

**Elektrophysiologische, molekularbiologische  
und verhaltensbiologische Untersuchungen zur Funktion von  
N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren  
bei Gehirnentwicklung und Lernvorgängen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

**Silke Hirsch**

geboren am 7. Mai 1979 in Mainz

Mainz, 2008

magistris

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einführung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Der neonatale zerebrale Kortex .....	2
1.1.1	<i>Kortexentwicklung</i> .....	2
1.1.2	<i>Subplattenzellen</i> .....	4
1.1.3	<i>Synchrone kortikale Netzwerkoszillationen während der Entwicklung</i> .....	5
1.1.4	<i>Elektrische Synapsen</i> .....	6
1.2	Der Hippocampus .....	7
1.2.1	<i>Funktionelle Anatomie des Hippocampus</i> .....	7
1.2.2	<i>Synaptische Plastizität</i> .....	8
1.2.3	<i>Einbettung der CA1-Neurone in hippocampale Schaltkreise</i> .....	9
1.3	NMDA-Rezeptoren.....	10
1.3.1	<i>Struktur und Funktion von NMDA-Rezeptoren</i> .....	10
1.3.2	<i>Eingangsspezifische NMDA-Rezeptoren</i> .....	13
1.3.3	<i>NMDA-Rezeptoren bei der Extinktion einer aversiven Erinnerung</i> .....	13
1.3.4	<i>Extinktion und PTSD</i> .....	15
1.4	Ziele dieser Arbeit .....	16
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden</b> .....	<b>17</b>
2.1	Versuchstiere .....	17
2.2	Gehirnpräparation .....	18
2.3	Elektrophysiologische Ableitungen.....	18
2.4	Extrazelluläre Stimulation .....	19
2.5	Einzelzell-Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) .....	19
2.6	Stereotaktische Operation zur Ausschaltung des NR1-Gens in CA1 .....	20
2.7	Verhaltensexperimente .....	21
2.7.1	<i>Lokomotorische Aktivität</i> .....	21
2.7.2	<i>Open Field</i> .....	21
2.7.3	<i>Hell/Dunkel-Kammer</i> .....	22
2.7.4	<i>Erhöhtes Kreuzlabyrinth. Elevated Plus Maze (EPM)</i> .....	22
2.7.5	<i>Schreckantwort und Präpuls-Inhibition</i> .....	22
2.7.6	<i>Soziale Interaktion</i> .....	23
2.7.7	<i>Schwimmzwang (Porsolt-Test)</i> .....	24
2.7.8	<i>Angstkonditionierung</i> .....	24
2.7.9	<i>Schmerzsensitivität</i> .....	25

2.8	Perfusion und Kryoschnitte .....	25
2.9	Immunocytochemie für Cre und $\beta$ -Galaktosidase .....	25
2.10	In-situ Hybridisierung für NR1 und nukleäre Gegenfärbung .....	26
2.11	Biocytin-Zellfärbung .....	26
2.12	Datenanalyse .....	27
2.13	Verwendete Chemikalien .....	27
2.14	Verwendete Lösungen .....	28
2.14.1	ACSF .....	28
2.14.2	Elektrodenlösungen .....	29
2.14.3	Anästhetika .....	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
3.1	Subplattenzellen sind direkt nach der Geburt elektrisch gekoppelt .....	30
3.2	Thalamo-kortikale und subplattinneninterne Afferenzen auf Neurone der Subplatte unterscheiden sich in ihren funktionellen Eigenschaften .....	31
3.2.1	<i>Subplattenzellen haben ein leicht depolarisiertes Ruhemembranpotenzial.</i> .....	31
3.2.2	<i>Afferenzen aus Thalamus und Subplatte innervieren ein Subplattenneuron sowohl proximal als auch distal.</i> .....	34
3.2.3	<i>Zeitnahe Aktivierung verschiedener Afferenzen ruft unterschiedliche Zellantworten im postsynaptischen Subplattenneuron hervor.</i> .....	36
3.2.4	<i>Der Subplatteneingang kann Paarpuls-Fazilitierung (PPF) zeigen.</i> .....	37
3.2.5	<i>Die thalamokortikale Verbindung hält einer repetitiven Stimulation nicht stand, sondern ermüdet.</i> .....	38
3.2.6	<i>Aus der Subplatte einlaufende Aktivität wird im postsynaptischen Neuron zeitlich summiert.</i> .....	40
3.2.7	<i>Überblick über die eingangsspezifischen funktionellen Eigenschaften der Subplattenaferenzen.</i> .....	42
3.3	Thalamokortikale und subplattinneninterne Afferenz unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten. ....	42
3.3.1	<i>Die Kinetik der NMDA-Rezeptor-vermittelten EPSCs unterscheidet sich zwischen thalamokortikaler und subplattinneninterner Afferenz</i> .....	43
3.3.2	<i>Die Spannungsabhängigkeit der NMDA-Rezeptor-vermittelten EPSCs unterscheidet sich zwischen thalamokortikaler und subplattinneninterner Afferenz.</i> .....	45
3.3.3	<i>Die eingangsspezifische Spannungsabhängigkeit der NMDA-Rezeptor-Ströme verschwindet innerhalb der ersten drei Tage. Die NMDA-Rezeptor-Untereinheit NR2D wird exprimiert.</i> .....	47

3.3.4	<i>Pharmakologisch unterscheiden sich NMDA-Rezeptor-vermittelte EPSCs von Neuronen der Subplatte nicht.</i> .....	49
3.4	CA1-Pyramidenzellen zeigen eine synapsenspezifische Verteilung der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten und dopaminerge Modulation. ....	50
3.4.1	<i>In CA1-Pyramidenzellen besitzen die Synapsen der Schaffer-Kollateralen NR2B-reichere NMDA-Rezeptoren als die des temporo-ammonischen Pfades.</i> 50	
3.4.2	<i>NR2B-vermittelte EPSCs werden in CA1-Pyramidenzellen durch Dopaminausschüttung potenziert.</i> .....	51
3.5	NMDA-Rezeptoren sind für die Extinktion einer aversiven Erinnerung wichtig. ....	52
3.5.1	<i>AAV-Cre Injektion in die CA1-Region des dorsalen Hippocampus von fNRI-Mäusen führt zu einem selektiven NMDA-Rezeptor-Genverlust.</i> .....	53
3.5.2	<i>In CA1-NMDA-Rezeptor-ko-Mäusen findet keine Extinktion einer aversiven Erinnerung statt.</i> .....	55
3.5.3	<i>Schockintensität und Umgebungsgestaltung beeinflussen das Angstverhalten beider Tiergruppen in gleicher Weise.</i> .....	58
3.5.4	<i>CA1-NMDA-Rezeptor-ko-Mäuse zeigen nach Angstkonditionierung Hyperaktivität und übersteigerte Ängstlichkeit.</i> .....	60
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>64</b>
4.1	Synchrone Netzwerkoszillationen während der Kortextwicklung.....	67
4.2	Eingangsspezifische funktionelle Eigenschaften von Subplatten-Afferenzen.....	68
4.3	Eingangsspezifische NMDA-Rezeptoren auf Subplattenzellen .....	70
4.4	Eingangsspezifische NMDA-Rezeptoren von CA1-Pyramidenzellen und ihre mögliche funktionelle Bedeutung.....	72
4.5	NMDA-Rezeptoren bei der Extinktion einer aversiven Erinnerung.....	73
4.5.1	<i>PTSD-Modell</i> .....	76
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>82</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>95</b>

# 1 Einführung

Die gegenwärtige Hirnforschung versucht zelluläre, molekular-biochemische und elektrophysiologische Prozesse bestimmten mentalen Leistungen, Fähigkeiten und Verhaltensweisen zuzuordnen. Die komplexe Struktur solcher Abläufe erfordert plastische Veränderungen des neuronalen Netzwerkes.

Im Zentralnervensystem der Vertebraten werden N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA)-Rezeptoren bei der erregenden Neurotransmission der meisten Synapsen aktiviert. Aufgrund ihrer einzigartigen Eigenschaften gelten diese Rezeptoren als Vermittler synaptischer Plastizität. Sie spielen daher eine besonders wichtige Rolle bei Lernvorgängen und während der Entwicklung. Die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren ist sowohl von der chemischen synaptischen Übertragung als auch von der elektrischen Aktivität der Neurone abhängig. In der Funktionsweise dieser Rezeptoren sind also zwei Prinzipien neuronaler Interaktion vereint: Elektrische und chemische Transmission beeinflussen NMDA-Rezeptoren gemeinsam.

Bei kognitiven Leistungen treten neuronale Aktivitäten hauptsächlich im zerebralen Kortex auf. Der Funktionsweise dieser Struktur gilt daher ein besonderes Forschungsinteresse. Um kortikale Mechanismen und ihre Bedeutungen aufzuklären, ist es zunächst sinnvoll, die ontogenetische Entwicklung des Kortex zu verfolgen.

Für unsere Fähigkeit zu lernen und uns an Gelerntes zu erinnern, ist ein intakter Hippocampus nötig. Neuronale Vorgänge in dieser Hirnregion sind zentraler Gegenstand der Gedächtnisforschung.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle von NMDA-Rezeptoren von *Mus musculus* (Linné) während der zerebralen Ontogenese sowie bei spezifischen Lernvorgängen. Mittels elektrophysiologischer, molekularbiologischer, histologischer, pharmakologischer, genetischer, neurochirurgischer und verhaltensbiologischer Methoden wurden die Funktionen der NMDA-Rezeptoren im neonatalen Kortex sowie im adulten Hippocampus der Maus untersucht.

## 1.1 Der neonatale zerebrale Kortex

### 1.1.1 Kortexentwicklung

Der Neokortex der Säuger ist eine evolutionär junge Entwicklung des Telencephalons. Beim Menschen bildet er durch Auffaltung den größten Teil der Hirnoberfläche und erreicht die höchste zytoarchitektonische Komplexität (Krubitzer, 2007). Struktur und Funktion kortikaler Zellen und ihrer Verbindungen stehen im Zentrum langjähriger Hirnforschung (Überblick bei Bystron et al., 2008). Die evolutionäre Expansion des Kortex wurde nach Supèr und Uylings (2001) durch seine spezifische ontogenetische Entwicklung möglich.

Die Ontogenese des Neokortex (Abb. 1) beginnt mit der Proliferation und symmetrischen Teilung neuronaler und glialer Vorläuferzellen in der (Sub-)Ventricularzone (Boulder Committee, 1970). Einige postmitotische Zellen differenzieren sich zu Pionierneuronen und migrieren entlang radialer Gliazellen (Berry und Rogers, 1965) zur kortikalen Oberfläche, wo sie die Präplatte bilden (Marin-Padilla, 1971; Rickmann et al., 1977).

Die nächste Migrationswelle teilt die Präplatte in äußere Marginalzone und tiefgelegene Subplatte (Kostovic und Rakic, 1980). In der Subplatte findet man sehr früh, ab dem zwölften Embryonaltag (E12,5), zu funktionellen Neuronen differenzierte, bi- und multipolare, meist horizontal liegende Zellen, die sogenannten Subplattenzellen. Diese zählen neben den in der Marginalzone befindlichen Cajal-Retzius-Zellen zu den als erstes generierten Neuronen (Kostovic und Rakic, 1980).

Pyramidenzellen und andere kortikale Neurone wandern in Schüben durch tangentielle und radiale Migration in den Bereich zwischen Marginalzone und Subplatte ein und bilden die Kortikale Platte (Aboitiz et al., 2005). Dabei bleiben die radial einwandernden Pyramidenzellen oberhalb der Kortikalen Platte an der Grenze zur Marginalzone liegen. So formt sich zuerst Schicht VI. Die später generierten Zellen wandern durch Schicht VI hindurch zur pialen Oberfläche und bilden Schicht V. Während der Entwicklung werden also die innersten Schichten zuerst gebildet. Durch dieses „inside-out“ -

Entstehungsmuster, das für den Säugerkortex spezifisch ist, befinden sich die ältesten Zellen in den innersten Schichten (Angevine und Sidman, 1961; Parnavelas, 2000).

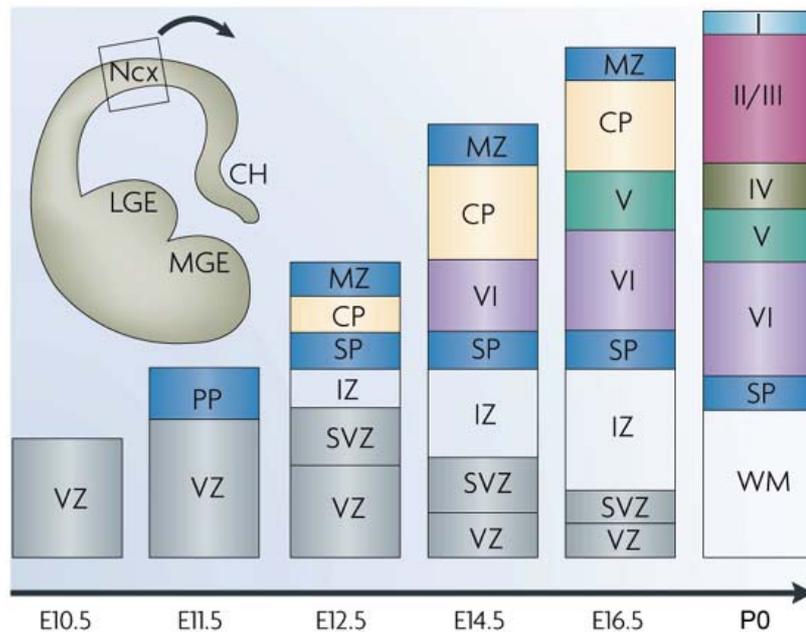


Abb. 1. **Ontogenese des Säugerkortex.** Die schematische Darstellung zeigt Entwicklungsschritte des Neokortex der Maus von Embryonaltag 10,5 bis zum Tag der Geburt, P0. Die nach dem elften Embryonaltag sich absondernde Präplatte (PP) teilt sich zunächst in Subplatte (SP) und Marginalzone (MZ). Die dazwischenliegende Kortikale Platte (CP) differenziert sich immer weiter aus und bildet nach der „inside-out“ Weise schließlich den 6-schichtigen Kortex.

Abkürzungen: **CH:** Kortexsaum, **CP:** Kortikale Platte, **E:** Embryonaltag, **Ncx:** Neocortex, **IZ:** Intermediärzone, **LGE:** Lateraler Ganglionhöcker, **MGE:** Medialer Ganglionhöcker, **MZ:** Marginalzone, **PP:** Präplatte, **SP:** Subplatte, **SVZ:** Subventrikularzone, **VZ:** Ventrikularzone, **WM:** Weiße Substanz, **I-VI:** Kortexschichten 1-6. Nach Molyneaux et al. (2007), verändert.

In den ersten Tagen (Nager) bzw. Wochen (Mensch) nach der Geburt gehen die Zellen der Marginalzone sowie der Subplatte zugrunde oder werden zu anderen Neuronen transformiert (eine Übersicht geben Supèr et al., 1998). Beim Menschen scheinen 80% der Subplattenzellen durch programmierten Zelltod (Apoptose) zu zerfallen. Die übrigen verbleiben in der weißen Substanz (Luskin und Shatz, 1985; Kostovic und Rakic, 1990). Beim Nager wird vermutlich ein Großteil der Subplattenzellen in Schicht VIb inkorporiert (Valverde et al., 1989; Uylings et al., 1990). Das vermeintliche Verschwinden der Subplatte ist hier wohl eher durch den Verlust spezifischer immuno-

zytochemischer Marker zu erklären als durch Degeneration der Neurone selbst (Robertson et al., 2000). Doch gibt es auch im Nagerkortex Hinweise auf apoptotische Subplattenzellen (Allendoerfer und Shatz, 1994). Bei diesem Prozess spielt die elektrische Aktivität im Kortex eine entscheidende Rolle (Heck et al., 2007).

### *1.1.2 Subplattenzellen*

Die Subplatte ist offenbar essentiell für eine gesunde Kortexentwicklung. Beim Menschen verursacht ihr Fehlen schwere kognitive Defekte (McQuillen und Ferriero, 2005). Säuger wie Maus, Ratte, Katze und Affe bilden nur bei intakter Subplatte Okulardominanzsäulen im visuellen Kortex aus (Ghosh und Shatz, 1992; Kanold et al., 2003). In der prä- und frühen postnatalen Phase hat die Subplatte exzitatorischen Einfluss auf den Kortex (Friauf und Shatz, 1991). Später ist sie an der Etablierung eines funktionellen Inhibitionssystems beteiligt, indem über die subplattengesteuerte Hochregulation bestimmter GABA<sub>A</sub>-Rezeptorgene eine schnelle GABAerge Transmission im Kortex heranreifen kann (Kanold und Shatz, 2006). Darüber hinaus beschleunigt die Subplatte den Übergang von exzitatorisch zu inhibitorisch wirkendem GABA durch die Expressionsregulation des Chloridtransporters KCC2 (Kanold und Shatz, 2006).

Neurone der Subplatte zeichnen sich aus durch ihre heterogene Morphologie (Valverde et al., 1989; Hanganu et al., 2002), ihre reifen elektrophysiologischen Eigenschaften (Luhmann et al., 2003) sowie ihre Neuromodulatoren und Wachstumsfaktoren (Wahle und Meyer, 1987; Kowall et al., 1993; Sarnat und Flores-Sarnat, 2002). Sie sind in transiente, aber gut ausgebildete Netzwerke integriert und bekommen synaptische Eingänge aus dem Thalamus, dem sich entwickelnden Kortex sowie von anderen Subplattenzellen (Hanganu et al., 2002). Sie bilden erste Synapsen mit den in den Kortex einwandernden thalamischen Axonen (Ghosh und Shatz, 1992) bevor diese zu Schicht IV migrieren (Friauf et al., 1990; Herrmann et al., 1994).

Während anfangs hauptsächlich das genetische Programm die Entwicklungsschritte steuert, gewinnt mit zunehmender Reife neuronale Aktivität an Bedeutung (Goodman und Shatz, 1993). Thalamische Axone folgen zunächst molekularen Markern (Rakic, 1988). Aber die Feinabstimmung ihrer Synapsenbildungen in der perinatalen Phase ist

aktivitätsabhängig (Katz und Shatz, 1996). Darüber hinaus scheinen Subplattenzellen thalamische Axone in ihrem Wachstum zu leiten (Molnár und Blakemore, 1995). Insbesondere NMDA-Rezeptoren spielen eine bedeutende Rolle bei der aktivitätsabhängigen Bildung neuronaler Netzwerke (Cull-Candy et al., 2001). NMDA-Rezeptorblockade zerstört die Bildung korrekter thalamokortikaler Verbindungen und kortikaler Kolumnen (Fox et al., 1996; Lee et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels elektrophysiologischer Experimente an neonatalen Subplattenzellen die funktionellen Eigenschaften der thalamokortikalen sowie der subplatteninternen Afferenz auf Neurone der Subplatte charakterisiert (siehe Kapitel 3.2).

### *1.1.3 Synchroner kortikale Netzwerkoszillationen während der Entwicklung*

Im unreifen Kortex findet sich schon in frühen Entwicklungsstadien, lange bevor er unter sensorischem Einfluss steht, synchrone (oszillatorische) Aktivität der Nervenzellen einer Kolumne. Dies ist für eine gesunde Weiterentwicklung des neuronalen Netzwerkes wichtig (Übersicht in Khazipov und Luhmann, 2006). Oszillationen treten entweder spontan (Garaschuk et al., 2000) oder durch Aktivierung verschiedener Neurotransmittersysteme auf (Peinado, 2000). Sie können mehrere Sekunden andauern und bestehen hauptsächlich aus Frequenzen des  $\alpha$ - und  $\beta$ -Bereichs von 10-20 Hz (Khazipov und Luhmann, 2006). Oszillatorische Aktivität in diesem Frequenzbereich schafft möglicherweise besonders günstige Bedingungen für die Bildung neuronaler Netzwerke und synaptischer Plastizität (Traub et al., 2004).

Nach der ersten postnatalen Woche werden kortikale Oszillationen von einem NMDA-Rezeptor-abhängigen Prozess generiert (Dupont et al., 2006). Zu diesem Entwicklungszeitpunkt ist die Subplatte bereits verschwunden. Sie aber ist für die Entstehung oszillatorischer Aktivitätsmuster im jüngeren Tier, direkt nach der Geburt, verantwortlich (Dupont et al., 2006). Möglicherweise wird die neuronale Aktivität zu dem frühen Entwicklungszeitpunkt ebenfalls über NMDA-Rezeptoren oder aber über elektrische Synapsen synchronisiert. Dies wurde mittels gepaarter Ableitungen in Kapitel 3.1 untersucht.

#### 1.1.4 Elektrische Synapsen

Elektrische Synapsen bestehen aus zwei sich in den Membranen benachbarter Zellen gegenüberliegenden Hemikanälen, welche aus je sechs Connexin-Proteinen bestehen. Sie formen unselektive Poren von ca. 1,2 nm Ø und einer elektrischen Leitfähigkeit von 10-300 pS, abhängig von der Connexinzusammensetzung. Die Poren sind permeabel für kleine Moleküle (<1kDa) wie cAMP, IP<sub>3</sub>, Glukose, langkettige Alkohole und Farbstoffe wie Biocytin oder Luzifer Yellow (Veenstra, 1996).

Man kennt 20 verschiedene Connexine, die sowohl Homo- als auch Heterokanäle bilden (Söhl und Willecke, 2004). Durch alternatives Splicen (Willecke et al., 2002) erhöht sich die Anzahl möglicher Kanalzusammensetzungen, deren Eigenschaften man noch nicht genau kennt (Yeager und Harris, 2007). Bekannt sind Spannungsabhängigkeiten (Bennett et al., 1993) und die Eigenschaften eines Tiefpassfilters (Galarreta und Hestrin, 1999; Landisman et al., 2002). Einzelne Connexine können über einen Zeitraum von nur wenigen Stunden bestehen oder das ganze Leben erhalten bleiben, wie die in der Linse unseres Auges (Mathias et al., 2007).

Connexine kommen in den meisten Geweben vor. In Herz und Haut verursachen Mutationen schwerwiegende Krankheiten (Moshal et al., 2007; Mese et al., 2007). Im Nervengewebe findet man das neuronspezifische Connexin Cx36 (Condorelli et al., 1998; Condorelli et al., 2003). Das zuerst in der Retina entdeckte Protein bildet elektrische Synapsen, welche eine nur schwache Spannungsabhängigkeit und mit 10-15 pS die kleinste Einzelkanalleitfähigkeit besitzen (Cook und Becker, 1995). Die Expressionsstärke von Cx36 erreicht im Nagergehirn in der zweiten Lebenswoche ihr Maximum und fällt daraufhin wieder ab (Prime et al., 2000).

Im Gegensatz zu chemischer Übertragung ist elektrische Kopplung zwar direkt und schnell, da keine Verzögerung durch den Signaltransduktionsprozess entsteht. Aber sie scheint nur bedingt modulierbar zu sein. Allerdings nehmen Phosphorylierung und pH-Wert Einfluss auf *gap junction*-Öffnungen (Connors und Long, 2004). Stickstoffmonoxid (Yang und Hatton, 1999) und verschiedene Neurotransmitter modulieren *gap junctions* über einen cGMP-abhängigen Mechanismus (Rörig und Sutor, 1996a).

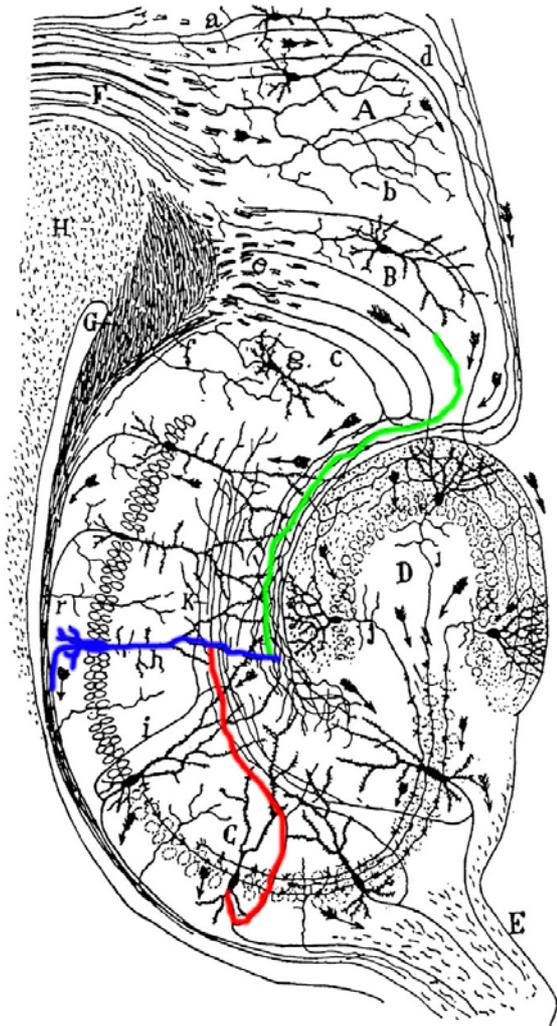
Osmolaritätsänderungen beeinflussen Farbstoffkopplung zwischen Neuronen als Indiz für vorhandene *gap junctions* (Cobbett und Hatton, 1984). Neuerdings mehren sich sogar Zeichen für aktivitätsabhängige Modulationen elektrischer Synapsen (Pereda et al., 2004; Landisman und Connors, 2005). In der direkten und schnellen Übertragung liegt ihre Fähigkeit, die Aktivität von Neuronen zu synchronisieren (Bennett und Zukin, 2004). Dies spielt vor allem während der Entwicklung eine große Rolle (Rörig und Sutor, 1996b; Kandler und Katz, 1998; Sun und Luhmann, 2007).

## 1.2 Der Hippocampus

### 1.2.1 Funktionelle Anatomie des Hippocampus

Der Hippocampus zählt zu den evolutionär ältesten Hirnregionen. Er ist Teil des limbischen Systems, liegt dem Neokortex an und hat eine gebogene Form. Innerhalb des Hippocampus sind die Neurone in charakteristischer Schichtung angeordnet (Abb. 2). Man unterscheidet den *Gyrus dentatus* mit seinen dichtgepackten Granulazellen vom *Cornu Ammonis*, das die CA-Pyramidenzellen enthält und in das *Subiculum* übergeht, welches schließlich in den *entorhinalen Kortex* mündet. Synaptischen Eingang erhält der Hippocampus hauptsächlich aus dem entorhinalen Kortex. Temporo-ammonische Fasern des *Tractus perforans* (Abb. 2 grün) bilden Synapsen mit distalen Dendriten der CA1-Pyramidenzellen und innervieren die Neurone des Gyrus dentatus. Diese wiederum stehen über ihre Moosfasern mit CA3-Zellen in Verbindung, welche über Schaffer-Kollaterale (Abb. 2 rot) ebenfalls die CA1-Zellen innervieren. Beide Hauptpfade (Schaffer-Kollaterale und Tractus perforans) nehmen ihren Ursprung im entorhinalen Kortex. Doch während der temporo-ammonische Pfad direkt Synapsen mit dem distalen CA1-Dendritenbaum bildet (monosynaptischer Bogen), projiziert der andere über Granulazellen des Gyrus dentatus und CA3-Pyramidenzellen, indirekt auf den proximalen Dendritenbaum desselben CA1 Neurons (trisynaptischer Bogen). Im letztgenannten Pfad wird Information erheblich stärker prozessiert (Kandel et al., 2000).

Abb. 2. Schematischer Querschnitt durch den Hippocampus der Maus. Relevante Teile: A: Entorhinaler Kortex. B: Subiculum. C: Cornu Ammonis (CA1-CA3). D: Gyrus Dentatus. Blau: CA1-Pyramidenzelle (nur ein apikaler Dendrit ist hervorgehoben). Rot: Schaffer-Kollaterale (Axon einer CA3-Pyramidenzelle); bildet Synapsen mit CA1-Neuronen an proximalen Dendriten im *Stratum radiatum*. Grün: Temporo-ammonische Faser des *Tractus perforans* aus dem entorhinalen Kortex stammend; bildet Synapsen mit CA1-Neuronen an distalen Dendriten im *Stratum lacunosum-moleculare*. Nach Cajal, 1911, verändert.



### 1.2.2 Synaptische Plastizität

CA3-CA1-Synapsen waren die ersten, an denen das Phänomen der Langzeit-Potenzierung (LTP) beschrieben wurde (Bliss und Lomo, 1970).

Repetitive hochfrequente Reizung verändert diese Synapsen langfristig über Stunden oder sogar Tage, indem sich deren synaptische Effizienz den Stimuli anpasst. Langzeitpotenzierung synaptischer Transmission im Hippocampus ist das führende experimentelle Modell für zelluläre Veränderungen, welche Lern- und Gedächtnisprozessen zugrunde liegen könnten (Malenka und Nicoll, 1999). Da im Gegensatz zu anderen mentalen Vorgängen wie Denken und Bewusstsein dieses Phänomen einer molekularzellulären Analyse zugänglich ist, steht es im zentralen Interesse neurowissenschaftlicher Forschung (Cajal, 1911; Eichenbaum, 2004). Die Gleichsetzung von synaptischer Plastizität mit Gedächtnis wird allerdings kontrovers diskutiert (Neves et al., 2008).

Läsionen des Hippocampus führen zu Gedächtnisverlusten. Berühmt geworden ist der Patient H. M., der seit der operativen Entfernung seines Hippocampus vor über 20 Jahren (wegen schwerer, pharmakologisch unbeeinflussbarer Epilepsie) an einem

charakteristischen Gedächtnisdefizit mit schwerer anterograder Amnesie leidet. Er kann keine Inhalte aus dem Arbeitsgedächtnis in das Langzeitgedächtnis mehr übertragen, alte Erinnerungen aber sind intakt (Corkin et al., 1984; Corkin, 2002). Offensichtlich ist der Hippocampus, im Zusammenspiel mit dem Neokortex, bei der Gedächtniskonsolidierung, der Überführung von Gedächtnisinhalten aus dem Kurz- in das Langzeitgedächtnis, von großer Bedeutung (Wiltgen et al., 2004). Insbesondere hippocampale NMDA-Rezeptoren scheinen an vielen Gedächtnisprozessen beteiligt zu sein (Nakazawa et al., 2004). Die in CA1-Synapsen auftretende LTP ist vornehmlich NMDA-Rezeptor-abhängig und vermutlich postsynaptischen Ursprungs (Corkin et al., 1984; Nicoll und Malenka, 1999; Corkin, 2002). Hippocampale NMDA-Rezeptoren sind wichtig für das räumliche Gedächtnis (Nakazawa et al., 2004) und die Extinktion aversiver Erinnerungen (Maren und Quirk, 2004). Jedoch spielen die Subregionen des Hippocampus und deren NMDA-Rezeptoren bei verschiedenen Lern- und Gedächtnisleistungen unterschiedliche Rollen (Kesner et al., 2005; Kesner, 2007a; Kesner, 2007b).

### 1.2.3 Einbettung der CA1-Neurone in hippocampale Schaltkreise

Kleine Veränderungen im gelernten Umfeld erzeugen ein sogenanntes „remapping“ des Aktivitätsmusters in CA3-Neuronen. (Lever et al., 2002; Leutgeb et al., 2004). Interessanterweise führen kleine Umfeldveränderungen verzögert auch zu Änderungen der CA1-Aktivität, welche den CA3-Ensembles nachgeschaltet ist. Das könnte ein unabhängiger Vorgang sein, der durch die Eingänge des temporo-ammonischen Pfades auf CA1-Zellen herrührt (Fyhn et al., 2004). Aber es wurde beobachtet, dass sich CA1-Ensembles auch dann verändern, wenn dieser Eingang konstant bleibt (Fyhn et al., 2004; Leutgeb et al., 2005). Daher muss es als wahrscheinlich angesehen werden, dass sich die Eigenschaften anderer Eingänge auf CA1-Zellen verändern, allen voran die der Schaffer-Kollateralen, von CA3-Zellen herkommend.

CA1-Pyramidenzellen erhalten synaptischen Eingang aus hauptsächlich zwei Regionen. Die temporo-ammonischen Fasern, die aus dem entorhinalen Kortex stammen, bilden Synapsen mit distalen Bereichen der apikalen CA1-Dendriten, im *Stratum lacunosum-moleculare*. Dagegen projizieren Schaffer-Kollateralen, von CA3-Pyramidenzellen herkommend, auf die proximalen Dendriten der CA1-Neurone, im *Stratum radiatum*.

Viele Membranproteine zeigen ein spezifisches Verteilungsmuster auf CA1-Dendriten: z.B. spannungsgesteuerte Calcium- und Natriumkanäle (Magee und Johnston, 1995), metabotrope Glutamatrezeptoren (Blümcke et al., 1996) und NMDA-Rezeptoren (Arrigoni und Greene, 2004). Dies könnte wichtig sein für Funktion und Plastizität des Neurons (Johnston et al., 2003).

## 1.3 NMDA-Rezeptoren

### 1.3.1 Struktur und Funktion von NMDA-Rezeptoren

Der N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor ist ein Glutamat-gesteuerter Kationenkanal. Er befindet sich in der Zellmembran nahezu jeder zentralen Nervenzelle und ist an der erregenden Signaltransduktion beteiligt (Kandel et al., 2000). Die Aminosäure N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) aktiviert NMDA-Rezeptoren selektiv durch kompetitive Bindung an die Glutamat-Bindestelle. Neben Glutamat und NMDA können zahlreiche Substanzen die Rezeptoren direkt durch Bindung an diverse, z.T. noch unbekannte Bindestellen modulieren (Abb. 3 zeigt eine Auswahl). Da Glycin als Koaktivator fungiert, muss die Glycin-Bindestelle besetzt sein, um den Rezeptorkanal zu öffnen (Kleckner und Dingledine, 1988). In der Regel zeigen NMDA-Rezeptoren eine ausgeprägte Spannungsabhängigkeit. Ein Magnesiumatom blockiert sie bei negativem Membranpotenzial fast vollständig. Erst wenn die Zelle depolarisiert, wird die Magnesiumblockade aufgehoben und monovalente Kationen können durch den Kanal strömen (Mayer et al., 1984).

Es gibt verschiedene Subtypen des NMDA-Rezeptors, die sich in ihrer Untereinheitenzusammensetzung unterscheiden. Wahrscheinlich sind alle NMDA-Rezeptoren aus vier Untereinheiten aufgebaut, unter denen mindestens eine NR1-Untereinheit sein muss, um einen funktionellen Rezeptor zu bilden. Die weiteren können variieren (Atlason et al., 2007). Neben der essentiellen NR1 und der optionalen NR3 Untereinheit gibt es offenbar in jedem NMDA-Rezeptor die seine funktionellen Eigenschaften determinierenden NR2 Untereinheiten (Dingledine et al., 1999). Man unterscheidet NR2A, B, C und D.

