

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig- Maximilians- Universität München**



**Rolle der cGMP-abhängigen Proteinkinase Typ I  
für das Angstgedächtnis und die synaptische Plastizität  
in der lateralen Amygdala**

Cindy Paul  
aus  
Temeschburg

2009

## Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Absatz 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Thomas Kleppisch betreut und von Herrn Prof. Dr. Martin Biel vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

## Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 29. Januar 2009

---

Cindy Paul

Dissertation eingereicht am: 29. Januar 2009

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Thomas Kleppisch
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Martin Biel

Mündliche Prüfung am: 26. Februar 2009

**Meinen Eltern**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Lernen und Gedächtnis .....	1
1.1.1	Formen des Gedächtnisses .....	1
1.1.2	Synaptische Plastizität.....	2
1.2	Rolle und Funktion der Amygdala für Lernen und Gedächtnis.....	3
1.2.1	Das Modell der Angstkonditionierung.....	3
1.2.2	Neuroanatomie der Amygdala.....	4
1.2.3	Bedeutung der Amygdala für die Angstkonditionierung .....	6
1.3	Molekulare Grundlagen der synaptischen Plastizität.....	9
1.3.1	Entstehung der Langzeitpotenzierung der synaptischen Übertragung .....	9
1.3.2	Der NO/cGMP/cGK-Signalweg als möglicher molekularer Mechanismus der synaptischen Plastizität .....	12
1.3.2.1	NO als retrograder Messenger.....	12
1.3.2.2	cGMP/cGK als mögliche Effektoren von NO.....	13
1.4	Zielsetzung der Arbeit.....	18
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1	Versuchstiere .....	19
2.1.1	cGKI- Nullmutanten (cGKI-KO) .....	19
2.1.2	cGKI $\alpha$ rescue Mauslinie (cGKI-rescue).....	19
2.1.3	Genotypisierung .....	21
2.1.3.1	Gewinnung der DNS .....	21
2.1.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	21
2.1.3.3	Agarose-Gel-Elektrophorese.....	23
2.2	Immunhistochemische Methoden .....	24
2.2.1	Anfertigen von Schnittpräparaten.....	24
2.2.2	Immunhistochemische Färbung von Gehirnschnitten .....	25
2.2.3	Nissl-Färbung .....	27
2.2.4	Stimulation von Hirnschnitten durch Aktivierung des cGMP-Signalwegs ....	28
2.3	Western Blot .....	29
2.3.1	Probengewinnung.....	29
2.3.2	Auftrennung mittels SDS-PAGE.....	30

2.3.3	Elektroblot.....	32
2.3.4	Immundetektion .....	33
2.3.5	Proteinbestimmung (BCA-Methode) .....	34
2.4	Elektrophysiologische Methoden .....	35
2.4.1	Extrazelluläre Ableitung von Feldpotentialen in der lateralen Amygdala .....	35
2.4.1.1	Schnittpräparation und Vorbereitung .....	35
2.4.1.2	Messung und Aufzeichnung .....	35
2.4.1.3	Auswertung .....	37
2.4.2	Messungen im patch-clamp-Modus .....	38
2.5	Verhaltenstests .....	39
2.5.1	Konditionierung.....	39
2.5.1.1	Klassische Angstkonditionierung .....	39
2.5.1.2	Sensitisierung.....	41
2.5.2	Open Field .....	42
2.5.3	Elevated Plus Maze.....	43
2.5.4	Light-Dark Box.....	44
2.5.5	Schmerzschwelle.....	45
2.6	Statistik .....	45
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>46</b>
3.1	Expression der cGKI im Gehirn .....	46
3.1.1	Immunhistochemischer Nachweis.....	46
3.1.2	Nachweis mittels Western Blots .....	49
3.1.3	Expressionsmuster der cGKI in der Rescue Mauslinie .....	50
3.2	Synaptische Transmission und Langzeitpotenzierung in der lateralen Amygdala .....	51
3.2.1	Basale synaptische Transmission .....	51
3.2.2	Messung der Langzeitpotenzierung in der lateralen Amygdala .....	54
3.3	Verhaltenstests: Grundcharakterisierung .....	56
3.3.1	Open Field .....	56
3.3.2	Elevated Plus Maze.....	59
3.3.3	Light- Dark Box.....	60
3.3.4	Bestimmung der Schmerzschwelle .....	61
3.4	Angstkonditionierung .....	62
3.4.1	Klassische auditorische Angstkonditionierung .....	62
3.4.2	Nicht-assoziative Angst nach Fußschock-Sensitisierung.....	67

---

3.5	Phosphorylierung von CREB durch Aktivierung der cGKI.....	69
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>71</b>
4.1	Expression der cGKI im Gehirn .....	71
4.2	Die Rolle der cGKI für synaptische Plastizität in der lateralen Amygdala .....	74
4.3	Die Funktion der cGKI für das assoziative Angstgedächtnis.....	77
4.4	CREB-Phosphorylierung als möglicher cGKI-vermittelter Signaltransduktionsmechanismus .....	82
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>87</b>
6.1	Tabellenverzeichnis .....	87
6.2	Abbildungsverzeichnis .....	88
6.3	Abkürzungsverzeichnis .....	89
6.4	Verwendete Antikörper .....	92
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>93</b>
7.1	Zitierte Veröffentlichungen .....	93
7.2	Eigene Publikationen .....	100
<b>8</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>101</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>102</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Lernen und Gedächtnis

### 1.1.1 Formen des Gedächtnisses

Das menschliche Gehirn ist eines der komplexesten Organe des Körpers, dessen Funktionsweise in vieler Hinsicht bis heute noch nicht geklärt ist. Insbesondere seine Gedächtnisfunktion, das heißt seine Fähigkeit, sich Informationen anzueignen und abzurufen, stellt einen faszinierenden Forschungsgegenstand dar. Bei der Aufklärung der Gedächtnisfunktion stehen vor allem zwei Fragen im Vordergrund: *Wo* werden die Informationen abgespeichert - das heißt, welche Hirnstrukturen sind für die Gedächtnisspeicherung verantwortlich- und *wie* werden die Information gespeichert - das heißt, welche molekularen und zellulären Mechanismen spielen dabei eine Rolle.

Die ersten Forschungsarbeiten bezüglich der Frage, inwiefern eine Gedächtnisleistung einer bestimmten Hirnregion zugeordnet werden kann, wurden im 19. Jahrhundert aufgenommen. In der heutigen Zeit, weiß man, dass die Funktion des Gedächtnisses nicht in einer bestimmten Hirnregion lokalisiert ist, sondern vielmehr von mehreren Gehirnteilen gleichzeitig geleistet wird. Bemerkenswert dabei ist, dass je nach Art der zu speichernden Informationen unterschiedliche Gedächtnissysteme existieren (zur Übersicht siehe Milner et al., 1998). So bezeichnet man die Speicherung von Fakten oder Ereignissen als deklaratives oder explizites Gedächtnis, welches das Wissen eines Menschen darstellt. Diese Funktion wird dem medialen Teil des Temporallappens zugeordnet. Zu diesem gehört der Hippocampus, der entorhinale, perirhinale und parahippocampale Kortex. Dieser Gedächtnisform gegenüber steht das nicht-deklarative oder auch implizite Gedächtnis, welches Fertigkeiten und motorische Abläufe speichert, die dem Bewusstsein nicht zugänglich sind. Hierfür sind diverse subkortikale Hirnregionen verantwortlich. Das wahrscheinlich am besten untersuchte Exempel des nicht-deklarativen Gedächtnisses ist die klassische Konditionierung nach Pawlow, auf die in dieser Arbeit später noch ausführlicher eingegangen wird.

Außer nach der Qualität der zu speichernden Information wird auch nach der Dauer der Speicherung unterschieden. Für die Speicherung von Informationen für nur wenige Minuten existiert ein Kurzzeitgedächtnis, oder auch Arbeitsgedächtnis genannt, welches im Temporallappen lokalisiert ist. Eine längerfristige Speicherung von deklarativen

Informationen erfolgt mit Hilfe des Hippocampus; die Langzeitspeicherung von Informationen findet jedoch im Neokortex statt. Im Gegensatz dazu werden nicht-deklarative Inhalte in den jeweiligen Hirnstrukturen gespeichert, welche an der Verarbeitung der entsprechenden Informationen beteiligt sind.

Im Allgemeinen kann man einen Lernprozess durch folgende Phasen beschreiben:

1. Zunächst erfolgt die Aquisition, das heißt, die Aneignung der neuen Informationen.
2. Danach wird die neu erworbene Information konsolidiert, das heißt vom Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis überführt. Dieser Prozess kann mehrere Tage dauern.
3. Ein Abruf der Information reproduziert den Gedächtnisinhalt. Durch diese erneute Aktivierung der Information wird der Gedächtnisinhalt zunächst in einen labilen Übergangszustand überführt und kann danach verfestigt werden. Dieser Vorgang wird als Rekonsolidierung bezeichnet.
4. Findet eine Rekonsolidierung nicht statt, kann im Laufe der Zeit die Information verloren gehen, was zum Vergessen führt.

### **1.1.2 Synaptische Plastizität**

Auf die Frage, wie das Gehirn zu seiner Gedächtnisleistung fähig ist, hat Ramon y Cajal 1894 postuliert, dass das Gehirn und seine Verknüpfungen dynamisch und anpassungsfähig sein müssen. Im folgenden 20. Jahrhundert konnte das Prinzip der chemischen Übertragung über Synapsen geklärt werden. Dabei wurde das Phänomen beobachtet, dass die Effektivität der synaptischen Übertragung modifiziert werden kann, das heißt, die Effizienz einer Synapse kann in Abhängigkeit des Aktivitätsmusters verändert werden. Diese Vorgänge werden als synaptische Plastizität bezeichnet. In der heutigen Neurowissenschaft nimmt man an, dass die synaptische Plastizität unter anderem die Grundlage für Lernen und Gedächtnis bildet. Die erste Hypothese dahingehend wurde durch Donald Hebb 1949 aufgestellt. Er postulierte -vereinfacht gesagt-, dass es zu einer Verstärkung einer Synapse zwischen zwei Zellen kommt, wenn diese gleichzeitig aktiv sind. 1973 konnte diese Theorie dann erstmals experimentell gestützt werden, als Bliss und Lomo die ersten aktivitätsabhängigen, langanhaltenden Veränderungen der synaptischen Übertragung *in vitro* beobachten konnten (Bliss and Lomo, 1973). Dieses Phänomen, das zunächst an Synapsen im Hippocampus beschrieben wurde, wird als Langzeitpotenzierung bezeichnet und kann aber auch an vielen anderen Synapsen in unterschiedlichen Hirnteilen beobachtet werden. Im Laufe der Zeit hat sich die LTP zu einem sehr beliebten Modell entwickelt, um die zellulären und molekularen Mechanismen der synaptischen Plastizität zu untersuchen. Durch die intensive Forschung in diesem Gebiet ist bekannt, dass es verschiedene Formen der synaptischen Plastizität gibt, welche in diversen neuronalen Schaltkreisen zu



beobachtet sind (zur Übersicht siehe Citri and Malenka, 2008). Ein wichtiges Kriterium der synaptischen Plastizität besteht darin, dass sie bidirektional ist, das heißt, dass die synaptische Effizienz in Abhängigkeit des Aktivitätsmusters sowohl gesteigert als auch gedrosselt werden kann. Das zu beobachtende Phänomen wird sinngemäß als Langzeitpotenzierung (LTP) bzw. als Langzeitdepression (LTD) bezeichnet. Außerdem unterscheidet man, je nachdem, wie lange die Veränderungen anhalten, in Kurzzeitplastizität (von Millisekunden bis Minuten) und Langzeitplastizität (von Minuten bis Stunden oder auch länger), welchen unterschiedliche molekulare Mechanismen zugrunde liegen. Die bisher am besten untersuchte Form der LTP ist die an CA1-Synapsen der Pyramidenneuronen im Hippocampus. Hierbei werden alle drei Kriterien erfasst, die laut der Hebb'schen Theorie erfüllt sein müssen, um assoziative synaptische Veränderungen hervorzurufen (Bliss and Collingridge, 1993):

1. Kooperativität: Nur wenn genügend afferente Fasern stimuliert werden und eine bestimmte Aktivitätsschwelle überschritten wird, kann LTP ausgelöst werden. Somit sind schwache Inputs nicht in der Lage zur LTP-Induktion.
2. Assoziativität: Ein schwacher Input kann verstärkt werden, wenn er in der Nachbarschaft zu einem starken Input einläuft, sofern beide Inputs zeitgleich aktiv sind.
3. Input-Spezifität: Synapsen, die nicht gleichzeitig mit dem starken Input aktiv sind, bleiben unverändert.

## **1.2 Rolle und Funktion der Amygdala für Lernen und Gedächtnis**

### **1.2.1 Das Modell der Angstkonditionierung**

Ein sehr gut etabliertes Modell, um synaptische Plastizität und deren Relevanz für das assoziative Lernverhalten zu untersuchen, stellt die Amygdala und ihre Funktion bei der Angstkonditionierung dar. Sie steht eng im Zusammenhang mit dem emotionalen Lernen und ist wesentlich an der Akquisition, der Speicherung und der Expression von Angst beteiligt. Ihre Bedeutung für das emotionale Gedächtnis wurde ausführlich mit Hilfe der Angstkonditionierung belegt. Die ersten klassischen Konditionierungsversuche wurden von Pawlow 1927 beschrieben, auf dessen Prinzip auch die Angstkonditionierung beruht: wird ein neutraler, harmloser Reiz (z. B. Ton, „conditioned stimulus“ = CS) mit einem aversiven Reiz (z.B. Fußschock, „unconditioned stimulus“, US) zeitlich gepaart, so kann danach der zuvor neutrale Reiz alleine eine Angstreaktion auslösen. Dieses Verhalten während einer erneuten CS-Präsentation wird als konditionierte Angstreaktion bezeichnet, welche auf der

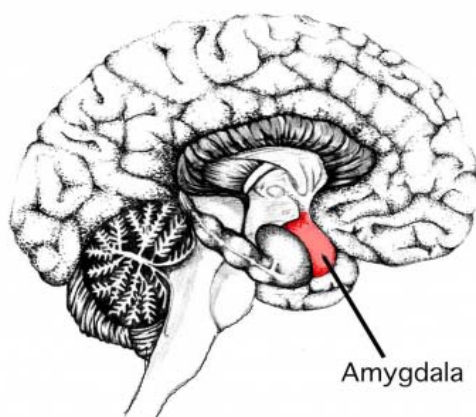
Assoziation der beiden Reize (CS und US) beruht. Um diese Angstreaktion zu quantifizieren, wird bei der Konditionierung mit Nagetieren das sogenannte Freezing-Verhalten als Parameter herangezogen. Dieses arttypische Angstverhalten ist als völlige Bewegungslosigkeit zu beobachten und ist daher für den Experimentator einfach auszuwerten. Weitere Vorzüge der Angstkonditionierung liegen darin, dass sie nicht nur einfach anzuwenden, sondern auch effektiv ist (bereits eine CS-US-Paarung reicht meist aus) und langanhaltende Reaktionen hervorruft (das Angstgedächtnis hält über viele Wochen an). Somit stellt die Angstkonditionierung eine einfach zu handhabende Methode zur Untersuchung von assoziativen Lernvorgängen dar.

Die Angstkonditionierung repräsentiert eine simple Art des Lernens, welche für jeden Organismus überlebenswichtig ist, um gefährlichen Situationen auszuweichen und Gefahren vorauszusehen. Tatsächlich konnte diese Form des Lernens bisher in einer Vielzahl von Spezies (von Fruchtfliegen, über Mäuse bis zum Menschen) beobachtet werden und scheint evolutionär konserviert zu sein (LeDoux, 2000).

Eine zentrale Rolle bei der Angstkonditionierung spielt die Hirnregion der Amygdala, welche wesentlich bei der Verarbeitung und Weiterleitung der Reize, die zur Angstkonditionierung beitragen, beteiligt ist. Die Voraussetzungen für diese Schlüsselrolle sind durch die Neuroanatomie der Amygdala gegeben, auf welche im folgenden Kapitel kurz eingegangen werden soll.

### 1.2.2 Neuroanatomie der Amygdala

Die Amygdala ist Teil des limbischen Systems und stellt einen phylogenetisch älteren Teil des Gehirns dar. Sie ist ein bilateral angeordnetes Kerngebiet des Gehirns im medialen Teil des Temporallappens (siehe Abb. 1.1). Aufgrund der Form eines Hauptkerns wird sie auch als Mandelkern bezeichnet und erhält daher ihren Namen von dem altgriechischen Wort für Mandel.



*Abb. 1.1: Lage der Amygdala  
Dargestellt ist die Lage der Amygdala  
im menschlichen Gehirn, verborgen  
unter dem Temporallappen.*

Die Amygdala besteht aus einem Komplex von 12 Kernen, die sich jedoch noch weiter unterteilen lassen. Die wichtigsten Teilbereiche der Amygdala, die auch bei der Konditionierung eine Rolle spielen, sind die Kerne der lateralen (LA), der basalen (B), der akzessorisch basalen (AB) Amygdala sowie der zentrale Kern (CE) der Amygdala (LeDoux, 2000, siehe auch Abb. 1.2). Die Amygdala wird hauptsächlich durch zwei Afferenzen innerviert: sowohl kortikale (Mascagni et al., 1993; Romanski and LeDoux, 1993; McDonald, 1998) als auch thalamische (LeDoux et al., 1990a; LeDoux et al., 1990b) Hirnregionen projizieren zur Amygdala, welche in der LA zusammenlaufen. Somit stellt speziell die LA den Eingangsort für viele sensorischen Informationen dar (LeDoux et al., 1990a; Romanski et al., 1993), wobei im weiteren hauptsächlich auf die auditorischen und nozizeptiven Afferenzen eingegangen werden soll, die bei der Angstkonditionierung von Bedeutung sind. Der auditorische Reiz (CS, Ton) wird über den auditorischen Thalamus (*Corpus geniculatum mediale* und *posterior intralaminar Nucleus* des Thalamus) (Turner and Herkenham, 1991) sowie über den assoziativen auditorischen Kortex (TE3) (Romanski and LeDoux, 1993) zur LA geleitet. Analog dazu werden auch die über den *Tractus spinothalamicus* einlaufenden Schmerzreize (US, milder elektrischer Fußschock) direkt vom Thalamus sowie indirekt über kortikale somatosensorische Areale auf Neurone in der LA verschaltet. Generell scheint der Zugang durch die *Capsula interna* aus den thalamischen Regionen die schnellere und direktere Projektion zu sein, welche die noch unprozessierten Daten übermittelt, während die Projektion über die *Capsula externa* die schon prozessierten und komplexeren Informationen enthält (LeDoux, 2000). Nach dem Eintreffen in der LA werden die Informationen intra-amygdalär weitergeleitet zu der B, AB und zum CE der Amygdala, wo sie weiter verarbeitet werden. Der CE stellt den Haupt-Output der integrierten Signale aus der Amygdala dar (Pitkanen et al., 1997). Diese werden auf nachgeschaltete Hirnregionen wie Hypothalamus oder Hypophyse projiziert, welche autonome (z. B. Blutdrucksteigerung) oder endokrine Angstreaktionen (z. B. Ausschüttung von Stresshormonen) auslösen können (siehe Abb. 1.3). Bei der Angstkonditionierung mit Nagetieren stellt allerdings die Angststarre (engl.: „freezing“) für den Experimentator die wichtigste zu beobachtende Reaktion nach der Konditionierung dar. Sie dient als Parameter bei der Auswertung für das Lernverhalten. Diese Freezing-Reaktion wird über das periaquäduktale Grau (PAG, lat. *Substantia grisea periaqueductalis*) vermittelt, welches Angst- und Fluchtreaktionen steuert (Amorapanth et al., 1999).

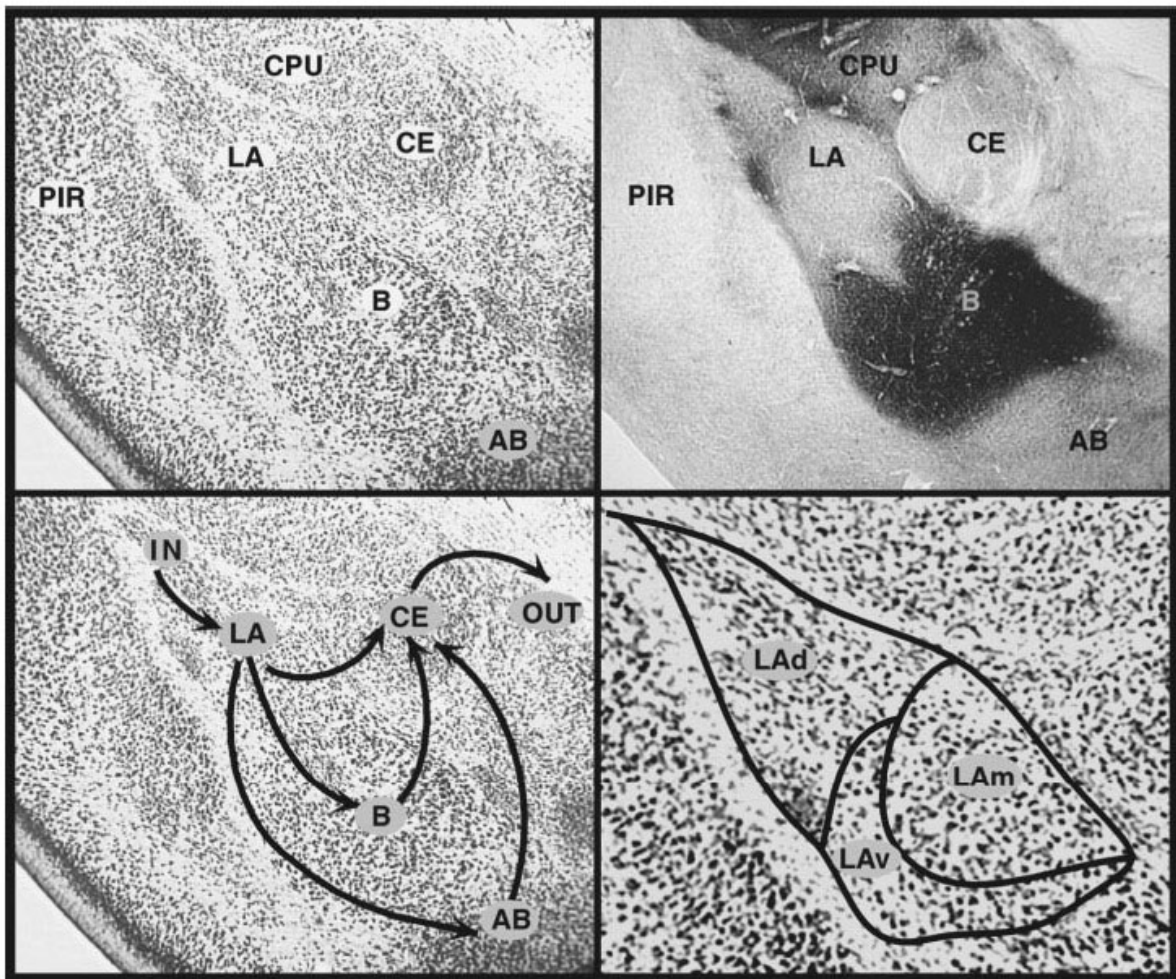


Abb. 1.2: Anordnung und Verschaltung der Kerne der Amygdala

Abgebildet sind die Kerngebiete der Amygdala, die bei der Angstkonditionierung eine Rolle spielen, und deren Verknüpfung. Durch die Acetylcholin-Esterase-Färbung (oben rechts) werden die einzelnen Kerngebiete besser ersichtlicher als in der Nissl-Färbung (links oben und unten). Die Amygdala liegt zwischen dem piriformen Kortex (PIR) und dem Putamen (CPU). Die Pfeile verdeutlichen die wesentlichen Verknüpfungen zwischen den Kernen, die bei der Angstkonditionierung relevant sind sowie die Lokalisation der Inputs (IN) als auch der Outputs (OUT) der Stimuli. Die Vergrößerung unten rechts der LA zeigt die Unterteilung in die Subnuclei der LA mit der dorsalen (LAd), der medialen (LAm) und der ventralen (LAv) Division (Abb. aus LeDoux, 2000).

### 1.2.3 Bedeutung der Amygdala für die Angstkonditionierung

Da die auditorische Angstkonditionierung ein sehr beliebtes Modell darstellt, um synaptische Plastizität und Lernen zu untersuchen, sind die zugrundeliegenden neuronalen Schaltkreise schon sehr gut erforscht und verstanden. Die Amygdala hat sich dabei als zentrale Komponente bei der Angstkonditionierung erwiesen. In Abb. 1.3 sind die Prozesse

---

während der Konditionierung schematisch dargestellt, in welcher die zentrale Rolle der LA auf zellulärer Ebene hervorgehoben wird. Es wird angenommen, dass der Lernprozess bei der Konditionierung durch eine Verstärkung der Synapsen vermittelt wird, welche den CS auf die Neuronen der LA projizieren (Sigurdsson et al., 2007). Vor der Konditionierung stellt der Ton zunächst einen schwachen Reiz dar, welcher keine Angstreaktion auslöst. Der Fußschock hingegen ist ein sehr starker Reiz, welcher eine starke Antwort der Neuronen der LA hervorruft. Da diese beiden Reize, der Ton und der Schmerzreiz, während der Konditionierung gepaart werden, konvergieren die beiden Inputs zeitgleich auf denselben Neuronen der LA. Das bedeutet, dass gleichzeitig zu einer starken postsynaptischen Depolarisation der LA-Neuronen durch den Schmerzreiz auch die Präsynapsen aktiv sind, welche den Ton vermitteln. Durch diese koinzidente Aktivität eines schwachen und eines starken Inputs der LA ist die Voraussetzung gegeben, dass Änderungen der synaptischen Plastizität im Sinne der Hebb'schen Regeln stattfinden. Infolgedessen kommt es zu einer Verstärkung der zuvor schwachen CS-Synapse, wodurch auch die nachgeschalteten Hirnstrukturen wie der CE einen verstärkten Input erhalten. Dadurch kann nun auch die Präsentation des Tons alleine eine Angstreaktion hervorrufen. Das Tier hat nun die Verknüpfung der beiden Stimuli gelernt, und reagiert ab jetzt auf den Ton allein mit einer Angstreaktion. Basierend auf diesem zellulären Modell wird die LA als den Ort angesehen, an welchem während der Angstkonditionierung die CS-US-Assoziation geknüpft wird und synaptische Plastizität stattfindet.

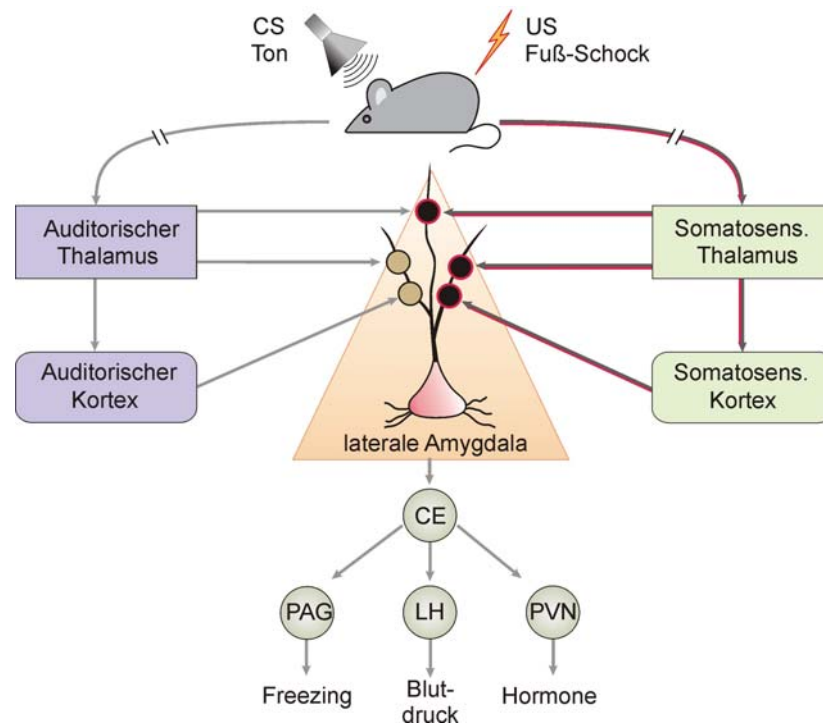


Abb. 1.3: Neuronaler Schaltkreis während der Angstkonditionierung

In dieser schematischen Abbildung des neuronalen Schaltkreises soll die zentrale Rolle der lateralen Amygdala bei der Angstkonditionierung hervorgehoben werden, bei der das Tier lernen soll, einen neutralen Stimulus (Ton, CS) mit einem aversiven Stimulus (Fußschock, US) zu assoziieren. Die Schlüsselrolle für die Bildung der Assoziation von CS und US erhält die LA durch die räumliche Konvergenz und zeitliche Koinzidenz der beiden Stimuli auf denselben Neuronen der Amygdala. Diese projizieren zum zentralen Kern der Amygdala (CE), welche über diverse nachgeschaltete Hirnregionen verschiedene Angstreaktionen auslöst: die Angststarre (Freezing) wird über das periaquäduktale Grau (PAG) gesteuert, während über den lateralen Hypothalamus (LH) der Blutdruck und Herzfrequenz gesteigert wird sowie über den paraventriculären Hypothalamus (PVN) die Ausschüttung von Stresshormonen wie Kortisol erfolgt. Nach der Paarung von CS und US führt die Präsentation des CS alleine zu einer Angstreaktionen, da durch die Konvergenz der beiden Stimuli in der LA eine Verstärkung des CS-Inputs erfolgt ist. (modifiziert von Sigurdsson et al., 2007)

Die Hypothese dieses zellulären Modells wurde bereits durch eine Vielzahl von Studien unterstützt. So konnte zum Beispiel mit Single-Unit-Recordings gezeigt werden, dass einzelne Neuronen der LA tatsächlich sowohl durch nozizeptive als auch durch auditorische Reize aktivierbar sind (Romanski et al., 1993). Dieser Befund bestätigt, dass es zur Konvergenz der CS- und US-Projektionen in der LA kommt.

Weitere Hinweise darauf, dass synaptische Plastizität in den Neuronen der LA während der Konditionierung stattfindet, lieferten Studien, die belegen, dass sich das Aktivitätsmuster der LA-Neuronen durch die Konditionierung ändert (Quirk et al., 1995; McKernan and Shinnick-Gallagher, 1997; Quirk et al., 1997; Rogan et al., 1997; Collins and Pare, 2000;

Repa et al., 2001; Maren and Quirk, 2004). Diese Studien zeigen anhand von Feldpotentialableitungen oder Single-Unit-Recordings in lebenden Tieren, dass nach der Konditionierung die Ansprechbarkeit der LA-Neuronen auf den CS in der Tat erhöht ist, wodurch vermutlich die Assoziation der beiden Stimuli kodiert wird. Die LA scheint somit der primäre Ort der synaptischen Plastizität während der Konditionierung zu sein, wobei nicht auszuschließen ist, dass auch andere Hirnregionen wie der auditorische Thalamus und Cortex der synaptischen Plastizität unterliegen (Quirk et al., 1997; Armony et al., 1998). Jedoch demonstrieren zahlreiche weitere Studien, dass die Funktion der LA für die Konditionierung essentiell ist (Campeau and Davis, 1995; Maren et al., 1996; Killcross et al., 1997; Amorapanth et al., 2000). Diese Arbeiten zeigen, dass durch neurotoxische Läsionen der Bereiche der LA und B sowohl vor als auch nach der Konditionierung die Angstreaktion auf den US stark vermindert wird. Dabei vermindern die Läsionen nicht die Fähigkeit eine Angstreaktion auszudrücken, sondern vielmehr das Lernvermögen des Tiers, eine CS-US-Verknüpfung zu bilden (Maren, 2001).

Auch beim Menschen wurde die Funktion der Amygdala für das Angstlernen untersucht. So hat man festgestellt, dass Patienten mit dem Urbach-Wiethe-Syndrom, einer seltenen genetischen Erkrankung, die mit einer Degeneration der Amygdala einhergeht, angstvolle Gesichtsausdrücke nicht erkennen können und Defizite bei der Pawlowschen Konditionierung zeigen (Bechara et al., 1995). Gleichartige Befunde konnten auch bei Patienten beobachtet werden, welchen die Amygdala chirurgisch zum Zwecke einer Epilepsie-Behandlung entfernt wurde. (LaBar et al., 1995; Phelps et al., 1997). Weiterhin konnte die funktionelle Bedeutung der Amygdala mit fMRI-Studien gestützt werden. Mit dieser Technik konnte belegt werden, dass bei Probanden während des Konditionierungsprozesses eine erhöhte neuronale Aktivität in der Amygdala auftrat, interessanterweise aber nur, wenn ihnen der konditionierte Stimulus gezeigt wurde, welcher einen milden Stromschlag voraussagte (LaBar et al., 1998; Phelps et al., 2001).

## **1.3 Molekulare Grundlagen der synaptischen Plastizität**

### **1.3.1 Entstehung der Langzeitpotenzierung der synaptischen Übertragung**

Entsprechend dem zellulären Modell nimmt man an, dass die aktivitätsabhängige Potenzierung der synaptischen Übertragung die Grundlage für die Bildung des Angstgedächtnisses darstellt. Das Phänomen der Langzeitpotenzierung (LTP) der synaptischen Transmission ist ein beliebtes *in vitro*-Modell, mit welchem die molekularen

Mechanismen untersucht werden können, die zu synaptischer Plastizität beitragen. Auch in der LA ist LTP messbar. Damit steht eine geeignete Methode zur Verfügung, welche Aufschluss über die Mechanismen der synaptischen Plastizität in der LA geben kann. Diese Mechanismen der LTP in der Amygdala, von welchen man annimmt, dass sie in ähnlicher Weise auch bei der Angstkonditionierung ablaufen, sollen im folgenden kurz erläutert werden (zur Übersicht siehe Blair et al., 2001; Schafe et al., 2001; Stork and Pape, 2002; Rodrigues et al., 2004):

Ein wichtiges Kriterium der synaptischen Plastizität ist, dass die synaptische Übertragung aktivitätsabhängig moduliert werden kann. Um eine LTP auszulösen, wird daher in der Regel ein hochfrequenter Tetanus (meist 100 Hz) angewendet, welcher die afferenten Fasern stimuliert. Im Gegensatz dazu wird eine LTD über eine niederfrequente tetanische Reizung (900 Pulse mit 1-5 Hz) ausgelöst. Da in dieser Arbeit ausschließlich die LTP untersucht wurde, wird im folgenden nur auf die Mechanismen der LTP an exzitatorischen Synapsen eingegangen (zur Übersicht siehe auch Citri and Malenka, 2008).

Der wichtigste exzitatorische Transmitter ist Glutamat, welcher an verschiedenen Glutamatrezeptoren auf der postsynaptischen Membran binden kann. Man unterscheidet die ionotropen Glutamatrezeptoren  $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazol-Propionsäure-Rezeptoren (AMPA) und die N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDAR) sowie die metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR). Die AMPAR sind leitend für monovalente Kationen ( $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$ ) und sind wesentlich für die Ausbildung der exzitatorischen Depolarisation der postsynaptischen Membran nach Glutamatausschüttung verantwortlich. Im Gegensatz zu den AMPAR weisen die NMDAR eine spannungsabhängige Aktivität auf. NMDAR werden im Ruhezustand durch  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen blockiert, welche sich erst durch eine Depolarisation von dem Rezeptor lösen und die Kanalpore freigeben. Die Aktivierung der NMDAR benötigt daher sowohl eine ausreichende postsynaptische Depolarisation, die den  $\text{Mg}^{2+}$ -Block löst, als auch eine gleichzeitige präsynaptische Aktivität, die für eine Glutamatausschüttung sorgt. Laut den Hebb'schen Regeln weisen NMDAR die postulierten Eigenschaften Assoziativität und Kooperativität auf, die für eine inputspezifische Induktion der LTP nötig sind. Sie werden deshalb auch als „Koinzidenz-Detektoren“ bezeichnet. Die für die Auslösung einer LTP benötigte Depolarisation der Postsynapse wird mit Hilfe eines hochfrequenten Tetanus hervorgerufen.

