

Aus dem Institut für Anatomie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Charakterisierung der Projektionen des ventralen CA1 und des Subiculums zum Nucleus basomedialis der Amygdala in der Maus und ihre Beziehungen zu GABAergen Interneuronen

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Martin Clemens Müller
aus Heidelberg
Magdeburg 2015

Bibliographische Beschreibung:

Müller, Martin Clemens:

Charakterisierung der Projektionen des ventralen CA1 und des Subiculums zum Nucleus basomedialis der Amygdala in der Maus und ihre Beziehungen zu GABAergen Interneuronen. - 2015. - 58 Blätter, 15 Abbildungen.

Kurzreferat:

In der vorliegenden Arbeit wurden in GAD-67-GFP-Mäusen durch hippocampale Injektionen des PHAL-Tracers die Zielstrukturen von Projektionsneuronen der Region CA1 und des angrenzenden Subiculums im Nucleus amygdalae basomedialis, pars posterior, analysiert, wobei mehrheitlich nicht-GABAerge distale Dendriten als Ziele identifiziert wurden. Zusätzlich ließ sich in einigen Fällen auch eine direkte Innervation amygdalärer GABAerger Interneurone nachweisen.

Darüber hinaus konnte durch amygdaläre Fluorogold-Injektionen eine GABAerge Projektion aus CA1 in den Nucleus amygdalae basomedialis, pars posterior, dokumentiert werden.

Schlüsselwörter:

Hippocampus

Amygdala

GABA

GFP

EM

GABAerge Projektion

Synapse

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
Einführung und Darstellung des aktuellen Forschungsstandes.....	1
Der Hippocampus.....	2
Hippocampale Efferenzen.....	2
Die Amygdala.....	3
Einteilung und Nomenklatur.....	3
Zellen und Neurotransmitter der Amygdala.....	3
Kortiko-amygdaläre Verbindungen.....	5
Afferenzen aus CA1.....	5
Amygdaläre Projektionen zur CA1-Region.....	5
Der Nucleus basomedialis.....	6
Lernen und Konditionierung.....	7
Klassische Konditionierung.....	7
Kontextuelle Konditionierung.....	7
Klinische Bedeutung.....	8
Fragestellung.....	9
Material und Methoden.....	10
GFP-Mäuse.....	10
Genotypisierung der Mäuse.....	10
Tracer-Injektionen.....	11
Anästhesie.....	11
Operationstechnik.....	11
Aufarbeitung der Schnitte.....	12
Perfusion und Primärfixierung.....	12
Vibratom.....	13
Färbung für das Elektronenmikroskop.....	13
Beurteilung im Lichtmikroskop.....	14
Postfixierung.....	15
Erste Dehydrierung.....	15
Blockkontrastierung.....	15
Endgültige Dehydrierung.....	15
Kunstharzinfiltration.....	16
Flacheinbettung.....	16
Ausstanzen der Schnitte.....	16
Ultramikrotom.....	16
Nachkontrastierung.....	17
Auswertung der Schnitte im Lichtmikroskop.....	17
Elektronenmikroskopie.....	17
Das Elektronenmikroskop.....	17
Auswertung der Schnitte im Elektronenmikroskop.....	17
EDV.....	18
Ergebnisse.....	19
Lichtmikroskopische Ergebnisse.....	19
Elektronenmikroskopische Ergebnisse.....	22
PHAL.....	24

GFP.....	24
PHAL- und Miniruby-markierte Synapsen.....	24
GFP-markierte Strukturen.....	28
Umgebende Strukturen der GFP-positiven Profile ohne synaptischen Kontakt.....	29
Afferenzen auf GFP-positive Profile.....	29
Markierte präsynaptische Profile an symmetrischen Synapsen.....	31
Übersicht der verschiedenen synaptischen Kontakttypen.....	32
Retrograde Markierung von hippocampalen Neuronen.....	32
GFP-positive Somata.....	34
Diskussion.....	35
Einordnung in den aktuellen Forschungsstand.....	35
Methodenkritik.....	35
Der PHAL-Tracer.....	35
Miniruby.....	36
Retrograder Tracer.....	37
Falsch-positive Markierungen.....	37
Größe der PHAL-positiven Profile.....	38
Eindringtiefe der Antikörper und Dicke der PSD.....	38
Diskrepanzen der veröffentlichten und der hier dargestellten Daten.....	38
Beziehung hippocampaler Afferenzen zu GABAergen Strukturen.....	39
Afferenzen auf amygdaläre GABAerge Interneurone.....	39
GABAerge Synapsen an GABAergen Strukturen.....	40
GABAerge hippocampo-amygdaläre Projektionen.....	41
Nachbarschaft zu exzitatorischen Synapsen.....	42
Subpopulationen GABAerger Interneurone in der Amygdala.....	42
Gedächtnisbildung und funktionsspezifische Netzwerke.....	43
Zusammenfassung.....	45
Literaturverzeichnis.....	46
Danksagungen.....	53
Ehrenerklärung.....	54
Darstellung des Bildungsweges.....	55

Abkürzungsverzeichnis

Englische Begriffe in *kursiver Schrift*

AB	<i>accessory basal nucleus</i> , Nucleus amygdalae basalis accessorius
AHIP	amygdalo-hippocampale Übergangszone
BDA	<i>biotinylated dextran amine</i> , biotinylierte Dextran-Amine
BLA	Nucleus amygdalae basolateralis, pars anterior
BLP	Nucleus amygdalae basolateralis, pars posterior
BMA	Nucleus amygdalae basomedialis, pars anterior
BMP	Nucleus amygdalae basomedialis, pars posterior
CA1-3	Cornu ammonis, Felder CA1-3
CB	Calbindin D28K
CCK	Cholecystokinin
CE	Nucleus amygdalae centralis
COa	Nucleus amygdalae corticalis anterior
CR	Calretinin
CS	<i>conditioned stimulus</i> , konditionierter Stimulus
DG	<i>dentate gyrus</i> , Gyrus dentatus
EC	<i>entorhinal cortex</i> , Cortex entorhinalis
EDV	Elektronische Datenverarbeitung
GABA	<i>gamma-aminobutyric acid</i> , Gamma-Amino-Buttersäure
GAD67	<i>glutamic acid decarboxylase 67</i> , Isoform 67 der Glutamatdecarboxylase
GFP	<i>green fluorescenting protein</i> , Grün fluoreszierendes Protein
IPSC	<i>inhibitory postsynaptic current</i> , inhibitorische postsynaptische Spannung / Potential
LA	Nucleus amygdalae lateralis
LTP	<i>long-term potentiation</i> , Langzeit-Potenzierung

ME	Nucleus amygdalae medialis
NOS	<i>neuronal nitric oxide synthase</i> , neuronale NO-Synthase
NPY	Neuropeptid Y
PB	<i>phosphate buffer</i> , Phosphat-Puffer
PHAL	Alpha-Phaseolus vulgaris leucoagglutinin
PSD	<i>postsynaptic density</i> , postsynaptische Verdichtung
PV	Parvalbumin
SOM	Somatostatin
STr	<i>subiculum, transition area</i> , Übergangszone zwischen CA1 und dem Subiculum
TLE	Temporallappenepilepsie
UCS	<i>unconditioned stimulus</i> , unconditionierter Stimulus
VIP	<i>vasoactive intestinal protein</i> , vasoaktives intestinales Protein
VS	ventrales Subiculum

Einführung und Darstellung des aktuellen Forschungsstandes

Lokale amygdaläre GABAerge Interneurone spielen eine wichtige Rolle im Informationsfluss zwischen Amygdala und Hippocampus. Sie modulieren die lokale Aktivität der Amygdala sowohl auf Ebene der internukleären Verbindungen über die interkalierten Kerne (*intercalated nuclei*) (Royer et al. 1999) als auch auf intranukleärer Ebene (Woodruff und Sah 2007a). GABAerge Interneurone übernehmen feedforward- und feedback-Hemmung (Samson et al. 2003; Rainnie et al. 1991) und sind in die Synchronisation rhythmischer Aktivitätsmuster in der Amygdala involviert (Woodruff und Sah 2007a). So finden sich in der basolateralen Amygdala symmetrische Synapsen vor allem in der perisomatischen Region von Pyramidenzellen, wobei alleine Parvalbumin-positive GABAerge Neurone für etwas mehr als 50% der symmetrischen Synapsen verantwortlich sind (Muller et al. 2006).

Aktuelle Untersuchungen legen zudem nahe, dass verschiedenen Angstniveaus jeweils definierte Populationen von Neuronen in der basalen Amygdala zugeordnet werden können, die in ein Netzwerk aus Hippocampus, Amygdala und medialem präfrontalen Kortex eingebunden sind (Herry et al. 2008). Die Antwort auf einen konditionierten Stimulus wird maßgeblich durch einen Schaltkreis in der zentralen Amygdala mitbestimmt, in welchen eine definierte Subpopulation GABAerger Interneurone eingebunden ist (Haubensak et al. 2010). In der basolateralen Amygdala werden während Angst-Konditionierung Stimulus-spezifisch distinkte disinhibitorische Kreise von Interneuronen aktiviert (Wolff et al. 2014).

Die Funktion der Amygdala in emotionalem Verhalten (Yilmazer-Hanke et al. 2004) und der Speicherung emotionaler Inhalte (Bergado-Acosta et al. 2008; Ehrlich et al. 2009; Makkar et al. 2010) wird ebenfalls offensichtlich von GABAergen Interneuronen beeinflusst.

Ein tieferes Verständnis der afferenten Verschaltung GABAerger amygdalärer Interneurone sowie ihrer Verbindungen mit dem hippocampalen Komplex ist daher von großer Bedeutung für das Verständnis der Vorgänge während der Entstehung und Kontrolle von emotionalen Gedächtnisinhalten.

Der Hippocampus

Die Hippocampusformation beinhaltet den entorhinalen Kortex, den Gyrus dentatus, den Hippocampus im eigentlichen Sinne, unterteilt in die Regionen CA1 bis CA3 sowie das Subiculum, das Präsubiculum und das Parasubiculum (Amaral und Witter 1989).

Der intrahippocampale Informationsfluss verläuft größtenteils unidirektional: Vereinfacht beschrieben projiziert der entorhinale Kortex in den Gyrus dentatus, dieser über die Moosfasern in die Region CA3. In Form der Schaffer-Kollateralen sendet die Region CA3 Efferenzen in die Region CA1. Diese projiziert zum Subiculum, dieses wiederum in den entorhinalen Kortex (Canteras und Swanson 1992; Amaral und Witter 1989).

Neuere Arbeiten betonen eine funktionelle Trennung des Hippocampus entlang der septotemporalen Achse in einen ventralen und einen dorsalen Anteil. Der ventrale Anteil wird vor allem mit Angst-bezogenem Verhalten in Zusammenhang gebracht, während der dorsale Anteil eine wichtige Rolle beim räumlichen Lernen und Gedächtnis spielt (Bannerman et al. 2004). Ratten zeigen nach ventral, nicht aber nach dorsal lokalisierten Hippocampusläsionen weniger Angst im Elevated-Plus-Maze-Versuchsaufbau (Kjelstrup et al. 2002). Für die Expression von Angstgedächtnis-Inhalten nach Spuren-Konditionierung (*trace fear conditioning*) sind, ungeachtet ihrer unterschiedlichen Funktionen, jedoch beide Anteile notwendig (Yoon und Otto 2007).

Hippocampale Efferenzen

Bisher wurde angenommen, dass glutamaterge Projektionsneurone exzitatorische Signale zu entfernten Arealen aussenden, um dort monosynaptisch lokale Projektionsneurone sowie GABAerge Interneurone zu innervieren (Jinno 2009). In den letzten Jahren mehren sich jedoch Hinweise, dass spezifische Subpopulationen von GABAergen hippocampalen Neuronen ebenfalls weitreichende Projektionen zu subkortikalen und kortikalen Gebieten aussenden. Beschrieben wurden unter anderem Efferenzen zum Subiculum, medialen Septum (Jinno et al. 2007) sowie zum kontralateralen Gyrus dentatus (Jinno 2009).

Die Amygdala

Einteilung und Nomenklatur

Die Amygdala ist ein im Temporallappen gelegener bilateraler Kernkomplex. Es existieren drei verschiedene Nomenklaturen der Kerngebiete; eine Gegenüberstellung der Nomenklaturen sowie eine genaue Aufschlüsselung der einzelnen Nuclei und Subnuclei ist in Pitkänen (2000) zu finden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Atlas nach Franklin und Paxinos (2007) inklusive der darin verwendeten Nomenklatur eingesetzt.

Wichtige Punkte und wiederkehrende Unklarheiten:

- In allen drei Nomenklaturen kann man die tiefe und die oberflächliche Kerngruppe sowie die verbleibenden amygdalären Gebiete unterscheiden.
- In einzelnen Veröffentlichungen ist von der Nomenklatur nach „Paxinos und Watson“ die Rede, dies bezieht sich auf den zugehörigen Atlas der Anatomie des Rattenhirns. Die Nomenklatur ist vergleichbar der hier verwendeten (Franklin und Paxinos 2007).
- Der Nucleus basomedialis (BM), insbesondere der posteriore Anteil (BMP), wird in einigen Darstellungen auch als Nucleus basalis accessorius (*accessory basal nucleus, AB*) beschrieben, zudem wird der anteriore Anteil (BMA) in anderen Darstellungen dem Nucleus corticalis anterior (*anterior cortical nucleus, COa*) zugerechnet (Pitkänen 2000).
- Nucleus basomedialis und Nucleus basolateralis werden gelegentlich als basale Nuclei (*basal nuclei*) zusammengefasst. Teilweise ungenau gehandhabt wird die Unterscheidung zwischen Nucleus basolateralis (= singulärer Kern) und der basolateralen Amygdala (= Kerngruppe: Nucleus basolateralis, Nucleus lateralis, Nucleus basomedialis) (Pape und Pare 2010).

Zellen und Neurotransmitter der Amygdala

In der basolateralen Amygdala lassen sich ähnlich dem Aufbau des Kortexes zwei unterschiedliche Zellpopulationen unterscheiden: Glutamaterge, pyramidenartige Projektionsneurone und zahlenmäßig deutlich unterlegene, non-pyramidale, GABAerge Interneurone (McDonald 1992; Pape und Pare 2010).

GABA (Gamma-Aminobuttersäure) ist der wichtigste inhibitorische Transmitter im adulten

zentralen Nervensystem; Glutamat der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter. Glutamat wird mithilfe der GAD (*glutamic acid decarboxylase*, Glutamatdecarboxylase) in GABA umgewandelt. Es existieren zwei Isoformen der Glutamatdecarboxylase, die GAD67 und die GAD65.

GABAerge Neurone können neurochemisch, elektrophysiologisch oder morphologisch weiter unterschieden und in Subpopulationen eingeteilt werden. Sosulina et al. (Sosulina et al. 2010) legten kürzlich eine Nomenklatur vor, anhand derer sie GABAerge Interneurone der lateralen Amygdala nach elektrophysiologischen Gesichtspunkten in 5 Klassen (I – V) unterteilten. In aktuellen Arbeiten erfahren unterdessen histochemische Untersuchungen eine immer größere Anwendung. Jinno et al. beschrieben GAD67, Calcium-bindende Proteine wie Parvalbumin (PV), Calretinin (CR) und Calbindin D28K (CB), Neuropeptide wie Neuropeptid Y (NPY), Somatostatin (SOM), Cholecystokinin (CCK) und vasoaktives intestinales Protein (VIP) sowie *nitric oxide synthase* (NOS) als wichtige neurochemische Marker in hippocampalen GABAergen Interneuronen (Jinno und Kosaka 2006). Insbesondere die Calcium-bindenden Proteine finden aktuell häufig Verwendung zur Identifikation von Subpopulationen amygdaler GABAerger non-Pyramidenzellen (McDonald und Mascagni 2001).

Mascagni et al. (Mascagni und McDonald 2003) haben unter histochemischen Gesichtspunkten eine Definition von mindestens vier Untergruppen non-pyramidaler Interneurone der basolateralen Amygdala vorgeschlagen:

1. Parvalbumin-positive Neurone (der Großteil ist ebenfalls Calbindin-positiv)
2. Somatostatin-positive Neurone (viele sind auch Calbindin- und NPY-positiv)
3. große, Cholecystokinin-positive Neurone (einige sind ebenfalls Calbindin-positiv)
4. kleine Neurone mit unterschiedlichen Kollokalisierungen von Cholecystokinin, VIP und Calretinin

Parvalbumin-positive Interneurone bilden noch weitere Subgruppen und scheinen durch differenzierte elektrische Kopplung untereinander mehrere Netzwerke in der basolateralen Amygdala zu bilden (Woodruff und Sah 2007b).

Subpopulationen von GABAergen Interneuronen scheinen gezielt jeweils verschiedene Kompartimente von amygdalären Projektionszellen zu kontaktieren, beispielsweise Somatostatin-positive Interneurone bevorzugt distale und daher kleine Dendriten (Muller et

al. 2007a). Für Parvalbumin-positive Interneurone konnten bei Katzen proximale Anteile von PV-negativen Neuronen als bevorzugte Ziele identifiziert werden (Smith et al. 1998).

Kortiko-amygdaläre Verbindungen

Kortikale Afferenzen zum amygdalären Kerngebiet sind in der Vergangenheit eingehend untersucht worden. Präfrontale Afferenzen zeigten überwiegend asymmetrische Synapsen mit Pyramidenzellen des Nucleus basalis in der Ratte (Brinley-Reed et al. 1995).

Afferenzen aus CA1

Hippocampo-amygdaläre Projektionen entstammen dem Subiculum und der CA1-Region des Ammonshorns (Kishi et al. 2006; Ottersen 1982; Ishikawa und Nakamura 2006), wobei nur das temporale Drittel des CA1-Feldes zur Amygdala projiziert (van Groen und Wyss 1990; Pitkänen et al. 2000). Sie werden als streng ipsilateral angesehen (Kishi et al. 2006; van Groen und Wyss 1990). Die intensivsten reziproken Verbindungen mit dem Hippocampus scheint der Nucleus basalis zu besitzen (Pitkänen et al. 2000).

Das wichtigste Ziel von Projektionsneuronen des ventralen Subiculums ist der posteriore Anteil des ipsilateralen Nucleus basomedialis, wo sie ein dichtes Netz formen. Retrograde tracergestützte Untersuchungen mit Fluorogold lassen vermuten, dass auch Fasern aus der angrenzenden, ventralen CA1-Region hieran beteiligt sind (Canteras und Swanson 1992).

Die Projektionen des Subiculums respektive der CA1-Region zur Amygdala scheinen topographisch organisiert zu sein (Cenquizca und Swanson 2007); Kishi et al. (2006) konnten zeigen, dass einer septo-temporalen Achse im Ursprungsgebiet Ziele auf einer mediolateralen (= transversalen) Achse in der Amygdala zugeordnet werden können. Eine Ausnahme stellten hierbei Projektionen zum Nucleus basomedialis dar, deren Ursprünge innerhalb des Subiculums und der CA1-Region weit verstreut lagen.

Amygdaläre Projektionen zur CA1-Region

Die Verbindungen der Amygdala inklusive des Nucleus basomedialis mit der CA1-Region sind reziprok; wobei es insgesamt so erscheint, dass die Amygdala mehr Projektionen zum hippocampalen Komplex sendet als sie von diesem empfängt (Pitkänen et al. 2000). Die wichtigsten Ursprünge von amygdalo-hippocampalen Projektionen zu CA1 sind der Nucleus basalis, Nucleus basomedialis und Nucleus corticalis posterior (Pikkarainen et al. 1999; Pitkänen et al. 2000; Petrovich et al. 1996). Die Zielbereiche im Hippocampus

scheinen eher getrennt als überlappend zu sein, passend zu der Annahme, dass die Amygdala in verschiedene Stadien der hippocampalen Informationsprozessierung eingreifen kann (Pikkarainen et al. 1999).