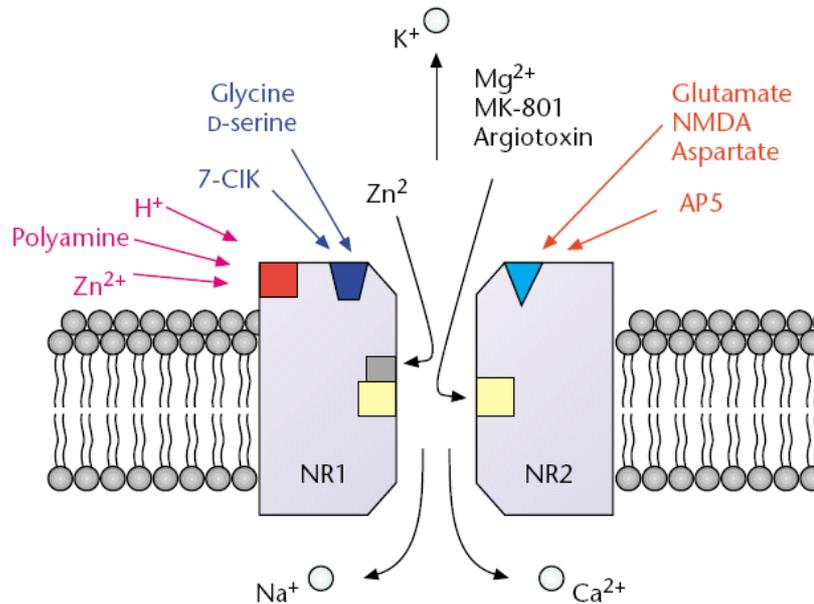


Abb. 3. **Schema eines NMDA-Rezeptors.** Zwei sich gegenüberliegende Untereinheiten (NR1 und NR2) sind membranspannend dargestellt. Sie besitzen viele Bindestellen für unterschiedliche Substanzen. Glutamat bindet an NR2, Glycin an NR1. Magnesium blockiert bei niedrigen Membranpotentialen den Rezeptor in der Porenregion. Im geöffneten Zustand ist der Kanal permeabel für Kationen. Aus: Cull-Candy und Brickley, 2001.

Von den Untereinheiten und ihren Subtypen existieren in der Zelle mehrere Splicevarianten: NR1-1a, -1b, -2a, -2b, -3a, -3b, -4a, -4b; NR2B-1, -2, NR2C-1a, -1b, -1c, -1d, -2, -3, -4, NR2D-1, -2, -3; NR3A-1, -2. Dies erhöht die Anzahl der möglichen Rezeptorsubtypen. Hinweise auf triheteromere NMDA-Rezeptoren mehren sich (Buller et al., 1994; Kew et al., 1998; Tovar und Westbrook, 1999; Pina-Crespo und Gibb, 2002; Schuler et al., 2008). NMDA-Rezeptoren finden sich post- und perisynaptisch an glutamatergen Synapsen. NR2D-haltige sind offenbar extrasynaptisch (Brickley et al., 2003; Lozovaya et al., 2004).

Eine Untereinheit des NMDA-Rezeptors besteht aus einem membranspannenden Protein mit extrazellulärem N-Terminus und intrazellulärem C-Terminus. Die zweite der vier Transmembran-Domänen ist genaugenommen nicht membranspannend, sondern bildet eine intramembranäre Schleife, welche im Tetramer die Pore formt (Abb. 4).

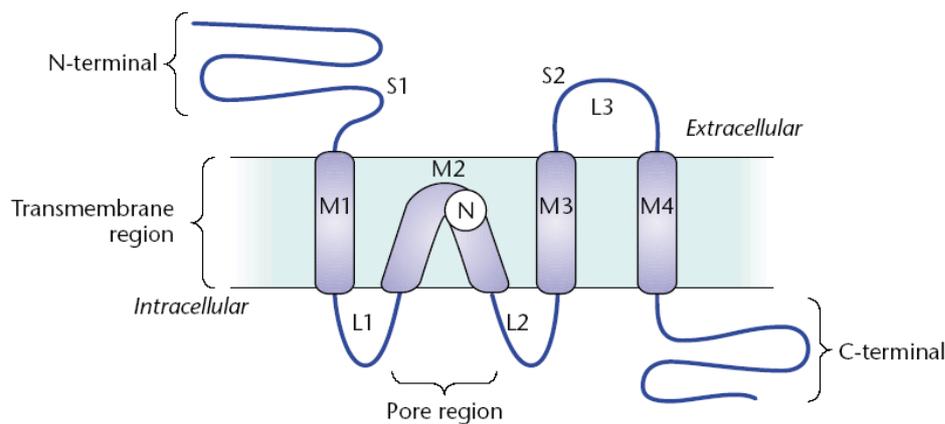


Abb. 4. **Schematischer Aufbau einer NMDA-Rezeptor-Untereinheit:** extrazellulärer N-Terminus; vier Membranregionen (M1-4), verbunden mit zwei intrazellulären Schleifen (L1 und L2) und einer extrazellulären Schleife (L3); intrazellulärer C-Terminus. Auf N-Terminus und L3 liegen bei NR2 die Glutamatbindestellen S1 und S2. Die Porenregion formt M2, wobei besonders das Stickstoffatom (N) von Bedeutung ist. Aus: Cull-Candy und Brickley 2001.

Betrachtet man klonierte Rezeptoren funktionell, so lassen sich die verschiedenen NR2 Untereinheiten anhand von Einzelkanalleitfähigkeit, EPSC-Kinetik (= Zeitverlauf des exzitatorischen postsynaptischen Stromes), Pharmakologie und Magnesiumsensitivität unterscheiden (Dingledine et al., 1999; Cull-Candy et al., 2001).

NR2B-reichen Rezeptoren misst man aufgrund ihrer hohen Calciumpermeabilität eine besondere Rolle bei neuronaler Plastizität zu (Dingledine et al., 1999). Diese werden in frühen Entwicklungsstadien exprimiert (Laurie et al., 1997). Wenige Tage nach der Geburt verschiebt sich das Gleichgewicht bei Nagern zugunsten von NR2A (Scheetz und Constantine-Paton, 1994). Dieser Vorgang könnte zur Präzisierung der Informationsverarbeitung beitragen (Flint et al., 1997).

Der NMDA-Rezeptor wird, neben seiner Aktivierung durch Glutamat in Anwesenheit von Glycin, durch andere Neurotransmittersysteme moduliert (Übersicht in Marino und Conn, 2002). Dopaminrezeptoren vom Typ D1/5 können über Protein-Protein-Interaktion direkt mit der NR2A-Untereinheit des NMDA-Rezeptors in Kontakt treten und das dopaminerge System ist in der Lage, NMDA-Rezeptor-Ströme sowohl zu erhöhen als auch zu erniedrigen (Lee et al., 2002).

### 1.3.2 Eingangsspezifische NMDA-Rezeptoren

Nicht nur die ontogenetisch differenzielle Regulation verschiedener NMDA-Rezeptor-Untereinheiten (Scheetz und Constantine-Paton, 1994) spricht für funktionelle Unterschiede der verschiedenen NMDA-Rezeptoren im Nervensystem. Zudem gibt es bei einigen Neuronen Hinweise auf eine zelluläre Eingangsspezifität für NMDA-Rezeptor-Subtypen (Hanganu et al., 2002; Kumar und Huguenard, 2003; Arrigoni und Greene, 2004). Das bedeutet, dass an den verschiedenen Synapsen einer einzelnen Zelle NMDA-Rezeptoren sitzen, die sich je nach Affferenz unterscheiden. CA1-Pyramidenzellen im Hippocampus der Ratte besitzen an ihren Synapsen mit Schaffer-Kollateralen NR2B-reiche Rezeptoren, während an den Synapsen des Tractus perforans NR2A vorherrscht (Arrigoni und Greene, 2004).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich die Synapsen der Subplattenzellen (siehe Kapitel 3.3) bzw. der CA1-Pyramidenzellen der Maus (siehe Kapitel 3.4) eingangsspezifisch hinsichtlich ihrer Zusammensetzung der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten unterscheiden. Schaltkreise und neuronale Interaktionen im Hippocampus sind sehr gut untersucht. Das ermöglicht zudem die Suche nach physiologischen Bedeutungen der differentiellen (sub)zellulären Verteilung von NMDA-Rezeptoren. Das dopaminerge System beeinflusst NMDA-Rezeptoren eventuell subtyp-spezifisch (Lee et al., 2002). Die dopaminerge Modulation von NMDA-Rezeptor-Signalen in CA1-Zellen wurde daher im Zusammenhang mit deren molekularer Ausstattung untersucht.

### 1.3.3 NMDA-Rezeptoren bei der Extinktion einer aversiven Erinnerung

Nager, wie Ratten und Mäuse, zeigen ein charakteristisches Verhalten, wenn sie geängstigt sind, das sogenannte „freezing“. Dabei sitzt das Tier unbeweglich, hebt weder Kopf noch Bein und schnüffelt nicht. Das *freezing*-Verhalten ist von jedem anderen, wie Explorieren, Putzen, Fressen, Schlafen gut zu unterscheiden. Da dieses Angstverhalten bei Mäusen und Ratten eindeutig zu beobachten ist, etablierte sich die Angstkonditionierung als grundlegende Untersuchungsmethode in der Verhaltensbiologie. Die Gesamtdauer an „freezing“, die innerhalb eines vorgegebenen Zeitraums beobachtet wird, dient als Maß für die Stärke der Angst.

Nach der klassischen Untersuchungsmethode wird Angst durch elektrische Stromschläge hervorzurufen, die das Tier an seinen Füßen erfährt. Die Stromstärke wird so eingestellt, dass sie nicht gesundheitsschädlich, aber unangenehm ist. Das Tier lernt schnell die Box zu fürchten, in der es die Stromschläge erhält (Akquisition). Seine Angst ist kontextspezifisch und, je nach Versuchsdurchführung, hippocampusabhängig (Rudy et al., 2004). Blockade der NMDA-Rezeptor-Funktion im gesamten Hippocampus beeinträchtigt das Erlernen dieser Aufgabe (Bardgett et al., 2003). Beobachtet man nun aber das Verhalten eines dressierten Tieres über einen längeren Zeitraum von mehreren Tagen, während man es in regelmäßigen Abständen derselben Box aussetzt, ohne Stromstöße zu applizieren, so verzeichnet man eine graduelle Abnahme der Angst. Sie nähert sich einem Grenzwert, der zwar über dem Ausgangsstatus liegt, jedoch über lange Zeit, z.T. lebenslang, konstant bleibt. Dieser Vorgang wird als „Extinktion“ der Angsterinnerung bezeichnet und muss als Neulernen der Beurteilung „nicht mehr gefährlich“ interpretiert werden und nicht als Vergessen. Denn nach einem milden Stromschlag geringer Stärke, welcher im undressierten Tier kein „freezing“ auslöst („reminder shock“), tritt die Angst abrupt in voller Stärke wieder auf („reinstatement“).

Seit Pavlov (1927) weiß man, dass die alleinige Präsentation eines konditionierten Stimulus (Kontext) – ohne Präsentation des unkonditionierten Stimulus (Stromschlag) – Extinktion generiert. Aber die neuronalen Vorgänge beim Extinktionsprozess sind noch weitgehend unverstanden. Das gesonderte Untersuchen von Extinktion setzt ein normales Erlernen voraus. Die verschiedenen Felder des Hippocampus spielen bei Gedächtnisvorgängen unterschiedliche Rollen (Daumas et al., 2005). Lee und Kesner (2004) haben gezeigt, dass CA1-Läsionen die Akquisition nicht beeinflussen müssen. Allerdings entwickeln diese Tiere innerhalb von 48 Stunden nach der Dressur unspezifische Gedächtnisdefizite. Eine NMDA-Rezeptor-Dysfunktion in CA3-Pyramidenzellen beeinträchtigt auch nicht das initiale Erlernen, aber doch die Kontextrepräsentation kurz danach (Cravens et al., 2006) und vereitelt somit eine Untersuchung von Extinktion.

#### 1.3.4 Extinktion und PTSD

Extinktion ist auch beim Menschen ein wichtiger mentaler Vorgang. Fehlt er, können Krankheiten wie das posttraumatische Stresssyndrom (PTSD) entstehen (Liberzon und Sripada, 2008). Angststörungen erregen gegenwärtig große öffentliche Aufmerksamkeit, besonders in den USA aufgrund ihrer PTSD-gefährdeten Soldaten aus dem Irakkrieg (Vieweg et al., 2006). Aber auch im deutschsprachigen Raum mehrt sich die Literatur über derartige psychische Störungen (Möller et al., 1999; Morschitzky, 2004). Den Begriff PTSD prägten amerikanische Psychologen als Konsequenz aus ihrer Arbeit mit Vietnamkriegsveteranen und von häuslicher Gewalt betroffenen Frauen (Herman, 1992).

Patienten, die unter einer Angststörung leiden, haben nicht selten ein traumatisches Erlebnis gehabt, über das sie nicht hinwegkommen können. Sie erleben es wieder und wieder in ungeminderter Intensität, können nicht zwischen damaliger und heutiger Situation unterscheiden und entwickeln in der Folge häufig andere psychische Störungen wie etwa Depressionen (Vieweg et al., 2006).

Neben den genannten Symptomen, welche die neuere Literatur als fehlende Extinktion diskutiert (Heldt et al., 2007; Liberzon und Sripada, 2008), treten Übererregbarkeit, Schreckhaftigkeit und soziale Kontaktprobleme auf (siehe Symptomkataloge DSM-IV und ICD-10). Behandelt werden posttraumatische Angststörungen mit der Expositionstherapie, einer Gesprächstherapie, bei welcher der Patient sich unter Aufsicht an die traumatische Situation erinnern soll, um dabei gezielt intervenieren zu können (McNally, 2007). Leider ist diese Therapie häufig nicht erfolgreich. Diskutiert wird über den besten Zeitpunkt der Intervention (Maren und Chang, 2006), sowie über die Bedingungen, unter denen sie überhaupt angebracht ist (Foa und Meadows, 1997).

Bei Patienten mit Angststörungen tritt häufig eine Reduktion des Hippocampus-Volumens auf (Sapolsky, 2001). Dem scheint eine veränderte Stressphysiologie zugrunde zu liegen (Yehuda, 2001). Bei der Entstehung solcher Krankheiten sind genetische und epigenetische Faktoren beteiligt (Yehuda und LeDoux, 2007). Stärke des Traumas, soziale und psychologische Betreuung danach und sogar genetische Prädispositionen sind als Einflussfaktoren bekannt (Bisson, 2007). Die molekularen Komponenten aber kennt man noch nicht. Ein Verständnis der neuronalen Mechanismen, die zu Angststörungen führen, wird helfen, geeignete Therapieansätze zu finden.

Dazu wird ein Tiermodell benötigt, mit dem die Auswirkungen des Fehlens von Extinktion untersucht werden können (siehe Kapitel 3.5).

#### **1.4 Ziele dieser Arbeit**

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit folgenden Fragestellungen der Hirnforschung unter besonderer Berücksichtigung der NMDA-Rezeptor-Funktion bei Kortextentwicklung und Lernvorgängen der Maus:

1. Wie erzeugt die Subplatte des sich entwickelnden zerebralen Kortex direkt nach der Geburt synchrone Netzwerkoszillationen, welche für die korrekte Bildung des neuronalen Netzwerks entscheidend sind? (Kapitel 3.1)
2. Welche funktionellen Eigenschaften haben thalamischer und Subplatteneingang auf Subplattenzellen? (Kapitel 3.2)
3. Welche NMDA-Rezeptor-Untereinheiten befinden sich an den verschiedenen Synapsen der Subplattenzellen? (Kapitel 3.3)
4. Welche Verteilung der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten haben CA1-Pyramidenzellen und welche physiologischen Implikationen hat dies? (Kapitel 3.4)
5. Spielen NMDA-Rezeptoren eine Rolle bei der Extinktion einer aversiven Erinnerung? (Kapitel 3.5)

Antworten auf diese Fragen sollen helfen, die ontogenetische Entwicklung des Säugerkortex zu verstehen, bei der Subplattenneuronen eine entscheidende Rolle zukommt (Luhmann et al., 2003). Hippocampale NMDA-Rezeptoren übernehmen wichtige Funktionen bei Lern- und Gedächtnisvorgängen. Mit Hilfe der vorliegenden Untersuchungen könnten daher eventuell auch spezifische Lernformen besser erklärt werden.

Obwohl sämtliche Experimente am Modellorganismus der Maus durchgeführt werden, darf man die erhobenen Befunde in weiten Bereichen auf den Menschen übertragen, denn die molekularen Mechanismen laufen bei allen Säugern in ähnlicher Weise ab (Shapiro, 2001; Khazipov und Luhmann, 2006).

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

C57Bl6 Wildtyp, NR2A<sup>-/-</sup> und fNR1-Mäuse wurden in einer pathogenfreien Tierhaltung in Käfigen mit zu 2 bis 4 Tieren gehalten. Sie hatten Wasser und Fressen ad libitum und Licht von 6 Uhr morgens bis 6 Uhr abends. Gezüchtet wurden Wildtyp, hetero- und homozygote NR2A<sup>-/-</sup> (Jackson Laboratories) sowie homozygote fNR1 (genotypisiert). Brutpaare wurden einzeln gehalten. Für Verhaltensexperimente wurden Männchen verwendet. Ab dem Zeitpunkt der operativen Virusinfektion bei fNR1 (siehe 2.6) wurden die Tiere ausschließlich durch den Experimentator betreut.

Alle Experimente wurden durchgeführt unter Beachtung des deutschen und amerikanischen Tierschutzgesetzes für Labortiere und wurden von den Tierschutzbeauftragten der Universität Mainz bzw. Dallas überwacht.

Die Zuchtlinie der fNR1-Mäuse enthält, auf der Basis des C57Bl6 genetischen Hintergrundes, ein sogenanntes „gefloxtes“ NR1 NMDA-Rezeptor-Gen: zwei *loxP-sites* flankieren Exon11-22 des NR1-Gens (Tsien et al., 1996b). Das Restriktionsenzym Cre-Rekombinase erkennt die Sequenzen der *loxP-sites* und schneidet den dazwischenliegenden Bereich aus dem Genom aus. Dieser Vorgang ist irreversibel. Eine mit Cre-Rekombinase infizierte Zelle, die ein fNR1-Gen enthält, kann dauerhaft kein NR1-Genprodukt und somit keinen funktionellen NMDA-Rezeptor mehr exprimieren (100% *knock-out*). Für den Zeitverlauf der Infektion wichtig ist der Vektor, mit dem das Enzym übertragen wird. Wir entschieden uns für ein Adeno-assoziiertes Virus, dem ein für Cre-Rekombinase kodierendes Plasmid einkloniert worden war (Gene Therapy Initiative, Harvard Institute of Human Genetics, Boston, MA, USA; Direktor: Dr. Richard Mulligan; Associate Director: Dr. Jeng-Shin Lee). Dieses Virus infiziert Neurone mit hoher Effizienz. Seine Aktivität entfaltet sich einige Tage nach der Infektion und bleibt dann über Monate stabil (Green und Nestler, 2006). Die Tiere wurden im Alter von sechs Wochen operativ mit dem Virus infiziert und zehn Tage später in Verhaltensexperimenten eingesetzt.

## 2.2 Gehirnpräparation

Männlichen C57Bl6-Mäusen wurde unter schneller und tiefer Anästhesie das Gehirn entnommen, direkt in eiskalte, gut oxygenierte ACSF-Lösung (siehe 2.14.1) überführt und sodann mit einem Vibratom (HR2, Sigmann Elektronik, Hüffenhardt) in coronale Scheiben geschnitten: 300  $\mu\text{m}$  bei adultem Gewebe, 400  $\mu\text{m}$  bei neonatalem Gewebe und 600  $\mu\text{m}$  zur Untersuchung von elektrischen Synapsen in neonatalem Gewebe. Direkt nach dem Schneiden wurden beide Hemisphären getrennt. Geschnitten wurden sie in eiskalter Lösung. Nach der Präparation wurden sie für 20-45 min bei 34°C ruhen gelassen, bevor sie auf Raumtemperatur abgekühlt und für die Messung verwendet wurden. Bei der Präparation älterer Tiere (3-13 Monate) wurde vor der Gehirnentnahme transkardial mit eiskalter ACSF-Lösung perfundiert..

## 2.3 Elektrophysiologische Ableitungen

Bei 34°C wurden von Neuronen der visuell identifizierten Hirnregion (kortikale Subplatte und hippocampale CA1-Region; (Paxinos und Franklin, 1991) jeweils *whole-cell*- bzw. *cell-attached*-Ableitungen durchgeführt. Die Zellen wurden unter visueller Kontrolle (Zeiss-Mikroskope) gepatcht. Als Patchpipetten dienten Borosilikatglasröhrchen (O.D.: 1,5 mm, I.D.: 0,86 mm, Sutter Instruments und O.D.: 2 mm, I.D.: 1,16 mm ScienceProducts), die mit einem Elektrodenziehgerät (Modell PP-830, Narishige oder Modell P-97, Sutter Instruments) vor jedem Experiment ausgezogen wurden (Pipettenwiderstand ca. 6 M $\Omega$  für CA1-Pyramidenzellen und ca.15 M $\Omega$  für Subplattenzellen). Sie wurden mit Elektrodenlösung (s. 2.14.2) gefüllt. Der Elektrodenlösung wurde 0,5% Biocytin zugesetzt. Nach der elektrophysiologischen Untersuchung wurden die biocytingefüllten Zellen histologisch angefärbt (s. 2.11). Die elektrische Aktivität der Zellen bzw. Einzelkanäle wurde verstärkt und gefiltert mit 1,3 bis 3 kHz (SEC-10LX und SEC-05LX, npí electronic; EPC-7, List-Elektronik; Multiclamp 700A Amplifier, Axon Instruments, Molecular Devices), digitalisiert mit 10 kHz (ITC-18 Instrutech bzw. Digidata Axon Instruments, Molecular Devices) und aufgezeichnet (TIDA software, HEKA Electronics; PClamp V9.5, Axon Instruments). Alle Messungen wurden korrigiert für die nach (Neher, 1992) ermittelten *liquid junction* Potenziale. Das

Ruhemembranpotenzial wurde im Ganzzellmodus direkt nach Eröffnen der Zellmembran und im cell-attached Modus bestimmt (Tyzio et al., 2003). Zur Untersuchung isolierter NMDA-Rezeptor-Ströme wurden 20  $\mu\text{M}$  Bicucullin und 10  $\mu\text{M}$  CNQX oder 50  $\mu\text{M}$  Picrotoxin und 10  $\mu\text{M}$  NBQX im Bad appliziert, um GABA<sub>A</sub>-Rezeptor- und AMPA/Kainat-Rezeptor-vermittelte Ströme zu blockieren.

## 2.4 Extrazelluläre Stimulation

Synaptische Zellantworten wurden mittels extrazellulärer elektrischer Stimulation (150  $\mu\text{s}$ ; 0,4-80 V) evoziert. Bipolare Stimulationselektroden aus Wolframdraht (Frederick Haer & Co, Bowdoinham, Maine; Impedanz 4-5 M $\Omega$ ) wurden bei Ableitungen an Subplattenzellen im Thalamus sowie in der Subplatte positioniert. Für Ableitungen an CA1-Pyramidenzellen wurden die Stimulationselektroden in den Strati *radiatum* (um Schaffer-Kollaterale zu stimulieren) sowie *lacunosum-moleculare* (um Fasern des temporo-ammonischen Pfades zu stimulieren) des Hippocampus positioniert.

Diese Platzierung ermöglichte jeweils die anatomisch getrennte aber simultane Stimulation zweier afferenter Pfade sowohl in der Subplatte als auch im Hippocampus. Die Eingänge wurden in der Regel alternierend mit Intervallen von 30-60s stimuliert, je nach Alter der Tiere. Zwecks funktioneller Charakterisierung der Synapsen kamen zwei bis fünf aufeinander folgende Stimulationen desselben Eingangs bzw. des jeweils anderen mit Intervallen zwischen 20-140ms zur Anwendung.

## 2.5 Einzelzell-Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Um in den elektrisch abgeleiteten Subplattenzellen die mRNA-Expression der NR2-Untereinheiten des NMDA-Rezeptors zu untersuchen, wurde mittels weitlumiger Patch-Pipette (1 M $\Omega$ , gefüllt mit nur 8  $\mu\text{l}$  Lösung) das Zytoplasma der elektrophysiologisch charakterisierten Zelle eingesaugt, sodann die Spitze des Glasröhrchens in ein PCR-Reaktionsgefäß (gefüllt mit 2  $\mu\text{l}$  Aqua destillata) gebrochen, der Inhalt entleert (Druckausübung mit steriler Spritze erforderlich) und sofort auf Trockeneis eingefroren, um RNase Aktivität zu unterbinden. Gelagert wurden die Proben maximal 4 Tage bei -80°C. Da das Ausgangsvolumen 10  $\mu\text{l}$  betrug, konnten RT- und PCR-Reaktion im

selben PCR-Gefäß durchgeführt werden. Verwendet wurde hierzu Qiagen OneStep RT-PCR Kit, HotStarTaq Polymerase und folgende Primer (5'-3'):

NR2A sense: GCTACGGGCAGACAGAGAAG,  
NR2A antisense: GTGGTTGTCATCTGGCTCAC,  
NR2B sense: GCTACAACACCCACGAGAAGAG,  
NR2B antisense: GAGAGGGTCCCACTTTCC,  
NR2C sense: AACCACACCTTCAGCAGCG,  
NR2C antisense: GACTTCTTGCCCTTGGTGAG,  
NR2D sense: CGATGGCGTCTGGAATGG,  
NR2D antisense: AGATGAAAACGTGACGGCG,  
mouse  $\beta$ -actin sense: GGGAAATCGTGCGTGACATC,  
mouse  $\beta$ -actin antisense: CGGATGTCAACGTCACACTT.

Als Sequenzvorlage diente Paarmann et al. (2000). Die dem Rattengenom entstammenden Sequenzen wurden an das Mausgenom angepasst. Mit einer Exon-übergreifenden Sequenz wurde besondere Sorgfalt auf das Design des NR2C Primers gelegt. Die in allen PCR-Experimenten mitlaufende Wasserkontrolle war stets unkontaminiert. Als Längenmarker diente eine 100 bp DNA-Leiter. Kortikale Neurone wurden mit einer gebrochenen Patch-Pipette gesammelt (Impedanz  $<1\text{M}\Omega$ , mehrere Zellen pro Probe).

## 2.6 Stereotaktische Operation zur Ausschaltung des NR1-Gens in CA1

Für die vorliegende *in-vivo* Studie (Kapitel 3.5) wurden fNR1-Mäuse (Tsien et al., 1996b) verwendet. Mit Hilfe des Cre-Rekombinase-Enzyms lässt sich bei diesen Mäusen das NR1-Gen ausschalten. Dieses kodiert für die essentielle Untereinheit aller funktionellen NMDA-Rezeptoren. Cre-Rekombinase wurde mittels eines Adeno-assoziierten Virus (AAV) in die gewünschte Hirnregion, CA1 des Hippocampus, injiziert (Scammell et al., 2003). Dazu wurden die Mäuse betäubt (Isofluran oder Ketamin/Xylazin Gemisch, s. 2.14.3), in einen stereotaktischen Apparat (Model 900, Kopf Instruments) eingespannt, die Kopfhaut rasiert, desinfiziert und eröffnet (medianer Längsschnitt). Die Augen wurden mit Lubricant feucht gehalten. Gemäß der stereotaktischen Koordinaten für die CA1-Pyramidenzellschicht des dorsalen Hippocampus (Paxinos und Franklin, 1991) wurden mit einem elektrischen Zahnarztbohrer (Stahl,

Ø 0,4 mm) bilateral Löcher in den Schädelknochen gebohrt ohne das Gehirn zu beschädigen. Eine Glaskapillare (abgebrochene intrazelluläre Pipette, gezogen mit einem P-97 Puller, Sutter Instruments) oder eine Hamiltonspritze (RN-Syringe, Hamilton) wurden mit 2,5 µl AAV-Lösung gefüllt, in den stereotaktischen Apparat eingespannt und an der gewünschten Stelle im Gehirn positioniert. Mit einem Mikrodruckapplikatorsystem (PicoSpritzerIII, Föhr Medical Instruments, und Glaskapillare) bzw. manuell (Hamiltonspritze) wurde pro Hemisphäre 1 µl AAV-Lösung über einen Zeitraum von 10 min injiziert. Nach der Injektion wurden die Nadeln für 5 min im Gewebe belassen, um ein Verteilen der virushaltigen Flüssigkeit im Injektionskanal beim Zurückziehen zu verhindern. Danach wurden sie langsam entfernt und die Kopfhaut mit Klemmen geschlossen (Reflex Wound Clip System, Fine Science Tools). Das Aufwachen des Tieres auf einem Wärmekissen wurde bis zum Erreichen des vollen Bewusstseins überwacht. Das Zuheilen der Narbe wurde täglich kontrolliert. Nach 2-4 Tagen wurden die Klammern entfernt und die Narbe mit Neosporin desinfiziert.

## 2.7 Verhaltensexperimente

Alle Versuchsaufbauten wurden vor und nach jedem Experiment mit Quatricide (Quaternary Ammoniumchlorid, Pharmacal, Naugatuck, Connecticut) desinfiziert und getrocknet.

### 2.7.1 Lokomotorische Aktivität

Die Mäuse wurden einzeln in saubere Käfige gesetzt (18cm x 28cm), in denen der Boden dünn mit Hobelspänen bedeckt war. Ihre Bewegungen wurden von fünf Lichtschranken registriert, welche quer zur Käfiglängsseite verliefen (Photobeam Activity System, San Diego Instruments, San Diego, Kalifornien). Summiert über je 5 min wurden alle Lichtschrankenunterbrechungen über 2 Stunden aufgezeichnet.

### 2.7.2 Open Field

Mäuse wurden einzeln in die Peripherie einer für sie unbekanntes Kiste gesetzt (44cm x 44cm x 30cm). Sie durften für 5 min in schwach beleuchtetem Raum die Kiste explorieren. Über eine Videoaufzeichnung wurde die Zeitdauer ihrer Bewegungen und die

zurückgelegte Strecke ermittelt (Ethovision 3.0, Noldus, Leesburg, Virginia). Zwei Felder wurden dabei unterschieden: die Peripherie (Randstreifen von 5 cm) und das Zentrum (Kistenmitte, 14cm x 14cm).

### 2.7.3 *Hell/Dunkel-Kammer*

Einzelne Mäuse wurden in die dunkle Hälfte eines Käfigs gesetzt, der aus einer dunklen und einer grell beleuchteten Seite besteht. Beide Seiten sind durch ein kleines Tor miteinander verbunden. Nach 2-minütiger Habituation wurde das Tor zur hellen Seite geöffnet und die Tiere konnten für 10 min beide Seiten explorieren. Ihre Bewegungen wurden von acht Lichtschranken aufgezeichnet.

### 2.7.4 *Erhöhtes Kreuzlabyrinth. Elevated Plus Maze (EPM)*

Mäuse wurden einzeln in das Zentrum eines schmalen Kreuzlabyrinthes gesetzt, welches auf einem Stativ 31 cm über dem Boden befestigt ist. Jeder der vier Arme ist 30 cm lang und 5 cm breit. Zwei gegenüberliegende sind gesäumt von 25 cm hohen schwarzen Wänden. In schwach beleuchtetem Raum durften die Tiere 5 min lang explorieren. Bewegungen des Körperzentrums wurden von oben über eine Videokamera mittels Aufzeichnungsprogramm (Ethovision 3.0) registriert. Zur Analyse wurde die Zeit gemessen, die das Tier auf den offenen, exponierten Armen verbrachte.

### 2.7.5 *Schreckantwort und Präpuls-Inhibition*

Das Schreckverhalten wurde mittels SR-Lab Startle Response System (San Diego Instruments, San Diego, Kalifornien) untersucht. Dazu wurden die Tiere in ein schmales Plexiglasröhrchen gesetzt, in dem sie 5 min akklimatisieren durften. Das Röhrchen befindet sich in einer schallisolierten Box und ist verbunden mit einem Seismographen. Dieser ermittelt aus Amplitude, Frequenz und Dauer der durch Erschrecken entstehenden Erschütterungen einen systemimmanenten Wert für die individuelle Schreckantwort einer jeden Maus. Während der Eingewöhnungsperiode wurde die Kammer mit 70 dB weißem Hintergrundrauschen beschallt. Es folgten sechs Schreckstimuli (120 dB,

40 ms, weißes Rauschen) mit einem durchschnittlichen Intervall von 15 s (7-23 s). Sie wurden gefolgt von 40 Schreckstimuli, denen ein Präpuls um 100 ms vorausging (20 ms Dauer; Präpulsintensität: 0,4, 8 oder 16 dB über Hintergrundrauschen, Reihenfolge zufällig). Nach der Präpulsperiode wurden weitere 6 Schreckstimuli ohne Präpuls präsentiert. Für jedes Tier wurde ein Wert für die Grundsreckhaftigkeit errechnet durch Mittelung aller seismologischen Antworten, welche auf die Schreckstimuli folgten, die ohne Vorpuls präsentiert worden waren. Die Präpulsinhibition (PPI) wurde gemessen, indem diejenigen Antworten gemittelt wurden, welche auf Schreckstimuli folgten, denen 4 dB (PP04), 8 dB (PP08) und 16 dB (PP16) Pulse vorausgegangen waren.

#### 2.7.6 Soziale Interaktion

**Mit erwachsenen Tieren.** Eine schmale Drahtgitterröhre wurde an einer Seite des *open field* aufgestellt. Eine Testmaus wurde in diese so vorbereitete Kiste gesetzt und durfte 5 min erkunden. Mit Videokamera und Ethovision-Software wurden ihre Bewegungen aufgezeichnet und die Zeit gestoppt, die sie in drei definierten Zonen verbrachte: innerhalb eines 10 cm breiten Streifens rund um die Drahtkäfigsäule, im weiteren Umfeld (25 cm) und in den gegenüberliegenden Ecken ( $10 \times 10 \text{ cm}^2$ ) des *open field*. Nach der Erkundungsphase wurde eine adulte Wildtypmaus (C57/Bl6) in die Käfigsäule gesetzt. Für weitere 5 min wurde die Zeit gemessen, in der sich die gleichaltrige Testmaus in den drei Zonen aufhielt. Als Maß der sozialen Interaktion wurde der Quotient aus der Zeitdauer gebildet, die das Tier in der Nähe der anderen Maus verbrachte und der Zeitdauer, die es in jener Zone verbrachte, als keine Maus im Käfig war (Referenz).

**Mit juvenilen Tieren.** Die Testmaus wurde zusammen mit einem unbekanntem Jungtier (Wildtyp, vier Wochen alt) in einen sauberen, leeren Käfig gesetzt. Ihre aktive Interaktion (Nase an Jungtier) wurde über 5 min beobachtet und die Zeit manuell gestoppt. Dieser Test wurde drei Tage später mit derselben, nun bekannten juvenilen Maus wiederholt.

### 2.7.7 Schwimmzwang (*Porsolt-Test*).

Ein 5-Liter Becherglas wurde zu  $\frac{3}{4}$  mit Wasser gefüllt. Eine Testmaus wurde sanft ins Wasser gelassen und für 6 min gezwungen zu schwimmen. Nach 2 min wurde manuell die Zeit gestoppt, in der die Maus ihre Schwimmbewegungen aufgab und bewegungslos trieb.

### 2.7.8 Angstkonditionierung.

Angst (*freezing*) wurde manuell in einer Box gemessen, die mit einem Metallgitterboden ausgerüstet war, der unter Strom gestellt werden kann (Med. Associates, St. Albans, Vermont) während die Mäuse für 5 min diesem Kontext ausgesetzt waren. Die Dressur bestand aus drei Stromstößen à 0,5 mA und 2s, 1 min Intervall, nach einer Habituationphase von 2 min. 3h nach diesem Training und im folgenden alle 24h, 10 Tage lang sowie 6 Wochen später (Tag 43), wurden die Tiere demselben Kontext ausgesetzt, ohne nochmals einen Stromschlag zu erhalten. Kurz vor den ersten beiden Reexpositionen wurden sie zusätzlich einem unbekanntem Kontext ausgesetzt, um ihre Kontextunterscheidungsfähigkeit zu testen. Am neunten Tag erhielten alle einen „Erinnerungsschock“ (*reminder shock*: 0,3 mA, 2s). Dies führt, falls Extinktion und nicht Vergessen stattfand, zu einer Gedächtniswiederherstellung, dem sogenannten *reinstatement* (*freezing* so hoch wie direkt nach der Dressur). Die geeignete Stärke des *reminder shocks* wurde in Vorversuchen ermittelt. Es wurde diejenige Stärke gewählt, die in unkonditionierten Mäusen zwar eine geringe Angstreaktion auslöst, sich aber signifikant von derjenigen unterscheidet, die im dressierten, konditionierten Tier hervorgerufen wird.