Interessanterweise lässt sich die Funktion der NMDAR als Koinzidenz-Detektoren analog zu der LTP-Induktion auch auf das zelluläre Modell der Angstkonditionierung übertragen: wird der Ton vor der Konditionierung präsentiert, so wird an den CS-Inputs Glutamat



ausgeschüttet. Da der Ton als schwacher Reiz gilt, ruft er nur eine schwache Depolarisation der Postsynapse durch Öffnung von AMPAR hervor. Jedoch bindet das ausgeschüttete Glutamat auch an NMDAR. Kommt es dann zu einer gleichzeitigen starken Depolarisation dieses LA-Neurons durch den Input des Fußschocks, kann der  $Mg^{2+}$ -Block aufgehoben werden und NMDAR öffnen sich. Dadurch können über NMDAR auch Calcium-Ionen in die aktiven Synapsen fließen, da sie im Unterschied zu den AMPAR für  $Ca^{2+}$ -Ionen leitend sind. Eine weitere Calciumquelle stellen die spannungsabhängigen Calciumkanäle (VGCC) dar, die sich ebenfalls nur bei einer ausreichenden Depolarisation öffnen und einen langanhaltenden Einstrom von  $Ca^{2+}$ -Ionen ermöglichen. Ein Anstieg in der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration stellt den Startpunkt für eine Vielzahl biochemischer Prozesse dar. Wird eine bestimmte Schwellenkonzentration für  $Ca^{2+}$ -Ionen in der Postsynapse erreicht, werden verschiedene Signaltransduktions-Mechanismen in Gang gesetzt, die bis heute noch nicht bis ins Detail geklärt sind. Beispielsweise gilt die  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) als wichtiges Transduktionsmolekül nach  $Ca^{2+}$ -Anstieg (Malinow et al., 1989; Silva et al., 1992). Die CaMKII wird nach LTP-Induktion aktiviert und phosphoryliert AMPAR, was zum einen zu einer erhöhten Einzelkanal-Leitfähigkeit der AMPAR führt und zum anderen zu einer verstärkten Insertion der AMPAR in die postsynaptische Membran. Beide Mechanismen führen zu einer verstärkten Reizübermittlung über AMPAR, was als ein wesentlicher Mechanismus für eine kurzfristige Änderung der synaptischen Transmission angesehen wird.

Im Gegensatz zu dieser initialen Phase der LTP („early LTP“ = E-LTP), die nur für einige Minuten anhält, steht die langandauernde LTP („late LTP“ = L-LTP), die für mindestens 1-2 Stunden nach Tetanus zu beobachten ist. Für diese langfristigen Veränderungen der synaptischen Funktion sind RNA- und Proteinsynthese essentiell. Die neu synthetisierten Proteine, wie beispielsweise der neurotrophe Faktor *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), dienen zur Modulation der synaptischen Funktion. Die neuronale Proteinbiosynthese kann u.a. durch eine Signaltransduktion über die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA), die Proteinkinase C (PKC), die CaMKIV oder *extracellular related-signal protein kinase* (ERK)/ *mitogen-activated protein-kinase* (ERK/MAPK) ausgelöst werden, deren Signalwege auf einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors *cAMP response element binding protein* (CREB) konvergieren. Der Transkriptionsfaktor CREB ist bekannt für seine kritische Rolle für synaptische Plastizität sowie für verschiedene Formen von Lernen und Gedächtnis. (Bourtchuladze et al., 1994; Impey et al., 1998; Silva et al., 1998; Lamprecht, 1999; Han et al., 2007).

Darüber hinaus findet noch eine Vielzahl paralleler Prozesse statt, die für die synaptische Plastizität von Bedeutung sind. Beispielsweise finden auch strukturelle Veränderungen der Synapsen statt, d. h. Umstrukturierungen von Spines sowie Neubildungen oder Aufsplitten von bestehenden Spines (zur Übersicht siehe Bliss and Collingridge, 1993; Lamprecht and LeDoux, 2004).

### **1.3.2 Der NO/cGMP/cGK-Signalweg als möglicher molekularer Mechanismus der synaptischen Plastizität**

#### **1.3.2.1 NO als retrograder Messenger**

Während die oben genannten Mechanismen zur Induktion der LTP postsynaptisch lokalisiert sind, diskutiert man auch präsynaptische Mechanismen, die zur Ausbildung der LTP beitragen können. Es gibt Befunde, die auf eine vermehrte Transmitterfreisetzung nach der Induktion von LTP hinweisen, vermutlich durch eine Erhöhung der Freisetzungswahrscheinlichkeit der Vesikel an der präsynaptischen Membran (Malinow and Tsien, 1990; Bolshakov and Siegelbaum, 1995). Damit derartige präsynaptische Veränderungen nach postsynaptischer Induktion der LTP stattfinden können, bedarf es zwingend dem Vorhandensein eines retrograden Botenstoffs (Messenger), der postsynaptisch gebildet wird, aber auch präsynaptisch wirken kann. Ein geeigneter Kandidat, der solch eine Funktion als retrograder Messenger erfüllen kann, ist das Molekül Stickstoffmonoxid (NO). Durch einen postsynaptischen Anstieg der  $[Ca^{2+}]$ -Konzentration wird die  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängige NO-Synthase (NOS) aktiviert. Diese kann durch eine enzymatische Umwandlung von Arginin in Citrullin NO in der Postsynapse freisetzen. NO ist als ein sehr leicht diffusibles Molekül in der Lage über den synaptischen Spalt in die Präsynapse zu gelangen und dort, auf bisher noch weitgehend unbekannt Weise, die Transmitterfreisetzung zu erhöhen.

Diese Hypothese, dass NO als retrograder Messenger fungiert, wird durch verschiedene Befunde unterstützt. So konnte gezeigt werden, dass die LTP in der CA1-Region in hippocampalen Schnitten durch NO-Scavenger, die extrazellulär vorkommendes NO abfangen, gehemmt wird sowie durch Applikation von NO erhöht werden kann (Zhuo et al., 1993; Hawkins et al., 1994; Huang, 1997; Lu et al., 1999). Neben den pharmakologischen Methoden konnte auch mit einem genetischen Modell der NOS-Knockout-Tiere die Bedeutung der NOS-Synthase gestützt werden. Bei diesen NOS-Knockout-Mäusen, denen

sowohl die endotheliale und als auch die neuronale NOS fehlen, wurde eine verminderte LTP festgestellt (Son et al., 1996).

Durch viele weitere Studien hat sich das Stickstoffmonoxid-Molekül als multifunktionaler neuronaler Messenger bewiesen (zur Übersicht siehe Schuman and Madison, 1994; Feil and Kleppisch, 2008). Dabei hat NO seine Bedeutung für die synaptische Plastizität nicht nur im Hippocampus erlangt, sondern auch für die Funktion in der Amygdala. Analog zu den Befunden von Studien im Hippocampus wurde auch in der LA eine NO-abhängige LTP gefunden (Schafe et al., 2005). Diese Arbeit zeigt zunächst, dass die nNOS postsynaptisch in exzitatorischen Pyramidalneuronen der lateralen Amygdala exprimiert wird und dass die LTP über den thalamischen Input zur lateralen Amygdala durch NOS-Inhibitoren und NO-Scavengern hemmbar ist. Interessanterweise konnte diese Studie auch zeigen, dass NO eine Rolle bei der Angstkonditionierung spielt. Sie demonstrierten, dass das Langzeitgedächtnis nach einer Angstkonditionierung mittels intra-amygdalärer Infusion von NOS-Inhibitoren oder NO-Scavengern beeinträchtigt wurde. In Übereinstimmung dazu konnte durch andere Arbeitsgruppen eine Induktion der NO-Produktion in der Amygdala während der Angstkonditionierung beobachtet werden, welche mit dem Freezing-Verhalten der Tiere korrelierte (Izquierdo et al., 2006; Sato et al., 2006). Folglich scheint NO als neuronaler Modulator in der lateralen Amygdala nicht nur für die synaptische Plastizität sondern auch für die Konsolidierung des Angstgedächtnisses von Bedeutung zu sein.

### **1.3.2.2 cGMP/cGK als mögliche Effektoren von NO**

Als einen wichtigen Signalweg, durch welchen NO seine Wirkung vermittelt, wird der cGMP/cGK-Signalweg angesehen, dessen Bedeutung und Funktion in der Amygdala für die synaptische Plastizität in dieser Arbeit untersucht werden soll. Ein wichtiger Effektor von NO ist die lösliche Guanylylzyklase (sGC), welche nach Aktivierung den intrazellulären sekundären Messenger zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) generiert. Als ein wichtiger Signalübermittler des cGMP-Signals gilt die cGMP-abhängige Proteinkinase (cGK), auf deren Struktur und Funktion an dieser Stelle nun etwas genauer eingegangen werden soll: Die cGK wird durch zwei Gene (*prkg1* und *prkg2*) kodiert, welche auf unterschiedlichen Chromosomen liegen (für weitere Details siehe Pfeifer et al., 1999; Hofmann et al., 2000; Feil et al., 2005a; Hofmann et al., 2006). Daher existieren zwei Formen dieser Proteinkinase: die cGK Typ I (cGKI), welche zytosolisch vorliegt und ein Molekulargewicht von 77 kDa pro Monomer besitzt sowie die cGK Typ II (cGKII) mit 87 kDa pro Monomer, welche membrangebunden vorkommt. Die cGKI existiert in zwei Isoformen, cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$ , welche verschiedene Promotoren und 5'Exons des Gens nutzen und

sich daher in der Sequenz des N-Terminus unterscheiden. Die cGKI und II gehören zur Klasse der Serin-/Threonin-Kinasen und sind strukturell sehr ähnlich. Sie liegen als Homodimere vor, wobei ein Monomer aus jeweils zwei großen funktionellen Domänen aufgebaut ist (siehe Abb. 1.4). Die regulatorische Domäne beinhaltet einen N-terminalen Leucin-Zipper für die Dimerisierung, eine Pseudosubstrat-Bindestelle, welche eine autoinhibitorische Funktion besitzt sowie zwei cGMP-Bindestellen mit jeweils einer hohen und einer niedrigeren Affinität, welche allosterisch wirken. Daran schließt sich die katalytische Domäne mit einer Bindestelle für ATP und für das Substratmolekül sowie dem katalytischen Zentrum, das für die Übertragung der Phosphatgruppe auf das Substratprotein verantwortlich ist. Die cGKI wird durch cGMP im submikromolaren Bereich aktiviert, wobei die cGKI $\beta$  eine circa 10-fach höhere Konzentration als die cGKI $\alpha$ -Isoform benötigt (Ruth et al., 1991). Durch eine Besetzung beider cGMP-Bindestellen wird eine Konformationsänderung hervorgerufen, wobei das katalytische Zentrum von der autoinhibitorischen Domäne freigegeben wird und somit zur Substratbindung verfügbar ist. Daraufhin können Serin-/Threoninreste des Substrats sowie die Autophosphorylierungsstelle der cGK phosphoryliert werden.

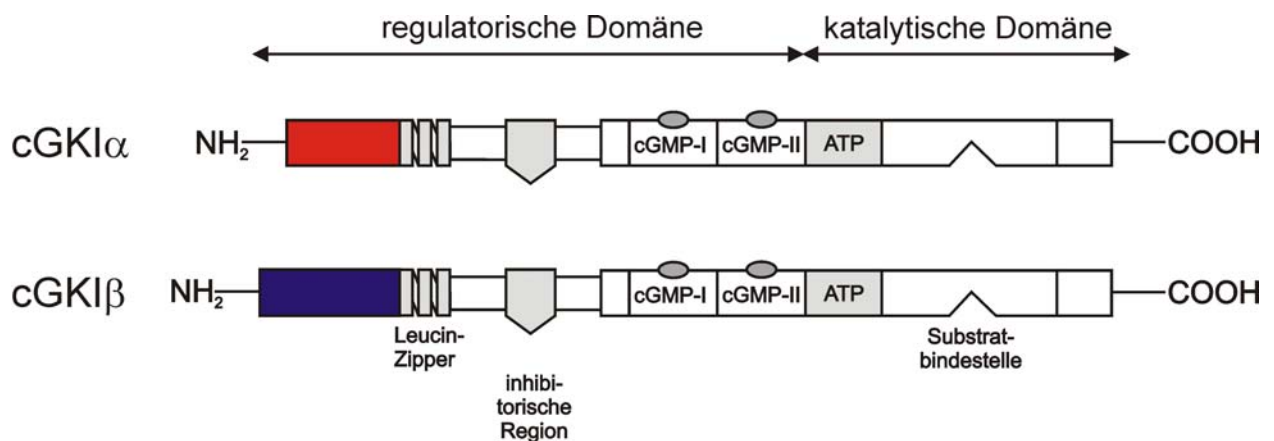


Abb. 1.4: Schematisches Modell der Struktur der cGKI $\alpha$  und  $\beta$  Isoform

Die Abbildung zeigt die schematische Struktur der Monomere der  $\alpha$ - und der  $\beta$ - Isoform der cGKI

Die cGKI ist in diversen physiologischen Prozessen involviert und wird in unterschiedlichen Geweben exprimiert, in allen Glattmuskelgeweben, Blutplättchen, Niere, Lunge und Herzmuskelgewebe (Hofmann et al., 2006). Aber auch in neuronalem Gewebe wurde die cGKI nachgewiesen (El-Husseini et al., 1999; Kleppisch et al., 1999; Geiselhoring et al., 2004; Feil et al., 2005b). So liegt die cGKI in hoher Konzentration in Teilen des Großhirns wie

Hippocampus, Cortex, suprachiasmatischer Nucleus, olfaktorischer Bulbus, Amygdala sowie auch im Cerebellum vor. Während in den Purkinjezellen des Cerebellums und dem Hinterhorn des Rückenmarks die cGKI $\alpha$ -Isoform die dominierende Form darstellt, überwiegt die  $\beta$ -Isoform im Großhirn.

Bis heute wurden schon einige Substrate der cGKI identifiziert, allerdings hauptsächlich in nicht-neuronalem Gewebe. Die Substrate der cGKI im Zentralnervensystem und ihre funktionelle Bedeutung sind dagegen weit weniger erforscht (zur Übersicht siehe Wang and Robinson, 1997; Feil et al., 2005a; Feil and Kleppisch, 2008). Als Downstream-Targets der cGKI in neuronalem Gewebe sind bisher Ionenkanäle (BK<sub>Ca</sub>-Kanal), G-Proteine und deren Regulatoren (*Regulator of G-Protein Signalling* (RGS) 2,3 und 4) und viele Zytoskelett-assoziierte Proteine (*vasodilator-stimulated phosphoprotein* (VASP), (Arancio et al., 2001; Wang et al., 2005)), die kleine GTPase RhoA (Sauzeau et al., 2000; Wang et al., 2005) und Septin-3 (Xue et al., 2000)) identifiziert worden.

Auf welche Weise der NO/cGMP/cGKI-Signalweg modulierend auf die synaptische Plastizität eingreift, ist bisher noch nicht hinreichend geklärt. Dass dieser Signalweg aber eine wichtige Rolle für synaptische Plastizität sowie für Lernen und Gedächtnis spielt, konnte bisher vielfach belegt werden. So konnte die Rolle der sGC als möglicher Effektor von NO und des daraus resultierenden cGMP für die synaptische Plastizität durch die Befunde unterstützt werden, dass die LTP im Hippocampus durch Aktivatoren und Inhibitoren der sGC erhöht bzw. erniedrigt werden kann (Arancio et al., 1995; Chien et al., 2003; Chien et al., 2005). Ebenso zeigt eine Studie mit sGC-Knockouttieren, dass die NO-induzierte LTP im visuellen Kortex über die sGC vermittelt wird (Haghikia et al., 2007). Parallel dazu steht der NO/cGMP/cGKI-Transduktionsweg auch im Zusammenhang mit Lernen und Gedächtnis. Hinweise dafür liefert die Arbeit von Chien et al. (2005), die zeigt, dass durch eine intrazerebroventrikuläre Injektion eines sGC-Aktivators die Lernleistung von Versuchstieren gesteigert werden konnte und umgekehrt durch die Injektion von NOS- und cGK-Inhibitoren verringert wird.

Weiterhin zeigte Zhuo et al. (1994), dass sich die LTP in hippocampalen Schnitten durch Zugabe eines cGK-Aktivators bzw. -Inhibitors erhöhen oder erniedrigen lässt. Übereinstimmende Resultate finden sich auch in der Arbeit von Arancio et al. (2001), die durch Injektion der aufgereinigten cGKI in die präsynaptische Zelle einer Kultur aus Hippocampus-Neuronen die LTP steigern und diesen Effekt durch einen cGKI-Inhibitor umkehren konnten. Auch anhand von Studien mit Knockout (KO)-Mäusen, bei welchen das Gen für die cGKI, cGKII oder beiden deletiert ist, konnte die Funktion der cGK für die LTP

untermauert werden. Dabei konnte zunächst keine veränderte LTP im Hippocampus bei jungen Tieren (3-4 Wochen), gefunden werden (Kleppisch et al., 1999). Da diese konventionellen cGKI-KO Tiere aufgrund diverser gastrointestinaler Phänotypen schon vor dem Erwachsenenalter versterben (Pfeifer et al., 1998), wurde ein Hippocampus-spezifischer cGKI-KO (cGKI<sup>hko</sup>) generiert, welcher auch im adulten Alter (12 Wochen) untersucht werden konnte. Adulte cGKI-defiziente Tiere zeigten nach einem starken Tetanus-Protokoll, welches das sogenannte L-LTP auslöst und Proteinsynthese-abhängig ist, Defizite im L-LTP (Kleppisch et al., 2003). Diese Studie belegt auch, dass Anisomycin, ein Proteinsyntheseinhibitor, keinen Effekt auf die L-LTP in den cGKI<sup>hko</sup>-Tieren hat, während die L-LTP in den Kontroll-Tieren mit Anisomycin auf das Niveau der KO-Tiere gebracht wurde. In Übereinstimmung dazu stehen die Befunde weiterer Arbeiten, die für eine Rolle der cGK für die späte Phase der LTP und der Proteinsynthese sprechen (Lu et al., 1999; Lu and Hawkins, 2002).

Neuere Studien belegen, dass der NO/cGMP/cGKI-Signalweg auch in der Amygdala eine Rolle für die synaptische Plastizität und für die Konsolidierung des Angstgedächtnisses spielt (Ota et al., 2008). Diese Arbeit demonstriert, dass durch cGK-Inhibitoren und Aktivatoren sowohl das Langzeitgedächtnis als auch die LTP über den thalamischen Input moduliert werden kann. Dieses Ergebnis unterstützt damit die Annahme, dass die Bildung von NO in der Amygdala für die synaptische Plastizität und das Langzeitgedächtnis von Bedeutung ist.

Eine Möglichkeit, wie die cGKI modulierend auf die Formation des L-LTP sowie des Langzeitgedächtnisses einwirken kann, ist ein Eingreifen in die Gentranskription. Dieser Effekt wäre denkbar durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors *cAMP-response element binding protein* (CREB) (Gudi et al., 1996), welcher eng im Zusammenhang mit der Funktion des Gedächtnisses steht (Bourtchuladze et al., 1994; Silva et al., 1998; Lamprecht, 1999). Man nimmt an, dass die CREB-abhängige Transkription ein entscheidender Schritt für die Gedächtniskonsolidierung und auch für die Ausbildung der L-LTP *in vitro* ist (Bourtchuladze et al., 1994; Impey et al., 1996). Tatsächlich konnte mit zahlreichen Studien belegt werden, dass CREB für die Ausbildung des Angstgedächtnisses in der Amygdala benötigt wird und während der Angstkonditionierung aktiviert wird (Impey et al., 1998; Hall et al., 2001; Lin et al., 2001; Stanciu et al., 2001; Han et al., 2007). Auch *in-vitro*-Studien an Hippocampus-Präparaten demonstrieren, dass der NO/cGMP/cGK-Signalweg zu einer erhöhten Phosphorylierung und damit zu einer Aktivierung von CREB führt, ausgelöst durch die gleichen Mechanismen, die auch zur Induktion von LTP verwendet werden (Lu et al., 1999; Lu and Hawkins, 2002; Chien et al., 2003). Ein

---

entsprechender Nachweis der NO/cGMP-vermittelten CREB-Aktivierung in der Amygdala wurde allerdings bislang noch nicht erbracht. Es ist bekannt, dass eine CREB-Phosphorylierung in der Amygdala über den ERK/MAPK-Signalweg und die PKA vermittelt werden kann. (Huang et al., 2000; Schafe et al., 2000; Lin et al., 2001; Ota et al., 2008). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine cGK-vermittelte Aktivierung von ERK/MAPK in der Amygdala stattfindet, was letztlich ebenfalls zur CREB-Aktivierung führen kann (Ota et al., 2008). Diese Möglichkeit spräche für eine indirekte Aktivierung von CREB durch die cGK. Prinzipiell wäre auch eine direkte Phosphorylierung denkbar, denn CREB besitzt wie auch für die PKA eine Phosphorylierungsstelle für die cGKI an Serin<sup>133</sup> (Colbran et al., 1992). Letztendlich ist es jedoch noch nicht geklärt, auf welche Weise die cGK CREB aktivieren kann und ob dies auch in den Neuronen der Amygdala stattfindet. Für eine direkte Phosphorylierung wäre eine nukleäre Translokation der cGK notwendig, die allerdings sehr kontrovers diskutiert wird. (Gudi et al., 1996; Collins and Uhler, 1999; Gudi et al., 2000; Browning et al., 2001; Feil et al., 2002; Casteel et al., 2008; Sugiura et al., 2008).

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser hier vorgelegten Arbeit war es, die Rolle der cGKI in der Amygdala für Lernen und Gedächtnis sowie für die zugrundeliegende synaptische Plastizität zu untersuchen. In der Literatur wird der NO/cGMP-Signalweg als wichtiger Mechanismus beschrieben, welcher eine tragende Rolle für neuronale Phänomene wie die Langzeitpotenzierung und das assoziative Angstgedächtnis spielt. Als ein bedeutsamer Effektor des NO/cGMP-Signals gilt die cGMP-abhängige Proteinkinase, welche in zwei Formen, cGKI und cGKII, vorliegt. Anhand der hier vorgestellten Untersuchungen sollte eine mögliche Rolle der Proteinkinase cGK Typ I als downstream-Modulator des NO/cGMP-Signals für die synaptische Plastizität und das Angstgedächtnis ermittelt werden. Zu diesem Zwecke wurden mit Hilfe verschiedener cGKI-defizienter Mausmodelle folgende Charakteristika bzw. Funktionen der cGKI untersucht:

- Detaillierte Analyse der cGKI-Expression in den für das Angstlernen relevanten Hirnarealen, mit besonderem Augenmerk auf der Amygdala, der Schlüsselkomponente für die Pawlowsche Angstkonditionierung
- Elektrophysiologische Untersuchung der synaptischen Plastizität in der lateralen Amygdala mit Hilfe von LTP-Messungen mit verschiedenen cGKI-defizienten Tieren
- Beurteilung des assoziativen Amygdala-abhängigen Angstlernens von cGKI rescue Tieren anhand verschiedener Konditionierungs-Experimente
- Untersuchung einer möglichen Rolle des Transkriptionsfaktors CREB als molekularer Effektor der cGKI in der lateralen Amygdala für synaptische Plastizität und Angstgedächtnis.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Alle Versuche wurden gemäß den Tierschutzrichtlinien durchgeführt und von der Regierung Oberbayern genehmigt.

#### 2.1.1 cGKI- Nullmutanten (cGKI-KO)

Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden mit cGKI-Nullmutanten (cGKI<sup>L1/L1</sup>, hier vereinfacht als cGKI-KO bezeichnet) und entsprechenden Kontroll-Tieren (cGKI<sup>+/+</sup> oder cGKI<sup>+L1</sup>, als cGKI-ctr bezeichnet) durchgeführt, welche aus der Verpaarung heterozygoter Elterntiere stammten. Der selektive Verlust der cGKI erfolgte durch Flankierung des Exons 10 des cGKI-Allels mit zwei loxP-Seiten und anschließender Cre-vermittelter Rekombination, was zur Deletion des flankierten Exons führte (Wegener et al., 2002). Aufgrund dieser Deletion exprimieren homozygote Tiere dieser Linie keine cGKI. Diese Mauslinie wurde am Institut für Pharmakologie etabliert und auf einem SV129-Hintergrund gezüchtet. Für Expressionsanalysen wie Immunhistologie oder Western Blot wurden Tiere im Alter von 5-12 Wochen verwendet. Die elektrophysiologischen Experimente wurden mit 4-6 Wochen alten Tieren (Feldpotential-Ableitungen) bzw. 2-3 Wochen alten Tieren (Patch clamp-Methode) durchgeführt.

#### 2.1.2 cGKI $\alpha$ rescue Mauslinie (cGKI-rescue)

Da durch den Verlust der cGKI schwerwiegende vaskuläre und gastrointestinale Phänotypen hervorgerufen werden (Pfeifer et al., 1998), versterben circa 50 % der cGKI-KO schon im durchschnittlichen Alter von circa 6 Wochen. Da jedoch nur erwachsene und gesunde Tiere für Verhaltensversuche verwendet werden können, eignen sich cGKI-KO Tiere nicht für derartige Experimente. Aus diesem Grund wurde für sämtliche Verhaltensversuche die cGKI -escue Mauslinie verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Mauslinie, bei welcher über einen Glattmuskel-spezifischen Promoter eine Rekonstitution der cGKI $\alpha$ -Isoform herbeigeführt wird (Weber et al., 2007). Durch diese Re-Expression der cGKI $\alpha$  in glatten Muskelzellen werden die Tiere im Schnitt 52 Wochen alt, zeigen nur schwache

Phänotypen und sind somit für Verhaltensversuche geeignet. Der sogenannte Rescue-Genotyp wurde generiert, indem die kodierende Sequenz des cGKI $\alpha$ - bzw. des cGKI $\beta$ -Proteins unter den Glattmuskel-spezifischen Promoter SM22 $\alpha$  gestellt wurde, was zu einer selektiven Expression der cGKI $\alpha$ -Isoform in glatten Muskelzellen führt. Diese transgene Mauslinie (SM22<sup>+/ $\alpha$</sup> ) wurde mit einem cGKI-defizienten Hintergrund verkreuzt, was dann zu dem sogenannten cGKI $\alpha$ -rescue-Genotyp (SM22<sup>+/ $\alpha$</sup> ; cGKI<sup>L1/L1</sup>) führt.

Da die cGKI bei einer cGKI-rescue Maus nur im Glattmuskelgewebe exprimiert wird und in allen übrigen Geweben -wie auch Hirngewebe- abwesend ist, stellt die cGKI-rescue Maus einen Knockout für cGKI im Gehirn dar.

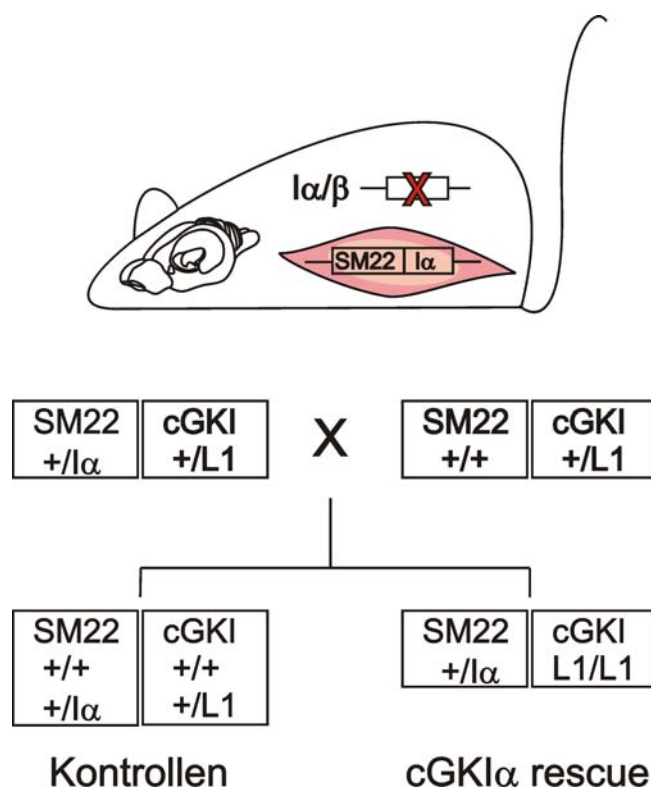


Abb. 2.1: Modell einer cGKI $\alpha$  rescue Maus und Zuchtschema

Oben: Die endogene Expression beider Isoformen der cGKI ist in allen Zellen unterbunden (endogener Genort rot durchgestrichen). Jedoch wird über den Glattmuskel-spezifischen Promoter SM22 die  $I\alpha$ -Isoform im Glattmuskelgewebe re-exprimiert (Glattmuskelzelle rosa dargestellt). Die übrigen Gewebe sind cGKI defizient (weiß).

Unten: Zuchtschema zur Generierung des sogenannten cGKI $\alpha$ -rescue Genotyps und der jeweiligen Kontrollen.

### 2.1.3 Genotypisierung

#### 2.1.3.1 Gewinnung der DNS

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

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

Tab. 2.1: Proteinase K-Puffer

#### 2.1.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase- Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*) ist eine *in-vitro* Methode, mit welcher man mit Hilfe von Enzymen gezielt Nukleotid-Sequenzen amplifizieren kann. Im Falle der Genotypisierung dient die gewonnene genomische DNS als Matrize, welche zunächst bei 94°C (Denaturierung) in die jeweiligen Einzelstränge aufgeschmolzen wird. An diese können nun spezifische Oligonukleotid-Primer binden (Annealing bei 55- 62°C), Die komplementäre Bindung des *forward*-Primer an die Matrize legt den Startpunkt der Elongation (72°C) durch die hitzestabile Taq- Polymerase fest. Durch einen zweiten Primer wird die Länge des Amplifikats bestimmt. Durch Wiederholung der Zyklen reichert sich die gewünschte DNS-Sequenz an.

10x PCR-Puffer	Stocklösung	Endkonzentration
KCl	1 M	500 mM
Tris/HCl pH 8,0	1 M	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 M	15 mM
dNTPs (Carl Roth)	100 mM	2 mM

Tab. 2.2: 10 x PCR-Puffer

Primer für cGKI-KO Mauslinie	Sequenz
RF 53	5' –cct ggc tgt gat ttc act cca –3'
RF 118	5' –aaa tta taa ctt gtc aaa ttc ttg -3'
RF 125	5' –gtc aag tga cca cta tg –3'

Tab. 2.3: Primersequenzen für cGKI-KO-Genotypisierung

Primer für cGKI $\alpha$ -rescue Mauslinie	Sequenz
RF 67	5' –ctc aga gtg gaa ggc ctg ctt –3'
SW 16	5' –cgc aag ggt tac tca cca ca -3'
SW 12	5' –cct cct tga gca tga gaa tct tg–3'

Tab. 2.4: Primersequenzen für SM22-I $\alpha$ - Genotypisierung

PCR Ansatz für cGKI-KO		Einsatz
DNS	aus Schwanzbiopsie	1,0 $\mu$ l
10 x PCR-Puffer	10 x	2,5 $\mu$ l
Primer RF53 ; RF118 ; RF125	25 $\mu$ M	jeweils 0,25 $\mu$ l
Taq-Polymerase (Promega)	5 U/ $\mu$ l	0,25 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O		20,5 $\mu$ l
Gesamt		25 $\mu$ l

Tab. 2.5: PCR-Ansatz für cGKI-KO- Genotypisierung

PCR Ansatz für SM22-I $\alpha$		Einsatz
DNS	aus Schwanzbiopsie	1,0 $\mu$ l
10 x PCR-Puffer	10 x	2,5 $\mu$ l
Primer RF 67	25 $\mu$ M	0,3 $\mu$ l
Primer SW 16	25 $\mu$ M	0,2 $\mu$ l
Primer SW 12	25 $\mu$ M	0,5 $\mu$ l
Taq-Polymerase (Promega)	5 U/ $\mu$ l	0,3 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O		20,2 $\mu$ l
Gesamt		25 $\mu$ l

Tab. 2.6: PCR-Ansatz für SM22-I $\alpha$ -Genotypisierung

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

Phase	cGKI-KO	SM22I $\alpha$	
Initiale Denaturierung	94°C, 5 Min	94°C, 5 Min	
Denaturierung	94°C; 15 s	94°C; 10 s	35x
Annealing	55°C; 30 s	62°C; 20 s	
Elongation	72°C; 30 s	72°C; 30 s	
Finale Elongation	72°C ; 5 Min	72°C ; 5 Min	

Tab. 2.7: PCR-Programme für die Genotypisierungen

### 2.1.3.3 Agarose-Gel-Elektrophorese

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

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

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

Tab. 2.8: 10x TBE- Puffer

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

Tab. 2.9: 6x DNS- Auftragspuffer

## 2.2 Immunhistochemische Methoden

Immunhistochemische Methoden ermöglichen den Nachweis von Proteinen in Gewebeschnitten mit Hilfe von Antikörpern. Durch die Bindung eines spezifischen Antikörpers an dem zu untersuchenden Protein kann das Vorhandensein und die zelluläre Verteilung dieses Proteins in einem Gewebe untersucht werden. Um das Protein zu detektieren, muss der Antigen-Antikörper-Komplex sichtbar gemacht werden. Dies kann auf verschiedene Wege erfolgen, zum Beispiel über Farbreaktionen (indirekte Methode) oder über Farbstoff-konjugierte Antikörper (direkte Methode).

Um das Expressionsmuster der cGKI im Gehirn zu untersuchen, wurden koronare Paraffinschnitte angefertigt und anschließend mit einem anti-cGKI-common-Antikörper gefärbt. Um die zelluläre Lokalisation der cGKI beurteilen zu können, wurde zusätzlich eine Kernfärbung mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Hoechst 33342 durchgeführt.

### 2.2.1 Anfertigen von Schnittpräparaten

Um Gewebeschnitte anzufertigen, muss das Gewebe zuvor fixiert und somit konserviert werden. Die Haltbarmachung der Präparate wurde mit Formaldehyd (FA) durchgeführt.

Vorgehen:

- Perfusion: die Tiere wurden tief mit Diethylether anästhesiert und dann mittels transkardialer Perfusion über die linke Herzkammer circa 10 Minuten mit 4% FA/PBS perfundiert.
- Entnahme des Gehirns und 4h Nachfixieren in 4% FA/PBS auf dem Schüttler bei Raumtemperatur (RT)
- 3 x 1 h waschen mit PBS

- Dehydrierung des Gewebes mit einer aufsteigenden Alkoholreihe bei RT auf dem Schüttler:
  - EtOH 50% 1 h
  - EtOH 60% 1 h (oder ü. N. bei 4°C)
  - EtOH 70% 1 h (oder ü. N. bei 4°C)
  - EtOH 80% 1h (oder ü. N. bei 4°C)
  - EtOH 90% 1 h
  - 2 x EtOH 100% 30 Min
  - 1 x EtOH 50%/Toluol 50% 30 Min
  - 2 x Toluol 100% 30 Min
  - geschmolzenes Paraffin I, II, und III (Paraplast X-tra, Sigma) für mindestens 1 h oder ü.N. bei 60°C
- Einbettung des Gewebes in Paraffin in eine Gießform und Erstarren lassen
- Anfertigen von koronaren Gewebeschnitten (10µm) mit einem Mikrotom (Microm HM 335 E) und Aufziehen der Schnitte auf polylysinierte Objektträger (Menzel)
- Trocknen der Schnitte bei RT für mindestens 1 Tag

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

Tab. 2.10: PBS, pH 7,4

<b>Fixierlösung 4% FA/PBS</b>	<b>Einsatz</b>	<b>Endkonzentration</b>
Formalin 37% (Carl Roth)	10,8 ml	4 %
PBS	ad 100 ml	

Tab. 2.11: Fixierlösung

### 2.2.2 Immunhistochemische Färbung von Gehirnschnitten

Um das Expressionsmuster der cGKI in der Amygdala zu untersuchen, wurden für die Färbung nur Schnitte aus jener Schnittebene ausgewählt, auf welchen die Amygdala gut zu erkennen war. Zur Orientierung diente eine Nissl-Färbung eines Parallelschnittes und der

Vergleich mit Nissl-Färbungen aus dem Atlas „The Mouse Brain“ von Paxinos und Franklin (2004, Elsevier).

