: Angstkonditionierung mit Protokoll 1 an Wildtypmäusen (C57BL/6J)
- Abb. 3.6: Angstkonditionierung an cGKII-KO Mäusen mit Protokoll 1
- Abb. 3.7: Sensitierungsversuche mit C57BL/6J Mäusen
- Abb. 3.8: Bestimmung der Schmerzschwelle
- Abb. 3.9: Ergebnisse des Open Field Tests an cGKII-KO Mäusen
- Abb. 4.1: Zeitverlauf des auditorischen Angstlernens an C57BL/6J Mäusen

6.3 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μA	Mikroampere
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
μs	Mikrosekunden
AB	akzessorisch basaler Kern der Amygdala
Abb.	Abbildung
ACSF	„ <i>artificial cerebrospinal fluid</i> “ = artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit
ADPRTF	ADP-Ribosyltransferase
AMPA	α-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4- Isoxazolpropionsäure
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
B	basaler Kern der Amygdala
BCA	„ <i>bicinchonone acid</i> “ = Bicinchononsäure
BDNF	„ <i>brain derived neurotrophic factor</i> “
BLA	basolateraler Kern der Amygdala
BSA	Rinderserumalbumin
CA1	„ <i>Cornu ammonis I</i> “ = Region 1 im Ammonshorn des Hippocampus
Ca ²⁺	Calcium
CaMK	Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase
CE	zentraler Kern der Amygdala
CFTR	„ <i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> “, Chloridkanal
cGKI	zyklisches Guanosinmonophosphat-abhängige Proteinkinase Typ I
cGKII	zyklisches Guanosinmonophosphat-abhängige Proteinkinase Typ II
CGM	„ <i>Corpus geniculatum mediale</i> “, Region im Thalamus
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CNG	„ <i>cyclic nucleotide gated ion channel</i> “
CPU	„ <i>Caudate putamen</i> “ = Striatum (Nucleus caudatus + Putamen)

CREB	<i>cAMP</i> (zyklisches Adenosinmonophosphat) <i>response element binding protein</i>
CS	„ <i>conditioned stimulus</i> “ = konditionierter Reiz
CTD	C-terminale Domäne
ctr	Kontrolltiere
DAB	Diaminobenzidin
dB	Dezibel
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	2`-Desoxynucleosid-5`-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N`,N`-tetraessigsäure
EPSC	“ <i>excitatory postsynaptic current</i> ” = erregender postsynaptischer Strom
ERK	<i>extracellular related-signal protein kinase</i>
ES	embryonale Stammzellen
EtOH	Ethanol
FA	Formaldehyd
FC	“ <i>Fear Conditioning</i> ” = Angstkonditionierung
FP	Feldpotential
g	Gramm
GABA	γ -Amino-Buttersäure
GluR1 bzw. 2	Untereinheiten des AMPA-Rezeptors
h	Stunde/Stunden
HCN	“ <i>Hyperpolarization and cyclic nucleotide gated ion channel</i> ”
HRP	„ <i>horseradish peroxidase</i> “ = Meerrettich-Peroxidase
Hz	Hertz
IHC	Immunhistochemie
IOR	“ <i>input-output-relation</i> ”
k	Kilo
KO	<i>knock-out</i>
LA	lateraler Kern der Amygdala
LAd	dorsolateraler Kern der Amygdala

LAm	mediolateraler Kern der Amygdala
LA _v	ventrolateraler Kern der Amygdala
LTD	„ <i>long-term depression</i> “ = Langzeitdepression
LTM	„ <i>long-term memory</i> “ = Langzeitgedächtnis
LTP	„ <i>long-term potentiation</i> “ = Langzeitpotenzierung
E-LTP	„ <i>early long-term potentiation</i> “ = frühe Phase der Langzeitpotenzierung
L-LTP	„ <i>late long-term potentiation</i> “ = späte Phase der Langzeitpotenzierung
m	Meter
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	„ <i>mitogen-activated-protein kinase</i> “
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium
min.	Minute/Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mPer1 bzw. 2	„ <i>Clock genes</i> “, Gene mit Funktion für den circadianen Rhythmus
mRNA	„ <i>messenger RNA</i> “ = Boten-RNA
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
eNOS	endotheliale NO-Synthase
nNOS	neuronale NO-Synthase
PAGE	Polyacrylamid Gel-Elektrophorese
PBS	„ <i>phosphate buffered saline</i> “ = Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	„ <i>polymerase chain reaction</i> “ = Polymerase-Kettenreaktion
PIN	posteriorer intralaminarer Nucleus, Kerngebiet des Thalamus
PKA	zyklisches Adenosinmonophosphat-abhängige Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G = cGK
PPF	„ <i>paired pulse facilitation</i> “
prkg1 bzw. 2	Gene für die cGKs