Das Angstverhalten wurde nicht nur in der Schockbox gemessen, auf welche die Tiere konditioniert worden waren, sondern auch in Umgebungen, die Teile des konditionierten Kontexts als Signale enthielten, wie Ventilatorgeräusch, Beleuchtung, Duft oder Metallgitterboden.

### 2.7.9 *Schmerzsensitivität*

Die Schmerzempfindlichkeit auf elektrische Stromschläge wurde gemessen in der oben genannten Box (Med. Associates, St. Albans, Vermont) mit naiven Tieren. Nach 1 min Habituation erhielten die Mäuse alle 15s einen Fußschock von 2s Länge und steigender Intensität. Begonnen wurde bei 0,05 mA, was keine Reaktion auslöste. Gesteigert wurde jeweils um 0,05 mA. Das Verhalten auf die Schocks wurde kategorisiert als Zucken, Springen und Quieken. Für jede Maus wurde die geringste Stromintensität festgestellt, bei der das jeweilige Verhalten auftrat.

## 2.8 **Perfusion und Kryoschnitte**

Nach Durchführung aller Verhaltensexperimente wurden die Mäuse mit Paraformaldehyd (4% PFA) transkardial perfundiert, um gut fixierte Gehirne für die Histologie zu erhalten. Nach Betäubung mit Ketamin/Xylazin Gemisch (s. 2.14.3) wurde der Thorax ventral eröffnet, der linke Ventrikel punktiert, das rechte Atrium mit einem Scherenschnitt geöffnet und das Tier über die Kanüle mit frisch angesetzter eiskalter 4%iger PFA-Lösung 10 min perfundiert. Anschließend wurde das Gehirn entnommen und in kalter PFA-Lösung über Nacht aufbewahrt. Dann wurde es zweimal in 20%iger Sucroslösung/1xPBS gewaschen (à 12 Stunden, bis Gehirn in der Flüssigkeit zu Boden gesunken), um die Osmolarität zu erhöhen. Bei  $-80^{\circ}\text{C}$  wurde es sodann schnellgefroren (24h) und bei  $-27^{\circ}\text{C}$  im Kryostaten (Leica, Solms) coronal geschnitten: 16  $\mu\text{m}$  für in-situ Hybridisation und 30  $\mu\text{m}$  für Immunohistologie.

## 2.9 **Immunocytochemie für Cre und $\beta$ -Galaktosidase**

Immunohistochemie wurde an 30  $\mu\text{m}$  dicken Coronalschnitten durchgeführt, die auf Objektträgern aufgezogen waren. Nach 60–90 min in 3% Standard Ziegen Serum (NGS) und 0,3% Triton X-100 in 1xPBS, wurden sie inkubiert mit den primären Antikörpern in 3% NGS und 0,3% Triton X-100 in 1x PBS für 12–20h bei Raumtemperatur. Primäre Antikörper: rabbit anti-Cre (1:1000; Novagen, Madison, Wisconsin) und rabbit anti- $\beta$ -galactosidase (1:10,000; Novagen). Die Schnitte wurden dann in 1xPBS gewaschen und inkubiert mit dem sekundären Antikörper (1:200) für 2–4h bei Raumtemperatur.

Schnitte wurden wieder gewaschen und dehydriert in Ethanolreihen (50, 75, 90, 100, 100%; à 10s; 2x 3 min in Citrosolve).

### **2.10 In-situ Hybridisierung für NR1 und nukleäre Gegenfärbung**

Der Verlust des NR1 Signals an der Virusinjektionsstelle wurde mittels NR1 in-situ Hybridisation an 16 µm Schnitten kontrolliert. Das Protokoll folgte dem von (Iwasato et al., 1997) beschriebenen. Antisense- und Sense-Proben wurden aus dem *pSP72-ASp* Klon gewonnen mittels SP6 und T7 RNA-Polymerasen und *EcoRI* und *HindIII* Restriktionsendonukleasen. *pSP72-ASp* wurde generiert durch Insertion von *AvrII-SphI* 0,4 kb (Probe-R) der NR1-cDNA in die *XbaI-SphI* Schnittstellen von *pSP72* (Promega, Madison, Wisconsin). Probe-R erkennt alle Splicevarianten des NR1-Gens. Die Hybridisierung erfolgte bei 60°C über Nacht in Hybridisierungspuffer mit <sup>35</sup>S-markierten RNA-Proben. Nach RNase-A-Behandlung wurden die Schnitte in einer Pufferserie von SSC/DTT Puffern und als letztes in DTT (60°C, 60 min) gewaschen. Abschließend erfolgte die Dehydrierung in Ethanol. Radiogramme der Schnitte wurden nach 4-7 Tagen Entwicklungszeit mit NeuroLucida (Bioscience, Williston, Vermont) quantifiziert.

Um zu prüfen, ob durch die Virusinjektion das Gewebe geschädigt wird, wurden in-situ- bzw. angrenzende Schnitte mit *pico green* gefärbt, einem Fluorophor, das DNA und somit den Nukleus intakter Zellen färbt. Hierzu wurden fixierte Schnitte 5 min in *pico green* (Molecular Probes) im Dunkeln inkubiert, dehydriert, eingebettet und im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

### **2.11 Biotin-Zellfärbung**

Über die Patch-Elektrode mit Biotin gefüllte Zellen wurden mit einer Avidin-gekoppelten Peroxidasereaktion histologisch angefärbt (Schröder und Luhmann, 1997). Schnitte wurden über Nacht in 4% Paraformaldehyd fixiert. Nach dem Waschen (3x 10min in PBS) wurden sie permeabilisiert mit 0,5% $H_2O_2$ /0,8%TritonX100 in PBS. Nach erneutem Waschen wurden sie über Nacht in ABC-Reagenz inkubiert (Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex) +2%BSA (Rinderserum-Albumin). Nach sorgfältigem

Waschen in PBS und Tris werden die Schnitte zuerst 30min in DAB-Lösung inkubiert (Diaminobenzidin, gelöst in H<sub>2</sub>O +Tris, filtriert), dann 10min in DAB+0,03%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bis sie hellbraun sind. Nach nochmaligem Waschen wird die Färbung intensiviert mit Kupfersulfat (0,5%CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O in Tris). Nach dem Waschen werden die Schnitte in aufsteigender Ethanolreihe und Aceton dehydriert und eingebettet in Durcupan. Dadurch sind sie jahrelang haltbar. Die biocytgefüllten Zellen erscheinen schwarz.

## 2.12 Datenanalyse

Elektrophysiologische Zellantworten wurden hinsichtlich ihrer Latenz, Anstiegsteilheit, Amplitude und Abfallskinetik analysiert mit TIDA software (HEKA, Lambrecht/Pfalz), Clampfit (Axon; Molecular Devices, Sunnyvale, Kalifornien), Origin (Microcal; OriginLab, Northampton, Massachusetts) und Igor Pro (WaveMetrics, Portland, Oregon). Zeitkonstanten wurden durch Annäherung mono- und biexponentieller Funktionen an den Kurvenverlauf ermittelt. Der Quotient aus der Amplitude des zweiten EPSCs und der des ersten wurde als *Paired-Pulse Ratio* berechnet. Dabei wurde die Amplitude des zweiten EPSCs stets vom Kurvenverlauf der *Decay*-Phase des ersten aus gemessen, da wegen des langsamen Zeitverlaufs der NMDA-Rezeptor-Ströme die Grundlinie noch nicht erreicht war. Korrelationskoeffizienten wurden aus linearen Regressionen nach der Methode der kleinsten Quadrate berechnet (Origin7). In den Abbildungen dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. Fehlerbalken sind sichtbar, sofern sie größer sind als das Symbol. Zur statistischen Analyse wurden Student'scher t-Test, Sign-Test, Mann-Whitney Test, ANOVA, Mittelwertvergleich nach Bonferroni und Levene-Test auf gleiche Verteilung verwendet. Signifikanzlevel von p<0,05 (\*), p<0,01 (\*\*) und p<0,001 (\*\*\*) wurden differenziert.

## 2.13 Verwendete Chemikalien

Bicucullin-Methiodid (20 µM; Sigma-Aldrich, Steinheim), CNQX (10 µM; Sigma-Aldrich), ±CPP (20 µM; ±-3-[2-Carboxypiperazin-4-yl]-Propanphosphorsäure; Sigma-Aldrich), DAB (Diaminobenzidin; Sigma-Aldrich), Durcupan (Einbettmedium; Sigma-Aldrich), Ethanol (reinst; Roth, Karlsruhe), Glycin (10 µM; Sigma-Aldrich), Ifenprodil

(3  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ ; Tocris, Bristol, Großbritannien), Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4$ ; Sigma-Aldrich), NBQX (10  $\mu\text{M}$ ; 1,2,3,4-Tetrahydro-6-Nitro-2,3-Dioxo-Benzo-[f]-Quinoxalin-7-Sulfonamid; Dinatriumsalz, Sigma-Aldrich oder Tocris), NVP-AAM077 (50 nM; [(R)-[(S)-1-(4-Bromo-Phenyl)-Ethylamino]-(2,3-Dioxo-1,2,3,4-Tetrahydroquinoxalin-5-yl)-Methyl]-Phosphorsäure; Novartis Pharma, Basel, Schweiz), Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt), Picrotoxin (PTX, 50  $\mu\text{M}$ ; Sigma-Aldrich), SKF-81297 (10  $\mu\text{M}$ ; D1/5-Agonist, Bayer Schering Pharma, Berlin), Vectorstain ABC-Kit (Peroxidasekonjugierter Avidin-Biotin-Komplex; Vectorlabs, Burlingame, Kalifornien), Wasserstoffperoxid (30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; Sigma-Aldrich) und *Petrophaga lorioti*-Trockenextrakt (10 pM; Sigma-Aldrich, Steinheim).

Alle weiteren Chemikalien, insbesondere die unten aufgelisteten Salze wurden bei Sigma-Aldrich, Steinheim, bestellt.

## 2.14 Verwendete Lösungen

Alle Angaben sind millimolare Konzentrationen, sofern nicht anders angegeben.

### 2.14.1 ACSF

#### neonatales Gewebe: Präparation der Hirnschnitte und Perfusion während der Ableitung

124 NaCl, 26  $\text{NaHCO}_3$ , 1,25  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 3 KCl, 1,6  $\text{CaCl}_2$ , 1,8  $\text{MgCl}_2$  und 20 Glukose, pH 7,4 nach Äquilibrierung mit 95%  $\text{O}_2$  und 5%  $\text{CO}_2$ , 310 mOsm.

#### adultes Gewebe: Präparation der Hirnschnitte

- a) 124 NaCl, 26  $\text{NaHCO}_3$ , 10 Glukose, 3 KCl, 2,6  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2,6  $\text{MgCl}_2$ , 2,5  $\text{CaCl}_2$  und 1 Kynurensäure; pH: 7,35, nach Oxygenierung mit 95%  $\text{O}_2$ /  $\text{CO}_2$ , ~320 mOsm.
- b) 125 Sucrose, 3 KCl, 1,2  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2  $\text{MgSO}_4$ , 26  $\text{NaHCO}_3$ , 10 Glukose und 2  $\text{CaCl}_2$ ; oxygeniert, pH 7,4; 310 mOsm.

#### adultes Gewebe, Perfusion: magnesiumfrei

124 NaCl, 26  $\text{NaHCO}_3$ , 10 Glukose, 3 KCl, 2,6  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und 3,0  $\text{CaCl}_2$   
+10 NBQX und 100 PTX.

### 2.14.2 Elektrodenlösungen

#### neonatal: NMDA-Rezeptor-Ströme, gap junctions

120 K-Gluconat, 4 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 EGTA, 10 HEPES, 2 Na<sub>2</sub>-ATP, 0,5 Na-GTP, 0,2% Biocytin; pH 7,3 (KOH); 293 mOsm (Sucrose). 10 mM QX-314 (Tocris, Bristol, UK) wurde bei Spannungsklemm-Experimenten zugegeben, um spannungsgesteuerte Natriumkanäle zu blockieren.

#### neonatal: cell-attached

126 NaCl, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1,25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>5</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2,5 KCl, 5 HEPES, 5 EGTA, pH 7,4 with NaOH. Direkt vor dem Experiment wurden 10µM NMDA und 10µM Glycin zugegeben.

#### adult, -60mV: Natrium-basierte Lösung

130 K-Gluconat, 10 KCl, 10 HEPES, 3 MgCl<sub>2</sub>, 2 Mg-ATP und 1 Na-GTP; pH: 7,30, ~280 mOsm

#### adult, depolarisierte Haltepotenziale: Cäsium-basierte Lösung

115 Cs-Metionin, 20 CsCl, 10 HEPES, 4 Mg-ATP, 0,4 Na-GTP und 0,6 EGTA, 10 mM QX-314 (Sigma-Aldrich oder Tocris); pH: 7,30, ~285 mOsm

### 2.14.3 Anästhetika

#### Intraperitoneal

Ketamin/Xylazin Gemisch: 2,7 ml Ketamin (100mg/ml, Sigma) + 1,5 ml Xylazin (20mg/ml, Sigma) in 30 ml Saline (0,9% NaCl in 1xPBS); 0,1 ml Anästhetikum/10 g Mausgewicht; intraperitoneal

#### Nasal

Isofluran (2-Chloro-2-(Difluoromethoxy)-1,1,1-Trifluoro-Ethan, Medsafe, Neu Seeland). Inhalationsanästhetikum, appliziert über Narkosegerät (Anaesthesia Machine, Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Subplattenzellen sind direkt nach der Geburt elektrisch gekoppelt.

Während der Ontogenese des Kortex treten sogenannte Netzwerkoszillationen auf. Sie entstehen durch synchron aktive Neuronengruppen und sind für die Weiterentwicklung des neuronalen Netzwerkes essentiell (Katz und Crowley, 2002). Synchroner Aktivität kann entweder durch einen NMDA-Rezeptor-abhängigen Prozess oder über elektrisch gekoppelte Zellen ausgelöst werden (Buzsáki und Draguhn, 2004).

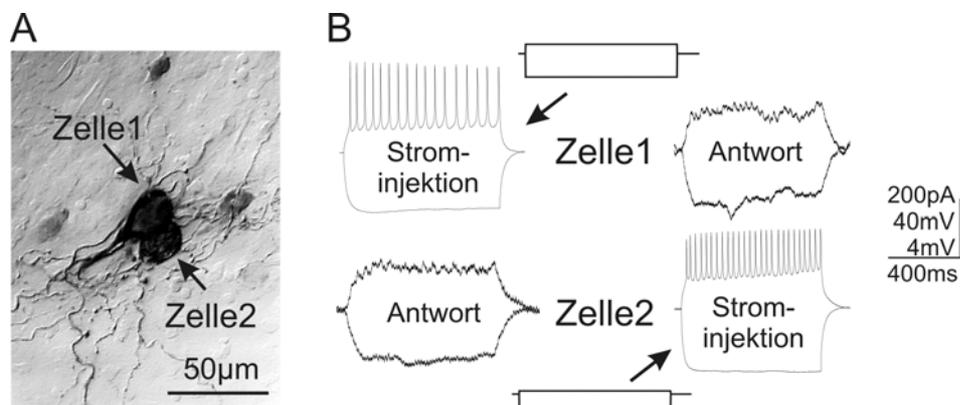


Abb. 7. **Elektrische Kopplung von Subplattenzellen.** A. Zwei dicht beieinander liegende Subplatteneurone wurden auf elektrische Kopplung untersucht (B) und mit Biocytin gefärbt. B. Zellen aus A wurden simultan abgeleitet. Strominjektion in Zelle 1 (links oben) verursacht eine Potenzialänderung (Antwort) in Zelle 2 (links unten) und umgekehrt.

Im neugeborenen Tier hängen Oszillationen von der Integrität der Subplatte ab (Dupont et al., 2006). Daher wurde mittels gepaarter Ableitungen von Subplatteneuronen untersucht, ob diese Neurone elektrisch miteinander gekoppelt sind. Ein elektrisch gekoppeltes Zellpaar wurde durch Strominjektion in eine Zelle des Paares identifiziert. Waren elektrische Synapsen zwischen den beiden Zellen vorhanden, wurde dadurch eine Spannungsänderung im zweiten Neuron bewirkt (Abb. 7B).

17% der untersuchten Subplattenzellen (15 von 89 gepatchten Paaren) waren elektrisch gekoppelt. Anhand der Größe der Potenzialänderung im Vergleich zur Strominjektion wurde die Stärke der elektrischen Kopplung berechnet (Bennett, 1977; Galarreta und

Hestrin, 1999). Die Kopplungsstärke betrug  $6,0 \pm 0,5\%$  (von 0,6% bis 27,7%, n=15 Paare) mit einer durchschnittlichen Leitfähigkeit von  $1,2 \pm 0,1$  nS (von 0,5 nS bis 5,3 nS, n=15 Paare).

Auf der Fotografie der beiden Biocytin-gefärbten Subplattenzellen (Abb. 7A) kann man noch drei weitere schwächer gefärbte Somata erkennen. Hier handelt es sich um farbstoffgekoppelte Zellen, ein Indiz für *gap junction*-Verbindungen zwischen diesen (Imanaga, 1987).

### **3.2 Thalamo-kortikale und subplattinneninterne Afferenzen auf Neurone der Subplatte unterscheiden sich in ihren funktionellen Eigenschaften.**

Über chemische Synapsen bilden Subplattenzellen ein weites Netzwerk, das bis in Kortex und Thalamus reicht und Entwicklungsprozesse während der Ontogenese des Kortex steuert (Kanold, 2004). Diverse Neurotransmittersysteme sind daran beteiligt (Hanganu et al., 2002) Dieses Kapitel beschäftigt sich mit den funktionellen Eigenschaften der thalamo-kortikalen sowie der subplattinneninternen Afferenz.

Als Grundlage für die funktionelle Charakterisierung der Subplatten-Afferenzen dienten neben der anatomisch-morphologischen und elektrophysiologischen Identifizierung der Subplattenneurone und ihrer passiven Membraneigenschaften, ihre eingangsspezifische Stimulation, sowie die Ermittlung des Membranruhepotenzials der zu untersuchenden Nervenzellen. Darauf aufbauend wurden die Zellantworten auf repetitive Reize unter verschiedenen Bedingungen charakterisiert.

#### *3.2.1 Subplattenzellen haben ein leicht depolarisiertes Ruhemembranpotenzial.*

Die am unteren Rand des Kortex befindlichen Subplattenzellen (Abb. 8A) unterscheiden sich morphologisch von den benachbarten Pyramidenzellen aus Schicht VI durch ihre bi- oder multipolare Form. Häufig waren sie horizontal angeordnet (Abb. 8A, rechts). Sie wurden synaptisch stimuliert durch bipolare Stimulationselektroden, welche im Thalamus und in der Subplatte positioniert wurden (Abb. 8A). Diese Anordnung

erlaubte die selektive Aktivierung der thalamo-kortikalen und subplatteninternen Fasern (Hanganu et al., 2002). Mit dieser Versuchsanordnung wurden die funktionellen Eigenschaften beider Eingänge untersucht.

An ihrem charakteristischen repetitiven Aktionspotenzialmuster, das entsteht, wenn man depolarisierende Strompulse über die Patch-Pipette appliziert (Abb. 8B), konnten Neurone der Subplatte elektrophysiologisch von den Nachbarzellen unterschieden werden (Friauf et al., 1990; Luhmann et al., 2000). Aus der Applikation hyperpolarisierender Ströme wurde ein Eingangswiderstand von  $1,5 \pm 0,2 \text{ G}\Omega$  ( $n=56$ ) ermittelt. Das am Anfang einer jeden Messung im Ganzzellmodus abgelesene Ruhemembranpotenzial betrug  $-59,3 \pm 1,7 \text{ mV}$  ( $n=51$ , korrigiert nach (Tyzio et al., 2003)). Da hohe Sealwiderstände in Subplattenzellen erreicht wurden ( $10 \text{ G}\Omega$ ), galt dies als gute Abschätzung des tatsächlichen Membranpotenzials (Tyzio et al., 2003). Trotzdem wurden zusätzlich Einzelkanalmessungen von NMDA-Rezeptoren an Subplattenneuronen durchgeführt (Abb. 8C), um das Ruhemembranpotenzial dieser Zellen unabhängig von den Ableitbedingungen bestimmen zu können. Histogramme der in Abb. 8C links gezeigten Spuren verdeutlichen, dass es sich um Öffnungsereignisse des Rezeptors mit definierten Leitfähigkeiten handelte. Die im *cell-attached* Modus gemessenen NMDA-Rezeptor-Ströme kehrten ihr Vorzeichen um bei einem Pipettenpotenzial von  $-49,4 \pm 3,3 \text{ mV}$  ( $n=17$ , Abb. 8D). Da ausgehend von den relativen Permeabilitäten und den intrazellulären Natrium- und Kaliumkonzentrationen in adulten Neuronen ein Umkehrpotenzial von ca.  $+5 \text{ mV}$  für NMDA-Rezeptor-Ströme abgeschätzt wird (Tyzio et al., 2003), betrug das Ruhemembranpotenzial von Subplattenneuronen entsprechend ca.  $-54 \text{ mV}$ .

Das Vorhandensein zweier verschiedener Leitfähigkeiten (neben dem geschlossenen Zustand), das in der oberen Spur zu erkennen ist, könnte ein Hinweis auf das Vorkommen der NR2D-Untereinheit sein. Dies wird in Kapitel 3.3 weitergehend untersucht.

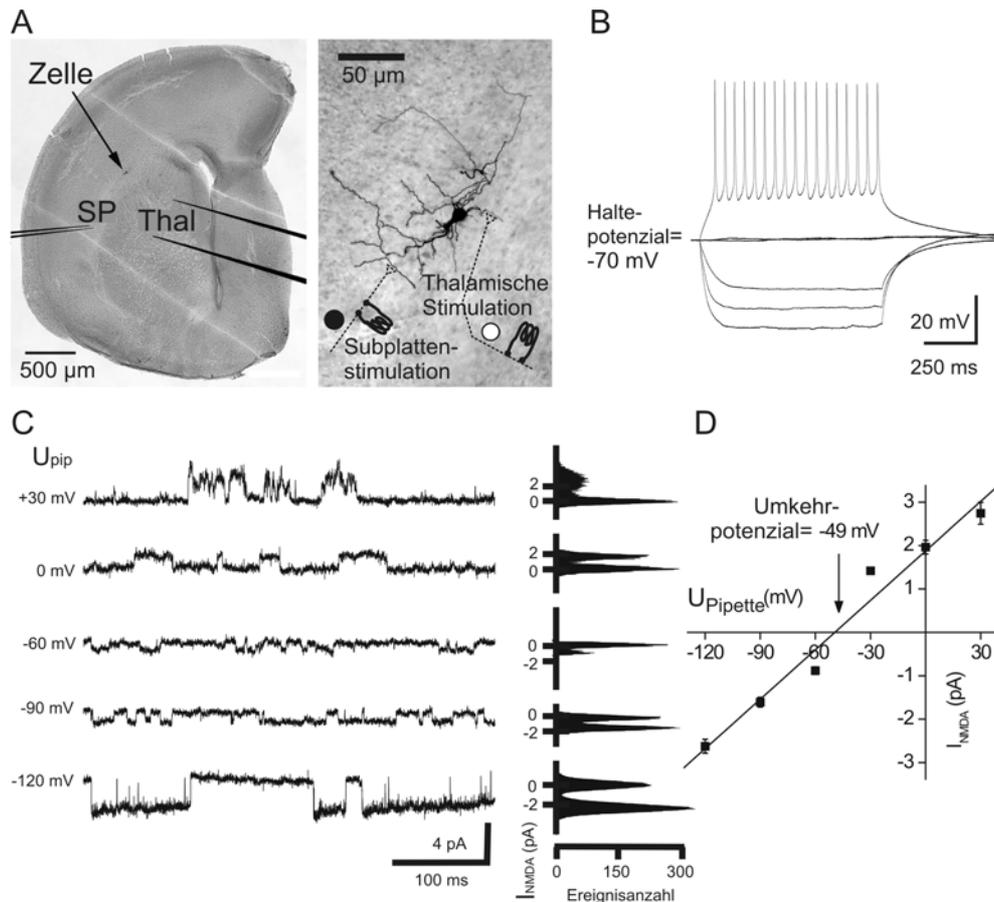


Abb. 8. Patch-clamp Ableitungen von Subplattenzellen in coronalen Hirnschnitten von P0-P3 Mäusen. **A.** Coronaler Hirnschnitt (linke Hemisphäre) einer 2 Tage alten Maus (links). SP = Subplatte mit enger bipolarer Stimulationselektrode (Abstand der Elektrodenspitzen: 80  $\mu\text{m}$ ); Thal = Thalamus mit weiter Stimulationselektrode (Abstand der Spitzen ca. 500  $\mu\text{m}$ ). Das rechte Bild zeigt die biocytinfärbte horizontale Subplattenzelle (Pfeil im linken Bild) in der Vergrößerung. Afferenzen aus Subplatte ( $\bullet$ ) und Thalamus ( $\circ$ ), welche mittels bipolarer Stimulationselektroden extrazellulär stimuliert wurden, sind schematisch eingezeichnet. **B.** Entladungsmuster einer P2-Subplattenzelle auf hyper- und depolarisierende Strominjektion im *whole-cell current-clamp* Modus. **C.** NMDA-Rezeptor-Einzelkanalableitungen von einer P1-Subplattenzelle im *cell-attached* Modus bei verschiedenen Pipettenpotenzialen und korrespondierende Histogramme der Öffnungsereignisse. **D.** Im Strom/Spannungsdiagramm kehrt sich das Vorzeichen der NMDA-Rezeptor-Ströme bei  $(E_m) = -49,4 \pm 3,3$  mV ( $n=17$ ) um.

### 3.2.2 Affenzen aus Thalamus und Subplatte innervieren ein Subplattenneuron sowohl proximal als auch distal.

Für die funktionelle Charakterisierung der spezifischen Affenzen wurden Subplattenneurone durch bipolare Stimulationselektroden, welche im Thalamus und in der Subplatte positioniert wurden, synaptisch selektiv stimuliert (Abb. 8A). Abb. 9A zeigt die so evozierten EPSCs unter physiologischen Bedingungen. Ihre Amplitude bei einem Haltepotenzial von -80 mV (Abb. 9A obere Spur) wurde durch die Zugabe von CNQX und Bicucullin zur Perfusionslösung, d.h. nach der Blockade von AMPA/Kainat- und GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, fast vollständig reduziert (Abb. 9A, zweite Spur von oben). Die nicht blockierten NMDA-Rezeptor-vermittelten Ströme wurden bei depolarisierten Haltepotenzialen sichtbar (Abb. 9A, mittlere Spuren), da der Magnesiumblock im NMDA-Rezeptor verschwindet. Durch zusätzliche Zugabe des NMDA-Rezeptor-Antagonisten CPP wurde die verbleibende Stromkomponente vollständig unterdrückt (Abb. 9A, untere Spur). In Gegenwart von 10 µM Glycin veränderte sich die NMDA-EPSC Amplitude nicht (Abb. 9B), was auf ein ausreichendes Vorhandensein des Koaktivators Glycin im Hirnschnitt schließen lässt.

Die Amplitude der bei -80 mV aufgezeichneten NMDA-EPSCs folgte der Stimulationsstärke nicht proportional (Abb. 9C). Bei geringer Stimulationsstärke traten keine Zellantworten auf. Bei Steigerung der Stimulationsstärke gab es einen Bereich, in dem entweder kleine EPSCs mit gleicher Amplitude auftraten oder das EPSC ausfiel (*failure*). Bei weiterer Steigerung kamen Komponenten hinzu und die EPSCs wurden größer und polysynaptisch (s. Pfeil, hier bei Subplattenstimulation). Abb. 9D zeigt oben eine Stimulationsstärke, bei der sowohl Ausfälle als auch EPSCs auftraten. Die *failure*-Rate an der Schwelle betrug  $30 \pm 8\%$  (n=34). Diese Rate blieb über einen Stimulationsstärkenbereich von  $11 \pm 4V$  (n=7) konstant, welcher für Subplattenstimulation um  $13 \pm 6V$  (n=12) tiefer lag, verglichen mit thalamischer Stimulation. Oberhalb der Schwelle nahm die *failure*-Rate antiproportional mit steigender Stimulationsstärke ab. Abb. 9D unten verdeutlicht den Bereich der Stimulationsstärke, in dem nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip EPSCs auftraten (n=15). In diesem Bereich sind die Bedingungen für minimale Stimulation, d.h. Stimulation einer einzelnen bzw. weniger Fasern gegeben.

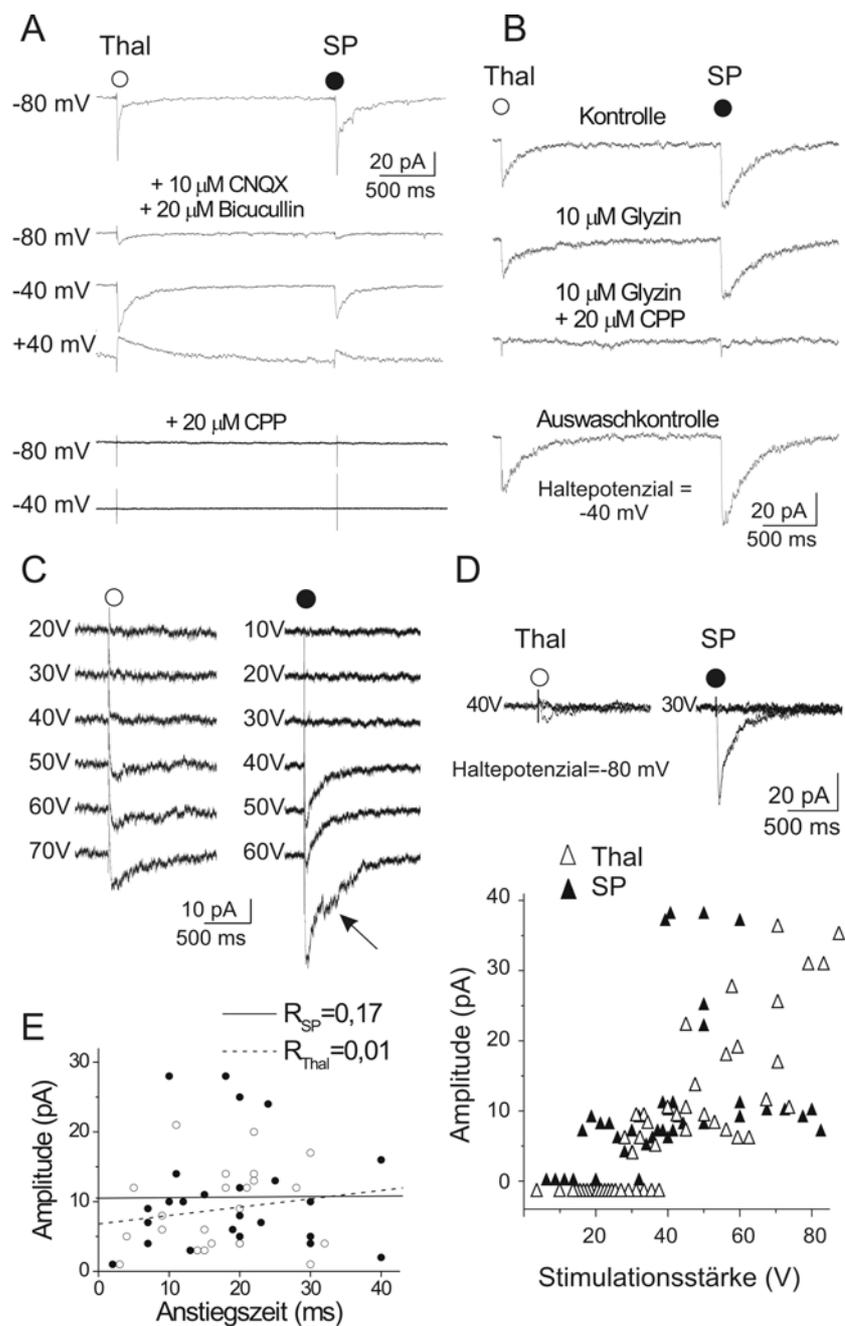


Abb. 9. Funktionelle Charakterisierung des thalamischen und subplatteninternen exzitatorischen Eingangs von neonatalen Subplattenzellen. **A.** EPSCs, die durch elektrische Stimulation thalamischer (○) und subplatteninterner (●) Afferenzen in einem Subplattenneuron bei verschiedenen Haltepotenzialen hervorgerufen werden. Jeweils 4 Aufzeichnungen sind gemittelt. Applikation von CNQX und Bicucullin (mittlere Spuren) vermindert die EPSC-Amplitude, CPP (untere Spur) blockiert sie. **B.** Zusätzliche Gabe von Glycin zur CNQX- und Bicucullin-enthaltenden Badlösung ändert das EPSC nicht, das bei -40 mV aufgezeichnet wurde und durch CPP blockiert werden konnte. Spuren sind jeweils Mittelungen von 2 Aufzeichnungen. **C.** Elektrische Stimulation der Afferenzen aus Thalamus (○) und Subplatte (●) erzeugt

EPSCs, die bei steigender Stimulationsstärke größer werden und polysynaptisch (Pfeil). **D.** Unter Minimalstimulationsbedingungen entsteht ein EPSC mit immer gleicher Amplitude. Daneben treten Totalausfälle auf (oben). Unten ist die Abhängigkeit der EPSC-Amplitude von der Stimulationsstärke für 15 Subplattenzellen aufgetragen. **E.** Weder für den thalamischen ( $\circ$ , gestrichelte Linie;  $R=0,01$ ) noch für den Subplatteneingang ( $\bullet$ , durchgezogene Linie;  $R=0,17$ ) besteht eine Korrelation zwischen der Anstiegssteilheit des EPSCs und seiner Amplitude.

Für jede Zelle wurde zu Beginn der Messung die Stimulationsstärke ermittelt, die in ca. 30% der Fälle kein EPSC erzeugte (30% *failure*-Rate). Unter diesen Minimalstimulationsbedingungen wurden im folgenden die Eigenschaften beider Afferenzen untersucht.

Der Zusammenhang zwischen Anstiegssteilheit des EPSCs und seiner Amplitude (Abb. 9E) wies keine Korrelation zwischen beiden Parametern auf. Damit hatte dendritisches Filtern keinen unterschiedlichen Einfluss auf beide Eingänge. Dies lässt darauf schließen, dass die Synapsen beider Eingänge gleichmäßig auf dem Dendritenbaum des postsynaptischen Neurons verteilt waren (Bekkers und Stevens, 1996). Allerdings kann bei den sehr hohen Eingangswiderständen der Subplattenneurone auch die große Längskonstante dazu führen, dass dendritisches Filtern mit dieser Methode nicht beobachtet werden konnte.

### 3.2.3 *Zeitnahe Aktivierung verschiedener Afferenzen ruft unterschiedliche Zellantworten im postsynaptischen Subplattenneuron hervor.*

Um eine mögliche postsynaptische Interaktion zwischen den beiden Eingängen zu untersuchen, wurden sie in schnell aufeinanderfolgendem Wechsel stimuliert (Abb. 10A). Bei nacheinander erfolgender Aktivierung beider Eingänge konnte das EPSCs der stimulierten Afferenz zugeordnet werden ( $\circ$  Thalamus und  $\bullet$  Subplatte). Das Verhältnis beider EPSCs zueinander wurde durch den Quotienten aus der Amplitude des zweiten und der des ersten EPSCs ausgedrückt und für die verschiedenen Stimulationsintervalle errechnet (Abb. 10B). Thalamisch evozierte EPSCs hatten eine relativ konstante Amplitude, selbst wenn kurz zuvor (20-100ms) eine Aktivität aus der Subplatte einlief ( $ISI > 0$  ms). Die Amplitude von SP-EPSCs stieg stark an, wenn die Subplatte kurz (20-50 ms) nach dem Thalamus stimuliert wurde ( $ISI < 0$  ms). So scheint

das Aktivitätslevel in der Subplatte gesteigert zu werden, wenn der subplatteninternen Exzitation eine Aktivität thalamischer Eingänge vorausgeht.

