

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Physiologie I
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Hans-Christian Pape

**Funktion GABAerger Synapsen
in der lateralen Amygdala GAD65-defizienter Mäuse**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät Münster

vorgelegt von Paulukat, Linda
aus Wuppertal
2010

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Hans-Christian Pape

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Eric Schulze-Bahr

Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.2010

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Physiologie I

Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer.-nat. Hans-Christian Pape

Referent: Univ.-Prof. Dr. rer.-nat. Hans-Christian Pape

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Eric Schulze-Bahr

ZUSAMMENFASSUNG

Funktion GABAerger Synapsen der lateralen Amygdala GAD-65 defizienter Mäuse

Linda Paulukat

Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.2010

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung einer genetisch determinierten Defizienz der Glutamatdecarboxylase 65 auf die synaptischen und zellulären Eigenschaften von Zellen in der lateralen Amygdala (LA) der Maus untersucht (Genehmigung für Tierversuche vom 09.09.2010, AZ 50.0835.1.0 (G 53/2005)). Die LA steht als Zentrum für Angst- und Fluchtreflexe (LeDoux et al., 1990a) in Zusammenhang mit Verhaltensauffälligkeiten GAD65 defizienter Tiere (Fanselow and LeDoux, 1999; Rodrigues et al., 2004). Diese Arbeit wurde mit dem Ziel durchgeführt elektrophysiologische Merkmale und synaptische Eigenschaften GAD65 defizienter im Vergleich zu heterozygoten GAD65^{+/-} und GAD65^{+/+} Neuronen zu identifizieren.

Es wurden Veränderungen in der Kinetik und Frequenz spontaner mIPSCs festgestellt, die unter anderem Hinweise auf eine veränderte Zusammensetzung der postsynaptischen GABA_A-Rezeptoren in GAD65 defizienten Neuronen liefern. Es zeigte sich außerdem eine Tendenz zur Verminderung der Amplitude der mIPSCs in diesen Neuronen, der eine Verminderung der Dichte der postsynaptischen Rezeptoren oder der Menge des freigesetzten Neurotransmitters zugrunde liegen könnte.

Bei extrazellulärer Stimulation zeigte sich, dass zur Auslösung eines Minimalreleases in GAD65^{-/-} signifikant höhere Spannungen notwendig sind als in GAD65^{+/-} und in GAD65^{+/+}. Da die weiteren Ergebnisse gegen Veränderungen der postsynaptischen Rezeptoren und der präsynaptischen Freisetzungswahrscheinlichkeit sprechen, ist eine mögliche Erklärung eine Veränderung der synaptischen Verschaltung der Inter- und Projektionsneurone. Diese Arbeit liefert neue Hinweise darauf, dass GAD65 wichtige Charakteristika der synaptischen Übertragung beeinflusst. Das Fehlen von GAD65 hat deutliche Auswirkungen auf die spontane und evozierte Transmitterfreisetzung.

1	Einleitung	4
1.1	Die synaptische Übertragung.....	4
1.1.1	Aufbau einer chemischen Synapse	5
1.1.1.1	präsynaptische Transmitterausschüttung	5
1.1.1.2	der synaptische Spalt	7
1.1.2	Kurzzeitplastizität (STP)	7
1.1.2.1	postsynaptische Rezeptoren.....	8
1.1.3	Glutamat-Rezeptoren.....	9
1.1.3.1	metabotrope Glutamat-Rezeptoren.....	10
1.1.3.2	Kainat-Rezeptoren & AMPA-Rezeptoren.....	10
1.1.3.3	NMDA-Rezeptoren	11
1.1.4	GABA-Rezeptoren	11
1.1.4.1	GABA _A -Rezeptor	12
1.1.4.2	GABA _B -Rezeptor	14
1.1.4.3	GABA _C -Rezeptor	15
1.2	γ -Amino-Buttersäure (GABA)	15
1.2.1	Glutamatdecarboxylase	16
1.2.2	Herstellung des “Knock-Outs”	17
1.2.2.1	GAD67 “Knock-Out”	19
1.2.2.2	GAD65 “Knock-Out”	19
1.3	Die laterale Amygdala	20
1.3.1	Neurone der lateralen Amygdala.....	23
1.3.1.1	Projektionsneurone	23
1.3.1.2	Interneurone.....	25
1.4	Prinzip der Patch-Clamp Technik	27
1.5	Ziele der Arbeit.....	29
2	Material und Methoden	31
2.1	Lösungen und Pharmaka	31
2.2	Präparation der Hirnschnitte.....	33
2.3	elektrophysiologische Untersuchungen.....	34
2.3.1	Der Versuchsaufbau	34
2.3.2	Ableitung spontaner postsynaptischer Miniaturströme	35

Inhaltsverzeichnis

2.3.3	Ableitung evozierter postsynaptischer Ströme	36
2.3.4	Registrierung der Membraneigenschaften.....	37
2.3.5	Auswertung.....	37
3	Ergebnisse.....	38
3.1	Passive Membraneigenschaften.....	38
3.2	Aktive Membraneigenschaften.....	39
3.3	Miniaturströme	41
3.4	Evozierte IPSCs.....	45
4	Diskussion	51
4.1	Elektrische Erregbarkeit und Morphologie GAD65 defizienter Neurone....	51
4.2	Veränderung der Kinetik spontaner mIPSCs in GAD65-/- Neuronen	52
4.3	Erhöhung der Frequenz spontaner mIPSCs in GAD65-/- Neuronen	53
4.3.1	Wahrscheinlichkeit der Transmitterfreisetzung in GAD65-/-	54
4.3.2	Veränderung der Interneurone in GAD65-/-	55
4.4	Amplitude spontaner mIPSCs	59
4.5	Auswirkungen der GAD65-Deletion auf evozierte postsynaptische Ströme	61
4.5.1	Veränderung der Kurzzeitplastizität an GABAergen Synapsen GAD65 defizienter Interneurone.....	61
4.5.2	Veränderung evozierter IPSCs in GAD65-/- Neuronen.....	62
4.5.3	Auswirkung hoher synaptischer Beanspruchung auf GAD65-/- Neurone	65
5	Zusammenfassung	68
6	Literaturverzeichnis	70
7	Anhang	I
7.1	Abkürzungsverzeichnis	I
7.2	Lebenslauf	III
7.3	Danksagung	V
7.4	Genehmigungsbescheid für Tierversuche	VI

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1:	Der synaptische Vesikelzyklus.....	7
Abb. 1-2:	Aufbau eines GABA _A -Rezeptors	14
Abb. 1-3:	Lage der Amygdala im Hirnschnitt	19
Abb. 2-1:	GAD65 Deletionsmutation durch homologe Rekombination	31
Abb. 2-2:	Schematischer Aufbau einer „patch clamp“ Ableitung	34
Abb. 2-3:	Stimulationsprotokoll I.....	36
Abb. 2-4:	Stimulationsprotokoll II.....	37
Abb. 3-1:	Passive Membraneigenschaften von GAD65 ^{+/+} , GAD65 ^{+/-} und GAD65 ^{-/-}	39
Abb. 3-2:	Durch überschwellige Strominjektion evozierte Aktionspotentiale.....	40
Tab. 3-1:	Aktive Membraneigenschaften.....	40
Abb. 3-3:	Spontane GABA _A -Rezeptor vermittelte mIPSCs.....	41
Abb. 3-4:	Mittlere Amplitude und mittlere Frequenz der spontanen mIPSCs	42
Abb. 3-5:	Anstiegszeit und Abklingzeitkonstante der mIPSCs.....	43
Abb. 3-6:	Spontane GABA _A -Rezeptor vermittelte IPSCs unter pharmakologischer Beeinflussung.....	44
Abb. 3-7:	Durch extrazelluläre Stimulation evozierte GABA-Ströme.....	45
Abb. 3-8:	Antwortverhalten auf extrazelluläre Stimulation	46
Abb. 3-9:	Stimulationsstärke und darauf normierte postsynaptische Stromamplitude	48
Abb. 3-10:	Amplitude des ersten Pulses von Durchlauf 2 normiert auf Durchlauf 1	49

1 Einleitung

Das zentrale Nervensystem ist Schaltstelle vegetativer und autonomer Funktionen des Menschen. Es ermöglicht die Interaktion mit der Umwelt und steht im Dienste der Wahrnehmung, der Integration des Wahrgenommenen, des Denkens und Fühlens und der Auslösung angemessener Reaktionen auf äußere und innere Reize. Durch verschiedenste Schädigungen des ZNS kann es zu vielfältigen Störungen und Ausfällen des Organismus kommen, dessen Verständnis für die Medizin von elementarer Bedeutung ist.

Funktionelle Einheit des ZNS ist das Neuron. Das zentrale Nervensystem besteht aus etwa 10^{12} Neuronen, die über Synapsen hemmend oder erregend miteinander in Kontakt stehen. So kann eine einzige Nervenzelle von über 20 000 Synapsen beeinflusst werden.

1.1 Die synaptische Übertragung

Damit Informationen übertragen und verarbeitet werden können, müssen die einzelnen Nervenzellen miteinander kommunizieren und interagieren können. Dazu müssen Signale über die Zellgrenzen hinweg übertragen werden. Wird eine Nervenzelle erregt, so fließt ein Strom entlang ihres Axons bis zur präsynaptischen Terminale. Hier findet sich die Kontaktstelle zur nächsten Nervenzelle, die durch elektrische oder chemische Synapsen gebildet wird. Bei einer elektrischen Synapse besteht ein direkter Kontakt des Zytoplasmas der benachbarten Zellen, wodurch diese elektrisch leitend miteinander verbunden sind (Roerig and Feller, 2000). Beide Zellen bilden aus 6 Konnexonen einen Proteinkomplex, der den Übertritt niedermolekularer Substanzen ermöglicht.

An einer chemischen Synapse besteht kein direkter Kontakt der benachbarten Zellen. Der elektrische Strom wird durch kurzzeitige Umwandlung in ein chemisches Signal auf die nächste Zelle übertragen (Collingridge and Lester, 1989). Nach ihrer Morphologie lassen sich chemische Synapsen in zwei Gruppen einteilen. Synapsen des Typs Gray I enthalten elektronenmikroskopisch runde synaptische Vesikel, die in einen etwa 30 nm breiten synaptischen Spalt ausgeschüttet werden. Zu ihnen gehören die glutamatergen Synapsen. Gray-Typ II Synapsen sind inhibitorisch und meistens GABAerg mit abgeflachten Neurotransmitter enthaltenden Vesikeln. Der synaptische

Spalt ist etwa 20 nm breit und auch die aktive Zone ist mit $< 1 \mu\text{m}^2$ kleiner als bei Gray-Typ I Synapsen (Gray, 1969).

Synapsen bilden sich normalerweise zwischen Axon und Dendrit (axodendritisch), zwischen Axon und Soma (axosomatisch) oder zwischen Axon und Axon (axoaxonisch) zweier Neurone aus. Im ZNS sind auch dendrodendritische Synapsen zwischen den Dendriten verschiedener Neurone und somasomatische Synapsen bekannt, welche einen synaptischen Kontakt der Zellkörper darstellen.

1.1.1 Aufbau einer chemischen Synapse

Eine chemische Synapse ist ein Ort der Kommunikation zwischen zwei Neuronen. Sie besteht aus den spezialisierten Membranbereichen des Prä- und des Postsynaptischen Neurons und dem dazwischen liegenden synaptischen Spalt. Zur Bildung der chemischen Synapsen sind verschiedene Neurotrophine unerlässlich (Vicario-Abejòn et al., 1998). Einer der wichtigsten ist der brain-derived neurotrophic factor BDNF, der die Bildung von glutamergen und GABAergen Synapsen vorantreibt und an Interneuronen Dendriten- und Axonwachstum sowie die Expression der Gene für die Glutamat-decarboxylase fördert (Marty et al., 1997).

1.1.1.1 präsynaptische Transmitterausschüttung

Das Axon des präsynaptischen Neurons ist an der Grenze zum synaptischen Spalt verdickt. Hier befindet sich die präsynaptische Terminalie mit Mitochondrien und vesikulären Strukturen in denen verschiedene Neurotransmitter gespeichert sein können. Die Vesikel liegen zum Teil über Synapsin fixiert an Aktinfilamenten des Zytoskeletts vor. Sie können entlang des F-Aktins zur präsynaptischen Membran gelangen. Dieser Teil der Vesikel wird als Reservepool bezeichnet. Ein anderer Teil der Vesikel ist durch Proteine direkt an die präsynaptische Membran gebunden, er wird „readily releasable pool“ genannt (Christgau et al., 1992; Kaufmann et al., 1991; Zucker and Regehr, 2002). Damit es zur Transmitterausschüttung kommen kann, müssen an den Vesikeln bestimmte Abläufe stattfinden.

1.1.1.1.1 der synaptische Vesikelzyklus

In der Membran der Neurotransmitter-speichernden Vesikel sind die G-Proteine Rab3a und Rab3b lokalisiert. Durch Hydrolyse des GTPs und Interaktion mit RIM (Rab3

interacting molecule 3) wird die Bildung eines Anlagerungskomplexes möglich (Hosaka et al., 1999). Um die im Reservepool gespeicherten Vesikel zu mobilisieren, muss erst das ebenfalls vesikelassoziierte Protein Synapsin über die Calcium-Calmodulin abhängige Proteinkinase II (CaMKII) phosphoryliert werden (Llinás et al., 1991). Um die Vesikel auf die Fusion mit der Plasmamembran vorzubereiten, bildet sich nun ein core-Komplex aus dem vesikelassoziierten v-SNARE (Synaptobrevin/ VAMP) und dem plasmamembranständigen t-SNARE (Syntaxin I + SNAP25). Syntaxin liegt in Ruhe gebunden an Munc 18 vor, welches zur Freisetzung des Syntaxins mit Munc 13 interagieren muss (Zhang et al., 2000). Der core-Komplex wird durch das Kalziumbindende Protein Complexin stabilisiert (Knaus et al., 1990; Fykse et al., 1993; Verhage et al., 2000; Augustin et al., 1999). Die SNARE-Proteine können mit dem Ca^{2+} -sensitiven Protein Synaptotagmin interagieren, welches bei Bindung von Ca^{2+} seine Konformation ändert (Dulobova et al., 2003; Chen et al., 1999; Südhof, 2002). Dadurch wird bei spannungsabhängigem Ca^{2+} -Einstrom die Bildung einer Fusionspore möglich und der Neurotransmitter gelangt in den synaptischen Spalt (Sugita and Südhof, 2000, Fernandez-Chacon et al., 2001). Die Neurotransmitter werden als sog. „Quanten“ freigesetzt. Ein Quant enthält dabei 6000 - 8000 Transmittermoleküle. Diese Quanten werden vereinzelt auch ohne ankommendes Aktionspotential spontan freigesetzt, was zu spontanen postsynaptischen Miniaturströmen führt. Die Zeitspanne vom Kalzium-einstrom bis zur Vesikelfusion mit der Membran beträgt etwa 100-200 μsec (Llinas et al., 1981). Nach der Transmitterfreisetzung wird der Vesikel über Endozytose wieder aufgenommen. Dafür findet zuerst eine Clathrin-Assemblierung am entsprechenden Membranabschnitt statt, die durch Adapterproteine wie AP2 und AP180 vermittelt wird (Schmid, 1997). Die dann abgeschnürten Membranstücke verschmelzen im Zytosol mit Endosomen, von denen bei Bedarf wieder Vesikel abgetrennt werden können. Über membranständige Protonenpumpen wird das Innere dieser recycelten Vesikel angesäuert und über spezifische Transportsysteme mit Transmittermolekülen gefüllt, die im Zytosol der Synapse vorliegen (Liu and Edwards, 1997). In der Membran der Vesikel befinden sich wieder Synapsine, die die Bindung an Filamente des Zytoskeletts wie Neurofilamente, Aktinfilamente und Mikrotubuli vermitteln (Betz and Bewick, 1992).

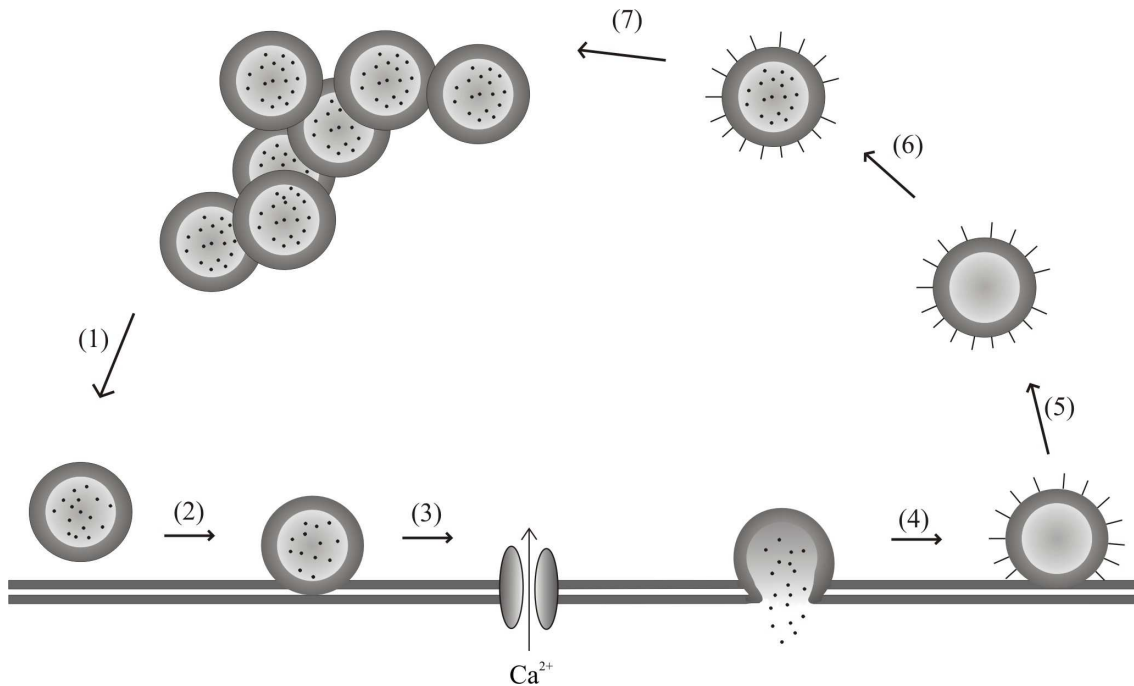


Abb. 1-1: Der synaptische Vesikelzyklus

(1) Transport von Vesikeln aus dem Reservepool zur Membran und Andocken, (2) Interaktion von Proteinen in Vesikel- und Plasmamembran, (3) Ca^{2+} -Einstrom und Exozytose, (4) Clathrinabhängige Endozytose, (5) Abschnürung des entleerten Vesikels, (6) Ansäuerung und Befüllung mit Neurotransmitter, (7) Speicherung im Reserve Pool oder direkter Transport zur Membran

1.1.1.2 der synaptische Spalt

Die freigesetzten Transmittermoleküle diffundieren nun durch den synaptischen Spalt, welcher etwa 20-50 nm breit ist und mit dem Extrazellularraum in Verbindung steht. Die Diffusion von der Post- zur Präsynapse dauert etwa 0,1 ms. Die freigesetzten Transmittermoleküle können auch homosynaptisch an Rezeptoren der Präsynapse wirken.

1.1.2 Kurzzeitplastizität (STP)

Bei wiederholter Erregung einer Synapse können sich die Menge des ausgeschütteten Transmitters und die Stärke der postsynaptischen Antwort verändern. Diese Veränderung persistiert über einen Zeitraum von Zehntelsekunden bis Minuten (Zucker and Regehr, 2002). Dabei kann sich die Effektivität der synaptischen Übertragung erhöhen oder vermindern.

Bei der sog. Faszilitierung reicht eine einzige präsynaptische Aktivierung aus, damit für mehrere 100 ms ein zweiter postsynaptischer Strom größer ist als der erste (Perkel et al., 1990; Konnerth et al., 1990). Bei der posttetanischen Potenzierung führt eine Folge

hochfrequenter Stimuli bis zu mehrere Sekunden lang zu erhöhter Effektivität der Synapse. Diese Steigerung der synaptischen Effektivität reflektiert eine erhöhte Ausschüttungswahrscheinlichkeit der synaptischen Vesikel, evtl. in Kombination mit einer Erhöhung der Anzahl der aktiven Zonen. Dabei ist der Ca^{2+} -Influx während der Depolarisation der Präsynapse von elementarer Bedeutung. Nach der „residual calcium“ Hypothese erhöht das nach der ersten Depolarisation verbliebene intrazelluläre Kalzium die Ausschüttungswahrscheinlichkeit von Vesikeln bei späteren Aktivierungen (Atluri and Regehr, 1996; Delaney and Tank, 1994). Dieser Effekt kann auch durch Freisetzung intrazellulären Kalziums imitiert werden. Verstärkt wird der Kalzium-Anstieg durch einen verminderten Natrium-Gradienten nach synaptischer Erregung und einer daraus resultierenden Hemmung des Na^+ - Ca^{2+} -Austauschers. Es ist unklar, ob das Kalzium als freie Ionen persistiert oder ob es von speziellen „Enhancement“-Stellen gebunden und langsam wieder freigesetzt wird. Nach Depolarisation wird außerdem Kalzium in präsynaptischen Mitochondrien gespeichert und bildet einen Pool der das residuelle Kalzium aufrecht erhalten kann. Wenn das erste ankommende Aktionspotential schon eine Transmitterfreisetzung bewirkt hat, so kann diese beim zweiten höher ausfallen. Außerdem kann es bei einer Synapse, die beim ersten präsynaptischen Stimulus keinen Transmitter freigesetzt hat, durch das erhöhte Kalzium bei einer zweiten Erregung zu einer Transmitterausschüttung kommen (Zucker and Regehr, 2002).

Es gibt auch Synapsen, bei denen wiederholte Aktivität die Transmitterausschüttung herabsetzt (Eccles et al., 1941). Das kann an einer Erschöpfung des Vesikelpools, an einer Freisetzung modulatorischer Substanzen oder an einer Desensitisierung der postsynaptischen Rezeptoren liegen. Außerdem kann der ausgeschüttete Neurotransmitter über präsynaptische Rezeptoren zu einer Autohemmung führen (Zucker and Regehr, 2002).

1.1.2.1 postsynaptische Rezeptoren

In der postsynaptischen Membran befinden sich transmembranäre Proteine, die als Rezeptoren fungieren. Unterhalb der postsynaptischen Membran ist ein elektronenmikroskopisch dichter Bereich der „postsynaptic density“ (PSD) genannt wird. Hier befinden sich in hoher Dichte Proteine zur Organisation der Rezeptoren und Proteine des Zytoskeletts wie Tubulin, Aktin und Spektrin (Sheng, 1997).

Die in der Membran verankerten Rezeptoren erhöhen bei Bindung eines Neurotransmitters die Leitfähigkeit für eine oder mehrere Ionensorten. Dadurch kommt es zum elektrochemisch getriebenen Ionenstrom in die oder aus der postsynaptischen Zelle. Die Membran wird dabei entweder depolarisiert, was zu der Auslösung und Weiterleitung eines Aktionspotentials führen kann, oder hyperpolarisiert, wodurch die Zelle schwerer erregbar wird und ankommende Ströme kurzgeschlossen werden. Verschiedene Neurotransmitter können so eine erregende oder hemmende Wirkung auf das nachgeschaltete Neuron haben. Ob es schließlich zur Auslösung eines postsynaptischen Aktionspotentials kommt entscheidet die räumliche und zeitliche Integration der verschiedenen ankommenden hemmenden und erregenden Einflüsse (Tao and Poo, 2000).

Bei den Rezeptoren unterscheidet man ionotrope und metabotrope Wirkmechanismen. Ionotrope Rezeptoren bestehen aus mehreren Peptiduntereinheiten, die eine Bindungsstelle für den Transmitter bereitstellen und gleichzeitig einen Ionenkanal bilden. Durch die direkte Kopplung an den Kanal werden schnelle synaptische Vorgänge vermittelt. Metabotrope Rezeptoren bestehen aus einer einzigen Polypeptidkette, die 7 mal die Membran durchspannt und intrazellulär an ein G-Protein gekoppelt ist. Bei Bindung des Neurotransmitters werden Enzyme, zum Beispiel durch Phosphorylierung, aktiviert. Diese aktivieren wiederum sog. second-messenger-Systeme welche dann den eigentlichen Effekt vermitteln (Wisden and Seeburg, 1993; Hollmann and Heinemann, 1994; Tao and Poo, 2000).

1.1.3 Glutamat-Rezeptoren

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (Palmer et al., 2005). Es gibt ionotrope und metabotrope Glutamat-Rezeptoren. Die ionotropen Rezeptoren lassen sich aufgrund ihrer Antagonisten und Agonisten in verschiedene Gruppen unterteilen. Bindung von L-Glutamat bewirkt die Öffnung eines für einwertige Ionen nichtselektiven Kationenkanals. Die Durchlässigkeit für zweiwertige Kationen wie Kalzium variiert je nach Zusammensetzung des Rezeptors aus verschiedenen Untereinheiten. Der Ioneneinstrom zeichnet sich durch eine schnelle Anstiegs- und Abklingzeit aus. Wichtig für die Organisation und Stabilität von Glutamat-Rezeptoren sind verschiedene Proteine wie PSD95 (postsynaptic density

protein 95kDa) für NMDA-Rezeptoren oder GRIP (Glutamat-Rezeptor-Interacting-Protein) und GRASP (GRIP1-associated scaffold protein) für AMPA-Rezeptoren (Moss and Smart, 2001).

1.1.3.1 metabotrope Glutamat-Rezeptoren

Die metabotropen Glutamatrezeptoren gehören zu den phylogenetisch ältesten metabotropen Rezeptoren. Sie bestehen aus 7 membrandurchspannenden Domänen und führen zu Ionenströmen mit langen Latenzen (Pin and Duvoisin, 1995). Die Glutamatbindungsstelle befindet sich an einer großen N-terminalen Domäne. Die Rezeptoren lassen sich aufgrund ihres Wirkmechanismus in verschiedene Gruppen unterteilen. Gruppe I –Rezeptoren (mGluR1 und mGluR5) aktivieren über ein G-Protein die Phospholipase C. Diese spaltet PIP2 (Phospho-Inositol-Diphosphat) in IP3 (Inositol-Tri-Phosphat) und Diacylglycerol (DAG) und bewirkt dadurch eine Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern (Hermans and Challiss, 2001). MGluR1 und mGluR5 spielen eine wichtige Rolle bei der synaptischen Plastizität (Alagarsamy et al., 2001). Die Rezeptoren-Gruppen II und III wirken durch eine Hemmung der Adenylatzyklase und führen damit zu einer Senkung des cAMP-Spiegels und einer Herabsetzung der Aktivität der Proteinkinase A.

1.1.3.2 Kainat-Rezeptoren & AMPA-Rezeptoren

Kainat-Rezeptoren regulieren im adulten Gehirn als präsynaptische Rezeptoren die Aktivität GABAerger und glutamerger Synapsen (Kidd et al., 2002); postsynaptisch sind sie beteiligt an der basalen glutamergen Transmission. Sie bilden, wie auch die AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazolpropionsäure) -Rezeptoren, einen Kationenkanal, der durchlässig für monovalente Kationen ist und ein Umkehrpotential von 0 mV aufweist. Für divalente Kationen schwankt die Leitfähigkeit je nach Zusammensetzung aus den verschiedenen Untereinheiten. Die Leitfähigkeit des AMPA-Rezeptors beträgt zwischen 8 und 15 pS, die des Kainat-Rezeptors ist mit 1-5 pS deutlich kleiner (Nicoll et al., 1990).

AMPA-Rezeptoren sind für den Großteil der Erregung im ZNS verantwortlich. Sie bestehen aus 4 Untereinheiten GluR1-4. (Hollmann and Heinemann, 1994). Jede dieser Untereinheiten setzt sich aus einer intrazellulären C-terminalen Domäne, 4 hydrophoben Domänen TM1-4 und einer extrazellulären N-terminalen Domäne zusammen. TM2

bildet eine Schlaufe in der intrazellulären Membranseite, während die anderen hydrophoben Domänen die Membran durchspannen. Die Ligandenbindung findet zwischen der N-terminalen Domäne und einer Schlaufe zwischen TM3 und TM4 statt (Palmer et al., 2005). Die postsynaptische Antwort zeigt bei AMPA-Rezeptoren schnelle Anstiegs- und Abklingzeiten von 1 und 0,2-8 ms (Edmonds et al., 1995). Obwohl AMPA-Rezeptoren ionotrop sind, können durch den Ca^{2+} -Influx verschiedene Proteinkinasen aktiviert und dadurch second-messenger Kaskaden ausgelöst werden (Palmer et al., 2005).

1.1.3.3 NMDA-Rezeptoren

Der NMDA Rezeptor setzt sich als Heteromer aus einer NR1-Untereinheit in Kombination mit einem oder mehreren Typen von NR2-Untereinheiten zusammen. Die NR1-Untereinheit bildet den Ionenkanal, während die NR2-Untereinheiten die spezifischen Eigenschaften des Rezeptors bestimmen. Dazu gehören unter anderem Affinität für verschiedene Liganden und kinetische Eigenschaften (Dingledine et al., 1999). Die Besonderheit des NMDA-Rezeptors liegt in seiner Blockade durch Magnesium bei Membranpotentialen $\sim \leq -40$ mV (Nowak et al., 1984; Nicoll et al., 1990) und seiner hohen Leitfähigkeit für Kalzium (Alagarsamy et al., 2001). Erst nach Vordepolarisation durch non-NMDA-Rezeptoren löst sich der Mg^{2+} -Block und der Ionenkanal öffnet sich. So dient er als Koinzidenzdetektor und vermittelt synaptische Plastizität (Tsien, 2000). Von besonderer Bedeutung für diese ist die NR2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors. Sie vermittelt im Gegensatz zur NR2A-Untereinheit einen langsamen Ionenstrom mit einer Abfalls-Zeitkonstante von über 200 ms (Chen et al., 1999). Dadurch kann vermehrt Kalzium in die Zelle einströmen, welches weitere plastische Prozesse in Gang setzt (Chen et al., 1999). Die NR2B-Untereinheit wird nach der frühen postnatalen Entwicklung in den meisten Hirnregionen durch NR2A-Untereinheiten ersetzt (Cathala et al., 2000). Ihre Konzentration bleibt jedoch in Bereichen erhöhter plastischer Aktivität wie der lateralen Amygdala hoch. Hier ist sie unabdingbar für die Aneignung konditionierter Angst (Rodrigues et al., 2001).