Die Reziprozität der amygdalo-hippocampalen Verbindungen spiegelt sich auch funktionell wider: Die basolaterale Amygdala beeinflusst die synaptische Plastizität im Hippocampus (Nakao et al. 2004; Abe 2001), was möglicherweise wichtig für die Verstärkung emotional belegter Gedächtnisinhalte ist und in Teilen durch Stresshormone wie Noradrenalin und Corticosteron mediiert wird (Akirav und Richter-Levin 2002). In umgekehrter Richtung scheint ein ähnlicher Mechanismus zu existieren (Maren und Fanselow 1995).

Der Nucleus basomedialis

Der Nucleus basomedialis lässt sich mikroskopisch in einen magnozellulären und einen parvozellulären Anteil unterteilen, zwischen welchen nur wenige Verbindungen bestehen (Pitkänen 2000). Er empfängt intra-amygdaläre Afferenzen insbesondere aus dem Nucleus lateralis (Pape und Pare 2010) und medialis sowie schwächere Afferenzen unter anderem aus dem Nucleus corticalis anterior und posterior (Pitkänen 2000).

Intra-amygdaläre Efferenzen entsendet der Nucleus basomedialis unter anderem zum Nucleus lateralis, Nucleus medialis, dem periamygdaloiden Kortex, Nucleus centralis und dem Nucleus corticalis posterior. Der parvozelluläre Anteil scheint etwas stärkere intra-amygdaläre Projektionen auszusenden als der magnozelluläre Anteil (Pitkänen 2000).

Der basomediale Nucleus erhält zudem Afferenzen aus dem kontralateralen Nucleus basomedialis und projiziert seinerseits zum kontralateralen Nucleus medialis (Pitkänen 2000).

Extra-amygdaläre Afferenzen erreichen den Nucleus basomedialis aus vielen verschiedenen Strukturen, unter anderem dem Kortex, dem olfaktorischen System, dem Thalamus, dem Hypothalamus und dem Mittelhirn. Die Projektionen aus dem Hippocampus stammen aus dem entorhinalen Kortex (zum parvozellulären Anteil), dem proximalen und distalen temporalen Subiculum und aus dem temporalen CA1-Gebiet (Pitkänen 2000; McDonald und Mascagni 1997).

Extra-amygdaläre Efferenzen des Nucleus basomedialis erreichen unter anderem den Hippocampus, den Kortex, das olfaktorische System, den Thalamus und den Hypothalamus (Pitkänen 2000). Die amygdalo-hippocampalen Projektionen aus dem Nucleus basomedialis erreichen den entorhinalen Kortex, temporale Anteile von CA1 sowie das Subiculum und das Parasubiculum (Pitkänen 2000).

Lernen und Konditionierung

Klassische Konditionierung

Es ist allgemeiner Konsens, dass der Amygdala eine zentrale Rolle in der Speicherung und Expression von Inhalten des emotionalen Gedächtnisses zukommt. Ein breit angewendetes Modell, um die zugrundeliegenden Mechanismen zu untersuchen, ist die klassische (*Pavlov'sche*) Konditionierung. Sie bietet sich als einfache, schnelle und robuste Methode an und ist zudem an verschiedenen Spezies anwendbar. Es wird ein zuvor neutraler Stimulus (CS), z.B. ein akustisches Signal, mit einem bisher unkonditionierten Stimulus (UCS) verknüpft. Ist der unkonditionierte Stimulus (UCS) aversiver Natur, z.B. ein Elektroschock, spricht man von Angst-Konditionierung (LeDoux 2000).

Zentrale Annahme des bisherigen Konzeptes ist es, dass CS und UCS auf Neurone (*principal cells*) im Nucleus amygdalae lateralis konvergieren. Hier wird nach mehrmaligem Üben die Stärke der synaptischen Übertragung des CS-Inputs dauerhaft erhöht; die Speicherung geschieht vermutlich in Form von LTP und anderen Formen synaptischer Plastizität (Maren 2005). Die Weiterleitung der Information geschieht zum Nucleus centralis, der wichtigsten Output-Station der Amygdala für Angst-Reaktionen (Pape und Pare 2010; Phelps und LeDoux 2005; LeDoux 2000).

Kontextuelle Konditionierung

Stellt die Umgebung des Versuchstieres oder des Patienten den CS dar, spricht man von kontextueller Konditionierung. Hierfür sind, im Gegensatz zur Konditionierung auf einen unimodalen Stimulus, sowohl die Amygdala als auch der Hippocampus notwendig (Phillips und LeDoux 1992; LeDoux 2003).

Der ventrale Hippocampus ist in der Bildung von Angstgedächtnis-Inhalten (Bast et al. 2001; Rudy und Matus-Amat 2005) involviert; zur Kontext-spezifischen Expression von Angstgedächtnis-Inhalten nach Extinktions-Training werden der ventrale (Hobin et al. 2006) und dorsale (Maren und Hobin 2007) Anteil benötigt. Das Abrufen gespeicherter

kontextuell-konditionierter Gedächtnisinhalte ist unabhängig vom Alter des erlernten Wissens ebenfalls Hippocampus-abhängig (Sutherland et al. 2008).

Die zentrale Rolle der Amygdala und des Hippocampus bei kontextueller Konditionierung konnte in fMRI-Untersuchungen auch an Menschen bestätigt werden (Alvarez et al. 2008).

Klinische Bedeutung

Die in dieser Arbeit untersuchten anatomischen Strukturen sowie Transmittersysteme sind von großer Bedeutung in der medizinischen Forschung und klinischen Praxis:

- *Angststörungen:* Nur beispielhaft sei die posttraumatische Belastungsstörung genannt, im Rahmen derer die basolaterale Amygdala Schauplatz struktureller Plastizität zu sein scheint (Cui et al. 2008).

Vermutlich ist die Amygdala beim Menschen notwendig für das Erkennen der Emotion Angst in menschlichen Gesichtern, während die Identifizierung eines Gesichtes auch mit Amygdala-Schaden möglich ist (Adolphs et al. 1994).

- *Gedächtnis:* Bei Alzheimer-Patienten konnte eine volumetrische Abnahme der Amygdalae mit einer verschlechterten Gedächtnisleistung bezogen auf emotionale Inhalte korreliert werden (Mori et al. 1999).

Die menschliche Amygdala scheint darüber hinaus den Grad der bewussten Erinnerung an emotional gewichtige Ereignisse zu steuern. Hamann et al. (Hamann et al. 1999) konnten mithilfe der Positronen-Emissions-Tomographie eine erhöhte Aktivität der Amygdala bei der Gedächtnisbildung von emotional belegten Inhalten mit einer besseren Erinnerung dieser Inhalte korrelieren.

- *Epilepsie:* Schaden oder Veränderungen in Form von Volumenreduktion der Amygdalae können bei Erwachsenen oder Kindern mit Temporallappenepilepsie vorliegen. Lokale Veränderungen in inhibitorischen amygdalären Netzwerken werden mit verringerter Krampfschwelle und erhöhter Exzitabilität innerhalb der Amygdala in Verbindung gebracht (Pitkänen et al. 1998; Yilmazer-Hanke et al. 2007). Bei Ratten konnte nach einem Status epilepticus ein Schaden der Amygdala, der einen Verlust an inhibitorischen GABAergen Neuronen inkludierte, beobachtet werden (Tuunanen et al. 1996).
- *Medikamente und GABA:* Sowohl an der Emotion Angst als auch an depressiven Störungen sind GABAerge Mechanismen beteiligt (Kalueff und Nutt 2007). Im

GABAergen System wirksamen Medikamenten kommt hierbei eine bedeutsame Rolle innerhalb Therapie, insbesondere in der Akutsituation, zu. Beispielsweise vermittelt das klinisch weit verbreitete Benzodiazepin Diazepam über GABA_A-Rezeptoren die Entstehung postsynaptischer inhibitorischer Potentiale (IPSCs) im Nucleus amygdalae basolateralis und centralis (Kang-Park et al. 2004). Hierbei ist die Pharmakodynamik von Benzodiazepinen im hippocampo-amygdalären Netzwerk, beispielsweise paradoxe Steigerungen der motorischen Aktivität, ungeachtet ihrer breiten klinischen Anwendung, immer noch nicht vollständig verstanden (Heldt und Ressler 2006).

Fragestellung

Das hippocampo-amygdaläre System ist, insbesondere in Hinblick auf Angstgedächtnis und Angst-bezogenes Verhalten, von größter Bedeutung. Um zur weiteren Aufklärung der neuroanatomischen Grundlagen beizutragen, war das Ziel dieser Arbeit daher die Untersuchung hippocampo-amygdalärer Projektionen aus CA1 und angrenzenden Teilen des Subiculum und ihrer Beziehungen zu GABAergen Interneuronen des Nucleus basomedialis der Amygdala. Mit Hilfe anterograder Tracer sollten die Projektionen aus der ventralen Hippocampusregion im Zielgebiet visualisiert werden. Anschließend sollten durch die Kombination von immunhistochemischen mit elektronenmikroskopischen Verfahren einzelne Axone und ihre Zielzellen identifiziert und die Verbindungen zwischen beiden Strukturen so auf synaptischer Ebene charakterisiert werden.

Material und Methoden

GFP-Mäuse

In dieser Arbeit wurden zehn erwachsene, 3 bis 8 Monate alte, männliche (n = 7) und weibliche (n = 3) Mäuse mit einer homologen Insertion (*knock-in*) des *Green Fluorescent Proteins* (GFP) im Genom der 67 kDa-Isoform der Glutamatdecarboxylase verwendet (Tamamaki et al. 2003). GFP-cDNA wurde zwischen der an 5'-Position an GAD67 angrenzenden Region und dem GAD67-Startcodon eingefügt, wodurch die Zelle GFP exprimiert. Durch das knock-in kommt es zur Ausschaltung des GAD67-Gens.

Homozygotie wirkt sich hierbei durch eine schwere Palatoschisis letal aus (Asada et al. 1997), weshalb ausschließlich heterozygote Tiere zur Anwendung kommen können. GFP findet sich anschließend sowohl in den Somata als auch in den Dendriten und Axonen GABAerger Neurone (Tamamaki et al. 2003).

Sämtliche Experimente wurden in Übereinstimmung mit der European Communities Council Directive (86/609/EEC) und dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Sämtliche Versuche wurden durch das Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt genehmigt (Aktenzeichen: 45502-2-813 Uni MD).

Genotypisierung der Mäuse

Für das Knock-in Modell GAD 67 wurden Tiere des Wildtyps C57BL/6 mit knock-in Modellen GAD 67 gekreuzt. Die Tiere wurden in unserer Einrichtung aufgezogen und kurz nach dem Abstillen mittels Polymerasekettenreaktion (*multiplex polymerase chain reaction, PCR*) genotypisiert.

Als Ausgangsmaterial hierfür dienten etwa 5 mm der Schwanzspitze. Dieses Material wurde in 500 µl Lysispuffer und 10 µl Proteinase K (10 mg/ml; Merck, Darmstadt) bei 55 °C über Nacht in einem Eppendorfröhrchen inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die DNA nach Zentrifugieren mit Hilfe von Isopropanol (Apotheke Uniklinikum Magdeburg) ausgefällt.

Nach PCR (Primer TR1B: 5' – GGC ACA GCT CTC CCT TCT GTT TGC – 3'; Primer TR3: 5' – GCT CTC CTT TCG CGT TCC GAC AG – 3'; Primer TRGFP 8: 5' – CTG CTT GTC GGC CAT GAT ATA GAC G – 3') erfolgte die Sichtbarmachung der DNA in einer horizontalen Gelkammer auf Agarosegel (Promega, Mannheim). Als Fluoreszenz-Farbstoff kam Ethidiumbromid (1 mg/ml; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) zur Anwendung. Besondere

Vorsicht war aufgrund der Kanzerogenität geboten (Kategorie 3B nach 67/548/EWG). 100 ml Agarosegel wurden 10 µl Ethidiumbromid zugesetzt. Die Darstellung erfolgte anschließend in einer Elektrophoresekammer (Serva, Heidelberg) auf einem Transilluminator (Biozym, Hessisch Oldendorf).

Tracer-Injektionen

Anästhesie

Die Anästhesie der Versuchstiere wurde mithilfe von repetitiven Dosen einer intraperitoneal verabreichten Mischung aus Xylazin (Xylazin 2%, Ceva, Libourne, Frankreich) und Ketamin (Ketavet 100 mg/ml, Pharmacia, Berlin) durchgeführt (Gourdon 2002). Hierzu wurden in einer sterilen 10 ml – Einmalspritze folgende Bestandteile aufgezogen:

- 1 ml Ketamin (Konzentration 100 mg/ml)
- 0,1 ml Xylazin (Konzentration 100 mg/ml)
- 8,9 ml steriles Wasser für Injektionszwecke (aqua ad injectionem)

Die Bestandteile müssen durch mehrmaliges Schütteln gut vermischt werden, um die korrekte Dosierung der Medikamente zu ermöglichen. Hiervon wurde zur Induktion der Narkose 0,1 ml / 10 g Mausgewicht mittels einer 27-Gauge-Kanüle (Außendurchmesser 0,40 mm) intraperitoneal verabreicht. Meist war nach ca. 30 Minuten eine erneute Gabe der halben Initialdosis zur Aufrechterhaltung der Anästhesie notwendig. Vor dem Einspannen der Mäuse in das stereotaktische Operationsgestell wurde Lidocain (Xylocain-Gel 2%, Astra Zeneca, Wedel) zur additiven Lokalanästhesie in die Ohren eingebracht. Ebenfalls wurde der Wundbereich postoperativ vor dem Vernähen mit Lidocain (Präparat wie oben) betäubt.

Operationstechnik

Die Versuchstiere wurden in Bauchlage in einem stereotaktischen Operationsgestell fixiert. Nach Rasur des Schädels wurde ein Medianschnitt vorgenommen und die Schädelkalotte freipräpariert. Nach stereotaktischer Lagebestimmung anhand von Bregma erfolgte die Bohrung und das Einführen der Hohnadel. Anschließend wurde iontophoretisch (+ 5µA, 5 Sekunden on/off, 30 min Applikationsdauer) der PHAL-Tracer (n = 6, 2,5% in 0,01 M Phosphat-Puffer (PB), pH 8,0; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) oder Miniruby-Tracer (n = 2, 10% in 0,01 M Phosphat-Puffer (PB), pH 7,4; D-3312, Invitrogen,

Darmstadt) in die ventrale CA1-Region des Hippocampus und die Übergangszone zwischen CA1 und dem Subiculum appliziert. Die hierfür verwendeten stereotaktischen Koordinaten bezogen auf Bregma waren wie folgt: Anterior-posterior (AP) 3,6 mm; medio-lateral (ML) 3 mm; dorso-ventral (DV) 3 mm.

Bei zwei Versuchstieren wurde Fluorogold (4%, in A. dest.; Fluorochrome, Englewood, CO, USA) als retrograder Tracer in die Amygdala injiziert. Zur Injektion wurde in diesem Fall eine Hamilton ® Spritze verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Injektionsnadel, die Applikation des Tracers erfolgte durch vorsichtigen manuellen Druck auf den Spritzenkolben über einen Zeitraum von mehreren Minuten. Die verwendeten stereotaktischen Koordinaten bezogen auf Bregma lauteten: AP 1,8 mm; ML 2,8 mm; DV 4 mm.

Die Koordinaten der Amygdala sowie der Hippocampus-Region wurden mithilfe des Atlases von Franklin und Paxinos (2007) bestimmt.

Nach der Injektion wurde das Tier ausgespannt und die Wunde mittels 5-0-Nahtmaterial in Einzelknopftechnik verschlossen.

Aufarbeitung der Schnitte

Perfusion und Primärfixierung

Nach einer für den Transport des Tracers ausreichenden Überlebenszeit von 10-14 Tagen (Gerfen und Sawchenko 1984; Groenewegen 1990) wurden die Tiere mittels einer tödlichen intraperitoneal verabreichten Überdosis Hypnotikum eingeschläfert: Zur Anwendung kam das Barbiturat Pentobarbital („Narcoren“, Merial, Hallbergmoos).

Die Primärfixierung erfolgte direkt nach dem Töten des Tieres durch transkardiale Perfusion. Nach Aufspannen des Tieres auf ein Korkbrett wurde bis zum Herzen präpariert, eine Hohlnadel in die linke Kammer eingeführt und der rechte Vorhof eröffnet. Hierdurch wurde unter einem Abzug zuerst das Blut mit NaCl 0,9% über eine Pumpe ausgewaschen (Laufzeit der Pumpe hierfür etwa 2 Minuten) und direkt danach ein Gemisch aus 0,1% Glutaraldehyd, 4% Paraformaldehyd, 15% gesättigter Pikrinsäure und 0,1 M PB (pH 7,4) infundiert. Nach etwa 15 Minuten wurde die Pumpe abgestellt. Anschließend wurde der Schädel eröffnet, das Gehirn herauspräpariert und für mindestens 5 Stunden oder über Nacht in einem Glutaraldehyd-freien Fixans postfixiert.

Vibratom

In einem Vibratom (Series 1000 Sectioning System, TPI, St. Louis, MO, USA) erfolgte die Herstellung von koronalen Gewebeschnitten mit einer Dicke von 50 - 100 μm . Von den mit PHAL oder Miniruby injizierten Gehirnen wurden je drei Serien angefertigt.

Färbung für das Elektronenmikroskop

Zur Darstellung des PHAL-Tracers wurde Bio-Anti-PHAL und zur Darstellung GABAerger Neurone wurde Anti-GFP verwendet. Zunächst wurden die Schnitte 4 mal für je 10 Minuten in 0,1 M PB gespült. Anschließend wurden mittels endogener Peroxidase in

- 1 ml Methanol und
- 200 μl H_2O_2 (30%) und
- 19 ml PB

für 10 Minuten unter Schütteln noch vorhandene Blutbestandteile „wegbleicht“. Zum Beenden dieser Reaktion ist keine Blockierung notwendig. Überschüssiges H_2O_2 wurde gründlich ausgewaschen.

Anschließend wurden die Schnitte in den entsprechenden Antikörpern inkubiert:

- 3,6 μl Bio-Anti-PHAL (1:600; biotinylated goat anti-PHAL, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) sowie
- 0,72 μl anti-GFP (1:3000; ab6556, Abcam, Cambridge, UK) zusammen mit
- 2,14 ml 0,1 M PB in
- 21,6 μl NGS (normal goat serum; 1%).

Triton wurde nicht verwendet, um die Ultrastruktur nicht zu zerstören. Die Inkubationszeit betrug 2 Tage bei 4 $^{\circ}\text{C}$.

Anschließend wurden die Schnitte 3 x in PB gespült und für 90 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler in ABC-elite (A and B complex; 1:120; 8,8 $\mu\text{l}/\text{ml}$; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) inkubiert. Die mit PHAL markierten Axone waren homogen schwarz gefärbt.