PVC	Polyvinylchlorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RF	„ <i>reverse forward</i> “ (bei Primern)
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde/Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
sGC	lösliche Guanylylzyklase
STM	„ <i>short-term memory</i> “ = Kurzzeitgedächtnis
TA	“ <i>transit area</i> ” = Übergangszone vom Thalamus zur Amygdala
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	„ <i>tris buffered saline</i> “ = Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	TBS mit Tween® 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	α,α,α -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
TrkB	neurotropher Tyrosinkinaserzeptor Typ B (bindet BDNF)
u. a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
US	„ <i>unconditioned stimulus</i> “ = unconditionierter Reiz
V	Volt
VGCC	“ <i>voltage-gated calcium channel</i> ” = spannungsgesteuerter Calcium-Kanal
VOR	vestibulookulärer Reflex
WT	Wildtyp
x g	-fache Erdbeschleunigung
z. B.	zum Beispiel

6.4 Verwendete Antikörper

Art	Name	Wirt	Verdünnung	Herkunft
Primärantikörper	cGKII (sc-25430)	Kaninchen	1:1000 für Western Blot 1:50 für IHC	Santa Cruz Biotechnology
Primärantikörper	cGKI α (sc-10335)	Ziege	1:500 für Western Blot	Santa Cruz Biotechnology
Primärantikörper	cGKI β (sc-10342)	Ziege	1:500 für Western Blot	Santa Cruz Biotechnology
Sekundärantikörper	anti-rabbit IgG, HRP-konjugiert	Ziege	1:2000 für Western Blot	Cell Signaling
Sekundärantikörper	anti-rabbit IgG biotinyliert	Ziege	1:200 für IHC	Vector Laboratories
Sekundärantikörper	anti-goat IgG, HRP-konjugiert	Esel	1:2000 für Western Blot	Santa Cruz Biotechnology

Tab. 6.1 Verwendete Antikörper

7 Literaturverzeichnis

7.1 Zitierte Veröffentlichungen

- Amaral (1992) Anatomical organization of the primate amygdaloid complex. In, pp 1-66: Aggleton.
- Apergis-Schoute AM, Debiec J, Doyere V, LeDoux JE, Schafe GE (2005) Auditory fear conditioning and long-term potentiation in the lateral amygdala require ERK/MAP kinase signaling in the auditory thalamus: a role for presynaptic plasticity in the fear system. *J Neurosci* 25:5730-5739.
- Arancio O, Kandel ER, Hawkins RD (1995) Activity-dependent long-term enhancement of transmitter release by presynaptic 3',5'-cyclic GMP in cultured hippocampal neurons. *Nature* 376:74-80.
- Barry MF, Ziff EB (2002) Receptor trafficking and the plasticity of excitatory synapses. *Curr Opin Neurobiol* 12:279-286.
- Bauer EP, Schafe GE, LeDoux JE (2002) NMDA receptors and L-type voltage-gated calcium channels contribute to long-term potentiation and different components of fear memory formation in the lateral amygdala. *J Neurosci* 22:5239-5249.
- Bechara A, Tranel D, Damasio H, Adolphs R, Rockland C, Damasio AR (1995) Double dissociation of conditioning and declarative knowledge relative to the amygdala and hippocampus in humans. *Science* 269:1115-1118.
- Blair HT, Schafe GE, Bauer EP, Rodrigues SM, LeDoux JE (2001) Synaptic plasticity in the lateral amygdala: a cellular hypothesis of fear conditioning. *Learn Mem* 8:229-242.
- Bliss TV, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:331-356.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
- Bolshakov VY, Siegelbaum SA (1995) Regulation of hippocampal transmitter release during development and long-term potentiation. *Science* 269:1730-1734.
- Bradley J, Zhang Y, Bakin R, Lester HA, Ronnett GV, Zinn K (1997) Functional expression of the heteromeric "olfactory" cyclic nucleotide-gated channel in the hippocampus: a potential effector of synaptic plasticity in brain neurons. *J Neurosci* 17:1993-2005.
- Bredt DS, Nicoll RA (2003) AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron* 40:361-379.
- Breiter HC, Etcoff NL, Whalen PJ, Kennedy WA, Rauch SL, Buckner RL, Strauss MM, Hyman SE, Rosen BR (1996) Response and habituation of the human amygdala during visual processing of facial expression. *Neuron* 17:875-887.
- Brodal (1982) *Neurological Anatomy*. New York: Oxford Univ. Press.
- Buchel C, Morris J, Dolan RJ, Friston KJ (1998) Brain systems mediating aversive conditioning: an event-related fMRI study. *Neuron* 20:947-957.
- Cahill L, McGaugh JL (1998) Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends Neurosci* 21:294-299.
- Cahill L, Weinberger NM, Roozendaal B, McGaugh JL (1999) Is the amygdala a locus of "conditioned fear"? Some questions and caveats. *Neuron* 23:227-228.