1.1.4 GABA-Rezeptoren

GABA-Rezeptoren gehören einer Familie von Rezeptoren an, die durch Genduplikation und Divergenz aus einem gemeinsamen Ursprungsgen entstanden sind. Dafür spricht

die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen der Rezeptoren dieser Familie, zu der der ligandengesteuerte Acetylcholin-, Glycin-, Glutamat-, und schließlich der GABA_A-Rezeptor gehören (Bormann, 1988; Bormann, 2000). GABA-Rezeptoren vermitteln im adulten Gehirn eine Hyperpolarisation der postsynaptischen Zelle sowie einen Kurzschluss ankommender Ströme und bewirken so eine herabgesetzte Erregbarkeit.

Sie lassen sich in drei Gruppen einteilen: in ionotrope GABA_A-Rezeptoren, metabotrope GABA_B-Rezeptoren und eine weitere Gruppe ionotroper GABA-Rezeptoren, GABA_C-Rezeptoren.

1.1.4.1 GABA_A-Rezeptor

GABA_A-Rezeptoren werden außer durch GABA auch durch Muscimol und Isoguvacin aktiviert. Bicucullin hemmt den Rezeptor kompetitiv und Picrotoxin nicht-kompetitiv (Sieghart, 1992; Nicoll et al., 1990). GABA_A-Rezeptoren sind ionotrope Rezeptoren, durch deren Aktivierung ein Chlorid-Kanal geöffnet wird. Dadurch kommt es im adulten Gehirn zu einem schnellen Anstieg der Cl⁻-Leitfähigkeit und damit einem Chlorideinstrom in die Zelle, was zu Hyperpolarisation und verminderter Erregbarkeit führt (Bormann, 1988; Study and Barker, 1981). Unter bestimmten Umständen, wie zum Beispiel während der embryonalen Entwicklung können GABA_A-Rezeptoren auch depolarisierend wirken. Wenn etwa aufgrund noch nicht vollständig entwickelter Chlorid-Transporter die intrazelluläre Chloridkonzentration hoch ist, so kann eine Öffnung des Kanals einen Chloridausstrom in Richtung des Cl⁻-Gleichgewichtspotentials und somit eine Depolarisation bewirken (Woodruff, 2006). Das Umkehrpotential des durch GABA ausgelösten Chloridstroms liegt bei etwa -70 mV. Der GABA_A-Rezeptor besitzt mehrere GABA-Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität. Durch Bindung von GABA an Stellen mit hoher Affinität können die anderen Bindungsstellen allosterisch beeinflusst werden. Zum Öffnen des assoziierten Chloridkanals ist die Bindung von mehr als einem Molekül GABA notwendig, da die Stellen mit hoher Affinität bereits bei basaler GABA-Konzentration besetzt sind (Sieghart, 1995). Die Leitfähigkeit des offenen Rezeptors beträgt 30 pS, wobei der Porendurchmesser 5,6 Å beträgt (Hamill, 1987). Der GABA_A-Rezeptor besteht aus verschiedenen Untereinheiten. Bisher sind 6 α-, 3 β-, 3 γ-, 1 δ-, 1 ε-, 1 θ- und 1 π-Isoform bekannt, die sich teilweise durch alternatives Spleißen weiter differenzieren

können (Moss and Smart, 2001). Die Gene für die verschiedenen Untereinheiten verteilen sich auf verschiedene Chromosomen (Sieghart, 1995). Jede Untereinheit wird aus vier transmembranären Domänen gebildet (TM1-TM4) (Bormann 2000). An diesen Domänen befinden sich auch Bindungsstellen für modulatorische Moleküle und Pharmaka. Durch unterschiedliche Kombination der verschiedenen Untereinheiten werden verschiedene Affinitäten vermittelt. Die Assemblierung der Untereinheiten und die subzelluläre Lokalisation wird durch Proteine wie Gephyrin, Dystrophin und GABA_A-Rezeptor-Assoziiertes Protein (GABARAP) und deren Interaktion mit dem Zytoskelett vermittelt (Moss and Smart, 2001). Bei Vertebraten liegt der GABA_A-Rezeptor als Heteropentamer vor; die häufigste Kombination besteht aus 1 γ -, 2 α - und 2 β - Untereinheiten. Durch Koexpression von α - und β -Untereinheiten kann sich ein GABA-sensitiver Ionenkanal bilden, durch Integration einer γ -Untereinheit wird die Benzodiazepin-Sensitivität vermittelt. Je nach Art der α -Untereinheit werden die Rezeptoren in GABA_{A1-6} unterteilt. Durch Blockierung des GABA_A-Rezeptors zeigt sich in Tiermodellen ein gesteigertes Angstverhalten (Shimada et al., 1995). GABA-Agonisten wie Muscimol setzen unabhängig von GABA direkt an der GABA-Bindungsstelle des Rezeptors an und bewirken so eine Steigerung der Cl⁻-Leitfähigkeit (Olsen, 1982). Die Aktivität des GABA_A-Rezeptors kann auch durch Phosphorylierung moduliert werden. Die Phosphorylierungs-Stelle liegt zwischen den Domänen TM3 und TM4 (Sieghart, 1995). So sind GABA_A-Rezeptoren zum Beispiel eng mit Proteinkinase C β III und deren Rezeptor RACK1 assoziiert, die die Phosphorylierung der β -Untereinheit vermitteln (Moss and Smart, 2001). Die Phosphorylierung kann sowohl eine Steigerung als auch eine Hemmung der Rezeptoraktivität bewirken. Medizinisch wichtig ist die Interaktion des GABA_A-Rezeptors mit Benzodiazepinen und Barbituraten. Barbiturate steigern die GABAerge Transmission allosterisch durch Steigerung der mittleren Dauer der Kanalöffnung (Guidotti et al. 1983). Diazepam und andere Benzodiazepine steigern die Wirksamkeit von GABA durch Erhöhen der Öffnungswahrscheinlichkeit und Steigerung der Cl⁻-Leitfähigkeit des GABA_A-Rezeptors (Study and Barker, 1981; Eghbali et al., 1997). Für ihre Wirksamkeit benötigen sie die Anwesenheit von GABA (Sieghart, 1995). Durch diese Substanzgruppen werden anxiolytische Effekte vermittelt, welche auch therapeutisch beim Menschen genutzt werden (Corbett et al., 1991). Auch verschiedene Muskel-

relaxanzien und Anästhetika wie Etomidat und Halothan verdanken ihre Wirkung zumindest teilweise der Beeinflussung des GABA_A-Rezeptors. Einige Antidepressiva wie Amoxapin und Mianserin entfalten einen Teil ihrer Wirkung an diesem Rezeptor (Sieghart, 1995). Außerdem besitzt der GABA_A-Rezeptor Bindungsstellen für Neurosteroide und Ethanol (Bormann, 1988). Ethanol bewirkt eine Potenzierung des GABA-vermittelten Chloridstroms. Eine Zink-Bindungsstelle auf einigen, aber nicht allen GABA_A-Rezeptoren, durch welche Zink die GABA-Antwort hemmt, wird diskutiert (Sieghart, 1995). GABA_A-Rezeptoren zeigen bei andauernder Exposition zu GABA eine verminderte Antwort. Ein Grund dafür ist der verminderte transmembranäre Chlorid-Gradient. Außerdem zeigt der Rezeptor Desensitisierung und es findet eine Down-Regulierung der Rezeptoren statt (Sieghart, 1995).

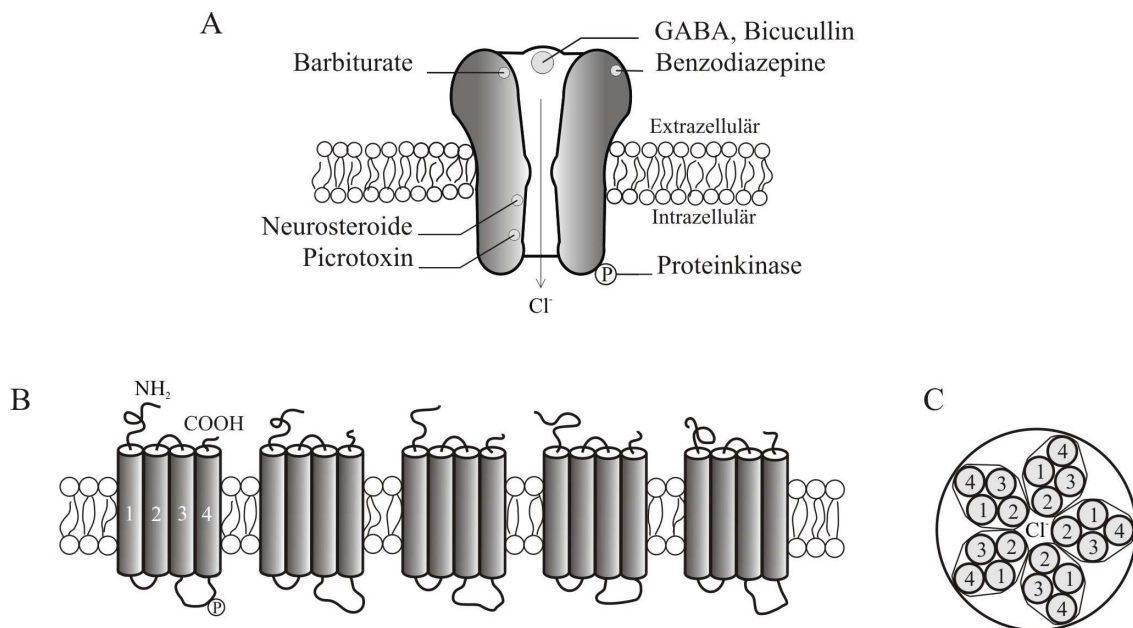


Abb.1-2: Aufbau eines GABA_A-Rezeptors

(A) schematische Darstellung eines GABA_A-Rezeptors mit extrazellulären Bindungsstellen und intrazellulärer Phosphorylierungsstelle. (B) Ein GABA_A-Rezeptor setzt sich aus 5 Untereinheiten mit je 4 transmembranären Domänen zusammen. Die Phosphorylierungsstelle liegt zwischen den Untereinheiten 3 und 4. (C) Die Anordnung der Untereinheiten. Der Chloridkanal wird aus der Untereinheit TM2 gebildet. (nach Bormann, 2000)

1.1.4.2 GABA_B-Rezeptor

GABA_B-Rezeptoren wirken metabotrop über die Adenylatzyklase. Sie sind präsynaptisch als Autorezeptoren anzutreffen, wo sie durch Hemmung von Ca²⁺-Kanälen die Transmitterausschüttung des Neurons hemmen. Bei einem Wegfall dieser präsynaptischen Hemmung kommt es im Mausmodell zu einer Generalisierung

konditionierter Angst (Shaban et al., 2006). Postsynaptisch führen GABA_B-Rezeptoren durch Öffnung eines K⁺-Kanals zu Hyperpolarisation und schwererer Erregbarkeit des postsynaptischen Neurons. Agonist am GABA_B-Rezeptor ist Baclofen, Antagonist Phaclofen. GABA_B-Rezeptoren bilden ein Heterodimer aus zwei Untereinheiten, GABA_{B1} und GABA_{B2}. GABA_{B1} ist ein Protein mit 7 die Membran durchspannenden Domänen, das für die Interaktion mit Agonisten wichtig ist. Auch die GABA_{B2}-Untereinheit durchspannt die Membran 7 mal. Sie enthält aber auch einen langen N-terminalen extrazellulären Teil und wird benötigt um die GABA_{B1}-Untereinheit zur Zellmembran zu leiten. Außerdem interagiert sie mit dem G-Protein (Bowery, 2002).

1.1.4.3 GABA_C-Rezeptor

GABA_C-Rezeptoren bilden wie GABA_A-Rezeptoren einen Ionenkanal für Cl⁻. Sie bilden ein Heteropentamer, das sich aus 3 verschiedenen ρ-Untereinheiten zusammensetzt. Diese finden sich im adulten Gehirn fast ausschließlich in der Retina (Moss and Smart, 2001). Die aufgrund ihrer verschiedenen Pharmakologie ursprünglich als GABA_C klassifizierten Rezeptoren werden oft auch als Untergruppe der GABA_A-Rezeptoren angesehen (GABA_{A0}) (Bormann 2000).

1.2 γ-Amino-Buttersäure (GABA)

γ-Aminobuttersäure, kurz GABA, entsteht durch Decarboxylierung der Aminosäure Glutamat. GABA ist der häufigste inhibitorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (Krnjevic, 1974; Fagg and Foster, 1983). Es wird vor allem von lokalen Interneuronen ausgeschüttet, nur wenige Projektionsneurone wie die Purkinjezellen des Kleinhirns, bestimmte Neurone der Basalganglien und des Gyrus dentatus des Hippocampus nutzen GABA als Neurotransmitter (Nicoll et al., 1990; Szabò et al., 2000). GABA wird, wie die anderen Neurotransmitter auch, in Quanten freigesetzt. Dabei ist ein Quantum GABA in der Lage, etwa 80 postsynaptische Rezeptoren zu besetzen (Nusser et al., 1997). Aufgrund des veränderten Chlorid-Gradienten in unreifen Nervenzellen wirkt GABA während der Embryogenese und auch an unreifen Nervenzellen im adulten Gehirn exzitatorisch (Ben-Ari, 2002; Ge et al., 2006). An reifen Neuronen bewirkt GABA durch inhibitorische Kontrolle der exzitatorischen Impulse im ZNS unter anderem eine Regulierung der Reaktion auf angstauslösende Stimuli. Eine

Erhöhung des GABA-Levels durch Hemmung des Abbaus durch die GABA-Transaminase erzeugt anxiolytische Effekte (Corbett et al., 1991).

1.2.1 Glutamatdecarboxylase

Das Enzym, welches die Herstellung von GABA durch Decarboxylierung von Glutamat katalysiert ist, die Glutamatdecarboxylase (GAD). GAD wird vor allem im ZNS exprimiert, in geringer Menge auch in Ovarien, Hoden und den β -Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas, wo ihre Funktion jedoch unklar ist (Okada et al., 1976; Tillakaratne et al., 1992). Außerdem wird GAD und damit auch GABA, in embryonalem Nervengewebe exprimiert, wo sie die Proliferation, Migration, das Axonwachstum von Neuronen und die Bildung von Synapsen beeinflusst (LoTurco et al., 1995). Die Glutamatdecarboxylase liegt in zwei unterschiedlich großen Isoformen vor, der Glutamatdecarboxylase 65 (GAD65) und -67 (GAD67) (Erlander et al., 1991), die durch zwei unabhängige Gene kodiert werden. *Gad1* kodiert für GAD67 und liegt auf Chr2q31 und *Gad2* kodiert für GAD65 und liegt auf Chr10p11.23 (Erlander et al., 1991). Obwohl in den meisten Hirnregionen sowohl in Zellkörpern als auch in Synapsen beide GAD-Isoformen zu finden sind, gibt es deutliche Unterschiede in der Verteilungsdichte. So liegt GAD67 als zytosolisches Enzym im gesamten Soma vor, wo es über das Tetrapeptid NPHK (Asn-Pro-His-Lys) an den Kofaktor Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP) gebunden ist. GAD65 ist vermehrt in den Axonterminalen anzutreffen (Esclapez et al., 1994; Kaufmann et al., 1991). Es ist in den Synapsen reversibel an Vesikel gebunden (Esclapez et al., 1994; Martin et al., 1991; Jin et al., 1999). Außerdem liegt GAD 65 in großen Mengen als Apoenzym, also inaktiv, vor und kann durch Bindung von PLP aktiviert werden (Martin et al., 1991; Itoh and Uchimura, 1981; Kaufmann et al., 1991). Die Assoziation des Kofaktors PLP mit GAD65 wird von anorganischem Phosphat (P_i) und durch Depolarisation gefördert und von ATP gehemmt, steigt also in Zeiten hohen Energieverbrauchs durch synaptische Beanspruchung (Kaufmann et al., 1991, Miller and Walters, 1979). Das lässt die Vermutung zu, dass GAD65 vor allem für die GABA-Versorgung bei erhöhtem Bedarf wichtig ist und einen Reservepool an GABA für Zeiten hoher synaptischer Beanspruchung herstellt (Martin et al., 1991, Kash et al., 1997). So konnte auch gezeigt werden, dass die mRNA von GAD65 vor allem in Zeiten chronischen Stresses vermehrt

hergestellt wird, während in akuten Stresssituationen vor allem die Menge der GAD67 mRNA ansteigt (Bowers et al., 1998). GAD65 könnte auch die Feineinstellung der inhibitorischen Neurotransmission regulieren (Kash et al., 1999). GAD67 sorgt für die Grundversorgung mit GABA und produziert über 90 % der gesamten GABA-Menge.

Bei verschiedenen pathologischen Zuständen spielt GAD eine Rolle. So bilden sich Autoantikörper gegen beide GAD-Isoformen bei Menschen, die später einen insulinabhängigen Diabetes mellitus entwickeln und GAD zeigt eine hohe Aktivität in menschlichen Insulinomen (Okada et al., 1976). Autoantikörper gegen GAD65 können das sogenannte Stiff-man-Syndrom (Kono et al., 2001) auslösen. Auch neurologische Erkrankungen wie Temporallappen-Epilepsie, Post-traumatisches Stress-Syndrom und Depressionen (Levine et al., 2001) können mit GAD zusammenhängen.

1.2.2 Herstellung des “Knock-Outs”

Für diese Arbeit wurden homozygote und heterozygote GAD65 defiziente Mäuse verwendet. Zur Herstellung des GAD65-KnockOuts siehe Kash 1997 und Asada 1996. Es wurden Mäuse der Art *Mus Musculus* (Hausmaus) verwendet. Die Sequenz des GAD65 Gens von F1-Embryos aus C57/BL/6-Weibchen und CBA-Männchen konnte aus einer Genbank gewonnen werden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, Nr. D42051). Der Zielvektor (pMC1DT-ApA) enthielt die Neokassette PGKNeopA, die für das Neomycinresistenzgen kodiert und eine Diphtherietoxin-Fragment-A-Kassette (DT-A), die aber außerhalb des homologen Bereichs des Vektors lag. Dieser Zielvektor wurde nun in einen Bluescript-SK-Vektor (BSK) (Stratagene) eingebracht. Wichtiger Bestandteil dieses Vektors ist eine Polylinker-Region, die multiple Erkennungssequenzen für verschiedene Restriktionsendonukleasen besitzt. Jede dieser Erkennungssequenzen ist nur einmal auf dem Plasmid enthalten, so dass das Plasmid an einer dieser Stellen durch eine Endonuklease geschnitten und linearisiert werden kann, und ein Stück fremde DNA angehängt werden kann. Die Polylinker Region liegt eingebettet im β -Galaktosidase-kodierenden Gen LacZ und bewirkt bei Expression in einem Bakterium bei Anwesenheit von X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) eine Blaufärbung. Nach Unterbrechung der Polylinker-Region durch den Zielvektor können die erfolgreichen Kombinationen durch ihre weiße Farbe in Anwesenheit von X-Gal identifiziert werden (α -Komplementierung). Als Zielzellen dienten nun

embryonale TT2-Stammzellen (Transparent Testa 2). Durch Elektroporation wurde die Zellmembran durchlässig gemacht und der zuvor hergestellte lineare Vektor konnte aufgenommen werden.

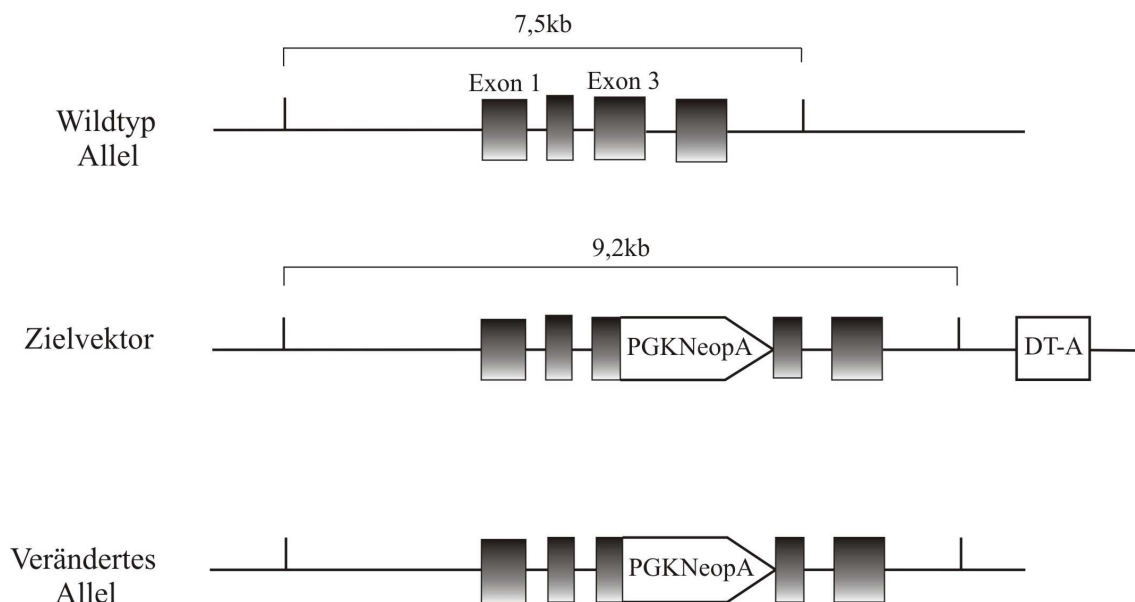


Abb. 2-1: GAD65 Deletionsmutation durch homologe Rekombination

Wildtyp Allel und Zielvektor zur Herstellung der GAD65 Deletionsmutante und verändertes Allel. Der Zielvektor enthält ein Neomycinresistenzgen zur positiven und ein Diphtherie-Toxin A Gen zur negativen Selektion (verändert nach Asada et al., 1996).

Durch Rekombination wurde der Vektor nun in das Genom der Stammzellen integriert. Durch Neomycin-Gabe wurden dann alle nicht-rekombinanten Zellen abgetötet, da diese nicht das Neomycin-Resistenzgen des Targeting-Vektors enthielten (positive Selektion). Zellen, die den Vektor durch nicht-homologe Rekombination aufgenommen hatten, exprimierten das außerhalb der homologen Arme gelegene Gen für Diphtherie-Toxin A und starben durch Hemmung des Elongationsfaktors 2 und damit der Proteinbiosynthese (negative Selektion). Die erfolgreichen homologen Rekombinationen wurden durch Restriktionsverdau und Southern Blot-Analysen verifiziert und die Zellen in 8-Zell-Stadien von ICR-Mäusen injiziert, so dass sich chimäre Mäuse entwickelten. Durch Kreuzung mit C57Bl/6-Wildtypmäusen konnten so GAD65 defiziente Mäuse (GAD65^{-/-}) entstehen.

Da das GAD65-Gen in Exon 3 unterbrochen wird und Exon 1 und 2 intakt bleiben könnte evtl. noch ein schmales N-terminales Peptid gebildet werden, das aber nicht für die Enzymaktivität ausreicht (Kash et al., 1997; Asada et al., 1996; Yagi et al., 1993).

1.2.2.1 GAD67 “Knock-Out”

GAD67-Knock-Out Mäuse werden mit einer Gaumenspalte geboren. Ihre Lunge ist größtenteils atelektatisch und die Tiere sterben perinatal oder innerhalb des ersten Lebensstages wahrscheinlich an respiratorischer Insuffizienz (Asada et al., 1997; Condie et al., 1997). Ihre Gehirne zeigen bei morphologischer Unauffälligkeit eine GAD-Aktivität von weniger als 20 % und ein GABA-Level von nur 7 % des Wildtyps (Kash et al., 1999, Asada et al., 1997). GABA ist also essenziell für die embryonale Entwicklung und GAD65 kann alleine nicht genug GABA für die Überlebensfähigkeit des Organismus generieren.

1.2.2.2 GAD65 “Knock-Out”

GAD65-Knock-Out Mäuse (GAD65^{-/-}) sind überlebensfähig. Sie haben beinahe normal hohe basale GABA-Level und eine normal hohe holo-GAD-Aktivität. GAD65 mRNA ist in den homozygoten Knock-Outs erwartungsgemäß nicht vorhanden, in den heterozygoten GAD65^{+/-} Mäusen um die Hälfte reduziert (Asada et al., 1996). Die homozygoten Knock-Outs zeigen eine 50 %ige Reduktion der durch Kofaktor aktivierbaren Enzymaktivität (Kash et al., 1997), eine leichte Reduktion des basalen GABA-Levels scheint bei erwachsenen Tieren aufgehoben zu sein (Hensch et al., 1998). Da GAD65^{-/-} Mäuse auch ohne Gaumenspalte oder sonstige Abnormalitäten geboren werden und sich normal entwickeln, scheint GAD65 kein essentieller trophischer Faktor in der Embryonalentwicklung zu sein. Allerdings zeigen GAD65^{-/-} eine erhöhte Mortalität durch das Auftreten spontaner epileptischer Anfälle, so dass > 30 % der Tiere während der ersten 7 Monate sterben (Kash et al., 1997). Diese Anfälle können schon durch leichten Stress oder Angst ausgelöst werden. Die epileptischen Anfälle betreffen auch das limbische System, ihre Stärke ist abhängig vom genetischen Hintergrund des Knock-Outs (Kash et al., 1997). Nach Gabe von Picrotoxin bekommen GAD65^{-/-} Mäuse schneller Krampfanfälle als Kontrolltiere; die heterozygoten GAD65^{+/-} liegen dazwischen (Asada, 1996). Außerdem zeigen GAD65-

/- Mäuse eine veränderte Plastizität des visuellen Kortex während der Entwicklung (Hensch et al., 1998).

Das Fehlen der Glutamatdecarboxylase 65 wurde in Verhaltenstests in Hinsicht auf unterschiedliche Aspekte untersucht. Die Tests basierten auf dem natürlichen Vermeidungsverhalten von Mäusen gegenüber offenen Räumen. Im „open field“ Test und im „elevated zero maze“ Test wurde eine gesteigerte Ängstlichkeit der GAD65^{-/-} Mäuse gegenüber GAD65^{+/+} festgestellt (Kash et al., 1999).

Bei Gabe von Diazepam zeigen Wildtyp-Mäuse typischerweise eine gesteigerte lokomotorische Aktivität, was auf die anxiolytischen Effekte der Substanz zurückgeführt wird. Bei Untersuchungen mit GAD65^{-/-} zeigte sich jedoch keine Änderung des Verhaltens. Auch bei der Injektion von Barbituraten zeigte sich eine verminderte Wirksamkeit (Kash et al., 1999). Beide Substanzen benötigen die Anwesenheit von GABA, um ihre Wirkung zu entfalten. Ihre verminderte Wirksamkeit könnte sich also durch eine Verminderung der raschen GABA-Freisetzung erklären lassen.

Der GABA-Agonist Muscimol wirkt auf Wildtyp-Mäuse sedativ. Da Muscimol unabhängig von GABA direkt auf den GABA-Rezeptor wirkt, zeigte sich dieser beruhigende Effekt auch bei den GAD65^{-/-} (Kash et al., 1999). GAD65^{-/-} Mäuse sind nicht hyperaktiv und zeigen keine Anzeichen von Tremor, Spastik, Ataxie oder Bewegungsstörungen. GAD65 scheint also nicht für die grobe lokomotorische Kontrolle verpflichtend zu sein (Kash et al., 1997). Die postsynaptische Dichte von GABA_A-Rezeptoren ist in GAD^{-/-} gegenüber GAD^{+/+} unverändert (Kash et al., 1999).

1.3 Die laterale Amygdala

Die laterale Amygdala gehört zum Kernkomplex der Amygdala, einer der wichtigsten Gehirnregionen zur Generierung von emotionalem Verhalten und essentiell zur Formung emotionaler Gedächtnisinhalte (Aggleton, 1992; Shinnick-Gallagher et al., 2003). Die Amygdala wurde zuerst von Burdach im frühen 19. Jhd. beschrieben (Sah et al., 2003) und besteht aus 13 Einzelkernen, die sich verschiedenen Gruppen zuordnen lassen. Diese Kerne lassen sich wiederum in Untereinheiten aufteilen und weisen starke intra- und internukleäre Verbindungen auf (Krettek and Price, 1977; Pitkänen et al., 2000). Dabei laufen die Verbindungen innerhalb der lateralen Amygdala vor allem von

dorsal nach ventral und von lateral nach medial. Insgesamt liegt bei den intranukleären Fasern im Vergleich zu anderen Hirnarealen allerdings ein großes Maß an Heterogenität vor (Samson and Paré, 2006). Makroskopisch entspricht die Amygdala einer Ansammlung grauer Substanz rostral vom Ende des Ncl. caudatus im Temporallappen. Sie wird ventral vom basalen Kern, lateral von der externen Kapsel und medial vom zentralen Nukleus begrenzt.

