

Aus dem Institut für Anatomie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Identifikation und Charakterisierung von GABAergen
hippocampo-amygdalären Projektionsneuronen

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von	Judith Eberhardt, geb. Fuchs
aus	Ivenrode
Magdeburg	2016

Für meine Familie

„Wer immer nur tut, was er schon kann, bleibt immer nur das, was er schon ist.“

(Henry Ford)

Bibliographische Beschreibung:

Eberhardt, Judith:

Identifikation und Charakterisierung von GABAergen hippocampo-amygdalären Projektionsneuronen.

- 2016. - 102 Bl., 27 Abb., 5 Tab., 2 Anl.

Kurzreferat

GABAerge Neurone sind essentiell für die Regulierung von neuronalen Netzwerken und für die funktionelle Interaktion zwischen Hippocampus und Amygdala. Die vorliegende Arbeit bestätigt, dass diese nicht nur lokal agieren, sondern auch eine GABAerge Projektion vom ventralen Hippocampus und dem angrenzenden Subiculum zur Amygdala existiert. Mit Hilfe von Fluoro-Gold-Injektionen in die Amygdala wurden hippocampo-amygdaläre Projektionsneurone retrograd markiert. Unter der Verwendung einer GAD67-GFP knock-in Mausmutante konnten GABAerge Neurone mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie identifiziert werden. Hierdurch wurde gezeigt, dass 19 % der GABAergen Neurone vom ventralen Hippocampus in die Amygdala projizieren. Davon sind die meisten im Stratum oriens und Stratum pyramidale lokalisiert. Gemessen an der Zahl aller hippocampo-amygdalären Projektionsneurone haben die GABAergen Neurone einen Gesamtanteil von 4 % und sind am häufigsten im Stratum oriens zu finden. Trotz dieses vermeintlich geringen Anteils an allen hippocampo-amygdalären Projektionen, kommt den GABAergen Projektionsneuronen eine bedeutende Rolle bei der Synchronisation der neuronalen Aktivität zwischen Hippocampus und Amygdala sowie der Generierung von Oszillationen zu. Dadurch wird ein schneller Informationsfluss gewährleistet, der eine physiologische Verarbeitung vor allem von emotionsgefärbten Gedächtnisinhalten erlaubt. Zur weiteren Charakterisierung der GABAergen Projektionsneurone wurden Immunfluoreszenzfärbungen zur Detektion von Parvalbumin-, Neuropeptid Y- und Cholecystokinin-exprimierenden Neuronen durchgeführt. Am häufigsten wurde mit 39 % PARV von den GABAergen Projektionsneuronen synthetisiert. Allerdings sind auch NPY und CCK mit 15 % bzw. 12 % nennenswerte Kofaktoren der GABAergen Projektionsneurone.

Schlüsselwörter

Furcht, Angst, Gedächtnis, GABA, Hippocampus, Amygdala

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Allgemeine Einleitung.....	1
1.2	Der Hippocampus	2
1.2.1	Anatomie	2
1.2.2	Funktion und intrinsische Konnektivität	4
1.3	Die Amygdala.....	5
1.3.1	Anatomie, Funktion und intrinsische Konnektivität.....	5
1.4	γ -Aminobuttersäure	7
1.5	GABAerge Interneurone	8
1.5.1	Parvalbumin.....	9
1.5.2	Neuropeptid Y	10
1.5.3	Cholecystokinin	12
1.6	Hippocampo-amygdaläre Projektionen	14
1.6.1	GABAerge Projektionsneurone	14
1.7	Zielstellung	15
2	Material und Methoden	17
2.1	Versuchstiere.....	17
2.1.1	Ethische Grundlagen	17
2.1.2	Mausmutanten und Tierhaltung	17
2.1.3	Tracing	18
2.2	Histologie.....	19
2.2.1	Perfusion und Fixation.....	19
2.2.2	Immunhistochemische Aufarbeitung	19
2.3	Zellzählung und Flächenbestimmung	20
2.3.1	Verwendete Technik.....	20
2.3.2	Kartierung.....	20
2.3.3	Injektionsflächen und Volumenberechnung	23