- Cassell MD, Freedman LJ, Shi C (1999) The intrinsic organization of the central extended amygdala. *Ann N Y Acad Sci* 877:217-241.
- Chapman PF, Bellavance LL (1992) Induction of long-term potentiation in the basolateral amygdala does not depend on NMDA receptor activation. *Synapse* 11:310-318.
- 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.
- Chien WL, Liang KC, Teng CM, Kuo SC, Lee FY, Fu WM (2005) Enhancement of learning behaviour by a potent nitric oxide-guanylate cyclase activator YC-1. *Eur J Neurosci* 21:1679-1688.
- Chikuda H, Kugimiya F, Hoshi K, Ikeda T, Ogasawara T, Shimoaka T, Kawano H, Kamekura S, Tsuchida A, Yokoi N, Nakamura K, Komeda K, Chung UI, Kawaguchi H (2004) Cyclic GMP-dependent protein kinase II is a molecular switch from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes. *Genes Dev* 18:2418-2429.
- Citri A, Malenka RC (2008) Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33:18-41.
- Clugnet MC, LeDoux JE (1990) Synaptic plasticity in fear conditioning circuits: induction of LTP in the lateral nucleus of the amygdala by stimulation of the medial geniculate body. *J Neurosci* 10:2818-2824.
- Collins DR, Pare D (2000) Differential fear conditioning induces reciprocal changes in the sensory responses of lateral amygdala neurons to the CS(+) and CS(-). *Learn Mem* 7:97-103.
- de Vente J, Asan E, Gambaryan S, Markerink-van Ittersum M, Axer H, Gallatz K, Lohmann SM, Palkovits M (2001) Localization of cGMP-dependent protein kinase type II in rat brain. *Neuroscience* 108:27-49.
- Doron NN, LeDoux JE (2000) Cells in the posterior thalamus project to both amygdala and temporal cortex: a quantitative retrograde double-labeling study in the rat. *J Comp Neurol* 425:257-274.
- 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.
- El-Husseini AE, Bladen C, Vincent SR (1995) Molecular characterization of a type II cyclic GMP-dependent protein kinase expressed in the rat brain. *J Neurochem* 64:2814-2817.
- El-Husseini AE, Williams J, Reiner PB, Pelech S, Vincent SR (1999) Localization of the cGMP-dependent protein kinases in relation to nitric oxide synthase in the brain. *J Chem Neuroanat* 17:45-55.
- Fanselow MS, LeDoux JE (1999) Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. *Neuron* 23:229-232.
- Farb CR, LeDoux JE (1997) NMDA and AMPA receptors in the lateral nucleus of the amygdala are postsynaptic to auditory thalamic afferents. *Synapse* 27:106-121.
- Feil R, Kleppisch T (2008) NO/cGMP-dependent modulation of synaptic transmission. *Handb Exp Pharmacol*:529-560.
- Feil R, Hofmann F, Kleppisch T (2005) Function of cGMP-dependent protein kinases in the nervous system. *Rev Neurosci* 16:23-41.
- Feil R, Hartmann J, Luo C, Wolfsgruber W, Schilling K, Feil S, Barski JJ, Meyer M, Konnerth A, De Zeeuw CI, Hofmann F (2003) Impairment of LTD and cerebellar learning by Purkinje cell-specific ablation of cGMP-dependent protein kinase I. *J Cell Biol* 163:295-302.
- Garelick MG, Storm DR (2005) The relationship between memory retrieval and memory extinction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9091-9092.

