

Aus dem
CharitéCentrum für Grundlagenmedizin (CC2)
Institut für Neurophysiologie
Direktor Prof. Dr. rer. nat. Jörg R. P. Geiger

Habilitationsschrift

Glutamat-Rezeptoren und synaptische Plastizität in der lateralen Amygdala

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Physiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

Von

Dr. rer. nat. Christine Gebhardt

Eingereicht: Dezember 2018

Dekan: Prof. Dr. Axel R. Pries

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hans-Christian Pape, Münster

2. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Draguhn, Heidelberg

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

1. Einleitung

- 1.1. Amygdala und Furcht
- 1.2. Synaptische Plastizität in der lateralen Amygdala
- 1.3. Eigenschaften ionotroper Glutamat-Rezeptoren
- 1.4. TRP (transient receptor potential)-Rezeptoren im ZNS

2. Eigene Arbeiten

- 2.1. Erste Publikation: An der Induktion von LTP und LTD in der LA sind sowohl die NMDA-Rezeptor Untereinheiten NR2A als auch NR2B beteiligt.
- 2.2. Zweite Publikation: Die AMPA-Rezeptor Untereinheiten GluA1 und GluA3 haben Afferenz-abhängige Funktionen bei LA-LTP und Furchtkonditionierung.
- 2.3. Dritte Publikation: Capsaicin-induzierte Veränderungen der LA-LTP durch Aktivierung von TRPV1-Rezeptoren.
- 2.4. Vierte Publikation: Eine neue Form der Capsaicin-induzierten Modulation der LA-LTP wird durch Aktivierung von TRPM1-Rezeptoren vermittelt.
- 2.5. Fünfte Publikation: Die Glutamat-Rezeptor Untereinheit GluA1 ist an der Capsaicin-induzierten Modulation der LA-LTP, jedoch nicht der LA-LTD beteiligt.

3. Diskussion

- 3.1. Funktionelle Bedeutung einzelner Glutamat-Rezeptor Untereinheiten bei synaptischer Plastizität und Furchtkonditionierung in der LA
- 3.2. Modulation synaptischer Plastizität durch Aktivierung von TRP Kanälen

4. Zusammenfassung

5. Literaturangaben

6. Eidesstattliche Erklärung

Abkürzungen

AMPA α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionsäure

CA1-3 Cornu ammonis (Area 1-3)

cAMP Zyklisches Adenosinmonophosphat

CaMKII Ca^{2+} - Calmodulin-Kinase II

EC Caspsula externa

ECTx Entorhinaler Cortex

EPSP Exzitatorisches postsynaptisches Potenzial

GABA γ -Aminobuttersäure

HFS Hochfrequenz-Stimulation (high frequency stimulation)

IPSP Inhibitorisches postsynaptisches Potenzial

LA laterale Amygdala

LFS Niederfrequenz-Stimulation (low frequency stimulation)

LTD Langzeitdepression

LTP Langzeitpotenzierung

NMDA N-Methyl-D-Aspartat

NOS Stickstoffmonoxid-Synthetase

TARP transmembranäres AMPA-Rezeptor-regulierenden Protein

TRP Transientes Rezeptor Potenzial

VGCC Spannungsgesteuerte Calciumkanäle (voltage-gated calcium channels)

ZNS Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Amygdala und Furcht

Die Fähigkeit, Umweltreize adäquat zu bewerten und angemessen zu reagieren, ist für alle Spezies eine grundlegende Voraussetzung, um in einer sich ständig verändernden Umgebung zu überleben. Je nachdem, ob ein Reiz positiv zu bewerten ist, und z. B. die Befriedigung körperlicher Bedürfnisse in Aussicht stellt, oder negativ zu bewerten ist und auf eine Bedrohung hindeutet, werden verschiedene neuronale Systeme aktiviert. Handelt es sich um ein bedrohliches Ereignis, können bestimmte spezies-spezifische Reaktionen wie Erstarren oder Flucht, die Freisetzung von Stresshormonen sowie Veränderungen im autonomen Nervensystem die Folge sein (Fanselow, 1994; LeDoux, 2000; Blanchard et al., 2005). Die Gesamtheit dieser Ereignisse wird auch als Furchtreaktion bezeichnet.¹ Neben einer angeborenen Furchtreaktion (innate fear response), die bei Mäusen z.B. durch den Geruch von Fuchsurin ausgelöst werden kann (Rosen et al., 2015; Wallace and Rosen, 2000), kann eine Furchtreaktion auch erlernt werden, wenn ein neutraler Reiz mit einem unkontingierten Reiz assoziiert wird. Pharmakologische und Läsionsexperimente an Nagern zeigten, dass in den neuronalen Netzwerken, die bei der Furchtreaktion aktiviert werden, die Amygdala eine zentrale Rolle spielt (Davis, 1997; LeDoux, 1998; Wallace and Rosen, 2001; Fanselow and Kim, 1994). Die Amygdala ist eine heterogene Ansammlung morphologisch und funktionell unterschiedlicher, subcortical gelegener Hirnkerne, die untereinander komplex verschaltet und durch ein ausgedehntes Netzwerk mit verschiedenen anderen Hirnregionen verbunden sind (Pitkanen et al., 1997; Swanson and Petrovich, 1998). Ein geeignetes tierexperimentelles Modell, um Lernprozesse bei Furcht (fear learning) zu untersuchen, ist die Pavlovsche Furchtkonditionierung (Maren and Fanselow, 1996; LeDoux, 2000; Davis, 1997). Bei der Furchtkonditionierung wird dem Versuchstier ein anfänglich neutraler Reiz (conditioned stimulus, CS), z.B. ein Ton (auditorische

¹ Um in diesem Zusammenhang eine klare sprachliche Abgrenzung von Furcht als Emotion zu erreichen, schlägt LeDoux vor, statt „Furchtreaktion“ den Begriff „Bedrohungsreaktion“ zu verwenden (LeDoux, 2014). In der hier vorliegenden Arbeit wird der Terminus „Furcht“ gebraucht, um die Reaktion auf eine Bedrohung und nicht, um einen emotionalen Zustand zu beschreiben.

Furchtkonditionierung) gemeinsam mit einem aversiven Reiz (unconditioned stimulus, US), z.B. einem milden Fußschock präsentiert. Als Folge eines Lernprozesses kann eine Furchtreaktion auch dann auftreten, wenn der neutrale Reiz allein präsentiert wird (Fendt and Fanselow, 1999). Mit dem experimentellen Tiermodell der Furchtkonditionierung ließ sich nicht nur das Phänomen der Furchtreaktion experimentell erfassen, es gilt auch als geeignetes Modell, um neuronale Mechanismen von Lernen und Gedächtnis zu untersuchen (Sah et al., 2008; LeDoux, 2000). Bei der Furchtkonditionierung spielt insbesondere der basolaterale Kernkomplex der Amygdala (basolaterale Amygdala, BLA), bestehend aus dem lateralen (LA), dem basolateralen (BL) und dem basomedialen Kern (BM) und der zentrale Kern (CeA) eine entscheidende Rolle (LeDoux et al., 1990a; Maren et al., 1996; Campeau and Davis, 1995). Die BLA ist eine cortex-ähnliche Struktur, die zu etwa 80% aus glutamatergen Projektionsneuronen und zu etwa 20 % aus GABAergen Interneuronen besteht, jedoch keine für den Cortex typische Schichtung aufweist (McDonald, 1982b; Sah et al., 2003). Die CeA kann in den medialen (CeAm) und den lateralen (CeAl) Teil untergliedert werden (Krettek and Price, 1978) und besteht ähnlich wie das Striatum überwiegend aus mittelgroßen GABAergen Projektionsneuronen mit zahlreichen Dornfortsätzen (medium spiny neurons) (McDonald, 1982a; Swanson and Petrovich, 1998). Zudem existiert eine weitere Gruppe hochspezialisierter GABAerger Interneurone (Intercalated cell masses, ICM), die sich zwischen BLA und CeA befinden (Millhouse, 1986; Pare and Smith, 1993). Die sensorischen Informationen über den CS und den US konvergieren hauptsächlich in der LA, die eine Art Eingangsstation des neuronalen Schaltkreises der Furchtkonditionierung darstellt (Romanski et al., 1993; Romanski and LeDoux, 1992). Dort findet die Assoziation der beiden Stimuli statt, ein Lernvorgang, der sich auf zellulärer Ebene als aktivitätsabhängige synaptische Plastizität beschreiben lässt (Fanselow and LeDoux, 1999).

1.2. Synaptische Plastizität in der lateralen Amygdala

Als synaptische Plastizität wird die Fähigkeit zweier Neurone mit gemeinsamen Kontaktstellen (Synapsen) bezeichnet, die Übertragungsstärke von präsynaptisch nach postsynaptisch zu verändern. Formen synaptischer Plastizität sind die Langzeitpotenzierung (LTP), eine aktivitätsabhängige

dauerhafte Verstärkung der synaptischen Effizienz, sowie die Langzeitdepression (LTD), eine aktivitätsabhängige andauernde Abschwächung der synaptischen Effizienz. Der Zusammenhang zwischen synaptischer Plastizität und Lern- und Gedächtnisprozessen wurde schon 1894 von Ramon Cajal vermutet (Cajal, 1894) und die LTP weist Eigenschaften auf, die sie zu einem passenden zellulären Modell für Gedächtnisbildung macht (Bliss and Collingridge, 1993; Maren and Baudry, 1995).

Der erste experimentelle Nachweis einer LTP wurde 1973 im Hippocampus eines anästhesierten Kaninchens beschrieben. Die im Gyrus Dentatus (GD) gemessene evozierte Antwort war nach einer mehrere Sekunden dauernden hochfrequenten Stimulation (100 Hz Tetanus) des im entorhinalen Cortex entspringendem Fasertraktes (Tractus perforans) über Stunden erhöht, was als Folge einer verstärkten synaptischen Transmission interpretiert wurde (Bliss and Lomo, 1973). Aus ihren Beobachtungen zogen Bliss und Lomo Schlussfolgerungen für einen potenziellen Mechanismus von Gedächtnisprozessen: "Our experiments show that there exists at least one group of synapses in the hippocampus whose efficiency is influenced by activity which may have occurred several hours previously - a time scale long enough to be potentially useful for information storage." (Bliss and Lomo, 1973).