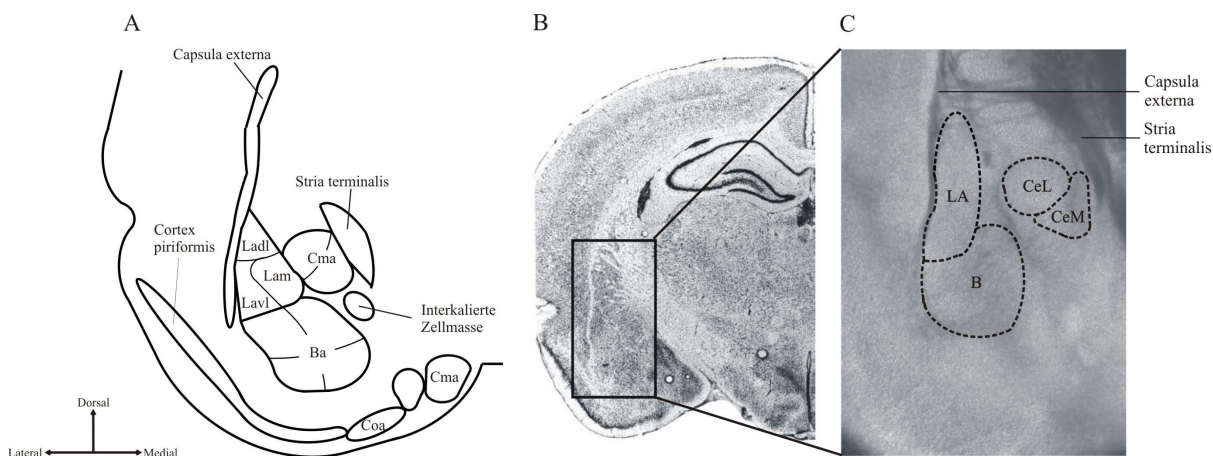


Abb. 1-3: Lage der Amygdala im Hirnschnitt

(A) Schematische Darstellung im Frontalschnitt. Cma, zentromediale Amygdala; Coa, kortikale Kerne der Amygdala; Ba, Basale Kerngruppe der Amygdala, Ladl, laterale Untereinheit der lateralen Amygdala; Lam, mediale Untereinheit der lateralen Amygdala; Lavl, ventrolaterale Untereinheit der lateralen Amygdala. (B) Frontalschnitt durch Bregma-3 mit Nissl-Färbung. (C) Vergrößerung der Amygdala ohne Färbung. Eingezeichnet ist die ungefähre Lage der lateralen Amygdala (LA), der Basalen Amygdala (B) und die laterale (CeL) und mediale (CeM) Untereinheit des zentralen Nukleus. (nach Sah et al., 2003)

Die laterale Amygdala besteht aus der kleinzelligen dorsolateralen, der größerzelligen ventrolateralen und der medialen Untereinheit (Sah et al., 2003). Sie wird als sensorischer Eingang des gesamten Corpus amygdaloideum betrachtet und dient als sensorische Schnittstelle (Pitkänen et al., 1997; LeDoux et al., 1990a; McDonald, 1998). Sensorische Informationen erreichen die laterale Amygdala aus dem Thalamus und dem Kortex (McDonald, 1998), olfaktorische Projektionen über den piriformen Kortex (Luskin, 1983) und über zwischengeschaltete andere amygdaloide Stationen.

Somatosensorische und nozizeptive Afferenzen zur lateralen Amygdala entspringen vor allem in der Inselrinde (Shi and Cassell, 1997). Sie gelangen über den medialen Corpus geniculatum mediale und den posterioren internukleären Nukleus des Thalamus zur Amygdala (Bordi and LeDoux, 1994). Gustatorische und viszerale Afferenzen erhält die

laterale Amygdala aus der Inselrinde (Shi and Cassell, 1998) und aus dem posteromedialen ventralen Thalamus (Nakashima et al., 2000). Besonders wichtig für die Angst-Konditionierung ist der auditorische Input zur lateralen Amygdala. Dieser hat seinen Ursprung in T3; T1 hat keine direkte Verbindung zur Amygdala (Shi and Cassell, 1997). Außerdem erhält die laterale Amygdala auditorische Informationen über den Corpus geniculatum mediale (LeDoux et al., 1990b). Auch visuelle Afferenzen zur lateralen Amygdala können entweder vom visuellen Kortex oder über thalamische Zentren zur lateralen Amygdala gelangen (Shi and Davis, 2001). Dabei treten unimodale sensorische Informationen vor allem lateral in die laterale Amygdala ein, wohingegen polymodale Informationen hauptsächlich medial eintreten (Pitkänen et al., 2000).

Efferenzen der lateralen Amygdala führen in großer Zahl zum medialen Temporallappen, zum präfrontalen Kortex und zum Ncl. Accumbens (Petrovich et al., 2001; Pitkänen, 2000). Außerdem sendet die laterale Amygdala Informationen zum zentralen Kern der Amygdala (Pitkänen et al., 1997), der die Erregung zum Hirnstamm und zum Hypothalamus weiterleitet.

Funktionell lässt sich die Amygdala dem limbischen System zuordnen. Sie hat modulatorischen Einfluss auf vegetative Zentren des Hypothalamus und vermittelt Verhaltensweisen auf emotionale Reize, zum Beispiel Flucht- und Angstreaktionen.

So zeigen sich in bildgebenden Verfahren Reaktionen der Amygdala auf verschiedenste soziale Situationen wie zum Beispiel Bewegungen, die Angst ausdrücken (de Gelder et al., 2004). Ausschlaggebend für das Verständnis der Bedeutung der Amygdala waren Versuche von Heinrich Klüver und Paul Bucy 1939. In diesen wurden die Auswirkungen einer bilateralen Temporallappen-Läsion untersucht. Die beschriebenen Affen zeigten eine Verflachung des Gefühlslebens, einen ungehemmten Sexualtrieb, sowie eine orale Tendenz. Die emotionale Komponente dieses Symptomkomplexes konnte später der Amygdala zugeordnet werden.

Menschen mit bilateralen Amygdala-Läsionen können je nach Zeitpunkt der Läsion soziale Defizite durch erlernte Verhaltensweisen ausgleichen. Sie zeigen jedoch Defizite in der Interpretation von menschlichen Gesichtsausdrücken, besonders wenn diese Angst ausdrücken (Adolphs et al., 1999). Sie interpretieren damit menschliche Gesichts-

ausdrücke tendenziell als vertrauenserweckender als gesunde Vergleichspersonen (Adolphs et al., 1998).

1.3.1 Neurone der lateralen Amygdala

Die Neurone der lateralen Amygdala lassen sich nach verschiedenen Kriterien kategorisieren. Nach dem Adaptationsverhalten ihrer Aktionspotentiale lassen sie sich in Projektions- und in Interneurone unterteilen (Faber et al., 2001). Die Verarbeitung emotionaler Reize wird durch ein Gleichgewicht aus hemmenden und erregenden Einflüssen vermittelt (Davis et al., 1994). Die Erregung wird dabei von glutamergen Projektionsneuronen übertragen, die Hemmung von GABAergen Interneuronen (Carlsen, 1988).

Neben Projektions- und Interneuronen existieren verschiedene weitere Formen von Nervenzellen in der lateralen Amygdala, die aber hier nicht weiter beschrieben werden. Dazu gehören „extended cells“, „cone cells“, „chandelier cells“ und „neurogliaform cells“ (Faulkner and Brown, 1999; Kamal and Tömböl, 1975; Millhouse and DeOlmos, 1983)

1.3.1.1 Projektionsneurone

Die Projektionsneurone, auch pyramidale-, spiny- oder class1- Zellen genannt, machen etwa 80 % der Nervenzellen der lateralen Amygdala aus und benutzen Glutamat als Neurotransmitter (Carlsen, 1988; Smith and Paré, 1994).

1.3.1.1.1 Morphologie

Die Projektionsneurone besitzen in der Regel ein pyramidenförmiges Soma mit 3 bis 7 Dendriten, die sich weiter zu Sekundär- und Tertiärdendriten mit spitzen Ausläufern verzweigen. Oft ist ein Hauptdendrit erkennbar, der dem apikalen Dendriten kortikaler Neurone vergleichbar ist (Faber et al., 2001; Hall, 1972). Die Zellen zeigen keine spezielle Ausrichtung, sondern sind unregelmäßig angeordnet. Der Primärdendrit ist apikal und basal von etwa gleicher Länge, was die Zellen morphologisch von kortikalen Pyramidenzellen unterscheidet (Faber et al., 2001). Das Axon der Projektionsneurone entspringt entweder direkt vom Zellkörper oder vom Ursprung des Hauptdendriten (Faber et al., 2001; Paré et al., 1995). Bevor die Zellen als Projektionsneurone

Dendriten in andere Kerngebiete senden, geben sie noch lokale Kollateralen ab (Paré et al., 1995; Smith and Paré, 1994). Die Morphologie der Projektionsneurone reicht von pyramidenförmigen bis zu sternförmigen Zellen (Faber et al., 2001). Diese unterschiedliche Morphologie scheint jedoch keinen Bezug zu den elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen zu haben (Faber et al., 2001). Der Durchmesser des Somas der Projektionsneurone der lateralen Amygdala beträgt 10-15 μm (Millhouse and DeOlmos, 1983).

1.3.1.1.2 Elektrophysiologie

Projektionsneurone in der lateralen Amygdala lassen sich durch unterschiedliches Adaptationsverhalten bei der Generierung von Aktionspotentialen weiter unterteilen. Einige adaptieren bereits vollständig nach ein oder zwei Aktionspotentialen, andere zeigen verminderte oder gar keine Adaptation. Morphologisch wurde zwischen diesen verschiedenen Zelltypen kein Unterschied festgestellt (Faber et al., 2001; Funahashi et al., 2000). Das unterschiedliche Adaptationsverhalten könnte mit dem „After-Hyperpolarizing Potential“ (AHP) korrelieren. So fanden Faber et al. 2000, dass maximal adaptierende Projektionsneurone der lateralen Amygdala kürzere AHPs haben als nicht adaptierende. In verschiedenen Studien wurden etwa 3 % der Neurone identifiziert, die unabhängig von der Stärke und Dauer der Depolarisation nur ein einziges Aktionspotential generieren (Chapman et al., 1990; Faber et al., 2001; Faulkner and Brown, 1999). Die Unterschiede im Adaptationsverhalten könnten mit einer unterschiedlichen Verteilung von spannungsabhängigen und Kalzium-aktivierten K^+ -Kanälen zusammenhängen (Faber et al., 2001; Faber and Sah, 2002).

Die passiven Membraneigenschaften dieser verschieden adaptierenden Neurone unterscheiden sich nicht. So fanden Faber et al. 2001 ein durchschnittliches Ruhemembranpotential von -66 mV und einen durchschnittlichen Eingangswiderstand von $150\text{ M}\Omega$. Aktionspotentiale konnten vollständig durch Tetrodotoxin blockiert werden.

1.3.1.1.3 Synaptische Eigenschaften

Die Projektionsneurone der lateralen Amygdala erhalten glutamergen Input aus kortikalen und thalamischen Strukturen (Farb et al., 1995), welcher an ihren Synapsen AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionoc acid)- und NMDA (N-

methyl-D-aspartat)-Rezeptoren aktiviert (Farb and LeDoux, 1997; Farb and LeDoux, 1999). Die Anwesenheit von Kainat-Rezeptoren (Castillo et al., 1997) ist für die basale synaptische Transmission von Bedeutung (Li and Rogawski, 1998). Diese drei ionotropen Rezeptoren spielen eine Rolle bei verschiedene Formen synaptischer Plastizität in der lateralen Amygdala (Sah et al., 2003). Glutamat aktiviert außerdem einen metabotropen Glutamat-Rezeptor, der über ein G-Protein die Phospholipase C oder die Adenylatzyklase aktiviert (Pin and Duvoisin, 1995) und dadurch synaptische Plastizität induziert (Sah et al., 2003).

Bevor die Axone der Projektionsneurone die laterale Amygdala verlassen kollateralisieren sie. Die Kollateralen führen sowohl zu lokalen Interneuronen (Smith et al., 2000), als auch zu anderen Projektionsneuronen (McDonald, 1982). Um das Soma herum befinden sich in starker Dichte inhibitorische Synapsen Parvalbumin-positiver Interneurone, die den exzitatorischen Ausgang kontrollieren. Exzitatorische Inputs erreichen die Projektionsneurone vor allem an distalen Dendriten (Muller et al., 2006).

1.3.1.2 Interneurone

1.3.1.2.1 Morphologie

Die zweite Gruppe von Neuronen in der lateralen Amygdala, die GABAergen (McDonald and Augustine, 1993) Interneurone, wirken inhibitorisch. Sie sind kleiner als die Projektionsneurone und werden auch als „spiny cells“ oder als „stellate“ oder „classII“-Zellen (Millhouse and DeOlmos, 1983; Hall, 1972; Sah et al., 2003) bezeichnet. Sie haben 2 bis 6 primäre Dendriten, die ein sphärisches Feld um das Soma formen (Lang and Paré, 1998; McDonald, 1982). Die GABAergen Interneurone enthalten Kalzium-bindende Proteine wie Parvalbumin (PV), Calbindin und Calretinin und Neuropeptide wie das vasoaktive intestinale Peptid (VIP), Somatostatin und Cholezystokinin (CCK) (McDonald and Mascagni, 2001 b; Kemppainen and Pitkänen, 2000). Aufgrund der Verteilung und Kolokalisation dieser Peptide lassen sich die Interneurone in mindestens vier Untergruppen unterteilen. Parvalbumin- und Calbindin- positive Zellen, Somatostatin- und Calbindin- positive Zellen, Cholezytokinin- und oft Calbindin- positive Zellen und VIP-, Calretinin- und Choelzystokinin- positive Zellen. (McDonald and Betette, 2001; Mascagni and McDonald, 2003; McDonald and Mascagni, 2001b; Kemppainen and Pitkänen, 2000). Über die Hälfte der GABAergen

Interneurone gehören dem Parvalbumin-positiven Typ an. Die Axone dieser Interneurone verzweigen sich in der Nähe des Zellkörpers (Millhouse and DeOlmos, 1983), bilden Korb-ähnliche Strukturen um das Soma der Projektionsneurone (McDonald and Mascagni, 2001b) und können so eine starke inhibitorische Kontrolle über deren exzitatorischen Ausgang ausüben (Carlsen, 1988; Lang and Paré, 1998; McDonald and Betette, 2001; Paré and Smith, 1998). Dadurch wird eine überschießende Erregung in der lateralen Amygdala verhindert (Royer and Paré, 2003) und relevante Signale werden von nicht relevanten getrennt (Bauer and LeDoux, 2004).

1.3.1.2.2 Elektrophysiologie

Auf einen anhaltenden depolarisierenden Reiz hin generieren die Interneurone eine Kette schmaler, nicht-adaptierender Aktionspotentiale mit einer Halbbreite („half-width“) von etwa 0,7 ms (Lang and Paré, 1997; Paré et al., 1995; Washburn and Moises, 1992). Sie zeigen eine höhere spontane Aktivität als Projektionsneurone mit Frequenzen von 10-15 Hz (Lang and Paré, 1998; Paré et al., 1995).

1.3.1.2.3 synaptische Eigenschaften

Die Interneurone der lateralen Amygdala erhalten exzitatorischen Eingang von lokalen, kortikalen und thalamischen Zellen (Lang and Paré, 1998; Szinyei et al., 2000). Außerdem bilden sie untereinander ein dichtes Netzwerk aus (McDonald, 1982). Sie besitzen AMPA-Rezeptoren mit einer relativ hohen Permeabilität für Kalzium (Mahanty and Sah, 1998). Außerdem spielen auch auf Interneuronen entgegen früherer Ansichten NMDA-Rezeptoren eine bedeutende Rolle bei der synaptischen Übertragung aus kortikalen und thalamischen Afferenzen. Auch die für die synaptische Plastizität bedeutende NMDA-Untereinheit NR2B konnte in Interneuronen der lateralen Amygdala nachgewiesen werden (Szinyei et al., 2003). An den nachgeschalteten Projektionsneuronen vermitteln die Interneurone ein inhibitorisches postsynaptisches Potential. Dieses Potential setzt sich aus einer schnellen und einer langsamen Komponente zusammen. Der frühere Teil der Antwort wird durch GABA_A-Rezeptoren vermittelt, was sich darin äußert dass er sensitiv zu den GABA_A-Antagonisten Picrotoxin und Bicucullin ist. Der spätere Anteil der Antwort wird durch GABA_B - Rezeptoren vermittelt und ist sensitiv gegenüber dem GABA_B -Antagonisten CGP35348 (Lang and Paré, 1997; Washburn and Moises 1992; Samson and Paré,

2006). Auffällig ist eine große Variabilität der Anzahl postsynaptischer GABA_A-Rezeptoren, die den aktiven Zonen der Präsynapse gegenüberliegen. Sie kann von einigen wenigen bis zu mehreren hundert Rezeptoren variieren (Biró et al., 2006). Interneurone können sowohl Vorwärts- als auch Rückwärtshemmung vermitteln (Alger and Nicoll, 1982). Sie selber stehen unter inhibitorischer und exzitatorischer Kontrolle von Dopamin (Marowsky et al., 2005). Die aktiven Zonen der Interneurone enthalten mehrere „Release Sites“, so dass bei hohen Freisetzungswahrscheinlichkeiten mehrere Vesikel pro aktiver Zone freigesetzt werden können. Dadurch kann eine hohe Variabilität postsynaptischer Antworten auf einen präsynaptischen Release entstehen (Biró et al., 2006).

1.4 Prinzip der Patch-Clamp Technik

Ende der 30er Jahre wurde von Kenneth S. Cole und H.J. Curtis nachgewiesen, dass sich bei Erregung einer Nervenzelle die Membranleitfähigkeit verändert. Sie benutzten dazu zum ersten Mal die Technik der Spannungsklemme (voltage clamp). Bert Sackmann und Erwin Neher verfeinerten dann die Spannungsklemme, was zwischen 1973 und 1976 zur Entwicklung der Patch-Clamp Technik führte, mit deren Hilfe man Ströme durch einzelne Ionenkanäle registrieren kann.

Grundlage der Patch-Clamp Technik ist die Verhinderung der Änderung des Membranpotentials einer Zelle durch Injektion eines Kompensationsstroms. So kann das Membranpotential bei einem bestimmten Wert konstant gehalten werden. Durch Messung des Kompensationsstroms können Rückschlüsse auf die Leitfähigkeit der Membran und damit auch auf die Aktivität von Ionenkanälen geschlossen werden.

Zuerst wird mit Hilfe eines Pullers (Patch Pipette Puller PA-10, E.S.F. electronics) aus Borsilikatglas (Harvard Apparatus LTD, GC150T-10) eine Mikropipette hergestellt und mit intrazellulärer Lösung befüllt. Über einen Ag/AgCl-Draht wird die Pipette mit dem Vorverstärker (hier: HEKA EPC10 ProbeI, GND SIN 560110) verbunden.

Mit Hilfe eines Mikromanipulators wird die Pipette über den Schnitt gebracht. Ein anliegender Überdruck verhindert dabei ein Verstopfen der Pipette. Nach maximaler Annäherung an eine Zelle bildet sich bei leichtem Unterdruck ein hoher

Abdichtungswiderstand im GΩ-Bereich zwischen Membran und Pipette aus, wodurch das Membranstück unter der Pipette elektrisch isoliert wird.

Um die in dieser Arbeit genutzte Ganz-Zell-Konfiguration zu erreichen, wird nun durch einen leichten Unterdruck das Membranstück unter der Pipette aufgerissen und die intrazelluläre Flüssigkeit in der Pipette steht mit dem Zellinneren in Verbindung. Über eine Diffusion der Pipettenlösung in die Zelle kann Einfluss auf die Zusammensetzung des Zytoplasmas genommen werden. Zentrales Bauelement des Vorverstärkers ist der Operationsverstärker (OPV), ein Strom-Spannungs-Wandler. Der OPV hat zwei Eingänge, die die anliegende Spannung messen. Am -Eingang wird das Membranpotential registriert, über den +Eingang die festgelegte Kommandospannung.

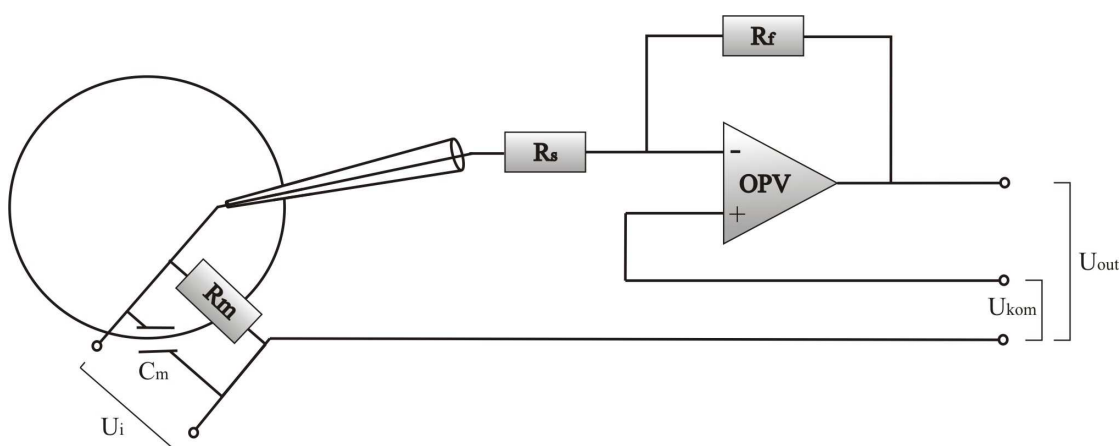


Abb. 2-2: Schematischer Aufbau einer „patch clamp“ Ableitung

(U_i) Spannung zwischen Zellinnerem und Bezugsselektrode; (C_m) Kapazität der Zellmembran, (R_m) Membranwiderstand der Zellmembran, (U_{kom}) vorgegebenes Membranpotential, (U_{out}) dem Ionenstrom proportionale Spannung = Meßgröße, (OPV) Operationsverstärker, (R_f) Rückkopplungswiderstand, (R_s) Serienwiderstand

Durch den OPV selbst fließt aufgrund seines hohen Eingangswiderstands kein Strom. Am Ausgang liefert der OPV eine Spannung, die proportional zur Differenz der Eingangsspannungen ist. Über einen Rückkopplungswiderstand fließt nun ein Kompensationsstrom, der die Differenz zwischen Sollspannung und Membranpotential ausgleicht, so dass an der Zelle zu jeder Zeit die gewünschte Kommandospannung anliegt. Über die Registrierung des Kompensationsstroms lässt sich eine Aussage über die Leitfähigkeit der Membran bei verschiedenen Membranpotentialen machen.

1.5 Ziele der Arbeit

Die Glutamatdecarboxylase steht als Enzym zur Herstellung von GABA im Zentrum der Kontrolle exzitatorischer Reize im ZNS durch inhibitorische Einflüsse. Diese Kontrolle ist essentiell zur Filterung auf den Organismus einwirkender Reize und zur Verhinderung einer überwallenden Exzitation, wie sie z. B. im Rahmen von epileptischen Anfällen beobachtet wird (Scharfman, 2007). Obwohl einiges über den Metabolismus des wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitters, GABA, bekannt ist, sind viele Einzelheiten weiterhin unklar. Diese Arbeit konzentriert sich auf die Rolle der kleineren Isoform der Glutamatdecarboxylase, GAD65. Um Erkenntnisse über ihre funktionelle Bedeutung zu erlangen, werden Deletionsmutanten genutzt, deren Defizite auf die Wirkung der GAD65 im gesunden Organismus rückschließen lassen. Obwohl das Enzym nur den kleineren Teil der basalen GABA-Menge in adulten Neuronen herstellt, stehen Defizite in seiner Struktur im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheitsbildern beim Menschen und Verhaltensauffälligkeiten bei Tieren (Kash et al., 1999; Levine et al., 2001; Kono et al., 2001). Ziel der Arbeit ist es, die Aufgabe der GAD65 bei der synaptischen Übertragung zwischen Interneuronen und Projektionsneuronen zu untersuchen. Dazu werden spontane und evozierte GABAerge Ströme von homozygoten und heterozygoten GAD65-defizienten Mäusen mit denen genetisch normaler Mäuse verglichen. Die Messungen werden an Projektionsneuronen vorgenommen, die unter inhibitorischer GABAerger Kontrolle stehen. Durch eventuell vorhandene Unterschiede zwischen den Zellcharakteristika in den verschiedenen Genotypen können Hinweise auf die Funktion der GAD65 in der Entwicklung von Projektionsneuronen und auf Defekte der normalen Zellfunktion bei Fehlen des Enzyms gewonnen werden. Die laterale Amygdala wurde als Ort der Untersuchung gewählt, da in ihr als Integrationszentrum für Angst- und Fluchtreflexe die inhibitorische Kontrolle synaptischer Eingangssignale besonders wichtig ist. Bei Läsionen der lateralen Amygdala bei Affen und Menschen wurden Verhaltensauffälligkeiten festgestellt, die zum Teil in GAD65^{-/-} Mäusen auftraten (Adolphs et al., 1995; Adolphs et al., 1998; Kash et al., 1999). Gerade hier scheint also die Rolle des Enzyms für ein angemessenes Verhalten essentiell zu sein.

Zur Untersuchung der synaptischen Übertragung sollen in dieser Arbeit sowohl spontane, als auch evozierte inhibitorische postsynaptische Ströme gemessen werden.

Die spontanen IPSCs können indirekt Hinweise auf die Freisetzungswahrscheinlichkeit von Vesikeln in der Präsynapse liefern. Außerdem lassen sich über die postsynaptische Amplitude Aussagen zu Veränderungen der Rezeptoren machen. Durch die Auslösung postsynaptischer Ströme kann die Funktion der Interneurone über ihren Einfluss auf die nachgeschalteten Projektionsneurone ermittelt werden. Außerdem kann über die evozierten Potentiale eine starke Beanspruchung der Synapse simuliert werden, und die Ausschüttung von GABA unter synaptischem Stress in den verschiedenen Genotypen verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Lösungen und Pharmaka

Im Folgenden sind die in der Arbeit verwendeten Lösungen und Pharmaka aufgelistet.

Präparations-Lösung

Substanz	Konzentration [mM]
KCl	2,5
NH ₂ PO ₄	1,25
MgSO ₄	10
PIPES	20
Glucose	10
Saccharose	200
CaCl ₂	0,5
pH = 7,35; ~305 mOsmol/kg	

Artifizielle cerebro-spinale Flüssigkeit (ACSF)

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	120
KCl	2,5
NaH ₂ PO ₄	1,25
MgSO ₄	2
NaHCO ₃	22
C ₆ H ₁₂ O ₆ (vor Gebrauch zugegeben)	20
CaCl ₂ (vor Gebrauch zugegeben)	2
pH 7,3 (eingestellt mit Carbogen)	

Präinkubationslösung (Stammlösung, wird 5fach verdünnt)

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	125
NaHCO ₃	24
CaH ₂ PO ₄	1,25
MgSO ₄	2
KCl	2,5
vor Gebrauch zugeben für 200ml:	Menge:
Glukose	0,396g
CaCl ₂	400 µl 1molare Lösung

Intrazelluläre Lösung I (Miniaturströme)

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	10
CsCl	110
EDTA	11
HEPES	10
Mg-ATP	3
Na-GTP	0,5
Phosphocreatin	15
MgCl ₂	1
CaCl ₂	0,5
pH 7,25; ~295-302 mOsmol/kg	

Intrazelluläre Lösung II (evozierte Ströme)

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	10
KCl	110
EDTA	11
HEPES	10
Mg-ATP	3
Na-GTP	0,5
Phosphocreatin	15
MgCl ₂	1
CaCl ₂	0,5

pH 7,25; ~295-302 mOsmol/kg

Pharmaka

Substanz	Konzentration [μ M]	bezogen von
TTX	1	Tocris bioscience
DNQX	10	Tocris bioscience
GABAzin	25	Tocris bioscience
Picrotoxin	100	Tocris bioscience
CGP555845	50	Tocris bioscience

2.2 Präparation der Hirnschnitte

Versuchstiere waren weibliche GAD65^{+/+}, ^{+/-} und ^{-/-} Mäuse am postnatalen Tag 16 - 31. Die Tiere wurden mit Isofluran (Florene® 100% V/V) anästhesiert und anschließend decapitiert. Anschließend wurde das Gehirn herauspräpariert. Dazu wurde die Kopfhaut entfernt, der Schädel durch einen Frontalschnitt an Bregma eröffnet und

die Schädeldecke mit Hilfe einer feinen Pinzette entfernt. Intermittierend wurde das Gehirn mit kalter Präparationslösung heruntergekühlt um Hypoxieschäden zu vermeiden. Schließlich wurde das Gehirn durch Durtrennung des Frontallappens aus der Schädelhöhle herausgelöst und unverzüglich in 3-4 °C kalte Präparationslösung überführt. Das gekühlte Gehirn wurde nun mit Hilfe eines Vibratoms (Vibratome® Series 1000, Sectioning Systems, Ted Pella Inc.) in 300 µm dicke Frontalschnitte geschnitten. Die Dicke von 300 µm gewährleistet genügend dünne Schnitte für die Durchsicht mit der Infrarot-Videooptik und für die Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Glukose durch Diffusion. Gleichzeitig bleiben viele neuronale Schaltkreise erhalten.

Die Schnitte, auf denen die laterale Amygdala makroskopisch identifiziert werden konnte, wurden anschließend in mit Carbogen begaste Präinkubationslösung überführt. Durch Erhitzung des Bades auf 30 °C für 20 min (Heizer: HAAKE, CI, Typ 002-9910) wurden die geschädigten Zellen zerstört, woraufhin sich im restlichen Schnitt für weitere 60 min bei Raumtemperatur der Zellmetabolismus wiederherstellen konnte und die Schnitte sich von der mechanischen Belastung erholen konnten.

Zur Messung wurden die Schnitte schließlich in die mit ACSF durchspülte Messkammer überführt. Die ACSF wurde ebenfalls zur Einstellung des pH-Werts mit Carbogen begast.

