



Zielstrukturen des serotonergen Systems
in der laterobasalen Amygdala:
Untersuchungen an Ratten und einem Mausmodell
für emotionale Dysregulation

Targets of the serotonergic system
in the laterobasal amygdala:
investigations in rats and a mouse model
for emotional dysregulation

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences

Julius–Maximilians–Universität Würzburg

Research Training Group GRK 1253/1:

Processing of affective stimuli: from the molecular basis to the emotional experience

vorgelegt von

Maria Roswitha Bonn

aus Aschaffenburg

Würzburg 2011

Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende: Prof. Ulrike Holzgrabe

1. Betreuerin: Prof. Esther Asan

2. Betreuer: Prof. Erhard Wischmeyer

3. Betreuer: Prof. Karl Mertens

4. Betreuer: Prof. Klaus-Peter Lesch

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Wenn das Gehirn so einfach wäre
dass wir es verstehen könnten
wären wir zu dumm
um es zu begreifen.

Jostein Gaarder



FÜR MEINE ELTERN

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
I Zusammenfassung / Abstract	1
II Einleitung	5
1 Die Amygdala	6
1.1 Pyramidenzellen	7
1.2 Interneurone	9
2 Monoaminerge Systeme	11
2.1 Das serotonerge System	11
2.1.1 Ursprung und Morphologie serotonerger Afferenzen	11
2.1.2 Genetische Modifizierung des serotonergen Systems: Serotonintransporter knock out	12
2.1.3 Das serotonerge System, Stress und die Amygdala	14
2.1.4 Serotoninrezeptoren	15
2.1.4.1 5-HT _{1A}	15
2.1.4.2 5-HT _{2C}	17
2.1.4.3 5-HT ₃	18
2.2 Das dopaminerge System	19
2.2.1 Dopaminrezeptoren	19
3 Zielstrukturen monoaminerger Systeme in der Amygdala	20
3.1 Zielstrukturen dopaminerger Afferenzen	20
3.2 Zielstrukturen serotonerger Afferenzen	21
4 Neuropeptid Y und Neuropeptid Y–Rezeptoren	22
5 Zielsetzungen dieser Arbeit	24
III Material	26

6 Tiere und tierisches Hirngewebe	26
6.1 Morphometrische Untersuchungen	26
6.2 Lichtmikroskopische Untersuchungen und <i>in situ</i> Hybridisierung	26
6.3 Immunfluoreszenzen und Elektronenmikroskopie	26
7 Antikörper	27
8 Enzyme	27
9 Nucleinsäuren	28
9.1 Plasmid-DNA	28
9.2 Oligodesoxynukleotide	28
9.3 DNA-Größenmarker	28
10 Reaktionskits	29
11 Medien	29
12 Puffer	29
13 Lösungsmittel	30
14 Lösungen	30
15 Chemische Verbindungen	31
15.1 Biochemikalien	31
15.2 Sonstiges	32
16 Sonstiges	33
17 Geräte	33
18 Computerprogramme	34
IV Methoden	35
19 3D-Rekonstruktion von Neuronen und Morphometrie	35
19.1 Versuchsgruppen für morphometrische Analysen	35
19.2 3D-Rekonstruktion von Neuronen im La und BL	36
19.3 Morphometrische Analysen	37
19.4 Auswertung der Daten und Statistik	37
20 Doppelimmunhistochemie – Lichtmikroskopie	38
20.1 Perfusionsfixierung und Gewebeaufbereitung	38
20.2 Doppelimmunhistochemie	39
20.3 Lichtmikroskopische Auswertung der Präparate	40
20.4 Statistik	41

21 Immunfluoreszenz- und Elektronenmikroskopie	41
21.1 Gewebeaufbereitung	41
21.2 Weitere Vorbereitung und Primärantikörperinkubation	41
21.3 Immunfluoreszenzmikroskopie	42
21.4 Elektronenmikroskopie	42
21.4.1 Auswertung elektronenmikroskopischer Präparate	43
22 Herstellung der NPY cRNA-Sonden	44
22.1 RNA-Isolierung aus Gewebe	44
22.2 Auswahl der Primer	45
22.3 cDNA-Synthese durch reverse Transkription	46
22.4 Polymerase-Kettenreaktion	46
22.5 Ligation des PCR-Produkts	47
22.6 Transformation des Vektors in kompetente Zellen und Selektion	49
22.7 Präparation von Plasmid-DNA	50
22.8 Restriktionsanalyse und Sequenzierung	50
22.9 Glycerolstocks	51
22.10 Restriktionsverdau	51
22.11 DNA-Extraktion und -Fällung	52
22.12 <i>In vitro</i> Transkription	53
22.13 cRNA-Extraktion, -Fällung und -Konzentrationsmessung	54
23 <i>In situ</i> Hybridisierung	54
23.1 Gewebeaufbereitung	54
23.2 ISH mit Chromogenen (CISH) – Einzelmarkierung	54
23.2.1 Rehydrierung, Acetylierung und Hybridisierung	54
23.2.2 Posthybridisierung und Antikörperinkubation	55
23.2.3 Enzymatischer Nachweis der cRNA-Sonden	55
23.3 ISH mit Fluoreszenzfarbstoffen (FISH) – Einzelmarkierung	56
23.3.1 Nachweis der cRNA-Sonden mit Fluoreszenzfarbstoffen	56
23.3.2 Zellkernfärbung und Eindecken	56
23.4 Doppelmarkierung mit Fluoreszenzfarbstoffen	57
23.4.1 Nachweis der ersten cRNA-Sonde	57
23.4.2 Nachweis der zweiten cRNA-Sonde	57
23.5 Doppelmarkierung: Kombination aus FISH und CISH	57
23.5.1 Nachweis der cRNA-Sonden	58
23.6 Dreifachmarkierung: Kombination aus FISH und CISH	58
23.6.1 Nachweis der ersten cRNA-Sonde	58
23.6.2 Nachweis der zweiten und dritten cRNA-Sonde	58
23.7 Optimierung der ISH	59
23.7.1 Einzelmarkierungen	59
23.7.2 Doppelmarkierungen	59
23.7.3 Dreifachmarkierungen	60
23.7.4 Eindeckmedien	62
23.8 Kontrollen	64

23.9	Auswertung der ISH-Präparate	64
V	Ergebnisse	65
24	Einfluss des 5-Htt-Genotyps und von sozialem Stress auf die neuronale Morphologie	65
24.1	Analyse der Sternzellen	65
24.2	Analyse der Pyramidenzellen	65
24.2.1	3D Sholl-Analyse, Dendritenlänge und Verzweigungsdichte	65
24.2.2	Analyse der Gesamtzahl dendritischer Dornen und Dornendichte	67
24.2.2.1	5-Htt-Genotyp-abhängige Unterschiede	67
24.2.2.2	Stressbedingte Unterschiede	70
25	Lichtmikroskopische Analyse morphologischer Beziehungen zwischen serotonergen bzw. dopaminergen Afferenzen und NPY-ir Neuronen	73
25.1	Verteilung und Morphologie der NPY-ir Neurone in der Amygdala	73
25.2	Wahl der Antikörper zum Nachweis serotonerger Fasern	75
25.3	Perisomatische 5-Htt-ir Appositionen an NPY-ir Neurone im La und BL	75
25.4	Nachweis von TH-ir Fasern im La und BL	78
25.5	Perisomatische TH-ir Appositionen an NPY-ir Neurone im La und BL	78
25.6	5-Htt-ir vs. TH-ir Appositionen an NPY-ir Somata im La und BL	80
26	Elektronenmikroskopische Analyse morphologischer Beziehungen zwischen serotonergen bzw. dopaminergen Afferenzen und NPY-ir Neuronen	82
26.1	NPY-Immunreaktivität	82
26.2	NPY- und 5-HT-Immunreaktivität	82
26.3	NPY- und TH-Immunreaktivität	83
26.4	Kontrollen	84
27	Serotonin- und Dopaminrezeptorexpression von NPY-Neuronen	88
27.1	Signalintensität und Verteilung der NPY mRNA	88
27.2	Signalintensität und Verteilung der 5-HT _{1A} mRNA	88
27.3	Signalintensität und Verteilung der 5-HT _{2C} mRNA	90
27.4	Signalintensität und Verteilung der 5-HT ₃ mRNA	91
27.5	NPY mRNA und 5-HT _{1A} mRNA	92
27.6	NPY mRNA und 5-HT _{2C} mRNA	95
27.7	NPY mRNA und 5-HT ₃ mRNA	98
27.8	5-HT _{1A} mRNA und 5-HT _{2C} mRNA	99
27.9	NPY mRNA und CRF mRNA	99
27.10	Drd ₂ mRNA und Kollokalisierung mit NPY mRNA	100
27.11	Koexpression von NPY, 5-HT _{1A} und 5-HT _{2C} mRNA	101
VI	Diskussion	102

28 Einfluss des 5-Htt-Genotyps und von sozialem Stress auf die Morphologie von Pyramidenzellen und Interneuronen im La und BL von Mäusen	102
28.1 Erörterung der eingesetzten Methoden	103
28.2 Auswirkungen des 5-Htt KO auf die dendritische Morphologie	104
28.3 Auswirkungen von Stress auf die dendritische Morphologie	106
29 Interaktionen des serotonergen und dopaminergen Systems mit NPY-Neuronen im La und BL von Ratten	108
29.1 Morphologie der NPY-Neurone	108
29.2 Serotonerge Innervation der NPY-Neurone	109
29.3 Dopaminerge Innervation der NPY-Neurone	110
29.4 Vergleich der serotonergen und dopaminergen Innervation der NPY-Neurone	111
29.5 5-HTR-Expression der NPY-Neurone	112
29.5.1 Erörterung der eingesetzten Methoden	113
29.6 Funktionelle Zusammenhänge	114
29.6.1 Einfluss des serotonergen Systems auf die laterobasale Amygdala . .	115
29.6.2 Kritische Betrachtung und offene Fragen	117
30 Zusammenfassende Erörterung	119
31 Ausblicke	120
32 Abschließende Gedanken	122
Literatur	123
VII Anhang	145
33 Danksagung	145
34 Publikation	147
35 Curriculum Vitae	148
36 Affidavit / Eidesstattliche Erklärung	150

Abbildungsverzeichnis

1	Lokalisation des La und BL im Rattengehirn	7
2	Relative Häufigkeit der NPY-Neurone im Verhältnis zu anderen interneu- ronalen Populationen des des La und BL	10
3	Das serotonerge Neuron und die serotonerge Synapse	13
4	Versuchsgruppen für morphometrische Analysen	35
5	Golgipräparate und 3D-Rekonstruktionen	36
6	3D Sholl-Analyse	38
7	Aufbau des pCR [®] II-Vektors (Invitrogen)	48
8	Restriktionsverdau der verwendeten Konstrukte	52
9	Methodenschema zur HS-TSA-FISH	56
10	Leitfaden zur Durchführung von Mehrfachmarkierungen mit ISH	60
11	Vergleich von HS-, MS- und LS-TSA-FISH	61
12	Beleuchtungsexperiment	63
13	Morphometrische Analyse der Sternzellen	66
14	Maximale Ausbreitung der Dendriten der Pyramidenzellen	67
15	Anzahl der Schnittpunkte der Dendriten mit den Oberflächen der Kugeln .	68
16	Gesamtlänge des dendritischen Materials	69
17	Dendritische Verzweigungsdichte	70
18	Dornendichte _{Vo}	71
19	Gesamtdornendichte	72
20	Gesamtzahl dendritischer Dornen	72
21	Verteilung der NPY-ir Neurone in der Amygdala	73
22	Morphologie der NPY-ir Neurone im La und BL	75
23	Serotonerge Typ D und Typ M Axone	76
24	5-Htt-ir Appositionen an NPY-ir Neurone	76
25	TH-ir Fasern in der Amygdala	79
26	TH-ir Appositionen an NPY-ir Neuronen des BL	79
27	NPY-ir Somata mit 5-Htt-ir bzw. TH-ir Appositionen	81
28	Anzahl der 5-Htt-ir bzw. TH-ir Appositionen pro NPY-ir Soma	81
29	NPY-Immunreaktivität auf ultrastruktureller Ebene (Immunogold)	83
30	NPY-Immunreaktivität auf ultrastruktureller Ebene (DAB)	84
31	Morphologische Beziehungen zwischen NPY- und 5-HT-ir Strukturen . . .	85
32	NPY- und TH-Immunreaktivität auf ultrastruktureller Ebene	86
33	Morphologische Beziehungen zwischen NPY- und TH-ir Strukturen	87
34	5-HT- und TH-ir Appositionen an NPY-ir Neurone (Immunfluoreszenz) . .	87
35	Verteilung der NPY mRNA in verschiedenen Hirnrarealen	89
36	Verteilung der 5-HT _{1A} mRNA in verschiedenen Hirnrarealen	90
37	Verteilung der 5-HT _{2C} mRNA in verschiedenen Hirnrarealen	91
38	ISH für 5-HT ₃ mRNA im BL	92
39	Koexpression von NPY mRNA und 5-HT _{1A} mRNA	94
40	NPY mRNA und 5-HT _{1A} mRNA in verschiedenen Hirnrarealen	94
41	Koexpression von NPY mRNA und 5-HT _{2C} mRNA	96
42	NPY mRNA und 5-HT _{2C} mRNA in verschiedenen Hirnrarealen	97

43	NPY mRNA und 5-HT ₃ mRNA in verschiedenen Hirnarealen	98
44	Koexpression von 5-HT _{1A} mRNA mit 5-HT _{2C} mRNA und NPY mRNA mit CRF mRNA	99
45	Drd ₂ mRNA in verschiedenen Hirnarealen	100
46	Koexpression von NPY, 5-HT _{1A} und 5-HT _{2C} mRNA	101

Tabellenverzeichnis

1	Für die Herstellung von cRNA-Sonden und für die <i>in situ</i> Hybridisierung verwendete Konstrukte. Bp: Basenpaare.	28
2	Primerauswahl für die Klonierung entsprechender cDNA-Abschnitte zur Herstellung der NPY cRNA-Sonden	28
3	Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau	51
4	Allgemeiner Reaktionsansatz für die <i>in vitro</i> Transkription	53
5	Zur Herstellung der cRNA-Sonden verwendete Restriktionsenzyme und RNA Polymerasen	53
6	Verwendete Markierungsmixe zur Herstellung der cRNA-Sonden	53
7	Hybridisierungsbedingungen der verwendeten cRNA-Sonden	55
8	Literaturangaben zur Beurteilung der mit den verwendeten cRNA-Sonden erzielten Verteilungsmuster der ISH-Signale.	59
9	Verteilung der NPY-ir Neurone in der Amygdala	74
10	Morphologie der NPY-ir Somata im La und BL	74
11	Anzahl der NPY-ir Neurone mit perisomatischen 5-Htt-ir Appositionen	77
12	Morphologie 5-Htt-ir Fasern	77
13	5-Htt-ir Appositionen pro NPY-ir Soma	78
14	Anzahl der NPY-ir Neurone mit TH-ir Appositionen	80
15	TH-ir Appositionen pro NPY-ir Soma	80
16	Koexpression von NPY mRNA und 5-HT _{1A} mRNA, ♀	93
17	Koexpression von NPY mRNA und 5-HT _{1A} mRNA, ♂	93
18	Koexpression von NPY mRNA und 5-HT _{2C} mRNA, ♀	96
19	Koexpression von NPY mRNA und 5-HT _{2C} mRNA, ♂	96
20	Koexpression von NPY mRNA und 5-HT ₃ mRNA, ♀ und ♂	98

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	Serotonin
5-HT _{1A}	Serotoninrezeptor 1A
5-HT _{2A}	Serotoninrezeptor 2A
5-HT _{2C}	Serotoninrezeptor 2C
5-HT ₃	Serotoninrezeptor 3
5-HTR	Serotoninrezeptor
5-HTT	humaner Serotonintransporter
5-Htt	Serotonintransporter (allgemein und Tiere)
5-Htt KO	Serotonintransporter knock out
5-HTTLPR	Serotonintransporter-gekoppelte polymorphe Region
AP	alkalische Phosphatase
App	Apposition
as	antisense
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
BL	basolateraler Nucleus der Amygdala
BLA	basolateraler Kernkomplex der Amygdala
BM	basomedialer Nucleus der Amygdala
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin, engl.: bovine serum albumin
CaMKII	Calcium-Calmodulinkinase II
CB	Calbindin
CCK	Cholecystokinin
Ce	zentraler Nucleus der Amygdala
CISH	<i>in situ</i> Hybridisierung mit Chromogenen
CR	Calretinin
CRF	Corticotropin releasing factor
DAB	3´3´Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DAPI	4´,6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dFISH	Doppel-Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
DIG	Digoxigenin
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
dpH	doppel pH-Methode
DR	Nucleus raphes posterior
Drd ₁	Dopaminrezeptor 1
Drd ₂	Dopaminrezeptor 2
DrdR	Dopaminrezeptor
EPM	Elevated Plus Maze
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
GABA	γ-Aminobuttersäure
GABA _A	GABA-Rezeptor vom Typ A
GABA _B	GABA-Rezeptor vom Typ B
GABAR	GABA-Rezeptor

GAD	Glutamatdecarboxylase
GD	Gyrus dentatus
GIRK-Kanal	G-Protein gekoppelter einwärts gleichrichtender Kaliumkanal, engl.: G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel
HMFm	Hogness Modified Freezing Medium
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
HS-TSA-FISH	Tyramidsignal-verstärkte Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung mit relativ hoher Sensitivität
IL	infralimbischer Kortex
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactosid
IR	Immunreaktivität
ir	immunreaktiv
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
K ₂ P	Zwei-Porendomänen Kaliumkanal
KO	knock out
Kon	Kontrollgruppe
kS	kontrollierbarer Stress
La	lateraler Nucleus der Amygdala
LS-TSA-FISH	Tyramidsignal-verstärkte Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung mit relativ geringer Sensitivität
M	Männchen
mCPP	Meta-Chlorphenylpiperazin
Me	medialer Nucleus der Amygdala
MR	Nucleus raphes medianus
MS-TSA-FISH	Tyramidsignal-verstärkte Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung mit relativ moderater Sensitivität
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartatrezeptor
NPG	1,5 % n-Propylgallat in 60 % Glyzerin/PBS
NPY	Neuropeptid Y
OD	optische Dichte
PB	Phosphatpuffer
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung, engl.: phosphate-buffered saline
PCA	p-Chloramphetamin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, engl.: polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
POD	Meerrettichperoxidase
PV	Parvalbumin
RT	Raumtemperatur
s	sense
SA	Streptavidin
SD	Standardabweichung, engl.: standard deviation
SEM	Standardfehler des Mittelwertes, engl.: standard error of the mean
SNP	single nucleotide polymorphism

SOM	Somatostatin
St	Striatum
TASK-3	TWIK-ähnlicher säuresensitiver Kaliumkanal, engl.: TWIK-related acid-sensitive potassium channel-3
TH	Tyrosinhydroxylase
TSA	Tyramidsignalverstärkung, engl.: Tyramide signal amplification
TX-100	TritonX-100
uS	unkontrollierbarer Stress
Ver	Verlierer
VIP	vasoaktives Intestinalpeptid
VTA	ventrales tegmentales Areal
W	Weibchen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactosid
YR	Neuropeptid Y-Rezeptor
ZNS	zentrales Nervensystem

Teil I

Zusammenfassung

Die Amygdala ist ein heterogener Kernkomplex, der dem limbischen System angehört, und dicht von serotonergen Afferenzen innerviert wird. Sowohl bei Tieren als auch beim Menschen spielen Interaktionen zwischen dem serotonergen System und der Amygdala bei der Verarbeitung emotionsbezogener Reize, insbesondere bei solchen, die mit Angst oder Stress assoziiert sind, eine zentrale Rolle. Genetische Variationen im serotonergen System und/oder dauerhafter Stress können dazu führen, dass diese Verarbeitungsprozesse fehlerhaft ablaufen, wodurch Verhaltensanormalitäten bzw. die Entstehung psychiatrischer Erkrankungen begünstigt werden. Die Zielneurone der serotonergen Transmission in der Amygdala, die molekularen Mechanismen möglicher Interaktionen und strukturelle Konsequenzen der Störungen dieser Interaktionen sind jedoch bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht vollständig bekannt. Daher bestand ein Ziel der vorliegenden Arbeit darin, den Einfluss eines Ungleichgewichts im serotonergen System (Serotonintransporter knock out, 5-Htt KO) sowie von wiederholtem, sozialem Stress auf die neuronale Morphologie der Amygdala zu analysieren und Zielneurone serotonerger Afferenzen zu identifizieren und zu charakterisieren, um die neuronalen Netzwerke der Emotionsverarbeitung besser verstehen zu können.

Um vom *5-Htt*-Genotyp abhängige und stressbedingte neuromorphologische Veränderungen zu untersuchen, wurden dreidimensionale Rekonstruktionen von Pyramiden- und Sternzellen der laterobasalen Amygdala von männlichen, adulten Wildtyp (WT)- und 5-Htt KO-Mäusen angefertigt und bezüglich verschiedener morphologischer Parameter ausgewertet. An den Pyramidenzellen wurden nur geringfügige Veränderungen der dendritischen Komplexität, jedoch, im Vergleich zu WT-Mäusen, eine wesentliche Erhöhung der Dornendichte an spezifischen dendritischen Kompartimenten bei gestressten WT-Mäusen, sowie nicht gestressten und gestressten 5-Htt KO-Mäusen nachgewiesen. Im Vergleich zu nicht gestressten WT-Mäusen war die dendritische Dornendichte aller anderen Gruppen gleichermaßen erhöht. Die Sternzellen, welche zu den Interneuronen zählen, zeigten bezüglich der untersuchten Parameter keine morphologischen Veränderungen auf.

Eine besondere Subpopulation der Interneurone stellen die Neuropeptid Y (NPY)-Neurone der laterobasalen Amygdala dar, da sie in diesen Nuclei anxiolytisch wirken. Es ist schon viel darüber bekannt, welche molekularen Effekte NPY über entsprechende Rezeptoren haben kann und wie NPY emotionsähnliche Zustände, insbesondere angstähnliches Verhalten, regulieren kann. Allerdings gibt es nur wenige Anhaltspunkte darüber, durch welche

Systeme NPY-Neurone selbst moduliert werden. Da sowohl NPY-Neurone in der laterobasalen Amygdala als auch das serotonerge System an angstregulierenden Prozessen beteiligt sind, sollte im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob es sich bei diesen Neuronen um Zielstrukturen des serotonergen Systems handelt. Mittels licht- und elektronenmikroskopischer Analysen wurden perisomatische, synaptische Kontakte zwischen serotonergen Afferenzen und NPY-immunreaktiven Neuronen in der laterobasalen Amygdala von Ratten verifiziert. Da der funktionelle Einfluss der serotonergen Innervation auf diese Zielneurone wesentlich von deren Serotoninrezeptor (5-HTR)-Ausstattung abhängt, wurden Koexpressionsanalysen von NPY mRNA mit den mRNAs verschiedener 5-HTR durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine neue Variation der *in situ* Hybridisierung entwickelt und etabliert, mit der NPY-Neurone auf eine Koexpression mit mRNAs geringer Expressionsstärke zuverlässig untersucht werden können. Die Analysen ergaben, dass NPY mRNA-reaktive Neurone in der laterobasalen Amygdala 5-HT_{1A} und 5-HT_{2C}, jedoch nicht 5-HT₃ mRNA koexprimieren.

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Resultate liefern detaillierte, neue Erkenntnisse über den Einfluss des serotonergen Systems auf die laterobasale Amygdala von Mäusen und Ratten. Bei den Veränderungen der dendritischen Dornendichte nach wiederholten, sozialen Stresserfahrungen könnte es sich um neuroadaptive bzw. kompensatorische Mechanismen der Pyramidenzellen handeln, die WT-Mäusen eine Anpassung an sich ändernde, negative Umweltbedingungen ermöglicht. Die erhöhte Dornendichte könnte dabei die Ausbildung eines „emotionalen Gedächtnisses“ repräsentieren, das eine schnelle und flexible Verhaltensantwort auf ein erneutes Auftauchen von Gefahr erlaubt. Eine solche Modulation der Erregbarkeit der laterobasalen Amygdala könnte beispielsweise über eine situationsentsprechende Hemmung des Outputs der Pyramidenzellen durch differentiell aktive inhibitorische Netzwerke erfolgen. Eine differentielle Aktivierung kann z. B. über unterschiedliche Rezeptorausstattungen, wie es in der Subpopulation der NPY-Neurone in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurde, erfolgen. Das erhöhte angstähnliche Verhalten der 5-Htt KO-Mäuse nach wiederholtem sozialen Stress könnte mit der Unfähigkeit zusammenhängen, in entsprechenden Situationen durch Neubildung von Dornen zu reagieren, da die Dornendichte bei diesen Tieren schon unter stressarmen Umweltbedingungen ihr Maximum erreicht hat. Sowohl Fehlfunktionen der neuronalen Plastizität als auch mögliche Fehlfunktionen der differentiellen Inhibierung der Pyramidenzellen durch Interneurone, die durch genetische Variationen und/oder Stress bedingt sein können, repräsentieren möglicherweise eine „offene Tür“, die zu manifesten Auffälligkeiten im Verhalten bei Tieren führt bzw. auch zur Entstehung bestimmter psychiatrischer Erkrankungen beim Menschen beiträgt.

Abstract

The amygdala is a heterogenous nuclear complex, which belongs to the limbic system and receives a dense serotonergic innervation. In animals and in humans, interactions between the serotonergic system and the amygdala play a key role in emotional stimulus processing, especially for anxiety- and stress-related stimuli. Genetic variations within the serotonergic system and/or chronic stress can cause dysregulation of these mechanisms, which promote abnormal behavior and development of psychiatric disorders, respectively. Up to now, the target neurons of serotonergic neurotransmission in the amygdala, the molecular mechanisms of possible interactions and morphological consequences of dysregulation of these interactions are not investigated completely, yet. Thus, one aim of this thesis was to analyze the impact of an imbalance within the serotonergic system (serotonin transporter knock out, 5-Htt KO) and repeated social stress on neuronal morphology in the amygdala and to identify and characterize target neurons of serotonergic afferents. This will help to get a better understanding of the neuronal networks associated with emotional stimulus processing.

To investigate *5-Htt* genotype-dependent and stress-related neuromorphological changes, three-dimensional reconstructions of pyramidal cells and stellate interneurons of the laterobasal amygdala of male, adult wildtype (WT) and 5-Htt KO mice were carried out and different morphological parameters were analyzed. Pyramidal cells displayed only subtle changes in dendritic complexity but a significant increase in spine density on specific dendritic compartments in stressed WT mice and naïve and stressed 5-Htt KO mice, compared to naïve WT mice. In all groups, the increase in spine density was, compared to WT mice, similar. Stellate interneurons lacked detectable genotype-dependent and stress-related morphological differences.

Neuropeptide Y (NPY) neurons represent a unique and special interneuronal subpopulation in the laterobasal amygdala due to their anxiolytic effects in these nuclei. There is much information about the molecular effects of NPY *via* specific receptors and how NPY can regulate emotion-related states, especially anxiety-like behavior. However, only few indications are available, by which systems NPY neurons are modulated themselves. Since both NPY neurons in the laterobasal amygdala and the serotonergic system are involved in anxiety-regulating processes, the task of the second part of the present thesis was to investigate if these neurons were targets of the serotonergic system. Applying light and electron microscopic methods, perisomatic synaptic contacts between serotonergic afferents and NPY-immunoreactive neurons were identified in the laterobasal amygdala of rats. As the functional impact of the serotonergic innervation significantly depends on the

serotonin receptor (5-HTR) equipment of the target neurons, coexpression of NPY mRNA and different 5-HTR mRNAs was studied. For this purpose, a novel variation of *in situ* hybridization, which allows specific coexpression analyses of NPY mRNA with low-abundant mRNAs, was developed and established. The results show that NPY mRNA-reactive neurons in the laterobasal amygdala coexpress 5-HT_{1A} and 5-HT_{2C}, but lack 5-HT₃ mRNA. In the present thesis, detailed, new data on the impact of the serotonergic system on the laterobasal amygdala of mice and rats were obtained. The changes in dendritic spine density after repeated stress could represent neuroadaptive or compensatory mechanisms of these neurons, which enable WT mice to adapt to negative environmental changes. The increase in dendritic spine density could stand for the formation of an “emotional memory“ facilitating quick and flexible behavioral reactions upon re-appearing danger. This modulation of the laterobasal amygdala’s excitability could occur, for instance, *via* a specific inhibition of pyramidal output by differentially activated inhibitory networks. Such a differential activation can result from a variable receptor equipment, as shown for NPY neurons in the laterobasal amygdala in the present thesis. The increased anxiety-like behavior of 5-Htt KO mice after repeated social stress could be due to the inability of these mice to further increase spine density in corresponding situations, since spine density already reached the maximum level in a low-stress environment. Both dysfunction of neuronal plasticity and possible dysfunction of the differential inhibition of pyramidal cells *via* interneurons presumably caused by genetic variations and/or stressful life events could represent an “open door“ facilitating abnormal behavior in animals or development of certain psychiatric disorders in humans.

Teil II

Einleitung

Kein Tag unseres Lebens vergeht, an dem wir nicht von Emotionen begleitet und geleitet werden. Wir bezeichnen sie mit Begriffen wie Freude, Überraschung, Traurigkeit oder Angst, und Wissenschaftler sind sehr daran interessiert, die Prozesse beim Erleben von Emotionen in unserem Organismus zu entschlüsseln. Generell bestehen Emotionen aus physiologischen Reaktionen des Organismus und kognitiven/emotionalen Wahrnehmungen. Zu den charakteristischen physiologischen Reaktionen zählen z. B. starkes Herzklopfen, vermehrtes Schwitzen oder eine erhöhte Anspannung der Muskulatur. Durch unser Gehirn nehmen wir zusätzlich ein subjektives bewusstes Gefühl wahr, welches wir dann kognitiv bewerten, verbalisieren und durch unsere Mimik und unser Verhalten zum Ausdruck bringen können. Diese Komponenten scheinen einander zu bedingen, jedoch ist bis heute noch nicht geklärt, wie diese voneinander abhängen bzw. welche zuerst auftritt. Aus evolutionsbiologischer Perspektive dienen Emotionen unter anderem dazu unser Überleben zu sichern, indem wir beispielsweise auf Grund von Angst bedrohliche Situationen vermeiden. Andererseits werden wir auch bei der Partnersuche oder der Bindung an unsere Kinder von Emotionen geleitet. Dass Tiere Emotionen genauso wie wir Menschen empfinden, ist eher unwahrscheinlich. Dennoch ist es möglich, bestimmte Zustände bei Tieren über deren Verhalten zu interpretieren, welche dann als „Korrelate emotionaler Verhaltensweisen“ oder als „emotionsähnlich“ bezeichnet werden.

Wird das emotionales Gleichgewicht gestört, kann dies zu Veränderungen im Gehirn führen, welche abnorme Verhaltensweisen bei Tieren bzw. emotionale Dysregulationen beim Menschen bedingen können, wozu auch psychiatrische Erkrankungen, wie Depressionen, zählen. Bei einer Depression handelt es sich um eine heterogene, multifaktorielle Erkrankung, deren neurobiologische Mechanismen zum Teil noch nicht verstanden sind, und die in manchen Fällen schlecht therapierbar ist. Es ist bekannt, dass Umwelteinflüsse, wie beispielsweise Stress, und/oder genetische Faktoren Veränderungen der Neuroplastizität, sowie Veränderungen monoaminerger und peptiderger Systeme bedingen können, welche an diesem Krankheitsbild individuell in unterschiedlichem Maße beteiligt sind. Doch welche genauen Prozesse spielen sich hierbei in unserem Gehirn ab, wo genau spielen sie sich ab und wie können sie moduliert werden? Die vorliegende Arbeit soll Beiträge zu einem besseren Verständnis dieser Vorgänge liefern.

1 Die Amygdala

Im Jahre 1819 wurde das Corpus amygdaloideum zum ersten Mal von dem deutschen Anatomen Karl Friedrich Burdach beschrieben. Er lokalisierte es im medialen Temporalappen des menschlichen Gehirns und nannte es auf Grund seiner mandelförmigen Erscheinung „Amygdala“ (griechisch: $\alpha\mu\gamma\delta\alpha\lambda\omicron\nu$ „Mandel“). Nach der heutigen Definition handelt es sich bei der Amygdala ein heterogenes Gehirnareal, das sich aus verschiedenen Kerngruppen zusammensetzt: zu den Nuclei mit kortikalem Ursprung zählen der laterale (La), basolaterale (BL) und basomediale Nucleus (BM). Beim zentralen (Ce) und medialen Nucleus (Me) handelt es sich um caudoventrale Differenzierungen des Striatums, die der zentromedialen Kerngruppe zugeordnet werden [17, 190]. Bei dem Gebiet, welches Burdach „Amygdala“ nannte, handelt es sich um den La und BL, auf denen der Fokus der Untersuchungen liegen wird.

Die Neurochemie und intrinsischen Verbindungen der amygdalären Subnuclei sind bei Nagetieren, Primaten und Menschen ähnlich, jedoch ist die relative Größe der Nuclei zueinander verschieden und einige Details der regulatorischen Projektionen sind artspezifisch und können sogar innerhalb einer Art variieren [10, 151]. Im Rattenhirn befindet sich die Hauptausdehnung der Amygdala innerhalb der coronalen Schnittebene, in welcher unter anderem auch das Striatum, der Hippocampus sowie der Nervus opticus zu sehen sind (Abb. 1). Die Detailaufnahme in Abb. 1 zeigt die genaue Lokalisation des La, BL und Ce. Es wurde bereits vielfach belegt, dass die Amygdala bei der Verarbeitung emotionaler Reize, insbesondere bei solchen, die mit Furcht, Angst oder Stress assoziiert sind, eine zentrale Rolle spielt. Dies gilt sowohl für Mäuse und Ratten als auch für Menschen [42, 88, 165]. Bei der Prozessierung emotionaler Stimuli erfüllt jeder Nucleus der Amygdala bestimmte Funktionen. Der La stellt hierbei die wichtigste Eingangsstation der Amygdala dar, der sensorische Informationen aus dem Thalamus und verschiedenen kortikalen Arealen erhält. Von dort aus werden diese Informationen zum Teil an den BL weitergeleitet, welcher zusätzlich Eingangsinformationen aus dem Hippocampus erhält [46, 88, 89, 152]. Weiterhin erhält der La auch afferente Projektionen aus dem infralimbischen Kortex (IL), während Projektionen des prälimbischen Kortex den BL erreichen [107]. Vom La und/oder BL aus werden die Informationen an den Ce weitergeleitet [152], bei dem es sich um die wichtigste Ausgangsstation der Amygdala handelt.

Diese Verschaltungssystematik lässt sich am Beispiel der Angstkonditionierung gut verdeutlichen: während dieses Prozesses treffen die Informationen, die vom konditionierten (Ton) und unkonditionierten Stimulus (elektrischen Schock) ausgehen, im La zusammen und werden von dort aus zum BL und Ce weitergeleitet [46, 88, 89, 152]. Projektionen

vom Ce zu Hypothalamus und Hirnstamm vermitteln dann die physiologischen Veränderungen, die zu beobachten sind, wenn Ratten als Reaktion auf den Ton, der zuvor mit einem elektrischen Schock gepaart wurde, Schreckverhalten zeigen [90, 88]. Bei Menschen scheinen die Prozesse der Konditionierung gleich abzulaufen. Probanden, welchen ein Ton präsentiert wurde, der zuvor mit einem unangenehmen Stimulus gepaart wurde, zeigten eine erhöhte Aktivität der Amygdala und eine verstärkte Schreckreaktion im Vergleich zu einer entsprechenden Kontrollgruppe [62, 86]. Auf Grund der individuellen Funktionalität der Nuclei der Amygdala sollten diese, wenn es die Methodik erlaubt, stets separat analysiert werden. Im Folgenden werden einige neuroanatomische und neurobiologische Aspekte des La und BL genauer betrachtet.

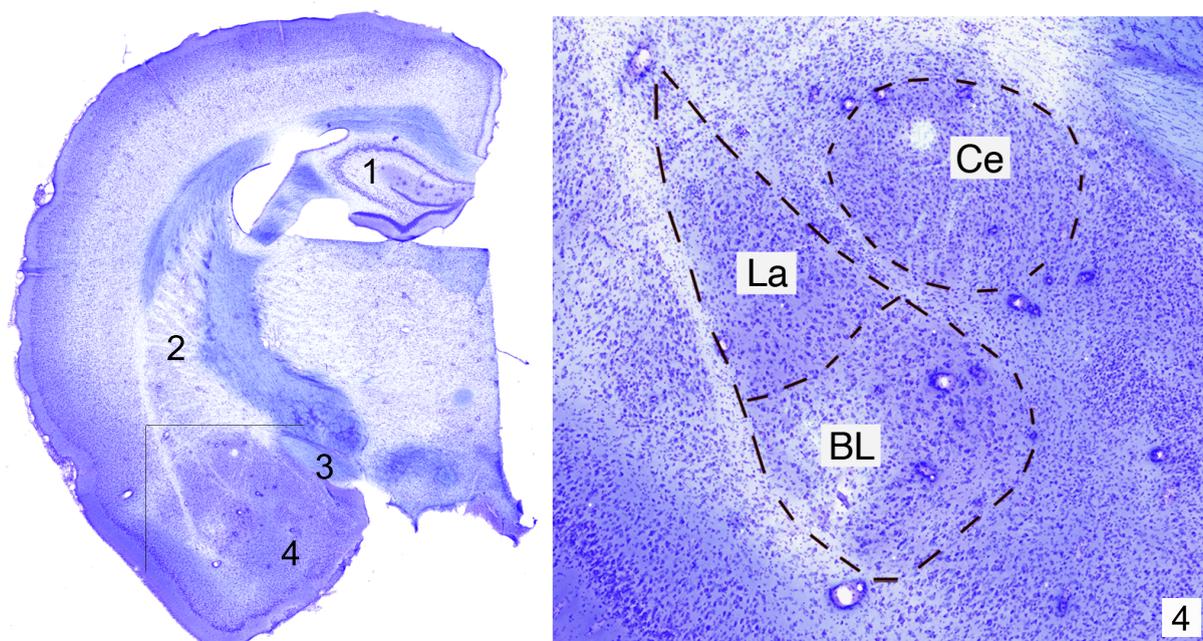


Abbildung 1: Lokalisation des La, BL und Ce im Rattengehirn. Die Übersichtsaufnahme zeigt einen coronalen Vibratomeschnitt einer Rattengehirnhälfte, die mit der Nissl-Methode angefärbt wurde, wodurch die Zellkörper blau erscheinen. 1: Hippocampus, 2: Striatum, 3: Nervus opticus, 4: Amygdala. Die Detailaufnahme (4) zeigt die genaue Lokalisation des La, BL und Ce.

1.1 Pyramidenzellen

Aus morphologischer und funktioneller Perspektive lassen sich die Neurone der kortex-ähnlichen Kerngruppe der Amygdala grob in zwei Klassen, nämlich Pyramidenzellen und Interneurone, einteilen. Millhouse und DeOlmos haben die Morphologie dieser Neurone im La und BL von Ratten detailliert analysiert und beschrieben. Sofern nicht anders erwähnt, sind alle in diesem Abschnitt erwähnten morphologischen Beschreibungen dieser Neurone der entsprechenden Publikation entnommen [117].

Ungefähr 85 % aller Neurone im La und BL sind Pyramidenzellen. Bei diesen handelt es sich um Projektionsneurone, die vorwiegend Informationen von anderen Hirnarealen, aber auch intrinsischen Systemen, erhalten und selbst entsprechende Informationen an weitere Nuclei der Amygdala oder andere Hirnareale vermitteln. Inhibitorische Afferenzen kommen hierbei zum Großteil im perisomatischen Bereich der Pyramidenzellen des La und BL an und nehmen in distaler Richtung ab, wo die Anzahl der Kontakte mit exzitatorischen Afferenzen zunimmt [129]. Allerdings wurden auch an distalen Bereichen von Pyramidenzellen inhibitorische Kontakte, z. B. mit für Somatostatin (SOM) immunreaktiven (ir) Terminalen nachgewiesen [130].

Pyramidenzellen besitzen einen für sie typischen, konisch geformten Zellkörper, der 10 bis 35 μm in der Längsachse erreichen kann. Von diesem geht am schmalen Ende ein Apikaldendrit mit vielen dendritischen Dornen (s. Punkt 19.2) ab, der auffallend dicker als die anderen Dendriten ist. Im La und BL verzweigen sich diese Apikaldendriten in manchen Fällen gleich nach dem Austritt aus dem Zellkörper in zwei gleichdicke Fortsätze (s. Punkt 19.2). Meist findet man direkt gegenüber der Apikaldendriten oder auch weiter seitlich an der Basis der Somata den Abgang der Axone. Typisch für diese ist eine glatte, schlauchförmige Morphologie, aber auch Varikositäten sind nicht selten. An der Basis eines pyramidalen Zellkörpers sind darüber hinaus dünnere Basaldendriten unterschiedlicher Anzahl angeordnet, welche mit vielen dendritischen Dornen besetzt sind. Pyramidenzellen erhalten an dendritischen Dornen fast ausschließlich exzitatorische Eingangsinformationen [17].

Sowohl im La als auch im BL findet man Pyramidenzellen, die bzgl. Form und Größe jenen im Kortex sehr ähneln. Es gibt aber auch einige modifizierte Pyramidenzellen, deren Apikaldendriten sich kaum von den Basaldendriten unterscheiden, und die nur wenige Dornen besitzen. Bei Ratten sind die elektrophysiologischen, pharmakologischen und synaptologischen Eigenschaften der kortikalen Pyramidenzellen jenen der Pyramidenzellen im La und BL ähnlich [32, 106]. Hier sind die Pyramidenzellen jedoch nicht wie im Kortex laminar, sondern diffus angeordnet und die Apikaldendriten sind nicht parallel ausgerichtet, sondern in unterschiedliche Richtungen orientiert. Die Zellkörper und proximalen Dendriten der Pyramidenzellen sind fast immer Calcium-Calmodulinkinase II (CaMK II)-ir [109]. CaMK II übernimmt bei Vorgängen der Langzeitpotenzierung und des emotionalen Lernens wichtige Funktionen.

Bei Pyramidenzellen handelt es sich vorwiegend um glutamaterge Projektionsneurone, deren Aktivität in der Amygdala z. B. durch Stress erhöht werden kann. Diese erhöhte Aktivität stellt ein mögliches Korrelat von erhöhtem angstähnlichen Verhalten im Tiermodell bzw. erhöhter Ängstlichkeit und auch Depressionen beim Menschen dar [166, 167, 215].

Am Tiermodell wurde bereits dokumentiert, dass angstähnliches Verhalten von einer erhöhten Dornendichte an Pyramidenzellen verschiedener Nuclei der Amygdala begleitet wird [119, 120, 206].

1.2 Interneurone

Die übrigen 15 % der im La und BL vorkommenden Neurone besitzen einen nicht-pyramidalen Charakter und zeigen keine CaMK II-Immunreaktivität (IR). Hierbei handelt es sich um Interneurone, welche hauptsächlich γ -Aminobuttersäure (GABA) als inhibitorischen Neurotransmitter verwenden [109]. Eine Funktion dieser Interneurone besteht darin, das Eingangs-Ausgangsverhältnis der Stimuli in der Amygdala zu regulieren, indem sie die Feuerrate der Pyramidenzellen durch deren Inhibierung kontrollieren [157, 158]. Es wurde nachgewiesen, dass Interneurone nicht nur synaptische Kontakte zu Pyramidenzellen, sondern auch zu weiteren Interneuronen im selben Kerngebiet ausbilden können [130].

Nach Millhouse und DeOlmos [117] wurden Interneurone des La und BL morphologisch in drei Gruppen, nämlich die runden Sternzellen (engl.: „stellate cells“), die fusiformen Kegelnzellen (engl.: „cone cells“) und die ebenso fusiformen ausgedehnten Neurone (engl.: „extended neurons“), eingeteilt. Sternzellen bilden mit einem Anteil von ca. einem Viertel die größte Gruppe der nicht-pyramidalen Zellen im La und BL. Die Somata sind rund, erlangen einen Durchmesser von 10 bis 25 μm und die Dendriten haben keine bis wenige Dornen (s. Punkt 19.2). Fusiforme Kegelnzellen wurden so benannt, da die oft verzweigten Dendriten einen kegelförmigen Verlauf haben. Die Dendriten besitzen meist viele Dornen und können auch varikös sein. Ausgedehnte Neurone sind im La und BL nur selten nachzuweisen. Die Dendriten verlaufen gerade, verzweigen sich kaum und besitzen wenige, ungleichmäßig verteilte Dornen.

Die GABAergen Interneurone im La und BL wurden im Rattengehirn nicht nur morphologisch, sondern auch neurochemisch genauer klassifiziert. Die Arbeitsgruppe um McDonald hat diese Neurone bzgl. calziumbindender Proteine und bestimmter Neuropeptide in vier Subpopulationen eingeteilt: (1) Parvalbumin (PV)-/ Calbindin (CB)-ir, (2) SOM-/CB-ir, (3) Cholecystokinin (CCK)-ir, welche groß und oft CB-ir sind, und (4) vasoaktives Intestinalpeptid (VIP)-/Calretinin (CR)-/CCK-ir, die klein und bipolar sind [128]. Eine weitere Subpopulation stellen die ebenso meist GABAergen [110] Neuropeptid Y (NPY)-ir Neurone dar, welche im basolateralen Kernkomplex (BLA, besteht definitionsgemäß meist aus La, BL und BM) von Ratten zu fast 100 % SOM-ir, jedoch nicht PV-ir sind [111, 112] (Abb. 2). Weiterhin wurden Kolokalisationen von NPY u. a. mit CB [198] und CCK [163] nachgewiesen (Abb. 2). Auf die NPY-Neurone und deren wichtige Funktion im La und BL wird unter Punkt 4 genauer eingegangen.

Setzen Interneurone GABA frei, können diese Transmittermoleküle an GABA-Rezeptoren (GABAR) andocken. Bei GABAR vom Typ A ($GABA_A$) handelt es sich um Chloridkanäle, welche GABA an ihre α -Untereinheit binden. Die Ligandenbindung führt zu einer Öffnung dieses Kanals, woraufhin ein Cl^- -Einstrom in die Zelle erfolgt, was zu deren Hyperpolarisation führt. Benzodiazepine, die an die γ -Untereinheit dieses Rezeptors binden, erhöhen dessen Affinität für GABA [78]. $GABA_A$ kommen im La und BL von Ratten hauptsächlich im Neuropil, an dornenarmen Interneuronen sowie Astrozyten vor; nur selten wurden sie an distalen Dendriten von Pyramidenzellen nachgewiesen. GABAR vom Typ B ($GABA_B$) wurden an Interneuronen und Pyramidenzellen nachgewiesen [108, 150] und sind im BLA sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert, wo sie die GABA-Freisetzung aus den Axonen regulieren bzw. über die Aktivierung von K^+ -Kanälen eine anhaltende Hyperpolarisation hervorrufen [108].

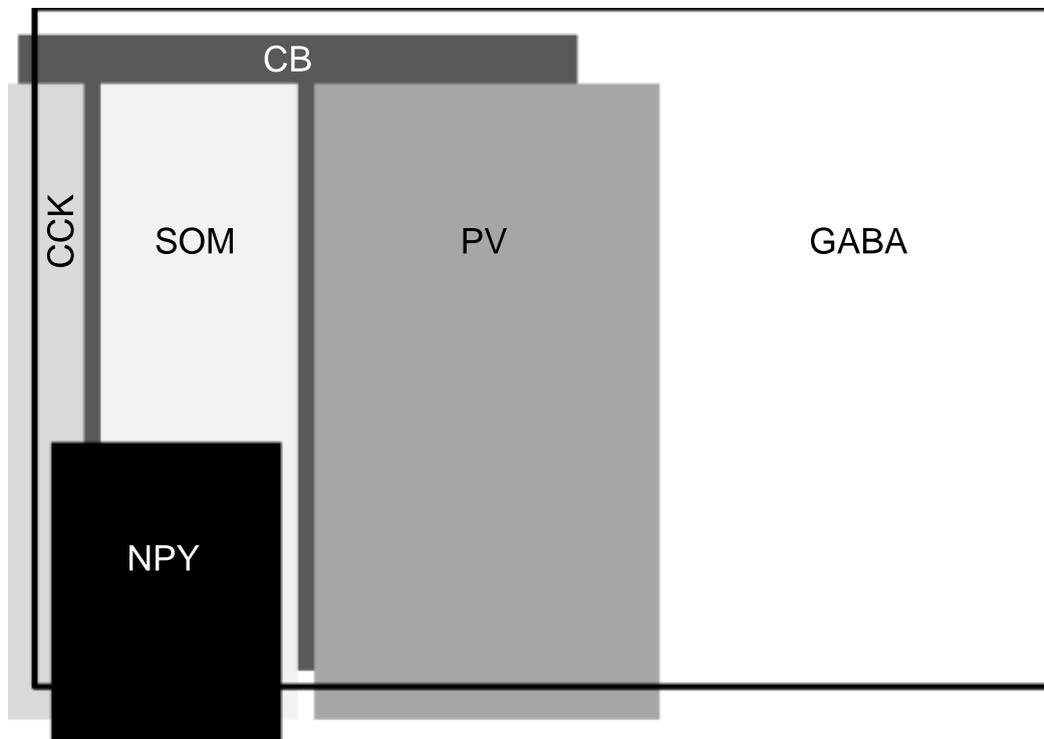


Abbildung 2: Häufigkeit der NPY-Neurone im Verhältnis zu anderen interneuronalen Populationen des La und BL. Dieses Schema zeigt die Häufigkeit der NPY-Neurone im La und BL in Relation zu GABA-, CCK-, SOM-, PV- und CB-Neuronen und die relative Überlappung mit diesen interneuronalen Populationen. Weitere Populationen, die im La und BL nicht mit NPY-Neuronen überlappen, sind hier nicht dargestellt. Dieses Schema wurde nach Truitt et al. [198] und McDonald und Mascagni [112] modifiziert; detailliertere Informationen können diesen Publikationen entnommen werden.

2 Monoaminerge Systeme

Bei Monoaminen handelt es sich um eine Gruppe von Neurotransmittern bzw. Neuromodulatoren im zentralen Nervensystem (ZNS), die aus Aminosäuren hergestellt werden. Zu diesen zählen z. B. die Catecholamine Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin, deren gemeinsamer Vorläufer L-Tyrosin ist, sowie Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT), das aus Tryptophan synthetisiert wird. Monoamine kommen sowohl im ZNS als auch in der Peripherie vor und erfüllen dort eine Vielzahl überlebenswichtiger Funktionen. Geraten die monoaminergen Systeme jedoch aus dem Gleichgewicht, können die daraus resultierenden Konsequenzen die Entstehung vieler Erkrankungen bedingen. Dies wird im Folgenden am Beispiel des serotonergen Systems genauer erläutert.

2.1 Das serotonerge System

Serotonin erfüllt im Herz-Kreislauf-, Verdauungs- und Nervensystem wichtige Funktionen. Beispielsweise ist es an der Erweiterung bzw. Verengung der Blutgefäße, sowie an der Peristaltik beteiligt. In dieser Arbeit soll jedoch der Fokus auf der Rolle des 5-HT im Gehirn liegen, wo es z. B. an der Regulation des zirkadianen Rhythmus, der Nahrungsaufnahme und der Körpertemperatur beteiligt ist. Weiterhin beeinflusst es, zusammen mit anderen Neurotransmittern, bei einer Vielzahl von Lebewesen grundlegende Entwicklungsabläufe wie z. B. die Zellteilung, Migration, Differenzierung und Morphogenese [29]. Eine der interessantesten Funktionen des 5-HT besteht darin, dass es Auswirkungen auf die Stimmungslage hat. Insbesondere Stress, Angst und Depressionen stehen mit 5-HT in sehr engem Zusammenhang, was später genauer erläutert wird. Zuvor soll jedoch auf die Neuroanatomie und -morphologie des serotonergen Systems eingegangen werden.

2.1.1 Ursprung und Morphologie serotonerger Afferenzen

Serotonerge Afferenzen haben ihren Ursprung im Nucleus raphes posterior (dorsaler Raphenkern, DR) und Nucleus raphes medianus (MR), die sich im Hirnstamm befinden. Die Morphologie der serotonergen Afferenzen, welche dem DR entspringen, sind sehr fein, besitzen pleomorphe Varikositäten und werden im Folgenden, nach Kosofsky und Molliver, als Typ D Axone bezeichnet [83]. Die sog. Typ M Axone entspringen dem MR, besitzen sehr große Varikositäten, variieren in ihrem Durchmesser und ähneln einer Perlenkette [83].

Typ D und Typ M Axone unterscheiden sich nicht nur auf Grund ihrer Morphologie, sondern auch bezüglich ihres Verteilungsmusters im ZNS: die Projektionsfasern des DR ziehen

sich dicht durch das gesamte Gehirn, während das Vorkommen der Typ M Axone weniger dicht ist. Weiterhin unterscheiden sie sich auf Grund ihrer pharmakologischen Eigenschaften: die feinen Typ D Axone sind gegenüber den neurotoxischen Auswirkungen der stimmungsverändernden Substanz p-Chloramphetamin (PCA) vulnerabel, die Typ M Axone sind jedoch widerstandsfähig. Diese Untersuchungen lassen die Vermutung zu, dass die serotonergen Typ D Axone aus dem DR eine wichtige Rolle bei der Kontrolle affektiver/emotionaler Zustände spielen [100]. Die unterschiedliche Reaktion der Typ D bzw. Typ M Axone auf PCA scheint mit deren differentieller Expression des Serotonintransporters [5-Htt (allgemein und Tiere), 5-HTT (Menschen)] einherzugehen: im Nucleus accumbens wurden an den Typ D Axonen, im Gegensatz zu den Typ M Axonen, 5-Htt immunhistochemisch nachgewiesen [25]. Weiterhin zeigten Schmidt und Kollegen, dass durch eine selektive Blockade der 5-Htt eine durch Amphetamine induzierte axonale Schädigung verhindert werden kann [176]. Im nächsten Abschnitt wird genauer auf die hohe Relevanz des 5-Htt für das serotonerge System eingegangen.

2.1.2 Genetische Modifizierung des serotonergen Systems: Serotonintransporter knock out

Der Vorgang der serotonergen Neurotransmission wird zum Großteil durch die Wiederaufnahme des 5-HT durch den NaCl-abhängigen 5-Htt reguliert (Abb. 3), bei dem es sich um einen Hauptangriffspunkt verschiedener Antidepressiva handelt [19]. Bei Menschen wird die Transkriptionsaktivität des *5-HTT*-Gens durch eine repetitive Sequenz innerhalb der Promotorregion, die auch 5-HTT-gekoppelte polymorphe Region (*5-HTTLPR*) genannt wird, moduliert. Von dieser existieren eine kurze und eine längere Variante, die mit differentieller *5-HTT*-Expression einhergeht. Die kurze Variante wird, im Vergleich zur langen Variante, mit einer verminderten Synthese des 5-HTT in Zusammenhang gebracht, die generell mit erhöhter Ängstlichkeit einhergeht und das Risiko, eine emotionale Dysregulation oder Depression zu entwickeln, erhöht [31, 91, 96, 133, 140]. Weiterhin weisen Probanden mit einer oder zwei Kopien des kurzen Allels bei der Präsentation angstbezogener Stimuli eine erhöhte Aktivität der Amygdala [64], mehr Depressionssymptome sowie eine erhöhte Selbstmordrate auf als homozygote Träger des langen Allels. Die beiden zuletzt genannten Punkte sind jedoch nur in Kombination mit Stresserfahrungen zutreffend [33, 58]. Außerdem wurde bei depressiven Patienten eine herabgesetzte Bindungsrate an 5-HTT in der Amygdala nachgewiesen [142].

Um den 5-Htt und dessen Relevanz für das serotonerge System, sowie die am Menschen entdeckte genetische Variation genauer analysieren zu können, wurde im Jahr 1998 die 5-Htt knock out- (5-Htt KO) Maus zum ersten Mal generiert [15]. Bei 5-Htt KO-Mäusen

sind neben dem lebenslangen Defizits des 5-Htt noch weitere Komponenten des serotonergen Systems im Vergleich zu Wildtypen WT verändert: beispielsweise ist die gesamte 5-HT-Konzentration im ZNS um 60 bis 80 % reduziert, im synaptischen Spalt sind die 5-HT-Werte jedoch ca. neunfach erhöht, was eine Herunterregulierung des postsynaptischen 5-HT-Rezeptors 1A (5-HT_{1A}) zur Folge hat [81].

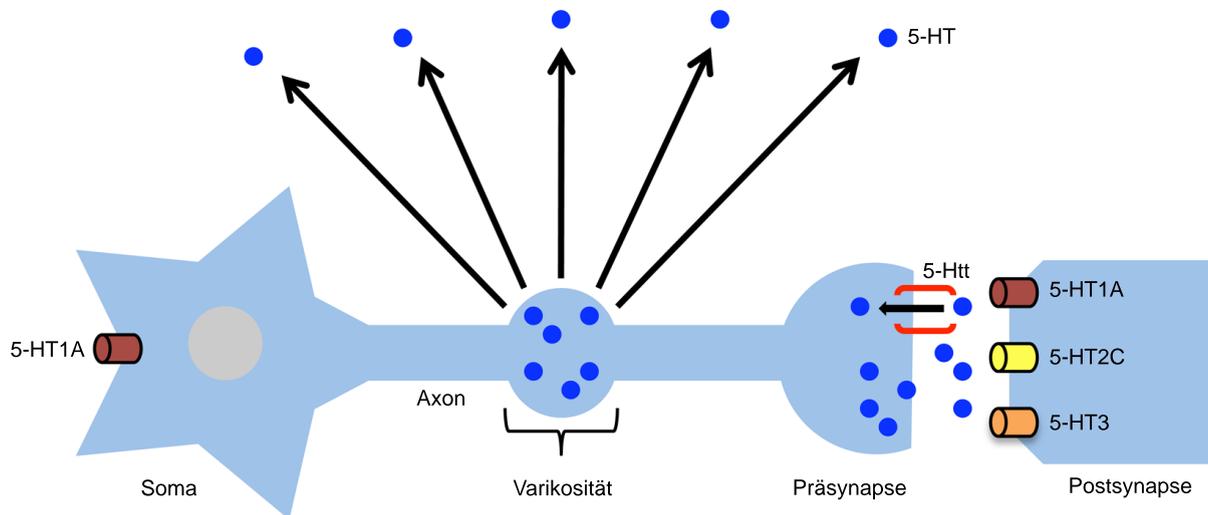


Abbildung 3: Das serotonerge Neuron und die serotonerge Synapse. 5-HT akkumuliert in den Varikositäten und den Präsynapsen und wird von dort aus freigesetzt. Von den Varikositäten aus kann 5-HT über große Distanzen diffundieren, an der Synapse wird die Aktivität des 5-HT durch dessen Wiederaufnahme durch den 5-Htt begrenzt. Die für diese Arbeit relevanten 5-HT-Rezeptoren sind angegeben.

Vergleichende Analysen der neuronalen Morphologie nicht gestresster WT- und 5-Htt KO-Mäuse wurden noch nicht durchgeführt, jedoch wurden in einer Studie von Wellman und Kollegen Mäuse beider Genotypen einem Angstkonditionierungsparadigma mit anschließender Extinktion und „Extinction Recall“ (Abruf der getesteten Angstkonditionierung nach der Extinktion) ausgesetzt. Hierbei wurde festgestellt, dass 5-Htt KO-Mäuse Defizite beim Extinction Recall hatten, welche mit Veränderungen der neuronalen Morphologie im IL und BLA einhergingen [210]. In einer anderen Studie von Jansen und Kollegen wurden WT-, heterozygote und homozygote 5-Htt KO-Mäuse einem Resident-Intruder Paradigma ausgesetzt, aus welchem sie entweder als Gewinner oder Verlierer hervorgingen [75]. Diese soziale Stresserfahrung erhöhte sowohl bei Gewinnern als auch bei Verlierern das angstähnliche Verhalten und verringerte das Erkundungsverhalten. Bei Verlierern wurde zusätzlich festgestellt, dass homozygote 5-Htt KO-Mäuse ein erhöhtes angstähnliches Verhalten und erniedrigtes Erkundungsverhalten als die Mäuse der anderen Genotypen aufzeigten [75].

2.1.3 Das serotonerge System, Stress und die Amygdala

Stresserfahrungen können bei Menschen neuropsychiatrische Erkrankungen, wie z. B. posttraumatische Störungen oder Depressionen, auslösen [72, 136, 175]. Auch am Tiermodell konnte bereits vielfach gezeigt werden, dass sich besonders das angstähnliche Verhalten auf Grund von Stress signifikant verändert [196, 202]. Viele Wissenschaftler beschäftigen sich mit der Thematik, wie Stresserfahrungen im Gehirn prozessiert werden und es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass besonders Areale des limbischen Systems, wie z. B. der IL, Hippocampus und die Amygdala, hierbei eine entscheidende Rolle spielen. Es wurde bereits gezeigt, dass eine Stresserfahrung mit einer von GABAergen Neuronen abhängige Desinhibierung des BLA einhergeht [73]. Dadurch steigt die Feuerrate der Pyramidenzellen an, woraufhin sich der BLA in einem übererregten Zustand befindet. Dadurch nimmt die synaptische Plastizität und die ausgehende Signalstärke zu, wodurch angstähnliches bzw. Stressverhalten erhöht werden kann [164].

Wie eine Stresssituation wahrgenommen wird und wie man darauf reagiert, wird durch verschiedene Neurotransmittersysteme, z. B. das noradrenerge [55] und das dopaminerge [48, 160], beeinflusst. Allerdings ist 5-HT der Neurotransmitter, der hauptsächlich mit Stress, Angst und dadurch induzierte neuropsychiatrische Erkrankungen in direkten Zusammenhang gebracht wird [70, 87, 97]. Während einer Erregungs- oder Stresssituation steigt die Serotoninfreisetzung in der Amygdala von Ratten an [171] und es ist weiterhin bekannt, dass die Ausgangsinformationen des BLA durch Serotonin moduliert werden [179]. Folglich scheint ein Zusammenhang zwischen serotoninabhängiger, neuronaler Aktivität in der Amygdala und der Verarbeitung unterschiedlicher emotionaler Stimuli zu bestehen.