Um einen Paraffinschnitt zu färben, muss dieser zunächst entparaffiniert und rehydriert werden. Dies wurde mit Toluol und einer absteigenden Alkoholreihe durchgeführt. Im Anschluss wurde ein Hitze-induziertes *Antigen-Retrieval* durchgeführt. Durch diese Hitzebehandlung werden die Vernetzungen, die durch die Polymerisation des FA bei der Fixierung entstanden sind, zum Teil wieder aufgebrochen. Dadurch wird das Epitop freigelegt, welches der Antikörper erkennt. Auf diese Weise konnte die Immunfärbung mit dem cGKIcommon-Antikörper deutlich intensiviert werden. Nach diesem Schritt folgten die Blockierung der unspezifischen Bindestellen mit Serum und die Inkubation mit dem primären Antikörper, welcher gegen das zu untersuchende Protein gerichtet ist. Für die Detektion des primären Antikörpers wurde die ABC-Methode („avidin-biotin-complex“, Vectastain ABC AP-kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) gewählt, welche auf der hohen Affinität der beiden Proteine Avidin und Biotin beruht. Diese indirekte Nachweismethode erfolgte in drei Schritten. Zunächst wurde ein sekundärer anti-rabbit-Antikörper hinzugegeben, welcher gegen den primären Antikörper gerichtet ist, und welcher biotinylierte Stellen besitzt. Danach wurde ein Komplex aus Avidin und Biotin-konjugiertem Enzym, hier alkalische Phosphatase, hinzugegeben, welcher an die freien biotinylierten Stellen des sekundären Antikörpers binden kann. Letztendlich wurde durch enzymatische Umsetzung eines zugegebenen Substrats der alkalischen Phosphatase eine Farbreaktion hervorgerufen.

Um die zelluläre Lokalisation der cGKI zu bestimmen, wurden die Schnitte zusätzlich mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 (5 µg/ml) für 10 Min inkubiert, welcher mit DNS interkaliert und sich daher als Marker für Zellkerne eignet. Nach der Einbettung der gefärbten Schnitte konnten diese unter dem Mikroskop (Zeiss, Axioscop) betrachtet und mit einer digitalen Kamera (Nikon, DX1) photographiert werden.

#### Protokoll:

- Entparaffinisieren: Toluol I: 10 Min  
Toluol II: 10 Min  
EtOH 100% I: 5 Min  
EtOH 100% II: 5 Min  
EtOH 90%: 5 Min  
EtOH 70%: 5 Min  
EtOH 50%: 5 Min



- PBS: 5 Min
- Antigen Retrieval: Inkubation in Antigen Retrieval-Puffer 15 Min bei RT  
3 x 3 Min aufkochen in der Mikrowelle in demselben Puffer  
abkühlen bis RT  
3 x 10 Min waschen mit PBS
  - Blocken: 1 h Inkubation mit 2 % *Normal Goat Serum* (NGS, Vector Laboratories)/  
PBS
  - Inkubation mit primärem Antikörper (in 2% NGS/PBS) ü. N. bei 4°C
  - 3 x 10 Min waschen mit PBS
  - Inkubation mit sekundären biotinylierten goat anti-rabbit Antikörper 1:200 in 1 %  
NGS/PBS für 1 h
  - 3 x 10 Min waschen mit PBS
  - Inkubation mit ABC-Komplex 45 Min bei RT (30 Min Vorinkubation der Komponenten  
A 1:100 und Komponente B 1:100 in PBS, lichtgeschützt), ab jetzt alle Schritte  
lichtgeschützt durchführen
  - 3 x 10 Min waschen mit PBS
  - Zugabe des Substrats, bis gewünschte Farbintensität erreicht wurde.
  - 3 x 5 Min waschen mit PBS
  - Inkubation mit Hoechst 33342 (5 µg/ml) 10 Min
  - 3 x 10 Min waschen mit PBS
  - Eindeckeln mit PermaFluor (Beckman Coulter, Marseille, Frankreich); wurde die  
Hoechst-Färbung weggelassen, wurde mit Aquatex eingedeckelt (Merck, Darmstadt)

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

Tab. 2.12: Antigen-Retrieval-Puffer pH 6,0

### 2.2.3 Nissl-Färbung

Die Nissl-Färbung ist eine Technik, die sich gut eignet, um Nervengewebe darzustellen. Das Gewebe wird mit Cresylviolett behandelt, welches an basophile Strukturen bindet. Somit werden bei der Nissl-Färbung alle Strukturen, die DNS und RNS enthalten wie Zellkern, endoplasmatisches Retikulum oder Mitochondrien, blau gefärbt. Da sich diese

Organellen nur im Zellkörper der Neuronen befinden, wird nur dieser gefärbt. Damit lassen sich histologische Strukturen sichtbar machen.

Protokoll:

- Entparaffinisieren der Objektträger wie in Kap. 2.2.2 beschrieben
- Letzter Schritt der absteigenden Alkoholreihe in Wasser
- 2 Min in 1 % Cresylviolett-Lösung tauchen
- kurz schwenken in Wasser
- kurz in 70 % EtOH tauchen
- kurz spülen mit 90 % EtOH, dann 100 % EtOH
- 2 Min in 100 % Toluol
- mit DePeX-Harz (Serva) eindeckeln

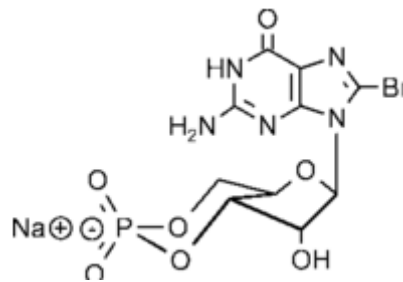
#### **2.2.4 Stimulation von Hirnschnitten durch Aktivierung des cGMP-Signalwegs**

Um zu ermitteln, ob es durch eine Stimulation der cGKI zu einer Zunahme von phosphoryliertem *cAMP-response element binding protein* (pCREB) kommt, wurden akute Hirnschnitte mit cGMP-Analoga behandelt und immunhistochemisch mit einem anti-pCREB-Antikörper gefärbt. Für diese Versuche wurden cGKI-KO und dazu gehörige Kontroll-Tiere im Alter von 4-8 Wochen verwendet. Die akuten Schnitte wurden ebenso angefertigt, wie es im Kapitel 2.4.1.1 beschrieben ist, allerdings mit einer Schnittdicke von 450 µm. Nach der Präparation folgte eine Ruhephase von 1-2 h in ACSF bei RT. Während der Stimulation wurden die Schnitte bei 30°C in begaster ACSF gehalten, welche kurz zuvor mit dem cGMP-Analogen 8-Bromoguanosin-3,5-zyklisches Monophosphat (8-Br-cGMP, 0,5 mM, Biolog) versetzt wurde. Dieses Analogon ist besser membrangängig als cGMP und vor allem metabolisch stabiler (Strukturformel siehe Abb. 2.2). Nach einer Stimulationsdauer von 30-45 Min wurden die Schnitte mittels Formaldehyd fixiert und weiterbehandelt wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben.

Für eine immunhistologische Färbung wurde mit den Paraffinschnitten ebenfalls so vorgegangen wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben. Der primäre rabbit anti-pCREB<sup>Ser133</sup>-Antikörper (Upstate) wurde 1:1000 in 5 % NGS/PBS verdünnt. Der Nachweis von pCREB erfolgte auch mit Hilfe der oben beschriebenen ABC-Methode. Als Enzym des ABC-Komplexes kam jedoch die Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) zum Einsatz und deren Substrat Diaminobenzidin (DAB). Durch die enzymatische Umsetzung des DAB kommt es zur Braunfärbung der Zellkerne, in denen pCREB vorliegt.

Da eine Aussage getroffen werden sollte, ob es zu einer Veränderung des Phosphorylierungsstatus von CREB durch eine Stimulation mit cGMP kommt, wurden die immunhistochemischen Färbungen quantitativ ausgewertet. Hierfür wurden die gefärbten Schnitte fotografiert und die Anzahl der pCREB-positiven Zellkerne in der lateralen Amygdala bestimmt. Mit Hilfe des Software-Programms *ImageTool* (UTHSCSA) wurde die Fläche (angegeben in Pixel<sup>2</sup>) der lateralen Amygdala jeder Aufnahme bestimmt und in demselben Bereich die Anzahl der pCREB-positiven Kerne gezählt. Die Normierung der Kernzahl auf eine bestimmte Flächeneinheit (1 FE = 10.000 pixel<sup>2</sup>) erlaubte eine vergleichende Aussage zwischen den verschiedenen Schnittpräparaten und diente daher als Parameter (pCREB+-Nuclei/FE) für die Auswertung.

Abb. 2.2: Strukturformel von 8-Br-cGMP



## 2.3 Western Blot

Mit der Methode des Western Blots lassen sich Proteingemische Gel-elektrophoretisch auftrennen, auf eine Trägermembran transferieren und mit Hilfe der Immundetektion sichtbar machen. Auf diese Weise lassen sich qualitativ und quantitativ Proteine nachweisen.

### 2.3.1 Probengewinnung

Die Tiere wurden mit Diethylether anästhesiert und enthauptet. Das Gehirn wurde entnommen und Schnitte angefertigt wie Kapitel 2.4.1.1 für die elektrophysiologischen Methoden beschrieben. Danach wurde aus den Schnitten, welche die Bereiche der Amygdala enthielten, die Region der Amygdala mit Hilfe eines feinen Skalpell unter einem Mikroskop ausgeschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das gefrorene Gewebe wurde mit Hilfe einer Fast-Prep24-Maschine (MP Biomedicals, Solon, OH) in Lysis-Puffer (Tab. 2.13) homogenisiert. Das Lysat wurde 10 Min bei 95°C erhitzt und danach 5 Min bei 13.000 x g zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wurde

abgenommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur Verwendung gelagert. Um eine gleichmäßige Beladung des Gels zu gewährleisten, wurde die Proteinkonzentration der Proben mittels BCA-Methode (siehe 2.3.5) bestimmt und die Proben mit Lysis-Puffer auf eine einheitliche Konzentration eingestellt (in der Regel zwischen  $3\text{-}5\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Vor dem Auftragen auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel wurden die Proben mit einer entsprechenden Menge 6xSDS-Proben-Puffer versetzt, erneut 10 Min bei  $95^{\circ}\text{C}$  erhitzt und dann nach dem Abkühlen in die Taschen des Gels gefüllt (Auftragsvolumen zwischen  $10\text{-}18\ \mu\text{l}/\text{Tasche}$ ).

<b>Lysis-Puffer, pH 7,4</b>	<b>Einsatz</b>	<b>Endkonzentration</b>
Tris	0,61 g	50 mM
SDS	2 g	2 %
H <sub>2</sub> O	ad 100 ml	auf pH 7,4 einstellen

Tab. 2.13: Lysis-Puffer, pH 7,4

### 2.3.2 Auftrennung mittels SDS-PAGE

Mit der SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) ist es möglich, Proteine nach ihrer Größe im elektrischen Feld aufzutrennen und anschließend zu detektieren. Für die Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht spielt SDS die entscheidende Rolle. Da SDS die Eigenschaften eines Detergens besitzt, ist es in der Lage, Proteine zu denaturieren, indem es nicht kovalente Bindungen der Proteine unterbricht und die Quartär- und Tertiärstruktur der Proteine auflöst. Außerdem lagert sich SDS an die Oberfläche der Proteine in einem konstanten Masse/Ladungs-Verhältnis (2 Moleküle SDS pro Aminosäure), was dazu führt, dass die Proteine eine konstante Ladungsverteilung aufweisen und somit nicht nach ihrer Ladung, sondern nur nach ihrer Masse im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Für die Trennung im Gel ist der Molekularsiebeffekt verantwortlich, das heißt, dass der Vernetzungsgrad des Polyacrylamid-Gels die Trenneigenschaften des Trenngels beeinflusst. Die Polymerisation erfolgt durch Quervernetzung von Acrylamid und Bisacrylamid zu einem festen Gel mit Hilfe von Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalstarter und Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator. Das SDS-Polyacrylamidgel besteht aus zwei Schichten, einem Sammelgel, in welchem die Proteine fokussiert werden, und aus einem Trenngel, in welchem die eigentliche Trennung stattfindet. Mit Hilfe einer Gießvorrichtung wurde zunächst das Trenngel gegossen, mit Ethanol bis zur Polymerisation überschichtet und dann mit dem Sammelgel abgeschlossen, in welchen sich die Probentaschen befanden. Nach dem Befüllen der Taschen wurden die Gele in eine

Elektrophoresekammer gespannt, mit SDS-Laufpuffer aufgefüllt und eine Spannung angelegt. Zum Durchlaufen der Proben im Sammelgel wurde eine Spannung von 100 Volt, verwendet, zum Auftrennen der Proben im Trenngel eine Spannung von 150 Volt.

<b>4xTris-HCl/SDS, pH 6,8</b>	
Tris	6 g
SDS	0,4 g
	ad 100 ml H <sub>2</sub> O, pH 6,8 einstellen, steril filtrieren

Tab. 2.14: 4x Tris-HCl/SDS, pH 6,8

<b>4xTris-HCl/SDS, pH 8,8</b>	
Tris	18,2 g
SDS	0,4 g
	ad 100 ml H <sub>2</sub> O, pH 8,8 einstellen, steril filtrieren

Tab. 2.15: 4x Tris-HCl/SDS, pH 8,8

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

Tab. 2.16: Polyacrylamid-Trenngel 10%

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

Tab. 2.17: Polyacrylamid-Sammelgel

<b>10x SDS-Elektrophorese-Laufpuffer</b>	
4xTris-HCl/SDS, pH 8,3	250 mM
Glycin	1,92 M
SDS	1%

Tab. 2.18: 10x SDS-Elektrophorese-Laufpuffer

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

Tab. 2.19: 6x SDS-Probenpuffer

### 2.3.3 Elektrolot

Nach der Trennung im SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proteine mit Hilfe des *Semi-Dry*-Verfahrens im elektrischen Feld einer Blotting-Aparatur auf eine Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF-Membran *Immobilon-P*, Millipore) als Trägermaterial übertragen. Die aufgetrennten Proteinbanden bleiben in ihrer Form erhalten und sind so für eine Immun-detektion zugänglich.

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

#### **Anode**

4 Lagen Filterpapier, getränkt in Anodenlösung I

4 Lagen Filterpapier, getränkt in Anodenlösung II

PVDF-Membran, mit Methanol befeuchtet, getränkt in Anodenlösung I

SDS-Polyacrylamidgel

8 Lagen Filterpapier, getränkt in Kathodenlösung

#### **Kathode**

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

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

Tab. 2.20: Blotting-Lösungen

### 2.3.4 Immundetektion

Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern ist es möglich, Proteine zu identifizieren und sichtbar zu machen. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers auf der Membran zu verhindern, wurde die Membran in 5 % Milchpulver/1xTBST für 1 h inkubiert. Danach wurde die Membran gewaschen (3x10 Min mit 1xTBST) und ü. N. bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur, welcher mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (Horseradish, HRP) gekoppelt ist. Somit ist eine Sichtbarmachung mit Hilfe einer Chemilumineszenz-Reaktion möglich. Bei dieser Reaktion wird Luminol in Gegenwart von Wasserstoffperoxid durch die Peroxidase oxidiert und in einen angeregten Zustand versetzt, welcher nach Auflegen eines Röntgenfilms eine Schwärzung des Films verursacht. Daher wurde nach erneutem Waschen die Membran mit einer ECL (enhanced chemiluminescent)-Lösung (ECL western blot analysis system, Amersham) versetzt, mit Klarsichtfolie abgedeckt und ein Film (Hyperfilm, Amersham) zur Belichtung aufgelegt. Nach einer Belichtungszeit zwischen 1-30 Min wurde der Film in einer Entwicklermaschine (Agfa Curix60) entwickelt.

<b>10xTBS, pH 8,2</b>	
Tris/HCl	50 mM
NaCl	750 mM
Methanol	20 %

Tab. 2.21: 10x TBS, pH 8,2

<b>1xTBST</b>	
10xTBS, pH 8,2	100 ml
Tween 20	1 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

Tab. 2.22: 1x TBST

### 2.3.5 Proteinbestimmung (BCA-Methode)

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

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

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

Vorgehen:

- Proteinproben 1:100 und 1:200 verdünnen
- Jeweils 50  $\mu\text{l}$  der verdünnten Proteinproben und der BSA-Standardreihe sowie 50  $\mu\text{l}$  Wasser als Leerwert vorlegen und 200  $\mu\text{l}$  des BCA-Reagenzes (Lösung I: Lösung II = 50:1, BC Assay, Interchim) hinzugeben.
- 45 Min bei 60°C inkubieren
- Extinktion der Proben bei 540 nm photometrisch messen (in 96-well-Platte im Titertek Multiskan<sup>®</sup> MCC/340)
- Anhand der Extinktionswerte eine Eichgerade erstellen und mit dieser die Proteinkonzentrationen der Proben berechnen.



## 2.4 Elektrophysiologische Methoden

### 2.4.1 Extrazelluläre Ableitung von Feldpotentialen in der lateralen Amygdala

Die extrazelluläre Ableitung von elektrischen Feldpotentialen (FP) ist eine gängige *in-vitro* Methode, um neuronale Erregung zu erfassen. Der Verlauf eines extrazellulären Feldpotentials spiegelt die Vorgänge an der postsynaptischen Membran wider. Da es bei einer Erregung der Neuronen zum Öffnen von Liganden- und Spannungs-gesteuerten Ionenkanäle der Postsynapse kommt, entstehen durch diesen transmembranalen Ionenstrom auch im Extrazellularraum Potentialdifferenzen. Diese lassen sich mit einer Mikroelektrode ableiten und sind ein Maß für die synaptische Übertragung. Bei diesen extrazellulären Messungen werden die Potentiale der postsynaptischen Membran des gesamten Dendritenbaums einer größeren Anzahl von Neuronen erfasst. Daher stellt ein Feldpotential ein Summenpotential dar, das durch eine räumliche und zeitliche Überlagerung vieler postsynaptischer Potentiale entsteht.

#### 2.4.1.1 Schnittpräparation und Vorbereitung

Für diese Versuche wurden Tiere im Alter von 4-6 Wochen verwendet. Nach einer tiefen Anästhesie mit Diethylether wurden die Tiere dekapitiert und das Gehirn rasch entnommen und in eisgekühlter, mit Carbogen (95 % Sauerstoff, 5 % Kohlenstoffdioxid) begaster Nährstofflösung (ACSF: artifizielle cerebrospinaler Flüssigkeit, Zusammensetzung in mM: NaCl 124; KCl 3; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,25; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2; CaCl<sub>2</sub> 2,5; NaHCO<sub>3</sub> 26; Glucose 10) getaucht. Die akuten, koronaren Hirnschnitte wurden mit einem Vibrationsmikrotom (Microm Typ HM 650 V, Walldorf, Deutschland) ebenfalls in eisgekühlter ACSF mit einer Schnittdicke von 400µm angefertigt. Danach wurden die Schnitte, welche Bereiche der Amygdala enthielten, in eine begaste Kammer mit ACSF bei RT überführt, in welcher sie bis Versuchsbeginn 1-2 Stunden ruhten.

#### 2.4.1.2 Messung und Aufzeichnung

Für die Messung wurden die Schnitte in eine *submerged*-Messkammer transferiert. Diese Messkammer wurde über ein Temperatur-Kontroll-System (LN Temperatur control system) bei 30°C temperiert und mit begaster, vorgewärmter ACSF mit 10 ml/Min perfundiert. Der Schnitt wurde mit einem harfenähnlichen Netz („Slice anchor kit for RC-22“, SHD-22 KIT, Warner Instruments) beschwert und somit fixiert. Zum Ableiten der Potentiale im Hirnschnitt wurden Glaspipetten aus Borosilikatglas (Länge 10 cm, Außendurchmesser 1 mm, Innendurchmesser 0.78 mm, Bio-Medical Instruments, Warren, MI, USA) verwendet und mit Hilfe

eines horizontalen Pullers (Flaming/Brown Micropipette Puller, Model P-97, Sutter Instruments, Novato, CA, USA) zu einem Widerstand von 2-5 Mega-Ohm gezogen. Die Ableitelektroden wurden mit ACSF gefüllt, in einen Ag-AgCl Elektrodenhalter (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) gespannt und mit einem Mikromanipulator in Position gebracht. Als Reizelektrode diente eine bipolare Wolframelektrode (TM53CCINS, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA). Die Reizausgabe erfolgte über einen Stimulus-Isolator (Stimulus Isolator A360, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) mit Strom-konstanter Reizausgabe. Die räumliche Anordnung der Elektroden zur Ableitung der Feldpotentiale durch Stimulation des kortikalen und des thalamischen Inputs ist in Abb. 2.3 dargestellt.

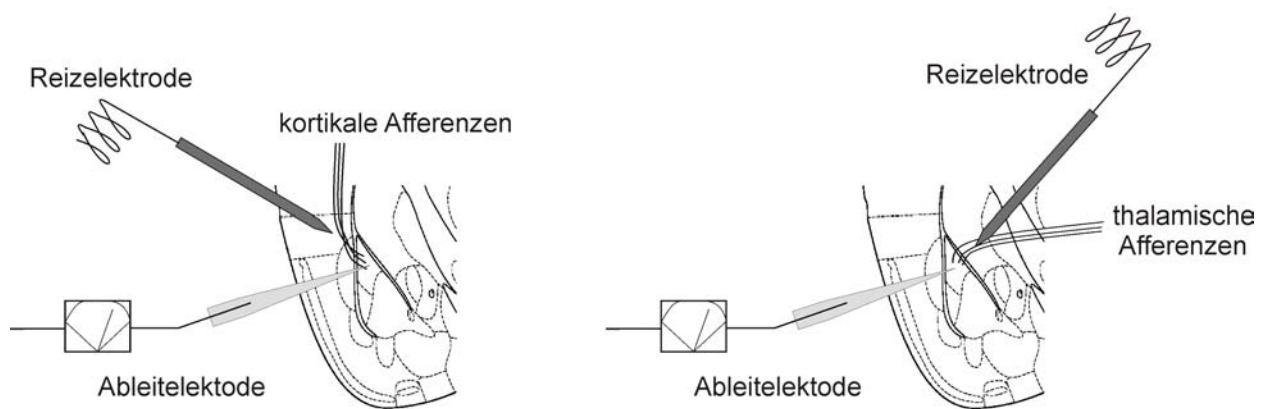


Abb. 2.3: Anordnung von Reiz- und Ableitelektrode bei Feldpotentialmessungen in der lateralen Amygdala

Links: kortikaler Input: Während die Ableitelektrode inmitten der lateralen Amygdala platziert wird, wird die Reizelektrode an die Capsula externa gesetzt, durch welche die kortikalen Afferenzen hindurchlaufen.

Rechts: thalamischer Input: Die Position der Ableitelektrode bleibt gleich, die Reizelektrode wird jedoch überhalb des zentralen Kerns der Amygdala in die sogenannte „Transit Area“ platziert, die von den einlaufenden thalamischen Afferenzen durchzogen ist.

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

Zu Beginn jeder Messung wurde mit einer *IOR (input-output relation)*- Kurve die maximale Reizantwort ermittelt. Danach wurde eine Baseline mit einer Reizstärke von 30-50 % der maximalen Reizantwort aufgenommen. Diese entspricht der basalen synaptischen

Transmission. Die Reizfrequenz betrug 0,083 Hz, d.h. alle 12 Sekunden, und die Reizdauer 100  $\mu$ s. Konnte eine stabile Baseline von 15 Min aufgenommen werden, so wurde über die Reizelektrode ein hochfrequenter Tetanus gesetzt (1 Sekunde mit einer Reizfrequenz von 100 Hz). Dabei wurde die gleiche Reizintensität wie für die Baseline gewählt. Der Tetanus wurde insgesamt 5-mal wiederholt im Abstand von 90 s (siehe Abb. 2.4). Dieses Reizprotokoll ist ein gängiges Protokoll, um eine langanhaltende Langzeitpotenzierung (L-LTP) in der Amygdala zu induzieren (Huang and Kandel, 1998), das heißt, die synaptische Übertragung über einen längeren Zeitraum zu steigern. Die LTP wurde nach dem Tetanus noch weitere 60 Min aufgezeichnet und als prozentuale Änderung der Amplitude im Vergleich zur Baseline angegeben.

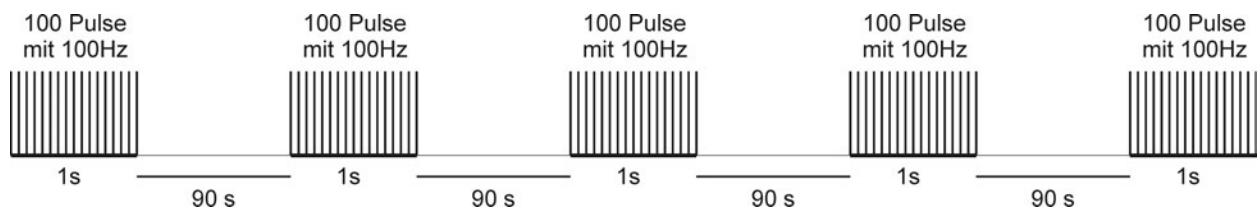


Abb. 2.4: 100 Hz-Tetanus zur Induktion einer Langzeit-Potenzierung in der Amygdala

Über die Reizelektrode wurden 100 Pulse einer Dauer von jeweils 100  $\mu$ s mit einer Frequenz von 100 Hz gegeben. Dieser 1 s andauernde Tetanus wurde insgesamt 5-mal appliziert mit einem Interstimulus-Intervall von 90 s.

### 2.4.1.3 Auswertung

Ein extrazellulär abgeleitetes Feldpotential setzt sich aus 3 Phasen zusammen: zunächst wird der Reizartefakt detektiert, ein biphasisches Signal, das synchron mit dem Reizstimulus auftritt. Darauf folgt das sogenannte „*fiber volley*“, eine meist sehr kleine negativ orientierte Welle, welche durch präsynaptische Erregung verursacht wird. Die Größe des *fiber volleys* korreliert mit der Anzahl der präsynaptischen Fasern, die durch den Stimulus erregt wurden. Danach erfolgt das eigentliche postsynaptische Potential als größere negative Welle, dessen Größe sich durch die Reizintensität beeinflussen lässt. In Abb. 2.5 ist exemplarisch ein Feldpotential abgebildet.

Als Parameter zur Beurteilung und Auswertung eines Feldpotentials in der Amygdala wird in der Regel seine Amplitude verwendet. Um die mittlere Amplitude eines Feldpotentials zu berechnen, wurden für die Auswertung drei Fenster innerhalb des Verlaufs des Feldpotentials gesetzt (siehe Abb. 2.5), mit welchen die maximalen und minimalen

Auslenkungen des Feldpotentials festgelegt wurden. Die mittlere Amplitude während der Baseline wurde gleich 100 % gesetzt. Die Potentialänderungen nach dem Tetanus wurden als prozentuale Änderung angegeben, ausgehend von der Baseline. Die Daten wurden mit dem Software Programm *OriginPro* (Origin Lab, Northampton, CA, USA) ausgewertet.

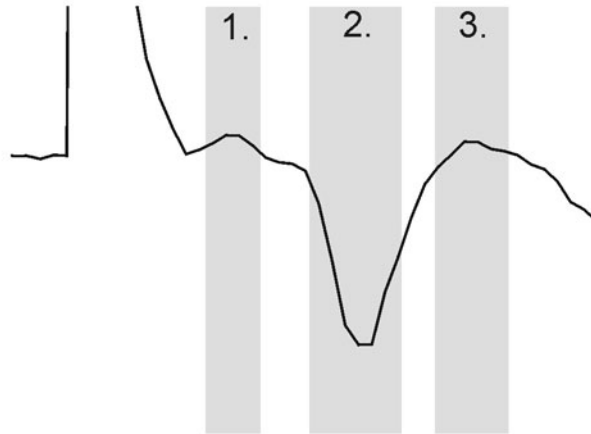


Abb. 2.5: Beispiel eines abgeleiteten Feldpotentials

Zunächst erscheint der Reizartefakt (nur unterer Teil abgebildet), danach die verschiedenen Phasen des Feldpotentials, welches in der lateralen Amygdala abgeleitet wurde. In grau sind die Bereiche unterlegt, in welche die Fenster zur Ermittlung der mittleren Amplitude des Potentials gesetzt wurden. Innerhalb der Fenster 1 und 3 wurde der maximale Wert und innerhalb Fenster 2 der minimale Wert verwendet.

#### 2.4.2 Messungen im patch-clamp-Modus

Mit dieser Technik wurden sogenannte *excitatory postsynaptic currents* (EPSCs) im *whole-cell*-Modus von Pyramidalneuronen der lateralen Amygdala aufgenommen. Dafür wurden wie oben beschrieben 300µm dicke Hirnschnitte von 2-3 Wochen alten Versuchstieren angefertigt. Die ACSF der Badlösung wurde mit 50µM Picrotoxin versetzt. Die Patch-Elektroden mit einem Widerstand von circa 3 MOhm wurden mit folgender Pipetten-Lösung gefüllt: (Angaben in mM) Glucose 10, HEPES 10, K-Gluconat 95, KCl 20, NaCl 10, MgCl<sub>2</sub> 1, EGTA 0,2, K-ATP 1, Na<sub>2</sub>GTP 1, Einstellung auf pH = 7,2. Alle Messungen wurden im *voltage-clamp*-Modus mit einem Haltepotential von -70mV durchgeführt. Die EPSCs wurden wie in Kap 2.4.1 beschrieben mit einer bipolaren Reizelektrode durch Stimulation des kortikalen oder des thalamischen Inputs ausgelöst. Die Reizdauer eines Pulses betrug 100µs. Die sogenannte *Paired-Pulse-Facilitation* (PPF) wurde durch zwei kurz aufeinander-

folgenden Pulsen mit einem Intervall von 25 und 50 ms induziert. Die PPF berechnet sich als das Verhältnis  $EPSC_2/EPSC_1$ .

## 2.5 Verhaltenstests

Für alle Verhaltenstests wurden ausschließlich männliche, 10-16 Wochen alte Geschwistertiere verwendet. Alle Versuchstiere wurden einzeln in Käfigen mit Futter und Wasser *ad libitum* gehalten und 2 Wochen vor Versuchsbeginn in einen inversen Tag-Nacht-Rhythmus gesetzt. Alle Versuche wurden in der Dunkelphase, d.h. in der aktiven Phase der Tiere durchgeführt. Um eine subjektive Bewertung der Experimente zu vermeiden, war dem Versuchsleiter der Genotyp der Versuchstiere nicht bekannt.

### 2.5.1 Konditionierung

#### 2.5.1.1 Klassische Angstkonditionierung

Die Angstkonditionierung ist eine klassische Art der Konditionierung, bei welcher das Tier lernen soll, einen harmlosen Stimulus (conditioned stimulus, CS), hier ein Ton, mit einem aversiven Stimulus (unconditioned stimulus, US), in diesem Fall ein milder elektrischer Fußschock in Verbindung zu bringen, indem man beide Stimuli gepaart präsentiert. Die daraus resultierende Lernleistung des Tiers kann anhand des „Freezing“-Verhaltens ausgewertet werden.

Die Angstkonditionierung wurde mit Hilfe des Fear Conditioning System (TSE Systems, Bad Homburg) durchgeführt. Für die Durchführung waren zwei verschiedene Kontext-Ausführungen notwendig, welche in ihrem Aussehen, Geruch und Belichtung unterschiedlich gestaltet waren: Die Konditionierung wurde in dem Konditionierungskontext (Kontext A, siehe Tab. 2.23) durchgeführt. Dieser bestand aus einer durchsichtigen Plexiglaskammer (22x22 cm) und einem Metallgitterboden, durch welchen der Fußschock appliziert werden konnte. Dieser Kontext wurde nach jedem Durchgang mit 70% Ethanol gereinigt. Der Testkontext (Kontext B) bestand aus einer schwarzen, zylinderförmigen Kammer mit Streu auf dem Boden und wurde mit 1% Essigsäure gereinigt. Da sich Kontext B von dem Konditionierungskontext in allen wesentlichen Punkten unterschied, stellte er somit einen neutralen Kontext dar.

Versuchsablauf (siehe Tab. 2.23): An Tag 0 wurde die Konditionierung durchgeführt, indem das Tier zunächst für 3 Min den Kontext explorieren konnte. Anschließend erfolgte die Tonpräsentation für 30 s, welche mit einem 2-s Fußschock abschloss. Nach einer 30-s

langen Regenerationsphase wurden die Tiere wieder in ihren Käfig zurückgesetzt. Um das kontextuelle Gedächtnis zu untersuchen, wurden die Tiere wieder dem Kontext A ausgesetzt und das *Freezing*-Verhalten für 3 Minuten beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde das auditorische Angstgedächtnis in dem neutralen Kontext B getestet. In diesem hatten die Mäuse zunächst 3 Min Zeit, ihre Umgebung zu explorieren, woraufhin dann die Präsentation des konditionierten Tons (CS) erfolgte.

Das Lernverhalten wurde je nach Protokoll zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Konditionierung untersucht. Es wurden 3 verschiedene Protokolle angewendet (siehe Abb. 2.7), welche sich in dem Zeitintervall zwischen Konditionierung und der ersten Testphase unterschieden. Es wurde die Intervalle von 2 Stunden, 1 und 7 Tage gewählt und für jedes Protokoll eine andere Gruppe von Versuchstieren verwendet. Somit ist es möglich, die Lernleistung in den unterschiedlichen Phasen der Gedächtnisbildung zu untersuchen. Während nach 2 Stunden das Kurzzeitgedächtnis getestet wird, kann nach einem Tag das Langzeitgedächtnis untersucht werden. Nach 7 Tagen ist dann von einem vollständig konsolidierten Gedächtnis auszugehen.

Phase	Ablauf	Parameter
Konditionierung	180 s Pause 28 s Ton (Sinuston 9 kHz, 80 dB) 2 s Ton+ Fußschock (0,7 mA) 30 s Pause	Kontext A : Box: Plexiglasquader Boden: Metallgitter Reinigung: 70% EtOH Lichtintensität: Stufe 2,5
Test: auditorisch	180 s Pause 180 s Ton (Sinuston 9 kHz, 80 dB)	Kontext B : Box : Zylinder Boden: Streu Reinigung: 1% Essigsäure Lichtintensität: Stufe 5
Test: kontextuell	180 s Pause	Kontext A

*Tab. 2.23: Phasen der Angstkonditionierung*

*Ablauf der verschiedenen Phasen der Konditionierung und der Testphasen mit den jeweiligen Bedingungen und eingestellten Parametern.*

Alle Phasen der Versuche wurden auf Video aufgezeichnet und manuell mit Hilfe der Software *winrat* (freundlicherweise von Carsten Wotjak, MPI für Psychiatrie, München, zur Verfügung gestellt) ausgewertet. Dabei wurde die Zeit analysiert, in welcher das Tier in völliger Angststarre verharrte und ausschließlich Bewegungen zu beobachten waren, die durch die Atmung verursacht wurden.

### 2.5.1.2 Sensitisierung

Die Sensitisierung dient dazu, die Anteile der nicht-assoziativen Angst nach einer Fußschock-Applikation zu bestimmen. In der Regel wird das *Freezing*-Verhalten, das nach einer Ton-Fußschock-Paarung zu beobachten ist, als Parameter für die Assoziationsstärke dieser beiden Stimuli verwendet. Jedoch wird das Ausmaß dieser Angstreaktion durch mindestens drei verschiedene neuronale Komponenten bestimmt (Kamprath and Wotjak, 2004). Zum einen löst der Ton alleine bei naiven Tieren schon reflexartig eine Angstreaktion auf direktem Weg aus. Zum anderen entsteht durch das aversive Erlebnis des Fußschocks eine nicht-assoziative Komponente, welche sich generell auf das Verhalten des Tieres auswirkt. Diese Tiere, denen ein Fußschock appliziert wurde, nennt man sensitisierte Tiere. Die Sensitisierung bewirkt, dass sie ein allgemein erhöhtes Angstverhalten in verschiedenen Tests wie Open Field oder Light-Dark Box zeigen. Die dritte Komponente stellt die assoziative Komponente dar, die bei einer Ton-Fußschock-Paarung entsteht und enthält die qualitativen Informationen der Assoziation. Alle drei Komponenten zusammen beeinflussen das Verhalten des Tieres.

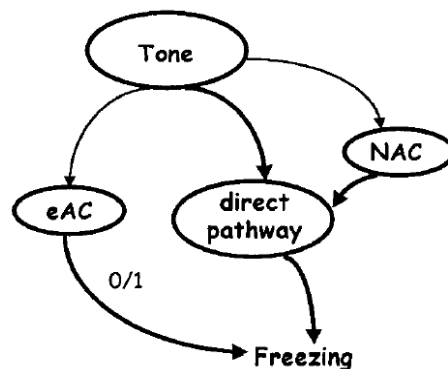


Abb. 2.6: Modell der 2-Komponenten-Theorie bei der Angstkonditionierung:

Das Modell stellt die verschiedenen Komponenten dar, welche das *Freezing*-Verhalten eines konditionierten Tieres beeinflussen. Der Ton löst zunächst reflexartig *Freezing* aus („direct pathway“). Durch die Applikation des Fußschocks entstehen dann zusätzlich nicht-assoziative Komponenten (NAC), die das *Freezing* verstärken. Die Assoziation mit dem Ton stellt die dritte Komponente dar, welche die Verknüpfung mit dem Fußschock enthält (eAC = excitatory associative component).