2.3 elektrophysiologische Untersuchungen

2.3.1 Der Versuchsaufbau

Zur Betrachtung der Schnitte diente ein aufrechtes Mikroskop der Firma Zeiss mit zwei Objektiven von 40- (Achromplan, Zeiss) und 5facher (Plan-Neufluar, Zeiss) Vergrößerung. Zur Einsicht in den Schnitt war das Mikroskop mit Infrarot-Licht ausgestattet. Das Zwischenbild wurde mit einer Kamera (Kappa, CF8/1) gefilmt zur optischen Kontrolle auf einen Bildschirm (Panasonic, WV-5410) übertragen. Die an dem Mikroskop befestigte Messkammer konnte unabhängig vom Mikroskop über einen Mikromanipulator (Luigs & Neumann, SM-5) bewegt werden. Das Mikroskop war auf einem durch Stickstoff schwingungsdämpfenden Tisch befestigt. Über einen Silberchlorid-Draht war die intrazelluläre Lösung der befüllten Pipette mit dem

Vorverstärker (HEKA, EPC10, Probe1, GND, SIN 560110) verbunden. Die Pipette ließ sich mit einem Mikromanipulator (Luigs & Neumann, SM-5) unabhängig von Mikroskop und Tisch bewegen. Die Hirnschnitte wurden in Inkubationslösung bei Raumtemperatur aufbewahrt und mit Carbogen begast. Unter optischer Kontrolle wurde mit Hilfe des Mikromanipulators (Luigs & Neumann SM-5) die Mikropipette auf die Zelle zu bewegt. Durch repetitive Gabe eines rechteckigen Strompulses von 2,5 mV wurde mit Hilfe des Programms „Pulse“ der Widerstand der Pipette und die Bildung des Giga-Seals kontrolliert. Nach Erreichen der Ganz-Zell-Konfiguration wurden die Ströme über den Patch-Clamp-Verstärker (HEKA, double patch clamp, EPC10) registriert. Parallel dazu wurden die Ströme zur optischen Kontrolle auf einem Oszilloskop (HAMEG, HM507 Analog Digital Scope) dargestellt. Zur extrazellulären Evozierung postsynaptischer Ströme wurde eine Elektrode mit Hilfe eines zweiten Mikromanipulators (LN SMI) im Schnitt platziert. Die Reizstärke wurde im Bereich von 0,5 bis 3,5 V reguliert (Isoflex A.M.P.I.).

2.3.2 Ableitung spontaner postsynaptischer Miniaturströme

Spontane postsynaptische GABAerge Miniaturströme wurden im Ganz-Zell-Modus an Projektionsneuronen der lateralen Amygdala registriert, die durch ihre Morphologie identifiziert wurden. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur bei einem Haltepotential von -65 mV vorgenommen. Um Aktionspotential-vermittelte Transmission auszuschließen, wurde der extrazellulären Lösung TTX (Tetrodotoxin) zugesetzt. Durch Zugabe von DNQX (6,7-Dinitroquinoxaline-2,3-dion) wurden glutamerge Ströme durch non-NMDA-Rezeptoren unterbunden. Glutamerge Ströme durch NMDA-Rezeptoren konnten aufgrund des negativen Haltepotentials ausgeschlossen werden.

Die intrazelluläre Lösung enthielt 110 mM Cäsium-Chlorid (intrazelluläre Lösung I). Das Cäsium nimmt in der Zelle den Platz des Kaliums ein, kann aber nicht durch K-Kanäle entweichen. Dadurch wurden K-Ströme vermindert. Durch die intrazelluläre Lösung wird außerdem eine symmetrische Chloridverteilung hergestellt. Die sonst bei Öffnung von GABA_A-Rezeptoren aufgrund des Konzentrationsgradienten auswärts gerichteten Chloridströme waren deshalb in Richtung des Chlorid-Gleichgewichtspotentials einwärts gerichtet.

Da durch die oben genannten Substanzen K-Kanäle und Glutamat-Rezeptoren blockiert und Aktionspotentiale unterbunden wurden, ließen sich bei der Ableitung nun isoliert spontane Miniaturströme durch GABA_A-Rezeptoren registrieren. Um diese Selektivität zu zeigen, wurde der ACSF in je einem Versuch der kompetitive GABA_A-Antagonist Gabazin, der nicht-kompetitive GABA_A-Antagonist Picrotoxin und der selektive GABA_B-Antagonist CGP zugesetzt.

Die Auswertung der spontanen postsynaptischen Miniaturströme erfolgte mit der Software Clampfit 10.0 (Axon CNS, Molecular Devices).

2.3.3 Ableitung evozierter postsynaptischer Ströme

Die Ableitung evozierter postsynaptischer Ströme fand bei Raumtemperatur und einem Haltepotential von -65 mV statt. Um postsynaptische GABAerge Ströme auszulösen, wurde eine bipolare Elektrode extrazellulär in der lateralen Amygdala platziert. Durch Zusatz von DNQX zur ACSF wurden Antworten durch non-NMDA-Rezeptoren blockiert. Ströme durch NMDA-Rezeptoren konnten aufgrund des negativen Haltepotentials ausgeschlossen werden. Als intrazelluläre Lösung wurde eine KCl-reiche Lösung verwendet (Intrazelluläre Lösung II). Es wurden 2 verschiedene Stimulationsprotokolle verwendet, bei denen 1ms lange Pulse zwischen 0,5 und 3,5 V eingesetzt wurden. Die Reizstärke wurde jeweils so eingestellt, dass in der postsynaptischen Ableitung eine monosynaptische Minimalstimulation vorlag. Als Minimalstimulation wurde eine Fehlerrate von etwa 40 % angenommen.

Das erste Protokoll bestand aus 4 Stimuli mit 5 Hz und einem Interstimulationsintervall (ISI) von 10 sek. Dieses Protokoll wurde pro Zelle 30 mal durchlaufen.

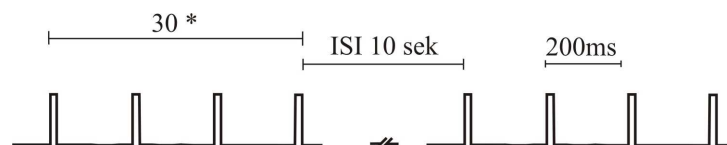


Abb. 2-3: Stimulationsprotokoll I

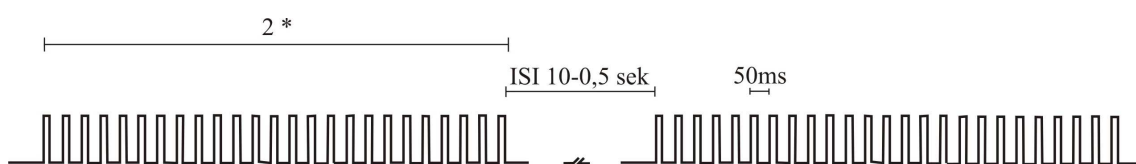


Abb. 2-4: Stimulationsprotokoll II

Das zweite Protokoll bestand aus 25 Stimuli mit 20 Hz und einem Interstimulationsintervall von erst 10, dann 5, 2, 1 und 0,5 sek.

Die Auswertung der evozierten postsynaptischen Ströme erfolgte mit der Software Clampfit 10.0.

2.3.4 Registrierung der Membraneigenschaften

Zur Ermittlung der passiven Membraneigenschaften wurde der Patch-clamp-Verstärker in den Current Clamp Modus gestellt. Dabei wird der durch die Membran fließende Strom vorgegeben und das resultierende Membranpotential registriert. Die Zellen wurden auf ein Haltepotential von -65 mV geklemmt. Als intrazelluläre Lösung diente die CsCl-reiche Lösung I. Da der extrazellulären Lösung TTX zugesetzt war konnte es nicht zur Auslösung von Aktionspotentialen kommen. Außerdem enthielt die extrazelluläre Lösung DNQX. Der injizierte Strom wurde nach einem anfänglichen hyperpolarisierenden Schritt in 5 Stufen um je 20 pA erhöht.

Um Aktionspotentiale zu registrieren wurde die intrazelluläre Lösung II verwendet. Auf die Zugabe von TTX wurde verzichtet. Der ACSF waren 50 µl einer 0,1 molaren DNQX-Lösung zugesetzt. Das Membranpotential der Zelle wurde auf -65 mV geklemmt. In 15 Stufen wurden mit einem Anstieg von 30 pA zuerst einige hyperpolarisierende und anschließend depolarisierende Strompulse von 500 ms Dauer gegeben bis Aktionspotentiale sichtbar waren und eine maximale Frequenz erreicht schien.

Die Messungen fanden bei Raumtemperatur statt. Auch hier erfolgte die Auswertung mit der Software Clampfit 10.0.

2.3.5 Auswertung

Um einen systematischen Fehler durch den Untersucher auszuschließen, wurden die Messungen und die Auswertung in Unkenntnis des Genotyps der Tiere durchgeführt. Für die statistische Auswertung der gewonnenen Daten wurde die Software OriginPro 7.5 benutzt. Die Mittelwerte der erhobenen Daten wurden mit Hilfe des Student's t-Tests verglichen. Das zugrundeliegende Signifikanzniveau betrug dabei $p < 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Passive Membraneigenschaften

Zunächst wurden die passiven Membraneigenschaften der Projektionsneurone der lateralen Amygdala untersucht. Der Eingangswiderstand der abgeleiteten Zellen konnte aus der Potentialänderung als Reaktion auf die Strominjektion ermittelt werden ($R = U / I$). GAD65^{+/+} Neurone hatten einen mittleren Eingangswiderstand von 264,17 M Ω ($\pm 27,12$; n = 26). Dieser unterschied sich signifikant vom Eingangswiderstand der GAD65^{-/-} Neurone von 175,68 M Ω ($\pm 23,91$; n = 26). Die GAD65^{+/-} Gruppe lag mit 236,7 M Ω ($\pm 32,06$; n = 15) dazwischen.

Die mittlere Membrankapazität der gemessenen Neurone betrug für GAD65^{+/+} 240,8 pF ($\pm 20,93$; n = 26), für GAD65^{+/-} 301,54 pF ($\pm 29,17$; n = 15) und für GAD65^{-/-} 272,61 pF ($\pm 27,08$; n = 26). Damit war die Membrankapazität von GAD65^{+/-} signifikant verschieden von den anderen beiden Gruppen.

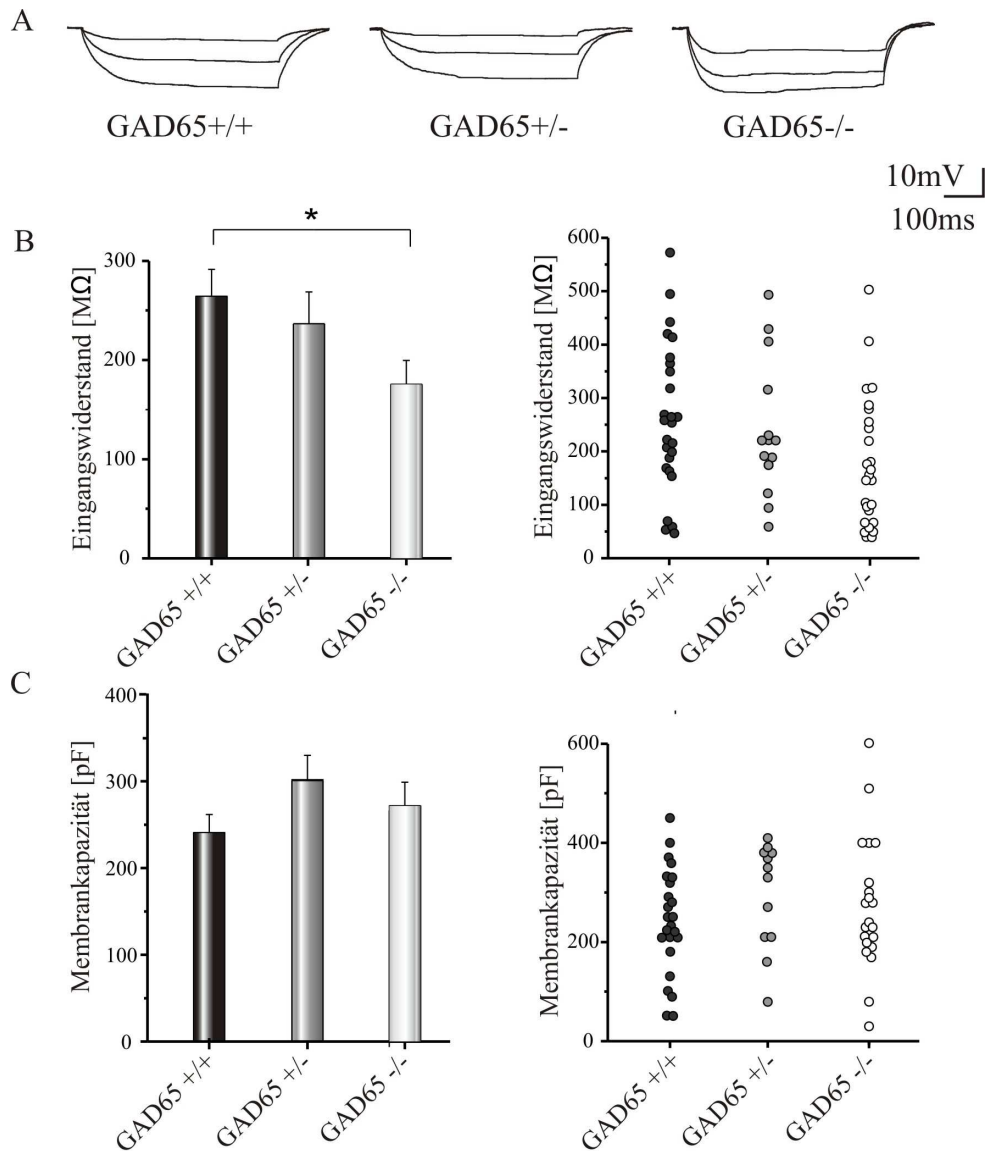


Abb. 3-1: Passive Membraneigenschaften von GAD65+/+, GAD65+/- und GAD65-/-
 (A) Durch hyperpolarisierende Strominjektion ausgelöste passive Antworten von GAD65 +/+, +/- und -/-. Darstellung des 1., 3. und 5. von insgesamt 5 Pulsen mit einem Inkrement von 20 pA. Haltepotential -65 mV. (B) Mittlerer Eingangswiderstand der drei Genotypen (n(+/+) = 26 , n(+/-) = 14, n(-/-) = 26). (C) Mittlere Membrankapazität der drei Gruppen (n(+/+) = 24 , n(+/-) = 12 , n(-/-) = 21).

3.2 Aktive Membraneigenschaften

Die aktiven Membraneigenschaften wurden mit der intrazellulären Lösung II abgeleitet. Der extrazellulären Lösung war DNQX beigesetzt. Bei einem Haltepotential von -65 mV wurden hyper- und depolarisierende Pulse gegeben, bis die ausgelösten Aktionspotentiale ein Frequenzmaximum erreicht hatten.

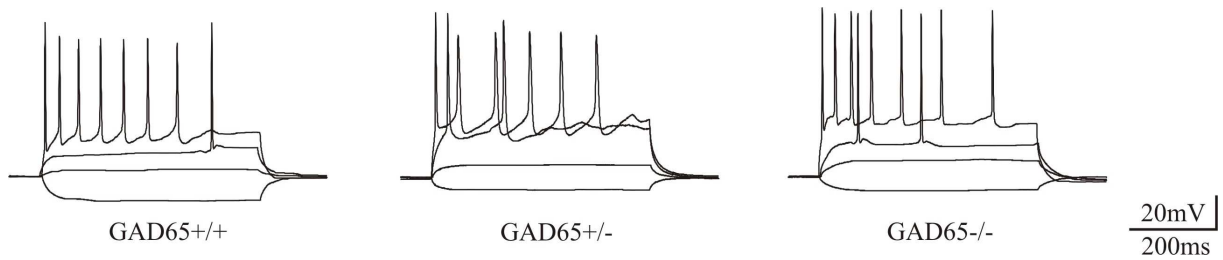


Abb. 3-2: Durch überschwellige Strominjektion ausgelöste Aktionspotentiale

Durch Strominjektion evozierte Aktionspotentiale von GAD65+/+, +/- und -/- Neuronen. Darstellung der passiven Antworten auf den am stärksten hyperpolarisierenden und den ersten depolarisierenden Reiz, sowie des initialen und maximalen Auftretens von Aktionspotentialen. Insgesamt wurden 15 Pulse mit einem Inkrement von 30 pA injiziert. Haltepotential -65 mV.

Die aktiven Membraneigenschaften unterschieden sich in den drei verschiedenen Genotypen nicht voneinander. Die Anzahl der ausgewerteten Zellen betrug für GAD65+/+ 29, für GAD65+/- 26 und für GAD65-/- 25.

	GAD65 +/+	GAD65 +/-	GAD65 -/-
AP-Frequenz [Hz]	12,87 ± 1,67	13,077 ± 1,58	14,14 ± 2,93
AP-Amplitude [mV]	67,31 ± 1,80	65,65 ± 1,52	67,27 ± 1,70
Schwelle [mV]	-40,3 ± 1,14	-41,39 ± 0,57	-42,44 ± 0,83
Halbbreite [ms]	2,73 ± 0,16	2,76 ± 0,14	2,91 ± 0,22
AHP [mV]	6,44 ± 0,51	7,28 ± 0,5	6,46 ± 0,65

Tab. 3-1: Aktive Membraneigenschaften

Mittlere Werte und Standardfehler der maximal aufgetretenen Aktionspotential-Frequenz, der Amplitude des ersten aufgetretenen Aktionspotentials, der Schwelle bis zur Auslösung des ersten Aktionspotentials sowie der Halbbreite und der Tiefe des Nachhyperpolarisierenden Potentials dieses Aktionspotentials (n(+/+) = 27, n(+/-) = 22, n(-/-) = 21).

Es gab in allen drei Gruppen eine große Variation von Aktionspotentialmustern. Einzelne Zellen generierten auch bei maximaler Stimulation nur ein Aktionspotential. Andererseits gab es ebenfalls in allen drei Gruppen Zellen, die nur eine geringe Adaptation zeigten und Frequenzen von bis zu 30 Hz erreichten. Die Zellen mit unterschiedlichen Aktionspotentialmustern ließen sich keinen klaren Gruppen zuordnen.

3.3 Miniaturströme

Spontane Miniaturströme wurden mit der intrazellulären Lösung I gemessen, durch deren Cs-Anteil K^+ -Ströme unterbunden wurden. Die extrazelluläre Lösung enthielt DNQX und TTX. Bei einem Haltepotential von -65 mV konnten so selektiv $GABA_A$ -Rezeptor vermittelte Ströme durch $GABA_A$ -Rezeptoren erfasst werden.

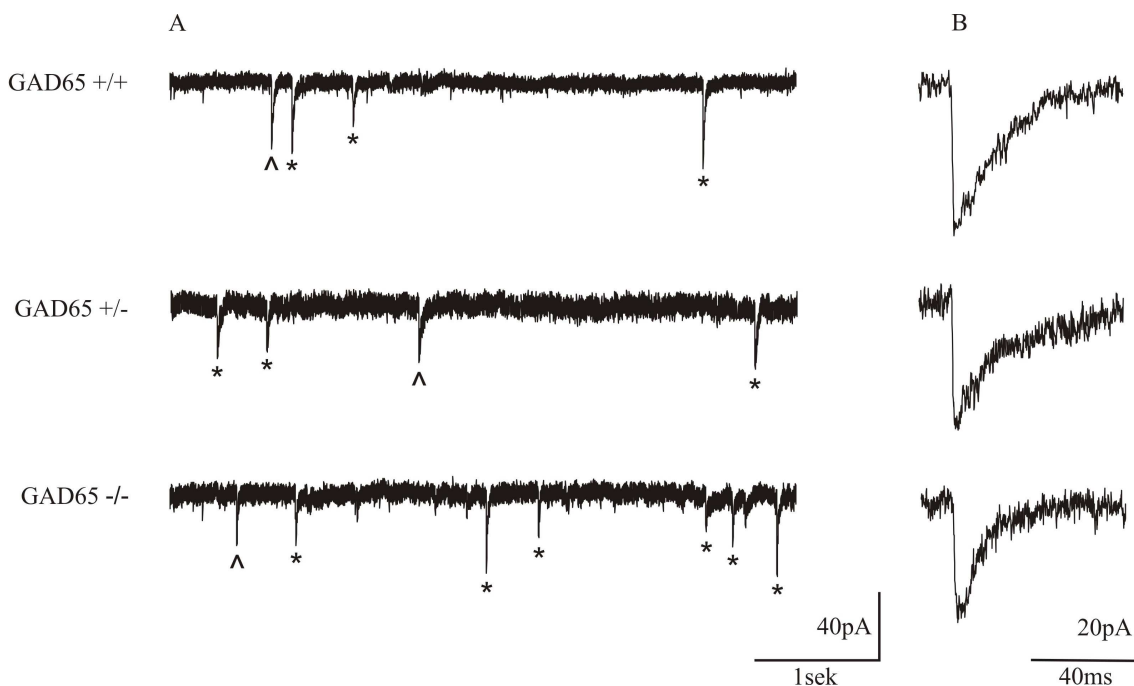


Abb. 3-3: Spontane $GABA_A$ -Rezeptor vermittelte mIPSCs

(A) Beispielstromspuren von $GABA_A$ vermittelten postsynaptischen Miniaturströmen an GAD65+/+, +/- und -/- Neuronen. (B) Vergrößerte Darstellung des mit „^“ markierten Ereignisses der jeweiligen Beispielstromspur.

Die registrierten Stromspuren wurden nach Frequenz und Amplitude der postsynaptischen Ereignisse analysiert. Die Frequenz der spontanen Ereignisse lag für GAD65+/+ bei $0,85$ Hz ($\pm 0,1$, $n = 29$) und für GAD65+/- bei $0,87$ Hz ($\pm 0,15$, $n = 14$). Die Frequenz in GAD65-/- unterschied sich mit $1,7$ Hz ($\pm 0,15$, $n = 25$) signifikant von den anderen beiden Genotypen. Im Gegensatz dazu war die mittlere Amplitude in den drei Gruppen nicht signifikant verschieden. Sie war in GAD65+/+ mit $40,29$ pA ($\pm 2,33$, $n = 29$) am größten. Die Amplitude bei GAD65+/- betrug $34,46$ pA ($\pm 3,46$, $n = 14$) und bei GAD65-/- $34,95$ pA ($\pm 2,33$; $n = 25$).

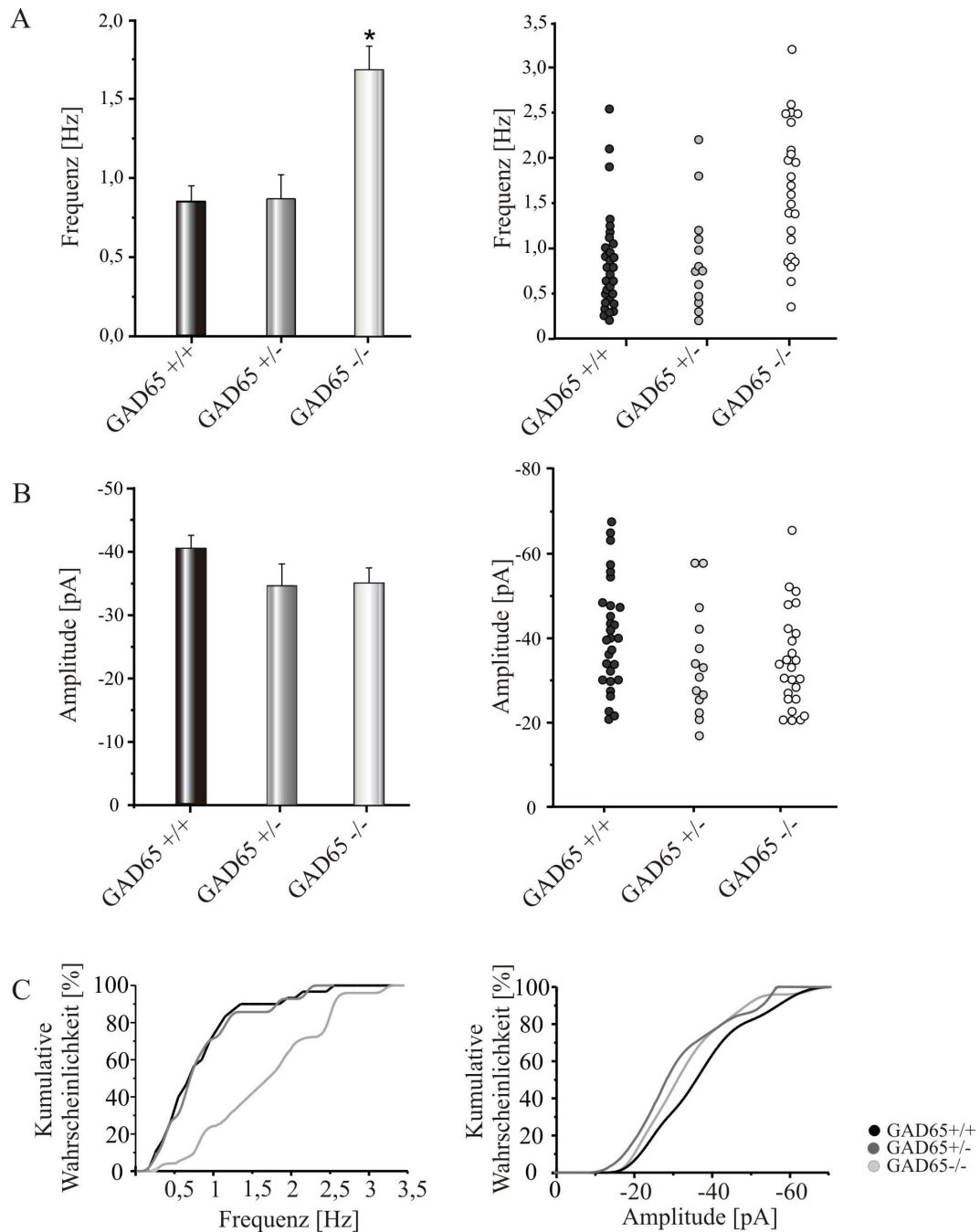


Abb. 3-4: Mittlere Frequenz und mittlere Amplitude der spontanen mIPSCs

(A) Mittlere Frequenz der spontanen mIPSCs für GAD65 +/+, +/- und -/- Neurone (n(+/+) = 29, n(+/-) = 13, n(-/-) = 24). (B) Mittlere Amplitude der spontanen mEPSCs für GAD65 +/+, +/- und -/- Neurone (n(+/+) = 29, n(+/-) = 13, n(-/-) = 24). (C) Kumulative Wahrscheinlichkeiten der mittleren Frequenz und mittleren Amplitude.

Im nächsten Schritt wurde die Kinetik der postsynaptischen Ereignisse analysiert. Die Anstiegszeit wurde als 10 – 90 % der Strecke von der Grundlinie (0%) bis zum Erreichen der maximalen Amplitude (100%) gemessen. Für GAD65+/+ wurde ein Wert von 1,086 ms (\pm 0,065; n = 29), für GAD65+/- 1,62 ms (\pm 0,211; n = 14) und für

GAD65^{-/-} 1,18 ms (\pm 0,074; n = 025) bestimmt. Der Unterschied von GAD65^{+/-} zu den beiden anderen Gruppen war signifikant (p = 0,05). Die Abklingzeitkonstante τ , die das Absinken einer monoexponentiellen Kurve auf $1 / e$ (36,8 %) ihres Ausgangswertes beschreibt, betrug für GAD65^{+/+} 14,58 ms (\pm 0,59; n = 29), für GAD65^{+/-} 15,66 ms (\pm 1,01; n = 14) und für GAD65^{-/-} 11,32 ms (\pm 0,71; n = 25). Dabei unterschied sich der Wert von GAD65^{-/-} bei einem Signifikanzniveau von 0,05 signifikant von den beiden Kontrollgruppen (GAD65^{+/-} und +/+).

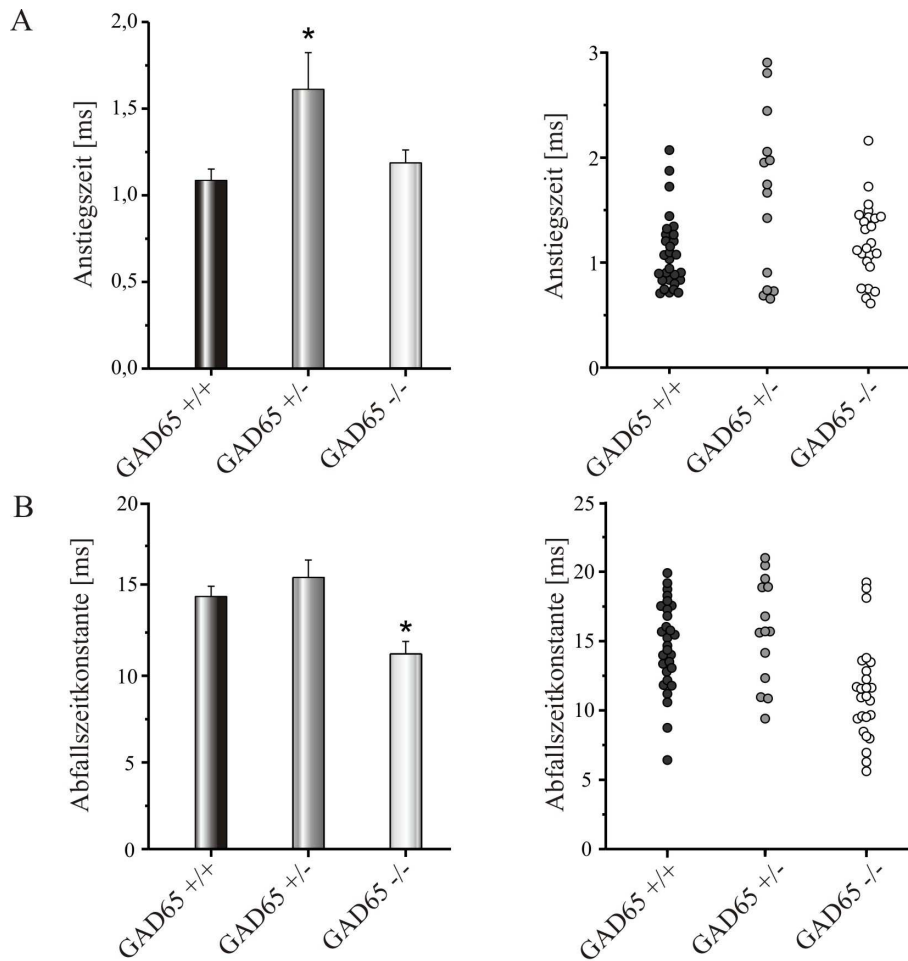


Abb. 3-5: Anstiegszeit und Abklingzeitkonstante der mIPSCs

(A) Mittlere Anstiegszeit der spontanen GABA_A-Rezeptoren vermittelten IPSCs (n(+/-) = 29, n(+/-) = 14, n(-/-) = 24). (B) Mittlere Abklingzeitkonstante τ der spontanen GABA_A-Rezeptoren vermittelten IPSCs (n(+/-) = 29, n(+/-) = 14, n(-/-) = 24).