Hierbei ist zu beachten, dass zwar sowohl kontrollierbarer (kS) als auch unkontrollierbarer Stress (uS) erhöhtes angstähnliches Verhalten im Tiermodell zur Folge haben, jedoch sind die Auswirkungen nach uS wesentlich höher [60]. Angstähnliche Verhaltens-effekte auf Grund von uS können bis zu drei Tagen anhalten. Maier und Watkins schlagen vor, dass während dieser Zeitspanne die 5-HT_{1A} Autorezeptoren, die bei erhöhter 5-HT-Konzentration eigentlich die Feuerrate serotonerger Neurone im DR drosseln (s. 2.1.4.1), bei uS auf Grund extrem hoher 5-HT-Konzentrationen densensitisiert werden, wodurch die serotonergen Neurone im DR wieder empfänglicher für Eingangsinformationen werden und weiterfeuern, was zu angstähnliches Verhalten führen kann [99, 36]. Bei chronischem Stress könnte dieses System noch weiter aus der Balance geraten, wodurch länger andauernde angstähnliche Verhaltensweisen bzw. Angststörungen ausgelöst werden können. Die Aktivität serotonerger Neurone im DR wird u. a. über Corticotropin releasing factor (CRF) moduliert, wobei die genaue extrinsischen CRF-Quelle noch nicht bekannt ist

[201]. Hier spielen vermutlich auch CRF-Neurone aus dem Ce eine entscheidende Rolle. Auch pharmakologische Studien liefern Hinweise auf direkte Zusammenhänge zwischen Stress und dem serotonergen System: z. B. ruft der 5-HT-Rezeptoragonist Meta-Chlorphenylpiperazin (mCPP) bei Nagern angstähnliche Reaktionen hervor [13, 116] und in klinischen Studien wurde gezeigt, dass mCPP bei Menschen Angst- und Panikzustände verschlimmert [35, 181]. Wie sich Stress und genetische Modifizierungen des serotonergen Systems auf die neuronale Morphologie in verschiedenen Hirnarealen auswirken können, wurde bereits an Mäusen und Ratten untersucht und hierbei wurden Veränderungen der dendritischen Komplexität sowie der Dichte dendritischer Dornen dokumentiert [74, 104, 165].

2.1.4 Serotoninrezeptoren

Wie sich die Wirkung des 5-HT im La und BL entfalten kann, hängt u. a. vom zeitlichen Verlauf der 5-HT-Wirkung, der damit verbundenen extrazellulären Konzentration im La und BL sowie im DR und der 5-HT-Rezeptorausstattung der Zielneurone ab. Für keinen anderen Neurotransmitter sind so viele Rezeptoren bekannt wie für 5-HT. Die Familie der 5-HT-Rezeptoren umfasst 14 Mitglieder, welche in sieben Gruppen aufgeteilt und wiederum subklassifiziert wurden. Die Resultate verschiedener Untersuchungen belegen, dass der Großteil der 5-HT-Rezeptoren in der Amygdala von Ratten vorzufinden sind [14, 70, 143, 188]. Aus elektrophysiologischen Untersuchungen geht hervor, dass 5-HT die Feuerrate von Pyramidenzellen und Interneuronen über 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} und 5-HT₃ in der Amygdala modulieren kann. Hierbei steigt die allgemeine neuronale Feuerrate bei Applikation von 5-HT₂- und 5-HT₃-Agonisten in verschiedenen amygdaloiden Nuclei an und wird bei Applikation eines 5-HT_{1A}-Agonisten inhibiert [187]. In den folgenden Abschnitten werden 5-HT_{1A}, 5-HT_{2C} und 5-HT₃ (Abb. 3) genauer charakterisiert.

2.1.4.1 5-HT_{1A} Der 5-HT_{1A} besitzt sieben Transmembrandomänen, bindet 5-HT mit nanomolarer Affinität [63] und liegt im ZNS heterogen verteilt vor. Bei 5-HT_{1A}, die im somatodendritischen Bereich serotonerger Neurone im DR und MR lokalisiert sind, handelt es sich um inhibitorische Autorezeptoren [162], welche die Rückkopplungsinhibierung des serotonergen Systems gewährleisten. Die Aktivierung dieser 5-HT_{1A} durch 5-HT bewirkt eine Herabsetzung der Feuerrate der serotonerger Neurone, was zu einer Abschwächung der 5-HT-Synthese und -freisetzung führt [14].

In den Projektionsgebieten serotonerger Neurone sind 5-HT_{1A} hauptsächlich postsynaptisch lokalisiert [118], elektrophysiologische Untersuchungen deuten aber auch auf eine präsynaptischen Lokalisation der 5-HT_{1A} hin [85]. Eine Aktivierung der postsynaptischen

5-HT_{1A} führt über inhibitorische G_{βγ}-Proteine zu einer Öffnung von G-Protein gekoppelten einwärts gleichrichtenden Kaliumkanälen (GIRK-Kanäle; engl.: G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel, s. [161]), was einen erhöhten Kaliumausstrom aus der Zelle bewirkt. Dies geht mit einer Hyperpolarisation der Zellmembran einher und die Feuerrate der Zelle wird herabgesetzt [98]. Diese Hyperpolarisation der Zellmembran kann z. B. im La auch durch 8-OH-DPAT, einen selektiven 5-HT_{1A}-Agonisten, ausgelöst werden. Durch WAY 100635, einen 5-HT_{1A}-Antagonisten, kann diese Inhibition der Zellerregbarkeit blockiert werden [153, 187]. Weiterhin sind 5-HT_{1A} an N-Methyl-D-Aspartatrezeptoren (NMDAR) gekoppelt und senken deren Effizienz herab [16].

In einer autoradiografischen Kartierungsstudie des Rattengehirns belegten Miquel und Kollegen mittels *in situ* Hybridisierung (ISH) und immunhistochemischen Markierungen, dass 5-HT_{1A} vorwiegend in Strukturen des limbischen Systems, wie z. B. im Gyrus dentatus und in der CA1-Region des Hippocampus sowie, mit geringerer Expressionsstärke, in der Amygdala vorzufinden sind [118]. Die Verteilung der 5-HT_{1A}-IR sowie der mRNA sind z. B. im Hippocampus und der Amygdala durchaus vergleichbar. Da sich die Bindungsstellen des 5-HT_{1A}-Proteins mit dem mRNA-Expressionsmuster decken, liegt die Vermutung nahe, dass die Lokalisation des Proteins in unmittelbarer Nähe des Syntheseorts, also hauptsächlich im somatodendritischen Bereich eines Neurons, liegt [118]. Sowohl im Kortex als auch in Arealen des limbischen Systems sind 5-HT_{1A} weit verbreitet. Mittels immunhistochemischer Untersuchungen wurden diese Rezeptoren bereits im La und BL an ca. 71 % der Pyramidenzellen, 89 % der CB- und 88 % der PV-ir Neuronen nachgewiesen [12].

Das Vorkommen des 5-HT_{1A} im La und BL lässt vermuten, dass dieser Rezeptor bei der Verarbeitung emotions- bzw. angstrelevanter Reize eine wichtige Rolle spielt. Diese Vermutung wurde bereits vielfach bestätigt, jedoch sind die Befunde bei Ratten zum Teil kontrovers: eine direkte Applikation verschiedener 5-HT_{1A}-Agonisten in den BLA (8-OH-DPAT, Ipsairone, Buspiron) bewirkt in unterschiedlichen Verhaltenstests meistens anxiolytische Effekte. Im sozialen Interaktionstest wirken diese Agonisten jedoch anxiogen und z. B. im Elevated Plus Maze (EPM) wurden keine Auswirkung auf das Verhalten nachgewiesen [57, 114]. Die anxiolytische Wirkung von 8-OH-DPAT kann durch den 5-HT_{1A}-Antagonisten WAY 100635, welcher dasselbe Bindungsmuster wie 8-OH-DPAT hat, aufgehoben werden [40].

5-HT_{1A} KO zeigen erhöhtes angsthähnliches Verhalten und eine erhöhte Stressantwort [145] und eignen sich daher als Tiermodelle, um Ängstlichkeit zu untersuchen [197]. Dies gilt sowohl für homo- als auch für heterozygote 5-HT_{1A} KO, was bedeutet, dass ein partielles Rezeptordefizit hinreichend für diesen Phänotyp ist. Folglich ist es sehr wahrscheinlich,

dass eine Herunterregulation des 5-HT_{1A} ein Risikofaktor für Angsterkrankungen darstellt. Dies konnten Studien am Menschen tatsächlich belegen: bei Patienten mit Stimmungs- oder Angststörungen wurden erniedrigte Vorkommen des 5-HT_{1A} im Gehirn nachgewiesen [92]. Chronischer Stress, einer der Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung einer Stimmungsstörung, begünstigt im Tiermodell eine Abnahme des 5-HT_{1A} im Hippocampus [207]. Auch bei 5-Htt KO-Mäusen, die erhöhtes angsthähnliches Verhalten zeigen [133], wurde eine Herunterregulierung des postsynaptischen 5-HT_{1A} als Folge der ca. neunfach erhöhten Serotoninwerte im synaptischen Spalt dokumentiert. Des Weiteren wurde gezeigt, dass eine selektive Blockade des 5-HT_{1A} durch einen Antagonisten bei 5-Htt KO-, jedoch nicht bei WT-Mäusen anxiolytische Effekte im EPM hat [71, 81].

2.1.4.2 5-HT_{2C} Auf Grund seiner hohen Affinität zu [³H]-5-HT, die jener der 5-HT₁-Familie entspricht, wurde der heute und der Bezeichnung „5-HT_{2C}“ bekannte Rezeptor zuerst „5-HT_{1C}“ genannt [147]. Nach weiteren Analysen wurde dieser Rezeptor jedoch wegen seiner pharmakologischen Eigenschaften der 5-HT₂-Familie zugesprochen. Der 5-HT_{2C} besitzt sieben Transmembrandomänen, unterscheidet sich jedoch strukturell vom 5-HT_{1A}, und ist in der Amygdala postsynaptisch lokalisiert [70]. Über ein G_{αq}-Protein-gekoppelten Signalweg führt dessen Aktivierung zur Schließung von Zwei-Porendomänen Kaliumkanälen (K₂P), besonders TASK-3 (engl.: TWIK-related acid-sensitive potassium channel-3) [208]. Die neuronale Erregbarkeit wird hauptsächlich durch solche K₂P reguliert. Sie sind im Ruhezustand der Zelle geöffnet, was einen Kaliumausstrom (Hintergrundstrom) begünstigt. Das Ruhepotenzial der Zelle ist also niedrig. Über 5-HT_{2C} werden diese Kanäle inhibiert, was eine Depolarisation eines Neurons erleichtert bzw. erhöhen kann. Weiterhin sind 5-HT_{2A/C} an NMDAR gekoppelt und steigern deren Effizienz [94].

Sowohl bei Nagetieren als auch beim Menschen wird die 5-HT_{2C} mRNA posttranskriptionell editiert, das heißt, es existieren mehrere 5-HT_{2C}-Isoformen, die im Gehirn unterschiedlich verteilt vorliegen [28, 139]. *In vitro* Experimente zeigen: je weniger diese Isoformen editiert sind, desto funktioneller sind sie [101]. Manche Isoformen können die Interaktion des Rezeptors mit dem G_q-Protein um ein bis zu 15-faches herabsetzen [28]. Folglich interagieren sie unterschiedlich effektiv mit dem G_q-Protein, was zu verschiedenen regulatorischen und pharmakologischen Konsequenzen führt. Der 5-HT_{2C} ist der einzige bekannte Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen, dessen mRNA posttranskriptionell editiert wird [211]. In einer vergleichenden qualitativen Studie über die Verteilung der 5-HT_{2C} mRNA und der Bindungsdichte an die korrespondierenden Proteine wurde eine hohe Korrelation nachgewiesen [115]. Das bedeutet, dass 5-HT_{2C} hauptsächlich somatodendritisch lokalisiert sind, was auch anhand immunhistochemischer Untersuchungen

bestätigt wurde [95, 208]. In kortikalen Gebieten wurden 5-HT_{2C} sowohl an Pyramidenzellen [214] als auch Interneuronen [95] nachgewiesen, für den La und BL gibt es noch keine äquivalenten Befunde.

Unterschiedliche pharmakologische Studien und entsprechende Verhaltensuntersuchungen zeigen, dass 5-HT_{2C}-Agonisten, die direkt in die Amygdala appliziert werden, anxiogen wirken [30, 114]. Während einer nicht kontrollierbaren, jedoch nicht während einer kontrollierbaren, Stresssituation steigt die extrazelluläre 5-HT-Konzentration im BLA von Ratten an [4], woraufhin durch Aktivierung der 5-HT_{2C} angstähnliches Verhalten ausgelöst wird [36]. Eine Injektion des 5-HT_{2C} Agonisten CP 809,101 löst die gleiche Stressantwort aus und durch den 5-HT_{2C} Antagonisten SB 242,084 konnte das angstähnliche Verhalten nach nicht kontrollierbarem Stress unterbunden werden [36].

Besonders interessant sind auch pharmakologische Befunde, die an 5-Htt KO-Mäusen, die einen „ängstlichen“ Phänotyp zeigen [68], durchgeführt wurden: im sog. Open Field Test wurde durch den selektiven 5-HT_{2C}-Agonisten RO 60-0175 angstähnliches Verhalten bei WT-Mäusen induziert, welches bei 5-Htt KO-Mäusen ausblieb [125]. Dies könnte mit unterschiedlichen Editierungsprofilen des 5-HT_{2C} bei WT- und 5-Htt KO-Mäusen zusammenhängen. 5-Htt KO-Mäuse zeigen ein geringeres Vorkommen der weniger editierten, funktionelleren Isoformen, also ein erhöhtes Vorkommen der editierteren Isoformen mit herabgesetzter Signaleffektivität [125]. Diese Beobachtung liefert einen Hinweis darauf, warum 5-Htt KO-Mäuse weniger verhaltensauffällig bei Applikation von 5-HT_{2C} Agonisten sind.

2.1.4.3 5-HT₃ Bisher ist der 5-HT₃ der einzige bekannte 5-HT-Rezeptor, welcher der Klasse der durch Liganden gesteuerten Ionenkanäle angehört, zu welcher auch GABA_A zählen. 5-HT₃ umfasst fünf Transmembrandomänen und ist im geöffneten (aktivierten) Zustand für monovalente Kationen permeabel, was zur Depolarisation der Zelle führt und in der Amygdala und anderen Hirnarealen zu einer schnellen exzitatorischen synaptischen Übertragung beiträgt [78, 189]. Die höchste 5-HT₃-Dichte wurde im Hirnstamm nachgewiesen, aber auch im La und BL findet man 5-HT₃ vor [122]. Elektrophysiologische Untersuchungen deuten auf eine präsynaptische Lokalisation dieser ionotropen Rezeptoren an GABAergen Interneuronen der Amygdala hin, welche dort die GABA-Freisetzung begünstigen [70, 84]. Einige GABAerge Neurone, die mit 5-HT₃ ausgestattet sind, sind gleichzeitig bezüglich CCK, CR, VIP, oder PV immunreaktiv, der Großteil der 5-HT₃-ir Neuronen gehört jedoch, laut Mascagni und Kollegen, einer noch unbekanntem Subpopulation an [105].

Eine direkte Applikation von 5-HT₃-Antagonisten in die Amygdala von Ratten hat in

unterschiedlichen Verhaltenstests fast immer anxiolytische Effekte, Agonisten wirken anxiogen [114]. 5-HT₃-Antagonisten führen jedoch auch gegenteilige Effekte herbei [69]. Bei Menschen werden 5-HT₃-Antagonisten zu therapeutischen Zwecken, z. B. bei Angsterkrankungen oder kognitiven Fehlfunktionen, eingesetzt [141].

2.2 Das dopaminerge System

So wie das serotonerge System hat auch das dopaminerge System im ZNS unterschiedliche Funktionen. Beispielsweise ist Dopamin ein wichtiger Transmitter im Belohnungssystem und wird freigesetzt, wenn man überraschend eine Belohnung erhält. Gerät das dopaminerge System in Form einer Degeneration der Nervenzellen in der Substantia nigra pars compacta aus dem Gleichgewicht, entsteht die Parkinson-Krankheit, bei der es sich um eine der häufigsten und bekanntesten Bewegungsstörungen beim Menschen handelt.

Wie bereits erwähnt, ist das dopaminerge System auch an der Verarbeitung emotionaler Reize sowie an der Vermittlung der Stressantwort beteiligt [39, 174]. Es wurde bereits gezeigt, dass Dopamin bei Stress in der Amygdala freigesetzt wird [213], die inhibitorischen Vorgänge im BLA vermindert [59, 168] und damit angstähnliche Verhaltensweisen, sowie eine damit einhergehende synaptische Plastizität ermöglichen könnte [102, 121]. Andere Untersuchungen deuten an, dass dopaminerge Afferenzen im Ce CRF-ir Neurone, welche den Dopaminrezeptor (DrdR) vom Typ 2 (Drd₂) besitzen, innervieren, wodurch Stressreaktionen vermutlich gedämpft werden können [47].

2.2.1 Dopaminrezeptoren

Die Auswirkungen von Dopamin auf die jeweiligen Zielneurone hängen von deren DrdR-Ausstattung ab. Die metabotropen DrdR gehören der Familie der an G-Proteine gekoppelte Rezeptoren an, für welche sieben Transmembrandomänen charakteristisch sind. Von den fünf bereits bekannten DrdR kommt Drd₁ im BLA am häufigsten vor [121], der die Adenylatzyklase aktiviert [78]. Pharmakologische Studien zeigen, dass Drd₁-Agonisten, die direkt in den BLA injiziert werden, in der Regel anxiogen und entsprechende Antagonisten hingegen anxiolytisch wirken [121]. Drd₂-Antagonisten, die direkt in den BLA injiziert werden, wirken ebenso anxiolytisch [121]. Die Wirkungsweise beider DrdR scheint also in diesem Kernkomplex gleich zu sein, allerdings liegt die Vermutung nahe, dass sie von unterschiedlichen Zelltypen bzw. neuronalen Subpopulationen ausgebildet werden, da deren Verteilungsmuster nicht überlappend ist [177]. Bisher wird angenommen, dass sich Drd₂ im BLA sowohl an Interneurone als auch an Pyramidenzellen befinden [121], wo sie die Adenylatzyklase inhibieren [78].

Aus dem *Drd₂*-Gen können durch alternatives Spleißen zwei Proteinisoformen, nämlich eine längere mit 444 Aminosäuren sowie eine kürzere mit 415 Aminosäuren, synthetisiert werden. Auf Grund der daraus resultierenden Varianz innerhalb der zytoplasmatischen Schleife, welche für die Bindung an G-Proteine verantwortlich ist, interagieren diese Isoformen mit unterschiedlichen G-Proteinen [154]. Die längere Isoform ist hauptsächlich postsynaptisch lokalisiert und bei der kürzeren handelt es sich um einen präsynaptischen Autorezeptor [199]. *Drd₁* und *Drd₂* wurden im La und BL von Ratten und Menschen nachgewiesen, allerdings ist die intra-amygdaläre Verteilung dieser *DrdR* in beiden Spezies unterschiedlich [121].

3 Zielstrukturen monoaminerger Systeme in der Amygdala

Bei allen bisher untersuchten Spezies erhält die Amygdala eine dichte noradrenerge, dopaminerge und serotonerge Innervation, wobei diese bzgl. der einzelnen Nuclei heterogen ist und von Spezies zu Spezies variieren kann. Beispielsweise erreicht eine Vielzahl noradrenerger Afferenzen aus der Pons und Medulla oblongata die Amygdala über das amygdalofugale Bündel oder die Stria terminalis [9, 76]. Hierbei erhält der mediale Teil des Ce (CeM) die dichteste noradrenerge Innervation. Da der Fokus dieser Arbeit hauptsächlich auf der serotonergen Innervation der Amygdala liegt und vergleichend dopaminerge afferente Systeme untersucht werden, wird für eine detaillierte Beschreibung der noradrenergen Innervation der Amygdala von Ratten an dieser Stelle auf die Arbeiten von Asan [8] sowie Fallon und Ciofi [76] verwiesen.

3.1 Zielstrukturen dopaminerger Afferenzen

Die Amygdala wird von Neuronen des ventralen tegmentalaren Areals (VTA) sowie der Substantia nigra pars compacta dopaminerg innerviert [76, 135]. Auch hier erhält der CeM gegenüber den anderen Nuclei die dichteste Innervation (dopaminerge Faserdichte CeM > BL > La) [8, 76, 121]. Um dopaminerge Afferenzen immunhistochemisch darzustellen, werden oft Antikörper gegen Tyrosinhydroxylase (TH) verwendet [7, 9, 149]. Im La und BL bilden bis zu 50 % der TH-ir Terminale symmetrische Synapsen aus, die PV- und CR-ir Somata kontaktieren [149]. Die Hauptziele der TH-ir Afferenzen sind im La und BL jedoch Dornen bzw. distale Dendriten noch nicht charakterisierter Neurone, unter denen sich mit hoher Wahrscheinlichkeit auch Pyramidenzellen befinden [149]. Weiterhin wurden in elektronenmikroskopischen Präparaten des BL von Ratten Membranappositionen

zwischen TH-ir Afferenzen und NPY-ir Somata beobachtet [9].

Es gibt viele Hinweise darauf, dass die dopaminerge Innervation der Amygdala eine Rolle bei der Verarbeitung emotionaler Reize spielt. Beispielsweise korreliert die Dichte der TH-ir Fasern im La und BL invers mit angstähnlichem Verhalten in adulten Ratten [212] und nach einer unilateralen Läsion dopaminerger Afferenzen mit Ursprung im VTA und der Substantia nigra steigt die Expression der NPY mRNA sowie die Anzahl der NPY-ir Neurone in der Amygdala im Vergleich zur kontralateralen Seite an [183]. Das wissenschaftliche Interesse, Interaktionen zwischen dopaminergen Afferenzen und deren Zielneuronen in der Amygdala aufzuklären, ist also sehr hoch und es wurden schon wichtige Zusammenhänge analysiert. Um die von Dopamin abhängigen Prozesse in der Amygdala noch besser verstehen zu können, müssen weiterführende Untersuchungen angeschlossen werden.

3.2 Zielstrukturen serotonerger Afferenzen

Die Amygdala erhält eine dichte serotonerge Innervation, welche ihren Ursprung vorwiegend im DR hat [76, 205]. Diese serotonergen Projektionen erreichen die Amygdala über das amygdalofugale Faserbündel und die Stria terminalis [76]. Der La und BL werden sehr dicht und gleichmäßig von Typ D Axonen innerviert, während insbesondere der laterale Ce im Verhältnis dazu nur eine sehr geringe serotonerge Innervation erhält [10, 9, 76]. Die Amygdala wird auch von Projektionen des MR serotonerg innerviert [76], wobei im BL, Ce und Me, jedoch nicht im La, Typ M Axone in sehr geringem Maße nachgewiesen wurden [204].

Im La und BL stellen sowohl Pyramidenzellen als auch bestimmte Interneurone Zielneurone serotonerger Afferenzen dar [131]. Mittels ultrastruktureller Analyse wurde nachgewiesen, dass im BLA 76 % der 5-HT-ir Afferenzen synaptische Kontakte ausbilden und deren häufigste Ziele dendritische Dornen und distale Dendriten von Pyramidenzellen sind [131]. Mittels lichtmikroskopischer Analysen wurden potenzielle Kontaktstellen zwischen serotonergen Afferenzen und CB-, PV-, SOM- und CR-ir Neuronen im BLA nachgewiesen [131]. Am Elektronenmikroskop wurden Kontakte zwischen serotonergen Terminalen und PV-ir Neuronen bestätigt. Die 5-HT-ir Terminale besitzen Ansammlungen kleiner synaptischer Vesikel und eine geringe Anzahl größerer dicht gepackter Vesikel. 5-HT wird jedoch nicht nur an synaptischen Terminalen über die klassische Neurotransmission, sondern auch über die parakrine Signalübertragung (Volumentransmission) an den Varikositäten freigesetzt (Abb. 3, [3]). Hierbei befinden sich in unmittelbarer Umgebung des Freisetzungsortes keine postsynaptischen Strukturen. Von den Varikositäten aus, bei welchen es sich um mit Transmitter gefüllte Anschwellungen von Axonen handelt, kann 5-HT über relativ weite Strecken diffundieren und somit verschiedene Zielstrukturen in größerer Entfernung errei-

chen [20, 27].

Viele elektrophysiologische und pharmakologische Studien sowie Verhaltensuntersuchungen belegen, dass Veränderungen der serotonergen Neurotransmission das angstähnliche Verhalten von Nagetieren beeinflussen kann [97]. Eine Reihe von Untersuchungen hat gezeigt, dass die Subpopulation von Interneuronen, welche NPY produziert, eine besondere Bedeutung für anxiolytische Vorgänge hat (s. Punkt 4). Daher liegt die Vermutung nahe, dass auch diese Neurone von serotonergen Afferenzen kontaktiert werden. Obwohl es von enormer Relevanz für die weitere Aufklärung „emotionaler Schaltkreise“ ist, mögliche Interaktionen zwischen dem serotonergen System und NPY–Neuronen im La und BL zu analysieren, wurden auch hierzu noch keine Untersuchungen durchgeführt.

4 Neuropeptid Y und Neuropeptid Y–Rezeptoren

NPY besteht aus 36 Aminosäuren und wurde erstmals von Tatemoto im Jahre 1982 beschrieben [193]. Sowohl im ZNS von Nagetieren als auch von Menschen wurde NPY in hohen Mengen nachgewiesen und gilt als eines der im Gehirn am meisten verbreiteten Neuropeptide [134]. NPY und andere Neuropeptide werden häufig als Neuromodulatoren bezeichnet und unterscheiden sich von klassischen Neurotransmittern. Beispielsweise können sie über längere Distanzen diffundieren und ihre Wirkung hält deutlich länger als die von klassischen Neurotransmittern an, da keine entsprechenden Wiederaufnahmemechanismen vorhanden sind [172].

In manchen Hirnarealen, wie z. B. dem ventromedialen Nucleus geniculatus, fungieren NPY–Neurone als Projektionsneurone. Bei Ratten gelangen von dort aus Afferenzen zum suprachiasmatischen Nucleus und sind an der Regulation des zirkadianen Rhythmus beteiligt [134]. Im La und BL hingegen handelt es sich bei NPY–Neuronen um intrinsische Interneurone und damit um Bestandteile lokaler Netzwerke innerhalb eines Nucleus (engl.: „local circuit neurons“), welche die neuronale Aktivität von Pyramidenzellen regulieren können [79, 134]. Außerdem wird NPY in Neuronen des Locus caeruleus produziert, die den BLA noradrenerg innervieren [61]. Im gesamten Ratten- und Menschengehirn repräsentieren NPY–Neurone auf Grund ihres einzigartigen Verteilungsmusters [2, 61] eine eigene Subpopulation mit meist nicht-pyramidalem Charakter.

Es ist schon längere Zeit bekannt, dass NPY u. a. an der Regulation des zirkadianen Rhythmus, des Essverhaltens sowie der Hypothalamus–Hypophysen–Nebennierenrinden–Achse (HPA–Achse) beteiligt ist [134]. Dies sind alles Funktionen, welche bei Personen, die unter Angststörungen oder Depressionen leiden, beeinträchtigt sein können. Daher vermuteten Widerlöv und Kollegen, dass NPY auch bei solchen Erkrankungen eine Rolle spielt [134].

Tatsächlich belegten sie in einer klinischen Studie, dass depressive Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe viel geringere NPY–Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis hatten. Weiterhin wurde bei depressiven Patienten eine geringere Dichte NPY–positiver Zellen in der Amygdala im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen [52]. In einer aktuelleren Studie wurde gezeigt, dass ein SNP (engl: „single nucleotide polymorphism“) im *NPY*–Gen zu einer 30 prozentigen Reduzierung der NPY mRNA im gesamten Gehirn führt, die mit einer erhöhten Amygdalaaktivität nach Präsentation bedrohlich wirkender Gesichtsausdrücke in Zusammenhang zu stehen scheint [216]. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass Träger derselben genetischen Variation während einer Therapie mit Antidepressiva nach einer Zeitspanne von zwei Wochen langsamer auf diese Therapie ansprechen und nach vierwöchiger Behandlung eine geringere Rückbildungsrate der Depression aufweisen [45]. Die Ergebnisse aus pharmakologischen Experimenten und Verhaltensstudien vieler voneinander unabhängiger Arbeitsgruppen manifestieren, dass NPY emotionsähnliches Verhalten herabsenkt und insbesondere angst- und depressionsähnliche Reaktionen, sowie Stressverhalten reduziert [79, 123, 134, 170]. Mikroinjektionsstudien mit NPY und entsprechenden Antagonisten sowie weitere Verhaltensstudien weisen auf die Beteiligung von NPY an anxiolytischen bzw. emotionsmodulierenden Vorgängen speziell in der Amygdala hin [79, 123]. Besonders die intrinsischen NPY–Neurone im La und BL scheinen bei Ratten an den angstlösenden Effekten beteiligt zu sein, da die Anzahl dieser Neurone invers mit angsthähnlichem Verhalten korreliert [212] und eine spezifische Läsion dieser Neurone bei gleichzeitiger Erhaltung extrinsischer NPY–Afferenzen angsthähnliches Verhalten verstärkt [198].

Heilig und Kollegen postulieren, dass in der Amygdala NPY während einer Stresserfahrung der Gegenspieler des anxiogen wirkenden CRF ist [66]. In der Amygdala sind CRF–ir Projektionsneurone im Ce vorzufinden, die bei der Entstehung von angsthähnlichem Verhalten eine entscheidende Rolle spielen, indem sie durch Freisetzung von CRF reflexive und vegetative Reaktionen modulieren [49]. In der initialen Stressphase wird CRF aus dem Ce freigesetzt, wodurch die typischen stressbedingten endokrinen und autonomen Reaktionen ausgelöst werden. Während der späten Stressphase wird NPY freigesetzt, wodurch das „emotionale Gleichgewicht“ wiederhergestellt wird [66]. Wie diese durch NPY vermittelten Prozesse ablaufen bzw. welche direkten Effekte NPY auf Zielzellen hat, hängt von deren NPY–Rezeptorexpression ab.

Im Gehirn von Ratten und Menschen sind vier funktionsfähige Neuropeptid Y–Rezeptoren (YR), nämlich Y_1 , Y_2 , Y_4 und Y_5 , bekannt, wobei Y_4 in der Amygdala von Ratten nicht nachgewiesen wurde [79]. Diese YR sind an G–Proteine gekoppelt [18]. Im BLA von Ratten vermitteln postsynaptisch lokalisierte Y_1 anxiolytische und an NPY–Neuronen präsynap-

tisch lokalisierte Y_2 anxiogene Effekte [65, 173, 169, 170, 192]. Y_5 ist in geringerem Ausmaß als Y_1 an anxiolytischen Vorgängen beteiligt und spielt eher bei sedativen Effekten eine Rolle [184].

Rostowski und Kollegen konnten mittels immunhistochemischen Markierungen zeigen, dass 99,9% der CaMKII- und 85% der Glutamatdecarboxylase (GAD)-positiven Zellen im La und BL Y_1 kolokalisieren [169], folglich kann NPY sowohl Pyramidenzellen als auch Interneurone modulieren. Y_1 ist fast ausschließlich an den Somata von Pyramidenzellen und Interneuronen lokalisiert [169]. Im La scheint NPY über Y_1 , welche GIRK aktivieren, eine Hyperpolarisation von Pyramidenzellen zu begünstigen [185]. Jedoch deuten die Resultate einer pharmakologischen Studie von Giesbrecht und Kollegen an, dass die durch NPY und Y_1 bedingte Hyperpolarisation von Pyramidenzellen wohl nicht über GIRK vermittelt werden [53]. Weiterhin sollen die NPY-Effekte unabhängig von GABA sein [53]. Y_2 inhibieren im aktivierten Zustand die NPY- und GABA-Freisetzung. Eine Deletion des Y_2 begünstigt einen anxiolytischen Phänotyp. Vermutlich wird dann mehr GABA und NPY freigesetzt, wodurch angsthähnliches Verhalten herabgesetzt werden kann [192].

Eine Vielzahl voneinander unabhängiger Experimente liefert Hinweise darauf, dass das intrinsische NPY-System im La und BL für anxiolytische Vorgänge sowohl bei Tieren als auch bei Menschen von herausragender Bedeutung ist. Daher ist es von hohem Interesse, diese Neurone genau zu charakterisieren, was tiefere Einblicke in „emotionale Schaltkreise“ ermöglicht.

5 Zielsetzungen dieser Arbeit

Es besteht ein großes wissenschaftliches und gesellschaftliches Interesse daran, unser Verständnis bezüglich der Verarbeitung emotionaler Stimuli und der Entstehung von Emotionen zu erweitern. Ein besonderer Fokus liegt hierbei auf der Aufklärung zentralnervöser Prozesse bei der Verarbeitung von Angst- und Stresssituationen, deren Folge oft psychiatrische Erkrankungen, wie z. B. Depressionen sein können. Untersuchungen an Tieren und Menschen deuten darauf hin, dass Umwelteinflüsse, wie z. B. Stress, und/oder genetische Faktoren an dem Krankheitsbild der Depression individuell in unterschiedlichem Maße beteiligt sind. Ein solches „emotionales Ungleichgewicht“ kann mit Veränderungen der Neuroplastizität, Veränderungen im serotonergen System und funktionellen Veränderungen bestimmter, für die Verarbeitung emotionaler Stimuli relevanter, Schaltkreise einhergehen. Ein zentraler Bestandteil dieser Schaltkreise ist die laterobasale Amygdala (La und BL). Ziel dieser Arbeit ist es, mittels Untersuchungen verschiedener Aspekte tiefere Einblicke in die für Emotionen relevanten neuronalen Netzwerke des Gehirns zu

erhalten.

In der laterobasalen Amygdala werden eingehende sensorische Signale durch das Zusammenspiel von Pyramidenzellen und Interneuronen weiter prozessiert. Literaturdaten belegen, dass beide Neuronenpopulationen durch serotonerge Neurotransmission beeinflusst werden. In der vorliegenden Arbeit sollen zwei experimentelle Ansätze benutzt werden, um diesen Einfluss näher zu charakterisieren. Im ersten Ansatz soll untersucht werden, ob ein nachgewiesenes Ungleichgewicht innerhalb des serotonergen Systems (5-Htt KO) bei Mäusen Auswirkungen auf die Morphologie von Pyramidenzellen und Interneuronen des La und BL hat. Da Stress als zusätzlicher Umweltfaktor bei Menschen mit genetisch bedingter geringer Expression des *5-HTT* emotionale Dysregulationen begünstigen kann, sollen außerdem morphologische Veränderungen in WT- und 5-Htt KO-Mäusen, die einer sozialen Stresserfahrung ausgesetzt wurden, untersucht werden. Im zweiten experimentellen Ansatz stehen grundlegende Untersuchungen des serotonergen Einflusses auf anxiolytische NPY-Neurone im La und BL im Fokus. Da Verhaltensuntersuchungen zur Bedeutung der NPY-Neurone bisher hauptsächlich an Ratten durchgeführt wurden, stehen im Zentrum dieser experimentellen Untersuchungen die Analyse der serotonergen und dopaminergen Innervation sowie die entsprechende Rezeptorexpression von NPY-Neuronen im La und BL von Ratten. Die zu erwartenden Resultate sollen einen Beitrag zur Aufklärung darüber leisten, wie die anxiolytisch wirkenden NPY-Neurone im La und BL durch monoaminerge Systeme moduliert werden können.

Weiterhin können diese Ergebnisse dazu beitragen, mögliche Wirkungsmechanismen pharmakologischer Substanzen besser zu verstehen und zu interpretieren und Wege für weiterführende Therapieansätze von Stimmungsstörungen aufzuzeigen. Hierfür sind nämlich genaue Kenntnisse über morphologische Veränderungen auf Grund von Stress- oder Angstsituationen erforderlich und man muss wissen, ob genetische Variationen bestimmte morphologische Varianten begünstigen können. Da sowohl das serotonerge als auch das dopaminerge System, besonders in der Amygdala, an der Stressverarbeitung beteiligt sind, müssen die gesamten Zielstrukturen entsprechender Afferenzen genau dokumentiert werden und die Rezeptorausstattung der Zielneurone muss bekannt sein, um mögliche funktionelle Effekte nachvollziehen zu können.

Teil III

Material

6 Tiere und tierisches Hirngewebe

Alle für die vorliegende Arbeit relevanten Experimente mit Versuchstieren wurden entsprechend der Richtlinien zum Schutz und Gebrauch von Versuchstieren durchgeführt. Die Anzahl der verwendeten Tiere wurde stets so gering wie möglich gehalten.

6.1 Morphometrische Untersuchungen

Für die morphometrischen Analysen wurde Hirngewebe von adulten, männlichen WT- und 5-Htt KO-Mäusen derselben Mauslinie [15] verwendet. Diese Mäuse besaßen den genetischen Hintergrund des C57BL/6J-Stammes und wurden am Institut für Verhaltensbiologie der Universität Münster gezüchtet. Um bei diesen Mäusen eine Verlierererfahrung hervorzurufen, wurden sie im Rahmen eines Resident–Intruder–Stressparadigmas mit adulten Männchen des aggressiveren NMRI-Stammes konfrontiert. Diese Verhaltensexperimente wurden von den Diplombiologinnen Friederike Jansen und Rebecca Heiming durchgeführt und vom Animal Welfare Officer der Universität Münster genehmigt [75].

6.2 Lichtmikroskopische Untersuchungen und *in situ* Hybridisierung

Bei allen hier verwendeten Versuchstieren handelte es sich um Wistar–Ratten, welche im institutseigenen Tierstall gezüchtet oder von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen wurden. Die entsprechenden Gewebeentnahmen wurden von der Universität Würzburg und der Regierung von Unterfranken genehmigt.

6.3 Immunfluoreszenzen und Elektronenmikroskopie

Bei allen für die Immunfluoreszenzen und Elektronenmikroskopie verwendeten Versuchstieren handelte es sich um Wistar–Ratten, die von Charles River (Philadelphia, PA, USA) bezogen wurden. Die entsprechenden Experimente wurden vom *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC) der Thomas Jefferson University in Philadelphia genehmigt.

7 Antikörper

Artikel	Verdünnung	Bestellnummer	Firma
anti-Digoxigenin AP, Fab Fragmente	1:600	11093274910	Roche
anti-Digoxigenin POD, Fab Fragmente	1:1000	11207733910	Roche
anti-Fluoreszein AP, Fab Fragmente	1:600	11426338910	Roche
anti-Fluoreszein POD, Fab Fragmente	1:1000	11426338910	Roche
anti-Neuropeptid Y (aus Kaninchen)	1:8000	N9528	Sigma
anti-Serotonin (aus Kaninchen)	1:45000	20080	Incstar
anti-Serotonin (aus Ratte)	1:500	MAS 055	Harlan – Sera – Lab
anti-Serotonintransporter (aus Kaninchen)	1:750	PC177L	Calbiochem
anti-Tyrosinhydroxylase (aus Maus)	1:100	MAB5280	Chemicon
anti-Tyrosinhydroxylase (aus Maus)	1:1000	22941	Immunostar
Biotinylierter anti-Kaninchen IgG (aus Esel)	1:400	711-065-152	Jackson Immuno Research
Biotinylierter anti-Kaninchen IgG (aus Ziege)	1:500	BA-1000	Vector
Biotinylierter anti-Maus IgG (aus Esel)	1:400	715-065-151	Jackson Immuno Research
Biotinylierter anti-Maus IgG (aus Ziege)	1:500	BA-9200	Vector
Biotinylierter anti-Ratte IgG (aus Ziege)	1:400	BA-9400	Vector
Fluorescein (FITC)-konjugierter AffiniPure anti-Kaninchen IgG (aus Esel)	1:200	711-095-152	Jackson Immuno Research
Fluorescein (FITC)-konjugierter AffiniPure anti-Maus IgG (aus Esel)	1:200	715-095-150	Jackson Immuno Research
Gold-konjugierter anti-Kaninchen IgG (aus Ziege)	1:50	25100	Electron Microscopy Sciences
Gold-konjugierter anti-Maus IgG (aus Ziege)	1:50	25121	Electron Microscopy Sciences
Gold-konjugierter anti-Ratte IgG (aus Ziege)	1:50	25181	Electron Microscopy Sciences
Rhodamine (TRIC)-konjugierter AffiniPure anti-Maus IgG (aus Esel)	1:200	715-025-150	Jackson Immuno Research
Rhodamine (TRIC)-konjugierter AffiniPure anti-Ratte IgG (aus Ziege)	1:200	112-025-003	Jackson Immuno Research

8 Enzyme

Artikel	Bestellnummer	Hersteller
DNase I	04716728	Roche
<i>Eco</i> R I inkl. Puffer Eco	ER0271	Fermentas
Glucoseoxidase	G6766	Sigma
<i>Hind</i> III inkl. Puffer Red	ER0501	Fermentas
<i>Not</i> I inkl. Puffer 0	ER0591	Fermentas
<i>Pst</i> I inkl. Puffer 0	ER0611	Fermentas
RNase A	10109169001	Roche
<i>Sac</i> I inkl. Puffer Sac	ER1131	Fermentas
Sp6 RNA Polymerase inkl. 5 x Transkriptionspuffer	EP0131	Fermentas
T3 RNA Polymerase inkl. 5 x Transkriptionspuffer	11 031 163 001	Roche
T7 RNA Polymerase inkl. 5 x Transkriptionspuffer	M0251L	New England Biolabs
<i>Taq</i> -Polymerase	-	Hauseigene Synthese
<i>Xba</i> I inkl. Puffer Puffer Tango	ER0681	Fermentas
<i>Xho</i> I inkl. Puffer Red	ER0691	Fermentas

9 Nucleinsäuren

9.1 Plasmid-DNA

Name, Zugangsnr. im NCBI	Vektor	Größe des Inserts	Homologie des Inserts zur Rattensequenz
ratNPY-1 NM_012614	pCRII, 4 Kb (Invitrogen)	503 Bp	100 %
ratNPY-80 NM_012614	pCRII, 4 Kb (Invitrogen)	423 Bp	100 %
ratCRF X03036	pGEM4, 3,5 Kb (Promega)	1 Kb	100 %
rat5-HT _{1A} NM_012585.1	pGEM blue, 3 Kb (Promega)	910 Bp	100 %
rat5-HT _{2C} NM_012765.3	Bluescript SK, 3 Kb (Agilent Technologies)	400 Bp	100 %
ms5-HT ₃ M74425	pGEM-T, 3 Kb (Promega)	845 Bp	92 %
msDrd ₂ NM_010077.2	pCRII, 4 Kb (Invitrogen)	344 Bp	97 %

Tabelle 1: Für die Herstellung von cRNA-Sonden und für die *in situ* Hybridisierung verwendete Konstrukte. Bp: Basenpaare.

9.2 Oligodesoxynukleotide

cRNA	Primersequenz 5'>3' forward/reverse	Zugangsnr. im NCBI	T _m (°C)
ratNPY-1	CAAGCTCATTTCCTCGCAGA / AACGACAACAAGGGAATGG	NM_012614	60,23 59,83
ratNPY-80	TAACAAACGAATGGGGCTGT / AACGACAACAAGGGAATGG	NM_012614	60,37 59,83

Tabelle 2: Primerauswahl für die Klonierung entsprechender cDNA-Abschnitte zur Herstellung der NPY cRNA-Sonden

Artikel	Hersteller
Primer für NPY-1 bzw. NPY-80	MWG Operon

9.3 DNA-Größenmarker

Artikel	Bestellnummer	Hersteller
100 Bp-DNA-Größenmarker inkl. 6x Ladepuffer	25-2020	Peqlab
1 kB-DNA-Größenmarker	SM1331	Fermentas
Lambda DNA/ <i>Eco</i> 91I inkl. Ladepuffer	SM0111	Fermentas

10 Reaktionskits

Artikel	Bestellnummer	Hersteller
Dual Promotor TA Cloning® Kit	K4600-01	Invitrogen
iScript™ cDNA Synthese Kit	170-8891	Bio-Rad
PeqGOLD RNAPure™ System	30-1010	Peqlab
RNeasy-Mini-Kit	74104	Qiagen
Silberintensivierungskit	22708	Polysciences
TSA™ Biotin System	NEL700001KT	Perkin Elmer
TSA™ Cy3 System	NEL704A001KT	Perkin Elmer
Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System	A7640	Promega
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	A1330	Promega
Vectastain ABC Kit	PK-6100	Vector

11 Medien

LB-Medium		LB-Agarplatten	
A. dest.		LB-Medium	
LB-Pulver	2,5 %	Turboampicillin	0,01 %
autoklavieren		Select Agar	1,5 %

10 x HMFM (Hogness Modified Freezing Medium; Gefrierschutzmedium für Bakterien)			
Komponente A		Komponente B	
Dikaliumhydrogenphosphat	1,3 M	Magnesiumsulfat	5 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	0,66 M	Trinatriumcitrat	20 mM
		Ammoniumsulfat	85 mM
		Glycerin	45 %
A. bidest.		A. bidest.	
Komponente A und B wurden getrennt autoklaviert und anschließend steril im Verhältnis 1:5 gemischt.			

12 Puffer

0,1 M PB (pH 7,4)		0,01 M PBS f. Lichtmikroskopie (pH 7,4)	
Kaliumdihydrogenphosphat	0,1 M	Natriumchlorid	0,14 M
Dinatriumhydrogenphosphat Monohydrat	0,02 M	Kaliumchlorid	0,003 M
A. dest.		Dinatriumhydrogenphosphat	0,01 M
		Kaliumdihydrogenphosphat	0,001 M
		A. dest.	

0,1 M PB f. Elektronenmikroskopie	
A. dest.	
Natriumphosphat (dibasic)	0,08 M
Natriumphosphat (monobasic)	0,03 M
pH auf 7,3–7,4 einstellen	mit Natriumphosphat (mono- bzw. dibasic)

0,1 M Tris-Puffer	
A. dest.	
Natriumchlorid	0,2 M
Trizma base	0,01 M
pH	7,6

0.01 M PBS f. Elektronenmikroskopie		Wasch-Inkubationspuffer		Citratpuffer	
A. dest.		BSA	0,8 %	A. dest.	
Natriumchlorid	0,2 M	Fischgelatine	0,1 %	Natriumcitrat (tribasic)	0,2 M
Natriumphosphat (dibasic)	0,008 M	PBS	0,01 M	pH	7,4 (mit Zitronensäure)
Natriumphosphat (monobasic)	0,003 M	pH	7,4		
pH	7,4				

Agarosegel		Laufpuffer für Agarosegele	
Agarose	1,5 %	EDTA pH 8,0	1 mM
EDTA	1 mM	Tris-Acetat pH 8,0	40 mM
Tris-Acetat pH 8,0	10 mM	A. biest.	
Ethidiumbromid	0,002 %		
A. bidest.			

RNase-Puffer		Waschpuffer f. ISH		Antikörperlösung f. ISH	
NaCl	500 mM	NaCl	159 mM	Blockpulver in Waschpuffer	0,25 %
Tris	10 mM	Tris	100 mM	TX-100 in Waschpuffer	0,15 %
EDTA	1 mM	pH	7,5		
RNase A (50 $\frac{U}{mg}$)	0,04 $\frac{mg}{ml}$				

AP-Puffer		Stopp-Puffer	
Tris	100 mM	Tris	10 mM
NaCl	100 mM	EDTA	0,1 mM
Magnesiumchlorid-hexahydrat	50 mM	pH	7,5
pH	9,5		

13 Lösungsmittel

Artikel	Bestellnummer	Hersteller
Ethanol	111ACS200	Pharmco – Aaper
Ethanol absolut	A3678	AppliChem
Formamid	P040.1	Roth
Phenol, wassergesättigt	A1624	AppliChem
Roti-Chloroform	X984.1	Roth
Roti-Phenol, TE-gepuffert	0038.2	Roth

14 Lösungen

Vorspüllösung		Fixans 1 für dpH (pH 6,5)		Fixans 2 für dpH (pH 11)		Kryoprotectanslösung	
Heparin	0,7 %	PFA	4 %	PFA	4 %	Ethylenglycol	30 %
Natriumchlorid	0,9 %	Natriumacetat	2 %	Natriumcarbonat	0,14 M	Glycerin	25 %
		PB	0,1 M	Glutaraldehyd	0,02 %	PB	0,05 M
				PB	0,1 M		

Fixans 1 f. Elektronenmikroskopie		Fixans 2 f. Elektronenmikroskopie	
PB	0,1 M	PB	0,1 M
PFA	4 %	PFA	2 %
		Acrolein	3,75 %

Primärantikörperlösung f. Lichtmikroskopie		Sekundärantikörperlösung f. Lichtmikroskopie	
PBS	0,01 M	PBS	0,01 M
TritonX – 100	0,5 %	TritonX – 100	0,5 %
Ziegenserum	1 %	Ziegenserum	1 %
Natriumazid	0,05 %		

Primär- und Sekundärantikörperlösung f. Immunfluoreszenz- und Elektronenmikroskopie	
Tris-Puffer	0,1 M
BSA	0,1 %
ggf. TX-100	0,04 % f. Elektronenmikroskopie 0,25 % f. Immunfluoreszenzmikroskopie

DAB-Entwicklerlösung f. Lichtmikroskopie	
DAB	0,25 mg
Ammoniumchlorid	0,4 mg
Glucoseoxidase	0,004 mg
β -D-Glucose (10 %)	20 μ l
0,1M PB	1 ml
ggf. 0,05 M Ammoniumnickelsulfat	20 μ l

DAB-Entwicklungslösung f. Elektronenmikroskopie		Bleicitratlösung	
3,3'-Diaminobenzidin	0,022 %	Bleinitrat	1,33 g
H ₂ O ₂	0,003 %	Tri-Natriumcitrat	1,76 g
Tris	0,1 M	A. dest	100 ml

Prähybridisierungslösung	
Dextransulfat	20 %
SSC	8 x
Denhardt 's Lösung	2 x
0,05 % DEPC-Wasser	ad 50 ml
Der obige Ansatz wurde direkt vor Gebrauch mit Formamid 1:2 verdünnt. Hierzu wurden 250 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Lachsspermien-DNA gegeben, welche vor Zugabe 5 min bei 95°C denaturiert und dann sofort auf Eis abgekühlt wurde.	

15 Chemische Verbindungen

15.1 Biochemikalien

Artikel	Bestellnummer	Hersteller
AlexaFluor®488, an Streptavidin gekoppelt	S-11223	Invitrogen
Biotin RNA Markierungsmix	11 685 597 910	Roche
Digoxigenin RNA Markierungsmix	11 277 073 910	Roche
Essigsäureanhydrid	45830	Fluka
Fluoreszein RNA Markierungsmix	11 685 619 910	Roche
Lachsspermien-DNA	D9156	Sigma
RNase Inhibitor	M0314L	New England Biolabs
Ziegenserum	G6767	Sigma

15.2 Sonstiges

Artikel	Bestellnummer	Hersteller
Aquatex®	108562	Merck
2-Methylbutan	A0440	AppliChem
2,4,6-Tri-Dimethylaminoethylphenol	90-72-2	Electron Microscopy Sciences
3´3´Diaminobenzidin	45,861-9	Aldrich
3´3´Diaminobenzidintetrahydrochlorid	D5905	Sigma
4´,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	10236276001	Roche
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactosid-Lösung (X-Gal)	7240-90-6	AppliChem
Acrolein	10102	Electron Microscopy Sciences
Agar	A360-500	Fisher Scientific
Ammoniumsulfat	A3485	AppliChem
Ammoniumnickelsulfat	574988	Sigma
Ammoniumchlorid	A9434	Sigma
β-D-Glucose	G5250	Sigma
Bleinitrat	R1217	Agar Scientific
BSA	A7888	Sigma
D(+)-Sucrose	A1125	AppliChem
Denhardt´s Lösung	D2532	Sigma
DEPEX	18243.01	Serva
Dextransulfat	A4970	Sigma
Diethyläther	A0787	AppliChem
Diethylpyrocarbonat	D5758	Sigma
Dikaliumhydrogenphosphat	A4001	AppliChem
Dodecenyln Bernsteinanhydrid	26544-387	Electron Microscopy Sciences
D.P.X., neutrales Eindeckmedium	317616	Sigma
Einbettmedium für Gefrierschnitte	0201-08926	Reichert-Jung
Epon-812 Substitut	145.31	Electron Microscopy Sciences
Essigsäure	3738.4	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure	8043	Roth
Ethylenglycol	A3682	AppliChem
Fischgelatine	RPN416V	GE Healthcare
Fluoro-Gel	17983-100	Science Services
Gel Red, 10000 x in Wasser	41003	Biotium
Glutaraldehyd (8%/25%)	16020/16220	Electron Microscopy Sciences
Glutaraldehyd	G5882	Sigma
Glycerin	A2364	AppliChem
Glycerin	3783	Roth
Heparin Natrium	3029843	Ratiopharm
Heparin – Natriumlösung	NDC 63323-540-31	APP Pharmaceuticals
Immersionöl	A0699	AppliChem
Isolffuran	14043-220-05	Webster
Isopropyl-β-D-Thiogalactosid (IPTG)	A1008	AppliChem
Kaliumchlorid	A3582	AppliChem
Kaliumdihydrogenphosphat	A3620	AppliChem
Ketamin	NDC 0856-4403-01	Fort Dodge
LB-Mediumpulver	A0954	AppliChem
Magnesiumchlorid-hexahydrat	A1447	AppliChem
Magnesiumsulfat	106067	Merck
Nadic Methylanhydrid	25134-21-8	Electron Microscopy Sciences
Natriumacetat	A1522	AppliChem
Natriumacetat-Trihydrat	A1045	AppliChem
Natriumazid	30175	Serva
Natriumborhydrid	452882	Sigma
Natriumcarbonat	A1881	AppliChem
Natriumchlorid	A3597	AppliChem
Natriumchlorid	S271-3	Fisher Scientific
Natriumchlorid	3957	Roth
Natriumchlorid, 0,9% Lösung	NDC 0409-4888-10	Hospira
Natriumcitrat (tribasic)	S4641	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat	A1938	AppliChem
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	A3559	AppliChem
Natriumhydrogencarbonat	6329	Merck

Natriumhydroxidplättchen	A1551	AppliChem
Natriumphosphat (dibasic)	S7907	Sigma
Natriumphosphat (monobasic)	S8282	Sigma
NBT/BCIP Stocklösung	11681451001	Roche
Nembutal Natriumlösung (Pentobarbital)	67386-501-52	Ovation Pharmaceutical
Osmiumtetroxid	19190	Electron Microscopy Sciences
Paraformaldehyd	A3813	AppliChem
Paraformaldehyd (körnig)	30525-89-4	Electron Microscopy Sciences
Propylenoxid	20401	Electron Microscopy Sciences
Salzsäure 37%	A0659	AppliChem
Select Agar	30391023	Invitrogen
SSC Konzentrat (Natriumsalzcitrat)	S6639	Sigma
Superoptimales Katabolitrepressions- (S.O.C.) Medium	S1797	Sigma
Triethanolamin	90279	Sigma
Tri-Natriumcitrat	R1107	Agar Scientific
Tri-Natriumcitrat	A3901	AppliChem
Tris	4855	Roth
Tris-Acetat	7125	Roth
TritonX-100	BP151	Fisher Scientific
TritonX-100	T8787	Sigma
Trizma base	T6791	Sigma
Turboampicillin	300021	Stratagene
Uranylacetat	77870	Serva
Wasserstoffperoxid (30%)	H1009	Sigma
Xyla-Ject	NDC 57310-362-26	Phoenix
Xylol	A1714	AppliChem
Xylol	UN1307	Fisher Scientific

16 Sonstiges

Artikel	Bestellnummer	Hersteller
Aclarfolie	50426-25	Electron Microscopy Sciences
Kupfernetze mit hexagonaler Masche mit Gelatine beschichtete Objektträger	G300H-Cu 7802	Electron Microscopy Sciences LabScientific
Objektträger	J1800AMNZ	Menzel

17 Geräte

Artikel	Bestellnummer	Hersteller
Axioskop 2 mot plus	3305000365	Zeiss
Centrifuge	5417R	Eppendorf
Frigocut	2800 E	Reichert-Jung
Hybridisierungsofen	98100910	Heraeus
Kamerasystem	AMT advantage HR / HR-B	Adv. Microscopy Techniques Corp.
LEO Transmissionselektronenmikroskop	AB912	Zeiss
Metallblockthermostat	11476	Liebish
Mikro 20	200424	Hettich Zentrifugen
Morgagni Transmissionselektronenmikroskop	268	Fei Company, Hillsboro, OR, USA
NanoDrop Spektrophotometer	ND-1000	Peqlab
Perfusionspumpe	ISM221-0344	Ismatec
Power Pac	164-5050	BioRad
Spektrophotometer SmartSpec Plus	170-2525	BioRad
Thermocycler	050-723	Biometra
TissueLyser (Homogenisator)	85300	Qiagen
Vac Man™20 Manifold	A7231	Promege
Vibratom	VT100S	Leica
Wasserbad	000 3959	Heinse & Ziller

18 Computerprogramme

Adobe Photoshop CS BibDesk, Version 1.3.18 Excel, Power Point Freie Softwareumgebung R, Version 2.10.0 L ^A T _E X mit TeXShop, Version 2.18 NeuroLucida MultiAlin Spot Advanced, Version 4.5.9.9 SsS, Version 2.0	Adobe Systems, Inc. Michael O. McCracken Microsoft Office 2008 http://cran.r-project.org/ Richard Koch MicroBrightfield, Inc. http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/ Diagnostic Instruments, Inc. http://zoolution.de
--	---

Teil IV

Methoden

19 3D-Rekonstruktion von Neuronen und Morphometrie

19.1 Versuchsgruppen für morphometrische Analysen

Es wurden vier Versuchsgruppen untersucht: (1) WT ($n = 6$) und (2) 5-Htt KO ($n = 6$), die im Alter von 95 ± 14 Tagen an drei aufeinanderfolgenden Tagen ein Resident–Intruder–Stressparadigma durchliefen, sowie (3) WT ($n = 6$) und (4) 5-Htt KO ($n = 6$) in demselben Alter, die dieses Paradigma nicht durchliefen. In diesem Paradigma erfuhren die Tiere aus Gruppe (1) und (2) während Revierkämpfen mit einer männlichen Maus der NMRI–Stammes sozialen Stress in Form von Niederlagen (Verlierererfahrung, s. [75]). Diese Tiere werden im Folgenden „Verlierer“ (Ver) genannt. Die Gruppen (3) und (4) werden als Kontrollgruppen (Kon) bezeichnet. Die Verhaltensexperimente wurden von den Diplombiologinnen Friederike Jansen und Rebecca Heiming am Institut für Verhaltensbiologie der Universität Münster durchgeführt (für Details s. [75]). Zur Gewebegewinnung wurden die Mäuse aller Gruppen narkotisiert, dekapitiert und die Gehirne herauspräpariert. Die Tiere der Gruppen mit Stresserfahrung wurden sieben Tage nach der letzten Konfrontation geopfert; die Tiere ohne Stresserfahrung wurden zum selben Zeitpunkt geopfert. Die Zellen der Mäusegehirne wurden mittels einer nach Glaser und Van der Loos [54] modifizierten Golgi–Cox–Imprägnierungsmethode von Frau Dr. Sarah Nietzer und Frau Marion Winnig angefärbt. Danach wurde das Gewebe in Celloidin eingebettet, in $150 \mu\text{m}$ dicke Scheiben geschnitten, auf Glasobjektträger aufgezogen und eingedeckt (Abb. 5 A; für methodische Details s. [137, 138]).

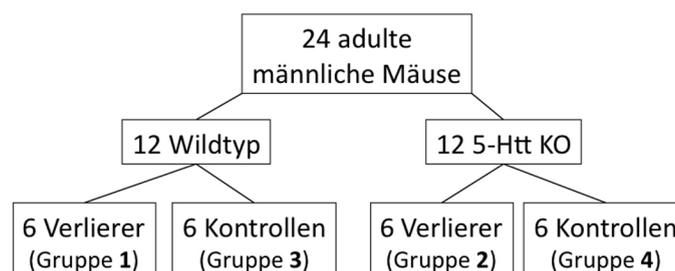


Abbildung 4: Versuchsgruppen für morphometrische Analysen

19.2 3D-Rekonstruktion von Neuronen im La und BL

La und BL wurden auf den Gewebeschnitten mit Hilfe eines Gehirnatlanten [51] identifiziert. Anschließend wurden dort Pyramiden- und Sternzellen gemäß morphologischer Kriterien nach Millhouse und DeOlmos [117] identifiziert. Es wurden nur die Neurone zur Analyse herangezogen, deren dendritische Verzweigungen inklusive dendritischer Dornen intensiv angefärbt waren, und welche vollständig erschienen. Die dendritischen Dornen wurden als solche bewertet, wenn sie über ein knollenartiges Köpfchen sowie einen dünnen Hals verfügten (Abb. 5 B, [186]). Im La und BL wurden pro Versuchstier jeweils vier Pyramiden- (Abb. 5 C) und vier Sternzellen rekonstruiert (Abb. 5 D). Hierzu wurden die identifizierten Neurone mit einem Olympus BX51 Mikroskop bei 100 x 1600-facher Vergrößerung mit Immersionsöl betrachtet. Unter Verwendung des Neurolucida-Systems (Microbrightfield, Inc.) wurden die Somata, dendritischen Verzweigungen der Pyramiden- und Sternzellen sowie dendritische Dornen der Pyramidenzellen im La und BL dreidimensional rekonstruiert. Hierbei war die Experimentatorin bezüglich des Genotyps und der Stresskondition der Mäuse blind.

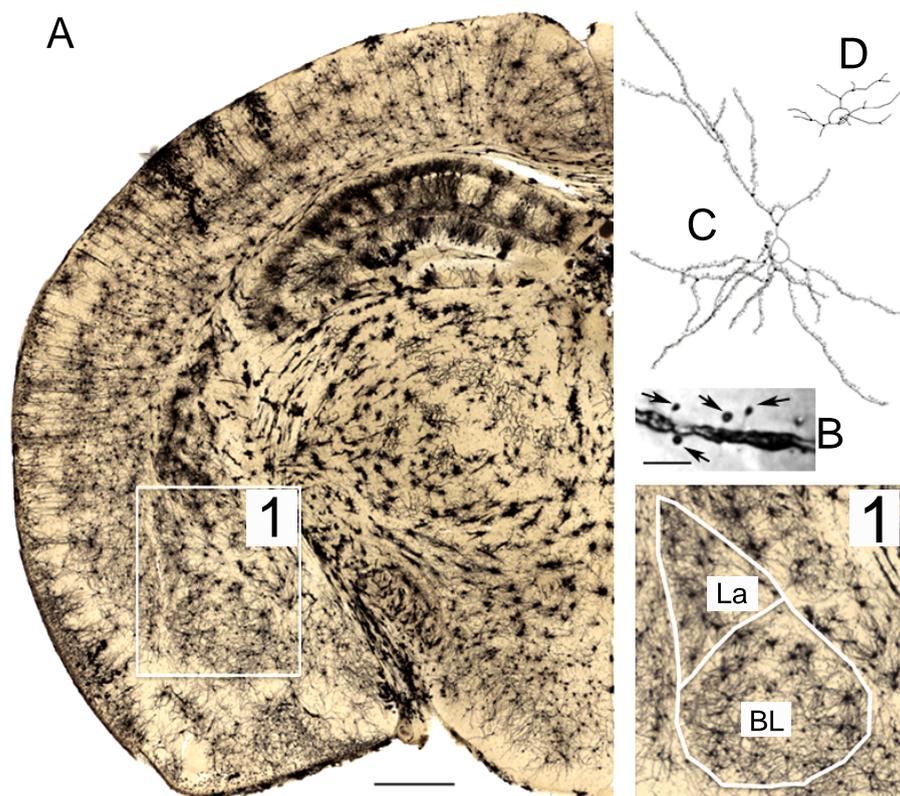


Abbildung 5: Golgipräparate und 3D-Rekonstruktionen. (A) Golgi-Präparat einer Maushirnhälfte. (1) zeigt eine Vergrößerung von (A) mit La und BL. (B) Abschnitt eines Dendriten einer Pyramidenzelle mit dendritischen Dornen (Pfeile). (C, D) Beispielhafte 3D-Rekonstruktion einer Pyramiden- (C) bzw. Sternzelle (D). Größenbalken in (A): 500 μm ; in (B): 25 μm .