(aus Kamprath and Wotjak, 2004)

Um zu untersuchen, welchen Anteil die nicht-assoziative Komponente bei dem *Freezing*-Verhalten besitzt, wurde ein Sensitierungs-Protokoll (siehe Abb. 2.7) angewendet. Dabei wurden naive Tiere sensitisiert, indem ihnen ein Fußschock (ohne vorherige Ton-

Präsentation) appliziert wurde und dann zu einem späteren Zeitpunkt das Freezing-Verhalten während der Tonpräsentation in einem neutralen Kontext ausgewertet wurde.

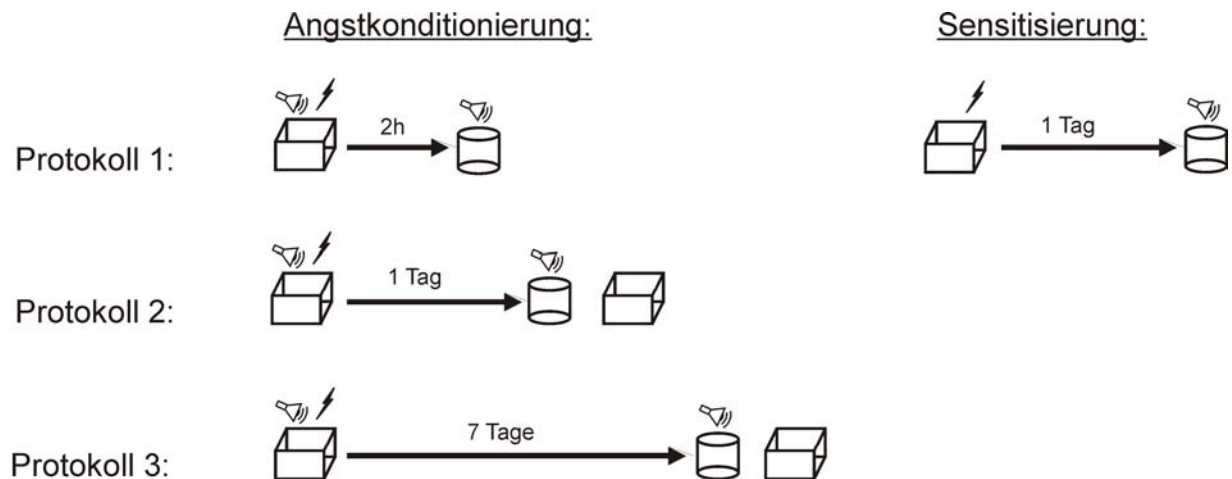


Abb. 2.7: Konditionierungsprotokolle

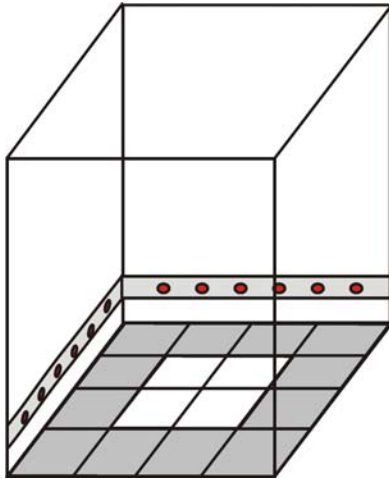
Für die Angstkonditionierung (links) wurden drei verschiedene Protokolle angewendet mit unterschiedlichen Zeitintervallen (Protokoll 1: 2 h; Protokoll 2: 1 Tag; Protokoll 3: 7 Tage) zwischen der Konditionierung und Test. An Tag 1 und 7 wurde auch das kontextuelle Gedächtnis getestet. Mit dem Sensitierungsprotokoll (rechts) wurde das Freezing-Verhalten während des Tons 1 Tag nach alleiniger Fußschock-Applikation geprüft.

### 2.5.2 Open Field

Dieser Test dient dazu, das explorative Verhalten der Tiere in einer unbekanntem Umgebung zu untersuchen. In solch einer Situation steht das Tier in dem inneren Konflikt, sich entweder in eine sichere Ecke zurückzuziehen oder sich der Gefahr auszusetzen und die unbekanntem Umgebung zu erkunden. Die Bewegungen des Tiers in einer neuen Umgebung geben daher Aufschluss über den generellen emotionalen Zustand des Tieres. Die Analyse wurde ebenfalls mit Hilfe der TSE-Apparatur durchgeführt. Das Open Field bestand aus einer quadratischen Plexiglasbox und einem glatten Kunststoffboden. Die Versuchsdauer betrug 10 Min, in welcher naive Tiere den Raum im Dunkeln explorieren konnten. Dabei wurde mit Hilfe von Infrarotsensoren, welche die Box umgaben, jede Bewegung des Tieres aufgezeichnet. Anhand dieser Daten ließen sich mittels der TSE-Software verschiedene Parameter wie Aktivität, zurückgelegter Weg oder „Rearings“ (Aufrichten) berechnen, welche Aufschluss geben über das Angst-assoziierte Verhalten der Tiere. Außerdem wurde auch die Thigmotaxis analysiert. Dabei handelt es sich laut



Definition um eine Orientierungsbewegung der Tiere aufgrund von Berührungsreizen, wobei in diesem Fall eine Berührung mit der Wand gemeint ist. Für die Auswertung wurde daher das Feld in eine Randzone (Breite 5,5 cm) und eine mittlere Zone (11 x 11 cm) unterteilt und die jeweilige Aufenthaltsdauer der einzelnen Zonen berechnet. Als Parameter für das Angstverhalten diente die prozentuale Aufenthaltsdauer in der Randzone (Thigmotaxis).



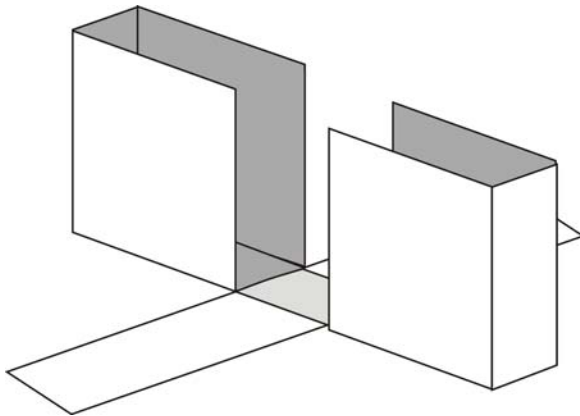
*Abb. 2.8: Aufbau des Open Fields*

*Die durchsichtige Plexiglasbox war umgeben von Infrarotleisten, die die Bewegungen des Tiers registrierten. In Grau ist auf dem Kunststoffboden (22 x 22 cm) der Bereich eingezeichnet, der als Randzone (Breite: 5,5 cm) betrachtet wurde. Die innere Zone ist in weiß dargestellt.*

### 2.5.3 Elevated Plus Maze

Bei dem Test im Elevated Plus Maze (EPM) macht man sich zu Nutze, dass Nagetiere eine angeborene Aversion gegenüber offenen, ungeschützten Bereichen besitzen und enge, schmale Räume bevorzugen, welche sie als sicher empfinden. Jedoch kann das Tier durch eine explorative Veranlagung dazu verleitet werden, den unbekanntem und vermeintlich gefährlichen Bereich zu erkunden. Daher ist es mit dem EPM-Test möglich, mit Hilfe der Aufenthaltsdauer in verschiedenen gestalteten Räumen Informationen über das Angst-assoziierte Verhalten zu erhalten. Das Maze (engl.: Labyrinth) besteht aus einer kreuzförmigen Plattform aus PVC, wobei die gegenüberliegenden Arme entweder offen (30 x 5 cm) oder geschlossen (30 x 5 x 15 cm) sind und in ihrer Mitte eine neutrale Zone (5 x 5 cm) besitzen (siehe Abb. 2.9). Die Beleuchtung wurde so eingesetzt, dass auf dem offenen Arm eine Helligkeit von 300 lux, im geschlossenen Arm 5 lux und in der neutralen Zone 115 lux herrschte. Zu Beginn des Tests wurde das Tier in die Mitte der neutralen Zone gesetzt mit dem Kopf zum geschlossenen Arm gerichtet. Während der 5 Min Versuchsdauer wurde jeder Übertritt von einer Zone in eine andere festgehalten sowie die

jeweilige Aufenthaltsdauer. Ein Übertritt wurde nur gewertet, wenn das Tier die Zone auch mit den Hinterpfoten betreten hatte. Als Parameter wurden die Gesamtzahl der Übertritte ausgewertet sowie die prozentuale Anzahl der Übertritte in den offenen Arm verglichen zur Gesamtzahl und die prozentuale Aufenthaltsdauer in den offenen Armen.



*Abb. 2.9: Aufbau des Elevated Plus Mazes*

*Jeweils 2 offene, beleuchtete Arme (weiß) und zwei geschlossene, dunkle Arme (dunkelgrau) liegen sich gegenüber und sind mit einer neutralen Zone (hellgrau) verbunden.*

#### **2.5.4 Light-Dark Box**

Das Prinzip der Light-Dark Box basiert auf der Tatsache, dass Nagetiere von Natur aus hell erleuchtete Bereiche meiden. Auch bei diesem Test wird das Versuchstier vor die Wahl gestellt, im sicheren dunklen Kompartiment zu bleiben oder das helle Kompartiment zu erkunden. Die Light-Dark Box besteht daher aus zwei verschiedenen Kompartimenten, welche mit einem Tunnel verbunden sind, über welchen das Tier durchtreten kann (siehe Abb. 2.10). Das größere, hell erleuchtete Kompartiment bestand aus weißen Kunststoffwänden und wurde mit 300 lux beleuchtet, das kleinere, dunkle Kompartiment mit schwarzen Wänden mit 5 lux. Zu Versuchsbeginn wurde das Tier in die Mitte des dunklen Kompartiments gesetzt. Die Versuchsdauer betrug 5 Minuten, in welchen analog zum EPM jeder Übertritt sowie die Aufenthaltszeiten notiert wurden.

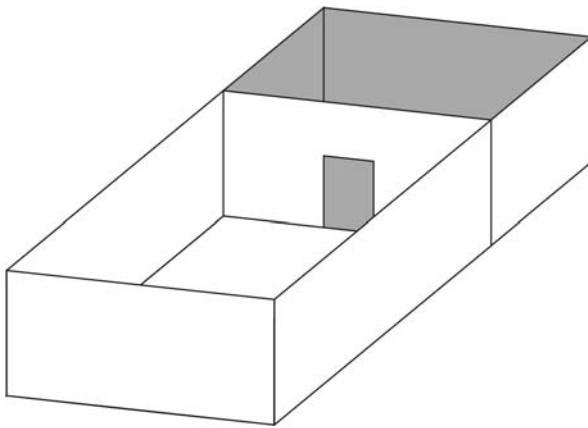


Abb. 2.10: Aufbau der Light-Dark Box  
Das kleinere dunkle Kompartiment ist über einen Tunnel mit dem größeren hellen Kompartiment verbunden.

### 2.5.5 Schmerzschwelle

Dieser Test diente dazu, die Schmerzschwelle der Versuchstiere bezüglich eines elektrischen Fußschocks zu bestimmen. Da die Tiere während der Angstkonditionierung mit einem Fußschock konditioniert werden sollten, musste sichergestellt werden, dass die verschiedenen Genotypen keinen Unterschied im akuten Schmerzempfinden aufweisen. Da die Fußschock-Intensität das Freezing-Verhalten quantitativ bestimmt (Kamprath and Wotjak, 2004), ist eine unveränderte Schmerzwahrnehmung des unkonditionierten Stimulus essentiell für eine korrekte Konditionierung.

Für die Bestimmung der Schmerzschwelle wurden die naiven Versuchstiere in den gleichen Kontext (Kontext A) mit dem Metallgitterboden gesetzt, wie er auch für die Konditionierungsversuche benutzt wurde. Nach einer 3-minütigen Explorationsphase wurden elektrische Fußschocks mit steigender Intensität appliziert, beginnend mit 0,1 mA, und einer Pausenintervall von 30 s. Als Schmerzschwelle wurde die Stromstärke des Fußschocks betrachtet, bei welcher merkliche Schmerzreaktionen des Tieres zu beobachten waren wie Springen oder Zusammenzucken („*jumping*“) oder Vokalisieren („*vocalizing*“).

## 2.6 Statistik

In dieser Arbeit wurden alle erhobenen Daten als Mittelwerte  $\pm$  SEM (*standard error of the mean*) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des *Students t*-Test oder einer mehrfaktoriellen Varianzanalyse. Das Signifikanzniveau wurde wie folgt definiert:  $p > 0,05$ : nicht signifikant;  $p < 0,05$ : statistisch signifikant (\*);  $0,001 < p < 0,01$ : statistisch signifikant (\*\*);  $p < 0,001$ : statistisch hochsignifikant (\*\*\*).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Expression der cGKI im Gehirn

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle der cGKI für das Angstgedächtnis untersucht werden. Aus diesem Grund wurde zunächst die Expression der cGKI auf Proteinebene in Hirnarealen analysiert, welche mit Angstlernen assoziiert sind. Dabei wurde das Hauptaugenmerk auf den Bereich der Amygdala gerichtet, welche eine Schlüsselrolle bei der Angstkonditionierung spielt. Mit immunhistologischen Methoden ließ sich die Expression der cGKI in der Amygdala in Gehirnschnitten nachweisen und ihre Lokalisation in den verschiedenen Kernbereichen der Amygdala genauer bestimmen. Durch eine Zellkernfärbung mit Hoechst konnten auch Hinweise auf die zelluläre Verteilung der cGKI in den Neuronen der Amygdala erhalten werden. Die gleichzeitige Färbung von Gehirnschnitten von cGKI-KO und cGKI-rescue Tieren diente als Kontrolle für die Spezifität des Antikörpers, um unspezifische Bindungen im Gehirnschnitt auszuschließen. Zusätzlich sollte ermittelt werden, welche der beiden cGKI-Isoformen in der Amygdala exprimiert wird. Da die Isoform-spezifischen Antikörper nicht für die immunhistochemische Methode geeignet sind, wurde diese Fragestellung mit Hilfe des Western Blots geklärt.

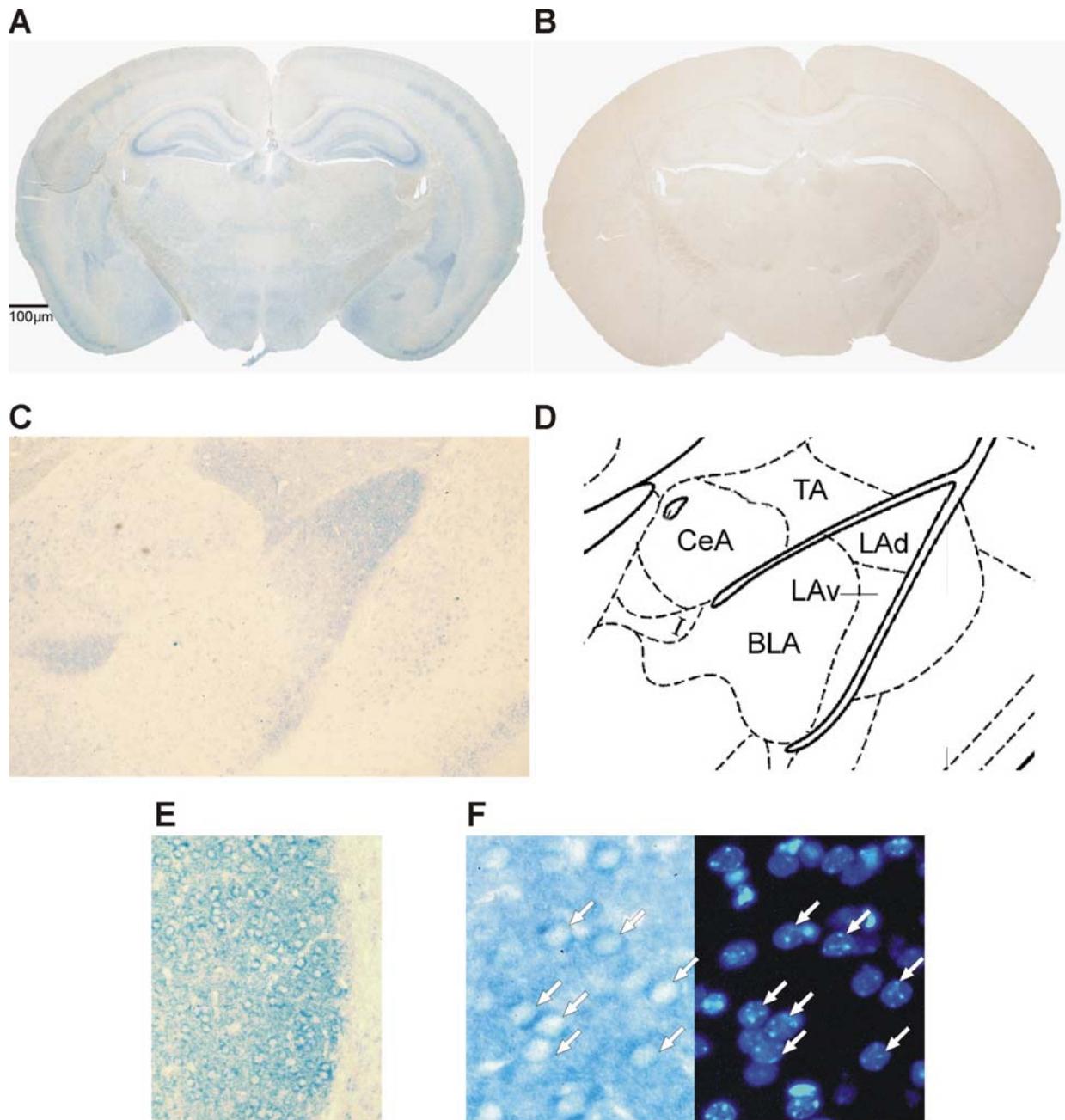
#### 3.1.1 Immunhistochemischer Nachweis

Die immunhistochemische Färbung mit dem cGKIcommon-Antikörper (erkennt beide cGKI-Isoformen) zeigte eine deutliche Expression der cGKI in den Hirnregionen der Großhirnrinde (Cortex), des Hippocampus und im Bereich der Amygdala (Abb. 3.1A). Damit werden die Angaben in der Literatur in den wesentlichen Teilen bestätigt (Kleppisch et al., 1999; Geiselhoringer et al., 2004; Feil et al., 2005b). Die Vergrößerung des Bereichs der Amygdala zeigt, dass die LA ein Hot Spot der cGKI-Expression zu sein scheint (Abb. 3.1C), denn vor allem die dorsolateralen (LAd) und ventrolateralen (LAv) Kerne der Amygdala zeigten eine starke Färbung. Weiterhin wurde eine Expression im Übergangsbereich zu den thalamischen Regionen (TA), durch welche die thalamischen Fasern laufen, und im medialen interkalierenden Nucleus (I), welcher in Verbindung mit der Angst-Auslöschung steht (Jungling et al., 2008), detektiert. Die übrigen basolateralen Bereiche (BLA) der Amygdala zeigten eine wesentlich schwächere Färbung. Auch in den thalamischen

Regionen, welche bei der Angstkonditionierung beteiligt sind, wurde lediglich eine schwache Expression gefunden.

Die gleiche Färbemethode ergab mit einem Gehirnschnitt einer cGKI-KO Maus keine Färbung des Gewebes (Abb. 3.1B). Daraus ist zu schließen, dass es sich bei der Bindung des cGKI-Antikörpers um eine spezifische Bindung handelte und die Färbung mit diesem Antikörper spezifisch das Vorhandensein der cGKI anzeigte.

Abb. 3.1E zeigt eine Vergrößerung der Färbung im Bereich der LA, welche Aufschluss über die zelluläre Verteilung der cGKI in den Neuronen der LA geben soll. In dieser Abbildung ist eine Färbung im Bereich des Neuropils zu erkennen, in welchem präsynaptische Endigungen sowie axonale und dendritische Fortsätze der postsynaptischen Neuronen enthalten sind. Zusätzlich war jedoch auch eine zytosolische Expression der cGKI in den postsynaptischen Zellen detektierbar, was sich als intensive ringförmige Färbung um die Zellkerne äußerte. Um die Zellkerne eindeutig zu identifizieren, wurde eine Doppelfärbung mit dem Kernmarker Hoechst 33342 durchgeführt (Abb. 3.1F). Somit weisen diese Daten darauf hin, dass die cGKI sowohl in präsynaptischen Strukturen als auch in den Somata der Postsynapsen der LA exprimiert wird.



*Abb. 3.1: Immunhistochemischer Nachweis der cGKI in der lateralen Amygdala*

*A: Färbung eines Gehirnschnittes einer cGKI-ctr Maus zeigte eine Expression der cGKI hauptsächlich in einer bestimmten Schicht des Neocortex, des Hippocampus und der Amygdala.*

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

*C: Eine Vergrößerung verdeutlicht die Verteilung der cGKI in den verschiedenen Bereichen der Amygdala: deutliche Expression in dem dorsolateralen (LAd) und dem ventrolateralen (LAv) Kernbereich der Amygdala, sowie in dem Übergangsbereich zum Thalamus (TA) und in dem interkalierendem Nucleus (I), schwache Färbung im basolateralen Bereich (BLA).*

*D: Der Vergleich von Abb. C mit einem Ausschnitt aus dem Maus-Gehirnatlas von Paxinos and Franklin ermöglicht eine Zuordnung zu den verschiedenen Amygdala-Kernbereichen.*

*E: Vergrößerung der LA im Randbereich mit Übergang zur ungefärbten Capsula Externa (rechts)*

*F: Doppelfärbung mit Hoechst zeigte, dass hauptsächlich der zytoplasmatische Bereich gefärbt war, daneben aber auch die neuropilen Strukturen. Die Zellkerne (Pfeile) schienen eher ungefärbt zu sein.*

### 3.1.2 Nachweis mittels Western Blots

Da zwei verschiedene Isoformen der cGKI (cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$ ) existieren, sollte mit Hilfe eines Western Blots geklärt werden, welche Isoformen in der Amygdala exprimiert werden. Dafür wurde Proben aus dem Gewebe der Amygdala eingesetzt (Amy), welche aus Hirnschnitten isoliert wurden. Die Detektion erfolgte mit Isoform-spezifischen Antikörpern, welche exklusiv den N-Terminus der cGKI $\alpha$ - bzw. der cGKI $\beta$ -Isoform erkennen. Die Ergebnisse (Abb. 3.2) zeigten, dass im Gewebe der Amygdala einer Kontroll-Maus (WT) nur die cGKI $\beta$ -Isoform exprimiert wird, während die cGKI $\alpha$ -Isoform nicht detektierbar war. Die Funktionalität des anti-cGKI $\alpha$ -Antikörpers wurde mit einer Probe aus Gewebe des Kleinhirns (Cerebellum, Cer) belegt, in welchem die cGKI $\alpha$ -Isoform hoch exprimiert wird (Geiselhoringer et al., 2004), was sich als robuste Bande mit dem anti-cGKI $\alpha$ -Antikörper äußerte. Als Negativ-Kontrolle für den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Antikörper dienten die Proben der cGKI-KO Maus (I-KO).

Mit denselben Proben wurde auch die Expression der cGK Typ II (cGKII) analysiert, da es zu einer kompensatorischen Hochregulation der cGKII in der cGKI-KO Mauslinie kommen könnte. Daher wurden die Proben der WT und der I-KO Tiere zusätzlich mit einem anti-cGKII-Antikörper getestet (Abb. 3.2). Die entsprechenden Western Blots zeigten keine Expressionsunterschiede der cGKII zwischen beiden Genotypen. Daher lässt sich eine Hochregulation der cGKII im cGKI-KO ausschließen. Um die Spezifität des anti-cGKII-Antikörpers zu zeigen, wurden Proben von cGKII-defizienten Tieren (II-KO) verwendet, bei welchen keine Bande detektierbar war.

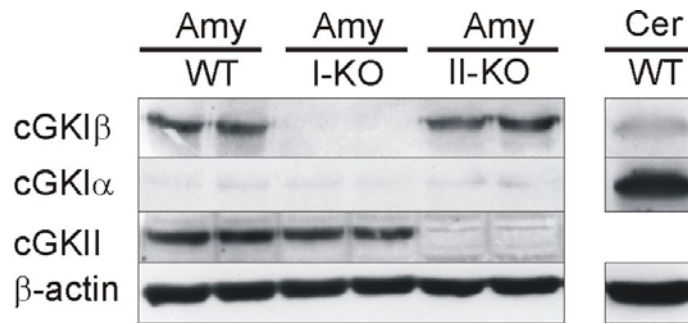


Abb. 3.2: Western Blots mit Isoform-spezifischen Antikörpern

Für diese Western Blots wurden ausschließlich Proben aus Amygdala-Gewebe (Amy) und Cerebellum (Cer) verwendet. Anhand der Isoform-spezifischen Antikörper wurde gezeigt, dass in der Amygdala nur die  $\beta$ -Isoform, nicht die  $\alpha$ -Isoform der cGKI exprimiert wird. Die Detektion der cGKII in WT und I-KO Tieren belegte, dass es im I-KO nicht zu einer Hochregulation der cGKII kommt.  $\beta$ -actin diente als Ladungskontrolle.

### 3.1.3 Expressionsmuster der cGKI in der Rescue Mauslinie

Da in den Verhaltensexperimenten aus den genannten Gründen nicht die cGKI-KO Mauslinie verwendet wurde, sondern die cGKI-rescue Mauslinie, wurde auch die Expression der cGKI im Gehirngewebe der letztgenannten Linie auf Proteinebene untersucht. Diese Untersuchung sollte belegen, dass im neuronalen Gewebe der cGKI-rescue Tiere kein cGKI-Protein exprimiert wird. Dazu wurde zunächst ein Western Blot aus Gesamtgehirn-Lysat aller drei Genotypen angefertigt (Abb. 3.3A). Die cGKI wurde mit dem cGKIcom-Antikörper detektiert, welcher eine robuste Bande im Falle der Kontroll-Probe ergab. Während die entsprechende Bande im cGKI-KO völlig fehlte, war jedoch noch eine schwache Bande bei der cGKI-rescue Probe ( $I\alpha$  rescue) zu detektieren. Es ist zu vermuten, dass diese Bande durch die Re-Expression der cGKI in den vaskulären Glattmuskelzellen im Gehirn verursacht wird.

Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden zusätzlich immunhistochemische Färbungen mit dem cGKIcom-Antikörper von cGKI-ctr und cGKI-rescue Tieren angefertigt. Diese Färbungen zeigten, dass bei einer cGKI-rescue Maus nur Glattmuskelzellen der zerebralen Gefäße cGKI exprimieren (Abb. 3.3C), während die Neuronen cGKI-defizient sind. Im Gegensatz dazu sind in der Kontrolle sowohl neuronales Gewebe als auch Blutgefäße gefärbt (Abb. 3.3B). Diese Befunde erlauben es, die cGKI-rescue Maus als eine cGKI-defiziente Maus bezüglich des neuronalen Hirngewebes zu betrachten.



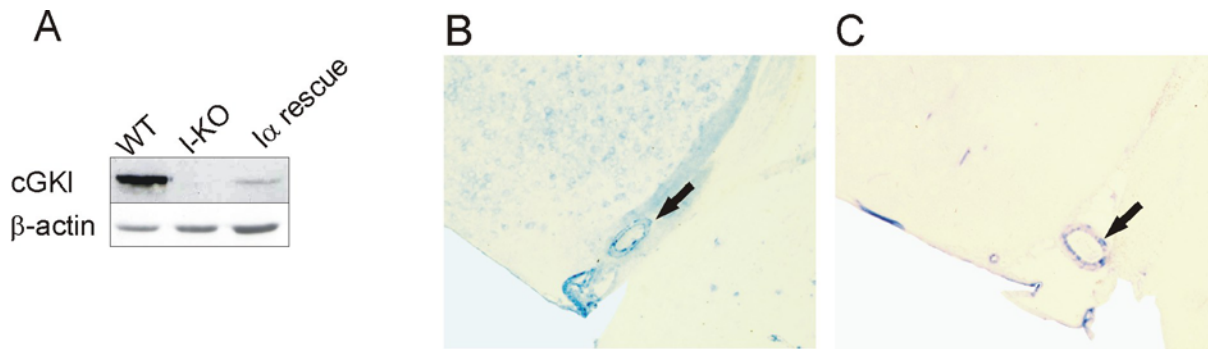


Abb. 3.3: Western Blot und Immunhistochemische Untersuchung der cGKI-rescue Maus

A: Western Blot aus Gesamthirn-Lysat einer cGKI-ctr (WT), cGKI-KO (I-KO) und einer cGKI $\alpha$ -rescue (I $\alpha$  rescue) Maus, zeigt eine robuste Expression der cGKI in der Kontrolle, fehlende Expression im I-KO und eine schwache Detektion bei der cGKI-rescue Maus, was durch die Re-Expression in vaskulären Zellen verursacht wird.  $\beta$ -actin diente als Ladungskontrolle

B: Immunhistochemische Färbung eines Gehirnschnittes einer cGKI-ctr Maus demonstriert eine Expression der cGKI sowohl in Neuronen als auch in Blutgefäßen (schwarzer Pfeil).

C: Eine Färbung eines cGKI-rescue Gehirnschnittes zeigte, dass cGKI-Protein bei einer cGKI-rescue Maus nur in den Glattmuskelzellen der zerebralen Gefäße (schwarzer Pfeil), aber nicht in neuronalem Gewebe vorliegt.

## 3.2 Synaptische Transmission und Langzeitpotenzierung in der lateralen Amygdala

Nach den Befunden in 3.1 bezüglich der hohen Expression der cGKI in den Kernen der lateralen Amygdala, stellte sich die Frage nach der funktionellen Bedeutung der cGKI für die synaptische Plastizität in diesem Hirnbereich. Um dieser Frage nachzugehen, wurde die basale synaptische Übertragung als auch deren Langzeitpotenzierung in der lateralen Amygdala untersucht. Um Aufschluss über eine mögliche Bedeutung der cGKI zu erhalten, wurde ein umfassender Vergleich der Mausmodelle der cGKI-KO und der cGKI-rescue Maus bezüglich der synaptischen Plastizität durchgeführt.

### 3.2.1 Basale synaptische Transmission

Zunächst wurde die Rolle der cGKI für die basale synaptische Transmission untersucht. Hierfür wurde geprüft, ob es zu einer veränderten synaptischen Übertragung in Hirnschnitten von cGKI-KO Tieren kommt. Ein wichtiger Parameter der synaptischen

Übertragung ist die sogenannte *input-output-relation* (IOR). Diese beschreibt die Relation zwischen der präsynaptischen Reizintensität (*input*, in  $\mu\text{A}$ ) und der daraus resultierenden postsynaptischen Antwort, die man ableiten kann (*output*, in mV). Dabei wurden Reizintensitäten im Bereich von 0-120 $\mu\text{A}$  getestet. Diese IOR-Messungen wurden sowohl über Reizung des kortikalen (Abb. 3.4B) als auch des thalamischen Inputs (Abb. 3.4B) durchgeführt. Die Ergebnisse, die in Abb. 3.4 zusammengefasst sind, belegen, dass kein Unterschied in der synaptischen Übertragungsleistung zwischen einer cGKI-ctr und einer cGKI-KO Maus besteht. Messungen in Hirnschnitten von cGKI-rescue Tieren zeigen ebenfalls, dass die cGKI-rescue Tiere keinen offensichtlichen Defekt in der basalen Transmission aufweisen. Von allen drei Genotypen sind in Abb. 3.4B und C repräsentative Beispiele von abgeleiteten Feldpotenzialen gezeigt, die mit einer Reizintensität von 40, 60, 80, 100 und 120 $\mu\text{A}$  hervorgerufen wurden.

Ein weiterer Parameter, der zur Analyse der synaptischen Übertragung herangezogen wurde, ist die *paired-pulse-facilitation* (PPF), welche auf eine präsynaptische Funktion zurückzuführen ist (Zucker, 1989). Die PPF beschreibt das Phänomen, welches auftritt, wenn man zwei Pulse mit einem relativ kurzen Interstimulus-Intervall (z. B. 50 ms) paart. Dabei ist zu beobachten, dass die zweite Reizantwort im Vergleich zur ersten vergrößert ist. Daher berechnet sich die PPF als Verhältnis der zweiten Reizantwort zur ersten Reizantwort ( $\text{EPSC}_2/\text{EPSC}_1$ ). Die PPF stellt eine kurzfristige Form der synaptischen Plastizität der Präsynapse dar. Man nimmt an, dass sie wahrscheinlich auf einer erhöhten Freisetzungswahrscheinlichkeit von Transmittervesikel an der präsynaptischen Membran nach dem ersten konditionierenden Puls beruht. Eine erhöhte intrazelluläre  $[\text{Ca}^{2+}]$ -Konzentration in der Präsynapse wird als Ursache für die PPF beschrieben (Zucker, 1989). Die Messungen der PPF wurden mit Hilfe der patch-clamp-Technik in der Ganzzellkonfiguration durchgeführt und Interstimulus-Intervalle von 25 und 50 ms verwendet. Auch für diese Messungen wurden alle drei oben genannten Genotypen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.4D und E zusammengefasst. Die Auswertung zeigt, dass es zu keinem signifikanten Unterschied in der PPF zwischen den verschiedenen Genotypen kam.

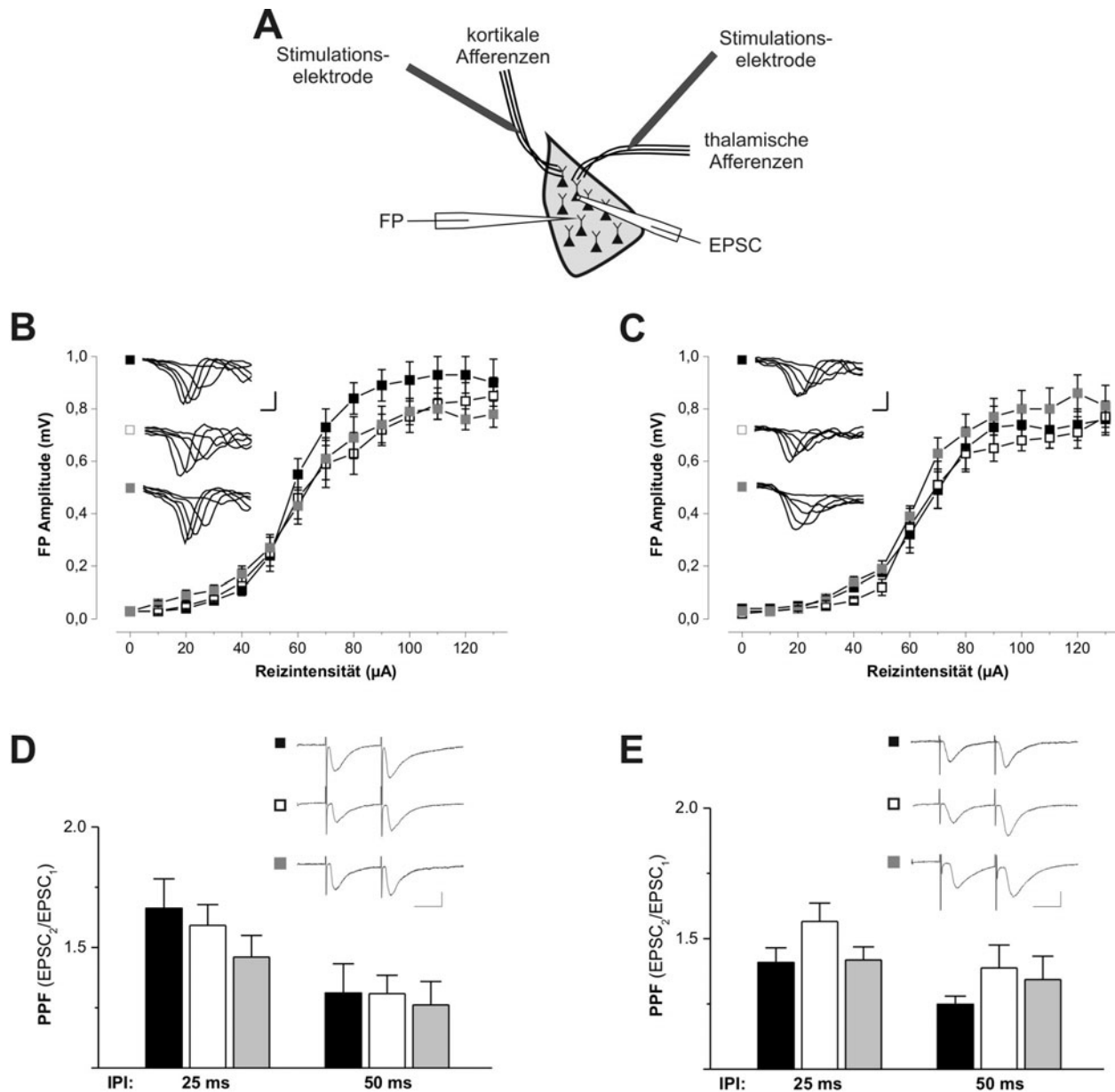


Abb. 3.4: Basale synaptische Transmission in der lateralen Amygdala

A: Anordnung der Reizelektroden und der Ableitelektroden für Feldpotential-Messungen und der Patch-Pipette für EPSC-Messungen. Die Neuronen der lateralen Amygdala (grau unterlegt) sind schematisch dargestellt.