Der Nachweis der Vermittlung der erfassten postsynaptischen Ereignisse durch $GABA_A$ -Rezeptoren, wurde mit Hilfe pharmakologischer Tests geführt.

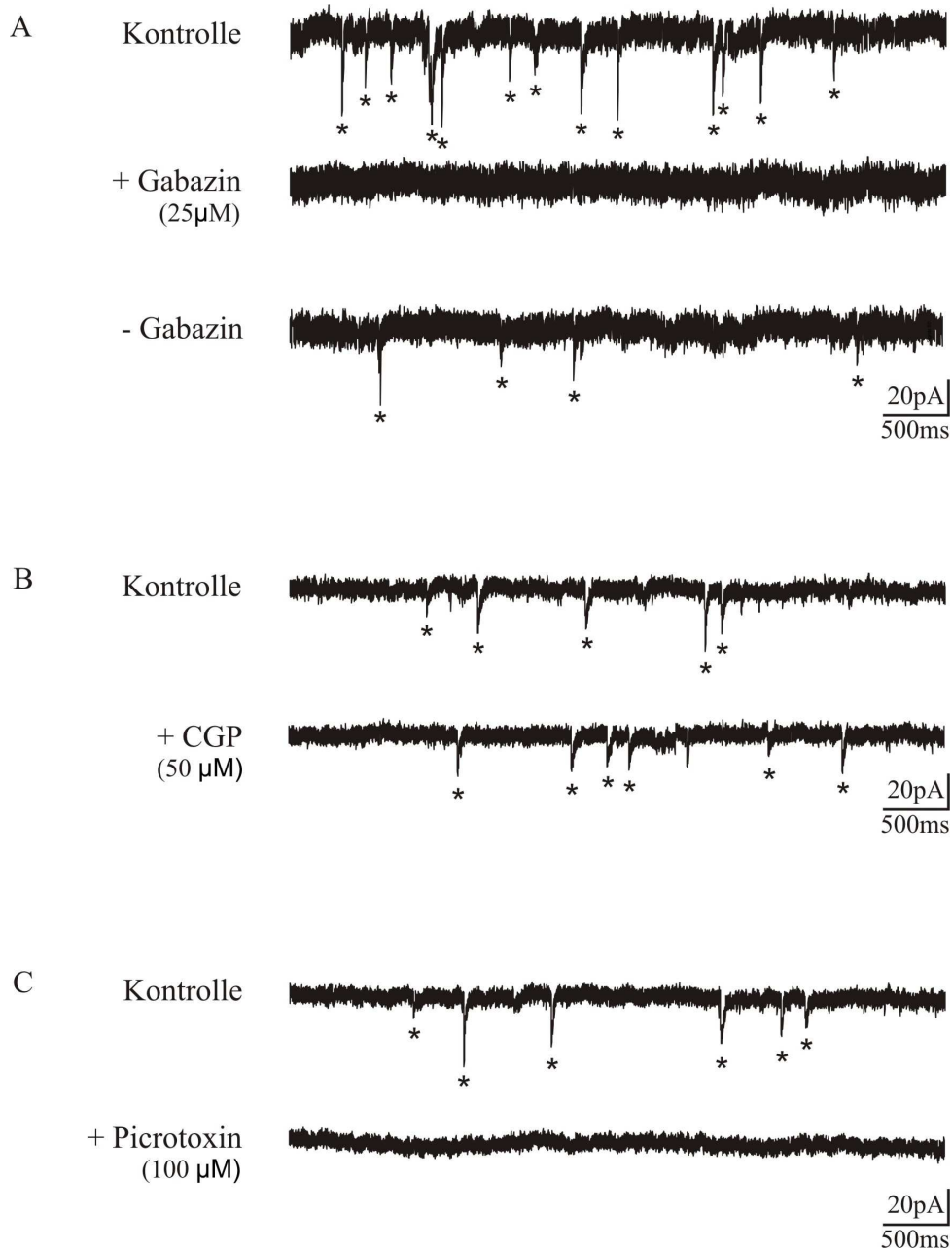


Abb. 3-6: Spontane $GABA_A$ -Rezeptor vermittelte IPSCs unter pharmakologischer Beeinflussung
 (A) Beispielstromspur von spontanen $GABA_A$ -Rezeptor vermittelten mIPSCs vor und 10 min nach Zugabe von Gabazin und nach Auswaschen von Gabazin nach 40 min. (B) Beispielstromspur von spontanen $GABA_A$ -Rezeptor vermittelten mIPSCs vor und nach Zugabe von CGP. (C) Beispielstromspur von spontanen $GABA_A$ -Rezeptor vermittelten mIPSCs vor und nach Zugabe von Picrotoxin.

Abb.3-6A zeigt eine in einem GAD65^{+/-} Neuron registrierte Stromspur. Nach Zugabe des kompetitiven GABA_A-Inhibitors Gabazin (25 μ M) lassen sich nach etwa 10 min keine postsynaptischen Ströme mehr erkennen. Bei Nachführen Gabazin-freier Lösung treten nach 30 min wieder spontane postsynaptische Ströme auf. In Abb. 3-6 B ist eine Stromspur vor Zugabe des GABA_B-Antagonisten CGP (50 μ M) abgebildet. Nach Zugabe des Pharmakons lässt sich keine Änderung der postsynaptischen Ereignisse feststellen. Die Frequenz der Ereignisse steigt sogar leicht von 0,86 Hz auf 1,12 Hz. Im dritten Experiment wird der nicht-kompetitive GABA_A-Antagonist Picrotoxin (100 μ M) eingewaschen. Nach 15 min sind die postsynaptischen Ströme vollständig blockiert. Auch nach weiteren 5 min treten keine spontanen Ereignisse mehr auf.

3.4 Evozierte IPSCs

Zum Vergleich evozierter synaptischer Antworten in den drei Genotypen unter synaptischer Beanspruchung, wurden in einem ersten Stimulationsprotokoll 4 depolarisierende Strompulse im Bereich von 0,5 bis 3,5 V mit einer Frequenz von 5 Hz injiziert.

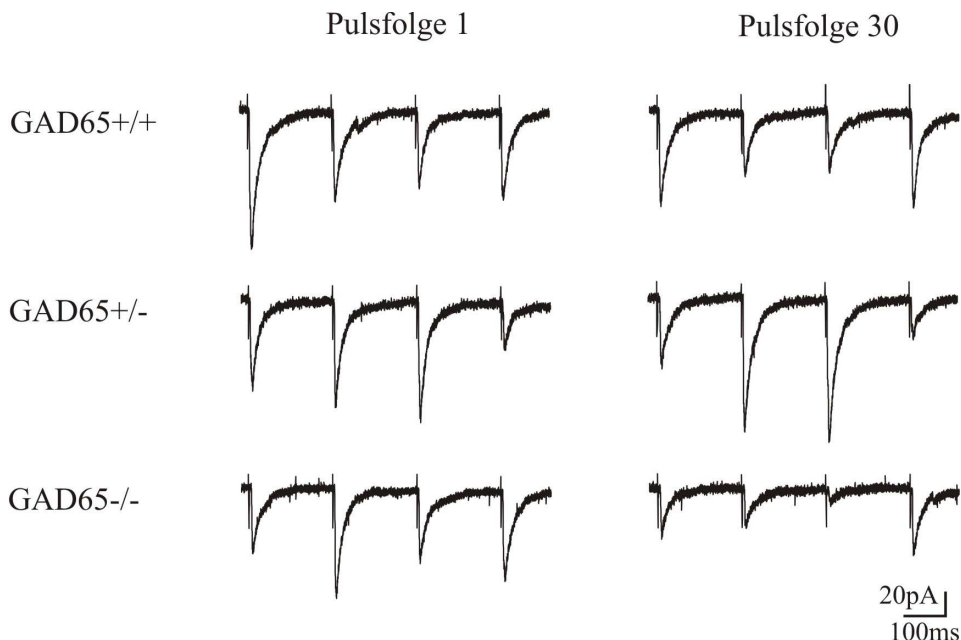
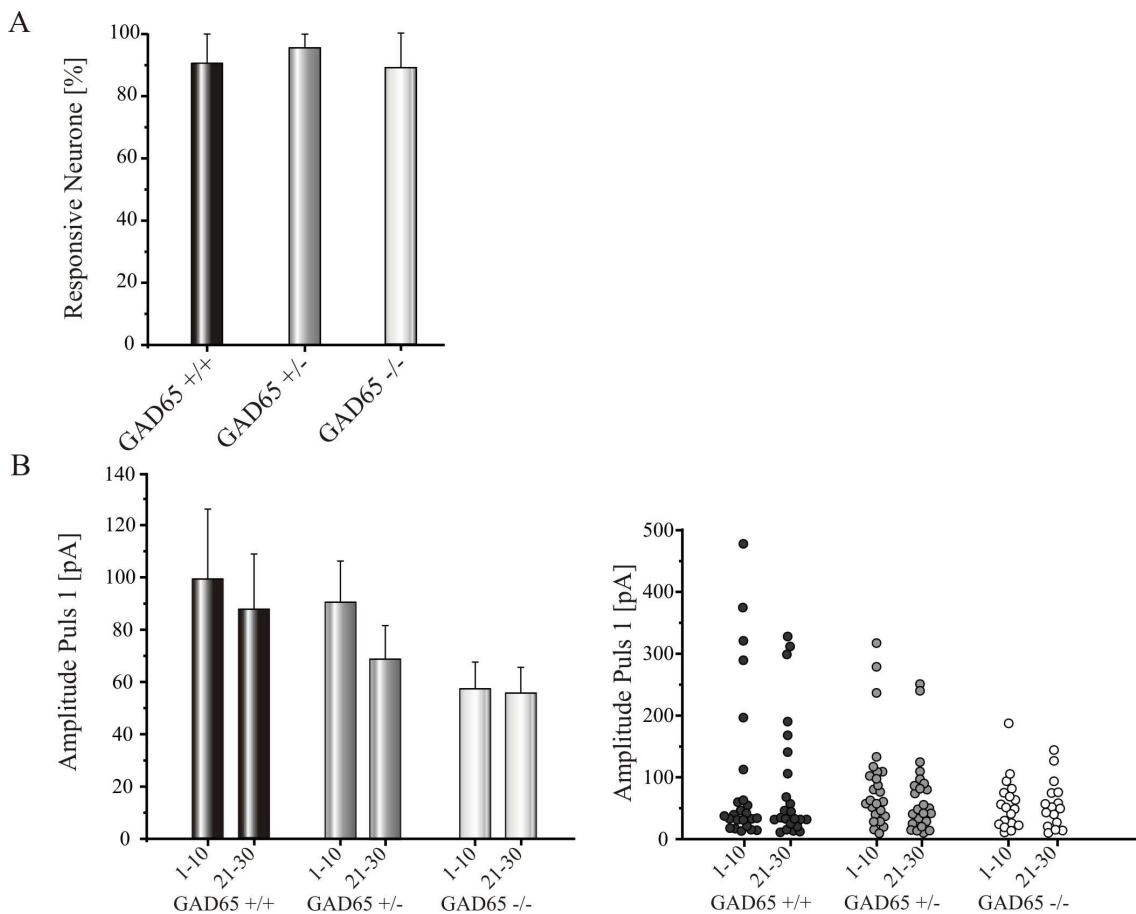


Abb. 3-7: Durch extrazelluläre Stimulation ausgelöste GABAerge postsynaptische Ströme
 Beispielspuren zur Darstellung der ersten und letzten von insgesamt 30 Pulsfolgen. Injiziert wurden jeweils 4 Pulse mit 50 Hz im Abstand von 10 sek in GAD65^{+/+}, ^{+/-} und ^{-/-} Neuronen.

Im Abstand von jeweils 10 Sekunden wurde diese Pulsfolge 30 mal wiederholt. Abbildung 3-7 zeigt Beispielspuren der ersten und der letzten Pulsfolge in den drei Genotypen.

Von den in GAD65^{+/+} abgeleiteten Neuronen zeigten 90,6 % (\pm 9,4) eine, durch die extrazelluläre Stimulation erzeugte, postsynaptische Antwort. Bei GAD65^{+/-} lag der Wert bei 95,6 % (\pm 4,4) und bei GAD65^{-/-} bei 88,9 % (\pm 11,1). Die Amplitude der postsynaptischen Antwort auf den ersten Puls wurde jeweils für die ersten zehn und die letzten zehn Pulsfolgen gemittelt. Dabei ergab sich für GAD65^{+/+} für die Pulsfolgen 1-10 ein Mittelwert von 99,08 pA (\pm 26,77; n = 24) und für die Pulsfolgen 21-30 ein Mittelwert von 87,36 pA (\pm 21,13; n = 23). GAD65^{+/-} erreichte in den ersten zehn Pulsfolgen auf dem ersten Puls ein Mittel von 90,48 pA (\pm 15,78; n = 25) und in den letzten zehn ein Mittel von 68,98 pA (\pm 12,88; n = 24). Für GAD65^{-/-} wurde ein Wert von 57,41 pA (\pm 10,18; n = 18) für die ersten und von 55,81 pA (\pm 9,79; n = 16) für die letzten Pulsfolgen ermittelt.



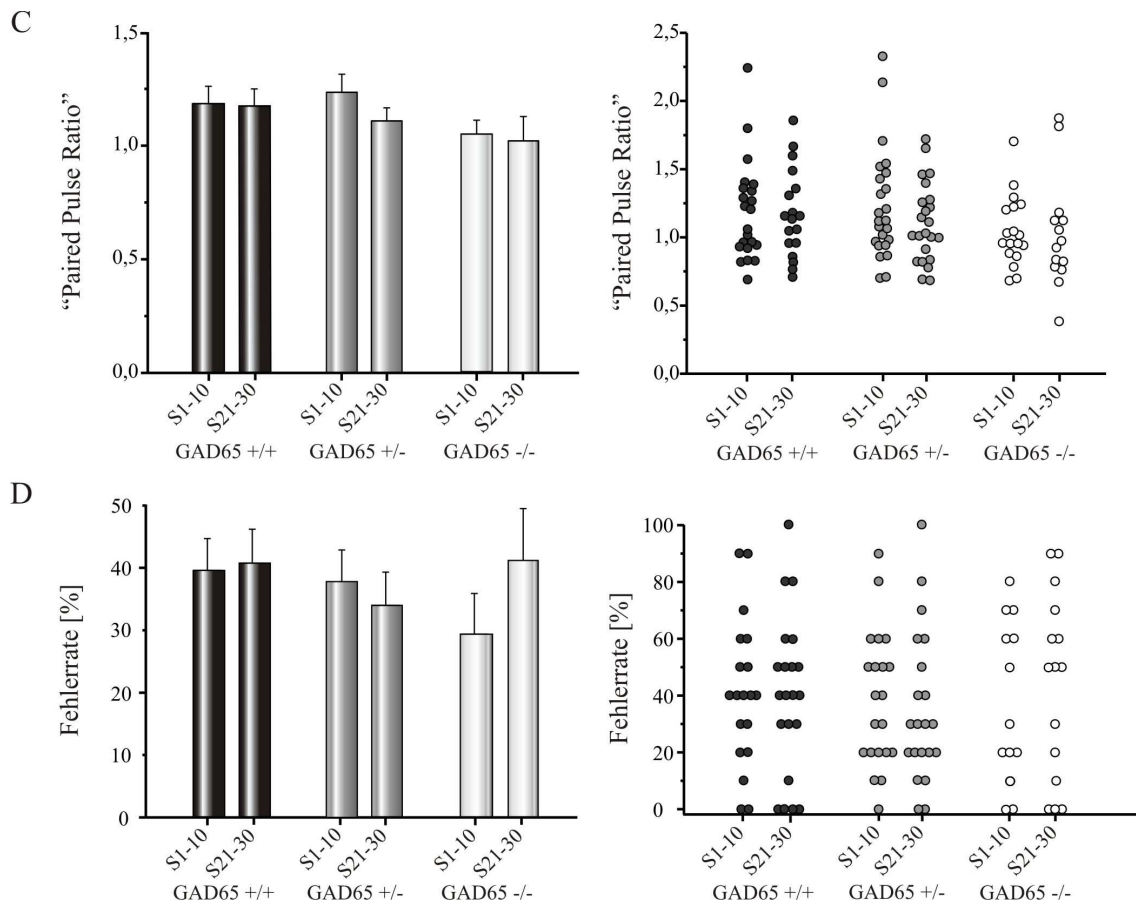


Abb. 3-8: Evozierte postsynaptische GABAerge Antworten in den drei Genotypen

(A) Anteil responsiver Neurone in GAD65+/+, +/- und -/- bei Applikation einer Folge von 30 * 4 Pulsen mit 5 Hz und einem ISI von 10 sek. (B) Mittlere Amplitude des Ereignisses nach Puls 1 in den ersten zehn (1-10) und letzten zehn (21-30) von 30 Durchgängen des Stimulationsprotokolls in GAD65+/+, +/- und -/- Neuronen (n(+/+) = 24, n(+/-) = 22, n(-/-) = 18). (C) Mittleres Verhältnis von Puls 2 zu Puls 1 (P2/P1) in den ersten zehn (1-10) und letzten zehn (21-30) Durchgängen in den drei Genotypen (n(+/+) = 22, n(+/-) = 22, n(-/-) = 18). (D) Mittlere Fehlerrate des ersten Pulses der Durchgänge 1-10 und 21-30 in den drei Genotypen (n(+/+) = 21, n(+/-) = 21, n(-/-) = 15).

Auch das „Paired Pulse Ratio“ (PPR) als Verhältnis der Antwort auf den zweiten zur Antwort auf den ersten Puls wurde für die ersten und die letzten zehn Pulsfolgen getrennt ermittelt. Pulse, die keine postsynaptische Antwort evozierten, wurden nicht in die Wertung einbezogen. Das PPR betrug für GAD65+/+ auf den ersten zehn Pulsfolgen $1,18 \pm 0,077$ (n = 22), auf den letzten zehn Pulsfolgen $1,17 \pm 0,076$ (n = 18). GAD65+/- erreichte ein mittleres PPR von $1,23 \pm 0,08$ (n = 24) bei Pulsfolge 1-10 und von $1,11 \pm 0,058$ (n = 23) bei Pulsfolge 21-30. Das PPR für GAD65+/+ betrug $1,05 \pm 0,061$ (n = 18) für die ersten und $1,02 \pm 0,108$ (n = 14) für die letzten zehn Pulsfolgen. Zur Überprüfung ob vergleichbare Minimalstimulationsbedingungen in den drei Genotypen

vorlagen, wurde die Fehlerrate des ersten Pulses für die ersten zehn und die letzten zehn Pulsfolgen gemittelt. Für GAD65^{+/+} wurden Fehlerraten von $39,6 \pm 5,1$ % für Pulsfolge 1 – 10 und von $40,8 \pm 5,4$ % ($n = 19$) für Pulsfolge 21-30 ermittelt. In GAD65^{+/-} zeigte sich eine Fehlerrate von $37,8 \pm 5,1$ % bei Pulsfolge 1 – 10 und von $34 \pm 5,4$ % ($n = 21$) bei Pulsfolge 21 – 30. GAD65^{-/-} Neurone zeigten eine Fehlerrate von $29,4 \pm 6,5$ % in Pulsfolge 1 – 10 und von $41,2 \pm 8,3$ % ($n = 13$) in Pulsfolge 21 - 30.

Die Stimulationsstärke wurde so eingestellt, dass es zu einer minimalen Transmitterfreisetzung aus der präsynaptischen Zelle kam. Ausgehend von einer unterschwellig niedrigen extrazellulären Stimulation wurde die Spannung der Stimulation erhöht, bis es bei etwa 30 % der Pulse zu einem IPSC in dem abgeleiteten Neuron kam. Dafür waren in den verschiedenen Genotypen unterschiedliche Spannungen notwendig. GAD65^{+/+} Neurone wurden mit durchschnittlich $1,23 \pm 0,08$ V ($n = 22$) stimuliert, GAD65^{+/-} mit $1,64 \pm 0,12$ V ($n = 23$) und GAD65^{-/-} mit $2,31 \pm 0,2$ V ($n = 17$). Alle drei Genotypen unterschieden sich bei einem Signifikanzniveau von $p = 0,05$ voneinander. Um eine Vergleichbarkeit der erfassten Amplituden zu gewährleisten wurden diese auf die zum Release benötigte Stimulationsstärke bezogen (Amplitude [pA] / Stimulationsstärke [V]). Dabei wurde die theoretische Amplitude ermittelt, die rein rechnerisch durch ein Volt Spannung erzeugt wurde. Dieser Wert wurde jeweils für den ersten Puls der ersten zehn Durchläufe gemittelt. Es ergab sich für GAD65^{+/+} eine Amplitude von $98,5 \pm 28,24$ pA/V ($n = 24$) und für GAD65^{+/-} ein Wert von $74,14 \pm 19,68$ pA/V ($n = 24$). Die Berechnung für GAD65^{-/-} ergab eine Amplitude von $27,68 \pm 5,37$ pA/V ($n = 18$). GAD65^{-/-} unterschied sich damit signifikant von GAD65^{+/+}.

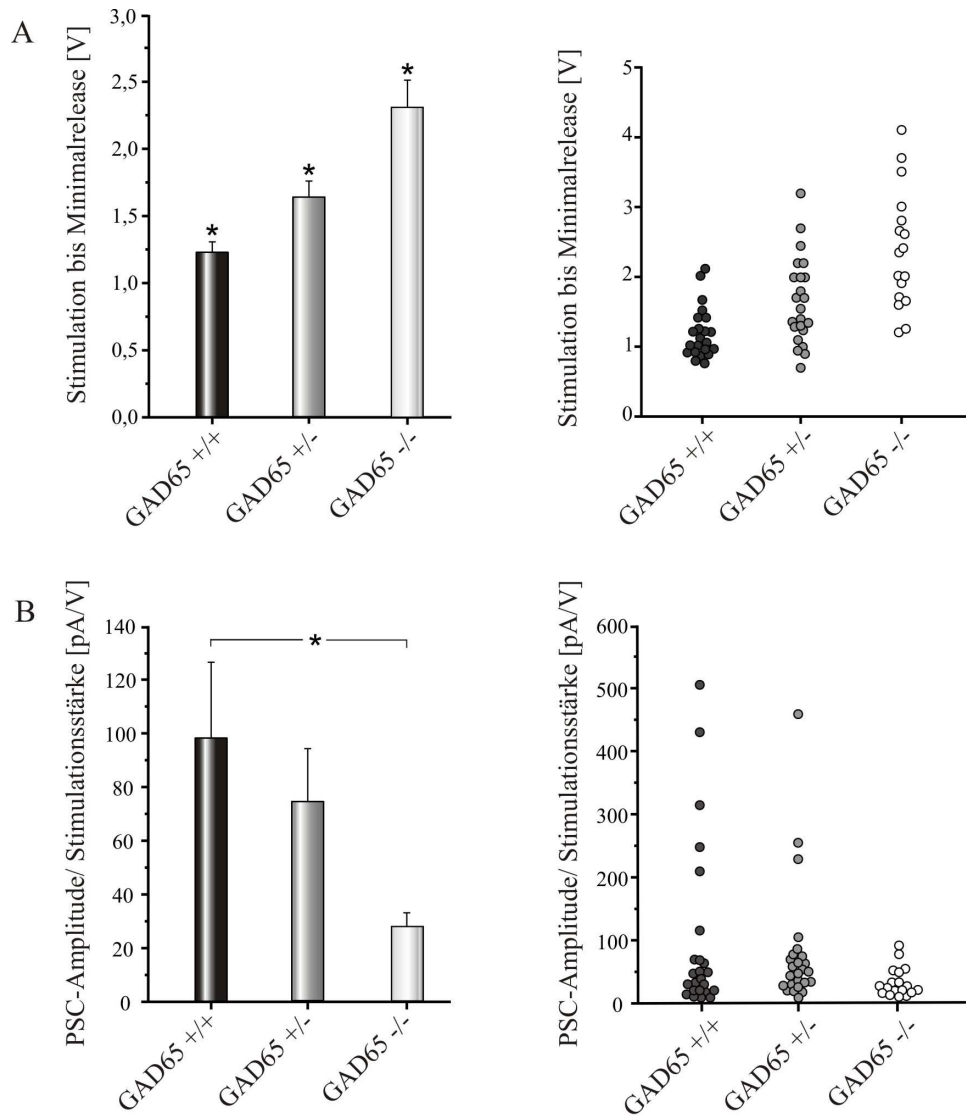


Abb. 3-9: Stimmulationsstärke und darauf normierte postsynaptische Stromamplitude

(A) Mittlere Stärke der extrazellulären Stimulation bis zum Erreichen eines Minimalreleases in GAD65^{+/+}, ^{+/-} und ^{-/-} (n^(+/+) = 22, n^(+/-) = 23, n^(-/-) = 17). (B) Auf 1V normierte mittlere Amplitude des ersten Pulses der Durchgänge 1 - 10 in den drei Genotypen (n^(+/+) = 24, n^(+/-) = 25, n^(-/-) = 18).

Abschließend wurden die Neuronen mit Hilfe extrazellulärer Strompulse in einer Folge von 2 mal 25 Pulsen mit einer Frequenz von 20 Hz stimuliert. Das Intervall zwischen den beiden Durchläufen wurde systematisch im Bereich von 10 sek, 5 sek, 2 sek, 1 sek und schließlich 0,5 sek variiert. Die Amplitude der Antwort auf den ersten Puls des zweiten Durchlaufs wurde normiert auf den ersten Puls des ersten Durchlaufs, und die Werte wurden in den drei Genotypen vergleichend betrachtet. Für die Intervalle von 10 sek und 0,5 sek ergaben sich folgende Werte. GAD65^{+/+} zeigte beim 10sek Intervall einen Wert von $2,35 \pm 0,71$ und für das 0,5 sek Intervall einen Wert von $0,96 \pm 0,31$ (n = 9). Für GAD65^{+/-} ergab sich bei 10 sek $3,12 \pm 0,73$ und bei 0,5 sek $0,61 \pm 0,09$ (n =

15). GAD65^{-/-} erreichte bei einem Intervall von 10 sek einen Wert von $2 \pm 0,76$ und bei einem Intervall von 0,5 sek einen Wert von $0,82 \pm 0,25$ (n = 11).

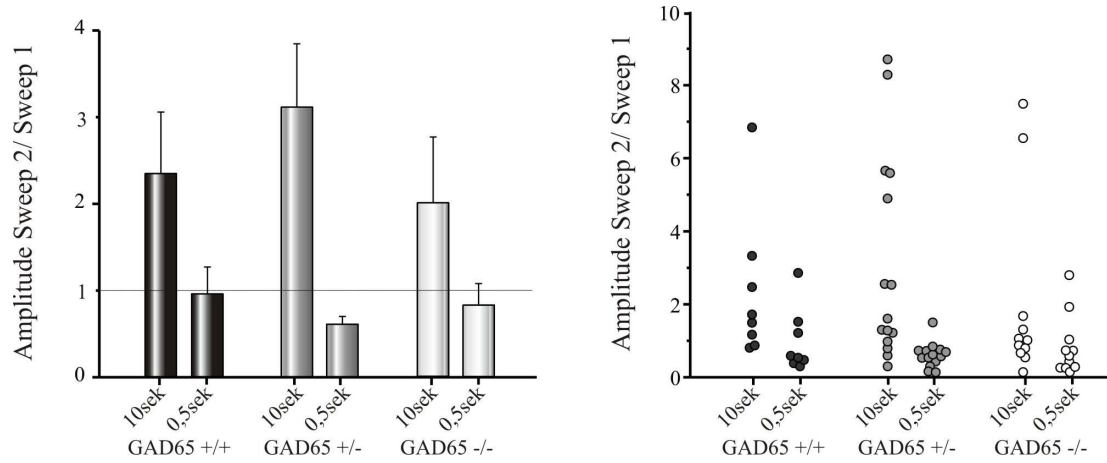


Abb. 3-10: Amplitude des ersten Pulses von Durchlauf 2 normiert auf Durchlauf 1
 Amplitude von Puls 1 des 2. Durchlaufs normiert auf Puls 1 des 1. Durchlaufs (P1D2/P1D1) bei einem Intervall zwischen beiden Durchläufen von 10 und von 0,5 sek (n(+/+) = 8, n(+/-) = 15, n(-/-) = 11).

4 Diskussion

Die Deletion eines bestimmten Gens ist eine häufig verwendete Methode um Erkenntnisse über die Funktion des Genprodukts zu erlangen. Bei nicht letal verlaufenden Gendeletionen lassen sich durch verschiedene Tests gegebenenfalls Veränderungen im Verhalten des Organismus und mit Hilfe der Elektrophysiologie zelluläre Korrelate feststellen. Durch die ermittelten Defizite kann wiederum auf die Funktion des Proteins im gesunden Organismus rückgeschlossen werden. Die Deletion des Gens für GAD67, das den größten Teil der GABA-Menge herstellt wirkt sich peri- oder direkt postnatal letal aus (Asada et al., 1997). Die Tiere mit einer Deletion des Gens für GAD65 sind überlebensfähig. Auch diese weisen jedoch während der ersten Lebensmonate eine erhöhte Letalität auf (Kash et al., 1997) und zeigen ein verändertes Angstverhalten in Verhaltenstests (Kash et al., 1999).