- Goosens KA, Hobin JA, Maren S (2003) Auditory-evoked spike firing in the lateral amygdala and Pavlovian fear conditioning: mnemonic code or fear bias? *Neuron* 40:1013-1022.
- Harro J, Orelund L (2001) Depression as a spreading adjustment disorder of monoaminergic neurons: a case for primary implication of the locus coeruleus. *Brain Res Brain Res Rev* 38:79-128.
- Hawkins RD, Zhuo M, Arancio O (1994) Nitric oxide and carbon monoxide as possible retrograde messengers in hippocampal long-term potentiation. *J Neurobiol* 25:652-665.
- Hawkins RD, Son H, Arancio O (1998) Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus. *Prog Brain Res* 118:155-172.
- Helmstetter FJ, Bellgowan PS (1994) Effects of muscimol applied to the basolateral amygdala on acquisition and expression of contextual fear conditioning in rats. *Behav Neurosci* 108:1005-1009.
- Hensler JG (2006) Serotonergic modulation of the limbic system. *Neurosci Biobehav Rev* 30:203-214.
- Hofmann F, Feil R, Kleppisch T, Schlossmann J (2006) Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev* 86:1-23.
- Hornung JP (2003) The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J Chem Neuroanat* 26:331-343.
- Huang CC, Gean PW (1994) Paired-pulse depression of the N-methyl-D-aspartate receptor-mediated synaptic potentials in the amygdala. *Br J Pharmacol* 113:1029-1035.
- Huang EP (1997) Synaptic plasticity: a role for nitric oxide in LTP. *Curr Biol* 7:R141-143.
- Huang YY, Kandel ER (1998) Postsynaptic induction and PKA-dependent expression of LTP in the lateral amygdala. *Neuron* 21:169-178.
- 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, Shaban H, Bissiere S, Luthi A (2003) Presynaptic induction of heterosynaptic associative plasticity in the mammalian brain. *Nature* 426:841-845.
- 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.
- Isaacson (1982) *The Limbic System*. In. New York: Plenum.
- Ito M, Karachot L (1990) Messengers mediating long-term desensitization in cerebellar Purkinje cells. *Neuroreport* 1:129-132.
- 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.
- Jarchau T, Hausler C, Markert T, Pohler D, Vanderkerckhove J, De Jonge HR, Lohmann SM, Walter U (1994) Cloning, expression, and in situ localization of rat intestinal cGMP-dependent protein kinase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9426-9430.
- Kamprath K, Wotjak CT (2004) Nonassociative learning processes determine expression and extinction of conditioned fear in mice. *Learn Mem* 11:770-786.
- Kihlstrom JF (1987) The cognitive unconscious. *Science* 237:1445-1452.
- Kleppisch T (1999a) Langzeitpotenzierung im Hippocampus: Die funktionelle Rolle von zyklischem Guanosinmonophosphat und der Zyko-Guanosinmonophosphat-abhängigen Proteininkinase. In: Fakultät für Medizin. München: Technische Universität München.
- Kleppisch T, Pfeifer A, Klatt P, Ruth P, Montkowski A, Fassler R, Hofmann F (1999b) Long-term potentiation in the hippocampal CA1 region of mice lacking cGMP-dependent kinases is normal and susceptible to inhibition of nitric oxide synthase. *J Neurosci* 19:48-55.

- Kleppisch T, Wolfsgruber W, Feil S, Allmann R, Wotjak CT, Goebbels S, Nave KA, Hofmann F, Feil R (2003) Hippocampal cGMP-dependent protein kinase I supports an age- and protein synthesis-dependent component of long-term potentiation but is not essential for spatial reference and contextual memory. *J Neurosci* 23:6005-6012.
- Kotter R, Meyer N (1992) The limbic system: a review of its empirical foundation. *Behav Brain Res* 52:105-127.
- Kullmann DM, Siegelbaum SA (1995) The site of expression of NMDA receptor-dependent LTP: new fuel for an old fire. *Neuron* 15:997-1002.
- LaBar KS, LeDoux JE, Spencer DD, Phelps EA (1995) Impaired fear conditioning following unilateral temporal lobectomy in humans. *J Neurosci* 15:6846-6855.
- LaBar KS, Gatenby JC, Gore JC, LeDoux JE, Phelps EA (1998) Human amygdala activation during conditioned fear acquisition and extinction: a mixed-trial fMRI study. *Neuron* 20:937-945.
- LeDoux JE (1987) *The Nervous System*.
- LeDoux JE (1991) Emotion and the limbic system concept. *Concepts Neurosci*:169-199.
- LeDoux JE (1994) Emotion, memory and the brain. *Sci Am* 270:50-57.
- LeDoux JE (1996) In: *The Emotional Brain*. New York: Simon & Schuster.
- LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23:155-184.
- LeDoux JE, Farb C, Ruggiero DA (1990a) Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. *J Neurosci* 10:1043-1054.
- LeDoux JE, Farb CR, Romanski LM (1991) Overlapping projections to the amygdala and striatum from auditory processing areas of the thalamus and cortex. *Neurosci Lett* 134:139-144.
- LeDoux JE, Cicchetti P, Xagoraris A, Romanski LM (1990b) The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J Neurosci* 10:1062-1069.
- Lee HK, Takamiya K, Han JS, Man H, Kim CH, Rumbaugh G, Yu S, Ding L, He C, Petralia RS, Wenthold RJ, Gallagher M, Huganir RL (2003) Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. *Cell* 112:631-643.
- Leinders-Zufall T, Rosenboom H, Barnstable CJ, Shepherd GM, Zufall F (1995) A calcium-permeable cGMP-activated cation conductance in hippocampal neurons. *Neuroreport* 6:1761-1765.
- Li XF, Stutzmann GE, LeDoux JE (1996) Convergent but temporally separated inputs to lateral amygdala neurons from the auditory thalamus and auditory cortex use different postsynaptic receptors: in vivo intracellular and extracellular recordings in fear conditioning pathways. *Learn Mem* 3:229-242.
- Lin Y, Quartermain D, Dunn AJ, Weinshenker D, Stone EA (2008) Possible dopaminergic stimulation of locus coeruleus alpha1-adrenoceptors involved in behavioral activation. *Synapse* 62:516-523.
- Linke R, Braune G, Schwegler H (2000) Differential projection of the posterior paralaminar thalamic nuclei to the amygdaloid complex in the rat. *Exp Brain Res* 134:520-532.
- Lisman J, Raghavachari S (2006) A unified model of the presynaptic and postsynaptic changes during LTP at CA1 synapses. *Sci STKE* 2006:re11.
- Lowry CA, Hale MW, Evans AK, Heerkens J, Staub DR, Gasser PJ, Shekhar A (2008) Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. *Ann N Y Acad Sci* 1148:86-94.
- Lu YF, Kandel ER, Hawkins RD (1999) Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. *J Neurosci* 19:10250-10261.
- MacLean PD (1949) Psychosomatic disease and the visceral brain; recent developments bearing on the Papez theory of emotion. *Psychosom Med* 11:338-353.