2.4	Statistik	23
3	Ergebnisse	24
3.1	Allgemeine Verteilung der Neurone.....	24
3.1.1	Verteilung der GABAergen Neurone auf Schichten des Hippocampus.....	24
3.1.2	Verteilung der Projektionsneurone auf Schichten des Hippocampus	25
3.1.2.1	Tracerinjektion, Diffusionsvolumen und retrograd markierte Projektionsneurone .	28
3.1.3	Verteilung der Peptid-positiven Neurone auf Schichten des Hippocampus.....	29
3.1.3.1	Etablierung eines CCK-Färbeprotokolls	31
3.2	GABAerge Projektionsneurone	34
3.2.1	Doppelmarkierte Neurone: FG + GFP	34
3.2.2	Dreifachmarkierte Neurone: FG + GFP + Peptid.....	37
3.3	Peptiderge Neurone	45
3.3.1	PARV-Doppelmarkierungen: FG + PV, GFP + PV.....	45
3.3.2	NPY-Doppelmarkierungen: FG + NPY, GFP + NPY	46
3.3.3	CCK-Doppelmarkierungen: FG + CCK, GFP + CCK	48
4	Diskussion	51
4.1	Auswertung	52
4.2	GABAerge Neurone im ventralen Hippocampus und angrenzendem Subiculum.....	54
4.3	Projektionsneurone im ventralen Hippocampus und angrenzendem Subiculum	55
4.4	Peptid-exprimierende Neurone im ventralen Hippocampus und angrenzendem Subiculum	57
4.5	GABAerge Neurone und ihre Subpopulationen	58
4.6	GABAerge Projektionsneurone des Hippocampus.....	61
4.6.1	Hippocampo-amygdaläre GABAerge Projektionsneurone.....	63
5	Zusammenfassung	66
6	Literaturverzeichnis	67
7	Danksagung.....	79
8	Ehrenerklärung.....	80

9	Darstellung des Bildungsweges	81
10	Anhang.....	82

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Der Hippocampus	3
Abbildung 2	Die Amygdala.....	7
Abbildung 3	Verteilung der PARV-, NPY- bzw. CCK-exprimierenden GABAergen Neurone im Hippocampus.....	9
Abbildung 4	Typische, druckkontrollierte Injektionsstelle der Amygdala	18
Abbildung 5	ROI mit angrenzenden Arealen und Kartierungsbeispiel	22
Abbildung 6	Verteilung der GABAergen Neurone	25
Abbildung 7	Variation der GABAergen Neuronenverteilung.....	25
Abbildung 8	Zusammenfassung der druckkontrollierten Injektionsstellen in der Amygdala	27
Abbildung 9	Verteilung der retrograd markierten Projektionsneurone.....	27
Abbildung 10	Variation der Verteilung retrograd markierter Projektionsneurone.....	27
Abbildung 11	Korrelationsanalyse der retrograd markierten Projektionsneurone zum Diffusionsvolumen von FG	29
Abbildung 12	Verteilung der immunhistochemisch positiven Neurone für PARV, NPY und CCK ...	30
Abbildung 13	Variation der peptidergen Neuronenverteilung von PARV-, NPY- und CCK-positiven Neuronen.....	31
Abbildung 14	Etablierung eines Färbeprotokolls zur Detektion von CCK.....	33
Abbildung 15	Variation der Verteilung GABAerger Projektionsneurone	35
Abbildung 16	Anteil GABAerger Projektionsneurone an allen GABAergen Neuronen	36
Abbildung 17	Anteil der GABAergen Projektionsneurone an allen Projektionsneuronen	36
Abbildung 18	Absolute Neuronenzahl der Projektionsneurone und GABAergen Neurone.....	37
Abbildung 19	Dreifachmarkierte Neurone	38
Abbildung 20	Gesamtanteil der dreifachmarkierten Neurone an den GABAergen Projektionsneuronen in %	40
Abbildung 21	Anteil der dreifachmarkierten Neurone an den GABAergen Projektionsneuronen in der jeweiligen Hippocampusschicht.....	41
Abbildung 22	Allgemeine Verteilung der PARV-, NPY- und CCK-exprimierenden GABAergen Projektionsneurone auf Schichten des Hippocampus	42
Abbildung 23	Absolute Anzahl der Dreifachmarkierungen je Hirnschnitt und Peptid	43
Abbildung 24	Dreifachmarkierte Neurone in Relation zu allen Projektionsneuronen (T / FG), GABAergen Neuronen (T / GFP) und Peptid-positiven Neuronen (T / Peptid)	44
Abbildung 25	PARV-Doppelmarkierungen: FG + PV, GFP + PV.....	46
Abbildung 26	NPY-Doppelmarkierungen: FG + NPY, GFP + NPY	48