4.1 Elektrische Erregbarkeit und Morphologie GAD65 defizienter Neurone

In dieser Studie wurden im ersten Schritt aktive und passive Membraneigenschaften von Projektionsneuronen der lateralen Amygdala in den Genotypen vergleichend untersucht. Dadurch lassen sich Aussagen über grundlegende endogene Charakteristika machen und hierauf aufbauend die synaptischen Eigenschaften differenziert erfassen. Die Größe der Depolarisation des Membranpotentials als Reaktion auf eine Strominjektion wird als Eingangswiderstand bezeichnet. Der Widerstand wird bestimmt von der Größe einer Zelle und von der Art und Menge ihrer transmembranären Kanäle. Der Eingangswiderstand wurde ausgehend von einem Haltepotential von -65 mV ermittelt und war in GAD65^{-/-} gegenüber GAD65^{+/+} signifikant vermindert. Die Kapazität der Zellmembran gibt ebenfalls Auskunft über die relative Größe einer Zelle. Sie unterschied sich in den verschiedenen Genotypen nicht voneinander. Entsprechend scheint die Größe der Zellen nicht signifikant unterschiedlich zu sein, was auch in der Literatur bisher nicht anderweitig beschrieben wurde. Die signifikante Abweichung der GAD65^{-/-} von den GAD65^{+/+} beim Eingangswiderstand ließe sich folglich durch Unterschiede in der Art oder Dichte der Membrankanäle erklären. Jedoch fehlen hierzu detaillierte Hinweise, sowohl in der vorliegenden als auch in anderen Studien. Die hier gefundenen

Charakteristika der Zellmembran weichen leicht von in der Literatur beschriebenen Werten ab (Faber et al., 2001). Diese Abweichungen lassen sich durch Unterschiede in den benutzten extrazellulären und intrazellulären Lösungen erklären, die zum Beispiel verschiedene Kanäle der Zellmembran blockieren und damit den Eingangswiderstand verändern.

Durch Auslösung von Aktionspotentialen konnten die aktiven Membraneigenschaften ermittelt werden. In den drei Genotypen unterschieden sich die Schwelle zur Auslösung von Aktionspotentialen, deren Amplitude, Anzahl und Frequenz nicht voneinander. Auch die früher in der Literatur beschriebenen unterschiedlichen Adaptationsmuster der ausgelösten Aktionspotentiale (Chapman et al., 1990; Faber et al., 2001; Faber and Sah, 2002) konnten in der vollen Bandbreite beobachtet werden. Unterschiede zwischen den Genotypen zeigten sich nicht. Die für die Generierung von Aktionspotentialen wichtigen zellulären Charakteristika, wie zum Beispiel die Verteilung schneller spannungsabhängiger Na⁺- und spannungsabhängiger K⁺- Kanäle in den Projektionsneuronen sind also auch bei Fehlen von GAD65 unverändert. Unterschiede im synaptischen Antwortverhalten sind demzufolge auf veränderte synaptische und weniger auf intrinsische Eigenschaften zurückzuführen.

Insgesamt zeigt sich, dass die Deletion des Gens für die GAD65 einen geringen Einfluss auf die passiven und keinen Einfluss auf die aktiven Membraneigenschaften der Zellen hat. Die Zellen in GAD65^{-/-} zeigen in allen untersuchten Bereichen physiologische und mit GAD65^{+/+} vergleichbare Charakteristika. Diese Vergleichbarkeit bildet die Voraussetzung für weitere Analysen der Zelleigenschaften.

4.2 Veränderung der Kinetik spontaner mIPSCs in GAD65^{-/-} Neuronen

Um die Kinetik der spontanen mIPSCs zu untersuchen, wurde die Anstiegszeit und die Abklingzeitkonstante der synaptischen Ströme ermittelt. Die Abklingzeitkonstante kann unter anderem Auskunft über die Zusammensetzung der GABA_A-Rezeptoren aus Untereinheiten geben. So wurde gezeigt, dass in Mäusen mit einer Deletion der α 1-Untereinheit die Abklingzeit verlängert ist, während β 1-Untereinheiten eine kurze Abklingzeit zu fördern scheinen (van Ooyen et al., 2004; Huntsman and Huguenard, 2006). Außerdem haben verschiedene GABA-Agonisten und Antagonisten Einfluss auf

die Abklingzeit der spontanen mIPSCs. In dieser Studie wurde die Abklingzeitkonstante τ ermittelt. Sie gibt an wie lange eine monoexponentiell absinkende Kurve, in diesem Fall der postsynaptische Strom, braucht um 36,8 % ($1/e$) ihres Ausgangswertes zu erreichen. Dabei war die Abklingzeitkonstante der mIPSCs von GAD65^{-/-} Mäusen signifikant niedriger als die der beiden anderen Genotypen. Durch eine kürzere Abklingzeit der inhibitorischen Pulse kann es in den Projektionsneuronen schneller wieder zur Auslösung von Aktionspotentialen kommen. Es könnte also eventuell als Reaktion auf das Fehlen von GAD65 die Zusammensetzung der Untereinheiten der GABA_A-Rezeptoren verändert sein.

Die Anstiegszeit wurde von 10 - 90 % der Baseline bis zum Erreichen der maximalen Amplitude gemessen. Sie gibt Auskunft über die Öffnung der postsynaptischen Rezeptoren und ist abhängig von der Konzentration des Neurotransmitters im synaptischen Spalt und von Rezeptoröffnungswahrscheinlichkeiten (Bier et al., 1996). Außerdem ändert sie sich mit der Diffusionsgeschwindigkeit und -strecke, also auch mit der Breite des synaptischen Spalts. Überraschenderweise ist die Anstiegszeit in GAD65^{+/-} signifikant länger als in den beiden anderen Genotypen. Ein solches Phänomen ist bisher in der Literatur noch nicht beschrieben worden, und könnte einer hohen zufälligen Variationsbreite der stochastischen Rezeptoreigenschaften zugrunde liegen, die nicht auf genotypspezifische Unterschiede schließen lassen.

4.3 Erhöhung der Frequenz spontaner mIPSCs in GAD65^{-/-} Neuronen

Um die Rolle von GAD65 in der synaptischen Übertragung zu untersuchen, wurden zunächst unter DNQX und TTX selektiv GABA_A-vermittelte spontane postsynaptische Miniaturströme registriert. Die Frequenz der spontanen postsynaptischen mIPSCs war in GAD65-defizienten Neurone etwa um den Faktor 2 statistisch signifikant höher als in den beiden Vergleichsgruppen. Die Frequenz wird vor allem durch die Anzahl der Synapsen, und von der Freisetzungswahrscheinlichkeit der Vesikel in der präsynaptischen Terminale bestimmt. Die ermittelten Unterschiede der mittleren Frequenzen lassen darauf schließen, dass durch Deletion des Gens für GAD65 einer dieser beiden Faktoren in GAD65^{-/-} Mäusen verändert sein könnte. Es wurde beschrieben, dass eine Blockierung des Abbaus von GABA die Frequenz spontaner

postsynaptischer Potentiale erhöht, während eine Blockierung der GABA-Synthese die Frequenz erniedrigt (Engel et al., 2001). Der Frequenzerhöhung könnte also mit der Menge des vorhandenen GABA zusammenhängen. Außerdem waren durch den Synthese-Antagonist MPA (Medroxyprogesteronacetat, ein Gestagen) Frequenz und Amplitude von mIPSCs vermindert. Die Vermutung wurde aufgestellt, dass MPA vor allem die an synaptischen Vesikeln lokalisierte Synthese von GABA durch GAD65 blockiert (Engel et al., 2001). Der gefundene Effekt ist jedoch gegensätzlich zu der in dieser Studie beobachteten Frequenzerhöhung von mIPSCs. Diese scheint also nicht mit einer Synthesestörung von GABA zusammenzuhängen.

4.3.1 Wahrscheinlichkeit der Transmitterfreisetzung in GAD65-/-

Die Wahrscheinlichkeit der Transmitterfreisetzung in der Präsynapse hängt unter anderem von der Menge der zur Verfügung stehenden Vesikel ab. Nur die sich im „readily releasable pool“ befindlichen Vesikel können spontan ausgeschüttet werden, wobei die Ausschüttungswahrscheinlichkeit mit der Größe des Pools steigt (Stevens and Williams, 2007). So könnte in GAD65-/- durch eine Art Feedback-Mechanismus die Anzahl der Vesikel erhöht sein um eine inadäquate GABA-Transmission durch eine erhöhte Ausschüttungswahrscheinlichkeit zu kompensieren, wodurch die gefundene Frequenzerhöhung erklärt werden könnte. Hinweise darauf lieferten Jin und Mitarbeiter (1999) an GABA-defizienten Spulwürmern (*Caenorhabditis elegans*), die eine leicht erhöhte Anzahl präsynaptischer GABAerger Vesikel aufwiesen. Im Gegensatz dazu fanden Tian und Mitarbeiter (1999) eine Verminderung der Ausschüttung von Vesikeln. Sie untersuchten hippocampale Neurone und fanden Veränderungen, die mit einem Defekt in der Vesikelzahl, -füllung oder -ausschüttung zu vereinbaren waren. Sie sprechen die Möglichkeit an, dass GAD65 einen Mechanismus zur Füllung von GABAergen Vesikeln unterstützt, der in GAD65-/- Neuronen defekt ist, und so zu einer verminderten Ausschüttungswahrscheinlichkeit führt. Diese Ergebnisse wurden jedoch in Neuronen von Hippocampus und Retina gewonnen und sind demzufolge nur begrenzt vergleichbar mit den hier untersuchten Neuronen der lateralen Amygdala. In anderen Studien wurde gezeigt, dass kein Defizit in der Füllung synaptischer Vesikel besteht, da in GAD65-defizienten Neuronen der vesikuläre GABA-Transporter VGAT kompensatorisch hochreguliert wird, wodurch die Füllung der Vesikel mit GABA

gewährleistet wird (Wu et al., 2007). Geht man davon aus, dass die Menge des zur Ausschüttung bereitstehenden GABA in GAD65^{-/-} tatsächlich vermindert ist, könnte die erhöhte Frequenz spontaner mIPSCs auch durch eine verminderte rückgekoppelte Hemmung auf die Freisetzung an der identischen Synapse (Autoinhibition) erklärt werden. Zum Beispiel werden GABA_B-Rezeptoren in der Präsynapse exprimiert und bewirken über einen K⁺-Kanal eine erschwerte Erregbarkeit der Synapse und damit eine verminderte Freisetzungswahrscheinlichkeit von Vesikeln. Stimulation der GABA_B-Rezeptoren bewirkt eine Abnahme der Frequenz spontaner mIPSCs und auch Aktionspotential-generierter IPSCs (Rohrbacher et al., 1997). Eine gegensätzliche Erklärung könnten aktuelle Studien liefern, die auf das Vorhandensein von präsynaptischen GABA_A-Rezeptoren hinweisen. Diese erhöhen bei geringer GABA-Ausschüttung in den synaptischen Spalt die Frequenz spontaner mIPSCs, ein Effekt der durch GABA-Agonisten und GABA-Wiederaufnahmehemmer verstärkt wird (Vautrin et al., 1994; Trigo et al., 2007). Es wäre zu überprüfen, ob die Anzahl dieser Rezeptoren bei GAD65-Defizienz kompensatorisch erhöht ist. Allerdings war der beschriebene Effekt nur bis zum postnatalen Tag 14 zu beobachten, ein Alter, das die Tiere in dieser Studie bereits überschritten hatten. Durch eine veränderte Neogenese, wie später diskutiert, könnte sich der Effekt eventuell auch später noch bemerkbar machen. Beide Ansätze zur präsynaptischen Hemmung könnten die in dieser Studie gefundene Frequenzerhöhung erklären. Ihnen widerspricht allerdings unter anderem die Tatsache, dass eine Erniedrigung der basalen, zur Ausschüttung zur Verfügung stehenden GABA-Versorgung bei GAD65^{-/-} in adulten Tieren bisher nicht nachgewiesen wurde (Hensch et al., 1998). Eine Veränderung der präsynaptischen Rezeptoren ist deshalb unwahrscheinlich. Die Anzahl und Eigenschaften der präsynaptischen GABAergen Vesikel müssten noch einmal unter den hier angewandten Versuchsbedingungen in der lateralen Amygdala untersucht werden um einen Effekt auf die in dieser Arbeit gefundene Frequenzerhöhung zu bestätigen oder auszuschließen.

4.3.2 Veränderung der Interneurone in GAD65^{-/-}

Eine erhöhte Frequenz spontaner postsynaptischer Ströme könnte durch verschiedene Veränderungen GABAerger Interneurone zustande kommen. Die Interneurone der lateralen Amygdala wirken nicht nur hemmend auf exzitatorische Projektionsneurone,

sondern bilden auch untereinander ein Netzwerk starker inhibitorischer Kontrolle (McDonald, 1982). Wenn diese Kontrolle wegfällt, erhöht sich die Freisetzungswahrscheinlichkeit der Vesikel des nachgeschalteten Neurons. Eine erhöhte spontane Ausschüttungsfrequenz könnte also durch eine erhöhte Anzahl inhibitorischer Synapsen erklärbar sein, die auf ein Projektionsneuron wirken. Zum anderen würde eine verminderte Innervation der Interneurone untereinander die vorhandenen Synapsen enthemmen und so die Frequenz erhöhen. Das würde voraussetzen, dass sich das Fehlen von GAD65 auf Synapsen zwischen Interneuronen anders auswirkt als auf inhibitorische Synapsen auf Projektionsneurone. Für andere neurogenetische Faktoren wurde bereits eine unterschiedliche Wirkung auf die Entwicklung dieser beiden Typen von Synapsen beschrieben (Wardle and Poo, 2003). Auch eine erhöhte Dichte der Synapsen der Projektionsneurone auf die Interneurone könnte diese enthemmen und zu einer vermehrten Vesikelausschüttung führen. Die Anzahl der inhibitorischen Synapsen, die im abgeleiteten Neuron spontane mIPSCs auslösen können, könnte durch die fehlende GAD65 und die veränderte GABA-Verteilung und Beschaffenheit während der Embryogenese und weiteren Entwicklung verändert sein. So regulieren neuronale Aktivität und die Synthese von Neurotransmittern die Neurogenese und die Bildung von funktionellen Netzwerken der Neurone untereinander (Akerman and Cline, 2007; Marty et al., 2000). Die Inhibition durch GABAerge Interneurone verhindert dabei eine überwallende Erregung in der lateralen Amygdala (Royer and Paré, 2003) und hilft, relevante Signale von nicht relevanten zu trennen (Bauer and LeDoux, 2004). Möglicherweise ist dieser, die Synaptogenese regulierende, Mechanismus durch das Fehlen von GAD65 gestört. Dadurch könnte die spontane Ausschüttung von GABA an inhibitorischen Synapsen vermehrt sein.

Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass GABA unabdingbar in der Entwicklung von Nervenzellen ist (Akerman and Cline, 2007). Dabei ist vor allem die exzitatorische Wirkung von GABA aufgrund der hohen intrazellulären Chlorid-Konzentration unreifer Neurone essentiell. So bilden sich funktionierende GABAerge Interneurone während der fetalen Entwicklung zeitlich vor Bildung der Projektionsneurone und bilden so einen Wachstumsreiz unter Umgehung der neurotoxischen Wirkung großer Mengen Glutamats und ohne das sensible Gleichgewicht zwischen Inhibition und Exzitation zu stören (Gozlan and Ben-Ari, 2003). Die Störung der GABAergen Exzitation führt in

vivo zu Defekten in der Bildung von Synapsen und Dendriten (Ge et al., 2006). Offensichtlich bilden sich aktivitätsabhängig neuronale Netzwerke aus, die dem Vorhandensein ausreichender Mengen von GABA bedürfen. Im Gegensatz dazu fanden Jin und Mitarbeiter (1999) keinen Hinweis darauf, dass ein Mangel an GABA die Morphologie, Menge oder Konnektivität der Axone verändert. Allerdings wurde diese Untersuchung nicht an Säugetieren durchgeführt und ist eventuell nicht ohne weiteres auf die Ergebnisse dieser Studie übertragbar.

Eine andere Möglichkeit ist, dass die Glutamatdecarboxylase selbst einen Einfluss auf die Neurogenese hat. Die Menge von GAD korreliert mit der Neurogenese und erreicht ihren Höhepunkt kurz vor der Geburt (Barker et al., 1998). Dabei erhöht eine Aktivität der Neurone wiederum über die Proteinkinase A (PKA) die Menge der GAD65-immunoreaktiven Neurone durch einen posttranslationalen Mechanismus (Gakhar-Koppole, 2008). Das weist auf einen wichtigen Beitrag von GAD65 in der Entwicklung der neuronalen Netzwerke hin. An Untersuchungen der lateralen superioren Olive des Hamsters wurde in neonatalen und in adulten Tieren die Konzentration der verschiedenen Isoformen der Glutamatdecarboxylase untersucht. Kurz nach der Geburt fanden sich hohe Konzentrationen GAD65 im Gegensatz zu niedrigen Konzentrationen GAD67, ein Gegensatz zu dem Verhältnis der Enzyme zueinander in adulten Tieren (Jenkins and Simmons, 2006). Auch diese Studie weist auf einen wichtigen Beitrag von GAD65 während der Entwicklung hin. In GAD67-defizienten Interneuronen wurden Defizite in der Verzweigung der Axone, Bildung von perisomatischen Synapsen an Projektionsneuronen und eine Einschränkung der Komplexität des neuronalen Netzwerks festgestellt. Diese Effekte stellten sich jedoch bei Deletion des Gens für GAD65 weder im adulten Gehirn noch bei Mutationen in der Keimbahn ein (Chattopadhyaya et al., 2007). Eine weitere Studie untersuchte fetale und neonatale Mäusen, die keine der beiden Isoformen der Glutamatdecarboxylase exprimierten und fand keine histologisch und immunohistochemisch erkennbaren Veränderungen der Histogenese (Ji et al., 1999). Es stellt sich also die Frage, ob und wenn ja wie sich eine Deletion des Gens für GAD65 auf die Neurogenese auswirkt, und ob eine eventuelle Auswirkung die hier beschriebenen Phänomene erklären kann.

In kultivierten hippocampalen Schnitten wurde gezeigt, dass die Bildung von inhibitorischen Synapsen aktivitätsabhängig ist. Bei Blockade von non-NMDA

Glutamat-Rezeptoren, die sonst eine Exzitation vermitteln, wurde eine Abnahme der Dichte GABAerger Synapsen im Hippocampus erzeugt. Im Gegensatz dazu führte eine Blockade von GABA_A-Rezeptoren zu einer erhöhten Synapsendichte sowie einer vermehrten Nachweisbarkeit von GAD65 (Marty et al., 2000). Auch die Regulation von Somagröße, Anzahl synaptischer Vesikel und Herstellung von GABA in Interneuronen könnte aktivitätsabhängig sein. Die regulierenden Faktoren sind dabei Neurotrophine wie der „Brain - Derived Neurotrophic Factor“ (BDNF), der bei Exzitation von Projektionsneuronen ausgeschüttet wird (Marty et al., 1997; Vicario-Abeyòn et al., 1998). Verschiedene Studien zeigen die kritische Rolle, die BDNF in der Reifung des GABAergen Systems spielt. So zeigen heterozygote BDNF - defiziente Mäuse eine deutliche Einschränkung der GABAergen Funktionen, zum Beispiel eine verminderte Frequenz von spontanen mIPSCs (Abidin et al., 2008) und eine verminderte Innervationsdichte GABAerger Terminalen (Kohara et al., 2007). Auf der anderen Seite könnte also ein erhöhter BDNF-Spiegel über Veränderungen in der synaptischen Innervation der Projektionsneurone eine höhere Frequenz spontaner mIPSCs auslösen. Hinweise darauf lieferten Versuche, bei denen lokale Expression von BDNF die Expression von GABA und GAD, sowie die Freisetzungswahrscheinlichkeit von GABA in der Präsynapse erhöhte (Ohba et al., 2005). Auch Wardle und Poo (2003) fanden unter BDNF eine erhöhte Frequenz spontaner mIPSCs und eine Abnahme der postsynaptischen Amplitude bei der Projektion von Interneuronen auf Projektionsneurone. Bei Synapsen von Interneuronen auf andere Interneurone fanden sie im Gegensatz dazu eine verminderte Frequenz von mIPSCs. Es stellt sich also die Frage, ob eine Deletion von GAD65 einen Einfluss auf die Ausschüttung von BDNF oder anderen Neurotrophinen hat und damit die in dieser Arbeit gefundene erhöhte Frequenz von mIPSCs erklären könnte. GABA selbst hat in der Entwicklungsphase von Neuronen über exzitatorische Impulse Einflüsse auf die Ausschüttung von BDNF. Es wurde argumentiert, dass GABA selbst ein trophischer Faktor ist, der den Umschwung von seiner exzitatorischen zur inhibitorischen Wirkung veranlasst (Ganguly et al., 2001). Sollte dies der Fall sein, könnte ein verminderter GABA-Spiegel in der Entwicklung der GAD65^{-/-} Mäuse einen verspäteten oder veränderten Umschwung zur exzitatorischen Wirkung bewirken. Dieser Theorie widersprechen aber Titz und Mitarbeiter (2003), die trotz Blockade von GABA_A-Rezeptoren eine Entwicklung von der exzitatorischen zur

inhibitorischen Wirkung feststellen konnten. Aber auch wenn man davon ausgeht, dass GABA selbst ein trophischer Faktor in der Embryonalentwicklung ist, der die Entwicklung von Interneuronen beeinflusst, so stellt sich doch die Frage, ob ein Fehlen des Gens für GAD65 bereits diese Entwicklung unterbricht. Trotz all dieser offenen Fragen bleibt festzustellen, dass in der Entwicklung eine Variation der Synapsendichte zur Erlangung eines Gleichgewichts aus Exzitation und Inhibition stattfindet. Auch wenn die Regulierung dieses Mechanismus noch nicht vollständig geklärt ist, gibt es doch viele Hinweise darauf, dass GABA und auch GAD65 eine Rolle dabei spielen. Eine Veränderung in der Neurogenese durch ein Defizit von GAD65, GABA oder daraus resultierende veränderte Aktivitätsmuster könnte die in dieser Studie gefundenen Phänomene in GAD65^{-/-} erklären. Aufgrund der Vielfältigkeit der Einflüsse der von GAD65 abhängigen Faktoren ist ein Einfluss auf die Synaptogenese nicht unwahrscheinlich und wurde auch schon in verschiedenen Studien auf verschiedene Aspekte hin untersucht. Es sind jedoch weitere Untersuchungen der Entwicklung der Interneurone und Projektionsneurone der lateralen Amygdala in GAD65^{-/-} Tieren in verschiedenen Stadien der Entwicklung notwendig, um eine solche Veränderung genauer zu charakterisieren.

4.4 Amplitude spontaner mIPSCs

Im Gegensatz zu der erhöhten Frequenz der spontanen GABA-Ausschüttung war die postsynaptische Amplitude der mIPSCs in der vorliegenden Studie zwar tendenziell, jedoch nicht statistisch signifikant erniedrigt. Dieses Ergebnis entspricht den Erkenntnissen anderer Studien, die in GAD65^{-/-} Tieren keinen Unterschied in der mittleren synaptischen Amplitude von spontanen mIPSCs fanden (Tian et al., 1999). Die Größe der postsynaptischen Amplitude ist vor allem abhängig von der Dichte und Menge der postsynaptisch lokalisierten GABA_A-Rezeptoren (Nusser et al., 1997). Man könnte vermuten, dass die postsynaptische Rezeptordichte in GAD65^{-/-} aufgrund der verminderten Stimulation durch GABA kompensatorisch erhöht ist. Dies scheint aber nicht der Fall zu sein. So fanden zum Beispiel Kash und Mitarbeiter (1999) keine Hinweise auf eine veränderte Rezeptordichte in GAD65^{-/-}. Im Gegensatz dazu erhöhte eine Blockade der postsynaptischen GABA_A-Rezeptoren mit Bicucullin in CA1-Schnitten des Hippocampus die Dichte GAD65-positiver Terminalen (Marty et al.,

2000). Falls die erhöhte Frequenz der mIPSCs eine erhöhte Rezeptoraktivierung anzeigt, könnte auf diese Weise kompensatorisch eine verminderte Interneuronmenge oder Synapsendichte resultieren. Eine andere Erklärung für die Variation der Amplitude postsynaptischer GABAerger Miniaturströme ist eine Variation in der Menge des Neurotransmitters pro ausgeschüttetem Quantum (Frerking et al., 1995). Voraussetzung dafür, dass eine Erhöhung der Menge des ausgeschütteten Transmitters die Amplitude der postsynaptischen mIPSCs verändern kann ist, dass die Rezeptoren bei Auslösung eines Vesikels Neurotransmitter nicht gesättigt sind. Hinweise dafür lieferten Biró und Mitarbeiter (2006) an hippocampalen GABAergen Synapsen sowie Perrais and Ropert 1999 an Synapsen des visuellen Kortex. Die Zugabe des GABA-Transaminase-Hemmers Vigabatrin erhöhte die Frequenz und auch die Amplitude der mIPSCs durch eine größere präsynaptische GABA-Menge und eine größere Transmittermenge pro freigesetztem Vesikel (Engel et al., 2001). Es wurde gezeigt, dass der GABA_A-Rezeptor-Agonist Zolpidem (ein Benzodiazepin) die Amplitude der mIPSCs vergrößerte ohne die Leitfähigkeit der Rezeptoren zu verändern (Perrais and Ropert, 1999). So könnte eine tendenzielle Erniedrigung der Amplitude der mIPSCs durch eine verminderte synaptische GABA-Konzentration in GAD65^{-/-} erklärt werden. Allerdings war in diesen Versuchen der erzielte Effekt temperaturabhängig und war bei Körpertemperatur (37 °C) nicht mehr nachweisbar. Obwohl die gefundene Änderung in der Amplitude nicht statistisch signifikant war, bietet sie doch einen weiteren Ansatzpunkt zum Verständnis der Veränderung der Zelleigenschaften durch das Fehlen von GAD65.

4.5 Auswirkungen der GAD65-Deletion auf evozierte postsynaptische Ströme

Zur Auslösung postsynaptischer Ströme wurde eine bipolare Stimulationselektrode extrazellulär in der lateralen Amygdala platziert. Die Antworten responsiver Neurone wurden analysiert.

4.5.1 Veränderung der Kurzzeitplastizität an GABAergen Synapsen GAD65 defizienter Interneurone

Wird in einer Synapse durch Depolarisation eine Transmitterfreisetzung bewirkt, so kann dadurch die Freisetzung von Transmittermolekülen bei einer weiteren Depolarisation positiv oder negativ beeinflusst werden. Die Effizienz einer Synapse wird also durch Aktivität verändert. Dieses Phänomen der Kurzzeitplastizität kann durch das „Paired Pulse Ratio“ (PPR) beschrieben werden, das ein Maß für eine erhöhte oder verminderte Freisetzungswahrscheinlichkeit von Vesikeln der Präsynapse bei wiederholter Stimulation ist. Das PPR wurde für die ersten zwei Pulse der ersten und der letzten zehn von 30 Durchläufen gemittelt. Die Pulse hatten dabei eine Frequenz von 5 Hz. In allen drei Genotypen fand sich eine Faszilitierung nach einem Aktionspotential. Die Faszilitierung unterschied sich in den drei Gruppen nicht voneinander, sie wird wahrscheinlich durch residuelles Calcium nach der ersten Aktivierung ausgelöst (Altluri and Regehr, 1996; Delaney and Tank, 1994) und wurde für GABAerge Synapsen auch in anderen Studien in anderen Gehirnarealen, wie zum Beispiel dem Bulbus olfactorius, nachgewiesen (Nusser, 2002). Inhibitorische Synapsen tendieren demzufolge zu einer stärkeren Hemmung der nachgeschalteten Projektionsneurone bei wiederholter Aktivierung. Dass das PPR in allen drei hier untersuchten Genotypen gleich ist weist darauf hin, dass die Freisetzungswahrscheinlichkeit für GABA-haltige Vesikel in GAD65^{-/-} gegenüber dem Wildtyp nicht verändert ist. Die Paired Pulse Faszilitierung zeigt auch, dass der „readily releasable Pool“ der synaptischen Vesikel nach dem ersten Aktionspotential noch nicht erschöpft ist oder bereits neue Vesikel aus dem Reservepool rekrutiert wurden. Tendenziell zeigte sich bei den letzten 10 Durchgängen ein niedrigeres PPR als bei den ersten zehn. Das PPR lag jedoch immer über 1 und ließ keine Schlüsse auf genotypspezifische Unterschiede zu. Die Faszilitierung der inhibitorischen Antwort bleibt also

auch nach längerer Aktivierung bestehen, sie ist jedoch nicht mehr so stark wie nach wenigen Depolarisationen. Da es sich sowohl bei der „Paired Pulse“ Depression als auch bei der „Paired Pulse“ Faszilitierung sehr wahrscheinlich um präsynaptische Phänomene handelt, liefert die Homogenität unter den drei Genotypen einen Hinweis darauf, dass die Vorgänge des Vesikelzyklus in der Präsynapse, zumindest unter den hier verwendeten Parametern und experimentellen Bedingungen, auch bei GAD65^{-/-} intakt sind.

Tian und Mitarbeiter fanden 1999 nach Stimulation mit 100 Hz in hippocampalen GAD65^{+/+} Neuronen eine starke posttetanische Potenzierung, die mit einer Veränderung des Paired Pulse Ratio einherging. Sie schlossen dadurch auf eine Erhöhung der Wahrscheinlichkeit der Transmitterfreisetzung nach synaptischer Beanspruchung. Diese posttetanische Potenzierung konnte jedoch in GAD65^{-/-} nicht nachgewiesen werden, was auf einen Defekt in der Transmitterausschüttung im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen schließen ließe. In dieser Arbeit fand sich jedoch kein Hinweis auf eine Beeinträchtigung der Transmitterausschüttung. Die Kurzzeitplastizität war in GAD65^{-/-} gegenüber genetisch normalen Zellen unverändert und die Neurone zeigten keine Veränderung der Effizienz bei synaptischer Aktivität.