- MacLean PD (1952) Some psychiatric implications of physiological studies on frontotemporal portion of limbic system (visceral brain). *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 4:407-418.
- Malenka RC, Bear MF (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44:5-21.
- Malinow R (1991) Transmission between pairs of hippocampal slice neurons: quantal levels, oscillations, and LTP. *Science* 252:722-724.
- Malinow R (1998) Silencing the controversy in LTP? *Neuron* 21:1226-1227.
- Malinow R, Tsien RW (1990) Presynaptic enhancement shown by whole-cell recordings of long-term potentiation in hippocampal slices. *Nature* 346:177-180.
- Malinow R, Mainen ZF (1996) Long-term potentiation in the CA1 hippocampus. *Science* 271:1604-1606.
- Malinow R, Malenka RC (2002) AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 25:103-126.
- Maren S (2001) Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci* 24:897-931.
- Maren S, Quirk GJ (2004) Neuronal signalling of fear memory. *Nat Rev Neurosci* 5:844-852.
- 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.
- 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.
- McKernan MG, Shinnick-Gallagher P (1997) Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro. *Nature* 390:607-611.
- McNaughton BL, Douglas RM, Goddard GV (1978) Synaptic enhancement in fascia dentata: cooperativity among coactive afferents. *Brain Res* 157:277-293.
- Milner B, Squire LR, Kandel ER (1998) Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20:445-468.
- Miyazawa T, Ogawa Y, Chusho H, Yasoda A, Tamura N, Komatsu Y, Pfeifer A, Hofmann F, Nakao K (2002) Cyclic GMP-dependent protein kinase II plays a critical role in C-type natriuretic peptide-mediated endochondral ossification. *Endocrinology* 143:3604-3610.
- Monzon ME, Varas MM, De Barioglio SR (2001) Anxiogenesis induced by nitric oxide synthase inhibition and anxiolytic effect of melanin-concentrating hormone (MCH) in rat brain. *Peptides* 22:1043-1047.
- Morris JS, Ohman A, Dolan RJ (1998) Conscious and unconscious emotional learning in the human amygdala. *Nature* 393:467-470.
- Mulberg AE, Resta LP, Wiedner EB, Altschuler SM, Jefferson DM, Broussard DL (1995) Expression and localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA and its protein in rat brain. *J Clin Invest* 96:646-652.
- Muller J, Corodimas KP, Fridel Z, LeDoux JE (1997) Functional inactivation of the lateral and basal nuclei of the amygdala by muscimol infusion prevents fear conditioning to an explicit conditioned stimulus and to contextual stimuli. *Behav Neurosci* 111:683-691.
- Öhman (1992) Fear and anxiety as emotional phenomena: clinical, phenomenological, evolutionary perspectives, and information-processing mechanisms. In: (Haviland SL, ed), pp 511-536.
- Oster H, Werner C, Magnone MC, Mayser H, Feil R, Seeliger MW, Hofmann F, Albrecht U (2003) cGMP-dependent protein kinase II modulates mPer1 and mPer2 gene induction and influences phase shifts of the circadian clock. *Curr Biol* 13:725-733.