19.3 Morphometrische Analysen

Die morphometrischen Analysen wurden mit dem Neurolucida Explorer durchgeführt. Von jedem rekonstruierten Neuron wurden folgende Parameter bestimmt:

- Gesamtlänge des dendritischen Materials in μm
- Gesamtzahl dendritischer Verzweigungspunkte
- dendritische Verzweigungsdichte = $\frac{\text{Gesamtzahl dendritischer Verzweigungspunkte}}{\text{entspr. Länge des dendritischen Materials in } \mu\text{m}} \times 100$
- Gesamtzahl dendritischer Dornen, nur bei Pyramidenzellen
- Gesamtdornendichte = $\frac{\text{Gesamtzahl der Dornen}}{\text{entspr. Länge des dendritischen Materials in } \mu\text{m}}$
nur bei Pyramidenzellen
- Dornendichte_{VO} = $\frac{\text{Gesamtzahl der Dornen einer bestimmten Verzweigungsordnung}}{\text{entspr. Länge des dendritischen Materials dieser Verzweigungsordnung in } \mu\text{m}}$
nur bei Pyramidenzellen

Diese Parameter wurden für das gesamte dendritische Material (für Pyramidenzellen und Sternzellen) sowie für Apikal- und Basaldendriten separat (nur für Pyramidenzellen) bestimmt. Die Dornendichte wurde zum einen bezüglich des entsprechenden dendritischen Materials (z. B. Apikaldendrit), und zum anderen bezüglich der dendritischen Verzweigungsordnung [ein Dendrit teilt sich an jedem Verzweigungspunkt in zwei Äste der nächsthöheren Ordnung auf, s. Abb. 6] analysiert, da die Dornendichte mit der Verzweigungsordnung zunimmt [210].

Zur quantitativen morphologischen Untersuchung der radialen Verteilung neuronaler Fortsätze um ein Soma wurde eine 3D Sholl-Analyse (Abb. 6, [180]) durchgeführt, bei welcher um den Mittelpunkt eines Somas im Abstand von $20 \mu\text{m}$ konzentrische Kugeln gelegt wurden. Mit deren Hilfe ließen sich folgende Parameter bestimmen:

- Schnittpunkte der Dendriten mit den Kugeloberflächen
- maximale Ausbreitung der Dendriten in μm (gemessen bis zu der Kugeloberfläche, welche von den Dendriten jeweils erreicht wird)

19.4 Auswertung der Daten und Statistik

Für jeden in Punkt 19.3 erwähnten Parameter wurde pro Tier und Neuronentyp das arithmetische Mittel berechnet. Diese Werte wurden dann zur Berechnung eines Mittelwertes pro Gruppe \pm des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM) herangezogen und auch zur graphischen Dokumentation verwendet (eine Gruppe bestand aus sechs Tieren). Erste Analysen zeigten, dass die morphometrischen Daten nicht normalverteilt vorlagen und die Varianzen der Gruppen ungleich waren. Daher wurden die statistischen Analysen mit

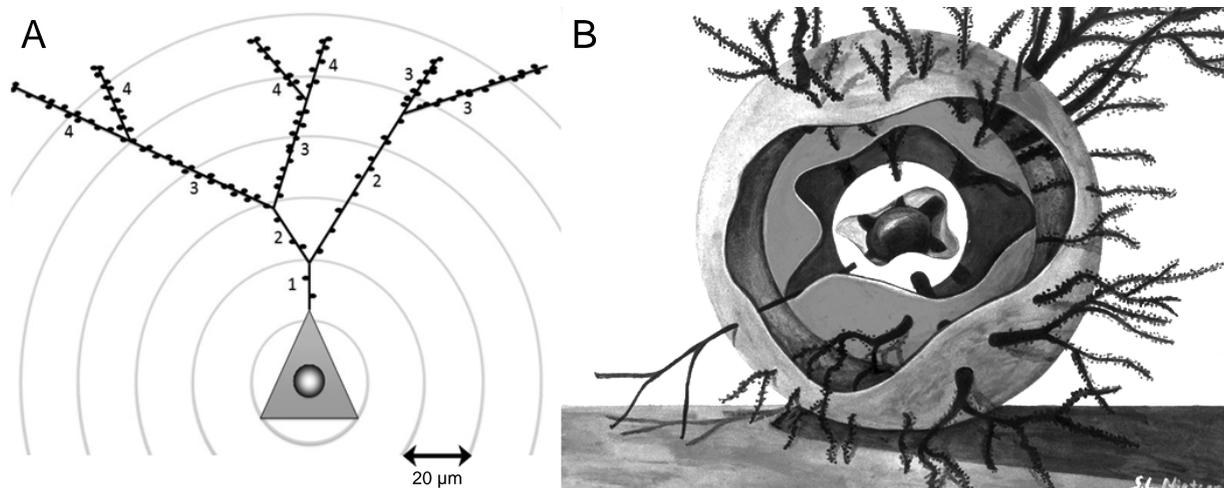


Abbildung 6: 3D Sholl-Analyse. Das Schema in (A) zeigt eine 2D Sholl-Analyse für den Apikaldendriten einer Pyramidenzelle. Die Sholl-Analyse mit dem NeuroLucida-System erfolgte jedoch dreidimensional (B). Im Abstand von 20 µm wurden um den Mittelpunkt eines Somas konzentrische Kugeln gelegt. Die Ziffern 1–4 in (A) kennzeichnen die jeweilige Verzweigungsordnung des Apikaldendriten. (B) wurde von Frau Dr. Sarah Nietzer zur Verfügung gestellt.

nichtparametrischen Verfahren durchgeführt. Gruppenvergleiche wurden nur dann durchgeführt, wenn der p-Wert im Kruskal Wallis Test Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen anzeigte ($p < 0,1$). Da für jeden Parameter fünf Gruppenvergleiche durchgeführt wurden, lag das Signifikanzniveau p nach Bonferronikorrektur bei $< 0,01$ (**). p -Werte im Bereich $< 0,05$ sowie $> 0,01$ wurden mit einem Stern gekennzeichnet (*), p -Werte im Bereich $> 0,05$ sowie $< 0,1$ wurden als Tendenz angegeben (#). Die statistischen Berechnungen wurden von Frau Dr. Sarah Nietzer mit der freien Softwareumgebung R, Version 2.10.0 (<http://cran.r-project.org/>) durchgeführt.

20 Doppelimmunhistochemie – Lichtmikroskopie

20.1 Perfusionsfixierung und Gewebeaufbereitung

Alle Versuchstiere wurden im Alter von drei Monaten mit Diethyläther tief narkotisiert und entweder mit der doppel pH-Methode [dpH, $n(\varnothing) = 8$, Ratte 2, 3, 5, 6, 8–11] oder mit 4% Paraformaldehyd (PFA) in 0,01 M phosphatgepufferter Salzlösung [PBS, engl.: phosphate-buffered saline, $n(\varnothing) = 4$, Ratte 1, 4, 7, 12; $n(\sigma) = 2$, Ratte 13, 14] über den linken Herzventrikel perfundiert. Die Perfusionsart beeinflusste die Ergebnisse der immunhistochemischen Experimente nicht. Zuerst wurde eine Vorspülung mit Präfixans für maximal 1 min durchgeführt, danach wurde entweder für 10 min mit Fixans 1 und 15 min mit Fixans 2 (dpH) oder für 10 min mit 4% PFA in 0,01 M PBS perfundiert. Die Geschwindigkeit der Perfusionspumpe war stets gleich.

Nach der Gewebeentnahme wurde dieses über Nacht bei 4°C in Fixans 2 ohne Glutaraldehyd (dpH) bzw. in 0,01 M PBS mit 4 % PFA postfixiert. Am nächsten Tag wurde das gesamte Gehirn solange in 0,01 M PBS mit 10 % Sucrose inkubiert, bis es sich auf den Boden eines Becherglases abgesenkt hat, und danach über Nacht bei 4°C in 0,01 M PBS mit 20 % Sucrose inkubiert. Am Folgetag wurde dieses Gewebe über 2-Methylbutan in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert. Bei Bedarf wurde es aufgetaut (30 min bei -20°C, dann 30 min bei 4°C) und es wurden coronale Serienschnitte (Dicke: 45 µm) am Vibratom (Bregma -2,12 mm bis -3,30 mm, [51]) angefertigt. Wollte man das Gewebe zeitnahe verwenden, wurden nach der Postfixierung nach gründlichem Waschen in 0,01 M PBS (3 x 15 min) coronale Serienschnitte am Vibratom angefertigt. Diese wurden bis zur Verwendung bei -20°C in Kryoprotectanslösung gelagert oder sofort für immunhistochemische Färbungen herangezogen.

20.2 Doppelimmunhistochemie

Bei allen durchgeführten Doppelmarkierungen wurden zuerst die serotonergen bzw. dopaminergen Fasern und anschließend die NPY-ir Strukturen markiert.

Nach gründlichem Waschen in 0,01 M PBS (6 x 10 min) erfolgte ein zweistündiger Proteinblock in 0,01 M PBS mit 1 % TritonX-100 und 5 % des dem Sekundärantikörper entsprechenden Serums (hier: Ziegenserum). Im Anschluss wurde das Gewebe in der entsprechenden Primärantikörperlösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte nach gründlichem Waschen in 0,01 M PBS (6 x 10 min) eine Inkubation für 3 h bei Raumtemperatur (RT) in der entsprechenden Sekundärantikörperlösung. Danach wurden ungebundene Antikörper mit 0,01 M PBS abgewaschen (6 x 10 min) und eine Inkubation in Avidin-Biotin-Komplex in 0,01 M PBS für 2 h durchgeführt. Nach 10 minütigem Waschen in 0,01 M PBS wurde 3´3´Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)-Entwicklerlösung mit Ammoniumnickelsulfat zugegeben. DAB wurde durch Peroxidasen mit Hilfe von H₂O₂ zu einem dunkelbraunen Reaktionsprodukt umgesetzt, welches durch Präzipitation des Metalls einen tiefschwarzen Farbton erhielt. Diese Reaktion wurde durch waschen in 0,01 M PBS (3 x 10 min) beendet sobald die optimale Signalintensität erreicht wurde (15–22 min). Die monoaminergen Fasern wurden also schwarz markiert. Anschließend erfolgte die Inkubation in der zweiten Primärantikörperlösung (NPY) über Nacht. Am Folgetag wurden die ungebundenen Antikörper mit 0,01 M PBS abgewaschen (6 x 10 min) und es erfolgte eine Inkubation in der entsprechenden Sekundärantikörperlösung gefolgt von erneutem Waschen in 0,01 M PBS (6 x 10 min) und einer Inkubation in Avidin-Biotin-Komplex für 2 h. Im Anschluss wurde die zweite DAB-Entwicklung ohne Ammoniumnickelsulfat durchgeführt, wodurch NPY-ir Strukturen eine braune Farbe erhielten. Die Gewebeschnitte

wurden dann auf SuperFrostTM Objektträger aufgezogen und über Nacht an der Luft getrocknet. Anschließend wurden sie über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert (70, 95, 2 x 100 % Ethanol, je 3 min), in Xylol entfettet (2 x 3 min) und schließlich mit DEPEX eingedeckt.

Parallel zu den Doppelmarkierungen wurden stets entsprechende Einzelmarkierungen für jeden verwendeten Primärantikörper durchgeführt, sowie Negativkontrollen ohne die jeweiligen Primärantikörper angefertigt. Die Kontrollen zeigten für die jeweiligen nicht markierten Antigene keine immunhistochemischen Signale auf, was die Schlussfolgerung erlaubt, dass die eingesetzten Antikörper spezifisch an ihre Zielstrukturen banden und die Detektionssysteme, die für die Doppelmarkierungen angewendet wurden, nur die gewünschten Immunreaktionen darstellten.

20.3 Lichtmikroskopische Auswertung der Präparate

Am Lichtmikroskop wurden zuerst die Intensität sowie die Verteilung der immunhistochemischen Signale der Einzel- und Doppelmarkierungen miteinander verglichen. Bei den Doppelmarkierungen war die Signalintensität des Antigens, welches als zweites detektiert wurde (NPY), oft geringer als in der entsprechenden Einzelmarkierung, was die Auswertung jedoch nicht nennenswert beeinträchtigte. Es spielte keine Rolle, ob das Gewebe direkt nach der Perfusion verwendet oder zwischenzeitlich in Kryoprotectans gelagert wurde. La und BL wurden bei schwacher Vergrößerung identifiziert und alle NPY-ir Neurone in eine Vorlage aus dem Rattengehirnatlas [146] eingezeichnet. Anschließend wurde die Form der NPY-ir Somata identifiziert und dann die Anzahl der perisomatischen serotonergen bzw. dopaminergen Appositionen gezählt. Es wurden nur solche Kontakte als Appositionen bewertet, bei denen bei 100-facher Vergrößerung mit Immersionsöl auf verschiedenen Fokusebenen keine Lücken zwischen serotonergen bzw. dopaminergen Fasern und NPY-ir Somata ersichtlich waren. Bei Appositionen handelt es sich um potentielle Kontaktstellen zwischen NPY-ir Somata und serotonergen bzw. dopaminergen Fasern.

Für die Auswertung wurden die Gehirne der weiblichen Versuchstiere (s. Punkt 20.1) verwendet. Um geschlechtsspezifische Unterschiede bezüglich der lichtmikroskopisch untersuchten Parameter auszuschließen, wurden zusätzlich zwei männliche Tiere (s. Punkt 20.1) ausgewertet. Die erhaltenen Daten befanden sich im selben Rahmen wie die der weiblichen Versuchstiere, wurden jedoch nicht in die Auswertung integriert.

20.4 Statistik

Pro Versuchstier wurden vier bis acht Vibratonschnitte aus der vorderen, mittleren und hinteren coronalen Schnittebene ausgewertet. Um die Normalverteilung der zu testenden Werte zu überprüfen, wurde bei einem Signifikanzniveau von 0,01 der Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest mit Lilliefors Korrektur angewendet. Zur vergleichenden Analyse wurde bei normalverteilten Werten der t-Test für zwei gepaarte bzw. ungepaarte Stichproben mit Signifikanzniveau 0,05 angewendet. Für die Auswertung der nicht normalverteilt vorliegenden Werte wurde der Randomisierungstest für zwei gepaarte bzw. ungepaarte Stichproben herangezogen. Das Signifikanzniveau lag hier ebenso bei 0,05. Die statistischen Auwertungen wurden mit dem Programm SsS 2.0 (<http://zoolution.de>) durchgeführt.

21 Immunfluoreszenz- und Elektronenmikroskopie

21.1 Gewebeaufbereitung

Die Ratten wurden vor der Perfusion kurz mit Isofluran betäubt und anschließend durch eine intraperitoneale Injektion von 0,5 ml Pentobarbital tief narkotisiert. Die Perfusion erfolgte zuerst mit 20 ml Heparinlösung und danach mit 500 ml 0,1 M Phosphatpuffer (PB) mit 4 % PFA [$n(\sigma) = 4$, Ratte 1, 2, 5, 6; $n(\varphi) = 2$, Ratte 9, 10]. Alternativ wurden die Tiere mit 20 ml Heparinlösung, dann mit 90 ml 0,1 M PB mit 3,75 % Acrolein und 2 % PFA und anschließend mit 400 ml 0,1 M PB mit 2 % PFA perfundiert [$n(\sigma) = 4$, Ratte 3, 4, 7, 8]. Die Gehirne wurden herauspräpariert und über Nacht bei 4°C in 0,1 M PB mit 4 % PFA bzw. in 0,1 M PB mit 3,75 % Acrolein und 2 % PFA immersionsfixiert.

Am Tag nach der Perfusion wurde das Gewebe in 0,2 % Agar in A. dest. eingebettet und in 0,1 M PB am Vibratom bei RT geschnitten. Es wurden coronale Serienschnitte mit einer Dicke von 40 μm angefertigt, die bis zum Gebrauch bei 4°C in 0,1 M PB gelagert wurden.

21.2 Weitere Vorbereitung und Primärantikörperinkubation

Das Gewebe wurde aus 0,1 M PB entnommen und 30 min in 0,1 M PB mit 1 % Natriumborhydrid inkubiert (dieser Schritt wurde bei der Verwendung des anti-5-HT Antikörpers nicht durchgeführt). Nach Waschsritten mit 0,1 M PB (3 x 3 min) und 0,1 M Tris-Puffer (2 x 5 min) erfolgte eine 30-minütige Inkubation in 0,1 M Tris-Puffer mit 0,5 % Rinderserumalbumin (BSA, engl.: bovine serum albumin). Anschließend wurde das Gewebe 2 x 5 min

in 0,1 M Tris-Puffer gewaschen und bei RT mit den entsprechenden Primärantikörpern, die in 0,1 M Tris-Puffer mit 0,25 % TX-100 und 0,1 % BSA verdünnt wurden, inkubiert. Für die Elektronenmikroskopie erfolgte die Inkubation ohne TX-100. Die Inkubationsdauer betrug bei Verwendung des anti-5-HT Antikörpers 44 bis 48 h, ansonsten 16 bis 18 h. Hierbei musste beachtet werden, dass der anti-5-HT Antikörper nur an mit 4 % PFA fixiertem Gewebe ein spezifisches Signal lieferte. Die anti-NPY und anti-TH Antikörper lieferten bei beiden Fixierungsmethoden (s. 21.1), sowohl auf licht- als auch auf elektronenmikroskopischer Ebene, vergleichbare Ergebnisse. Am nächsten Tag wurde das Gewebe, für die Immunfluoreszenzmikroskopie (s. 21.3) bzw. für eine elektronenmikroskopische Analyse (s. 21.4) verwendet.

21.3 Immunfluoreszenzmikroskopie

Ungebundene Primärantikörper wurden mit 0,1 M Tris-Puffer abgewaschen (3 x 10 min) und anschließend wurde das Gewebe mit entsprechenden Sekundärantikörpern, verdünnt in 0,1 M Tris-Puffer mit 0,25 % TX-100 und 0,1 % BSA, für 2 bis 3 h bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Danach erfolgten Waschschrte in 0,1 M Tris-Puffer (3 x 10 min), 0,1 M PB (10 min) und 0,05 M PB (5 min). Die Gewebeschnitte wurden dann auf mit Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen und über Nacht unter Lichtausschluss an der Luft getrocknet. Am nächsten Tag erfolgte eine Dehydrierung in 30, 50, 70, 95 und 2 x 100 % Ethanol (je 2 min) und ein Reinigungsschritt in Xylol (2 x 2 min). Die Präparate wurden dann mit DEPEX eingedeckt und dienten als Kontrollmarkierungen, welche parallel zu Markierungen für die Elektronenmikroskopie angefertigt wurden.

21.4 Elektronenmikroskopie

Nach gründlichem Waschen mit 0,1 M Tris-Puffer (3 x 10 min) erfolgte die Inkubation mit einem biotinylierten Sekundärantikörper für 30 min bei RT. Anschließend wurde das Gewebe erneut 3 x 10 min in 0,1 M Tris-Puffer gewaschen, für 30 min in Avidin-Biotin-Komplex inkubiert und nochmals 3 x 10 min in 0,1 M Tris-Puffer gewaschen. Die Entwicklung mit DAB dauerte 5 bis 10 min und wurde am Lichtmikroskop kontrolliert. Danach erfolgten Waschschrte in 0,1 M Tris-Puffer (3 x 10 min) und 10 min in Wasch-Inkubationspuffer. Im Anschluss wurde das Gewebe für 2 h in mit Goldpartikeln konjugierten Sekundärantikörpern, verdünnt in Wasch-Inkubationspuffer, inkubiert, danach 5 min in Wasch-Inkubationspuffer und 3 x 5 min in 0,01 M PBS gewaschen und dann für 10 min in 2 % Glutaraldehyd in 0,01 M PBS inkubiert. Nach kurzem Waschen in 0,01 M PBS und Citratpuffer wurde 5 bis 10 min lang eine Silberintensivierung durchgeführt, da-

nach 2 x 5 min in Citratpuffer und kurz in 0,1 M PB gewaschen. Das Gewebe wurde dann für 1 h in 2 % Osmiumtetroxid in 0,1 M PB unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurde es kurz in 0,1 M PB gewaschen, je 5 min in 30, 50, 70 und 95 % Ethanol, dann 2 x 10 min in 100 % Ethanol dehydriert, 2 x 10 min in Propylenoxid und dann über Nacht in einer Mischung aus Propylenoxid und Epon (1:2) inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte eine zweistündige Inkubation in 100 % Epon, danach wurde das Gewebe zwischen zwei Aclarfolien flacheingebettet und über Nacht polymerisierte das Epon bei 55 bis 60°C aus. Anschließend wurden serielle Ultradünnschnitte (Dicke: 74 nm) des La bzw BL angefertigt und auf Metallnetze für die Elektronenmikroskopie aufgezogen. Zur Kontrasterhöhung des Gewebes, insbesondere der Zellmembranen, Proteine und Nucleinsäuren, wurden die Netze mit den Ultradünnschnitten lichtgeschützt 20 min lang auf einen Tropfen 2 % Uranylacetat in 70 % Ethanol gelegt und anschließend kurz in 70 % Ethanol und 5 x in abgekochtem A. dest gewaschen. Unter CO₂-armen Bedingungen (der Arbeitsplatz wurde mit NaOH-Plätzchen ausgelegt) wurden die Netze anschließend 7 min lang auf einen Tropfen Bleicitratlösung gelegt und danach kurz 5 x in abgekochtem A. dest gewaschen. Die Netze mit dem kontrastierten Gewebe wurden mindestens 30 min an der Luft getrocknet und konnten dann ins Elektronenmikroskop eingelegt werden.

21.4.1 Auswertung elektronenmikroskopischer Präparate

Am Elektronenmikroskop wurde zuerst die Ultrastruktur des Gewebes bewertet. Somata wurden anhand ihres Nucleus identifiziert. Synaptische Kontakte wurden als solche definiert, wenn (1) eine Membranapposition zwischen einer Prä- und Postsynapse deutlich zu erkennen war, (2) Transmittervesikelansammlungen und ggf. Mitochondrien in den Präsynapsen identifiziert wurden. Weiterhin wurden zwei morphologische Synapsentypen unterschieden, nämlich Gray Typ I und Gray Typ II. Diese Klassifizierung diente zur vorläufigen Einschätzung der Natur eines synaptischen Kontakts. Gray Typ I Synapsen werden auch als asymmetrische Synapsen bezeichnet und sind meist exzitatorisch. Besonders die postsynaptische Region aber auch der synaptische Spalt sind im Vergleich zur Präsynapse sehr elektronendicht. Die synaptischen Vesikel erscheinen meist rund. Synaptische Kontakte vom Gray Typ I werden hauptsächlich an dendritischen Dornen, aber auch am dendritischen Schaft nachgewiesen. Gray Typ II Synapsen werden auch als symmetrische Synapsen bezeichnet und sind meist inhibitorisch. Hier sind im Bereich der Postsynapse und des synaptischen Spalts keine oder kaum elektronendichtere Bereiche zu erkennen. Die synaptischen Vesikel erscheinen meist oval. Synaptische Kontakte vom Gray Typ II werden oft an Somata und kaum an Dornen nachgewiesen [17].

Im nächsten Schritt wurde die Spezifität des DAB- bzw. Goldsignals bewertet. Eine im-

munreaktive Struktur wurde bzgl. des DAB-Signals als positiv bewertet, wenn innerhalb dieser Struktur genügend Reaktionsprodukt zu erkennen war, wodurch sich diese deutlich vom umliegenden Gewebe abhob. Eine immunreaktive Struktur wurde bzgl. des Goldsignals als positiv bewertet, wenn mindestens zwei Goldkörnchen innerhalb dieser Struktur identifiziert wurden. Bei schwachen Goldsignalen wurde zusätzlich das umliegende Gewebe genau betrachtet. Deutete hierbei nichts auf eine Unspezifität des Goldsignals hin, wie z. B. Goldkörnchen in Gefäßen, an Myelin oder sonstigen Strukturen, an welchen kein Signal zu erwarten war (z. B. innerhalb der Somata im La / BL bei 5-HT-Markierungen), wurde dieses als spezifisch eingestuft. Ein einzelnes Goldkörnchen innerhalb einer Struktur wurde nicht als spezifisches Signal bewertet. Außerdem wurden entsprechende Negativkontrollen angefertigt, welche frei von DAB- bzw. Goldsignalen waren.

22 Herstellung der NPY cRNA-Sonden

Die cRNA-Sonden NPY-1 und NPY-80 wurden eigens im Klinischen Labor der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie (Punkt 22.1 – 22.9) sowie am Institut für Anatomie und Zellbiologie (Punkt 22.10 – 22.13) der Universität Würzburg generiert. Alle anderen in dieser Arbeit erwähnten cRNA-Sonden wurden von Frau Dr. Angelika Schmitt zur Verfügung gestellt (Tab. 1). Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Schritte bei RT durchgeführt.

22.1 RNA-Isolierung aus Gewebe

Die Versuchstiere [$n(\varnothing) = 2$] wurden im Alter von drei Monaten mit Diethyläther tief narkotisiert, im Anschluss dekapitiert und das Gehirn wurde entnommen. Aus 100 mg Gehirngewebe wurde unter Verwendung des RNeasy-Mini-Kits sowie des PeqGOLD RNA PureTM Systems die gesamte RNA isoliert. Hierbei wurde das Gewebe zuerst in 1 ml peqLAB-Puffer in einem Homogenisator zerkleinert und anschließend 5 min inkubiert. Der PeqGOLD RNA PureTM Puffer enthielt Guanidiniumisothiocyanat, das Proteine denaturiert und somit RNasen inhibiert. Anschließend wurden 200 μ l Chloroform hinzugegeben und 15 sek lang gründlich gemischt. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wurde die Lösung zentrifugiert (10 min, 10.000 g). Anschließend wurden 250 μ l Ethanol zugegeben und nach gründlichem Mischen wurde die Lösung auf Silica-Gelsäulen (Bestandteil des RNeasy-Mini-Kits), die auf einer Vakuumvorrichtung (Vac ManTM20 Manifold) angebracht waren und an welche RNA bindet, gegeben, und für 15 sek zentrifugiert (10.000 g). Der Durchfluss wurde verworfen und anschließend wurden 350 μ l RW1-Puffer zum Waschen der an die Silica-Kügelchen gebundenen RNA gegeben und nochmals zentrifugiert

(15 sek, 10.000 g). Um DNA-Reste abzubauen und zu entfernen, wurden 10 μ l DNase in 70 μ l RDD-Puffer auf die Membran pipettiert und 15 min inkubiert. Die verdaute DNA und DNase wurden anschließend mit 500 μ l RPE-Puffer gewaschen. Dabei wurde nach Zugabe des RPE-Puffers zunächst für 15 sek zentrifugiert (10.000 g), das Eluat verworfen und anschließend, nach erneuter Zugabe von 500 μ l RPE-Puffer, für 2 min zentrifugiert (10.000 g). Um Restflüssigkeit aus der Membran zu entfernen, wurde nach dem Verwurf des Eluats erneut zentrifugiert (1 min, 10.000 g). Die RNA wurde anschließend mit 50 μ l A. bidest. (RNase-frei) eluiert. Dazu wurde A. bidest. direkt auf die Membran pipettiert und zentrifugiert (1 min, 10.000 g). Zur Erhöhung der RNA-Konzentration des Eluats wurde dieses ein zweites Mal auf die Membran gegeben. Die gelöste RNA wurde bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

22.2 Auswahl der Primer

Mit Hilfe der Informationen aus der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und des Primer-Suchprogramms *Primer3* (<http://primer3.sourceforge.net/>) wurden innerhalb der mRNA-Sequenz für NPY der Ratte einzigartige Primer ausfindig gemacht, welche die gewünschte NPY-Sequenz flankierten (Tab. 2). Unter Verwendung der Primerpaars NPY-1 wurde eine cRNA-Sonde generiert, die 503 Bp lang ist, und mit dem Primerpaar NPY-80 wurde eine cRNA-Sonde mit einer Länge von 423 Bp generiert. Diese Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon generiert. Im Folgenden ist die mRNA Sequenz des NPY-Gens (*Rattus norvegicus*, NM_012614) dargestellt. Die ausgewählten Primer sind farbig markiert:

Rattus norvegicus, NM_012614: CAA GCT CAT TCC TCG CAG AGG CGC CCA GAG CAG AGC ACC CGC TGC GCA GAG ACC ACA GCC CGC CCG CCA TGA TGC TAG GTA ACA AAC GAA TGG GGC TGT GTG GAC TGA CCC TCG CTC TAT CCC TGC TCG TGT GTT TGG GCA TTC TGG CTG AGG GGT ACC CCT CCA AGC CGG ACA ATC CGG GCG AGG ACG CGC CAG CAG AGG ACA TGG CCA GAT ACT ACT CCG CTC TGC GAC ACT ACA TCA ATC TCA TCA CCA GAC AGA GAT ATG GCA AGA GAT CCA GCC CTG AGA CAC TGA TTT CAG ATC TCT TAA TGA GAG AAA GCA CAG AAA ATG CCC CCA GAA CAA GGC TTG AAG ACC CTT CCA TGT GGT GAT GGG AAA TGA AAC TTG CTC TCC TGA CTT TTC CTA GTT TCC CCC CAC ATC TCA TCT CAT CCT GTG AAA CCA GTC TGC CTG TCC CAC CCA ATG CAT GCC ACC ACC AGG CTG GAT TCC GAC CCA TTT CCC TTG TTG TCG TTG TAT ATA TGT GTG TTT AAA TAA AGT ATC ATG CAT TC

22.3 cDNA-Synthese durch reverse Transkription

Für die cDNA-Synthese wurde das iScript™ cDNA Synthese Kit der Firma Qiagen verwendet. Dieses Kit enthielt eine reverse Transkriptase aus dem Moloney Mäuse Leukämie Virus, ein Enzym, das für die Synthese eines zur mRNA komplementären cDNA-Stranges verwendet wurde. Ein ebenso im Kit enthaltener RNase-Inhibitor schützte die mRNA vor deren Abbau durch RNasen. Zudem enthielt das Kit einen 5x iScript Reaktionsmix, ein Gemisch aus Oligo (dT)- und Random-Primern sowie die vier Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs) dATP, dCTP, dGTP und dTTP/dUTP. Die reverse Transkriptase benötigt als Startpunkt für ihre Synthese einen kurzen doppelsträngigen Bereich, der durch Hybridisierung eines Oligonukleotid-Primers mit der RNA generiert wurde. Die Oligo (dT)-Primer hefteten sich an den Poly (A)-Schwanz der mRNA an, während die Random-Primer mit zufälliger Basenfolge sich an verschiedenen Stellen der mRNA, die zu ihnen komplementär waren, anlagerten und dort als Startpunkt für die Synthese dienten. Durch Einsatz dieses Primergemisches wurde die gesamte RNA revers transkribiert. Die gewonnene cDNA wurde bis zum Gebrauch bei -20°C aufbewahrt. Der Ansatz für die cDNA-Synthese setzte sich folgendermaßen zusammen:

Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese	
5x iScript Reaktionsmix	4 μ l
iScript Reverse Transkriptase	1 μ l
RNA (500 ng/ μ l)	x μ l
Nucleasefreies Wasser	y μ l
Gesamtvolumen	20 μ l

Reaktionsbedingungen für die cDNA-Synthese	
Zeit	Temperatur
5 min	25°C
30 min	42°C
5 min	85°C

22.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein *in vitro*-Verfahren zur Vervielfältigung von DNA, die meist aus 20 bis 40 Zyklen besteht. Jeder Zyklus einer PCR beginnt mit der Denaturierung des DNA-Doppelstrangs, wobei dessen Wasserstoffbrückenbindungen durch Hitze (95°C) aufgebrochen werden. Anschließend lagern sich Forward- und Reverse-Primer bei entsprechender Hybridisierungs-Temperatur, welche von der Länge und dem GC-Gehalt der Primer abhängt, an die DNA-Einzelstränge an (Annealing). Während der Elongationsphase synthetisiert die *Taq*-Polymerase, die Mg²⁺ als Kofaktor benötigt, bei 72°C den komplementären Strang. Hierbei beginnt sie am freien 3'OH-Ende der Primer und

wandert in 5′–3′-Richtung. Die *Taq*-Polymerase stammt aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* und bleibt auch bei hohen Temperaturen stabil.

Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten PCR wurde die optimale Hybridisierungstemperatur, Konzentration des MgCl₂-Puffers (10 bzw. 15 mM) und der optimale pH-Wert bestimmt, bei welchem sich die verwendeten Primer spezifisch an die cDNA anlagern und die Polymerase eine optimale Aktivität erreicht. Bei der Auswahl der Temperaturen orientierte man sich am Mittelwert der jeweiligen Schmelzpunkte beider verwendeter Primer und führte dann die PCR bei dieser sowie $\pm 2^\circ\text{C}$ durch. Die eingesetzte *Taq*-Polymerase synthetisiert durch das Anheften der entsprechenden dNTPs den komplementären DNA-Strang. Neben ihrer matrizenabhängigen Polymeraseaktivität besitzt sie auch eine matrizenunabhängige terminale Transferaseaktivität, das heißt, sie kann ein einzelnes Nucleotid an das 3′-Ende eines DNA-Fragments anfügen. Die *Taq*-Polymerase hat eine hohe Präferenz für Adenin und somit entstand ein PCR-Produkt mit einem Poly-dA-Überhang. Ob das gewünschte PCR-Produkt entstanden ist, wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Optimale Resultate wurden mit 10 mM des MgCl₂-Puffers und einer Hybridisierungstemperatur von 61°C erzielt.

Reaktionsansatz für die PCR	
MgCl ₂ -Puffer (10 bzw. 15 mM)	2,5µl
Desoxyribonukleosidtriphosphate (je 2,5 mM)	1µl
F-R-Primergemisch	2,5µl
DNA-Matrize	1µl
Taq-Polymerase	0,3µl
Merck-Wasser	17,7µl
Gesamtvolumen	25µl

Reaktionsprotokoll der Optimierungs-PCR			
Phase	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95°C	3 min	1 x
Denaturierung	95°C	45 s	30-40 x
Hybridisierung	55-60°C	45 s	
Elongation	72°C	45 s	
Elongation	72°C	3 min	1 x
	10°C	∞	

22.5 Ligation des PCR-Produkts

Das PCR-Produkt mit dem Poly-dA-Überhang wurde anschließend mit der Multiple Cloning Site eines pCR[®]II-Vektors (Abb. 7) aus dem Dual Promotor TA Cloning[®] Kit der Firma Invitrogen, welcher einen dT-Überhang an jedem 3′-Ende besaß, ligiert. Der pCR[®]II-Vektor enthielt einen *lac*-Promotor und ein *lacZα*-Fragment, die für die im Anschluss stattfindende Blau-Weiß-Selektion (s. 22.6) entscheidend waren. Innerhalb dieses Bereichs befanden sich M13-Bindungsstellen, welche für die spätere Sequenzierung nötig

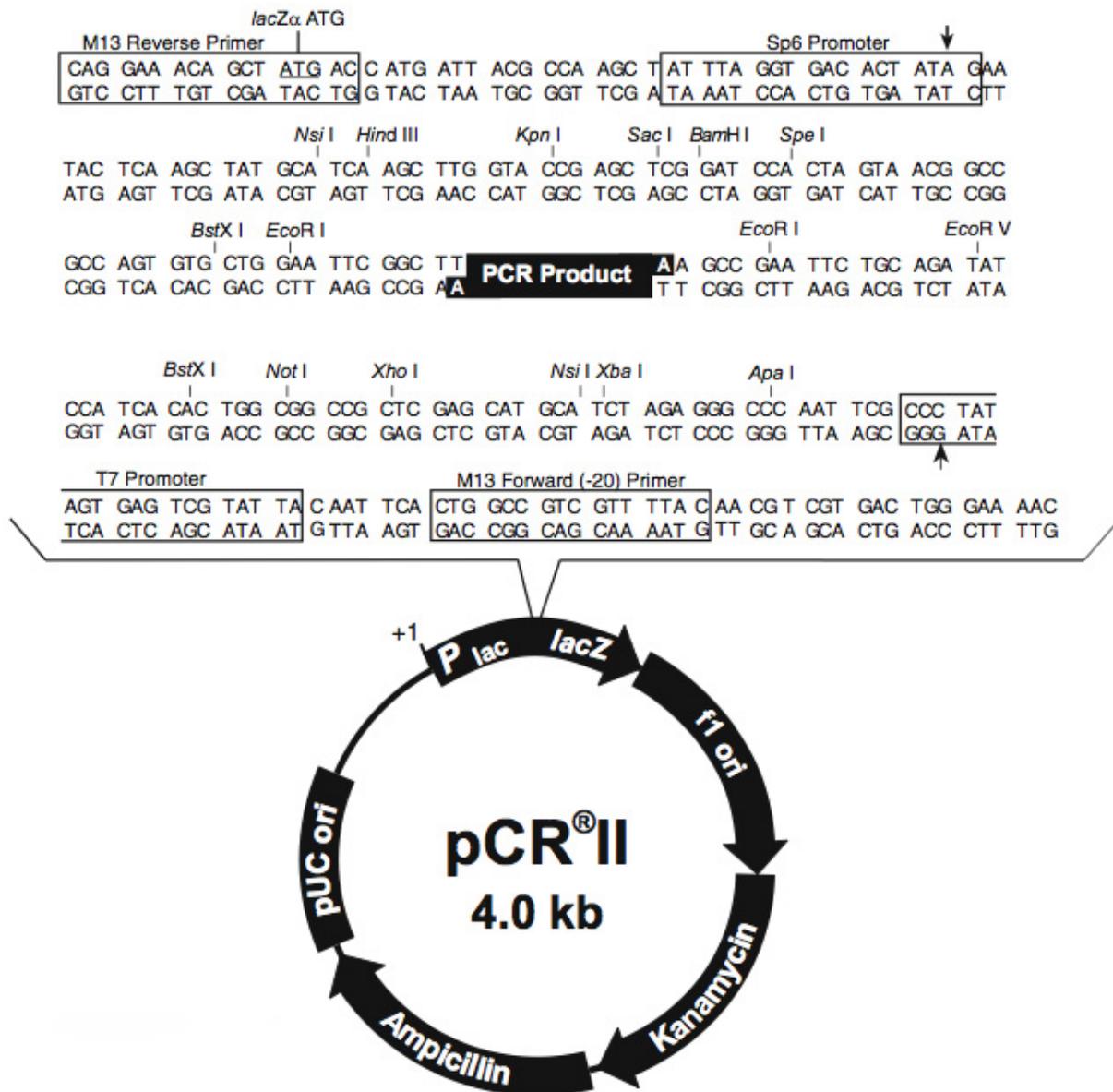


Abbildung 7: Vektormappe des pCR[®]II-Vektors (Invitrogen). Im oberen Bereich ist die Multiple Cloning Site dargestellt und der untere Bereich zeigt die wichtigsten Sequenzabschnitte des Vektors.

waren, und einen SP6- sowie T7-Promotor, welche eine *in vitro* Transkription zur Herstellung des antisense- und sense-Stranges ermöglichten. Weiterhin waren auf dem Vektor ein Kanamycin- sowie Ampicillinresistenzgen vorhanden, welche für die Selektionsverfahren (s. 22.6) unentbehrlich waren. Der pUC origin erlaubte die Replikation und Erhaltung des Plasmids in *E. coli*. Sobald sich ein PCR-Produkt in den Vektor eingliederte, konnte das lacZ α -Gen nicht mehr exprimiert werden und folglich wurde keine β -Galaktosidase mehr synthetisiert. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 14°C und 30°C Heizdeckeltemperatur in einem PCR-Gerät. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Reaktionsansatz für die Ligation	
T4 DNA Ligase, 4.0 Weiss Units	1 μ l
10 x Ligationspuffer	2 μ l
PCR-Produkt	2 μ l
pCR@II-Vektor	2 μ l
steriles Wasser	3 μ l
Gesamtvolumen	10 μ l

22.6 Transformation des Vektors in kompetente Zellen und Selektion

Bei der Transformation handelt es sich um die Aufnahme von DNA durch Wirtszellen. Hierfür wurden 50 μ l kompetenter TOP10F[']-Zellen (*E. coli*) aus dem Dual Promotor TA Cloning Kit auf Eis aufgetaut, mit 2 μ l des Ligationsansatzes vorsichtig gemischt und 30 min lang auf Eis inkubiert. Die Transformation des Vektors in die kompetente TOP10F[']-Zellen erfolgte dann durch einen Hitzeschock (30 sek bei 42°C). Danach wurden die Bakterien in 250 μ l S.O.C.-Medium aufgenommen und in einem Thermoschüttler bei 37°C und 225 rpm 1 h lang geschüttelt. Anschließend wurde eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt, um zu sehen, ob die Bakterien erfolgreich transformiert wurden. Hierzu wurden 50 μ l der Bakteriensuspension auf ampicillinhaltige LB-Platten ausplattiert. Nur die Zellen, welche den Vektor mit dem Ampicillinresistenzgen aufgenommen hatten, konnten auf diesem Medium überleben und sich vermehren. Ob diese Bakterien auch das PCR-Produkt enthielten, wurde wie folgt überprüft: auf die ampicillinhaltigen LB-Platten wurden 80 μ l 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactosid (X-Gal), ein Lactoseanalogon, hinzugegeben. Da die TOP10F[']-Zellen einen lac-Repressor synthetisierten, der die Transkription des lac-Promotors reprimiert, wurden noch 4 μ l Isopropyl- β -D-Thiogalactosid (IPTG) zugefügt, wodurch die Transkription des β -Galactosidasegens induziert wurde. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C. Die Bakterien, welche den Vektor ohne das PCR-Produkt enthielten, waren in der Lage durch β -Galactosidase X-Gal in Galactose sowie ein intensiv blaues Präzipitat umzusetzen. Bakterien, welche den Vektor mit dem Insert enthielten, konnten diese Reaktion nicht katalysieren, da sie keine β -Galaktosidase synthetisieren konnten (s. 22.5). Diese Kolonien erschienen weiß und einige dieser Kolonien wurden am Folgetag in ampicillinhaltiges (100 μ g/ml) LB-Medium überführt. Die Bakterien wurden in Plastikröhrchen in schräger Lage bei 37°C und 70 rpm im Wasserbad über Nacht inkubiert.

Reaktionsansatz für die Transformation	
Ligationsansatz	2 μ l
TOP10F [']	50 μ l

22.7 Präparation von Plasmid-DNA

Am Folgetag wurde eine Mini-Präparation nach der Arbeitsanleitung des Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification Kits durchgeführt, um die Plasmide mit dem PCR-Produkt aus einer geringen Menge der Bakteriensuspension zu isolieren. Im Anschluss wurde die DNA-Konzentration am NanoDrop Spektrophotometer bestimmt. Bei der Messung von Nucleinsäurekonzentrationen am Spektrophotometer wird die optische Dichte (OD) einer Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, da Nucleinsäuren dort ihr Extinktionsmaximum besitzen. Bei einer OD von 1 liegt eine DNA-Konzentration von $50 \frac{ng}{\mu l}$ bzw. eine RNA-Konzentration von $40 \frac{ng}{\mu l}$ vor. Über diese Werte und die Verdünnung der Probe kann nun die Nucleinsäurekonzentration der Probe bestimmt werden. Über das Verhältnis von OD_{260} zur OD_{280} können Proteinverunreinigungen erkannt werden, da Proteine bei 260 und 280 nm ein Extinktionsmaximum haben. Nucleinsäuren gelten als relativ rein, wenn der Wert des Quotienten $\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$ zwischen 1,6 und 2,0 liegt.

50 μl aus der Bakteriensuspension, die bereits für die Mini-Präparation verwendet wurde, wurden mit 100 ml LB-Medium und 80 μl Ampicillin in einen sterilen Schikanegläskolben gegeben, der Kolben wurde mit Aluminiumfolie abgedeckt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die übrige Bakteriensuspension wurde bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag wurde eine Midi-Präparation nach der Arbeitsanleitung des Wizard[®] Plus SV Midipreps DNA Purification Kits durchgeführt, um die Plasmide mit dem PCR-Produkt aus einer größeren Menge Bakteriensuspension zu isolieren. Anschließend wurde die DNA-Konzentration am NanoDrop Spektrophotometer gemessen.

22.8 Restriktionsanalyse und Sequenzierung

Von der präparierten Plasmid-DNA wurden 200 ng für die Restriktionsanalyse eingesetzt, bei der das cDNA-Insert mittels einer Restriktionsendonuclease (*EcoR1*) aus dem Plasmid herausgeschnitten wurde. Dies erfolgte für 2 h bei 37°C und das Ergebnis wurde anschließend mittels eines Agarosegels (1 % Agarose) überprüft. Um die genaue Identität der cDNA zu verifizieren und deren Orientierung im Vektor zu bestimmen, wurde eine geringe Menge des Konstrukts zur Sequenzierung zu Qiagen (Hilden, Deutschland) geschickt. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden anschließend mit der Datenbank des NCBI abgeglichen.

Reaktionsansatz für die Restriktionsanalyse	
Plasmid	200 ng
Restriktionsenzym puffer	2 μl
<i>EcoR1</i> (20 U)	2 μl
Wasser	ad 10 μl

22.9 Glycerolstocks

Nach erfolgreicher Sequenzierung wurde ein Teil der Bakteriensuspension aus Punkt 22.6 in 10x HMF_M (Hogness Modified Freezing Medium, Gefrierschutzlösung für Bakterien) aufgenommen und zur Konservierung bei -80°C gelagert (Glycerolstocks). Bei Bedarf konnte hiervon mit einer Filterspitze etwas entnommen, ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert werden. Mit den erhaltenen Bakterienkolonien konnte anschließend wieder eine Mini-Präparation (s. 22.7) durchgeführt werden.

22.10 Restriktionsverdau

Zur Vorbereitung der *in vitro* Transkription wurden die ringförmigen Plasmide an passender Stelle mit entsprechenden Restriktionsendonucleasen linearisiert, um die zirkuläre DNA zu öffnen (Tab. 3, 5). Um eine möglichst hohe Ausbeute zu erhalten, wurden jeweils drei Ansätze mit identischer Zusammensetzung vorbereitet und ein weiterer Ansatz ohne das jeweilige Restriktionsenzym diente als Kontrolle. 4 µl Ladepuffer wurden mit 1 µl jedes Ansatzes versetzt, diese Lösung wurde auf ein Agarosegel (0,8%) mit 0,005% Gel Red aufgetragen und 20–30 min bei 120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Hierdurch wurde kontrolliert, ob die eingesetzten Restriktionsenzyme die Plasmide vollständig geschnitten haben und ob die Banden auf der erwarteten Höhe lagen. Die Produktgröße wurde mit einem entsprechenden DNA-Größenmarker abgeglichen.

Die Herstellung der NPY-Sonden bzw. die Aufbereitung der von Frau Dr. Angelika Schmitt zur Verfügung gestellten Plasmide (CRF, 5-HT_{1A}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃ und Drd₂) verlief erfolgreich. Nach dem Restriktionsverdau waren auf den Agarosegelen die entsprechenden Banden der geschnittenen und ungeschnittenen Plasmide auf der jeweils erwarteten Höhe (vgl. Tab. 1) unter UV-Licht zu sehen (Abb. 8). Hierbei musste noch die Größe des jeweils verwendeten Vektors mit einberechnet werden (Tab. 1). Da die nicht geschnittenen, also ringförmig vorliegenden Plasmide einen geringeren Widerstand im Gel aufwiesen, liefen diese schneller als die mit Restriktionsenzymen geschnittenen Plasmide.

Plasmid	1500 ng
Restriktionspuffer	10 x
Restriktionsenzym	20 U
A. bidest	x µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 3: Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau.

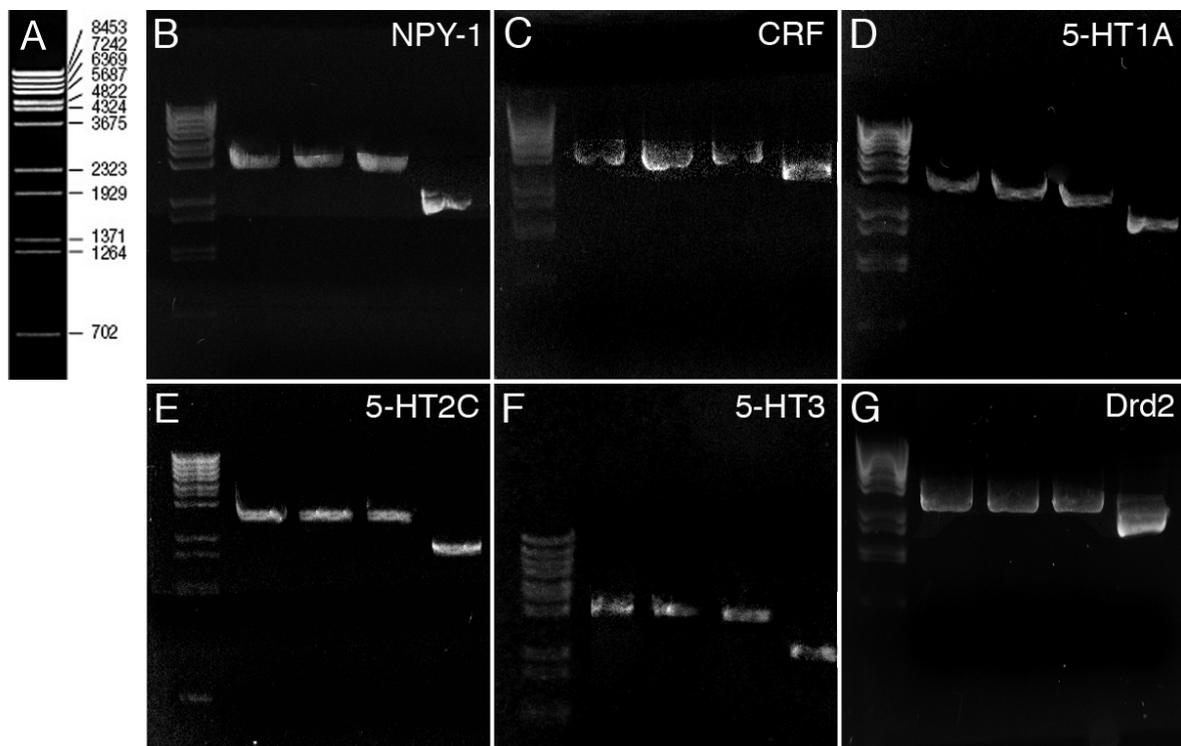


Abbildung 8: Restriktionsverdau der verwendeten Konstrukte. Nach jedem Restriktionsverdau wurde kontrolliert, ob die eingesetzten Restriktionsenzyme die Plasmide geschnitten haben und ob die Banden auf der erwarteten Höhe lagen. Die Produktgröße wurde mit einem entsprechenden DNA-Größenmarker (A, B-G: Spur 1) abgeglichen. In der jeweils fünften Spur wurde ein ungeschnittenes Plasmid zur Kontrolle aufgetragen.

22.11 DNA-Extraktion und -Fällung

Nach erfolgreichem Restriktionsverdau wurden die drei identischen Ansätze zusammenpipettiert und mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser (0,05 % DEPC) auf 300 μl aufgefüllt. Zur DNA-Aufreinigung wurden 300 μl (1 Vol) einer Mischung aus TE-gepuffertem Phenol und Chloroform (1:2) hinzugegeben, gründlich gemischt und 15 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase mit den Nucleinsäuren wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 300 μl (1 Vol) Chloroform hinzugegeben, gründlich gemischt und 10 min lang bei 13.000 rpm zentrifugiert, um Phenolrückstände zu entfernen. Anschließend wurde die obere Phase erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur DNA-Fällung wurden 30 μl (0,1 Vol) einer 3 M Natriumacetatlösung (in DEPC-Wasser, pH 5,2) hinzugegeben, kurz gemischt und sofort 750 μl (2,5 Vol) eiskalter Ethanol hinzugegeben. Nach erneutem Mischen wurden die Ansätze über Nacht bei -20°C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Ansätze 30 min lang bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde vorsichtig verworfen und sofort 300 μl 80 % Ethanol zum Waschen des Pellets zugegeben. Danach wurden die Ansätze 15 min lang bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde erneut vorsichtig verworfen und die Flüssigkeitströpfchen

an den Reaktionsgefäßwänden mit einer Pipettenspitze abgenommen. Die Pellets wurden 40–60 min an der Luft getrocknet und anschließend in 35 μl DEPC-Wasser gelöst.

22.12 *In vitro* Transkription

Um entsprechende antisense- und sense-Sonden zu generieren, wurde das Insert der gefällten DNA mit entsprechenden RNA-Polymerasen *in vitro* transkribiert und hierbei entsprechend mit Digoxigenin (DIG), Fluoreszein oder Biotin markiert (Tab. 4, 5, 6). Die Inkubationsdauer betrug 2–3 h bei 37°C gefolgt von einem 15-minütigen DNA-Verdau mit 2 μl DNase I (20 U) bei 37°C. Um zu kontrollieren, ob die *in vitro* Transkription erfolgreich verlief, wurde 1 μl jedes Ansatzes in 4 μl Ladepuffer aufgenommen, auf ein Agarosegel (0,8 %) mit 0,005 % Gel Red aufgetragen und bei 120 V 20–30 min elektrophoretisch aufgetrennt.

linearisiertes Plasmid	17,5 μl
Transkriptionspuffer	5 x
RNA Markierungsmix	3 μl
RNase Inhibitor	20 U
RNA Polymerase	20 U
Gesamtvolumen	30 μl

Tabelle 4: Allgemeiner Reaktionsansatz für die *in vitro* Transkription.

	Restriktionsenzym as	Restriktionsenzym s	RNA Polymerase as	RNA Polymerase s
ratNPY-1/-80	<i>Hind</i> III	<i>Xho</i> I	T7	Sp6
ratCRF	<i>Hind</i> III	<i>Sac</i> I	Sp6	T7
rat5-HT _{1A}	<i>Pst</i> I	<i>EcoR</i> I	T7	Sp6
rat5-HT _{2C}	<i>Hind</i> III	<i>Not</i> I	T3	T7
ms5-HT ₃	<i>EcoR</i> I	<i>Xba</i> I	T7	Sp6
msDrd ₂	<i>Xho</i> I	<i>Hind</i> III	Sp6	T7

Tabelle 5: Zur Herstellung der cRNA-Sonden verwendete Restriktionsenzyme und RNA Polymerasen. In dieser Tabelle sind alle in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte aufgelistet und vermerkt, welche Restriktionsenzyme und RNA Polymerasen zur Herstellung von antisense- bzw. sense-Sonden verwendet wurden.

	Biotin-Markierungsmix	Fluoreszein-Markierungsmix	DIG-Markierungsmix
ratNPY-1/-80	E, T	E, D	E, D
ratCRF	–	–	E, D
rat5-HT _{1A}	–	–	E, D, T
rat5-HT _{2C}	–	E, D, T	E, D
ms5-HT ₃	–	–	E, D
msDrd ₂	–	E, D	E, D

Tabelle 6: Verwendete Markierungsmixe zur Herstellung der cRNA-Sonden. In dieser Tabelle sind alle in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte aufgelistet und vermerkt, mit welchen RNA-Markierungsmixen diese erfolgreich hergestellt wurden. E: für Einzelmarkierungen, D: für Doppelmarkierungen, T: für Dreifachmarkierungen

22.13 cRNA-Extraktion, -Fällung und -Konzentrationsmessung

Die Phenol-Chloroform-Extraktion der cRNA und anschließende Fällung der aufgereinigten cRNA wurden genauso wie unter 22.11 beschrieben durchgeführt. Allerdings wurde hier unter RNase-freien Bedingungen gearbeitet und wassergesättigtes, stabilisiertes Phenol verwendet. Die Konzentration und Reinheit der in DEPC-Wasser gelösten cRNA wurde anschließend am Spektrophotometer (SmartSpec Plus) gemessen.

23 *In situ* Hybridisierung

Für die *in situ* Hybridisierung wurden alle Lösungen mit 0,05 % DEPC-Wasser angesetzt und es wurde bis zur Hybridisierung unter RNase-freien Bedingungen gearbeitet.

23.1 Gewebeaufbereitung

Im Alter von drei Monaten wurden die Ratten [n(♀)=7, Ratte 15–17, 23, 24, 28, 30; n(♂)=9, Ratte 18–22, 25–27,29] mit Diethylether tief narkotisiert und dekapitiert. Im Anschluss wurden die Gehirne entnommen, mit einem Einbettmedium für Gefrierschnitte auf einer Korkplatte fixiert, über 2-Methylbutan in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert. Von diesem Gewebe wurden dann am Kryostaten bei -25°C coronale Serienschnitte mit einer Dicke von jeweils 10 µm (Bregma -2,12 mm bis -3,30 mm; [146]) hergestellt. Die Objektträger wurden vor Gebrauch 5 h lang bei 163°C ausgebacken. Das geschnittene Gewebe wurde in einer frisch angesetzten Lösung aus PBS (4°C) mit 4 % PFA 5 min lang immersionsfixiert und bis zur weiteren Verwendung in 100 % Ethanol bei 4°C gelagert.

23.2 ISH mit Chromogenen (CISH) – Einzelmarkierung

23.2.1 Rehydrierung, Acetylierung und Hybridisierung

Zuerst wurden die Gewebeschnitte in einer absteigenden Ethanolreihe (95, 80 und 70 %, jeweils 2 min) rehydriert, 2 x 5 min in 2 x Natriumsalz-Citratpuffer (SSC, engl: sodium saline citrate buffer) gewaschen und dann zur Permeabilisierung des Gewebes 5 min lang mit 0,02 N HCl behandelt. Nach erneutem Waschen in 2 x SSC (2 x 5 min) wurden sie 20 min lang in einer frisch hergestellten Lösung bestehend aus 0,25 % Essigsäureanhydrid und 0,2 % HCl in 0,1 M Triethanolaminpuffer acetyliert, um positive Ladungen im Gewebe gegenüber der negativ geladenen cRNA-Sonden abzuschirmen, nochmals in 2 x SSC (2 x 5 min) gewaschen, mit Prähybridisierungslösung und Parafilm bedeckt und in einer

feuchten Kammer 60 min lang im Hybridisierungsöfen bei entsprechender Temperatur (Tab. 7) inkubiert. Die entsprechende cRNA-Sonde wurde in Prähybridisierungslösung verdünnt und 5 min lang bei 84°C im Heizblock erhitzt. Mit dieser Hybridisierungslösung wurde das Gewebe bedeckt, Paraffim darüber gelegt und in einer feuchten Kammer 18 bis 22 h im Hybridisierungsöfen bei entsprechender Temperatur (Tab. 7) inkubiert.

cRNA-Sonde	Konzentration	Hybridisierungstemperatur
ratNPY-1 bzw. 80	10 $\frac{ng}{\mu l}$	57–60°C
ratCRF	10 $\frac{ng}{\mu l}$	58°C
rat5-HT _{1A}	15 $\frac{ng}{\mu l}$	57°C
rat5-HT _{2C}	10 $\frac{ng}{\mu l}$	58°C
ms5-HT ₃	15 $\frac{ng}{\mu l}$	58°C
msDrd ₂	15 $\frac{ng}{\mu l}$	60°C

Tabelle 7: Hybridisierungsbedingungen der verwendeten cRNA-Sonden

23.2.2 Posthybridisierung und Antikörperinkubation

Am nächsten Tag wurden die Gewebeschnitte wie folgt behandelt: (1) 3 x 5 min mit 2 x SSC, (2) 30 min mit 50 % Formamid in 2 x SSC bei 58°C im Wasserbad, (3) 3 x 5 min mit 2 x SSC, (4) 30 min mit RNase-Puffer bei 37°C im Wasserbad, um überschüssige cRNA-Fragmente abzubauen, (5) 2 x 2 min mit RNase-Puffer ohne RNase A, (6) 30 min mit RNase-Puffer ohne RNase A bei 58°C im Wasserbad. Danach wurde das Gewebe 5 min lang in Waschpuffer gewaschen und anschließend mindestens 30 min lang mit 0,5 % Blockpulver in Waschpuffer (Blockpuffer) behandelt. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation mit einem entsprechenden Antikörper, der mit einer alkalischen Phosphatase (AP) konjugiert war, für 150 min.

23.2.3 Enzymatischer Nachweis der cRNA-Sonden

Nachdem die Gewebeschnitte 2 x 5 min in Waschpuffer und 5 min in AP-Puffer gewaschen wurden, wurden sie mit Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) und 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP) in AP-Puffer (1:50) im Dunkeln unter kontrollierten Bedingungen für mehrere Stunden bzw. über Nacht inkubiert. Bei diesem Schritt reagierte NBT/BCIP mit der AP, wodurch ein rotbraunes Reaktionsprodukt entstand. Sobald das optimale Reaktionsergebnis erreicht war, wurde die Signalentwicklung 2 x 5 min mit Stopp-Puffer beendet, dann 2 x 5 min in A. dest. gewaschen und schließlich mit Aquatex[®] eingedeckt. Dieses Verfahren wird im Folgenden als ISH mit Chromogenen (CISH) bezeichnet.

23.3 ISH mit Fluoreszenzfarbstoffen (FISH) – Einzelmarkierung

Für FISH erfolgten die Rehydrierung, Acetylierung, Hybridisierung und Posthybridisierung wie unter 23.2.1 und 23.2.2 beschrieben mit der Ausnahme, dass hier für die FISH entsprechende, mit Meerrettichperoxidasen (POD) gekoppelte, Antikörper verwendet wurden.

23.3.1 Nachweis der cRNA-Sonden mit Fluoreszenzfarbstoffen

Nachdem die nicht gebundenen Antikörper mit Waschpuffer (3 x 5 min) abgewaschen wurden, wurde das Gewebe für 30 min mit einer TSATM (Tyramid signalverstärkung, engl.: Tyramide signal amplification) Biotin-Lösung, welche an den POD umgesetzt wurde, nach Vorschrift des Herstellers (Perkin Elmer) behandelt und anschließend nochmals 3 x 5 min in Waschpuffer gewaschen. Danach erfolgte eine Inkubation mit AlexaFluor[®] 488, das an Streptavidin (SA) gekoppelt war, verdünnt in Waschpuffer ($5 \frac{\mu g}{ml}$) für 30 min. Auf Grund der relativ hohen Sensitivität (HS) dieses Detektionssystems, wird der Nachweis von cRNA-Sonden mit TSATM Biotin und AlexaFluor[®] 488, das an SA gekoppelt ist, im Folgenden als HS-TSA-FISH bezeichnet. Ein Schema zur Veranschaulichung dieser Methode ist auf Abb. 9 zu sehen.