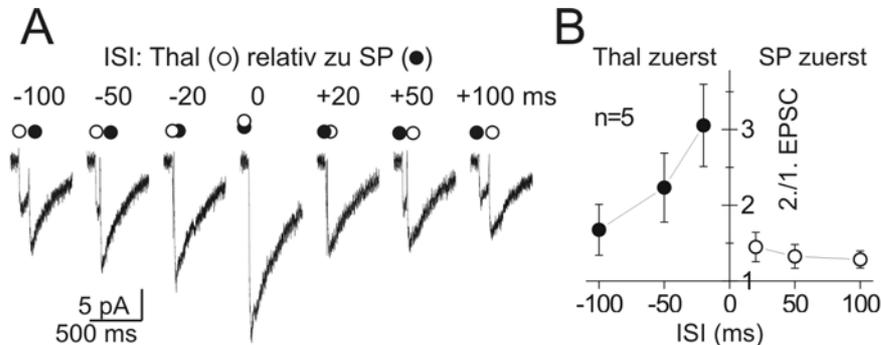


Abb. 10. **Aufeinanderfolgende Aktivierung thalamo-kortikaler und subplatteninterner Afferenzen mit Intervallen von bis zu 100 ms.** **A.** EPSCs, die durch Stimulation des Thalamus (○) und der Subplatte (●) entstehen bei Intervallen von -100 ms (Thalamusstimulation vor Subplattenstimulation) bis +100 ms (Thalamusstimulation nach Subplattenstimulation). Gezeigte Spuren sind Mittelungen dreier Aufzeichnungen. **B.** Verhältnis des zweiten zum ersten EPSC (Quotient aus der Amplitude des zweiten und der des ersten EPSCs) bei den verschiedenen Stimulationsintervallen (n=5 Subplattenzellen).

### 3.2.4 Der Subplatteneingang kann Paarpuls-Fazilitierung (PPF) zeigen.

In kurzem Abstand aufeinander folgende Stimulationen derselben Afferenz (Paarpuls-Stimulation) führten je nach Effizienz der Präsynapse zu einer Veränderung der Amplitude des zweiten EPSCs (Thomson, 2000). Die Eingänge aus Thalamus und Subplatte wurden mit je zwei Pulsen im Abstand von 20-140 ms (Abb. 12) stimuliert. In der Mehrzahl der untersuchten Neurone zeigte der Subplatteneingang Bahnung (Paarpuls-Fazilitierung (PPF), Abb. 12A). Dies war unabhängig vom postsynaptisch aktivierten Rezeptortyp, da die Stimulation aller Rezeptoren (●, n=16) und die selektive Stimulation ausschließlich der NMDA-Rezeptoren (●, n=8) dieselben PPF-Werte ergab. Das weist auf den präsynaptischen Ursprung dieses Phänomens hin. In sechs Zellen wurde nach Stimulation keine PPF beobachtet. Der thalamische Eingang (○, n=10) veränderte sich nicht oder wurde schwächer (PPD, n=3, Abb. 12A,B)

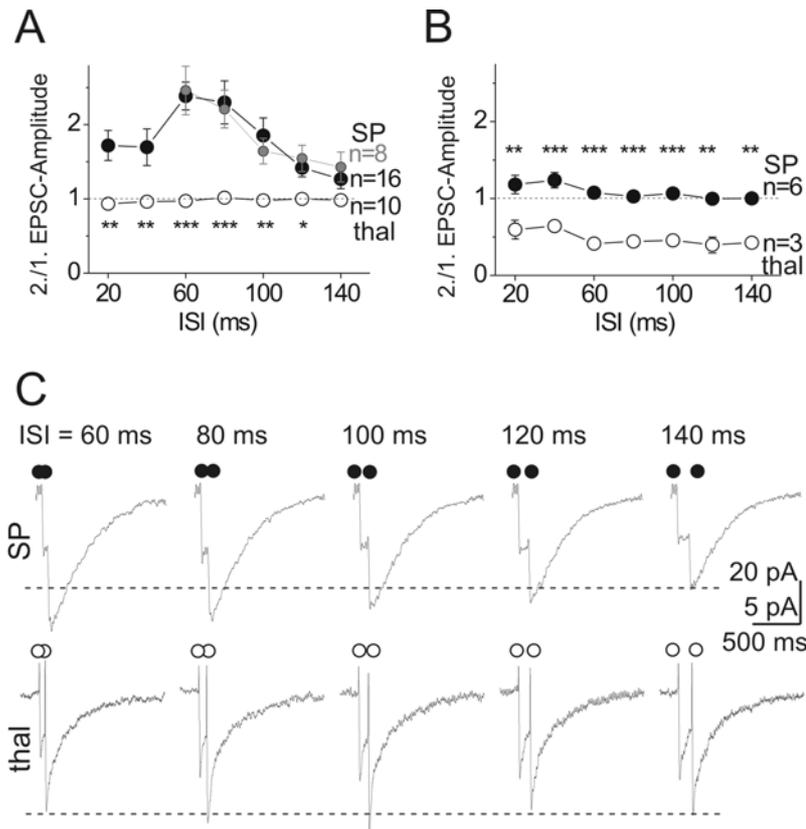


Abb. 12. **Eingangsspezifische Paarpuls-Fazilitierung (PPF) der EPSCs von Subplattenzellen.** **A.** Paarpuls-Stimulation der Subplatte (●, n=16 Zellen) und des Thalamus (○, n=10 Zellen) zeigt eine signifikante Bahnung des Subplatteneingangs bei Stimulationsintervallen (ISI) zwischen 20 und 140 ms. Ein ähnliches Ergebnis wurde erzielt, wenn durch Zugabe von CNQX und Bicucullin reine NMDA-Rezeptor-Ströme betrachtet wurden (●, n=8). **B.** In einigen Zellen wurde das Fehlen von PPF im Subplatteneingang (n=6) und PPD im thalamischen (n=3) beobachtet. **C.** NMDA-EPSCs, die durch Paarpuls-Stimulation mit Intervallen von 60-140 ms hervorgerufen werden.

### 3.2.5 Die thalamokortikale Verbindung hält einer repetitiven Stimulation nicht stand, sondern ermüdet.

Die beiden Eingänge unterschieden sich weiterhin in ihrer Fähigkeit, repetitiver Stimulation zu folgen. Mit niedrigen Frequenzen stimuliert (0,01-3,3 Hz), entstehen in reifen Neuronen immer nahezu gleich große EPSCs (Kandel et al., 2000). Auch für den Subplatteneingang konnte bis zu einer Frequenz von 3,3 Hz keine signifikante Abnahme der EPSC-Amplitude bei repetitiver Reizung beobachtet werden (n=6, Abb. 13A, links). Im Gegensatz dazu wurde bei Stimulation thalamischer Afferenzen ab einer

Frequenz von 0,33 Hz eine signifikante Abnahme der EPSC-Amplitude beobachtet (n=6, Abb. 13A, rechts). Ein derartiges Phänomen ist aus unreifen Neuronen als „synaptic fatigue“ bekannt (Abrahamsson et al., 2005). Abb. 13B zeigt Amplituden von fünf einander folgenden EPSCs bei drei ausgewählten Stimulationsintervallen von 0,3s, 30s und 70s (Subplatten-EPSCs, Abb. 13B links, n=6; thalamische EPSCs, Abb. 13B rechts, n=6). Bei Thalamusstimulation wurde ab dem dritten EPSC die Amplitude signifikant kleiner für 0,3s und 30s ISI.

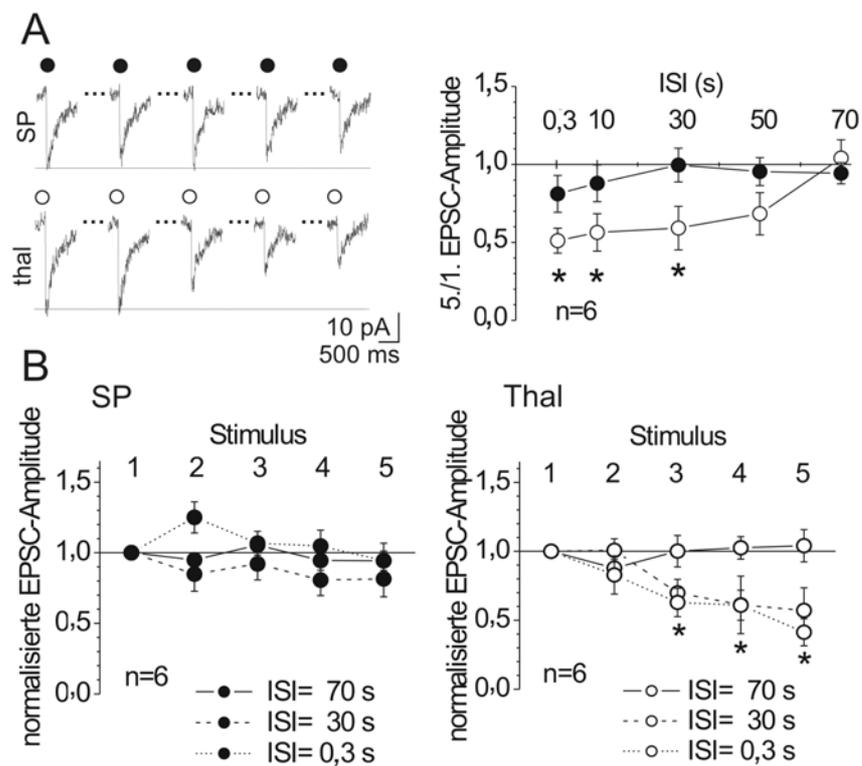


Abb. 13. Synaptische Antwort auf niederfrequente Reizung des thalamischen (○) und subplatteninternen (●) Eingangs. **A. Links:** NMDA-EPSCs auf fünf hintereinander folgende Stimuli mit einem Intervall von 300 ms (Mittelungen jeweils zweier Aufzeichnungen). Die dünnen Linien zeigen die Amplitude des ersten EPSCs an. **Rechts:** Verhältnis der Amplitude des fünften zum ersten EPSC bei Stimulationsintervallen (ISIs) zwischen 0,3s und 70s (n=6). Thalamische EPSCs sind frequenzsensitiv: signifikante Verminderung bei ISIs von 0,3-30s (p<0,05). **B.** Amplituden der fünf aufeinander folgenden EPSCs, die durch Subplatten- (links) bzw. Thalamusstimulation (rechts) mit ISIs von 0,3s, 30s und 70s hervorgerufen werden (n=6 Zellen). Thalamische EPSCs werden signifikant kleiner (p<0,05).

3.2.6 Aus der Subplatte einlaufende Aktivität wird im postsynaptischen Neuron zeitlich summiert.

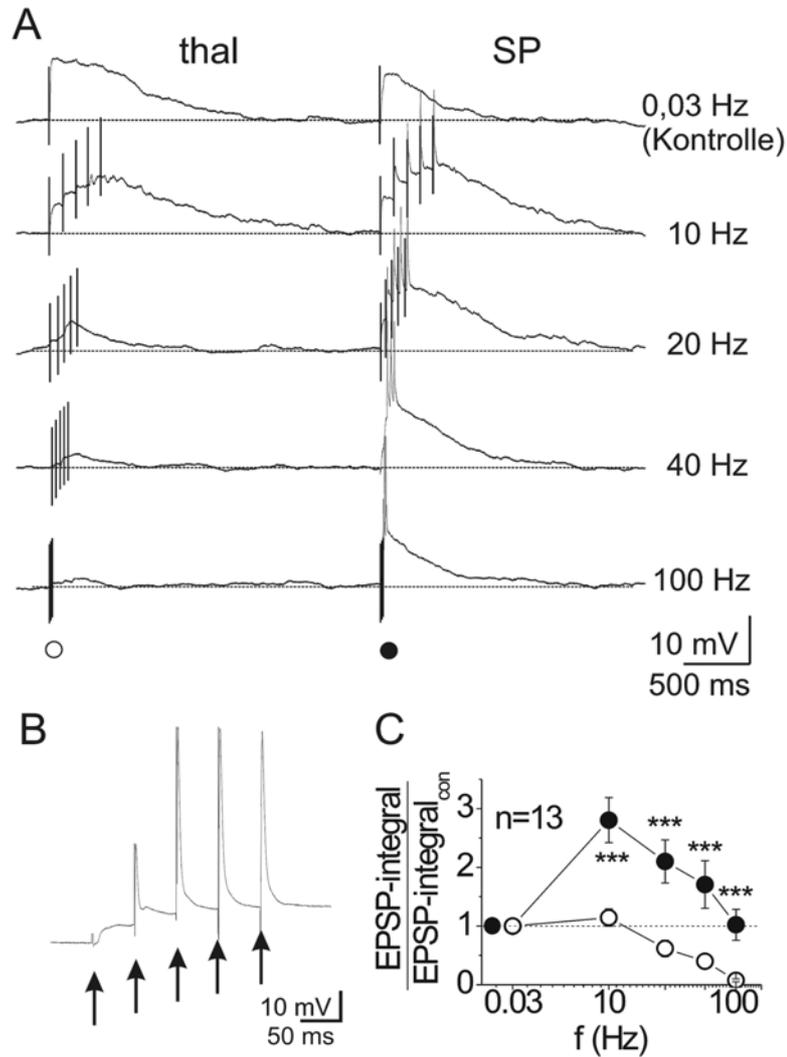


Abb. 14. **Zeitliche Summation der aus Thalamus bzw. Subplatte einlaufenden Aktivität.** A. Hochfrequente Stimulation des Thalamus (○, links) und der Subplatte (●, rechts) bei  $-80$  mV. EPSPs des Subplatteneingangs summieren sich bei Frequenzen zwischen 10 und 40 Hz auf und werden überschwellig. B. Synaptische Antwort auf Subplattenstimulation mit 20 Hz. Aktionspotenziale folgen einzelnen Stimuli. C. Verhältnis der durch repetitive Stimulation erzeugten Zellantwort (EPSP-Integral) zur Kontrollantwort (Integral des ersten, durch 0,03 Hz Stimulation evozierten EPSPs) von 13 Subplattenzellen. Während der thalamische Eingang einer hochfrequenten Reizung nicht standhält, summieren sich die aus der Subplatte einlaufenden EPSP maximal bei 10 Hz.

Repetitive Reizung der beiden Eingänge wurde auch im *current-clamp* Modus untersucht. So sind höhere Stimulationsfrequenzen möglich. Thalamische Afferenzen konnten einer hochfrequenten Reizung nicht folgen. Das EPSP verschwand bei 100 Hz fast vollständig (○ Abb. 14A). Dagegen summierte sich die Aktivität der subplatteninternen Afferenzen im postsynaptischen Neuron auf und erzeugte sogar Aktionspotenziale (● Abb. 14A). Ähnlich intrazellulärer Strominjektion (Abb. 8B) wurde die Subplattenzelle auch durch synaptische Stimulation zu Aktionspotenzialsalven angeregt (Abb. 14B). Trotz gleicher Ausgangs-EPSP-Amplitude bei 0,03 Hz Reizung (Kontrolle) von  $7,1 \pm 1,1$  mV (n=17) in beiden Eingängen, änderte sich die Größe des EPSPs nach repetitiver Reizung signifikant für die unterschiedlichen Afferenzen. Abb. 14C setzt das Ausgangs-EPSPs zum durch repetitive Reizung erzeugten EPSP in Bezug. Das durch repetitive Subplattenaktivierung erzeugte EPSP war für alle getesteten Frequenzen (>0,03 Hz) signifikant größer als das thalamisch induzierte ( $p < 0,001$  für die Frequenzen 10, 20, 40 und 100 Hz, n=13).

### 3.2.7 Überblick über die eingangsspezifischen funktionellen Eigenschaften der Subplattenafferenzen.

Zur Veranschaulichung der oben erläuterten funktionellen Unterschiede des thalamischen und subplatteninternen Eingangs auf Subplattenzellen fasst Tabelle 1 die wichtigsten Eigenschaften zusammen.

EPSC-Eigenschaften der <b><u>thalamischen Afferenz (Thal)</u></b> <i>Symbol in Abbildungen: ○</i>	EPSC-Eigenschaften der <b><u>subplatteninternen Afferenz (SP)</u></b> <i>Symbol in Abbildungen: ●</i>
keine Summation bei zeitnaher Stimulation der Subplatte	Summation bei zeitnaher Stimulation des Thalamus
PPD	PPF
Ermüdung bei niederfrequenter Reizung	Stabilität bei niederfrequenter Reizung
Rückgang bei hochfrequenter Reizung	Steigerung bei hochfrequenter Reizung

Tabelle 1: Eingangsspezifische EPSC-Eigenschaften von Subplattenzellen bei Stimulation des Thalamus bzw. der Subplatte.

### 3.3 Thalamokortikale und subplatteninterne Afferenz unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten.

Die Untersuchung funktioneller Eigenschaften der Subplatten-Afferenzen aus Thalamus und Subplatte ergab Hinweise auf relativ spannungsinsensitive NMDA-Rezeptoren mit geringer Einzelkanalleitfähigkeit. Möglicherweise resultierte dies aus der Beteiligung NR2C- bzw. NR2D-reicher Rezeptoren an der Rezeptorpopulation, was sich auch in der EPSC-Kinetik niederschlagen müsste (Cull-Candy et al., 2001). Um weitere Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von NR2C- bzw. NR2D-reichen Rezeptoren zu erhalten, wurden Kinetik und Spannungsabhängigkeit von NMDA-Rezeptor-vermittelten

Strömen in Subplattenzellen untersucht. Zur molekularen Identifikation der in den elektrophysiologisch abgeleiteten Zellen vorhandenen NMDA-Rezeptor-Untereinheiten wurden Einzelzell-PCR Experimente durchgeführt. Die Anteile von NR2A und NR2B an der Rezeptorpopulation wurden zusätzlich pharmakologisch abgeschätzt.

### 3.3.1 *Die Kinetik der NMDA-Rezeptor-vermittelten EPSCs unterscheidet sich zwischen thalamokortikaler und subplatteninterner Afferenz*

Aufgrund unterschiedlicher Desensitivierungseigenschaften der verschiedenen NMDA-Rezeptor-Subtypen unterscheiden sich die *Decay*-Phasen der EPSCs je nach Untereinheitenzusammensetzung (Cull-Candy et al., 2001). NR2A-haltige Rezeptoren desensitivieren schnell, NR2D-haltige sehr langsam. Zusätzlich sind letztere spannungsinsensitiver.

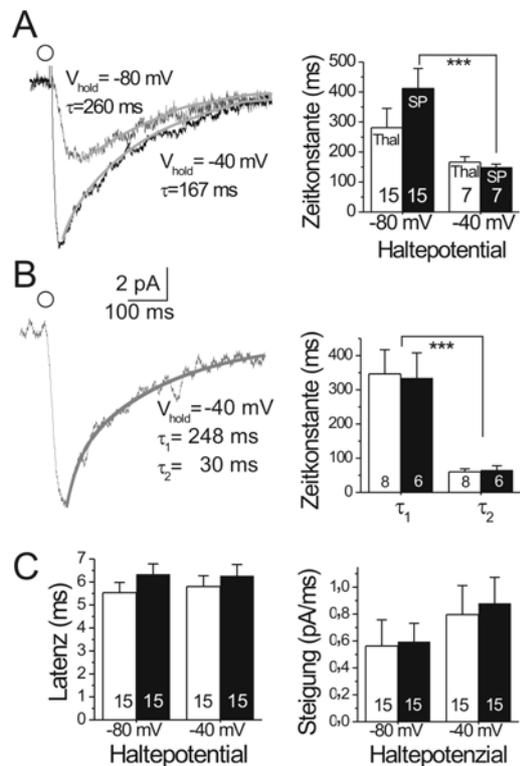
Deshalb wurden NMDA-Rezeptor-vermittelte EPSCs in Subplattenneuronen bei verschiedenen Haltepotenzialen hinsichtlich ihrer Kinetik untersucht. Dabei wurden Zeitkonstanten der *Decay*-Phasen, Latenzzeit sowie Anstiegssteilheit der durch thalamische bzw. subplatteninterne Stimulation ausgelösten EPSCs miteinander verglichen (Abb. 15). Bei -80 mV fiel der Strom langsamer ab als bei -40 mV (Abb. 15A). Für Subplatten-EPSCs war die Zeitkonstante bei -80 mV ( $\tau=411 \pm 73$  ms,  $n=15$ ) signifikant größer als bei -40 mV ( $\tau=148 \pm 7$  ms,  $n=9$ ,  $p<0,001$ ).

Bei -40 mV wurden zwei Gruppen von EPSCs hinsichtlich ihrer *Decay*-Kinetik unterschieden. Die mathematisch beste Beschreibung des Kurvenverlaufs folgte in der einen Gruppe einer monoexponentiellen Funktion, in der anderen einer biexponentiellen. Im letzteren Fall unterschieden sich die Zeitkonstanten der biexponentiellen Funktion signifikant für alle EPSCs. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Stimulationsorten festgestellt werden (Abb. 15B). Die gemessenen Zeitkonstanten reflektierten möglicherweise das Vorhandensein der ubiquitären Untereinheiten NR2A und NR2B (Cull-Candy et al., 2001). Ihre Aktivierung überdeckte bei depolarisierten Potenzialen die Beteiligung aller anderen Untereinheiten (Monyer et al., 1994).

Weder in Latenz noch in Anstiegsteilheit unterschieden sich die EPSCs der beiden Eingänge (Abb. 15C). Diese Parameter hingen auch nicht vom Haltepotential ab. Die beiden Eingänge lagen also nicht an elektrotonisch differenzierbaren Stellen im Subplattenneuron; ein Hinweis auf räumliche Gleichverteilung der Synapsen über den Dendritenbaum des Subplattenneurons (vgl. 3.2.2).

**Abb. 15. Kinetik der NMDA-EPSCs von Subplattenzellen.**

**A.** Thalamisch evozierte NMDA-EPSCs eines Subplattenneurons bei -80 mV und -40 mV (links). Die Abfallphasen der Kurven sind durch monoexponentiellen Funktionen mit der Zeitkonstante  $\tau$  genähert. Rechts: Zeitkonstanten der bei -80 mV und -40 mV aufgenommenen EPSCs für den thalamo-kortikalen (Thal) sowie den subplatteninternen (SP) Eingang. Letzterer weist signifikant unterschiedliche Zeitverläufe auf:  $\tau=411 \pm 67$  ms für -80 mV ( $n=15$ ) und  $\tau=158 \pm 12$  ms für -40 mV ( $n=9$ );  $p<0,001$ . Thalamische Stimulation liefert EPSCs mit Zeitkonstanten von  $281 \pm 64$  ms für -80 mV ( $n=15$ ) und  $156 \pm 18$  ms für -40 mV ( $n=7$ ).



**B.** Thalamisch evoziertes NMDA-EPSC eines Subplattenneurons bei -40 mV, dessen Abfallphase mit einer biexponentiellen Funktion am besten beschrieben werden kann ( $\tau_1=248$  ms,  $\tau_2=30$  ms). Rechts: Zeitkonstanten solcher EPSCs für beide Eingänge bei -40 mV.  $\tau_1$  unterscheidet sich signifikant von  $\tau_2$  in jedem EPSC ( $p<0,001$  für beide Eingänge;  $n=8$  und  $6$ ). **C.** Latenzzeit (links) und Anstiegsteilheit (rechts) von NMDA-EPSCs, die bei -80 mV und -40 mV für beide Eingänge (Thal weiß und SP schwarz) in Subplattenzellen aufgezeichnet wurden ( $n=15$  jeweils).

### 3.3.2 *Die Spannungsabhängigkeit der NMDA-Rezeptor-vermittelten EPSCs unterscheidet sich zwischen thalamokortikaler und subplatteninterner Affferenz.*

Eine NMDA-Rezeptor-vermittelte Zellantwort verschwindet im allgemeinen unter physiologischen Bedingungen bei hyperpolarisierten Potenzialen, da ein Magnesiumatom den Rezeptor blockiert (Mayer et al., 1984). Die Untereinheiten NR2C und NR2D jedoch zeichnen sich durch eine geringere Magnesiumsensitivität aus (Momiya et al., 1996). Ist die Rezeptorpopulation aus NR2C- oder NR2D-haltigen Rezeptoren aufgebaut, entstehen auch bei hyperpolarisierten Potenzialen NMDA-EPSCs (Monyer et al., 1994).

Deshalb wurde die Spannungsabhängigkeit der NMDA-EPSCs in Subplattenzellen für die Eingänge aus Thalamus bzw. Subplatte untersucht (Abb. 16). Am Tag der Geburt (P0, Abb. 16 linke Seite) waren die messbaren Ströme klein und beide Eingänge (Thal weiß und SP schwarz) unterschieden sich in ihrer Spannungsabhängigkeit (Abb. 16C). Für den Subplatteneingang (schwarze Symbole) war die Steigung der Kurve im hyperpolarisierten Bereich flach; ein typischer Kurvenverlauf für NR2C/D-reiche Rezeptoren (Monyer et al., 1994). Im Gegensatz dazu zeigten thalamisch evozierte EPSCs eine für NMDA-Rezeptoren typischere Spannungsabhängigkeit mit Blockade bei Hyperpolarisation (Abb. 16C, weiße Symbole). In älteren Tieren (P3, Abb. 16 rechte Seite) zeigten alle NMDA-Rezeptor-Ströme die von reifen Stadien bekannte Spannungsabhängigkeit (MacDonald und Nowak, 1990).

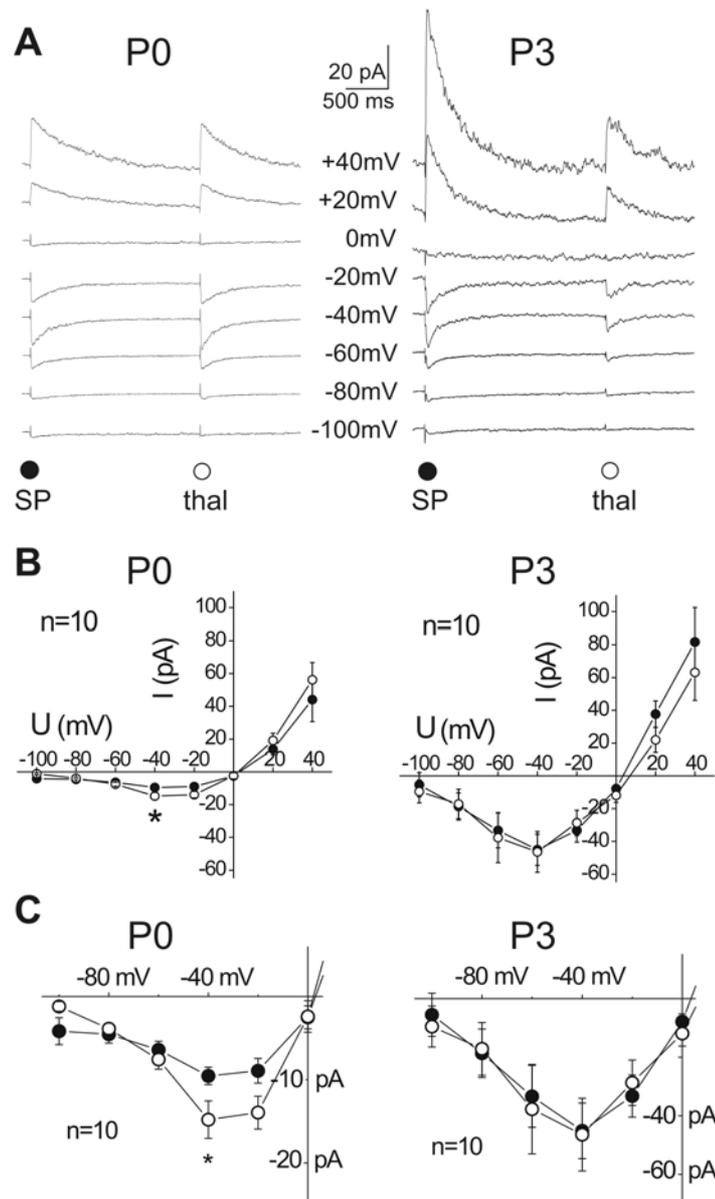


Abb. 16. **Spannungsabhängigkeit der NMDA-Rezeptor-Ströme in P0- und P3-Subplattenzellen.** **A.** NMDA-EPSCs, die bei Haltepotenzialen zwischen -90 mV und +50 mV durch Stimulation der Subplatte (●) bzw. des Thalamus (○) in einem P0- (links) und einem P3-Subplattenneuron (rechts) hervorgerufen wurden. **B.** Amplituden dieser EPSCs im Strom-Spannungsdiagramm (n=11 für P0 und n=7 für P3). **C.** Detail aus B. Amplituden unterscheiden sich eingangsspezifisch nur in P0 (links;  $p < 0,05$  für ● versus ○ bei -40 mV; n=11 jeweils). Der Subplatteneingang (●) besitzt eine schwächere Spannungsabhängigkeit (flachere Steigung) als der thalamokortikale (○) in P0.

### *3.3.3 Die eingangsspezifische Spannungsabhängigkeit der NMDA-Rezeptor-Ströme verschwindet innerhalb der ersten drei Tage. Die NMDA-Rezeptor-Untereinheit NR2D wird exprimiert.*

Kinetik und Spannungsabhängigkeit der NMDA-EPSCs wiesen auf eine beachtliche Beteiligung der NR2D-Untereinheit in subplatteninternen Synapsen hin. Dies wurde genauer untersucht, indem der bei -80 mV verbleibende Strom (vermutlich NR2C/D-vermittelt) zu dem Maximalstrom bei -40 mV (Abb. 17A) für den thalamischen sowie den subplatteninternen Eingang jeder Zelle ins Verhältnis gesetzt wurde (Burgard und Hablitz, 1994).

Im frühen Entwicklungsstadium, P0, war der Quotient für subplatteninterne Synapsen groß ( $0,55 \pm 0,11$ ,  $n=16$ , Abb. 17A). Das bedeutet einen großen Anteil an spannungsinsensitiven NMDA-Rezeptoren in diesen Synapsen. Dagegen war der Quotient für thalamische Synapsen signifikant kleiner ( $0,22 \pm 0,02$ ,  $n=16$ , Abb. 17B). Dieser eingangsspezifische Unterschied war nach zwei Tagen verschwunden (Abb. 17C).

Die elektrophysiologischen Eigenschaften der NMDA-EPSCs gaben funktionelle Hinweise auf das Vorhandensein der Untereinheiten NR2C und/ oder NR2D in Subplattenzellen. Molekularbiologisch konnten mittels Einzelzell-PCR NR2A und NR2B wie erwartet in Subplattenzellen nachgewiesen werden. NR2C fehlte, aber die mRNA von NR2D ist deutlich erkennbar ( $n=5$ , Abb. 17D oben). Die zur Kontrolle auf gleiche Weise untersuchten kortikalen Neurone ( $n=8$ ) exprimierten alle NMDA-Rezeptor-Untereinheiten (Abb. 17D unten).

Somit könnten die eingangsspezifischen Unterschiede auf die unterschiedlich starke Beteiligung der NR2D-Untereinheit (und nicht auf NR2C) in den Subplattensynapsen zurückzuführen sein.

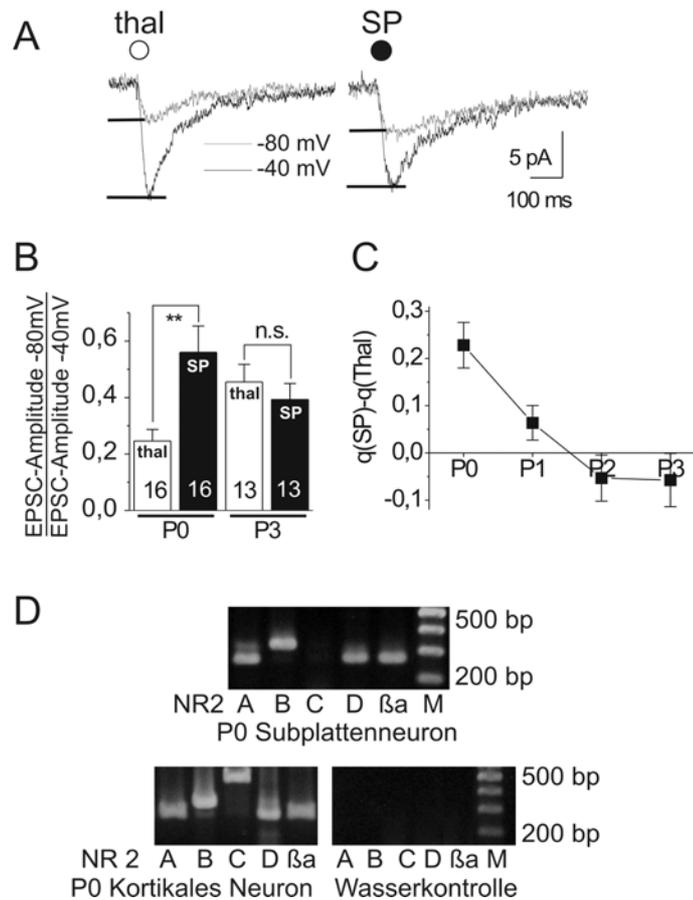


Abb. 17. **Vorhandensein der NR2D-Untereinheit in Subplattenzellen.** **A.** Amplituden von NMDA-EPSCs wurden bei  $-80$  mV und  $-40$  mV für die beiden Eingänge aus Thalamus ( $\circ$ ) bzw. Subplatte ( $\bullet$ ) in Subplattenzellen gemessen. **B.** Diese zueinander ins Verhältnis gesetzten Amplituden (Quotient,  $q$ , aus „EPSC-Amplitude bei  $-80$  mV“ und „EPSC-Amplitude bei  $-40$  mV“) wurden für Zellen aus P0- und P3-Tieren bestimmt als Maß für die Größe des jeweils übrigbleibenden Stromes bei hyperpolarisierten Potenzialen. Bei P0 bleibt viel Strom aus subplatteninternen Synapsen übrig,  $q=0,56 \pm 0,09$ ; aus thalamischen dagegen nur  $q=0,25 \pm 0,04$ . Dieser eingangsspezifische Unterschied ist signifikant mit  $p < 0,01$  ( $n=16$ ). **C.** Die Eingangsspezifität einzelner P0, P1, P2 und P3 Zellen ist ausgedrückt durch den Unterschied, den die Quotienten des übrigbleibenden Stromes aus Thalamus (Thal) bzw. Subplatte (SP) im jeweiligen Neuron annehmen:  $q(\text{SP})-q(\text{Thal})$ . Bei P0 ist der Unterschied groß ( $0,23 \pm 0,05$ ;  $n=16$ ). Bei P1 ist er klein ( $0,06 \pm 0,04$ ;  $n=5$ ). Ab P2 gibt es keinen eingangsspezifischen Unterschied in der Spannungsabhängigkeit mehr ( $-0,05 \pm 0,05$ ;  $n=8$  für P2 und  $-0,06 \pm 0,05$ ;  $n=13$  für P3). **D.** Einzelzell-RT-PCR-Ergebnisse aus einem P0-Subplattenneuron (oben) und zur Kontrolle aus einem kortikalen Neuron, sowie Wasser (unten). Helle Banden bedeuten mRNA-Nachweise für die Untereinheiten NR2A-D und beta-Aktin. Als Marker, M, dient eine 100 bp DNA-Leiter. Gezeigt ist jeweils der Bereich von 200-500 bp.