B und C: IOR-Messungen über Reizung der kortikalen (B) und der thalamischen (C) Afferenzen zeigten keinen Unterschied zwischen cGKI-ctr (schwarz, kortikal n=21; thalamisch n=11), cGKI-KO (weiß, kortikal n=12; thalamisch n=9) und cGKI-rescue (grau; kortikal n=11; thalamisch n=13) bezüglich der synaptischen Übertragungsleistung.

D und E: Ergebnisse der PPF-Messungen mit einem Interstimulus-Intervall von 25 und 50 ms ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei untersuchten Genotypen cGKI-ctr (schwarz; kortikal n=8, thalamisch n=7), cGKI-KO (weiß; kortikal n=10, thalamisch n=11) und cGKI-rescue (grau; kortikal n=11, thalamisch n=11).

### 3.2.2 Messung der Langzeitpotenzierung in der lateralen Amygdala

Um die funktionelle Bedeutung der cGKI für die synaptische Plastizität in der lateralen Amygdala zu analysieren, wurden Messungen der Langzeitpotenzierung (*long-term potentiation*, LTP) in Gehirnschnitten von cGKI-ctr, cGKI-KO und cGKI-rescue Tieren durchgeführt. Die Induktion der LTP wurde über den kortikalen als auch über den thalamischen Input mit Hilfe eines 100 Hz-Tetanus durchgeführt, wie in Abb. 2.4 beschrieben, wobei die Elektroden wie in Abb. 2.3 angeordnet wurden. Alle Messungen wurden in Gegenwart von Picrotoxin (50 $\mu$ M) durchgeführt. Abb. 3.5 zeigt die dabei erhaltenen Messergebnisse mit den verschiedenen Mausmodellen.

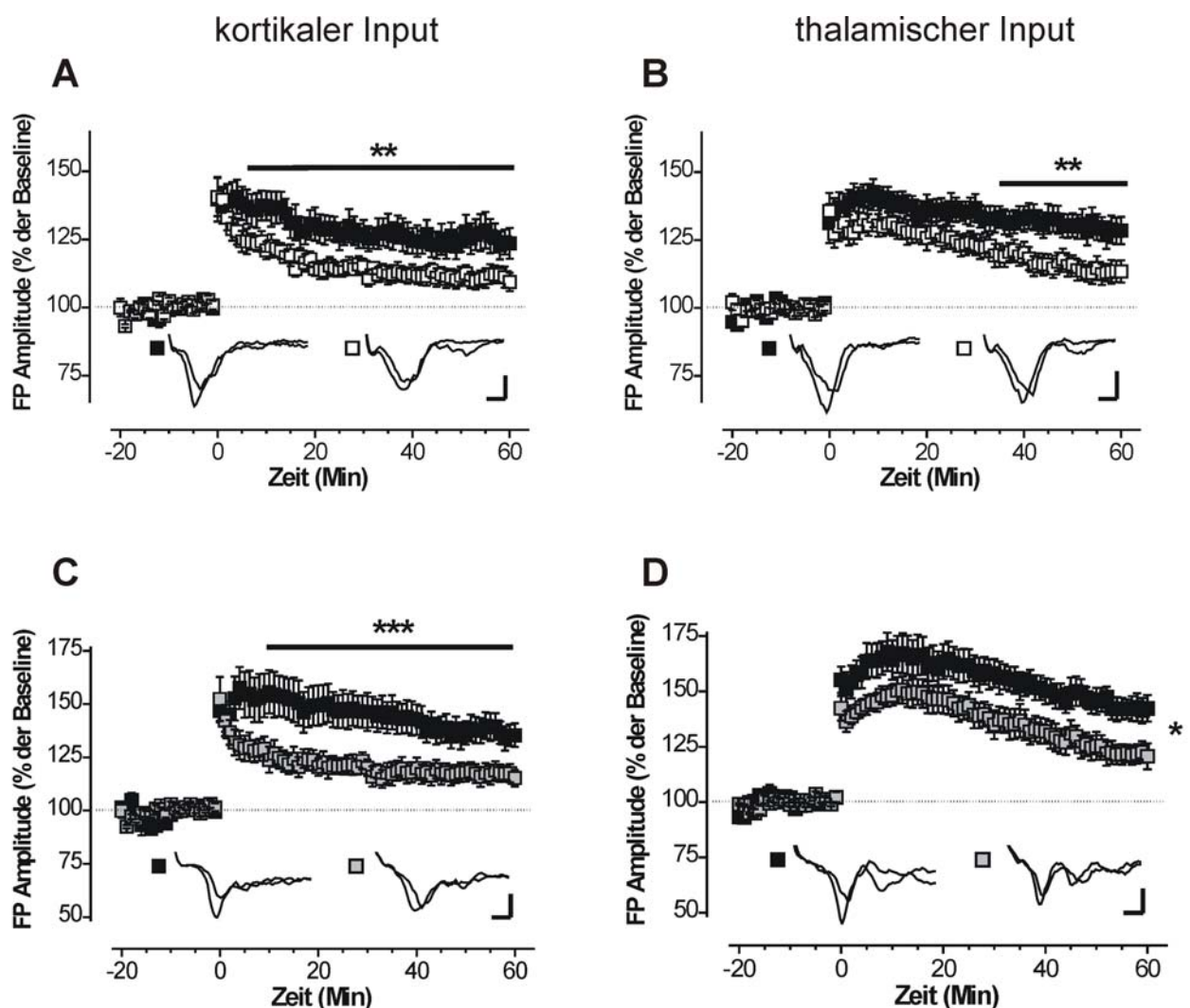


Abb. 3.5: Langzeitpotenzierung in der lateralen Amygdala

A: Induktion der LTP über den kortikalen Input ergab in Gehirnschnitten von cGKI-KO Tieren (weiß;  $n = 14$  Schnitte;  $n = 7$  Tiere) eine geringere Potenzierung als in Schnitten von cGKI-ctr Tieren (schwarz;  $n = 11$  Schnitte;  $n = 6$  Tiere).

*B: Auch die Induktion über den thalamischen Input resultierte in einer geringeren Potenzierung bei cGKI-KO Tieren (weiß; n = 10 Schnitte; n = 5 Tiere) als bei den cGKI-ctr (schwarz; n = 13 Schnitte; n = 7 Tiere).*

*C: Vergleich der cGKI -rescue Tiere (grau; n = 11 Schnitte; n = 5 Tiere) mit den Kontrollen (schwarz; n = 11 Schnitte; n = 5 Tiere) ergab ebenfalls eine signifikant verringerte LTP über den kortikalen Input.*

*D: Auch im thalamischen Input war die LTP der cGKI-rescue Tiere (grau; n = 8 Schnitte; n = 4 Tiere) im Vergleich zu den dazugehörigen Kontrollen (schwarz; n = 9 Schnitte; n = 4 Tiere) vermindert.*

Die Ergebnisse zeigen, dass die Potenzierung nach einem Tetanus in den Schnitten von cGKI-KO Tieren geringer war als in den Kontroll-Tieren. Im kortikalen Input lag die Potenzierung der cGKI-KO mit  $111,1 \pm 3,3$  % signifikant unterhalb der Werte der cGKI-ctr mit  $125,8 \pm 5,8$  % (Abb. 3.5A). Das gleiche Ergebnis wurde interessanterweise auch im thalamischen Input erzielt (Abb. 3.5B:  $113,4 \pm 3,8$  % versus  $129,2 \pm 4,98$  %). Die statistische Auswertung der Messwerte ergab mit Hilfe einer Two-Way ANOVA für wiederholte Messungen eine signifikante Interaktion von Genotyp x Zeit für beide Inputs (kortikal:  $F_{12,276} = 1,83$ ;  $p = 0,0042$ ; thalamisch:  $F_{12,252} = 1,83$ ;  $p = 0,044$ ). Eine Signifikanz wurde nach 10 Min im kortikalen bzw. nach 35 Min im thalamischen Input erreicht ( $p < 0,01$ , Newman-Keuls *post hoc* Test).

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die reduzierte LTP der cGKI-KO Tiere auf einer verminderten zerebralen Durchblutung beruht, wurden die gleichen LTP-Messungen zusätzlich mit der cGKI-rescue Mauslinie durchgeführt. Dabei konnten die LTP-Daten der cGKI-rescue Mauslinie die Ergebnisse mit den Nullmutanten bestätigen: die Potenzierung nach einem hochfrequenten Tetanus war bei cGKI-rescue Tieren in beiden Inputs geringer als bei den Kontrollen (Abb. 3.5C und D: kortikaler Input:  $117,6 \pm 4,3$  % versus  $137,0 \pm 6,0$  %; thalamischer Input:  $121,8 \pm 4,6$  % versus  $142,1 \pm 5,7$  %). Mit Hilfe einer Two-Way ANOVA-Statistik für wiederholte Messungen konnte eine Signifikanz sowohl für den kortikalen (Genotyp:  $F_{1,20} = 6,92$ ;  $p = 0,016$ ; Genotyp x Zeit:  $F_{12,240} = 3,32$ ;  $p < 0,0005$ ) als auch für den thalamischen Input (Genotyp:  $F_{1,15} = 5,11$ ;  $p = 0,039$ ) ermittelt werden.

Zusammenfassend kann anhand dieser Ergebnisse geschlossen werden, dass die cGKI eine tragende Rolle für die synaptische Plastizität in der lateralen Amygdala besitzt. Dabei scheint diese Funktion tendenziell eine Rolle für die spätere Phase der LTP zu spielen, da der Unterschied zwischen den Genotypen mit zunehmender Zeitdauer nach Tetanus eminenter wurde.

### 3.3 Verhaltenstests: Grundcharakterisierung

Der Befund der verminderten LTP durch Ausschalten des cGKI-Gens warf die Frage auf, inwiefern sich der beobachtete Defekt bezüglich der synaptischen Plastizität auf die Amygdala-abhängige Gedächtnisfunktion auswirkt. Um diese Frage zu beantworten, wurden Konditionierungsversuche mit der cGKI-rescue Mauslinie durchgeführt. Aus diesem Grund war es notwendig, zunächst das grundlegende Verhalten naiver Tiere dieser Mauslinie zu analysieren. In diesem Zuge konnte ausgeschlossen werden, dass sich ein bereits vorhandener Verhaltensphänotyp auf das Lernverhalten auswirkt und die Ergebnisse der Angstkonditionierung beeinflusst. Daher wurden im Rahmen der nachfolgenden Experimente das basale, lokomotorische, explorative und Angst-assoziierte Verhalten naiver cGKI ctr und rescue Tiere untersucht.

#### 3.3.1 Open Field

Das Verhalten im Open Field wurde mit cGKI-ctr (n = 15) und cGKI-rescue Tieren (n = 11) untersucht. Die Versuchsdauer betrug dabei 10 Min. Anhand der computergestützten Aufzeichnung wurden die in Abb. 3.6 dargestellten Parameter ausgewertet. Die Abbildungen zeigen jeweils den Mittelwert über die gesamten 10 Min Versuchsdauer und die dazugehörigen Werte in 2-Min-Intervallen. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass sich das Verhalten der beiden Genotypen in keinem der untersuchten Parameter signifikant unterschieden hat.

Zunächst wurde die lokomotorische Aktivität der Tiere untersucht. Diese wurde als prozentuale Zeit angegeben, in welcher sie sich aktiv bewegten. Dabei wurden keine offensichtlichen Differenzen in der lokomotorischen Aktivität zwischen den Genotypen cGKI-ctr ( $23,07 \pm 1,64$  %) und cGKI-rescue ( $26,41 \pm 1,53$  %) festgestellt (Abb. 3.6A). Auch während des Versuchsablaufs wurde in keinem der erfassten 2-Minuten-Intervalle ein Unterschied sichtbar. Im Einklang dazu war die Wegstrecke, welche im Open Field zurückgelegt wurde, für Kontroll- und Rescue Tiere vergleichbar (Abb. 3.6B: cGKI-ctr:  $34,25 \pm 4,44$  m; cGKI-rescue:  $38,68 \pm 5,2$  m). Diese Ergebnisse belegen, dass die cGKI-ctr und cGKI-rescue eine vergleichbare Aktivität zeigten und keinen offensichtlichen lokomotorischen Phänotyp aufwiesen.

Mit Hilfe des Open Field Tests konnte auch das Angst-assoziierte Verhalten der Tiere untersucht werden. Hierfür wurde die Thigmotaxis anhand der Aufenthaltszeiten in der inneren Zone bzw. in der Randzone ermittelt. Dabei zeigte die Auswertung, dass sich die

---

cGKI-rescue mit  $77,46 \pm 5,89$  % annähernd gleich lang wie die Kontroll-Tiere mit  $78,23 \pm 4,45$  % in der Randzone aufhielten (Abb. 3.6C). Ein weiterer Indikator für exploratives Verhalten ist das Aufrichten auf die Hinterbeine (Rearing), welches ebenfalls im Rahmen des Open Field Tests analysiert wurde. Dabei war zu sehen, dass sowohl die Kontroll- als auch die cGKI-rescue Tiere etwa gleich viel Zeit in aufgerichteter Position verbrachten (Abb. 3.6D: cGKI-ctr:  $4,88 \pm 0,9$  %; cGKI-rescue  $4,58 \pm 1,6$  %). Auch hier spiegelten die Ergebnisse wider, dass die untersuchten Genotypen der Rescue-Mauslinie keine auffälligen Differenzen in ihrem explorativen oder Angst-assoziierten Verhalten aufzeigten.

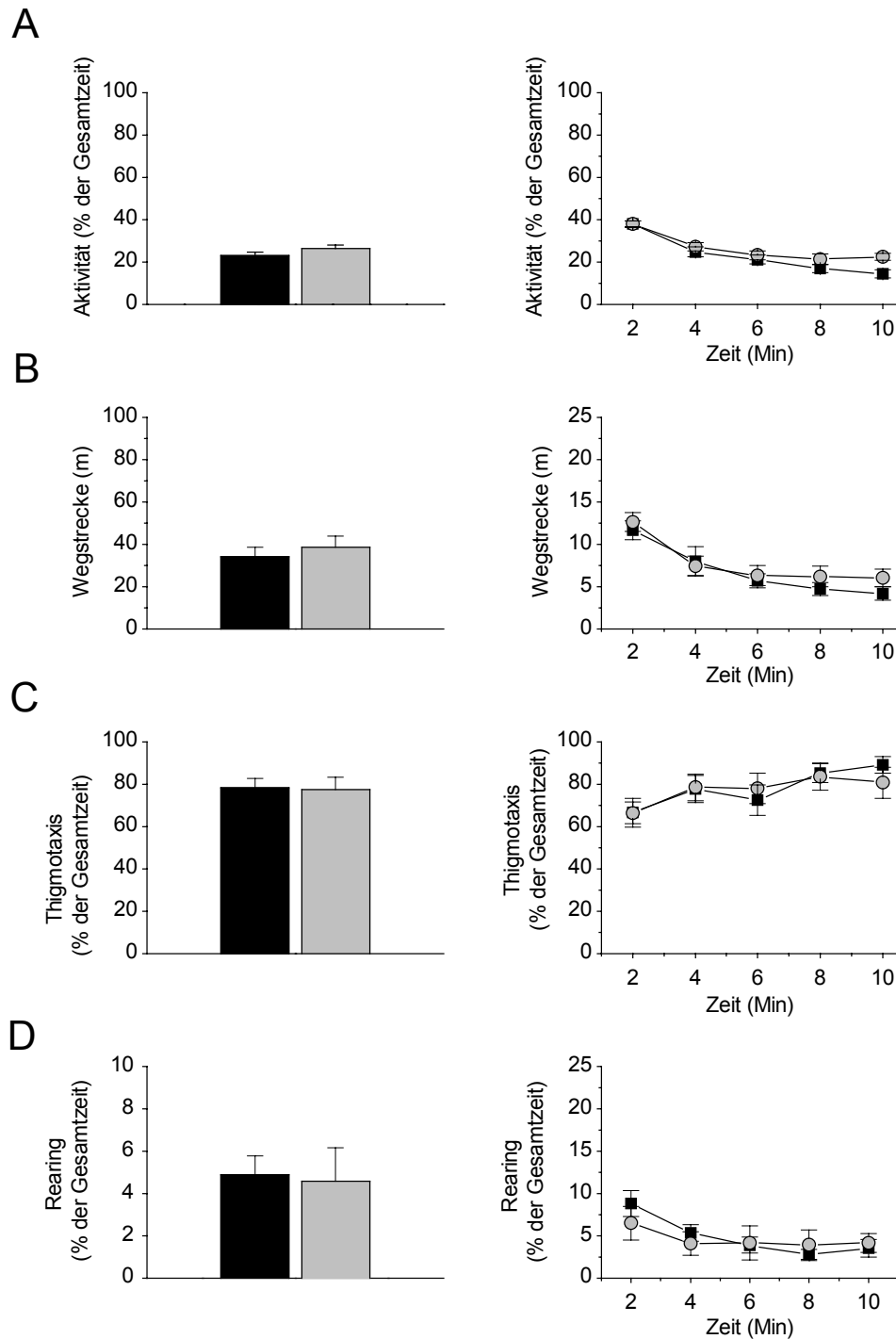


Abb. 3.6: Ergebnisse des Open Field Tests

Die untersuchten Parameter der cGKI-ctr (schwarz) und der cGKI-rescue (grau) sind links als Mittelwert der gesamten Versuchsdauer (10 Min) angegeben und rechts als Zeitverlauf in 2-Minuten-Intervallen.

A: cGKI-ctr und cGKI-rescue zeigten die gleiche Aktivität während des Tests..

B: Die zurückgelegte Strecke war im Mittel bei cGKI-ctr und cGKI-rescue Tiere gleich.

C: Es war kein Unterschied zwischen den Genotypen cGKI-ctr und cGKI-rescue bezüglich der Aufenthaltszeit in der Randzone (Thigmotaxis) zu beobachten.

D: cGKI-ctr und cGKI-rescue verbrachten gleich viel Zeit in aufgerichteter Position (Rearing).



### 3.3.2 Elevated Plus Maze

Um weitere Indizien über eventuelle Verhaltensunterschiede zu erhalten, wurde das Verhalten der cGKI-ctr und cGKI-rescue Tiere im Elevated Plus Maze getestet. Dieser Test gibt in erster Linie Hinweise über das Angst-assoziierte Verhalten. Die wichtigsten Parameter, die dabei ausgewertet wurden, waren die Anzahl der Übertritte in den offenen Arm und die Aufenthaltsdauer im offenen Arm. Zusätzlich wurde auch die Gesamtzahl der Übertritte in die unterschiedlichen Zonen betrachtet. Diese Analyse ergab insgesamt 12 Übertritte für beide Genotypen (Abb. 3.7A: cGKI-ctr:  $12 \pm 2,0$ ; cGKI-rescue:  $12 \pm 2,4$ ). Dieser Befund belegt, dass beide Genotypen der Mauslinie bezüglich ihrer Aktivität im EPM nicht unterschiedlich waren ( $p = 1$ ), was auch im Einklang mit den Befunden des Open Field Tests steht. Jedoch zeigten die cGKI-rescue Tiere eine Tendenz, den offenen Arm seltener zu betreten als die cGKI-ctr (Abb. 3.7B: cGKI-rescue:  $26,5 \pm 10,5\%$ ; cGKI-ctr:  $40,3 \pm 11,7\%$ ) Die Werte unterschieden sich allerdings nicht signifikant ( $p = 0,39$ ). Analog verhält es sich mit der Aufenthaltsdauer in den offenen Armen: während die Kontroll-Tiere  $41,6 \pm 13,9\%$  der Gesamtzeit in den offenen Armen verbrachten, hielten sich die cGKI-rescue Tiere dort nur  $30,2 \pm 13,4\%$  der Zeit auf (Abb. 3.7C;  $p = 0,49$ ). Da es jedoch in keinen Parametern zu signifikanten Unterschieden kam, wurde auf ein unverändertes Angstverhalten des rescue-Genotyps geschlossen.

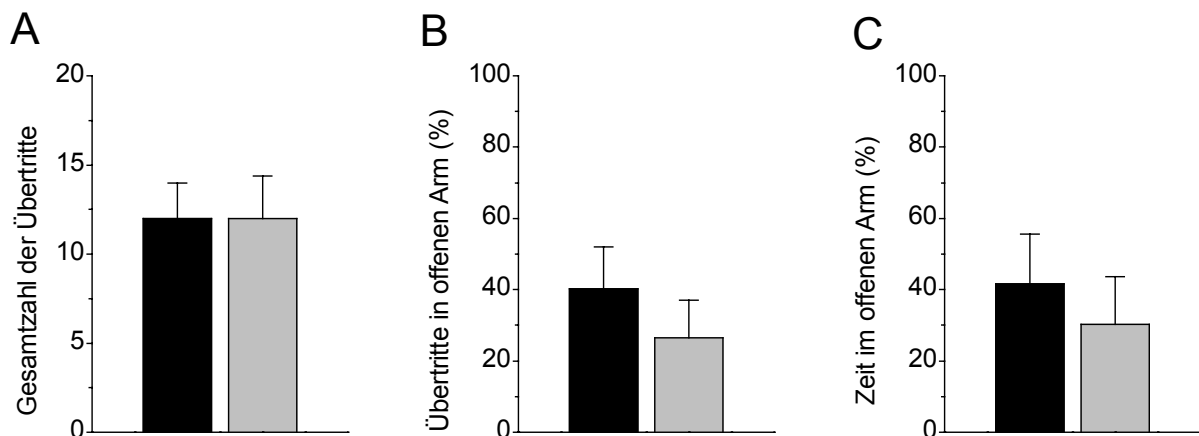


Abb. 3.7: Ergebnisse des Tests im Elevated Plus Maze

Das Verhalten von cGKI-ctr (schwarz,  $n = 7$ ) und cGKI-rescue (grau,  $n = 8$ ) wurde 5 Min analysiert.

A: Die Gesamtanzahl der Übertritte in alle Arme lag bei beiden Genotypen bei 12 Übertritten.

B: Das Verhältnis der Übertritte in den geschlossenen Arm zur Gesamtzahl der Übertritte lag bei den cGKI-rescue niedriger als bei den cGKI-ctr.

C: Die Zeit, welche die cGKI-rescue Mäuse auf dem offenen Arm verbrachten, ist dementsprechend auch niedriger als bei den cGKI-ctr.

### 3.3.3 Light- Dark Box

Das Prinzip des Tests in der Light-Dark Box ist dem des Elevated Plus Maze sehr ähnlich. Die Entscheidung des Tieres, sich entweder im dunklen oder im hell erleuchteten Kompartiment aufzuhalten, gibt Aufschluss über das generelle Angstverhalten des Tieres. Daher werden auch die gleichen Parameter wie beim Test im Elevated Plus Maze ausgewertet. Analog zu den Ergebnissen im Elevated Plus Maze war auch bei der Light-Dark Box die Gesamtzahl der Wechsel zu den verschiedenen Kompartimenten nicht unterschiedlich zwischen den Genotypen (Abb. 3.8A: cGKI-ctr:  $10 \pm 1,8$ ; cGKI-rescue:  $10,9 \pm 2,2$ ;  $p = 0,76$ ). Dies zeigte, dass die Tiere nicht lokomotorisch gehemmt waren und sich durchaus in der Box bewegt haben. Jedoch zeigten die cGKI-rescue Tiere bei diesem Test im Gegensatz zu den Ergebnissen im Elevated Plus Maze, eine stärkere Tendenz, das helle Kompartiment zu betreten als die Kontrollen (Abb. 3.8B:  $13 \pm 5,8\%$  versus  $3,9 \pm 2,9\%$  der Gesamtzahl der Übertritte;  $p = 0,2$ ). Entsprechend verhielt es sich auch mit der Aufenthaltsdauer im hellen Kompartiment: auch hier verbrachten die cGKI-rescue Tiere mit  $11,4 \pm 7,9\%$  mehr Zeit als ihre Geschwister-Kontrollen mit  $4,2 \pm 3,9\%$  der Gesamtzeit (Abb. 3.8C;  $p = 0,44$ ). Erneut ergab jedoch die Statistik bei keinem Parameter einen signifikanten Unterschied.

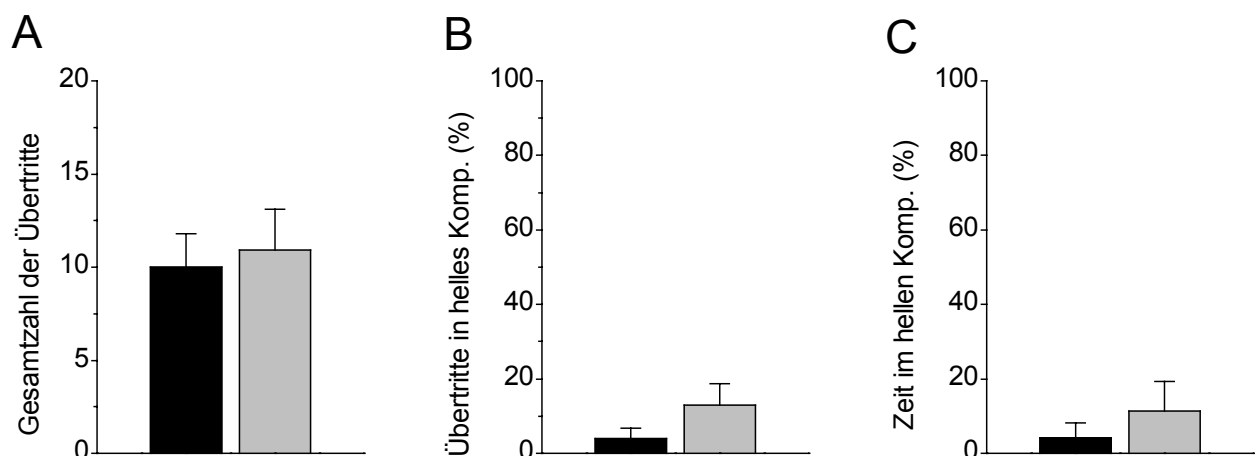


Abb. 3.8: Ergebnisse in der Light-Dark Box

CGKI-ctr (schwarz,  $n = 7$ ) und cGKI-rescue (grau,  $n = 8$ ) wurden 5 Min in der Box beobachtet.

A: Die Anzahl der Wechsel zwischen den Kompartimenten war bei beiden Genotypen annähernd gleich.

B: Die cGKI-rescue Tiere betraten das helle Kompartiment häufiger als die cGKI-ctr Tiere.

C: Entsprechend war die Aufenthaltsdauer im hellen Kompartiment der cGKI-rescue Mäuse länger als die der cGKI-ctr.

Fasst man die Ergebnisse bisher zusammen, lieferte keiner der durchgeführten Tests einen eindeutigen Hinweis auf eine grundlegende Veränderung der cGKI-rescue Tiere bezüglich der Lokomotion, des Angst-assoziierten oder explorativen Verhaltens im Vergleich zu ihren Geschwister-Kontrollen. Schlussfolgernd konnte davon ausgegangen werden, dass keine grundsätzlichen Verhaltensphänotypen vorlagen, welche die Interpretation des Angstverhaltens während der Angstkonditionierung erschweren würden. Daher wurde die cGKI-rescue Mauslinie als geeignet betrachtet, um mit ihr weitere Verhaltensversuche bezüglich Lernen und Gedächtnis durchzuführen.

### 3.3.4 Bestimmung der Schmerzschwelle

In der Literatur gibt es zahlreiche Hinweise, dass der NO/cGMP-Signalweg für bestimmte Formen der Schmerzwahrnehmung von Bedeutung ist. Eine Beteiligung der cGKI wird dabei allerdings kontrovers diskutiert. Zum einen gibt es Befunde, dass die im Rückenmark exprimierte cGKI über den NO/cGMP-Signalweg für eine inflammatorische Hyperalgesie verantwortlich ist (Schmidtko et al., 2003; Tegeder et al., 2004). Andere Arbeiten aber sprechen gegen eine Rolle der cGK als Effektor bei der inflammatorischen Schmerzverarbeitung (Tegeder et al., 2002). Eine neuere Studie legt nahe, dass die cGKI bei der inflammatorischen Schmerzwahrnehmung möglicherweise vielmehr über Natriuretische Peptide und durch die partikuläre (pGC) als durch NO und der löslichen Guanylylzyklase aktiviert wird (Schmidtko et al., 2008). All diesen Studien ist jedoch gemeinsam, dass sie ausschließen, dass die cGKI *per se* in die Wahrnehmung und Verarbeitung akuter Schmerzreize involviert ist. Dies ist allerdings ein kritischer Punkt für die hier eingesetzte Pawlowsche Angstkonditionierung, da die akute Schmerzwahrnehmung eine wichtige Voraussetzung für die Assoziation des Tones (CS) mit dem Fußschock (US) darstellt. Daher wurde zusätzlich die akute Schmerzschwelle der verwendeten Mauslinie ermittelt, indem naiven cGKI-rescue und Kontroll-Tieren Fußschocks mit ansteigender diskreter Intensität appliziert wurden, bis eine eindeutige Schmerzreaktion wie Vokalisieren oder Springen auftrat. Die Ergebnisse dieses Experiments zeigten, dass cGKI-rescue Mäuse eine unveränderte Schmerzschwelle bezüglich eines elektrischen Fußschocks besaßen (Abb. 3.9). Während die Fußschock-Intensität um jeweils 0,1 mA gesteigert wurde, konnte ein Vokalisieren bei den Kontroll-Tieren im Mittel bei  $0,39 \pm 0,03$  mA und bei cGKI-rescue Tieren bei  $0,37 \pm 0,02$  mA beobachtet werden. Ähnlich verhielt es sich auch mit dem Springen, das bei den Kontroll-Mäusen zum ersten Mal bei  $0,37 \pm 0,03$  mA und bei den Rescue-Mäusen bei  $0,36 \pm 0,02$  mA auftrat.

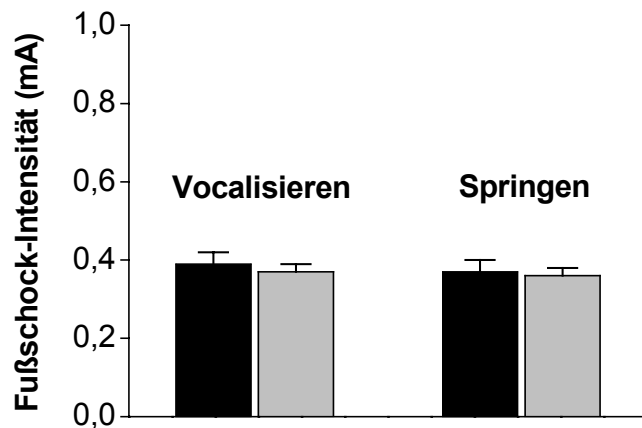


Abb. 3.9: Bestimmung der Schmerzschwelle

Es wurde die Reaktion einer Gruppe naiver cGKI-rescue Tiere ( $n = 7$ , grau) und dazugehöriger Kontrollen ( $n = 7$ , schwarz) auf steigende Stromintensität des Fußschocks untersucht. Dabei wurde kein Unterschied der Schmerzschwelle zwischen den Genotypen beobachtet, ab welcher eine merkliche Reaktion in Form von Springen oder Vokalisieren der Tiere ersichtlich war.

## 3.4 Angstkonditionierung

### 3.4.1 Klassische auditorische Angstkonditionierung

Nachdem nun anhand der bisher beschriebenen Verhaltenstests (Kap. 3.3.1 bis 3.3.4) keine grundlegenden Verhaltensstörungen der cGKI-rescue Tiere festgestellt werden konnte, wurde diese Mauslinie als geeignet betrachtet, um mit ihr weitere Tests bezüglich des Lernverhaltens durchzuführen.

Die Expressionsdaten ließen erkennen, dass die laterale Amygdala einen *Hot Spot* der cGKI-Expression darstellt. Im Einklang dazu lieferten auch die LTP-Messungen Hinweise auf eine Rolle der cGKI für synaptische Plastizität. Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob dieser Defekt in der synaptischen Plastizität bei cGKI-rescue Tieren mit Verlusten in der Lernleistung einhergeht. Mit der klassischen Konditionierung war es möglich, das Vermögen der Tiere zu untersuchen, ein assoziatives Gedächtnis zu formen und zu konsolidieren. Dabei sollte das Lernverhalten nach der Angstkonditionierung Aufschluss über eine mögliche Rolle der cGKI für die Amygdala-abhängige Gedächtnisfunktion geben.

Das Vorgehen bei der Angstkonditionierung ist in Kapitel 2.5.1 genauer beschrieben. Die Gedächtnisbildung wurde induziert, indem ein harmloser Stimulus (Ton) mit einem aversiven Reiz (Fußschock) gepaart wurde. Um die Stärke der gebildeten Assoziation zu prüfen, wurde das Angstverhalten (*Freezing* = Angststarre) bei erneuter Tonpräsentation analysiert. Da der Vorgang der Gedächtnisbildung auf verschiedenen zeitlich aufeinander-

folgenden Phasen beruht, wurde das Angstgedächtnis zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Konditionierung getestet. Aus diesem Grund wurden drei verschiedene Versuchsprotokolle angewendet, um die verschiedenen Phasen der Gedächtnisbildung abzudecken (siehe Abb. 2.7). So wurde das Angstgedächtnis nach 2 Stunden, 1 Tag und 7 Tagen nach Fußschock-Konditionierung untersucht. Da lediglich das Angstverhalten während der ersten Tonpräsentation nach Konditionierung von Interesse war, wurde für jedes Protokoll eine neue Gruppe naiver Tiere verwendet. Somit konnte der Einfluss von anderen Prozessen wie Rekonsolidierung oder Extinktion ausgeschlossen werden, welche die weitere Konsolidierung des Gedächtnisses modulieren können (Tronson and Taylor, 2007). Im Folgenden sollen nun die Ergebnisse der verschiedenen Protokolle erläutert werden:

#### Protokoll 1: 2 h post-Konditionierung

Mit dem ersten Protokoll wurde das auditorische Angstgedächtnis 2 Stunden nach Fußschock-Konditionierung getestet, um das Kurzzeitgedächtnis zu untersuchen. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.10 zusammenfassend dargestellt. Es wurde eine Kohorte von 12 cGKI-rescue und 15 Kontroll-Tieren untersucht. Anhand der Freezing-Zeiten sieht man, dass die Tiere vor der Konditionierung eine vernachlässigbar geringe Angstreaktion zeigten. Nach der Konditionierung wurde das Angstverhalten in einem neutralen Kontext zunächst 3 Minuten ohne Ton, dann 3 Minuten während der Tonpräsentation analysiert. Beide Gruppen zeigten ein leicht erhöhtes Freezing-Verhalten vor dem Ton im Vergleich zu den prä-Konditionierungswerten (cGKI-ctr:  $1,6 \pm 0,6$  % versus  $5,7 \pm 1,1$  %; cGKI-rescue:  $0,9 \pm 0,2$  % versus  $7,9 \pm 2,7$  %), was auf eine Sensitisierung durch den Fußschock zurückzuführen ist. Darüberhinaus stieg mit dem Einsetzen des konditionierten Tons die Freezing-Reaktion stark an. Dabei zeigten die cGKI-rescue Tiere mit  $37 \pm 5,9$  % Freezing eine etwas geringere Angstreaktion als ihre Kontrollen mit  $42,7 \pm 3,9$  %. Allerdings ergaben die Werte keinen signifikanten Unterschied mit dem *Student's t-Test* ( $p = 0,21$ ). Auch die Darstellung des Freezing-Verhaltens als zeitlicher Verlauf (Abb. 3.10 rechts) macht deutlich, dass sich die beiden Gruppen während des Tests gleich verhielten. Zusammenfassend lieferte das Experiment keine Hinweise dafür, dass die Funktion des Kurzzeitgedächtnisses bei den cGKI-rescue Tieren beeinträchtigt war.