Nach erneutem dreimaligem Spülen mit PB wurden die Schnitte in

- 1 ml Diaminobenzidin (10 mg/ml),
- 0,5 ml Kobaltchlorid 1%,

- 0,4 ml Ammoniumnickelsulfat 1% und
- 19 ml PB zusammen mit
- 220 µl H₂O₂ 0,3%

für 10 Minuten inkubiert (Adams 1981).

Nach erneutem dreimaligen Spülen in PB wurden die Schnitte für 90 Minuten in Bio-anti-Rabbit (biotinylated anti-rabbit IgG; 1:200, 4,4 µl/ml; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) eingelegt.

Anschließend wurden sie drei mal in PB gespült und erneut für 1 Stunde in ABC-elite inkubiert. Nach nochmaligem dreimaligem Spülen in gleicher Weise erfolgte die erneute Inkubation in DAB. Eine Verstärkung, beispielsweise durch Kobaltchlorid oder Ammoniumverbindungen, wurde nicht eingesetzt. Das Reaktionsprodukt zeigte nun eine bräunliche Färbung. Nach nochmaligem dreimaligem Spülen in PB waren die Schnitte bereit für die Einbettung.

Die Aufbereitung der Miniruby-Gehirne gelang ebenfalls mittels ABC-elite und DAB.

In der zweiten Serie wurde wie zuvor beschrieben vorgegangen, jedoch wurde zur Sichtbarmachung des PHAL-Tracers avidin-Cy3 (1:1000; in 0,1 M PB, pH7,4; Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, USA) verwendet. Diese Schnittserie sowie die zweite Schnittserie der Miniruby-markierten Gehirne wurden aufgezogen und mit Mowiol (Hoechst, Mannheim) überzogen. Die zweite Serie wurde hauptsächlich als Vergleich für die Kontrolle der Qualität der GFP-Markierung verwendet.

Die dritte Serie wurde bei -20 °C in einer kryoprotektiven Lösung (30% Ethylenglykol, 25% Glycerol, in 0,05 M PB, pH 7,4) eingelagert.

Von den beiden Gehirnen mit Amygdala-Injektionen wurden 40 µm dicke Koronalschnitte hergestellt, auf Objektträger aufgezogen und mit Mowiol überzogen.

Beurteilung im Lichtmikroskop

Die so hergestellten immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden im Lichtmikroskop hinsichtlich des Erfolges der Injektionen und der Färbungen beurteilt. Hierbei konnten einerseits Daten über die Verteilung des anterograden Tracers in der Amygdala gewonnen werden, andererseits auch die Anfärbung selbst beurteilt werden. Die weitere, sehr aufwändige Prozessierung der Schnitte für das Elektronenmikroskop lohnte nur, wenn eine deutliche Anfärbung durch den PHAL-Tracer in der Amygdala vorhanden war.

Die stärkste Anfärbung zeigte durchgehend der Nucleus basomedialis der Amygdala. Schnitte, welche diesen enthielten, wurden für die weitere Prozessierung zur Elektronenmikroskopie ausgewählt.

Postfixierung

Die Schnitte wurden jeweils zweimal in PB gespült, anschließend glatt ausgelegt. Es wurde folgender Ansatz verwendet:

- 10 ml PB 0,1 M pH 7,4; 700 mg β -D(+)-Glucose, hiervon 500 μ l in jedes Gläschen
- In jedes Gläschen 8 Tropfen Osmium 1% (Osmiumtetroxid, OsO₄; Science Services, München)
- 2 Schnitte pro Gläschen

Die Postfixierung erfolgte nun unter Ausschluss von Licht für 60 Minuten. 5 Minuten nach Beginn wurden die Röhrchen noch einmal geschwenkt. Anschließend wurden die Schnitte in 0,1 M PB (pH 7,4) 3 x 5 min auf einem Schüttler gespült und glatt gelegt. Dies hatte jetzt zu erfolgen, da die Schnitte durch die nachfolgende Dehydrierung immer härter wurden und bei einer späteren Glättung eventuell zerbrochen wären.

Erste Dehydrierung

Die erste Dehydrierung erfolgte in 50% und anschließend in 70% Ethanol für je 5 Minuten.

Blockkontrastierung

Zur Blockkontrastierung wurde 1% Uranylacetat nach folgendem Ansatz verwendet:

- 100 mg Uranylacetat (Achtung: Radioaktiv!)
- 10 ml 70% Ethanol (unvergällt)

Diese erfolgte für 60 Minuten ebenfalls unter Ausschluss von Licht, wobei darauf zu achten war, dass die Schnitte horizontal lagen. 15 Minuten nach Beginn der Prozedur wurden die Schnitte erneut geschwenkt.

Endgültige Dehydrierung

Die abschließende Dehydrierung erfolgte in einer Ethanolreihe mit aufsteigenden Konzentrationen. Es wurde Ethanol 80% und 90% für je 5 Minuten und anschließend Ethanol 96% und 2 mal 100% für je 10 Minuten verwendet. Letzterer wurde einen Tag zuvor mithilfe eines Molekularsiebes hergestellt.

Kunstharzinfiltration

Durcupan (ACM Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurde aus den gelieferten Komponenten A/M, B, C und D bei 50°C auf einem Magnetrührer für 2 x 15 Minuten hergestellt. Folgendes Mischungsverhältnis wurde verwendet:

- 10 g Komponente A / M
- 10 g Komponente B
- 11 Trpf. Komponente C
- 7 Trpf. Komponente D

Der dabei entstehende Alkohol musste abgesaugt werden. Die Schnitte wurden am Ende mit einem Holzspieß in ein neues Glas transferriert.

Flacheinbettung

Die Flacheinbettung erfolgte zwischen 2 jeweils 0,1 mm dicken Folien. Zwischen diesen wurde lückenlos Durcupan verteilt und anschließend die Schnitte eingelegt. Direkt nach dem Zusammenlegen der beiden Folien wurden eventuell vorhandene Luftblasen manuell herausgedrückt. Nach 15 Minuten bei 70°C wurden nocheinmal die letzten Luftblasen vorsichtig herausgedrückt. Das Durcupan wurde anschließend im Ofen bei 70°C für 2 bis 3 Tage auspolymerisiert.

Ausstanzen der Schnitte

Die interessanten Regionen, insbesondere der basomediale Nucleus der Amygdala, wurden mithilfe eines Stereomikroskops identifiziert und mittels eines Skalpell aus geschnitten. Diese Sektionen wurden mit Sekundenkleber auf Beemkapseln aufgeklebt.

Ultramikrotom

Die Schnitte wurden zu einer Pyramiden-Form getrimmt. Es erfolgte die Herstellung von Semidünnschnitten mit einer Dicke von etwa 1 µm, die auf Objektträger aufgelegt wurden. Die anschließend hergestellten Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 50 – 70 nm (silbergraue Farbe) wurden auf mit Formvar bezogene, single-slot Kupfer-Grids aufgelegt. Hierzu wurde ein Ultracut S (Reichard-Jung, Wien, Österreich) verwendet.

Nachkontrastierung

Die Nachkontrastierung erfolgte in 2 % Uranylacetat und 0,01 % Bleicitrat in 50% Alkohol direkt auf den Grids. Anschließend konnten die Schnitte im Transmissions-Elektronenmikroskop betrachtet werden.

Auswertung der Schnitte im Lichtmikroskop

Es wurde ein Zeiss Axioplan 2 Mikroskop verwendet, welches mit Fluoreszenz-Optiken ausgerüstet war. Die digitale Bilderfassung erfolgte mittels einer angebauten Kamera (Spot Rt slider, Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA). Helligkeit und Kontrast wurden mittels GIMP (*GNU Image Manipulation Program*) adjustiert. Mittels Open Office wurden Zahlen und Erklärungen in die Bilder eingefügt.

Elektronenmikroskopie

Das Elektronenmikroskop

Es wurde ein LEO 906 E Transmissions-Elektronenmikroskop (Zeiss, Oberkochen) benutzt. Zur digitalen Bilderfassung war es mit einer BioScan Camera (Gatan Inc., USA) ausgerüstet. Die Aufnahme sowie die initiale Sichtung der Bilder inklusive Anpassung hinsichtlich Helligkeit und Kontrast erfolgte mittels der zugehörigen Software (Digital Micrograph, Gatan, Inc., Pleasanton, CA, USA). Mittels Microsoft Office wurden Zahlen und Erklärungen in die Bilder eingefügt.

Auswertung der Schnitte im Elektronenmikroskop

Zur Identifizierung der markierten Strukturen erfolgte zuerst ein meanderartiges Scannen des eingeschleusten Schnittes bei 12000-facher Vergrößerung. Regionen von Interesse wurden bei deutlich höheren Vergrößerungen, bis zu 64000-fach, betrachtet. Nach bestmöglicher Scharfstellung wurde eine Kamera (siehe oben) in das Elektronenmikroskop eingeschleust und die markierte Struktur inklusive ihrer Umgebung bei verschiedenen Vergrößerungen abfotografiert.

Zur elektronenmikroskopischen Identifikation von Dendriten, Axonen und Synapsen wurden die gängigen Standardkriterien herangezogen; beispielsweise typisch angeordnete Mikrotubuli in Dendriten oder Ansammlungen von Vesikeln und postsynaptische Veränderungen in Synapsen (Peters et al. 1991).

EDV

Die mithilfe der Software Digital Micrograph (wie oben) aufgenommenen Bilder wurden anschließend mittels der Software ImageJ (*Freeware, National Institute of Health*) analysiert. Informationen über Vergrößerung etc. waren in den Metadaten des dm3-Formates gespeichert und konnten durch das ebenfalls frei erhältliche dm3-Plugin für ImageJ ausgelesen werden. Durchmesser einzelner Profile sowie Flächenmessungen wurden hier vorgenommen. Anschließend wurden die Bilder in jpeg-Dateien umgewandelt und mit GIMP (*GNU Image Manipulation Program*) endgültig nachbearbeitet. Verändert wurden hierbei Helligkeit, Kontrast, Sättigung sowie die Schärfe. Andere Veränderungen an den Bildern wurden nicht vorgenommen.

Ergebnisse

Lichtmikroskopische Ergebnisse

Die Injektionen von PHAL oder Miniruby erfolgten stereotaktisch gesteuert in die ventrale CA1-Region des Hippocampus nahe der Übergangszone zum Subiculum (Abbildung 1; Abbildung 4 b). Der anterograde Transport des Tracers führte zu Markierungen, welche hauptsächlich im anterioren und posterioren Nucleus basomedialis (BMA und BMP) (Abbildung 2 a - d), im Nucleus medialis (ME) sowie in der amygdalo-hippocampalen Übergangszone (AHIP) zu finden waren.

In den Nuclei basolaterales anteriores et posteriores (BLA, BLP) fanden sich Anfärbungen von wechselnder Intensität. Abhängig von der anterior-posterioren Lage der Injektionsstelle fanden sich Anfärbungen im medialen Anteil des Nucleus centralis. Der am dichtesten angefärbte axonale Plexus wurde durchgehend im posterioren Teil des Nucleus basomedialis (BMP) (Abbildung 2; Abbildung 4 c) gefunden; passend zu den Ergebnissen bei Ratten (Kishi et al. 2006; Canteras und Swanson 1992; Cenquizca und Swanson 2007). Van Groen beschrieb insbesondere Projektionen aus dem temporalen Anteil von CA1 in den ipsilateralen Nucleus basolateralis (van Groen und Wyss 1990).

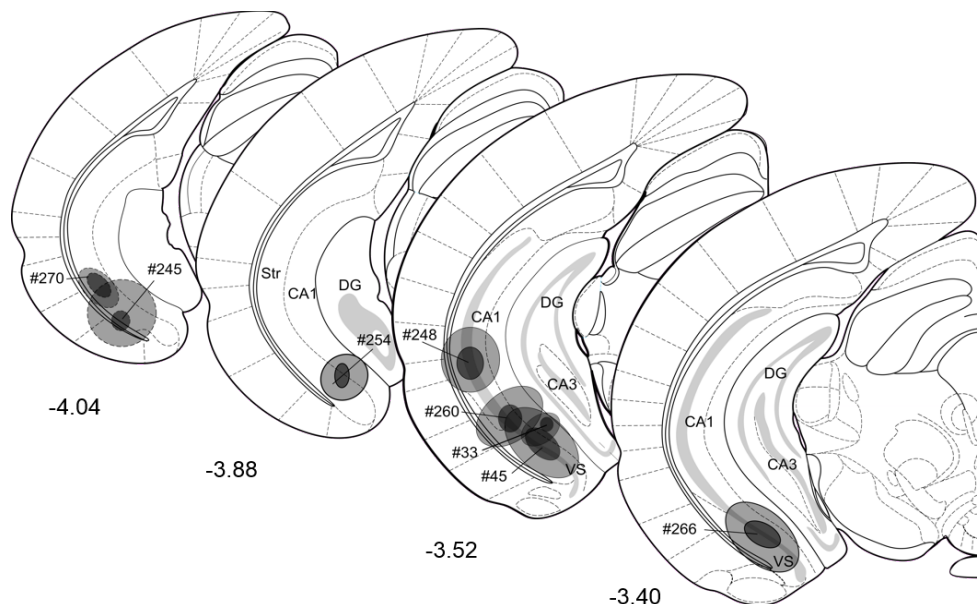


Abbildung 1 Übersicht über die Injektionsstellen. Die Zahlen unter den Schnittbildern entsprechen der Distanz zu Bregma in mm. Die Raute bezeichnet den jeweiligen Fall. Der Kernbereich jeder Injektion ist in dunklem grau, der Randbereich in hellem grau dargestellt. CA1 = Region CA1 des Hippocampus, CA3 = Region CA3 des Hippocampus, DG = Gyrus dentatus, STr = Übergangszone zwischen CA1 und Subiculum, VS = ventrales Subiculum. Bilder aus Franklin und Paxinos (2007). (Müller et al. 2012)

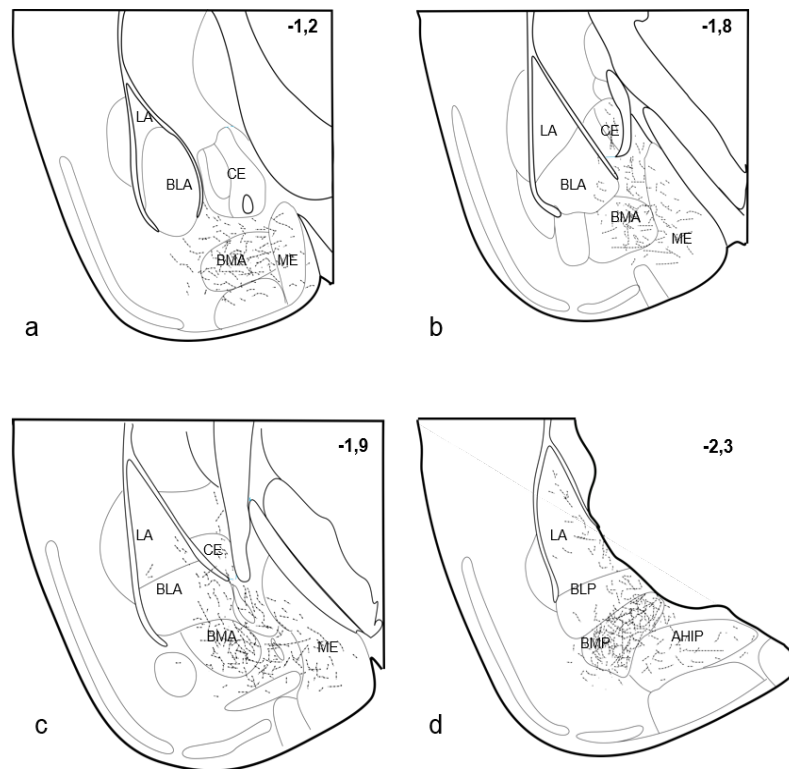


Abbildung 2 Zeichnung frontaler Schnitte der Amygdala (#45) in rostrocaudaler Anordnung (a-d). Die Zahlen in den rechten, oberen Ecken geben jeweils die AP-Position bezogen auf Bregma an. Anterograd markierte Fasern wurden in nahezu jedem Kern der Amygdala gefunden. Die dichteste Anfärbung wurde im BMP beobachtet. AHIP = amygdalo-hippocampale Übergangszone, BLA = Nucleus amygdalae basolateralis pars anterior, BLP = Nucleus amygdalae basolateralis pars posterior, BMA = Nucleus amygdalae basomedialis pars anterior, BMP = Nucleus amygdalae basomedialis pars posterior, CE = Nucleus amygdalae centralis, LA = Nucleus amygdalae lateralis, ME = Nucleus amygdalae medialis (Müller et al. 2012)

Unter Fluoreszenz-Beleuchtung zeigten sich dünne anterograd markierte Fasern im BMP mit multiplen Verdickungen (Abbildung 3 a, b, d, e, g). Obwohl die Fasern meist im Neuropil angesiedelt waren, zeigte sich gelegentlich eine direkte Nachbarschaft zu GABAergen Neuronen oder primären Dendriten (Abbildung 3 c, f, d, g). Färbung des Tracers und der GFP-positiven Neurone mittels dualer Peroxidase-Behandlung führten zu dünnen schwarzen Fasern mit kleinen Verdickungen, welche teilweise Kontakt mit braunen Somata und primären Dendriten herstellten (Abbildung 3 h, i).