Abbildung 27 CCK-Doppelmarkierungen: FG + CCK, GFP + CCK 50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verteilung der GABAergen Projektionsneurone auf Schichten des Hippocampus.....	35
Tabelle 2	PARV-, NPY- bzw. CCK-positive GABAerge Projektionsneurone in %.....	39
Tabelle 3	GABAerge Neuronenverteilung auf Schichten des Hippocampus	87
Tabelle 4	Verteilung der retrograd markierten Projektionsneurone auf Schichten des Hippocampus	88
Tabelle 5	Verteilung der PARV-, NPY- bzw. CCK-positiven Neurone auf Schichten des Hippocampus	89

Abkürzungsverzeichnis

AP	Anterior-posterior
B	Nucleus basalis
BA	Nucleus basalis accessorius
BSA	Bovines Serumalbumin
CA	Cornu ammonis
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCK	Cholecystokinin
CEA	Nucleus centralis
CM	Nucleus medialis
CO	Nucleus corticalis
Cy	Cyanin-Farbstoff
Da	Dalton
DG	Gyrus dentatus
DV	Dorso-ventral
EC	Entorhinaler Cortex
FG	Fluoro-Gold
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAD	Glutamatdecarboxylase
GFP	Green Fluorescent Protein
i.p.	intraperitoneal
la	Stratum lacunosum
LA	Nucleus lateralis
LTP	Langzeit-Potenzierung
ML	Medio-lateral
mo	Stratum moleculare
MW	Mittelwert
NGS	Normal goat serum
NHS	Normal horse serum
NPY	Neuropeptid Y
PARV	Parvalbumin
PB	Phosphatpuffer
po	Stratum multiforme, polymorphe Schicht
PP	Pankreatisches Polypeptid
PV	PARV, Parvalbumin
PYY	Peptid YY
ra	Stratum radiatum

ROI	Region of Interest
sg	Stratum granulosum
slu	Stratum lucidum
sm	Stratum moleculare
so	Stratum oriens
sp	Stratum pyramidale
SPF	Specific pathogen free
Str.	Stratum
T	dreifachmarkierte Neurone, Triple
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
γ	gamma
θ	theta

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einleitung

„Cogito ergo sum“ (in Originalsprache „Je pense donc je suis“), „Ich denke, also bin ich“, dieses berühmte Zitat von René Descartes (1596-1650) bildet einen bekannten Grundsatz der Philosophie. Die Frage nach den biologischen Korrelaten des Denkens motiviert Hirnforscher seit Jahrzehnten zur täglichen Arbeit. Viele Erkenntnisse wurden bereits gewonnen, die dabei helfen, unser Denken und den Vorgang der Gedächtnisbildung zu verstehen. Zur traurigen Berühmtheit gelangte dabei der Patient H.M., der an Epilepsie litt. Zur Therapie seines Leidens wurde nach frustranter medikamentöser Therapie eine bilaterale, mediale Temporallappenlobektomie inklusive Hippocampus und Amygdala durchgeführt. Diese Maßnahme führte zur Reduzierung der Anfallshäufigkeit, jedoch litt der Patient postoperativ an einer ausgeprägten und anhaltenden anterograden Amnesie, die sowohl das deklarative als auch das episodische Gedächtnis beeinträchtigte. Das Kurzzeit- und Arbeitsgedächtnis blieben davon unbeeinflusst (Scoville und Milner 1957; Corkin 1984; Eichenbaum 2013). Diese Erkenntnis verstärkte die Vermutung, dass Hippocampus und Amygdala essentiell für Gedächtnisbildung und Konsolidierung von Wissen sind. Es folgten zahlreiche weitere Versuche und Experimente, die diese Annahme festigten und die Beteiligung weiterer Hirnstrukturen an den komplexen Vorgängen der Informationsverarbeitung und Emotionsbildung zeigten. Konsistent bei allen Daten war die Bedeutung von Amygdala und Hippocampus bei der Verarbeitung von Sinneseindrücken und der Gedächtnisbildung, vor allem bei jenen Gedächtnisinhalten, die mit Emotionen assoziiert sind und in einem bestimmten räumlichen Kontext stattfinden (Davis 1992; LeDoux 2000; McGaugh 2000; Kentros 2006; Quirk und Mueller 2008). Im Rahmen dessen wurde der Begriff des limbischen Systems stets moduliert und erweitert. Es umfasst Hirnstrukturen, die unter anderem essentiell für Gedächtnis und Emotionen sind. Dazu zählen zum einen Amygdala und Hippocampus, zum anderen aber auch zahlreiche weitere Strukturen, wie z. B. Corpus mamillare und Gyrus cinguli (MacLean 1949; Isaacson 1982). Allerdings besteht keine einheitliche Definition, welche Strukturen zum limbischen System gehören (LeDoux 2000). Vielfach wurde bei den Untersuchungen „Angst“ als elementare und verhältnismäßig leicht provozierbare Emotion genutzt, um Erkenntnisse über die neurobiologischen Korrelate zu gewinnen. Das Modell der kontextuellen Furchtkonditionierung stellt hierbei eine häufig angewandte Versuchsmethodik in der Hirnforschung dar, bei dem Tieren ein neutraler konditionierter Reiz (Ton, Licht, Geruch) in einer bestimmten Umgebung geboten wird, der mit einem aversiven, unkonditionierten Reiz wie, z. B. einem Fußschock, gekoppelt ist. Die Tiere lernen die Assoziation zwischen konditioniertem und unkonditioniertem Reiz und reagieren infolgedessen auf den vormals