In den darauffolgenden Jahren konnte gezeigt werden, dass an dieser, wie auch an anderen exzitatorischen Synapsen im Hippocampus, der Neurotransmitter Glutamat² freigesetzt wird (Storm-Mathisen, 1977; Storm-Mathisen and Iversen, 1979; Watkins and Evans, 1981), der postsynaptisch verschiedene ligandengesteuerte Ionenkanäle öffnet, ionotrope Glutamat-Rezeptoren, die entsprechend ihren Agonisten in NMDA- und nicht-NMDA-Rezeptoren (AMPA- und Kainat-Rezeptoren) kategorisiert wurden (Watkins and Evans, 1981). Kurze Zeit später fand Graham Collingridge heraus, dass die durch eine hochfrequente Reizung (100 Hz für eine Sekunde) der aus

² Jüngere Ergebnisse deuten darauf hin, dass an der Moosfaser-CA3-Pyramidenzellsynapse neben Glutamat entwicklungs- und aktivitätsabhängig auch GABA freigesetzt werden kann (Gutierrez, 2000; Gutierrez and Heinemann, 2001; Gutierrez, 2002).

der Area CA3 stammenden Fasern (Schaffer-Kollateralen) und der aus dem kontralateralen Hippocampus stammenden Fasern (Kommissurenfasern) induzierte LTP an hippocampalen CA1 Neuronen durch den selektiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten 2-Amino-5-phosphonovaleriansäure (5-APV) reversibel geblockt werden kann. Die basale synaptische Transmission war in Gegenwart von APV vollkommen intakt³, konnte jedoch durch Nicht NMDA-Rezeptor Antagonisten geblockt werden (Collingridge et al. 1983a; Collingridge et al. 1983b). Die Interpretation dieser Ergebnisse führte zu einer Klassifikation der ionotropen Glutamat-Rezeptoren nach ihrer Rolle bei der LTP: Während die NMDA-Rezeptoren bei der LTP-Induktion eine Rolle spielen, wird von den Nicht-NMDA-Rezeptoren auch unter Nicht-Induktionsbedingungen die postsynaptische Rezeptorantwort vermittelt. Nach der Entdeckung, dass der NMDA-Rezeptor nicht nur ein ligandengesteuerter Ionenkanal ist, sondern sein Leitwert auch vom Membranpotenzial abhängt⁴, konnte nun ein molekularer Mechanismus für eine „Hebbsche Synapse“⁵ präsentiert werden: Während der präsynaptischen Stimulation wird ausreichend Glutamat freigesetzt, um postsynaptische Nicht-NMDA-Rezeptoren so stark zu aktivieren, das die postsynaptische Depolarisation groß genug wird, die Aufhebung des Mg²⁺-Blocks der NMDA-Rezeptoren zu bewirken. In der Folge kann Ca²⁺ über den geöffneten NMDA-Rezeptor in die Zelle einströmen, was Ereignisse auslöst, die zu einer LTP-Induktion und -Expression führen. Der NMDA-Rezeptor spielt dabei die Rolle des Koinzidenzdetektors von prä- und postsynaptischer Aktivität (Collingridge and Singer, 1990; Bliss and Collingridge, 1993)⁶.

³ da die NMDA-Rezeptoren durch Mg²⁺-Ionen blockiert werden (Coan and Collingridge, 1985).

⁴ In Nähe des Ruhemembranpotenzials ist der Leitwert des NMDA-Rezeptors gering, da der Ionenkanal durch ein Mg²⁺ Ion blockiert ist. Dieser Mg²⁺-Block wird bei Depolarisation aufgehoben (Nowak et al., 1984; Mayer et al., 1984).

⁵ Der kanadische Neuropsychologe Donald Hebb postulierte in seinem Buch „The Organization of Behaviour“ dass eine Verstärkung der synaptischen Effizienz die gleichzeitige Aktivität des prä- und des postsynaptischen Neurons voraussetzt. Synapsen, an denen diese koinzidente Aktivität auftritt, wurden in der Folge als Hebbsche Synapsen bezeichnet (Hebb, 1949).

⁶ Die für eine LTP-Induktion notwendige Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺ -Konzentration (Lynch et al., 1977) und die ebenfalls notwendige postsynaptische Depolarisation (Malinow and Miller, 1986; Wigstrom et al., 1986) muss nicht notwendigerweise über die Aktivierung der NMDA-Rezeptors erfolgen. Entsprechend dem Induktionsmechanismus kann eine LTP in NMDA-Rezeptor-abhängig oder in NMDA-Rezeptor-unabhängig unterteilt werden.

Die Signalkaskaden, die der Aktivierung der NMDA-Rezeptoren nachgeschaltet sind und zu einer LTP führen, beinhalten die Aktivierung verschiedener Proteinkinasen. Die wichtigste Proteinkinase ist die Ca²⁺-Calmodulin- Kinase II (CaMKII) (Lisman, 1994). Wird die CaMKII pharmakologisch inhibiert oder das verantwortliche Gen ausgeschaltet, kann eine LTP nicht mehr induziert werden (Malenka et al., 1989;Malinow et al., 1989;Silva et al., 1992). Eine Aktivierung der CaMKII hingegen potenziert die synaptische Transmission (Lledo et al., 1995;Pettit et al., 1994).

Auch bei der LTD gibt es verschiedene Induktionsmechanismen, die sich in NMDA-Rezeptor-abhängig und NMDA-Rezeptor-unabhängig unterteilen lassen (Collingridge et al., 2010;Malenka and Bear, 2004). Für die Induktion einer LTD ist im Unterschied zur Induktion einer LTP ein moderater Anstieg der intrazellulären Ca²⁺ - Konzentration notwendig (Yang et al., 1999), der zu einer Aktivierung von Proteinphosphatasen führt (Mulkey et al., 1993;Mulkey et al., 1994).

Synaptische Plastizität wie LTP oder LTD gibt es in nahezu allen Hirnregionen⁷, wengleich die zu Grunde liegenden Mechanismen am intensivsten im Hippocampus untersucht wurden. Nachdem in der Amygdala erstmals 1983 eine LTP beschrieben wurde (Racine et al. 1983) , konnte - abhängig vom Stimulationsprotokoll und den stimulierten Afferenzen - sowohl eine NMDA-Rezeptor-abhängige als auch NMDA-Rezeptor-unabhängige Induktion von LTP und LTD *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden.⁸ Ein besonderes Interesse galt den glutamatergen Afferenzen aus Thalamus und Cortex, die mit den Projektionsneuronen der LA Synapsen bilden (Farb et al., 1992;LeDoux et al., 1991;LeDoux et al., 1990b). Eine Reihe von experimentellen Befunden untermauerte die Hypothese, dass die glutamaterge LTP an diesen Synapsen ein der Furchtkonditionierung zu Grunde liegender Mechanismus ist (Maren, 1999;Blair et al., 2001): Zum einen konnte gezeigt werden, dass

⁷ In den vergangenen Jahrzehnten wurden die zellulären Mechanismen synaptischer Plastizität ausgiebig untersucht und eine Vielzahl verschiedener, z.T. für bestimmte Synapsen spezifische Regulationsmechanismen beschrieben (Larsen and Sjostrom, 2015).

⁸ Neben einer NMDA-Rezeptor-abhängigen LTP-Induktion (Gean et al., 1993;Maren and Fanselow, 1995;Huang and Kandel, 1998), konnte eine LTP durch Aktivierung spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle (Bauer et al., 2002;Fourcaudot et al., 2009) oder Aktivierung metabotroper Glutamat-Rezeptoren der Gruppe I (Lee et al., 2002) induziert werden. LTD konnte durch Aktivierung von NMDA-Rezeptoren L-Typ Ca²⁺-Kanälen oder metabotrope Glutamat-Rezeptoren der Gruppe II induziert werden (Kaschel et al., 2004;Tchekalarova and Albrecht, 2007).

Furchtkonditionierung bei Ratten zu einer Verstärkung der synaptischen Transmission bei diesen Synapsen führt, was sowohl in vivo (Rogan et al., 1997), als auch post mortem in Hirnschnittpräparaten (McKernan and Shinnick-Gallagher, 1997) nachgewiesen wurde. Andererseits kann eine Inhibition von NMDA-Rezeptoren in der LA sowohl die LTP als auch die Furchtkonditionierung beeinträchtigen.

1.3. Eigenschaften ionotroper Glutamat-Rezeptoren

Projektionsneurone der LA exprimieren AMPA-, NMDA- und metabotrope Glutamat-Rezeptoren (Rainnie et al., 1991; Farb et al., 1995; Farb and LeDoux, 1997).

Funktionelle NMDA-Rezeptoren bilden Heterotetramere (Laube et al., 1998), die auf vielfältige Art und Weise aus den verschiedenen Untereinheiten GluN1, GluN2 und GluN3 zusammengesetzt sind und deren Eigenschaften von ihrer Zusammensetzung abhängig sind. Die GluN1-Untereinheit wird durch ein einzelnes Gen kodiert, tritt aber in verschiedenen Splicevarianten auf. Weiterhin gibt es vier verschiedene GluN2-Untereinheiten (GluN2A-2D), die durch vier verschiedene Gene kodiert werden, sowie zwei verschiedene GluN3- (3A und 3B) Untereinheiten (Cull-Candy et al., 2001; Paoletti et al., 2013). Die Mehrheit der NMDA-Rezeptoren im ZNS sind aus zwei GluN1 und zwei GluN2 Untereinheiten zusammengesetzt.⁹ Die GluN1-Untereinheiten sind ubiquitär im Gehirn verbreitet (Monyer et al., 1994), enthalten die Bindungsstelle für den Ko-Agonisten Glycin (Kuryatov et al., 1994; Wafford et al., 1995; Williams et al., 1996) und sind für die Bildung der Kanalpore notwendig. Die GluN2-Untereinheiten enthalten die Bindungsstelle für Glutamat (Laube et al., 1997; Anson et al., 1998), bestimmen die kinetischen Eigenschaften des Stroms, der durch die NMDA-Rezeptoren vermittelt wird und sind in verschiedenen Hirnregionen unterschiedlich und entwicklungspezifisch exprimiert (Monyer et al., 1994). In der Amygdala sind neben GluN1- vor allem GluN2A- und GluN2B-Untereinheiten exprimiert (Lopez de Armentia and Sah, 2003; Delaney et al., 2013)¹⁰. In

⁹ Zur Rolle der NR3- Untereinheit wird auf den Übersichtsartikel (Low and Wee, 2010; Pacherneegg et al., 2012) verwiesen.