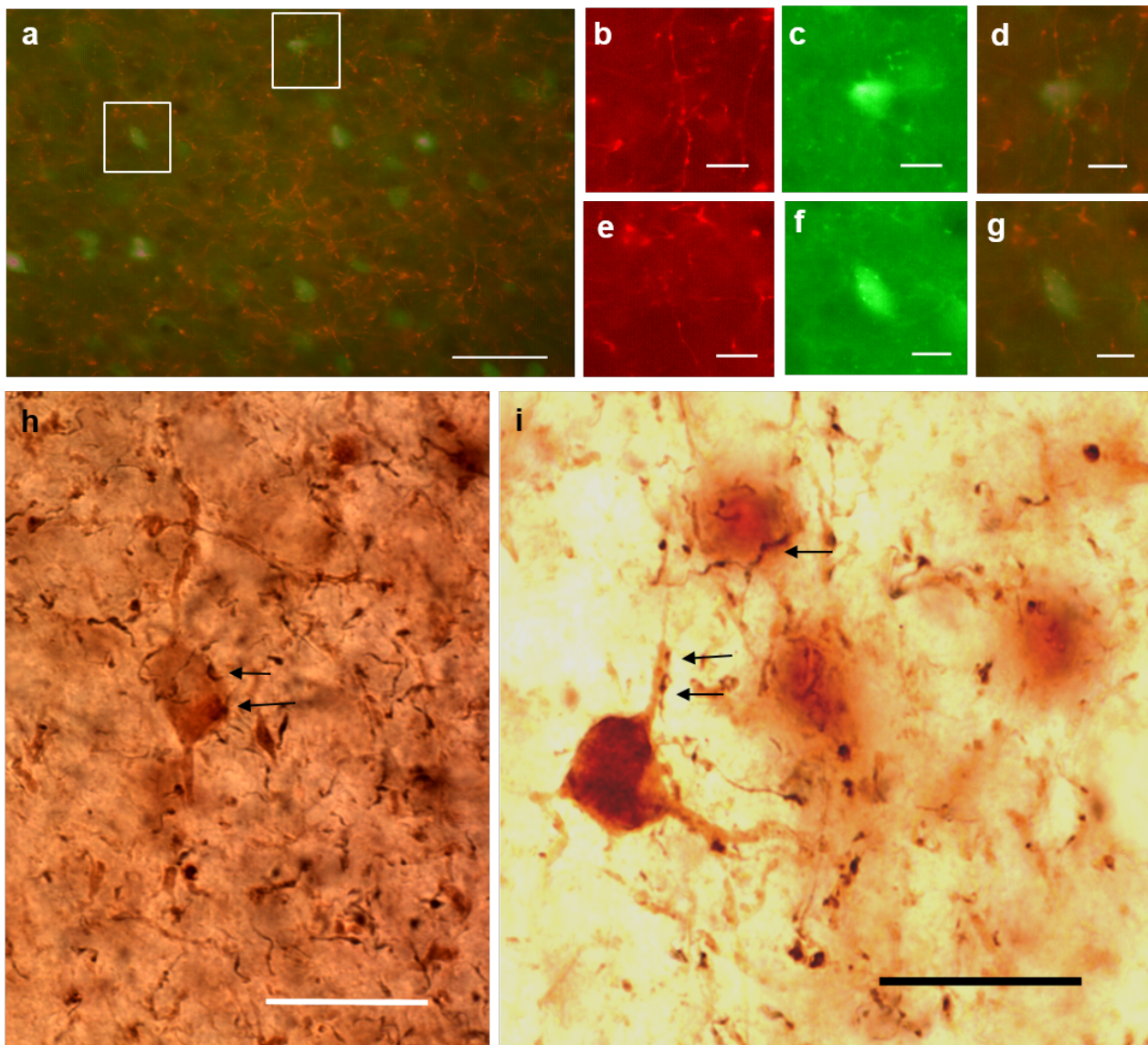


Abbildung 3 Anterograd mit Miniruby markierte Axone (rot) und GAD67-GFP-positive Neurone in der basomedialen Amygdala (**a-g**). Die weißen Quadrate markieren nochmals vergrößerte Ausschnitte (**b-d** und **e-g**). (**b**) und (**e**) zeigen anterograd markierte Axone mit kleinen Boutons und (**c**) und (**f**) zeigen GAD67-GFP-positive Neurone, wie in (**a**) markiert. Die übereinandergelagerten Bilder (**a**), (**d**) und (**g**) lassen einen Kontakt der terminalen Boutons mit GAD67-GFP-positiven Neuronen vermuten. (**h-i**) zeigen lichtmikroskopische Aufnahmen afferenter Axone und GAD67-GFP-positiver Neurone nach Peroxidasebehandlung. GAD67-GFP-positive Neurone (braun) werden von hippocampalen Afferenzen (schwarz) kontaktiert. Einige Kontakte sind mit Pfeilen markiert. Maßstab = 50 μm (**a**) / 20 μm (**h-i**) / 10 μm (**b-g**) (Müller et al. 2012)

Während PHAL ausschließlich anterograd transportiert wurde, wurden durch Miniruby auch einige Neurone im Injektionsgebiet angefärbt. Durch ihre rötliche Färbung in den für die Fluoreszenzmikroskopie prozessierten Schnitten respektive ihre schwarze Färbung in den für die elektronenmikroskopische Auswertung prozessierten Schnitten konnten diese Zellen von den GABAergen Zellen, welche braun angefärbt waren, eindeutig unterschieden werden. Die Qualität der GFP-Immunochemie wurde fortwährend durch den

direkten Vergleich mit unbehandelten Schnitten desselben Areals mittels Fluoreszenzmikroskopie kontrolliert. Der durchgeführte Vergleich des Fluoreszenzbildes (grüne GAD67 Neurone, rote Cy3-PHAL-Axone und Tetramethylrhodamin in Miniruby-markierten Axonen) mit den zugehörigen, für die Elektronenmikroskopie prozessierten Schnitten, zeigte praktisch identische Anfärbungen. Dies zeigte die hohe Spezifität des verwendeten Antikörpers für GFP.

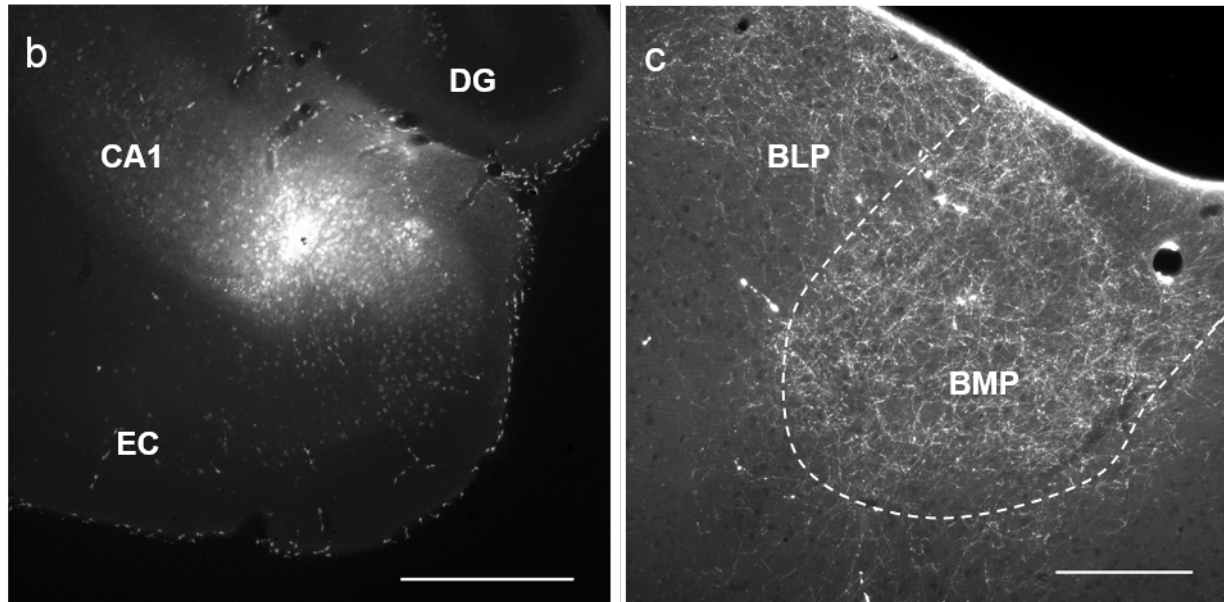


Abbildung 4 Beispiel einer typischen Injektionsstelle **(b)** im ventralen Anteil von CA1 / Subiculum unter Verwendung von Miniruby (Fall #45). Der Kernbereich der Injektion ist von einer Diffusionszone umgeben. Die Injektion ist begrenzt auf das Stratum pyramidale. **(c)** Anterograde Markierungen im BMP und dem medialen BLP. Beachte die relativ scharfe Abgrenzung des BMP (gestrichelte Linie). BLP = Nucleus amygdalae basolateralis pars posterior, BMP = Nucleus amygdalae basomedialis pars posterior, CA1 = Region CA1 des Hippocampus, DG = Gyrus dentatus, EC = Cortex entorhinalis. Maßstab = 500 μ m (a) / 200 μ m (b) (Müller et al. 2012)

Elektronenmikroskopische Ergebnisse

Da die dichteste Anfärbung im Nucleus basomedialis, pars posterior (BMP) gefunden wurde (Abbildung 4 c) (Abbildung 2), wurde diese Region für die elektronenmikroskopische Analyse ausgewählt.

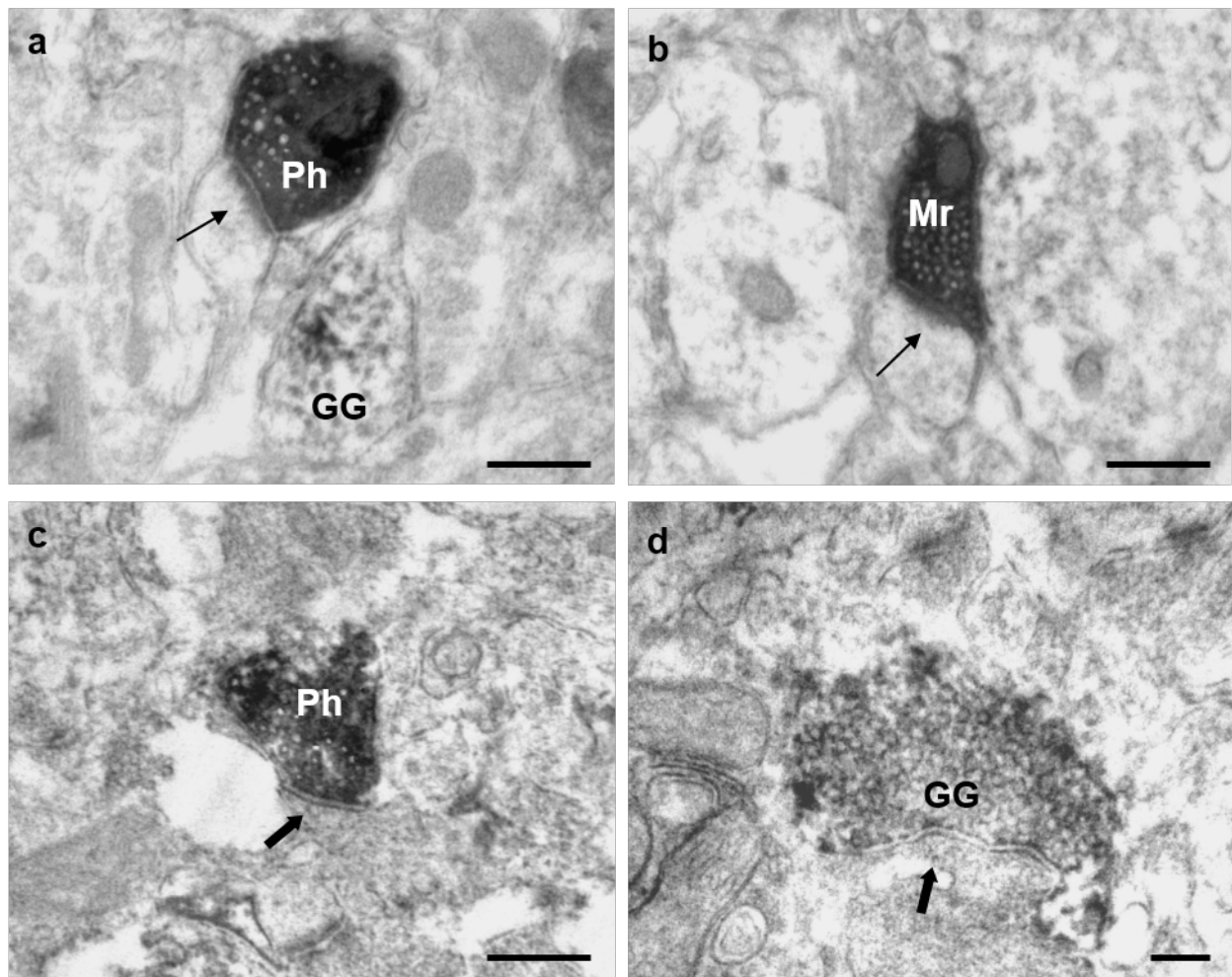


Abbildung 5 (a) PHAL-positive Synapse mit PSD. Der Pfeil deutet auf den synaptischen Spalt mit postsynaptischer Verdichtung. Vesikel erscheinen als kleine weiße Punkte. Die postsynaptische Struktur ist in diesem Fall ein unmarkierter Spine. In unmittelbarer Nähe liegt ein GFP-positives Profil; ein synaptischer Kontakt zwischen den markierten Strukturen ist hier jedoch nicht ersichtlich. (b) Miniruby-markierte Präsynapse, welche eine asymmetrische Synapse (Pfeil) mit einem unmarkierten Profil ausbildet. Die synaptischen Vesikel erscheinen als helle Punkte, auch das Mitochondrium erscheint heller als die um sie herum zu findende Markierung. (c) Ein PHAL-positiver präsynaptischer Bouton bildet eine symmetrische Synapse mit einem unmarkierten Profil aus (Pfeil). (d) Eine GFP-positive Präsynapse bildet eine symmetrische Synapse (Pfeil) auf ein unmarkiertes Profil aus. Verglichen mit den anderen markierten Profilen ist dieses von beachtlicher Größe. Mr = Miniruby, GG = GAD67-GFP, Ph = Phaseolus vulgaris leucoagglutinin, PSD = postsynaptische Verdichtung, Maßstab = 0,5 µm (Müller et al. 2012)

Für die Elektronenmikroskopie wurden die Schnitte mit Antikörpern inkubiert. Diese konnten anschließend mittels DAB (GFP-exprimierende Neurone) und Schwermetall-unterstütztem DAB (anterograd markierte Axone) dargestellt werden. Die anterograd markierten Fasern (homogenes, tief schwarzes Reaktionsprodukt) lagen zwischen lokalen GABAergen Neuronen (inhomogen verteiltes Reaktionsprodukt mit flockigem Aussehen) und stellten gelegentlich Kontakt zu diesen her (Abbildung 3 h, i). Die Mehrheit der Synapsen wurde jedoch im Neuropil zwischen den GABAergen Somata gefunden.

PHAL

Sowohl PHAL- als auch GFP-positive Strukturen konnten anhand ihres typischen Färbungsmusters im Elektronenmikroskop identifiziert werden. PHAL-positive Terminalien waren homogen tiefschwarz gefärbt. Dies schloss sämtliche Zellorganellen ein, lediglich die synaptischen Vesikel und größere Organellen wie beispielsweise Mitochondrien blieben ausgespart. Hieraus ergab sich das typische elektronenmikroskopische Bild (Abbildung 5 a). Lag die postsynaptische Verdichtung (PSD, *postsynaptic density*) in der angeschnittenen Ebene, stellte sich diese als sichtbare Verdunklung, jedoch weniger homogen als die PHAL-Markierung, dar. Zwischen der Präsynapse und der PSD war der synaptische Spalt sichtbar. Die Darstellung der PSD war von der angeschnittenen Ebene abhängig. So erklärt sich, dass vermutlich mehr PHAL-positive Synapsen eine PSD besaßen als sichtbar waren.

Bei ungefärbten Vesikeln und dicker, prominenter postsynaptischer Verdichtung spricht man von einer asymmetrischen Synapse, welche mit exzitatorischer Aktivität verbunden wird (Abbildung 5 a). Bei ungefärbten Vesikeln, jedoch kleinerer, fast nicht sichtbarer postsynaptischer Verdichtung von einer symmetrischen Synapse, welcher eine inhibitorische Funktion zugeschrieben wird (Abbildung 5 c) (Peters et al. 1991).

GFP

GFP-positive Strukturen, angefärbt mit nicht-Schwermetall-intensiviertem DAB, stellten sich flockig-schwarz dar (Wouterlood und Jorritsma-Byham 1993), mit einer charakteristischen Verteilung der Verdunkelungen (Abbildung 14 a, b). Diese konnte zuverlässig von der Schwermetall-verstärkten DAB-Anfärbung der anterograd markierten Neurone unterschieden werden.

PHAL- und Miniruby-markierte Synapsen

Dreiundachtzig (n = 83) Strukturen wurden wie oben beschrieben als PHAL-positive Synapsen identifiziert. Neunzehn (n = 19) Strukturen wurden als Miniruby-positive Synapsen identifiziert.

(Abbildung 5 a) zeigt eine anterograd markierte PHAL-positive Terminalie, (Abbildung 5 b) zeigt eine Miniruby-positive Präsynapse. Aufgrund der vergleichbaren Eigenschaften den anterograden Transport betreffend (Reiner 2006) wurden beide Färbungen zusammengefasst; es ergaben sich für die weiteren Auswertungen nunmehr Einhundertundzwei (n = 102) anterograd markierte hippocampo-amygdaläre Synapsen.

Diese anterograd markierten Synapsen waren von relativ geringer Größe (Abbildung 6). Diese betrug im Durchschnitt $0,214 \mu\text{m}^2$ (maximal $1,110 \mu\text{m}^2$; minimal $0,019 \mu\text{m}^2$; Standardabweichung $0,022 \mu\text{m}^2$). Nur etwas weniger als 40% aller anterograd markierten Synapsen hatten eine Größe von mindestens $0,2 \mu\text{m}^2$.

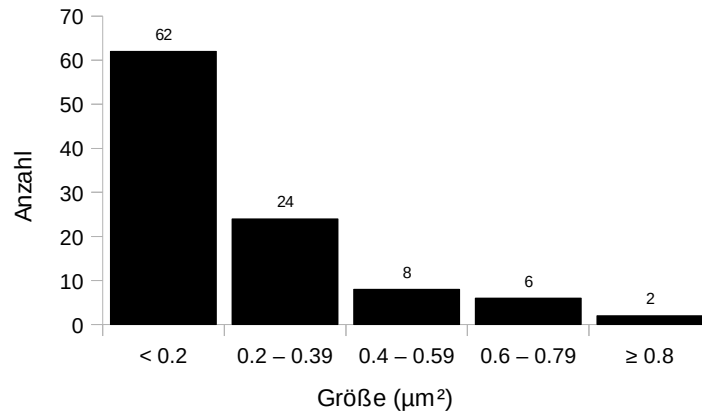


Abbildung 6 Größenverteilung der anterograd mit PHAL oder Miniruby markierten Synapsen. Mehr als die Hälfte aller markierten Profile waren kleiner als $0,2 \mu\text{m}^2$.

19 unmarkierte Profile, welche von einer anterograd markierten Synapse kontaktiert wurden und eine zugehörige postsynaptische Verdichtung zeigten, konnten in der angeschnittenen Ebene ausgemessen werden. Diese postsynaptischen Strukturen waren ebenfalls von geringer Größe. Sie betrug im Durchschnitt $0,199 \mu\text{m}^2$ (maximal $0,662 \mu\text{m}^2$; minimal $0,077 \mu\text{m}^2$; Standardabweichung $0,010 \mu\text{m}^2$) (Abbildung 7).

Die überwiegende Mehrheit der identifizierbaren Postsynapsen waren unmarkierte Strukturen (Abbildung 5 a).

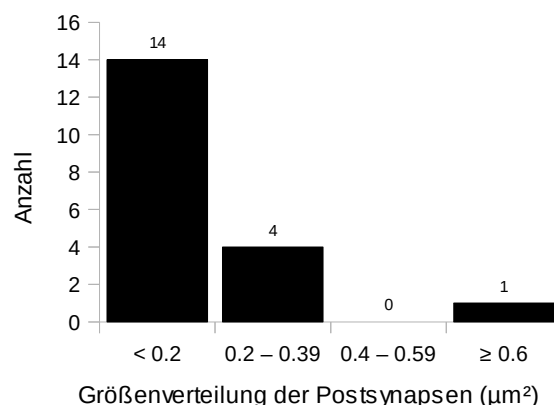


Abbildung 7 Größenverteilung der postsynaptischen Profile, welche von anterograd markierten Terminalien kontaktiert wurden.

Ebenfalls von meist geringer Größe waren anbeiliegende Dendriten, welche zwar räumlichen Kontakt zur markierten Präsynapse besaßen, jedoch keine in der angeschnittenen Ebene sichtbaren synaptischen Verbindungen mit ihr eingingen (Abbildung 8). Es wurden 465 Profile ausgemessen. Die durchschnittliche Größe betrug $0,171 \mu\text{m}^2$ (maximal $1,739 \mu\text{m}^2$, minimal $0,009 \mu\text{m}^2$, Standardabweichung $0,025 \mu\text{m}^2$). Hierbei ist zu bemerken, dass nicht alle angrenzenden Profile ausgemessen werden konnten, da hierfür in der angeschnittenen Ebene sichtbare Begrenzungen notwendig waren.