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich außerdem schließen, dass der Prozess der Akquisition von cGKI-rescue Tieren nicht beeinträchtigt war. Eine Veränderung des Akquisitionsprozesses würde sich bereits unmittelbar nach der Konditionierung, d. h. schon 2 h danach, bemerkbar machen. Da jedoch kein Unterschied zwischen den Genotypen bezüglich des

Freezing-Verhaltens unmittelbar nach der Fußschock-Konditionierung (2 h) auftrat, ist davon auszugehen, dass die Akquisition bei allen Tieren in gleichem Maße stattgefunden hat.

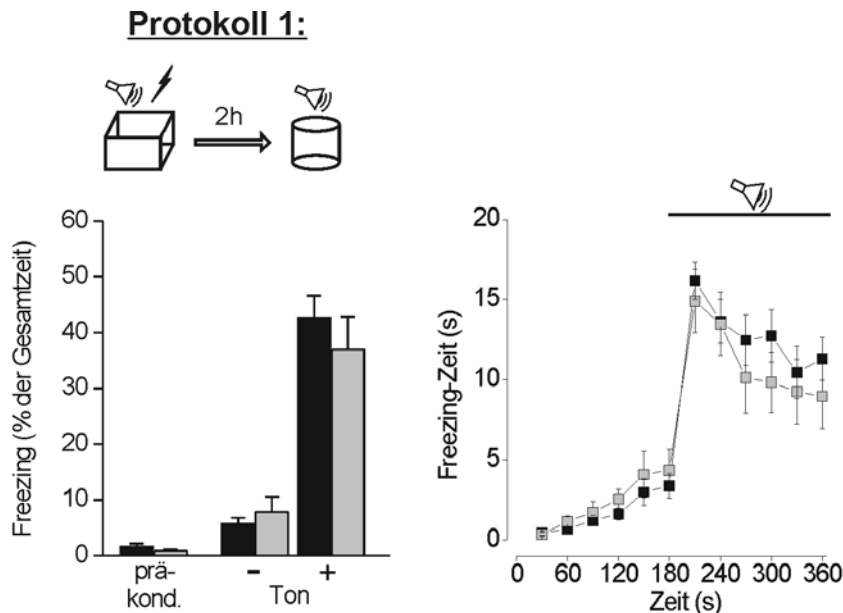


Abb. 3.10: Ergebnisse der Angstkonditionierung mit Protokoll 1

Der Test des auditorischen Angstgedächtnisses in Kontext B wurde 2 h nach der Konditionierung durchgeführt. Links sind die Mittelwerte der cGKI-rescue Tiere (grau;  $n = 12$ ) und ihrer Kontrollen (schwarz;  $n = 15$ ) und rechts der zeitliche Verlauf der Testphase vor (0-180) und während (180-360) der Tonpräsentation dargestellt. Zu keinem Zeitpunkt wurde ein unterschiedliches Freezing-Verhalten festgestellt, was auf ein intaktes Kurzzeitgedächtnis und eine vollständige Akquisition hinweist.

### Protokoll 2: 1 Tag post- Konditionierung

Hierfür wurde eine Gruppe von 8 cGKI-rescue und 11 cGKI ctr-Tiere verwendet. Im Gegensatz zu den Ergebnissen nach 2 h zeigten die cGKI rescue Tiere erstaunlicherweise nach 24 h eine signifikant geringere Freezing-Reaktion auf den konditionierten Stimulus im Vergleich zu ihren Geschwister-Kontrollen (Abb. 3.11:  $41,7 \pm 4,4$  % bei cGKI-rescue; Kontrollen:  $53,5 \pm 2,7$  %). Mit dem *Students t*-Test ergab sich eine Signifikanz von  $p = 0,014$ . Maßgeblich dabei ist, dass das Verhalten vor dem Einsetzen des Tons jedoch nicht unterschiedlich war (cGKI-ctr:  $11,6 \pm 1,9$  %; cGKI-rescue:  $9,7 \pm 2,4$  %;  $p = 0,27$ ). Auch die unmittelbare Reaktion auf den Ton (siehe Zeitverlauf in Abb. 3.11: Sekunde 180-210) beider Gruppen war zunächst gleich. Mit fortsetzender Präsentation des Tons nahm die

Freezing-Reaktion der cGKI-rescue Tiere jedoch ab, während die Freezing-Reaktion der Kontroll-Tiere aber auf dem Ausgangsniveau blieb.

Im Rahmen des Verhaltenstests zur Angstkonditionierung wurde auch das kontextuelle Gedächtnis untersucht. Für diese Art des Gedächtnisses ist in erster Linie der Hippocampus verantwortlich, welcher eine Assoziation mit dem Kontext herstellt (Morris et al., 1982). Diese Hippocampus-abhängige Lernleistung wurde getestet, indem die Tiere erneut für 3 Minuten dem Konditionierungskontext ausgesetzt und das Freezing-Verhalten in dieser Zeit analysiert wurde. Im Gegensatz zu dem auditorischen Angstgedächtnis konnte im kontextuellen Angstgedächtnis jedoch kein Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden (cGKI-ctr: 18,9 = 5,4 %; cGKI-rescue: 20,4 = 3,3 %). Daher deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die cGKI-rescue Tiere einen selektiven Defekt in der Bildung eines auditorischen Angstgedächtnisses aufweisen, während das kontextuelle Gedächtnis unbeeinflusst bleibt.

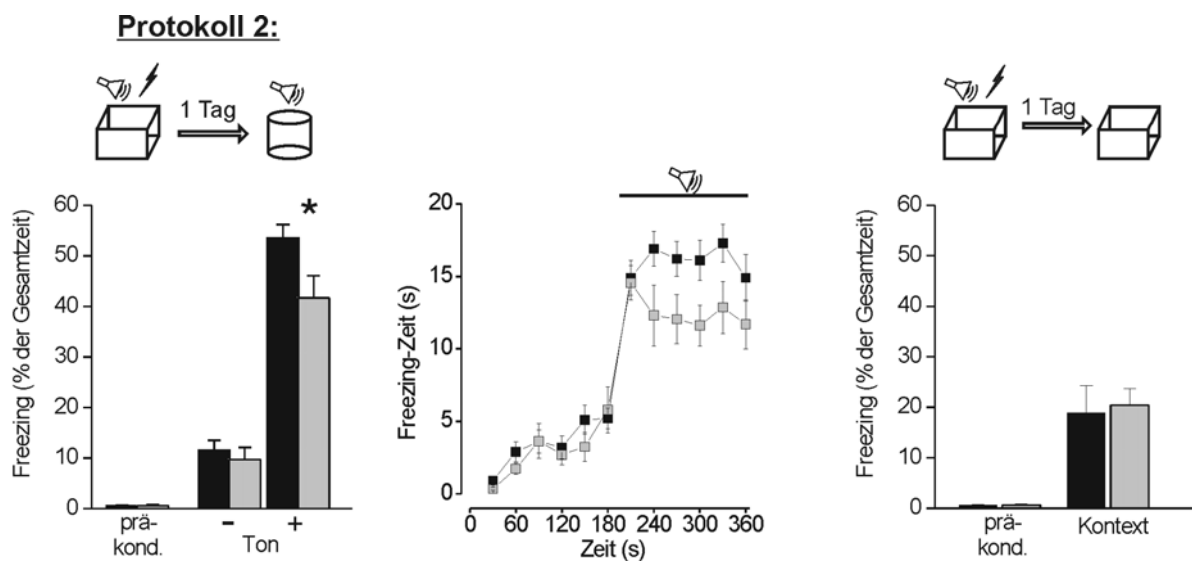


Abb. 3.11: Ergebnisse der Angstkonditionierung mit Protokoll 2

Die Reaktion auf den Ton nach 24 h nach der Konditionierung zeigte eine geringere Ton-Schock-Assoziation bei den cGKI-rescue Tieren (grau;  $n = 8$ ) als bei ihren Kontrollen (schwarz;  $n = 11$ ). Das Freezing-Verhalten vor der Konditionierung (prä-kond.) und vor der Ton-Präsentation war nicht unterschiedlich. In der mittleren Abbildung ist der zeitliche Verlauf dargestellt, anhand dessen deutlich wird, dass der Unterschied zwischen den Gruppen erst nach dem Einsetzen des Tons auftrat. Das Verhalten der Gruppen war im Konditionierungskontext (rechts) nach 24 h nicht unterschiedlich.

### Protokoll 3: 7 Tage post-Konditionierung

Mit diesem Protokoll sollte das Langzeitgedächtnis untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die Angstreaktion von 9 cGKI-rescue und 13 Kontroll- Tieren auf den Ton erst 7 Tage nach der Konditionierung getestet. Die Ergebnisse, welche in Abb. 3.12 dargestellt sind, zeigten ein deutlich verringertes Freezing-Verhalten während der Tonpräsentation der cGKI-rescue Tiere im Vergleich zu ihren Kontrollen. Interessant ist dabei, dass bei cGKI-ctr Mäusen mit  $50,7 \pm 5,4$  % auch nach 7 Tagen nahezu genauso viel Freezing zu beobachten war wie nach 1 Tag. Im Gegensatz dazu sanken die Freezing-Werte der cGKI-rescue Mäuse am siebten Tag nach Konditionierung noch weiter herab ( $34,8 \pm 6,5$  %). Somit zeigte dieses Experiment, dass die Differenz im Angstverhalten zwischen den Genotypen nach 7 Tagen noch größer wurde als nach 1 Tag. Der *Student's t*-Test ergab für die Mittelwerte während des Tons an Tag 7 eine Signifikanz von  $p = 0,037$ . Das Verhalten vor dem Einsetzen des konditionierten Stimulus war auch diesmal nicht unterschiedlich (cGKI-ctr:  $8,4 \pm 1,6$  %; cGKI-rescue:  $5,5 \pm 1,9$  %;  $p = 0,2$ ). Im Rahmen dieses Experiments wurde auch das kontextuelle Erinnerungsvermögen nach 7 Tagen untersucht. Wie auch an Tag 1 verhielten sich beide Genotypen während des Aufenthalts im Konditionierungskontext gleich. Dabei lagen die Werte des kontextuellen Freezing der cGKI-ctr bei  $21,2 \pm 3,7$  % und die der cGKI-rescue Tiere bei  $20,4 \pm 4,8$  %. Diese Ergebnisse unterstützen den Befund, dass selektiv das auditorische Langzeitgedächtnis der cGKI-defizienten Tiere beeinträchtigt ist, während das kontextuelle Angstgedächtnis durch den Verlust der cGKI nicht beeinflusst zu sein scheint.



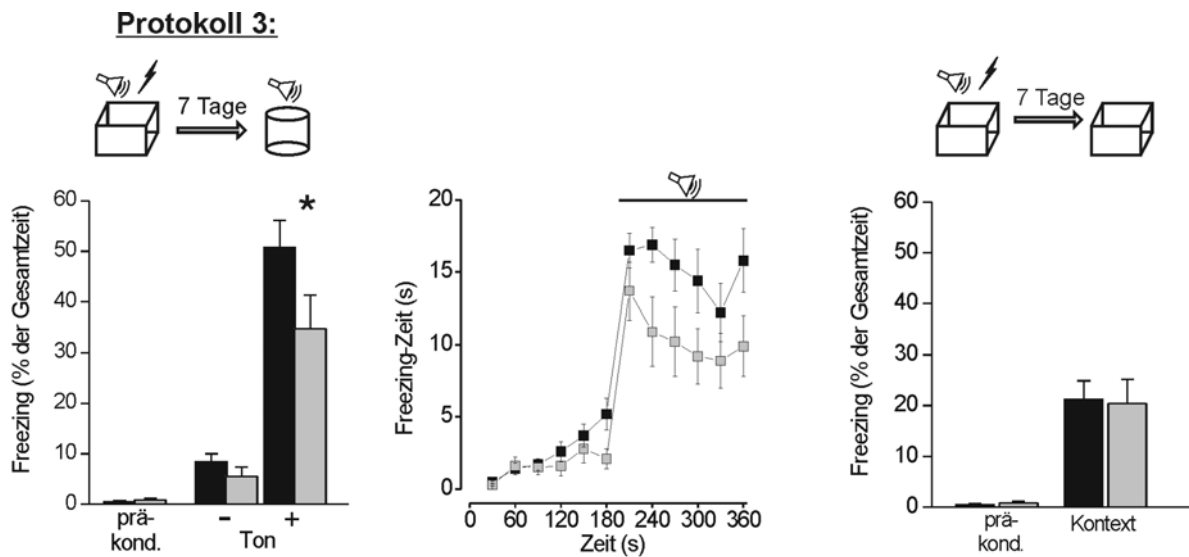


Abb. 3.12: Ergebnisse der Angstkonditionierung mit Protokoll 3

Links: die Angstreaktion auf den Ton der cGKI-rescue Tiere (grau;  $n = 9$ ) war 7 Tage nach der Konditionierung signifikant geringer als die der cGKI-ctr (schwarz;  $n = 13$ ), was für eine schwächere Gedächtniskonsolidierung bei den cGKI-defizienten Tieren spricht. Der Unterschied bestand nicht vor dem Einsetzen des Tons und auch nicht während der Testphase im Konditionierungskontext (rechts).

### 3.4.2 Nicht-assoziative Angst nach Fußschock-Sensibilisierung

Die oben beschriebene klassische Angstkonditionierung nach Pawlow dient, wie bereits erwähnt, zur Untersuchung der Ausbildung eines assoziativen Gedächtnisses. Obwohl bei dieser Konditionierung meist die assoziative Komponente von Interesse ist, darf nicht unberücksichtigt bleiben, dass durch das Vorgehen bei der Konditionierung auch nicht-assoziative Gedächtnisinhalte entstehen. Diese nicht-assoziativen Komponenten entstehen durch das aversive Erlebnis des Fußschocks, was zu einer generell erhöhten Reaktivität der Tiere führt, auch harmlosen Stimuli gegenüber. Dieser Prozess wird Sensibilisierung genannt und trägt zum Angstverhalten bei Konditionierungsversuchen bei (Kamprath and Wotjak, 2004).

Um einen möglichen Unterschied in der nicht-assoziativen Komponente als Ursache für das verringerte Freezing-Verhalten auszuschließen, wurde die Sensibilisierung, wie sie in Kapitel 2.5.1.2 beschrieben ist, getestet. Für diese Untersuchung wurde eine Gruppe von jeweils 8 naiven cGKI-rescue und Kontroll-Tiere verwendet. Die Durchführung wurde wie bei der Konditionierung vorgenommen, bis auf die fehlende Tonpräsentation vor dem

Fußschock. 24 Stunden später wurde dann das Freezing-Verhalten sowohl vor als auch während des Tons in einem neutralen Kontext getestet.

Die Ergebnisse in Abb. 3.13 demonstrieren, dass es nach einer Fußschock-Sensibilisierung zu keinem veränderten Freezing-Verhalten der cGKI-rescue Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen kommt. Dabei wurde weder vor dem Ton (cGKI-ctr:  $3,08 \pm 0,94$  %; cGKI-rescue:  $3,9 \pm 0,56$  %;  $p = 0,23$ ) noch während des Tons (cGKI-ctr:  $19,42 \pm 3,05$  %; cGKI-rescue:  $17,09 \pm 3,53$  %;  $p = 0,32$ ) ein unterschiedliches Verhalten der beiden Genotypen beobachtet. Das bedeutet also, dass die nicht-assoziative Komponente des Freezing-Verhaltens der cGKI rescue Mäuse nach einem Fußschock nicht verändert ist. Daher lässt sich schlussfolgern, dass die beobachtete verringerte Angstreaktion der cGKI rescue nach einer Fußschock-Konditionierung auf einer Reduktion der assoziativen Komponente beruht. In Abb. 3.13 sind zusätzlich die Freezing-Werte der Angstkonditionierung während der Tonpräsentation nach einem Tag (Protokoll 1) dargestellt, um einen direkten Vergleich zwischen dem rein nicht-assoziativen Freezing-Verhalten nach Sensibilisierung und dem Freezing, das sich nach einer Fußschock-Konditionierung ergibt, zu gestatten.

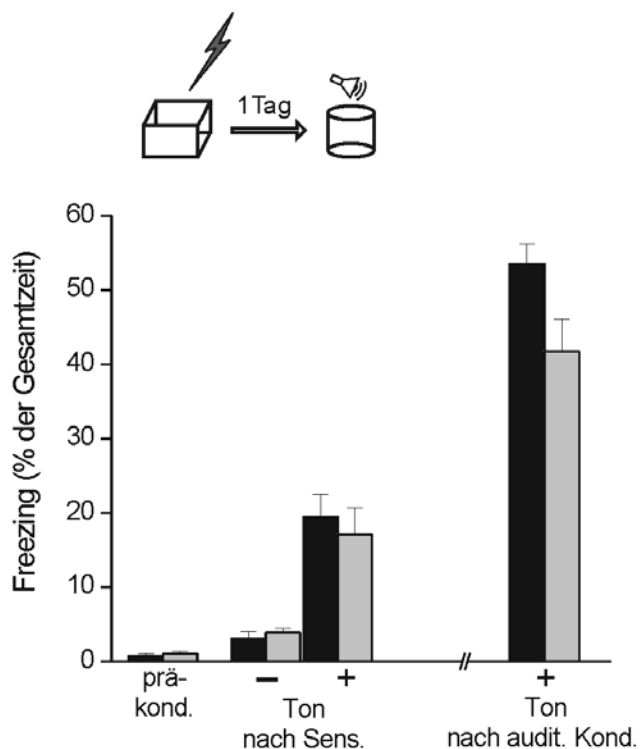


Abb. 3.13: Ergebnisse der Sensibilisierung mit cGKI-rescue Tieren. Durch die alleinige Gabe eines Fußschocks werden die Tiere sensibilisiert und reagieren auf den bisher unbekanntem Ton mit einer Angstreaktion. Dabei wurde deutlich, dass kein Unterschied im nicht-assoziativen Angstverhalten zwischen den beiden Genotypen existiert (schwarz: cGKI-ctr,  $n = 8$ ; grau: cGKI-rescue,  $n = 8$ ). Durch einen Vergleich mit den Werten der auditorischen Konditionierung (rechts) wird offensichtlich, dass das geringere Freezing der cGKI-rescue folglich auf einer reduzierten Assoziation mit dem Ton beruht.

### 3.5 Phosphorylierung von CREB durch Aktivierung der cGKI

Zusammenfassend ergaben die bisher beschriebenen Untersuchungen Hinweise auf eine mögliche funktionelle Bedeutung der cGKI in der Amygdala. Sowohl die LTP-Messungen als auch die Konditionierungsversuche weisen auf eine unterstützende Funktion der cGKI für langanhaltende Veränderungen der synaptischen Plastizität hin. Diese sind jedoch bekanntlich Proteinsynthese-abhängig. Ein wichtiger Transkriptionsfaktor, welcher eng im Zusammenhang mit Lernen und Gedächtnis steht, ist CREB (Silva et al., 1998). Mit den folgenden Untersuchungen sollten Hinweise erhalten werden, ob CREB ein möglicher Downstream-Effektor der NO/cGMP/cGKI Signalkaskade in der LA darstellt. Um dies zu klären, wurde geprüft, ob es zu Unterschieden in der CREB-Phosphorylierung in der LA nach Stimulation des cGMP-Signalwegs zwischen cGKI-KO und Kontrollen kommt. Hierfür wurden Gehirnschnitte von cGKI-KO und Kontrollen angefertigt, 30 Min mit 8-Br-cGMP (0,5mM) bzw. in normaler ACSF inkubiert, und anschließend für eine immunhistochemische Färbung vorbereitet. Auf diese Weise konnten sowohl stimulierte als auch unstimulierte Präparate beider Genotypen mit Hilfe eines phospho-spezifischen CREB-Antikörpers gefärbt und anschließend für die Auswertung photographiert werden.

Die Aufnahmen in Abb. 3.14 zeigen tatsächlich, dass es in den Schnitten der cGKI-ctr Tiere durch die Stimulation mit cGMP zu einer verstärkten Färbung des LA-Bereichs kommt. Bemerkenswerterweise war dies in den Präparaten der cGKI-KO Tiere nicht zu beobachten. Um diesen Effekt zu quantifizieren, wurden die pCREB-positiven Zellkerne pro Flächeneinheit (FE) in allen Präparaten ausgezählt. Damit die durchgeführten Experimente ( $n = 3$ ) miteinander vergleichbar sind, galt jeweils der Wert des unstimulierten cGKI-ctr-Präparats als Ausgangswert ( $= 1,0$ ) für alle anderen Werte des Experiments. In der Tat zeigte auch die quantitative Auswertung, dass es in Kontroll-Schnitten durch die Inkubation mit cGMP zu einer Zunahme der pCREB-positiven Zellkerne in der LA kommt. Dabei stieg der Wert der Kontroll-Tiere mit  $1,46 \pm 0,08$  statistisch signifikant im Vergleich zum Basalwert an ( $p = 0,0012$ ). Wie bereits erwähnt, konnte bei den Präparaten der cGKI-KO kein Effekt durch cGMP-Zugabe festgestellt werden. Dabei lagen sowohl die Werte der unstimulierten als der stimulierten cGKI-KO-Präparate auf dem Ausgangsniveau der cGKI-Kontrollen. Daher ließ sich bei den cGKI-KO Tieren auch kein signifikanter Anstieg der pCREB-positiven Kerne berechnen (cGKI-KO unstim:  $1,05 \pm 0,06$ ; cGKI-KO + cGMP:  $1,07 \pm 0,09$ ). Schließlich zeigt der Vergleich der stimulierten Präparate von cGKI-KO und cGKI-ctr einen signifikanten Unterschied von  $p = 0,021$ .

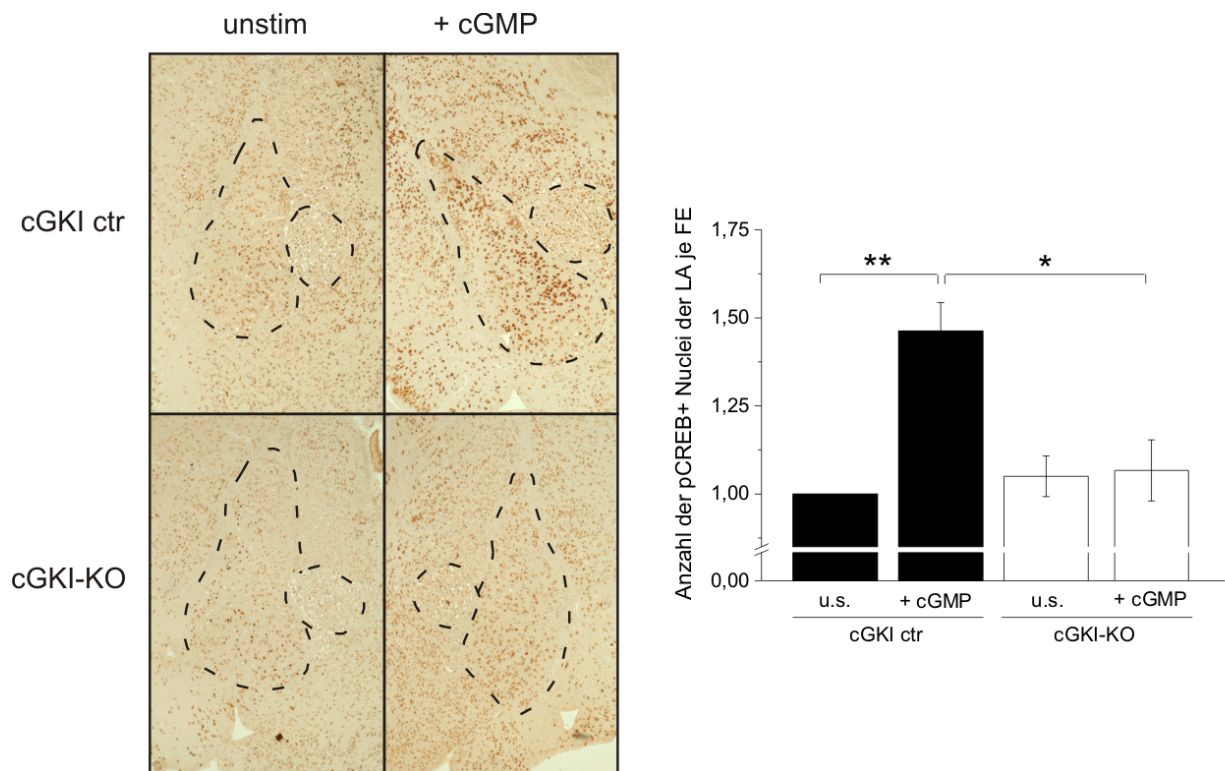


Abb. 3.14: Immunhistochemische Färbung von pCREB+-Zellkernen in der Amygdala von cGKI-KO und cGKI-ctrl nach cGMP-Applikation.

Links sind repräsentative Aufnahmen von unstimulierten und mit cGMP (0,5 mM, 30 Min) behandelten Schnittpräparaten von cGKI-ctrl und cGKI-KO dargestellt, in welchen eine gestrichelte Linie den Bereich der LA und des CE hervorheben soll. Rechts zeigt die Quantifizierung der pCREB+-Kerne eine Zunahme der pCREB-positiven Kerne in den Kontroll-Präparaten, welche in denen der cGKI-KO ausblieb.

## 4 Diskussion

Es ist bekannt, dass Stickstoffmonoxid (NO) ein wichtiges biologisches Signalmolekül darstellt, welches seine Wirkung in erster Linie durch eine Stimulation der sGC und einem anschließenden intrazellulären Anstieg der cGMP-Konzentration vermittelt. Als membrangängiges Molekül ist NO in der Lage, seine Wirkung auch in Nachbarzellen zu entfalten. Auch im ZNS gilt NO als wichtiger neuronaler Modulator (Schuman and Madison, 1994; Feil and Kleppisch, 2008), der sowohl regulierend auf Lernen und Gedächtnis als auch auf die Vorgänge der synaptischen Plastizität eingreifen kann. So konnte gezeigt werden, dass NO als retrograder Messenger in Hippocampus-Neuronen auf die synaptische Plastizität einwirkt (Hawkins et al., 1994; Hawkins et al., 1998) und auch für die Bildung des Angstgedächtnisses und der LTP-Induktion in der Amygdala von enormer Bedeutung ist (Schafe et al., 2005; Sato et al., 2006). Als wichtige Transduktionsproteine des NO/cGMP-Signals gelten die cGK Typ I und II, welche von zwei verschiedenen Genen codiert werden, und beide in der Amygdala exprimiert werden (El-Husseini et al., 1999; Feil et al., 2005b). Die vorliegende Arbeit beschreibt die funktionelle Rolle der cGKI als Transduktionsmolekül der NO/cGMP-Signalkaskade in der Amygdala für die synaptische Plastizität und die Konsolidierung des Angstgedächtnisses.

### 4.1 Expression der cGKI im Gehirn

Zunächst wurde das Expressionsmuster der cGKI in den Hirnarealen, welche für das Angstlernen wichtig sind, untersucht. Die Expressionsanalysen (Abb. 3.1) haben gezeigt, dass die cGKI in hoher Konzentration in der Amygdala vorliegt. Andere mit der Angstkonditionierung assoziierte Bereiche wie der Thalamus weisen eine wesentlich geringere Expression auf.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Expressionsdaten stehen im Einklang mit den Angaben in der Literatur (Kleppisch et al., 1999; Geiselhoringer et al., 2004; Feil et al., 2005b). Jedoch existierte bisher keine Analyse, welche die Verteilung der cGKI in den verschiedenen Hirnkernen der Amygdala detaillierter beschreibt. Mit den in dieser Arbeit gezeigten Färbungen konnte demonstriert werden, dass die cGKI hauptsächlich in den lateralen Kernen exprimiert wird, in welchen die verschiedenen Stimuli (Ton und Schmerzreiz) während der Angstkonditionierung konvergieren und daher vermutlich für deren Assoziation

verantwortlich sind (Sigurdsson et al., 2007). In Anbetracht der Expressionsdaten der cGKI lässt sich daher eine funktionelle Bedeutung der cGKI für das assoziative auditorische Angstgedächtnis und die zugrundeliegende synaptische Plastizität in der LA vermuten.

Desweiteren konnte anhand der Daten ein Hinweis auf die subzelluläre Verteilung der cGKI in den Neuronen der LA erzielt werden. Es wird im allgemeinen diskutiert, inwiefern prä- oder postsynaptische Mechanismen zur synaptischen Plastizität während der LTP-Induktion beitragen. Eine Fülle von Daten in der Literatur beschreiben NO als wichtigen neuronalen Modulator, welcher die Funktion eines retrograden Messengers erfüllen kann (Hawkins et al., 1994; Son et al., 1996; Huang, 1997; Hawkins et al., 1998; Arancio et al., 2001; Burette et al., 2002; Wang et al., 2005; Liu et al., 2007). Die durch Experimente an CA1-Hippocampusneuronen postulierte Signalkaskade für die LTP-Induktion sieht wie folgt aus: Ein durch eine Depolarisation verursachter postsynaptischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ioneneinstrom führt durch Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-abhängigen NO-Synthase zur Generierung von NO. Dieses gasförmige Molekül kann retrograd über den synaptischen Spalt zur Präsynapse diffundieren. Dort steigt durch eine Stimulation der löslichen Guanylylzyklase der intrazelluläre cGMP-Spiegel an, was eine Aktivierung der cGK ermöglicht. Diese kann durch Phosphorylierung bisher noch weitgehend unbekannter präsynaptischer Proteine zu einer Verstärkung der Transmitterfreisetzung beitragen. Auch für die Amygdala wurde eine kritische Rolle des NO/cGMP-Signals für synaptische Plastizität und Angstlernen beschrieben (Watanabe et al., 1995; Chien et al., 2003; Chien et al., 2005; Schafe et al., 2005). Allerdings ist noch nicht hinreichend geklärt, ob dieser Signalweg eine prä- oder postsynaptische Komponente der synaptischen Plastizität darstellt.

Die Daten dieser Arbeit indizieren erstmals anhand des Expressionsmusters, dass die cGKI sowohl prä-als auch postsynaptisch in den Neuronen der LA vorliegt. Das Gebiet der LA zeigte zum einen eine diffuse Färbung im Bereich des Neuropils (Abb. 3.1E und F). Dieser Bereich umfasst sowohl Endigungen präsynaptischer Neuronen der LA, die aus kortikalen und thalamischen Regionen stammen, als auch die dendritischen und axonalen Fortsätze der postsynaptischen Neuronen der LA. Zum anderen zeigen die Daten auch eine deutliche Expression der cGKI im Zytosol der postsynaptischen Neuronen der LA. Damit legen diese Daten nahe, dass für den NO/cGMP/cGKI-Signalweg ebenso prä- als auch postsynaptische Mechanismen denkbar sind. Auf diese Weise könnte -wie auch im Hippocampus beschrieben- eine cGKI-Aktivierung auf der präsynaptischen Seite zu einer Mobilisierung von Vesikeln und damit zu einer gesteigerten Transmitterfreisetzung führen (Zhuo et al., 1994; Arancio et al., 1995; Hawkins et al., 1998; Wang et al., 2005). Als möglicher

Downstream-Effektor der cGKI in Hippocampusneuronen wird VASP diskutiert (Arancio et al., 2001; Wang et al., 2005), welches auf die Dynamik des Zytoskeletts regulierend einwirken kann. Zudem konnte in anderen Zellsystemen auch RhoA als cGKI-Substrat identifiziert werden (Sauzeau et al., 2000; Gudi et al., 2002). Diese RhoGTPase, für die bereits eine Funktion für das Amygdala-abhängige Lernen beschrieben wurde (Lamprecht et al., 2002), ist ebenfalls an Actin-vermittelten Prozessen beteiligt, möglicherweise in Zusammenwirken mit VASP (Grosse et al., 2003). Diese raschen Umstrukturierungen von präsynaptischen Proteinen begleiten die Induktion der LTP (Antonova et al., 2001). Es ist bekannt, dass der NO/cGMP/cGK-Signalweg aktivitätsabhängig zu ähnlichen Veränderungen des Zytoskeletts und damit zu einer Anreicherung von synaptischen Proteinen wie Synapsin I oder Synaptophysin führt (Antonova et al., 2001; Wang et al., 2005). Diese Arbeiten indizieren, dass die cGKI durch eine Phosphorylierung von VASP modulierend auf die präsynaptische Transmitterfreisetzung wirken kann.

Daneben kommt auch  $\alpha$ -Synuclein als Downstream-Effektor des NO/cGMP/cGK-Signals in Betracht (Liu et al., 2007). Es wurde gezeigt, dass der NO/cGMP/cGK-Signalweg eine synaptische Aggregation von  $\alpha$ -Synuclein auslöst, was mit einer Potenzierung der synaptischen Transmission verbunden ist (Liu et al., 2004). Auch für die Plastizität in der Amygdala und das Angstlernen wurde gezeigt, dass synaptische Umstrukturierungen notwendig sind (Lamprecht and LeDoux, 2004; Lamprecht et al., 2006a; Lamprecht et al., 2006b; Ploski et al., 2008). Diese oben beschriebenen Mechanismen über VASP, RhoA oder  $\alpha$ -Synuclein wären auch in der LA denkbar, mit welchen die cGKI auf die präsynaptische Plastizität Einfluss nehmen könnte.

Parallel dazu wird diskutiert, dass das NO/cGMP-Signal seine Wirkung über die cGKI auch auf der postsynaptischen Seite entfalten kann. So wurde für die LTP-Induktion im Hippocampus gezeigt, dass die NO/cGMP/cGK-Transduktion zu einer CREB-abhängigen Proteinsynthese in der Postsynapse beiträgt (Lu et al., 1999; Lu and Hawkins, 2002). Die immunhistochemischen Daten dieser Arbeit legen nahe, dass auch in der Amygdala postsynaptische Mechanismen der cGKI möglich sind. Tatsächlich konnte eine kürzlich erschienene Studie von Ota et al. (2008) belegen, dass die postsynaptische Injektion eines cGK-Inhibitors die LTP in der LA hemmt. Dieser Befund bekräftigt die Annahme, dass der cGMP/cGK-Signalweg zumindest teilweise zur postsynaptischen Komponente der synaptischen Plastizität in der LA beiträgt.

Allerdings stellen die Ergebnisse in dieser Arbeit nur Hinweise dafür dar, dass die cGKI sowohl prä- als auch postsynaptisch in der LA lokalisiert ist. Um eine klare Aussage über den Expressionsort der cGKI zu treffen, wäre eine Ko-Lokalisation mit prä- oder post-

synaptischen Markern notwendig, wie es auch schon für kultivierte Hippocampusneuronen gezeigt wurde (Burette et al., 2002; Wang et al., 2005). Weitere interessante Hinweise, welche einen möglichen Mechanismus des NO/cGMP/cGKI-Signalwegs in der Amygdala unterstützen würden, wären Ko-Lokalisationsstudien der cGKI mit *upstream*-Proteinen wie der sGC oder NOS, welche bisher jedoch noch nicht erbracht wurden. Daher kann lediglich festgehalten werden, dass sich die hier beschriebenen Expressionsdaten der cGKI mit dem Expressionsmuster der nNOS aus der Arbeit von Schafe et al. (2005) decken.

Desweiteren konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass es sich bei der Expression der cGKI in der Amygdala um die  $\beta$ -Isoform handelt (Abb. 3.2). Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit den bisherigen Angaben, dass die cGKI $\beta$ -Isoform im Gewebe des Großhirns gegenüber der  $\alpha$ -Isoform überwiegt (Geiselhoringer et al., 2004; Feil et al., 2005b). Da die beiden Isoformen z. T. unterschiedliche Substratselektivität besitzen (siehe Hofmann et al., 2006), kann dieser Befund zukünftig eventuell Hinweise bei der Suche nach möglichen Zielproteinen der cGKI $\beta$  in der Amygdala liefern.

Die Daten belegen außerdem, dass auch die cGK Typ II in der Amygdala exprimiert wird (Abb. 3.2). Im Gegensatz zur cGKI konnte jedoch für die cGKII keine Funktion für die LTP-Induktion in der LA oder das Angstlernen nachgewiesen werden (Paul et al., 2008). Anhand dieser Daten kann jedoch ausgeschlossen werden, dass es in cGKI-KO Tieren durch das Fehlen der cGKI zu einer Hochregulation der cGKII kommt, was eventuelle Defizite beim cGKI-KO kompensieren könnte.