neutralen Reiz mit Furchtverhalten (Fendt und Fanselow 1999; Makkar et al. 2010). Heutzutage ermöglicht die Verwendung von Tiermodellen intensive Forschung mit sehr hohem Erkenntnisgewinn ohne verfrühten Einsatz am Menschen.

Im Rahmen dieser Arbeit soll ein besonderes Augenmerk auf die Konnektion zwischen Hippocampus und Amygdala gelegt werden, speziell auf Projektionen, die von GABAergen Neuronen des Hippocampus ausgehen. Zunächst folgen allgemeine Ausführungen zu den beteiligten Hirnstrukturen, Hippocampus und Amygdala.

1.2 Der Hippocampus

1.2.1 Anatomie

Der Hippocampus (griech.: „Seepferdchen“) ist ein wichtiger Bestandteil des limbischen Systems. Er befindet sich beim Menschen an der Wand des Seitenventrikelunterhorns und stellt sich makroskopisch als bilaterale, bogenförmige Struktur dar, die sich ausgehend von den Septumkernen von rostral-dorsal nach kaudal-ventral in den Temporallappen erstreckt. Er bildet den größten Anteil des Archicortex und weist typischerweise, im Gegensatz zum Neocortex, eine dreischichtige Struktur auf (Andersen et al. 1969). Oftmals wird auch von der Hippocampusformation gesprochen, die aus folgenden Teilen besteht: Gyrus dentatus (DG, auch Fascia dentata), Cornu ammonis (CA, Ammonshorn, Hippocampus im engeren Sinne) und Subiculum (Witter und Amaral 1995). Von manchen Autoren wird auch der entorhinale Cortex (EC) zur Hippocampusformation gezählt (Blackstad 1956; Amaral und Witter 1989). Das Ammonshorn wurde aufgrund seiner unterschiedlichen Neuronendichte und Verschaltung nach der Nomenklatur von Lorente de Nó zusätzlich in die Cornu ammonis-Regionen CA1-3 gegliedert (Lorente De Nó 1934). Prinzipiell sind der Aufbau und die Konnektivität des Hippocampus bei den verschiedenen Arten, wie z. B. Maus, Katze, Affe oder Mensch konsistent und miteinander vergleichbar (Abbildung 1A) (Swanson et al. 1987; Suzuki und Amaral 1990; Burwell 2000; van Groen et al. 2003; Witter und Amaral 2004; Cenquizca und Swanson 2007; Chrobak und Amaral 2007).