¹⁰ Die NR2C-Untereinheit scheint bei der Furchtkonditionierung eine Rolle zu spielen (Ogden et al., 2014; Hillman et al., 2011)

rekombinanten GluN1/GluN2B-Rezeptoren ist die Desensibilisierung im Vergleich zu GluN1/GluN2A-Rezeptoren verlangsamt (Vicini et al., 1998;Monyer et al., 1992), was auf unterschiedliche Funktionen der Rezeptoruntereinheiten bei der Induktion synaptischer Plastizität hindeuten könnte.

Die Familie der AMPA-Rezeptoren umfasst vier Untereinheiten (GluA1-GluA4), die sich zu Tetrameren zusammenlagern¹¹ (Rosenmund et al., 1998;Mano and Teichberg, 1998). Nach den derzeitigen Vorstellungen kann jede der einzelnen Untereinheiten des Tetramers ein Glutamat-Molekül binden und unabhängig agieren (Howe et al., 2001;Gebhardt and Cull-Candy, 2006;Dutta-Roy et al., 2015;Greger et al., 2017). Die biophysikalischen Eigenschaften der AMPA-Rezeptoren werden maßgeblich durch die Untereinheiten bestimmt. Eine besondere Rolle spielt die GluA2 Untereinheit, bei der durch eine posttranskriptionelle Veränderung (RNA Editing) statt eines Arginins ein Glutamin in die Porenregion des Ionenkanals eingebaut wird. Dies hat zur Folge, dass AMPA-Rezeptoren, die keine oder eine nicht editierte GluA2 Untereinheit enthalten, einen höheren Leitwert und eine höhere Ca^{2+} Permeabilität besitzen sowie bei positiven Membranpotenzialen intrazellulär durch Polyamine inhibiert werden können (Kamboj et al., 1995;Koh et al., 1995;Jonas and Burnashev, 1995;Verdoorn et al., 1991;Bowie and Mayer, 1995;Geiger et al., 1995).

Die Eigenschaften der AMPA-Rezeptoren und ihre physiologische Funktion sind nicht ausschließlich durch die Zusammensetzung der Untereinheiten bestimmt, sondern werden durch eine Reihe auxiliärer Proteine moduliert, zu denen u.a. die TARPs (transmembrane AMPA receptor regulatory proteins) gehören (Straub and Tomita, 2012;Tomita et al., 2003;Sager et al., 2009;Milstein and Nicoll, 2008;Greger et al., 2017;Jackson and Nicoll, 2011) und die mit den AMPA-Rezeptoren sogenannte AMPAR-Komplexe bilden, wobei die Expressionsmuster der auxiliären Proteine in verschiedenen Hirnregionen stark variieren (Tomita et al., 2003;Fukaya et al., 2005;Schwenk et al., 2014). Obwohl die Regulation der zellspezifischen Expression und die genauen zellulären Funktionen der auxiliären

¹¹ Welche Untereinheiten sich zu Tetrameren zusammenlagern, wird vor allem von der N-terminalen Domäne bestimmt (Rossmann et al., 2011).

Proteine sind noch nicht vollständig aufgeklärt sind, gibt es kaum Zweifel daran, dass die auxiliären Proteine bei der Regulation der synaptischen Transmission eine wichtige Rolle spielen.

LTP und LTD können sowohl durch präsynaptische als auch durch postsynaptische Mechanismen reguliert werden. Neben aktivitätsabhängigen Modifizierungen biophysikalischer Eigenschaften der AMPA-Rezeptoren z.B. durch Phosphorylierung (Benke et al., 1998; Benke and Traynelis, 2018), stellt der aktivitätsabhängige Ein- bzw. Ausbau von AMPA-R in individuellen Synapsen den wichtigsten postsynaptische Mechanismus dar (Derkach et al., 2007; Brecht and Nicoll, 2003; Malinow and Malenka, 2002), der komplex reguliert ist.

1.4. TRP (transient receptor potential)-Rezeptoren im ZNS

TRP-Kanäle bilden eine Superfamilie nichtselektiver Kationenkanäle, die bei Säugetieren in die sechs Unterfamilien TRPA, TRPC, TRPM, TRPV, TRPP und TRPML unterteilt wird (Nilius et al., 2007; Nilius and Szallasi, 2014). Das prominenteste Mitglied dieser Familie ist der TRPV1-Rezeptor, der durch Capsaicin aktiviert wird und daher auch als Capsaicin-Rezeptor bezeichnet wurde (Caterina et al., 1997). Eine Aktivierung des TRPV1-Rezeptors wird außerdem durch Temperaturen oberhalb von 43°C, durch Änderungen des pH-Wertes (Dhaka et al., 2009) sowie durch verschiedene endogene Substanzen ausgelöst, z.B. durch Anandamid¹² (N-arachidonoyl ethanolamine), 2-Arachidonoylglycerol, N-arachidonoyl dopamine, N-oleoyldopamine, ATP, Abbauprodukte der Lipoxigenase sowie Monoacylglycerol (Aguiar et al., 2014). Die nozizeptive Funktion des TRPV1-Rezeptors ist in peripheren Fasern und in Neuronen des Rückenmarks gut untersucht (Jardin et al., 2017; Moore et al., 2018). In den vergangenen Jahren wurde gezeigt, dass der TRPV1-Rezeptor auch in verschiedenen Hirnregionen exprimiert ist,^{13,14} wobei vermutet wird, dass eine Aktivierung von

¹² Anandamid ist ein Endocannabinoid, welches auch den CB1-Rezeptor aktiviert. Mögliche funktionelle Bedeutungen der Aktivierung dieser beiden Rezeptoren durch die gleichen Liganden wurden in verschiedenen Hirnregionen untersucht (Casarotto et al., 2012; Moreira et al., 2012; Terzian et al., 2009).

¹³ Eine genaue Auflistung, in welchen Hirnregionen TRPV1-Rezeptoren nachgewiesen wurde, ist in den Übersichtsartikeln zu finden (Aguiar et al., 2014; Martins et al., 2014).

¹⁴ TRPV1-Rezeptoren wurden auch in Astrozyten (Nam et al., 2015) und Mikroglia (Marrone et al., 2017) nachgewiesen und scheinen eine Rolle bei Neuroinflammation zu spielen.

TRPV1-Rezeptoren bei der Reaktion auf Stress eine Rolle spielen könnte. So zeigten Mäuse mit genetischer Elimination der TRPV1-Rezeptoren weniger Stresssymptome und eine verminderte Furchtkonditionierung (Marsch et al., 2007). Eine systemische Applikation des TRPV1-Rezeptor-Antagonisten Capsazepin in Ratten zeigte eine anxiolytische Wirkung (Kasckow et al., 2004). Obwohl die zu Grunde liegenden zellulären und molekularen Mechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt sind, scheinen TRPV1-Rezeptoren in die Regulation anxiogener Antworten involviert zu sein.

2. Eigene Arbeiten

Schwerpunkt der hier vorgestellten Publikationen sind elektrophysiologische Untersuchungen der glutamatergen synaptischen Plastizität in akuten Hirnschnittpräparaten von Mäusen. Ergänzend wurde an einigen Mäusen eine auditorische und kontextuelle Furchtkonditionierung untersucht sowie mit Hilfe immunhistochemischer Methoden die Expression von TRP-Rezeptoren.

Folgende Hypothesen wurden experimentell überprüft:

- 1) Untersuchungen im Hippocampus deuteten darauf hin, dass für die Induktion einer LTP die Aktivierung der NR2A-Untereinheit des NMDA-Rezeptors notwendig ist und für die Induktion einer LTD die Aktivierung der NR2B-Untereinheit. Es wurde vermutet, dass in der LA eine ähnliche funktionelle Differenzierung der NMDA-Rezeptoren bei der Induktion synaptischer Plastizität eine Rolle spielt.
- 2) Es wurde vermutet, dass durch eine genetische Eliminierung der AMPAR Untereinheiten GluA1 und GluA3 die LTP in der LA und die Furchtkonditionierung beeinträchtigt sind, wohingegen eine Modifikation der LA-LTD in Schnitten von GluA1-/- Mäusen fraglich erscheint.
- 3) Im Hippocampus war gezeigt worden, dass eine Aktivierung von TRPV1-Rezeptoren durch Capsaicin zu einer Verstärkung der LTP führt. Es war davon auszugehen, dass durch Erhöhung

der Offenwahrscheinlichkeit dieser nichtselektiven Ionenkanäle die Zelle depolarisiert wird und das als Folge auch in der LA zu einer Verstärkung der LTP führt.

- 4) Weiterhin war aus dem Hippocampus bekannt, dass in Gegenwart von Capsaicin eine LTD nicht mehr induziert werden kann. Es war davon auszugehen, dass auch die Amplitude der LA-LTD in Anwesenheit von Capsaicin vermindert ist und dass dieser Effekt durch die Aktivierung von TRPV1-Rezeptoren vermittelt wird.

2.1. Erste Publikation: An der Induktion von LTP und LTD in der LA sind sowohl die NMDA-Rezeptor Untereinheiten NR2A als auch NR2B beteiligt.

Eine Aktivierung von NMDA-Rezeptoren führt zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und kann sowohl die Induktion einer LTP als auch bei Induktion einer LTD zur Folge haben, wobei ein moderater Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration die Voraussetzung für die Induktion einer LTD ist, während ein stärkerer Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration die Induktion einer LTP zur Folge hat (Bear and Malenka, 1994). Im Hippocampus konnte gezeigt werden, dass durch unterschiedliche Induktionsprotokolle¹⁵ verschiedene Populationen von NMDA-Rezeptoren aktiviert werden, die sich in der Zusammensetzung ihrer Untereinheiten (NR2A oder NR2B) und damit in ihren biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften unterscheiden (Bartlett et al., 2007).

In der hier vorgestellten Studie wurde untersucht, wie in der LA die verschiedenen NMDA-Rezeptor-Untereinheiten an der Induktion von LTP und LTD beteiligt sind. Es konnte gezeigt werden, dass - im Gegensatz zum Hippocampus - die Induktion von LTP und LTD in der LA die Aktivierung NMDA-Rezeptoren erfordert, die sowohl NR2A als auch von NR2B Untereinheiten enthalten. In der LA scheint es daher keine generelle funktionelle Spezialisierung von NMDA-Rezeptor Untereinheiten bei

¹⁵ LTP wird u.a. durch hochfrequente Reizung der Afferenzen (z.B. repetitive Stimulation (Frequenz 100 Hz, Dauer 1 s) induziert, während LTD z.B. durch eine längere Reizung mit einer Frequenz von 1 Hz induziert werden kann. Es gibt es sehr viele verschiedene Induktionsprotokolle, die z.T. Synapsen-spezifisch sind.