### 3.3.4 Pharmakologisch unterscheiden sich NMDA-Rezeptor-vermittelte EPSCs von Neuronen der Subplatte nicht.

Untereinheiten-spezifische Antagonisten werden in der pharmakologischen Forschung zur Identifizierung von Rezeptorzusammensetzungen eingesetzt. Jedoch sind für die Untereinheiten NR2C und NR2D bisher keine bekannt. Ifenprodil ist ein hochspezifischer Blocker für NR2B-enthaltende Rezeptoren. NVP-AAM077 blockiert NR2A-enthaltende Rezeptoren bei geringer Dosierung (50 nM) selektiv (Berberich et al., 2005). Diese beiden Pharmaka wurden eingesetzt, um den Anteil der Untereinheiten NR2A und NR2B in der Rezeptorpopulation zu bestimmen.

Ifenprodil blockierte ca. 30% des EPSCs und NVP ca. 15% (Abb. 18). Da die beiden Eingänge (Thal und SP) sich weder in ihrer Ifenprodil-Sensitivität noch in ihrer NVP-Sensitivität unterschieden, scheinen die Untereinheiten NR2A und NR2B etwa den gleichen Anteil in allen Synapsen der Subplattenzellen zu enthalten. Das Ergebnis lässt eine starke Beteiligung der NR2B-Untereinheit vermuten, was im betrachteten Entwicklungsstadium zu erwarten ist (Scheetz und Constantine-Paton, 1994).

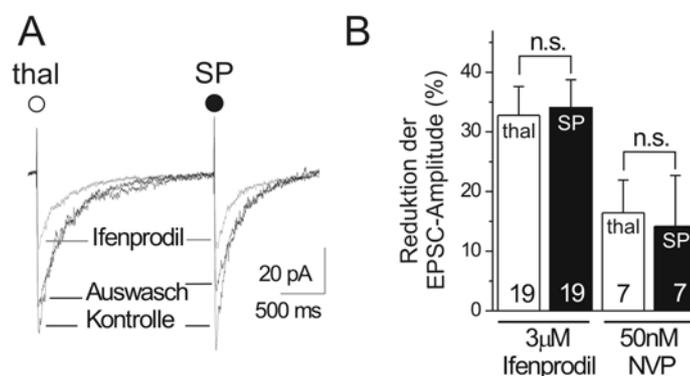


Abb. 18. **Pharmakologie der NMDA-EPSCs von Subplattenzellen.** A. NMDA-EPSCs eines P1-Subplattenneurons bei -40 mV. EPSCs sind erzeugt durch Stimulation des Thalamus (○) bzw. der Subplatte (●). Unter Badapplikation von 3 μM Ifenprodil verringert sich die Amplitude. Nach Auswaschen erreicht sie fast wieder den Ausgangswert (Kontrolle). B. Reduktion der EPSC-Amplitude durch die Pharmaka Ifenprodil (NR2B-Antagonist, 3 μM; n=19) und NVP-AAM077 (NR2A-Antagonist, 50 nM; n=7).

### **3.4 CA1-Pyramidenzellen zeigen eine synapsenspezifische Verteilung der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten und dopaminerge Modulation.**

In Subplattenzellen war die NMDA-Rezeptor-Untereinheit NR2D synapsenspezifisch unterschiedlich verteilt (Kapitel 3.3). Eine eingangsspezifische Verteilung von NMDA-Rezeptor-Untereinheiten ist von kortikalen Schicht V-Pyramidenzellen (Kumar und Huguenard, 2003) sowie von hippocampalen CA1-Pyramidenzellen der Ratte bekannt (Arrigoni und Greene, 2004) bekannt. Letztere exprimieren an ihren Synapsen mit Schaffer-Kollateralen wesentlich mehr NR2B als NR2A verglichen mit den Synapsen der temporo-ammonischen Fasern. Im folgenden wurde daher untersucht, ob auch CA1-Pyramidenzellen der Maus Eingangsspezifität aufweisen und welche Folgen das auf die dopaminerge Modulation des NMDA-Rezeptor-Systems haben könnte.

#### *3.4.1 In CA1-Pyramidenzellen besitzen die Synapsen der Schaffer-Kollateralen NR2B-reichere NMDA-Rezeptoren als die des temporo-ammonischen Pfades.*

Extrazelluläre Stimulation in *Stratum radiatum* und *Stratum lacunosum-moleculare* des Hippocampus (Abb. 2) bewirkte EPSCs in CA1-Pyramidenzellen. Pharmakologisch wurden NMDA-Rezeptor-vermittelte Ströme durch Zugabe von GABA<sub>A</sub>-Rezeptorblocker (50 µM PTX) und AMPA/Kainat-Rezeptorantagonist (10 µM NBQX) isoliert. Diese NMDA-EPSCs wurden durch Stimulation der Schaffer-Kollateralen (SCH, *Stratum radiatum*) und temporo-ammonische Fasern (TA, *Stratum lacunosum-moleculare*) evoziert (Abb. 19A). 10 µM Ifenprodil verminderte die EPSC-Amplituden. SCH-EPSCs der CA1-Zellen wurden stärker inhibiert ( $47 \pm 9\%$ , n=11) als deren TA-EPSCs ( $25 \pm 9\%$ , n=11 (selbe Zellen),  $p < 0,05$ , Abb. 19C). In CA1-Pyramidenzellen der Maus befinden sich demnach mehr NR2B-haltige NMDA-Rezeptoren in Synapsen der Schaffer-Kollateralen, verglichen mit denen des temporo-ammonischen Eingangs derselben Zelle (Abb. 19B).

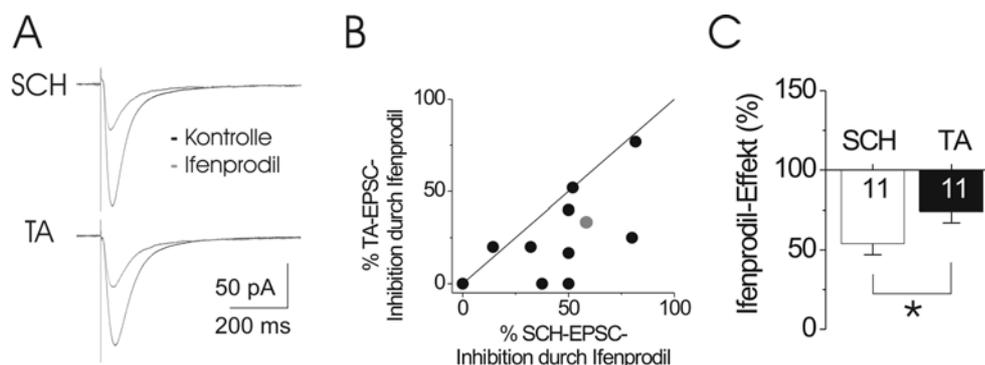


Abb. 19. **Ifenprodilsensitivität der NMDA-EPSCs von distinkten Synapsen an CA1-Pyramidenzellen.** **A.** Zellantworten eines CA1-Neurons auf Stimulation zweier Afferenzen, Schaffer-Kollateralen (SCH) und temporo-ammonischer Fasern (TA), unter Kontrollbedingungen (schwarz) und unter Badapplikation von 10 $\mu$ M Ifenprodil, einem NR2B-Antagonisten (grau). Stromspuren sind Mittelungen aus 58 EPSC-Aufzeichnungen. **B.** Ifenprodilinhibition der EPSCs von 11 CA1-Zellen. SCH-EPSCs werden stärker inhibiert als TA-EPSCs desselben Neurons. Grauer Punkt: Zelle aus A; Linie: Winkelhalbierende; 0%: keine Inhibition. **C.** Ifenprodileffekt auf die Eingänge SCH und TA der CA1-Neurone (n=11; p<0,05, Mann-Whitney-Test). 100%: Kontroll-EPSC.

### 3.4.2 NR2B-vermittelte EPSCs werden in CA1-Pyramidenzellen durch Dopaminausschüttung potenziert.

NMDA-EPSCs werden durch Aktivierung dopaminerger Rezeptoren moduliert (Lee und Liu, 2004). In nativen Rezeptorpopulationen findet man sowohl Potenzierung als auch Inhibition. Um zu untersuchen, ob die Richtung des Effekts von der postsynaptischen Zusammensetzung der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten abhängt, wurden Experimente an NR2A $^{-/-}$  Tieren durchgeführt, bei welchen die NR2A-Untereinheit genetisch ausgeschaltet ist.

CA1-Pyramidenzellen von NR2A $^{-/-}$  Tieren zeigten unter Aktivierung des dopaminergen Systems durch Badapplikation des D1/5-Agonisten SKF-81297 potenzierte EPSCs (Abb. 20A). Die in diesen Tieren aus NR2B bestehenden Rezeptoren der Synapsen mit Schaffer-Kollateralen (SCH) und temporo-ammonischen Fasern (TA) wurden durch SKF unterschiedlich stark potenziert (Abb. 20B). Der SKF-Effekt ist in TA-Synapsen größer (Abb. 20C), möglicherweise weil diese im Wildtyp sehr NR2A-reichen Synapsen im *knock-out*-Tier stärker verändert sind.

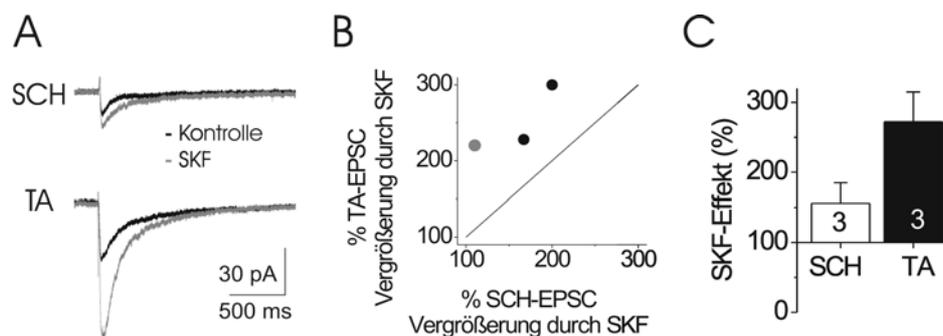


Abb. 20. **Modulation NR2B-vermittelter EPSCs durch den Dopaminagonisten SKF-81297.** **A.** Ganzzellableitungen eines CA1-Neurons von einer NR2A<sup>-/-</sup> Maus mit Stimulation afferenter Fasern: Schaffer-Kollateralen (SCH) und temporo-ammonische Fasern (TA). Gezeigte Spuren sind jeweils aus 37 Ableitungen gemittelt. Schwarz: Kontrollbedingungen; grau: Badapplikation von 10 $\mu$ M SKF-81297. **B.** Modulation der EPSC-Amplituden dreier Neurone durch SKF in Prozent (100%=Kontrolle). TA-EPSCs werden stärker potenziert als SCH-EPSCs. Inhibition tritt nicht auf. Grauer Punkt: Zelle aus A; Linie: Winkelhalbierende. **C.** Potenzierender SKF-Effekt auf die Eingänge SCH und TA dreier CA1-Neurone von NR2A<sup>-/-</sup> Tieren. 100%=Kontroll-EPSC.

### 3.5 NMDA-Rezeptoren sind für die Extinktion einer aversiven Erinnerung wichtig.

Die bisherigen Experimente zeigten, dass den verschiedenen NMDA-Rezeptor-Subtypen der hippocampalen CA1-Zellen wesentliche Funktionen bei der synaptischen Informationsmodulierung zukommen. Die Subregionen des Hippocampus übernehmen bei Lernvorgängen unterschiedliche Funktionen (Kesner, 2007b). Da in der CA1-Region hochdifferenziert regulierte, eingangsspezifische NMDA-Rezeptoren gefunden wurden (Kapitel 3.4) sollte im folgenden die Rolle der NMDA-Rezeptoren von CA1-Pyramidenzellen bei spezifischen Lernprozessen, nämlich der Akquisition und Extinktion von Gedächtnisinhalten, *in vivo* untersucht werden. Dazu wurden in adulten Tieren die NMDA-Rezeptoren in CA1-Zellen ausgeschaltet und das Verhalten dieser CA1-NMDA-Rezeptor-ko-Mäuse beobachtet.

### 3.5.1 AAV-Cre Injektion in die CA1-Region des dorsalen Hippocampus von fNR1-Mäusen führt zu einem selektiven NMDA-Rezeptor-Genverlust.

Während einer stereotaktischen Operation wurden jeweils 1µl Viruslösung (AAV-Cre bzw. AAV-lacZ) bilateral in die CA1-Region des dorsalen Hippocampus von fNR1-Mäusen injiziert. Durch die hier verwendete präzise Injektionstechnik kann ein eng umschriebener Bereich selektiv infiziert werden, ohne dass das Virus sich im ganzen Hippocampus verbreitet.

In-situ Hybridisationen von NR1-mRNA (Abb. 21A) in coronalen Hirnschnitten von fNR1-Tieren, die mit AAV-Cre infiziert worden waren zeigten, dass die Injektion des Virus zu einem spezifischen Verlust der NR1-Expression im Bereich des Injektionsortes führt. Die nukleäre Gegenfärbung mit *pico green* (Mitte) beweist, dass der verringerten Expressionsrate kein Verlust von Neuronen zugrunde liegt. Die geringe Neurotoxizität des Virus wurde bereits von (Scammell et al., 2003) nachgewiesen. Im dritten Bild ist das Ausmaß, das der NR1-Genverlust in neun Tieren annahm schematisch dargestellt. Die in-situ Hybridisierung von NR1-mRNA im AAV-lacZ infizierten Tier (nicht gezeigt) bewies, dass die Injektion von AAV-lacZ keinen mRNA-Verlust induzierte. Mit AAV-lacZ infizierte Mäuse dienten im folgenden als Kontrolltiere.

Elektrophysiologische Ableitungen von CA1-Pyramidenzellen belegten das Fehlen aller funktionellen NMDA-Rezeptoren in den Neuronen, die mit dem Cre-Rekombinasehaltigen Virus infiziert worden waren (Abb. 21B, linke Seite). Um synaptische Ströme zu evozieren, wurden sowohl Schaffer-Kollateralen (SCH) als auch der temporo-ammonische Faserstrang (TA) extrazellulär stimuliert. Abgeleitet wurden pharmakologisch isolierte (50 µM PTX und 10 µM NBQX) NMDA-Rezeptor-vermittelte EPSCs im *whole-cell voltage-clamp* Modus. Im AAV-Cre infizierten Tier traten in allen Neuronen, die aus der infizierten Region abgeleitet wurden (schwarz-weiße Kreissymbole, n=7) keinerlei NMDA-Rezeptor-Ströme auf (schwarze Stromspuren). Benachbarte Neurone desselben Tieres zeigten normale NMDA-Rezeptor-Ströme (graue Stromspuren und dazugehörige grau symbolisierte Zellen, n=15). Alle der im AAV-lacZ infizierten Tier abgeleiteten Neurone hatten normale NMDA-EPSCs (n=7), auch wenn sie in der infizierten Region lagen (schwarze Spuren und Kreissymbole, n=3).

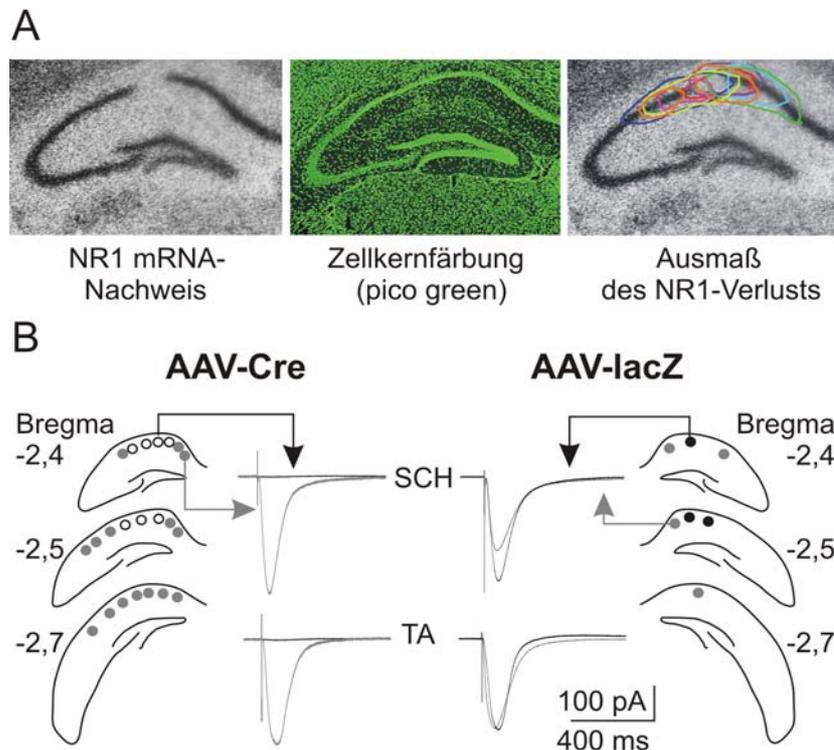


Abb. 21. **Lokaler NMDA-Rezeptor-Verlust in der CA1-Region des dorsalen Hippocampus von fNR1-Mäusen.** **A.** In situ Hybridisation der mRNA der NMDA-Rezeptor-Untereinheit NR1 im dorsalen Hippocampus einer fNR1-Maus zeigt den Verlust des Signals (Fehlen der schwarzen Färbung im *Stratum pyramidale*, links) in der vom Virus befallenen Teilregion von CA1. 1µl eines Cre-Rekombinase-beinhaltenden Adeno-assoziierten Virus (AAV-Cre) wurde bilateral in die CA1-Region des dorsalen Hippocampus von geflochten NR1-Mäusen (Tsien et al., 1996) injiziert. Dadurch wurde der *knock-out* induziert. Die nukleäre Gegenfärbung (pico green) des links gezeigten Schnittes belegt, dass keine Gewebeschädigung auftrat (Mitte). Das räumliche Ausmaß des virusinduzierten Genverlusts von neun Tieren ist rechts schematisch dargestellt. **B.** *Whole-cell voltage-clamp* Ableitungen von CA1 Pyramidenzellen zeigen den funktionellen Verlust der NMDA-Rezeptoren im von AAV-Cre befallenen Gebiet. Die Lage der abgeleiteten Zellen ist in Hippocampuszeichnungen von Bregma -2,4; -2,5 und -2,7 eingetragen. Schaffer-Kollateralen (SCH) und Fasern des temporo-ammonischen Pfades (TA) wurden extrazellulär stimuliert, um pharmakologisch isolierte NMDA-Rezeptor-vermittelte EPSCs im postsynaptischen CA1-Neuron hervorzurufen. Das NMDA-Rezeptor-Signal fehlt in AAV-Cre infizierten Zellen (links, schwarz-weiße Kreissymbole mit dazugehörigen schwarzen Stromspuren, n=7). Zellen in der Umgebung haben normale NMDA-EPSCs (graue Kreissymbole und graue Stromspuren, n=15). AAV-lacZ infizierte Zellen (rechts) zeigen normale NMDA-EPSCs (schwarze Kreissymbole mit schwarzen Stromspuren, n=3), wie auch umgebende Neurone (graue Kreissymbole und graue Stromspuren, n=4), da das Virus kein Cre-Rekombinaseenzym enthält. Die mittig dargestellten Stromspuren entstammen jeweils den mit Pfeilen gekennzeichneten Neuronen, die zuerst über SCH (*Stratum radiatum*) und dann über TA (*Stratum lacunosum-moleculare*) stimuliert wurden.

### 3.5.2 *In CA1-NMDA-Rezeptor-ko-Mäusen findet keine Extinktion einer aversiven Erinnerung statt.*

In adulten fNR1-Mäusen wurde mittels Virusinfektion ein NMDA-Rezeptor-Verlust in CA1-Neuronen induziert. Die so genetisch veränderten Tiere (Cre) wurden klassischer Konditionierung unterzogen. Sie lernten, einen bestimmten Kontext zu fürchten, welcher aus einer Schockbox mit Metallgitterboden bestand. Als Kontrollgruppe dienten virusinfizierte Tiere, bei denen kein Genverlust induziert worden war (lacZ). Das Versuchsdesign ist in Abb. 22A oben schematisch dargestellt. Zum Zeitpunkt Tag 0 wurden die Tiere mittels dreier Stromschläge dressiert, die sie an den Füßen erhielten. Sie wurden dem Kontext dabei insgesamt fünf Minuten lang ausgesetzt. Drei Stunden später wurden sie demselben Kontext wiederum fünf Minuten lang ausgesetzt und ihr Angstverhalten (*freezing*) wurde gemessen. Diese Prozedur wiederholte sich ab Trainingszeitpunkt alle 24 Stunden zehn Tage lang sowie ein weiteres Mal an Tag 43 (sechs Wochen später), ohne dass die Tiere wieder einen Fußschock erhielten. Nur am Tag 9 wurde ein Erinnerungsschock geringerer Intensität appliziert, der die Angst wiedererweckte (*reinstatement*). Während sich beide Gruppen, Cre und lacZ, in der Erlernphase nicht unterschieden (s. Tag 1, Abb. 22A), bildete sich ab Tag 2 ein Unterschied im Angstverhalten heraus, der über den gesamten beobachteten Zeitraum erhalten blieb. Sogar sechs Wochen nach Konditionierung unterschieden sich die Gruppen noch signifikant (*freezing*  $42 \pm 4\%$ ,  $n=17$  für Cre und  $22 \pm 2\%$ ,  $n=20$  für lacZ,  $p<0,01$ ; Bonferroni-Mittelwertvergleich).

Wie oben beschrieben, wurde das Angstverhalten der einzelnen Mäuse nach Dressur täglich fünf Minuten lang im konditionierten Kontext gemessen. In Abb. 22B sind die Ergebnisse in einminütigen Intervallen exemplarisch von Tag 2 und Tag 7 dargestellt. Das Verhalten der Kontrollgruppe (lacZ) folgte dem zu erwartenden Kurvenverlauf eines exponentiellen Abfalls mit positiver Zeitkonstante  $\tau$  (Lat, 1973). Das Vorzeichen der Zeitkonstante änderte sich jedoch (Sign-Test) bei der Beschreibung des Verhaltens der *knock-out* Tiere (Cre, exponentieller Abfall mit negativem  $\tau$ ).

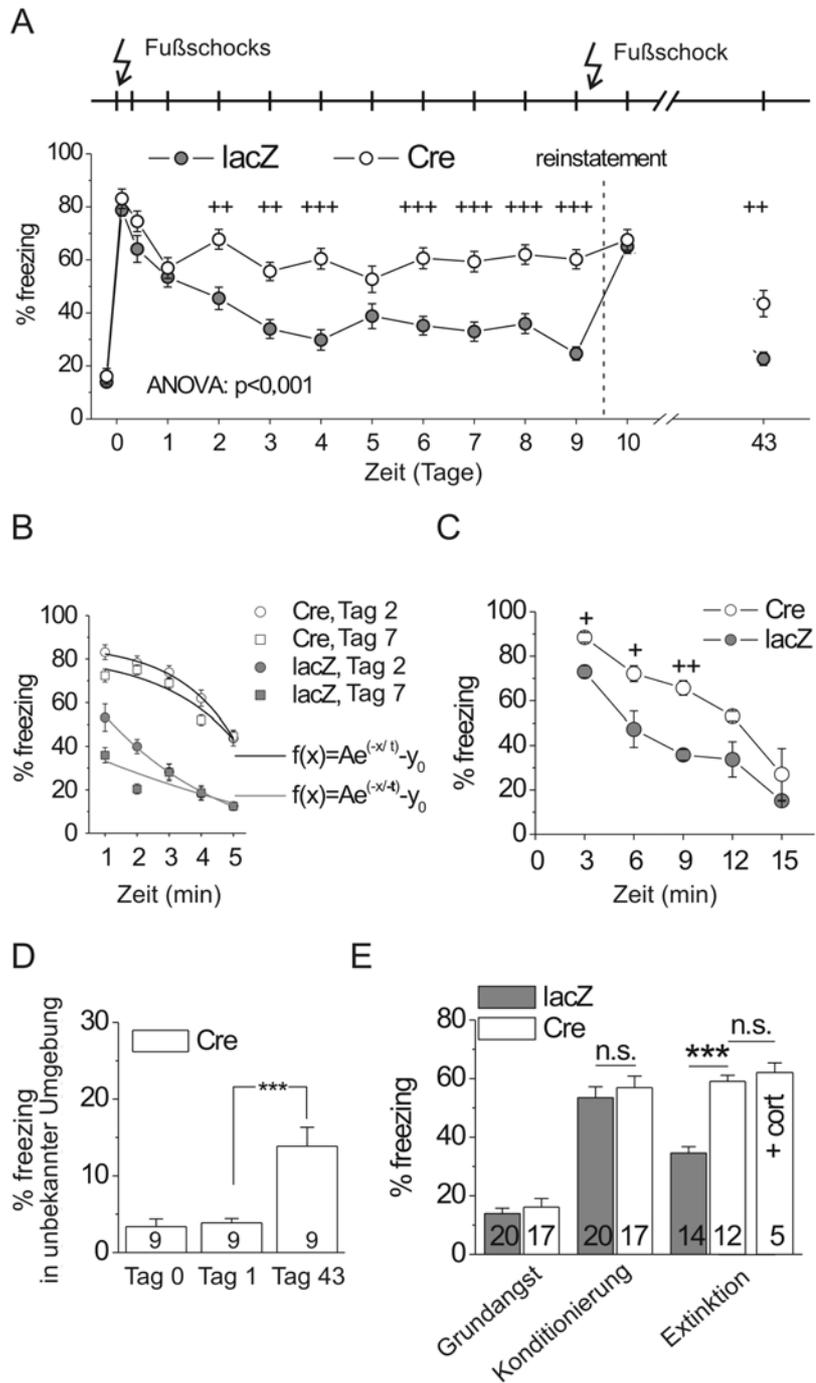


Abb. 22. **Angstkonditionierung und Extinktion der Angsterinnerung in fNR1-Mäusen.** A. AAV-Cre (weiße Symbole,  $n=17$ ) und AAV-lacZ (graue Symbole,  $n=20$ ) -injizierte Tiere wurden folgendermaßen angstkonditioniert: während fünfminütigem Aufenthalt in einer unbekannt Box erhielten sie drei Fußschocks (0,5 mA, 2s, Intervall 1min). Drei Stunden nach dieser Dressur, sowie nach jeweils 24 Stunden für 10 Tage und 6 Wochen später, wurden die Tiere der selben Box wieder ausgesetzt, ohne Fußschocks zu erhalten (s. Darstellung des Versuchsverlaufs auf schematischer Zeitleiste). An Tag 9 erhielten sie einen Schock geringerer Intensität (0,3 mA, 2s), der Reinstatement verursacht. Ihr Freezing-Verhalten wurde manuell alle 5s gemessen. Beide Gruppen (Cre vs. lacZ) wurden verglichen mittels

ANOVA ( $p < 0,001$ ) und Bonferroni-Mittelwertvergleich ( $p < 0,05$  +;  $p < 0,01$  ++;  $p < 0,001$  +++). **B. Angstverlauf bei initialer Gewöhnungsphase.** Das im fünfminütigen Test gemessene Angstverhalten wurde für Tag 2 und Tag 7 mittels exponentieller Funktionen,  $y(x) = Ae^{-x/t} - y_0$ , näherungsweise beschrieben:  $y_{Cre}(x) = -2,51e^{-x/1,76} + 86,74$ ,  $R^2 = 0,999$ ;  $y_{lacZ}(x) = 84,60e^{-x/3,96} - 11,66$ ;  $R^2 = 0,998$  an Tag 2 und  $y_{Cre}(x) = -4,57e^{-x/2,32} + 82,43$ ,  $R^2 = 0,922$ ;  $y_{lacZ}(x) = 67,19e^{-x/10,39} - 27,72$ ;  $R^2 = 0,72$  an Tag 7 ( $n = 12$  für Cre,  $n = 11$  für lacZ, jeweils). Der Sign-Test zeigt einen Vorzeichenwechsel von lacZ nach Cre. **C. Langzeithabituatation.** Wurden die Tiere dem konditionierten Kontext 15 Minuten lang exponiert, verringerte sich das Freezing in beiden Gruppen ( $n = 9$ , jeweils). Die Mittelwerte wurden mit dem Bonferroni-Test verglichen (+ =  $p < 0,05$ , ++ =  $p < 0,01$ ). **D. Generalisierung.** Ein unbekannter Kontext verursacht am ersten Tag nach Konditionierung (Tag 1) kein erhöhtes Freezing, wohl aber 6 Wochen später (Tag 43). **E. PTSD-Modell.** Grundangst (Tag 0), Angstkonditionierungseffekt (Tag 1) und seine Extinktion (Tag 2-9) wurde verglichen zwischen CA1-NMDA-Rezeptor-ko- (Cre) und Kontrolltieren (lacZ). Fünf Tieren der Cre-Gruppe wurden, direkt nach jeder Exposition an Tag 2-9, 10mg/kg Kortikosteron intraperitoneal injiziert (Extinktion + Kort.).

Drei Stunden nach der Dressur wurden die Tiere dem konditionierten Kontext längere Zeit ausgesetzt (15 Minuten), um ihr Habitationsvermögen zu prüfen (Abb. 22C). Während der ersten neun Minuten zeigte die *knock-out* Gruppe (Cre) höheres freezing (Bonferroni-Test). Danach fiel es bei beiden Gruppen auf 20-30% ab.

An Tag 43 (sechs Wochen nach der Konditionierung) zeigten CA1-NMDA-Rezeptor-ko-Mäuse (Cre) erhöhtes Angstverhalten gegenüber einer *neuen* Umgebung (Abb. 22D). Diese Art von Generalisierung trat am ersten Tag noch nicht auf.

Vergleicht man beide Tiergruppen hinsichtlich Grundangst (gemessen vor der Dressur an Tag 0) und Konditionierungsergebnis (Erlernen bzw. Akquisition der Angst am ersten Tag), so verhielten sie sich gleich (Abb. 22E). Sie unterschieden sich jedoch in ihrer Extinktionsfähigkeit (gemessen an Tag 2-9). Während der Extinktionsphase (Tag 2-9) wurde einem Teil der Tiere das Stresshormon Kortikosteron, das normalerweise bei Stress ausgeschüttet wird und zur Angstverarbeitung beiträgt (Brinks et al., 2008), direkt nach dem täglichen Test intraperitoneal appliziert. Kortikosteron konnte die fehlende Extinktion in der CA1-NMDA-Rezeptor-ko Gruppe nicht wiederherstellen (Cre, Extinktion+Kort.,  $n = 5$ ). In der Kontrollgruppe begünstigte Kortikosteron den Extinktionsprozess ( $n = 5$ , nicht gezeigt), was den Ergebnissen aus Wildtypmäusen ähnelt (Blundell, unveröffentlicht).

### 3.5.3 Schockintensität und Umgebungsgestaltung beeinflussen das Angstverhalten beider Tiergruppen in gleicher Weise.

Die optimale, zur Angstkonditionierung eingesetzte Schockintensität, wurde in einem Vorversuch ermittelt. Ein einziger Fußschock von 0,3 mA Stärke löste im naiven, untrainierten Tier eine leichte Angstreaktion aus (Abb. 23A). Nach der Dressur aber erzeugte derselbe Schock eine signifikant stärkere Angst. Er wurde als *reminder shock* eingesetzt, da mit einem Schock von 0,3 mA zwischen beiden Bedingungen (vor und nach der Konditionierung) unterschieden werden konnte, falls es sich um einen Extinktionsprozess handelte. Wäre dagegen der Vorgang des Vergessens beobachtet worden, hätte sich die Stärke der Angst, die von einem 0,3 mA-Schock hervorgerufen wurde, vor und nach der Konditionierung nicht unterschieden. Für die Dressur wurde eine Stromstärke von 0,5 mA gewählt. Da zwei aufeinander folgende Schocks dieser Stärke nur ca. 60% freezing hervorriefen (nicht gezeigt), wurde die Anzahl für Extinktionsuntersuchungen auf drei erhöht.

Einem unterschiedlichen Extinktionsverlauf, wie in 3.5.2 beschrieben, könnte eine unterschiedliche Schmerzsensitivität der Tiere zugrunde liegen. Da die Versuchsanordnung schmerzende Stromschläge beinhaltete, musste festgestellt werden, ob die Testtiere diese Behandlung möglicherweise intensiver erleben als die Kontrolltiere. Zur Bestimmung der Schmerzsensitivität wurden naive Tiere in die Schockbox verbracht und ihr Verhalten auf einzelne Stromschläge steigender Stärke beobachtet. Die Reaktion der Tiere wurde, neben dem Fehlen einer Reaktion bei niedrigen Stromstärken, in drei Kategorien geteilt: Zucken, Springen, Quieken. Die Gruppen (*lacZ* und *Cre*) unterschieden sich nicht. Lautäußerungen begannen für beide knapp unter 0,3 mA (Abb. 23B).

Ihre Fähigkeit, zwischen Kontexten unterscheiden zu können, wurde getestet, indem die Tiere 3 und 24 Stunden nach der Dressur nicht nur in den bekannten Kontext verbracht, sondern das *freezing* auch in einer für sie neuen, unbekanntem Umgebung gemessen wurde. Die neue Umgebung (andere Box) rief bei allen Tests weniger Angst hervor als die bekannte Schockbox (Abb. 23C). Demnach waren alle Tiere zu jeder Zeit in der Lage, beide Kontexte zu unterscheiden. Dennoch war die Angst drei Stunden nach Dressur gegenüber der neuen Umgebung signifikant höher in der CA1-NMDA-Rezeptor-ko-(*Cre*)-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe (*lacZ*).

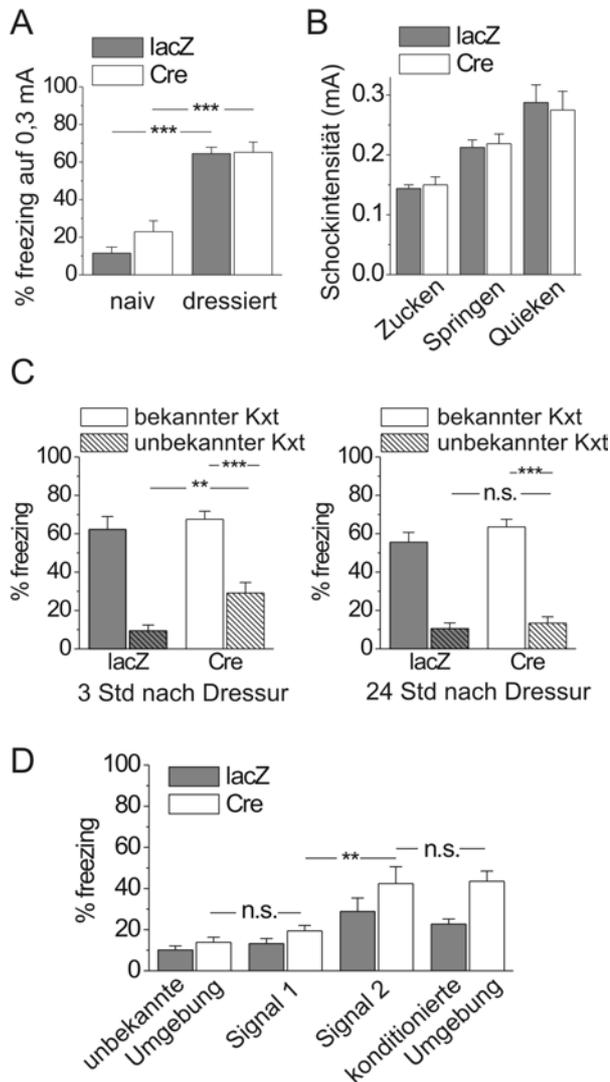


Abb. 23. Einfluss von Schockintensität und Umgebungsgestaltung auf das Angstverhalten von fNR1-Mäusen. **A.** Optimale Schockintensität. Freezing auf einen einzigen 0,3 mA-Fußschock steigt im dressierten Tier signifikant an (n=11 bzw. 9 für lacZ bzw. Cre). **B.** Schmerzsensitivität. Das Verhalten auf Fußschocks steigender Intensität wurde in drei Kategorien eingeteilt: Zucken, Springen, Quieten. Die niedrigste Intensität, bei der das jeweilige Verhalten erstmalig auftrat wurde für jede Maus festgestellt (n=11 bzw. 9 für lacZ bzw. Cre; kein Gruppenunterschied). **C.** Kontext-Unterscheidungsvermögen. 3 und 24 Stunden nach der Dressur wurden die Tiere sowohl in den altbekannten, konditionierten als auch in einen unbekanntem, neuen Kontext verbracht. Das Freezingverhalten wurde für jede Gruppe (lacZ und Cre, n=11 und 9) unter beiden Bedingungen gemessen. Die Angst gegenüber einer neuen Umgebung ist jeweils signifikant kleiner als in der konditionierten Schockbox. Drei Stunden nach der Dressur unterscheiden sich zusätzlich die Gruppen

lacZ und Cre in ihrem freezing in unbekannter Umgebung ( $10 \pm 3\%$  für lacZ und  $30 \pm 6\%$  für Cre;  $p < 0,01$ ). **D.** Signalwirkung verschiedener Teile der Umgebung. Das Angstverhalten beider Gruppen (lacZ und Cre, n=8 jeweils) wurde 6 Wochen nach dem Training in Umgebungen gemessen, die entweder völlig neu waren, Teile der bekannten enthielten oder aus der konditionierten bestanden (Signal 1 = Ventilatorgeräusch und Beleuchtung; Signal 2 = Metallgitterboden der Schockbox). Während Signal 1 kein erhöhtes freezing in Cre-Tieren hervorruft, bewirkt Signal 2 dasselbe Ausmaß an Angst wie der gesamte konditionierte Kontext ( $p < 0,01$  zwischen Signal 1 und 2).