- 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.
- Packard MG, Cahill L, McGaugh JL (1994) Amygdala modulation of hippocampal-dependent and caudate nucleus-dependent memory processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8477-8481.
- Pare D, Smith Y, Pare JF (1995) Intra-amygdaloid projections of the basolateral and basomedial nuclei in the cat: Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin anterograde tracing at the light and electron microscopic level. *Neuroscience* 69:567-583.
- 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.
- Petit-Demouliere B, Chenu F, Bourin M (2005) Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl)* 177:245-255.
- Pfeifer A, Aszodi A, Seidler U, Ruth P, Hofmann F, Fassler R (1996) Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science* 274:2082-2086.
- Pfeifer A, Ruth P, Dostmann W, Sausbier M, Klatt P, Hofmann F (1999) Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 135:105-149.
- Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, Ny L, Sausbier M, Hirneiss C, Wang GX, Korth M, Aszodi A, Andersson KE, Krombach F, Mayerhofer A, Ruth P, Fassler R, Hofmann F (1998) Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *Embo J* 17:3045-3051.
- Phelps EA, LaBar KS, Spencer DD (1997) Memory for emotional words following unilateral temporal lobectomy. *Brain Cogn* 35:85-109.
- Pitkanen (2000) *Connectivity of the rat amygdaloid complex*, Oxford University Press Edition. Oxford.
- 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.
- Quirk GJ, Repa C, LeDoux JE (1995) Fear conditioning enhances short-latency auditory responses of lateral amygdala neurons: parallel recordings in the freely behaving rat. *Neuron* 15:1029-1039.
- Quirk GJ, Armony JL, LeDoux JE (1997) Fear conditioning enhances different temporal components of tone-evoked spike trains in auditory cortex and lateral amygdala. *Neuron* 19:613-624.
- Repa C (2002) The neural basis for emotional learning: Electrophysiological investigations of fear conditioning. In: New York: New York University.
- Repa JC, Muller J, Apergis J, Desrochers TM, Zhou Y, LeDoux JE (2001) Two different lateral amygdala cell populations contribute to the initiation and storage of memory. *Nat Neurosci* 4:724-731.
- Rodrigues SM, Schafe GE, LeDoux JE (2001) Intra-amygdala blockade of the NR2B subunit of the NMDA receptor disrupts the acquisition but not the expression of fear conditioning. *J Neurosci* 21:6889-6896.
- Rodrigues SM, Schafe GE, LeDoux JE (2004) Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala. *Neuron* 44:75-91.
- Rodrigues SM, Bauer EP, Farb CR, Schafe GE, LeDoux JE (2002) The group I metabotropic glutamate receptor mGluR5 is required for fear memory formation and long-term potentiation in the lateral amygdala. *J Neurosci* 22:5219-5229.

- Rogan MT (2001) Long-term potentiation in the amygdala: implications for memory., Cambridge University Press Edition. Cambridge.
- Rogan MT, LeDoux JE (1995) LTP is accompanied by commensurate enhancement of auditory-evoked responses in a fear conditioning circuit. *Neuron* 15:127-136.
- Rogan MT, Staubli UV, LeDoux JE (1997) Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature* 390:604-607.
- Romanski LM, LeDoux JE (1993) Information cascade from primary auditory cortex to the amygdala: corticocortical and corticoamygdaloid projections of temporal cortex in the rat. *Cereb Cortex* 3:515-532.
- Rosenkranz JA, Grace AA (2002) Dopamine-mediated modulation of odour-evoked amygdala potentials during pavlovian conditioning. *Nature* 417:282-287.
- Royer S, Martina M, Pare D (1999) An inhibitory interface gates impulse traffic between the input and output stations of the amygdala. *J Neurosci* 19:10575-10583.
- Rumpel S, LeDoux J, Zador A, Malinow R (2005) Postsynaptic receptor trafficking underlying a form of associative learning. *Science* 308:83-88.
- Ruth P, Landgraf W, Keilbach A, May B, Egleme C, Hofmann F (1991) The activation of expressed cGMP-dependent protein kinase isozymes I alpha and I beta is determined by the different amino-termini. *Eur J Biochem* 202:1339-1344.
- 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.
- Savchenko A, Barnes S, Kramer RH (1997) Cyclic-nucleotide-gated channels mediate synaptic feedback by nitric oxide. *Nature* 390:694-698.
- Schafe GE, Doyere V, LeDoux JE (2005) Tracking the fear engram: the lateral amygdala is an essential locus of fear memory storage. *J Neurosci* 25:10010-10014.
- Schafe GE, Doyere V, LeDoux JE (2005b) Tracking the fear engram: the lateral amygdala is an essential locus of fear memory storage. *J Neurosci* 25:10010-10014.
- Schafe GE, Nader K, Blair HT, LeDoux JE (2001) Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. *Trends Neurosci* 24:540-546.
- Schafe GE, Bauer EP, Rosis S, Farb CR, Rodrigues SM, LeDoux JE (2005a) Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning requires nitric oxide signaling in the lateral amygdala. *Eur J Neurosci* 22:201-211.
- Schmidt H, Werner M, Heppenstall PA, Henning M, More MI, Kuhbandner S, Lewin GR, Hofmann F, Feil R, Rathjen FG (2002) cGMP-mediated signaling via cGKIalpha is required for the guidance and connectivity of sensory axons. *J Cell Biol* 159:489-498.
- Schmidtko A, Ruth P, Geisslinger G, Tegeder I (2003) Inhibition of cyclic guanosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase I (PKG-I) in lumbar spinal cord reduces formalin-induced hyperalgesia and PKG upregulation. *Nitric Oxide* 8:89-94.
- Schmidtko A, Gao W, Konig P, Heine S, Motterlini R, Ruth P, Schlossmann J, Koesling D, Niederberger E, Tegeder I, Friebe A, Geisslinger G (2008) cGMP produced by NO-sensitive guanylyl cyclase essentially contributes to inflammatory and neuropathic pain by using targets different from cGMP-dependent protein kinase I. *J Neurosci* 28:8568-8576.
- Schuman EM, Madison DV (1994) Nitric oxide and synaptic function. *Annu Rev Neurosci* 17:153-183.
- Schuman EM, Meffert MK, Schulman H, Madison DV (1994) An ADP-ribosyltransferase as a potential target for nitric oxide action in hippocampal long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11958-11962.
- Serulle Y, Zhang S, Ninan I, Puzzo D, McCarthy M, Khatri L, Arancio O, Ziff EB (2007) A GluR1-cGKII interaction regulates AMPA receptor trafficking. *Neuron* 56:670-688.