Im Rahmen der Expressionsanalysen konnte auch eindeutig belegt werden, dass cGKI-rescue Tiere kein cGKI-Protein in neuronalem Gewebe exprimieren und damit einen Knockout für cGKI im Gehirn darstellen (Abb. 3.3). Aufgrund dessen war es möglich, die cGKI-rescue Tiere in den darauffolgenden Experimenten auch als cGKI-defiziente Tiere einzusetzen.

## **4.2 Die Rolle der cGKI für synaptische Plastizität in der lateralen Amygdala**

Die LA stellt eine Schlüsselkomponente bei der Angstkonditionierung dar. Da die verschiedenen sensorischen Informationen auf den Neuronen der LA konvergieren, nimmt man an, dass sie den Ort darstellt, an welchem synaptische Plastizität während der Konditionierung stattfindet (Blair et al., 2001; Sigurdsson et al., 2007). Um einen besseren



Einblick in die generellen Grundlagen der Gedächtnisbildung zu erhalten, werden die molekularen Mechanismen, die zu diesen synaptischen Veränderungen beitragen, intensiv erforscht. Ein beliebtes Modell für diese Untersuchungen stellt die LTP dar, da zahlreiche Parallelen zwischen den Mechanismen der LTP und den Vorgängen von Lernen und Gedächtnis zu beobachten sind. Eine ganze Reihe von bisher veröffentlichten Daten legen eine Bedeutung des NO/cGMP-Signalwegs sowohl für das Amygdala-abhängige Lernverhalten als auch für die Entstehung der LTP in der Amygdala nahe (Chien et al., 2003; Chien et al., 2005; Schafe et al., 2005; Ota et al., 2008). Als ein wichtiges Transduktionsmolekül des NO/cGMP-Signals dient die cGKI. Ein Hauptgegenstand dieser Arbeit war es, die funktionelle Bedeutung der cGKI für die Modulation der synaptischen Plastizität in der LA zu untersuchen.

Tatsächlich zeigen die hier beschriebenen Experimente eine wichtige Funktion der cGKI für die synaptische Plastizität in der LA. Dieser Befund basiert auf Messungen der LTP in der LA mit Hilfe von cGKI-defizienten Mauslinien (Abb. 3.5). Diese Messungen ergaben eine signifikante Reduktion der LTP in den cGKI-KO Tieren im Vergleich zu den Kontroll-Tieren. Dieser Defekt trat sowohl im thalamischen als auch im kortikalen Input auf.

Um auszuschließen, dass dieser beobachtete Defekt der cGKI-Nullmutanten auf einer gestörten zerebralen Durchblutung aufgrund vaskulärer Dysfunktionen (Pfeifer et al., 1998) beruht, wurden die LTP-Messungen mit dem cGKI-rescue Mausmodell wiederholt. Da sich diese Mauslinie durch eine Re-Expression der cGKI in Blutgefäßen auszeichnet (Abb. 3.3), sind Durchblutungsstörungen wie sie bei den Nullmutanten auftreten könnten, nicht zu erwarten. In der Tat bestätigten die LTP-Messungen mit der cGKI-rescue Mauslinie die Ergebnisse der Nullmutanten: die cGKI-defizienten Rescue-Tiere zeigten wie die cGKI-Nullmutanten eine verminderte LTP im thalamischen wie auch im kortikalen Input zur LA im Vergleich zu den Kontroll-Tieren auf.

Diese Befunde stehen im Einklang mit anderen Studien zur Rolle des NO/cGMP-Signalwegs für die synaptische Plastizität in der LA. Die Arbeitsgruppe von Schafe et al. (2005) konnte zeigen, dass die LTP in der LA durch NOS-Inhibitoren und NO-Fängern hemmbar ist. Ebenso kann die LTP durch Erhöhung des cGMP-Spiegels mit Hilfe eines sGC-Aktivators gesteigert werden (Chien et al., 2003). In Übereinstimmung zu den Ergebnissen dieser Arbeit konnte durch Ota et al. (2008) belegt werden, dass die LTP in der LA durch Aktivierung bzw. Hemmung des NO/cGMP/cGK-Signalwegs entsprechend gesteigert bzw. reduziert werden kann. Allerdings lassen sich auch Abweichungen zu den Daten von Watanabe et al. (1995) und Ota et al. (2008) feststellen, die eine Funktion des NO/cGMP/cGK-Signalwegs für den kortikalen Input nicht darlegen konnten. Gründe für die

kontroversen Ergebnisse liegen möglicherweise darin, dass unterschiedliche Stimulationsprotokolle zur Auslösung der LTP sowie auch unterschiedliche Spezies wie Ratte und Maus verwendet wurden.

Ein allgemein diskutierter Gegenstand ist die Frage, inwiefern prä- oder postsynaptische Komponenten für die Ausbildung der LTP in der LA verantwortlich sind. Im Hinblick auf die Untersuchungen dieser Arbeit stellt sich entsprechend die Frage, ob die cGKI prä- oder postsynaptisch bei der LTP-Induktion in der LA agiert. Anhand der hier vorgestellten LTP-Messungen mit den verschiedenen genetischen Mausmodellen lassen sich jedoch keine Rückschlüsse auf diese Fragestellung ziehen. Im Gegensatz dazu lieferten verschiedene pharmakologische Studien Indizien für eine Rolle des NO als retrograder Messenger. Diese Hinweise beruhen auf dem Befund, dass sich die LTP in der LA durch einen nicht membrangängigen NO-Scavenger inhibieren ließ (Watanabe et al., 1995; Schafe et al., 2005). In Ergänzung dazu zeigt die Studie von Schafe et al. (2005), dass die PPF durch die Induktion der LTP im thalamischen Input reduziert wird. Da dieser Parameter im wesentlichen auf eine präsynaptische Funktion zurückzuführen ist (Zucker, 1989), zeigen diese Daten, dass eine präsynaptische Komponente im thalamischen Input zur LTP-Induktion beiträgt. Für die LTP über die kortikalen Afferenzen konnte ebenfalls eine präsynaptische Beteiligung nachgewiesen werden (Huang and Kandel, 1998).

Kürzlich konnte jedoch die Vermutung bestätigt werden, dass die LTP über den NO/cGMP/cGK-Signalweg zumindest teilweise auch über postsynaptische Mechanismen abläuft. Die Studie von Ota et al. (2008) zeigte, dass eine postsynaptische Injektion eines cGK-Inhibitors in LA-Neuronen zur Reduktion der LTP führte. Die immunhistochemischen Daten der vorliegenden Arbeit, die ebenfalls eine postsynaptische Expression der cGKI nahe legen, unterstützen zusätzlich die Annahme, dass die cGKI bei einem postsynaptischen Mechanismus beteiligt ist.

Weitere Punkte, die zur Beurteilung über eine prä- oder postsynaptische Position der cGKI dienen, sind die Parameter der IOR und der PPF. Diese Parameter geben in erster Linie Auskunft über präsynaptische Funktionen. Keine dieser Messungen zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen cGKI-KO, cGKI-rescue oder Kontroll-Tieren (Abb. 3.4). Dieser Befund spricht gegen eine kritische Funktion der cGKI für die basale präsynaptische Transmitterfreisetzung oder für eine kurzfristige Plastizität der Präsynapse. Die Auswirkung der LTP-Induktion auf die PPF wurde im Rahmen dieser Experimente nicht ermittelt. Diese Daten würden weitere Hinweise für eine prä- oder postsynaptische Beteiligung der cGKI bei der Entstehung der LTP liefern.

Weiterhin war bei den LTP-Messungen festzustellen, dass sich der Unterschied zwischen den Genotypen nicht gleich in den ersten Minuten nach dem Tetanus zeigte, sondern sich meist erst im Laufe der Messungen entwickelte. Dieser Befund deutet an, dass die cGKI von größerer Bedeutung für die späte Phase, d.h. für die Aufrechterhaltung der LTP als für die Induktion der LTP ist. Wie Studien an Hippocampuspräparaten gezeigt haben, gibt es zwei verschiedene Phasen der LTP, welche sich durch unterschiedliche molekulare Mechanismen auszeichnen (zur Übersicht siehe Citri and Malenka, 2008). Dem LTP-induzierenden Tetanus schließt sich zunächst die initiale Phase („early LTP“) an. Darauf folgt die späte Phase der LTP („late LTP“), welche im Gegensatz zur initialen Phase RNA- und Proteinbiosynthese-abhängig ist und der Stabilisierung der eingeleiteten synaptischen Veränderungen dient (Huang et al., 1994; Nguyen and Kandel, 1996). Interessanterweise konnte bereits ein Zusammenhang zwischen dem NO/cGMP/cGK-Signal und neuronaler Transkription in Hippocampusneuronen hergestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine LTP-Induktion über die NO/cGMP/cGK-Signalkaskade eine CREB-vermittelte Transkription in der postsynaptischen Zelle auslöst. (Lu et al., 1999; Lu and Hawkins, 2002). Ein entsprechender Mechanismus für die cGKI-vermittelte synaptische Plastizität wäre auch in der Amygdala denkbar und wurde daher im Rahmen dieser Arbeit untersucht (s. u.).

Zusammenfassend weisen die elektrophysiologischen Experimente auf eine wichtige Funktion der cGKI für die LTP in der LA hin. Während der Verlust der cGKI eine reduzierte LTP in der LA von cGKI-defizienten Tieren hervorrief, waren die Parameter der basalen synaptischen Übertragung bei diesen Tieren unverändert. Dieser Befund spricht dafür, dass die bei cGKI-defizienten Tieren beobachteten Defekte der LTP tatsächlich auf Defizite der aktivitätsabhängigen synaptischen Plastizität nach tetanischer Stimulation beruhen. Daraus folgt, dass die cGKI als ein maßgeblicher Effektor in der NO/cGMP-vermittelten synaptischen Modulation in der LA fungiert.

### **4.3 Die Funktion der cGKI für das assoziative Angstgedächtnis**

Man nimmt an, dass die aktivitätsabhängigen Änderungen der synaptischen Übertragung in der Amygdala und die daran beteiligten molekularen Mechanismen die Grundlage des assoziativen Lernens während der Angstkonditionierung darstellen (Rogan et al., 1997;

Schafe et al., 2001; Maren and Quirk, 2004; Sigurdsson et al., 2007). Um zu ermitteln, ob sich der beobachtete Defekt in der LTP bei cGKI-defizienten Tieren durch Defizite im Amygdala-abhängigen Lernverhalten widerspiegelt, wurde eine umfassende Analyse der Pawlowschen Angstkonditionierung durchgeführt. Mit Hilfe dieser Versuche wurde die Bildung eines assoziativen Angstgedächtnisses von cGKI rescue Tieren eingehend untersucht.

Die Ergebnisse zeigen zum ersten Mal mit Hilfe eines cGKI-defizienten Mausmodells, dass die cGKI eine kritische Rolle für die Konsolidierung eines assoziativen Angstgedächtnisses spielt. Dieser Befund beruht auf der Tatsache, dass der Verlust des cGKI-Proteins im Gehirn zu einem signifikant verringerten Freezing-Verhalten während der Präsentation des konditionierten Tons führte (zweifaktorielle Varianzanalyse mit Genotyp x Ton:  $F_{(1,62)} = 8,67$ ,  $p = 0,004$ ). Während der Konditionierung kommen eine Vielzahl unterschiedlicher Prozesse wie Akquisition, Konsolidierung, Rekonsolidierung und Extinktion zum Tragen. Um auszumachen, bei welchem dieser Prozesse der NO/cGMP/cGKI-Signalweg eine Rolle spielt, wäre eine zeitlich begrenzte Inaktivierung der cGKI wünschenswert. Diese Möglichkeit ist allerdings durch die Verwendung des cGKI-rescue Mausmodells nicht gegeben. Jedoch weisen die Daten darauf hin, dass die cGKI-defizienten Tiere Defizite im Langzeitgedächtnis aufweisen, während das Kurzzeitgedächtnis unverändert ist. Daraus ist einerseits zu schließen, dass das Vorhandensein der cGKI für die Akquisition sowie die Prozesse des Kurzzeitgedächtnisses nicht notwendig ist. Andererseits lässt sich schlussfolgern, dass der beobachtete Phänotyp der cGKI-rescue Mäuse vielmehr aus einem Defekt der Gedächtniskonsolidierung hervorgeht. Daher lässt sich eine Rolle der cGKI für die Proteinsynthese-abhängige Umwandlung des Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis vermuten. Dieser Rückschluss wurde ermöglicht, indem jede einzelne Kohorte zu einem einzigen Zeitpunkt (2 h, 1 Tag oder 7 Tage) nach der Konditionierung untersucht wurde, was einen Einfluss der Extinktion und der Rekonsolidierung ausschließt. Überraschenderweise wurde bei einer Varianzanalyse für die Faktoren Genotyp x Ton x Zeit eine Signifikanz knapp verfehlt. Eine mögliche Erklärung dafür wäre die ungenügende statistische Teststärke: das Freezing-Verhalten zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde nicht an den gleichen Gruppen wiederholt, sondern wie erwähnt für jeden Zeitpunkt an separaten Kohorten untersucht. Dadurch erhöht sich die Variabilität zwischen den Daten von den unterschiedlichen Zeitpunkten, was eine größere Gruppenstärke erfordert hätte. Aus diesem Grund wurde zusätzlich eine statistische Analyse mit Hilfe des *Students t-Test* für jeden einzelnen Zeitpunkt durchgeführt. Diese ergab eine signifikant reduzierte Freezingreaktion der Rescue-Tiere an Tag 1 (Abb. 3.11)

und Tag 7 (Abb. 3.12). Im Gegensatz dazu ergab sich 2 Stunden nach der Konditionierung kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen (Abb. 3.10). Dies impliziert ein Defizit des Langzeitgedächtnisses, während die Funktion des Kurzzeitgedächtnisses intakt ist. Aus diesem Grund sprechen die beobachteten zeitabhängigen Veränderungen des Gedächtnisses für veränderte Mechanismen der Konsolidierung. Tatsächlich entwickelte sich der Phänotyp der cGKI-rescue Mäuse in dem Zeitfenster, welcher für die Gedächtniskonsolidierung in der Amygdala benötigt wird (bis zu 2 Tagen, siehe Sacchetti et al., 1999).

Der Befund dieser Verhaltensversuche steht im Einklang mit den Arbeiten anderer Autoren. Schafe et al. (2005) belegte mit Hilfe intra-amygdalärer Infusionen von NOS-Inhibitoren und NO-Fängern eine kritische Rolle von NO in der Amygdala für die Konsolidierung des Angstgedächtnisses. Ebenso können die Ergebnisse von Ota et al. (2008) bestätigt werden, welche ebenfalls durch intra-amygdaläre Infusionen eines cGK-Inhibitors zeigten, dass die Aktivität der cGK in der Amygdala für eine Konsolidierung des Angstgedächtnisses benötigt wird. Die pharmakologischen Methoden besaßen jedoch den Nachteil, dass zwischen einem cGKI- oder cGKII-vermittelten Effekt nicht unterschieden werden konnte. Daher untermauern die hier vorgestellten Resultate nicht nur die bisher beschriebene Rolle des NO/cGMP-Signalwegs für die Amygdala-abhängige Gedächtnisfunktion, sondern liefern dank der selektiven genetischen Inaktivierung der cGKI zusätzlich die Erkenntnis, dass es sich um cGK Typ I handelt, welche diese Funktion vermittelt. Im Gegensatz dazu ließen sich entsprechende Phänotypen bei cGKII-KO Mäusen nicht feststellen (Paul et al., 2008). Mit den Expressionsanalysen ließ sich ferner darlegen, dass es sich um die  $\beta$ -Isoform der cGKI handelt, welche in der LA exprimiert wird.

Mit diesen hier vorgestellten Analysen wurde die Rolle des NO/cGMP/cGKI-Signalwegs für das auditorische Angstgedächtnis zum ersten Mal mit Hilfe des cGKI\_rescue Mausmodells untersucht. Frühere Analysen von konditionellen cGKI-KO (cGKI<sup>hko</sup>) Tieren, die mit Hilfe des Cre/loxP-Systems generiert wurden, führten zu keinem Phänotyp im auditorischen oder kontextuellen Gedächtnis (Kleppisch et al., 2003). Allerdings ist die Rekombination bei der dabei verwendeten NEX-Cre-Deleter Mauslinie lediglich im Neokortex und im Hippocampus effizient und dagegen nur schwach im Bereich der Amygdala (Schwab et al., 2000). Die cGKI-rescue Mauslinie zeichnet sich allerdings durch einen vollständigen Verlust des cGKI-Proteins im gesamten neuronalen Gewebe aus. Interessanterweise spiegelt sich der Unterschied zwischen diesen beiden Mausmodellen in einem unterschiedlichen Verhaltensphänotyp wider: ausschließlich bei cGKI-rescue Tieren wurde ein Defekt im assoziativen

auditorischen Angstgedächtnis, einer Amygdala-abhängigen Funktion, beobachtet. Bemerkenswerterweise war das kontextuelle Gedächtnis bei den Rescue-Tieren unbeeinflusst. Eine dreifaktorielle Varianzanalyse der Freezingzeiten im Konditionierungskontext konnte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine Interaktionen feststellen (Genotyp:  $F_{1,37} = 0,05$ ,  $p = 0,74$ ; Genotyp x Kontext:  $F_{1,37} = 0,83$ ,  $p = 0,37$ ; Genotyp x Kontext x Zeit:  $F_{1,37} = 0,05$ ,  $p = 0,82$ ). Zum einen zeigen die Daten, dass der Verlust der cGKI einen selektiven Defekt einer Amygdala-abhängigen Funktion auslöst und nicht zu einer generellen Beeinflussung des Gedächtnisses führt. Zum anderen unterstützen diese Daten -zusammen mit dem Expressionsmuster der cGKI in der Amygdala und dem Defekt der LTP in der LA- die Ansicht, dass die Amygdala eine selektive Funktion für das Angstgedächtnis besitzt. Umgekehrt unterstreicht das intakte kontextuelle Gedächtnis der cGKI-rescue Tiere, dass es sich dabei um eine Aufgabe handelt, welche vom Hippocampus und der basolateralen Amygdala abhängt (Morris et al., 1982; Sacchetti et al., 1999)

Es ist durchaus möglich, dass die cGKI auch Einfluss auf das grundlegende Verhalten der Versuchstiere hat. Um auszuschließen, dass die beobachteten unterschiedlichen Freezing-Reaktionen der cGKI-rescue Tiere auf einem veränderten basalen Verhalten beruhen, wurde das Angst-assoziierte Verhalten dieser Mauslinie eingehend analysiert. Dazu wurden die Tiere im Open Field, Elevated Plus Maze und in der Light-Dark Box untersucht (Abb. 3.6 bis Abb. 3.8). Keiner dieser Tests zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen cGKI-rescue Tieren und ihren Kontrollen. Daher sprechen die Ergebnisse gegen eine Funktion der cGKI für die lokomotorische Aktivität oder das natürliche Angstverhalten der Tiere. Es wurde lediglich eine leichte Tendenz der cGKI-rescue Tiere beobachtet, den offenen Arm des Elevated Plus Mazes seltener zu betreten als die Kontrollen. Ein ähnlicher Befund ist in der Arbeit von Monzon et al. (2001) beschrieben, welche zeigt, dass sich eine intra-amygdaläre Applikation eines NOS-Inhibitors anxiogen auswirkt. Allerdings würde dies eher ein erhöhtes Freezingverhalten der cGKI-defizienten Tiere während der Angst-konditionierung implizieren, was jedoch nicht der Fall war. Außerdem kommt noch hinzu, dass die cGKI-rescue Tiere beim Test in der Light-Dark Box erstaunlicherweise eine umgekehrte Tendenz als bei EPM zeigten, d.h. sie betraten das helle Kompartiment etwas häufiger als ihre Kontrollen. Zusammenfassend liefern die Daten daher in ihrer Gesamtheit keine eindeutigen Hinweise dafür, dass das grundlegende Angstverhalten der cGKI-rescue Tiere verändert ist.

Dem zellulären Modell der Pawlowschen Konditionierung zufolge, beruht die Bildung des auditorischen Angstgedächtnisses auf einer Potenzierung der auditorischen Inputs zur LA durch eine gleichzeitige Aktivierung eines starken Inputs (Sigurdsson et al., 2007). In den hier beschriebenen Experimenten diente ein elektrischer Fußschock als starker, aversiver Stimulus. Da das Niveau der Freezing-Reaktion unter anderem auch von der Intensität des aversiven Reizes abhängt (Kamprath and Wotjak, 2004), könnte eine verringerte Freezing-Reaktion möglicherweise auf einer defekten Schmerzwahrnehmung der cGKI-rescue Tiere beruhen. Allerdings sprechen die Ergebnisse in vieler Hinsicht dagegen. Zunächst belegen verschiedene Arbeiten in der Literatur, dass die cGMP/cGK-Transduktion keine Rolle für die akute Schmerzwahrnehmung spielt (Tegeeder et al., 2004; Schmidtko et al., 2008). Außerdem zeigen die cGKI-rescue Tiere ein intaktes Kurzzeitgedächtnis und ein normales kontextuelles Gedächtnis. Auch die unmittelbare Reaktion beim Einsetzen des konditionierten Tons war bei Rescue Tieren und Kontrollen zunächst noch gleich; der Unterschied im Freezing-Verhalten trat erst im Verlauf der Tonpräsentation auf (Abb. 3.11 und Abb. 3.12, Mitte). Beides deutet auf eine unveränderte Schmerzwahrnehmung des Fußschocks hin. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die akute Schmerzschwelle bezüglich eines elektrischen Fußschocks, wie er auch für die Konditionierung verwendet wurde, bei den cGKI-rescue Tieren nicht vermindert war (Abb. 3.9). Zusammenfassend bestätigen die Daten, dass das verringerte Freezing-Verhalten der cGKI-rescue Tiere aus einem selektiven Defekt des Amygdala-abhängigen Gedächtnisses hervorgeht und nicht auf einer beeinträchtigten Verarbeitung der Ton-/Schock-Stimuli beruht.

Bei der Durchführung der Angstkonditionierung ist zu berücksichtigen, dass neben den assoziativen Gedächtniskomponenten auch nicht-assoziative Anteile entstehen, welche das Angstverhalten der Tiere beeinflussen können (Kamprath and Wotjak, 2004). Diese nicht-assoziative Komponente wird durch das aversive Erlebnis des Fußschocks hervorgerufen und spiegelt sich im generellen Angstverhalten der Tiere wider. Dieses Phänomen, das als Sensitisierung bezeichnet wird, kann sich auf das Freezing-Verhalten während der Angstkonditionierung auswirken. Um zu ermitteln, inwiefern die nicht-assoziative Komponente zu der verringerten Freezing-Reaktion der cGKI-rescue Tiere beiträgt, wurde das Angstverhalten dieser Mauslinie nach einer Sensitisierung mittels Fußschock untersucht. Dabei zeigte sich interessanterweise, dass sensitisierte cGKI-rescue Tiere mit einer gleich starken Angstantwort auf den Ton wie ihre Kontrollen reagierten (Abb. 3.13). Daher ist davon auszugehen, dass die nicht-assoziative Komponente nach einer Fußschock-Konditionierung bei cGKI-rescue Tieren und ihren Kontrollen in gleichem Maße

zur Freezing-Reaktion beiträgt. Folglich unterstützt dieser Befund die Annahme, dass die cGKI selektiv für die Bildung eines assoziativen Gedächtnisses in der Amygdala von Bedeutung ist.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse der Angstkonditionierung darauf hin, dass die cGKI-defizienten Tiere ein normales kontextuelles Gedächtnis ausbilden, jedoch ein selektives Defizit im assoziativen auditorischen Angstlernen aufweisen. Die Daten weisen ferner darauf hin, dass die cGKI einen Einfluss auf die Mechanismen der Konsolidierung, das heißt, der Umwandlung des Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis, besitzt. Damit stellt die cGKI ein wichtiges Downstream-Element des NO/cGMP-Signalwegs für die Konsolidierung des assoziativen Angstgedächtnisses und der synaptischen Plastizität in der LA dar.

#### **4.4 CREB-Phosphorylierung als möglicher cGKI-vermittelter Signaltransduktionsmechanismus**

Eine Fülle von Daten belegt, dass sowohl die Konsolidierung als auch die Rekonsolidierung des Angstgedächtnisses von der RNA- und Proteinbiosynthese in der Amygdala abhängen (Impey et al., 1998; Schafe et al., 1999; Schafe and LeDoux, 2000; Hall et al., 2001; Lin et al., 2001; Stanciu et al., 2001; Wei et al., 2002; Han et al., 2007; Duvarci et al., 2008). Eine wesentliche Rolle scheint dabei der Transkriptionsfaktor CREB zu spielen, welchem generell eine wichtige Funktion für das Langzeitgedächtnis und die synaptische Plastizität zugeschrieben wird (zur Übersicht siehe Lamprecht, 1999). Interessanterweise konnte bereits ein Zusammenhang zwischen der NO/cGMP/cGK-Signalkaskade und neuronaler Transkription gezeigt werden (Lu et al., 1999; Lu and Hawkins, 2002; Nagai-Kusuhara et al., 2007). Diese Studien demonstrieren, dass die Paradigmen der LTP-Induktion im Hippocampus über einen NO/cGMP/cGK-vermittelten Mechanismus zur Phosphorylierung von CREB führen (Lu et al., 1999; Lu and Hawkins, 2002).

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit liefern einen Hinweis, dass auch in der Amygdala eine cGKI-vermittelte Transkription stattfinden kann. Die Ergebnisse indizieren, dass eine Aktivierung der cGKI in einer erhöhten CREB-Phosphorylierung in der LA resultiert (Abb. 3.14). Da dieser Effekt in Präparaten von cGKI-KO ausblieb, ist davon auszugehen, dass es sich tatsächlich um einen cGKI-vermittelten Mechanismus handelt.



Eine Kreuzaktivierung der PKA oder anderer cGMP-Effektoren (wie z. B. CNG-Kanäle oder cGKII) ist daher auszuschließen. Eine anschließende CREB-abhängige Transkription stellt einen potentiellen Mechanismus dar, über welchen die NO/cGMP/cGKI-Signalkaskade modulierend auf die Gedächtniskonsolidierung in der Amygdala Einfluss nehmen könnte.

Darüberhinaus liefert dieses Experiment ein weiteres Indiz dafür, dass die cGKI auch an postsynaptischen Prozessen beteiligt ist, was durch die Expressionsdaten dieser Arbeit ebenfalls suggeriert wird. Allerdings bleiben die genauen Mechanismen, wie es im Detail zur cGKI-vermittelten CREB-Aktivierung kommt, noch unklar.

Zum einen wäre die Möglichkeit einer direkten Aktivierung von CREB gegeben, da CREB eine Phosphorylierungsstelle für die cGKI *in vitro* besitzt (Colbran et al., 1992). In Zellkulturversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass die cGKI direkt mit CREB interagiert und somit zur Transkription führt (Gudi et al., 1996; Gudi et al., 2000). Für diesen Mechanismus wäre eine nukleäre Translokation der cGKI notwendig. Die Datenlage dazu ist jedoch kontrovers: während einige Arbeitsgruppen eine Translokation in den Zellkern nachweisen konnten (Gudi et al., 1996; Gudi et al., 2000; Casteel et al., 2008; Sugiura et al., 2008), schließen andere Autoren diese Möglichkeit aus (Collins and Uhler, 1999; Browning et al., 2001; Feil et al., 2002). Es ist auch noch nicht gezeigt, dass diese Interaktion in neuronalem Gewebe stattfindet.

Eine weitere Möglichkeit stellt die indirekte Aktivierung von CREB dar. Die Arbeit von Lu and Hawkins (2002) demonstriert, dass es zur cGMP-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern über Aktivierung von Ryanodinrezeptoren kommt. Diese Ryanodinrezeptoren öffnen sich durch Bindung ihres endogenen Liganden zyklische ADP-Ribose (cADPR). Die cADPR-Konzentration kann durch den NO/cGMP/cGKI-Signalweg gesteigert werden, da die cADP-Ribozyklase ein Substrat der cGKI darstellt (Galione et al., 1993; Willmott et al., 2000). Die Öffnung von Ryanodinrezeptoren bewirkt eine langanhaltende Amplifizierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals in der postsynaptischen Zelle, was eine Voraussetzung für die CREB-Phosphorylierung darstellt (Bito et al., 1996; Deisseroth et al., 1996). Durch den Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration können weitere Proteinkinasen aktiviert werden, welche dann schließlich zur CREB-Phosphorylierung führen. So wurde durch Schafe et al. (2000) gezeigt, dass die durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aktivierte ERK/MAPK-Transduktion wesentlich zur Gedächtniskonsolidierung in der Amygdala beiträgt, vermutlich über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB. Interessanterweise konnte in der kürzlich erschienenen Arbeit von Ota et al. (2008) ebenfalls gezeigt werden, dass der NO/cGMP/cGKI-Signalweg eine Aktivierung von ERK/MAP-Kinase in der Amygdala induziert. Auf diese Weise kann eine CREB-abhängige Transkription ausgelöst und das

Angstgedächtnis konsolidiert werden. Die Aktivität von CREB in einzelnen Neuronen entscheidet maßgeblich, ob diese Zellen in den neuronalen Schaltkreis während der Angstkonditionierung eingebunden werden (Han et al., 2007). Mit einer CREB-abhängigen Transkription steht ein potentieller Mechanismus zur Verfügung, mit welchem der NO/cGMP/cGKI-Signalweg in den Neuronen der LA eine Konsolidierung des Angstgedächtnisses und die zugrundeliegende synaptische Plastizität in der Amygdala vermitteln kann.

Allerdings sind noch weitere Experimente notwendig, um die Mechanismen der NO/cGMP/cGK-Signalkaskade und ihre Effektoren in der Amygdala zu identifizieren. Die hier gezeigten Daten stellen lediglich ein Indiz für eine cGKI-vermittelte Transkription via CREB dar, da nur die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors untersucht wurde. Um diesen Mechanismus hinreichend abzusichern, muss vielmehr nachgewiesen werden, dass es durch diese Signaltransduktion auch tatsächlich zur Genexpression in den LA-Neuronen kommt. Ein weiterer interessanter Punkt wäre zu untersuchen, ob der NO/cGMP/cGKI-Signalweg auch *in vivo*, z. B. nach einer Angstkonditionierung, zur CREB-abhängigen Transkription und damit zur Konsolidierung in der Amygdala führt. Ein entsprechender Befund würde letztendlich eine Beteiligung der cGKI bei dem sogenannten „*synapse to nucleus-signaling*“ (Deisseroth et al., 1996) unterstützen und die Rolle der cGKI für die Gedächtniskonsolidierung festigen.

## 5 Zusammenfassung

Zahlreiche Arbeiten in der Literatur unterstützen die Hypothese, dass aktivitätsabhängige Änderungen der synaptischen Übertragung die Grundlage von Lernen und Gedächtnis bilden. Dabei stellt das Paradigma der Pawlowschen Angstkonditionierung ein geeignetes Modell dar, mit welchem die zugrundeliegenden synaptischen Mechanismen untersucht werden können (zur Übersicht siehe Sigurdsson et al., 2007). Die entscheidende Rolle für diese assoziative Form des Lernens spielt die Amygdala, in welcher die verschiedenen sensorischen Informationen während der Konditionierung konvergieren (LeDoux, 2000; Maren, 2001). Der NO/cGMP-Signalweg gilt als ein wichtiger molekularer Mechanismus für die neuronale Modulation (Schuman and Madison, 1994; Feil and Kleppisch, 2008). Auch für die synaptische Plastizität in der Amygdala hat dieser Signalweg eine Bedeutung. So konnte gezeigt werden, dass die Entstehung des Botenstoffs NO in der Amygdala in die Bildung eines Angstgedächtnisses involviert ist (Schafe et al., 2005; Sato et al., 2006). Ein wichtiger Downstream-Effektor des NO/cGMP-Signals ist die cGK. Diese Proteinkinase wird durch zwei Gene kodiert, aus welchen die cGK Typ I und II hervorgehen. Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der cGK Typ I für die Bildung eines assoziativen Gedächtnisses und der zugrundeliegenden synaptischen Plastizität zu untersuchen. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden verschiedene cGKI-defiziente Mausmodelle herangezogen.

Zunächst konnte mit Hilfe von Expressionsanalysen gezeigt werden, dass die cGKI $\beta$ -Isoform in den Neuronen der LA in hoher Konzentration vorliegt. Anhand der Daten lassen sich sowohl prä- als auch postsynaptische Funktionen der cGKI in der Amygdala vermuten. Desweiteren wurde die funktionelle Bedeutung der cGKI für die synaptische Plastizität in der LA mit elektrophysiologischen Methoden ermittelt. Dabei zeigte sich, dass cGKI-defizienten Tiere ein Defizit in der LTP sowohl im thalamischen als auch im kortikalen Input zur LA besitzen. Diese Ergebnisse implizieren eine unterstützende Funktion der cGKI für die synaptische Plastizität in der LA.

Es wird angenommen, dass die Bildung eines Angstgedächtnisses während der Angstkonditionierung das Verhaltenskorrelat zu diesen zellulären Veränderungen während der LTP-Induktion darstellt (Blair et al., 2001; Schafe et al., 2001; Sigurdsson et al., 2007). Konditionierungsversuche mit cGKI-defizienten Tieren ergaben einen selektiven Defekt der Konsolidierung des auditorischen Angstgedächtnisses. Interessanterweise wirkte sich der cGKI-Verlust nur auf das auditorische Langzeitgedächtnis aus; das Kurzzeitgedächtnis blieb unbeeinflusst, wie auch das Hippocampus-abhängige kontextuelle Gedächtnis. Die

Konditionierungsversuche wurden schließlich durch eine umfangreiche Verhaltens-Charakterisierung der verwendeten Mauslinie abgerundet. Dabei waren die grundlegenden Verhaltensparameter bei den cGKI-defizienten Tieren unverändert. Insgesamt legen die Daten dieser Arbeit eine kritische Rolle der cGKI für langanhaltende Veränderungen der synaptischen Plastizität in der LA sowie für die Konsolidierung eines assoziativen Angstgedächtnisses dar.

Abschließend wurde ein möglicher molekularer Mechanismus für die beobachteten Effekte der cGKI in der Amygdala untersucht. Der Transkriptionsfaktor CREB spielt eine wesentliche Rolle für Lern- und Gedächtnisprozesse (Dash et al., 1990; Silva et al., 1998) und wird auch in der Amygdala exprimiert (Bourtchuladze et al., 1994). Es sollte geprüft werden, inwiefern der NO/cGMP/cGKI-Signalweg zu einer Aktivierung von CREB in der LA beiträgt. Mit den Untersuchungen konnten Hinweise auf eine cGKI-vermittelte CREB-Phosphorylierung in der LA erzielt werden. Die Frage, inwiefern sich der cGKI-vermittelten CREB-Aktivierung in der Amygdala auch eine Transkription anschließt, bleibt allerdings noch offen. Schließlich sind weitere Experimente notwendig, um zu klären, ob eine Transkription in der Amygdala über den NO/cGMP/cGKI-Signalweg auch während der Angstkonditionierung stattfindet und auf diesem Wege der Gedächtniskonsolidierung dienen kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen die Rolle der cGKI Typ I $\beta$  als Effektor der NO/cGMP-vermittelten synaptischen Plastizität und des Angstgedächtnisses in der Amygdala. Es wurde zum ersten Mal mit Hilfe genetischer Mausmodelle gezeigt, dass die cGKI eine Funktion für die LTP in der LA und die Gedächtniskonsolidierung besitzt. Abgesehen von den Hinweisen auf eine CREB-abhängige Transkription bleiben die cGKI-vermittelten Mechanismen jedoch noch unbekannt. Weitere Untersuchungen zu dieser Fragestellung werden das Verständnis für die zellulären und molekularen Prozesse von assoziativem Lernen und Gedächtnis vertiefen.