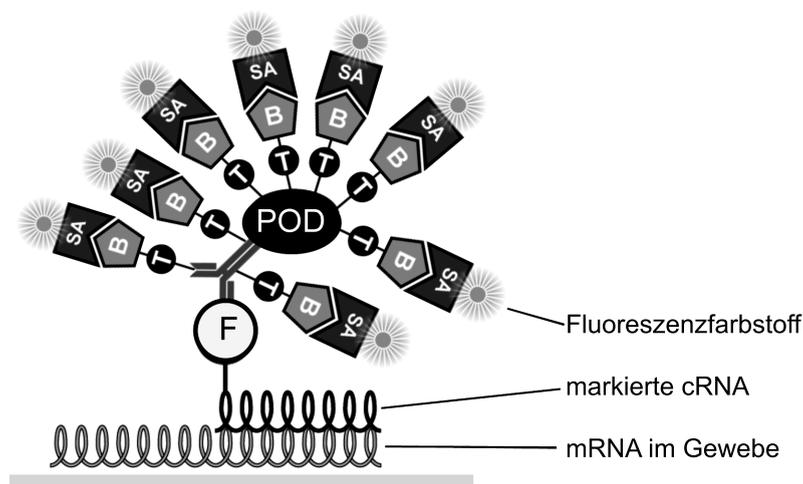


Abbildung 9: Methodenschema zur HS-TSA-FISH, modifiziert nach Perkin Elmer. B: Biotin, F: Fluoreszein, POD: Meerrettichperoxidase, SA: Streptavidin, T: Tyramid.

23.3.2 Zellkernfärbung und Eindecken

Die Gewebeschnitte wurden 2 x 5 min in Waschpuffer gewaschen, danach für 5 min mit 300 nM 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), verdünnt in Waschpuffer, inkubiert, 5 min in Waschpuffer gewaschen und mit Fluoro-Gel eingedeckt.

23.4 Doppelmarkierung mit Fluoreszenzfarbstoffen

Bevor Doppelmarkierungen durchgeführt wurden, wurden mögliche Kreuzreaktionen der eingesetzten cRNA-Sonden unter Verwendung des Programms „MultiAlin“ ausgeschlossen (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). Die Rehydrierung, Acetylierung, Hybridisierung und Posthybridisierung erfolgten wie unter 23.2.1 und 23.2.2 beschrieben mit der Ausnahme, dass bei Doppelmarkierungen zwei cRNA-Sonden, welche während der *in vitro* Transkription (s. 22.12) unterschiedlich markiert wurden (DIG und Fluoreszein), gleichzeitig für die Hybridisierung eingesetzt wurden.

23.4.1 Nachweis der ersten cRNA-Sonde

Die „schwächere“ Sonde wurde mit einem entsprechenden POD-gekoppelten Antikörper markiert (s. 23.3) und anschließend, wie unter 23.3.1 beschrieben, mittels HS-TSA-FISH detektiert. Nachdem die AlexaFluor[®] 488-Lösung mit Waschpuffer abgewaschen wurde (2 x 5 min), wurde ein Peroxidaseblock für 15 min mit 0,02 N HCl in Waschpuffer durchgeführt, um noch aktive Peroxidasen zu inaktivieren.

23.4.2 Nachweis der zweiten cRNA-Sonde

Anschließend wurde das Gewebe erneut (3 x 5 min) in Waschpuffer gewaschen und dann mit dem zweiten entsprechenden POD-gekoppelten Antikörper (s. 23.3) die „stärkere“ Sonde markiert (Inkubation über Nacht). Am Folgetag wurde der Antikörper 3 x 5 min mit Waschpuffer abgewaschen und es erfolgte eine Inkubation mit TSA[™]Cy3 für 7 min. Danach wurde das Gewebe wie unter 23.3.2 behandelt und eingedeckt. Auf Grund der relativ moderaten Sensitivität (MS) wird das in diesem Abschnitt erläuterte Detektionssystem als MS-TSA-FISH bezeichnet.

23.5 Doppelmarkierung: Kombination aus FISH und CISH

Die Rehydrierung, Acetylierung, Hybridisierung und Posthybridisierung erfolgten wie unter 23.2.1 und 23.2.2 beschrieben mit der Ausnahme, dass bei Doppelmarkierungen zwei cRNA-Sonden, welche während der *in vitro* Transkription (s. 22.12) unterschiedlich markiert wurden, gleichzeitig für die Hybridisierung eingesetzt wurden. Weiterhin wurde das Gewebe hier mit einem entsprechenden POD-gekoppelten Antikörper (für ratNPY) und AP-gekoppelten Antikörper (für eine der Monoaminrezeptor-Sonden) simultan für 150 min inkubiert.

23.5.1 Nachweis der cRNA-Sonden

Die Antikörper wurden 3 x 5 min mit Waschpuffer abgewaschen und anschließend, wie unter 23.3.1 beschrieben, mittels HS-TSA-FISH detektiert. Im Anschluss erfolgte der enzymatische Nachweis mittels CISH, wie unter 23.2.3 beschrieben mit der Ausnahme, dass die Präparate nach den Waschschritten mit Stopp-Puffer nicht mit A. dest., sondern 2 x 5 min in Waschpuffer gewaschen wurden, und mit Fluoro-Gel eingedeckt wurden.

23.6 Dreifachmarkierung: Kombination aus FISH und CISH

Bevor Dreifachmarkierungen durchgeführt wurden, wurden mögliche Kreuzreaktionen der eingesetzten cRNA-Sonden unter Verwendung des Programms „MultiAlin“ ausgeschlossen (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). Die Rehydrierung, Acetylierung, Hybridisierung und Posthybridisierung erfolgten bis einschließlich zur Inkubation in Blockpuffer wie unter 23.2.1 und 23.2.2 beschrieben mit der Ausnahme, dass hierbei drei cRNA-Sonden, welche während der *in vitro* Transkription (s. 22.12) unterschiedlich markiert wurden (Biotin, Fluoreszein bzw. DIG), gleichzeitig für die Hybridisierung eingesetzt wurden.

23.6.1 Nachweis der ersten cRNA-Sonde

Zuerst wurde die mit Biotin markierte cRNA Sonde (ratNPY) detektiert. Hierfür wurde das Gewebe nach dem Blockierungsschritt für 30 min mit SA, an welches POD gekoppelt sind (Perkin Elmer), inkubiert. Überschüssiges SA-POD wurde 3 x 5 min mit Waschpuffer abgewaschen, dann wurden die Schnitte für 7 min mit TSATMCy3 behandelt und 5 min in Waschpuffer gewaschen. Auf Grund der relativ geringen Sensitivität (LS, engl.: low sensitivity) dieses Detektionssystems, wird der Nachweis von mit Biotin markierten cRNA-Sonden durch SA-POD und TSATMCy3 im Folgenden als LS-TSA-FISH bezeichnet.

Im Anschluss wurde ein Peroxidaseblock für 15 min mit 0,02 N HCl in Waschpuffer durchgeführt und danach 3 x 5 min mit Waschpuffer gewaschen.

23.6.2 Nachweis der zweiten und dritten cRNA-Sonde

Die Gewebeschnitte wurden dann mit einem entsprechenden POD-gekoppelten Antikörper (zum Nachweis von rat5-HT_{2C}) und AP-gekoppelten Antikörper (zum Nachweis von rat5-HT_{1A}) simultan für 150 min inkubiert. Die nicht gebundenen Antikörper wurden 3 x 5 min mit Waschpuffer abgewaschen und das Gewebe wurde dann, wie unter 23.3.1 beschrieben, mittels HS-TSA-FISH detektiert. Im Anschluss erfolgte der enzymatische Nachweis mittels CISH, wie unter 23.2.3 beschrieben. Nach den Waschschritten im Stopp-Puffer wurde das Gewebe, wie unter 23.3.2 beschrieben, mit DAPI gefärbt und eingedeckt.

23.7 Optimierung der ISH

23.7.1 Einzelmarkierungen

Für jede der cRNA-Sonden aus Tab. 7 wurden die Hybridisierungstemperatur und Antikörperkonzentration bzw. -inkubationszeit in CISH-Einzelmarkierungen optimiert. Weiterhin wurden die optimale Konzentration und Inkubationszeit des mit AlexaFluor[®] 488 konjugierten SA bestimmt. Anschließend wurde jede cRNA-Sonde sowohl mittels CISH als auch HS-TSA-FISH detektiert und die Ergebnisse wurden miteinander verglichen. Zusätzlich wurde jede cRNA-Sonde während der *in vitro* Transkription sowohl mit Fluoreszein als auch mit DIG markiert, um zu überprüfen, ob die Markierung der cRNA mit dem Verteilungsmuster und/oder der Signalintensität interferiert. Das Verteilungsmuster der Einzelmarkierungen sollte miteinander vergleichbar sein und mit den Angaben entsprechender Literaturstellen (s. Tab. 8) übereinstimmen. Für ratNPY-1 bzw. -80 und rat5-HT_{2C} waren die Resultate der CISH- und HS-TSA-FISH-Einzelmarkierungen vergleichbar; folglich wurden die Kolo-kalisationsexperimente für diese cRNA-Sonden mit Doppel-FISH (dFISH) durchgeführt. Für rat5-HT_{1A}, ms5-HT₃ und msDrd₂ waren nur die Resultate CISH-Einzelmarkierungen sensitiv genug, daher wurden die Kolo-kalisationsexperimente dieser cRNA-Sonden mit ratNPY mittels HS-TSA-FISH/CISH-Kombination (s. 23.5) durchgeführt. ratCRF konnte mittels CISH, HS- und MS-TSA-FISH mit ausreichend hoher Sensitivität dargestellt werden. Ein allgemeiner Leitfaden zur Durchführung von Mehrfachmarkierungen mit ISH ist auf Abb. 10 dargestellt.

cRNA-Sonde	Informationen über Verteilungsmuster
ratNPY-1 bzw. 80	Gustafson et al., 1986 [61]
ratCRF	Asan et al., 2003 [47]
rat5-HT _{1A}	Aznar et al., 2003; Pazos and Palacios, 1985 [12, 148]
rat5-HT _{2C}	Clemett et al., 2000; Mengod et al., 1990 [38, 115]
ms5-HT ₃	Mascagni et al., 2007, Tecott et al., 1993 [105, 194]
msDrd ₂	Weiner et al., 1991 [209]

Tabelle 8: Literaturangaben zur Beurteilung der mit den verwendeten cRNA-Sonden erzielten Verteilungsmuster der ISH-Signale.

23.7.2 Doppelmarkierungen

Bevor doppel-ISH durchgeführt wurden, wurde zuerst mit dem im Internet zugänglichen Programm MultiAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) überprüft, ob die eingesetzten Sonden theoretisch miteinander hybridisieren könnten, um unerwünschte Kreuzreaktionen auszuschließen. Für die hier eingesetzten Sonden wurden keine potenziell komplementären Sequenzabschnitte nachgewiesen.

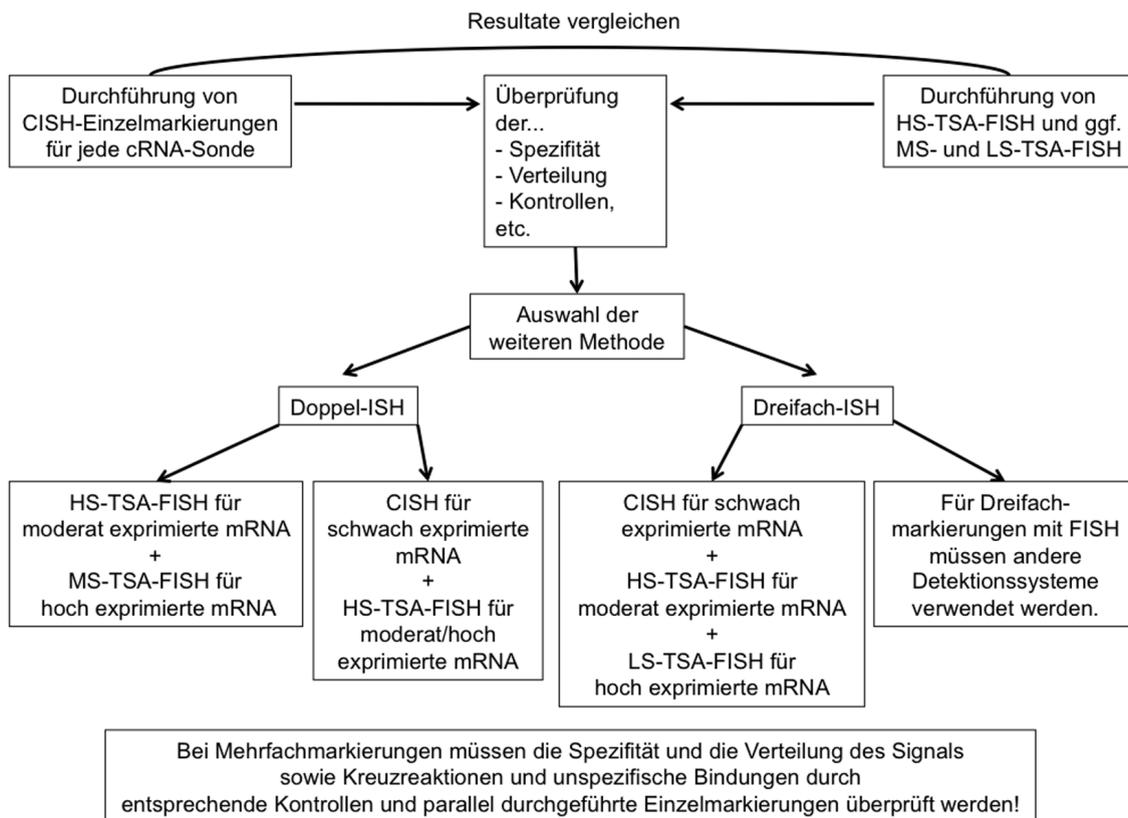


Abbildung 10: Leitfaden zur Durchführung von Mehrfachmarkierungen mit ISH

Während der Etablierung der HS-TSA-FISH/CISH-Kombination wurde nach der Inkubation mit AlexaFluor[®] 488 konjugiertem SA das Gewebe kurz mit Waschpuffer eingedeckt und die Ergebnisse der Fluoreszenzfärbung am Mikroskop betrachtet. Anschließend wurde das Gewebe mit NBT/BCIP behandelt und festgestellt, dass die chromogene Reaktion das Fluoreszenzsignal nicht beeinträchtigt und umgekehrt. Zusätzlich wurde getestet, ob sich die Ergebnisse unterscheiden, wenn zuerst das Fluoreszenzsignal und dann das Chromogensignal detektiert wird bzw. umgekehrt. Die Reihenfolge spielte hier keine Rolle, jedoch war es aus Zeitgründen sinnvoller zuerst HS-TSA-FISH und dann CISH durchzuführen. Es war also gewährleistet, dass die FISH- und CISH-Signale nicht miteinander interferieren. Während der Signalentwicklung des Chromogens wurden die Verteilung und Intensität des Reaktionsprodukts in regelmäßigen Abständen lichtmikroskopisch kontrolliert, bis die gewünschte Signalintensität erreicht wurde.

23.7.3 Dreifachmarkierungen

Nach der Durchführung verschiedener Testexperimente stellte sich heraus, dass die besten Resultate erzielt werden, wenn ratNPY mit Biotin, rat5-HT_{2C} mit Fluoreszein und

rat5-HT_{1A} mit DIG markiert wird. cRNA-Sonden, die mit Biotin markiert und über LS-TSA-FISH detektiert wurden, zeigten im Vergleich zu HS- und MS-TSA-FISH, stets wesentlich schwächere Signale auf. Dies ist für ratNPY auf Abb. 11 dargestellt: die Signalintensität und -verteilung unter Anwendung der HS- und MS-TSA-FISH sind miteinander vergleichbar (Abb. 11 A, B); mit beiden Methoden wurden sowohl NPY cRNA-positive Neurone mit hoher und geringerer mRNA-Expression nachgewiesen (Abb. 11 A, B, Pfeile). Unter Anwendung der LS-TSA-FISH konnten generell weniger Neurone und nahezu keine Neurone mit geringer mRNA-Expression detektiert werden (Abb. 11 C). LS-TSA-FISH war jedoch für ratNPY, im Gegensatz zu allen anderen in dieser Arbeit verwendeten cRNA-Sonden, noch ausreichend sensitiv.

Weiterhin wurde die mit Biotin markierte NPY cRNA zu Testzwecken direkt mit SA 488 (ohne TSA-System) detektiert und mit dem Ergebnis der LS-TSA-FISH verglichen. Hierbei stellte sich heraus, dass eine direkte Markierung mit SA 488 eine sehr geringe Sensitivität aufwies, sodass das Fluoreszenzsignal kaum erkennbar war. Mit LS-TSA-FISH war die Sensitivität jedoch ausreichend, um qualitative Auswertungen durchzuführen.

Außerdem wurde zur vergleichenden Analyse für rat5-HT_{2C} HS- und MS-TSA-FISH angewendet. Beim Vergleich der Resultate stellte sich deutlich heraus, dass MS-TSA-FISH nicht sensitiv genug war, um 5-HT_{2C} mRNA im La und BL zu detektieren. Mittels HS-TSA-FISH wurden jedoch optimale Ergebnisse erzielt. rat5-HT_{1A} und wurde stets mit CISH nachgewiesen, da alle anderen in dieser Arbeit verwendeten ISH-Detektionssysteme nicht ausreichend sensitiv waren.

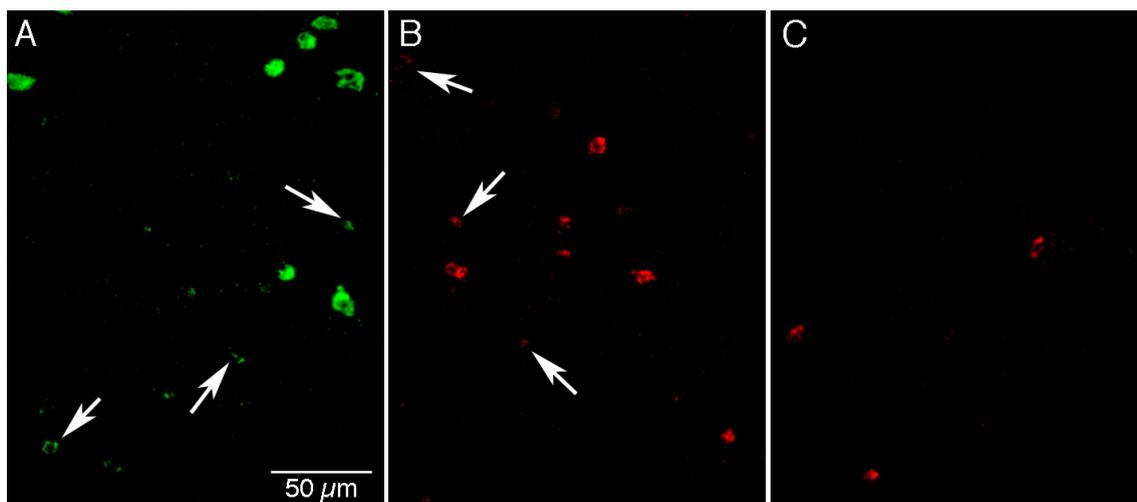


Abbildung 11: Vergleich von HS-, MS- und LS-TSA-FISH anhand der NPY cRNA-Sonde. (A) HS-TSA-FISH, (B) MS-TSA-FISH, (C) LS-TSA-FISH. Die Pfeile in (A) und (B) deuten auf NPY cRNA-positive Neurone mit relativ geringer mRNA-Expressionsstärke. Der Größenbalken in (A) gilt auch für (B) und (C).

23.7.4 Eindeckmedien

Weiterhin wurde das optimale Eindeckmedium für FISH/CISH Präparate bestimmt. Eindeckmedien für die Standardlichtmikroskopie, wie z. B. Aquatex[®], waren für die Betrachtung des CISH Signals geeignet (Abb. 12 A-C'), konnten für die FISH/CISH Präparate jedoch nicht verwendet werden, da die Fluoreszenzen des AlexaFluor[®] 488 und DAPI sehr schnell, im Cy2-Filter bereits nach 5 min, ausbleichen (Abb. 12 D-F'). Cy3-Fluoreszenzsignale wurden jedoch nicht beeinträchtigt (nicht gezeigt).

Die Verwendung von Fluoro-Gel bei CISH-Präparaten führte nach einer 20-minütigen UV-Belichtung (DAPI-Filter) zu leichter unspezifischer Zellkernfärbung (Abb. 12 H, H', Pfeile). In mit DAPI gefärbten FISH/CISH-Präparaten war diese unspezifischer Zellkernfärbung intensiver (Abb. 12 K, K', Pfeile). Nach einer 20-minütigen Belichtung durch den Cy2- oder Durchlichtfilter waren solche Artefakte nicht zu beobachten (Abb. 12 G, G', I, I', J, J', L, L'). Unter Verwendung von 1,5% n-Propylgallat in 60% Glycerin/PBS (NPG), einem Eindeckmedium, welches die Fluoreszenzen länger erhält [203], erschien das CISH-Signal unscharf (Abb. 12 M-O'). Unter Verwendung von NPG bei FISH/CISH-Präparaten entstand nach 20-minütiger UV- bzw. Cy2-Belichtung eine hohe unspezifische Hintergrundfärbung des gesamten Gewebes (Abb. 12 N', O'). In dFISH-Präparaten, die mit Fluoro-Gel eingedeckt wurden, waren nach Hellfeld-, DAPI- bzw. Cy2-Belichtung keine Veränderungen zu beobachten (Abb. 12 P-R'). Folglich bewies sich Fluoro-Gel als bestes Eindeckmedium für FISH/CISH-Präparate, obwohl es vom Hersteller nicht für NBT/BCIP empfohlen wird. Um unspezifische Zellkernfärbungen zu vermeiden, wurde während der mikroskopischen Auswertungen das DAPI-Signal, wenn überhaupt, nur kurzzeitig zur Orientierung betrachtet. Weiterhin wurden die Präparate zeitnahe ausgewertet, da fünf Wochen nach dem Eindecken mit Fluoro-Gel das CISH-Signal begann schwächer zu werden.

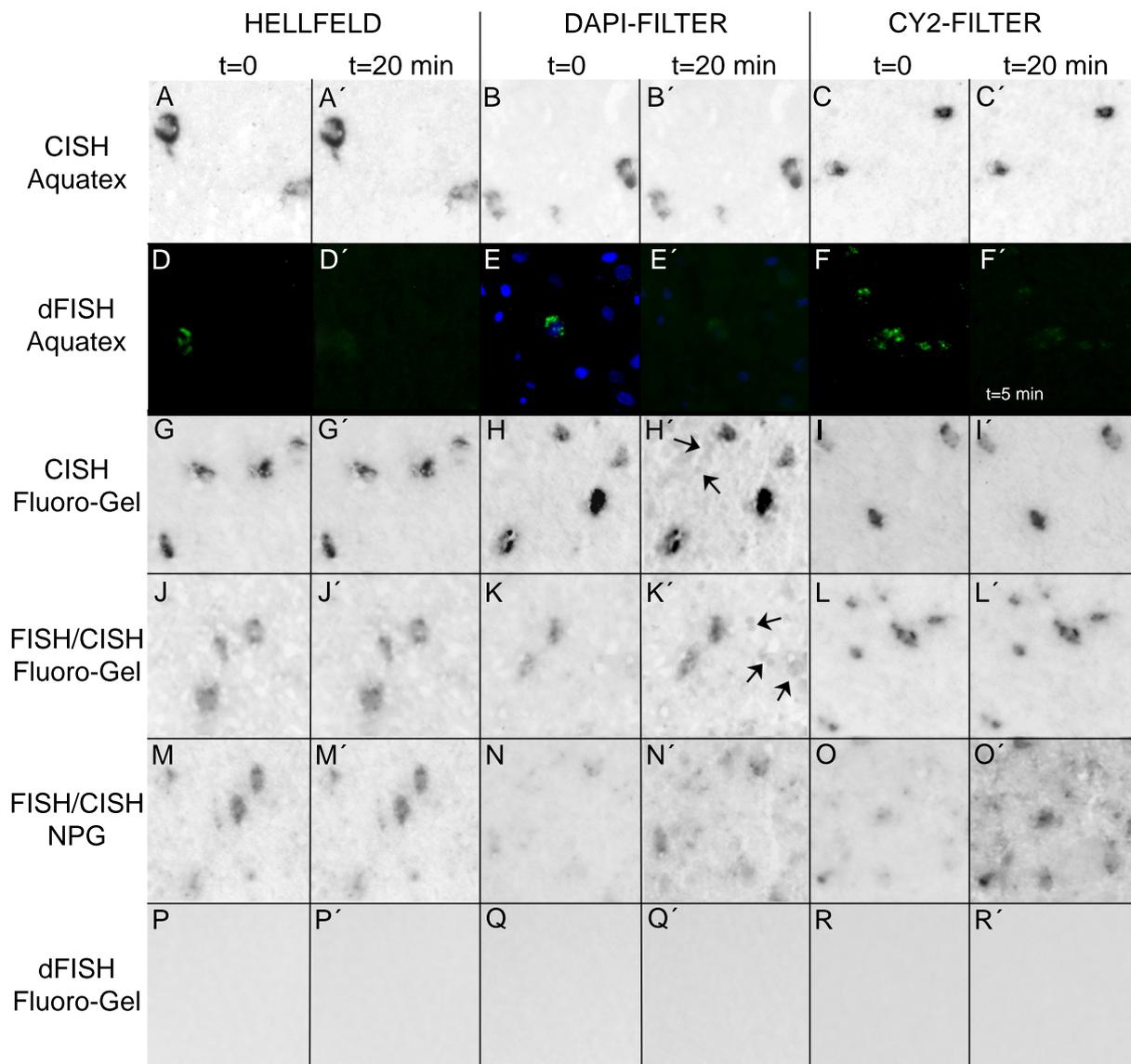


Abbildung 12: Beleuchtungsexperiment. Um das beste Eindeckmedium für FISH/CISH Präparate zu bestimmen, wurden Testreihen mit verschiedenen Eindeckmedien und unterschiedlicher Belichtung durchgeführt. Details s. Text.

23.8 Kontrollen

Die Spezifität der antisense-Sonden wurde überprüft, indem Gewebeschnitte mit der gleichen Menge der entsprechenden sense-Sonde inkubiert wurden oder mit Prähybridisierungspuffer (ohne die entsprechenden Sonden) behandelt wurden. Auf diesen Kontrollpräparaten waren keine unspezifischen Signale zu sehen. In Kreuzkontrollpräparaten, in welchen eine antisense-Sonde mit der sense-Sonde einer anderen cRNA gemischt wurde (z. B. NPY antisense-Sonde mit 5-HT_{1A} sense-Sonde) und anschließend nach demselben Protokoll wie für die entsprechende Doppelmarkierung behandelt wurde, kam es in allen möglichen Fällen der Doppel- und Dreifachmarkierungen zu keiner Beeinträchtigung des antisense-Signals. Durch diese Kontrollen bestätigte sich die Spezifität der antisense-Sonden und dass die eingesetzten Detektionssysteme keine Artefaktfärbungen hervorriefen.

23.9 Auswertung der ISH-Präparate

Die Gewebeschnitte wurden so gewählt, dass mindestens 30 μm Abstand zwischen den ausgewerteten Schnitten lagen, um eine mehrfache Auswertung von Neuronen auszuschließen. Pro Tier wurden mindestens neun Kryoschnitte aus der anterioren, medialen und posterioren coronalen Schnittebene des La und BL ausgewertet. Die fotografische Dokumentation erfolgte stets nach den Untersuchungen bzgl. der Kolokalisationen.

Im La und BL wurde eine hohe Anzahl NPY mRNA-positiver Neurone herangezogen (ca. 40 Neurone pro Nucleus), um die Irrtumswahrscheinlichkeit bzgl. der Kolokalisationsrate gering zu halten. Die prozentualen Werte wurden dann statistischen Testverfahren unterzogen. Um die Normalverteilung der zu testenden Werte zu überprüfen, wurde bei einem Signifikanzniveau von 0,01 der Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest mit Lilliefors Korrektur angewendet. Zur vergleichenden Analyse wurde bei normalverteilten Werten der t-Test für zwei gepaarte bzw. ungepaarte Stichproben mit Signifikanzniveau 0,05 angewendet. Für die Auswertung der nicht normalverteilten Werte wurde der Randomisierungstest für zwei gepaarte bzw. ungepaarte Stichproben herangezogen. Das Signifikanzniveau lag hier ebenso bei 0,05. Diese Berechnungen wurden mit dem Programm SsS 2.0 durchgeführt.

Teil V

Ergebnisse

24 Einfluss des 5-Htt-Genotyps und von sozialem Stress auf die neuronale Morphologie im La und BL von Mäusen

Die charakteristischen morphologischen Merkmale der Stern- und Pyramidenzellen waren im La und BL der silberimprägnierten Präparate deutlich erkennbar (Abb. 5). In den Präparaten jedes analysierten Tieres waren stets genügend freiliegende Neurone auffindbar und somit konnte eine ausreichende Anzahl mit dem NeuroLucida-System rekonstruiert werden.

24.1 Analyse der Sternzellen

Da es sich bei Sternzellen um dornenarme Interneurone handelt [117], wurden die Daten dieser Zellen lediglich bezüglich folgender Parameter ausgewertet: Gesamtlänge des dendritischen Materials (Abb. 13 A), Gesamtzahl dendritischer Verzweigungspunkte, dendritische Verzweigungsdichte (Abb. 13 B), maximale dendritische Ausbreitung (Abb. 13 C) und Anzahl der Schnittpunkte der Dendriten mit den Oberflächen der Kugeln (Abb. 13 D, E). Die statistische Auswertung dieser Parameter zeigte keine Gruppenunterschiede an.

24.2 Analyse der Pyramidenzellen

24.2.1 3D Sholl-Analyse, Dendritenlänge und Verzweigungsdichte

Die Analyse sowohl aller Dendriten gemeinsam, als auch der Apikal- und Basaldendriten separat, ergab, bezogen auf die maximale Ausbreitung der Dendriten (Abb. 14) sowie die Anzahl der Schnittpunkte der Dendriten mit den Oberflächen der Kugeln (Abb. 15), die mit Hilfe der 3D Sholl-Analyse ermittelt wurden, im La und BL keine Gruppenunterschiede. Ebenso unterschieden sich die Gruppenwerte bzgl. der Gesamtlänge des dendritischen Materials nicht (Abb. 16).

Die Gesamtanalyse des dendritischen Materials im La zeigte tendenziell eine höhere Verzweigungsdichte der WT_{Ver} ($p = 0,026$) und 5-Htt KO_{Ver} ($p = 0,093$) auf (im Vergleich zu WT_{Kon} ; Abb. 17 A). Die separate Analyse der Apikal- und Basaldendriten ergab keine

Gruppenunterschiede an den Basaldendriten (Abb. 17 C) und eine tendenziell höhere dendritische Verzweigungsdichte bei 5-Htt KO_{Kon} ($p = 0,065$) sowie eine signifikant höhere dendritische Verzweigungsdichte bei 5-Htt KO_{Ver} ($p = 0,004$) im Vergleich zu WT_{Kon} an den Apikaldendriten (Abb. 17 B). Im BL ergab die Datenanalyse der dendritischen Verzweigungsdichte keine Gruppenunterschiede (Abb. 17 D-F).

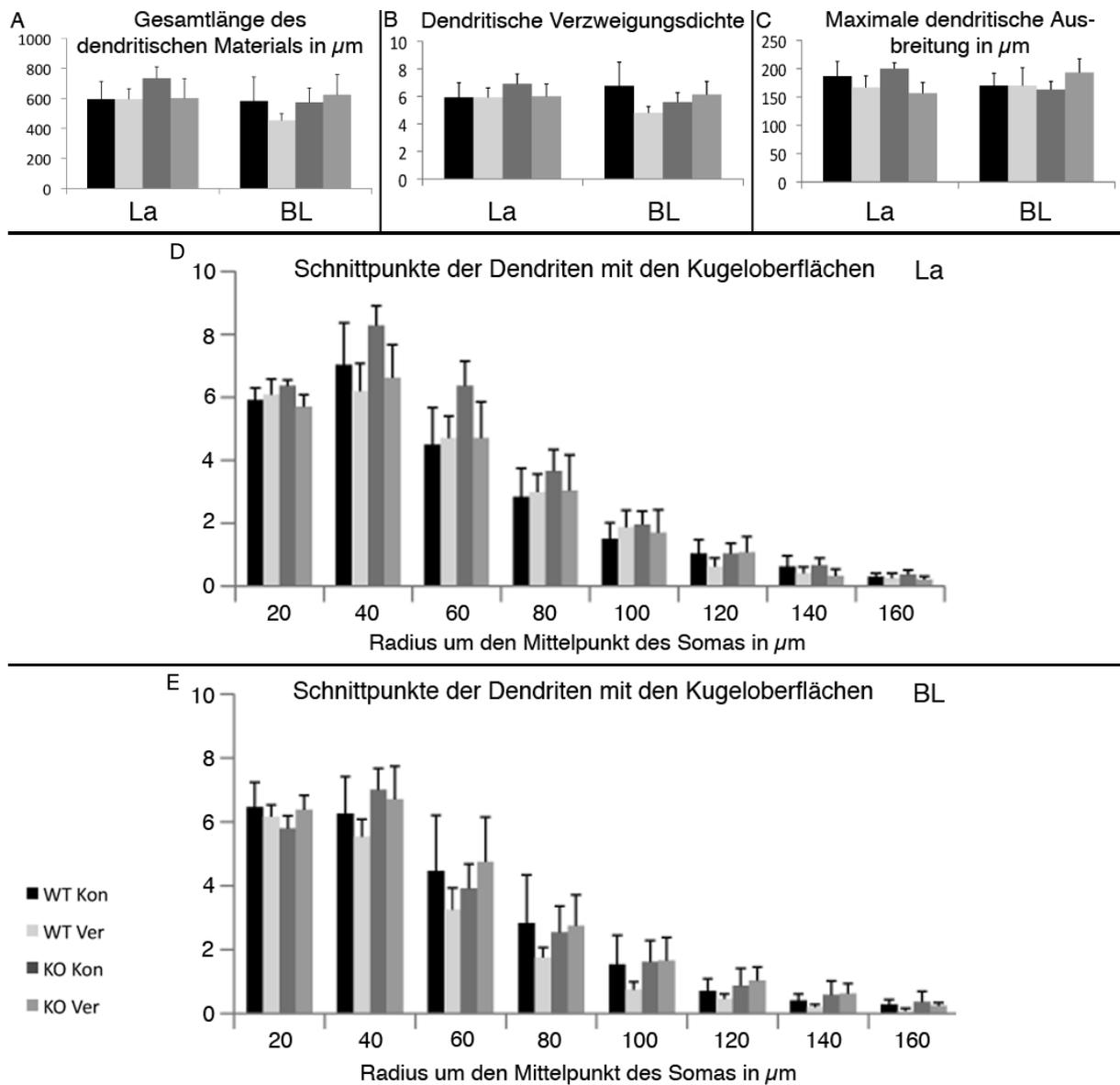


Abbildung 13: Morphometrische Analyse der Sternzellen. Bezüglich der untersuchten Parameter wurden keine Gruppenunterschiede nachgewiesen. Die Balken repräsentieren die jeweiligen arithmetischen Mittel, die Fehlerbalken die zugehörige Standardabweichung des Mittelwerts. BL: basolateraler Nucleus, KO: knock out, Kon: Kontrolle, La: lateraler Nucleus, Ver: Verlierer, WT: Wildtyp. $n = 6$ pro Gruppe.

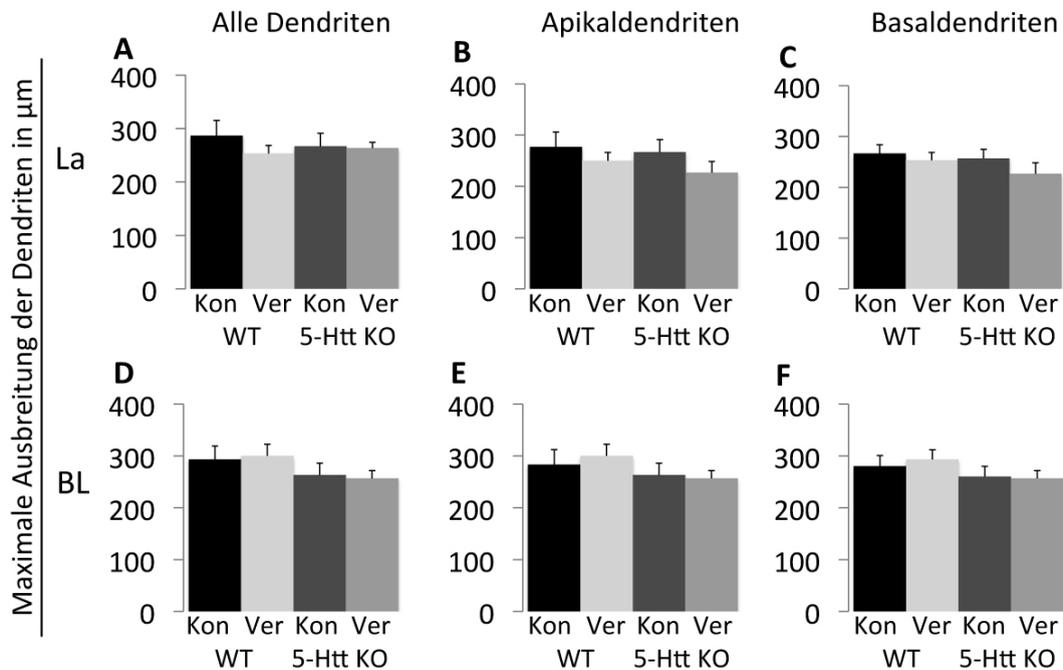


Abbildung 14: Maximale Ausbreitung der Dendriten der Pyramidenzellen (größte Kugeloberfläche, die noch von Dendriten berührt wird). Die statistische Auswertung zeigte im La und BL keine Gruppenunterschiede auf. Die Balken repräsentieren die jeweiligen arithmetischen Mittel, die Fehlerbalken die zugehörige Standardabweichung des Mittelwerts. 5-Htt: Serotonintransporter, BL: basolateraler Nucleus, KO: knock out, Kon: Kontrolle, La: lateraler Nucleus, Ver: Verlierer, WT: Wildtyp. $n = 6$ pro Gruppe.

24.2.2 Analyse der Gesamtzahl dendritischer Dornen und Dornendichte

Die Datenauswertung der Gesamtzahl dendritischer Dornen und Dornendichte lieferte deutliche, sowohl vom 5-Htt KO-Genotyp abhängige als auch stressbedingte Resultate. Für die dendritische Dornendichte_{VO} (D) aller Gruppen stellte sich für Pyramidenzellen im La und BL, in Übereinstimmung mit entsprechenden Literaturstellen [178, 210], folgender Zusammenhang heraus:

$$D_{1. Ordnung} < D_{2. Ordnung} < D_{3. Ordnung} \approx D_{4. Ordnung} \quad (\text{Abb. 18}).$$

24.2.2.1 5-Htt-Genotyp-abhängige Unterschiede Im La von 5-Htt KO-Mäusen wurde, im Vergleich zu WT_{Kon}, eine erhöhte Gesamtdornendichte aller Dendriten beider KO-Gruppen nachgewiesen (5-Htt KO_{Kon}: $p = 0,002$; 5-Htt KO_{Ver}: $p = 0,009$; Abb. 19 A), die sich sowohl an Apikal- (5-Htt KO_{Kon}: $p = 0,026$; 5-Htt KO_{Ver}: $p = 0,015$; Abb. 19 B) als auch an Basaldendriten widerspiegelte ($p = 0,002$ bzw. $p = 0,015$; Abb. 19 C). Auch die Analyse der Dornendichte_{VO} ergab für beide KO-Gruppen gleichsinnige Erhöhungen. Diese waren an Apikaldendriten auf die dritte und vierte Ordnung beschränkt (5-Htt KO_{Kon}: $p = 0,065$ bzw. $p = 0,015$; 5-Htt KO_{Ver}: $p = 0,026$ bzw. $p = 0,065$; Abb. 18 C). An Basaldendriten waren die Effekte an Dendriten erster bis dritter Ordnung für 5-Htt KO_{Kon}

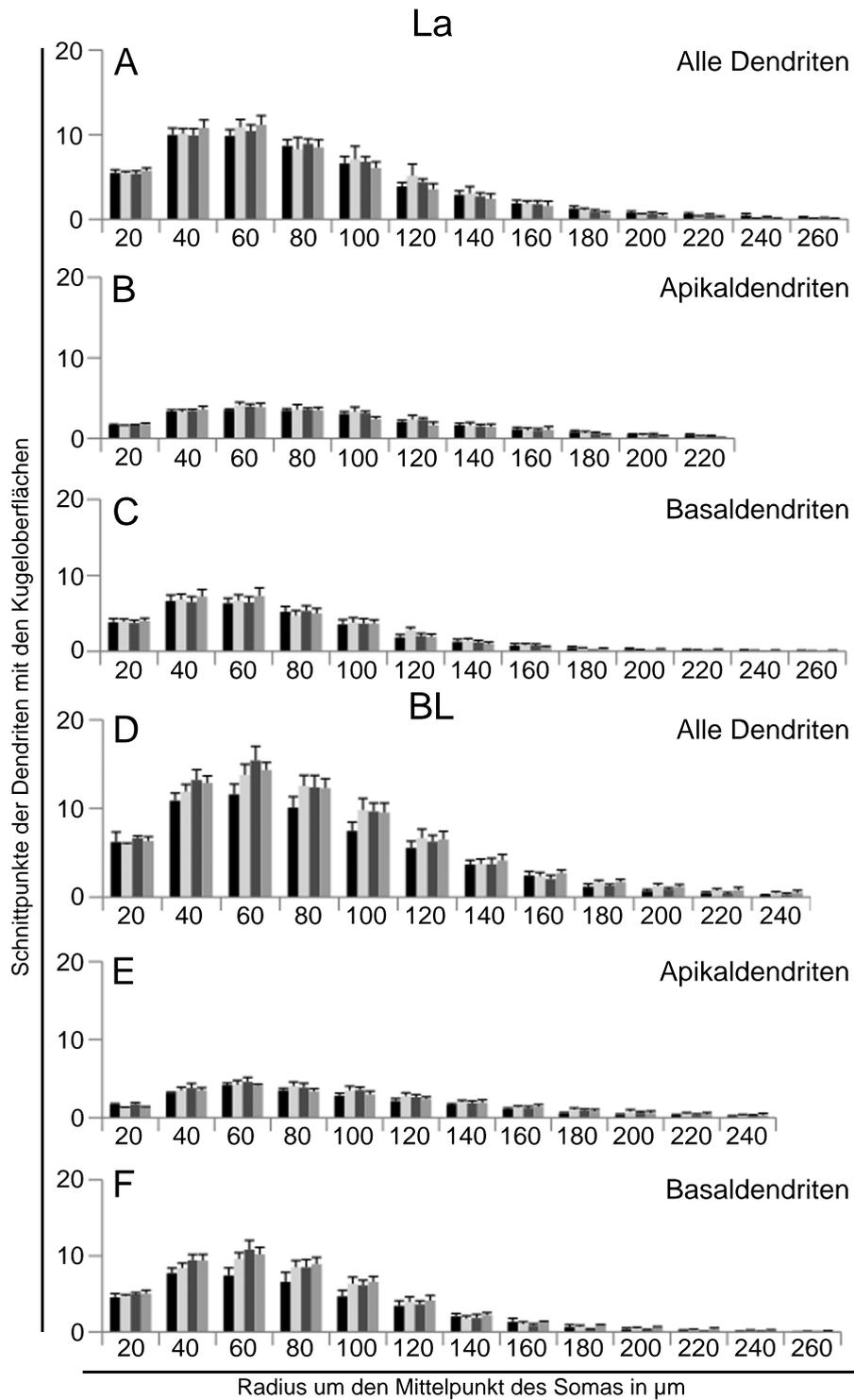


Abbildung 15: Anzahl der Schnittpunkte der Dendriten mit den Oberflächen der Kugeln. Die statistische Auswertung zeigte keine Gruppenunterschiede auf. Die Balken repräsentieren die jeweiligen arithmetischen Mittel, die Fehlerbalken die zugehörige Standardabweichung des Mittelwerts. BL: basolateraler Nucleus, La: lateraler Nucleus. Legende s. Abb. 13. n = 6 pro Gruppe.

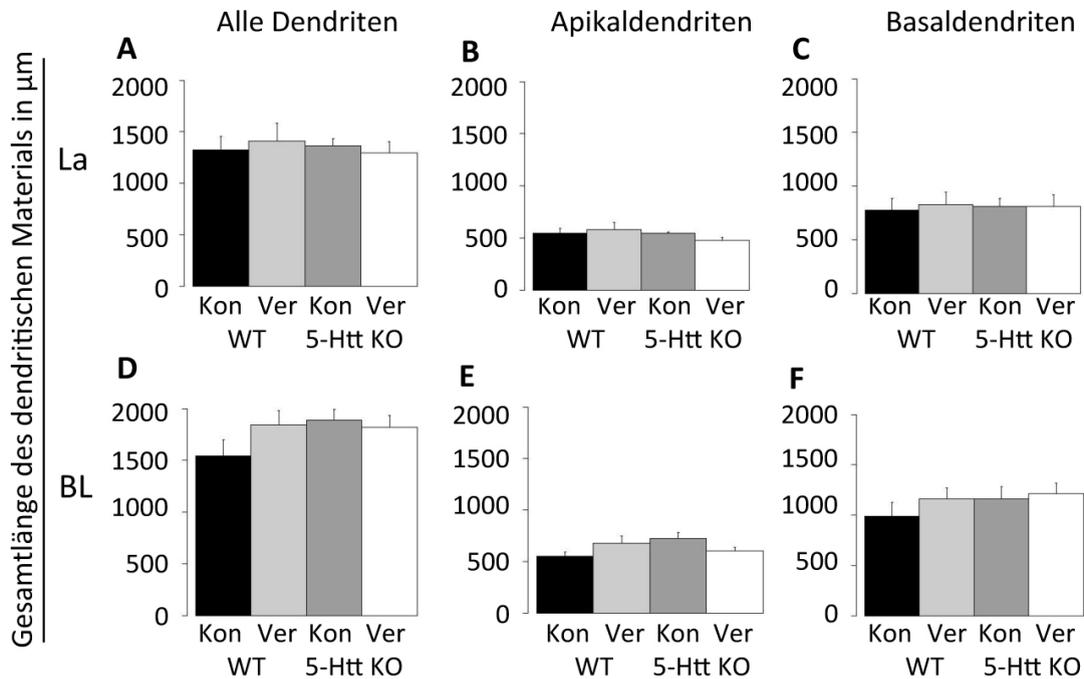


Abbildung 16: Gesamtlänge des dendritischen Materials. Die statistische Auswertung zeigte keine Gruppenunterschiede auf. Die Balken repräsentieren die jeweiligen arithmetischen Mittel, die Fehlerbalken die zugehörige Standardabweichung des Mittelwerts. 5-Htt: Serotonintransporter, BL: basolateraler Nucleus, KO: knock out, Kon: Kontrolle, La: lateraler Nucleus, Ver: Verlierer, WT: Wildtyp. $n = 6$ pro Gruppe.

($p = 0,041$ bzw. $p = 0,004$ bzw. $p = 0,004$; Abb. 18 E) bzw. erster bis vierter Ordnung für 5-Htt KO_{Ver} ($p = 0,093$ bzw. $p = 0,026$ bzw. $p = 0,065$ bzw. $p = 0,065$; Abb. 18 E) nachweisbar. Die Dornendichte_{VO} war, bezogen auf alle Dendriten, bei 5-Htt KO-Mäusen im Vergleich zu WT_{Kon} ebenfalls erhöht (5-Htt KO_{Kon}: $p = 0,015$ bzw. $p = 0,015$; 5-Htt KO_{Ver}: $p = 0,065$ bzw. $p = 0,026$ bzw. $p = 0,009$; Abb. 18 A). Bezüglich der Gesamtzahl dendritischer Dornen wurden im La keine Gruppenunterschiede festgestellt (Abb. 20 A–C).

An allen Dendriten von 5-Htt KO_{Kon} wurde im BL, im Vergleich zu WT_{Kon} eine signifikant erhöhte Gesamtdornendichte nachgewiesen ($p = 0,009$; Abb. 19 D), welche sich auch an den Basaldendriten tendenziell bestätigte ($p = 0,015$; Abb. 19 F). Mit einer Ausnahme an den Basaldendriten vierter Ordnung ($p = 0,041$; Abb. 18 F) wurden im BL bzgl. der Dornendichte_{VO} keine vom 5-Htt-Genotyp abhängigen Unterschiede nachgewiesen (Abb. 18 B, D). An allen Dendriten von 5-Htt KO_{Kon} war, im Vergleich zu WT_{Kon} die Gesamtzahl der dendritischen Dornen signifikant erhöht ($p = 0,009$; Abb. 20 D). Derselbe Effekt war auch an Apikaldendriten zu finden ($p = 0,009$; Abb. 20 E). Mittels der erhaltenen Daten dieser Experimente werden hier erstmalig durch den 5-Htt-Genotyp bedingte Unterschiede der Gesamtdornendichte, der Dornendichte_{VO} und der Gesamtzahl dendritischer Dornen von Pyramidenzellen nicht gestresster WT- und 5-Htt KO-Mäuse im La und BL beschrieben.

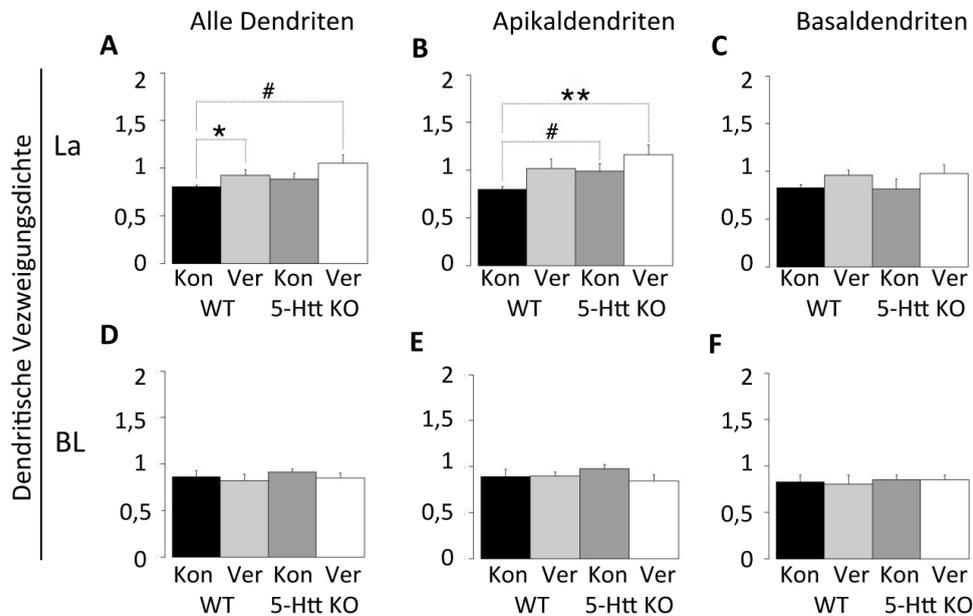


Abbildung 17: Dendritische Verzweigungsdichte. Im La konnten bei der Analyse aller Dendriten sowie der Apikaldendriten Gruppenunterschiede nachgewiesen werden. Die Balken repräsentieren die jeweiligen arithmetischen Mittel, die Fehlerbalken die zugehörige Standardabweichung des Mittelwerts. **: der p-Wert des Kruskal-Wallis Tests $< 0,1$ und der p-Wert des Wilcoxon Tests $< 0,01$; *: der p-Wert des Kruskal-Wallis Tests $< 0,1$ und der p-Wert des Wilcoxon Tests $< 0,05$ und $> 0,01$; #: der p-Wert des Kruskal-Wallis Tests $< 0,1$ und der p-Wert des Wilcoxon Tests $< 0,1$ und $> 0,05$. 5-Htt: Serotonintransporter, BL: basolateraler Nucleus, KO: knock out, Kon: Kontrolle, La: lateraler Nucleus, Ver: Verlierer, WT: Wildtyp. $n = 6$ pro Gruppe.

24.2.2.2 Stressbedingte Unterschiede WT_{Ver} wiesen im Vergleich zu WT_{Kon} eine tendenziell höhere Gesamtdornendichte auf (La: $p = 0,041$ für alle Dendriten; $p = 0,026$ für Apikaldendriten; $p = 0,065$ für Basaldendriten; BL: $p = 0,026$ für alle Dendriten; $p = 0,065$ für Basaldendriten; Abb. 19). Dasselbe galt für die Analyse der Dornendichte $_{VO}$: im La war die Dornendichte $_{VO}$ von WT_{Ver} im Vergleich zu WT_{Kon} aller Dendriten der ersten bis zur vierten Ordnung ($p = 0,093$; $p = 0,041$; $p = 0,026$; $p = 0,026$; Abb. 18 A), der Apikaldendriten dritter und vierter Ordnung ($p = 0,093$; $p = 0,093$; Abb. 18 C), der Basaldendriten erster bis dritter Ordnung ($p = 0,026$; $p = 0,026$; $p = 0,015$; Abb. 18 E) sowie der Basaldendriten vierter Ordnung im BL ebenfalls höher ($p = 0,026$; Abb. 18 F). Diese stressbedingten Unterschiede waren statistisch weniger aussagekräftig, jedoch den Veränderungen, die an Pyramidenzellen der 5-Htt KO-Mäuse nachgewiesen wurden, sehr ähnlich. Zwischen WT_{Ver} und 5-Htt KO $_{Kon}$ wurden weder signifikante noch tendenzielle Gruppenunterschiede nachgewiesen. An allen Dendriten von WT_{Ver} wurde im BL, im Vergleich zu WT_{Kon} eine signifikant erhöhte Gesamtzahl dendritischer Dornen nachgewiesen ($p = 0,041$; Abb. 20 D), welche sich auch an den Apikaldendriten tendenziell bestätigte ($p = 0,065$; Abb. 20 E).

Mit drei Ausnahmen, nämlich der Gesamtdornendichte der Basaldendriten im BL ($p = 0,041$; Abb. 19F), der Dornendichte $_{VO}$ aller Dendriten erster Ordnung ($p = 0,065$; Abb. 18

A) und der Dornendichte_{VO} der Basaldendriten vierter Ordnung im La ($p = 0,009$; Abb. 18 E), war die dendritische Dornendichte der Pyramidenzellen im La und BL von 5-Htt KO_{Ver} jener der 5-Htt KO_{Kon} gleich. Mittels der erhaltenen Daten dieser Experimente werden hier erstmalig stressbedingte Unterschiede der Gesamtdornendichte, der Dornendichte_{VO} und der Gesamtzahl dendritischer Dornen der Pyramidenzellen von WT- und 5-Htt KO-Mäusen im La und BL beschrieben.

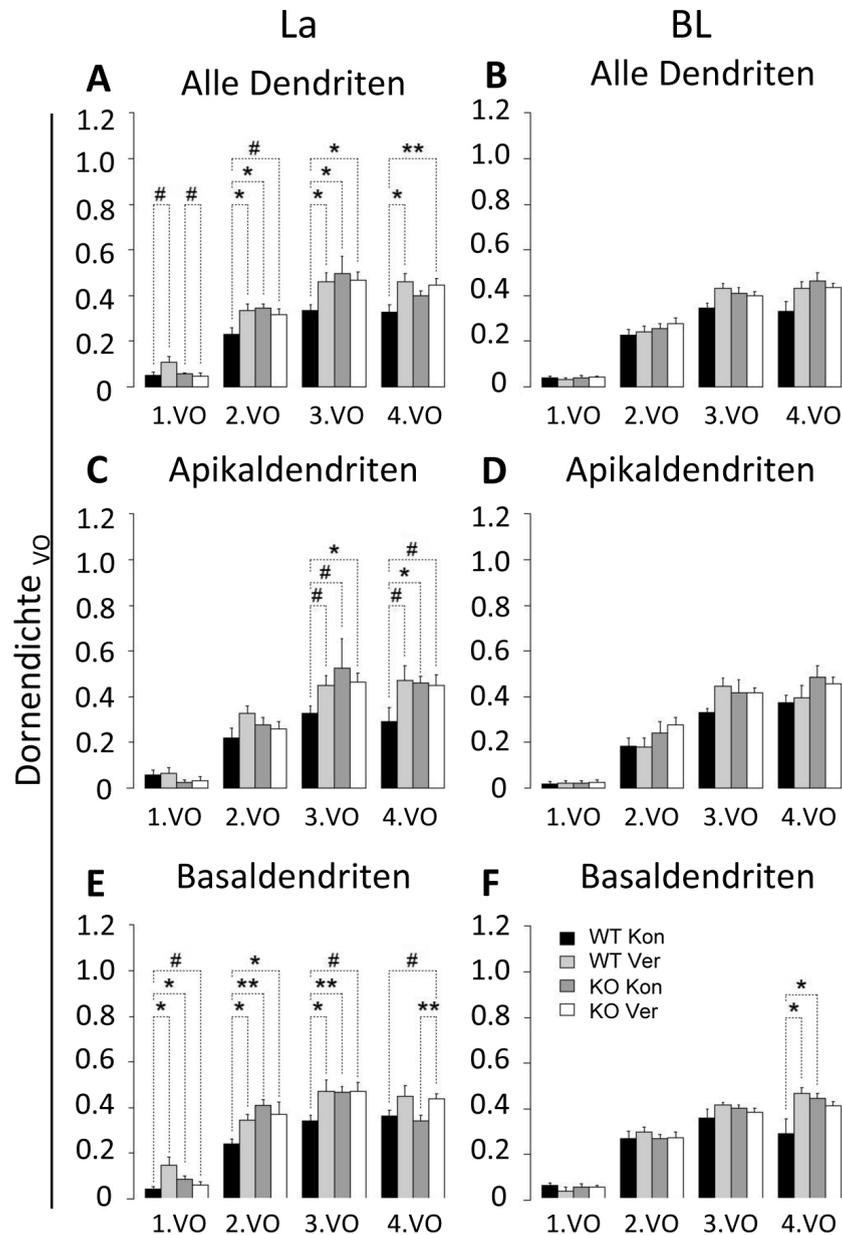


Abbildung 18: Dornendichte_{VO}. Die Balken repräsentieren die jeweiligen arithmetischen Mittel, die Fehlerbalken die zugehörige Standardabweichung des Mittelwerts. **: der p-Wert des Kruskal-Wallis Tests < 0,1 und der p-Wert des Wilcoxon Tests < 0,01; *: der p-Wert des Kruskal-Wallis Tests < 0,1 und der p-Wert des Wilcoxon Tests < 0,05 und > 0,01; #: der p-Wert des Kruskal-Wallis Tests < 0,1 und der p-Wert des Wilcoxon Tests < 0,1 und > 0,05. BL: basolateraler Nucleus, KO: knock out, Kon: Kontrolle, La: lateraler Nucleus, Ver: Verlierer, WT: Wildtyp. n = 6 pro Gruppe.

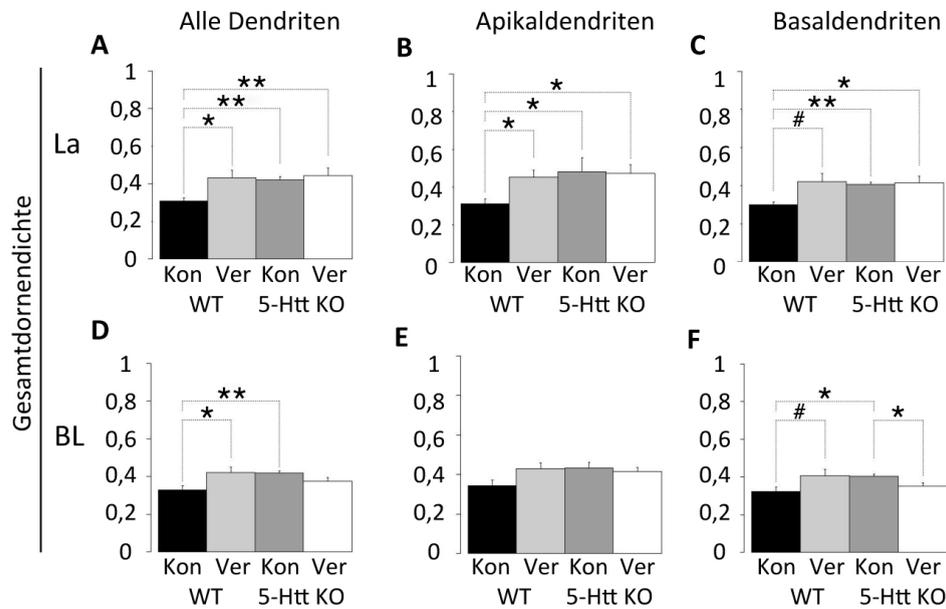


Abbildung 19: Gesamtdornendichte. In beiden Nuclei ließen sich sowohl vom 5-Htt-Genotyp abhängige als auch stressbedingte Veränderungen nachweisen, wobei die auffälligsten Effekte an allen Dendriten im La erfasst wurden. Die Balken repräsentieren die jeweiligen arithmetischen Mittel, die Fehlerbalken die zugehörige Standardabweichung des Mittelwerts. **: der p-Wert des Kruskal-Wallis Tests < 0,1 und der p-Wert des Wilcoxon Tests < 0,01; *: der p-Wert des Kruskal-Wallis Tests < 0,1 und der p-Wert des Wilcoxon Tests < 0,05 und > 0,01; #: der p-Wert des Kruskal-Wallis Tests < 0,1 und der p-Wert des Wilcoxon Tests < 0,1 und > 0,05. BL: basolateraler Nucleus, KO: knock out, Kon: Kontrolle, La: lateraler Nucleus, Ver: Verlierer, WT: Wildtyp. n = 6 pro Gruppe.