Die zytoarchitektonische Struktur der Cornu ammonis-Regionen ist ähnlich und gliedert sich in ein Stratum oriens (so, Korbzellschicht), ein Stratum pyramidale (sp, Pyramidenzellschicht) und schließlich in ein zellarmes Stratum moleculare (sm, Molekularschicht), das in ein Stratum radiatum (sr) und Stratum lacunosum (sl) unterteilt werden kann. Das Stratum moleculare wird deshalb auch als Stratum radiatum-lacunosum-moleculare (Trepel 2008) bezeichnet. In der CA3-Region befindet sich zwischen dem Stratum pyramidale und dem Stratum radiatum zusätzlich ein Stratum lucidum (slu). Der Gyrus dentatus zeigt einen vergleichbaren dreischichtigen Aufbau und legt sich „C“-förmig

um die Cornu ammonis-Struktur. Er besteht aus einem Stratum moleculare (mo), einem Stratum granulosum (sg, Körnerzellband) und einem Stratum multiforme (po, auch polymorphe Schicht). Das Stratum granulosum weist anstelle des Stratum pyramidale kleinere, körnerzellartige Neurone auf, deren Dendriten sich in der Molekularschicht befinden. Die Axone der Körnerzellen werden auch als Moosfasern bezeichnet und entsenden diese unter anderem ins Stratum multiforme sowie in die CA3-Region, wo sie Pyramidenzellen und beiliegende Interneurone kontaktieren (Amaral et al. 2007). Abbildung 1B stellt den Hippocampus eines Nagetiers mit seinem laminaren Aufbau dar.

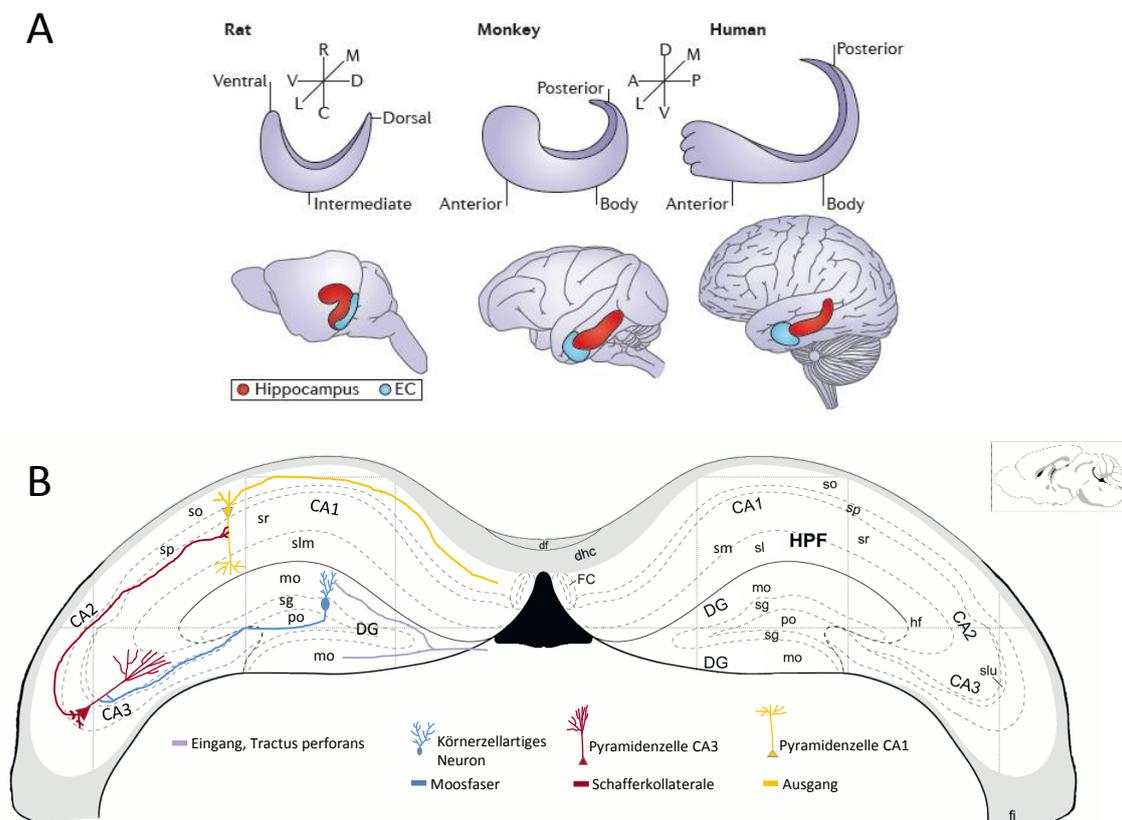


Abbildung 1 Der Hippocampus

(A) Schematische Darstellung der Hippocampuslage in Ratten, Affen und Menschen. Die longitudinale Achse wird bei Nagetieren als ventro-dorsal beschrieben und entspricht bei Primaten der anterior-posterioren Achse. EC: entorhinaler Cortex (Strange et al. 2014).