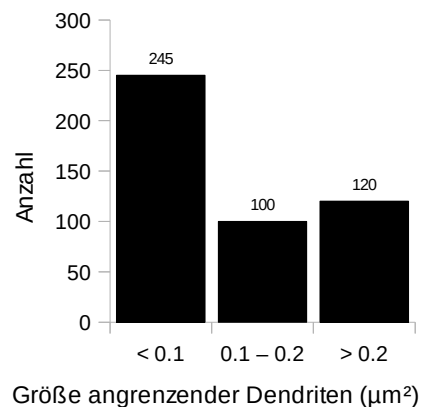


Abbildung 8 Größenverteilung der an PHAL- oder Miniruby-positive Profile angrenzenden Strukturen ohne sichtbaren synaptischen Kontakt zu ihnen.

Hieraus ergibt sich die Vermutung, dass hippocampale Afferenzen mehrheitlich kleinere, distal gelegene Dendriten kontaktieren.

Die durchschnittliche Anzahl an um markierte Terminalien herum liegenden, unmarkierten, ausmessbaren Profilen ohne synaptischen Kontakt betrug 4,56 (maximal 21, minimal 0, Standardabweichung 4,77) (Abbildung 9).

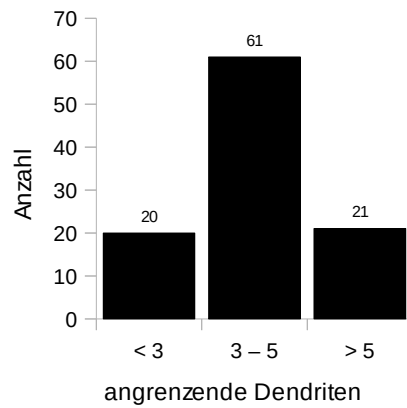


Abbildung 9 Verteilung der Anzahl an unmarkierten, in der angeschnittenen Ebene ausmessbaren Dendriten, welche direkt an der anterograd markierten Präsynapse anlagen.

Auffällig war die relativ große Anzahl an unmarkierten Synapsen, welche zwar räumlichen Kontakt zu einer anterograd markierten Präsynapse besaßen, jedoch keinen synaptischen Kontakt mit ihr eingingen (Abbildung 11 a; Abbildung 10). Die durchschnittliche Anzahl der an eine markierte Terminalie angrenzenden, unmarkierten Synapsen, welche keinen synaptischen Kontakt mit ihr eingingen, betrug 0,392 (maximal 3, minimal 0, Standardabweichung 0,200).

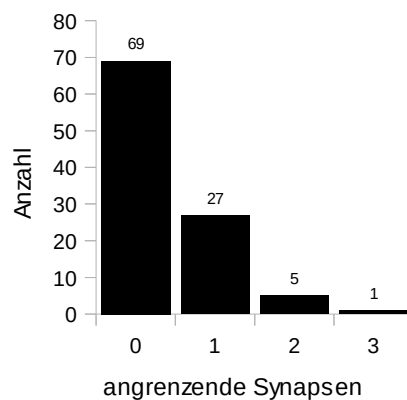


Abbildung 10 Synapsen, die direkten räumlichen Kontakt zu anterograd markierten Strukturen hatten, jedoch keinen synaptischen Kontakt mit ihnen eingingen.

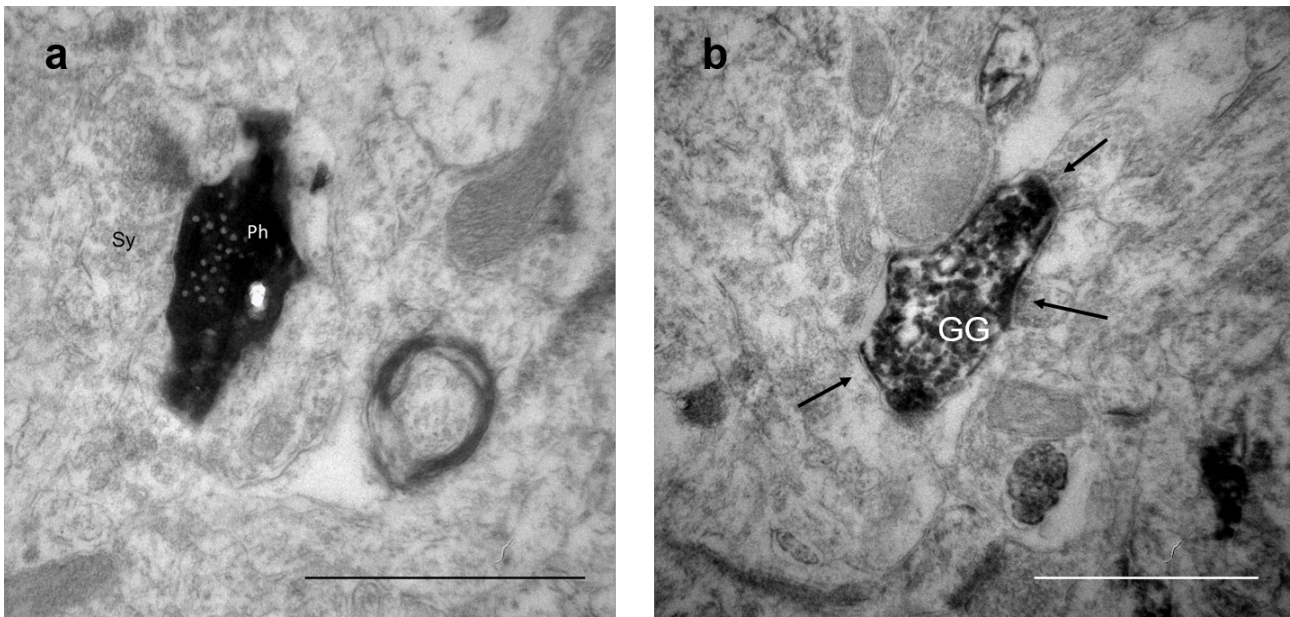


Abbildung 11 (a) Anterograd markierte Terminalie mit anbei liegender unmarkierter Synapse. Ein synaptischer Kontakt zwischen den zwei Strukturen ist nicht auszumachen. **(b)** Ein GFP-markiertes Profil mit mehreren afferenten, asymmetrischen Synapsen (Pfeile). Sämtliche afferenten Strukturen sind unmarkiert.
 GG = GAD67-GFP, Ph = Phaseolus vulgaris leucoagglutinin, Sy = unmarkierte Präsynapse, Maßstab = 1 µm

Die überwiegende Mehrheit der gefundenen hippocampalen Terminalien waren asymmetrische Synapsen.

Es konnte überraschenderweise jedoch zudem eine symmetrische Synapse (Abbildung 5 c) identifiziert werden. Dieser unerwartete Befund ließ auf eine inhibitorische, mutmaßlich GABAerge hippocampoamygdaläre Projektion schließen.

GFP-markierte Strukturen

Insgesamt konnten elektronenmikroskopisch 299 GFP-positive Profile gefunden und als dendritische Strukturen, Axone oder Präsynapsen identifiziert werden.

Einige GFP-positive Strukturen waren Spines, eine definitive Unterscheidung war jedoch durch die DAB-Ausfällungen nicht möglich.

Ein Ausmessen der Größe war bei 129 der 299 Profile möglich (entspricht 43,14%). Nicht möglich war dies bei Profilen, welche entweder nicht vollständig abfotografiert werden konnten oder deren Grenzen nicht sicher identifiziert werden konnten; entweder aufgrund von Gewebszerstörung oder nicht möglicher Fokussierung. Die durchschnittliche Größe der ausgemessenen GFP-positiven Strukturen betrug $0,78 \mu\text{m}^2$ (maximal $17,16 \mu\text{m}^2$, minimal $0,03 \mu\text{m}^2$, Standardabweichung $1,41 \mu\text{m}^2$) (Abbildung 12).

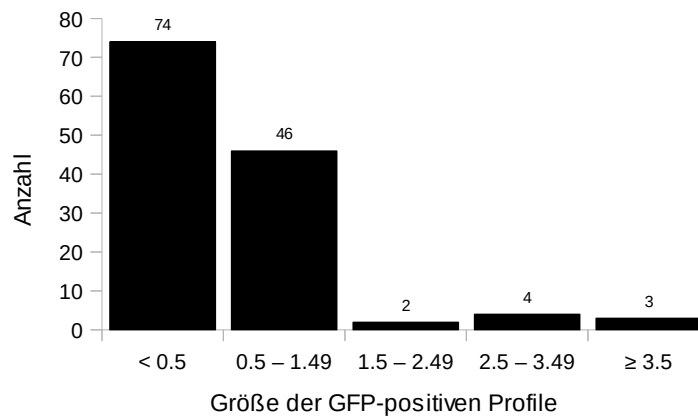


Abbildung 12 Größenverteilung der GFP-markierten Profile.

GFP-positive Profile waren somit im Durchschnitt deutlich größer als die unmarkierten, von hippocampalen Afferenzen kontaktierten Profile, deren durchschnittliche Größe $0,199 \mu\text{m}^2$ betrug (siehe oben).

Umgebende Strukturen der GFP-positiven Profile ohne synaptischen Kontakt

Unmittelbar an die GFP-positiven Profile angrenzende Dendriten, welche jedoch keinen synaptischen Kontakt mit diesen eingingen, wurden in „große“ und „kleine“ Dendriten eingeteilt. Dies ist jeweils in Bezug auf die Größe der an sie angrenzenden GFP-positiven Struktur zu verstehen.

Die durchschnittliche Anzahl der angrenzenden großen Dendriten betrug 1,077 (minimal 0, maximal 5, Standardabweichung 0,467).

Die durchschnittliche Anzahl der angrenzenden kleinen Dendriten betrug 2,514 (minimal 0, maximal 14, Standardabweichung 1,732).

Afferenzen auf GFP-positive Profile

An 102, entsprechend 34,11% der markierten Profile, fand sich mindestens eine unmarkierte afferente Synapse, in einigen Fällen waren auch mehrere afferente Synapsen an einem GFP-Profil sichtbar (Abbildung 11 b). Zu bedenken ist, dass nicht alle angetroffenen GFP-positiven Strukturen fotografiert werden konnten, daher ist diese Prozentzahl als Annäherung zu verstehen.

Afferente Synapsen wurden nur gezählt, wenn sie alle elektronenmikroskopischen Charakteristika einer Synapse zeigten, insbesondere einen synaptischen Spalt, Vesikel sowie eine postsynaptische Verdichtung (PSD) (Peters et al. 1991). Jedoch waren, in

Analogie zu den GFP-positiven Profilen, nicht alle Afferenzen ausmessbar; zumeist, da nicht alle Grenzen abfotografiert werden konnten. Ein Ausmessen war bei 103 der insgesamt 139 identifizierten unmarkierten Afferenzen möglich. Dies entspricht 74,10%.

Die durchschnittliche Größe der ausgemessenen unmarkierten Terminalien betrug $0,300 \mu\text{m}^2$ (maximal $1,556 \mu\text{m}^2$; minimal $0,042 \mu\text{m}^2$; Standardabweichung $0,032 \mu\text{m}^2$) (Abbildung 13).

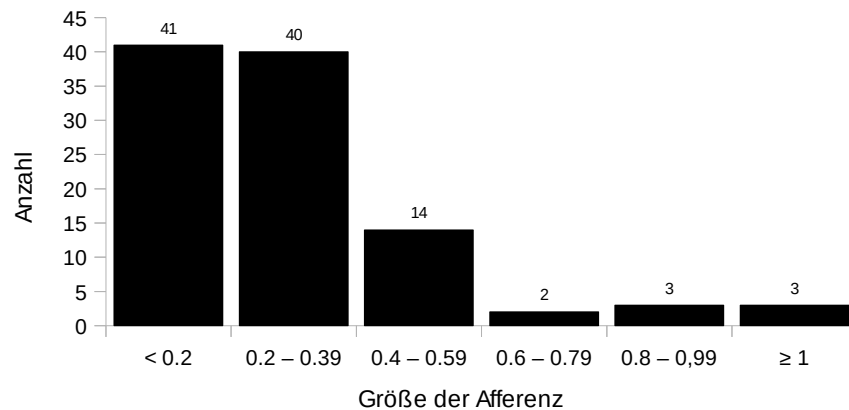


Abbildung 13 Größenverteilung der präsynaptischen Profile afferenter Synapsen auf GFP-markierte Strukturen (Müller et al. 2012).

Dies ist etwas größer als die durchschnittliche Größe der PHAL-markierten Synapsen ($0,214 \mu\text{m}^2$; siehe oben).

Bis auf drei Synapsen waren alle afferenten Strukturen unmarkiert; hiervon waren zwei präsynaptische Profile PHAL-positiv (Abbildung 14 c, d) und eines GFP-positiv (Abbildung 14 b).

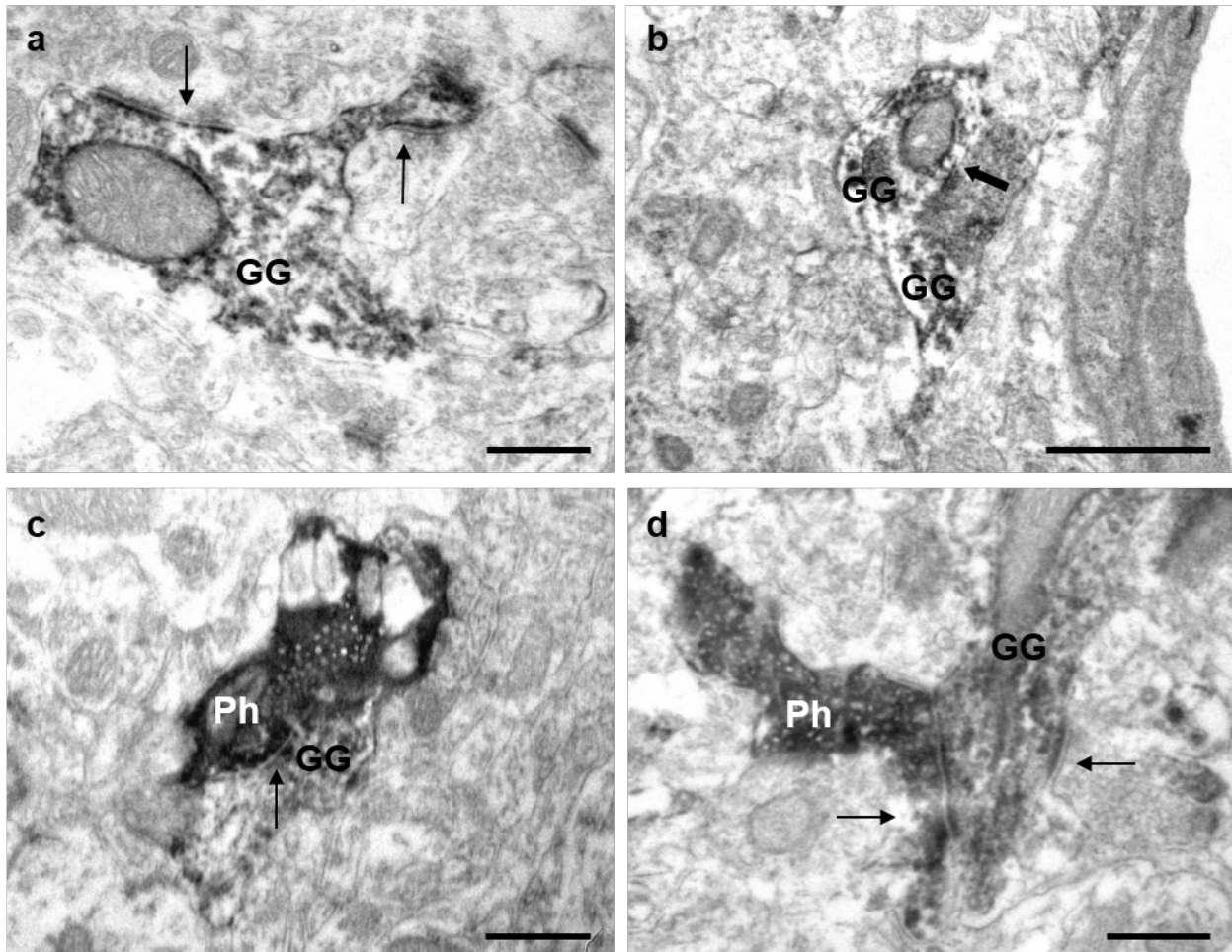


Abbildung 14 (a) Eine GFP-markierte dendritische Struktur im BMP wird von einer unmarkierten Schafsynapse und einer Spine Synapse kontaktiert. In beiden Fällen sind asymmetrische Synapsen mit postsynaptischer Verdichtung sichtbar (Pfeile). (b) Zwei GFP-positive Profile etablieren einen symmetrischen synaptischen Kontakt (Pfeil) miteinander. (c) Eine asymmetrische Synapse (Pfeil) zwischen einer PHAL-positiven Präsynapse und einer GFP-markierten postsynaptischen Struktur. (d) Eine Phal-positive präsynaptische Struktur bildet eine asymmetrische Synapse mit einem GFP-markiertem Profil. Auffällig sind die zwei sich gegenüberliegenden asymmetrischen Synapsen (Pfeile). Ph = Phaseolus vulgaris leucoagglutinin, BMP = Nucleus amygdalae basomedialis pars posterior, GG = GAD67-GFP, Maßstab = 0,5 μm (Müller et al. 2012)

Markierte präsynaptische Profile an symmetrischen Synapsen

Trotz des sehr häufigen Auftretens von GFP-positiven Dendriten fand sich nur eine sehr geringe Anzahl an GFP-positiven Präsynapsen. Diese Terminalien enthielten Vesikel, eine explizite postsynaptische Verdichtung (PSD) fehlte jedoch. Abbildung 5 d zeigt eine große GFP-positive Präsynapse, welche ein nicht markiertes Profil kontaktiert. Die durch GFP-positive Terminalien kontaktierten Strukturen waren zumeist unmarkierte Dendriten. Gelegentlich wurden jedoch auch GFP-positive Profile kontaktiert (Abbildung 14 b).

Abbildung 5 c zeigt ebenfalls eine symmetrische Synapse, welche jedoch anterograd markiert ist. Dieser Befund war unerwartet, jedoch von großer Wichtigkeit: Aufgrund der

symmetrischen Synapse ist eine GABAerge Synapse zu vermuten, jedoch wird das granuläre Muster der DAB-Anfärbung vermutlich von der deutlich dichteren Schwermetall-verstärkten DAB-Anfärbung überdeckt.

Übersicht der verschiedenen synaptischen Kontakttypen

In der Gesamtschau der Befunde ließen sich vier verschiedene Arten synaptischer Kontakte unterscheiden:

1. Anterograd markierte, asymmetrische Terminalien an unmarkierten Profilen (Abbildung 5 a, b). Diese waren am häufigsten anzutreffen. Da sämtliche GABAergen Zellen durch GFP markiert waren, muss man von einer direkten hippocampalen Innervation amygdalärer Projektionsneurone ausgehen.
2. Anterograd markierte Präsynapsen, welche asymmetrische Synapsen mit GFP-positiven Profilen ausbilden (Abbildung 14 d). Das Auffinden solcher Strukturen belegt eine direkte glutamaterge hippocampo-amygdaläre Projektion auf lokale amygdaläre GABAerge Interneurone.
3. Unerwarteterweise konnte eine anterograd markierte, also aus dem Hippocampus stammende Projektion erfasst werden, welche im untersuchten Zielgebiet eine symmetrische Synapse ausbildete (Abbildung 5 c). Zusammen mit den deshalb anschließend durchgeführten Fluoreszenz-unterstützten mikroskopischen Aufnahmen belegt dies eine hippocampo-amygdaläre GABAerge Projektion. Eine derartige Verbindung konnte in dieser Arbeit erstmals dokumentiert werden.
4. Symmetrische Synapsen zwischen zwei GFP-positiven Profilen (Abbildung 14 b).