## 6 Anhang

### 6.1 Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 2.1: Proteinase K-Puffer</i> .....	21
<i>Tab. 2.2: 10 x PCR-Puffer</i> .....	21
<i>Tab. 2.3: Primersequenzen für cGKI-KO-Genotypisierung</i> .....	22
<i>Tab. 2.4: Primersequenzen für SM22-I<math>\alpha</math>- Genotypisierung</i> .....	22
<i>Tab. 2.5: PCR-Ansatz für cGKI-KO- Genotypisierung</i> .....	22
<i>Tab. 2.6: PCR-Ansatz für SM22-I<math>\alpha</math>-Genotypisierung</i> .....	22
<i>Tab. 2.7: PCR-Programme für die Genotypisierungen</i> .....	23
<i>Tab. 2.8: 10x TBE- Puffer</i> .....	23
<i>Tab. 2.9: 6x DNS- Auftragspuffer</i> .....	24
<i>Tab. 2.10: PBS, pH 7,4</i> .....	25
<i>Tab. 2.11: Fixierlösung</i> .....	25
<i>Tab. 2.12: Antigen-Retrieval-Puffer pH 6,0</i> .....	27
<i>Tab. 2.13: Lysis-Puffer, pH 7,4</i> .....	30
<i>Tab. 2.14: 4x Tris-HCl/SDS, pH 6,8</i> .....	31
<i>Tab. 2.15: 4x Tris-HCl/SDS, pH 8,8</i> .....	31
<i>Tab. 2.16: Polyacrylamid-Trenngel 10%</i> .....	31
<i>Tab. 2.17: Polyacrylamid-Sammelgel</i> .....	31
<i>Tab. 2.18: 10x SDS-Elektrophorese-Laufpuffer</i> .....	32
<i>Tab. 2.19: 6x SDS-Probenpuffer</i> .....	32
<i>Tab. 2.20: Blotting-Lösungen</i> .....	33
<i>Tab. 2.21: 10x TBS, pH 8,2</i> .....	33
<i>Tab. 2.22: 1x TBST</i> .....	33
<i>Tab. 2.23: Phasen der Angstkonditionierung</i> .....	40
<i>Tab. 6.1: Verwendete primäre Antikörper</i> .....	92
<i>Tab. 6.2: Verwendete sekundäre Antikörper</i> .....	92

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1.1: Lage der Amygdala</i> .....	4
<i>Abb. 1.2: Anordnung und Verschaltung der Kerne der Amygdala</i> .....	6
<i>Abb. 1.3: Neuronaler Schaltkreis während der Angstkonditionierung</i> .....	8
<i>Abb. 1.4: Schematisches Modell der Struktur der cGKI<math>\alpha</math> und <math>\beta</math> Isoform</i> .....	14
<i>Abb. 2.1: Modell einer cGKI<math>\alpha</math> rescue Maus und Zuchtschema</i> .....	20
<i>Abb. 2.2: Strukturformel von 8-Br-cGMP</i> .....	29
<i>Abb. 2.3: Anordnung von Reiz- und Ableitelektrode bei Feldpotentialmessungen in der lateralen Amygdala</i> .....	36
<i>Abb. 2.4: 100 Hz-Tetanus zur Induktion einer Langzeit-Potenzierung in der Amygdala</i> .....	37
<i>Abb. 2.5: Beispiel eines abgeleiteten Feldpotentials</i> .....	38
<i>Abb. 2.6: Modell der 2-Komponenten-Theorie bei der Angstkonditionierung:</i> .....	41
<i>Abb. 2.7: Konditionierungsprotokolle</i> .....	42
<i>Abb. 2.8: Aufbau des Open Fields</i> .....	43
<i>Abb. 2.9: Aufbau des Elevated Plus Mazes</i> .....	44
<i>Abb. 2.10: Aufbau der Light-Dark Box</i> .....	45
<i>Abb. 3.1: Immunhistochemischer Nachweis der cGKI in der lateralen Amygdala</i> .....	48
<i>Abb. 3.2: Western Blots mit Isoform-spezifischen Antikörpern</i> .....	50
<i>Abb. 3.3: Western Blot und Immunhistochemische Untersuchung der cGKI-rescue Maus</i> .....	51
<i>Abb. 3.4: Basale synaptische Transmission in der lateralen Amygdala</i> .....	53
<i>Abb. 3.5: Langzeitpotenzierung in der lateralen Amygdala</i> .....	54
<i>Abb. 3.6: Ergebnisse des Open Field Tests</i> .....	58
<i>Abb. 3.7: Ergebnisse des Tests im Elevated Plus Maze</i> .....	59
<i>Abb. 3.8: Ergebnisse in der Light-Dark Box</i> .....	60
<i>Abb. 3.9: Bestimmung der Schmerzschwelle</i> .....	62
<i>Abb. 3.10: Ergebnisse der Angstkonditionierung mit Protokoll 1</i> .....	64
<i>Abb. 3.11: Ergebnisse der Angstkonditionierung mit Protokoll 2</i> .....	65
<i>Abb. 3.12: Ergebnisse der Angstkonditionierung mit Protokoll 3</i> .....	67
<i>Abb. 3.13: Ergebnisse der Sensitisierung mit cGKI-rescue Tieren</i> .....	68
<i>Abb. 3.14: Immunhistochemische Färbung von pCREB<sup>+</sup>-Zellkernen in der Amygdala von cGKI-KO und cGKI-ctr nach cGMP-Applikation</i> .....	70

### 6.3 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µA	Mikroamper
µl	Mikroliter
µs	Mikrosekunden
8-Br-cGMP	8-Bromo-Guanosin-3',5'-zyklisches Monophosphat
AB	akzessorisch basaler Kern der Amygdala
Abb.	Abbildung
ACSF	„ <i>artificial cerebrospinale fluid</i> “ = artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit
APS	Ammoniumpersulfat
B	basaler Kern der Amygdala
BLA	basolateraler Kern der Amygdala
BSA	Rinderserumalbumin
CE	zentraler Kern der Amygdala
cGKI	zyklisches Guanosinmonophosphat- abhängige Proteinkinase Typ I
cGKII	zyklisches Guanosinmonophosphat- abhängige Proteinkinase Typ II
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
CS	„ <i>conditioned stimulus</i> “ = konditionierter Reiz
ctr	Kontroll-Tiere
d	Tag
DAB	Diaminobenzidin
dB	Dezibel
DTT	Dithiothreitol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'- Desoxynukleosid-5'-triphosphat
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EPM	<i>elevated plus maze</i>
EtOH	Ethanol
FA	Formaldehyd

---

FP	Feldpotential
g	Gramm
h	Stunde/ Stunden
HRP	„ <i>horseradish peroxidase</i> “ = Meerrettich-peroxidase
Hz	Hertz
I	interkalierender Kern der Amygdala
IOR	<i>input- output- relation</i>
IRAG	IP <sub>3</sub> -Rezeptor-assoziiertes-cGMP-Kinase-Substratprotein
k	Kilo-
LA	lateraler Kern der Amygdala
LAd	dorsolateraler Kern der Amygdala
LAv	ventrolateraler Kern der Amygdala
LTD	„ <i>long-term depression</i> “ = Langzeit-Depression
LTP	„ <i>long-term potentiation</i> “ = Langzeit-Potenzierung
mg	Milligramm
Min	Minute/ Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
PAGE	Polyacrylamid Gel-Elektrophorese
PBS	„ <i>phosphate buffered saline</i> “ = Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	„ <i>polymerase chain reaction</i> “ = Polymerase-Kettenreaktion
PPF	„ <i>paired-pulse facilitation</i> “
PVC	Polyvinylchlorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TA	„transit area“ = Übergangsbereich vom Thalamus zur Amygdala
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	„ <i>tris buffered saline</i> “ = <i>Tris-gepufferte Salzlösung</i>
TBST	TBS mit Tween® 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	$\alpha,\alpha,\alpha$ -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin



---

U	Unit
ü. N.	über Nacht
US	„ <i>unconditioned stimulus</i> “ = unconditionierter Reiz
WT	Wild-Typ
x g	-fache Erdbeschleunigung

## 6.4 Verwendete Antikörper

Name	Wirt	Verdünnung	Herkunft
cGKIcommon	Kaninchen	1:200 für Western Blot 1:50 für IHC	Prof. F. Hofmann
cGKI $\alpha$ (sc-10335)	Ziege	1:500 für Western Blot	Santa Cruz Biotechnology
cGKI $\beta$ (sc-10342)	Ziege	1:500 für Western Blot	Santa Cruz Biotechnology
cGKII (sc-25430)	Kaninchen	1:1000 für Western Blot	Santa Cruz Biotechnology
$\beta$ -actin	Kaninchen	1:50 000 für Western Blot	Abcam
pCREB <sup>Serin133</sup> (06-519)	Kaninchen	1:1000 für IHC	Upstate

Tab. 6.1: Verwendete primäre Antikörper

Name	Wirt	Verdünnung	Herkunft
anti-rabbit IgG, HRP-konjugiert	Ziege	1:2000 für Western Blot	Cell Signaling
anti-goat IgG, HRP-konjugiert	Esel	1:2000 für Western Blot	Santa Cruz Biotechnology
anti-rabbit IgG, biotinyliert	Ziege	1:200 für IHC	Vector Laboratories

Tab. 6.2: Verwendete sekundäre Antikörper

## 7 Literaturverzeichnis

### 7.1 Zitierte Veröffentlichungen

- Amorapanth P, LeDoux JE and Nader K (2000) Different lateral amygdala outputs mediate reactions and actions elicited by a fear-arousing stimulus. *Nat Neurosci* **3**:74-79.
- Amorapanth P, Nader K and LeDoux JE (1999) Lesions of periaqueductal gray dissociate-conditioned freezing from conditioned suppression behavior in rats. *Learn Mem* **6**:491-499.
- Antonova I, Arancio O, Trillat AC, Wang HG, Zablow L, Udo H, Kandel ER and Hawkins RD (2001) Rapid increase in clusters of presynaptic proteins at onset of long-lasting potentiation. *Science* **294**:1547-1550.
- Arancio O, Antonova I, Gambaryan S, Lohmann SM, Wood JS, Lawrence DS and Hawkins RD (2001) Presynaptic role of cGMP-dependent protein kinase during long-lasting potentiation. *J Neurosci* **21**:143-149.
- Arancio O, Kandel ER and Hawkins RD (1995) Activity-dependent long-term enhancement of transmitter release by presynaptic 3',5'-cyclic GMP in cultured hippocampal neurons. *Nature* **376**:74-80.
- Armony JL, Quirk GJ and LeDoux JE (1998) Differential effects of amygdala lesions on early and late plastic components of auditory cortex spike trains during fear conditioning. *J Neurosci* **18**:2592-2601.
- Bechara A, Tranel D, Damasio H, Adolphs R, Rockland C and Damasio AR (1995) Double dissociation of conditioning and declarative knowledge relative to the amygdala and hippocampus in humans. *Science* **269**:1115-1118.
- Bito H, Deisseroth K and Tsien RW (1996) CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca(2+)- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell* **87**:1203-1214.
- Blair HT, Schafe GE, Bauer EP, Rodrigues SM and LeDoux JE (2001) Synaptic plasticity in the lateral amygdala: a cellular hypothesis of fear conditioning. *Learn Mem* **8**:229-242.
- Bliss TV and Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**:31-39.
- Bliss TV and Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* **232**:331-356.
- Bolshakov VY and Siegelbaum SA (1995) Regulation of hippocampal transmitter release during development and long-term potentiation. *Science* **269**:1730-1734.
- Bourtchuladze R, Frenquelli B, Blendy J, Cioffi D, Schutz G and Silva AJ (1994) Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* **79**:59-68.
- Browning DD, Mc Shane M, Marty C and Ye RD (2001) Functional analysis of type 1alpha cGMP-dependent protein kinase using green fluorescent fusion proteins. *J Biol Chem* **276**:13039-13048.
- Burette A, Zabel U, Weinberg RJ, Schmidt HH and Valtschanoff JG (2002) Synaptic localization of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the hippocampus. *J Neurosci* **22**:8961-8970.
- Campeau S and Davis M (1995) Involvement of the central nucleus and basolateral complex of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli. *J Neurosci* **15**:2301-2311.

- Casteel DE, Zhang T, Zhuang S and Pilz RB (2008) cGMP-dependent protein kinase anchoring by IRAG regulates its nuclear translocation and transcriptional activity. *Cell Signal* **20**:1392-1399.
- Chien WL, Liang KC, Teng CM, Kuo SC, Lee FY and Fu WM (2003) Enhancement of long-term potentiation by a potent nitric oxide-guanylyl cyclase activator, 3-(5-hydroxymethyl-2-furyl)-1-benzyl-indazole. *Mol Pharmacol* **63**:1322-1328.
- Chien WL, Liang KC, Teng CM, Kuo SC, Lee FY and Fu WM (2005) Enhancement of learning behaviour by a potent nitric oxide-guanylate cyclase activator YC-1. *Eur J Neurosci* **21**:1679-1688.
- Citri A and Malenka RC (2008) Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* **33**:18-41.
- Colbran JL, Roach PJ, Fiol CJ, Dixon JE, Andrisani OM and Corbin JD (1992) cAMP-dependent protein kinase, but not the cGMP-dependent enzyme, rapidly phosphorylates delta-CREB, and a synthetic delta-CREB peptide. *Biochem Cell Biol* **70**:1277-1282.
- Collins DR and Pare D (2000) Differential fear conditioning induces reciprocal changes in the sensory responses of lateral amygdala neurons to the CS(+) and CS(-). *Learn Mem* **7**:97-103.
- Collins SP and Uhler MD (1999) Cyclic AMP- and cyclic GMP-dependent protein kinases differ in their regulation of cyclic AMP response element-dependent gene transcription. *J Biol Chem* **274**:8391-8404.
- Dash PK, Hochner B and Kandel ER (1990) Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of Aplysia sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature* **345**:718-721.
- Deisseroth K, Bito H and Tsien RW (1996) Signaling from synapse to nucleus: postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity. *Neuron* **16**:89-101.
- Duvarci S, Nader K and LeDoux JE (2008) De novo mRNA synthesis is required for both consolidation and reconsolidation of fear memories in the amygdala. *Learn Mem* **15**:747-755.
- EI-Husseini AE, Williams J, Reiner PB, Pelech S and Vincent SR (1999) Localization of the cGMP-dependent protein kinases in relation to nitric oxide synthase in the brain. *J Chem Neuroanat* **17**:45-55.
- Feil R, Gappa N, Rutz M, Schlossmann J, Rose CR, Konnerth A, Brummer S, Kuhbandner S and Hofmann F (2002) Functional reconstitution of vascular smooth muscle cells with cGMP-dependent protein kinase I isoforms. *Circ Res* **90**:1080-1086.
- Feil R, Hofmann F and Kleppisch T (2005a) Function of cGMP-dependent protein kinases in the nervous system. *Rev Neurosci* **16**:23-41.
- Feil R and Kleppisch T (2008) NO/cGMP-dependent modulation of synaptic transmission. *Handb Exp Pharmacol*:529-560.
- Feil S, Zimmermann P, Knorn A, Brummer S, Schlossmann J, Hofmann F and Feil R (2005b) Distribution of cGMP-dependent protein kinase type I and its isoforms in the mouse brain and retina. *Neuroscience* **135**:863-868.
- Galione A, White A, Willmott N, Turner M, Potter BV and Watson SP (1993) cGMP mobilizes intracellular Ca<sup>2+</sup> in sea urchin eggs by stimulating cyclic ADP-ribose synthesis. *Nature* **365**:456-459.
- Geiselhoring A, Gaisa M, Hofmann F and Schlossmann J (2004) Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues. *FEBS Lett* **575**:19-22.
- Grosse R, Copeland JW, Newsome TP, Way M and Treisman R (2003) A role for VASP in RhoA-Diaphanous signalling to actin dynamics and SRF activity. *Embo J* **22**:3050-3061.
- Gudi T, Casteel DE, Vinson C, Boss GR and Pilz RB (2000) NO activation of fos promoter elements requires nuclear translocation of G-kinase I and CREB phosphorylation but is independent of MAP kinase activation. *Oncogene* **19**:6324-6333.
- Gudi T, Chen JC, Casteel DE, Seasholtz TM, Boss GR and Pilz RB (2002) cGMP-dependent protein kinase inhibits serum-response element-dependent transcription by inhibiting rho activation and functions. *J Biol Chem* **277**:37382-37393.

- Gudi T, Huvar I, Meinecke M, Lohmann SM, Boss GR and Pilz RB (1996) Regulation of gene expression by cGMP-dependent protein kinase. Transactivation of the c-fos promoter. *J Biol Chem* **271**:4597-4600.
- Haghikia A, Mergia E, Friebe A, Eysel UT, Koesling D and Mittmann T (2007) Long-term potentiation in the visual cortex requires both nitric oxide receptor guanylyl cyclases. *J Neurosci* **27**:818-823.
- Hall J, Thomas KL and Everitt BJ (2001) Fear memory retrieval induces CREB phosphorylation and Fos expression within the amygdala. *Eur J Neurosci* **13**:1453-1458.
- Han JH, Kushner SA, Yiu AP, Cole CJ, Matynia A, Brown RA, Neve RL, Guzowski JF, Silva AJ and Josselyn SA (2007) Neuronal competition and selection during memory formation. *Science* **316**:457-460.
- Hawkins RD, Son H and Arancio O (1998) Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus. *Prog Brain Res* **118**:155-172.
- Hawkins RD, Zhuo M and Arancio O (1994) Nitric oxide and carbon monoxide as possible retrograde messengers in hippocampal long-term potentiation. *J Neurobiol* **25**:652-665.
- Hofmann F, Ammendola A and Schlossmann J (2000) Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci* **113 ( Pt 10)**:1671-1676.
- Hofmann F, Feil R, Kleppisch T and Schlossmann J (2006) Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev* **86**:1-23.
- Huang EP (1997) Synaptic plasticity: a role for nitric oxide in LTP. *Curr Biol* **7**:R141-143.
- Huang YY and Kandel ER (1998) Postsynaptic induction and PKA-dependent expression of LTP in the lateral amygdala. *Neuron* **21**:169-178.
- Huang YY, Li XC and Kandel ER (1994) cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis-dependent late phase. *Cell* **79**:69-79.
- Huang YY, Martin KC and Kandel ER (2000) Both protein kinase A and mitogen-activated protein kinase are required in the amygdala for the macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation. *J Neurosci* **20**:6317-6325.
- Impey S, Mark M, Villacres EC, Poser S, Chavkin C and Storm DR (1996) Induction of CRE-mediated gene expression by stimuli that generate long-lasting LTP in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* **16**:973-982.
- Impey S, Smith DM, Obrietan K, Donahue R, Wade C and Storm DR (1998) Stimulation of cAMP response element (CRE)-mediated transcription during contextual learning. *Nat Neurosci* **1**:595-601.
- Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH and Cammarota M (2006) Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci* **29**:496-505.
- Jungling K, Seidenbecher T, Sosulina L, Lesting J, Sangha S, Clark SD, Okamura N, Duangdao DM, Xu YL, Reinscheid RK and Pape HC (2008) Neuropeptide S-mediated control of fear expression and extinction: role of intercalated GABAergic neurons in the amygdala. *Neuron* **59**:298-310.
- Kamprath K and Wotjak CT (2004) Nonassociative learning processes determine expression and extinction of conditioned fear in mice. *Learn Mem* **11**:770-786.
- Killcross S, Robbins TW and Everitt BJ (1997) Different types of fear-conditioned behaviour mediated by separate nuclei within amygdala. *Nature* **388**:377-380.
- Kleppisch T, Pfeifer A, Klatt P, Ruth P, Montkowski A, Fassler R and Hofmann F (1999) Long-term potentiation in the hippocampal CA1 region of mice lacking cGMP-dependent kinases is normal and susceptible to inhibition of nitric oxide synthase. *J Neurosci* **19**:48-55.
- Kleppisch T, Wolfsgruber W, Feil S, Allmann R, Wotjak CT, Goebbels S, Nave KA, Hofmann F and Feil R (2003) Hippocampal cGMP-dependent protein kinase I supports an age- and protein synthesis-dependent component of long-term potentiation but is not essential for spatial reference and contextual memory. *J Neurosci* **23**:6005-6012.

- LaBar KS, Gatenby JC, Gore JC, LeDoux JE and Phelps EA (1998) Human amygdala activation during conditioned fear acquisition and extinction: a mixed-trial fMRI study. *Neuron* **20**:937-945.
- LaBar KS, LeDoux JE, Spencer DD and Phelps EA (1995) Impaired fear conditioning following unilateral temporal lobectomy in humans. *J Neurosci* **15**:6846-6855.
- Lamprecht R (1999) CREB: a message to remember. *Cell Mol Life Sci* **55**:554-563.
- Lamprecht R, Farb CR and LeDoux JE (2002) Fear memory formation involves p190 RhoGAP and ROCK proteins through a GRB2-mediated complex. *Neuron* **36**:727-738.
- Lamprecht R, Farb CR, Rodrigues SM and LeDoux JE (2006a) Fear conditioning drives profilin into amygdala dendritic spines. *Nat Neurosci* **9**:481-483.
- Lamprecht R and LeDoux J (2004) Structural plasticity and memory. *Nat Rev Neurosci* **5**:45-54.
- Lamprecht R, Margulies DS, Farb CR, Hou M, Johnson LR and LeDoux JE (2006b) Myosin light chain kinase regulates synaptic plasticity and fear learning in the lateral amygdala. *Neuroscience* **139**:821-829.
- LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* **23**:155-184.
- LeDoux JE, Cicchetti P, Xagoraris A and Romanski LM (1990a) The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J Neurosci* **10**:1062-1069.
- LeDoux JE, Farb C and Ruggiero DA (1990b) Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. *J Neurosci* **10**:1043-1054.
- Lin CH, Yeh SH, Lin CH, Lu KT, Leu TH, Chang WC and Gean PW (2001) A role for the PI-3 kinase signaling pathway in fear conditioning and synaptic plasticity in the amygdala. *Neuron* **31**:841-851.
- Liu S, Fa M, Ninan I, Trinchese F, Dauer W and Arancio O (2007) Alpha-synuclein involvement in hippocampal synaptic plasticity: role of NO, cGMP, cGK and CaMKII. *Eur J Neurosci* **25**:3583-3596.
- Liu S, Ninan I, Antonova I, Battaglia F, Trinchese F, Narasanna A, Kolodilov N, Dauer W, Hawkins RD and Arancio O (2004) alpha-Synuclein produces a long-lasting increase in neurotransmitter release. *Embo J* **23**:4506-4516.
- Lu YF and Hawkins RD (2002) Ryanodine receptors contribute to cGMP-induced late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. *J Neurophysiol* **88**:1270-1278.
- Lu YF, Kandel ER and Hawkins RD (1999) Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. *J Neurosci* **19**:10250-10261.
- Malinow R, Schulman H and Tsien RW (1989) Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* **245**:862-866.
- Malinow R and Tsien RW (1990) Presynaptic enhancement shown by whole-cell recordings of long-term potentiation in hippocampal slices. *Nature* **346**:177-180.
- Maren S (2001) Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci* **24**:897-931.
- Maren S, Aharonov G and Fanselow MS (1996) Retrograde abolition of conditional fear after excitotoxic lesions in the basolateral amygdala of rats: absence of a temporal gradient. *Behav Neurosci* **110**:718-726.
- Maren S and Quirk GJ (2004) Neuronal signalling of fear memory. *Nat Rev Neurosci* **5**:844-852.
- Mascagni F, McDonald AJ and Coleman JR (1993) Corticoamygdaloid and corticocortical projections of the rat temporal cortex: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study. *Neuroscience* **57**:697-715.
- McDonald AJ (1998) Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol* **55**:257-332.
- McKernan MG and Shinnick-Gallagher P (1997) Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro. *Nature* **390**:607-611.
- Milner B, Squire LR and Kandel ER (1998) Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* **20**:445-468.
- Monzon ME, Varas MM and De Barioglio SR (2001) Anxiogenesis induced by nitric oxide synthase inhibition and anxiolytic effect of melanin-concentrating hormone (MCH) in rat brain. *Peptides* **22**:1043-1047.
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JN and O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* **297**:681-683.

- Nagai-Kusuhara A, Nakamura M, Mukuno H, Kanamori A, Negi A and Seigel GM (2007) cAMP-responsive element binding protein mediates a cGMP/protein kinase G-dependent anti-apoptotic signal induced by nitric oxide in retinal neuro-glial progenitor cells. *Exp Eye Res* **84**:152-162.
- Nguyen PV and Kandel ER (1996) A macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation requiring cAMP in the medial perforant pathway of rat hippocampal slices. *J Neurosci* **16**:3189-3198.
- Ota KT, Pierre VJ, Ploski JE, Queen K and Schafe GE (2008) The NO-cGMP-PKG signaling pathway regulates synaptic plasticity and fear memory consolidation in the lateral amygdala via activation of ERK/MAP kinase. *Learn Mem* **15**:792-805.
- Paul C, Schoberl F, Weinmeister P, Micale V, Wotjak CT, Hofmann F and Kleppisch T (2008) Signaling through cGMP-dependent protein kinase I in the amygdala is critical for auditory-cued fear memory and long-term potentiation. *J Neurosci* **28**:14202-14212.
- Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, Ny L, Sausbier M, Hirneiss C, Wang GX, Korth M, Aszodi A, Andersson KE, Krombach F, Mayerhofer A, Ruth P, Fassler R and Hofmann F (1998) Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *Embo J* **17**:3045-3051.
- Pfeifer A, Ruth P, Dostmann W, Sausbier M, Klatt P and Hofmann F (1999) Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **135**:105-149.
- Phelps EA, LaBar KS and Spencer DD (1997) Memory for emotional words following unilateral temporal lobectomy. *Brain Cogn* **35**:85-109.
- Phelps EA, O'Connor KJ, Gatenby JC, Gore JC, Grillon C and Davis M (2001) Activation of the left amygdala to a cognitive representation of fear. *Nat Neurosci* **4**:437-441.
- Pitkanen A, Savander V and LeDoux JE (1997) Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci* **20**:517-523.
- Ploski JE, Pierre VJ, Smucny J, Park K, Monsey MS, Overeem KA and Schafe GE (2008) The activity-regulated cytoskeletal-associated protein (Arc/Arg3.1) is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning in the lateral amygdala. *J Neurosci* **28**:12383-12395.
- Quirk GJ, Armony JL and LeDoux JE (1997) Fear conditioning enhances different temporal components of tone-evoked spike trains in auditory cortex and lateral amygdala. *Neuron* **19**:613-624.
- Quirk GJ, Reppas C and LeDoux JE (1995) Fear conditioning enhances short-latency auditory responses of lateral amygdala neurons: parallel recordings in the freely behaving rat. *Neuron* **15**:1029-1039.
- Reppas JC, Muller J, Apergis J, Desrochers TM, Zhou Y and LeDoux JE (2001) Two different lateral amygdala cell populations contribute to the initiation and storage of memory. *Nat Neurosci* **4**:724-731.
- Rodrigues SM, Schafe GE and LeDoux JE (2004) Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala. *Neuron* **44**:75-91.
- Rogan MT, Staubli UV and LeDoux JE (1997) Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature* **390**:604-607.
- Romanski LM, Clugnet MC, Bordi F and LeDoux JE (1993) Somatosensory and auditory convergence in the lateral nucleus of the amygdala. *Behav Neurosci* **107**:444-450.
- Romanski LM and LeDoux JE (1993) Information cascade from primary auditory cortex to the amygdala: corticocortical and corticoamygdaloid projections of temporal cortex in the rat. *Cereb Cortex* **3**:515-532.
- Ruth P, Landgraf W, Keilbach A, May B, Egleme C and Hofmann F (1991) The activation of expressed cGMP-dependent protein kinase isozymes I alpha and I beta is determined by the different amino-termini. *Eur J Biochem* **202**:1339-1344.
- Sacchetti B, Lorenzini CA, Baldi E, Tassoni G and Bucherelli C (1999) Auditory thalamus, dorsal hippocampus, basolateral amygdala, and perirhinal cortex role in the

- consolidation of conditioned freezing to context and to acoustic conditioned stimulus in the rat. *J Neurosci* **19**:9570-9578.
- Sato T, Suzuki E, Yokoyama M, Watanabe S and Miyaoka H (2006) Auditory fear conditioning and conditioned stress raise NO(3) level in the Amygdala. *Neuropsychobiology* **53**:142-147.
- Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Smolenski A, Lohmann SM, Bertoglio J, Chardin P, Pacaud P and Loirand G (2000) Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca<sup>2+</sup> sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* **275**:21722-21729.
- Schafe GE, Atkins CM, Swank MW, Bauer EP, Sweatt JD and LeDoux JE (2000) Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning. *J Neurosci* **20**:8177-8187.
- Schafe GE, Bauer EP, Rosis S, Farb CR, Rodrigues SM and LeDoux JE (2005) Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning requires nitric oxide signaling in the lateral amygdala. *Eur J Neurosci* **22**:201-211.
- Schafe GE and LeDoux JE (2000) Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. *J Neurosci* **20**:RC96.
- Schafe GE, Nadel NV, Sullivan GM, Harris A and LeDoux JE (1999) Memory consolidation for contextual and auditory fear conditioning is dependent on protein synthesis, PKA, and MAP kinase. *Learn Mem* **6**:97-110.
- Schafe GE, Nader K, Blair HT and LeDoux JE (2001) Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. *Trends Neurosci* **24**:540-546.
- Schmidtko A, Gao W, Konig P, Heine S, Motterlini R, Ruth P, Schlossmann J, Koesling D, Niederberger E, Tegeder I, Friebe A and Geisslinger G (2008) cGMP produced by NO-sensitive guanylyl cyclase essentially contributes to inflammatory and neuropathic pain by using targets different from cGMP-dependent protein kinase I. *J Neurosci* **28**:8568-8576.
- Schmidtko A, Ruth P, Geisslinger G and Tegeder I (2003) Inhibition of cyclic guanosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase I (PKG-I) in lumbar spinal cord reduces formalin-induced hyperalgesia and PKG upregulation. *Nitric Oxide* **8**:89-94.
- Schuman EM and Madison DV (1994) Nitric oxide and synaptic function. *Annu Rev Neurosci* **17**:153-183.
- Schwab MH, Bartholomae A, Heimrich B, Feldmeyer D, Druffel-Augustin S, Goebbels S, Naya FJ, Zhao S, Frotscher M, Tsai MJ and Nave KA (2000) Neuronal basic helix-loop-helix proteins (NEX and BETA2/Neuro D) regulate terminal granule cell differentiation in the hippocampus. *J Neurosci* **20**:3714-3724.
- Sigurdsson T, Doyere V, Cain CK and LeDoux JE (2007) Long-term potentiation in the amygdala: a cellular mechanism of fear learning and memory. *Neuropharmacology* **52**:215-227.
- Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW and Kida S (1998) CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* **21**:127-148.
- Silva AJ, Stevens CF, Tonegawa S and Wang Y (1992) Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* **257**:201-206.
- Son H, Hawkins RD, Martin K, Kiebler M, Huang PL, Fishman MC and Kandel ER (1996) Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. *Cell* **87**:1015-1023.
- Stanciu M, Radulovic J and Spiess J (2001) Phosphorylated cAMP response element binding protein in the mouse brain after fear conditioning: relationship to Fos production. *Brain Res Mol Brain Res* **94**:15-24.
- Stork O and Pape HC (2002) Fear memory and the amygdala: insights from a molecular perspective. *Cell Tissue Res* **310**:271-277.
- Sugiura T, Nakanishi H and Roberts JD, Jr. (2008) Proteolytic processing of cGMP-dependent protein kinase I mediates nuclear cGMP signaling in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **103**:53-60.



- Tegeder I, Del Turco D, Schmidtko A, Sausbier M, Feil R, Hofmann F, Deller T, Ruth P and Geisslinger G (2004) Reduced inflammatory hyperalgesia with preservation of acute thermal nociception in mice lacking cGMP-dependent protein kinase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:3253-3257.
- Tegeder I, Schmidtko A, Niederberger E, Ruth P and Geisslinger G (2002) Dual effects of spinally delivered 8-bromo-cyclic guanosine mono-phosphate (8-bromo-cGMP) in formalin-induced nociception in rats. *Neurosci Lett* **332**:146-150.
- Tronson NC and Taylor JR (2007) Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nat Rev Neurosci* **8**:262-275.
- Turner BH and Herkenham M (1991) Thalamoamygdaloid projections in the rat: a test of the amygdala's role in sensory processing. *J Comp Neurol* **313**:295-325.
- Wang HG, Lu FM, Jin I, Udo H, Kandel ER, de Vente J, Walter U, Lohmann SM, Hawkins RD and Antonova I (2005) Presynaptic and postsynaptic roles of NO, cGK, and RhoA in long-lasting potentiation and aggregation of synaptic proteins. *Neuron* **45**:389-403.
- Wang X and Robinson PJ (1997) Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system. *J Neurochem* **68**:443-456.
- Watanabe Y, Saito H and Abe K (1995) Nitric oxide is involved in long-term potentiation in the medial but not lateral amygdala neuron synapses in vitro. *Brain Res* **688**:233-236.
- Weber S, Bernhard D, Lukowski R, Weinmeister P, Worner R, Wegener JW, Valtcheva N, Feil S, Schlossmann J, Hofmann F and Feil R (2007) Rescue of cGMP kinase I knockout mice by smooth muscle specific expression of either isozyme. *Circ Res* **101**:1096-1103.
- Wegener JW, Nawrath H, Wolfsgruber W, Kuhbandner S, Werner C, Hofmann F and Feil R (2002) cGMP-dependent protein kinase I mediates the negative inotropic effect of cGMP in the murine myocardium. *Circ Res* **90**:18-20.
- Wei F, Qiu CS, Liauw J, Robinson DA, Ho N, Chatila T and Zhuo M (2002) Calcium calmodulin-dependent protein kinase IV is required for fear memory. *Nat Neurosci* **5**:573-579.
- Willmott NJ, Wong K and Strong AJ (2000) A fundamental role for the nitric oxide-G-kinase signaling pathway in mediating intercellular Ca(2+) waves in glia. *J Neurosci* **20**:1767-1779.
- Xue J, Wang X, Malladi CS, Kinoshita M, Milburn PJ, Lengyel I, Rostas JA and Robinson PJ (2000) Phosphorylation of a new brain-specific septin, G-septin, by cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **275**:10047-10056.
- Zhuo M, Hu Y, Schultz C, Kandel ER and Hawkins RD (1994) Role of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation. *Nature* **368**:635-639.
- Zhuo M, Small SA, Kandel ER and Hawkins RD (1993) Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus. *Science* **260**:1946-1950.
- Zucker RS (1989) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* **12**:13-31.

## 7.2 Eigene Publikationen

### Abstracts

Paul C., Weinmeister P., Christel C., Moosmang S., Feil R., Hofmann F., Kleppisch T. (2007) cGMP-dependent kinase I supports formation of associative fear memory and long-term potentiation in the lateral amygdala, 48. Frühjahrstagung der DGPT, Mainz, Germany

Paul C., Weinmeister P., Feil R., Hofmann F., Kleppisch T. (2007) cGMP-dependent Kinase I Supports Formation of Associative Fear Memory and Long-term Potentiation in the Lateral Amygdala, 3rd International Conference on cGMP Generators, Effectors and Therapeutic Implications, Dresden, Germany

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

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

### Originalarbeiten

Paul C, Schoberl F, Weinmeister P, Micale V, Wotjak CT, Hofmann F and Kleppisch T (2008) Signaling through cGMP-dependent protein kinase I in the amygdala is critical for auditory-cued fear memory and long-term potentiation. *J Neurosci* **28**:14202-14212.

## 8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Kleppisch ganz herzlich für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit und seine engagierte Unterstützung bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit ganz wesentlich beigetragen haben.

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

Prof. Dr. Biel möchte ich für die unkomplizierte Übernahme der Betreuung und die Vertretung vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU danken.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mit ihrer Unterstützung zu dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere Pascal Weinmeister und Robert Lukowski für die Tierzucht, Frau Günther-Blab für die Hilfe im Tierhaus sowie Ulla, Sabine und Teodora für ihre Unterstützung in jeglichen Laborangelegenheiten.

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

Auch möchte ich mich bei Lucas, Ulla und Carl für die vielen Kaffeerunden in unserem Büro und „Schwätzchen“ im Labor bedanken.

Zu guter Letzt bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern, die mir bisher in jeder Lebenslage beigestanden sind und durch deren liebevolle Unterstützung dies alles erst möglich war.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Cindy Paul  
Anschrift: Schleißheimer Straße 188  
80797 München  
Geburtsdatum/-ort: 22. Mai 1981, Temeschburg  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulische Ausbildung:

1987 – 1991 Grundschule Heilbronn-Biberach  
1991 – 2000 Elly-Heuss-Knapp-Gymnasium Heilbronn

### Studium:

10/2000 – 09/2004 Studium der Pharmazie an der Karls-Ruprecht-Universität Heidelberg

### Pharmaziepraktikum:

11/2004 – 04/2005 Rosenapotheke München  
05/2005 – 10/2005 Hexal AG, Holzkirchen  
01/2006 Approbation als Apothekerin

### Promotion:

Ab 02/2006 Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München, Thema „Rolle der cGMP-abhängigen Proteinkinase Typ I für das Angstgedächtnis und die synaptische Plastizität in der lateralen Amygdala“