4.5.2 Veränderung evozierter IPSCs in GAD65^{-/-} Neuronen

Zur Untersuchung der Veränderung von IPSCs an Projektionsneuronen als Reaktion auf eine Depolarisation afferenter Interneurone wurden die Neuronen extrazellulär stimuliert. Dazu wurde eine Minimalstimulation benutzt. Transmitter enthaltende Vesikel werden nach Gesetzen der Wahrscheinlichkeit ausgeschüttet; diese Freisetzungswahrscheinlichkeit wird durch Depolarisation erhöht (Allen and Stevens, 1994). Bei Minimalstimulation folgt nicht auf jeden Reiz eine postsynaptische Antwort, weil bei niedriger Reizstärke die Wahrscheinlichkeit der Transmitterfreisetzung geringer ist und außerdem ein kleineres Gebiet und damit weniger Fasern und Zellen stimuliert werden. Eine Minimalstimulation mit einer Fehlerrate von zum Beispiel 40%, wie sie in dieser Arbeit benutzt wurde, gewährleistet eine gleich hohe Ausschüttungswahrscheinlichkeit in der Präsynapse. Die hier evozierten Potentiale wurden monosynaptisch übertragen; alle postsynaptischen Antworten einer Stimulationsreihe hatten konstante kurze Latenzzeiten.

Die Amplitude der evozierten postsynaptischen Antworten wurde für den ersten Puls der ersten zehn und der letzten zehn von 30 Durchläufen gemittelt. Jeder Durchlauf bestand aus 4 Pulsen mit einer Frequenz von 5 Hz. Die gemessene Amplitude war zwar tendenziell, jedoch nicht statistisch signifikant, bei GAD65^{+/+} höher als bei GAD65^{+/-}, und bei GAD65^{-/-} am niedrigsten. Die Amplitude der IPSCs ausgelöst durch die ersten Pulse war in allen drei Genotypen höher als die Amplitude der letzten zehn Pulse. Wenn man voraussetzt, dass die Rezeptordichte und -funktion der Postsynapse konstant ist, kann man schließen, dass die Transmitterausschüttung der Synapse nach starker Beanspruchung vermindert ist. Dieses Ergebnis bestätigt vorausgegangene Studien. Zugrunde liegende Mechanismen beinhalten eine Desensibilisierung sowie eine „Down“-Regulierung der Expression GABA_A-Rezeptoren. Außerdem ist durch den verminderten Chlorid-Gradienten nach wiederholter Beanspruchung die Triebkraft für Chlorid bei Kanalöffnung vermindert (Sieghart, 1995).

Um eine Minimalstimulation mit gleich hoher Ausschüttungswahrscheinlichkeiten zu gewährleisten, waren unterschiedlich hohe Reiz - Spannungen notwendig. Um bei GAD65^{+/+} eine Minimalfreisetzung zu erreichen, wurde eine durchschnittliche Spannung von 1,2 V angelegt, bei GAD65^{-/-} 2,3 V. Grund dafür kann eine erhöhte Schwelle zur Freisetzung von Vesikeln in den GAD65^{-/-} Interneuronen sein. Ein anderer Grund könnte bei GAD65^{-/-} eine Veränderung der auf das Projektionsneuron projizierenden inhibitorischen Synapsen sein. So würde eine verminderte Anzahl von Interneuronen oder eine verminderte Dichte GABAerger Synapsen auf die Projektionsneurone die höheren Spannungen erklären, die zum Auslösen postsynaptischer Antworten nötig waren. Auch hier könnte die Erklärung in einer Veränderung der Neuro- oder Synaptogenese bei Fehlen von GAD65 liegen. Interpretiert man die gefundenen Unterschiede in der Erregbarkeit als gestörten hemmenden Eingang auf die Projektionsneurone, so stehen sie in Einklang mit in vivo gefundenen Verhaltensunterschieden zwischen GAD65^{+/+} und GAD65-defizienten Mäusen. GAD65^{-/-} Mäuse sind anfälliger für epileptische Anfälle (Asada et al., 1996), zeigen sie ein vermindertes Vermeidungsverhalten gegenüber offenen Räumen und ein vermindertes Ansprechen auf anxiolytische Substanzen wie Diazepam und Barbiturate (Kash et al., 1999), deren Angriffspunkt der GABA-Metabolismus ist. Diese Beobachtungen weisen auf eine verminderte inhibitorische Kontrolle der Projektions-

neurone der lateralen Amygdala hin. Eine Fehlerquelle in der Evozierung der postsynaptischen Potentiale könnte die fehlende Quantifizierung oder Vereinheitlichung der Abstände zwischen Stimulationselektrode und abgeleitetem Neuron und die unterschiedliche Position der Stimulationselektrode innerhalb der lateralen Amygdala sein. Diese Fehler wurde jedoch durch randomisierte Auswahl des Stimulationsortes innerhalb der lateralen Amygdala und durch Unkenntnis des Genotyps während der Messung so klein wie möglich gehalten.

Da die Stimulationsstärke in den drei Genotypen unterschiedlich war, können die resultierenden Amplituden der postsynaptischen Antwort nicht direkt miteinander verglichen werden. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die Amplituden auf ein Volt Spannung bezogen. Dabei wurde eine höhere Amplitude pro Volt bei GAD65^{+/+} (98,5 pA/V) als bei GAD65^{+/-} (74,1 pA/V) und bei GAD65^{-/-} (27,7 pA/V) deutlich. Auffällig war auch die wesentlich geringere Varianz der Amplituden in GAD65^{-/-} im Gegensatz zu den anderen beiden Genotypen. Die schwerere Erregbarkeit in GAD65^{-/-} könnte mehrere Ursachen haben. Präsynaptisch könnte bei GAD65^{-/-} eine geringere Transmittermenge pro ausgeschüttetem Vesikel oder eine verminderte Wahrscheinlichkeit der Vesikelausschüttung vorliegen. Dem widerspricht allerdings die erhöhte Frequenz der spontanen mIPSCs, die eher auf eine erhöhte Ausschüttungswahrscheinlichkeit schließen lässt. Auch das unveränderte PPR lässt eine veränderte Wahrscheinlichkeit der Transmitterausschüttung als Erklärung kaum zu. Allerdings wurde das PPR nur für eine Stimulationsfrequenz von 5 Hz berechnet. Eventuell kommt es bei höheren Frequenzen zu veränderten Ausschüttungswahrscheinlichkeiten in GAD65^{-/-}. In anderen Studien fanden sich jedoch Hinweise auf eine verminderte Ausschüttungswahrscheinlichkeit. In retinalen Ganglienzellen wurde eine Verminderung der Frequenz von IPSCs als Reaktion auf eine Depolarisation in GAD65^{-/-} im Gegensatz zu GAD65^{+/+} gefunden (Tian et al., 1999). Die in jener Studie untersuchten Zellsysteme der Netzhaut könnten sich allerdings in ihren Eigenschaften deutlich von denen der lateralen Amygdala unterscheiden. Auch die Art der Depolarisation folgte einem anderen Schema, nämlich einer Depolarisation der GABAergen amakrinen Zellen über Gap Junctions durch die retinalen Ganglienzellen. Postsynaptisch könnte es eine Veränderung der „postsynaptic density“ der Membran bei GAD65^{-/-} geben. Die Rezeptoren könnten in veränderter Form oder Dichte vorliegen, wobei dann eine

deutlichere Veränderung der Amplitude zu erwarten wäre. Außerdem sprechen, wie oben bereits erwähnt, verschiedene Studien gegen eine Veränderung der Rezeptoren. Die wahrscheinlichste Erklärung ist hier eine Veränderung der Innervation des präsynaptischen Neurons.

Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der verminderten Erregbarkeit ist eine Verminderung der Interneuronenzahl. Durch eine Störung der Entwicklung von Interneuronen wurde in Mäusen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber epileptischen Anfällen sowie ein verändertes Angstverhalten ausgelöst (Levitt, 2005), ähnlich dem Verhalten von GAD65-defizienten Mäusen. So könnten diese Verhaltensänderungen nicht nur durch das Fehlen von GAD65 und GABA, sondern eventuell auch durch eine veränderte Neurogenese hervorgerufen werden. Zusätzlich zu den oben beschriebenen Einflüssen der Glutamatdecarboxylase auf die Synapto- und Neurogenese konnte auch gezeigt werden, dass das Vorhandensein von GAD67 einen wichtigen Faktor zum Schutz von Zellen vor oxidativem Stress darstellt, und dass eine Inhibition der Bildung von GAD67 die Zellproliferation einschränkt (Moon et al., 2004). Zwar wurde diese Studie an Tumorzellen durchgeführt und beschränkte sich auf die Funktion von GAD67, trotzdem liefert sie erste Hinweise auf die Rolle der Glutamatdecarboxylase in der Zellproliferation und im intrazellulären Stoffwechsel. In Zelllinien der Hoden von Ratten konnte eine Erhöhung der Zellzahl durch Zugabe von GABA und GABA_A-Rezeptor-Agonisten nachgewiesen werden (Geigerseder et al., 2004). Es scheint also durchaus möglich, dass eine Deletion des Gens für GAD65 auch in der lateralen Amygdala über eine Verminderung der Anzahl der Interneurone die Auslösbarkeit von IPSCs an Projektionsneuronen herabsetzt.

4.5.3 Auswirkung hoher synaptischer Beanspruchung auf GAD65/- Neurone

Da GAD65 in großen Mengen als Apo-Enzym (Martin et al., 1991, Itoh and Uchimura, 1981) vorliegt und die Kofaktorbindung vor allem in Zeiten hohen Energieverbrauchs und synaptischer Beanspruchung geschieht (Kaufmann et al., 1991; Miller and Walters, 1997), wurde die Vermutung geäußert, dass es zur Bereitstellung von GABA in Stress-Situationen rekrutiert wird (Kash et al., 1999; Kash et al., 1997; Martin et al., 1991). Während induzierter epileptischer Anfälle in Ratten konnte ein Anstieg der GABA-

Konzentration auf das doppelte der basalen Werte gemessen werden. Dieser Anstieg war zu etwa 80 % auf die Synthese durch GAD65 zurückzuführen (Patel et al., 2006; Esclapez and Houser, 1999). Diese Studien zeigen die Bedeutung von GAD65 während stark aktiver Phasen des ZNS. Dementsprechend könnte erwartet werden, dass es in GAD65^{-/-} bei starker synaptischer Beanspruchung zu einer Verminderung der fusionskompetenten Vesikel und zu einer schnelleren Erschöpfung der GABA-Ausschüttung kommt. Um diese Theorie zu überprüfen, wurde eine stärkere Beanspruchung der Synapse simuliert. Es wurden Pulsfolgen von 25 Pulsen mit 20 Hz injiziert und der Abstand zwischen den beiden Durchläufen immer weiter verkürzt. Vor einer Änderung des Intervalls wurde eine adäquate Zeit abgewartet, um eine vollständige Regeneration der synaptischen Kapazitäten zu gewährleisten. Um eine eventuell auftretende Erschöpfung der Synapsen von GAD65^{-/-} zu erkennen, wurden die Amplituden des ersten Pulses der beiden Pulsfolgen bei verschiedenen Intervallen miteinander verglichen. Bei einem Interstimulationsintervall von 10 Sekunden erzeugte bei allen drei Genotypen der erste Puls der zweiten Pulsfolge eine um den Faktor 2-3 höhere Amplitude als der erste Puls der ersten Pulsfolge. Es hat eine Faszilitierung durch residuelles Calcium stattgefunden (Altluri and Regehr, 1996; Delaney and Tank, 1994). Bei einem verkleinerten Intervall zwischen den beiden Pulsfolgen von 0,5 Sekunden ergab sich statt der Faszilitierung eine leichte Depression der zweiten Pulsfolge. Auch diese war bei allen drei Genotypen etwa gleich. Durch diesen Versuch konnte demzufolge eine schnellere Erschöpfbarkeit der GABA-Ausschüttung in GAD65^{-/-} nicht nachgewiesen werden. Es ist allerdings möglich, dass das angewendete Stimulationsprotokoll die Synapsen noch nicht ausreichend beanspruchte, um einen Effekt des GAD65-Mangels sichtbar zu machen. Für die hier erzeugte Beanspruchung der Synapse reichte offensichtlich die GAD 67 zur Bereitstellung GABA-haltiger Vesikel aus. Außerdem könnten Vesikel aus dem Reservepool in den „readily releasable Pool“ überführt und zur Ausschüttung bereitgestellt worden sein. Unter der Annahme dass die Stimulation die Grenzen synaptischer Beanspruchbarkeit noch nicht erreicht hatte, entspricht dieses Ergebnis den Erkenntnissen anderer Studien, die gezeigt haben, dass ein GAD65-Mangel sich nicht auf die basale Versorgung mit GABA auswirkt, da GAD67 im adulten Gehirn den größten Teil des GABAs herstellt. Zur Depression der zweiten Pulsfolge bei einem kurzen Intervall zwischen den Pulsfolgen ist anzumerken,

dass alle Zellen zu diesem Zeitpunkt bereits $8 * 25$ Pulse durchlaufen hatten. Obwohl dies durchaus im Bereich einer normalen synaptischen Beanspruchung liegt, ist nicht völlig auszuschließen, dass es bereits zu einer Desensitisierung der postsynaptischen Rezeptoren gekommen ist.

Die in dieser Studie gefundene Erhöhung der Frequenz spontaner postsynaptischer Miniaturströme in GAD65-defizienten Neuronen wurde bisher in keiner anderen Studie beschrieben und eröffnet neue Ansätze zur Wirkung und Aufgabe der Glutamatdecarboxylase 65 im gesunden Organismus. Zusammen mit der festgestellten schwereren Auslösbarkeit evozierter inhibitorischer Ströme ergeben sich Hinweise auf eine wichtige Rolle dieses Enzyms in der Neuro- und Synaptogenese. Die Wirkung, die GAD65 auf die Entwicklung des zentralen Nervensystems und das essentiell wichtige Gleichgewicht aus Inhibition und Exzitation hat, sollte in weiteren Studien genauer untersucht werden. Da die Amygdala als Zentrum der Verarbeitung von Emotionen, eine alte Gehirnregion ist, die sich im Laufe der Evolution wenig verändert hat (Barton et al., 2002), könnten sich so schließlich Hinweise auf das Verständnis verschiedener Störungen im Menschen ergeben.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde mittels Patch-Clamp-Technik die Auswirkung einer genetisch determinierten Defizienz der Glutamatdecarboxylase 65 auf die synaptischen und zellulären Eigenschaften von Zellen in der lateralen Amygdala (LA) der Maus untersucht. Obwohl das Fehlen der GAD65, als eines der beiden Enzyme, die GABA produzieren, bei adulten Tieren keine Veränderung des GABA-Levels bewirkt hat ihre Defizienz weitreichende Auswirkungen. Die LA ist als Zentrum für Angst- und Fluchtreflexe für die Integration verschiedener Stimuli bei angstassoziierten Lernvorgängen unabdingbar (LeDoux et al., 1990a) und steht damit im Zusammenhang mit Verhaltensauffälligkeiten GAD65 defizienter Tiere (Fanselow and LeDoux, 1999; Rodrigues et al., 2004). Diese Arbeit wurde mit dem Ziel durchgeführt elektrophysiologische Merkmale und synaptische Eigenschaften GAD65 defizienter im Vergleich zu heterozygoten GAD65^{+/-} und GAD65^{+/+} Neuronen zu identifizieren.

Es konnte gezeigt werden dass die passiven und aktiven Membraneigenschaften sowie die Membrankapazität in den drei untersuchten Genotypen nicht oder nur geringfügig verändert sind. Die Mechanismen zur Interaktion der Nervenzellen untereinander sind also intakt.

Die Analyse der mIPSCs ergab eine signifikante Frequenzerhöhung in GAD65^{-/-} Neuronen. Dies weist auf eine erhöhte Freisetzungswahrscheinlichkeit von Transmittermolekülen in der Präsynapse oder eine Veränderung der synaptischen Verbindungen der Neurone untereinander hin. Untersuchungen zur Neurogenese bei GAD65 Defizienz könnten weitere Erkenntnisse liefern. Die Amplitude der mIPSCs war tendenziell in GAD65 defizienten Neuronen vermindert. Dieser Erniedrigung könnte eine Verminderung der Dichte der postsynaptischen Rezeptoren oder der Menge des freigesetzten Neurotransmitters zugrunde liegen.

Des Weiteren wurde die Kinetik der mIPSCs untersucht. Die Abklingzeitkonstante τ war in GAD65^{-/-} signifikant niedriger als in den beiden anderen Genotypen. Dies ist ein Hinweis auf eine veränderte Zusammensetzung der postsynaptischen GABA_A-Rezeptoren und resultiert in einer schnelleren Wiedererregbarkeit der Zelle.

Um weitere Parameter der synaptischen Übertragung zwischen GABAergen Interneuronen und Projektionsneuronen untersuchen zu können wurde eine extrazelluläre Stimulationselektrode in der lateralen Amygdala platziert. Eine deutliche

Paired Pulse Faszilitierung in allen drei Genotypen bei Stimulation mit 5 Hz machte deutlich, dass die Vorgänge des Vesikelzyklus in der Präsynapse auch bei GAD65-Defizienz intakt sind. Gegen Ende des Stimulationsprotokolls kam es, wahrscheinlich durch Desensibilisierung und „Down“-Regulierung der GABA_A-Rezeptoren, in allen Gruppen zu einer Abnahme der ausgelösten Amplitude.

Es konnte gezeigt werden dass zur Auslösung eines Minimalreleases in GAD65-/- signifikant höhere Spannungen notwendig sind als in GAD65+/- und in GAD65+/+. Eine Erklärung wäre eine erhöhte Schwelle zur Vesikelausschüttung in GAD65-/- Interneuronen, eine verminderte Anzahl von Interneuronen oder eine verminderte Anzahl GABAerger Synapsen. Die errechnete ausgelöste Amplitude pro Volt Spannung in GAD65-/- war nur knapp 30 % so groß wie die Amplitude in GAD65+/+. Da die anderen gefundenen Ergebnisse gegen Veränderungen der postsynaptischen Rezeptoren und der präsynaptischen Freisetzungswahrscheinlichkeit sprechen, ist eine mögliche Erklärung eine Veränderung der synaptischen Verschaltung der Inter- und Projektionsneurone.

Da angenommen wird, dass GAD65 zur Bereitstellung von GABA unter hoher synaptischer Beanspruchung dient, wurde diese durch eine höhere Anzahl von Pulsen in einer höheren Frequenz simuliert. Bei einem großen Interstimulationsintervall kam es zu einer Faszilitierung zwischen den ersten Pulsen der Pulsfolgen. Bei einem niedrigen Interstimulationsintervall von 0,5 sek konnte eine leichte Depression nachgewiesen werden. Durch dieses Stimulationsprotokoll konnte keine schnellere Erschöpfung der GABA-Ausschüttung in GAD65-/- nachgewiesen werden.

Diese Arbeit liefert neue Hinweise darauf, dass GAD65 wichtige Charakteristika der synaptischen Übertragung beeinflusst. Das Fehlen von GAD65 hat deutliche Auswirkungen auf die spontane und evozierte Transmitterfreisetzung. Die Ursachen dieser Veränderungen müssen in weiteren Studien genauer untersucht werden. Besonders die Untersuchung der Rolle von GAD und GABA in der Neurogenese könnte wichtige neue Erkenntnisse bringen. Veränderungen der synaptischen Ultrastruktur könnten mittels Elektronenmikroskopie erfasst werden. Außerdem sollten die hier vorgestellten Daten an älteren Tieren überprüft werden. Durch kombinierte Verhaltens- und elektrophysiologische Studien können sich Zusammenhänge der hier gefundenen Phänomene mit Verhaltensänderungen untersuchen lassen.

6 Literaturverzeichnis

- (1) Abidin I, Eysel UT, Lessmann V, Mittmann T, 2008. Impaired GABAergic inhibition in the visual cortex of BDNF heterozygous knock out mice. **J Physiol.** Epub ahead of print
- (2) Adolphs R, Tranel D, Damasio H, Damasio AR, 1995. Fear and the human amygdala. **J Neurosci.** 15(9):5879-91.
- (3) Adolphs R, Tranel D, Damasio AR, 1998. The human amygdala in social judgement. **Nature.** 292:470-4.
- (4) Adolphs R, Tranel D, Hamann S, Young AW, Calder AJ, Phelps EA, Anderson A, Lee GP, Damasio AR, 1999. Recognition of facial emotion in nine individuals with bilateral amygdala damage. **Neuropsychologia.** 37:1111-7.
- (5) Aggleton JP, Kentridge RW, Sembi S, 1992. Lesions of the fornix but not the amygdala impair the acquisition of concurrent discrimination by rats. **Behav Brain Res.** 48(2):103-12.
- (6) Akerman CJ, Cline HT, 2007. Refining the roles of GABAergic signalling during neural circuit formation. **Trends Neurosci.** 30(8):382-9.
- (7) Alagarsamy S, Sorensen SD, Conn PJ, 2001. Coordinate regulation of metabotropic glutamate receptors. **Curr Opin Neurobiol.** 11:357-62.
- (8) Alger BE and Nicoll RA, 1982. Feed-forward dendritic inhibition of rat hippocampal pyramidal cells studies in vitro. **J Physiol.** 328:105-23.
- (9) Allen C and Stevens CF, 1994. An evaluation of causes for unreliability of synaptic transmission. **Proc Natl Acad Sci USA.** 91(22):10380-3.

- (10) Asada H, Kawamura Y, Maruyama K, Kume H, Ding RG, Ji FY, Kanbara N, Kuzume H, Sanbo M, Yagi T, Obata K, 1996. Mice lacking the 65 kDa Isoform of Glutamic Acid Decarboxylase (GAD65) Maintain Normal Levels of GAD67 and GABA in Their Brains but are Susceptible to Seizures. **Biochem Biophys Res Commun.** 229:891-5.
- (11) Asada H, Kawamura Y, Maruyama K, Kume H, Ding RG, Kanbara N, Kuzume H, Sanbo M, Yagi T, Obata K, 1997. Cleft palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. **Proc Natl Acad Sci USA.** 94:6496-9.
- (12) Atluri PP and Regehr WG, 1996. Determinants of the time course of facilitation at the granule cell to Purkinje cell synapse. **J Neurosci.** 16:5661-71.
- (13) Augustin I, Rosenmund C, Südhof TC, Brose N, 1999. Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles. **Nature.** 400(6743):457-61.
- (14) Barker JL, Behar T, Li YX, Liu QY, Ma W, Maric D, Maric I, Schaffner AE, Serafini R, Smith SV, Somogyi R, Vautrin JY, Wen XL, Xian H, 1998. GABAergic cells and signals in CNS development. **Perspect Dev Neurobiol.** 5(2-3):305-22.
- (15) Barton RA, Aggleton JP, Grenyer R, 2002. Evolutionary coherence of the mammalian amygdala. **Proc Biol Sci.** 270(1514):539-43.
- (16) Bauer EP and LeDoux JE, 2004. Heterosynaptic long-term potentiation of inhibitory interneurons in the lateral amygdala. **J Neurosci.** 24(43):9507-12.
- (17) Ben-Ari Y, 2002. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. **Nat Rev Neurosci.** 3(9):728-39.
- (18) Betz WJ and Bewick GS, 1992. Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. **Science.** 255:200-3.
-

- (19) Bier M, Kits KS, Borst JG, 1996. Relation between rise times and amplitudes of GABAergic postsynaptic currents. **J Neurophysiol.** 75(3):1008-1012.
- (20) Biró ÁA, Holderith NB, Nusser Z, 2006. Release Probability-Dependent Scaling of the Postsynaptic Responses at Single Hippocampal GABAergic Synapses. **J Neurosci.** 26(48):12487-12496.
- (21) Bordi F and LeDoux JE, 1994. Response properties of single units in areas of rat auditory thalamus that project to the amygdala. I. Acoustic discharge patterns and frequency receptive fields. **Exp Brain Res.** 98(2):261-74.
- (22) Bormann J, 1988. Electrophysiology of GABAA and GABAB receptor subtypes. **Trends Neurosci.** 11(3):112-6.
- (23) Bormann J, 2000. The “ABC” of GABA receptors. **Trends Pharmacol Sci.** 21(1):16-9.
- (24) Bowers G, Cullinan WE, Herman JP, 1998. Region-specific regulation of glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA expression in central stress circuits. **J Neurosci.** 18(15):5938-47.
- (25) Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallagher JP, Marshall F, Raiteri M, Bonner TI, Enna SJ, 2002. International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian γ -Aminobutyric AcidB Receptors: Structure and Function. **Pharmacol Rev.** 54(2):247-64.
- (26) Carlsen J, 1988. Immunocytochemical localization of glutamate decarboxylase in the rat basolateral amygdaloid nucleus, with special reference to GABAergic innervation of amygdalostriatal projection neurons. **J Comp Neurol.** 273:513-26.

- (27) Castillo PE, Malenka RY, Nicoll RA, 1997. Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. **Nature**. 388:182-6.
- (28) Cathala L, Misra C, Cull-Candy S, 2000. Developmental profile of the changing properties of NMDA receptors at cerebellar mossy fiber-granule cell synapses. **J Neurosci**. 20:5899-5905.
- (29) Chapman PF, Kairiss EW, Keenan CI, Brown TH, 1990. Long-term synaptic potentiation in the amygdala. **Synapse**. 6(3):271-8.
- (30) Chattopadhyaya B, Di Cristo G, Wu CZ, Knott G, Kuhlmann S, Fu Y, Palmiter RD, Huang ZJ, 2007. GAD67-mediated GABA synthesis and signalling regulate inhibitory synaptic innervation in the visual cortex. **Neuron**. 54(6):889-903.
- (31) Chen YA, Scales SJ, Patel SM, Doung YC, Scheller RH, 1999. SNARE complex formation is triggered by Ca²⁺ and drives membrane fusion. **Cell**. 97(2):165-74.
- (32) Christgau S, Aanstoot HJ, Schierbeck J, Begley K, Tullin S, Hejnaes K, Baekkeskov S, 1992. Membrane anchoring of the autoantigen GAD65 to microvesicles in pancreatic beta-cells by palmitoylation in the NH₂-terminal domain. **J Cell Biol**. 118:309-320.
- (33) Collingridge GL and Lester RAJ, 1989. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. **Pharmacol Rev**. 41:143-210.
- (34) Condie BG, Bain G, Gottlieb DT, Capecchi M, 1997. Cleft palate in mice with a targeted mutation in the gamma-aminobutyric acid-producing enzyme glutamic acid decarboxylase. **Proc Natl Acad Sci USA**. 94(21):11451-5.

- (35) Corbett R, Fielding S, Cornfeldt M, Dunn RW, 1991. GABA-mimetic agents display anxiolytic-like effects in the social interaction and elevated plus maze procedures. **Psychopharmacology (Berl)**. 104(3):312-6.
- (36) Davis M, Rainnie D, Cassell M, 1994. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. **Trends Neurosci**. 17:208-14.
- (37) de Gelder B, Snyder J, Greve D, Gerard G, Hadjikhani N, 2004. Fear fosters flight: a mechanism for fear contagion when perceiving emotion expressed by a whole body. **Proc Natl Acad Sci USA**. 101(47):16701-6.
- (38) Delaney KR and Tank DW, 1994. A quantitative measurement of the dependence of short-term synaptic enhancement on presynaptic residual calcium. **J Neurosci**. 14:5885-5902.
- (39) Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF, 1999. The glutamate receptor ion channels. **Pharmacol Rev**. 51:7-61.
- (40) Dulobova I, Yamaguchi T, Arac D, Li H, Huryeva I, Min SW, Rizo J, Südhof TC, 2003. Convergence and Divergence in the mechanisms of SNARE binding by Sec1/Munc18-like proteins. **Proc Natl Acad Sci USA**. 100(1):32-7.
- (41) Edmonds B, Gibb AJ, Colquhoun D, 1995. Mechanisms of activation of glutamate receptors and the time course of excitatory synaptic currents. **Annu Rev Physiol**. 57:495-519.
- (42) Eghbali M, Curmi JP, Birnir B, Gage PW, 1997. Hippocampal GABA(A) channel conductance increased by diazepam. **Nature**. 388(6637):71-5.
- (43) Engel D, Pahner I, Schulze K, Frahm C, Jarry H, Ahnert-Hilger G, Draguhn A, 2001. Plasticity of rat central inhibitory synapses through GABA metabolism. **J Physiol**. 535.2:473-482.
-

- (44) Erlander MG, Tillakaratne NJ, Feldblum S, Patel N, Tobin AJ, 1991. Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. **Neuron**. 7:91-100.
- (45) Esclapez M and Houser CR, 1999. Up-regulation of GAD65 and GAD67 in remaining hippocampal GABA neurons in a model of temporal lobe epilepsy. **J Comp Neurol**. 412(3):488-505.
- (46) Esclapez M, Tillakaratne NJK, Kaufmann DL, Tobin AJ, Houser CR, 1994. Comparative Localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concepts of functional differences between the forms. **J Neurosci**. 14(3):1834-1855.
- (47) Faber ESL and Sah P, 2002. Physiological role of calcium-activated potassium currents in the rat lateral amygdala. **J Neurosci**. 22:1618-28.
- (48) Faber ESL, Callister RJ, Sah P, 2001. Morphological and Electrophysiological Properties of Principal Neurons on the Rat Lateral Amygdala in Vitro. **J Neurophysiol**. 85:714-23.
- (49) Fagg GE and Foster AC, 1983. Amino acid neurotransmitters and their pathway in mammalian central nervous system. **Neuroscience**. 9:701-19.
- (50) Fanselow MS, LeDoux JE, 1999. Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. **Neuron**. 23(2):229-32.
- (51) Farb CR and LeDoux JE, 1997. NMDA and AMPA receptors in the lateral nucleus of the amygdala are postsynaptic to auditory thalamic afferents. **Synapse**. 27:106-121.