Retrograde Markierung von hippocampalen Neuronen

Das Auffinden einer anterograd markierten symmetrischen Synapse gab Anlass für die Vermutung, dass GABAerge Projektionen vom ventralen Hippocampus zur Amygdala existieren. Zur Klärung erfolgten zwei (n = 2) große Injektionen von Fluorogold in die Amygdala. Diese Injektionen führten zu retrograder Markierung von Neuronen in paralaminaren thalamischen Kernen, im perirhinalen Kortex sowie im Hippocampus. Innerhalb des Hippocampus fanden sich markierte Neurone im Stratum oriens und dem Stratum pyramidale der ventralen CA1-Region sowie im Subiculum. (Abbildung 15 a) zeigt die Fluorogold- und GFP-markierten Zellen in der ventralen CA1-Region. Retrograd markierte Neurone fanden sich hier im Stratum pyramidale sowie in geringerer Anzahl im

Stratum oriens der CA1-Region. GFP-markierte Neurone dagegen waren gleichmäßig in allen Schichten verteilt. Durch Beleuchtung mit verschiedenen Spektren von Fluoreszenz-induzierendem Licht und anschließendem Übereinanderlegen der Bilder konnten Doppelmarkierungen sichtbar gemacht werden (Abbildung 15 b - d). In jedem der untersuchten Schnitte konnten Fluorogold-markierte und zugleich GFP-positive Neurone nachgewiesen werden, womit erstmals die Existenz einer GABAergen hippocampo-amygdalären Projektion nachgewiesen war.

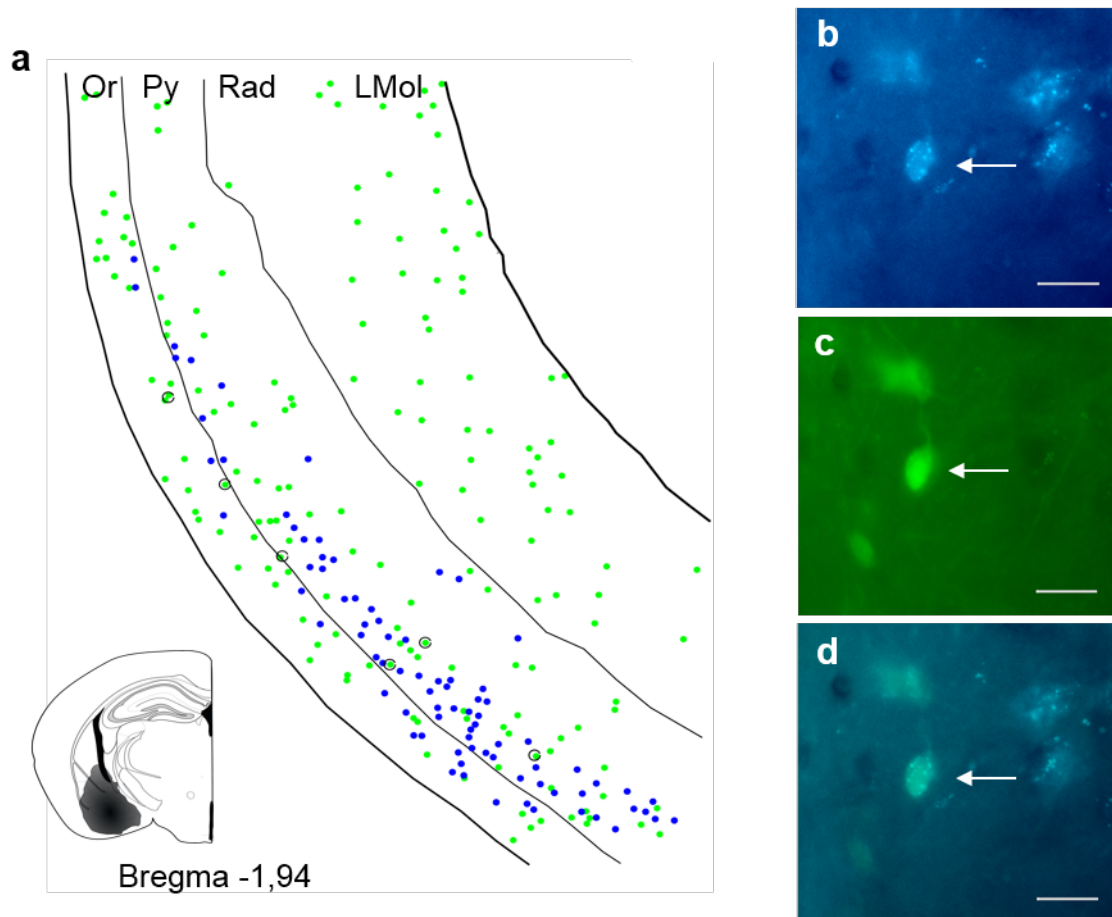


Abbildung 15 (a) Verteilung von GAD67-GFP-positiven Neuronen (grün) und retrograd markierten amygdalo-hippocampalen Projektionsneuronen (blau) im Übergang des ventralen CA1 zum Subiculum nach Fluorogold-Injektion in die Amygdala. Die Zahl in der linken unteren Ecke gibt die Distanz zu Bregma an. GAD67-GFP-positive Neurone waren gleichmäßig in allen Schichten verteilt, während Fluorogold-markierte Zellen hauptsächlich im Stratum oriens und basalen Anteilen des Stratum pyramidale lokalisiert waren. Einkreisierte Neurone im Stratum oriens und im basalen Anteil des Stratum pyramidale waren doppelmarkiert. Vergrößerte Fotografien eines Fluorogold-markierten, GAD67-GFP-positiven Neurons im Stratum oriens: (b) Fluorogold-Markierung, (c) GAD67-GFP-Markierung, (d) ist aus (b) und (c) zusammengesetzt. Die Pfeile markieren das doppelt markierte Neuron. Or = Stratum oriens, Py = Stratum pyramidale, Rad = Stratum radiatum, LMol = Stratum lacunosum-moleculare. Maßstab = 10 µm (Müller et al. 2012)

GFP-positive Somata

In den elektronenmikroskopisch untersuchten Schnitten fanden sich zahlreiche GFP-positive Somata. An einigen fanden sich afferente Synapsen, die höchste beobachtete Anzahl afferenter Synapsen an einem einzigen Soma betrug 5. Sämtliche gefundenen Afferenzen waren unmarkiert.

Diskussion

Einordnung in den aktuellen Forschungsstand

In dieser Arbeit wurden die direkten hippocampo-amygdalären Projektionen und ihre Zielneurone untersucht. Genutzt wurden hierzu anterograde Tracingmethoden in GAD67-GFP Mäusen. Mehrere bisherige Untersuchungen an Ratten hatten Projektionen aus dem ventralen Hippocampus und Subiculum nachgewiesen, welche fast die gesamte Amygdala betrafen, jedoch insbesondere den Nucleus basomedialis posterior (Canteras und Swanson 1992; Cenquizca und Swanson 2007; Kishi et al. 2006; Ottersen 1982) sowie den Nucleus basolateralis (van Groen und Wyss 1990). In Übereinstimmung hiermit wurden in dieser Arbeit die stärksten Markierungen im Nucleus amygdalae basomedialis, pars posterior dokumentiert. Darüber hinaus konnten neue Informationen über die Projektionen und ihre Zielzellen gewonnen werden:

- Hippocampo-amygdaläre Axone kontaktierten sowohl unmarkierte Neurone als auch als GABAerg identifizierte Neurone im BMP.
- Es fand sich eine anterograd markierte symmetrische Synapse, was auf eine GABAerge Projektion aus dem Hippocampus in die Amygdala schließen lässt. Dieser Befund wurde mit Hilfe von retrograder Markierung der hippocampo-amygdalären Projektionen bestätigt.

Diese Ergebnisse zeichnen ein erstes Bild eines neuen morphologischen Korrelats der vorbeschriebenen Rolle von GABAergen Neuronen, welche die amygdalo-hippocampalen Interaktionen während der Speicherung emotionaler Gedächtnisinhalte und der Ausführung emotionalen Verhaltens medieren (Bast et al. 2001; Mello et al. 1992b).

Methodenkritik

Der PHAL-Tracer

Phaseolus vulgaris bezeichnet im Deutschen die Gartenbohne. Phaseolus vulgaris leucoagglutinin stammt ursprünglich aus den Samen roter Kidneybohnen. Das Molekulargewicht beträgt 126 kDa; es besteht aus 4 Untereinheiten. Der PHAL-Tracer ist ein in der aktuellen Forschung häufig verwendeter Tracer. Iontophoretisch appliziert führt er zu relativ kleinen, präzisen Injektionsstellen von durchschnittlich 50 – 200 µm Durchmesser, welche zudem aufgrund der vollständigen Markierung der Neurone sicher

identifiziert werden können (Gerfen und Sawchenko 1984). Es wird ein fast ausschließlicher anterograder Transport beschrieben; nur sehr selten wird ein retrograder Transport beobachtet (Gerfen und Sawchenko 1984; Groenewegen 1990), welcher zudem nicht in allen Neuronentypen stattzufinden scheint (Chen und Aston-Jones 1998). Groenewegen et al. (Groenewegen 1990) beschrieben zwei Arten von retrograden Markierungen: Granuläre Anfärbungen sowie komplette Ausfüllung von Profilen. Letztere, die prinzipiell mit den hier beschriebenen anterograden Markierungen hätten verwechselt werden können, kamen einerseits seltener vor und wurden andererseits nur in relativ kleinen Entfernungen zur Injektionsstelle beobachtet. PHAL scheint zudem nicht wesentlich von vorbeiziehenden Fasern aufgenommen und transportiert zu werden. Es wird die gesamte Zelle markiert, inklusive der Dendriten, Axone, Axon-Kollateralen und Terminalien. Bei einer Überlebenszeit bis 17 Tage wurde keine erkennbare Degradation des transportierten PHAL-Tracers beschrieben (Gerfen und Sawchenko 1984; Groenewegen 1990; Lanciego 2006).

Der hier verwendete Tracer stammt aus den Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA. Er wurde bei 6 Tieren in folgender Verdünnung verwendet: 2,5% in 0,01 M PB, pH 8,0.

Miniruby

Dextrane sind biologisch inerte hydrophile Polysaccharide, welche eine niedrige Toxizität und geringe Immunogenität aufweisen. Zudem sind sie gegen die meisten endogenen Glykosidasen resistent (Reiner 2006). Dextranamin (eigentlich: Dextran-Lysin), konjugiert mit Biotin, wird als BDA (*biotinylated dextran amine*) bezeichnet. Miniruby bezeichnet eine Mischung aus BDA10kDa und RDA10kDa (Tetramethylrhodamin-konjugiertes DA). Derartige Mischungen mit fluoreszierenden Konjugaten ermöglichen die fluoreszenzmikroskopische Beurteilung der Injektionsstelle sowie der Transportqualität, bevor zeitaufwändigere Schritte zur Vorbereitung der Transmissions-Lichtmikroskopie respektive Elektronenmikroskopie unternommen werden (Reiner 2006).

Mithilfe von Dextranaminen lassen sich kleine und klar definierte Injektionsstellen produzieren. Morphologische Details werden meist sehr gut erhalten, insbesondere ist eine detailreiche Anfärbung von Terminalien durch 10kDa-Dextran-Amine möglich. Der Tracer toleriert eine Fixation mit Glutaraldehyd. Obwohl Dextranamine antero- und retrograd transportiert werden, überwiegt bei den 10kDa-Dextranaminen deutlich der anterograde Transport, insbesondere nach iontophoretischer Applikation (Lanciego 2006; Reiner 2006).

Miniruby kam an zwei Tieren zum Einsatz (Katalognummer: D-3312, Invitrogen / jetzt: Life Technologies, Darmstadt; 10% in 0,01 M PB, pH 7,4).

In dieser Studie wurde entweder PHAL oder Miniruby in den ventralen Hippocampus im Bereich der Region CA1 und des Subiculus von GAD67-GFP-Mäusen injiziert.

Der PHAL-Tracer wurde gewählt, da er fast ausschließlich anterograd transportiert wird und praktisch nur diejenigen Neurone markiert, deren Somata oder Dendriten im zentralen Bereich der Injektionsstelle liegen (Gerfen und Sawchenko 1984; Groenewegen 1990).

Miniruby wurde ausgewählt, da sich hiermit kleine Injektionsstellen sowie eine detaillierte Anfärbung des Zielgewebes, vor allem in Schnitten die für die Elektronenmikroskopie vorbereitet wurden, erreichen ließen (Reiner 2006).

Retrograder Tracer

Bei zwei Tieren (n = 2) wurde Fluorogold (4%, Fluorochrome, Englewood, CO, USA), verdünnt in destilliertem Wasser, verwendet.

Fluoro-Gold wird exklusiv retrograd transportiert. Es bietet die größte Spanne an möglicher Überlebenszeit; von wenigen Tagen bis hin zu einem Jahr. Zudem wird Fluoro-Gold praktisch nicht durch intakte oder beschädigte, durch das Injektionsgebiet ziehende Fasern aufgenommen. Fluoro-Gold selbst ist nicht elektronendicht, bedarf also der Verstärkung zur Sichtbarmachung im Elektronenmikroskop (Lanciego 2006).

Falsch-positive Markierungen

Nach Miniruby-Injektionen zeigten sich einige wenige retrograd markierte Neurone im BLA sowie der amygdalo-hippocampalen Übergangszone der Amygdala, jedoch nie im Nucleus basomedialis.

Es existieren Berichte über falsch-positive anterograde Markierungen durch den Miniruby-Tracer durch sogenannten axonalen „collateral-collateral transport“. In diesem Fall wird der Tracer nicht nur durch die innerhalb der Injektionsstelle liegenden Dendriten aufgenommen, sondern ebenfalls durch in der Injektionsstelle liegende Axonterminalien. In der Folge kann der Tracer durch retro- und anschließenden anterograden axonalen Transport in andere Kollateralen transportiert werden (Chen und Aston-Jones 1998). Für amygdaläre Projektionsneurone, deren Axone aus dem Ursprungskern herausziehen, wurden lokale Axon-Kollateralen beschrieben (McDonald 1982; Valverde 1962). Es fanden sich jedoch keine Axon-Kollateralen in der näheren Umgebung der retrograd durch

Miniruby markierten Neurone, weshalb wir die Wahrscheinlichkeit für eine falsch-positive Markierung von Axonen im basomedialen Nucleus in dieser Arbeit für vernachlässigbar gering halten. Zudem wurde die Mehrzahl der Tiere mit PHAL injiziert und aus dieser Kohorte die überwiegende Anzahl synaptischer Profile identifiziert. Wir gehen daher davon aus, dass sämtliche hier beschriebenen Terminalien tatsächlich hippocampalen Ursprungs waren.

Größe der PHAL-positiven Profile

Andere Studien, die ebenfalls den PHAL-Tracer verwendeten, kamen zu ähnlichen Größen bei der Ausmessung der markierten Profile. Brinley-Reed et al. (Brinley-Reed et al. 1995) haben präfrontale Projektionen zum magnozellularären Anteil des Nucleus basalis der Amygdala untersucht. Die dabei gemessenen PHAL-positiven Terminalien hatten einen Durchmesser von durchschnittlich 0,5 – 1,5 μm ; eine kreisrunde Form angenommen, entspricht dies einer Fläche von 0,20 – 1,77 μm^2 . Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Flächen waren in derselben Größenordnung; entsprechend dem Größenunterschied zwischen Ratten und Mäusen jedoch tendenziell kleiner.

Eindringtiefe der Antikörper und Dicke der PSD

Eine möglicherweise nicht ausreichende Eindringtiefe der Antikörper, mit deren Hilfe die PHAL- und GFP-positiven Profile identifiziert wurden, konnte theoretisch zu falsch-negativen Markierungen führen. Aus diesem Grunde wurden vornehmlich die oberen Schnitte aus einem Block für die Elektronenmikroskopie verwendet. Auf die qualitative Aussage der Arbeit hatte diese Problematik keinen Einfluss.

Nach verzögerter Fixation kommt es zu Veränderungen der Ultrastruktur, insbesondere die Synapsen betreffend (Tao-Cheng et al. 2007). Eine mögliche Verdickung der PSD's hätte keinen Einfluss auf das Ergebnis der vorliegenden Arbeit gehabt.

Diskrepanzen der veröffentlichten und der hier dargestellten Daten

Die aus dieser Untersuchung veröffentlichten Daten (Müller et al. 2012) stimmen nicht vollständig mit den hier präsentierten Daten überein. Dies kam durch eine erneute Untersuchung der angefertigten elektronenmikroskopischen Aufnahmen sowie Auswertung zusätzlicher Präparate der verwendeten Versuchstiere zustande. An den qualitativen Ergebnissen der Studie änderte sich hierdurch nichts.

Beziehung hippocampaler Afferenzen zu GABAergen Strukturen

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung des BMP fanden sich zahlreiche anterograd markierte Axone sowie amygdaläre GFP-positive Neurone und ihre Fortsätze. Die hippocampalen Fasern durchmischten sich mit den GFP-positiven Profilen; sowohl einzelne Profile als auch direkte Kontakte zwischen GFP- und anterograd markierten Profilen konnten aber durch die unterschiedliche Anfärbung sowohl im Licht- als auch im Elektronenmikroskop gut identifiziert werden. In diesen Fällen zeigte sich elektronenmikroskopisch in den meisten Fällen eine ausgesprägte postsynaptische Verdichtung (PSD), welche typisch für Synapsen mit exzitatorischer Funktion ist. Die meisten postsynaptischen Strukturen der anterograd markierten Synapsen waren jedoch kleine, mutmaßlich distale, GFP-negative Dendriten. Diese waren vermutlich amygdaläre Projektionsneurone oder Klasse-I-Zellen (McDonald 1982). GABAerge Neurone wurden dagegen deutlich seltener kontaktiert. Dies ist vergleichbar mit den bisherigen Beschreibungen kortikaler Afferenzen bei Ratten (Brinley-Reed et al. 1995) sowie Katzen und Affen (Smith et al. 2000).

Afferenzen auf amygdaläre GABAerge Interneurone

In dieser Untersuchung fanden sich zahlreiche, zumeist asymmetrische, unmarkierte Synapsen an GABAergen Interneuronen. Zusätzlich konnten auch anterograd markierte Synapsen nachgewiesen werden. In der Vergangenheit konnte eine große Anzahl an verschiedenen Inputs auf GABAerge Interneurone der Amygdala nachgewiesen werden, die sich sowohl nach ihrer anatomischen Herkunft als auch nach ihren neurochemischen Eigenschaften unterscheiden:

- Kongruent mit den Ergebnissen dieser Arbeit wurden hippocampo-amygdaläre Projektionen, mutmaßlich im Sinne einer Feedforward-Inhibition, mithilfe elektrophysiologischer Methoden vorbeschrieben (Mello et al. 1992a).
- Li et al. (Li et al. 2002) haben bei Ratten symmetrische GABAerge, asymmetrische noradrenerge und bisher nicht identifizierte, symmetrische und asymmetrische Afferenzen auf GABAerge Neurone im Nucleus basolateralis dokumentiert. Neuere Untersuchungen zeigten zudem, dass lediglich eine Subpopulation von GABAergen Neuronen über alpha-1-Adrenozeptoren direkt durch Noradrenalin exzitiert wird, während andere GABAerge Neurone praktisch keine Reaktion hierauf zeigen (Kaneko et al. 2008).