(B) Hippocampusaufbau einer Maus (rechts) und schematische Darstellung des unidirektionalen, trisynaptischen Schaltkreises (links). Abstand zum Bregma - 2,255 mm. HPF: Hippocampal formation, CA: Ammon's Horn, DG: Dentate gyrus, so: Stratum oriens, sp: Pyramidal layer, sr: Stratum radiatum, sl: Stratum lacunosum, slu: Stratum lucidum, mo: Molecular layer, sg: Granule cell layer, po: Polymorph layer, hf: Hippocampal fissure, fi: Fimbria, df: Dorsal fornix, dhc: Dorsal hippocampal commissure, FC: Fasciola cinerea (geändert nach Franklin und Paxinos 2007).

1.2.2 Funktion und intrinsische Konnektivität

Der Hippocampus ist fundamental für Gedächtnisbildung, Verhalten und spezielle Aspekte von Emotionen (Scoville und Milner 1957; O'Keefe und Nadel 1979; Swanson et al. 1987). Als Teil des limbischen Systems dient er der Verarbeitung und Integration von Sinneswahrnehmungen und beeinflusst das vegetative Nervensystem durch Regulierung der hypothalamisch-hypophysären-adrenalen Achse. Anatomisch und funktionell kann man ihn entlang seiner longitudinalen Achse in einen dorsalen, intermediären und ventralen Hippocampus unterteilen. Das dorsale Kompartiment entspricht dem posterioren Hippocampus des Primaten, das ventrale Kompartiment entspricht dem anterioren Hippocampus beim Primaten (Abbildung 1A) (Bannerman et al. 2004; Fanselow und Dong 2010; Strange et al. 2014). Der dorsale Hippocampus ist in kognitive Prozesse des Lernens und der Gedächtnisbildung involviert, die insbesondere mit Navigation, Lokomotion und Exploration assoziiert sind, und ist für das räumliche Lernen unverzichtbar (Moser et al. 1995; Pothuizen et al. 2004). Emotionales Verhalten und affektive Prozesse werden durch den ventralen Hippocampus moduliert und verarbeitet (Fanselow und Dong 2010). Insbesondere furcht- bzw. angst-assoziiertes Verhalten wird maßgeblich vom ventralen Hippocampus beeinflusst (Bannerman et al. 2004; Rudy und Matus-Amat 2005; Sierra-Mercado et al. 2011; Donley et al. 2005). Über die Funktion des intermediären Hippocampus ist weitaus weniger bekannt, gleichwohl man auch hier von einer Beteiligung an der Verarbeitung von kognitiven und räumlichen Gedächtnisinhalten sowie Übersetzung jener in Motivation und Aktionen ausgeht, die wichtig zum Überleben sind (Bast 2007; Bast et al. 2009).

Auf zellulärer Ebene liegt dem Lernen und der Gedächtnisbildung das Phänomen der Langzeit-Potenzierung (LTP) zugrunde (Maren und Fanselow 1995; Maren und Baudry 1995). Hier kommt es durch repetitive Reize zur Verstärkung der synaptischen Transmission und Modulation; man spricht auch von synaptischer Plastizität (Bliss und Gardner-Medwin 1973; Pastalkova et al. 2006; Whitlock et al. 2006). Dabei wird den N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren eine herausragende Rolle zugeschrieben (Collingridge 1987).