Induktion synaptischer Plastizität zu geben. Allerdings konnten bei der Induktion der LA-LTD Afferenz-spezifische Unterschiede nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur LTD bei Stimulation interner Fasern (IN-LA-LTD) konnte die LTD bei Stimulation der corticalen Fasern (EC-LA-LTD) durch NR2B-Antagonisten komplett geblockt werden.

Muller, T., Albrecht, D., Gebhardt, C. Both NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor are critical for long-term potentiation and long-term depression in the lateral amygdala of horizontal slices of adult mice *Learning & Memory*, /2009, 395-405,16.

<https://doi.org/10.1101/lm.1398709>

2.2. Zweite Publikation: Die AMPA-Rezeptor Untereinheiten GluA1 und GluA3 haben Afferenz-abhängige Funktionen bei LA-LTP und Furchtkonditionierung.

Während die NMDA-Rezeptoren bei der Induktion synaptischer Plastizität eine wichtige Rolle spielen, sind die postsynaptischen AMPA-Rezeptoren bei der Expression der synaptischen Plastizität von großer funktioneller Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung einzelner AMPAR Untereinheiten an Mäusen, bei denen die AMPAR-Untereinheiten GluA1 (GluA1 -/-) bzw. GluA3 (GluA3 -/-) genetisch eliminiert worden war, genauer untersucht werden. Aus dem Hippocampus war bekannt, dass GluA1 -/- Mäuse eine verminderte LTP an der CA3-CA1 Synapse aufweisen und ein eingeschränktes Arbeitsgedächtnis besitzen (Reisel et al., 2002; Zamanillo et al., 1999). Wir konnten zeigen, dass in coronalen Hirnschnittpräparaten von GluA1 -/- Mäusen die LA-LTP an cortikalen Synapsen verringert, an thalamischen Synapsen jedoch vollständig unterdrückt war. In Hirnschnittpräparaten von GluA3 -/- Mäusen war die LA-LTP an cortikalen Synapsen ebenfalls verringert, an thalamischen Synapsen hingegen unbeeinträchtigt. Da sowohl die auditorische als auch die kontextuelle Furchtkonditionierung nur in GluA1 -/- Mäusen, jedoch nicht in GluA3 -/- Mäusen beeinträchtigt war, unterstreichen die Untersuchungen die funktionelle Bedeutung der AMPAR GluA1 Untereinheit bei LA-vermittelten Lernprozessen.

Humeau, Y., Reisel, D., Johnson, A. W., Borchardt, T., Jensen, V., Gebhardt, C., Bosch, V., Gass, P., Bannerman, D. M., Good, M. A., Hvalby, O., Sprengel, R., & Luthi, A. 2007. A pathway-specific function for different AMPA receptor subunits in amygdala long-term potentiation and fear conditioning. *J. Neurosci.*, 27(41): 10947-10956.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2603-07.2007>

2.3. Dritte Publikation: Capsaicin-induzierte Veränderungen der LA-LTP durch Aktivierung von TRPV1-Rezeptoren.

In der vorherigen Arbeit war gezeigt worden, dass die Furchtkonditionierung bei Mäusen, bei denen die AMPA-Rezeptor Untereinheiten GluA1 genetisch eliminiert worden war, beeinträchtigt ist. Die Furchtkonditionierung ist jedoch auch bei Mäusen beeinträchtigt, in denen die TRPV1-Rezeptoren genetisch eliminiert worden war (Marsch et al., 2007). In der hier vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Aktivierung von TRPV1-Rezeptoren in der LA die synaptische Transmission und Plastizität beeinflusst. Wir konnten zeigen, dass TRPV1-Rezeptoren in der LA exprimiert sind und ihre Aktivierung durch Capsaicin zwar keinen Einfluss auf die basale glutamaterge und GABAerge synaptische Transmission hat, jedoch zu einer Verminderung der HFS-induzierten LA-LTP führt. Diese Verminderung der LA-LTP war auch nach Blockade der GABAergen synaptischen Transmission nachweisbar, jedoch nicht in Gegenwart von TRPV1-Antagonisten und nicht in Hirnschnittpräparaten von Mäusen in denen die TRPV1-Rezeptoren genetisch eliminiert worden sind (TRPV1^{-/-} Mäuse). Da CB1 Antagonisten den Effekt von Capsaicin auf die LA-LTP blockieren konnten, ist die Reduzierung der LA-LTP durch Capsaicin wahrscheinlich auf die Synthese von CB1-Agonisten zurückzuführen. Interessanterweise führt eine Sensitisierung der TRPV1-Rezeptoren durch hohe Isofluran-Konzentrationen vor Dekapitation (im Gegensatz zu Ether und niedrigen Isofluran-Konzentrationen) zu einer Capsaicin-induzierten Verstärkung der LA-LTP. Unsere Ergebnisse erhärten die Annahme, dass auch die TRPV1-Rezeptoren eine wichtige Rolle bei LA-vermittelten Lernprozessen spielen.

Zschenderlein, C., Gebhardt, C., von Bohlen Und, H. O., Kulisch, C., & Albrecht, D. 2011. Capsaicin-induced changes in LTP in the lateral amygdala are mediated by TRPV1. *PLoS.One.*, 6(1): e16116.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016116>

2.4. Vierte Publikation: Eine neue Form der Capsaicin-induzierten Modulation der LA-LTP wird durch Aktivierung von TRPM1-Rezeptoren vermittelt.

Nachdem wir zeigen konnten, dass eine Aktivierung von TRPV1 Rezeptors durch Capsaicin einen Einfluss auf die LA-LTP hat, sind wir nun der Frage nachgegangen, ob es auch einen Einfluss auf die LA-LTD gibt. Es konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit von Capsaicin die LTD in Abhängigkeit der gewählten Afferenz zur LA meist verstärkt war. Diese Capsaicin-induzierte Verstärkung der LA-LTD war interessanterweise auch in horizontalen Hirnschnittpräparaten von TRPV1^{-/-} Mäusen nachweisbar. Da in diesen Mäusen die TRPV1-Rezeptoren genetisch eliminiert worden sind, konnte die Capsaicin-induzierte Verstärkung der LA-LTD nicht durch eine Aktivierung dieser Rezeptoren hervorgerufen werden. Allerdings werden durch Capsaicin auch TRPM1-Rezeptoren aktiviert (Shen et al., 2009). Zunächst konnten wir zeigen, dass TRPM1-Rezeptoren in der LA und in angrenzenden Strukturen exprimiert sind. Als nächstes haben wir den Effekt von Capsaicin auf die LA-LTD an Mäusen untersucht, bei denen die TRPM1-Rezeptoren genetisch eliminiert worden waren (TRPM1^{-/-} Mäuse) und konnten zeigen, dass die Capsaicin-induzierte Modulation der LA-LTD in TRPM1^{-/-} Mäusen vollständig unterdrückt war. Damit konnten wir erstmalig nachweisen, dass TRPM1-Rezeptoren im ZNS auch außerhalb der Retina exprimiert sind und bei der Modulation der synaptischen Plastizität in der LA von funktioneller Bedeutung sind.

Gebhardt, C., von Bohlen Und, H.O., Hadler, M.D., Harteneck, C., Albrecht, D. A novel form of capsaicin-modified amygdala LTD mediated by TRPM1. *Neurobiology of Learn and Memory.* /2016, 1-12, 136.

<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.09.005>

2.5. Fünfte Publikation: Die Glutamat-Rezeptor Untereinheit GluA1 ist an der Capsaicin-induzierten Modulation der LA-LTP, jedoch nicht der LA-LTD beteiligt.

In den bisherigen Arbeiten konnten wir sowohl für die AMPAR Untereinheit GluA1 als auch für die TRP-Rezeptoren V1 und M1 eine funktionelle Bedeutung bei der synaptischen Plastizität in der LA nachweisen. Als nächstes stellten wir uns die Frage, ob es einen physiologischen Zusammenhang zwischen diesen Rezeptoren geben könnte. Daher haben wir untersucht, welchen Einfluss die genetische Eliminierung der AMPA-Rezeptor GluA1-Untereinheit auf die Capsaicin-induzierte Modulation der synaptischen Plastizität in der LA hat. Wie wir bereits gezeigt hatten, führt die Aktivierung von TRPV1-Rezeptoren durch Capsaicin zu einer Verminderung oder Verstärkung der HFS-induzierten LA-LTP, abhängig davon, ob die TRPV1-Rezeptoren - durch hohe Isofluran-Konzentrationen - sensibilisiert worden sind. Wir konnten nun nachweisen, dass die LA-LTP in GluA1^{-/-} Mäusen signifikant vermindert und der modulierende Effekt von Capsaicin auf die LA-LTP vollständig unterdrückt ist, sowohl bei hohen als auch bei niedrigen Isofluran-Konzentrationen. Im Gegensatz dazu waren die LA-LTD und der verstärkende Effekt von Capsaicin auf die LA-LTD in den GluA1^{-/-} Mäusen unverändert. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die AMPA-Rezeptor GluA1-Untereinheit bei der durch TRPV1-Rezeptoren vermittelte Modulation der LA-LTP, jedoch nicht für die durch TRPM1-Rezeptoren vermittelte Modulation der LA-LTD von Bedeutung ist.

Gebhardt, C., Albrecht, D. Glutamate receptor GluA1 subunit is implicated in capsaicin induced modulation of amygdala LTP but not LTD. *Learning & Memory*. /2018, 1-7, 25.

<https://doi.org/10.1101/lm.045948.117>

3. Diskussion

Die wichtigsten Ergebnisse der hier vorgestellten Publikationen sind folgende:

- 1) Für die Induktion von NMDA-Rezeptor-abhängiger LA-LTP und LA-LTD ist sowohl die Aktivierung der NMDA-Rezeptor Untereinheit NR2A als auch die Aktivierung der NMDA-Rezeptor Untereinheit NR2B notwendig.
- 2) Die AMPA-Rezeptor Untereinheit GluA1 ist sowohl an der Vermittlung der LA-LTP als auch an der Vermittlung der Furchtkonditionierung beteiligt. Die LA-LTD ist von der AMPA-Rezeptor Untereinheit GluA1 unabhängig.
- 3) Die Capsaicin-induzierte Modulation der LA-LTP wird durch TRPV1-Rezeptoren vermittelt.
- 4) Die Capsaicin-induzierte Modulation der LA-LTP hängt von der Art der Narkotisierung des Versuchstieres ab. Bei Verwendung von Ether oder mit niedrigen Isofluran-Konzentrationen bewirkt die Aktivierung von TRPV1-Rezeptoren eine Verminderung der LA-LTP, bei hohen Isofluran-Konzentrationen eine Erhöhung der LA-LTP.
- 5) Der Effekt von Capsaicin auf die Ausprägung der LTP wird postsynaptisch durch die AMPA-Rezeptor GluA1-Untereinheit vermittelt.
- 6) Erstmals wurden TRPM1-Rezeptoren im ZNS außerhalb der Retina nachgewiesen.
- 7) Die Capsaicin-induzierte Modulation der LA-LTD wird durch TRPM1-Rezeptoren vermittelt und ist unabhängig von der GluA1-Untereinheit.