Sechs Wochen nach Training wurde das Angstverhalten in verschiedenen Umgebungen getestet (Abb. 23D). Dazu wurden 1.) eine komplett neue, unbekannte Box verwendet, 2.) Teile aus der bekannten Box mit einer neuen Umgebung kombiniert (Signal 1 = Ventilatorgeräusch und Beleuchtung, Signal 2 = Metallgitterboden aus dem trainierten Kontext) sowie 3.) die bekannte Schockbox (konditionierte Umgebung) eingesetzt.

Signal 1 erzeugte keine Angststeigerung, aber das Metallgitter (Signal 2) brachte die gleiche, in der *knock-out* Gruppe (Cre) übersteigerte, Angst hervor wie die Schockbox selbst.

#### 3.5.4 CA1-NMDA-Rezeptor-ko-Mäuse zeigen nach Angstkonditionierung Hyperaktivität und übersteigerte Ängstlichkeit.

In der Lokomotorbox wurden die Bewegungen eines jeden Tieres über zwei Stunden aufgezeichnet. In Intervallen von fünf Minuten wurden alle durch Lichtschrankenunterbrechungen registrierten Bewegungen aufsummiert. Im undressierten Zustand (vor Angstkonditionierung) nahm die Bewegung aller Tiere in gleichem Maße exponentiell ab (Abb. 24A, links). Zwei Wochen nach der Dressur hingegen war die Testgruppe Cre während der ersten Stunde des Tests signifikant aktiver als die Kontrollgruppe lacZ ( $p < 0,05$  im Mittelwertvergleich nach Bonferroni). Nach Angstkonditionierung – und fehlender Extinktion – waren die *knock-out* Tiere deutlich hyperaktiv ( $p < 0,001$  in ANOVA).

In der Hell/Dunkel-Kammer (Abb. 24B) wurde die Zeit gemessen, welche die einzelnen Tiere in der beleuchteten Seite verbrachten, als Maß für ihre Ängstlichkeit gegenüber hellem Licht. Vor der Konditionierung unterschieden sie sich die Gruppen lacZ und Cre nicht (Abb. 24B, links). Nach Konditionierung und 10 Tagen Extinktion verbrachte die Testgruppe Cre weniger Zeit in der beleuchteten Seite, war also ängstlicher (Abb. 24B, rechts,  $p < 0,05$ ).

In einem *Open Field* wurde die Zeit gemessen, welche die Tiere in der Peripherie verbrachten. Der Test wurde mit undressierten Tieren durchgeführt und zwei Wochen nach Angstkonditionierung wiederholt. Im Vergleich beider Gruppen lacZ und Cre (Abb. 24C) fällt auf, dass sie sich erst nach der Konditionierung – und Extinktion der Erinnerung – unterschieden. CA1-NMDA-Rezeptor-ko-Mäuse verbrachten dann mehr Zeit in der Peripherie ( $p < 0,001$ ). Sie müssen daher auch in diesem Test als ängstlicher eingestuft werden als die Kontrollgruppe lacZ.

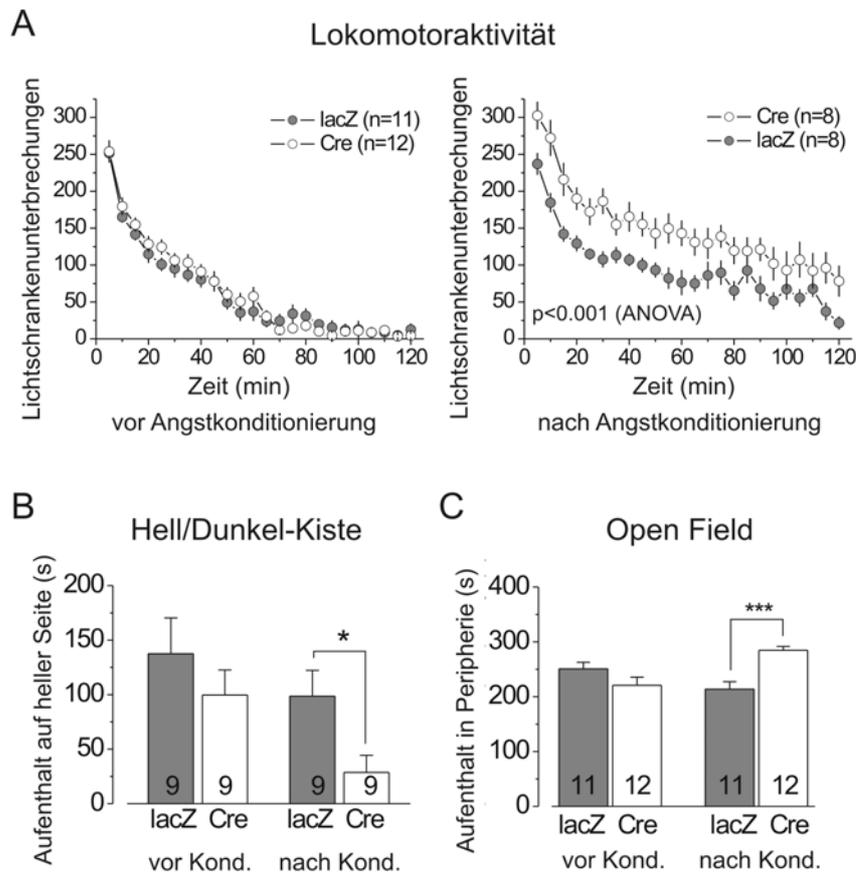


Abb. 24. **Lokomotion und Ängstlichkeit von AAV-Cre und -lacZ injizierten fNR1-Mäusen vor und nach Angstkonditionierung.** **A.** Die Lokomotorische Aktivität naiver Tiere (vor Angstkonditionierung, links, n=11 für lacZ, n=12 für Cre) und zwei Wochen nach Angstkonditionierung (rechts, n=8 jeweils). Nach der Dressur unterscheiden sich beide Populationen (ANOVA:  $p < 0,001$ ) und die korrespondierenden Mittelwerte signifikant während der ersten Stunde des Tests ( $p < 0,05$ , Bonferroni-Test). **B.** Die Aufenthaltsdauer der Tiere in der beleuchteten Seite einer Hell/Dunkel-Kammer beträgt vor Angstkonditionierung 100-140s. Nach Konditionierung ist sie für die Testgruppe Cre erniedrigt (30s,  $p < 0,05$ ; n=9 jeweils). **C.** In einem *Open Field* verbringen beide Gruppen, lacZ und Cre, vor Angstkonditionierung gleich viel Zeit in der Peripherie. Zwei Wochen nach Konditionierung ist diese Zeit für Cre gestiegen ( $p < 0,001$ ; n=11 für lacZ, n=12 für Cre).

Im *Open Field* wurde nicht nur die in der Peripherie verbrachte Zeit, sondern auch die gelaufene Strecke gemessen. Vor Angstkonditionierung unterschieden sich die Gruppen lacZ und Cre nicht. Nach der Konditionierung legten CA1-NMDA-Rezeptor-ko-Mäuse längere Strecken zurück ( $p < 0,05$ , Abb. 25A). Dieses Ergebnis ist kongruent zu den Lokomotionsdaten (Abb. 24A).

Neben Hell/Dunkel-Kammer und *Open Field* wurden die Tiere auch auf dem *Elevated Plus Maze* (EPM) auf ihre Ängstlichkeit hin untersucht. Nach Angstkonditionierung beobachtete man auch hier einen Trend zu größerer Ängstlichkeit in CA1-NMDA-Rezeptor-ko-Mäusen, da sie weniger Zeit auf den offenen Schenkeln verbrachten ( $p < 0,06$ , Abb. 25B).

Das täglich gemessene Körpergewicht aller Tiere blieb über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg konstant (Abb. 25C). Die Versuchsergebnisse können also nicht auf Metabolismusbeeinträchtigungen zurückgeführt werden.

Während der Extinktionsphase, d.h. während der zehn Tage täglicher Schockbox-Reexposition, wurden die Exkremate der Einzeltiere quantifiziert (Abb. 25D). Es ergab sich, dass CA1-NMDA-Rezeptor-ko-Mäuse (Cre) durchschnittlich mehr defäkierten ( $p < 0,05$ ).

Im Porsolt-Test (Schwimmzwang), der nach der Extinktionsperiode durchgeführt wurde, schnitten beide Gruppen gleich ab (Abb. 25E).

Die soziale Interaktion der Mäuse mit Wildtyptieren wurde mittels zweier Tests untersucht. Die Interaktion mit unbekanntem Adulttieren (Abb. 25F, links) wurde vor sowie nach Angstkonditionierung durchgeführt. Hierin unterschieden sich die Gruppen nicht. Die Interaktion mit zunächst unbekanntem, dann bekanntem Jungtier (Test 1 und 2, Abb. 25F, rechts) wurde nach der Angstkonditionierung durchgeführt und lieferte ebenfalls keinen Gruppenunterschied.

Weder bei Schreckantwort (Abb. 25G, links) noch Präpulsinhibition (PPI, Abb. 25G, rechts) trat ein Unterschied zwischen den Gruppen lacZ und Cre auf. Diese Tests fanden zwei Wochen nach Angstkonditionierung statt.

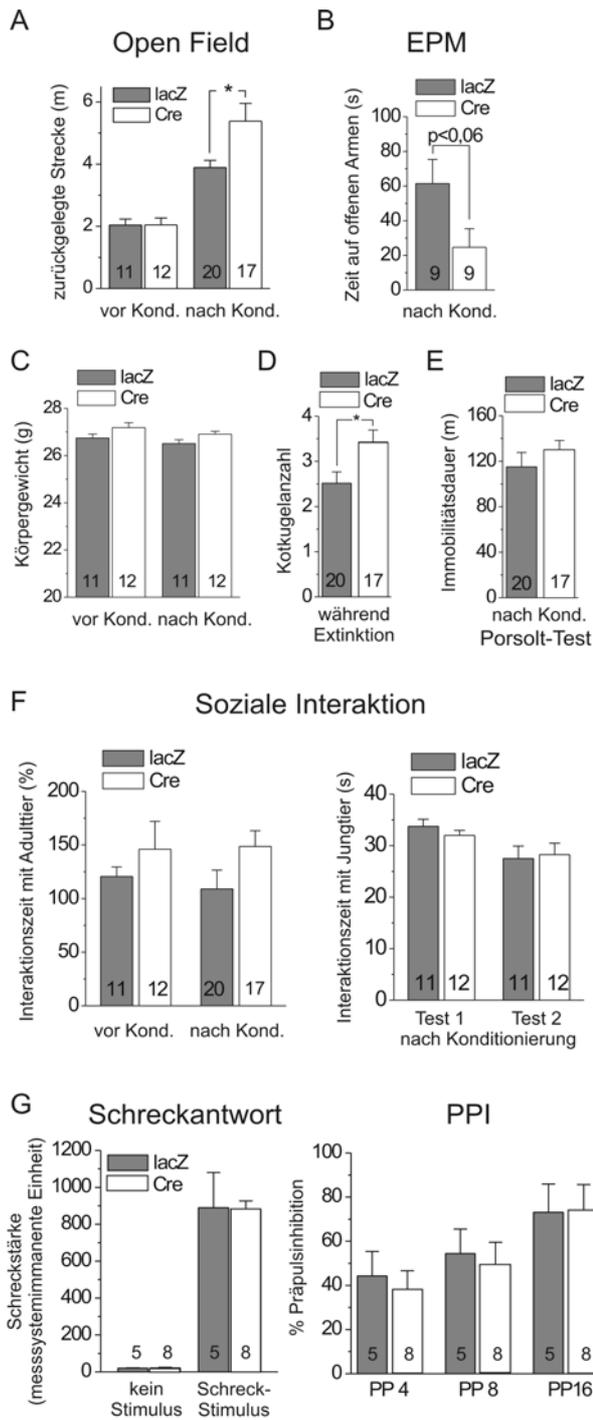


Abb. 25. Ängstlichkeit, soziale Interaktion und Schreckhaftigkeit von AAV-Cre und -lacZ injizierten fNR1-Mäusen vor und nach Angstkonditionierung (Kond.).

**A.** Zurückgelegte Strecke im Open Field. Nach Kond. unterscheiden sich AAV-lacZ und Cre injizierte Mäuse ( $p < 0,05$ ). **B.** Elevated Plus Maze (EPM). Zwei Wochen nach Kond. wurde die Zeit gemessen, die die Tiere auf den offenen Schenkeln des Labyrinthes verbrachten. Die Zeit der Cre-Gruppe ist kleiner ( $p < 0,06$ ). **C.** Körpergewicht. Die Tiere wurden täglich, zwei Tage nach Virusinjektion bis zum Perfusionszeitpunkt, mittags gewogen. Ihr Gewicht blieb konstant. **D.** Defäkation. Gezählt wurden die Kotkugeln, welche die Mäuse während des Extinktionstests an Tag 2-9 nach Konditionierung produzierten. Ihre Anzahl ist in der Cre-Gruppe erhöht ( $p < 0,05$ ). **E.** Porsolt-Test. Während erzwungenen Schwimmens wurde drei Wochen nach Kond. die Zeit gestoppt, in der die Tiere unbeweglich an der Wasseroberfläche trieben; kein Gruppenunterschied feststellbar. **F.** Soziale Interaktion. Die Interaktion mit adulten Mäusen (links) wurde vor und nach Kond. untersucht. Mit juvenilen Mäusen wurde die Interaktion zweimal gemessen. Im ersten Test war das Jungtier unbekannt, in Test 2 war es aus Test 1 bekannt. Die Interaktionszeit ist für

die Gruppen lacZ und Cre in allen Tests jeweils gleich. **G.** Schreckantwort und Präpulsinhibition (PPI). Die Verhaltensantwort auf Schreckstimuli von 120 dB wurde seismographisch ermittelt (links). Die Antwort auf Schreckstimuli, denen ein Prästimulus von 4, 8 und 16 dB um 100 ms vorausging, wurde dazu ins Verhältnis gesetzt (PPI, rechts). [Die Anzahl der Tiere, n, ist jeweils in der Säule angegeben].

## 4 Diskussion

Die Experimente der vorliegenden Arbeit ergaben folgende wesentlichen Befunde:

1. Subplattenzellen sind im neonatalen zerebralen Kortex der Maus elektrisch über *gap junctions* gekoppelt.
2. Subplatten-Afferenzen weisen funktionelle Unterschiede auf hinsichtlich ihrer Integration einlaufender Erregungen, Paarpulsfazitierung, synaptischer Ermüdung und zeitlicher Summation.
3. Im Gegensatz zu thalamokortikalen Axonen werden an subplatteninternen Synapsen in den ersten Tagen nach der Geburt besonders NR2D-reiche NMDA-Rezeptoren exprimiert.
4. Hippocampale CA1-Pyramidenzellen besitzen ebenfalls eingangsspezifische NMDA-Rezeptor-Subtypen. An Synapsen mit Schaffer-Kollateralen finden sich NR2B-reichere Rezeptoren als an Synapsen mit temporo-ammonischen Fasern. Aus NR2B bestehende NMDA-Rezeptoren werden durch Aktivierung des dopaminergen Systems potenziert.
5. Die genetische Deletion von funktionellen NMDA-Rezeptoren in CA1-Pyramidenzellen führt zu einer verringerten Extinktion nach Angstkonditionierung. Dies bewirkt Hyperaktivität und erhöhte Ängstlichkeit bei diesen Tieren.

Die hier behandelten neurobiologischen Fragestellungen konzentrierten sich auf die Rolle der NMDA-Rezeptoren während der Kortexentwicklung und bei Lernvorgängen. Den NMDA-Rezeptoren kommen bei allen Vertebraten Schlüsselfunktionen in der neuronalen Interaktion zu. Aufgrund ihrer spezifischen Eigenschaften vermitteln diese Rezeptoren synaptische Plastizität im Zentralnervensystem, insbesondere während der Ontogenese des Gehirns und beim Lernen.

Chemische synaptische Transmission zeichnet sich, im Gegensatz zur elektrischen Signalübertragung, durch vielfältige Modulationsmöglichkeiten aus. NMDA-Rezeptoren werden als liganden-gesteuerte Ionenkanäle von Glutamat aktiviert. Glutamat ist der wichtigste erregende Transmitter in Zentralnervensystem der Vertebraten. Zusätzlich ist die Anwesenheit von Glycin zur Aktivierung erforderlich und NMDA-Rezeptoren sind durch den reversiblen Magnesiumblock auch spannungsabhängig. Darüber hinaus können sie von vielen Substanzen moduliert werden (Abb. 3). Die duale Beeinflussbarkeit durch sowohl chemische als auch elektrische Transmission ist einzigartig unter den ionotropen Rezeptoren und macht den NMDA-Rezeptor zu einem Koinzidenz-Detektor. Dadurch wird das Hebbsche Prinzip (Hebb, 1949) verwirklicht und ein einheitliches Konzept für das Verständnis neuronaler Plastizität im Zusammenhang mit Entwicklungs- und Lernprozessen denkbar (Cotman et al., 1988).

Die Aktivierung der NMDA-Rezeptoren durch Glutamat bei gleichzeitiger Depolarisation der Zelle kann den Vorgang der Langzeitpotenzierung (LTP) einleiten (Abb. 26). NMDA-Rezeptoren sind in geöffnetem Zustand permeabel für Kalium-, Natrium- und vor allem Calciumionen. Der Calcium-Einstrom in die Zelle setzt intrazelluläre Kaskaden in Gang, die zur vermehrten postsynaptischen Insertion von AMPA-Rezeptoren und zu Genaktivierungen im Zellkern führen. Im weiteren Verlauf können neue Synapsen gebildet werden. Es entstehen langfristig wirksame Veränderungen der synaptischen Effizienz (LTP).

Im Gegensatz zur chemischen synaptischen Übertragung ist elektrische Kopplung zwischen Nervenzellen wenig modulierbar, ermöglicht aber eine unmittelbare Transmission ohne Zeitverzögerung. Sie ist besonders gut geeignet, neuronale Aktivität zu synchronisieren. Während der frühen Ontogenese sind Netzwerkoszillationen synchron aktiver Neurone essentiell für die Entwicklung des Kortex. Das folgende Kapitel beschäftigt sich mit der Entstehung dieser Oszillationen.

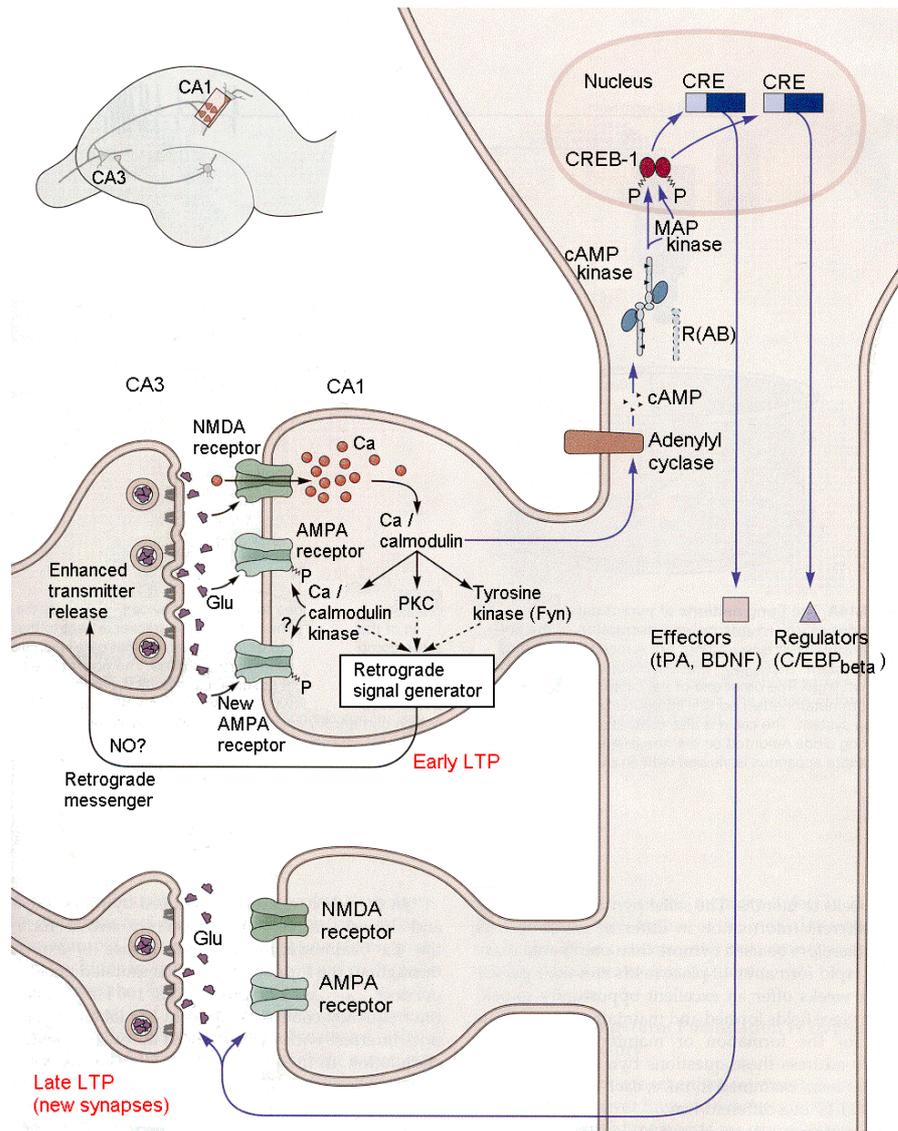


Abb. 26. **Langzeitpotenzierung (LTP)**. NMDA-Rezeptoren sind an der Entstehung langfristiger Veränderungen synaptischer Effizienz beteiligt, die während der Ontogenese des Vertebratengehirns von großer Bedeutung sind und womöglich auch allen Lern- und Gedächtnisprozessen zugrunde liegen. Das zuerst an der CA3-CA1-Synapse im Hippocampus entdeckte Phänomen wird mechanistisch in zwei Phasen unterteilt. In der ersten Phase (*Early LTP*) setzt der Calcium-Einstrom durch NMDA-Rezeptoren intrazelluläre Signalkaskaden in Gang, die zur Effektivitätssteigerung der Synapse beitragen. Obwohl vermutlich postsynaptischen Ursprungs, verändert der Prozess sowohl die Prä- als auch die Postsynapse. In der zweiten Phase (*Late LTP*) werden aufgrund von Proteinsynthese und bestimmter Genaktivierungen neue Synapsen gebildet. Dieser Vorgang ist langsamer, aber (im Rahmen des Hebb'schen Prinzips) dauerhaft. Nach (Kandel et al., 2000).

## 4.1 Synchrone Netzwerkoszillationen während der Kortextentwicklung

Die Synchronisation vieler Neurone kann durch elektrische Synapsen zwischen diesen Zellen begünstigt werden. Mittels gepaarter *patch clamp*-Ableitungen an Neuronen der Subplatte konnte hier erstmals direkt gezeigt werden, dass Subplattenzellen untereinander elektrisch gekoppelt sind (Kapitel 3.1). Damit könnten sie entscheidend zur Entstehung bzw. Amplifikation von Oszillationen beitragen, welche für die korrekte ontogenetische Entwicklung des Kortex nötig sind.

Während der Ontogenese des Säugerkortex treten **Netzwerkoszillationen** auf, die von synchron aktiven Neuronen getragen werden und zur normalen Entwicklung beitragen (Khazipov und Luhmann, 2006). Sie sind wesentlicher Bestandteil der Selbstorganisation des sich entwickelnden Nervensystems (Voigt et al., 1997). Im hier untersuchten somatosensorischen Nagerkortex sind sie bei der Entstehung der sogenannten „Barrels“ beteiligt (Petersen, 2007).

Generell sind mehrere Mechanismen denkbar, neuronale Aktivität zu synchronisieren. Im neonatalen Kortex werden Oszillationen im  $\alpha$ - und  $\beta$ -Frequenzbereich (7-30 Hz) beobachtet (Khazipov et al., 2004; Minlebaev et al., 2007). Aufgrund ihrer Tiefpassfilter-Eigenschaften eignen sich **elektrische Kopplungen** zwischen Nervenzellen besonders gut für die Erzeugung solch niederfrequenter Oszillationen (Galarreta und Hestrin, 1999; Landisman et al., 2002). Elektrische Synapsen treten vor allem während der Entwicklung auf (Connors et al., 1983). Später sind NMDA-Rezeptoren an der Synchronisation beteiligt (Fox et al., 1996; Lee et al., 2005). In den ersten Tagen nach der Geburt sind kortikale Oszillationen NMDA-Rezeptor-unabhängig. Während dieser Zeit können sie durch *gap junction*-Blocker verhindert werden (Dupont et al., 2006). Sie sind also von elektrischen Synapsen abhängig.

Die Experimente der vorliegenden Arbeit zeigen eindeutig, dass Subplattenzellen in dieser Phase elektrisch gekoppelt sind. Damit sind diese Zellen besonders gut geeignet, Netzwerkoszillationen im sich entwickelnden Kortex zu erzeugen bzw. zu verstärken. Kolumnär angeordnete Domänen aus gekoppelten Zellen bilden möglicherweise Vorläufer der visuellen und somatosensorischen Kolumnen (LoTurco und Kriegstein,

1991; Yuste et al., 1992), die den Kortex später strukturell untergliedern (Rice und Van der Loos, 1977).

Mit dem Verschwinden der Subplatte (Price et al., 1997) und der Abschwächung des Netzwerkes aus elektrisch gekoppelten Zellen (Montoro und Yuste, 2004), übernehmen NMDA-Rezeptoren eine entscheidende Rolle bei der Erzeugung von Oszillationen (Dupont et al., 2006). Der Mechanismus verschiebt sich also innerhalb weniger Tage in der Entwicklung von verlässlichen elektrischen Verbindungen hin zu chemischen, aktivitätsabhängigen Netzwerken (Dupont et al., 2006), welche den Vorteil haben, durch sensorische Erfahrung moduliert werden zu können.

#### **4.2 Eingangsspezifische funktionelle Eigenschaften von Subplatten-Afferenzen**

Ein ausgeprägtes, modulierbares Netzwerk chemisch verbundener Neurone existiert in der Subplatte schon während der ersten Tage nach der Geburt. Bei der Charakterisierung verschiedener Afferenzen wurde deutlich, dass sich die Eingänge funktionell unterscheiden (Kapitel 3.2). In Subplattenzellen lag eine funktionelle Eingangsspezifität vor, welche diese Neurone als komplexe Integratoren früher elektrischer Aktivität im Kortex ausweisen. Thalamokortikale und subplatteninterne Afferenz differierten hinsichtlich der Paarpulsfazitierung, ihrer Stabilität bei repetitiver Reizung, zeitlicher Summation und ihrer Fähigkeit, einlaufende Signale zu integrieren.

Das Ruhemembranpotenzial eines Neurons bestimmt seine Erregbarkeit sowie den intrazellulären Metabolismus. Es wurde für Subplattenzellen mit verschiedenen Versuchsanordnungen bestimmt (*whole-cell* und *cell-attached* Einzelkanal-Ableitungen). Die Neurone der Subplatte zeigten dabei ein leicht depolarisiertes Ruhemembranpotenzial. Öffnungen vieler NMDA-Rezeptoren, insbesondere der auf Subplattenzellen gefundenen NR2D-haltigen, werden so begünstigt. Das könnte einer verlässlichen Signalübertragung dienen und durch erhöhten Calciumeinstrom intrazelluläre Kaskaden initiieren. Diese wiederum fördern entweder das Überleben der Zellen (Hetman und Kharebava, 2006) oder induzieren Apoptose (Villmann und Becker, 2007). Wahrscheinlich gehen viele Subplattenneurone während des untersuchten Zeitraums zugrunde

(Luskin und Shatz, 1985). Für Cajal-Retzius-Zellen wird vermutet, dass das depolarisierte Membranpotenzial den programmierten Zelltod induziert (Mienville und Pesold, 1999). Andererseits spricht die Spontanaktivität von Subplattenzellen (Hanganu et al., 2001) für eine neurotrophe Funktion des hohen Membranpotenzials (Finney et al., 1998). Neuronale Aktivität in der Subplatte ist für die Kortextentwicklung entscheidend (Luhmann et al., 2003).

Bei der Untersuchung verschiedener Subplatten-Afferenzen zeigten subplatteninterne Verbindungen reifere Eigenschaften als thalamokortikale Synapsen. Eine typische Eigenschaft unreifer Synapsen ist die rasche **Erschöpfung** synaptischer Effizienz (Mohrmann et al., 2003), wie sie in thalamischen Verbindungen beobachtet wurde. Wahrscheinlich liegt dieser Abnahme der synaptischen Effektivität zugrunde, dass sich die Transmittervesikel schneller leeren, als sie regenerieren (Thomson, 2000).

Die weniger verlässliche Informationsübertragung aus dem Thalamus könnte mit dem hier untersuchten Entwicklungszeitpunkt zusammenhängen, in dem sensorische Einflüsse sich noch nicht entfaltet haben. Diese sind später für die funktionelle Reifung des somatosensorischen Systems verantwortlich (McLaughlin und Juliano, 2003). Da die Subplatte als bloße „Wartestation“ für thalamische Axone angesehen werden kann (Rakic, 1977), unterliegen diese Synapsen möglicherweise auch keinem Reifungsdruck.

Im Widerspruch zur „Wartestation“-Theorie, welche die Subplatte als nur passives Element ansieht, steht die Beobachtung, dass Subplatten-EPSCs durch kurz zuvor aus dem Thalamus einlaufende Erregung verstärkt wurden. Kehrete die Reihenfolge der stimulierten Afferenzen um, fand keine Summation im postsynaptischen Neuron statt. **Heterosynaptische Interaktionen** können spezifische Formen synaptischer Plastizität vermitteln (Tzounopoulos et al., 2004). Demnach hätten thalamokortikale Verbindungen erheblichen Einfluss auf subplatteninterne Informationsverarbeitung und in der Subplatte erfolgte eine aktive und komplexe Interaktion synaptischer Eingänge.

Der subplatteninternen Informationsverarbeitung scheint eine besonders wichtige Rolle im frühen postnatalen Kortex zuzukommen, die über die rein passive Funktion der Subplatte als transiente Struktur zur Erhaltung thalamischer Axone hinausgeht (Hanga-

nu et al., 2002; Dupont et al., 2006). Subplatteninterne Verbindungen lösten bei höherfrequenter Reizung (>10 Hz) **Aktionspotenzialsalven** in den Neuronen der Subplatte aus. Möglicherweise sind diese Verbindungen an der neuronalen Synchronisation, die der oszillatorischen Netzwerkaktivität im  $\beta$ -Frequenzbereich zugrunde liegt, zusätzlich beteiligt. Zwar spielen offenbar *elektrische* Synapsen bei der Erzeugung bzw. Verstärkung von neuronalen Oszillationen eine wesentliche Rolle (Dupont et al., 2006; Sun und Luhmann, 2007), aber chemische Synapsen könnten mit ihrer aktivitätsabhängigen Modulierbarkeit eine noch differenziertere Informationsverarbeitung ermöglichen.

### 4.3 Eingangsspezifische NMDA-Rezeptoren auf Subplattenzellen

Eine differenzierte Informationsverarbeitung in der Subplatte zeigte sich nicht nur in der funktionellen Eingangsspezifität der Subplattensynapsen, sondern auch in ihrer NMDA-Rezeptor-Untereinheitenverteilung (Kapitel 3.3). Diese erwies sich ebenfalls als eingangsspezifisch und darüber hinaus als entwicklungsabhängig. Ein derartig differenziertes und hoch reguliertes NMDA-Rezeptor-Vorkommen auf Einzelzellebene war bisher nur von wenigen und zudem reifen Neuronen bekannt.

Bei der Untersuchung der subplatteninternen sowie der thalamokortikalen Afferenz hinsichtlich ihrer molekularen NMDA-Rezeptor-Ausstattung unterschieden sich die Eingänge in Kinetik und Spannungsabhängigkeit ihrer NMDA-Rezeptor-vermittelten EPSCs. Dies deutet auf ein eingangsspezifisch unterschiedlich starkes Vorkommen der NMDA-Rezeptor-Untereinheit NR2D hin (Monyer et al., 1994; Cull-Candy et al., 2001).

Ein **synapsenspezifisches** Vorkommen unterschiedlicher NMDA-Rezeptor-Subtypen innerhalb einer Nervenzelle wurde bisher nur in reifen Neuronen beobachtet. Die verschiedenen Synapsen der hippocampalen CA1-Pyramidenzellen (Arrigoni und Greene, 2004) und der kortikalen Schicht V-Pyramidenzellen der Ratte (Kumar und Huguenard, 2003) unterscheiden sich in ihren NR2A/NR2B-Verhältnissen. Die hier untersuchten Subplattenafferenzen zeigten gleichermaßen hohe NR2B-Anteile, wie für den frühen Entwicklungszeitpunkt zu erwarten (Flint et al., 1997; Laurie et al., 1997).

Allerdings trat in subplatteninternen Synapsen zusätzlich die Untereinheit NR2D auf. Nach Kinetik und Spannungsabhängigkeit der EPSCs zu urteilen, handelte es sich nicht um reine NR1-NR2D Rezeptoren (Monyer et al., 1994; Cull-Candy et al., 2001), sondern vielmehr um **triheteromere** Assemblierungen, welche im Nervensystem vorherrschend zu sein scheinen (Tovar und Westbrook, 1999). Sie weisen gemischte elektrophysiologische Eigenschaften auf (Hatton und Paoletti, 2005). Von dem Versuch, NR2D pharmakologisch nachzuweisen wurde abgesehen, denn die Pharmakologie triheteromerer Rezeptoren ist noch unklar (Kew et al., 1998). Zudem hat die als NR2D-spezifischer Antagonist eingesetzte Substanz PPDA (Hrabetova et al., 2000) nur geringe Affinitätsunterschiede zu NR2B-haltigen Rezeptoren (Berberich et al., 2005), welche während des hier untersuchten Entwicklungszeitraums, P0-P3, dominant sind (Scheetz und Constantine-Paton, 1994). Gegenwärtig ist die pharmakologische Identifizierung nativer NMDA-Rezeptor-Zusammensetzungen nur bedingt möglich (Neyton und Paoletti, 2006).