- Vermutlich aus dem ventralen Tegmentum und der Substantia nigra (Fallon und Ciofi 1992) erhalten Parvalbumin-positive GABAerge Interneurone der basolateralen Amygdala inhibitorischen dopaminergen Input (Pinard et al. 2008). Dopamin supprimiert darüber hinaus bei Mäusen die feedforward-Inhibition durch lokale Interneurone in der lateralen Amygdala (Bissière et al. 2003).
- Muller et al. (Muller et al. 2007b) konnten in der basolateralen Amygdala eine serotoninerge Innervation von PV- und VIP-positiven Interneuronen nachweisen, welche zumeist inhibitorischer Natur war.
- Parvalbumin-positive Interneurone im Nucleus basolateralis erhalten einen zumeist inhibitorischen cholinergen Input (Muller et al. 2011).
- Der Nucleus endopiriformis moduliert über das Neuropeptid-S-System die Aktivität in der basolateralen Amygdala, woran GABAerge Mechanismen beteiligt sind (Meis et al. 2008).
- Projektionsneurone der basolateralen Amygdala von Katzen aktivieren über Axon-Kollateralen Parvalbumin-positive Interneurone, kongruent mit dem Prinzip einer Feedback-Inhibition (Smith et al. 2000); ähnliches konnte bei Ratten beobachtet werden (McDonald et al. 2005).
- Thalamische und kortikale Afferenzen: Es existieren kortikale Afferenzen auf Parvalbumin-positive Interneurone (Smith et al. 2000); exzitatorische thalamische Afferenzen konnten auf GABAerge Interneurone im Nucleus lateralis nachgewiesen werden (Woodson et al. 2000). Diese waren zum Großteil asymmetrisch und könnten so Teil einer feedforward-Inhibition sein. Zudem sind thalamische Afferenzen in der Lage, den amygdalo-hippocampalen Output zu modulieren (Linke et al. 2004). Elektrophysiologische Untersuchungen lieferten des Weiteren Hinweise auf auf GABAerge Interneurone konvergierende thalamische und kortikale Afferenzen (Szinyei et al. 2000), wobei thalamische Afferenzen funktionell GABAerger Kontrolle unterliegen (Shin et al. 2006).

GABAerge Synapsen an GABAergen Strukturen

Einige GABAerge Profile bildeten symmetrische Synapsen untereinander aus. Ähnliche Beobachtungen wurden bei Ratten beschrieben: VIP- und Calbindin-positive GABAerge Interneurone sind an den Netzwerken um amygdaläre Projektionsneurone beteiligt, wobei

jeder dieser beiden Subpopulationen vermutlich eine spezifische Rolle innerhalb der inhibitorischen Netzwerke zukommt (Muller et al. 2003). Muller et al. fanden ein Netzwerk aus Parvalbumin-positiven Interneuronen im basolateralen Nucleus, welche durch chemische Synapsen, dendritische Gap Junctions und axonale Gap Junctions verbunden waren. 20% der Synapsen auf Parvalbumin-positive Neurone zeigten präsynaptisch ebenfalls Parvalbumin-positive Axon-Terminalien und waren symmetrischer Natur (Muller et al. 2005).

Bei Mäusen konnten Parvalbumin-positive Interneurone der basolateralen Amygdala weiter subklassifiziert werden und Hinweise auf die Existenz von vier Subtyp-spezifischen Netzwerken gesammelt werden (Woodruff und Sah 2007b). Auch bei Katzen sind verschiedene Typen von Parvalbumin-positiven Interneuronen beschrieben worden, welche hemmenden Einfluss auf amygdaläre Neurone ausüben (Smith et al. 1998).

GABAerge hippocampo-amygdaläre Projektionen

Eine unerwartete Entdeckung waren symmetrische Synapsen, welche mit PHAL oder Miniruby markiert waren. Dies deutete auf eine GABAerge Projektion aus dem Hippocampus in den BMP hin. Verifiziert wurde diese Vermutung durch Injektionen von Fluorogold, eines retrograden Tracers, in die Amygdala bei zwei Mäusen. Die Existenz von weitreichenden GABAergen Projektionen aus dem Hippocampus wurde bereits in früheren Untersuchungen beobachtet; insbesondere wurden Projektionen von spezifischen Subpopulationen hippocampaler GABAerger Neurone zum medialen Septum, Subiculum (Jinno et al. 2007) und kontralateralem Gyrus dentatus beschrieben (Jinno 2009).

Kongruent mit unseren Befunden mehren sich in den letzten Jahren Hinweise, dass derartige weitreichende GABAerge Projektionen deutlich häufiger vorkommen als bisher angenommen. Sie sind zumeist bidirektional angelegt, so beispielsweise zwischen dem Hippocampus und dem Septum oder zwischen dem Hippocampus und dem entorhinalen Kortex (Caputi et al. 2013). Im Zielgebiet bewirken sie vermutlich über die Exzitation von lokalen GABAergen Interneuronen eine Disinhibition lokaler Projektionsneurone; zudem scheinen sie an der Synchronisation rhythmischer Aktivität zwischen entfernten Arealen beteiligt zu sein (Caputi et al. 2013; Jinno et al. 2007). Ähnliche Mechanismen sind hochrelevant für hippocampo-amygdaläre Interaktionen, beispielsweise während der Bildung von Angstgedächtnis-Inhalten: Seidenbecher et al (Seidenbecher et al. 2003)

beschrieben synchronisierte Aktivität im Theta-Frequenz-Bereich im hippocampo-amygdalären Netzwerk als mögliches neuronales Korrelat konditionierter Angst.

Aktuelle Untersuchungen in unserem Labor identifizieren zur Zeit die Subpopulationen hippocampaler GABAerger Neurone, denen diese Projektionsneurone angehören.

Nachbarschaft zu exzitatorischen Synapsen

In Ergänzung zu der Beschreibung der synaptischen Verbindungen markierter Strukturen in der Amygdala wurden in dieser Arbeit die an markierte Synapsen angrenzenden Strukturen analysiert und, soweit möglich, quantifiziert. Aktuelle Studien begründen derartige Untersuchungen; Merchán-Pérez et al. (Merchán-Pérez et al. 2009) beobachteten die Nachbarschaft von inhibitorischen Axonterminalien an Pyramidenzellen und exzitatorischen Synapsen, welche benachbarte Dendriten kontaktierten und vermuteten eine Aktivierung der inhibitorischen Synapsen durch einen Glutamat-Spillover.

Subpopulationen GABAerger Interneurone in der Amygdala

Es existieren umfangreiche Untersuchungen über die morphologische, elektrophysiologische und neurochemische Heterogenität der GABAergen amygdalären Interneurone (McDonald 1982; Sosulina et al. 2010; Muller et al. 2007a). Man vermutet, dass Subpopulationen dieser Zellen spezifische Funktionen sowohl bei der Kontrolle der amygdalären Projektionsneurone als auch bei der Integration des afferenten Informationsflusses zur Amygdala übernehmen. Szynyei et al. (2000) beschrieben eine spezielle Subpopulation von GABAergen Neuronen, welche vermutlich konvergierenden Input sowohl aus dem Thalamus als auch aus dem Kortex erhalten, und in dieser Position der Integration von Informationen aus diesen Gebieten während der Entstehung von Angst-motiviertem Verhalten dienen könnten.

Gruppen VIP- oder Calbindin-positiver GABAerger Interneurone in der basolateralen Amygdala bilden Subpopulationen, welche spezifische Funktionen innerhalb der inhibitorischen Netzwerke der Amygdala zu übernehmen scheinen. Aus morphologischer Sicht sind diese Neurone an den korbartigen Netzwerken um amygdaläre Projektionsneurone beteiligt (Muller et al. 2003) und etablieren synaptische Kontakte untereinander, kongruent mit den in dieser Arbeit beobachteten Synapsen zwischen GFP-positiven Strukturen. Netzwerke GABAerger Interneurone scheinen an der Kontrolle rhythmischer Aktivitätsmuster beteiligt zu sein (Muller et al. 2005), denen eine Funktion bei

der Konditionierung und Extinktion von Angstgedächtnis-Inhalten zugeschrieben wird (Pape und Pare 2010). Der noradrenerge Input auf die Amygdala wird ebenfalls über eine Subpopulation GABAerger Interneurone, mutmaßlich Somatostatin- und Cholezystokinin-positive, vermittelt (Kaneko et al. 2008), wodurch vermutlich Stressantworten mediert werden.

Neuere Arbeiten haben noch direkter die funktionelle Relevanz spezieller GABAerger Subpopulationen hervorgehoben. Neurokinin1-Rezeptor-exprimierende-Zellen, eine vergleichsweise kleine Subpopulation GABAerger Interneurone im Nucleus basolateralis, offenbarten beispielsweise einen erstaunlich großen Einfluss auf die Expression Angst-bezogenen Verhaltens (Truitt et al. 2009). Eine Anhand der Expression von Protein-Kinase-C definierte Subpopulation GABAerger Interneurone im lateralen Anteil des Nucleus amygdalae centralis inhibieren Projektionsneurone im medialen Anteil des Kerns und kontrollieren so vermutlich die Antwort auf einen konditionierten Stimulus (Haubensak et al. 2010).

Gedächtnisbildung und funktionsspezifische Netzwerke

Mittels Manipulation eines Transkriptionsfaktors und Darstellung einer aktivitätsabhängig transkribierten RNA argumentierten Han et al., dass die während der Bildung von Angstgedächtnis auf zellulärer Ebene stattfindende Selektion von an der Enkodierung teilnehmenden, amygdalären Neuronen ein kompetitiver Prozess sei (Han et al. 2007). Bezogen auf die potentiell kompetitive Verarbeitung verschiedener sensorischer Aspekte von Informationen würde dieses Konzept die Integration dieser Informationen in Abhängigkeit von ihrer relativen Wichtigkeit und Relevanz während des Erlernens erlauben.

In den letzten Jahren gewinnt die Überzeugung an Bedeutung, dass verschiedenen neuronalen Schaltkreisen und Subpopulationen von Neuronen in der Amygdala verschiedene Aspekte der Bildung von Angstgedächtnis-Inhalten zugeordnet werden können. Beispielsweise konnten zwei Arten von Neuronen im dorsalen Subnucleus des Nucleus lateralis mit der Bildung von Angstgedächtnis sowie der Langzeitspeicherung der Inhalte in Zusammenhang gebracht werden, wobei sich zudem Hinweise auf eine weitere Unterscheidung dieser Neurone in transient plastische und langfristig plastische fanden (Repa et al. 2001). Herry et al. (2008) zeigten, dass zwei verschiedene Populationen von Neuronen des Nucleus basalis während des Erlernens respektive der Extinktion neuer

Angstgedächtnisinhalte vermehrt aktiv sind. Beide Populationen weisen eine distinkt differierende Konnektivität mit dem Hippocampus und dem medialen präfrontalen Kortex auf.

In diesem Sinne könnte die direkte Innervation amygdalärer GABAerger Interneurone durch Neurone des ventralen Hippocampus der Kontrolle amygdalärer Netzwerke dienen, die für die Integration kontextueller Informationen während des Erlernens und der Extinktion von Angstgedächtnis-Inhalten relevant sind.

Zusammenfassung

Amygdala und Hippocampus sind zentrale Strukturen bei der Generierung, Speicherung und Expression von Angstgedächtnis-Inhalten auf kontextuelle Stimuli (Phillips und LeDoux 1992; LeDoux 2000). Die Beziehungen beider Strukturen sind intensiv und reziprok (Pitkänen et al. 2000). Amygdaläre GABAerge Interneurone nehmen in diesem Zusammenhang eine Vielzahl an Aufgaben wahr, insbesondere unterliegt die Aktivität amygdalärer Projektionsneurone ihrer Kontrolle (Woodruff und Sah 2007a).

In der vorliegenden Arbeit wurden bei GAD-67-GFP-Mäusen mithilfe von PHAL- und Miniruby-Injektionen in CA1 und das angrenzende Subiculum die Zielstrukturen im Nucleus amygdalae basomedialis, pars posterior auf elektronenmikroskopischem Niveau untersucht. Hierbei konnte eine direkte Innervation lokaler GABAerger Interneurone durch hippocampale Projektionsneurone nachgewiesen werden. Als Zielstrukturen konnten insbesondere distale Dendriten mit einer durchschnittlichen Größe von $0,199 \mu\text{m}^2$ (maximal $0,662 \mu\text{m}^2$; minimal $0,077 \mu\text{m}^2$; Standardabweichung $0,010 \mu\text{m}^2$) ausgemacht werden, wobei diese mehrheitlich nicht markiert waren. Auffällig waren die häufig angrenzenden unmarkierten Synapsen, welche keinen synaptischen Kontakt mit der markierten Struktur eingingen (durchschnittlich $0,392$ (maximal 3 , minimal 0 , Standardabweichung $0,200$)). Es wurden zusätzlich 299 GFP-positiven Strukturen identifiziert und ausgemessen, wobei sich an 34% mindestens eine unmarkierte afferente Synapse fand.

Unerwarteterweise konnte eine anterograd markierte, symmetrische Synapse dokumentiert werden. Daher erfolgten bei zwei Tieren zusätzlich Fluorogold-Injektionen in die Amygdala. Durch Fluoreszenz-unterstützte Lichtmikroskopie konnten anschließend Doppelmarkierungen im Hippocampus und somit CA1 als Ursprungsregion der Projektionen bestätigt werden. Dieser überraschende Befund reißt sich ein in aktuelle Arbeiten, die weitreichenden GABAergen Projektionen eine deutlich größere funktionelle Bedeutung zusprechen als bisher angenommen (Caputi et al. 2013).

Die erhobenen Daten belegen, dass GABAerge Neurone einen kleinen, jedoch wichtigen Beitrag zum direkten Input aus dem ventralen Hippocampus zum BMP leisten; und zwar sowohl als in der Amygdala lokalisierte Zielneurone als auch, wenn auch zu einem geringeren Anteil, hippocampale Projektionsneurone.

Literaturverzeichnis

- Abe, K. (2001): Modulation of hippocampal long-term potentiation by the amygdala: a synaptic mechanism linking emotion and memory. *Jpn. J. Pharmacol.* 86. S. 18–22
- Adams, J. C. (1981): Heavy metal intensification of DAB-based HRP reaction product. *J. Histochem. Cytochem.* 29. S. 775
- Adolphs, R.; Tranel, D.; Damasio, H.; Damasio, A. (1994): Impaired recognition of emotion in facial expressions following bilateral damage to the human amygdala. *Nature* 372. S. 669–672
- Akirav, I.; Richter-Levin, G. (2002): Mechanisms of amygdala modulation of hippocampal plasticity. *J. Neurosci.* 22. S. 9912–9921
- Alvarez, R. P.; Biggs, A.; Chen, G.; Pine, D. S.; Grillon, C. (2008): Contextual fear conditioning in humans: cortical-hippocampal and amygdala contributions. *J. Neurosci.* 28. S. 6211–6219
- Amaral, D. G.; Witter, M. P. (1989): The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31. S. 571–591
- Asada, H.; Kawamura, Y.; Maruyama, K.; Kume, H.; Ding, R.-G.; Kanbara, N. et al. (1997): Cleft palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94. S. 6496–6499
- Bannerman, D. M.; Rawlins, J. N. P.; McHugh, S. B.; Deacon, R. M. J.; Yee, B. K.; Bast, T. et al. (2004): Regional dissociations within the hippocampus - memory and anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28. S. 273–283
- Bast, T.; Zhang, W.-N.; Feldon, J. (2001): The ventral hippocampus and fear conditioning in rats. Different anterograde amnesias of fear after tetrodotoxin inactivation and infusion of the GABA(A) agonist muscimol. *Exp. Brain Res.* 139. S. 39–52
- Bergado-Acosta, J. R.; Sangha, S.; Narayanan, R. T.; Obata, K.; Pape, H.-C.; Stork, O. (2008): Critical role of the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase in consolidation and generalization of Pavlovian fear memory. *Learn. Mem.* 15. S. 163–171
- Bissière, S.; Humeau, Y.; Lüthi, A. (2003): Dopamine gates LTP induction in lateral amygdala by suppressing feedforward inhibition. *Nat. Neurosci.* 6. S. 587–592
- Brinley-Reed, M.; Mascagni, F.; McDonald, A. J. (1995): Synaptology of prefrontal cortical projections to the basolateral amygdala: an electron microscopic study in the rat. *Neurosci. Lett.* 202. S. 45–48
- Canteras, N. S.; Swanson, L. W. (1992): Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 324. S. 180–194
- Caputi, A.; Melzer, S.; Michael, M.; Monyer, H. (2013): The long and short of GABAergic neurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23. S. 179–186
- Cenquizca, L. A.; Swanson, L. W. (2007): Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Res. Rev.* 56. S. 1–26
- Chen, S.; Aston-Jones, G. (1998): Axonal collateral-collateral transport of tract tracers in brain neurons: false anterograde labelling and useful tool. *Neuroscience* 82. S. 1151–1163

- Cui, H.; Sakamoto, H.; Higashi, S.; Kawata, M. (2008): Effects of single-prolonged stress on neurons and their afferent inputs in the amygdala. *Neuroscience* 152. S. 703–712
- Ehrlich, I.; Humeau, Y.; Grenier, F.; Ciocchi, S.; Herry, C.; Lüthi, A. (2009): Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. *Neuron* 62. S. 757–771
- Fallon, J. H.; Ciofi, P. (1992): Distribution of monoamines within the amygdala. *The amygdala: neurobiological aspects of emotion, memory, and mental dysfunction*. S. 97–114. Wiley-Liss. New York.
- Franklin, K. B. J.; Paxinos, G. (2007): *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier. New York.
- Gerfen, C. R.; Sawchenko, P. E. (1984): An anterograde neuroanatomical tracing method that shows the detailed morphology of neurons, their axons and terminals: immunohistochemical localization of an axonally transported plant lectin, Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L). *Brain Res.* 290. S. 219–238
- Gourdon, J. (2002): *Rodent Anesthesia. Standard Operating Procedure*. Cornell University. Cornell Center for Animal Resources and Education.
- Groenewegen, H. J.; Wouterlood, F. G. (1990): Light and electron microscopic tracing of neuronal connections with phaseolus vulgaris-leucoagglutinin (PHA-L), and combinations with other neuroanatomical techniques. *Handbook of chemical neuroanatomy, Vol.8: analysis of neuronal microcircuits and synaptic interactions*. S. 47–124. Elsevier Science Publishers B. V. . Amsterdam.
- Hamann, S. B.; Ely, T. D.; Grafton, S. T.; Kilts, C. D. (1999): Amygdala activity related to enhanced memory for pleasant and aversive stimuli. *Nat. Neurosci.* 2. S. 289–293
- Han, J.-H.; Kushner, S. A.; Yiu, A. P.; Cole, C. J.; Matynia, A.; Brown, R. A. et al. (2007): Neuronal competition and selection during memory formation. *Science* 316. S. 457–460
- Haubensak, W.; Kunwar, P. S.; Cai, H.; Ciocchi, S.; Wall, N. R.; Ponnusamy, R. et al. (2010): Genetic dissection of an amygdala microcircuit that gates conditioned fear. *Nature* 468. S. 270–276
- Heldt, S. A.; Ressler, K. J. (2006): Localized injections of midazolam into the amygdala and hippocampus induce differential changes in anxiolytic-like motor activity in mice. *Behav. Pharmacol.* 17. S. 349–356
- Herry, C.; Ciocchi, S.; Senn, V.; Demmou, L.; Müller, C.; Lüthi, A. (2008): Switching on and off fear by distinct neuronal circuits. *Nature* 454. S. 600–606
- Hobin, J. A.; Ji, J.; Maren, S. (2006): Ventral hippocampal muscimol disrupts context-specific fear memory retrieval after extinction in rats. *Hippocampus* 16. S. 174–182
- Ishikawa, A.; Nakamura, S. (2006): Ventral hippocampal neurons project axons simultaneously to the medial prefrontal cortex and amygdala in the rat. *J. Neurophysiol.* 96. S. 2134–2138
- Jinno, S. (2009): Structural organization of long-range GABAergic projection system of the hippocampus. *Front. Neuroanat.* 3. Art. 13
- Jinno, S.; Klausberger, T.; Marton, L. F.; Dalezios, Y.; Roberts, J. D. B.; Fuentealba, P. et al. (2007): Neuronal diversity in GABAergic long-range projections from the hippocampus. *J. Neurosci.* 27. S. 8790–8804
- Jinno, S.; Kosaka, T. (2006): Cellular architecture of the mouse hippocampus: a