In den vorliegenden Publikationen wurden eine Reihe von Faktoren untersucht, die die glutamaterge synaptische Transmission und Plastizität in der LA der Maus beeinflussen.

3.1. Funktionelle Bedeutung einzelner Glutamat-Rezeptor Untereinheiten bei synaptischer

Plastizität und Furchtkonditionierung in der LA

Die Diversität ionotroper Glutamat-Rezeptoren resultiert u.a. aus der Zusammensetzung einzelner Rezeptoren aus verschiedenen Untereinheiten. In den hier vorgestellten Arbeiten wurde die Bedeutung verschiedener Glutamat-Rezeptoren Untereinheiten für die synaptische Plastizität in der

LA untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass beide NMDA-Rezeptor Untereinheiten NR2A und NR2B für die Induktion von LTP und LTD benötigt werden. Eine funktionelle Differenzierung der NMDA-Rezeptor Untereinheiten bei der Induktion synaptischer Plastizität konnte in der LA somit nicht nachgewiesen und somit die Ausgangshypothese nicht bestätigt werden.

In einer späteren Arbeit wurde nachgewiesen, dass die Mehrheit der synaptischen NMDA-Rezeptor in der BLA wahrscheinlich als Heterotrimer aus den Untereinheiten NR1, NR2A und NR2B zusammengesetzt ist (Delaney et al., 2013). Eine funktionelle Unterscheidung von NMDA-Rezeptoren, die NR2A-Untereinheiten enthalten und NMDA-Rezeptoren, die NR2B-Untereinheiten enthalten, wurde damit weitgehend redundant.

Veränderungen in den biophysikalischen Eigenschaften, der Zusammensetzung und der Anzahl der in der postsynaptischen Membran eingebauten AMPA-Rezeptoren sind wesentliche Faktoren, die die Veränderung der synaptischen Übertragungsstärke vermitteln. Durch genetische Ausschaltung einzelner AMPAR-Untereinheiten in den GluA1^{-/-} und GluA3^{-/-} Mäusen verändert sich die Zusammensetzung der AMPA-Rezeptoren in den Zellen. In WT-Mäusen liegen in hippocampalen CA1 Zellen 80 % der synaptischen und 95 % der extrasynaptischen AMPA-Rezeptoren als GluA1/GluA2 Heteromere vor, die meisten der verbleibenden AMPA-Rezeptoren liegen als GluA2/GluA3 Heteromere vor (Lu et al., 2009). Die genaue Zusammensetzung der AMPA-Rezeptoren in den Projektionsneuronen der LA ist nicht bekannt, es wird jedoch allgemein angenommen, dass eine ähnliche Zusammensetzung der AMPA-Rezeptoren wie in hippocampalen CA1 Zellen vorliegt. Wie wir zeigen konnten, war die basale glutamaterge synaptische Transmission in LA Projektionsneuronen durch die genetische Eliminierung von GluA1- bzw. GluA3- Untereinheiten nicht verändert. Die AMPA-Rezeptoren, die aus den verbleibenden Untereinheiten gebildet wurden, konnten die Vermittlung der basalen synaptischen Transmission übernehmen und den Mangel kompensieren.

Die synaptische Plastizität hingegen war besonders bei GluA1^{-/-} Mäusen beeinträchtigt, wodurch unsere Ausgangshypothese bestätigt wurde. Unsere in der LA erhobenen Daten bestätigen die besondere Rolle der AMPA-Rezeptor GluA1-Untereinheit bei der Expression der LA-LTP, die schon für die LTP im Hippocampus beschrieben wurde¹⁶ (Zamanillo et al., 1999). Im Gegensatz dazu war im Cortex die LTP in Abwesenheit von AMPA-Rezeptor GluA1-Untereinheiten nicht vermindert (Frey et al., 2009). Als Ursache für die besondere Bedeutung der GluA1-Untereinheit bei hippocampaler LTP wurde zunächst vermutet, dass die GluA1-Untereinheiten auf Grund ihres langen C-terminalen Endes¹⁷ aktivitätsabhängig in die postsynaptische Membran eingebaut werden, während AMPA-Rezeptoren mit kurzen C-terminalen Ende einen konstitutiven Ein- und Ausbau durchlaufen (Shi et al., 2001). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch das N-terminale Ende der GluA1 Untereinheit für den zielgerichteten Einbau und die Verankerung der AMPA-Rezeptoren in der Synapse bedeutsam sind (Watson et al., 2017; Diaz-Alonso et al., 2017).

Im Gegensatz zur LA-LTP war die LA-LTD in Hirnschnittpräparaten von GluA1^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Hirnschnittpräparaten von WT-Kontrollmäusen unverändert. Auch im Hippocampus war die Expression der LTD unabhängig von der Anwesenheit der GluA1 Untereinheit (Zamanillo et al., 1999; Selcher et al., 2012), obwohl zuvor gezeigt worden war, dass eine Dephosphorylierung der GluA1-Untereinheit für die Expression einer LTD in hippocampalen CA1 Zellen notwendig ist (Lee et al., 2003). Obwohl diese Diskrepanz eine Folge von Kompensationsmechanismen in GluA1^{-/-} Mäusen sein könnte, kann die Frage, inwieweit die Expression einer LTD von der Zusammensetzung der AMPA-Rezeptoren abhängt, noch nicht vollständig beantwortet werden. Sowohl in Mäusen mit genetischer Eliminierung der GluA2-Untereinheit als auch in Mäusen, in denen GluA2- und GluA3-

¹⁷ GluA1, GluA4 und Splicevarianten der GluA2 Untereinheit besitzen ein langes, GluA2, GluA3 und Splicevarianten der GluA4 Untereinheit ein kurzes C-terminales Ende.

Untereinheiten genetisch eliminiert wurden, war die hippocampale LTD nicht beeinträchtigt (Meng et al., 2003).

Im Gegensatz zur GluA1-Untereinheit hatte die Abwesenheit der GluA3-Untereinheit in unseren Messungen weniger Einfluss auf die Expression der LA-LTP. Die thalamische LA-LTP im Vergleich zu WT-Mäusen unverändert, nur die cortikale LA-LTP war beeinträchtigt. In früheren Studien an hippocampalen Hirnschnittpräparaten von GluA3 -/- Mäusen war gezeigt worden, dass die synaptische Transmission im Vergleich zu WT-Mäusen unverändert war, die LTP hingegen verstärkt (Meng et al., 2003) oder ebenfalls unverändert (Reinders et al., 2016). Interessanterweise konnte kürzlich in Hirnschnitt-Kulturen gezeigt werden, dass die AMPA-Rezeptor Untereinheit GluA3 die durch Amyloid β induzierte synaptische Depression in CA1 Neuronen vermittelt (Reinders et al., 2016).

Obwohl es in den letzten Jahren gelungen ist, die Expression bestimmter AMPA-Rezeptor Untereinheiten in einzelnen Zellen zu unterdrücken, was noch bessere Rückschlüsse auf deren Funktion erlauben sollte, wird die Rolle einzelner AMPAR Untereinheiten bei der Expression synaptischer Plastizität weiterhin kontrovers diskutiert (Granger et al., 2013; Granger and Nicoll, 2014; Zhou et al., 2018).

3.2. Modulation synaptischer Plastizität durch Aktivierung von TRP-Kanälen

In den hier vorgestellten Arbeiten haben wir nachgewiesen, dass die TRP-Rezeptoren TRPV1 und TRPM1 in der LA exprimiert sind, wobei die immunhistochemische Untersuchung auf eine präferentiell präsynaptische Lokalisation von TRPM1-Rezeptoren an den glutamatergen Afferenzen vom ECtx zur LA hinweist. Weiterhin konnten wir zeigen, dass die synaptische Plastizität in der LA durch Aktivierung von TRPV1- und TRPM1-Rezeptoren maßgeblich moduliert wird, wobei die LA-LTP durch Aktivierung von TRPV1-Rezeptoren und die LA-LTD durch Aktivierung von TRPM1-Rezeptoren beeinflusst wird. Welche Wirkung die Aktivierung von TRPV1-Rezeptoren auf die LA-LTP hat, ist abhängig vom verwendeten Narkosemittel: nach einer Ether-Narkose ist die LA-LTP vermindert, im

Gegensatz dazu jedoch nach einer tiefen Isofluran-Narkose erhöht¹⁸. Die Ursache ist möglicherweise eine Sensitisierung von TRPV1-Rezeptoren durch Isofluran, so dass eine nachfolgende Aktivierung durch Capsaicin zu einem vermehrten Kationeneinstrom führt (Cornett et al., 2008; Harrison and Nau, 2008). Der genaue Mechanismus, wie Isofluran¹⁹ eine Sensitisierung von TRPV1-Rezeptoren bewirkt, ist noch nicht aufgeklärt, scheint sich aber von dem für die Aktivierung durch Capsaicin zu unterscheiden. Eine Veränderung der synaptischen Plastizität durch Aktivierung von TRPV1-Rezeptoren wurde auch in anderen Hirnregionen beschrieben ist, so im Hippocampus (Gibson et al., 2008; Li et al., 2008; Chavez et al., 2010), im ECtx (Banke, 2016), im Nucleus Accumbens (Grueter et al., 2010) und im Colliculus Superior (Maione et al., 2009). Folglich könnte die sensitisierende Wirkung von Inhalationsanästhetika auf TRPV1-Rezeptoren auch Auswirkungen auf die synaptische Plastizität in verschiedenen Hirnregionen haben und möglicherweise auch bei einer postoperativen kognitiven Dysfunktion eine Rolle spielen.