**NR2D**-haltige Rezeptoren werden vorwiegend während der Entwicklung exprimiert (Llansola et al., 2005) und gelten daher als Zeichen unreifer Synapsen. Doch gerade die funktionell relativ reifen subplatteninternen Verbindungen exprimierten vermehrt NR2D. Diese Untereinheit bildet **spannungs-insensitivere** NMDA-Rezeptoren (Monyer et al., 1994; Cull-Candy et al., 2001). Das setzt die Aktivierungsschwelle der Rezeptoren herab und trägt so möglicherweise zu verlässlicherer Signalübertragung bei. Besonders in frühen Entwicklungsstadien, wie den hier untersuchten, könnte dies wichtig sein. (Dupont et al., 2006).

Darüber hinaus deaktivieren NR2D-haltige Rezeptoren sehr langsam (Monyer et al., 1994; Cull-Candy et al., 2001). Solch **langsam deaktivierende** synaptische Ströme wurden in subplatteninternen Verbindungen beobachtet. Sie könnten das Zeitfenster für eine aktivitätsabhängige Stärkung dieser Synapsen vergrößern (Vicini und Rumbaugh, 2000). Damit existierte ein Mechanismus, der subplatteninterne Verbindungen selektiv stärkt und so das neuronale Netzwerk innerhalb der Subplatte festigt.

Interessanterweise fand sich am Tag der Geburt eine ausgeprägte, eingangsspezifisch unterschiedliche Verteilung NR2D-enthaltender NMDA-Rezeptoren auf Subplattenzellen. Dieser Unterschied war **entwicklungsabhängig**, denn er verschwand innerhalb der

nächsten drei Lebensstage. Die NMDA-Rezeptor-Zusammensetzung wird hier höchst differentiell reguliert. Möglicherweise ist das Vorhandensein der NR2D-Untereinheit in Subplattenzellen also kein Merkmal unreifer Synapsen, sondern ein weiterer Hinweis auf die besondere Funktion der Subplatte während der Kortexentwicklung.

#### **4.4 Eingangsspezifische NMDA-Rezeptoren von CA1-Pyramidenzellen und ihre mögliche funktionelle Bedeutung**

Eingangsspezifische NMDA-Rezeptoren scheinen nicht nur während der ontogenetischen Entwicklung des Kortex eine wichtige Rolle zu spielen. Auch hippocampale CA1-Pyramidenzellen wiesen eine synapsenspezifische, funktionell unterschiedliche NMDA-Rezeptor-Zusammensetzung auf (Kapitel 3.4). Die molekulare Rezeptorausstattung dieser Synapsen reguliert möglicherweise Einflüsse anderer Neurotransmitter wie Dopamin auf hippocampale Schaltkreise. Eine dopaminerge Aktivierung wirkte potenzierend auf CA1-Synapsen spezifischer *knock-out* Tiere. Das deutet auf distinkte Funktionen der verschiedenen Rezeptorsubtypen hin.

Die Ifenprodil-Sensitivität der verschiedenen NMDA-EPSCs von CA1-Neuronen ließ eine verstärkte Beteiligung NR2B-reicher Rezeptoren an Synapsen mit Schaffer-Kollateralen erkennen, verglichen mit Synapsen temporo-ammonischer Fasern auf derselben Zelle. Durch Aktivierung des dopaminergen Systems vergrößerten sich NR2B-vermittelte Zellantworten.

Das **dopaminerge** System interagiert mit NMDA-Rezeptor-Signalwegen und beeinflusst so möglicherweise Gedächtnis- und Lernprozesse (Castner und Williams, 2007). Synaptische NMDA-Rezeptor-Ströme in CA1-Neuronen werden durch eine Aktivierung von D1/5 Dopaminrezeptoren bidirektional moduliert (Varela et al., in Begutachtung). Bisher konnte die Wirkungsrichtung keiner molekularen Rezeptorzusammensetzung zugeordnet werden. Die vorliegenden Befunde zeigten, dass Rezeptorpopulationen, denen NR2A fehlt, ausschließlich potenziert werden. Dopaminerge Aktivierung verstärkte also NR2B-vermittelte Signale. Daher spielen vermutlich NR2A-Untereinheiten eine Rolle bei der Vermittlung der inhibitorischen Dopaminwirkung. Da die

Rezeptorzusammensetzung der verschiedenen Synapsen differierte, können Dopaminwirkungen nun sowohl den synaptischen Eingängen als auch den dort befindlichen NMDA-Rezeptoren distinkt zugeordnet werden.

Dopaminerge Modulation erhöht die Empfindlichkeit der CA1-Neurone auf NR2B-reiche Eingänge, die von Schaffer-Kollateralen herkommen. Aufgrund des erhöhten NR2A-Anteils in temporo-ammonischen Verbindungen wird Dopamin die hippocampale Sensitivität gegenüber Eingängen aus dem entorhinalen Kortex vermindern. Beide Eingänge entspringen zwar dem entorhinalen Kortex, aber Information aus den Schaffer-Kollateralen sind durch *Gyrus dentatus* und CA3-Region weiter verarbeitet. Dopaminausschüttung aktiviert also bevorzugt den prozessierten, trisynaptischen Pfad.

Dopaminausschüttung aus Neuronen der VTA wurde mit der Hervorhebung eines Signals und mit **Belohnung** verbunden (Iversen und Iversen, 2007; Berridge, 2007). Neurone der A10 Region der VTA projizieren ins CA1-Feld des Hippocampus (Gasbarri et al., 1994). Im Menschen ermöglicht eine Aktivierung der VTA dann die zuverlässige Bildung von Gedächtnis, wenn sie einer Aktivierung des Hippocampus durch Erinnerung vorausgeht (Wittmann et al., 2007; Wittmann et al., 2008). Das dopaminerge System kann so Einfluss auf hippocampales Lernen nehmen. Vor diesem Hintergrund könnte verständlich werden, wie sowohl physiologische als auch pathophysiologische Veränderungen der Dopaminausschüttung das deklarative Gedächtnis beeinflussen.

#### 4.5 NMDA-Rezeptoren bei der Extinktion einer aversiven Erinnerung

NMDA-Rezeptoren der CA1-Pyramidenzellen haben bei vielen Lern- und Gedächtnisprozessen wichtige Funktionen (Frank et al., 2006; Grunwald und Kurthen, 2006; Izquierdo et al., 2006). Eine besondere Form des Lernens ist die Extinktion einer (aversiven) Erinnerung (Lutz, 2007; Quirk und Mueller, 2008; Bremner et al., 2008). Nach induziertem NMDA-Rezeptor-Verlust in der CA1-Region des dorsalen Hippocampus wurde ein spezifisches Extinktionsdefizit in Mäusen beobachtet, das im weiteren Verlauf zu Symptomen führte, die bei Menschen sogenannte Erworbene Angststörungen begleiten (Kapitel 3.5). Molekulare Grundlagen und Mechanismen der

Extinktion sind noch nicht geklärt. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch eine direkte Abhängigkeit der physiologischen Extinktionsfähigkeit von intaktem NMDA-Rezeptor-System in CA1. Da gestörte Extinktion ein Merkmal für pathologische Angst ist, könnten CA1-NMDA-Rezeptor-ko-Mäuse zukünftig als Modell für psychiatrische Angsterkrankungen dienen.

Bei fNR1-Mäusen wurde das NMDA-Rezeptor-Gen NR1 im Alter von 6 Wochen genetisch ausgeschaltet (induzierter *knock-out*). Zwei Wochen nach der Operation wurden die Tiere einem Angstkonditionierungsprotokoll unterzogen. Obwohl CA1-NMDA-Rezeptor-ko-Mäuse und Kontrolltiere gleichermaßen gut lernten (normale Akquisition) und sie sich ebenso gut an den konditionierten Kontext gewöhnten (normale Habituation), zeigten die *knock-out* Tiere ab dem zweiten Tag nach der Konditionierung ein starkes Defizit in ihrer **Extinktionsfähigkeit**. Dieses spezifische Lerndefizit trat auf, obwohl sie eine normale Schmerzsensitivität aufwiesen. Es scheinen also weder Grundangst noch Angstbereitschaft, Gewöhnung an Bedrohung oder Schmerzsensitivität von NMDA-Rezeptoren in der CA1-Region des Hippocampus kontrolliert zu sein. Jedoch waren Extinktion und initiale Habituation während der ersten Minuten, in denen das Tier der Bedrohungssituation ausgesetzt war, selektiv beeinträchtigt. Das Fehlen angemessener Extinktion beim Menschen ist ein Zeichen für pathologisch gesteigerte Angst (Heldt et al., 2007).

Neben dem ausgeprägten Extinktionsdefizit entwickelten CA1-NMDA-Rezeptor-ko-Mäuse eine **Sensibilisierung** (Siegmund und Wotjak, 2007) gegenüber unbekanntem Umgebungen. Angststörungen werden bei Menschen oft von einer derartigen Generalisierung begleitet und Tiermodelle imitieren diesen Befund (Stam, 2007a; Stam, 2007b).

Bei Angstpatienten treten des weiteren **Hyperaktivität** und unspezifisch gesteigerte **Ängstlichkeit** auf (Silverman und Ollendick, 2005). Auch CA1-NMDA-Rezeptor-ko-Mäuse waren nach Angstkonditionierung hyperaktiv und überängstlich. Mehrere unabhängige Tests mit verschiedenen Versuchsanordnungen in der Lokomotorbox, im *Open Field*, in der Hell/Dunkel-Kammer und auf dem *Elevated Plus Maze* lieferten hier konsistente Ergebnisse. Daher kann angenommen werden, dass im Tiermodell ein

Extinktionsdefizit zu erhöhter genereller Ängstlichkeit und Übererregung führt. Möglicherweise hängen auch beim Menschen die beobachteten Symptome der gesteigerten Ängstlichkeit und Hyperaktivität direkt mit dem beschriebenen Extinktionsdefizit in diesen Patienten (Heldt et al., 2007; Milad et al., 2008) zusammen.

Im Gegensatz zu den hier untersuchten CA1-NMDA-Rezeptor-ko-Mäusen sind Tiere, denen die NMDA-Rezeptoren in der CA3-Region fehlten, nicht in der Lage, den konditionierten von anderen Kontexten zu unterscheiden (Cravens et al., 2006). Fehlte der NMDA-Rezeptor in CA1, war die **Kontextunterscheidungsfähigkeit** vorhanden, aber vermindert. Diese Befunde deuten darauf hin, dass NMDA-Rezeptoren der verschiedenen Subregionen des Hippocampus unterschiedlich starken Einfluss auf die Kontextunterscheidungsfähigkeit haben. Interaktionen zwischen entorhinalem Kortex, Amygdala und Cingulum sind nachweislich an der Diskriminierung von Umfeldveränderungen während eines Extinktionsprozesses beteiligt (Freeman, Jr. et al., 1997).

Beim Menschen kann Angst manchmal durch bestimmte, für die betreffende Person hervorstechende, **Signale** ausgelöst werden (McNally et al., 1998). Kriegsveteranen berichten häufig von scheinbar alltäglichen Ereignissen, die in ihnen große Angst hervorrufen. Hubschraubergeräusche können Rückblenden auslösen, bei denen sich der Betroffene zurückversetzt fühlt in die Kriegssituation und nicht mehr unterscheiden kann zwischen Gegenwart und Vergangenheit (De Quervain und Margraf, 2008). Eine solche Reaktion hängt auch im Tier von der Stärke des Signals ab (Maren und Chang, 2006). Diese ist individuell verschieden und schwer vorhersagbar. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen an Mäusen konnte ein bestimmter Teil des bedrohlichen Kontexts die gleiche erhöhte Angst hervorrufen wie der Kontext selbst. Setzte man die Tiere auf jenes Metallgitter, auf dem sie Stromschläge erhalten hatten, zeigen CA1-NMDA-Rezeptor-ko-Mäuse überhöhtes *freezing*, selbst wenn sich das Metallgitter in völlig verschiedenen Umgebungen befand. Bei Angstpatienten kann der Auslöser ein scheinbar belangloses Detail sein, das in keiner anderen Person Angst hervorruft (McNally, 1998). Im Tierexperiment beurteilte auch die Kontrollgruppe das Metallgitter als gefährlich, aber ihre Angst war nicht übersteigert. Ob dieses Verhalten menschliche Befindlichkeiten widerspiegelt, könnte durch genaue Untersuchung von Personen

geklärt werden, die zwar ein traumatisches Erlebnis hatten, aber nicht an einer psychiatrischen Angststörung erkrankt sind.

Falls eine Angststörung nicht erkannt wird, entwickeln betroffene Personen häufig **Depressionen**. Im Tierversuch dient der Porsolt-Test (Schwimmzwang) als Indikator für eine mögliche Depressionsdisposition (West, 1990; Porsolt, 2000). In diesem Test unterschieden sich Test- und Kontrollgruppe hinsichtlich ihrer „Depressivität“ nicht. Das könnte bedeuten, dass Depressionen grundsätzlich andere molekulare Mechanismen zugrunde liegen als Angststörungen.

Menschen, die unter Angst leiden, haben häufig soziale **Kommunikationsschwierigkeiten** (Davidson et al., 1990). Erhöhte **Schreckhaftigkeit** oder verminderte **Präpulsinhibition** können hinzukommen (Bedi und Arora, 2007). Keines dieser Phänomene wurde in CA1-NMDA-Rezeptor-ko-Mäusen beobachtet. Allerdings treten selbst bei Menschen soziale Probleme nicht zwangsläufig im Zusammenhang mit Angststörungen auf (Leen-Feldner et al., 2008). Der Präpulsinhibitionstest wird bisher eher in der Schizophrenieforschung eingesetzt, denn eine gestörte Präpulsinhibition gilt im Tierversuch als Hinweis auf die sogenannten negativen Symptome, die bei Menschen mit Schizophrenien auftreten (Geyer und Ellenbroek, 2003). Eine Eignung dieses Tests bei Extinktionsstörungen wäre noch zu validieren.

#### 4.5.1 PTSD-Modell

Bei Menschen sind Extinktionsdefizite, Sensibilisierung gegenüber Unbekanntem, signalausgelöste Angst, Hyperaktivität und übersteigerte Ängstlichkeit Zeichen für eine pathologische Angststörung, wenn sie länger als einen Monat nach einer starken Angsterfahrung anhalten. Da CA1-NMDA-Rezeptor-ko-Mäuse diese Symptome aufwiesen, könnten sie als neues **Tiermodell** für solche Krankheiten verwendet werden. Man unterscheidet klinisch zwischen „akuten Belastungsreaktionen“ (ICD-10: F43.0) und „Posttraumatischen Belastungsstörungen“ (ICD-10: F43.1). Erstere treten direkt nach einem traumatischen Erlebnis auf und gehören zur überlebenssichernden physiologischen Reaktion des Organismus. Sie klingen gewöhnlich innerhalb eines Monats ab

und führen nicht zu nachhaltigen Beeinträchtigungen. Chronifizieren sich jedoch die Symptome oder erfolgt keine zeitnahe Verarbeitung des Traumas, kann ein **posttraumatisches Stresssyndrom** (PTSD) entstehen. Dessen Symptome äußern sich mitunter erst Jahre nach dem auslösenden Ereignis.

Die australischen und amerikanischen Richtlinien zur Behandlung von psychisch traumatisierten Patienten bevorzugen die sogenannte **Expositionstherapie** (Forbes et al., 2007; McNally, 2007). Schlägt diese nicht an, sollen – in Ermangelung spezifischer Wirksubstanzen – SSRIs (*selective serotonin reuptake inhibitors*) eingesetzt werden. Leider können die Symptome durch die Gesprächstherapie häufig kaum verbessert werden (Feldner et al., 2007; Zhang und Davidson, 2007). Daher wäre ein geeignetes Tiermodell, an dem die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen erforscht werden können, von großem Nutzen. Bisher stellte sich in phänomenologischen Untersuchungen heraus, dass zu frühe Intervention bei Ratten keine Erleichterung der Angst brachte (Maren und Chang, 2006).

Die **molekularen Ursache-Wirkungsketten**, die zur Ausbildung von Angststörungen führen, sind noch weitgehend unverstanden. Aus dem Tierexperiment weiß man, dass gesamthippocampale NMDA-Rezeptoren wichtig sind für Gedächtnisbildung (Bardgett et al., 2003), seine Festigung (Melik et al., 2006) und Extinktion (Santini et al., 2001; Delamater, 2004). Extinktion verlangt auch Proteinsynthese (Cammarota et al., 2005) und Calcium-Calmodulin-Kinase-(CAMKII)-abhängige Mechanismen (Szapiro et al., 2003) sowie Tyrosinkinaseaktivitäten in CA1 (Bevilaqua et al., 2005) und hippocampale Cdk5-Aktivierung (Sananbenesi et al., 2007).

Die Subregionen des Hippocampus spielen unterschiedliche Rollen bei Ausbildung und Festigung eines Gedächtnisinhaltes (Daumas et al., 2005). CA3-NMDA-Rezeptoren sind bei assoziativem Lernen von Bedeutung (Rajji et al., 2006). Ein NMDA-Rezeptor-Verlust vorwiegend in CA1-Pyramidenzellen (Tsien et al., 1996a) beeinträchtigt Mäuse bei Objekterkennung (Rampon et al., 2000) und räumlicher Orientierung (McHugh et al., 1996).

Klinische Studien berichten von niedrigen Kortisolspiegeln in PTSD-Patienten (Golier et al., 2007; Yehuda und Flory, 2007) und es ist bekannt, dass **Kortikosteron** in

Mäusen die Extinktion verbessert (Blundell, unveröffentlicht). Durch Kortikosteron kann das Wiedererinnern moduliert werden (Cammarota et al., 2005). Intensivmedizinische Versorgung erzeugt in vielen Patienten ebenfalls PTSD-ähnliche Symptome. Diese können durch Gabe von Glukokortikoiden verringert werden (Schelling et al., 2004; Schelling et al., 2006). Kortisol wird bei Stress ausgeschüttet, was zu Lern- und Gedächtnisdefiziten führen kann (LeDoux, 1996). Andererseits wird ein niedriger Kortisolspiegel ebenfalls mit Konzentrationsstörungen und Lernproblemen in Verbindung gebracht (Payne und Nadel, 2004). Hohe Kortisollevel sind offenbar auch für die psychische Verarbeitung traumatischer Erlebnisse unabdingbar (Yehuda et al., 2007). Da die Gabe von Kortikosteron die fehlende Extinktion bei CA1-NMDA-Rezeptor-ko-Mäusen nicht wiederherstellen konnte, scheinen NMDA-Rezeptoren in der CA1-Region für die Wirkung von Kortisol auf Extinktion eine entscheidende Bedeutung zu haben. Das genaue Zusammenspiel von Angststörung und Stresshormonspiegel wird allerdings kontrovers diskutiert (Elzinga und Bremner, 2002). Sicherlich beeinflussen weitere Faktoren wie das adrenerge (van Stegeren, 2008) und serotonerge System (Harada et al., 2008), BDNF (Heldt et al., 2007) und GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (Bouton et al., 2006) die Entstehung einer Angststörung. Unser Tiermodell aber, das sich auf die Rolle der NMDA-Rezeptoren bei PTSD konzentriert, legt nahe, dass eine Behandlung mit Kortison, die therapeutisch direkt nach der Exposition erfolgt (De Quervain und Margraf, 2008), dann Aussicht auf Erfolg haben könnte, wenn die NMDA-Rezeptoren in CA1 noch funktionstüchtig sind. So könnten CA1-NMDA-Rezeptor-ko-Mäuse dazu beitragen, neue Therapieansätze zur Behandlung von Angststörungen zu finden.

Das beobachtete Extinktionsdefizit in CA1-NMDA-Rezeptor-ko-Mäusen zeigte einen sehr direkten Zusammenhang auf zwischen einer molekularen Veränderung (NMDA-Rezeptor-*knock-out* in CA1) und der Ausbildung eines pathologischen Verhaltens (PTSD-ähnlicher Symptome). Dieser Befund ist ein guter Ausgangspunkt für die Erforschung der Mechanismen, die vom Genotyp (*knock-out*) bis hin zum Phänotyp (Verhalten) führen. Da LTP wahrscheinlich vielen Lern- und Gedächtnisprozessen zugrunde liegt (Malenka und Nicoll, 1999), könnte in einem nächsten Schritt untersucht werden, ob NMDA-Rezeptor-unabhängige **synaptische Plastizität** in CA1-Pyramidenzellen trotz des NMDA-Rezeptor-Verlustes in diesen Neuronen unverändert

ist. Es gibt Hinweise darauf, dass bei NMDA-Rezeptor-unabhängiger Langzeitpotenzierung vieler Synapsen, so möglicherweise auch der der Schaffer-Kollateralen, L-Typ Calciumkanäle eine Rolle spielen (Johnston et al., 1992). Diese wiederum wären die Vermittler der potenzierenden Wirkung von Kortikosteron (Schelling et al., 2004; Schelling et al., 2006; Chameau et al., 2007), was in direktem Zusammenhang mit PTSD zu stehen scheint (De Quervain und Margraf, 2008).

Des Weiteren ist anzunehmen, dass sich der Verlust der NMDA-Rezeptoren in CA1-Zellen auch auf die neuronalen Netzwerke auswirkt, über die der Hippocampus als Teil des limbischen Systems mit anderen Hirnregionen in Verbindung steht. Deshalb sollte sich die Erforschung des Mechanismus nicht auf lokale, CA1-spezifische Effekte beschränken, sondern das Gehirn als Gesamtorgan betrachtet werden. Seit langem ist der **Papez-Kreis** bekannt, über den der Hippocampus anatomisch mit Thalamus und Kortex verbunden ist (Papez, 1929). Bei PTSD-Patienten korreliert eine Aktivierung von Amygdala und Cingulum sogar mit erfolgreicher Therapie (Bryant et al., 2008) und das Fehlen dieser Aktivierung bewirkt womöglich Extinktionsdefizite, die zum Wiedererleben des Traumas führen (Bremner et al., 2008). Physiologische Auswirkungen des spezifischen NMDA-Rezeptor-Verlustes in CA1 auf die anatomischen Verbindungen des Papez-Kreises, würden neue Einblicke in die Interaktion der beteiligten Hirnregionen ermöglichen. Der hier entdeckte kausale Zusammenhang zwischen molekularer Veränderung und dem Verlust spezifischen Lernvermögens könnte daher als Grundlage für die Aufklärung neuronaler Prozesse dienen, welche nicht nur klinisch im Zusammenhang mit PTSD von Bedeutung sind.

## 5 Zusammenfassung

Im Zentralnervensystem der Säuger steuern N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA)-Rezeptoren viele neuronale Prozesse, insbesondere während der Ontogenese sowie bei Lern- und Gedächtnisvorgängen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung dieser Rezeptoren während der Kortexentwicklung und bei Lernvorgängen mittels elektrophysiologischer, molekularbiologischer, pharmakologischer, histologischer, genetischer und verhaltensbiologischer Methoden an der Maus untersucht.

Die ontogenetisch früh, aber nur transient angelegte Subplatte steuert entscheidende Entwicklungsvorgänge im Neokortex. Postnatal treten im Kortex oszillatorische Netzwerkaktivitäten auf, die von synchron aktiven Neuronen getragen werden und eine gesunde Entwicklung ermöglichen. Sie hängen von der Integrität der Subplatte und von elektrischen Synapsen ab. Mittels elektrophysiologischer Untersuchungen an neonatalen Subplattenzellen wurde festgestellt, dass diese Neurone elektrisch gekoppelt sind. Damit könnten sie einen wichtigen Beitrag zur Entstehung bzw. Verstärkung von Netzwerkoszillationen leisten (Dupont et al., 2006).

Subplattenzellen erhalten afferenten Eingang aus dem Thalamus sowie von benachbarten Subplattenzellen. Die funktionellen und molekularen Eigenschaften dieser Synapsen differierten in eingangsspezifischer Weise. Thalamokortikaler und subplatteninterner Eingang unterschieden sich sowohl in ihren Fähigkeiten, einlaufende Erregungen zeitlich zu summieren, als auch in Paarpulsantwort und synaptischer Ermüdung.

Verbindungen innerhalb der Subplatte besaßen während der ersten postnatalen Tage NR2D-reichere NMDA-Rezeptoren als thalamokortikale Synapsen. Dies äußerte sich in EPSC-Kinetik und -Spannungsabhängigkeit. Zusätzlich konnte NR2D-mRNA mittels Einzelzell-RT-PCR in Subplattenzellen nachgewiesen werden. Ihre funktionelle sowie molekulare Eingangsspezifität weist diese Zellen als höchst differenzierte Neurone aus, denen eine große Bedeutung für die Signalverarbeitung im unreifen Kortex zugeschrieben werden kann (Hirsch und Luhmann, 2008).

CA1-Pyramidenzellen des adulten Hippocampus zeigten eine den Subplattenzellen vergleichbare eingangsspezifische Verteilung der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten. Synapsen von Schaffer-Kollateralen besaßen einen höheren NR2B-Anteil als temporammonische Verbindungen. Die Aktivierung von Dopamin-Rezeptoren potenzierte NR2B-vermittelte synaptische Ströme in CA1-Neuronen. Dopaminausschüttung könnte demnach die hippocampalen Schaltkreise so beeinflussen, dass der informationsverrechnende trisynaptische Bogen bevorzugt wird, während der direkte Eingang aus dem entorhinalen Kortex geschwächt wird. Dies spiegelt möglicherweise die spezifischen Auswirkungen von Dopamin als Teil des Belohnungssystems auf die Gedächtnisbildung wider (Varela et al., in Begutachtung).

Bei komplexen Lernvorgängen, wie der Extinktion einer traumatischen Erinnerung, spielten NMDA-Rezeptoren von hippocampalen CA1-Zellen eine wesentliche Rolle. CA1-NMDA-Rezeptor-ko-Mäuse zeigten erhebliche Extinktionsdefizite nach Angstkonditionierung. Zudem entwickelten diese Mäuse erhöhte Ängstlichkeit und Hyperaktivität. Das sind beim Menschen Symptome für psychiatrische Angststörungen. Daher könnten CA1-NMDA-Rezeptor-ko-Mäuse als neues Tiermodell für solche Störungen dienen, die durch ein traumatisches Erlebnis ausgelöst werden, wie beim Posttraumatischen Stresssyndrom (PTSD). Patienten mit einer derartigen Erkrankung fehlt der Extinktionsprozess während der Erholungsphase nach der Traumatisierung und es entstehen Ängste und Hyperaktivität. Die hier entdeckte Auswirkung einer lokalen molekularen Veränderung im Hippocampus auf das Gesamtverhalten der Tiere könnte helfen, bisher unbekannte neuronale Zusammenhänge im Säugergehirn, bis hin zum Menschen, aufzuklären (Hirsch et al., in Vorbereitung).

## 6 Literatur

- (1970) Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology. The Boulder Committee. *Anat Rec* 166: 257-261.
- Aboitiz F, Montiel J, Garcia RR (2005) Ancestry of the mammalian preplate and its derivatives: evolutionary relicts or embryonic adaptations? *Rev Neurosci* 16: 359-376.
- Abrahamsson T, Gustafsson B, Hanse E (2005) Synaptic fatigue at the naive perforant path-dentate granule cell synapse in the rat. *J Physiol* 569: 737-750.
- Allendoerfer KL, Shatz CJ (1994) The subplate, a transient neocortical structure: Its role in the development of connections between thalamus and cortex. *Annu Rev Neurosci* 17: 185-218.
- Angevine JB, Sidman RL (1961) Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* 192: 766-768.
- Arrigoni E, Greene RW (2004) Schaffer collateral and perforant path inputs activate different subtypes of NMDA receptors on the same CA1 pyramidal cell. *Br J Pharmacol* 142: 317-322.
- Atlason PT, Garside ML, Meddows E, Whiting P, McIlhinney RA (2007) N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit NR1 forms the substrate for oligomeric assembly of the NMDA receptor. *J Biol Chem* 282: 25299-25307.
- Bardgett ME, Boeckman R, Krochmal D, Fernando H, Ahrens R, Csernansky JG (2003) NMDA receptor blockade and hippocampal neuronal loss impair fear conditioning and position habit reversal in C57Bl/6 mice. *Brain Res Bull* 60: 131-142.
- Bedi US, Arora R (2007) Cardiovascular manifestations of posttraumatic stress disorder. *J Natl Med Assoc* 99: 642-649.
- Bekkers JM, Stevens CF (1996) Cable properties of cultured hippocampal neurons determined from sucrose-evoked miniature EPSCs. *J Neurophysiol* 75: 1250-1255.
- Bennett MV, Rubin JB, Bargiello TA, Verselis VK (1993) Structure-function studies of voltage sensitivity of connexins, the family of gap junction forming proteins. *Jpn J Physiol* 43 Suppl 1: S301-S310.
- Bennett MV, Zukin RS (2004) Electrical coupling and neuronal synchronization in the Mammalian brain. *Neuron* 41: 495-511.
- Bennett MVL (1977) Electrical transmission: a functional analysis and comparison to chemical transmission. In: *Handbook of Physiology, Section 1: The Nervous System, Part I* (Brookhart JM, Mountcastle V, eds), pp 357-416. Bethesda: American Physiological Society.
- Berberich S, Punnakkal P, Jensen V, Pawlak V, Seeburg PH, Hvalby O, Köhr G (2005) Lack of NMDA receptor subtype selectivity for hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 25: 6907-6910.
- Berridge KC (2007) The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology (Berl)* 191: 391-431.
- Berry M, Rogers AW (1965) The migration of neuroblasts in the developing cerebral cortex. *J Anat* 99: 691-709.

- Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M (2005) Memory consolidation induces N-methyl-D-aspartic acid-receptor- and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent modifications in alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor properties. *Neuroscience* 136: 397-403.
- Bisson JI (2007) Post-traumatic stress disorder. *BMJ* 334: 789-793.
- Bliss TV, Lomo T (1970) Plasticity in a monosynaptic cortical pathway. *J Physiol* 207: 61P.
- Blümcke I, Behle K, Malitschek B, Kuhn R, Knopfel T, Wolf HK, Wiestler OD (1996) Immunohistochemical distribution of metabotropic glutamate receptor subtypes mGluR1b, mGluR2/3, mGluR4a and mGluR5 in human hippocampus. *Brain Res* 736: 217-226.
- Bouton ME, Westbrook RF, Corcoran KA, Maren S (2006) Contextual and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms. *Biol Psychiatry* 60: 352-360.
- Bremner JD, Elzinga B, Schmahl C, Vermetten E (2008) Structural and functional plasticity of the human brain in posttraumatic stress disorder. *Prog Brain Res* 167: 171-186.
- Brickley SG, Misra C, Mok MH, Mishina M, Cull-Candy SG (2003) NR2B and NR2D subunits coassemble in cerebellar Golgi cells to form a distinct NMDA receptor subtype restricted to extrasynaptic sites. *J Neurosci* 23: 4958-4966.
- Brinks V, de Kloet ER, Oitzl MS (2008) Strain specific fear behaviour and glucocorticoid response to aversive events: modelling PTSD in mice. *Prog Brain Res* 167: 257-261.
- Bryant RA, Felmingham K, Kemp A, Das P, Hughes G, Peduto A, Williams L (2008) Amygdala and ventral anterior cingulate activation predicts treatment response to cognitive behaviour therapy for post-traumatic stress disorder. *Psychol Med* 38: 555-561.
- Buller AL, Larson HC, Schneider BE, Beaton JA, Morrisett RA, Monaghan DT (1994) The molecular basis of NMDA receptor subtypes: native receptor diversity is predicted by subunit composition. *J Neurosci* 14: 5471-5484.
- Burgard EC, Hablitz JJ (1994) Developmental changes in the voltage-dependence of neocortical NMDA responses. *Dev Brain Res* 80: 275-278.
- Buzsáki G, Draguhn A (2004) Neuronal oscillations in cortical networks. *Science* 304: 1926-1929.
- Bystron I, Blakemore C, Rakic P (2008) Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat Rev Neurosci* 9: 110-122.
- Cajal R y (1911) *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertèbres*. Paris: Maloine.
- Cammarota M, Bevilaqua LR, Barros DM, Vianna MR, Izquierdo LA, Medina JH, Izquierdo I (2005) Retrieval and the extinction of memory. *Cell Mol Neurobiol* 25: 465-474.
- Castner SA, Williams GV (2007) Tuning the engine of cognition: a focus on NMDA/D1 receptor interactions in prefrontal cortex. *Brain Cogn* 63: 94-122.
- Chameau P, Qin Y, Spijker S, Smit G, Joels M (2007) Glucocorticoids specifically enhance L-type calcium current amplitude and affect calcium channel subunit expression in the mouse hippocampus. *J Neurophysiol* 97: 5-14.
- Cobbett P, Hatton GI (1984) Dye coupling in hypothalamic slices: dependence on in vivo hydration state and osmolality of incubation medium. *J Neurosci* 4: 3034-3038.

- Condorelli DF, Parenti R, Spinella F, Trovato SA, Belluardo N, Cardile V, Cicirata F (1998) Cloning of a new gap junction gene (Cx36) highly expressed in mammalian brain neurons. *Eur J Neurosci* 10: 1202-1208.
- Condorelli DF, Trovato-Salinaro A, Mudo G, Mirone MB, Belluardo N (2003) Cellular expression of connexins in the rat brain: neuronal localization, effects of kainate-induced seizures and expression in apoptotic neuronal cells. *Eur J Neurosci* 18: 1807-1827.
- Connors BW, Bernardo LS, Prince DA (1983) Coupling between neurons of the developing rat neocortex. *J Neurosci* 3: 773-782.
- Connors BW, Long MA (2004) Electrical synapses in the mammalian brain. *Annu Rev Neurosci* 27: 393-418.
- Cook JE, Becker DL (1995) Gap junctions in the vertebrate retina. *Microsc Res Tech* 31: 408-419.
- Corkin S (2002) What's new with the amnesic patient H.M.? *Nat Rev Neurosci* 3: 153-160.
- Corkin S, Sullivan EV, Carr FA (1984) Prognostic factors for life expectancy after penetrating head injury. *Arch Neurol* 41: 975-977.
- Cotman CW, Monaghan DT, Ganong AH (1988) Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb- type synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 11: 61-80.
- Cravens CJ, Vargas-Pinto N, Christian KM, Nakazawa K (2006) CA3 NMDA receptors are crucial for rapid and automatic representation of context memory. *Eur J Neurosci* 24: 1771-1780.
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 11: 327-335.
- Daumas S, Halley H, Frances B, Lassalle JM (2005) Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: differential involvement of dorsal CA3 and CA1 hippocampal subregions. *Learn Mem* 12: 375-382.
- Davidson JR, Kudler HS, Saunders WB, Smith RD (1990) Symptom and comorbidity patterns in World War II and Vietnam veterans with posttraumatic stress disorder. *Compr Psychiatry* 31: 162-170.
- De Quervain DJ, Margraf J (2008) Glucocorticoids for the treatment of post-traumatic stress disorder and phobias: A novel therapeutic approach. *Eur J Pharmacol* 583: 365-371.
- Delamater AR (2004) Experimental extinction in Pavlovian conditioning: behavioural and neuroscience perspectives. *Q J Exp Psychol B* 57: 97-132.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51: 7-61.
- Dupont E, Hanganu IL, Kilb W, Hirsch S, Luhmann HJ (2006) Rapid developmental switch in the mechanisms driving early cortical columnar networks. *Nature* 439: 79-83.
- Eichenbaum H (2004) Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron* 44: 109-120.
- Elzinga BM, Bremner JD (2002) Are the neural substrates of memory the final common pathway in posttraumatic stress disorder (PTSD)? *J Affect Disord* 70: 1-17.
- Feldner MT, Monson CM, Friedman MJ (2007) A critical analysis of approaches to targeted PTSD prevention: current status and theoretically derived future directions. *Behav Modif* 31: 80-116.