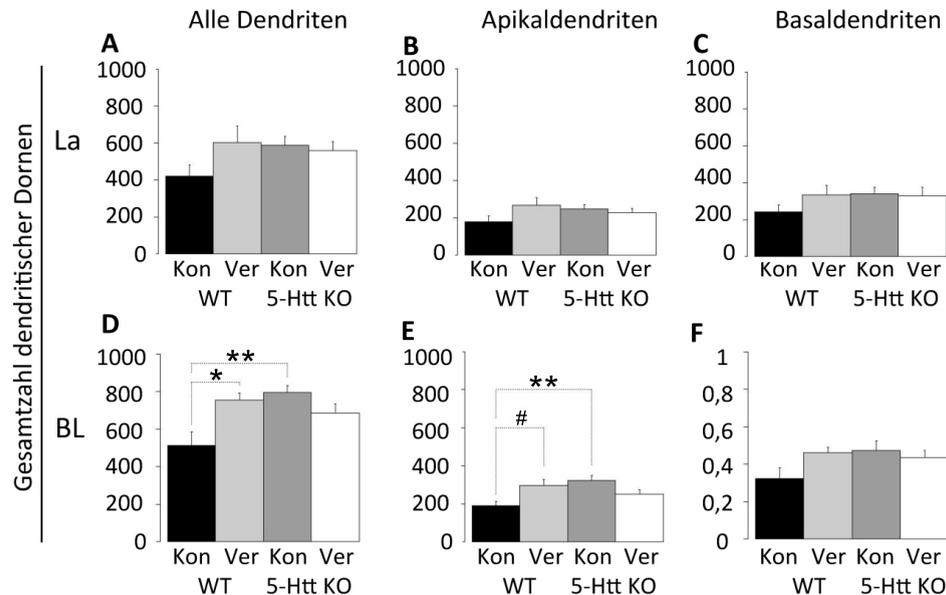


Abbildung 20: Gesamtzahl dendritischer Dornen. Die Balken repräsentieren die jeweiligen arithmetischen Mittel, die Fehlerbalken die zugehörige Standardabweichung des Mittelwerts. **: der p-Wert des Kruskal-Wallis Tests < 0,1 und der p-Wert des Wilcoxon Tests < 0,01; *: der p-Wert des Kruskal-Wallis Tests < 0,1 und der p-Wert des Wilcoxon Tests < 0,05 und > 0,01; #: der p-Wert des Kruskal-Wallis Tests < 0,1 und der p-Wert des Wilcoxon Tests < 0,1 und > 0,05. BL: basolateraler Nucleus, KO: knock out, Kon: Kontrolle, La: lateraler Nucleus, Ver: Verlierer, WT: Wildtyp. n = 6 pro Gruppe.

25 Lichtmikroskopische Analyse morphologischer Beziehungen zwischen serotonergen bzw. dopaminergen Afferenzen und NPY-ir Neuronen

25.1 Verteilung und Morphologie der NPY-ir Neurone in der Amygdala

Das Verteilungsmuster der NPY-ir Neurone im Gehirn von Nagetieren wurde bereits ausführlich in der Literatur beschrieben [37, 61] und stimmte mit den in dieser Arbeit erzielten immunhistochemischen Resultaten überein. Die lichtmikroskopische Auszählung der NPY-ir Somata in verschiedenen Nuclei der Amygdala anhand immunhistochemischer Doppelmarkierungen für NPY & 5-Htt ($n = 6$) und NPY & TH ($n = 6$) ergab, dass sich der größte Anteil der NPY-ir Neurone im La und BL befand (51,8 % bzw. 32,2 %). Der Prozentsatz sowie auch die Anzahl der NPY-ir Neurone im BM und Me war geringer (5,3 % bzw. 10,0 % Tab. 9). Im Ce war das NPY-Signal deutlich schwächer (Abb. 21).

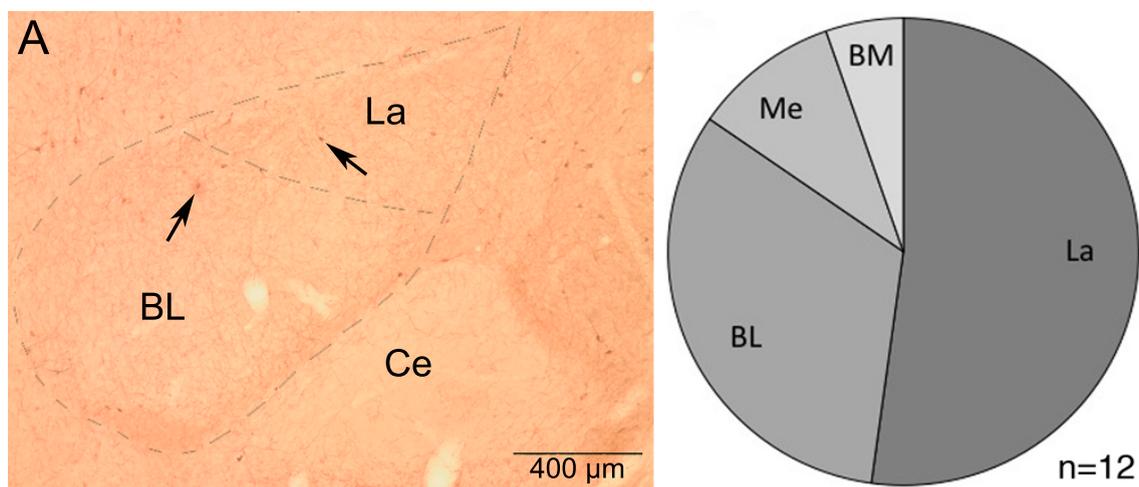


Abbildung 21: Verteilung der NPY-ir Neurone in verschiedenen Nuclei der Amygdala. Die meisten NPY-ir Neurone wurden im La und BL gezählt (B). Auf zwei NPY-ir Zellkörper wird beispielhaft durch Pfeile hingewiesen (A). Bei den Daten des Diagramms in (B) handelt es sich um die Mittelwerte aus Tab. 9.

Im La und BL wurden die NPY-ir Somata auf Grund deren Morphologie in fusiforme (Abb. 22 A) und runde (Abb. 22 B) eingeteilt. In beiden Nuclei wurden deutlich mehr fusiforme NPY-ir Somata als runde nachgewiesen: im La hatten durchschnittlich 74,2 % der NPY-ir Somata eine fusiforme und 25,8 % eine runde Gestalt, im BL waren es 75,6 % bzw. 24,4 % (Abb. 22 C, Tab. 10). Der prozentuale Anteil fusiformer bzw. runder NPY-ir Somata war in beiden Subnuclei gleich ($p = 0,444$).

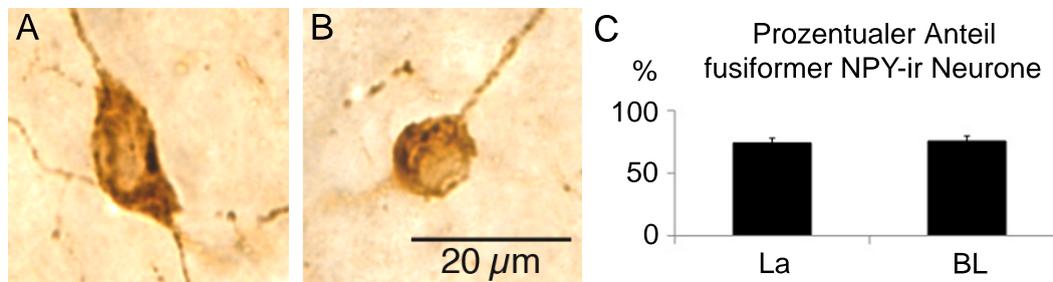


Abbildung 22: Morphologie der NPY-ir Neurone im La und BL. Im La und BL wurden durch immunhistochemische Färbungen sowohl fusiforme (A) als auch runde (B) NPY-ir Somata nachgewiesen. Der Messbalken in (B) gilt auch für (A). Die Daten der Grafik (C) stammen aus Tab. 10 (Mittelwerte). SD: Standardabweichung.

25.2 Wahl der Antikörper zum Nachweis serotonerger Fasern

Beim immunhistochemischen Nachweis serotonerger Fasern mit 5-Htt-Antikörpern wurden sehr gute Resultate erzielt (Abb. 23 A); das Signal fiel unter Verwendung von 5-HT-Antikörpern meist schwächer aus (nicht gezeigt). Mit 5-HT-Antikörpern wurden im BL nicht nur Typ D Axone (Abb. 23 B), wie auch beim Nachweis mit 5-Htt-Antikörpern, sondern auch Typ M Axone (Abb. 23 C), die keine Serotonintransporter besitzen, nachgewiesen. Typ M Axone ließen sich auf Grund deren perlenschnurartiger Morphologie sehr gut von den feineren Typ D Axonen unterscheiden, bei welchen die Varikositäten fusiform und unregelmäßig angeordnet waren (s. auch [195]). In 29 Präparaten von drei Versuchstieren wurden im BL 12 solcher Typ M Axone gezählt, welche sich nicht in unmittelbarer Umgebung von NPY-ir Somata befanden. Im La wurden, wie bereits in einer Publikation von Vertes und Kollegen erwähnt [204], keine Typ M Axone nachgewiesen. Da folglich keine Beziehungen zwischen Typ M Axonen und NPY-ir Somata zu erwarten waren, wurden serotonerge Afferenzen, und damit ausschließlich Typ D Axone, mit 5-Htt-Antikörpern detektiert. Die serotonerge Faserdichte war im La und BL gleich und im lateralen Ce sehr gering (Abb. 23 A), wie bereits z. B. von Muller und Kollegen [131] gezeigt wurde.

25.3 Perisomatische 5-Htt-ir Appositionen an NPY-ir Neurone im La und BL

Im La wurden durchschnittlich an 98,4% der NPY-ir Neurone perisomatische 5-Htt-ir Appositionen nachgewiesen und im BL an 95,3% (Abb. 24, Tab. 11, Abb. 27). Der Randomisierungstest für zwei gepaarte Stichproben ergab, dass der Prozentsatz der NPY-ir Somata, welche serotonergen Appositionen besaßen, im La und BL gleich war ($p = 0,438$). Im La besaß jedes fusiforme und runde Soma im Durchschnitt 2,1 5-Htt-ir Appositionen; im BL waren es 2,3 bzw. 2,4 (Tab. 13, Abb. 28). Die t-Tests für zwei gepaarte Stichproben

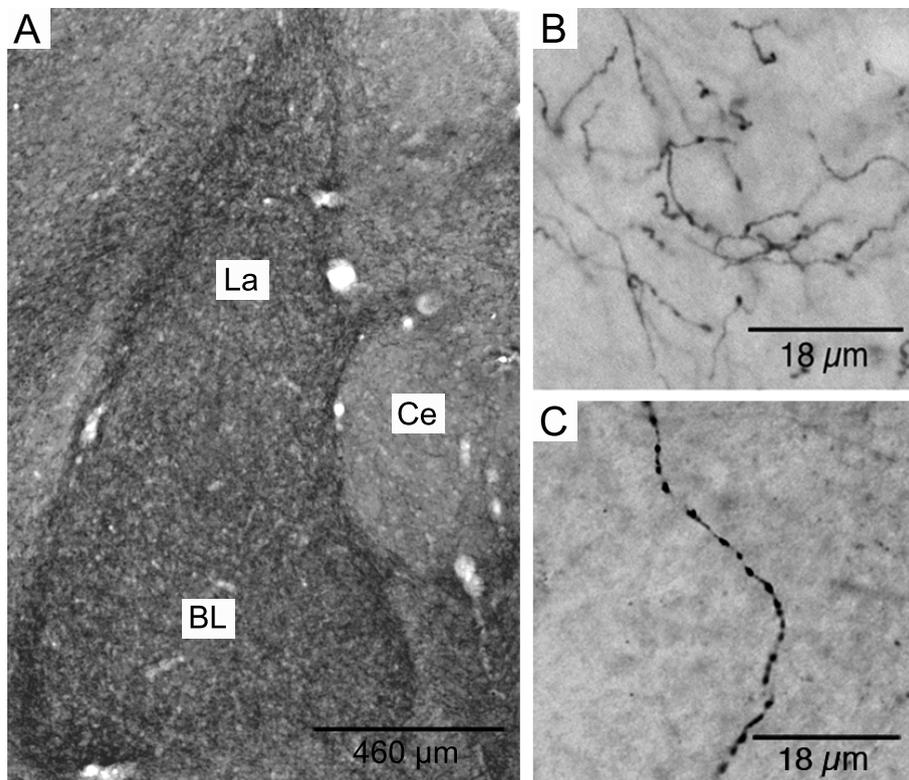


Abbildung 23: Serotonerge Typ D und Typ M Axone. (A) Immunhistochemische Markierung von Rattengewebe mit 5-Htt-Antikörpern, (B) immunhistochemische Markierung der Typ D Axone im Detail und (C) Typ M Axone im BL mit 5-HT-Antikörpern.

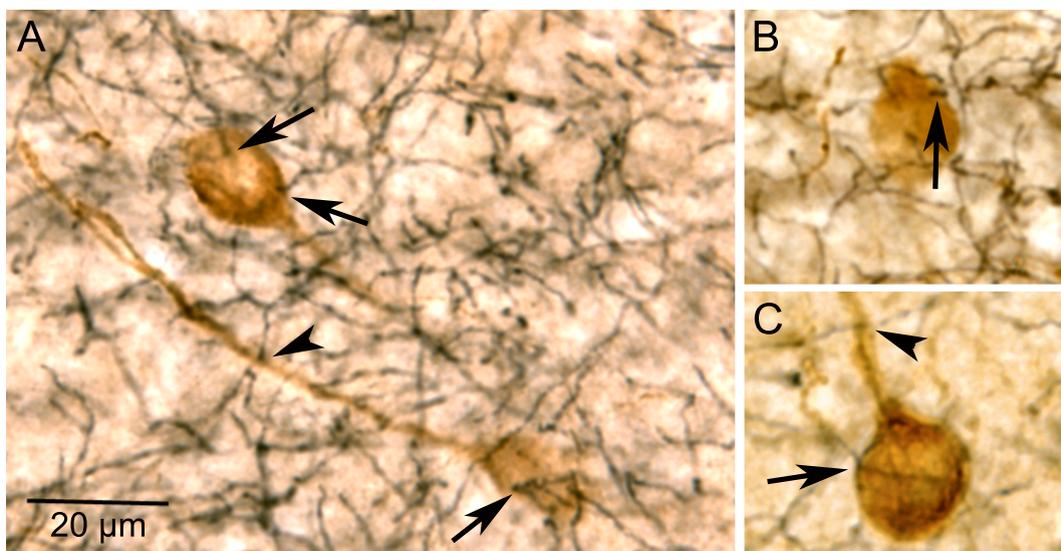


Abbildung 24: 5-Htt-ir Appositionen an NPY-ir Neurone im La und BL. Die Pfeile in (A) und (B) deuten beispielhaft variköse, perisomatische 5-Htt-ir Appositionen an, der Pfeil in (C) zeigt auf eine glatte 5-Htt-ir Apposition, die quer über das NPY-ir Soma verläuft. Die Pfeilspitzen in (A) und (C) zeigen auf 5-Htt-ir Appositionen an NPY-ir Fortsätzen, der Pfeil in (C) zeigt zusätzlich einen perizellulären Korb an. Der Messbalken in (A) gilt auch für (B) und (C).

	R 1	R 2	R 3	R 4	R 5	R 6	∅ ± SD
La	14 100,0 %	32 100,0 %	50 96,2 %	16 94,1 %	30 100,0 %	32 100,0 %	29,0 ± 13,1 98,4 % ± 2,6
BL	11 100,0 %	18 94,7 %	33 100,0 %	11 100,0 %	15 93,8 %	10 83,3 %	16,3 ± 8,7 95,3 % ± 6,5

Tabelle 11: Anzahl der NPY-ir Neurone mit perisomatischen 5-Htt-ir Appositionen im La und BL. Die entsprechenden Gesamtzahlen der NPY-ir Neurone sind in Tab. 9 aufgelistet. ∅ Mittelwert; SD Standardabweichung

ergaben, dass die Anzahl der 5-Htt-ir Appositionen pro fusiformem und rundem Soma sowohl im La ($p = 0,650$) als auch im BL ($p = 0,304$) gleich ist. Beim statistischen Vergleich beider Nuclei ergaben sich bzgl. der Appositionen pro fusiformem ($p = 0,358$) sowie rundem Soma ($p = 0,311$) ebenfalls keine Unterschiede (Abb. 28).

Die 5-Htt-ir Typ D Fasern wiesen in unmittelbarer Umgebung der NPY-ir Somata zwei unterschiedliche Morphologien auf: im La waren durchschnittlich 74,8 % dünn mit mehr oder weniger deutlich ausgeprägten fusiformen Varikositäten (Abb. 24 A, B, Pfeile) und 25,2 % waren völlig glatt (Abb. 24 C, Pfeil). Im BL waren es 75,2 bzw. 24,8 % (Tab. 12). Die t-Tests für zwei gepaarte Stichproben ergaben, dass sowohl im La als auch im BL deutlich mehr variköse Faserabschnitte Appositionen mit NPY-ir Somata als glatte [$p(\text{La}) = 0,0001$; $p(\text{BL}) = 0,001$] ausbilden. Das prozentuale Verhältnis von varikösen zu glatten Fasern war im La und BL gleich.

Es wurde häufig beobachtet, dass 5-Htt-ir Afferenzen perizelluläre Körbe, d.h. Fasern, die sich im Bereich der Somata teilen und dieses umschließen, um NPY-ir Somata bilden (Abb. 24 C, Pfeil, s. auch [195]). Es wurden auch Appositionen zwischen 5-Htt-ir Fasern und proximalen NPY-ir Fortsätzen beobachtet (Abb. 24 A, C, Pfeilspitzen). Auf eine quantitative Auswertung wurde verzichtet, da die proximalen Dendriten zu weniger NPY-Neurone immunreaktiv waren.

	R 1	R 2	R 3	R 4	R 5	R 6	∅ ± SD
La							
Fasern gesamt	33	54	96	34	72	52	56,8 ± 24,0
Typ D varikös	24 72,7 %	42 77,8 %	72 75,0 %	24 70,6 %	49 68,1 %	44 84,6 %	42,5 ± 17,9 74,8 % ± 5,9
Typ D glatt	8 27,3 %	12 22,2 %	24 25,0 %	10 29,4 %	23 31,9 %	8 15,4 %	14,2 ± 7,4 25,2 % ± 5,9
BL							
Fasern gesamt	32	36	78	32	30	21	38,2 ± 20,1
Typ D varikös	25 78,1 %	31 86,1 %	66 84,6 %	22 68,8 %	20 66,7 %	14 66,7 %	29,7 ± 18,7 75,2 % ± 9,0
Typ D glatt	7 21,9 %	5 13,9 %	12 15,4 %	10 31,2 %	10 33,3 %	7 33,3 %	7,5 ± 4,0 24,8 % ± 9,0

Tabelle 12: Morphologie 5-Htt-ir Fasern im La und BL. ∅ Mittelwert; SD Standardabweichung

	R 1	R 2	R 3	R 4	R 5	R 6	$\bar{x} \pm SD$
La							
App. gesamt	33	54	96	34	72	52	56,8 ± 24,0
App.an fusiforme Somata	22 66,7 %	35 64,8 %	75 78,1 %	27 79,4 %	58 80,6 %	40 76,9 %	42,8 ± 20,1 74,4 % ± 6,9
App.an runde Somata	11 33,3 %	19 35,2 %	21 21,9 %	4 20,6 %	14 19,4 %	12 23,1 %	13,5 ± 6,1 25,6 % ± 6,9
App. pro fusiformes Soma	2,2	1,6	1,8	2,1	2,5	2,1	2,1 ± 0,3
App. pro rundes Soma	2,8	1,9	1,9	1,8	2,3	2,0	2,1 ± 0,4
BL							
App. gesamt	32	36	78	32	30	21	38,2 ± 20,1
App.an fusiforme Somata	24 75,0 %	26 72,2 %	58 74,4 %	22 68,8 %	23 76,7 %	14 66,7 %	29,5 ± 15,3 72,3 % ± 3,9
App.an runde Somata	8 25,0 %	10 27,8 %	20 25,6 %	10 31,2 %	7 23,3 %	7 33,3 %	10,3 ± 4,9 27,7 % ± 3,9
App. pro fusiformes Soma	3,0	1,9	2,3	2,8	1,9	1,8	2,3 ± 0,5
App. pro rundes Soma	2,7	2,0	2,5	3,3	1,8	2,3	2,4 ± 0,5

Tabelle 13: 5-Htt-ir Appositionen pro NPY-ir Soma im La und BL. Die Werte für App. pro fusiformem bzw. rundem Soma ergeben sich aus den Quotienten der Anzahl der App. an fusiforme bzw. runde Somata dividiert durch die entsprechende Anzahl der fusiformen bzw. runden Somata aus Tab. 10. \bar{x} Mittelwert; SD Standardabweichung.

25.4 Nachweis von TH-ir Fasern im La und BL

Zum Nachweis dopaminergere Fasern im La und BL wurde, wie schon in bereits publizierte Arbeiten [8, 9, 149], ein monoklonaler Antikörper gegen TH verwendet. Die immunhistochemischen Markierungen lieferten sehr gute Resultate. Die Dichte der TH-ir Fasern war im Ce sehr hoch und im BL höher als im La (Abb. 25).

25.5 Perisomatische TH-ir Appositionen an NPY-ir Neurone im La und BL

Durchschnittlich wurden im La an 47,3 % und im BL an 62,3 % der NPY-ir Somata TH-ir Appositionen nachgewiesen (Abb. 26, Tab. 14). Hierbei wurde jede TH-ir Faser als eine Apposition gewertet. Der t-Test für zwei gepaarte Stichproben ergab, dass im BL mehr NPY-ir Somata TH-ir Appositionen besaßen als im La ($p = 0,0004$; Abb. 27).

Im La besaß jedes fusiforme NPY-ir Soma im Durchschnitt 0,6 und jedes runde 0,7 TH-ir Appositionen; im BL waren es 1,1 bzw. 0,9 Appositionen (Tab. 15). Die t-Tests für zwei gepaarte Stichproben ergaben, dass die Anzahl der TH-ir Appositionen pro fusiformem bzw. rundem Soma sowohl im La ($p = 0,695$) als auch im BL ($p = 0,392$) gleich war. Beim statistischen Vergleich beider Nuclei gab es bzgl. der Appositionen pro rundem Soma ($p = 0,130$) ebenfalls keine Unterschiede. Im BL besaßen jedoch die fusiformen Somata mehr TH-ir Appositionen pro NPY-ir Soma als im La ($p = 0,014$; Abb. 28). TH-ir Af-

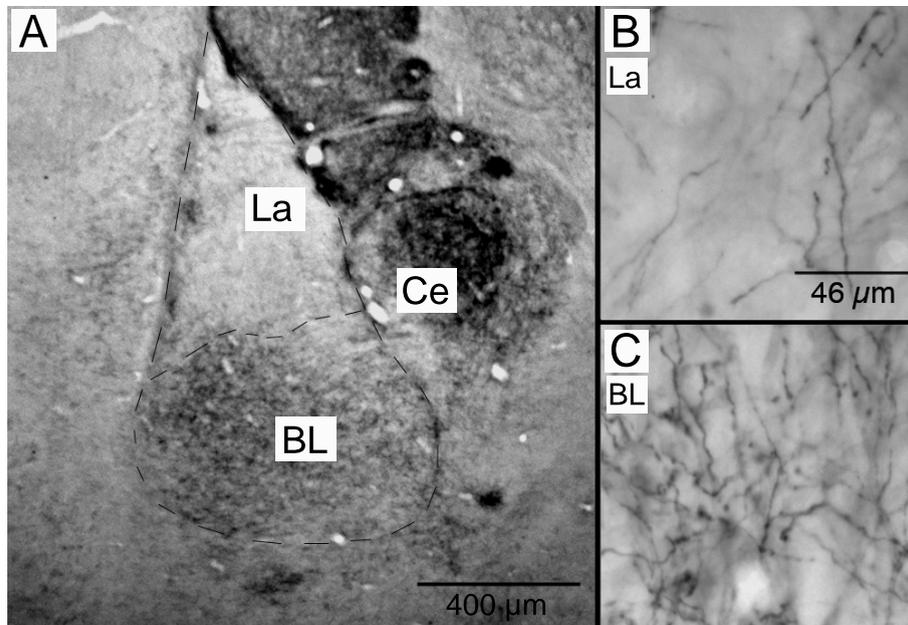


Abbildung 25: TH-ir Fasern in der Amygdala. (A) zeigt eine Übersichtsaufnahme des La und BL. Die Faserdichte ist im BL höher als im La. (B) zeigt TH-ir Fasern im La, (C) zeigt TH-ir Fasern im BL im Detail. Der Messbalken in (B) gilt auch für (C).

ferenzen kontaktierten auch proximale Fortsätze NPY-ir Neurone (Abb. 26 B). Auf eine quantitative Auswertung wurde verzichtet, da die proximalen Dendriten zu weniger NPY Neurone immunreaktiv waren.

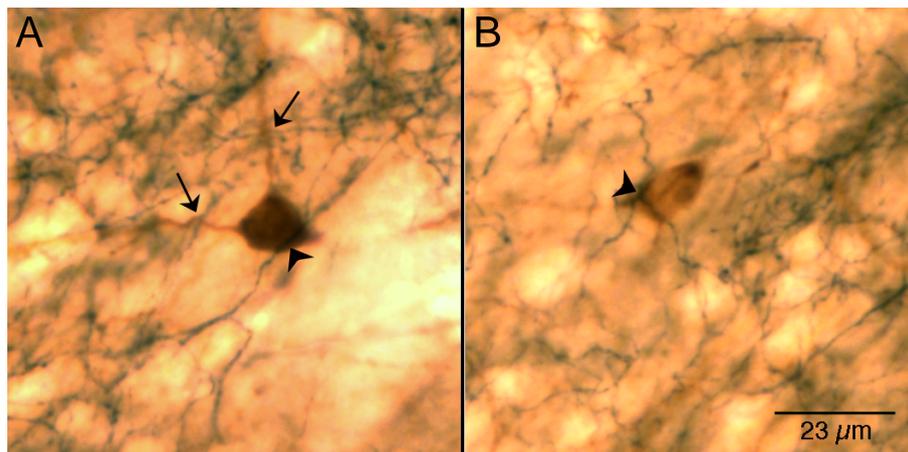


Abbildung 26: TH-ir Appositionen an NPY-ir Neuronen des BL. Die Pfeilspitzen weisen auf TH-ir Appositionen an NPY-ir Somata hin, die Pfeile in (A) auf TH-ir Appositionen an NPY-ir Fortsätzen. Der Messbalken in (B) gilt auch für (A).

	R 7	R 8	R 9	R 10	R 11	R 12	$\bar{x} \pm SD$
La	9 40,9 %	10 41,7 %	13 46,4 %	32 45,1 %	18 54,5 %	28 54,9 %	18,3 ± 9,6 47,3 % ± 6,1
BL	7 63,6 %	10 55,6 %	9 64,3 %	25 56,8 %	16 66,7 %	26 66,7 %	15,5 ± 8,3 62,3 % ± 4,9

Tabelle 14: Anzahl der NPY-ir Neurone mit TH-ir Appositionen im La und BL. Die Gesamtzahlen der NPY-ir Neurone sind in Tab. 9 aufgelistet. \bar{x} Mittelwert; SD Standardabweichung.

	R 7	R 8	R 9	R 10	R 11	R 12	$\bar{x} \pm SD$
La							
App. gesamt	15	10	16	48	18	37	24,0 ± 15,0
App. an fusiforme Somata	9 60,0 %	10 100,0 %	11 68,8 %	32 66,7 %	13 72,2 %	26 70,3 %	16,8 ± 9,7 73,0 % ± 13,9
App. an runde Somata	6 40,0 %	0 0,0 %	5 31,2 %	16 33,3 %	5 27,8 %	11 29,7 %	7,2 ± 5,6 27,0 % ± 13,9
App. pro fusiformes Soma	0,6	0,6	0,6	0,6	0,5	0,7	0,6 ± 0,1
App. pro rundes Soma	1,2	0,0	0,6	0,8	0,7	0,7	0,7 ± 0,4
BL							
App. gesamt	13	14	11	37	26	46	24,5 ± 14,4
App. an fusiforme Somata	8 61,5 %	12 85,7 %	8 72,7 %	27 73,0 %	22 84,6 %	39 84,8 %	19,3 ± 12,4 77,1 % ± 9,7
App. an runde Somata	2 38,5 %	2 14,3 %	3 27,3 %	10 27,0 %	4 15,4 %	7 15,2 %	4,7 ± 3,2 23,0 % ± 9,7
App. pro fusiformes Soma	1,0	1,7	0,8	0,8	1,3	1,2	1,1 ± 0,3
App. pro rundes Soma	1,0	0,4	1,0	1,3	0,6	1,0	0,9 ± 0,3

Tabelle 15: TH-ir Appositionen pro NPY-ir Soma im La und BL. Die Werte für App. pro fusiformem bzw. rundem Soma ergeben sich aus den Quotienten der Anzahl der App. an fusiforme bzw. runde Somata dividiert durch die entsprechende Anzahl der fusiformen bzw. runden Somata aus Tab. 10. \bar{x} Mittelwert; SD Standardabweichung.

25.6 5-Htt-ir vs. TH-ir Appositionen an NPY-ir Somata im La und BL

Die statistischen Testverfahren für zwei ungepaarte Stichproben ergaben, dass sowohl im La ($p = 0,013$) als auch im BL ($p < 0,0001$) ein wesentlich höherer Prozentsatz an NPY-ir Somata von 5-Htt-ir als von TH-ir Appositionen kontaktiert wurden (Abb. 27). Weitere Tests ergaben, dass NPY-ir Somata sowohl im La als auch im BL signifikant mehr 5-Htt-ir Appositionen als TH-ir Appositionen pro fusiformem [$p(\text{La}) < 0,0001$; $p(\text{BL}) = 0,016$] bzw. pro rundem Soma [$p(\text{La}) < 0,0001$; $p(\text{BL}) < 0,0001$] besaßen (Abb. 28).

Die Analyse der lichtmikroskopischen Präparate zeigt erstmalig eine mögliche, dichte perisomatische Innervation der NPY-ir Neurone durch serotonerge Afferenzen und eine verhältnismäßig geringe perisomatische Innervation der NPY-ir Neurone durch dopaminerge Afferenzen im La und BL von Ratten auf.

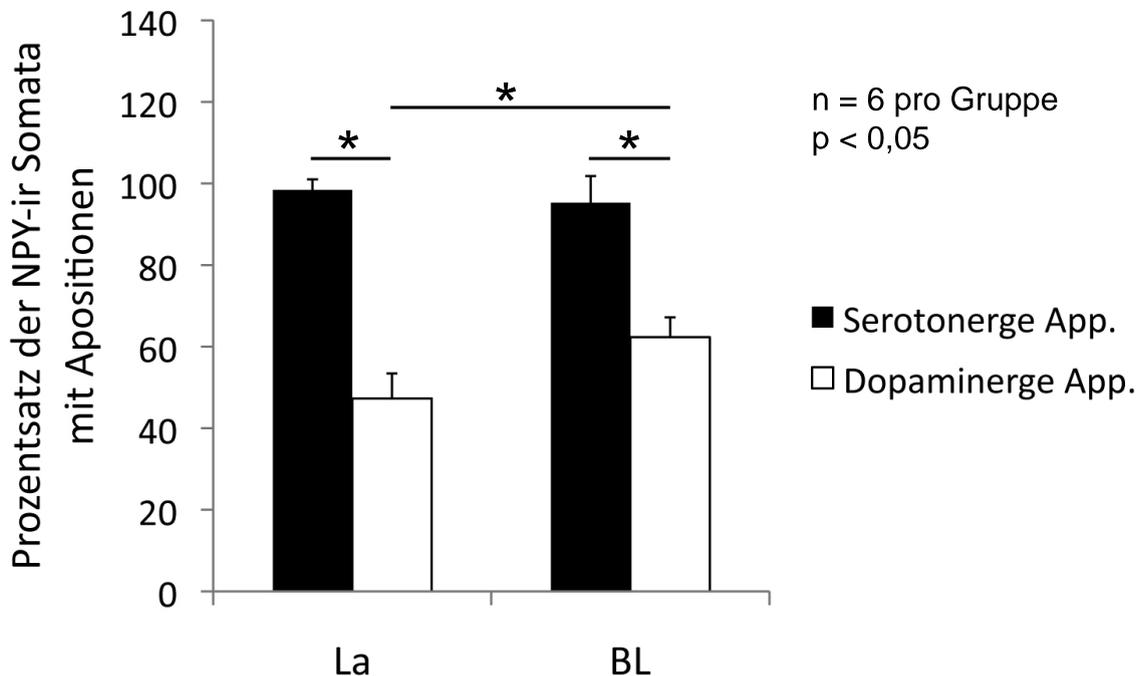


Abbildung 27: NPY-ir Somata mit 5-Htt-ir bzw. TH-ir Appositionen. Die Werte stammen aus Tab. 11 und 14 und sind als Mittelwerte und deren Standardabweichungen dargestellt. NPY-ir Somata besaßen sowohl im La ($p=0,013$) als auch im BL ($p<0,0001$) mehr 5-Htt-ir als TH-ir Appositionen. Weiterhin besaßen im BL mehr NPY-ir Somata TH-ir Appositionen als im La ($p=0,0004$).

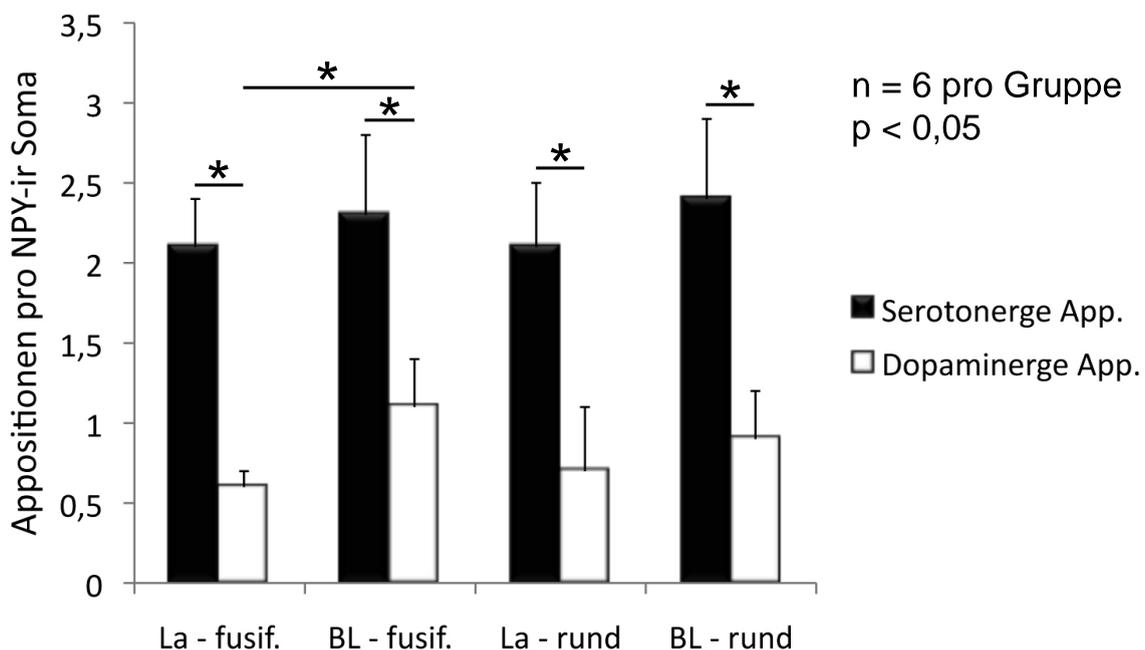


Abbildung 28: Anzahl der 5-Htt-ir bzw. TH-ir Appositionen pro NPY-ir Soma. Die Werte stammen aus Tab. 13 und 15 und sind als Mittelwerte und deren Standardabweichungen dargestellt. NPY-ir Somata besaßen sowohl im La als auch im BL wesentlich mehr 5-Htt-ir als TH-ir Appositionen pro Soma. Dies galt sowohl für die fusiformen als auch für die runden Somata. Im BL wurden mehr TH-ir Appositionen pro fusiformem Soma nachgewiesen als im La; bei den runden Somata unterschieden sich die Werte nicht. p (La - fusif.) = 0,0001; p (BL - fusif.) = 0,016; p (La - rund) < 0,0001; p (BL - rund) < 0,0001; p (La-BL) = 0,014.

26 Elektronenmikroskopische Analyse morphologischer Beziehungen zwischen serotonergen bzw. dopaminergen Afferenzen und NPY-ir Neuronen

26.1 NPY-Immunreaktivität

Auf elektronenmikroskopischer Ebene wurde NPY-IR spezifisch sowohl über mit Goldpartikeln konjugierten Sekundärantikörpern (Abb. 29) als auch über DAB (Abb. 30) nachgewiesen. Im La und BL wurden viele NPY-ir Somata mit Nucleus, Nucleolus sowie proximalen Fortsätzen identifiziert (z. B. Abb. 30 A). Weiterhin wurden synaptische Kontakte zwischen unmarkierten Terminalen und NPY-ir Dendriten beobachtet. In der Präsynapse waren deutlich Transmittervesikel (Abb. 30 B, schwarzer Pfeil) sowie ein Mitochondrium (M) zu erkennen und der synaptische Spalt zeichnete sich deutlich ab (Abb. 30 B weißer Pfeil). Auf Grund der starken DAB-Reaktion war der Synapsentyp meist nicht eindeutig zuzuordnen. Es ließen sich häufig NPY-ir Terminale nachweisen, welche unmarkierte Neurone an proximalen Fortsätzen (Abb. 30 C), unmarkierten Dendriten (Abb. 30 D) oder unmarkierten Somata (nicht abgebildet) kontaktierten. Das NPY-ir Terminal auf Abb. 30 D bildet einen symmetrischen synaptischen Kontakt mit einem unmarkierten Dendriten aus (Pfeile). Asymmetrische synaptische Kontakte zwischen NPY-ir Terminalen und unmarkierten Strukturen wurden nicht beobachtet.

26.2 NPY- und 5-HT-Immunreaktivität

Da die ultrastrukturelle Darstellung serotonerger Fasern mit Antikörpern gegen 5-HT erfolgreich blieb, wurden hierfür Antikörper gegen 5-HT verwendet. Es konnten Membranappositionen zwischen 5-HT-ir Terminalen (Gold), welche anhand synaptischer Vesikel verifiziert wurden, und fusiformen sowie runden NPY-ir Somata (DAB) nachgewiesen werden (Abb. 31). Auf Abb. 31 B ist ein 5-HT-ir Terminal (schwarzer Pfeil kennzeichnet Goldkörnchen) in der Nähe eines NPY-ir Somas zu erkennen. Diese Strukturen sind durch den Fortsatz eines Astrozyten (*) separiert. Auf dem Folgeschnitt (Abb. 31 C) wurde innerhalb des 5-HT-ir Terminals ein zweites Goldkörnchen (weißer Pfeil) sowie eine Membranapposition (weiße Pfeilspitzen) zwischen dem 5-HT-ir Terminal und dem NPY-ir Soma nachgewiesen. Weiterhin wurde ein 5-HT-ir Terminal mit vier Goldkörnchen identifiziert (Abb. 31 E, weiße Pfeile), welches einen symmetrischen synaptischen Kontakt (Abb. 31 E, weiße Pfeilspitze) mit einem somatischen Dornen eines NPY-ir Somas ausbildet. Dieser somatische Dorn wurde zusätzlich von einem unmarkierten Terminal (uT) kontaktiert.

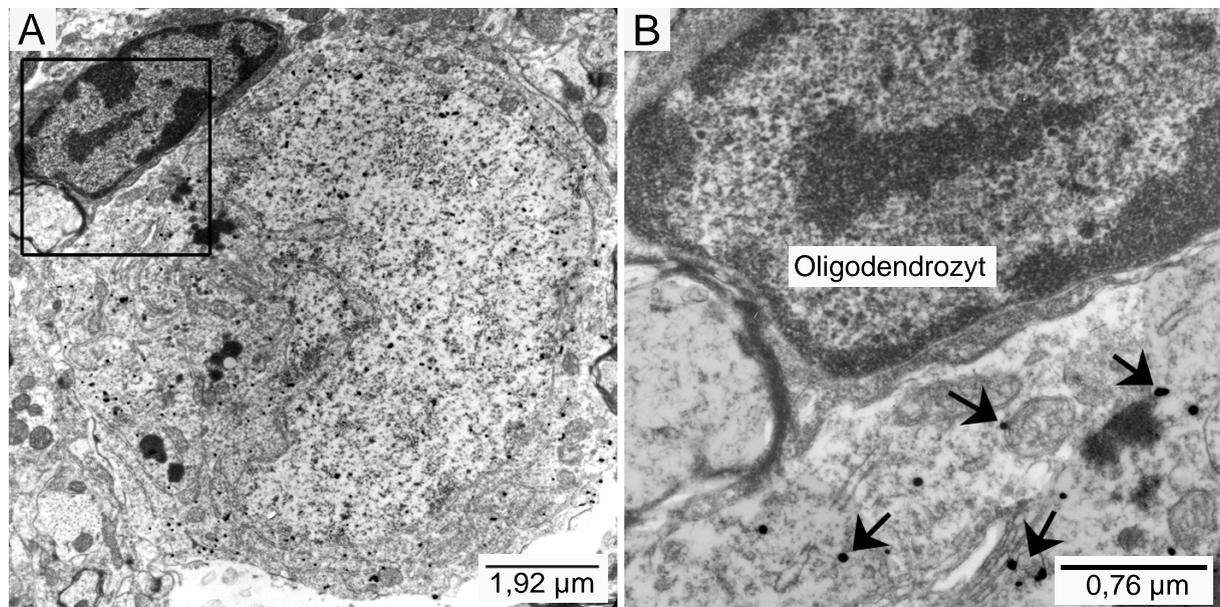


Abbildung 29: NPY-Immunreaktivität auf ultrastruktureller Ebene im La (Immunogold-Markierung). Zur Detektion der NPY-Antikörper wurden mit Goldpartikeln konjugierte Sekundärantikörper verwendet. (A) zeigt eine Übersichtsaufnahme eines NPY-ir Somas, an welches ein Oligodendrozyt grenzt, und (B) eine Detailaufnahme. Die Pfeile deuten auf einige Goldpartikel.

Die Analyse der elektronenmikroskopischen Präparate zeigt erstmalig die perisomatische Innervation runder und fusiformer NPY-ir Neurone durch serotonerge Afferenzen im La und BL von Ratten auf.

26.3 NPY- und TH-Immunreaktivität

Membranappositionen zwischen TH-ir Axonen und NPY-ir Somata wurden bereits im BL beschrieben [9]. Auf den in dieser Arbeit untersuchten Präparaten wurden solche Appositionen nicht nachgewiesen, allerdings wurde eine Vielzahl symmetrischer synaptischer Kontakte zwischen TH-ir Terminalen und unmarkierten Somata (Abb. 32 A1, 2, Pfeilspitzen) bzw. unmarkierten Dendriten (Abb. 32 A3, Pfeilspitzen) gefunden. Weiterhin wurden NPY- und TH-ir Strukturen nachgewiesen, welche eine Membranapposition mit einem unmarkierten Soma als gemeinsame Zielstruktur ausbildeten (Abb. 32 A4). Ob es sich hierbei um ein NPY-ir bzw. ein TH-ir Terminal handelt, konnte nicht bestimmt werden, da keine deutlichen Vesikel sichtbar waren. Weiterhin wurden ein TH-ir Terminal und eine NPY-ir Struktur gefunden, welche durch einen astrozytären Fortsatz räumlich separiert wurden. Schließlich konnte eine Membranapposition zwischen einem TH- und einem NPY-ir Terminal nachgewiesen werden (Abb. 32 B).

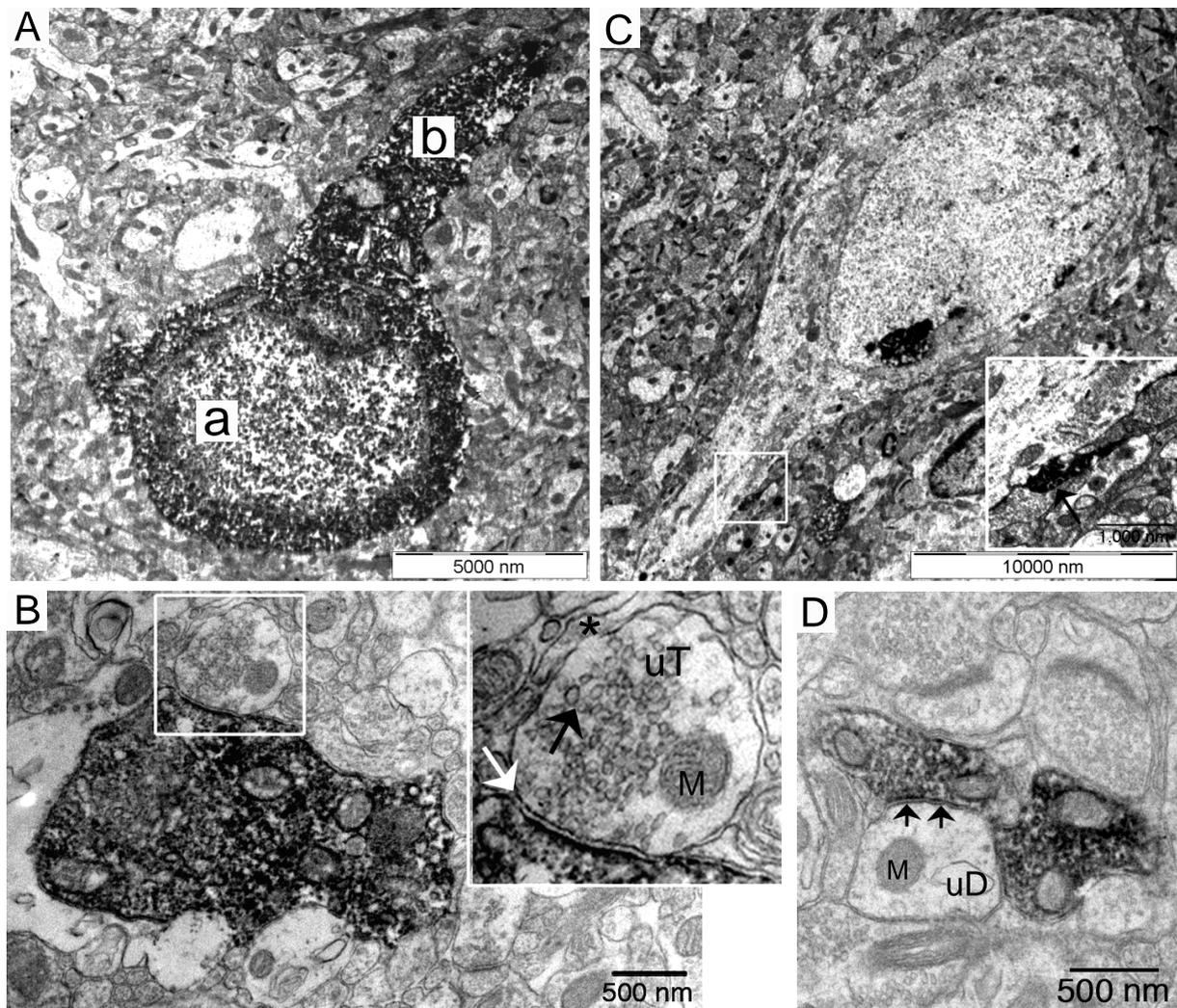


Abbildung 30: NPY-Immunreaktivität auf ultrastruktureller Ebene im La und BL (DAB). (A) NPY-ir Soma mit Nucleus (a) und einem dendritischen Fortsatz (b). (B) Unmarkiertes Terminal (uT) bildet synaptischen Kontakt mit einem NPY-ir Dendriten. Der schwarze Pfeil in der Detailaufnahme deutet auf Vesikel, der weiße Pfeil auf den synaptischen Spalt, * Astrozytenfortsatz. (C) NPY-ir Terminal kontaktiert ein unmarkiertes Soma. Der Pfeil in der Detailaufnahme deutet auf Vesikel. (D) NPY-ir Terminal bildet symmetrischen synaptischen Kontakt (Pfeile) mit einem unmarkierten Dendriten (uD), M: Mitochondrium.

26.4 Kontrollen

Die Kontrollpräparate, die nicht mit den entsprechenden Primärantikörpern inkubiert wurden, ansonsten aber genauso behandelt wurden, zeigten keine markanten unspezifischen Signale auf. Parallel zu den immunhistochemischen Markierungen für die Elektronenmikroskopie wurden entsprechende Präparate für eine fluoreszenzmikroskopische Analyse angefertigt, um die spezifische Bindung der Primärantikörper zu kontrollieren. Wie bei den Präparaten für die Lichtmikroskopie (s. 25) wurden auch hier Appositionen zwischen serotonergen (Abb. 34 A) bzw. dopaminergen Afferenzen (Abb. 34 B) und NPY-ir Somata sowie Fortsätzen beobachtet.

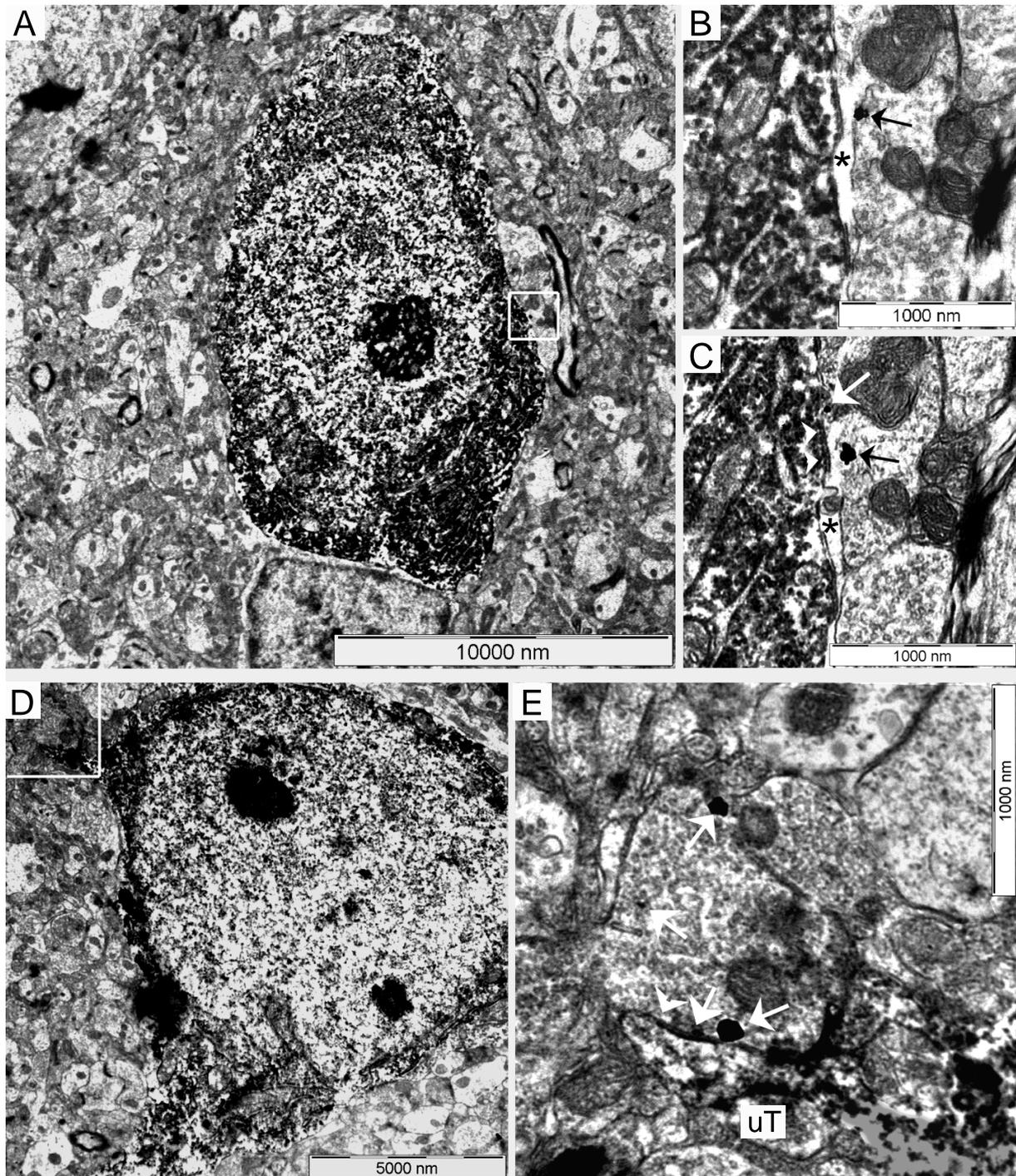


Abbildung 31: Morphologische Beziehungen zwischen NPY- und 5-HT-ir Strukturen im La und BL. (A) und (D) zeigen Übersichtsaufnahmen von einem fusiformen bzw. einem runden NPY-ir Neuron (DAB), welche von 5-HT-ir Terminalen (Gold) kontaktiert werden. Bei (C) und (D) handelt es sich um eine Detailaufnahme von (A) bzw. den Folgeschnitt. Goldkörnchen sind durch Pfeile, die Membranapposition durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. (E) ist eine Detailaufnahme von (D); hier sind Goldkörnchen ebenso durch Pfeile und die Membranapposition am somatischen Dornen durch Pfeilspitzen markiert. (*) Astrozytenfortsatz.

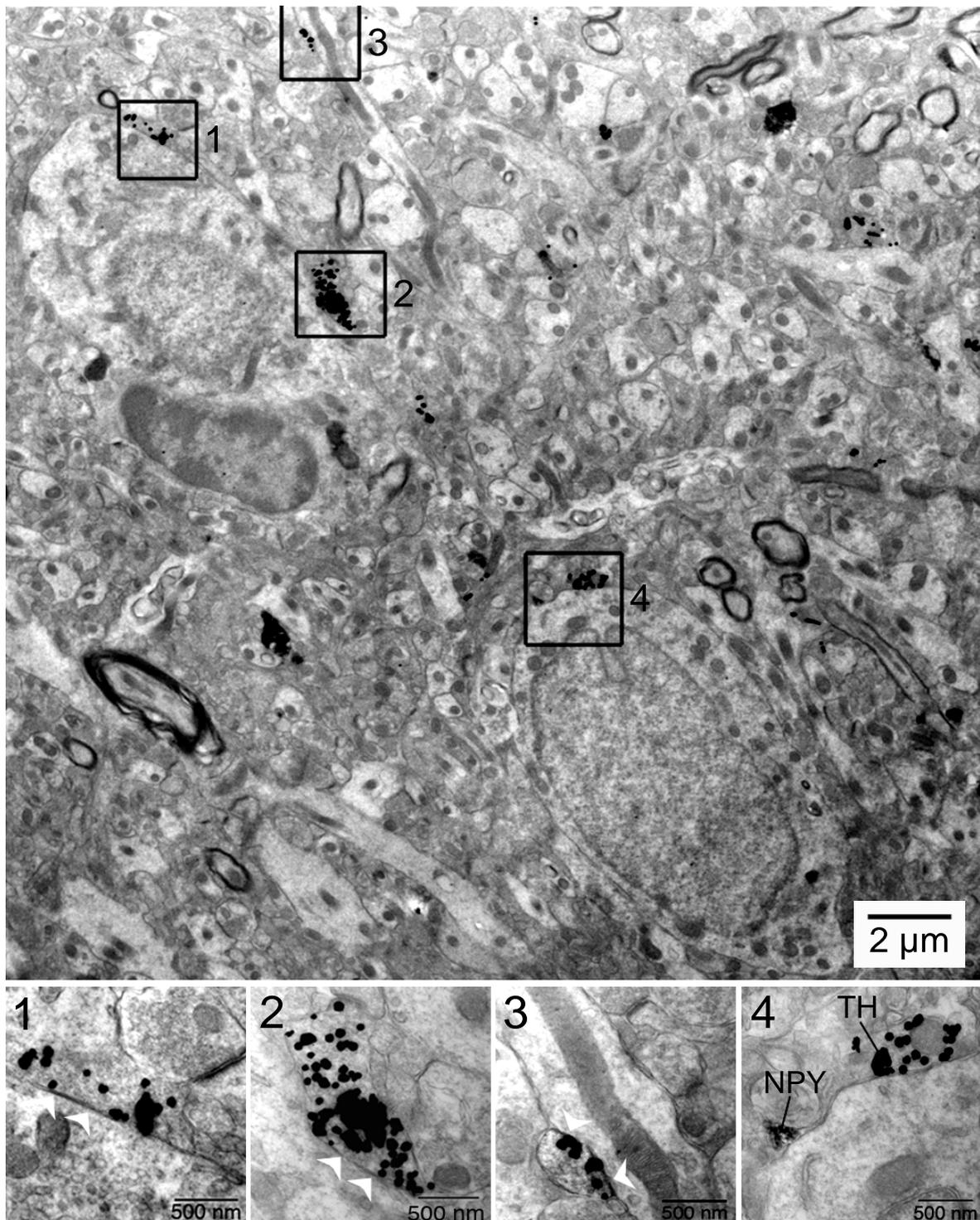


Abbildung 32: NPY- und TH-Immunreaktivität auf ultrastruktureller Ebene im BL. TH-ir Terminale bilden mit unmarkierten Somata (1, 2) und unmarkierten Dendriten (3) symmetrische Kontakte (Pfeilspitzen) aus. NPY- und TH-ir Strukturen bilden Membranappositionen mit einem unmarkierten Soma als gemeinsame Zielstruktur aus (4).

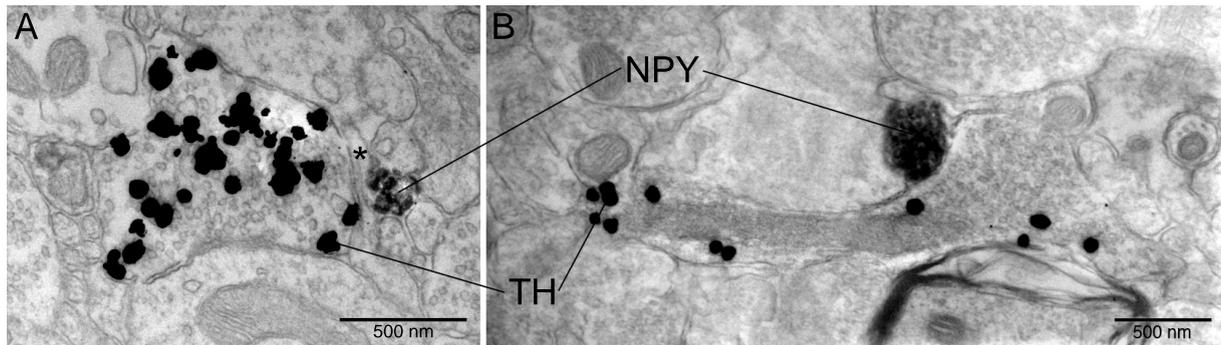


Abbildung 33: Morphologische Beziehungen zwischen NPY- und TH-ir Strukturen im BL. (A) zeigt ein TH-ir Terminal, das durch den Fortsatz eines Astrozyten (*) von einer NPY-ir Struktur separiert vorliegt. (B) zeigt eine Membranapposition zwischen einem TH- und einem NPY-ir Terminal.

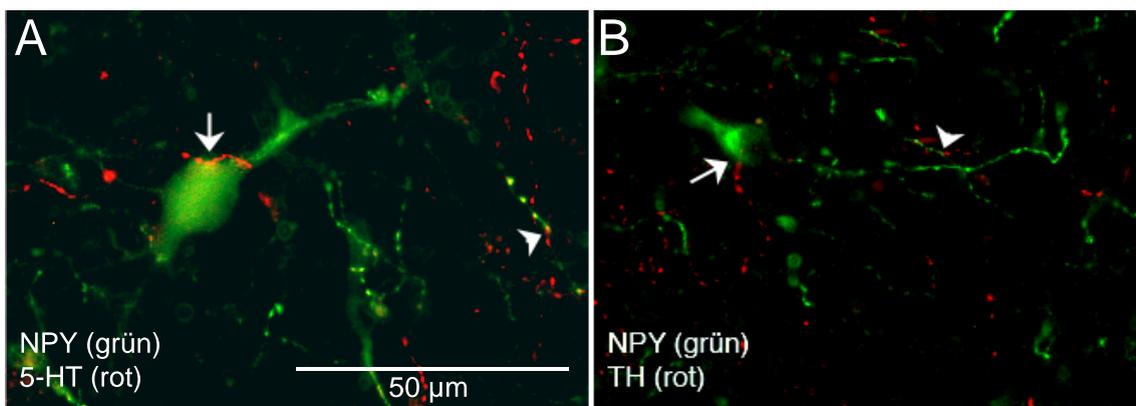


Abbildung 34: 5-HT- und TH-ir Appositionen an NPY-ir Neurone (Immunfluoreszenz). (A) zeigt eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung gegen NPY und 5-HT, (B) gegen NPY und TH. Monoaminerge Appositionen an Somata und Fortsätze sind durch Pfeile bzw. Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Größenbalken in (A) gilt auch für (B).

27 Serotonin- und Dopaminrezeptorexpression von NPY-Neuronen

27.1 Signalintensität und Verteilung der NPY mRNA

NPY mRNA wurde in Einzelmarkierungen sowohl mit CISH als auch mit HS-TSA-FISH nachgewiesen. Hierbei war die Verteilung der antisense-Signale beider Methoden in verschiedenen Hirnarealen [z. B. Hippocampus (Abb. 35 A, C), La und BL (Abb. 35 E, G) und Me (Abb. 35 I, K)] vergleichbar und stimmte mit dem immunhistochemischen Verteilungsmuster, das bereits in der Literatur beschrieben wurde [61, 155], überein. Die Signalintensität war unter Anwendung von CISH etwas prominenter als bei HS-TSA-FISH. Die sense-Kontrollen waren stets frei von unspezifischen Signalen (Abb. 35 B, D, F, H, J, L).