Während Capsaicin die LA-LTP über eine Aktivierung von TRPV1-Rezeptoren moduliert, wird die LA-LTD über eine Aktivierung von TRPM1-Rezeptoren verändert. Damit konnten wir im ZNS erstmalig eine physiologische Funktion der TRPM1-Rezeptoren nachweisen, deren funktionelle Bedeutung bisher nur in der Haut und in der Retina untersucht wurde. Unklar ist noch, wie der TRPM1-Rezeptor physiologisch aktiviert werden kann, da bislang keine endogenen Agonisten bekannt sind. Der aus der Retina bekannte Mechanismus der Aktivierung von TRPM1-Rezeptoren beruht auf einer Interaktion von metabotropen Glutamat-Rezeptoren (mGluR6) mit TRPM1-Rezeptoren (Koike et al., 2010). Unsere Daten deuten darauf hin, dass es auch in der Amygdala einen funktionalen Zusammenhang zwischen der Aktivierung von TRPM1-Rezeptoren und metabotropen Glutamat-Rezeptoren der Gruppe I geben könnte. Während die pharmakologische Inhibition von metabotropen Glutamat-Rezeptoren der Gruppe II durch CPPG keinen Einfluss auf die durch

¹⁸ Während eine Narkose mit 4 % Isofluran keinen Einfluss auf die LA-LTP hat, bewirkt eine Narkose mit 8 % Isofluran eine Verminderung der LA-LTP (Kulisch et al., 2011).

¹⁹ Neben Isofluran wirken auch andere Inhalationsanästhetika wie z.B. Chloroform, Halothan und Sevofluran sensitisierend auf TRPV1-Rezeptoren (Mutoh et al., 1998; Jorgensen and Domene, 2018).

Capsaicin-induzierte Verminderung der LA-LTP hatte, konnte durch pharmakologische Inhibition von metabotropen Glutamat-Rezeptoren der Gruppe I mittels AIDA die Capsaicin-induzierte Modulation der LA-LTP signifikant reduziert werden.

Während die Capsaicin-induzierte Modulation der LA-LTD in GluA1-defizienten Mäusen nicht verändert war, konnten wir zeigen, dass bei der Capsaicin-induzierten Modulation der LA-LTP die AMPA-Rezeptor Untereinheit GluA1 sowie die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthetase (nNOS) eine Rolle spielen, da in GluA1-defizienten Mäusen sowie in Mäusen, in denen die nNOS genetisch eliminiert wurde, diese Modulation nicht nachweisbar war. Eine mögliche Interaktion zwischen nNOS und GluA1 könnte über eine S-Nitrosylierung von Stargazin ablaufen. Stargazin ist eine auxiliäre Untereinheit (TARP $\gamma 2$), an die die AMPA-Rezeptor GluA1-Untereinheit binden muss, um in die Zellmembran transportiert zu werden (Bats et al., 2007; Payne, 2008). Die S-Nitrosylierung von Stargazin ist jedoch eine notwendige Voraussetzung dafür, dass Stargazin selbst in die Zellmembran transportiert wird. In nNOS-defizienten Mäusen ist die S-Nitrosylierung von Stargazin reduziert und in der Zellmembran sind weniger AMPA-Rezeptor GluA1-Untereinheiten als in WT-Kontrollmäusen exprimiert (Selvakumar et al., 2009). Vermutlich sind für die Capsaicin-induzierte Modulation der LA-LTP nicht nur die Existenz von GluA1-Untereinheiten, sondern auch ihre ausreichende Expression in der Zellmembran notwendige Voraussetzungen. Im Gegensatz zur LA-LTP ist.

4. Zusammenfassung

Synaptische Plastizität an zentralen Synapsen gilt als grundlegender Mechanismus für Lernen und Gedächtnis. Die Amygdala ist für das Furchtgedächtnis von besonderer Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit sind einige zelluläre und molekulare Mechanismen, die der glutamatergen synaptischen Plastizität in der LA zu Grunde liegen, näher untersucht worden. Bei der NMDA-Rezeptor-abhängigen Induktion von LTP und LTD scheinen sowohl NR2A- als auch NR2B-Untereinheiten eine Rolle zu spielen. Die LTP-Expression hängt zumindest teilweise von der AMPA-

Rezeptor Untereinheit GluA1 ab, während diese bei LTD-Expression nicht beteiligt zu sein scheint.

Weiterhin wird die synaptische Plastizität in der LA durch die Aktivierung von TRP-Kanälen moduliert. Die Aktivierung von TRPV1-Rezeptoren durch Capsaicin hat eine durch die AMPA-Rezeptor Untereinheit GluA1 vermittelte Verminderung der Amplitude der LA-LTP zur Folge, während die Capsaicin-induzierte Modulation der LA-LTD durch Aktivierung von TRPM1-Rezeptoren vermittelt wird. Erstmals wurde damit eine Funktion von TRPM1-Rezeptoren im ZNS außerhalb der Retina beschrieben.

5. Literaturangaben

Aguiar DC, Moreira FA, Terzian AL, Fogaca MV, Lisboa SF, Wotjak CT, Guimaraes FS (2014) Modulation of defensive behavior by Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 (TRPV1) channels. *Neurosci Biobehav Rev* 46 Pt 3:418-428.

Anson LC, Chen PE, Wyllie DJ, Colquhoun D, Schoepfer R (1998) Identification of amino acid residues of the NR2A subunit that control glutamate potency in recombinant NR1/NR2A NMDA receptors. *J Neurosci* 18:581-589.

Banke TG (2016) Inhibition of TRPV1 channels enables long-term potentiation in the entorhinal cortex. *Pflugers Arch* 468:717-726.

Bartlett TE, Bannister NJ, Collett VJ, Dargan SL, Massey PV, Bortolotto ZA, Fitzjohn SM, Bashir ZI, Collingridge GL, Lodge D (2007) Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in LTP and LTD in the CA1 region of two-week old rat hippocampus. *Neuropharmacology* 52:60-70.

Bats C, Groc L, Choquet D (2007) The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking. *Neuron* 53:719-734.

Bauer EP, Schafe GE, LeDoux JE (2002) NMDA receptors and L-type voltage-gated calcium channels contribute to long-term potentiation and different components of fear memory formation in the lateral amygdala. *J Neurosci* 22:5239-5249.

Bear MF, Malenka RC (1994) Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol* 4:389-399.

Benke T, Traynelis SF (2018) AMPA-Type Glutamate Receptor Conductance Changes and Plasticity: Still a Lot of Noise. *Neurochem Res*.

Benke TA, Luthi A, Isaac JT, Collingridge GL (1998) Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature* 393:793-797.

Blair HT, Schafe GE, Bauer EP, Rodrigues SM, LeDoux JE (2001) Synaptic plasticity in the lateral amygdala: a cellular hypothesis of fear conditioning. *Learn Mem* 8:229-242.

Blanchard DC, Blanchard RJ, Griebel G (2005) Defensive responses to predator threat in the rat and mouse. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 8:Unit.

Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.

Bliss TV, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:331-356.

Bowie D, Mayer ML (1995) Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block. *Neuron* 15:453-462.

Bredt DS, Nicoll RA (2003) AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron* 40:361-379.

Cajal SRy (1894) The Croonian Lecture: La fine structure des centres nerveux. *Proc R Soc London* 55:444-467.

Campeau S, 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.

Casarotto PC, Terzian AL, Aguiar DC, Zangrossi H, Guimaraes FS, Wotjak CT, Moreira FA (2012) Opposing roles for cannabinoid receptor type-1 (CB1) and transient receptor potential vanilloid type-1 channel (TRPV1) on the modulation of panic-like responses in rats. *Neuropsychopharmacology* 37:478-486.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-824.

Chavez AE, Chiu CQ, Castillo PE (2010) TRPV1 activation by endogenous anandamide triggers postsynaptic long-term depression in dentate gyrus. *Nat Neurosci* 13:1511-1518.

Coan EJ, Collingridge GL (1985) Magnesium ions block an N-methyl-D-aspartate receptor-mediated component of synaptic transmission in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 53:21-26.

Collingridge GL, Peineau S, Howland JG, Wang YT (2010) Long-term depression in the CNS. *Nat Rev Neurosci* 11:459-473.

Collingridge GL, Singer W (1990) Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol Sci* 11:290-296.

Cornett PM, Matta JA, Ahern GP (2008) General anesthetics sensitize the capsaicin receptor transient receptor potential V1. *Mol Pharmacol* 74:1261-1268.

Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 11:327-335.

Davis M (1997) Neurobiology of fear responses: the role of the amygdala. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 9:382-402.

Delaney AJ, Sedlak PL, Autuori E, Power JM, Sah P (2013) Synaptic NMDA receptors in basolateral amygdala principal neurons are triheteromeric proteins: physiological role of GluN2B subunits. *J Neurophysiol* 109:1391-1402.

Derkach VA, Oh MC, Guire ES, Soderling TR (2007) Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 8:101-113.

Dhaka A, Uzzell V, Dubin AE, Mathur J, Petrus M, Bandell M, Patapoutian A (2009) TRPV1 is activated by both acidic and basic pH. *J Neurosci* 29:153-158.

Diaz-Alonso J, Sun YJ, Granger AJ, Levy JM, Blankenship SM, Nicoll RA (2017) Subunit-specific role for the amino-terminal domain of AMPA receptors in synaptic targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:7136-7141.

Dutta-Roy R, Rosenmund C, Edelman SJ, Le NN (2015) Ligand-dependent opening of the multiple AMPA receptor conductance states: a concerted model. *PLoS One* 10:e0116616.

Fanselow MS (1994) Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. *Psychon Bull Rev* 1:429-438.

Fanselow MS, Kim JJ (1994) Acquisition of contextual Pavlovian fear conditioning is blocked by application of an NMDA receptor antagonist D,L-2-amino-5-phosphonovaleric acid to the basolateral amygdala. *Behav Neurosci* 108:210-212.

Fanselow MS, LeDoux JE (1999) Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. *Neuron* 23:229-232.

Farb C, Aoki C, Milner T, Kaneko T, LeDoux J (1992) Glutamate immunoreactive terminals in the lateral amygdaloid nucleus: a possible substrate for emotional memory. *Brain Res* 593:145-158.

Farb CR, Aoki C, LeDoux JE (1995) Differential localization of NMDA and AMPA receptor subunits in the lateral and basal nuclei of the amygdala: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 362:86-108.

Farb CR, LeDoux JE (1997) NMDA and AMPA receptors in the lateral nucleus of the amygdala are postsynaptic to auditory thalamic afferents. *Synapse* 27:106-121.

Fendt M, Fanselow MS (1999) The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev* 23:743-760.

Fourcaudot E, Gambino F, Casassus G, Poulain B, Humeau Y, Luthi A (2009) L-type voltage-dependent Ca(2+) channels mediate expression of presynaptic LTP in amygdala. *Nat Neurosci* 12:1093-1095.