Haupteintrittspforte für Afferenzen des Hippocampus ist der Gyrus dentatus, dessen größter Input über den Tractus perforans vom entorhinalen Cortex ausgeht. Der Tractus perforans terminiert in der Molekularschicht des Gyrus dentatus. Die glutamatergen Körnerzellen projizieren mittels Moosfasern in das Stratum lucidum der CA3-Region. Von hier projizieren Axone der Pyramidenzellen in die CA1-Region. Diese Axone werden auch Schaffer-Kollaterale genannt. Von der CA1-Region erfolgen weitere Projektionen ins Subiculum und von dort weiter in den entorhinalen Cortex. Zudem verlassen Efferenzen den Hippocampus über die Fimbria hippocampi, um in andere Hirnareale wie Amygdala,

Cortex, Hypothalamus oder Corpora mamillaria zu projizieren. Die gerichtete Projektion innerhalb der Hippocampusformation ist auch als unidirektionaler, trisynaptischer Schaltkreis bekannt (Abbildung 1B) (Amaral und Witter 1989; Amaral et al. 2007). Dieser wird durch GABAerge Interneurone moduliert, die durch ihre Aktivität Einfluss auf die exzitatorischen Neurone des Hippocampus nehmen (Freund und Buzsaki 1996; Benes und Berretta 2001).

1.3 Die Amygdala

1.3.1 Anatomie, Funktion und intrinsische Konnektivität

Die Amygdala (Corpus amygdaloideum) ist ein paarig angelegter Komplex aus mehreren Kernen, der sich im medialen Temporallappen befindet. Makroskopisch erinnert die humane Amygdala an eine Mandel, sodass Burdach (Burdach 1819-1822) diese heterogene Kerngruppe als Amygdala (latein.: „Mandelkern“) bezeichnete. Die Kerne unterscheiden sich sowohl funktionell als auch anatomisch und können in weitere Subnuclei unterteilt werden (Johnston 1923; Swanson und Petrovich 1998). Nach Pitkänen können bei der Ratte analog zum Primatenhirn (Amaral et al. 1992) folgende drei Hauptkerngruppen mit ihren dazugehörigen Nuclei unterschieden werden:

tiefe Nuclei - Nucleus lateralis (LA), Nucleus basalis (B), Nucleus basalis accessorius (BA);
(= basolateraler Komplex oder basolaterale Amygdala);

superficiale Nuclei - Nucleus tractus olfactorii lateralis, Nucleus tractus olfactorii accessorius, Nucleus corticalis anterior, Nucleus medialis, Cortex periamygdaloidalis, Nucleus corticalis posterior;

weitere Areale der Amygdala - Area amygdaloidales anterior, Nucleus centralis (CEA), Area amygdalohippocampalis, zwischengeschaltete Nuclei (IA) (Pitkänen et al. 1997).

Der Nucleus basalis wird in manchen Klassifikationen auch als Nucleus basolateralis bezeichnet und der Nucleus basalis accessorius als Nucleus basomedialis (LeDoux 2000). Darüber hinaus kann die Amygdala entsprechend ihrer phylogenetischen Entwicklung unterteilt werden. Demnach unterscheidet man eine phylogenetisch ältere cortico-mediale bzw. zentro-mediale Kerngruppe, die eng mit dem olfaktorischen System assoziiert ist, von einer jüngeren basolateralen Kerngruppe, die eng mit dem Neocortex verbunden ist (Johnston 1923; Swanson und Petrovich 1998). Diese Einteilungen sind vereinfacht und stellen lediglich einen Auszug der zahlreichen Nomenklaturmöglichkeiten dar, die kontrovers diskutiert werden.

Die Amygdala gehört wie der Hippocampus zum limbischen System und beeinflusst sowohl regulatorische als auch verhaltensbezogene Funktionen. Sie ist beteiligt an der emotionalen

Gedächtnisbildung, am Aggressions-, Sozial- und Sexualverhalten sowie an autonomen und endokrinen Prozessen (Davis und Whalen 2001). Als eine Art Integrationsorgan moduliert sie Gedächtnisinhalte und stellt eine Brücke zwischen Bewusstsein und Emotion dar, obgleich nicht alle verarbeiteten Informationen in unser Bewusstsein treten. Von besonderer Bedeutung ist sie bei Emotionen, die mit Angst und Wut assoziiert sind (Brioni et al. 1989; Davis 1992; LeDoux 2000; Davis und Whalen 2001; Donley et al. 2005). Hier wird der Interaktion zwischen Hippocampus und Amygdala eine außerordentliche Bedeutung beigemessen.