- Finney EM, Stone JR, Shatz CJ (1998) Major glutamatergic projection from subplate into visual cortex during development. *J Comp Neurol* 398: 105-118.
- Flint AC, Maisch US, Weishaupt JH, Kriegstein AR, Monyer H (1997) NR2A subunit expression shortens NMDA receptor synaptic currents in developing neocortex. *J Neurosci* 17: 2469-2476.
- Foa EB, Meadows EA (1997) Psychosocial treatments for posttraumatic stress disorder: a critical review. *Annu Rev Psychol* 48: 449-480.
- Forbes D, Creamer M, Phelps A, Bryant R, McFarlane A, Devilley GJ, Matthews L, Raphael B, Doran C, Merlin T, Newton S (2007) Australian guidelines for the treatment of adults with acute stress disorder and post-traumatic stress disorder. *Aust N Z J Psychiatry* 41: 637-648.
- Fox K, Schlaggar BL, Glazewski S, O'Leary DDM (1996) Glutamate receptor blockade at cortical synapses disrupts development of thalamocortical and columnar organization in somatosensory cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5584-5589.
- Frank LM, Brown EN, Stanley GB (2006) Hippocampal and cortical place cell plasticity: implications for episodic memory. *Hippocampus* 16: 775-784.
- Freeman JH, Jr., Weible A, Rossi J, Gabriel M (1997) Lesions of the entorhinal cortex disrupt behavioral and neuronal responses to context change during extinction of discriminative avoidance behavior. *Exp Brain Res* 115: 445-457.
- Friauf E, McConnell SK, Shatz CJ (1990) Functional synaptic circuits in the subplate during fetal and early postnatal development of cat visual cortex. *J Neurosci* 10: 2601-2613.
- Friauf E, Shatz CJ (1991) Changing patterns of synaptic input to subplate and cortical plate during development of visual cortex. *J Neurophysiol* 66: 2059-2071.
- Fyhn M, Molden S, Witter MP, Moser EI, Moser MB (2004) Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science* 305: 1258-1264.
- Galarreta M, Hestrin S (1999) A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature* 402: 72-75.
- Garaschuk O, Linn J, Eilers J, Konnerth A (2000) Large-scale oscillatory calcium waves in the immature cortex. *Nat Neurosci* 3: 452-459.
- Gasbarri A, Packard MG, Campana E, Pacitti C (1994) Anterograde and retrograde tracing of projections from the ventral tegmental area to the hippocampal formation in the rat. *Brain Res Bull* 33: 445-452.
- Geyer MA, Ellenbroek B (2003) Animal behavior models of the mechanisms underlying antipsychotic atypicality. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27: 1071-1079.
- Ghosh A, Shatz CJ (1992) Involvement of subplate neurons in the formation of ocular dominance columns. *Science* 255: 1441-1443.
- Golier JA, Schmeidler J, Legge J, Yehuda R (2007) Twenty-four Hour Plasma Cortisol and Adrenocorticotropic Hormone in Gulf War Veterans: Relationships to Posttraumatic Stress Disorder and Health Symptoms. *Biol Psychiatry*.
- Goodman CS, Shatz CJ (1993) Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Neuron* 10 Suppl.: 77-98.

- Green TA, Nestler EJ (2006) Psychiatric applications of viral vectors. In: *Gene Therapy in the Central Nervous System: from Bench to Bedside* (Kaplitt MG, During MJ, eds), pp 181-193. New York: Elsevier Science.
- Grunwald T, Kurthen M (2006) Novelty detection and encoding for declarative memory within the human hippocampus. *Clin EEG Neurosci* 37: 309-314.
- Hanganu IL, Kilb W, Luhmann HJ (2001) Spontaneous synaptic activity of subplate neurons in neonatal rat somatosensory cortex. *Cereb Cortex* 11: 400-410.
- Hanganu IL, Kilb W, Luhmann HJ (2002) Functional synaptic projections onto subplate neurons in neonatal rat somatosensory cortex. *J Neurosci* 22: 7165-7176.
- Harada K, Yamaji T, Matsuoka N (2008) Activation of the serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor is involved in the enhanced anxiety in rats after single-prolonged stress. *Pharmacol Biochem Behav* 89: 11-16.
- Hatton CJ, Paoletti P (2005) Modulation of triheteromeric NMDA receptors by N-terminal domain ligands. *Neuron* 46: 261-274.
- Hebb DO (1949) *The organization of behaviour*. New York: John Wiley.
- Heck N, Golbs A, Riedemann T, Sun JJ, Lessmann V, Luhmann HJ (2007) Activity-Dependent Regulation of Neuronal Apoptosis in Neonatal Mouse Cerebral Cortex. *Cereb Cortex*.
- Heldt SA, Stanek L, Chhatwal JP, Ressler KJ (2007) Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Mol Psychiatry* 12: 656-670.
- Herman J (1992) *Trauma and Recovery*. New York: BasicBooks.
- Herrmann K, Antonini A, Shatz CJ (1994) Ultrastructural evidence for synaptic interactions between thalamocortical axons and subplate neurons. *Eur J Neurosci* 6: 1729-1742.
- Hetman M, Kharebava G (2006) Survival signaling pathways activated by NMDA receptors. *Curr Top Med Chem* 6: 787-799.
- Hrabetova S, Serrano P, Blace N, Tse HW, Skifter DA, Jane DE, Monaghan DT, Sacktor TC (2000) Distinct NMDA receptor subpopulations contribute to long-term potentiation and long-term depression induction. *J Neurosci* 20: RC81-NIL5.
- Imanaga I (1987) Cell-to-cell coupling studied by diffusional methods in myocardial cells. *Experientia* 43: 1080-1083.
- Iversen SD, Iversen LL (2007) Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci* 30: 188-193.
- Iwasato T, Erzurumlu RS, Huerta PT, Chen DF, Sasaoka T, Ulupinar E, Tonegawa S (1997) NMDA receptor-dependent refinement of somatotopic maps. *Neuron* 19: 1201-1210.
- Izquierdo I, Bevilacqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M (2006) Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci* 29: 496-505.
- Johnston D, Christie BR, Frick A, Gray R, Hoffman DA, Schexnayder LK, Watanabe S, Yuan LL (2003) Active dendrites, potassium channels and synaptic plasticity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358: 667-674.
- Johnston D, Williams S, Jaffe D, Gray R (1992) NMDA-receptor-independent long-term potentiation. *Annu Rev Physiol* 54: 489-505.

- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (2000) Principles of Neural Science. New York: McGraw-Hill.
- Kandler K, Katz LC (1998) Relationship between dye coupling and spontaneous activity in developing ferret visual cortex. *Dev Neurosci* 20: 59-64.
- Kanold PO (2004) Transient microcircuits formed by subplate neurons and their role in functional development of thalamocortical connections. *Neuroreport* 15: 2149-2153.
- Kanold PO, Kara P, Reid RC, Shatz CJ (2003) Role of subplate neurons in functional maturation of visual cortical columns. *Science* 301: 521-525.
- Kanold PO, Shatz CJ (2006) Subplate neurons regulate maturation of cortical inhibition and outcome of ocular dominance plasticity. *Neuron* 51: 627-638.
- Katz LC, Crowley JC (2002) Development of cortical circuits: Lessons from ocular dominance columns. *Nat Rev Neurosci* 3: 34-42.
- Katz LC, Shatz CJ (1996) Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274: 1133-1138.
- Kesner RP (2007a) A behavioral analysis of dentate gyrus function. *Prog Brain Res* 163: 567-576.
- Kesner RP (2007b) Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus. *Learn Mem* 14: 771-781.
- Kesner RP, Hunsaker MR, Gilbert PE (2005) The role of CA1 in the acquisition of an object-trace-odor paired associate task. *Behav Neurosci* 119: 781-786.
- Kew JN, Richards JG, Mutel V, Kemp JA (1998) Developmental changes in NMDA receptor glycine affinity and ifenprodil sensitivity reveal three distinct populations of NMDA receptors in individual rat cortical neurons. *J Neurosci* 18: 1935-1943.
- Khazipov R, Luhmann HJ (2006) Early patterns of electrical activity in the developing cerebral cortex of humans and rodents. *Trends Neurosci* 29: 414-418.
- Khazipov R, Sirota A, Leinekugel X, Holmes GL, Ben Ari Y, Buzsaki G (2004) Early motor activity drives spindle bursts in the developing somatosensory cortex. *Nature* 432: 758-761.
- Kleckner NW, Dingledine R (1988) Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 241: 835-837.
- Kostovic I, Rakic P (1980) Cytology and time of origin of interstitial neurons in the white matter in infant and adult human and monkey telencephalon. *J Neurocytol* 9: 219-242.
- Kostovic I, Rakic P (1990) Developmental history of the transient subplate zone in the visual and somatosensory cortex of the macaque monkey and human brain. *J Comp Neurol* 297: 441-470.
- Kowall NW, Quigley BJ, Jr., Krause JE, Lu F, Kosofsky BE, Ferrante RJ (1993) Substance P and substance P receptor histochemistry in human neurodegenerative diseases. *Regul Pept* 46: 174-185.
- Krubitzer L (2007) The magnificent compromise: cortical field evolution in mammals. *Neuron* 56: 201-208.
- Kumar SS, Huguenard JR (2003) Pathway-specific differences in subunit composition of synaptic NMDA receptors on pyramidal neurons in neocortex. *J Neurosci* 23: 10074-10083.

- Landisman CE, Connors BW (2005) Long-term modulation of electrical synapses in the mammalian thalamus. *Science* 310: 1809-1813.
- Landisman CE, Long MA, Beierlein M, Deans MR, Paul DL, Connors BW (2002) Electrical synapses in the thalamic reticular nucleus. *J Neurosci* 22: 1002-1009.
- Lat J (1973) The analysis of habituation. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 33: 771-789.
- Laurie DJ, Bartke I, Schoepfer R, Naujoks K, Seeburg PH (1997) Regional, developmental and interspecies expression of the four NMDAR2 subunits, examined using monoclonal antibodies. *Brain Res Mol Brain Res* 51: 23-32.
- LeDoux J (1996) *The Emotional Brain*. New York: Simon and Schuster.
- Lee FJ, Liu F (2004) Direct interactions between NMDA and D1 receptors: a tale of tails. *Biochem Soc Trans* 32: 1032-1036.
- Lee FJ, Xue S, Pei L, Vukusic B, Chery N, Wang Y, Wang YT, Niznik HB, Yu XM, Liu F (2002) Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell* 111: 219-230.
- Lee I, Kesner RP (2004) Differential contributions of dorsal hippocampal subregions to memory acquisition and retrieval in contextual fear-conditioning. *Hippocampus* 14: 301-310.
- Lee LJ, Lo FS, Erzurumlu RS (2005) NMDA receptor-dependent regulation of axonal and dendritic branching. *J Neurosci* 25: 2304-2311.
- Leen-Feldner EW, Feldner MT, Reardon LE, Babson KA, Dixon L (2008) Anxiety sensitivity and posttraumatic stress among traumatic event-exposed youth. *Behav Res Ther* 46: 548-556.
- Leutgeb S, Leutgeb JK, Moser MB, Moser EI (2005) Place cells, spatial maps and the population code for memory. *Curr Opin Neurobiol* 15: 738-746.
- Leutgeb S, Leutgeb JK, Treves A, Moser MB, Moser EI (2004) Distinct ensemble codes in hippocampal areas CA3 and CA1. *Science* 305: 1295-1298.
- Lever C, Wills T, Cacucci F, Burgess N, O'Keefe J (2002) Long-term plasticity in hippocampal place-cell representation of environmental geometry. *Nature* 416: 90-94.
- Liberzon I, Sripada CS (2008) The functional neuroanatomy of PTSD: a critical review. *Prog Brain Res* 167: 151-169.
- Llansola M, Sanchez-Perez A, Cauli O, Felipo V (2005) Modulation of NMDA receptors in the cerebellum. 1. Properties of the NMDA receptor that modulate its function. *Cerebellum* 4: 154-161.
- LoTurco JJ, Kriegstein AR (1991) Clusters of coupled neuroblasts in embryonic neocortex. *Science* 252: 563-566.
- Lozovaya NA, Grebenyuk SE, Tsintsadze TS, Feng B, Monaghan DT, Krishtal OA (2004) Extrasynaptic NR2B and NR2D subunits of NMDA receptors shape 'superslow' afterburst EPSC in rat hippocampus. *J Physiol* 558: 451-463.
- Luhmann HJ, Hanganu IL, Kilb W (2003) Cellular physiology of the neonatal rat cerebral cortex. *Brain Res Bull* 60: 345-353.

- Luhmann HJ, Reiprich RA, Hanganu IL, Kilb W (2000) Cellular physiology of the neonatal rat cerebral cortex: Intrinsic membrane properties, sodium and calcium currents. *J Neurosci Res* 62: 574-584.
- Luskin MB, Shatz CJ (1985) Studies of the earliest generated cells of the cat's visual cortex: cogeneration of subplate and marginal zones. *J Neurosci* 5: 1062-1075.
- Lutz B (2007) The endocannabinoid system and extinction learning. *Mol Neurobiol* 36: 92-101.
- MacDonald JF, Nowak LM (1990) Mechanisms of blockade of excitatory amino acid receptor channels. *Trends Pharmacol Sci* 11: 167-172.
- Magee JC, Johnston D (1995) Synaptic activation of voltage-gated channels in the dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Science* 268: 301-304.
- Malenka RC, Nicoll RA (1999) Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* 285: 1870-1874.
- Maren S, Chang CH (2006) Recent fear is resistant to extinction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 18020-18025.
- Maren S, Quirk GJ (2004) Neuronal signalling of fear memory. *Nat Rev Neurosci* 5: 844-852.
- Marin-Padilla M (1971) Early prenatal ontogenesis of the cerebral cortex (neocortex) of the cat (*Felis domestica*). A Golgi study. I. The primordial neocortical organization. *Z Anat Entwicklungsgesch* 134: 117-145.
- Marino MJ, Conn PJ (2002) Direct and indirect modulation of the N-methyl D-aspartate receptor. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 1: 1-16.
- Mathias RT, Kistler J, Donaldson P (2007) The lens circulation. *J Membr Biol* 216: 1-16.
- Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB (1984) Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309: 261-263.
- McHugh TJ, Blum KI, Tsien JZ, Tonegawa S, Wilson MA (1996) Impaired hippocampal representation of space in CA1-specific NMDAR1 knockout mice. *Cell* 87: 1339-1349.
- McLaughlin DF, Juliano SL (2003) Developmental regulation of plasticity in the forepaw representation of ferret somatosensory cortex. *J Neurophysiol* 89: 2289-2298.
- McNally RJ (1998) Experimental approaches to cognitive abnormality in posttraumatic stress disorder. *Clin Psychol Rev* 18: 971-982.
- McNally RJ (2007) Mechanisms of exposure therapy: how neuroscience can improve psychological treatments for anxiety disorders. *Clin Psychol Rev* 27: 750-759.
- McNally RJ, Metzger LJ, Lasko NB, Clancy SA, Pitman RK (1998) Directed forgetting of trauma cues in adult survivors of childhood sexual abuse with and without posttraumatic stress disorder. *J Abnorm Psychol* 107: 596-601.
- McQuillen PS, Ferriero DM (2005) Perinatal subplate neuron injury: implications for cortical development and plasticity. *Brain Pathol* 15: 250-260.
- Melik E, Babar E, Ozen E, Ozgunen T (2006) Hypofunction of the dorsal hippocampal NMDA receptors impairs retrieval of memory to partially presented foreground context in a single-trial fear conditioning in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 16: 241-247.

- Mese G, Richard G, White TW (2007) Gap junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol* 127: 2516-2524.
- Mienville JM, Pesold C (1999) Low resting potential and postnatal upregulation of NMDA receptors may cause Cajal-Retzius cell death. *J Neurosci* 19: 1636-1646.
- Milad MR, Orr SP, Lasko NB, Chang Y, Rauch SL, Pitman RK (2008) Presence and acquired origin of reduced recall for fear extinction in PTSD: Results of a twin study. *J Psychiatr Res* 42: 515-520.
- Minlebaev M, Ben Ari Y, Khazipov R (2007) Network mechanisms of spindle-burst oscillations in the neonatal rat barrel cortex in vivo. *J Neurophysiol* 97: 692-700.
- Mohrmann R, Lessmann V, Gottmann K (2003) Developmental maturation of synaptic vesicle cycling as a distinctive feature of central glutamatergic synapses. *Neuroscience* 117: 7-18.
- Möller HJ, Laux G, Kapfhammer HP (1999) *Psychiatrie und Psychotherapie*. Berlin Heidelberg: Springer.
- Molnár Z, Blakemore C (1995) How do thalamic axons find their way to the cortex. *Trends Neurosci* 18: 389-397.
- Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JR, Macklis JD (2007) Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 8: 427-437.
- Momiyama A, Feldmeyer D, Cull-Candy SG (1996) Identification of a native low-conductance NMDA channel with reduced sensitivity to Mg<sup>2+</sup> in rat central neurones. *J Physiol* 494 ( Pt 2): 479-492.
- Montoro RJ, Yuste R (2004) Gap junctions in developing neocortex: a review. *Brain Res Rev* 47: 216-226.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12: 529-540.
- Morschitzky H (2004) *Angststörungen: Diagnostik, Konzepte, Therapie, Selbsthilfe*. Wien New York: Springer.
- Moshal KS, Camel CK, Kartha GK, Steed MM, Tyagi N, Sen U, Kang YJ, Lominadze D, Maldonado C, Tyagi SC (2007) Cardiac dys-synchronization and arrhythmia in hyperhomocysteinemia. *Curr Neurovasc Res* 4: 289-294.
- Nakazawa K, McHugh TJ, Wilson MA, Tonegawa S (2004) NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nat Rev Neurosci* 5: 361-372.
- Neher E (1992) Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods Enzymol* 207: 123-131.
- Neves G, Cooke SF, Bliss TV (2008) Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci* 9: 65-75.
- Neyton J, Paoletti P (2006) Relating NMDA receptor function to receptor subunit composition: limitations of the pharmacological approach. *J Neurosci* 26: 1331-1333.
- Nicoll RA, Malenka RC (1999) Expression mechanisms underlying NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Ann N Y Acad Sci* 868: 515-525.

- Paarmann I, Frermann D, Keller BU, Hollmann M (2000) Expression of 15 glutamate receptor subunits and various splice variants in tissue slices and single neurons of brainstem nuclei and potential functional implications. *J Neurochem* 74: 1335-1345.
- Papez JW (1929) *Comparative Neurology: a manual and text for the study of the nervous system of vertebrates*. New York: Thomas Y. Crowell.
- Parnavelas JG (2000) The origin and migration of cortical neurones: new vistas. *Trends in Neurosciences* 23: 126-131.
- Pavlov IP (1927) *Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex*. London: Oxford University Press.
- Paxinos, G. and Franklin, K. B. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 1-11-1991. New York, Elsevier Science.
- Payne JD, Nadel L (2004) Sleep, dreams, and memory consolidation: the role of the stress hormone cortisol. *Learn Mem* 11: 671-678.
- Peinado A (2000) Traveling slow waves of neural activity: A novel form of network activity in developing neocortex. *J Neurosci* 20: NIL1-NIL6.
- Pereda AE, Rash JE, Nagy JI, Bennett MV (2004) Dynamics of electrical transmission at club endings on the Mauthner cells. *Brain Res Brain Res Rev* 47: 227-244.
- Petersen CC (2007) The functional organization of the barrel cortex. *Neuron* 56: 339-355.
- Pina-Crespo JC, Gibb AJ (2002) Subtypes of NMDA receptors in new-born rat hippocampal granule cells. *J Physiol* 541: 41-64.
- Porsolt RD (2000) Animal models of depression: utility for transgenic research. *Rev Neurosci* 11: 53-58.
- Price DJ, Aslam S, Tasker L, Gillies K (1997) Fates of the earliest generated cells in the developing murine neocortex. *J Comp Neurol* 377: 414-422.
- Prime G, Horn G, Sutor B (2000) Time-related changes in connexin mRNA abundance in the rat neocortex during postnatal development. *Brain Res Dev Brain Res* 119: 111-125.
- Quirk GJ, Mueller D (2008) Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology* 33: 56-72.
- Rajji T, Chapman D, Eichenbaum H, Greene R (2006) The role of CA3 hippocampal NMDA receptors in paired associate learning. *J Neurosci* 26: 908-915.
- Rakic P (1977) Prenatal development of the visual system in rhesus monkey. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 278: 245-260.
- Rakic P (1988) Specification of cerebral cortical areas. *Science* 241: 170-176.
- Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, Shimizu E, Kiyin M, Tsien JZ (2000) Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci* 3: 238-244.
- Rice FL, Van der Loos H (1977) Development of the barrels and barrel field in the somatosensory cortex of the mouse. *J Comp Neurol* 171: 545-560.

- Rickmann M, Chronwall BM, Wolff JR (1977) On the development of non-pyramidal neurons and axons outside the cortical plate: the early marginal zone as a pallial anlage. *Anat Embryol (Berl)* 151: 285-307.
- Robertson RT, Annis CM, Baratta J, Haraldson S, Ingeman J, Kageya GH, Kimm E, Yu J (2000) Do subplate neurons comprise a transient population of cells in developing neocortex of rats? *J Comp Neurol* 426: 632-650.
- Rörig B, Sutor B (1996a) Regulation of gap junction coupling in the developing neocortex. *Mol Neurobiol* 12: 225-249.
- Rörig B, Sutor B (1996b) Serotonin regulates gap junction coupling in the developing rat somatosensory cortex. *Eur J Neurosci* 8: 1685-1695.
- Rudy JW, Huff NC, Matus-Amat P (2004) Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. *Neurosci Biobehav Rev* 28: 675-685.
- Sananbenesi F, Fischer A, Wang X, Schrick C, Neve R, Radulovic J, Tsai LH (2007) A hippocampal Cdk5 pathway regulates extinction of contextual fear. *Nat Neurosci* 10: 1012-1019.
- Santini E, Muller RU, Quirk GJ (2001) Consolidation of extinction learning involves transfer from NMDA-independent to NMDA-dependent memory. *J Neurosci* 21: 9009-9017.
- Sapolsky RM (2001) Atrophy of the hippocampus in posttraumatic stress disorder: how and when? *Hippocampus* 11: 90-91.
- Sarnat HB, Flores-Sarnat L (2002) Cajal-Retzius and subplate neurons: their role in cortical development. *Eur J Paediatr Neurol* 6: 91-97.
- Scammell TE, Arrigoni E, Thompson MA, Ronan PJ, Saper CB, Greene RW (2003) Focal deletion of the adenosine A1 receptor in adult mice using an adeno-associated viral vector. *J Neurosci* 23: 5762-5770.
- Scheetz AJ, Constantine-Paton M (1994) Modulation of NMDA receptor function: implications for vertebrate neural development. *FASEB J* 8: 745-752.
- Schelling G, Roozendaal B, De Quervain DJ (2004) Can posttraumatic stress disorder be prevented with glucocorticoids? *Ann N Y Acad Sci* 1032: 158-166.
- Schelling G, Roozendaal B, Krauseneck T, Schmoelz M, DE Quervain D, Briegel J (2006) Efficacy of hydrocortisone in preventing posttraumatic stress disorder following critical illness and major surgery. *Ann N Y Acad Sci* 1071: 46-53.
- Schröder R, Luhmann HJ (1997) Morphology, electrophysiology and pathophysiology of supragranular neurons in rat primary somatosensory cortex. *Eur J Neurosci* 9: 163-176.
- Schüler T, Mesic I, Madry C, Bartholomäus I, Laube B (2008) Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 heterodimers constitutes the initial step in N-methyl-D-aspartate receptor assembly. *J Biol Chem* 283: 37-46.
- Shapiro M (2001) Plasticity, hippocampal place cells, and cognitive maps. *Arch Neurol* 58: 874-881.
- Siegmund A, Wotjak CT (2007) A mouse model of posttraumatic stress disorder that distinguishes between conditioned and sensitised fear. *J Psychiatr Res* 41: 848-860.
- Silverman WK, Ollendick TH (2005) Evidence-based assessment of anxiety and its disorders in children and adolescents. *J Clin Child Adolesc Psychol* 34: 380-411.

- Söhl G, Willecke K (2004) Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 62: 228-232.
- Stam R (2007a) PTSD and stress sensitisation: a tale of brain and body Part 1: human studies. *Neurosci Biobehav Rev* 31: 530-557.
- Stam R (2007b) PTSD and stress sensitisation: a tale of brain and body Part 2: animal models. *Neurosci Biobehav Rev* 31: 558-584.
- Sun JJ, Luhmann HJ (2007) Spatio-temporal dynamics of oscillatory network activity in the neonatal mouse cerebral cortex. *Eur J Neurosci* 26: 1995-2004.
- Supèr H, Soriano E, Uylings HB (1998) The functions of the preplate in development and evolution of the neocortex and hippocampus. *Brain Res Rev* 27: 40-64.
- Supèr H, Uylings HBM (2001) The early differentiation of the neocortex: a hypothesis on neocortical evolution. *Cereb Cortex* 11: 1101-1109.
- Szapiro G, Vianna MR, McGaugh JL, Medina JH, Izquierdo I (2003) The role of NMDA glutamate receptors, PKA, MAPK, and CAMKII in the hippocampus in extinction of conditioned fear. *Hippocampus* 13: 53-58.
- Thomson AM (2000) Facilitation, augmentation and potentiation at central synapses. *Trends in Neurosciences* 23: 305-312.
- Tovar KR, Westbrook GL (1999) The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *J Neurosci* 19: 4180-4188.
- Traub RD, Bibbig A, LeBeau FE, Buhl EH, Whittington MA (2004) Cellular mechanisms of neuronal population oscillations in the hippocampus in vitro. *Annu Rev Neurosci* 27: 247-278.
- Tsien JZ, Chen DF, Gerber D, Tom C, Mercer EH, Anderson DJ, Mayford M, Kandel ER, Tonegawa S (1996a) Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell* 87: 1317-1326.
- Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S (1996b) The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87: 1327-1338.
- Tyzio R, Ivanov A, Bernard C, Holmes GL, Ben-Ari Y, Khazipov R (2003) Membrane potential of CA3 hippocampal pyramidal cells during postnatal development. *J Neurophysiol* 90: 2964-2972.
- Tzounopoulos T, Kim Y, Oertel D, Trussell LO (2004) Cell-specific, spike timing-dependent plasticities in the dorsal cochlear nucleus. *Nat Neurosci* 7: 719-725.
- Uylings HBM, Van Eden CG, Parnavelas JG, Kalsbeek A (1990) The prenatal and postnatal development of rat cerebral cortex. In: *The cerebral cortex of the rat* (Kolb B, Tees RC, eds), pp 35-76. Cambridge: MIT Press.
- Valverde F, Facal Valverde MV, Santacana M, Heredia M (1989) Development and differentiation of early generated cells of sublayer VIb in the somatosensory cortex of the rat: a correlated Golgi and autoradiographic study. *J Comp Neurol* 290: 118-140.
- van Stegeren AH (2008) The role of the noradrenergic system in emotional memory. *Acta Psychol (Amst)* 127: 532-541.
- Veenstra RD (1996) Size and selectivity of gap junction channels formed from different connexins. *J Bioenerg Biomembr* 28: 327-337.
- Vicini S, Rumbaugh G (2000) A slow NMDA channel: in search of a role. *J Physiol* 525 Pt 2: 283.

- Vieweg WV, Julius DA, Fernandez A, Beatty-Brooks M, Hettema JM, Pandurangi AK (2006) Posttraumatic stress disorder: clinical features, pathophysiology, and treatment. *Am J Med* 119: 383-390.
- Villmann C, Becker CM (2007) On the hypes and falls in neuroprotection: targeting the NMDA receptor. *Neuroscientist* 13: 594-615.
- Voigt T, Baier H, De Lima AD (1997) Synchronization of neuronal activity promotes survival of individual rat neocortical neurons in early development. *Eur J Neurosci* 9: 990-999.
- Wahle P, Meyer G (1987) Morphology and quantitative changes of transient NPY-ir neuronal populations during early postnatal development of the cat visual cortex. *J Comp Neurol* 261: 165-192.
- West AP (1990) Neurobehavioral studies of forced swimming: the role of learning and memory in the forced swim test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 14: 863-877.
- Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, Sohl G (2002) Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 383: 725-737.
- Wiltgen BJ, Brown RA, Talton LE, Silva AJ (2004) New circuits for old memories: the role of the neocortex in consolidation. *Neuron* 44: 101-108.
- Wittmann BC, Bunzeck N, Dolan RJ, Duzel E (2007) Anticipation of novelty recruits reward system and hippocampus while promoting recollection. *Neuroimage* 38: 194-202.
- Wittmann BC, Schiltz K, Boehler CN, Duzel E (2008) Mesolimbic interaction of emotional valence and reward improves memory formation. *Neuropsychologia* 46: 1000-1008.
- Yang QZ, Hatton GI (1999) Nitric oxide via cGMP-dependent mechanisms increases dye coupling and excitability of rat supraoptic nucleus neurons. *J Neurosci* 19: 4270-4279.
- Yeager M, Harris AL (2007) Gap junction channel structure in the early 21st century: facts and fantasies. *Curr Opin Cell Biol* 19: 521-528.
- Yehuda R (2001) Are glucocorticoids responsible for putative hippocampal damage in PTSD? How and when to decide. *Hippocampus* 11: 85-89.
- Yehuda R, Flory JD (2007) Differentiating biological correlates of risk, PTSD, and resilience following trauma exposure. *J Trauma Stress* 20: 435-447.
- Yehuda R, Golier JA, Tischler L, Harvey PD, Newmark R, Yang RK, Buchsbaum MS (2007) Hippocampal volume in aging combat veterans with and without post-traumatic stress disorder: relation to risk and resilience factors. *J Psychiatr Res* 41: 435-445.
- Yehuda R, LeDoux J (2007) Response variation following trauma: a translational neuroscience approach to understanding PTSD. *Neuron* 56: 19-32.
- Yuste R, Peinado A, Katz LC (1992) Neuronal domains in developing neocortex. *Science* 257: 665-669.
- Zhang W, Davidson JR (2007) Post-traumatic stress disorder: an evaluation of existing pharmacotherapies and new strategies. *Expert Opin Pharmacother* 8: 1861-1870.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

AAV-Cre	Adeno-assoziiertes Virus, das für Cre-Rekombinase kodiert
AAV-lacZ	Adeno-assoziiertes Virus, das für lacZ kodiert
ACSF	Artificial Cerebrospinal Fluid
AMPA	(±)- $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazol-4-Propionsäure
ANOVA	Analysis of Variance; Statistische Varianzanalyse
AP	Aktionspotenzial
AP5	(2R)-Amino-5-Phosphonopentanoat (NMDA-Rezeptorblocker)
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor; Nervenwachstumsfaktor
CA1-CA3	Hippocampale Regionen Cornu Ammonis 1-3
CA1-NMDA- Rezeptor-ko- Mäuse	Mäuse, bei denen mittels stereotaktischer Virusinjektionen die NMDA-Rezeptoren der hippocampalen CA1-Region genetisch ausgeschaltet worden waren
cAMP	Cyklisches Adenosinmonophosphat
Cdk5	Cyclin-dependent Kinase 5; Enzym, das u.a. den Zellzyklus reguliert
cGMP	Cyklisches Guanosinmonophosphat
CMV	Cytomegalie-Virus Promotor (aktiv in allen eukaryotischen Zellen)
CNQX	6-Cyano-7-Nitroquinoxalin-2,3-Dion (AMPA/Kainat-Rezeptorblocker)
CPP	R-(-)-3-(2-Carboxypiperazin-4-yl)-Propyl-1-Phosphorsäure (NMDA-Rezeptorblocker)
Cre	Cre-Rekombinase-Enzym (aus E. coli Bakteriophagen P1); bzw. mit Cre-Rekombinase infizierte Tiere, denen mittels Virusinjektion die NMDA-Rezeptoren in der hippocampalen CA1-Region ausgeschaltet worden waren: <b>CA1-NMDA-Rezeptor-ko-Tiere</b>
Cx	Connexin ( <i>gap junction</i> -Protein)
D1/5	Dopamin-Rezeptoren der Typklasse 1 und 5
DAB	3,3-Diaminobezidin

DMSO	Dimethylsulfoxid
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders; Handbuch Psychischer Störungen, 4. Ausgabe
E 10.5 – E 16.5	Embryonaltage 10,5-16,5
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetra-Essigsäure
EPM	erhöhtes Kreuzlabyrinth (Elevated Plus Maze)
EPSC	Exzitatorischer Postsynaptischer Strom
EPSP	Exzitatorisches Postsynaptisches Potenzial
fNR1	“floxed” NR1-Gen; gentechnisch veränderter Mausstamm, bei dem loxP-sites Exon 11-22 des NMDA-Rezeptorgens NR1 flankieren
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethanschwefelsäure
ICD-10	International Classification of Diseases; Katalog der Weltgesundheitsorganisation, 10. Ausgabe, mit Kapitel F43ff.
IP <sub>3</sub>	Inositol-trisphosphat
IPSC	Inhibitorisches Postsynaptisches Potenzial
ISI	Interstimulusintervall
KCC2	Kalium-Chlorid-Kotransporter 2
kDa	Kilo-Dalton (Molekulargewicht)
lacZ	für $\beta$ -Galaktosidase kodierendes Gen, das mittels Virusinjektionen in die Zellen der hippocampalen CA1-Region verbracht wurde bzw. Abk. f. Tiergruppe, die mit lacZ infiziert worden war: <b>Kontrolltiere</b>
loxP site	DNA-Sequenz, die vom Cre-Rekombinase-Enzym erkannt wird
LTP	Langzeitpotenzierung
NBQX	2,3-Dihydroxy-6-Nitro-7-Sulfamoyl-Benzof[quinoxalin-2,3-Dion (AMPA/Kainat-Rezeptorblocker)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NR1	Essentielle NMDA-Rezeptor-Untereinheit

NR2A-/-	Mausstamm, bei dem die NMDA-Rezeptor-Untereinheit NR2A genetisch ausgeschaltet ist
NR2A-NR2D	Subtypen der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten NR2
NVP-AAM077	[(R)-[(S)-1-(4-Bromo-Phenyl)-Ethylamino]-(2,3-Dioxo-1,2,3,4-Tetrahydro-Quinoxalin-5-yl)-Methyl]-Phosphorsäure (NR2A-Antagonist)
P0-P3	Postnatale Tage 0-3
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
PPF	Paarpuls-Fazilitierung (paired pulse facilitation)
PPI	Präpulsinhibition (der Schreckantwort)
PTSD	Posttraumatisches Stresssyndrom
Ptx	Picrotoxin (GABA <sub>A</sub> -Rezeptorblocker)
QX-314	Lidocain-N-Ethylbromid (Natrium-Kanalblocker)
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
SKF-81297	Selektiver D1/5 Dopamin-Rezeptor Agonist
SP	Subplatte bzw. Subplatten-Eingang: extrazellulär stimulierte subplatteninterne Afferenz auf Subplattenzellen
SP-EPSC	durch Subplattenstimulation erzeugtes EPSC in Subplattenzellen
Thal	Thalamischer Eingang: extrazellulär stimulierte thalamokortikale Afferenz auf Subplattenzellen
Thal-EPSC	durch Thalamusstimulation erzeugtes EPSC in Subplattenzellen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan; physiologischer Puffer
Triton X100	Polyethylenglycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl) phenyl]-ether; Detergenz
VTA	Ventral Tegmental Area, Ventrales Tegmentum (des Mesencephalons)