Frey MC, Sprengel R, Neve TL (2009) Activity pattern-dependent long-term potentiation in neocortex and hippocampus of GluA1 (GluR-A) subunit-deficient mice. *J Neurosci* 29:5587-5596.

Fukaya M, Yamazaki M, Sakimura K, Watanabe M (2005) Spatial diversity in gene expression for VDCCgamma subunit family in developing and adult mouse brains. *Neurosci Res* 53:376-383.

Gean PW, Chang FC, Huang CC, Lin JH, Way LJ (1993) Long-term enhancement of EPSP and NMDA receptor-mediated synaptic transmission in the amygdala. *Brain Res Bull* 31:7-11.

Gebhardt C, Cull-Candy SG (2006) Influence of agonist concentration on AMPA and kainate channels in CA1 pyramidal cells in rat hippocampal slices. *J Physiol* 573:371-394.

Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P, Monyer H (1995) Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* 15:193-204.

Gibson HE, Edwards JG, Page RS, Van Hook MJ, Kauer JA (2008) TRPV1 channels mediate long-term depression at synapses on hippocampal interneurons. *Neuron* 57:746-759.

Granger AJ, Nicoll RA (2014) LTD expression is independent of glutamate receptor subtype. *Front Synaptic Neurosci* 6:15.

Granger AJ, Shi Y, Lu W, Cerpas M, Nicoll RA (2013) LTP requires a reserve pool of glutamate receptors independent of subunit type. *Nature* 493:495-500.

Greger IH, Watson JF, Cull-Candy SG (2017) Structural and Functional Architecture of AMPA-Type Glutamate Receptors and Their Auxiliary Proteins. *Neuron* 94:713-730.

Grueter BA, Brasnjo G, Malenka RC (2010) Postsynaptic TRPV1 triggers cell type-specific long-term depression in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci* 13:1519-1525.

Gutierrez R (2000) Seizures induce simultaneous GABAergic and glutamatergic transmission in the dentate gyrus-CA3 system. *J Neurophysiol* 84:3088-3090.

Gutierrez R (2002) Activity-dependent expression of simultaneous glutamatergic and GABAergic neurotransmission from the mossy fibers in vitro. *J Neurophysiol* 87:2562-2570.

Gutierrez R, Heinemann U (2001) Kindling induces transient fast inhibition in the dentate gyrus--CA3 projection. *Eur J Neurosci* 13:1371-1379.

Harrison N, Nau C (2008) Sensitization of nociceptive ion channels by inhaled anesthetics--a pain in the gas? *Mol Pharmacol* 74:1180-1182.

Hebb D (1949) *The Organization of behaviour: a neuropsychological theory*. New York: Wiley.

Hillman BG, Gupta SC, Stairs DJ, Buonanno A, Dravid SM (2011) Behavioral analysis of NR2C knockout mouse reveals deficit in acquisition of conditioned fear and working memory. *Neurobiol Learn Mem* 95:404-414.

Howe JR, Robert A, Smith TC, Wall MJ, Usowicz MM (2001) Evidence for concentration-dependent substate gating in the decay of fast excitatory postsynaptic currents. *Biophysical Journal* 80:107A.

Huang YY, Kandel ER (1998) Postsynaptic induction and PKA-dependent expression of LTP in the lateral amygdala. *Neuron* 21:169-178.

Jackson AC, Nicoll RA (2011) The expanding social network of ionotropic glutamate receptors: TARPs and other transmembrane auxiliary subunits. *Neuron* 70:178-199.

Jardin I, Lopez JJ, Diez R, Sanchez-Collado J, Cantonero C, Albarran L, Woodard GE, Redondo PC, Salido GM, Smani T, Rosado JA (2017) TRPs in Pain Sensation. *Front Physiol* 8:392.

Jonas P, Burnashev N (1995) Molecular mechanisms controlling calcium entry through AMPA-type glutamate receptor channels. *Neuron* 15:987-990.

Jorgensen C, Domene C (2018) Location and Character of Volatile General Anesthetics Binding Sites in the Transmembrane Domain of TRPV1. *Mol Pharm* 15:3920-3930.

Kamboj SK, Swanson GT, Cull-Candy SG (1995) Intracellular spermine confers rectification on rat calcium-permeable AMPA and kainate receptors. *J Physiol* 486 (Pt 2):297-303.

Kaschel T, Schubert M, Albrecht D (2004) Long-term depression in horizontal slices of the rat lateral amygdala. *Synapse* 53:141-150.

Kasckow JW, Mulchahey JJ, Geraciotti TD, Jr. (2004) Effects of the vanilloid agonist olvanil and antagonist capsazepine on rat behaviors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28:291-295.

Koh DS, Burnashev N, Jonas P (1995) Block of native Ca(2+)-permeable AMPA receptors in rat brain by intracellular polyamines generates double rectification. *J Physiol* 486 (Pt 2):305-312.

Koike C, Obara T, Uriu Y, Numata T, Sanuki R, Miyata K, Koyasu T, Ueno S, Funabiki K, Tani A, Ueda H, Kondo M, Mori Y, Tachibana M, Furukawa T (2010) TRPM1 is a component of the retinal ON bipolar cell transduction channel in the mGluR6 cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:332-337.

Krettek JE, Price JL (1978) A description of the amygdaloid complex in the rat and cat with observations on intra-amygdaloid axonal connections. *J Comp Neurol* 178:255-280.

Kulisch C, Eckers N, Albrecht D (2011) Method of euthanasia affects amygdala plasticity in horizontal brain slices from mice. *J Neurosci Methods* 201:340-345.

Kuryatov A, Laube B, Betz H, Kuhse J (1994) Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron* 12:1291-1300.

Larsen RS, Sjostrom PJ (2015) Synapse-type-specific plasticity in local circuits. *Curr Opin Neurobiol* 35:127-135.

Laube B, Hirai H, Sturgess M, Betz H, Kuhse J (1997) Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron* 18:493-503.

Laube B, Kuhse J, Betz H (1998) Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *J Neurosci* 18:2954-2961.

LeDoux J (1998) Fear and the brain: where have we been, and where are we going? *Biol Psychiatry* 44:1229-1238.

LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23:155-184.

LeDoux JE (2014) Coming to terms with fear. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:2871-2878.

LeDoux JE, Cicchetti P, Xagoraris A, Romanski LM (1990a) The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J Neurosci* 10:1062-1069.

LeDoux JE, Farb C, Ruggiero DA (1990b) Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. *J Neurosci* 10:1043-1054.

LeDoux JE, Farb CR, Romanski LM (1991) Overlapping projections to the amygdala and striatum from auditory processing areas of the thalamus and cortex. *Neurosci Lett* 134:139-144.

Lee HK, Takamiya K, Han JS, Man H, Kim CH, Rumbaugh G, Yu S, Ding L, He C, Petralia RS, Wenthold RJ, Gallagher M, Huganir RL (2003) Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. *Cell* 112:631-643.

- Li HB, Mao RR, Zhang JC, Yang Y, Cao J, Xu L (2008) Antistress effect of TRPV1 channel on synaptic plasticity and spatial memory. *Biol Psychiatry* 64:286-292.
- Lisman J (1994) The CaM kinase II hypothesis for the storage of synaptic memory. *Trends Neurosci* 17:406-412.
- Lledo PM, Hjelmstad GO, Mukherji S, Soderling TR, Malenka RC, Nicoll RA (1995) Calcium/calmodulin-dependent kinase II and long-term potentiation enhance synaptic transmission by the same mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11175-11179.
- Lopez de Armentia M, Sah P (2003) Development and subunit composition of synaptic NMDA receptors in the amygdala: NR2B synapses in the adult central amygdala. *J Neurosci* 23:6876-6883.
- Low CM, Wee KS (2010) New insights into the not-so-new NR3 subunits of N-methyl-D-aspartate receptor: localization, structure, and function. *Mol Pharmacol* 78:1-11.
- Lu W, Shi Y, Jackson AC, Bjorgan K, During MJ, Sprengel R, Seeburg PH, Nicoll RA (2009) Subunit composition of synaptic AMPA receptors revealed by a single-cell genetic approach. *Neuron* 62:254-268.
- Lynch GS, Dunwiddie T, Gribkoff V (1977) Heterosynaptic depression: a postsynaptic correlate of long-term potentiation. *Nature* 266:737-739.
- Maione S, Cristino L, Migliozi AL, Georgiou AL, Starowicz K, Salt TE, Di M, V (2009) TRPV1 channels control synaptic plasticity in the developing superior colliculus. *J Physiol* 587:2521-2535.
- Malenka RC, Bear MF (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44:5-21.
- Malenka RC, Kauer JA, Perkel DJ, Mauk MD, Kelly PT, Nicoll RA, Waxham MN (1989) An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature* 340:554-557.
- Malinow R, Malenka RC (2002) AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 25:103-126.
- Malinow R, Miller JP (1986) Postsynaptic hyperpolarization during conditioning reversibly blocks induction of long-term potentiation. *Nature* 320:529-530.
- Malinow R, Schulman H, Tsien RW (1989) Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* 245:862-866.
- Mano I, Teichberg VI (1998) A tetrameric subunit stoichiometry for a glutamate receptor-channel complex. *Neuroreport* 9:327-331.
- Maren S (1999) Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory. *Trends Neurosci* 22:561-567.
- Maren S, Aharonov G, 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, Baudry M (1995) Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationships to learning and memory. *Neurobiol Learn Mem* 63:1-18.