27.2 Signalintensität und Verteilung der 5-HT_{1A} mRNA

5-HT_{1A} mRNA wurde in Einzelmarkierungen sowohl mit CISH als auch mit HS-TSA-FISH nachgewiesen (Abb. 36). Bezüglich der Körnerzellen des GD, in welchen 5-HT_{1A} mRNA sehr hoch exprimiert wird [118], waren CISH- und HS-TSA-FISH-Signale miteinander vergleichbar, wobei hier das CISH-Signal präziser als das HS-TSA-FISH-Signal war (Abb. 36 A, C). Im Hilus des GD waren jedoch Fluoreszenzsignale zu sehen, für welche in CISH-Präparaten kein äquivalentes Signal nachgewiesen wurde (Abb. 36 A, C), was auf die generell höhere Hintergrundfärbung in HS-TSA-FISH-Präparaten zurückzuführen war. In Hirnarealen, in welchen die Expression der 5-HT_{1A} mRNA pro Zelle geringer war, wie z. B. im La und BL, konnte kein eindeutiges und präzises HS-TSA-FISH-Signal nachgewiesen werden. Das Fluoreszenzsignal bestand hier aus ungleichmäßig verteilten Pünktchen, die sich zwar vom Hintergrund des Gewebes abhoben, jedoch keinen Zellen sicher zugeordnet werden konnten (Abb. 36 G). Weiterhin wurden auch in den sense-Kontrollen der HS-TSA-FISH kleine Pünktchen nachgewiesen (Abb. 36 D, H, Pfeile), was ein weiterer Grund war an der Spezifität der HS-TSA-FISH-Signale zu zweifeln. Im Gegensatz hierzu zeigten die sense-Kontrollen der CISH-Präparate keine Hintergrundfärbung auf (Abb. 36 B, F). Das CISH-antisense-Signal war deutlich erkennbar, spezifisch und konnte im BL, sowie auch in anderen Hirnarealen, präzise den entsprechenden Zellen zugeordnet werden (Abb. 36 E). Unter Anwendung der CISH wurde im La und BL eine hohe Dichte 5-HT_{1A} mRNA-reaktiver Zellen beobachtet. Diese Resultate gehen z. B. mit jenen von Aznar und Kollegen [12] konform, die in einem Großteil der Pyramidenzellen und Interneuronen der Amygdala 5-HT_{1A}-IR detektiert haben. Da sich die regionale Verteilung

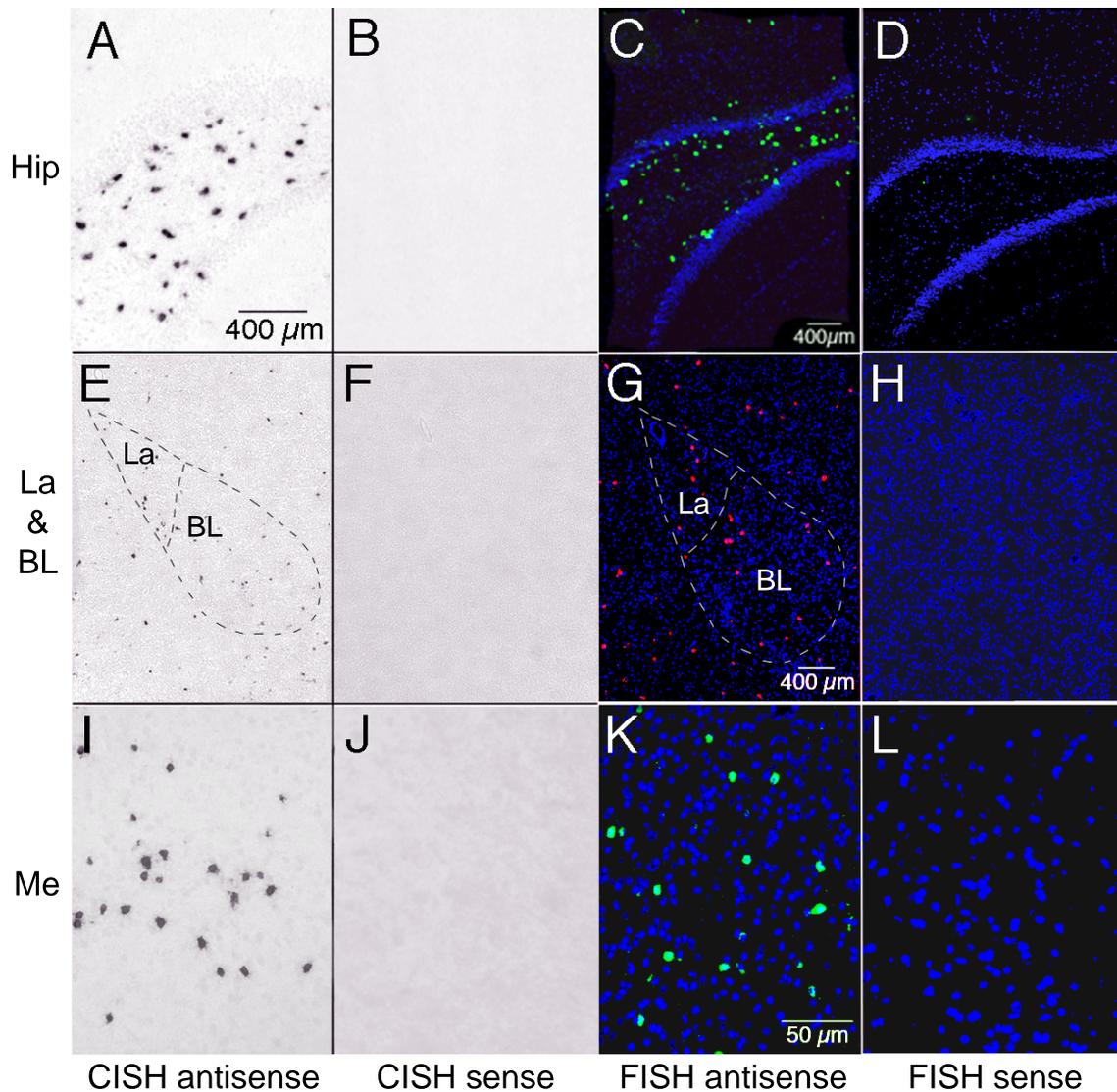


Abbildung 35: Verteilung der NPY mRNA in verschiedenen Hirnarealen. (A, B) NPY CISH antisense bzw. sense im Hippocampus, NPY mRNA-Reaktivität ist grau dargestellt; (C, D) NPY HS-TSA-FISH antisense bzw. sense im Hippocampus, NPY mRNA-Reaktivität ist grün, DAPI ist blau dargestellt; (E, F) NPY CISH antisense bzw. sense im La und BL, NPY mRNA-Reaktivität ist grau dargestellt; (G, H) NPY MS-TSA-FISH antisense bzw. sense im La und BL, NPY mRNA-Reaktivität ist rot, DAPI ist blau dargestellt; (I, J) NPY CISH antisense bzw. sense im Me, NPY mRNA-Reaktivität ist grau dargestellt; (K, L) NPY HS-TSA-FISH antisense bzw. sense NPY mRNA-Reaktivität ist grün, DAPI ist blau dargestellt. Der Größenbalken in (A) gilt auch für (B), der in (C) auch für (D), der in (G) auch für (E, F und H), der in (K) auch für (I, J und L).

der 5-HT_{1A} mRNA mit jener des Proteins in der Amygdala deckt [118], können die hier erzielten Ergebnisse mit denen einer immunhistochemische Studie [12] verglichen werden.

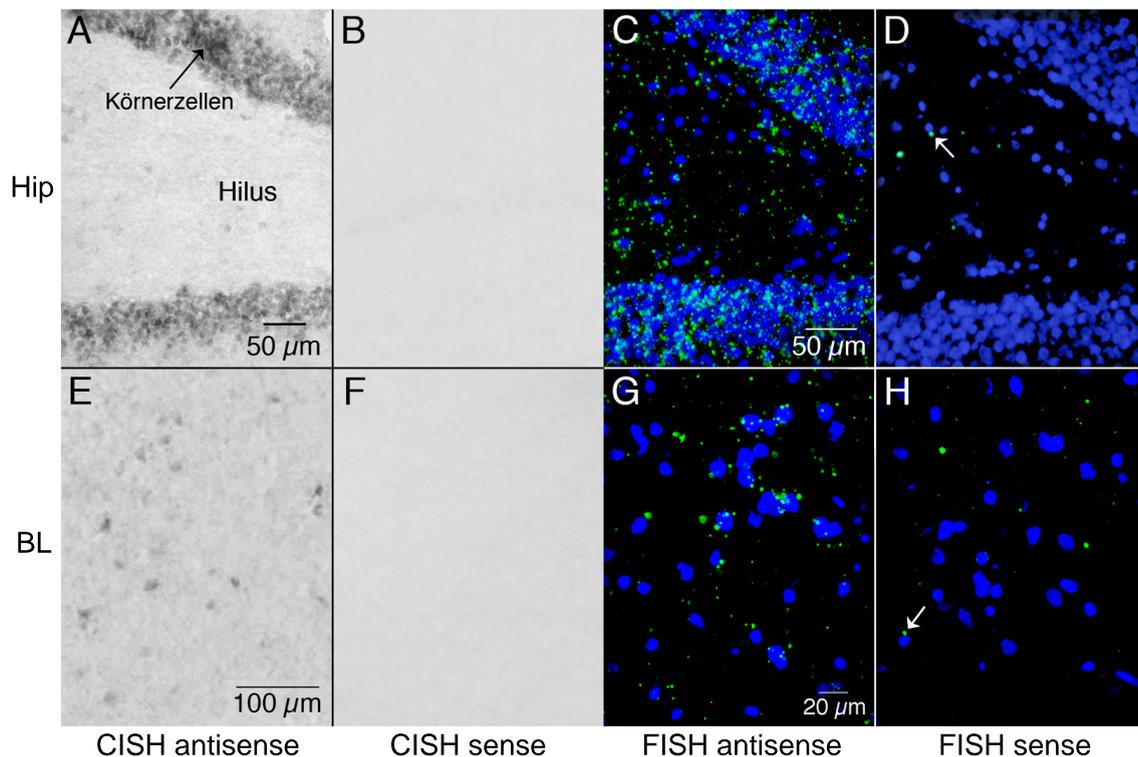


Abbildung 36: Verteilung der 5-HT_{1A} mRNA in verschiedenen Hirnarealen. (A, B) 5-HT_{1A} CISH antisense bzw. sense im Hippocampus, 5-HT_{1A} mRNA-Reaktivität ist grau dargestellt; (C, D) 5-HT_{1A} HS-TSA-FISH antisense bzw. sense im Hippocampus, 5-HT_{1A} mRNA-Reaktivität ist grün, DAPI ist blau dargestellt; (E, F) 5-HT_{1A} CISH antisense bzw. sense im BL, 5-HT_{1A} mRNA-Reaktivität ist grau dargestellt; (G, H) 5-HT_{1A} HS-TSA-FISH antisense bzw. sense im BL, 5-HT_{1A} mRNA-Reaktivität ist grün, DAPI ist blau dargestellt. Der Größenbalken in (A) gilt auch für (B), der in (C) auch für (D), der in (E) auch für (F), der in (G) auch für (H).

27.3 Signalintensität und Verteilung der 5-HT_{2C} mRNA

5-HT_{2C} mRNA wurde in Einzelmarkierungen sowohl mit CISH als auch mit HS-TSA-FISH nachgewiesen. Die Signalintensität und Dichte 5-HT_{2C} mRNA-reaktiver Zellen war u.a. im La und Me sehr hoch und im BL moderat (Abb. 37 A, C, E, G, I, K). In diesen Hirnarealen war das Verteilungsmuster beider Methoden miteinander vergleichbar und stimmte mit jenem aus der Literatur bereits beschriebenem überein [115]. Das CISH-Signal war etwas prominenter als das HS-TSA-FISH-Signal. In den sense-Kontrollen der HS-TSA-FISH waren vereinzelt fluoreszierende Pünktchen zu erkennen (Abb. 37 D, H, L, Pfeile). Diese minimalen Artefakte konnten jedoch in Hirnarealen mit hoher bis moderater 5-HT_{2C} mRNA-Expression vernachlässigt werden. Die sense-Kontrollen der CISH waren komplett frei von unspezifischen Signalen (Abb. 37 B, F, J).

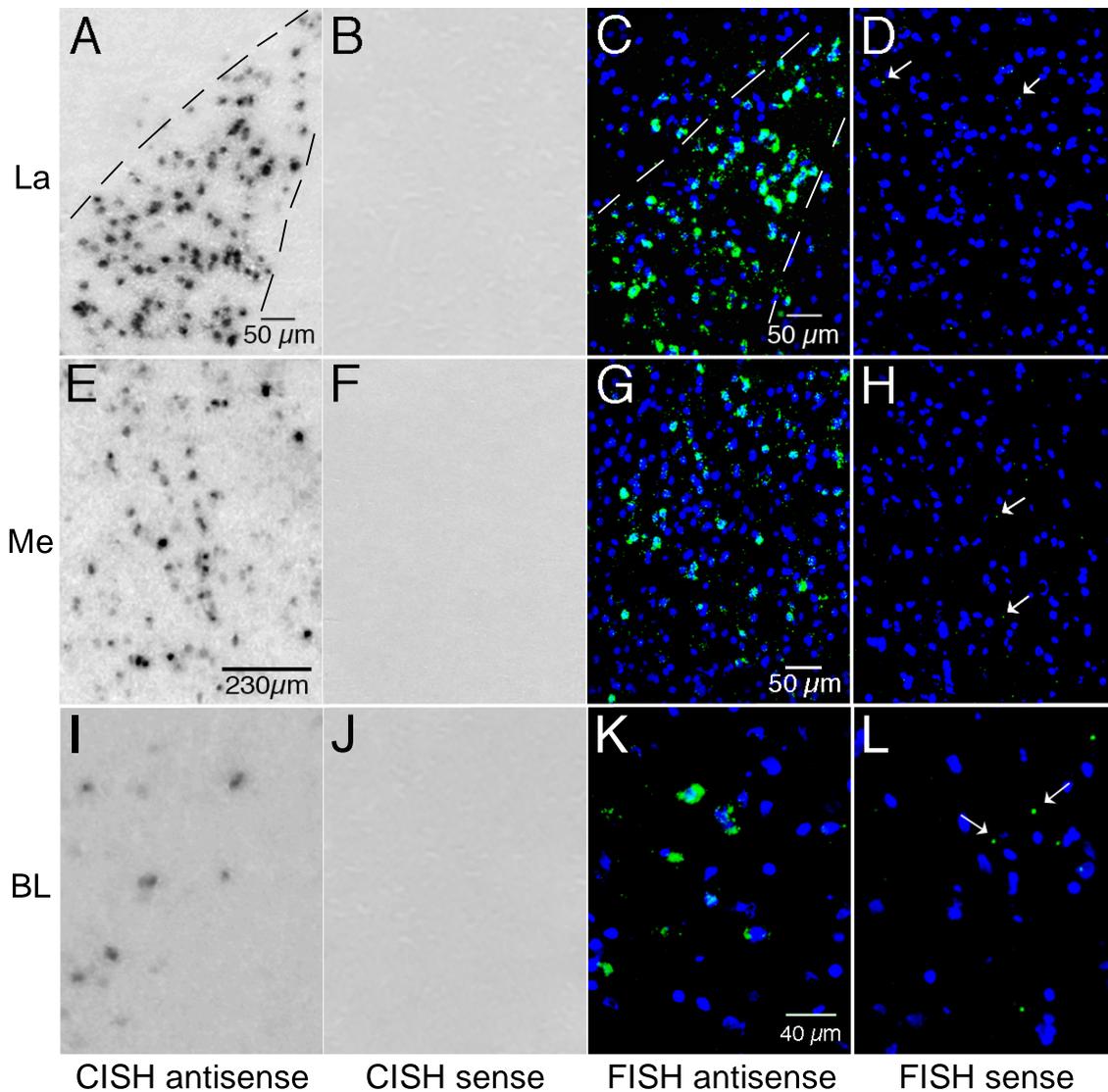


Abbildung 37: Verteilung der 5-HT_{2C} mRNA in verschiedenen Hirnarealen. (A, B) 5-HT_{2C} CISH antisense bzw. sense im La, 5-HT_{2C} mRNA-Reaktivität ist grau dargestellt; (C, D) 5-HT_{2C} HS-TSA-FISH antisense bzw. sense im La, 5-HT_{2C} mRNA-Reaktivität ist grün, DAPI ist blau dargestellt; (E, F) 5-HT_{2C} CISH antisense bzw. sense im Me, 5-HT_{2C} mRNA-Reaktivität ist grau dargestellt; (G, H) 5-HT_{2C} HS-TSA-FISH im Me, NPY mRNA-Reaktivität ist grün, DAPI ist blau dargestellt; (I, J) 5-HT_{2C} CISH antisense bzw. sense im BL, 5-HT_{2C} mRNA-Reaktivität ist grau dargestellt; (K, L) 5-HT_{2C} HS-TSA-FISH antisense bzw. sense im BL, 5-HT_{2C} mRNA-Reaktivität ist grün, DAPI ist blau dargestellt. Der Größenbalken in (A) gilt auch für (B), der in (C) auch für (D), der in (E) auch für (F), der in (G) auch für (H), der in (K) auch für (I, J und L).

27.4 Signalintensität und Verteilung der 5-HT₃ mRNA

5-HT₃ mRNA wurde in Einzelmarkierungen sowohl mit CISH als auch mit HS-TSA-FISH nachgewiesen. Dass es sich bei dieser Sonde um eine cRNA-Sonde für den 5-HT₃ der Maus handelt, beeinträchtigte die Ergebnisse an Rattengewebe nicht. Das Verteilungsmuster wurde anhand von CISH-Präparaten mit entsprechenden Literaturstellen verglichen [105, 194] und stimmte hiermit überein. Im Vergleich zu Markierungen der 5-

HT_{1A} und 5-HT_{2C} mRNA wurden nur wenige 5-HT₃ mRNA-reaktive Zellen detektiert. Die 5-HT₃ mRNA-reaktiven Zellen der CISH-Präparate ließen sich eindeutig identifizieren und die sense-Präparate waren frei von Hintergrundfärbungen (Abb. 38 A, B). In HS-TSA-FISH-Präparaten bestand das Fluoreszenzsignal – ähnlich wie bei 5-HT_{1A}-HS-TSA-FISH-Präparaten, jedoch in geringerer Signalintensität – aus ungleichmäßig verteilten fluoreszierenden Pünktchen, die sich zwar vom Hintergrund des Gewebes abhoben, jedoch keinen Zellen sicher zugeordnet werden konnten (Abb. 38 C). Solche Pünktchen wurden auch in den sense-Kontrollpräparaten vorgefunden, weshalb die Spezifität des HS-TSA-FISH-Signals auch hier angezweifelt wurde (Abb. 38 D, Pfeile).

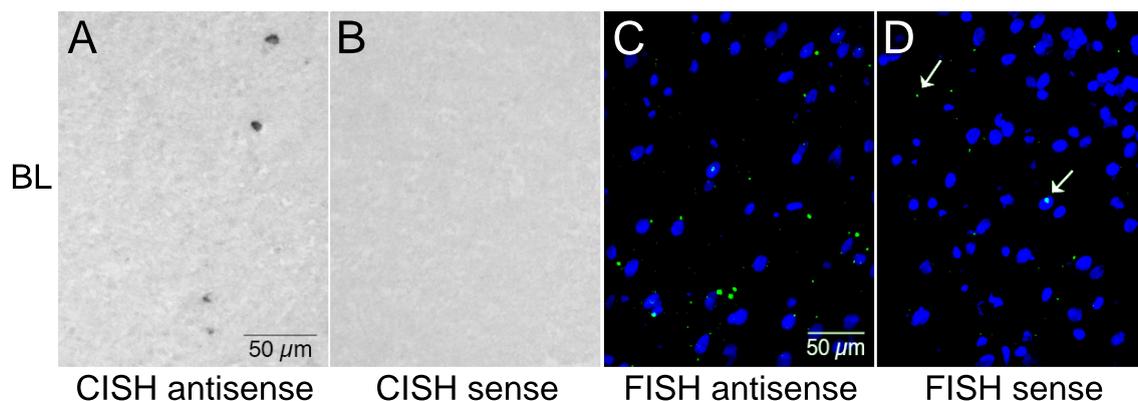


Abbildung 38: ISH für 5-HT₃ mRNA im BL. (A, B) 5-HT₃ CISH antisense bzw. sense im BL, 5-HT_{1A} mRNA-Reaktivität ist grau dargestellt; (C, D) 5-HT_{1A} HS-TSA-FISH antisense bzw. sense im BL, 5-HT_{1A} mRNA-Reaktivität ist grün, DAPI ist blau dargestellt. Der Größenbalken in (A) gilt auch für (B), der in (C) auch für (D).

27.5 NPY mRNA und 5-HT_{1A} mRNA

Da in HS-TSA-FISH-Präparaten die Einzelmarkierungen für 5-HT_{1A} mRNA keine überzeugenden Resultate lieferten, wurde zur Koexpressionsanalyse von NPY und 5-HT_{1A} mRNA die Kombination aus HS-TSA-FISH und CISH angewendet. Im La beider Geschlechter war die Zelldichte der 5-HT_{1A} mRNA-reaktiven Neurone weitaus höher als die der NPY mRNA-reaktiven Neurone. Koexpression von NPY und 5-HT_{1A} mRNA wurde in einer Subpopulation der NPY mRNA-reaktiven Neurone nachgewiesen: im La exprimierten 58,2% der NPY mRNA-reaktiven Neurone auch 5-HT_{1A} mRNA, bei den Männchen waren es 53,9% (Tab. 16 u. 17, Abb. 39, Abb. 40 A-C). Der entsprechende t-Test für zwei ungepaarte Stichproben ergab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,1298$).

Auch im BL beider Geschlechter war die Zelldichte der 5-HT_{1A} mRNA-reaktiven Neurone weitaus höher als die der NPY mRNA-reaktiven Neurone. Koexpression von NPY und 5-HT_{1A} mRNA wurde ebenso in einer Subpopulation der NPY mRNA-reaktiven Neurone nachgewiesen: im BL exprimierten 58,1% der NPY mRNA-reaktiven Neurone auch

5-HT_{1A} mRNA, bei den Männchen waren es 54,2% (Tab. 16 u. 17, Abb. 39, Abb. 40 D-F). Der entsprechende t-Test für zwei ungepaarte Stichproben ergab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,2592$).

Um die Werte des La mit denen des BL innerhalb der Gruppe der Weibchen bzw. Männchen zu vergleichen, wurden entsprechende t-Test für zwei gepaarte Stichproben angewendet. Auch hier ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede (La-BL-Weibchen: $p = 0,9576$; La-BL-Männchen: $p = 0,9238$). Die Kreuz- und sense Kontrollen zeigten die erwarteten Resultate (Abb. 40 G-I). Die Resultate dieser Analysen zeigen erstmalig, dass eine Teilpopulation der NPY mRNA-reaktiven Neurone im La und BL 5-HT_{1A} mRNA koexprimiert.

	R 15	R 16	R 17	R 24	R 23	R 28	∅ ± SD
La							
Koexpression	48 64,9%	38 58,5%	45 60,0%	19 50,0%	30 62,5%	23 53,5%	34 ± 12 58,2% ± 5,6
nur NPY mRNA	26 35,1%	27 41,5%	30 40,0%	19 50,0%	18 37,5%	20 46,5%	23 ± 5 41,8% ± 5,6
BL							
Koexpression	35 61,4%	27 60,0%	30 65,2%	25 59,5%	23 51,1%	19 51,2%	27 ± 6 58,1% ± 5,7
nur NPY mRNA	22 38,6%	13 40,0%	16 34,8%	17 40,5%	22 48,9%	18 48,8%	18 ± 4 41,9% ± 5,7

Tabelle 16: Koexpression von NPY mRNA und 5-HT_{1A} mRNA, ♀. ∅ Mittelwert; SD Standardabweichung

	R 18	R 19	R 20	R 27	R 26	R 29	∅ ± SD
La							
Koexpression	26 55,3%	26 53,1%	26 54,2%	26 52,0%	23 59,0%	23 50,0%	26 ± 1 53,9% ± 3,1
nur NPY mRNA	21 44,7%	23 46,9%	22 45,8%	24 48,0%	16 41,0%	23 50,0%	22 ± 3 46,1% ± 3,1
BL							
Koexpression	17 53,1%	17 60,7%	22 61,1%	26 48,1%	17 50,0%	24 52,2%	21 ± 4 54,2% ± 5,5
nur NPY mRNA	15 46,9%	11 39,3%	14 38,9%	28 51,9%	17 50,0%	22 47,8%	18 ± 6 45,8% ± 5,5

Tabelle 17: Koexpression von NPY mRNA und 5-HT_{1A} mRNA, ♂. ∅ Mittelwert; SD Standardabweichung

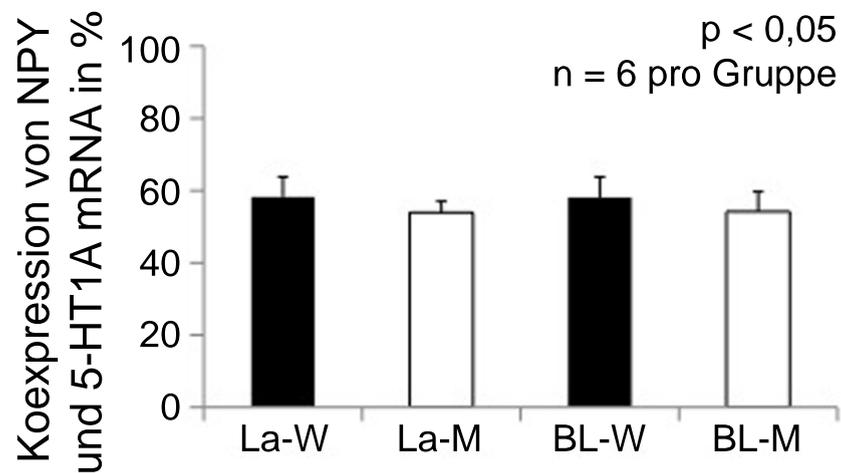


Abbildung 39: Koexpression von NPY mRNA und 5-HT_{1A} mRNA. Die Werte stammen aus Tab. 16 und 17 und sind als Mittelwerte und deren Standardabweichungen dargestellt. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. W: Weibchen; M: Männchen.

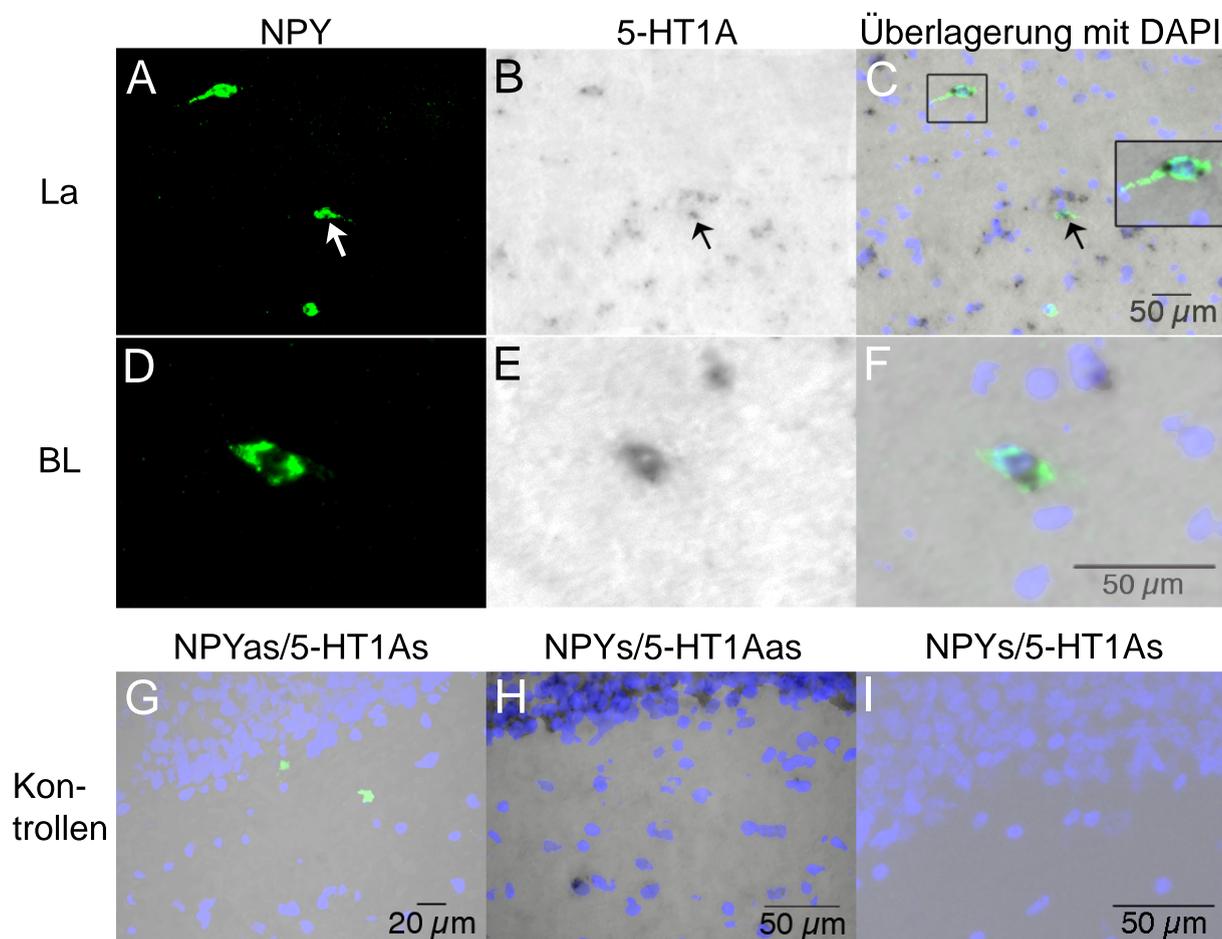


Abbildung 40: NPY mRNA und 5-HT_{1A} mRNA im La (A–C) und BL (D–F). Der Pfeil in (C) deutet auf eine Zelle, die NPY und 5-HT_{1A} mRNA exprimiert. Auf den Bildern (G) und (H) sind Kreuzkontrollen und auf (I) eine entsprechende sense-Kontrolle dargestellt. Der Größenbalken in (C) gilt auch für (A) und (B), der in (F) auch für (D) und (E).

27.6 NPY mRNA und 5-HT_{2C} mRNA

Um die Koexpression von NPY mRNA und von 5-HT_{2C} mRNA im La, BL und Me zu untersuchen, wurde dFISH angewendet. Im La beider Geschlechter war die Zelldichte der 5-HT_{2C} mRNA-reaktiven Neurone weitaus höher als die der NPY mRNA-reaktiven Neurone. Koexpression von NPY und 5-HT_{2C} mRNA wurde in einer Subpopulation der NPY mRNA-reaktiven Neurone nachgewiesen: im La der Weibchen exprimierten 33,0% aller untersuchten NPY mRNA-reaktiven Neurone auch 5-HT_{2C} mRNA, bei den Männchen waren es 42,1% (Tab. 18 u. 19, Abb. 41, Abb. 42 A-C). Der entsprechende t-Test für zwei ungepaarte Stichproben ergab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,1874$).

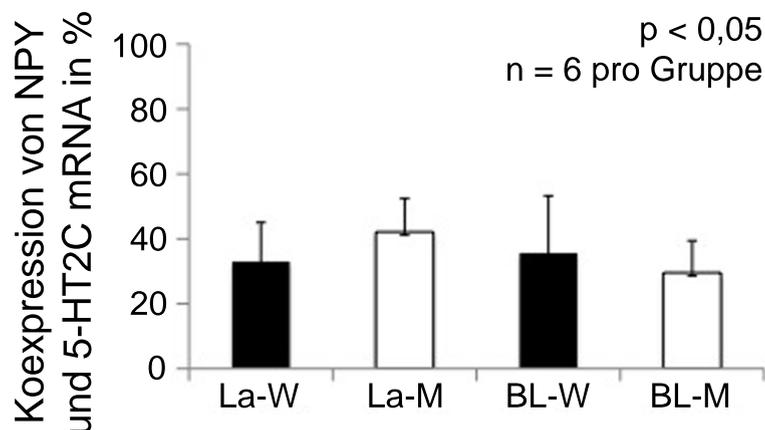
Im BL beider Geschlechter ähnelte sich die Zelldichte der 5-HT_{2C} und der NPY mRNA-reaktiven Neurone, wobei die meisten 5-HT_{2C} mRNA-reaktiven Neurone nicht der Gruppe der NPY mRNA-reaktiven Neurone angehörten. Koexpression von NPY und 5-HT_{2C} mRNA wurde in einer Subpopulation der NPY mRNA-reaktiven Neurone nachgewiesen: im BL der Weibchen exprimierten 35,6% aller untersuchten NPY mRNA-reaktiven Neurone auch 5-HT_{2C} mRNA, bei den Männchen waren es 29,6% (Tab. 18 u. 19, Abb. 41, Abb. 42 D-F). Der entsprechende t-Test für zwei ungepaarte Stichproben ergab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,4787$).

Um die Werte des La mit denen des BL innerhalb der Gruppe der Weibchen bzw. Männchen zu vergleichen, wurden entsprechende t-Test für zwei gepaarte Stichproben angewendet. Auch hier ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede (La-BL-Weibchen: $p = 0,7667$; La-BL-Männchen: $p = 0,4996$). Zusätzlich wurde die Koexpressionsrate von NPY mRNA und 5-HT_{2C} mRNA im Me zweier Weibchen sowie von sechs Männchen ausgewertet. Für Weibchen ergab sich eine Koexpressionsrate von 88,8%, bei Männchen von 89,8% (Tab. 18 u. 19, Abb. 42 G-I). Auf Grund der kleinen Stichprobengröße in der Gruppe der Weibchen wurden keine statistischen Tests durchgeführt. Die Kreuz- und sense-Kontrollen zeigten die erwarteten Resultate (Abb. 42 J-L). Die Resultate dieser Analysen zeigen erstmalig, dass eine Teilpopulation der NPY mRNA-reaktiven Neurone im La und BL 5-HT_{2C} mRNA koexprimiert.

	R 15	R 16	R 17	R 23	R 24	R 30	$\bar{x} \pm SD$
La							
Koexpression	31 41,3 %	27 35,5 %	20 32,8 %	12 27,9 %	24 12,9 %	21 47,7 %	22,5 ± 6,5 33,0 % ± 12,0
nur NPY mRNA	44 58,7 %	49 64,5 %	41 67,2 %	31 72,1 %	40 87,1 %	23 52,3 %	38 ± 9,4 77,0 % ± 12,0
BL							
Koexpression	5 12,2 %	20 62,5 %	18 41,8 %	6 21,4 %	16 34,0 %	13 41,9 %	13 ± 6,3 35,6 % ± 17,6
nur NPY mRNA	36 87,8 %	12 37,5 %	25 58,2 %	22 78,6 %	31 66,0 %	18 58,1 %	24 ± 8,7 64,4 % ± 17,6
Me							
Koexpression	–	–	–	89 89,0 %	54 88,5 %	–	71,5 ± 24,7 88,75 % ± 0,4
nur NPY mRNA	–	–	–	11 11,0 %	7 11,5 %	–	9,0 ± 2,8 11,25 % ± 0,4

Tabelle 18: Koexpression von NPY mRNA und 5-HT_{2C} mRNA, ♀. \bar{x} Mittelwert; SD Standardabweichung

	R 27	R 26	R 25	R 20	R 21	R 22	$\bar{x} \pm SD$
La							
Koexpression	38 60,3 %	18 42,9 %	19 32,8 %	17 32,1 %	37 44,0 %	24 40,7 %	25,5 ± 9,6 42,1 % ± 10,2
nur NPY mRNA	25 39,7 %	24 57,1 %	39 67,2 %	36 67,9 %	47 56,0 %	35 59,3 %	34,3 ± 8,7 57,9 % ± 10,2
BL							
Koexpression	18 43,9 %	11 36,7 %	14 33,3 %	5 20,8 %	13 20,0 %	10 22,7 %	11,8 ± 4,4 29,6 % ± 9,9
nur NPY mRNA	23 56,1 %	19 63,3 %	28 66,7 %	19 79,2 %	52 80,0 %	34 77,3 %	29,2 ± 12,6 70,4 % ± 9,9
Me							
Koexpression	168 (98,8 %)	103 (96,3 %)	58 (90,6 %)	30 (88,2 %)	42 (80,8 %)	124 (83,8 %)	87,5 ± 53,5 89,8 % ± 7,0
nur NPY mRNA	2 (1,2 %)	4 (3,7 %)	6 (9,4 %)	4 (11,8 %)	10 (19,2 %)	24 (16,2 %)	8,3 ± 8,1 10,3 % ± 7,0

Tabelle 19: Koexpression von NPY mRNA und 5-HT_{2C} mRNA, ♂. \bar{x} Mittelwert; SD StandardabweichungAbbildung 41: Koexpression von NPY und 5-HT_{2C} mRNA. Die Werte stammen aus Tab. 18 und 19 und sind als Mittelwerte und deren Standardabweichungen dargestellt. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. W: Weibchen; M: Männchen.

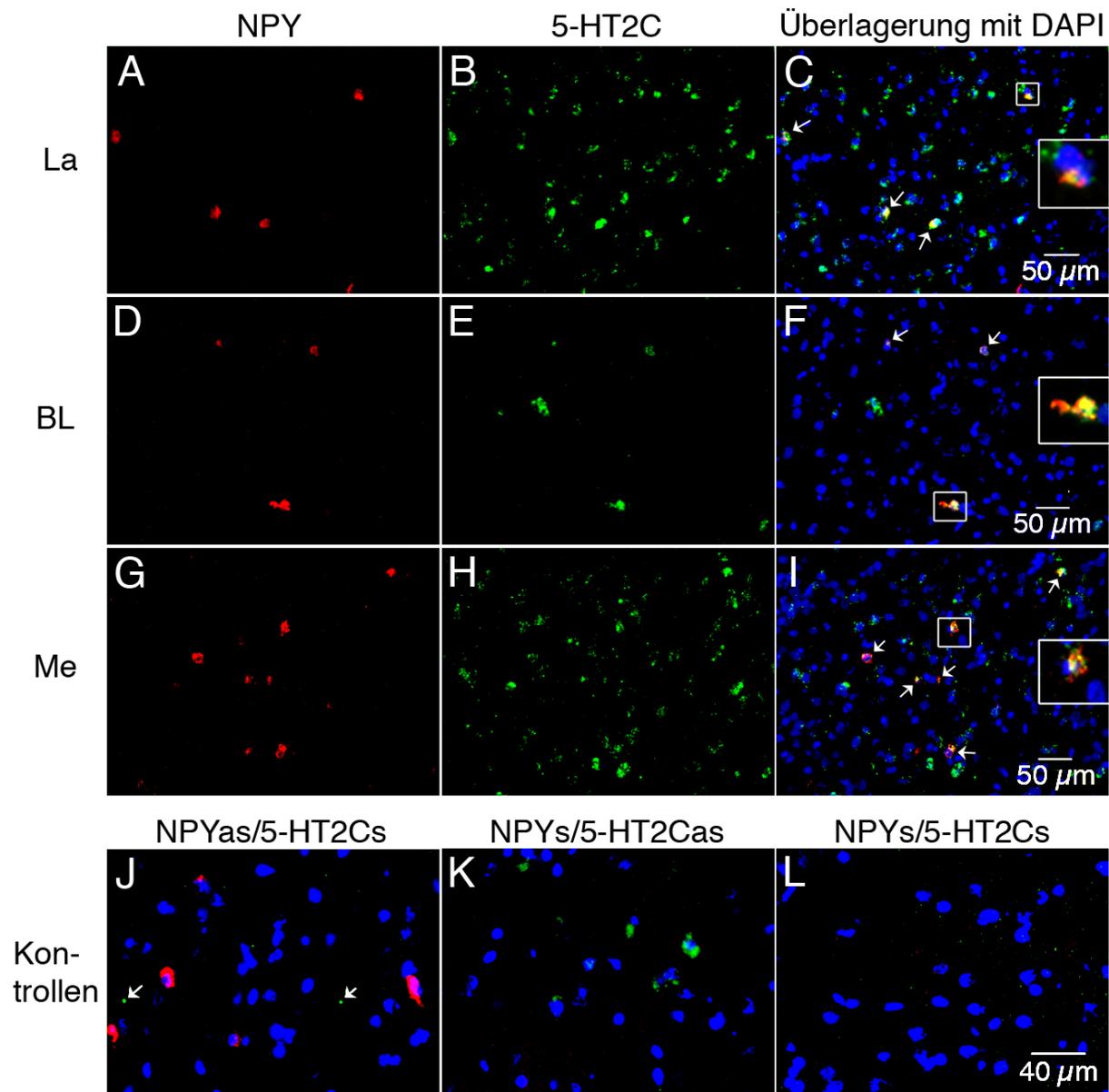


Abbildung 42: NPY mRNA und 5-HT_{2C} mRNA im La (A–C), BL (D–F) und Me (G–I). Die Pfeile in (C, F) und (I) deuten auf Zellen, die NPY und 5-HT_{2C} mRNA exprimieren. Auf den Bildern (J) und (K) sind Kreuzkontrollen und auf (L) eine entsprechende sense-Kontrolle dargestellt. Der Größenbalken in (C) gilt auch für (A) und (B), der in (F) auch für (D) und (E), der in (I) auch für (G) und (H), der in (L) auch für (J) und (K).

27.7 NPY mRNA und 5-HT₃ mRNA

Auf Grund mangelnder Signalintensität und –spezifität wurde nicht dFISH, sondern die Kombination aus HS-TSA-FISH und CISH für die Koexpressionsanalyse von NPY mRNA und 5-HT₃ mRNA angewendet. Es wurden der La und BL von drei Weibchen (Ratte 15 bis 17) und von zwei Männchen (Ratte 18 und 19) untersucht. Hierbei wurde keine Koexpression von NPY mRNA und 5-HT₃ mRNA gefunden (Tab. 20).

	R 15	R 16	R 17	R 18	R 19	∅ ± SD
La						
Anzahl NPY Neurone	64	62	61	63	41	58 ± 9,7
Anzahl 5-HT ₃ Neurone	37	23	31	27	23	28 ± 5,9
Koexpression	0	0	0	0	0	0 ± 0
BL						
Anzahl NPY Neurone	46	38	42	46	27	40 ± 7,9
Anzahl 5-HT ₃ Neurone	30	39	41	27	29	33 ± 6,3
Koexpression	0	0	0	0	0	0 ± 0

Tabelle 20: Koexpression von NPY mRNA und 5-HT₃ mRNA, ♀ und ♂. ∅ Mittelwert; SD Standardabweichung

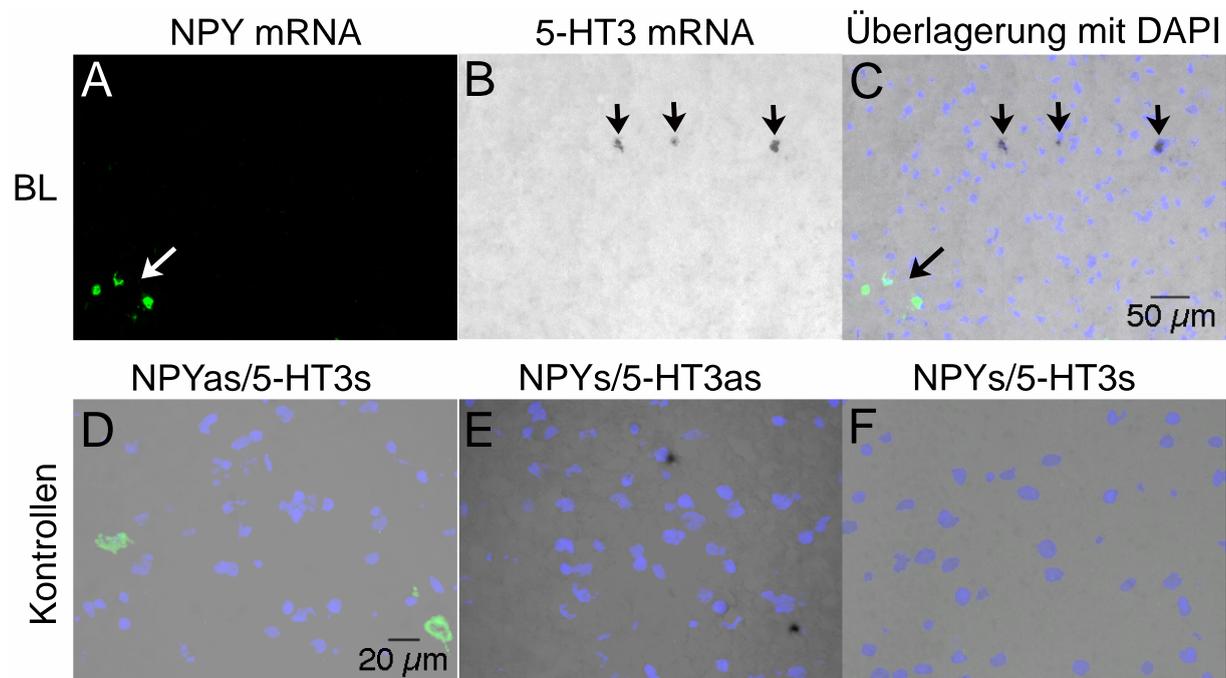


Abbildung 43: NPY mRNA und 5-HT₃ mRNA im BL (A–C). Auf den Bildern (D) und (E) sind Kreuzkontrollen und auf (F) eine entsprechende sense-Kontrolle dargestellt. Der Größenbalken in (C) gilt auch für (A) und (B), der in (D) auch für (E) und (F).

27.8 5-HT_{1A} mRNA und 5-HT_{2C} mRNA

Unter Anwendung der Kombination aus CISH und HS-TSA-FISH für 5-HT_{1A} mRNA und 5-HT_{2C} mRNA wurden im La und BL neben einfach markierten Zellen (schmale Pfeile in Abb. 44 A–C für 5-HT_{2C}; Pfeilspitzen in Abb. 44 A–C für 5-HT_{1A}) auch Zellen gefunden, welche diese mRNAs koexprimieren (Abb. 44 A–C, breite Pfeile). Hierbei wurden La und BL von zwei weiblichen sowie zwei männlichen Wistar-Ratten untersucht; es wurde keine Quantifizierung durchgeführt. Die sense-Kontrollen zeigten keine unspezifischen Markierungen (Abb. 44 D).

27.9 NPY mRNA und CRF mRNA

Einzelmarkierungen mit HS-TSA-FISH und CISH für CRF mRNA wiesen u. a. deutliche Signale im Ce auf (nicht gezeigt). Als zusätzliche Spezifitätskontrolle wurden dFISH für NPY mRNA (HS-TSA-FISH) und CRF mRNA (MS-TSA-FISH) durchgeführt. Hierbei wurde, wie zu erwarten war, keine Koexpression nachgewiesen, da es sich um getrennte neuronale Populationen handelt (Abb. 44 E–H); es wurde keine Quantifizierung durchgeführt. Die sense-Kontrollen zeigten keine unspezifischen Markierungen (Abb. 44 H).

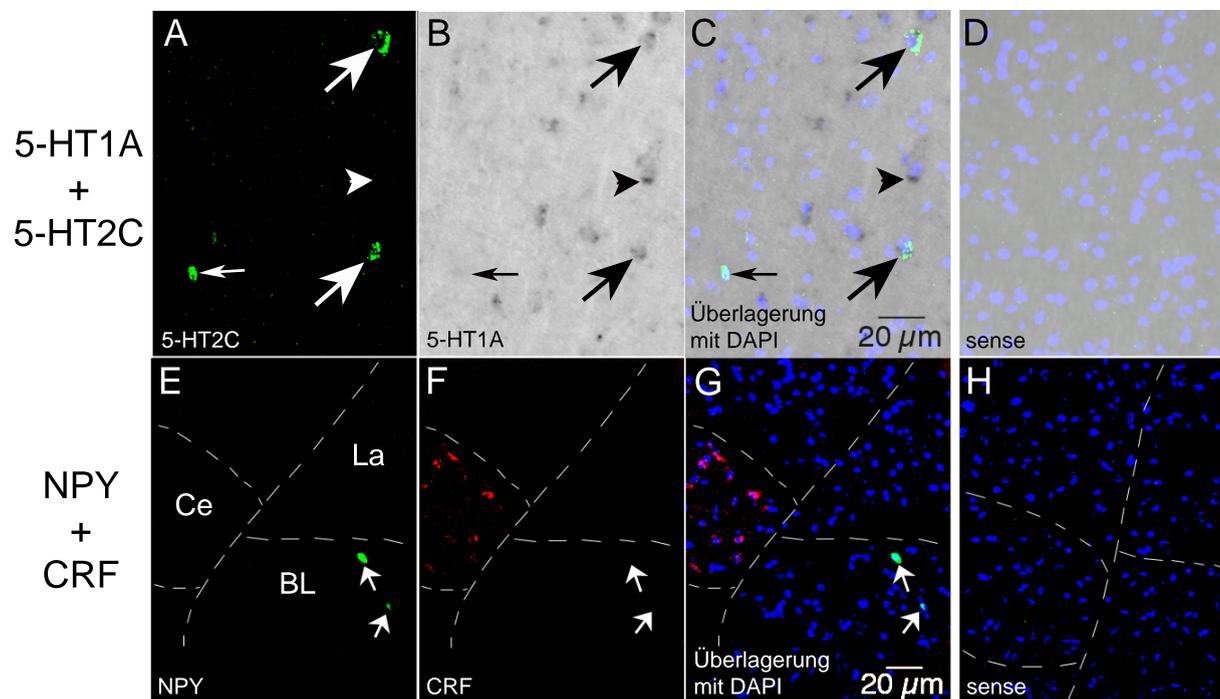


Abbildung 44: Koexpression von 5-HT_{1A} mRNA mit 5-HT_{2C} mRNA (A–D) und NPY mRNA mit CRF mRNA (E–H). Der Größenbalken in (C) gilt auch für (A, B) und (D), der in (G) auch für (E, F) und (H).

27.10 Drd₂ mRNA und Kolokalisation mit NPY mRNA

Drd₂ mRNA wurde lediglich bei einem von mehreren Versuchen erfolgreich mit MS-TSA-FISH detektiert (Abb. 45), konnte jedoch nicht mit HS-TSA-FISH detektiert werden. Im BL und Ce wurden nur vereinzelt Drd₂ mRNA-positive Zellen gesehen (Abb. 45 A bzw. B) und eine hohe Hintergrundfluoreszenz erschwerte die Detektion. Im La wurden keine Drd₂ mRNA-positive Zellen beobachtet. Eine hohe Zelldichte war im Striatum zu beobachten (Abb. 45 C). Hier war die Signalintensität der MS-TSA-FISH höher als in den Nuclei der Amygdala, wodurch die Detektion problemlos verlief. Unter Anwendung der CISH war der Nachweis der Drd₂ mRNA meist erfolgreich und auch hier ähnelte das Verteilungsmuster dem der MS-TSA-FISH. Obwohl die CISH eine höhere Sensitivität aufwies, konnten auch hier nur selten Drd₂ mRNA-positive Zellen in den Nuclei der Amygdala nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Im Striatum wurde eine Koexpression von NPY mRNA und Drd₂ mRNA dokumentiert (Abb. 45 D–F).

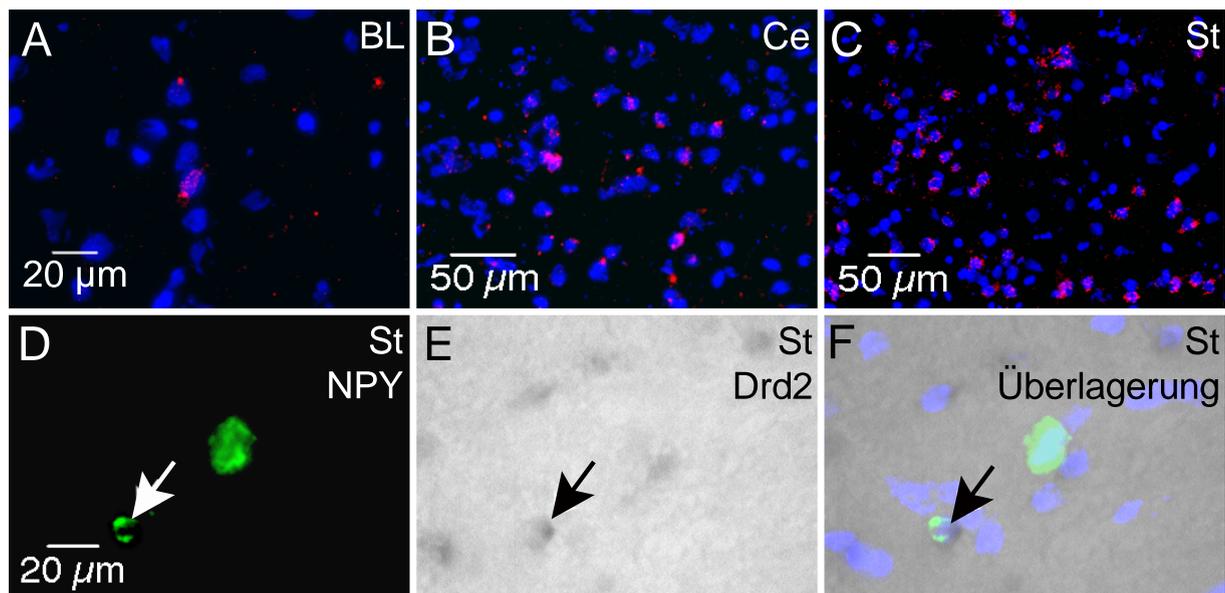


Abbildung 45: Drd₂ mRNA in verschiedenen Hirnarealen. Expression der Drd₂ mRNA im BL (A), Ce (B) und Striatum (St; C). Im St wurde eine Koexpression von NPY und Drd₂ mRNA beobachtet (D–F, Pfeile). Der Größenbalken in (D) gilt auch für (E) und (F).

27.11 Koexpression von NPY, 5-HT_{1A} und 5-HT_{2C} mRNA

Es wurden Dreifachmarkierungen für NPY, 5-HT_{1A} und 5-HT_{2C} mRNA durchgeführt. Hierbei wurden im La und BL erstmalig NPY mRNA-positive Neurone nachgewiesen, die 5-HT_{1A} und 5-HT_{2C} mRNA koexprimieren (Abb. 46, breiter Pfeil in A–E, Detail in E'). Weiterhin wurden auch einfach markierte Zellen für NPY (nicht gezeigt), 5-HT_{1A} (Abb. 46, breite Pfeilspitze in A–E) und 5-HT_{2C} mRNA (Abb. 46, schmale Pfeilspitze in A–E) detektiert. Außerdem wurden in diesen Präparaten auch doppelt markierte Zellen mit NPY und 5-HT_{2C} mRNA (Abb. 46, schmaler Pfeil in A–E) sowie 5-HT_{1A} und 5-HT_{2C} mRNA gefunden (Abb. 46, gelbe Pfeile in A–E). Diese Präparate wurden nur qualitativ ausgewertet.

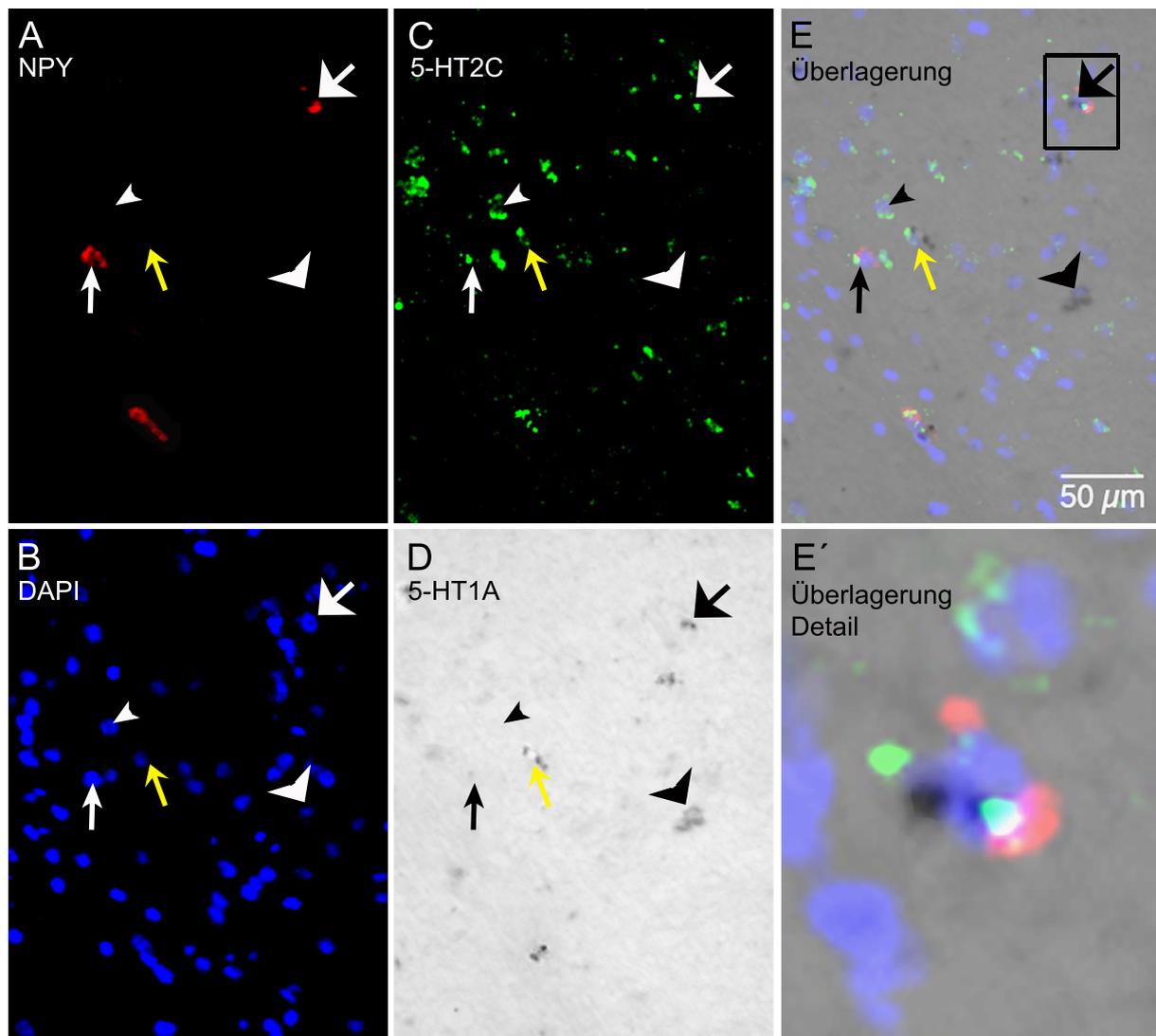


Abbildung 46: Koexpression von NPY, 5-HT_{1A} und 5-HT_{2C} mRNA im La. Bei dieser Dreifachmarkierung wurde NPY mRNA mit LS-TSA-FISH, 5-HT_{1A} mRNA mit CISH und 5-HT_{2C} mRNA mit HS-TSA-FISH detektiert. Der Größenbalken in E gilt auch für A–D.

Teil VI

Diskussion

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Resultate liefern neue, detaillierte Erkenntnisse über den Einfluss des serotonergen Systems auf die laterobasale Amygdala von Mäusen und Ratten. Es wurde gezeigt, dass sowohl der 5-Htt KO als auch wiederholter sozialer Stress bei adulten, männlichen Mäusen zu morphologischen Veränderungen spezifischer dendritischer Kompartimente von Pyramidenzellen, jedoch nicht von Interneuronen, führt. Weiterhin wurden NPY-Neurone der laterobasalen Amygdala von Ratten als Zielneurone serotonerger Afferenzen identifiziert und eine differentielle 5-HTR-Ausstattung dieser Interneurone dokumentiert. In der folgenden Diskussion werden die Befunde der verschiedenen Untersuchungen zuerst separat erörtert und abschließend in einer ganzheitlichen Modellvorstellung zusammengeführt.

28 Einfluss des 5-Htt-Genotyps und von sozialem Stress auf die Morphologie von Pyramidenzellen und Interneuronen im La und BL von Mäusen

Die Resultate der morphologischen Untersuchungen an nicht gestressten und gestressten adulten männlichen WT- und 5-Htt KO-Mäusen erbringen eine Vielzahl neuer Erkenntnisse: zum einen lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass ein lebenslanges Defizit des 5-Htt, welches selbst ohne eine Stresserfahrung mit Veränderungen im angst- und emotionsähnlichen Verhalten einhergeht [5, 67, 75], zu Unterschieden der neuronalen Morphologie der Pyramidenzellen im La und BL führt. Zum anderen erzeugen wiederholte Verlierererfahrungen während Revierkämpfen, durch die angstähnliches Verhalten erhöht wird [75], Veränderungen der neuronalen Morphologie in WT-Mäusen. Diese Veränderungen sind an den dendritischen Dornen von Pyramidenzellen am deutlichsten und gleichen den Unterschieden, welche zwischen nicht gestressten WT- und 5-Htt KO-Mäusen nachgewiesen wurden. In der 5-Htt KO-Gruppe wurden nach einer Stresserfahrung jedoch keine zur WT-Gruppe äquivalenten Veränderungen nachgewiesen.

Die Morphologie der Pyramidenzellen aller untersuchten Gruppen ändert sich in Bezug auf die maximale Ausbreitung der Dendriten, Schnittpunkte der Dendriten mit den Oberflächen der Kugeln, Gesamtlänge des dendritischen Materials sowie die dendritische Verzweigungsdichte gar nicht bzw. nur geringfügig. Die Morphologie der Sternzellen zeigt

bzgl. der in dieser Arbeit untersuchten Parameter keine vom 5-Htt Genotyp abhängigen Unterschiede oder durch Stress bedingten Veränderungen. Es ist jedoch durchaus denkbar, dass diese Neurone durch 5-Htt KO bzw. wiederholten sozialen Stress nicht auf morphologischer Ebene, sondern z. B. bzgl. ihrer Serotoninrezeptor- (5-HTR) Ausstattung moduliert werden. Diese Annahme lässt sich durch Befunde von Li und Kollegen rechtfertigen, die herausgefunden haben, dass der 5-Htt KO bei Mäusen mit einer Dichtezunahme des 5-HT_{2C} in der Amygdala einhergeht [94], welcher dort von Interneuronen exprimiert wird [21]. Weiterhin ist bekannt, dass Stresserfahrungen bei Ratten die durch den 5-HT_{2A} regulierte GABA-Freisetzung im BLA beeinträchtigen [77]. Diese funktionellen Veränderungen verschiedener 5-HTR könnten mit veränderten Verhaltensweisen, wie z. B. erhöhtem angstähnlichen Verhalten, in Zusammenhang gebracht werden.

28.1 Erörterung der eingesetzten Methoden

Für diese Studie wurden die morphologischen Kriterien zur Bestimmung von Pyramidenzellen und Sternzellen von Millhouse und DeOlmos herangezogen, die ihre Untersuchungen hauptsächlich an Rattengehirnen durchgeführt haben [117]. In diesem Fall konnte deren Beschreibungen problemlos auf Mausgewebe angewendet werden.

Der La und BL wurden auf Grund bereits erwähnter Zusammenhänge separat voneinander analysiert (s. 1), wovon in einer Vielzahl anderer Studien, in welchen durch Stress induzierte morphologische Veränderungen untersucht wurden, abgesehen wurde. In vielen Fällen wurde der BLA, der sich definitionsgemäß meist aus La, BL und BM zusammensetzt [106], untersucht. In anderen Studien wurde der La nicht explizit in die Analysen mit einbezogen [120, 210]. Obwohl es diese Bedingungen erschweren, die hier erzielten Ergebnisse mit bereits veröffentlichten Daten ähnlicher Experimente zu vergleichen, wurde die separate Analyse des La und BL bevorzugt, da sich u. a. die extrinsischen und intraamygdaloiden Verbindungen dieser Nuclei unterscheiden. Wie bereits erwähnt, ist der La eine wichtige Eingangsstation für sensorische Eingangsinformationen aus dem Thalamus und verschiedenen kortikalen Arealen. Von hier aus werden diese Informationen teilweise an den BL weitergeleitet, welcher zusätzlich Eingangsinformationen aus dem Hippocampus erhält [46, 88, 89, 152]. Weiterhin erhält der La vom IL afferente Projektionen, während Projektionen des prälimbischen Kortex den BL erreichen [107]. Es wurde kürzlich berichtet, dass die Tiere eines ängstlichen Rattenstamms im Vergleich zu denen eines weniger ängstlichen Rattenstamms ein abweichendes Aktivierungsprofil im CG, IL und La, jedoch nicht im BL aufwiesen [127], was die Notwendigkeit einer separaten Analyse des La und BL zusätzlich untermauert.