- Shaban H, Humeau Y, Herry C, Cassasus G, Shigemoto R, Ciochi S, Barbieri S, van der Putten H, Kaupmann K, Bettler B, Luthi A (2006) Generalization of amygdala LTP and conditioned fear in the absence of presynaptic inhibition. *Nat Neurosci* 9:1028-1035.
- Sheng M, Lee SH (2001) AMPA receptor trafficking and the control of synaptic transmission. *Cell* 105:825-828.
- Shi CJ, Cassell MD (1997) Cortical, thalamic, and amygdaloid projections of rat temporal cortex. *J Comp Neurol* 382:153-175.
- Shibuki K, Okada D (1991) Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature* 349:326-328.
- Sigurdsson T, Doyere V, Cain CK, LeDoux JE (2007) Long-term potentiation in the amygdala: a cellular mechanism of fear learning and memory. *Neuropharmacology* 52:215-227.
- 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.
- Song I, Huganir RL (2002) Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 25:578-588.
- Stone EA, Lin Y, Ahsan R, Quartermain D (2004) Role of locus coeruleus alpha1-adrenoceptors in motor activity in rats. *Synapse* 54:164-172.
- Tegeder I, Del Turco D, Schmidtko A, Sausbier M, Feil R, Hofmann F, Deller T, Ruth P, Geisslinger G (2004) Reduced inflammatory hyperalgesia with preservation of acute thermal nociception in mice lacking cGMP-dependent protein kinase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3253-3257.
- Tischkau SA, Mitchell JW, Pace LA, Barnes JW, Barnes JA, Gillette MU (2004) Protein kinase G type II is required for night-to-day progression of the mammalian circadian clock. *Neuron* 43:539-549.
- Tranel D, Gullickson G, Koch M, Adolphs R (2006) Altered experience of emotion following bilateral amygdala damage. *Cogn Neuropsychiatry* 11:219-232.
- Tronson NC, Taylor JR (2007) Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nat Rev Neurosci* 8:262-275.
- Tsvetkov E, Shin RM, Bolshakov VY (2004) Glutamate uptake determines pathway specificity of long-term potentiation in the neural circuitry of fear conditioning. *Neuron* 41:139-151.
- Tsvetkov E, Carlezon WA, Benes FM, Kandel ER, Bolshakov VY (2002) Fear conditioning occludes LTP-induced presynaptic enhancement of synaptic transmission in the cortical pathway to the lateral amygdala. *Neuron* 34:289-300.
- Uhler MD (1993) Cloning and expression of a novel cyclic GMP-dependent protein kinase from mouse brain. *J Biol Chem* 268:13586-13591.
- Vaandrager AB, Smolenski A, Tilly BC, Houtsmuller AB, Ehlert EM, Bot AG, Edixhoven M, Boomaars WE, Lohmann SM, de Jonge HR (1998) Membrane targeting of cGMP-dependent protein kinase is required for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1466-1471.
- Vazdarjanova A, McGaugh JL (1998) Basolateral amygdala is not critical for cognitive memory of contextual fear conditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15003-15007.
- Walker DL, Davis M (2000) Involvement of NMDA receptors within the amygdala in short-versus long-term memory for fear conditioning as assessed with fear-potentiated startle. *Behav Neurosci* 114:1019-1033.
- 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.
- 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.