- (52) Farb CR and LeDoux JE, 1999. Afferents from rat temporal cortex synapse on lateral amygdala neurons that express NMDA and AMPA receptors. **Synapse**. 33:218-29.
- (53) Farb CR, Aoki C, LeDoux JE, 1995. Differential localization of NMDA and AMPA receptor subunits in the lateral and basal nuclei of the amygdala: a light and electron microscopic study. **J Comp Neurol**. 362(1):86-108.
- (54) Faulkner B and Brown TH, 1999. Morphology and physiology of neurons in the rat perirhinal-lateral amygdala area. **J Comp Neurol**. 411(4):613-42.
- (55) Fernandez-Chacon R, Konigstorfer A, Gerber SH, Garcia J, Matos MF, Stevens CF, Brose N, Rizo J, Rosenmund C, Südhof TC, 2001. Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. **Nature**. 410(6824):41-9.
- (56) Frerking M, Borges S, Wilson M, 1995. Variation in GABA mini amplitude is the consequence of variation in transmitter concentration. **Neuron**. 15(4):885-95.
- (57) Funahashi M, Matsuo R, Stewart M, 2000. Propagation of synchronous burst discharges from entorhinal cortex to morphologically and electrophysiologically identified neurons of rat lateral amygdala. **Brain Res**. 884:104-15.
- (58) Fykse EM, Takei K, Walch-Solimena C, Geppert M, Jahn R, De Camilli P, Südhof TC, 1993. Relative properties and localizations of synaptic vesicle protein isoforms: the case of the synaptophysins. **J Neurosci**. 13(11):4997-5004.
- (59) Gakhar-Koppole N, Bengtson CP, Parlato R, Horsch K, Eckstein V, Ciccolini F, 2008. Depolarization promotes GAD65-mediated GABA synthesis by a post-translational mechanism in neural stem cell-derived neurons. **Eur J Neurosci**. 27(2):269-83.

- (60) Ganguly K, Schinder AF, Wong ST, Poo M, 2001. GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. **Cell**. 105(4):521-32.
- (61) Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL, Song H, 2006. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. **Nature**. 439(7076):589-93.
- (62) Geigerseder C, Doepner RF, Thalhammer A, Krieger A, Mayerhofer A, 2004. Stimulation of TM3 Leydig cell proliferation via GABA(A) receptors: a new role for testicular GABA. **Reprod Biol Endocrinol**. 2:13.
- (63) Gozlan H and Ben-Ari Y, 2003. Interneurons are the source and the targets of the first synapses formed in the rat developing hippocampal circuit. **Cereb Cortex**. 13(6):684-92.
- (64) Gray EG, 1969. Electron microscopy of excitatory and inhibitory synapses: a brief review. **Prog Brain Res**. 31:141-155.
- (65) Guidotti A, Corda MG, Wise BC, Vaccarino F, Costa A, 1983. GABAergic synapses. Supramolecular organization and biochemical regulation. **Neuropharmacology**. 22:1471-9.
- (66) Hall E, 1972. The amygdala of the cat: a Golgi study. **Z Zellforsch Mikrosk Anat**. 134:439-58.
- (67) Hamill OP, Bormann J, Sakmann B, 1987. Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. **J Physiol**. 385:243-86.

- (68) Hensch TK, Fasioloni M, Matasa N, Stryker MP, Baekkeskov S, Kash S, 1998. Local GABA circuit control of experience dependent plasticity in developing visual cortex. **Science**. 282:1504-8.
- (69) Hermans E and Challiss RA, 2001. Structural, signalling and regulatory properties of the group I metabotropic glutamate receptors: prototypic family C G-protein-coupled receptors. **Biochem J**. 359:465-484.
- (70) Hollmann M and Heinemann S, 1994. Cloned glutamate receptors. **Annu Rev Neurosci**. 17:31-108.
- (71) Hosaka M, Hammer RE, Südhof TC, 1999. A phospho-switch controls the dynamic association of synapsins with synaptic vesicles. **Neuron**. 24(2):377-87.
- (72) Huntsman MM and Huguenard JR, 2006. Fast IPSCs in rat thalamic reticular nucleus require the GABAA receptor beta 1 subunit. **J Physiol**. 572(Pt2):459-75.
- (73) Itoh M and Uchimura H, 1981. Regional differences in cofactor saturation of glutamate decarboxylase (GAD) in discrete brain nuclei of the rat. Effect of repeated administration of haloperidol on GAD activity in the substantia nigra. **Neurochem Res**. 6:1283-9.
- (74) Jenkins SA and Simmons DD, 2006. GABAergic neurons in the lateral superior olive of the hamster are distinguished by differential expressions of gad isoforms during development. **Brain Res**. 1111(1):12-25.
- (75) Ji F, Kanbara N, Obata K, 1999. GABA and histogenesis in fetal and neonatal mouse brain lacking both the isoforms of glutamic acid decarboxylase. **Neurosci Res**. 33(3):187-94.

- (76) Jin Y, Jorgensen E, Hartweg E, Horvitz HR, 1999. The Caenorhabditis elegans Gene unc-25 Encodes Glutamic Acid Decarboxylase and Is Required for Synaptic Transmission But Not Synaptic Development. **J Neurosci.** 19(2):539-548.
- (77) Kamal AM and Tömböl T, 1975. Golgi studies on the amygdaloid nuclei of the cat. **J Hirnforsch.** 16:175-201.
- (78) Kash SF, Johnson RS, Tecott LH, Noebels JL, Mayfield RD, Hanahan D, Baekkeskov S, 1997. Epilepsy in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. **Proc Natl Acad Sci USA.** 94:14060-65.
- (79) Kash SF, Tecott LH, Hodge C, Baekkeskov S, 1999. Increased anxiety and altered responses to anxiolytics in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. **Proc Natl Acad Sci USA.** 96:1698-1703.
- (80) Katz B, 1969. The release of neural transmitter substances. **Liverpool University Press.**
- (81) Kaufman DL, Houser CR, Tobin AJ, 1991. Two forms of the gamma-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. **J Neurochem.** 56:720-3.
- (82) Kempainen S, Pitkänen A, 2000. Distribution of parvalbumin, calretinin, and calbindin-D(28k) immunoreactivity in the rat amygdaloid complex and colocalization with gamma-aminobutyric acid. **J Comp Neurol.** 426(3):441-67.
- (83) Kidd FL, Coumis U, Collingridge GL, Crabtree JW, Isaac JT, 2002. A presynaptic kainite receptor is involved in regulating the dynamic properties of thalamocortical synapses during development. **Neuron.** 34(4):635-46.
- (84) Knaus P, Marqueze-Pouey B, Scherer H, Betz H, 1990. Synaptoporin, a novel putative channel protein of synaptic vesicles. **Neuron.** 5(4):453-62.
-

- (85) Kohara K, Yasuda H, Huang Y, Adachi N, Sohya K, Tsumoto T, 2007. A local reduction in cortical GABAergic synapses after a loss of endogenous brain-derived neurotrophic factor, as revealed by single-cell gene knock-out method. **J Neurosci.** 27(27):7234-44.
- (86) Konnerth A, Llano I, Armstrong CM, 1990. Synaptic currents in cerebellar purkinje cells. **Proc Ntl Acad Sci USA.** 87:2662-5.
- (87) Kono S, Miyajima H, Sugimoto M, Suzuki Y, Takahashi Y, Hishida A, 2001. Stiff-person syndrome associated with cerebellar ataxia and high glutamic acid decarboxylase antibody titer. **Intern Med.** 40(9):968-71.
- (88) Krettek JE and Price JL, 1977. The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. **J Comp Neurol.** 171(2):157-91.
- (89) Krnjevic K, 1974. Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates. **Physiol Rev.** 54:418-540.
- (90) Lang EJ and Paré D, 1997. Similar inhibitory processes dominate the responses of cat lateral amygdaloid projection neurons to their various afferents. **J Neurophysiol.** 77:341-52.
- (91) Lang EJ and Paré D, 1998. Synaptic responsiveness of interneurons of the cat lateral amygdaloid nucleus. **Neuroscience.** 83:877-89.
- (92) LeDoux JE, Cicchetti P, Xagoraris A, Romanski LM, 1990a. The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. **J Neurosci.** 10(4):1062-9.
- (93) LeDoux JE, Farb C, Ruggiero DA, 1990b. Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. **J Neurosci.** 10(4):1043-54.
-

- (94) Levine J, Chengappa KN, Gershon S, Drevets W, 2001. Differentiating primary pathophysiologic from secondary adaptational processes. **Depress Anxiety**. 14:105-111.
- (95) Levitt P, 2005. Disruption of interneuron development. **Epilepsia**. 7:22-8.
- (96) Li H and Rogawski MA, 1998. GluR5 kainate receptor mediated synaptic transmission in rat basolateral amygdala in vitro. **Neuropharmacology**. 37:1279-86.
- (97) Liu Y and Edwards RH, 1997. The role of vesicular transport proteins in synaptic transmission and neuronal degeneration. **Annu Rev Neurosci**. 20:125-56.
- (98) Llinas R, Steinberg IZ, Walton K, 1981. Relationship between presynaptic calcium current and postsynaptic potential in squid giant synapse. **Biophys J**. 33(3):323-51.
- (99) Llinás R, Gruner JA, Sugimori M, McGuinness TL, Greengard P, 1991. Regulation by synapsin I and Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II of the transmitter release in squid giant synapse. **J Physiol**. 436:257-82.
- (100) LoTurco JJ, Owens DF, Heath MJS, Davis MBE, Kriegstein AR, 1995. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. **Neuron**. 15:1287-98.
- (101) Luskin MB, Price JL, 1983. The topographic organization of associational fibers of the olfactory system in the rat, including centrifugal fibers to the olfactory bulb. **J Comp Neurol**. 216(3):264-91.
- (102) Mahanty NK and Sah, P, 1998. Calcium-permeable AMPA receptors mediate long-term potentiation in interneurons in the amygdala. **Nature**. 394:683-7.

- (103) Marowsky A, Yanagawa Y, Obata K, Vogt KE, 2005. A specialized subclass of interneurons mediates dopaminergic facilitation of amygdala function. **Neuron**. 48, 1025-37.
- (104) Martin DL, Martin SB, Wu SJ, Espina N, 1991. Regulatory Properties of Brain Glutamate Decarboxylase (GAD): The Apoenzyme of GAD is present principally as the smaller of two molecular forms of GAD in brain. **J Neurosci**. 11(9):2725-2731.
- (105) Marty S, Berzaghi MdaP, Berninger B, 1997. Neurotrophins and activity-dependent plasticity of cortical interneurons. **Trends Neurosci**. 20:198-202.
- (106) Marty S, Wehrlé R, Sotelo C, 2000. Neuronal Activity and Brain-Derived Neurotrophic Factor Regulate the Density of Inhibitory Synapses in Organotypic Slice Cultures of Postnatal Hippocampus. **J Neurosci**. 20(21):8087-8095.
- (107) Mascagni F and McDonald AJ, 2003. Immunohistochemical characterization of cholecystinin containing neurons in the rat basolateral amygdala. **Brain Res**. 976:171-84.
- (108) McDonald AJ, 1982. Cytoarchitecture of the central amygdaloid nucleus of the rat. **J Comp Neurol**. 208:401-18.
- (109) McDonald AJ, 1998. Cortical pathways to the mammalian amygdala. **Prog Neurobiol**. 55(3):257-332.
- (110) McDonald AJ and Augustine JR, 1993. Localization of GABA-like immunoreactivity in the monkey amygdala. **Neuroscience**. 52:281-94.
- (111) McDonald AJ and Bettette RL, 2001. Parvalbumin-containing neurons in the rat basolateral amygdala: morphology and co-localization of Calbindin-D (28kD). **Neuroscience**. 102:413-25.
-

- (112) McDonald AJ and Mascagni F, 2001. Colocalization of calcium-binding proteins and GABA in neurons of the rat basolateral amygdala. **Neuroscience**. 105:681-93.
- (113) Miller LP and Walters JR, 1979. Effects of depolarization on cofactor regulation of glutamic acid decarboxylase in substantia nigra synaptosomes. **J Neurochem**. 33:533-539.
- (114) Millhouse OE and DeOlmos J, 1983. Neuronal configurations in lateral and basolateral amygdala. **Neuroscience**. 10:1269-1300.
- (115) Moon MS, Cho EW, Byun HS, Jung IL, Kim IG, 2004. GAD67KD antisense in colon cancer cells inhibits cell growth and sensitizes to butyrate and pH reduction and H₂O₂ and gamma-radiation. **Arch Biochem Biophys**. 430(2):229-36.
- (116) Moss SJ, Smart TG, 2001. Constructing inhibitory synapses. **Nat Rev Neurosci**. 2(4):240-250.
- (117) Muller JF, Mascagni F, McDonal AJ, 2006. Pyramidal cells of the rat basolateral amygdala: synaptology and innervation by parvalbumin-immunoreactive interneurons. **J Comp Neurol**. 494(4):635-50.
- (118) Nakashima M, Uemura M, Yasui K, Ozaki HS, Tabata S, Taen A, 2000. An anterograde and retrograde tract-tracing study on the projections from the thalamic gustatory area in the rat: distribution of neurons projecting to the insular cortex and amygdaloid complex. **Neurosci Res**. 36(4):297-309.
- (119) Nicoll RA, Malenka RC, Kauer JA, 1990. Functional Comparison of Neurotransmitter Receptor Subtypes in Mammalian Central Nervous System. **Physiol Rev**. 70(2):513-565.
- (120) Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A, 1984. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. **Nature**. 307:462-5.

- (121) Nusser Z, Cull-Candy S, Farrant M, 1997. Differences in synaptic GABA(A) receptor number underlie variation in GABA mini amplitude. **Neuron**. 19(3):697-709.
- (122) Nusser Z, 2002. Release-independent short-term facilitation at GABAergic synapses in the olfactory bulb. **Neuropharmacology**. 43(4):573-83.
- (123) Ohba S, Ikeda T, Ikegaya Y, Nishiyama N, Matsuki N, Yamada MK, 2005. BDNF locally potentiates GABAergic presynaptic machineries: target-selective circuit inhibition. **Cereb Cortex**. 15(3):291-8.
- (124) Okada Y, Taniguchi H, Schimada C, 1976. High concentration of GABA and high glutamate decarboxylase activity in rat pancreatic islets and human insulinoma. **Science**. 194:620-2.
- (125) Olsen RW, 1982. Drug interactions at the GABA receptor-ionophore complex. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. 22:245-277.
- (126) Palmer CL, Cotton L, Henley JM, 2005. The molecular pharmacology and cell biology of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. **Pharmacol Rev**. 57(2):253-77.
- (127) Paré D and Smith Y, 1998. Intrinsic circuitry of the amygdaloid complex: common principles of organization in rats and cats. **Trends Neurosci**. 21(6):240-1.
- (128) Paré D, Pape HC, Dong J, 1995. Bursting and oscillating neurons of the cat basolateral amygdaloid complex in vivo: electrophysiological properties and morphological features. **J Neurophysiol**. 74:1179-91.

- (129) Patel AB, de Graaf RA, Martin DL, Battagliolo G, Behar KL, 2006. Evidence that GAD65 mediates increased GABA synthesis during intense neuronal activity in vivo. **J Neurochem.** 97(2):385-96.
- (130) Perkel DJ, Hestrin S, Sah P, Nicoll RA, 1990. Excitatory synaptic currents in purkinje cells. **Proc R Soc Lond B Biol Sci.** 241:116-21.
- (131) Petrovich GD, Canteras NS, Swanson LW, 2001. Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. **Brain Res Rev.** 38(1-2):247-89.
- (132) Perrais D and Ropert N, 1999. Effect of zoldipem on miniature IPSCs and occupancy of postsynaptic GABA_A receptors in central synapses. **J Neurosci.** 19(2):578-88.
- (133) Pin JP and Duvoisin R, 1995. The metabotropic glutamate receptors: structure and function. **Neuropharmacology.** 34:1-26.
- (134) Pitkänen A, Savander V, LeDoux JE, 1997. Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat : an emerging framework for understanding functions of the amygdala. **Trends Neurosci.** 20(11):517-23.
- (135) 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.** 911:369-91.
- (136) Rodrigues SM, Schafe GE, LeDoux JE, 2001. Intra-amygdala blockade of the NR2B subunit of the NMDA receptor disrupts the acquisition but not the expression of fear conditioning. **J Neurosci.** 21:6889-96.

- (137) Rodrigues SM, Schafe GE, LeDoux JE, 2004. Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala. **Neuron**. 44(1):75-91.
- (138) Roerig B and Feller MB, 2000. Neurotransmitters and Gap Junctions in developing neural circuits. **Brain Res Rev**. 32:86-114.
- (139) Rohrbacher J, Jarolimek W, Lewen A, Misgeld U, 1997. GABA_B receptor-mediated inhibition of spontaneous inhibitory synaptic currents in rat midbrain culture. **J Physiol**. 500.3 739-749.
- (140) Royer S and Paré D, 2003. Conservation of total synaptic weight through balanced synaptic depression and potentiation. **Nature**. 422:518-22.
- (141) Sah P, Faber ESL, Lopez de Armentia M, Power J, 2003. The Amygdaloid Complex: Anatomy and Physiology. **Physiol Rev**. 83:803-34.
- (142) Samson RD, Paré D, 2006. A spatially structured network of inhibitory and excitatory connections directs impulse traffic within the lateral amygdala. **Neuroscience**. 141:1599-1609.
- (143) Scharfman HE, 2007. The neurobiology of epilepsy. **Curr Neurol Neurosci Rep**. 7(4):348-54.
- (144) Schmid SL, 1997. Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. **Annu Rev Biochem**. 66:511-48.
- (145) Shaban H, Humeau Y, Herry C, Cassasus G, Shigemoto R, Ciocchi S, Barbieri S, Putten van der H, Kaupmann K, Bettler B, Lüthi A, 2006. Generalization of amygdala LTP and conditioned fear in the absence of presynaptic inhibition. **Nat Neurosci**. 9(8):1028-1035.
-

- (146) Sheng M, 1997. Excitatory synapses. Glutamate receptors put in their place. **Nature**. 386(6622):221-23.
- (147) Shi CJ, Cassell MD, 1997. Cortical, thalamic, and amygdaloid projections of rat temporal cortex. **J Comp Neurol**. 382(2):153-75.
- (148) Shi CJ, Cassell MD, 1998. Cortical, thalamic, and amygdaloid connections of the anterior and posterior insular cortices. **J Comp Neurol**. 399(4) :440-68.
- (149) Shi CJ and Davis M, 2001. Visual Pathways Involved in Fear Conditioning Measured with Fear-Potentiated Startle: Behavioral and Anatomic Studies. **J Neurosci**. 21(24):9844-55.
- (150) Shimada T, Matsumoto K, Osanai M, Matsuda H, Terasawa K, Watanabe H, 1995. The modified light/dark transition test in mice: evaluation of classic and putative anxiolytic and anxiogenic drugs. **Gen Pharmacol**. 26:205-10.
- (151) Shinnick-Gallagher P, McKernan MG, Xie J, Zinebi F, 2003. L-type voltage-gated calcium channels are involved in the in vivo and in vitro expression of fear conditioning. **Ann N Y Acad Sci**. 985:135-49.
- (152) Sieghart W, 1995. Structure and Pharmacology of γ -Aminobutyric AcidA Receptor Subtypes. **Pharmacol Rev**. 47(2):181-233.
- (153) Sieghart W, 1992. GABAA receptors: ligand-gated Cl⁻ ion channels modulated by multiple drug-binding sites. **Trends Pharmacol Sci**. 13(12):446-50.
- (154) Smith Y and Paré D, 1994. Intra-amygdaloid projections of the lateral nucleus in the cat: PHA-L anterograde labelling combined with postembedding GABA and glutamate immunocytochemistry. **J Comp Neurol**. 342:232-48.

- (155) Smith Y, Paré D, Paré JF, 2000. Differential innervation of parvalbumin-immunoreactive interneurons of the basolateral amygdaloid complex by cortical and intrinsic inputs. **J Comp Neurol.** 416:496-508.
- (156) Stevens CF and Williams JH, 2007. Discharge of the readily releasable pool with action potentials at hippocampal synapses. **J Neurophysiol.** 98(6):3221-9.
- (157) Study RE and Barker JL, 1981. Diazepam and (–)-pentobarbital: fluctuation analysis reveals different mechanisms for potentiation of gamma-aminobutyric acid responses in cultured central neurons. **Proc Natl Acad Sci USA.** 78:7180-4.
- (158) Sugita S and Südhof TC, 2000. Specificity of Ca²⁺-dependent protein interactions mediated by the C2A domains of synaptotagmins. **Biochemistry.** 39(11):2940-9.
- (159) Südhof TC, 2002. Synaptotagmins: why so many?. **J Biol Chem.** 277(10):7629-32.
- (160) Szabò G, Kartarova Z, Hoertnagl B, Somogyi R, Sperk G, 2000. Differential regulation of adult and embryonic glutamate decarboxylases in rat dentate granule cells after kainite-induced limbic seizures. **Neuroscience.** 100(2):287-95.
- (161) Szinyei C, Heinbockel T, Montagne J, Pape HC, 2000. Putative cortical and thalamic inputs elicit convergent excitation in a population of GABAergic interneurons of the lateral amygdala. **J Neurosci.** 20:8909-8915.
- (162) Szinyei C, Stork O, Pape HC, 2003. Contribution of NR2B subunits to synaptic transmission in amygdaloid interneurons. **J Neurosci.** 23:2549-56.
- (163) Tao HW and Poo MM, 2000. Retrograde signalling at central synapses. **Proc Natl Acad Sci USA.** 98:11009-11015.

- (164) Tian N, Petersen C, Kash S, Baekkeskov S, Copenhagen D, Nicoll R, 1999. The role of the synthetic enzyme GAD65 in the control of neuronal γ -aminobutyric acid release. **PNAS**. 96(22):12911-16.
- (165) Tillakaratne NJ, Erlander MG, Collard MW, Greif KF, Tobin AJ, 1992. Glutamate decarboxylase in nonneural cells of rat testis and oviduct: differential expression of GAD65 and GAD67. **J Neurochem**. 58:618-27.
- (166) Titz S, Hans M, Kelsch W, Lewen A, Swandulla D, Misgeld U, 2003. Hyperpolarizing inhibition develops without trophic support by GABA in cultured rat midbrain neurons. **J Physiol**. 550(Pt3):719-30.
- (167) Trigo FF, Chat M, Marty A, 2007. Enhancement of GABA release through endogenous activation of axonal GABA(A) receptors in juvenile cerebellum. **J Neurosci**. 27(46):12452-63.
- (168) Tsien JZ, 2000. Linking Hebb`s coincidence-detection to memory formation. **Curr Opin Neurobiol**. 10:266-73.
- (169) van Ooyen A, Bosman L, Brussaard A, 2004. Influence of the decay time of the GABAergic postsynaptic current on the spatial spread of network activity. **Neurocomputing**. 58-60: 291-295.
- (170) Vautrin J, Schaffner AE, Barker JL, 1994. Fast presynaptic GABAA receptor-mediated Cl⁻ conductance in cultured rat hippocampal neurons. **J Physiol**. 479(Pt1):53-63.
- (171) Verhage M, Maia AS, Plomp JJ, Brussaard AB, Heeroma JH, Vermeer H, Toonen RF, Hammer RE, van den Berg TK, Missler M, Geuze HJ, Südhof TC, 2000. Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. **Science**. 287(5454):864-9.
-

- (172) Vicario-Abejòn C, Collin C, McKay RD, Segal M, 1998. Neurotrophins induce formation of functional excitatory and inhibitory synapses between cultured hippocampal neurons. **J Neurosci.** 18:7256-71.
- (173) Wardle RA and Poo MM, 2003. Brain-derived neurotrophic factor modulation of GABAergic synapses by postsynaptic regulation of chloride transport. **J Neurosci.** 23(25):8722-32.
- (174) Washburn MS and Moises HC, 1992. Electrophysiological and morphological properties of rat basolateral amygdaloid neurons recorded in vitro. **J Physiol.** 449:121-54.
- (175) Wisden W and Seeburg PH, 1993. Mammalian ionotropic glutamate receptors. **Curr Opin Neurobiol.** 3:291-8.
- (176) Woodruff AR, Monyer H, Sah P, 2006. GABAergic Excitation in the basolateral amygdala. **J Neurosci.** 26(46):11881-7.
- (177) Wu H, Jin Y, Buddhala C, Osterhaus G, Cohen E, Jin H, Wei J, Davis K, Obata K, Wu JY, 2007. Role of glutamate decarboxylase (GAD) isoform, GAD65, in GABA synthesis and transport into synaptic vesicles – Evidence from GAD65-knockout mice studies. **Brain Res.** 1154:80-3.
- (178) Yagi T, Nada S, Watanabe N, Tamemoto H, Kohmura N, Ikawa Y, Aizawa S, 1993. A novel negative selection for homologous recombinants using diphtheria toxin A fragment gene. **Anal Biochem.** 214:77-86.
- (179) Zhang W, Efanov A, Yang SN, Fried G, Kolare S, Brown H, Zaitsev S, Berggren PO, Meister B, 2000. Munc-18 associates with Syntaxin and serves as a negative regulator of exocytosis in the pancreatic beta –cell. **J Biol Chem.** 275(52):41521-7.
-

- (180) Zucker RS and Regehr WG, 2002. Short-term synaptic plasticity. **Annu Rev Physiol.** 64:355-405.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

+/+	Wild-Typ
+/-	heterozygote Deletionsmutante
-/-	homozygote Deletionsmutante
ACSF	artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit
AHP	„After Hyperpolarizing Potential“
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazolpropionsäure
AP	Adapterprotein
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	„Brain-derived neurotrophic factor“
BSK	Bluescript-SK-Vektor
CaMKII	Ca ²⁺ -Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCK	Cholezystokinin
DAG	Diacylglycerol
DNQX	6,7-Dinitroquinoxaline-2,3-dion
DT-A	Diphtherietoxin-Fragment-A-Kassette
F1	Filialgeneration 1
GABA	γ -Amino-Buttersäure
GABARAP	GABA _A -Rezeptor-Assoziiertes Protein
GAD	Glutamat-Decarboxylase
G-Protein	Guanosinnukleotid-abhängiges Protein
GRASP	“GRIP1-associated scaffold protein”
GRIP	“Glutamat-Rezeptor Interacting Protein”
GTP	Guanosein-Triphosphat
GVG	Vigabatrin
IP3	Inositoltriphosphat
IPSC	„inhibitory postsynaptic current“
ISI	Interstimulationsintervall

LA	laterale Amygdala
mGluR	metabotroper Glutamat Rezeptor
mIPSC	„miniature inhibitory postsynaptic current“
MPA	Medroxyprogesteronacetat
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Ncl.	Nucleus
NMDA	N-methyl-D-aspartat
NPHK	Tetrapeptid, bindet PLP, Asn-Pro-His-Lys
NR2B	Untereinheit des NMDA-Rezeptors
OPV	Operationsverstärker
PIP2	Phosphoinositoldiphosphat
PKA	Proteinkinase A
PLP	Pyridoxal-5`-Phosphat
PPR	“Paired Pulse Ratio”
PSD	„postsynaptic density“
PSD95	“postsynaptic density protein 95 kDa”
PV	Parvalbumin
RACK1	“receptor for activated C-kinase”
RIM	„Rab3 interacting molecule 3“
SNAP25	„synaptosomal associated protein 25 kD“
SNARE	„soluble NSF attachment receptor“
STP	„short term plasticity“
T1	primärer auditorischer Kortex
T3	tertiärer auditorischer Kortex
TT2	Transparent Testa 2
TTX	Tetrodotoxin
VGAT	GABA-Transporter
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
ZNS	zentrales Nervensystem

7.2 Lebenslauf

7.3 Danksagung

7.4 Genehmigungsbescheid für Tierversuche



Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster • 48128 Münster

Gegen Empfangsbekanntnis

Herr
Prof. Dr. rer. nat. Hans – Christian Pape
Institut für Physiologie I und
Institut für Experimentelle Epilepsieforschung
Robert – Koch – Str. 27a

48149 Münster

Dienstgebäude:
Domplatz 6-7
48143 Münster
Telefon: 0251 411-0
Durchwahl: 411-2104
Telefax: 411-2115
Raum: C 211
Auskunft erteilt:
Herr Skoff
E-Mail:
Dez50@brms.nrw.de
Aktenzeichen:
50.0835.1.0 (G 53/2005)



September 2005

Tierschutz; Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Ihr Antrag vom 14.07.2005

G e n e h m i g u n g s b e s c h e i d

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Pape,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der zur Zeit gültigen Fassung (BGBl. I S. 1105, 1818) wird Ihnen die Genehmigung zur Durchführung des nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

" Neurophysiologische Korrelate von Furchtverhalten und Furchtgedächtnis in den Schaltkreisen Amygdala-Hippocampus-Präfrontaler Cortex"

Leiter des Versuchsvorhabens und sein Stellvertreter sind:

Herr
Prof. Dr. rer. nat. Hans-Christian Pape
Institut für Physiologie I und
Institut für Experimentelle Epilepsieforschung
Robert – Koch – Str. 27a
48149 Münster

Herr
Dr. rer. nat. Thomas Seidenbecher
Institut für Physiologie I
Robert – Koch – Str. 27a
48149 Münster

Diese Genehmigung gilt bis zum **30.09.2008**.

E-Mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de
Internet: www.bezreg-muenster.nrw.de
Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411 - 3300
ÖPNV - Haltestellen:
Domplatz, Linien 2, 10, 11, 12, 14, 20
Raphaelsklinik, Linien 2, 10, 11, 12 (Haus K)
Albrecht-Thaer-Straße, Linie 17 (Haus N)
Hauptbahnhof, ca. 100 m zu Fuß (Haus S)

Konten der
Landeskasse
BLZ: 400 000 00
Konto: 40 001 520
IBAN: DE34 4000 0000 0040
0015 20
BIC: MARKDEF1400

Deutsche Bundesbank
- Filiale Münster
400 500 00
61 820
DE65 4005 0000
0000 0618 20
WELADE3M

1/2

NRW.

BEZIRKSREGIERUNG MÜNSTER

Empfangsbekanntnis gemäß § 5 Absatz 2 VwZG

Aktenzeichen, Name	Datum	Anlagen
50.0835.1.0 (G 53/2005)	September 2005	Genehmigungsbescheid

Das o.a. Schreiben habe ich heute erhalten.

Ort, Datum

Unterschrift ggfls. Stempel des Empfängers

sofort zurück:

Bezirksregierung Münster
Dezernat 50
Zimmer C 211