Weiterhin wurden Apikal- und Basaldendriten der Pyramidenzellen sowohl in deren Ge-

samtheit als auch separat analysiert, da bereits vielfach belegt wurde, dass Stress die Morphologie der Apikal- und Basaldendriten z. B. im Hippocampus [113] oder mPFC [26, 178] unterschiedlich beeinflussen kann. Weiterhin ist bekannt, dass die Apikal- und Basaldendriten in kortikalen Arealen (La und BL werden als kortexähnliche Nuclei bezeichnet) unterschiedliche Eingangsinformationen erhalten [178]. Bis zum heutigen Zeitpunkt liegen solche Informationen über Pyramidenzellen des La und BL noch nicht vor, dennoch erhalten vermutlich auch diese Neurone an Apikal- bzw. Basaldendriten Eingangsinformationen von unterschiedlichen Projektionsbahnen. Ein Hinweis hierfür könnte sein, dass die Dornendichte $_{VO}$ sowohl bei 5-Htt KO- als auch bei gestressten WT-Mäusen im Vergleich zu nicht gestressten WT-Mäusen nur an bestimmten dendritischen Kompartimenten erhöht ist (s. 28.2, 28.3). Diese Unterschiede konnten nur auf Grund der separaten Auswertung der dendritischen Verzweigungsordnungen ausfindig gemacht werden.

28.2 Auswirkungen des 5-Htt KO auf die dendritische Morphologie

Die markantesten vom 5-Htt Genotyp abhängigen Unterschiede wurden an dendritischen Dornen von Pyramidenzellen nachgewiesen. Im La und BL zeigen diese Neurone nicht gestresster 5-Htt KO- im Vergleich zu nicht gestressten WT-Mäusen eine signifikant erhöhte Gesamtzahl der dendritischen Dornen sowie der Gesamtdornendichte auf und die Analyse der Dornendichte $_{VO}$ ergab die deutlichsten Unterschiede im La an Basaldendriten zweiter und dritter Ordnung.

Aus diesen Daten kann man schlussfolgern, dass 5-Htt KO- im Vergleich zu WT-Mäusen im La und BL einen höheren exzitatorischen synaptischen Input erhalten (laut gängiger Literatur erhalten Pyramidenzellen an dendritischen Dornen hauptsächlich exzitatorische und an den Somata inhibitorische Eingangsinformationen [17]), was man mit einer erhöhten Erregbarkeit dieser Zellen bzw. der gesamten Nuclei gleichsetzen kann. Eine erhöhte Erregung der Amygdala, welche z. B. durch Stress ausgelöst werden kann, steht im Tiermodell und beim Menschen in Verbindung mit erhöhtem angstähnlichen Verhalten bzw. Depressionen [166, 167, 215]. Weiterhin wurde bereits mehrfach beschrieben, dass angstähnliches Verhalten im Tiermodell von einer erhöhten Dornendichte in verschiedenen Nuclei der Amygdala begleitet wird [119, 120, 206]. Die erhöhte Gesamtzahl dendritischer Dornen im BL sowie die erhöhte Dornendichte in beiden hier untersuchten Nuclei können also als morphologische Korrelate zu einem erhöhten angstähnlichen Verhalten der 5-Htt KO-Mäuse gedeutet werden. Im La waren Unterschiede in der Dornendichte $_{VO}$ besonders an Basaldendriten zweiter und dritter Ordnung zu beobachten. Auf eine ver-

änderte Serotoninhomöostase reagieren also ganz bestimmte dendritische Kompartimente der Pyramidenzellen im La, was nur durch die separate Analyse der Verzweigungsordnungen herausgefunden werden konnte. Dieses Wissen kann in weiterführenden Studien dafür genutzt werden, um den Ursprung möglicher spezifischer Eingangsprojektionen und deren Relevanz für verschiedene Verhaltensphänomene zu untersuchen.

Interessanterweise wurde im IL gezeigt, dass Pyramidenzellen nicht gestresster 5-Htt KO im Vergleich zu WT-Mäusen tendenziell eine geringere Dornendichte aufweisen, was auf eine herabgesetzte Aktivität dieses Areals hindeutet [137, 138]. Diese Resultate gehen mit Beobachtungen konform, dass Träger der kurzen Variante der *5-HTTLPR* eine herabgesetzte Aktivität des ventromedialen PFC sowie eine erhöhte Aktivität der Amygdala aufwiesen [31, 159]. Doch welche Prozesse könnten sich auf molekularer Ebene abspielen, sodass eine erhöhte Dornendichte und eine damit einhergehende Übererregbarkeit des La und BL eintritt?

Trägt man Auszüge einer Modellvorstellung von Bennett [16] sowie Befunde von Li und Kollegen [93, 94] zusammen, wäre Folgendes denkbar: (1) ist auf Grund eines 5-Htt KO oder eines genetischen Polymorphismus der 5-Htt bzw. 5-HTT gar nicht bzw. weniger effizient, kann dies eine Erhöhung der 5-HT_{2C} u. a. im La und BL bedingen [16, 94]. (2) es ist bekannt, dass 5-HT_{2C} die Effektivität der NMDAR erhöhen können. Auf Grund des erhöhten Vorkommens der 5-HT_{2C} bei 5-Htt KO-Mäusen steigt also bei 5-HT-Freisetzung die Aktivität der NMDAR an und die mit diesen Rezeptoren verknüpften Ca²⁺- und CAMK-abhängigen Signalkaskaden können die vermehrte Bildung dendritischer Dornen der Pyramidenzellen im La und BL von 5-Htt KO-Mäusen begünstigen [16, 191], was dann den angsthähnlichen Phänotyp dieser Mäuse bedingt. Diese Modellvorstellung wird zusätzlich dadurch untermauert, dass ein Defizit einer Untereinheit des NMDAR, das mit einer geringeren Aktivität der Pyramidenzellen einhergeht, auch mit einer geringeren Dornendichte im BLA im Vergleich zur Kontrollgruppe zusammenhängt [126]. Da 5-HT_{1A} die Aktivität der NMDAR erniedrigen [16], wäre ebenso ein herabgesetztes Vorkommen des 5-HT_{1A} bei 5-Htt KO-Mäusen ein möglicher Grund für die vermehrte Dornenbildung der Pyramidenzellen des La und BL. Allerdings wurde ein geringes Vorhandensein der 5-HT_{1A} u. a. im Hypothalamus oder im BM, jedoch nicht im La und BL nachgewiesen [93]. Daher scheint die erhöhte Dichte der dendritischen Dornen an Pyramidenzellen im La und BL von 5-Htt KO-Mäusen und damit eine Übererregbarkeit dieser Nuclei eher von 5-HT_{2C} als von 5-HT_{1A} abzuhängen.

28.3 Auswirkungen von Stress auf die dendritische Morphologie

Die markantesten durch Stress bedingten morphologischen Veränderungen wurden ebenso an dendritischen Dornen von Pyramidenzellen nachgewiesen. Allerdings sind diese Ergebnisse statistisch betrachtet etwas weniger aussagekräftig. Wiederholter sozialer Stress führt, mit wenigen Ausnahmen, bei WT-Mäusen an denselben dendritischen Kompartimenten zu gleichartigen Erhöhungen der Gesamtzahl der dendritischen Dornen, der Gesamtdornendichte sowie der Dornendichte_{VO}, die auch bei nicht gestressten 5-Htt KO- im Vergleich zu WT-Mäusen gefunden wurden. Mit wenigen Ausnahmen konnten keine durch Stress bedingten Veränderungen bei 5-Htt KO-Mäusen nachgewiesen werden. Folglich unterschieden sich gestresste WT-, 5-Htt KO- und nicht gestresste 5-Htt KO-Mäuse bzgl. ihrer neuronalen Morphologie nahezu nicht. Da Stress bei WT-Mäusen – ähnlich einem 5-Htt KO – mit einer erhöhten extrazellulären 5-HT-Konzentration im BLA [80] und mit einem erhöhten angstähnlichen Verhalten einhergeht [75], könnten die NMDAR-abhängigen Mechanismen, welche die Veränderungen der dendritischen Morphologie bei gestressten WT-Mäusen erzeugen, jenen bei 5-Htt KO-Mäusen gleichen. Allerdings muss hierbei beachtet werden, dass 5-Htt KO-Mäuse während ihrer gesamten Entwicklung eine veränderte 5-HT-Homöostase besitzen, und WT-Mäuse im Rahmen dieser Arbeit einer kurzzeitigen, wiederholten sozialen Stresserfahrung ausgesetzt wurden.

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Resultate weichen bei grober Betrachtung von denen einer Studie von Wellman und Kollegen [210] ab: hier wurden WT- und 5-Htt KO-Mäuse einem Stressparadigma in Form von Angstkonditionierung mit anschließender Extinktion und Extinction Recall ausgesetzt. Diese Mäuse wurden innerhalb einer Stunde nach Vollendung der Tests des Extinction Recalls geopfert. Die morphologische Analyse der Pyramidenzellen ergab im BLA gestresster 5-Htt KO-Mäuse, im Vergleich zu gestressten WT-Mäusen, eine erhöhte Dornendichte an Dendriten erster bis vierter Ordnung, was von den in der vorliegenden Arbeit erzielten Resultaten abweicht.

Zur Erläuterung dieser unterschiedlichen Befunde, wird ein aktuelles Modell von Roozendaal und Kollegen herangezogen, nach welchem der zeitliche Rahmen einer Stressexposition unterschiedliche Auswirkungen auf die morphologischen Veränderungen von Pyramidenzellen haben kann [165]: akuter Stress soll eine durch GABAerge Neurone vermittelte Desinhibierung glutamaterger Synapsen im BLA herbeiführen, was zu neuronaler Plastizität und einer damit einhergehenden initialen Dornenbildung sowie erhöhtem angstähnlichen Verhalten führen kann (s. auch [164]). Eine wiederholte Stressexposition führt dann zu einer vermehrten Dornenbildung und schließlich zu Veränderungen der dendritischen Komplexität. Andererseits kann eine Erholungsphase nach der Stressexposition

die morphologischen Veränderungen zum Beispiel im mPFC umkehren [56, 156]. Folglich können morphologische Veränderungen von der Stressart (akut vs. wiederholt) sowie dem zeitlichen Rahmen, in welchem die Tiere nach einer Stressexposition geopfert bzw. untersucht werden (1 Stunde vs. 7 Tage), abhängen. Daher sollten die in dieser Arbeit erzielten Resultate nicht mit denen von Wellman und Kollegen [210] gleichgesetzt werden, da sowohl die experimentellen Konditionen als auch Analysemethoden beider Studien (u. a. separate Analyse des La und BL in dieser Arbeit vs. Analyse des BLA bei Wellman und Kollegen) stark voneinander abweichen.

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Resultate dokumentieren, dass sich Dendriten der Pyramidenzellen im La und BL nach wiederholter Stresserfahrung nur bei WT-Mäusen umbilden. Bei 5-Htt KO-Mäusen wurden nach Stress lediglich geringe bzw. keine Veränderungen der neuronalen Plastizität gefunden. Anhand von Verhaltensuntersuchungen wurde belegt, dass gestresste 5-Htt KO- im Vergleich zu nicht gestressten 5-Htt KO- und gestressten WT-Mäusen ein signifikant erhöhtes angstähnliches Verhalten zeigen [75]. Diese Studien scheinen der oben aufgestellten Hypothese, dass eine erhöhte Dornendichte im La und BL ein morphologisches Korrelat von erhöhtem angstähnlichen Verhalten sei, entgegenzustehen. Allerdings könnten die Veränderungen der Dornendichte auch neuroadaptive Mechanismen sein, um Stresserfahrungen entgegen zu können. Hierbei könnten zusätzliche Mechanismen, die auf morphologischer Ebene nicht erfasst wurden, gleichzeitig ablaufen und somit können nicht adäquate Reaktionen auf einen Stressor vermieden werden. 5-Htt KO-Mäuse zeigen auf Grund des 5-Htt Defizits bereits von Geburt an einen dem gestressten WT gleichen morphologischen Zustand der Pyramidenzellen im La und BL, welcher von einem angstähnlicherem Zustand im Vergleich zu nicht gestressten WT-Mäusen begleitet wird. Bei 5-Htt KO-Mäusen führt Stress zu keiner deutlichen Neuroplastizität der Pyramidenzellen, was bedeuten kann, dass bei diesen Mäusen keine weiteren Kompensationsmechanismen, im Sinne von Dornenneubildung, ablaufen können, was sich dann in den entsprechenden Verhaltensweisen äußert. Auch Roozendaal und Kollegen sind der Ansicht, dass es noch weiterer Klärung bedarf, ob bestehende morphologische Veränderungen in der Amygdala ein Indiz für schlecht angepasste Funktionsweisen seien oder ob solche Veränderungen aus Anpassungseffekten in Folge von Stress resultieren [165].

29 Interaktionen des serotonergen und dopaminergen Systems mit NPY-Neuronen im La und BL von Ratten

Die in dieser Arbeit erzielten Resultate liefern detaillierte neue Erkenntnisse über die Interaktionen monoaminerg afferenz mit der für anxiolytische Effekte besonders bedeutsamen Subpopulation NPY-produzierender inhibitorischer Interneurone im La und BL von Ratten. Zum einen wurden synaptische Kontakte und Membrananappositionen serotonerger bzw. dopaminerg afferenz und NPY-ir Strukturen nachgewiesen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass NPY-Neurone eine differentielle 5-HTR-Expression aufweisen. Die einzelnen in dieser Arbeit erhobenen Befunde werden im Folgenden genauer erörtert.

29.1 Morphologie der NPY-Neurone

Sowohl in licht- als auch elektronenmikroskopischen Präparaten wurden fusiforme und runde NPY-ir Somata zu gleichen Anteilen sowohl im La als auch im BL nachgewiesen, die, aus morphologischer Sicht, zwei bisher noch nicht beschriebene unterschiedliche Populationen innerhalb der NPY-Neurone darstellen. Die fusiformen und runden NPY-ir Somata unterscheiden sich vermutlich nicht nur bzgl. deren Morphologie, sondern auch bzgl. der Expression weiterer Neuropeptide bzw. calciumbindender Proteine. Dies kann in weiteren Untersuchungen in Anlehnung an die Veröffentlichungen von McDonald und Kollegen weiter verfolgt werden. Weiterhin wäre es interessant zu untersuchen, ob diese beiden Populationen unterschiedliche Zielstrukturen (z. B. Pyramidenzellen vs. Interneurone), oder eine unterschiedliche Rezeptorausstattung besitzen. Leider ließen die entsprechenden Kolokalisationsexperimente keine exakte Unterscheidung zwischen runden und fusiformen NPY-Somata zu, da hier deren Morphologie in vielen Fällen nicht eindeutig bestimmt werden konnte.

Alle NPY-ir Terminale, die im La und BL gefunden wurden, bildeten symmetrische bzw. nicht eindeutig identifizierbare synaptische Kontakte mit unmarkierten Dendriten und Somata aus. Mit den hier eingesetzten Methoden konnte jedoch nicht bestimmt werden, ob es sich bei diesen Präsynapsen um Terminale intrinsischer NPY-Neurone oder um Projektionen aus anderen Arealen, z. B. dem Locus caeruleus, handelte. Die symmetrischen synaptischen Kontakte bestätigen jedoch den inhibitorischen Charakter der NPY-Neurone, da es sich bei diesen Gray Typ II Synapsen fast ausschließlich um inhibitorischen Kontakte handelt [17] und keine Gray Typ I Synapsen (meist exzitatorisch) gefunden wurden.

29.2 Serotonerge Innervation der NPY-Neurone

Die lichtmikroskopischen Analysen zeigen, dass im La und BL nahezu 100% der NPY-ir Somata serotonerge Appositionen besitzen. In beiden Nuclei werden runde und fusiforme NPY-Somata gleichermaßen von serotonergen Appositionen erreicht. Mittels ultrastrukturellen Analysen wurden synaptische Kontakte und direkte Membranappositionen zwischen serotonergen Afferenzen und sowohl runden als auch fusiformen NPY-Somata bewiesen. Eines der identifizierten runden NPY-ir Somata bildete einen somatischen Dornen aus, der mit einem serotonergen Terminal einen symmetrischen synaptischen Kontakt formte. Solche somatischen Dornen wurden bereits in anderen ultrastrukturellen Analysen, sowohl an Neuronen in der Amygdala [9] als auch im Nucleus caudatus [44], nachgewiesen. Hierbei handelt es sich um Auswüchse der Somata, die wahrscheinlich, genau wie dendritische Dornen, eine spezielle Struktur zur Aufnahme synaptischer Eingangsinformationen darstellen. Neben perisomatischen Appositionen wurden auch Kontakte serotonerger Afferenzen an proximalen Dendriten vieler NPY-ir Neurone beobachtet. Mit den hier verwendeten Methoden konnte leider nicht untersucht werden, ob bzw. wie intensiv diese Afferenzen auch distale Kompartimente der NPY-ir Neurone innervieren, da durch die NPY-Immunreaktionen diese Strukturen nicht vollständig dargestellt werden konnten. Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde belegen jedoch eindeutig synaptische Kontakte zwischen serotonergen Afferenzen und NPY-ir Somata. Diese perisomatischen Kontakte weisen auf einen direkten Einfluss serotonerger Afferenzen auf die Zielneurone hin, da eine dem Soma nahe Signaltransduktion metabolische Prozesse im Zellkörper unmittelbar initiieren kann.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse deuten des Weiteren darauf hin, dass NPY-ir Somata im BL ausschließlich von Typ D Axonen aus dem DR innerviert werden, da entsprechende immunhistochemische Markierungen mit 5-HT-Antikörpern am Lichtmikroskop keine Typ M Axone in unmittelbarer Umgebung von NPY-ir Somata aufzeigten. Dies rechtfertigt die Verwendung von 5-Htt-Antikörpern, mit welchen auch die Morphologie der Typ D Axone wesentlich besser zur Geltung kommt, da 5-Htt in hoher Dichte an den Membranen der Typ D Fasern lokalisiert sind. Das in dieser Arbeit beobachtete Verteilungsmuster der Typ M Axone stimmt mit dem von Vertes und Kollegen [204] beschriebenen überein: beispielsweise wurden hier im La auch keine Typ M Axone nachgewiesen. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass nur serotonerge Projektionen aus dem DR die NPY-ir Somata im La und BL beeinflussen. In diesem Zusammenhang sind die Befunde von Mamounas und Kollegen sehr interessant, die belegen, dass Typ D Axone, jedoch nicht Typ M Axone, die z. B. an der Verarbeitung von Lern- und Gedächtnisprozessen (Langzeitpotenzierung) beteiligt sind [204], für stimmungsverändernde

Psychopharmaka wie PCA vulnerabel sind [100]. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass bestimmte Typ D Projektionen aus dem DR neuronale Schaltkreise beeinflussen, die für die Prozessierung von Emotionen in der Amygdala relevant sind. Unter diesen Projektionen befinden sich wahrscheinlich auch solche, die NPY-Neurone im La und BL gezielt innervieren.

In den lichtmikroskopischen Analysen wurden die Typ D Afferenzen weiter differenziert, nämlich in solche, die in unmittelbarer Nähe der NPY-Somata Varikositäten besitzen bzw. völlig glatt sind. In beiden untersuchten Nuclei bildeten varköse Fasern wesentlich häufiger Appositionen mit NPY-ir Somata aus als glatte Fasern. Bei den glatten Fasern handelt es sich um Typ D Axone, die im weiteren Verlauf der oben beschriebenen Morphologie von Typ D Axonen entsprechen. Wahrscheinlich sind Typ D Axone an den Abschnitten, an welchen keine 5-HT-Ausschüttung vorgesehen ist, nicht mit Varikositäten ausgestattet, was einem Neuron sowohl räumliche als auch energetische Vorteile bringt. An den lichtmikroskopisch identifizierten Appositionen zwischen glatten serotonergen Afferenzen und NPY-ir Somata ist also eine neurochemische Transmission eher unwahrscheinlich.

Unter Verwendung von 5-HT-Antikörpern fiel auf, dass sowohl am Licht- als auch am Elektronenmikroskop die immunhistochemische Signalintensität sehr schwach war. Dies hängt möglicherweise damit zusammen, dass während einer Perfusion, bei der eine Vorspüllösung eingesetzt wurde, 5-HT sehr schnell von den Axonen exozytiert wird. Mittels bereits durchgeführter Perfusionen, bei denen keine Vorspüllösung verwendet wurde, wurden deutlich bessere Resultate erzielt. Dieses Gewebe kann für zukünftige Analysen verwendet werden. Trotz des schwachen 5-HT-Signals wurden während der elektronenmikroskopischen Untersuchungen häufig NPY-ir Somata entdeckt, die von 5-HT-ir Strukturen kontaktiert wurden. Dies untermauert zusätzlich den relativ hohen Einfluss von 5-HT auf NPY-Neurone.

29.3 Dopaminerge Innervation der NPY-Neurone

Um dopaminerge Afferenzen nachzuweisen, wurde ein monoklonaler Antikörper gegen TH verwendet. Diese Wahl erscheint auf den ersten Blick unspezifisch, da TH auch zur Synthese von Noradrenalin und Adrenalin notwendig ist und folglich sowohl in noradrenergen als auch adrenergen Neuronen vorkommt. In einer detaillierten immunhistochemischen Studie wurde dokumentiert, dass im La und BL mit einem monoklonalen TH-Antikörper nahezu ausschließlich dopaminerge Fasern detektiert werden [7]. Daher ist für die in dieser Arbeit untersuchten Fragestellungen die Verwendung dieses Antikörpers durchaus gerechtfertigt. Bei den TH-ir Afferenzen, welche im La und BL Appositionen mit NPY-ir Neuronen ausbilden, handelt es sich um Typ A Fasern, für die eine feine und glatte Morphologie mit

schmalen Varikositäten charakteristisch ist. In den hier untersuchten Präparaten konnten diese Axontypen ebenso nachgewiesen werden. Typ A Fasern innervieren z. B. im La, BL und Ce von Ratten hauptsächlich dendritische Dornen und gelegentlich einige Somata [8]. Im BL wurden am Lichtmikroskop wesentlich mehr Appositionen zwischen TH-ir Afferenzen und NPY-ir Somata gezählt als im La, wobei an fusiformen und runden NPY-ir Somata gleich viele Appositionen nachgewiesen wurden. Auch die Anzahl der Appositionen pro NPY-ir Soma war im BL signifikant höher als im La. Dies könnte darauf hindeuten, dass NPY-Neurone im BL stärker von dopaminergen Projektionen beeinflusst werden. Diese Resultate scheinen jedoch eher damit zusammenzuhängen, dass die TH-Faserdichte im BL höher als im La ist (s. auch [8]).

Im BL wurden bereits direkte Membranappositionen zwischen TH-ir Afferenzen und NPY-ir Somata elektronenmikroskopisch nachgewiesen [9]. In dieser Arbeit wurden Membranappositionen zwischen TH- und NPY-ir Strukturen im La und BL bestätigt, was Interaktionen zwischen diesen Systemen zusätzlich untermauert. Des Weiteren projizieren TH- und NPY-ir Terminale im La und BL auf gemeinsame Zielstrukturen, wobei hier nicht bestimmt werden kann, ob es sich um intrinsische NPY-Terminale handelt. Wenn man die Rezeptorausstattung (DrdR und YR) dieser Zielneurone kennen würde, würde man detailliertere Einblicke erhalten, wie Dopamin und NPY diese modulieren können. Während der ultrastrukturellen Analysen wurden trotz einer spezifischen und intensiven Markierung von TH-ir Afferenzen keine Kontakte zwischen diesen und NPY-ir Somata gefunden. Dies bestätigt, worauf die lichtmikroskopischen Untersuchungen bereits hingedeutet haben, nämlich, dass der Einfluss des dopaminergen Systems auf NPY-Neurone relativ gering ist.

29.4 Vergleich der serotonergen und dopaminergen Innervation der NPY-Neurone

Die licht- und elektronenmikroskopischen Befunde deuten darauf hin, dass NPY-ir Somata wesentlich intensiver von serotonergen als dopaminergen Afferenzen kontaktiert werden, da deutlich mehr serotonerge als dopaminerge Kontakte mit NPY-ir Somata nachgewiesen wurden. Dies trifft sowohl auf den La als auch auf den BL zu. Im Gegensatz zu dopaminergen Afferenzen bilden serotonerge Afferenzen oft perizelluläre Körbe um NPY-Neurone, was ebenso dafür spricht, dass der wichtige perisomatische serotonerge Einfluss auf NPY-Neurone höher als der dopaminerge ist. Diese Beobachtungen schließen eine mögliche, intensive dopaminerge Innervation distaler Kompartimente der NPY-Neurone selbstverständlich nicht aus. Auch in anderen lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden keine

perizellulären Körbe von TH-ir Fasern um NPY-ir Neurone im BLA [24], jedoch z. B. um CRF-ir Somata im Ce von Ratten gefunden [47]. CRF-Neurone werden im Ce mit angstgenerierenden Prozessen in Verbindung gebracht [66], wohingegen NPY-Neurone im La und BL anxiolytische Effekte besitzen [212]. Allerdings scheint auch ein zusätzlicher, möglicherweise geringerer, Einfluss von 5-HT auf CRF-Neurone vorhanden zu sein [9, 47]. Smialowska und Kollegen postulieren, dass Dopamin in der laterobasalen Amygdala die Biosynthese von NPY reguliert, da hier eine Denervierung dopaminergere Afferenzen zur Anregung der NPY-Synthese führt [183]. Eine Dopaminausschüttung im La und BL scheint also die NPY-Synthese herabzusetzen, was für anxiogene Effekte von Dopamin in diesen Nuclei sprechen würde. Bei diesen Prozess sollen besonders Drd_1 und Drd_2 involviert sein [182]. Über das serotonerge System wird eher die NPY-Freisetzung in der Amygdala reguliert, da sich nach einer Blockade der serotonergen Transmission weder die Expression der NPY mRNA noch die NPY-IR in der Amygdala ändert [182]. Folglich scheinen das serotonerge sowie das dopaminerge System die NPY-Neurone im La und BL unterschiedlich zu modulieren und können vermutlich verschiedene Aspekte anxiolytischer Effekte beeinflussen. Um diese funktionellen Zusammenhänge besser verstehen zu können, müssen weiterführende Studien durchgeführt werden, in welchen die Serotonin- und Dopaminrezeptorexpression von NPY- und CRF-Neuronen sowie anderen neuronalen Populationen in der Amygdala detailliert untersucht werden. Hierzu wurden bereits einige aufschlussreiche Befunde erhoben (s. 29.5, [47]).

29.5 5-HTR-Expression der NPY-Neurone

Die Signale aller in dieser Arbeit eingesetzten cRNA-Sonden stimmten unter Verwendung der optimalen ISH-Variante mit den Verteilungsmustern entsprechender Literaturstellen (s. Tab. 8) überein. Die Resultate der Koexpressionsstudien zeigen erstmalig, dass eine Teilpopulation der NPY mRNA-positiven Neurone im La und BL 5-HT_{1A} und/oder 5-HT_{2C}, jedoch nicht 5-HT₃ koexprimieren. Es ist bereits bekannt, dass auch andere interneuronale Population sowie Pyramidenzellen des BLA mit verschiedenen 5-HTR ausgestattet sind: beispielsweise koexprimieren ca. 70 % der Pyramidenzellen und knapp 90 % der PV-Neurone 5-HT_{1A}-ir [12]. Ein Großteil PV-ir Neurone ist auch mit 5-HT_{2A} ausgestattet [77]. Bezüglich des 5-HT₃ wiesen Mascagni und McDonald nach, dass im BLA nahezu alle 5-HT₃-ir Neurone auch GABA-ir sind. Bei diesen Untersuchungen beobachteten sie keine Kolokalisation von 5-HT₃- und SOM-IR [105], was insofern mit den in der vorliegenden Arbeit erzielten Resultaten konform geht, dass NPY-ir Neurone zu fast 100 % SOM-ir sind [111].

29.5.1 Erörterung der eingesetzten Methoden

Um eindeutige Resultate für die Koexpressionsanalysen zu erhalten, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine neue Variation der ISH-Mehrfachmarkierung zum Nachweis von hoch bzw. gering exprimierten mRNAs entwickelt, bei welcher die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen und einem Chromogen kombiniert wurde. Hierbei wurden die verschiedenen Komponenten aller verwendeten Detektionssysteme optimiert (s. 23.7). Da die Sensitivität der HS- und MS-TSA-FISH für die hoch bis moderat exprimierten NPY- und 5-HT_{2C}-Sonden ausreichend war, wurden für entsprechende Kolokalisationsexperimente doppel-FISH eingesetzt. Da 5-HT_{1A}, 5-HT₃ und Drd₂ mRNA nur durch CISH mit ausreichender Sensitivität und vor allem Spezifität nachgewiesen werden konnten, wurden die entsprechenden Kolokalisationsexperimente mit der Kombination HS-TSA-FISH/CISH durchgeführt. Für Dreifachmarkierungen wurde NPY mRNA über LS-TSA-FISH, 5-HT_{2C} mRNA über HS-TSA-FISH und 5-HT_{1A} über CISH nachgewiesen. Die DrdR-Expression der NPY-Neurone konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden, da die Sensitivität der verwendeten ISH-Methoden nicht ausreichend war. In folgenden Experimenten müssen alternative Methoden getestet werden, um das optimale Detektionssystem für diese cRNA Sonden zu ermitteln.

Zur Bestimmung der Monoaminrezeptorausstattung der NPY-Neurone wurden keine immunhistochemischen Markierungen durchgeführt, da die Spezifität entsprechender Antikörper oft fraglich ist [106]. Außerdem können Neuropeptide und Rezeptoren nicht nur an den Somata sondern auch an distalen Fortsätzen lokalisiert sein. In solchen Fällen hätten Koexpressionen mittels immunhistochemischer Markierungen sicherlich nicht mit einer vergleichbar guten Erfolgsrate nachgewiesen werden können, da die subzelluläre Lokalisation viel 5-HTR in der laterobasalen Amygdala noch nicht vollständig bekannt ist. Im Gegensatz hierzu befindet sich mRNA im Bereich der Somata, wodurch die Koexpression verschiedener mRNAs eines Neurons analysiert werden kann. Ein Nachteil des Nachweises von mRNA besteht allerdings darin, dass weder die Synthese, noch die subzelluläre Lokalisation des entsprechenden Proteins ermittelt werden kann. Daher sind die ISH-Befunde der vorliegenden Arbeit als Hinweise auf das Vorhandensein spezifischer Rezeptormoleküle einzuordnen, und können als Grundlage weiterer morphologischer und funktioneller Studien dienen, die nun gezielt durchgeführt werden können.

Anstatt der CISH hätte man zum Nachweis der gering exprimierten mRNAs auch ein TSA-System mit zusätzlicher Signalverstärkung und einem entsprechenden fluoreszierenden Substrat einsetzen können, wie es bereits von Breininger und Baskin verwendet wurde [22]. Allerdings müssen für diese schnell ablaufende Reaktion die Inkubationszeiten genau angepasst werden, um unspezifische Hintergrundfärbungen möglichst gering zu halten.

Der Vorteil der in dieser Arbeit eingesetzten CISH ist, dass durch den langsamen Verlauf der Entwicklungsreaktion mit NBT/BCIP diese kontrolliert ablaufen und zum optimalen Zeitpunkt beendet werden, wodurch man ein Signal erhält, das völlig frei von unspezifischen Hintergrundfärbungen ist.

Weiterhin gibt es auch die Möglichkeit drei oder mehr mRNAs auf einem Gewebeschnitt über spezielle anorganische Nanopartikel, sogenannte „Quantum dot Fluorophore“, zu markieren, welche ein sehr geringes Emissionsspektrum besitzen und eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen [34]. Die Verwendung dieser Systeme sind jedoch mit einem sehr hohen Maß an Kosten verbunden. Zum einen sind die entsprechenden Quantum dot Fluorophore sehr teuer, die mikroskopische Auswertung sollte an einem konfokalen Laser-mikroskop erfolgen, und es müssen entsprechende Bandpassfilter vorhanden sein. Bei der in der vorliegenden Arbeit etablierten Methode handelt es sich um eine nicht-radioaktive, reproduzierbare und kostengünstige Variante der Mehrfach-ISH, mit der die untersuchten mRNAs mittels konventioneller Fluoreszenz- und Lichtmikroskopie ebenfalls spezifisch und mit hoher Sensitivität nachgewiesen werden konnten. Wenn man die wenigen Punkte, in welchen diese Methode etwas anfällig ist, kennt und beachtet, stellt diese neue Variation der ISH-Mehrfachmarkierung, bei welcher der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen und einem Chormogenen kombiniert wurde, eine wichtige methodische Entwicklung dar, mit der nicht nur die Rezeptorausstattung bestimmter neuronaler Populationen, sondern auch Koexpressionen einer Vielzahl anderer mRNAs in unterschiedlichem Gewebe nachgewiesen werden können.

29.6 Funktionelle Zusammenhänge

Obwohl die Befunde der vorliegenden Arbeit nur kleine Puzzleteile für das Verständnis der Funktionen der laterobasalen Amygdala im Rahmen von Emotions-Netzwerken liefern, soll im Folgenden kurz der Versuch unternommen werden, diese Daten im Kontext mit Literaturdaten in ein funktionelles Konzept zur möglichen Wirkung von Serotonin auf bestimmte Zielneurone einzuordnen, aus dem sich Hypothesen für künftige Untersuchungen generieren lassen. Als Grundlage der funktionellen Betrachtungen sollen gut fundierte und weitgehend akzeptierte Daten zur Morphologie, Neurochemie und Funktionalität verschiedener Zellpopulationen und Transmittersysteme der laterobasalen Amygdala dienen. So wird generell eine erhöhte Aktivität von Pyramidenzellen der laterobasalen Amygdala als Korrelat erhöhter, meist negativer, Emotionalität betrachtet (s. oben, [166, 167, 215]). Die Erregbarkeit der Pyramidenzellen wird u. a. von inhibitorischen GABAergen Interneuronen reguliert [157]; eine GABA-Freisetzung führt über GABA_A, die sowohl an Pyramidenzellen als auch interneuronen nachgewiesen wurden, zur Anxiolyse [108, 150].

Zahlreiche GABAerge Interneurone produzieren PV und bilden inhibitorische Synapsen besonders an Somata und proximalen Dendriten von Pyramidenzellen. NPY-Neurone gehören zu den nicht PV-reaktiven Interneuronen und scheinen eine besonders wichtige Funktion für anxiolytische Prozesse in der laterobasalen Amygdala zu haben. Sie stellen eine Subpopulation der somatostatinerger Neurone dar, die distale Dendriten und Dornen von Pyramidenzellen relativ dicht innervieren. Darüberhinaus findet sich somatostatinerge Innervation auch an Somata und proximalen Dendriten von Pyramidenzellen sowie an PV-ir Interneuronen.

Im Folgenden soll unter Einbeziehung der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse darauf eingegangen werden, wie das serotonerge System Neurone des La und BL, und speziell NPY-Neurone als identifizierte Zielneurone des serotonergen Systems, beeinflussen könnte.

29.6.1 Einfluss des serotonergen Systems auf die laterobasale Amygdala

Wie bereits erwähnt wurde, liefern verschiedene Studien, in welchen 5-HT_{1A}-Agonisten bzw. -antagonisten eingesetzt und Verhaltensexperimente durchgeführt wurden, oft kontroverse Befunde [40, 50, 82, 103, 114, 124]. Dies kann damit zusammenhängen, dass die pharmakologischen Substanzen auf verschiedene Arten, z. B. subkutan oder intravenös, appliziert wurden. Hierbei wirken sie auf die entsprechende gesamte Rezeptorpopulation bzw. nur auf einen bestimmten Anteil. Es kann nicht vorhergesagt werden, ob die Substanzen an prä- und/oder postsynaptischen Rezeptoren wirken und in welchen Arealen sie tatsächlich ankommen und wirken. Dass die Effekte pharmakologischer Substanzen wesentlich vom Applikationsort, auch innerhalb des Gehirns, abhängen, wird in einem Übersichtsartikel von Menard und Treit detailliert erläutert [114]. Beispielsweise bewirkt eine direkte Applikation verschiedener 5-HT_{1A}-Agonisten (8-OH-DPAT, Ipsairone, Buspiron) in die Amygdala in unterschiedlichen Verhaltenstests zwar meistens anxiolytische Effekte, kann aber auch anxiogen wirken oder gar keine angstähnlichen Verhaltenseffekte haben [114]. Die von der Norm abweichenden Effekte können mit der eben erwähnten Art der Applikation zusammenhängen oder damit, dass ineffektive, nicht physiologische Konzentrationen entsprechender Pharmaka verwendet wurden [114].

Es ist jedoch auch naheliegend, dass die Wirkung solcher Substanzen bzw. 5-HT ebenso davon abhängt, welche neuronalen Populationen (Pyramidenzellen vs. Interneurone) innerhalb einer bestimmten Region tatsächlich und in welchem Ausmaß aktiviert werden. Es wurde beispielsweise dokumentiert, dass eine akute 5-HT-Freisetzung im BL dazu führt, dass GABAerge Interneurone über 5-HT₂ aktiviert werden, was die Inhibition von Pyramidenzellen begünstigt [157]. Diese Inhibierung der Pyramidenzellen könnte u. a.

durch 5-HT_{2C} an NPY-Neuronen vermittelt werden. Laut Rodriguez und Kollegen [164] bedingt Stress, der auch von einer erhöhten 5-HT-Konzentration im BLA begleitet wird [4, 171], eine Dämpfung der inhibitorischen Kontrolle GABAerger Interneurone, wodurch die Aktivierung von Pyramidenzellen begünstigt wird. Dies könnte mit der Expression inhibitorischer 5-HT_{1A} an NPY- und anderen Interneuronen zusammenhängen. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass ca. 60 % der NPY-Neurone im La und BL 5-HT_{1A} und nur 30 bis 40 % 5-HT_{2C} mRNA ausbilden. Hiervon sind einige NPY-Neurone auch mit beiden 5-HTR ausgestattet, sodass man schlussfolgern kann, dass es nur relativ wenige NPY-Neurone gibt, die nur 5-HT_{2C} ausbilden. Die meisten NPY-Neurone bilden vermutlich nur 5-HT_{1A} bzw. beide 5-HTR aus.

Generell ist die Beobachtung, dass Neurone sowohl mit inhibitorischen 5-HT_{1A} als auch mit exzitatorischen 5-HT_{2C} ausgestattet sind, nicht abwegig. Beispielsweise wurde nachgewiesen, dass 5-HT_{1A} und 5-HT_{2C} an Pyramidenzellen des mPFC Gegenspieler bei der Regulation der NMDAR sind, wobei 5-HT_{1A} die Effizienz der NMDAR senken und 5-HT_{2A/C} diese erhöhen [214]. Des Weiteren dämpfen 5-HT_{2A/C} den Effekt des 5-HT_{1A} auf NMDAR [214]. Wie Stress- oder Angstinformationen im La und BL prozessiert werden, kann also durchaus von der zeitlichen und relativen Aktivität und Effektivität der 5-HTR an Pyramidenzellen und Interneuronen abhängen. Außerdem sind solche Prozesse auch wesentlich von der Art bzw. Dauer einer Stresssituation abhängig.

Es ist bekannt, dass die 5-HT-Konzentration während Stressphasen in der Amygdala von Ratten ansteigt [171]. Dieser Anstieg führt möglicherweise bei NPY-Neuronen, welche 5-HT_{1A} bzw. 5-HT_{1A} und 5-HT_{2C} ausbilden, in der initialen Stressphase zu deren Inhibierung, was eine Aktivierung vieler Pyramidenzellen ermöglicht, da der Großteil der NPY-Neurone, aber auch der PV-Neurone im La und BL, 5-HT_{1A} ausbildet. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass auch die meisten Pyramidenzellen mit 5-HT_{1A} ausgestattet sind [12]. Allerdings könnte die Desinhibierung dieser Projektionsneurone, bedingt durch den Ausfall der Inhibierung durch die Interneurone, einen größeren Einfluss auf die Pyramidenzellen haben als die inhibitorischen Signale, die in diesem Zeitfenster über den 5-HT_{1A} direkt an die Pyramidenzellen vermittelt werden.

Sobald im Verlauf einer Stresssituation die 5-HT-Konzentration einen bestimmten Schwellenwert überschritten hat, könnten somatodendritische 5-HT_{1A} an den Interneuronen desensibilisiert werden, was bereits im Hippocampus gezeigt wurde [11]. In diesem Fall könnte die erregende Wirkung des 5-HT_{2C}, der in einigen NPY-Neuronen zusätzlich zu 5-HT_{1A} exprimiert wird, überwiegen und Depolarisationen dieser Neurone begünstigen. Weiterhin depolarisieren auch die NPY-Neurone, die nur 5-HT_{2C} ausbilden. Der Abklang der serotonergen Neurotransmission und eine damit einhergehende Normalisierung der 5-HT-

Konzentration im La und BL könnte ebenso eine Aktivierung vieler NPY-Neurone begünstigen. NPY wird nun freigesetzt, bindet an den inhibitorischen und anxiolytisch wirkenden Y_1 der meisten Pyramidenzellen und begünstigt dann deren Hyperpolarisation. Zusätzlich könnten geringe 5-HT-Konzentrationen über 5-HT_{1A} der Pyramidenzellen zu deren Hyperpolarisation beitragen. Eine zeitlich differenzierte Wirkung der durch Stress vermittelten Erhöhung der 5-HT-Konzentration auf inhibitorische NPY-Neurone könnte folglich ein Mediator einer geregelten Abfolge von Hemmung und Enthemmung von Pyramidenzellen der laterobasalen Amygdala sein. Diese Vorgänge können zur Initiierung neuroplastischer Mechanismen, wie der Dornenbildung einerseits, und zur Dämpfung inadäquater Verhaltensreaktionen andererseits beitragen, wie bereits unter Punkt 28.3 als mögliche Regulations- und Kompensationsmechanismen zur Bewältigung von Stress vorgeschlagen wurde.

29.6.2 Kritische Betrachtung und offene Fragen

Die Darstellung der möglichen Beeinflussung der NPY-Neurone durch das serotonerge System spricht in gewisser Weise gegen die gängige Meinung, dass 5-HT_{1A} anxiolytisch wirken, da NPY-Neurone durch die Aktivierung von 5-HT_{1A} inhibiert werden und damit die Aktivierung von Pyramidenzellen begünstigt wird. Die reine Nettowirkung aller aktivierten 5-HT_{1A} kann im La und BL jedoch durchaus anxiolytisch sein und bezieht sich vermutlich eher auf die 5-HT_{1A} an Pyramidenzellen als auf jene an Interneuronen. Allerdings bleibt in Untersuchungen mit 5-HT_{1A} -Agonisten die Wirkung aller anderen Rezeptoren außen vor, was die realen Vorgänge im Gehirn nicht widerspiegelt. Das in dieser Arbeit aufgestellte Modell ist jedoch auch nur eine stark vereinfachte Hypothese, bei welcher eine Vielzahl von Faktoren nicht berücksichtigt wurden.

Beispielsweise ist die subzelluläre Lokalisation der 5-HT_2 an Pyramidenzellen bzw. Interneuronen der Amygdala noch nicht vollständig bekannt (Somata vs. proximale/distale Dendriten, prä- vs. postsynaptisch). Des Weiteren gibt es keine wissenschaftlichen Studien darüber, wie 5-HT_{1A} und 5-HT_{2C} in der Amygdala interagieren. Es wurde lediglich gezeigt, dass 5-HT_{1A} und 5-HT_{2C} an Pyramidenzellen des mPFC Gegenspieler bei der Regulation der NMDAR sind [214] und dass eine chronische Aktivierung von 5-HT_2 durch entsprechende Agonisten im anterioren cingulären Kortex, aber nicht in limbischen Hirnarealen, die Wirkung der 5-HT_{1A} dämpfen können [200]. Daher erschien es für den La und BL sinnvoll, ein Modell aufzustellen, in dem der 5-HT_{1A} nicht über den 5-HT_{2C} gedämpft wird.

Weiterhin müssten die Editierungsprofile der 5-HT_{2C} weiterführend untersucht werden. Es könnte sich dabei herausstellen, dass die 5-HT_{2C} der Interneurone mehr editiert werden,

und damit eine geringere Signaleffektivität als die 5-HT_{2C} der Pyramidenzellen besitzen [125], die evtl. gar nicht oder nur wenig editiert werden. Dies würde folglich bedeuten, dass Interneurone in geringerem Maße durch 5-HT_{2C} moduliert werden als Pyramidenzellen, was wiederum die anxiogene Wirkung der 5-HT_{2C} über Pyramidenzellen in der Amygdala erklären könnte.

Auch die Wirkung von 5-HT auf PV-Neurone, die nicht nur zum Großteil 5-HT_{1A} sondern auch 5-HT_{2A} ausbilden (s. oben) wurde nicht in dieses Modell integriert. PV-Neurone werden zusätzlich von SOM-, und damit auch von NPY-Neuronen, innerviert und exprimieren Y₁ [130, 169]. Rostowski und Kollegen stellten die Hypothese auf, dass NPY über Y₁ seine Wirkung über mindestens zwei Wege vermitteln kann, da Y₁ an Pyramidenzellen und Interneuronen nachgewiesen wurden [169]. Insgesamt ist die Betrachtung der Wirkung von 5-HT auf lediglich eine interneuronale Subpopulation nicht geeignet, um der Komplexität der neuronalen Schaltkreise im La und BL gerecht zu werden. Dennoch können die in dieser Arbeit erzielten Befunde und die daraus entwickelten Interpretationen zur Entwicklung experimentell prüfbarer Thesen führen.

Um die Gesamtwirkung der serotonergen Innervation auf alle Neurone im La und BL besser verstehen zu können, bedarf es darüber hinaus weiterer Rezeptorexpressionsanalysen aller in identifizierten Neuronen vorkommender 5-HTR. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass NPY-Neurone nicht mit 5-HT₃ ausgestattet sind, denen ein anxiolytischer Nettoeffekt nachgesagt wird. Folglich sind nicht nur NPY-Neurone sondern noch weitere neuronale Systeme an anxiolytischen Vorgängen beteiligt, wozu es bereits einige Befunde gibt: beispielsweise werden verschiedene Subpopulationen von Interneuronen, die Neurokinin 1 Rezeptor-ir sind und denen auch ein Teil der NPY-Neurone angehört, stark mit angstregulierenden Prozessen in Zusammenhang gebracht [198]. Weitere Kandidaten in der Amygdala sind Neurone, die das Neuropeptid S ausbilden [144].

Ein zusätzlicher Faktor, der diese Prozesse beeinflussen kann, stellen die serotonergen Neurone im DR dar. Es gibt Hinweise darauf, dass bestimmte serotonerge Neurone im DR, nämlich die im medialen und caudalen Bereich des dorsomedialen Raphekerns, an der Angst- und Stressregulation beteiligt sind [1]. Lowry und Kollegen konnten mittels retrograden Markern zeigen, dass der BL selektiv von Neuronen aus dem dorsalen Bereich des medial-rostrocaudalen DR innerviert wird [97]. Sie schlagen vor, dass verschiedene Untergruppen serotonerger Neurone den Beginn, die Aufrechterhaltung und die Beendigung einer Angstphase regulieren [97]. Es kann folglich durchaus sein, dass definierte Subpopulation dieser serotonerger Neurone gezielt NPY-Neurone im La und BL innervieren und anxiolytische sowie stressabhängige Prozesse modulieren. Allerdings darf auch nicht vernachlässigt werden, dass nicht nur das serotonerge System sondern z. B. auch

das noradrenerge und dopaminerge System die Neurone im La und BL beeinflussen.

30 Zusammenfassende Erörterung

Valerie Compaan hat sich in einem ihrer Artikel [41] mit möglichen Zusammenhängen zwischen Neuroplastizität, psychiatrischen Störungen und 5-HT_{1A} auseinandergesetzt und ihre Modellvorstellung eignet sich hervorragend als Grundgerüst für eine zusammenfassende Erörterung der in der vorliegenden Arbeit erzielten Befunde. Sie postuliert, dass das Gehirn bei bestimmten genetischen Veränderungen des serotonergen Systems seine adaptiven Ressourcen schon in der Entwicklung und unter Stressbedingungen „verbrennt“, und daher im Erwachsenenalter keine ausreichende Adaptionsflexibilität mehr besitzt. Hierbei betont sie, dass Neurone sich effektiv adaptieren, jedoch nur begrenzt kompensieren können. Die Grenzen dieser Anpassungsfähigkeit der Neurone angesichts sich ändernder, negativer Umweltbedingungen könnten dann eine „offene Tür“ für Verhaltensstörungen darstellen [41].

Auf die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde angewendet könnte eine Erhöhung der Dornendichte an Dendriten von Pyramidenzellen der laterobasalen Amygdala nach wiederholter Stresserfahrung eine neuroadaptive Reaktion hierauf darstellen. Dadurch sind wildtypische Tiere in der Lage, sich durch entsprechendes Verhalten dieser Stresssituation anzupassen. Die erhöhte Dornendichte könnte dabei die Ausbildung eines emotionalen Gedächtnisses repräsentieren, das eine schnelle und flexible Verhaltensantwort auf ein erneutes Auftauchen von Gefahr erlaubt, wie Rodriguez und Kollegen bereits vorgeschlagen haben [164]. Dabei ist die Erregbarkeit der Neurone offenbar so reguliert, dass das Verhalten unter nicht bedrohlichen Umständen „normal“ bleibt.

Eine solche Modulation der Erregbarkeit der laterobasalen Amygdala könnte beispielsweise über eine situationsentsprechende Hemmung des Outputs der Pyramidenzellen durch differentiell aktive inhibitorische Netzwerke erfolgen. Eine differentielle Aktivierung kann sowohl über unterschiedliche Rezeptorausstattungen, wie es in der Subpopulation der NPY-Neurone in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, als auch durch den selektiven Input weiterer Hirnareale, wie z. B. des DR [131] oder Hippocampus [23, 46, 132], stattfinden. Somit scheint eine selektive und situationsentsprechende Aktivierung der Interneurone möglich. Diese inhibitorischen Interneurone innervieren Pyramidenzellen sowohl perisomatisch, als auch an proximalen und distalen Dendriten [129]. Insbesondere für die SOM-Neurone, von denen eine Subpopulation NPY enthält, ist bekannt, dass sie vorwiegend an distalen Dendriten und Dornen inhibitorische Synapsen ausbilden [130], und damit die Fortleitung des exzitatorischen Input, der durch Synapsen an den Dornenköpfen vermit-

telt wird, blockieren können.

Rodriguez und Kollegen haben gezeigt, dass Stress die GABAerge Inhibition von Pyramidenzellen des BLA reduziert, und damit möglicherweise neuronale Plastizität, z.B. die Ausbildung zusätzlicher dendritischer Dornen, erleichtert, die, wie oben erwähnt, als Korrelat für die Ausbildung eines Gedächtnisses für aversive Stimuli betrachtet wird [164]. Die Autoren postulieren weiterhin, dass die GABAerge Transmission in der Amygdala als dynamischer Steuerungsmechanismus dazu dienen könnte, das Verhalten an sich ändernde Umweltbedingungen anzupassen, und dass Störungen dieser Mechanismen zu verstärkter und dysfunktioneller Emotionalität führen könnten. Eine differenzierte Hemmung der Pyramidenzellaktivität könnte also durchaus die Grundlage der relativen „Verhaltensnormalität“ von Wildtyp-Tieren nach Stress und von nicht gestressten 5-Htt-defizienten Mäusen bei erhöhter dendritischer Dornendichte sein. Die Verhaltensauffälligkeiten bei 5-Htt KO-Mäusen nach Stress könnten dann einerseits durch die Unfähigkeit bedingt sein, nach Aufhebung der Inhibition durch die Interneurone mit der Neubildung von Dornen zu reagieren, da die Dornendichte schon unter stressarmen Umweltbedingungen ihr Maximum erreicht hat. Andererseits könnte eine Fehlfunktion der differentiellen Inhibition durch Interneurone unter Stress dann die „offene Tür“ repräsentieren, die zu manifesten Auffälligkeiten im emotionellen Verhalten führt. Eine Ursache dafür könnten Imbalancen im genau geregelten Ablauf der serotonergen Transmission in der Amygdala unter Normalbedingungen bzw. unter Stress sein, die bei wildtypischen Tieren zur differentiellen Hemmung und Enthemmung der Pyramidenzellen durch Interneurone beiträgt. Diese Erörterung betont nochmals die Wichtigkeit, Interaktionen zwischen monoaminergen System und inhibitorischen Interneuronen weiterführend zu analysieren, und diesen neuronalen Netzwerken auch in Zukunft höchste Aufmerksamkeit zu schenken.

31 Ausblicke

Mit dieser Arbeit ist es gelungen zu zeigen, dass Stress sowie der 5-Htt-Genotyp die neuronale Morphologie und damit die Neuroplastizität im La und BL von Mäusen beeinflusst. In weiterführenden morphologischen Untersuchungen wäre es interessant zu sehen, ob diese durch Stress bedingten Veränderungen reversibel sind und wie bzw. ob sie sich im zeitlichen Verlauf verändern. Zusätzlich sollten Gehirne von heterozygoten 5-Htt KO-Mäusen für diese Untersuchungen herangezogen werden. Weiterhin könnte untersucht werden, wie sich verschiedene Arten von Stress (z. B. akut vs. chronisch) auf die neuronale Morphologie aller Gruppen auswirkt. Auch andere Tiermodelle, z. B. Tryptophanhydroxylase 2 KO-Mäuse, könnten für weiterführende Untersuchungen eingesetzt werden.

Weiterhin wurden in dieser Arbeit neue Erkenntnisse darüber erzielt, dass anxiolytisch wirkende NPY-Neurone im La und BL von Ratten durch monoaminerge Afferenzen und entsprechende Rezeptoren moduliert werden können. Diese Ergebnisse tragen, zusammen mit bereits bekannten Daten über die monoaminerge Innervation und Rezeptorausstattung von Pyramidenzellen als auch anderen interneuronalen Subpopulationen, zu einem besseren Verständnis für mögliche neuronale Verschaltungsmechanismen im La und BL von Ratten bei. Obwohl es mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden kann, wurde bis zum heutigen Zeitpunkt jedoch noch nicht nachgewiesen, ob tatsächlich intrinsische NPY-Neurone im La und BL auf Pyramidenzellen und weitere interneuronale Subpopulationen projizieren. Hier könnten nämlich auch NPY-Afferenzen z. B. aus dem Locus Coeruleus oder dem lateralen Septum beteiligt sein [65]. Dieser Fragestellung sollte mit Hilfe entsprechender ultrastruktureller Analysen auf den Grund gegangen werden.

An dieser Stelle kommt natürlich auch die Frage auf, inwiefern die hier erzielten Ergebnisse auf das menschliche Gehirn übertragbar sind und ob die Resultate für therapeutische Zwecke bei Stimmungsstörungen bzw. -erkrankungen relevant sein können. Es ist durchaus denkbar, dass unter Stressbedingungen ähnliche morphologische Veränderungen an Pyramidenzellen, wie sie bei Mäusen nachgewiesen wurden, auch im menschlichen Gehirn stattfinden. Weiterhin könnte die Dornendichte auch an Pyramidenzellen von Trägern der kurzen Variante der *5-HTTLPR* in der Amygdala erhöht sein. Darauf deuten Bindungsstudien an humanem Gehirnmaterial hin, in denen gezeigt wurde, dass homo- und heterozygote Träger der *5-HTTLPR* eine geringere Bindungsdichte gegenüber 5-HT_{1A} besitzen [43], was auf eine höhere Aktivität der NMDAR und eine Erhöhung der Dornendichte schließen lässt. Daher bestünde ein sinnvoller Ansatz für zukünftige Studien am Tiermodell darin, zu untersuchen, inwiefern pharmakologische Eingriffe in die Mechanismen, welche die Neubildung dendritischer Dornen begünstigen, das angstähnliche Verhalten nach Stresserfahrungen bei WT- und 5-Htt KO-Mäusen beeinflussen können. Hierzu gibt es bereits viele Untersuchungen bzgl. verschiedener Komponenten des serotonergen Systems. Weiterhin könnte man in die hochkomplexen, von NMDAR abhängigen, Signalwege eingreifen, die in einem aktuellen Übersichtsartikel von Takemoto-Kimura und Kollegen dargestellt sind [191].

Es wäre außerdem interessant, die Expression von 5-HT_{1A} und 5-HT_{2C} in NPY-Neuronen von WT- und 5-Htt KO-Mäusen zu untersuchen und alle Befunde mit neuroplastischen Vorgängen unter Stress zu korrelieren, die bei diesen Mäusen zur Verhaltensdekompensation führen kann.

32 Abschließende Gedanken

Verschiedene Arten von Depressionen werden meistens mit Medikamenten behandelt, die bestimmte Komponenten des serotonergen Systems, wie die Monaminoxidase oder den 5-HTT, hemmen, was die serotonerge synaptische Transmission erhöht. Zur Behandlung von Angststörungen werden oft Benzodiazepine eingesetzt, die den inhibitorischen Effekt GABAerger Interneurone verstärken [78]. Allerdings sind Depressionen und Angststörungen nicht völlig separat zu betrachten, sondern können einander bedingen. Hierbei ist auch Stress ein Faktor, der besonders in unserer Gesellschaft oft zur Entwicklung solcher Krankheiten beiträgt. Depressionen können, wie Stress, mit einer Übererregbarkeit der Amygdala einhergehen, die auf eine Verminderung der inhibitorischen Aktivität der Interneurone zurückzuführen sein kann [6].

Ein generelles Problem bei der Anwendung entsprechender Pharmaka und Therapien solcher Krankheitsbilder ist, dass es sich hierbei um multifaktorielle Erkrankungen handelt, bei denen sich die Symptome von Patient zu Patient unterscheiden können. Weiterhin sind hierbei neben der Amygdala noch weitere Hirnareale beteiligt und die Veränderungen im Gehirn können sich auf verschiedenen Ebenen abspielen: zum einen hängt die Entwicklung solcher Erkrankungen von Gen-Umwelt-Interaktionen ab und unterschiedliche äußere Einflüsse (z. B. akute/r vs. chronische/r Stress/Angst, physischer vs. psychischer Stress und daraus resultierende Angst) können verschiedene Auswirkungen auf die Morphologie der Neurone, Transmitterfreisetzung oder auf die Rezeptorausstattung und damit verbundenen regulatorischen Prozessen mit sich bringen. Alle Systeme im Gehirn können an den unterschiedlichsten Punkten moduliert werden, sind in hohem Maße plastisch und dadurch anpassungsfähig.

Auch zum heutigen Zeitpunkt muss noch viel über mögliche Wirkungsmechanismen verschiedener Pharmaka spekuliert werden, da noch immer nicht alle Bestandteile der neuronalen Netzwerke sowohl in der Amygdala als auch im gesamten Gehirn bekannt sind bzw. verstanden wurden. Allerdings ist das derzeitige Wissen schon so detailliert, dass viele Mechanismen im Gehirn sowie Wirkungsmechanismen pharmakologischer Substanzen verstanden sind, was dazu beiträgt, vielen Patienten zu helfen und dazu motiviert, an weiterführenden Fragestellungen zu forschen.