-
- Weisskopf MG, Bauer EP, LeDoux JE (1999) L-type voltage-gated calcium channels mediate NMDA-independent associative long-term potentiation at thalamic input synapses to the amygdala. *J Neurosci* 19:10512-10519.
- Werner C, Raivich G, Cowen M, Strekalova T, Sillaber I, Buters JT, Spanagel R, Hofmann F (2004) Importance of NO/cGMP signalling via cGMP-dependent protein kinase II for controlling emotionality and neurobehavioural effects of alcohol. *Eur J Neurosci* 20:3498-3506.
- Wernet W, Flockerzi V, Hofmann F (1989) The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett* 251:191-196.
- Wilensky AE, Schafe GE, LeDoux JE (1999) Functional inactivation of the amygdala before but not after auditory fear conditioning prevents memory formation. *J Neurosci* 19:RC48.
- Yaniv D, Schafe GE, LeDoux JE, Richter-Levin G (2001) A gradient of plasticity in the amygdala revealed by cortical and subcortical stimulation, in vivo. *Neuroscience* 106:613-620.
- Zamanillo D, Sprengel R, Hvalby O, Jensen V, Burnashev N, Rozov A, Kaiser KM, Koster HJ, Borchardt T, Worley P, Lubke J, Frotscher M, Kelly PH, Sommer B, Andersen P, Seeburg PH, Sakmann B (1999) Importance of AMPA receptors for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning. *Science* 284:1805-1811.
- 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.

7.2 Eigene Publikationen

Abstracts

Paul C, Schöberl F, Weinmeister P, Hofmann F, Kleppisch T (2008) cGMP-dependent protein kinase I supports long-term memory of associative fear and synaptic plasticity in the lateral amygdala (2008), International Symposium on Learning, Memory and Cognitive Function, Valencia, Spain

Paul C, Schöberl F, Weinmeister P, Hofmann F, Kleppisch T (2008) Associative fear memory and LTP of synaptic transmission in the lateral amygdala is supported by cGMP-dependent protein kinase (2008), 49. Frühjahrstagung der DGPT, Mainz, Germany

Originalarbeiten

Paul C, Schöberl F, Weinmeister P, Micalé V, Wotjak CT, Hofmann F and 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.

8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Kleppisch ganz herzlich bedanken. Seine Betreuung meiner Arbeit war stets hervorragend und er stand immer für Fragen bereit. So trug er ganz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Bei Prof. Hofmann möchte ich mich für die Aufnahme an seinem Institut und seinem Interesse am Fortgang dieser Arbeit bedanken.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben. Dies waren vor allem Cindy Paul beim Erlernen der Methoden, Astrid Vens bei der Tierzucht sowie Ulla für ihre Unterstützung in Laborangelegenheiten.

Ein großer Dank geht an Dr. Carsten Wotjak und Vincenzo Micale, die uns bei vielen Verhaltensversuchen mit Rat und Tat zur Seite standen.

Außerdem bedanken möchte ich mich bei Lucas, Carl, Robert, Pascal und Veronika für neue Impulse bei unseren gemeinsamen Mittagessen.

Zu guter Letzt bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meiner lieben Freundin Nadja und bei meinen lieben Eltern, die mir bislang in jeder Lebenslage zur Seite gestanden haben. Denn all dies war erst möglich durch ihre aufopferungsvolle und bedingungslose Unterstützung.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Florian Helmut Sebastian Schöberl
Anschrift: Mozartstr. 1
85098 Großmehring
Geburtsdatum/-ort: 05.10.1982, Kösching
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung:

1989 – 1993 Volksschule Großmehring
1993 – 2002 Christoph-Scheiner-Gymnasium Ingolstadt

Universitäre Ausbildung

10/2003 – 05/2010 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
08/2005 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
12/2008 – 03/2009 PJ, Chirurgie, Prof. Dr. Metzger, Triemli Spital, Zürich
04/2009 – 07/2009 PJ, Innere Medizin, Prof. Dr. Reincke, Medizinische Poliklinik, Campus Innenstadt
08/2009 – 10/2009 PJ, Neurologische Klinik u. Poliklinik, Prof. Dr. Dieterich, Klinikum Großhadern
10/2009 – 12/2009 PJ, Neurology, Prof. Dr. Rossor, National Hospital of Neurology and Neurosurgery, University College London
05/2010 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Promotion:

seit 04/2007 Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München, AG Prof. Dr. Kleppisch
Thema: Rolle der cGMP-abhängigen Proteinkinase Typ II bei der synaptischen Plastizität und beim Angstlernen in der lateralen Amygdala