- Maren S, Fanselow MS (1995) Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal formation stimulation in vivo. *J Neurosci* 15:7548-7564.
- Maren S, Fanselow MS (1996) The amygdala and fear conditioning: has the nut been cracked? *Neuron* 16:237-240.
- Marrone MC, Morabito A, Giustizieri M, Chiurchiu V, Leuti A, Mattioli M, Marinelli S, Riganti L, Lombardi M, Murana E, Totaro A, Piomelli D, Ragozzino D, Oddi S, Maccarrone M, Verderio C, Marinelli S (2017) TRPV1 channels are critical brain inflammation detectors and neuropathic pain biomarkers in mice. *Nat Commun* 8:15292.
- Marsch R, Foeller E, Rammes G, Bunck M, Kossel M, Holsboer F, Zieglgansberger W, Landgraf R, Lutz B, Wotjak CT (2007) Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. *J Neurosci* 27:832-839.
- Martins D, Tavares I, Morgado C (2014) "Hotheaded": the role OF TRPV1 in brain functions. *Neuropharmacology* 85:151-157.
- Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB (1984) Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309:261-263.
- McDonald AJ (1982a) Cytoarchitecture of the central amygdaloid nucleus of the rat. *J Comp Neurol* 208:401-418.
- McDonald AJ (1982b) Neurons of the lateral and basolateral amygdaloid nuclei: a Golgi study in the rat. *J Comp Neurol* 212:293-312.
- McKernan MG, Shinnick-Gallagher P (1997) Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro. *Nature* 390:607-611.
- Meng Y, Zhang Y, Jia Z (2003) Synaptic transmission and plasticity in the absence of AMPA glutamate receptor GluR2 and GluR3. *Neuron* 39:163-176.
- Millhouse OE (1986) The intercalated cells of the amygdala. *J Comp Neurol* 247:246-271.
- Milstein AD, Nicoll RA (2008) Regulation of AMPA receptor gating and pharmacology by TARP auxiliary subunits. *Trends Pharmacol Sci* 29:333-339.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529-540.
- Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH (1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256:1217-1221.
- Moore C, Gupta R, Jordt SE, Chen Y, Liedtke WB (2018) Regulation of Pain and Itch by TRP Channels. *Neurosci Bull* 34:120-142.
- Moreira FA, Aguiar DC, Terzian AL, Guimaraes FS, Wotjak CT (2012) Cannabinoid type 1 receptors and transient receptor potential vanilloid type 1 channels in fear and anxiety-two sides of one coin? *Neuroscience* 204:186-192.
- Mulkey RM, Endo S, Shenolikar S, Malenka RC (1994) Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature* 369:486-488.

Mulkey RM, Herron CE, Malenka RC (1993) An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression. *Science* 261:1051-1055.

Mutoh T, Tsubone H, Nishimura R, Sasaki N (1998) Effects of volatile anesthetics on vagal C-fiber activities and their reflexes in anesthetized dogs. *Respir Physiol* 112:253-264.

Nam JH, et al. (2015) TRPV1 on astrocytes rescues nigral dopamine neurons in Parkinson's disease via CNTF. *Brain* 138:3610-3622.

Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA (2007) Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 87:165-217.

Nilius B, Szallasi A (2014) Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. *Pharmacol Rev* 66:676-814.

Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307:462-465.

Ogden KK, Khatri A, Traynelis SF, Heldt SA (2014) Potentiation of GluN2C/D NMDA receptor subtypes in the amygdala facilitates the retention of fear and extinction learning in mice. *Neuropsychopharmacology* 39:625-637.

Pachernegg S, Strutz-Seebohm N, Hollmann M (2012) GluN3 subunit-containing NMDA receptors: not just one-trick ponies. *Trends Neurosci* 35:240-249.

Paoletti P, Bellone C, Zhou Q (2013) NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 14:383-400.

Pare D, Smith Y (1993) The intercalated cell masses project to the central and medial nuclei of the amygdala in cats. *Neuroscience* 57:1077-1090.

Payne HL (2008) The role of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins (TARPs) in neurotransmission and receptor trafficking (Review). *Mol Membr Biol* 25:353-362.

Pettit DL, Perlman S, Malinow R (1994) Potentiated transmission and prevention of further LTP by increased CaMKII activity in postsynaptic hippocampal slice neurons. *Science* 266:1881-1885.

Pitkanen A, Savander V, LeDoux JE (1997) Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci* 20:517-523.

Rainnie DG, Asprodini EK, Shinnick-Gallagher P (1991) Excitatory transmission in the basolateral amygdala. *J Neurophysiol* 66:986-998.

Reinders NR, Pao Y, Renner MC, da Silva-Matos CM, Lodder TR, Malinow R, Kessels HW (2016) Amyloid-beta effects on synapses and memory require AMPA receptor subunit GluA3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:E6526-E6534.

Reisel D, Bannerman DM, Schmitt WB, Deacon RM, Flint J, Borchardt T, Seeburg PH, Rawlins JN (2002) Spatial memory dissociations in mice lacking GluR1. *Nat Neurosci* 5:868-873.

Rogan MT, Staubli UV, LeDoux JE (1997) Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature* 390:604-607.

- Romanski LM, Clugnet MC, Bordi F, LeDoux JE (1993) Somatosensory and auditory convergence in the lateral nucleus of the amygdala. *Behav Neurosci* 107:444-450.
- Romanski LM, LeDoux JE (1992) Equipotentiality of thalamo-amygdala and thalamo-cortico-amygdala circuits in auditory fear conditioning. *J Neurosci* 12:4501-4509.
- Rosen JB, Asok A, Chakraborty T (2015) The smell of fear: innate threat of 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline, a single molecule component of a predator odor. *Front Neurosci* 9:292.
- Rosenmund C, Stern-Bach Y, Stevens CF (1998) The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science* 280:1596-1599.
- Rossmann M, Sukumaran M, Penn AC, Veprintsev DB, Babu MM, Greger IH (2011) Subunit-selective N-terminal domain associations organize the formation of AMPA receptor heteromers. *EMBO J* 30:959-971.
- Sager C, Tapken D, Kott S, Hollmann M (2009) Functional modulation of AMPA receptors by transmembrane AMPA receptor regulatory proteins. *Neuroscience* 158:45-54.
- Sah P, Faber ES, Lopez de AM, Power J (2003) The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev* 83:803-834.
- Sah P, Westbrook RF, Luthi A (2008) Fear conditioning and long-term potentiation in the amygdala: what really is the connection? *Ann N Y Acad Sci* 1129:88-95.
- Schwenk J, Baehrens D, Haupt A, Bildl W, Boudkazi S, Roeper J, Fakler B, Schulte U (2014) Regional diversity and developmental dynamics of the AMPA-receptor proteome in the mammalian brain. *Neuron* 84:41-54.
- Selcher JC, Xu W, Hanson JE, Malenka RC, Madison DV (2012) Glutamate receptor subunit GluA1 is necessary for long-term potentiation and synapse unsilencing, but not long-term depression in mouse hippocampus. *Brain Res* 1435:8-14.
- Selvakumar B, Huganir RL, Snyder SH (2009) S-nitrosylation of stargazin regulates surface expression of AMPA-glutamate neurotransmitter receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:16440-16445.
- Shen Y, Heimel JA, Kamermans M, Peachey NS, Gregg RG, Nawy S (2009) A transient receptor potential-like channel mediates synaptic transmission in rod bipolar cells. *J Neurosci* 29:6088-6093.
- Shi S, Hayashi Y, Esteban JA, Malinow R (2001) Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons. *Cell* 105:331-343.
- Silva AJ, Stevens CF, Tonegawa S, Wang Y (1992) Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 257:201-206.
- Storm-Mathisen J (1977) Glutamic acid and excitatory nerve endings: reduction of glutamic acid uptake after axotomy. *Brain Res* 120:379-386.
- Storm-Mathisen J, Iversen LL (1979) Uptake of [3H]Glutamic acid in excitatory nerve endings: light and electronmicroscopic observations in the hippocampal formation of the rat. *Neuroscience* 4:1237-1253.
- Straub C, Tomita S (2012) The regulation of glutamate receptor trafficking and function by TARPs and other transmembrane auxiliary subunits. *Curr Opin Neurobiol* 22:488-495.

- Swanson LW, Petrovich GD (1998) What is the amygdala? *Trends Neurosci* 21:323-331.
- Tchekalarova J, Albrecht D (2007) Angiotensin II suppresses long-term depression in the lateral amygdala of mice via L-type calcium channels. *Neurosci Lett* 415:68-72.
- Terzian AL, Aguiar DC, Guimaraes FS, Moreira FA (2009) Modulation of anxiety-like behaviour by Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) channels located in the dorsolateral periaqueductal gray. *Eur Neuropsychopharmacol* 19:188-195.
- Tomita S, Chen L, Kawasaki Y, Petralia RS, Wenthold RJ, Nicoll RA, Brecht DS (2003) Functional studies and distribution define a family of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins. *Journal of Cell Biology* 161:805-816.
- Verdoorn TA, Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B (1991) Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. *Science* 252:1715-1718.
- Vicini S, Wang JF, Li JH, Zhu WJ, Wang YH, Luo JH, Wolfe BB, Grayson DR (1998) Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *J Neurophysiol* 79:555-566.
- Wafford KA, Kathoria M, Bain CJ, Marshall G, Le BB, Kemp JA, Whiting PJ (1995) Identification of amino acids in the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit that contribute to the glycine binding site. *Mol Pharmacol* 47:374-380.
- Wallace KJ, Rosen JB (2000) Predator odor as an unconditioned fear stimulus in rats: elicitation of freezing by trimethylthiazoline, a component of fox feces. *Behav Neurosci* 114:912-922.
- Wallace KJ, Rosen JB (2001) Neurotoxic lesions of the lateral nucleus of the amygdala decrease conditioned fear but not unconditioned fear of a predator odor: comparison with electrolytic lesions. *J Neurosci* 21:3619-3627.
- Watkins JC, Evans RH (1981) Excitatory amino acid transmitters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 21:165-204.
- Watson JF, Ho H, Greger IH (2017) Synaptic transmission and plasticity require AMPA receptor anchoring via its N-terminal domain. *Elife* 6.
- Wigstrom H, Gustafsson B, Huang YY, Abraham WC (1986) Hippocampal long-term potentiation is induced by pairing single afferent volleys with intracellularly injected depolarizing current pulses. *Acta Physiol Scand* 126:317-319.
- Williams K, Chao J, Kashiwagi K, Masuko T, Igarashi K (1996) Activation of N-methyl-D-aspartate receptors by glycine: role of an aspartate residue in the M3-M4 loop of the NR1 subunit. *Mol Pharmacol* 50:701-708.
- Yang SN, Tang YG, Zucker RS (1999) Selective induction of LTP and LTD by postsynaptic $[Ca^{2+}]_i$ elevation. *J Neurophysiol* 81:781-787.
- Zamanillo D, Sprengel R, Hvalby O, Jensen V, Burnashev N, Rozov A, Kaiser KM, Koster HJ, Borchardt T, Worley P, Lubke J, Frotscher M, Kelly PH, Sommer B, Andersen P, Seeburg PH, Sakmann B (1999) Importance of AMPA receptors for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning. *Science* 284:1805-1811.

Zhou Z, Liu A, Xia S, Leung C, Qi J, Meng Y, Xie W, Park P, Collingridge GL, Jia Z (2018) The C-terminal tails of endogenous GluA1 and GluA2 differentially contribute to hippocampal synaptic plasticity and learning. Nat Neurosci 21:50-62.

6. Eidesstattliche Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Berlin, den

Christine Gebhardt