Literatur

- [1] ABRAMS, JK ; JOHNSON, PL ; HOLLIS, JH ; LOWRY, CA: Anatomic and functional topography of the dorsal raphe nucleus. In: *Ann N Y Acad Sci* 1018 (2004 Jun), S. 46–57
- [2] ADRIAN, TE ; ALLEN, JM ; BLOOM, SR ; GHATEI, MA ; ROSSOR, MN ; ROBERTS, GW ; CROW, TJ ; TATEMOTO, K ; POLAK, JM: Neuropeptide Y distribution in human brain. In: *Nature* 306 (1983 Dec 8-14), Nr. 5943, S. 584–586
- [3] AGNATI, LF ; ZOLI, M ; STROMBERG, I ; FUXE, K: Intercellular communication in the brain: wiring versus volume transmission. In: *Neuroscience* 69 (1995 Dec), Nr. 3, S. 711–726
- [4] AMAT, J ; MATUS-AMAT, P ; WATKINS, LR ; MAIER, SF: Escapable and inescapable stress differentially alter extracellular levels of 5-HT in the basolateral amygdala of the rat. In: *Brain Res* 812 (1998 Nov 23), Nr. 1-2, S. 113–120
- [5] ANSORGE, MS ; ZHOU, M ; LIRA, A ; HEN, R ; GINGRICH, JA: Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice. In: *Science* 306 (2004 Oct 29), Nr. 5697, S. 879–881
- [6] ARONIADOU-ANDERJASKA, V ; QASHU, F ; BRAGA, MFM: Mechanisms regulating GABAergic inhibitory transmission in the basolateral amygdala: implications for epilepsy and anxiety disorders. In: *Amino Acids* 32 (2007), Nr. 3, S. 305–315
- [7] ASAN, E: Comparative single and double immunolabelling with antisera against catecholamine biosynthetic enzymes: criteria for the identification of dopaminergic, noradrenergic and adrenergic structures in selected rat brain areas. In: *Histochemistry* 99 (1993 Jun), Nr. 6, S. 427–442
- [8] ASAN, E: Ultrastructural features of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive afferents and their targets in the rat amygdala. In: *Cell Tissue Res* 288 (1997 Jun), Nr. 3, S. 449–469
- [9] ASAN, E: *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*. Bd. 142: *The Catecholaminergic Innervation of the Rat Amygdala*. Springer Verlag, 1998
- [10] ASAN, E ; YILMAZER-HANKE, DM ; ELIAVA, M ; HANTSCH, M ; LESCH, KP ; SCHMITT, A: The corticotropin-releasing factor (CRF)-system and monoaminergic

- gic afferents in the central amygdala: investigations in different mouse strains and comparison with the rat. In: *Neuroscience* 131 (2005), Nr. 4, S. 953–967
- [11] ASSIE, MB ; LOMENECH, H ; RAVAILHE, V ; FAUCILLON, V ; NEWMAN-TANCREDI, A: Rapid desensitization of somatodendritic 5-HT_{1A} receptors by chronic administration of the high-efficacy 5-HT_{1A} agonist, F13714: a microdialysis study in the rat. In: *Br J Pharmacol* 149 (2006 Sep), Nr. 2, S. 170–178
- [12] AZNAR, S ; QIAN, Z ; SHAH, R ; RAHBEK, B ; KNUDSEN, GM: The 5-HT_{1A} serotonin receptor is located on calbindin- and parvalbumin-containing neurons in the rat brain. In: *Brain Res* 959 (2003 Jan 3), Nr. 1, S. 58–67
- [13] BAGDY, G ; GRAF, M ; ANHEUER, ZE ; MODOS, EA ; KANTOR, S: Anxiety-like effects induced by acute fluoxetine, sertraline or m-CPP treatment are reversed by pretreatment with the 5-HT_{2C} receptor antagonist SB-242084 but not the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY-100635. In: *Int J Neuropsychopharmacol* 4 (2001 Dec), Nr. 4, S. 399–408
- [14] BARNES, N ; SHARP, T: A review of central 5-HT receptors and their function. In: *Neuropharmacology* 38 (1999), S. 1083–1152
- [15] BENGEL, D ; MURPHY, DL ; ANDREWS, AM ; WICHEMS, CH ; FELTNER, D ; HEILS, A ; MOSSNER, R ; WESTPHAL, H ; LESCH, KP: Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (“Ecstasy“) in serotonin transporter-deficient mice. In: *Mol Pharmacol* 53 (1998 Apr), „emotionsähnlich“, Nr. 4, S. 649–655
- [16] BENNETT, MR: Synapse regression in depression: the role of 5-HT receptors in modulating NMDA receptor function and synaptic plasticity. In: *Aust N Z J Psychiatry* 44 (2010 Apr), Nr. 4, S. 301–308
- [17] BENNINGHOFF A, Drenckhahn D. (Hrsg.): *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, Band 1*. 16. Urban & Fischer Verlag München, 2003
- [18] BERGLUND, MM ; HIPSKIND, PA ; GEHLERT, DR: Recent developments in our understanding of the physiological role of PP-fold peptide receptor subtypes. In: *Exp Biol Med (Maywood)* 228 (2003 Mar), Nr. 3, S. 217–244

- [19] BLAKELY, RD ; BERSON, HE ; FREMEAU, RT J. ; CARON, MG ; PEEK, MM ; PRINCE, HK ; BRADLEY, CC: Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain. In: *Nature* 354 (1991 Nov 7), Nr. 6348, S. 66–70
- [20] BLOOM, FE: Integration of wiring transmission and volume transmission. In: *Prog Brain Res* 125 (2000), S. 21–26
- [21] BONN, M ; ASAN, E: Double in situ hybridization reveals differential expression of serotonin receptor subtypes in peptidergic neurons of the rat amygdala. In: *FENS Abstr.* (2010), Nr. 5
- [22] BREININGER, J F. ; BASKIN, D G.: Fluorescence in situ hybridization of scarce leptin receptor mRNA using the enzyme-labeled fluorescent substrate method and tyramide signal amplification. In: *J Histochem Cytochem* 48 (2000 Dec), Nr. 12, S. 1593–1599
- [23] BRINLEY-REED, M ; MASCAGNI, F ; McDONALD, AJ: Synaptology of prefrontal cortical projections to the basolateral amygdala: an electron microscopic study in the rat. In: *Neurosci Lett* 202 (1995 Dec 29), Nr. 1-2, S. 45–48
- [24] BRINLEY-REED, M ; McDONALD, AJ: Evidence that dopaminergic axons provide a dense innervation of specific neuronal subpopulations in the rat basolateral amygdala. In: *Brain Res* 850 (1999 Dec 11), Nr. 1-2, S. 127–135
- [25] BROWN, P ; MOLLIVER, ME: Dual serotonin (5-HT) projections to the nucleus accumbens core and shell: relation of the 5-HT transporter to amphetamine-induced neurotoxicity. In: *J Neurosci* 20 (2000 Mar 1), Nr. 5, S. 1952–1963
- [26] BROWN, SM ; HENNING, S ; WELLMAN, CL: Mild, short-term stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. In: *Cereb Cortex* 15 (2005 Nov), Nr. 11, S. 1714–1722
- [27] BUNIN, MA ; WIGHTMAN, RM: Paracrine neurotransmission in the CNS: involvement of 5-HT. In: *Trends Neurosci* 22 (1999 Sep), Nr. 9, S. 377–382
- [28] BURNS, CM ; CHU, H ; RUETER, SM ; HUTCHINSON, LK ; CANTON, H ; SANDERS-BUSH, E ; EMESON, RB: Regulation of serotonin-2C receptor G-protein coupling by RNA editing. In: *Nature* 387 (1997 May 15), Nr. 6630, S. 303–308
- [29] BUZNIKOV, GA ; LAMBERT, HW ; LAUDER, JM: Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. In: *Cell Tissue Res* 305 (2001 Aug), Nr. 2, S. 177–186

- [30] CAMPBELL, Brian M. ; MERCHANT, KM: Serotonin 2C receptors within the basolateral amygdala induce acute fear-like responses in an open-field environment. In: *Brain Res* 993 (2003 Dec 12), Nr. 1-2, S. 1–9
- [31] CANLI, T ; LESCH, KP: Long story short: the serotonin transporter in emotion regulation and social cognition. In: *Nat Neurosci* 10 (2007 Sep), Nr. 9, S. 1103–1109
- [32] CARLSEN, J ; HEIMER, L: The basolateral amygdaloid complex as a cortical-like structure. In: *Brain Res* 441 (1988 Feb 16), Nr. 1-2, S. 377–380
- [33] CASPI, A ; SUGDEN, K ; MOFFITT, TE ; TAYLOR, A ; CRAIG, IW ; HARRINGTON, HL ; MCCLAY, Joseph ; MILL, Jonathan ; MARTIN, Judy ; BRAITHWAITE, A ; POULTON, R: Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. In: *Science* 301 (2003 Jul 18), Nr. 5631, S. 386–389
- [34] CHAN, P ; YUEN, T ; RUF, F ; GONZALEZ-MAESO, J ; SEALFON, SC: Method for multiplex cellular detection of mRNAs using quantum dot fluorescent in situ hybridization. In: *Nucleic Acids Res* 33 (2005), Nr. 18, S. e161
- [35] CHARNEY, DS ; WOODS, SW ; GOODMAN, WK ; HENINGER, GR: Serotonin function in anxiety. II. Effects of the serotonin agonist MCPP in panic disorder patients and healthy subjects. In: *Psychopharmacology (Berl)* 92 (1987), Nr. 1, S. 14–24
- [36] CHRISTIANSON, JP ; RAGOLE, T ; AMAT, J ; GREENWOOD, BN ; STRONG, PV ; PAUL, ED ; FLESHNER, M ; WATKINS, LR ; MAIER, SF: 5-hydroxytryptamine 2C receptors in the basolateral amygdala are involved in the expression of anxiety after uncontrollable traumatic stress. In: *Biol Psychiatry* 67 (2010 Feb 15), Nr. 4, S. 339–345
- [37] CHRONWALL, BM ; DIMAGGIO, DA ; MASSARI, VJ ; PICKEL, VM ; RUGGIERO, DA ; O'DONOHUE, TL: The anatomy of neuropeptide-Y-containing neurons in rat brain. In: *Neuroscience* 15 (1985 Aug), Nr. 4, S. 1159–1181
- [38] CLEMETT, DA ; PUNHANI, T ; DUXON, MS ; BLACKBURN, TP ; FONE, KC: Immunohistochemical localisation of the 5-HT_{2C} receptor protein in the rat CNS. In: *Neuropharmacology* 39 (2000), Nr. 1, S. 123–132
- [39] COCO, ML ; KUHN, CM ; ELY, TD ; KILTS, CD: Selective activation of mesoamygdaloid dopamine neurons by conditioned stress: attenuation by diazepam. In: *Brain Res* 590 (1992 Sep 11), Nr. 1-2, S. 39–47

- [40] COLLINSON, N ; DAWSON, GR: On the elevated plus-maze the anxiolytic-like effects of the 5-HT(1A) agonist, 8-OH-DPAT, but not the anxiogenic-like effects of the 5-HT(1A) partial agonist, buspirone, are blocked by the 5-HT1A antagonist, WAY 100635. In: *Psychopharmacology (Berl)* 132 (1997 Jul), Nr. 1, S. 35–43
- [41] COMPAN, Valerie ; CHATTOPADHYAY, A (Hrsg.): *Do Limits of Neuronal Plasticity Represent an Opportunity for Mental Diseases, Such as Addiction to Food and Illegal Drugs? Use and Utilities of Serotonin Receptor Knock-Out Mice*. Chapter 8 : CRC Press, 2007. – ISBN 0849339774; 9780849339776
- [42] DAMSA, C ; KOSEL, M ; MOUSSALLY, J: Current status of brain imaging in anxiety disorders. In: *Curr Opin Psychiatry* 22 (2009 Jan), Nr. 1, S. 96–110
- [43] DAVID, SP ; MURTHY, NV ; RABINER, EA ; MUNAFO, MR ; JOHNSTONE, EC ; JACOB, R ; WALTON, RT ; GRASBY, PM: A functional genetic variation of the serotonin (5-HT) transporter affects 5-HT1A receptor binding in humans. In: *J Neurosci* 25 (2005 Mar 9), Nr. 10, S. 2586–2590
- [44] DIFIGLIA, M ; MARSHALL, P ; COVAULT, J ; YAMAMOTO, M: Ultrastructural localization of molecular subtypes of immunoreactive neural cell adhesion molecule (NCAM) in the adult rodent striatum. In: *J Neurosci* 9 (1989 Dec), Nr. 12, S. 4158–4168
- [45] DOMSCHKE, K ; DANNLOWSKI, U ; HOHOFF, C ; OHRMANN, P ; BAUER, J ; KUGEL, H ; ZWANZGER, P ; HEINDEL, W ; DECKERT, J ; AROLT, V ; SUSLOW, T ; BAUNE, BT: Neuropeptide Y (NPY) gene: Impact on emotional processing and treatment response in anxious depression. In: *Eur Neuropsychopharmacol* 20 (2010 May), Nr. 5, S. 301–309
- [46] EHRLICH, I ; HUMEAU, Y ; GRENIER, F ; CIOCCHI, S ; HERRY, C ; LUTHI, A: Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. In: *Neuron* 62 (2009 Jun 25), Nr. 6, S. 757–771
- [47] ELIAVA, M ; YILMAZER-HANKE, DM ; ASAN, E: Interrelations between monoaminergic afferents and corticotropin-releasing factor-immunoreactive neurons in the rat central amygdaloid nucleus: ultrastructural evidence for dopaminergic control of amygdaloid stress systems. In: *Histochem Cell Biol* 120 (2003 Sep), Nr. 3, S. 183–197
- [48] ESCH, T ; STEFANO, GB: The neurobiology of stress management. In: *Neuro Endocrinol Lett* 31 (2010), Nr. 1, S. 19–39

- [49] FENDT, M ; FANSELOW, MS: The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. In: *Neurosci Biobehav Rev* 23 (1999 May), Nr. 5, S. 743–760
- [50] FLETCHER, A ; FORSTER, EA ; BILL, DJ ; BROWN, G ; CLIFFE, IA ; HARTLEY, JE ; JONES, DE ; MCLENACHAN, A ; STANHOPE, KJ ; CRITCHLEY, DJ ; CHILDS, KJ ; MIDDLEFELL, VC ; LANFUMEY, L ; CORRADETTI, R ; LAPORTE, AM ; GOZLAN, H ; HAMON, M ; DOURISH, CT: Electrophysiological, biochemical, neurohormonal and behavioural studies with WAY-100635, a potent, selective and silent 5-HT_{1A} receptor antagonist. In: *Behav Brain Res* 73 (1996), Nr. 1-2, S. 337–353
- [51] FRANKLIN, KBJ ; PAXINOS, G: *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, 1997 (ISBN 0-12-266070-6)
- [52] FRISCH, C ; HANKE, J ; KLEINERUSCHKAMP, S ; ROSKE, S ; KAADEN, S ; ELGER, CE ; SCHRAMM, J ; YILMAZER-HANKE, DM ; HELMSTAEDTER, C: Positive correlation between the density of neuropeptide y positive neurons in the amygdala and parameters of self-reported anxiety and depression in mesiotemporal lobe epilepsy patients. In: *Biol Psychiatry* 66 (2009 Sep 1), Nr. 5, S. 433–440
- [53] GIESBRECHT, CJ ; MACKAY, JP ; SILVEIRA, HB ; URBAN, JH ; COLMERS, WF: Countervailing modulation of Ih by neuropeptide Y and corticotrophin-releasing factor in basolateral amygdala as a possible mechanism for their effects on stress-related behaviors. In: *J Neurosci* 30 (2010 Dec 15), Nr. 50, S. 16970–16982
- [54] GLASER, EM ; LOOS, H Van der: Analysis of thick brain sections by obverse-reverse computer microscopy: application of a new, high clarity Golgi-Nissl stain. In: *J Neurosci Methods* 4 (1981 Aug), Nr. 2, S. 117–125
- [55] GODDARD, AW ; BALL, SG ; MARTINEZ, J ; ROBINSON, MJ ; YANG, CR ; RUSSELL, JM ; SHEKHAR, A: Current perspectives of the roles of the central norepinephrine system in anxiety and depression. In: *Depress Anxiety* 27 (2010 Apr), Nr. 4, S. 339–350
- [56] GOLDWATER, DS ; PAVLIDES, C ; HUNTER, RG ; BLOSS, EB ; HOF, PR ; MCEWEN, BS ; MORRISON, JH: Structural and functional alterations to rat medial prefrontal cortex following chronic restraint stress and recovery. In: *Neuroscience* 164 (2009 Dec 1), Nr. 2, S. 798–808
- [57] GONZALEZ, LE ; ANDREWS, N ; FILE, SE: 5-HT_{1A} and benzodiazepine receptors in the basolateral amygdala modulate anxiety in the social interaction test, but not in the elevated plus-maze. In: *Brain Res* 732 (1996 Sep 2), Nr. 1-2, S. 145–153

- [58] GRABE, HJ ; LANGE, M ; WOLFF, B ; VOLZKE, H ; LUCHT, M ; FREYBERGER, HJ ; JOHN, U ; CASCORBI, I: Mental and physical distress is modulated by a polymorphism in the 5-HT transporter gene interacting with social stressors and chronic disease burden. In: *Mol Psychiatry* 10 (2005 Feb), Nr. 2, S. 220–224
- [59] GRACE, AA ; ROSENKRANZ, JA: Regulation of conditioned responses of basolateral amygdala neurons. In: *Physiol Behav* 77 (2002 Dec), Nr. 4-5, S. 489–493
- [60] GRAHN, RE ; WILL, MJ ; HAMMACK, SE ; MASWOOD, S ; MCQUEEN, MB ; WATKINS, LR ; MAIER, SF: Activation of serotonin-immunoreactive cells in the dorsal raphe nucleus in rats exposed to an uncontrollable stressor. In: *Brain Res* 826 (1999 Apr 24), Nr. 1, S. 35–43
- [61] GUSTAFSON, EL ; CARD, JP ; MOORE, RY: Neuropeptide Y localization in the rat amygdaloid complex. In: *J Comp Neurol* 251 (1986 Sep 15), Nr. 3, S. 349–362
- [62] HAMM, AO ; WEIKE, AI: The neuropsychology of fear learning and fear regulation. In: *Int J Psychophysiol* 57 (2005 Jul), Nr. 1, S. 5–14
- [63] HAMON, M ; LANFUMEY, L ; MESTIKAWY, S el ; BONI, C ; MIQUEL, MC ; BOLLANOS, F ; SCHECHTER, L ; GOZLAN, H: The main features of central 5-HT₁ receptors. In: *Neuropsychopharmacology* 3 (1990 Oct-Dec), Nr. 5-6, S. 349–360
- [64] HARIRI, AR ; MATTAY, VS ; TESSITORE, A ; KOLACHANA, B ; FERA, F ; GOLDMAN, D ; EGAN, MF ; WEINBERGER, DR: Serotonin transporter genetic variation and the response of the human amygdala. In: *Science* 297 (2002 Jul 19), Nr. 5580, S. 400–403
- [65] HEILIG, M: The NPY system in stress, anxiety and depression. In: *Neuropeptides* 38 (2004 Aug), Nr. 4, S. 213–224
- [66] HEILIG, M ; KOOB, GF ; EKMAN, R ; BRITTON, KT: Corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y: role in emotional integration. In: *Trends Neurosci* 17 (1994 Feb), Nr. 2, S. 80–85
- [67] HEIMING, RS ; JANSEN, F ; LEWEJOHANN, L ; KAISER, S ; SCHMITT, A ; LESCH, KP ; SACHSER, N: Living in a dangerous world: the shaping of behavioral profile by early environment and 5-HTT genotype. In: *Front Behav Neurosci* 3 (2009), S. 26
- [68] HEISLER, LK ; ZHOU, L ; BAJWA, P ; HSU, J ; TECOTT, LH: Serotonin 5-HT_{2C} receptors regulate anxiety-like behavior. In: *Genes Brain Behav* 6 (2007 Jul), Nr. 5, S. 491–496

- [69] HIGGINS, GA ; JONES, BJ ; OAKLEY, NR ; TYERS, MB: Evidence that the amygdala is involved in the disinhibitory effects of 5-HT₃ receptor antagonists. In: *Psychopharmacology (Berl)* 104 (1991), Nr. 4, S. 545–551
- [70] HOLMES, A: Genetic variation in cortico-amygdala serotonin function and risk for stress-related disease. In: *Neurosci Biobehav Rev* 32 (2008 Sep), Nr. 7, S. 1293–1314
- [71] HOLMES, A ; YANG, RJ ; LESCH, KP ; CRAWLEY, JN ; MURPHY, DL: Mice lacking the serotonin transporter exhibit 5-HT(1A) receptor-mediated abnormalities in tests for anxiety-like behavior. In: *Neuropsychopharmacology* 28 (2003 Dec), Nr. 12, S. 2077–2088
- [72] HOLSBOER, F: Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. In: *J Affect Disord* 62 (2001 Jan), Nr. 1-2, S. 77–91
- [73] ISOARDI, NA ; BERTOTTO, ME ; MARTIJENA, ID ; MOLINA, VA ; CARRER, HF: Lack of feedback inhibition on rat basolateral amygdala following stress or withdrawal from sedative-hypnotic drugs. In: *Eur J Neurosci* 26 (2007 Aug), Nr. 4, S. 1036–1044
- [74] IZQUIERDO, A ; WELLMAN, CL ; HOLMES, A: Brief uncontrollable stress causes dendritic retraction in infralimbic cortex and resistance to fear extinction in mice. In: *J Neurosci* 26 (2006 May 24), Nr. 21, S. 5733–5738
- [75] JANSEN, F ; HEIMING, RS ; LEWEJOHANN, L ; TOUMA, C ; PALME, R ; SCHMITT, A ; LESCH, KP ; SACHSER, N: Modulation of behavioural profile and stress response by 5-HTT genotype and social experience in adulthood. In: *Behav Brain Res* 207 (2010 Feb 11), Nr. 1, S. 21–29
- [76] JH, Fallon ; P, Ciofi ; JP, Aggleton (Hrsg.): *The Amygdala*. New York: Wiley-Liss, 1992
- [77] JIANG, X ; XING, G ; YANG, C ; VERMA, A ; ZHANG, L ; LI, H: Stress impairs 5-HT_{2A} receptor-mediated serotonergic facilitation of GABA release in juvenile rat basolateral amygdala. In: *Neuropsychopharmacology* 34 (2009 Jan), Nr. 2, S. 410–423
- [78] KANDEL, ER ; SCHWARTZ, JH ; JESSELL, TM: *Principles of Neural Sciences*. 4. McGraw-Hill, 2000

- [79] KASK, A ; HARRO, J ; HORSTEN, S von ; REDROBE, JP ; DUMONT, Y ; QUIRION, R: The neurocircuitry and receptor subtypes mediating anxiolytic-like effects of neuropeptide Y. In: *Neurosci Biobehav Rev* 26 (2002 May), Nr. 3, S. 259–283
- [80] KAWAHARA, H ; YOSHIDA, M ; YOKOO, H ; NISHI, M ; TANAKA, M: Psychological stress increases serotonin release in the rat amygdala and prefrontal cortex assessed by in vivo microdialysis. In: *Neurosci Lett* 162 (1993 Nov 12), Nr. 1-2, S. 81–84
- [81] KIM, DK ; TOLLIVER, TJ ; HUANG, SJ ; MARTIN, BJ ; ANDREWS, AM ; WICHEMS, C ; HOLMES, A ; LESCH, KP ; MURPHY, DL: Altered serotonin synthesis, turnover and dynamic regulation in multiple brain regions of mice lacking the serotonin transporter. In: *Neuropharmacology* 49 (2005 Nov), Nr. 6, S. 798–810
- [82] KOEK, W ; PATOISEAU, JF ; ASSIE, MB ; COSI, C ; KLEVEN, MS ; DUPONT-PASSELAIGUE, E ; CARILLA-DURAND, E ; PALMIER, C ; VALENTIN, JP ; JOHN, G ; PAUWELS, PJ ; TARAYRE, JP ; COLPAERT, FC: F 11440, a potent, selective, high efficacy 5-HT_{1A} receptor agonist with marked anxiolytic and antidepressant potential. In: *J Pharmacol Exp Ther* 287 (1998 Oct), Nr. 1, S. 266–283
- [83] KOSOFSKY, BE ; MOLLIVER, ME: The serotonergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei. In: *Synapse* 1 (1987), Nr. 2, S. 153–168
- [84] KOYAMA, S ; MATSUMOTO, N ; KUBO, C ; AKAIKE, N: Presynaptic 5-HT₃ receptor-mediated modulation of synaptic GABA release in the mechanically dissociated rat amygdala neurons. In: *J Physiol* 529 Pt 2 (2000 Dec 1), S. 373–383
- [85] KOYAMA, S ; MATSUMOTO, N ; MURAKAMI, N ; KUBO, C ; NABEKURA, J ; AKAIKE, N: Role of presynaptic 5-HT_{1A} and 5-HT₃ receptors in modulation of synaptic GABA transmission in dissociated rat basolateral amygdala neurons. In: *Life Sci* 72 (2002 Dec 20), Nr. 4-5, S. 375–387
- [86] LABAR, KS ; GATENBY, JC ; GORE, JC ; LEDOUX, JE ; PHELPS, EA: Human amygdala activation during conditioned fear acquisition and extinction: a mixed-trial fMRI study. In: *Neuron* 20 (1998 May), Nr. 5, S. 937–945
- [87] LANFUMEY, L ; MONGEAU, R ; COHEN-SALMON, C ; HAMON, M: Corticosteroid-serotonin interactions in the neurobiological mechanisms of stress-related disorders. In: *Neurosci Biobehav Rev* 32 (2008 Aug), Nr. 6, S. 1174–1184

- [88] LEDOUX, J E.: Emotion circuits in the brain. In: *Annu Rev Neurosci* 23 (2000), S. 155–184
- [89] LEDOUX, JE: The amygdala. In: *Curr Biol* 17 (2007 Oct 23), Nr. 20, S. R868–74
- [90] LEDOUX, JE ; IWATA, J ; CICCHETTI, P ; REIS, DJ: Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. In: *J Neurosci* 8 (1988 Jul), Nr. 7, S. 2517–2529
- [91] LESCH, K P. ; BENGEL, D ; HEILS, A ; SABOL, S Z. ; GREENBERG, B D. ; PETRI, S ; BENJAMIN, J ; MULLER, C R. ; HAMER, D H. ; MURPHY, D L.: Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. In: *Science* 274 (1996 Nov 29), Nr. 5292, S. 1527–1531
- [92] LESCH, KP ; AULAKH, CS ; MURPHY, DL: 5-HT_{1A} receptor sensitivity in depression and anxiety disorders: molecular mechanisms of neuroadaptation. In: *Clin Neuropharmacol* 15 Suppl 1 Pt A (1992), S. 208A–209A
- [93] LI, Q ; WICHEMS, C ; HEILS, A ; LESCH, KP ; MURPHY, DL: Reduction in the density and expression, but not G-protein coupling, of serotonin receptors (5-HT_{1A}) in 5-HT transporter knock-out mice: gender and brain region differences. In: *J Neurosci* 20 (2000 Nov 1), Nr. 21, S. 7888–7895
- [94] LI, Q ; WICHEMS, CH ; MA, Li ; KAR, LD Van de ; GARCIA, F ; MURPHY, DL: Brain region-specific alterations of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors in serotonin transporter knockout mice. In: *J Neurochem* 84 (2003 Mar), Nr. 6, S. 1256–1265
- [95] LIU, S ; BUBAR, MJ ; LANFRANCO, MF ; HILLMAN, GR ; CUNNINGHAM, KA: Serotonin_{2C} receptor localization in GABA neurons of the rat medial prefrontal cortex: implications for understanding the neurobiology of addiction. In: *Neuroscience* 146 (2007 Jun 8), Nr. 4, S. 1677–1688
- [96] LOTRICH, FE ; POLLOCK, BG: Meta-analysis of serotonin transporter polymorphisms and affective disorders. In: *Psychiatr Genet* 14 (2004 Sep), Nr. 3, S. 121–129
- [97] LOWRY, CA ; JOHNSON, PL ; HAY-SCHMIDT, A ; MIKKELSEN, J ; SHEKHAR, A: Modulation of anxiety circuits by serotonergic systems. In: *Stress* 8 (2005 Dec), Nr. 4, S. 233–246
- [98] LÜSCHER, C ; SLESINGER, PA: Emerging roles for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease. In: *Nat Rev Neurosci* 11 (2010 May), Nr. 5, S. 301–315

- [99] MAIER, SF ; WATKINS, LR: Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. In: *Neurosci Biobehav Rev* 29 (2005), Nr. 4-5, S. 829–841
- [100] MAMOUNAS, LA ; MOLLIVER, ME: Evidence for dual serotonergic projections to neocortex: axons from the dorsal and median raphe nuclei are differentially vulnerable to the neurotoxin p-chloroamphetamine (PCA). In: *Exp Neurol* 102 (1988 Oct), Nr. 1, S. 23–36
- [101] MARION, S ; WEINER, DM ; CARON, MG: RNA editing induces variation in desensitization and trafficking of 5-hydroxytryptamine 2c receptor isoforms. In: *J Biol Chem* 279 (2004 Jan 23), Nr. 4, S. 2945–2954
- [102] MAROWSKY, A ; YANAGAWA, Y ; OBATA, K ; VOGT, KE: A specialized subclass of interneurons mediates dopaminergic facilitation of amygdala function. In: *Neuron* 48 (2005 Dec 22), Nr. 6, S. 1025–1037
- [103] MARTIN, P ; BENINGER, RJ ; HAMON, M ; PUECH, AJ: Antidepressant-like action of 8-OH-DPAT, a 5-HT_{1A} agonist, in the learned helplessness paradigm: evidence for a postsynaptic mechanism. In: *Behav Brain Res* 38 (1990 May 7), Nr. 2, S. 135–144
- [104] MARTINEZ-TELLEZ, RIsaura ; HERNANDEZ-TORRES, E ; GAMBOA, C ; FLORES, G: Prenatal stress alters spine density and dendritic length of nucleus accumbens and hippocampus neurons in rat offspring. In: *Synapse* 63 (2009 Sep), Nr. 9, S. 794–804
- [105] MASCAGNI, F ; MCDONALD, AJ: A novel subpopulation of 5-HT type 3A receptor subunit immunoreactive interneurons in the rat basolateral amygdala. In: *Neuroscience* 144 (2007 Feb 9), Nr. 3, S. 1015–1024
- [106] MCDONALD, A J. ; MASCAGNI, F: Neuronal localization of 5-HT type 2A receptor immunoreactivity in the rat basolateral amygdala. In: *Neuroscience* 146 (2007 Apr 25), Nr. 1, S. 306–320
- [107] MCDONALD, A J. ; MASCAGNI, F ; GUO, L: Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. In: *Neuroscience* 71 (1996 Mar), Nr. 1, S. 55–75
- [108] MCDONALD, A J. ; MASCAGNI, F ; MULLER, J F.: Immunocytochemical localization of GABABR1 receptor subunits in the basolateral amygdala. In: *Brain Res* 1018 (2004 Aug 27), Nr. 2, S. 147–158

- [109] MCDONALD, A J. ; MULLER, J F. ; MASCAGNI, F: GABAergic innervation of alpha type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase immunoreactive pyramidal neurons in the rat basolateral amygdala. In: *J Comp Neurol* 446 (2002 May 6), Nr. 3, S. 199–218
- [110] MCDONALD, A J. ; PEARSON, J C.: Coexistence of GABA and peptide immunoreactivity in non-pyramidal neurons of the basolateral amygdala. In: *Neurosci Lett* 100 (1989 May 22), Nr. 1-3, S. 53–58
- [111] MCDONALD, AJ: Coexistence of somatostatin with neuropeptide Y, but not with cholecystokinin or vasoactive intestinal peptide, in neurons of the rat amygdala. In: *Brain Res* 500 (1989), Oct, Nr. 1-2, S. 37–45
- [112] MCDONALD, AJ ; MASCAGNI, F: Immunohistochemical characterization of somatostatin containing interneurons in the rat basolateral amygdala. In: *Brain Res* 943 (2002 Jul 12), Nr. 2, S. 237–244
- [113] MCLAUGHLIN, KJ ; WILSON, JO ; HARMAN, J ; WRIGHT, RL ; WIECZOREK, L ; GOMEZ, J ; KOROL, DL ; CONRAD, CD: Chronic 17beta-estradiol or cholesterol prevents stress-induced hippocampal CA3 dendritic retraction in ovariectomized female rats: possible correspondence between CA1 spine properties and spatial acquisition. In: *Hippocampus* 20 (2010 Jun), Nr. 6, S. 768–786. – ISSN 1098-1063 (Electronic); 1050-9631 (Linking)
- [114] MENARD, J ; TREIT, D: Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. In: *Neurosci Biobehav Rev* 23 (1999 Mar), Nr. 4, S. 591–613
- [115] MENGOD, G ; POMPEIANO, M ; MARTINEZ-MIR, MI ; PALACIOS, JM: Localization of the mRNA for the 5-HT₂ receptor by in situ hybridization histochemistry. Correlation with the distribution of receptor sites. In: *Brain Res* 524 (1990 Jul 30), Nr. 1, S. 139–143
- [116] MILLAN, MJ: The neurobiology and control of anxious states. In: *Prog Neurobiol* 70 (2003 Jun), Nr. 2, S. 83–244
- [117] MILLHOUSE, OE ; DEOLMOS, J: Neuronal configurations in lateral and basolateral amygdala. In: *Neuroscience* 10 (1983 Dec), Nr. 4, S. 1269–1300

- [118] MIQUEL, M ; DOUCET, E ; BONI, C ; EL MESTIKAWY, S ; MATTHIESSEN, L ; DAVAL, G ; VERGE, D ; HAMON, M: Central serotonin 1A receptors: respective distributions of encoding mRNA, receptor protein and binding sites by in situ hybridization histochemistry, radioimmunohistochemistry and autoradiographic mapping in the rat brain. In: *Neurochem. Int.* 19 (1991), S. 453–465
- [119] MITRA, R ; ADAMEC, R ; SAPOLSKY, R: Resilience against predator stress and dendritic morphology of amygdala neurons. In: *Behav Brain Res* 205 (2009 Dec 28), Nr. 2, S. 535–543
- [120] MITRA, R ; JADHAV, S ; MCEWEN, BS ; VYAS, A ; CHATTARJI, S: Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005 Jun 28), Nr. 26, S. 9371–9376
- [121] MORA, M Pérez de la ; GALLEGOS-CARI, A ; ARIZMENDI-GARCÍA, Y ; MARCELLINO, D ; FUXE, K: Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis. In: *Prog. Neurobiol.* 90 (2010), S. 198–216
- [122] MORALES, M ; BLOOM, FE: The 5-HT₃ receptor is present in different subpopulations of GABAergic neurons in the rat telencephalon. In: *J Neurosci* 17 (1997 May 1), Nr. 9, S. 3157–3167
- [123] MORALES-MEDINA, JC ; DUMONT, Y ; QUIRION, R: A possible role of neuropeptide Y in depression and stress. In: *Brain Res* 1314 (2010 Feb 16), S. 194–205
- [124] MOREAU, JL ; GRIEBEL, G ; JENCK, F ; MARTIN, JR ; WIDMER, U ; HAEFELY, WE: Behavioral profile of the 5HT_{1A} receptor antagonist (S)-UH-301 in rodents and monkeys. In: *Brain Res Bull* 29 (1992 Dec), Nr. 6, S. 901–904
- [125] MOYA, PR ; FOX, MA ; JENSEN, CL ; LAPORTE, JL ; FRENCH, HT ; WENDLAND, JR ; MURPHY, DL: Altered 5-HT_{2C} receptor agonist-induced responses and 5-HT_{2C} receptor RNA editing in the amygdala of serotonin transporter knockout mice. In: *BMC Pharmacol* 11 (2011 Apr 7), Nr. 1, S. 3
- [126] MOZHUI, K ; KARLSSON, RM ; KASH, TL ; IHNE, J ; NORCROSS, M ; PATEL, S ; FARRELL, MR ; HILL, EE ; GRAYBEAL, C ; MARTIN, KP ; CAMP, M ; FITZGERALD, PJ ; CIOBANU, DC ; SPRENGEL, R ; MISHINA, M ; WELLMAN, CL ; WINDER, DG ; WILLIAMS, RW ; HOLMES, A: Strain differences in stress responsivity are associated with divergent amygdala gene expression and glutamate-mediated neuronal excitability. In: *J Neurosci* 30 (2010 Apr 14), Nr. 15, S. 5357–5367

- [127] MUIGG, P ; HETZENAUER, A ; HAUER, G ; HAUSCHILD, M ; GABURRO, S ; FRANK, E ; LANDGRAF, R ; SINGEWALD, N: Impaired extinction of learned fear in rats selectively bred for high anxiety—evidence of altered neuronal processing in prefrontal-amygdala pathways. In: *Eur J Neurosci* 28 (2008 Dec), Nr. 11, S. 2299–2309
- [128] MULLER, Jay F. ; MASCAGNI, Franco ; MCDONALD, Alexander J.: Synaptic connections of distinct interneuronal subpopulations in the rat basolateral amygdalar nucleus. In: *J Comp Neurol* 456 (2003 Feb 10), Nr. 3, S. 217–236
- [129] MULLER, JF ; MASCAGNI, F ; MCDONALD, AJ: Pyramidal cells of the rat basolateral amygdala: synaptology and innervation by parvalbumin-immunoreactive interneurons. In: *J Comp Neurol* 494 (2006 Feb 1), Nr. 4, S. 635–650
- [130] MULLER, JF ; MASCAGNI, F ; MCDONALD, AJ: Postsynaptic targets of somatostatin-containing interneurons in the rat basolateral amygdala. In: *J Comp Neurol* 500 (2007 Jan 20), Nr. 3, S. 513–529
- [131] MULLER, JF ; MASCAGNI, F ; MCDONALD, AJ: Serotonin-immunoreactive axon terminals innervate pyramidal cells and interneurons in the rat basolateral amygdala. In: *J Comp Neurol* 505 (2007 Nov 20), Nr. 3, S. 314–335
- [132] MULLER, M ; FABER-ZUSCHRATTER, H ; YANAGAWA, Y ; STORK, O ; SCHWEGLER, H ; LINKE, R: Synaptology of ventral CA1 and subiculum projections to the basomedial nucleus of the amygdala in the mouse: relation to GABAergic interneurons. In: *Brain Struct Funct* (2011 May 17)
- [133] MURPHY, DL ; LESCH, KP: Targeting the murine serotonin transporter: insights into human neurobiology. In: *Nat Rev Neurosci* 9 (2008 Feb), Nr. 2, S. 85–96
- [134] MUTT, V (Hrsg.): *Neuropeptide Y*. Raven Press, New York, 1989
- [135] NADER, K ; LEDOUX, JE: Inhibition of the mesoamygdala dopaminergic pathway impairs the retrieval of conditioned fear associations. In: *Behav Neurosci* 113 (1999 Oct), Nr. 5, S. 891–901
- [136] NEMEROFF, CB: The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. In: *Mol Psychiatry* 1 (1996 Sep), Nr. 4, S. 336–342
- [137] NIETZER, SL: *Gen-Umwelt-Interaktionen in Serotonin-Transporter-Knockout-Mäusen - Wie Stress die Genexpression und die neuronale Morphologie beeinflusst*. urn:nbn:de:bvb:20-opus-54391, Universität Würzburg, Dissertation, 2011

- [138] NIETZER, SL ; BONN, M ; JANSEN, F ; HEIMING, RS ; LEWEJOHANN, L ; SACHSER, N ; ASAN, ES ; LESCH, KP ; SCHMITT, AG: Serotonin transporter knockout and repeated social defeat stress: Impact on neuronal morphology and plasticity in limbic brain areas. In: *Behav Brain Res* 220 (2011 Jun 20), Nr. 1, S. 42–54
- [139] NISWENDER, CM ; COPELAND, SC ; HERRICK-DAVIS, K ; EMESON, RB ; SANDERS-BUSH, E: RNA editing of the human serotonin 5-hydroxytryptamine 2C receptor silences constitutive activity. In: *J Biol Chem* 274 (1999 Apr 2), Nr. 14, S. 9472–9478
- [140] NORDQUIST, N ; ORELAND, L: Serotonin, genetic variability, behaviour, and psychiatric disorders—a review. In: *Ups J Med Sci* 115 (2010 Feb), Nr. 1, S. 2–10
- [141] OLIVIER, B ; WIJNGAARDEN, I van ; SOUDIJN, W: 5-HT(3) receptor antagonists and anxiety; a preclinical and clinical review. In: *Eur Neuropsychopharmacol* 10 (2000 Mar), Nr. 2, S. 77–95
- [142] OQUENDO, MA ; HASTINGS, RS ; HUANG, YY ; SIMPSON, N ; OGDEN, RT ; HU, XZ ; GOLDMAN, D ; ARANGO, V ; VAN HEERTUM, RL ; MANN, JJ ; PARSEY, RV: Brain serotonin transporter binding in depressed patients with bipolar disorder using positron emission tomography. In: *Arch Gen Psychiatry* 64 (2007 Feb), Nr. 2, S. 201–208
- [143] PALACIOS, JM ; WAEBER, C ; HOYER, D ; MENGOD, G: Distribution of serotonin receptors. In: *Ann N Y Acad Sci* 600 (1990), S. 36–52
- [144] PAPE, HC ; JUNGLING, K ; SEIDENBECHER, T ; LESTING, J ; REINSCHIED, RK: Neuropeptide S: a transmitter system in the brain regulating fear and anxiety. In: *Neuropharmacology* 58 (2010 Jan), Nr. 1, S. 29–34
- [145] PARKS, CL ; ROBINSON, PS ; SIBILLE, E ; SHENK, T ; TOTH, M: Increased anxiety of mice lacking the serotonin1A receptor. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998 Sep 1), Nr. 18, S. 10734–10739
- [146] PAXINOS, G ; WATSON, C: *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6. Edition. Elsevier, 2007
- [147] PAZOS, A ; HOYER, D ; PALACIOS, JM: The binding of serotonergic ligands to the porcine choroid plexus: characterization of a new type of serotonin recognition site. In: *Eur J Pharmacol* 106 (1984 Nov 27), Nr. 3, S. 539–546

- [148] PAZOS, A ; PALACIOS, JM: Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. In: *Brain Res* 346 (1985 Nov 4), Nr. 2, S. 205–230
- [149] PINARD, CR ; MULLER, JF ; MASCAGNI, F ; McDONALD, AJ: Dopaminergic innervation of interneurons in the rat basolateral amygdala. In: *Neuroscience* 157 (2008 Dec 10), Nr. 4, S. 850–863
- [150] PIRKER, S ; SCHWARZER, C ; WIESELTHALER, A ; SIEGHART, W ; SPERK, G: GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. In: *Neuroscience* 101 (2000), Nr. 4, S. 815–850
- [151] PITKANEN, A ; KEMPPAINEN, S: Comparison of the distribution of calcium-binding proteins and intrinsic connectivity in the lateral nucleus of the rat, monkey, and human amygdala. In: *Pharmacol Biochem Behav* 71 (2002 Mar), Nr. 3, S. 369–377
- [152] PITKANEN, A ; SAVANDER, V ; LEDOUX, JE: Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. In: *Trends Neurosci* 20 (1997 Nov), Nr. 11, S. 517–523
- [153] POLLANDT, S ; DREPHAL, C ; ALBRECHT, D: 8-OH-DPAT suppresses the induction of LTP in brain slices of the rat lateral amygdala. In: *Neuroreport* 14 (2003 May 6), Nr. 6, S. 895–897
- [154] PROU, D ; GU, WJ ; LE CROM, S ; VINCENT, JD ; SALAMERO, J ; VERNIER, P: Intracellular retention of the two isoforms of the D(2) dopamine receptor promotes endoplasmic reticulum disruption. In: *J Cell Sci* 114 (2001 Oct), Nr. Pt 19, S. 3517–3527
- [155] QUIDT, ME de ; EMSON, PC: Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the rat central nervous system–II. Immunohistochemical analysis. In: *Neuroscience* 18 (1986 Jul), Nr. 3, S. 545–618
- [156] RADLEY, JJ ; ROCHER, AB ; JANSSEN, WGM ; HOF, PR ; MCEWEN, BS ; MORRISON, JH: Reversibility of apical dendritic retraction in the rat medial prefrontal cortex following repeated stress. In: *Exp Neurol* 196 (2005 Nov), Nr. 1, S. 199–203
- [157] RAINNIE, DG: Serotonergic modulation of neurotransmission in the rat basolateral amygdala. In: *J Neurophysiol* 82 (1999 Jul), Nr. 1, S. 69–85

- [158] RAINNIE, DG: Inhibitory and excitatory circuitries in amygdala nuclei: a synopsis of session II. In: *Ann N Y Acad Sci* 985 (2003 Apr), S. 59–66
- [159] RAO, H ; GILLIHAN, SJ ; WANG, J ; KORCZYKOWSKI, M ; SANKOORIKAL, GMV ; KAERCHER, KA ; BRODKIN, ES ; DETRE, JA ; FARAH, MJ: Genetic variation in serotonin transporter alters resting brain function in healthy individuals. In: *Biol Psychiatry* 62 (2007 Sep 15), Nr. 6, S. 600–606
- [160] RASHEED, N ; AHMAD, A ; PANDEY, CP ; CHATURVEDI, RKumar ; LOHANI, M ; PALIT, G: Differential response of central dopaminergic system in acute and chronic unpredictable stress models in rats. In: *Neurochem Res* 35 (2010 Jan), Nr. 1, S. 22–32
- [161] REUVENY, E ; SLESINGER, PA ; INGLESE, J ; MORALES, JM ; INIGUEZ-LLUHI, JA ; LEFKOWITZ, RJ ; BOURNE, HR ; JAN, YN ; JAN, LY: Activation of the cloned muscarinic potassium channel by G protein beta gamma subunits. In: *Nature* 370 (1994 Jul 14), Nr. 6485, S. 143–146
- [162] RIAD, M ; GARCIA, S ; WATKINS, KC ; JODOIN, N ; DOUCET, E ; LANGLOIS, X ; MESTIKAWY, S el ; HAMON, M ; DESCARRIES, L: Somatodendritic localization of 5-HT1A and preterminal axonal localization of 5-HT1B serotonin receptors in adult rat brain. In: *J Comp Neurol* 417 (2000 Feb 7), Nr. 2, S. 181–194
- [163] ROBERTS, GW ; WOODHAMS, PL ; POLAK, JM ; CROW, TJ: Distribution of neuropeptides in the limbic system of the rat: the amygdaloid complex. In: *Neuroscience* 7 (1982 Jan), Nr. 1, S. 99–131
- [164] RODRIGUEZ-MANZANARES, PA ; ISOARDI, NA ; CARRER, HF ; MOLINA, VA: Previous stress facilitates fear memory, attenuates GABAergic inhibition, and increases synaptic plasticity in the rat basolateral amygdala. In: *J Neurosci* 25 (2005 Sep 21), Nr. 38, S. 8725–8734
- [165] ROOZENDAAL, B ; MCEWEN, BS ; CHATTARJI, S: Stress, memory and the amygdala. In: *Nat Rev Neurosci* (2009 May 13)
- [166] ROSEN, JB ; SCHULKIN, J: From normal fear to pathological anxiety. In: *Psychol Rev* 105 (1998 Apr), Nr. 2, S. 325–350
- [167] ROSENKRANZ, J A. ; VENHEIM, Emily R. ; PADIVAL, Mallika: Chronic stress causes amygdala hyperexcitability in rodents. In: *Biol Psychiatry* 67 (2010 Jun 15), Nr. 12, S. 1128–1136

- [168] ROSENKRANZ, JA ; GRACE, AA: Dopamine attenuates prefrontal cortical suppression of sensory inputs to the basolateral amygdala of rats. In: *J Neurosci* 21 (2001 Jun 1), Nr. 11, S. 4090–4103
- [169] ROSTKOWSKI, AB ; TEPPEN, TL ; PETERSON, DA ; URBAN, JH: Cell-specific expression of neuropeptide Y Y1 receptor immunoreactivity in the rat basolateral amygdala. In: *J Comp Neurol* 517 (2009 Nov 10), Nr. 2, S. 166–176
- [170] ROTZINGER, S ; LOVEJOY, DA ; TAN, LA: Behavioral effects of neuropeptides in rodent models of depression and anxiety. In: *Peptides* 31 (2010 Apr), Nr. 4, S. 736–756
- [171] RUETER, LE ; JACOBS, BL: A microdialysis examination of serotonin release in the rat forebrain induced by behavioral/environmental manipulations. In: *Brain Res* 739 (1996 Nov 11), Nr. 1-2, S. 57–69
- [172] SAJDYK, TJ ; SHEKHAR, A ; GEHLERT, DR: Interactions between NPY and CRF in the amygdala to regulate emotionality. In: *Neuropeptides* 38 (2004 Aug), Nr. 4, S. 225–234
- [173] SAJDYK, TJ ; VANDERGRIF, MG ; GEHLERT, DR: Amygdalar neuropeptide Y Y1 receptors mediate the anxiolytic-like actions of neuropeptide Y in the social interaction test. In: *Eur J Pharmacol* 368 (1999 Mar 5), Nr. 2-3, S. 143–147
- [174] SALGADO-PINEDA, P ; DELAVEAU, P ; BLIN, O ; NIEOULLON, A: Dopaminergic contribution to the regulation of emotional perception. In: *Clin Neuropharmacol* 28 (2005 Sep-Oct), Nr. 5, S. 228–237
- [175] SAPOLSKY, RM: Stress hormones: good and bad. In: *Neurobiol Dis* 7 (2000 Oct), Nr. 5, S. 540–542
- [176] SCHMIDT, CJ ; TAYLOR, VL: Reversal of the acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine by 5-HT uptake inhibitors. In: *Eur J Pharmacol* 181 (1990 May 31), Nr. 1-2, S. 133–136
- [177] SCIBILIA, RJ ; LACHOWICZ, JE ; KILTS, CD: Topographic nonoverlapping distribution of D1 and D2 dopamine receptors in the amygdaloid nuclear complex of the rat brain. In: *Synapse* 11 (1992 Jun), Nr. 2, S. 146–154
- [178] SGOBIO, C ; TRABALZA, A ; SPALLONI, A ; ZONA, C ; CARUNCHIO, I ; LONGONE, P ; AMMASSARI-TEULE, M: Abnormal medial prefrontal cortex connectivity and

- defective fear extinction in the presymptomatic G93A SOD1 mouse model of ALS. In: *Genes Brain Behav* 7 (2008 Jun), Nr. 4, S. 427–434
- [179] SHEKHAR, A ; TRUITT, W ; RAINNIE, D ; SAJDYK, T: Role of stress, corticotrophin releasing factor (CRF) and amygdala plasticity in chronic anxiety. In: *Stress* 8 (2005 Dec), Nr. 4, S. 209–219
- [180] SHOLL, DA: Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. In: *J Anat* 87 (1953 Oct), Nr. 4, S. 387–406
- [181] SILVERSTONE, PH ; RUE, JE ; FRANKLIN, M ; HALLIS, K ; CAMPLIN, G ; LAVER, D ; COWEN, PJ: The effects of administration of mCPP on psychological, cognitive, cardiovascular, hormonal and MHPG measurements in human volunteers. In: *Int Clin Psychopharmacol* 9 (1994 Sep), Nr. 3, S. 173–178
- [182] SMIALOWSKA, M ; BAJKOWSKA, M ; HEILIG, M ; OBUCHOWICZ, E ; TURCHAN, J ; MAJ, M ; PRZEWLOCKI, R: Pharmacological studies on the monoaminergic influence on the synthesis and expression of neuropeptide Y and corticotropin releasing factor in rat brain amygdala. In: *Neuropeptides* 35 (2001 Apr), Nr. 2, S. 82–91
- [183] SMIALOWSKA, M ; BAJKOWSKA, M ; PREZEWLOCKA, B ; MAJ, M ; TURCHAN, J ; PRZEWLOCKI, R: Effect of 6-hydroxydopamine on neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor expression in rat amygdala. In: *Neuroscience* 94 (1999), Nr. 4, S. 1125–1132
- [184] SORENSEN, G ; LINDBERG, C ; WORTWEIN, G ; BOLWIG, TG ; WOLDBYE, DPD: Differential roles for neuropeptide Y Y1 and Y5 receptors in anxiety and sedation. In: *J Neurosci Res* 77 (2004 Sep 1), Nr. 5, S. 723–729
- [185] SOSULINA, L ; SCHWESIG, G ; SEIFERT, G ; PAPE, HC: Neuropeptide Y activates a G-protein-coupled inwardly rectifying potassium current and dampens excitability in the lateral amygdala. In: *Mol Cell Neurosci* 39 (2008 Nov), Nr. 3, S. 491–498
- [186] SPRUSTON, N: Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. In: *Nat Rev Neurosci* 9 (2008 Mar), Nr. 3, S. 206–221
- [187] STEIN, C ; DAVIDOWA, H ; ALBRECHT, D: 5-HT(1A) receptor-mediated inhibition and 5-HT(2) as well as 5-HT(3) receptor-mediated excitation in different subdivisions of the rat amygdala. In: *Synapse* 38 (2000 Dec 1), Nr. 3, S. 328–337

- [188] STOWE, RL ; BARNES, NM: Cellular distribution of 5-HT7 receptor mRNA in the rat brain. In: *Br J Pharmacol* 123 (1998), S. 229p.
- [189] SUGITA, S ; SHEN, KZ ; NORTH, RA: 5-hydroxytryptamine is a fast excitatory transmitter at 5-HT3 receptors in rat amygdala. In: *Neuron* 8 (1992 Jan), Nr. 1, S. 199–203
- [190] SWANSON, LW ; PETROVICH, GD: What is the amygdala? In: *Trends Neurosci* 21 (1998 Aug), Nr. 8, S. 323–331
- [191] TAKEMOTO-KIMURA, S ; SUZUKI, K ; KAMIJO, S ; AGETA-ISHIHARA, N ; FUJII, H ; OKUNO, H ; BITO, H: Differential roles for CaM kinases in mediating excitation-morphogenesis coupling during formation and maturation of neuronal circuits. In: *Eur J Neurosci* 32 (2010 Jul), Nr. 2, S. 224–230
- [192] TASAN, RO ; NGUYEN, NKhoi ; WEGER, S ; SARTORI, SB ; SINGEWALD, N ; HEILBRONN, R ; HERZOG, H ; SPERK, G: The central and basolateral amygdala are critical sites of neuropeptide Y/Y2 receptor-mediated regulation of anxiety and depression. In: *J Neurosci* 30 (2010 May 5), Nr. 18, S. 6282–6290
- [193] TATEMOTO, K ; CARLQUIST, M ; MUTT, V: Neuropeptide Y—a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. In: *Nature* 296 (1982 Apr 15), Nr. 5858, S. 659–660
- [194] TECOTT, LH ; MARICQ, AV ; JULIUS, D: Nervous system distribution of the serotonin 5-HT3 receptor mRNA. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993 Feb 15), Nr. 4, S. 1430–1434
- [195] TÖRK, I: Anatomy of the serotonergic system. In: *Ann N Y Acad Sci* 600 (1990), S. 9–34
- [196] TOTH, E ; AVITAL, A ; LESHEM, M ; RICHTER-LEVIN, G ; BRAUN, K: Neonatal and juvenile stress induces changes in adult social behavior without affecting cognitive function. In: *Behav Brain Res* 190 (2008 Jun 26), Nr. 1, S. 135–139
- [197] TOTH, M: 5-HT1A receptor knockout mouse as a genetic model of anxiety. In: *Eur J Pharmacol* 463 (2003 Feb 28), Nr. 1-3, S. 177–184
- [198] TRUITT, WA ; JOHNSON, PL ; DIETRICH, AD ; FITZ, SD ; SHEKHAR, A: Anxiety-like behavior is modulated by a discrete subpopulation of interneurons in the basolateral amygdala. In: *Neuroscience* 160 (2009 May 5), Nr. 2, S. 284–294

- [199] USIELLO, A ; BAIK, JH ; ROUGE-PONT, F ; PICETTI, R ; DIERICH, A ; LEMEUR, M ; PIAZZA, PV ; BORRELLI, E: Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. In: *Nature* 408 (2000 Nov 9), Nr. 6809, S. 199–203
- [200] VALDEZ, M ; BURKE, TF ; HENSLER, JG: Selective heterologous regulation of 5-HT1A receptor-stimulated 35S GTPgammaS binding in the anterior cingulate cortex as a result of 5-HT2 receptor activation. In: *Brain Res* 957 (2002 Dec 6), Nr. 1, S. 174–182
- [201] VALENTINO, RJ ; LUCKI, I ; VAN BOCKSTAELE, E: Corticotropin-releasing factor in the dorsal raphe nucleus: Linking stress coping and addiction. In: *Brain Res* 1314 (2010 Feb 16), S. 29–37
- [202] VALLEE, M ; MAYO, W ; DELLU, F ; LE MOAL, M ; SIMON, H ; MACCARI, S: Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. In: *J Neurosci* 17 (1997 Apr 1), Nr. 7, S. 2626–2636
- [203] VALNES, K ; BRANDTZAEG, P: Retardation of immunofluorescence fading during microscopy. In: *J Histochem Cytochem* 33 (1985 Aug), Nr. 8, S. 755–761
- [204] VERTES, R P. ; FORTIN, W J. ; CRANE, A M.: Projections of the median raphe nucleus in the rat. In: *J Comp Neurol* 407 (1999), Nr. 4, S. 555–582
- [205] VERTES, RP: A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. In: *J Comp Neurol* 313 (1991 Nov 22), Nr. 4, S. 643–668
- [206] VYAS, A ; JADHAV, S ; CHATTARJI, S: Prolonged behavioral stress enhances synaptic connectivity in the basolateral amygdala. In: *Neuroscience* 143 (2006 Dec 1), Nr. 2, S. 387–393
- [207] WATANABE, Y ; SAKAI, RR ; MCEWEN, BS ; MENDELSON, S: Stress and antidepressant effects on hippocampal and cortical 5-HT1A and 5-HT2 receptors and transport sites for serotonin. In: *Brain Res* 615 (1993 Jun 25), Nr. 1, S. 87–94
- [208] WEBER, M ; SCHMITT, A ; WISCHMEYER, E ; DORING, F: Excitability of pontine startle processing neurones is regulated by the two-pore-domain K⁺ channel TASK-3 coupled to 5-HT2C receptors. In: *Eur J Neurosci* 28 (2008 Sep), Nr. 5, S. 931–940
- [209] WEINER, DM ; LEVEY, AI ; SUNAHARA, RK ; NIZNIK, HB ; O'DOWD, BF ; SEEMAN, P ; BRANN, MR: D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991 Mar 1), Nr. 5, S. 1859–1863

- [210] WELLMAN, CL ; IZQUIERDO, A ; GARRETT, JE ; MARTIN, KP ; CARROLL, J ; MILLSTEIN, R ; LESCH, KP ; MURPHY, DL ; HOLMES, A: Impaired stress-coping and fear extinction and abnormal corticolimbic morphology in serotonin transporter knock-out mice. In: *J Neurosci* 27 (2007 Jan 17), Nr. 3, S. 684–691
- [211] WERRY, TD ; LOIACONO, R ; SEXTON, PM ; CHRISTOPOULOS, A: RNA editing of the serotonin 5HT_{2C} receptor and its effects on cell signalling, pharmacology and brain function. In: *Pharmacol Ther* 119 (2008 Jul), Nr. 1, S. 7–23
- [212] YILMAZER-HANKE, DM ; HANTSCH, M ; HANKE, J ; SCHULZ, C ; FABER-ZUSCHRATTER, H ; SCHWEGLER, H: Neonatal thyroxine treatment: changes in the number of corticotropin-releasing-factor (CRF) and neuropeptide Y (NPY) containing neurons and density of tyrosine hydroxylase positive fibers (TH) in the amygdala correlate with anxiety-related behavior of wistar rats. In: *Neuroscience* 124 (2004), Nr. 2, S. 283–297
- [213] YOKOYAMA, M ; SUZUKI, E ; SATO, T ; MARUTA, S ; WATANABE, S ; MIYAOKA, H: Amygdalic levels of dopamine and serotonin rise upon exposure to conditioned fear stress without elevation of glutamate. In: *Neurosci Lett* 379 (2005 Apr 29), Nr. 1, S. 37–41
- [214] YUEN, EY ; JIANG, Q ; CHEN, P ; FENG, J ; YAN, Z: Activation of 5-HT_{2A/C} receptors counteracts 5-HT_{1A} regulation of n-methyl-D-aspartate receptor channels in pyramidal neurons of prefrontal cortex. In: *J Biol Chem* 283 (2008 Jun 20), Nr. 25, S. 17194–17204
- [215] ZHOU, R ; WANG, S ; ZHU, X: Prenatal ethanol exposure attenuates GABAergic inhibition in basolateral amygdala leading to neuronal hyperexcitability and anxiety-like behavior of adult rat offspring. In: *Neuroscience* 170 (2010 Oct 27), Nr. 3, S. 749–757
- [216] ZHOU, Z ; ZHU, G ; HARIRI, AR ; ENOCH, MA ; SCOTT, D ; SINHA, R ; VIRKKUNEN, M ; MASH, DC ; LIPSKY, RH ; HU, XZ ; HODGKINSON, CA ; XU, K ; BUZAS, B ; YUAN, Q ; SHEN, PH ; FERRELL, RE ; MANUCK, SB ; BROWN, SM ; HAUGER, RL ; STOHLER, CS ; ZUBIETA, JK ; GOLDMAN, D: Genetic variation in human NPY expression affects stress response and emotion. In: *Nature* 452 (2008 Apr 24), Nr. 7190, S. 997–1001

Teil VII

Anhang

33 DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank geht an... / Thanks to...

Prof. Dr. Esther Asan für die perfekte und kompetente Betreuung und ganz besonders dafür, dass sie stets bereit war ihr Wissen an mich weiterzugeben. Ich habe von Dir sehr viel gelernt, was mir zukünftig sicherlich von großem Nutzen sein wird.

Dr. Angelika Schmitt für die methodische Betreuung der Sondenherstellung und des Morphologieprojekts und die große Unterstützung beim Schreiben unserer Publikation. Die Zeit unserer Zusammenarbeit war sehr schön, sehr effektiv und bedeutet mir sehr viel.

Prof. Dr. Erhard Wischmeyer für die Betreuung meiner Arbeit als Zweitgutachter und besonders für die Hilfestellung dabei, meine Daten mit elektrophysiologischen Untersuchungen in Zusammenhang zu bringen.

Prof. Dr. Karl Mertens für die Betreuung meiner Arbeit als Mitglied des Promotionskommittees und die erfrischenden Gespräche auf diversen GK-Tagungen.

Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch für die Betreuung meiner Arbeit als Mitglied des Promotionskommittees und besonders dafür, dass er es mir ermöglicht hat, in seinen Laboren einen Teil des Morphologieprojekts durchzuführen und die Sonden herzustellen.

Prof. Dr. Detlev Drenckhahn, der mir die Labore seines Lehrstuhls zur Verfügung gestellt hat.

Prof. Dr. Paul Pauli, Roswitha Gerhard, das gesamte **GK Emotions** und die **GSLs** für die schöne und erfahrungsreiche Zeit. Das GK Emotions ist eine erfolgreiche und sympathische Gruppe und ich bin sehr froh, ein Teil davon gewesen zu sein.

Rita Herrmann, Karin Reinfurt-Gehm, Sigi Schenk, Erna Kleinschroth, Brigitte Treffny und **Doris Dettelbacher-Weber** für eure kompromisslose Hilfe und Unterstützung zu jeder Zeit! Ihr habt euch immer Zeit genommen, mir sämtliche Methoden und (Arbeits)abläufe in unserem Hause zu erklären. Mit euch war die Atmosphäre im Labor mehr als angenehm, ihr seid spitze!

Dr. Sarah Nietzer, die mir alles beigebracht hat, was ich über NeuroLucida und die Auswertung wissen muss und mich auch bei der Sondenherstellung oft unterstützt hat. Es hat riesig Spaß gemacht, mit Dir zusammen zu arbeiten!

Gabriela Ortega und **Marion Winning** für die spitzenmäßige molekularbiologische bzw. histologische Unterstützung. Danke, dass ihr euch um mich gekümmert habt!

Franziska Töpfer, **Daniel Kriegsmann** und **Marina Pfeuffer** für eure tolle Arbeit als Praktikanten bzw. als Diplomandin!

Prof. Elisabeth Van Bockstaele, **Dr. Beverly Reyes** and **Dr. Ana Carvalho** who supported me inside and outside the lab in Philly. I really appreciate that!

Mario Kreutzfeldt, der mich für ´s Ninjutsu begeistert hat, wodurch ich viele nette Menschen kennenlernen durfte, die sowohl mein körperliches als auch geistiges Wohlbefinden schon oft gestärkt haben und das noch immer tun. DOMO :-)

Risa Sommer, **Linda Mazur** und **Julia Pfenning**, die besten Freundinnen wo gibt! Ihr habt einen großen Teil dazu beigetragen, dass ich so bin wie ich bin, ich hab euch lieb!

Mama und **Papa**, die immer für mich da sind, immer an mich glauben, mich bei allem unterstützen und mir vertrauen. Euch ist diese Arbeit nicht ohne Grund gewidmet.

Oma und **Opa**, die mich auch immer unterstützt und gestärkt haben, das was Gescheites aus mir wird

Dr. Axel Steinke für die extrem witzigen und schönen Monate, die ich mit Dir als Kollege verbringen durfte. Danke für die regenerativsten Mittagspausen, die Betreuung und Vorbereitung während meiner Histo-Zeit, die lehrreichen Stunden im Präpsaal, dass Du mir beigebracht hast, wie man mit Photoshop arbeitet und dass Du jetzt mein bester Freund, Verlobter und bald Ehemann bist! Danke für alles!

34 PUBLIKATION

Nietzer S*, Bonn M* et al. (2011) Serotonin transporter knock out and repeated social defeat stress: Impact on neuronal morphology and plasticity in limbic brain areas. Behavioural Brain Research 220:42–54 (*geteilte Erstautorenschaft)

35 AFFIDAVIT / EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

I hereby declare that my thesis entitled “Targets of the serotonergic system in the latero-basal amygdala: investigations in rats and a mouse model for emotional dysregulation“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I verify that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg,

.

Date

Signature

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Zielstrukturen des serotonergen Systems in der laterobasalen Amygdala: Untersuchungen an Ratten und einem Mausmodell für emotionale Dysregulation“ eigenständig, d. h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg,

.

Datum

Unterschrift