- quantitative aspect of chemically defined GABAergic neurons with stereology. *Neurosci. Res.* 56. S. 229–245
- Kalueff, A. V.; Nutt, D. J. (2007): Role of GABA in anxiety and depression. *Depress. Anxiety* 24. S. 495–517
- Kaneko, K.; Tamamaki, N.; Owada, H.; Kakizaki, T.; Kume, N.; Totsuka, M. et al. (2008): Noradrenergic excitation of a subpopulation of GABAergic cells in the basolateral amygdala via both activation of nonselective cationic conductance and suppression of resting K⁺ conductance: a study using glutamate decarboxylase 67-green fluorescent protein knock-in mice. *Neuroscience* 157. S. 781–797
- Kang-Park, M.-H.; Wilson, W. A.; Moore, S. D. (2004): Differential actions of diazepam and zolpidem in basolateral and central amygdala nuclei. *Neuropharmacology* 46. S. 1–9
- Kishi, T.; Tsumori, T.; Yokota, S.; Yasui, Y. (2006): Topographical projection from the hippocampal formation to the amygdala: a combined anterograde and retrograde tracing study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 496. S. 349–368
- Kjelstrup, K. G.; Tuvnes, F. A.; Steffenach, H.-A.; Murison, R.; Moser, E. I.; Moser, M.-B. (2002): Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99. S. 10825–10830
- Lanciego, J. L.; Wouterlood, F. G. (2006): Multiple neuroanatomical tract-tracing: approaches for multiple tract-tracing. *Neuroanatomical tract-tracing 3. Molecules, neurons, and systems.* S. 336–365. Springer. New York.
- LeDoux, J. (2003): The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cell. Mol. Neurobiol.* 23. S. 727–738
- LeDoux, J. E. (2000): Emotion circuits in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 23. S. 155–184
- Li, R.; Nishijo, H.; Ono, T.; Ohtani, Y.; Ohtani, O. (2002): Synapses on GABAergic neurons in the basolateral nucleus of the rat amygdala: double-labeling immunoelectron microscopy. *Synapse* 43. S. 42–50
- Linke, R.; Faber-Zuschratter, H.; Seidenbecher, T.; Pape, H.-C. (2004): Axonal connections from posterior paralaminar thalamic neurons to basomedial amygdaloid projection neurons to the lateral entorhinal cortex in rats. *Brain Res. Bull.* 63. S. 461–469
- Makkar, S. R.; Zhang, S. Q.; Cranney, J. (2010): Behavioral and neural analysis of GABA in the acquisition, consolidation, reconsolidation, and extinction of fear memory. *Neuropsychopharmacology* 35. S. 1625–1652
- Maren, S. (2005): Synaptic mechanisms of associative memory in the amygdala. *Neuron* 47. S. 783–786
- Maren, S.; Fanselow, M. S. (1995): Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal formation stimulation in vivo. *J. Neurosci.* 15. S. 7548–7564
- Maren, S.; Hobin, J. A. (2007): Hippocampal regulation of context-dependent neuronal activity in the lateral amygdala. *Learn. Mem.* 14. S. 318–324
- Mascagni, F.; McDonald, A. J. (2003): Immunohistochemical characterization of cholecystinin containing neurons in the rat basolateral amygdala. *Brain Res.* 976. S. 171–184
- McDonald, A. J. (1982): Neurons of the lateral and basolateral amygdaloid nuclei: a Golgi study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 212. S. 293–312

- McDonald, A. J. (1992): Cell types and intrinsic connections of the amygdala. The amygdala: neurobiological aspects of emotion, memory, and mental dysfunction. S. 67–96. Wiley-Liss. New York.
- McDonald, A. J.; Mascagni, F. (1997): Projections of the lateral entorhinal cortex to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *Neuroscience* 77. S. 445–459
- McDonald, A. J.; Mascagni, F. (2001): Colocalization of calcium-binding proteins and GABA in neurons of the rat basolateral amygdala. *Neuroscience* 105. S. 681–693
- McDonald, A. J.; Mascagni, F.; Mania, I.; Rainnie, D. G. (2005): Evidence for a perisomatic innervation of parvalbumin-containing interneurons by individual pyramidal cells in the basolateral amygdala. *Brain Res.* 1035. S. 32–40
- Meis, S.; Bergado-Acosta, J. R.; Yanagawa, Y.; Obata, K.; Stork, O.; Munsch, T. (2008): Identification of a neuropeptide S responsive circuitry shaping amygdala activity via the endopiriform nucleus. *PLoS ONE* 3. S. e2695
- Mello, L. E. A. M.; Tan, A. M.; Finch, D. M. (1992a): Convergence of projections from the rat hippocampal formation, medial geniculate and basal forebrain onto single amygdaloid neurons: an in vivo extra- and intracellular electrophysiological study. *Brain Res.* 587. S. 24–40
- Mello, L. E. A. M.; Tan, A. M.; Finch, D. M. (1992b): GABAergic synaptic transmission in projections from the basal forebrain and hippocampal formation to the amygdala: an in vivo iontophoretic study. *Brain Res.* 587. S. 41–48
- Merchán-Pérez, A.; Rodríguez, J.-R.; Ribak, C. E.; DeFelipe, J. (2009): Proximity of excitatory and inhibitory axon terminals adjacent to pyramidal cell bodies provides a putative basis for nonsynaptic interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106. S. 9878–9883
- Mori, E.; Ikeda, M.; Hirono, N.; Kitagaki, H.; Imamura, T.; Shimomura, T. (1999): Amygdalar volume and emotional memory in Alzheimer's disease. *Am. J. Psychiatry* 156. S. 216–222
- Muller, J. F.; Mascagni, F.; McDonald, A. J. (2003): Synaptic connections of distinct interneuronal subpopulations in the rat basolateral amygdalar nucleus. *J. Comp. Neurol.* 456. S. 217–236
- Muller, J. F.; Mascagni, F.; McDonald, A. J. (2005): Coupled networks of parvalbumin-immunoreactive interneurons in the rat basolateral amygdala. *J. Neurosci.* 25. S. 7366–7376
- Muller, J. F.; Mascagni, F.; McDonald, A. J. (2006): Pyramidal cells of the rat basolateral amygdala: synaptology and innervation by parvalbumin-immunoreactive interneurons. *J. Comp. Neurol.* 494. S. 635–650
- Muller, J. F.; Mascagni, F.; McDonald, A. J. (2007a): Postsynaptic targets of somatostatin-containing interneurons in the rat basolateral amygdala. *J. Comp. Neurol.* 500. S. 513–529
- Muller, J. F.; Mascagni, F.; McDonald, A. J. (2007b): Serotonin-immunoreactive axon terminals innervate pyramidal cells and interneurons in the rat basolateral amygdala. *J. Comp. Neurol.* 505. S. 314–335
- Muller, J. F.; Mascagni, F.; McDonald, A. J. (2011): Cholinergic innervation of pyramidal cells and parvalbumin-immunoreactive interneurons in the rat basolateral amygdala. *J. Comp. Neurol.* 519. S. 790–805

- Müller, M.; Faber-Zuschratter, H.; Yanagawa, Y.; Stork, O.; Schwegler, H.; Linke, R. (2012): Synaptology of ventral CA1 and subiculum projections to the basomedial nucleus of the amygdala in the mouse: relation to GABAergic interneurons. *Brain Struct. Funct.* 217. S. 5–17
- Nakao, K.; Matsuyama, K.; Matsuki, N.; Ikegaya, Y. (2004): Amygdala stimulation modulates hippocampal synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101. S. 14270–14275
- Ottersen, O. P. (1982): Connections of the amygdala of the rat. IV: Corticoamygdaloid and intraamygdaloid connections as studied with axonal transport of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* 205. S. 30–48
- Pape, H.-C.; Pare, D. (2010): Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. *Physiol. Rev.* 90. S. 419–463
- Peters, A.; Palay, S. L.; Webster, H. D. (1991): The fine structure of the nervous system. Neurons and their supporting cells. Third edition. Oxford University Press. New York.
- Petrovich, G. D.; Risold, P. Y.; Swanson, L. W. (1996): Organization of projections from the basomedial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 374. S. 387–420
- Phelps, E. A.; LeDoux, J. E. (2005): Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron* 48. S. 175–187
- Phillips, R. G.; LeDoux, J. E. (1992): Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav. Neurosci.* 106. S. 274–285
- Pikkarainen, M.; Rönkkö, S.; Savander, V.; Insausti, R.; Pitkänen, A. (1999): Projections from the lateral, basal, and accessory basal nuclei of the amygdala to the hippocampal formation in rat. *J. Comp. Neurol.* 403. S. 229–260
- Pinard, C. R.; Muller, J. F.; Mascagni, F.; McDonald, A. J. (2008): Dopaminergic innervation of interneurons in the rat basolateral amygdala. *Neuroscience* 157. S. 850–863
- Pitkänen, A. (2000): Connectivity of the rat amygdaloid complex. The amygdala: a functional analysis. Second edition. S. 31–115. Oxford University Press. Oxford.
- Pitkänen, A.; Pikkarainen, M.; Nurminen, N.; Ylinen, A. (2000): Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 911. S. 369–391
- Pitkänen, A.; Tuunanen, J.; Kälviäinen, R.; Partanen, K.; Salmenperä, T. (1998): Amygdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 32. S. 233–253
- Rainnie, D. G.; Asprodini, E. K.; Shinnick-Gallagher, P. (1991): Inhibitory transmission in the basolateral amygdala. *J. Neurophysiol.* 66. S. 999–1009
- Reiner, A.; Honig, M. G. (2006): Dextran amines: versatile tools for anterograde and retrograde studies of nervous system connectivity. *Neuroanatomical tract-tracing 3. Molecules, neurons, and systems.* S. 304–335. Springer. New York.
- Repa, J. C.; Muller, J.; Apergis, J.; Desrochers, T. M.; Zhou, Y.; LeDoux, J. E. (2001): Two different lateral amygdala cell populations contribute to the initiation and storage of memory. *Nat. Neurosci.* 4. S. 724–731
- Royer, S.; Martina, M.; Paré, D. (1999): An inhibitory interface gates impulse traffic between the input and output stations of the amygdala. *J. Neurosci.* 19. S. 10575–10583

- Rudy, J. W.; Matus-Amat, P. (2005): The ventral hippocampus supports a memory representation of context and contextual fear conditioning: implications for a unitary function of the hippocampus. *Behav. Neurosci.* 119. S. 154–163
- Samson, R. D.; Dumont, E. C.; Paré, D. (2003): Feedback inhibition defines transverse processing modules in the lateral amygdala. *J. Neurosci.* 23. S. 1966–1973
- Seidenbecher, T.; Laxmi, T. R.; Stork, O.; Pape, H.-C. (2003): Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. *Science* 301. S. 846–850
- Shin, R.-M.; Tsvetkov, E.; Bolshakov, V. Y. (2006): Spatiotemporal asymmetry of associative synaptic plasticity in fear conditioning pathways. *Neuron* 52. S. 883–896
- Smith, Y.; Paré, J.-F.; Paré, D. (1998): Cat intraamygdaloid inhibitory network: ultrastructural organization of parvalbumin-immunoreactive elements. *J. Comp. Neurol.* 391. S. 164–179
- Smith, Y.; Paré, J.-F.; Paré, D. (2000): Differential innervation of parvalbumin-immunoreactive interneurons of the basolateral amygdaloid complex by cortical and intrinsic inputs. *J. Comp. Neurol.* 416. S. 496–508
- Sosulina, L.; Graebenitz, S.; Pape, H.-C. (2010): GABAergic interneurons in the mouse lateral amygdala: a classification study. *J. Neurophysiol.* 104. S. 617–626
- Sutherland, R. J.; O'Brien, J.; Lehmann, H. (2008): Absence of systems consolidation of fear memories after dorsal, ventral, or complete hippocampal damage. *Hippocampus* 18. S. 710–718
- Szinyei, C.; Heinbockel, T.; Montagne, J.; Pape, H.-C. (2000): Putative cortical and thalamic inputs elicit convergent excitation in a population of GABAergic interneurons of the lateral amygdala. *J. Neurosci.* 20. S. 8909–8915
- Tamamaki, N.; Yanagawa, Y.; Tomioka, R.; Miyazaki, J.-I.; Obata, K.; Kaneko, T. (2003): Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J. Comp. Neurol.* 467. S. 60–79
- Tao-Cheng, J.-H.; Gallant, P. E.; Brightman, M. W.; Dosemeci, A.; Reese, T. S. (2007): Structural changes at synapses after delayed perfusion fixation in different regions of the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 501. S. 731–740
- Truitt, W. A.; Johnson, P. L.; Dietrich, A. D.; Fitz, S. D.; Shekhar, A. (2009): Anxiety-like behavior is modulated by a discrete subpopulation of interneurons in the basolateral amygdala. *Neuroscience* 160. S. 284–294
- Tuunanen, J.; Halonen, T.; Pitkänen, A. (1996): Status epilepticus causes selective regional damage and loss of GABAergic neurons in the rat amygdaloid complex. *Eur. J. Neurosci.* 8. S. 2711–2725
- Valverde, F. (1962): Intrinsic organization of the amygdaloid complex. A Golgi study in the mouse. *Trab. Inst. Cajal Invest. Biol.* 54. S. 291–314
- van Groen, T.; Wyss, J. M. (1990): Extrinsic projections from area CA1 of the rat hippocampus: olfactory, cortical, subcortical, and bilateral hippocampal formation projections. *J. Comp. Neurol.* 302. S. 515–528
- Wolff, S. B. E.; Gründemann, J.; Tovote, P.; Krabbe, S.; Jacobson, G. A.; Müller, C. et al. (2014): Amygdala interneuron subtypes control fear learning through disinhibition. *Nature* 509. S. 453–458

- Woodruff, A. R.; Sah, P. (2007a): Inhibition and synchronization of basal amygdala principal neuron spiking by parvalbumin-positive interneurons. *J. Neurophysiol.* 98. S. 2956–2961
- Woodruff, A. R.; Sah, P. (2007b): Networks of parvalbumin-positive interneurons in the basolateral amygdala. *J. Neurosci.* 27. S. 553–563
- Woodson, W.; Farb, C. R.; LeDoux, J. E. (2000): Afferents from the auditory thalamus synapse on inhibitory interneurons in the lateral nucleus of the amygdala. *Synapse* 38. S. 124–137
- Wouterlood, F. G.; Jorritsma-Byham, B. (1993): The anterograde neuroanatomical tracer biotinylated dextran-amine: comparison with the tracer *Phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin in preparations for electron microscopy. *J. Neurosci. Methods* 48. S. 75–87
- Yilmazer-Hanke, D. M.; Faber-Zuschratter, H.; Blümcke, I.; Bickel, M.; Becker, A.; Mawrin, C.; Schramm, J. (2007): Axo-somatic inhibition of projection neurons in the lateral nucleus of amygdala in human temporal lobe epilepsy: an ultrastructural study. *Exp. Brain Res.* 177. S. 384–399
- Yilmazer-Hanke, D. M.; Hantsch, M.; Hanke, J.; Schulz, C.; Faber-Zuschratter, H.; Schwegler, H. (2004): Neonatal thyroxine treatment: changes in the number of corticotropin-releasing-factor (CRF) and neuropeptide Y (NPY) containing neurons and density of tyrosine hydroxylase positive fibers (TH) in the amygdala correlate with anxiety-related behavior of wistar rats. *Neuroscience* 124. S. 283–297
- Yoon, T.; Otto, T. (2007): Differential contributions of dorsal vs. ventral hippocampus to auditory trace fear conditioning. *Neurobiol. Learn. Mem.* 87. S. 464–475

Danksagungen

Ich bedanke mich herzlich bei Frau Röhl für die technische Unterstützung, insbesondere bei der Färbung und Prozessierung der Schnitte.

Andrea Kröber danke ich für die Unterstützung und Geduld bei der DNA-Typisierung der Mäuse und ihre technische Expertise!

Frau Wiegand danke ich für die immer wieder blitzschnelle Lieferung sämtlicher von mir bestellten Literaturquellen.

Zudem möchte ich Frau Dr. rer. nat. Heidi Faber-Zuschratter für die Einweisung und die geduldige Hilfe bei der Arbeit mit dem Elektronenmikroskop danken.

Prof. Dr. rer. nat. Rüdiger Linke gebührt mein Dank für die Betreuung während des Erstellens der Arbeit und die unendliche Geduld beim Beantworten meiner Fragen.

Unterstützt wurde diese Arbeit durch SFB 779-B5.

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Charakterisierung der Projektionen des ventralen CA1 und des Subiculus zum Nucleus basomedialis der Amygdala in der Maus und ihre Beziehungen zu GABAergen Interneuronen

im Institut für Anatomie

mit Unterstützung durch Prof. Dr. rer. nat. Rüdiger Linke

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Bremerhaven, den 08.06.2015

Darstellung des Bildungsweges

Schulbildung

- 1989 - 2002 Dekan-Ernst-Schule, Leininger Gymnasium in Grünstadt an der Weinstraße
1999 6 Monate Austauschschüler an der Hillmorton Highschool, Christchurch, Neuseeland

Zivildienst

- 01.04.2002 - 31.01.2003 Rettungsdienst Arbeiter Samariter Bund Grünstadt, Prüfung zum Rettungsanwärter

Hochschulbildung

- 2003 - 2009 Medizinstudium an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Ärztliche Prüfung am 05.11.2009

Praktisches Jahr

- 18.08. - 07.12.2008 Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Uniklinikum Magdeburg
08.12. - 29.03.2009 Klinik für Innere Medizin, Medigreif Kreiskrankenhaus Burg
30.03. - 19.07.2009 Klinik für Chirurgie, Regionalspital Prättigau, Schiers, Schweiz

Bisherige Arbeitsverhältnisse

- 01.03.2010 – 31.03.2011 Medizinische Klinik, St. Joseph-Hospital Bremerhaven, Chefarzt Prof. Dr. med. H. - H. Heidtmann
seit 01.05.2011 Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, Klinikum Bremerhaven, bis 12/2014 Chefarzt Prof. Dr. med. Mario Kasper
seit 12/2014 kommissarischer Leiter M. F. Hauenschild

Bremerhaven, den 08.06.2015