Bei der Furchtkonditionierung sind insbesondere Nucleus lateralis (LA), Nucleus basalis (B), Nucleus basalis accessorius (BA) und Nucleus centralis (CEA) von Bedeutung (LeDoux 2000). Der LA ist die Haupteintrittspforte für auditorische und andere sensorische Afferenzen (LeDoux et al. 1990a; LeDoux et al. 1990b; Pitkänen et al. 1997). Von hier erfolgen Projektionen in den B, BA und CEA. Der B und BA projizieren ebenfalls in den CEA, der konvergent Informationen von allen Amygdalakernen erhält (LeDoux 2000). Der CEA fungiert als Hauptausgangskern und weist unter anderem Projektionen zum Hirnstamm und Hypothalamus auf (LeDoux et al. 1988; Pitkänen et al. 1997; Pitkänen et al. 2000), wo unter anderem vegetative Reaktionen auf Emotionen wie z. B. Angst und Wut gesteuert werden. Abbildung 2 zeigt die Amygdala mit ihren Kerngebieten und den wichtigsten neuronalen Projektionen innerhalb der Amygdala bei der Furchtkonditionierung.

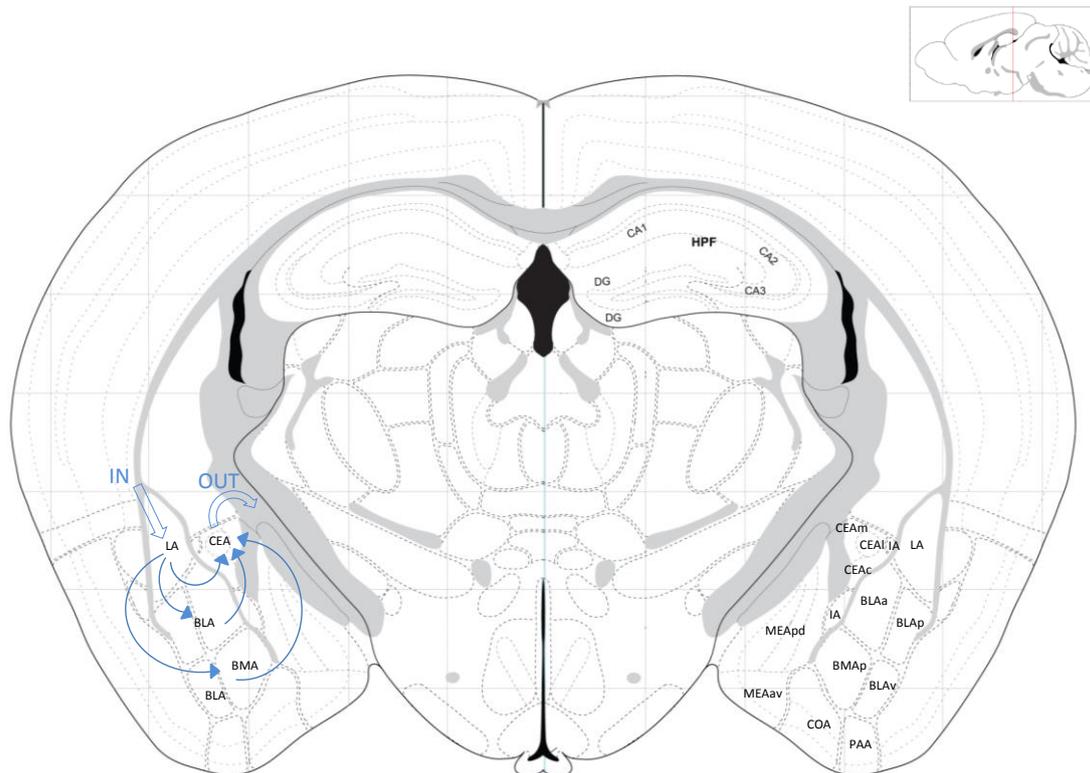


Abbildung 2 Die Amygdala

in einem coronaren Schnitt eines Mäusehirns. Abstand zum Bregma - 1,855 mm.

Rechte Bildhälfte: Darstellung der verschiedenen Kerngebiete. LA: Lateral amygdalar nucleus, BLA: Basolateral amygdalar nucleus (entspricht B), BLAa: anterior part, BLAp: posterior part, BLAv: ventral part, BMAp: Basomedial amygdalar nucleus (entspricht BA), posterior part, MEA: Medial amygdalar nucleus, MEApd: posterodorsal part, MEAav: anteroventral part, COA: Cortical amygdalar area, PAA: Piriform-amygdalar area, IA: intercalated amygdalar nucleus, CEA: Central amygdalar nucleus, CEAc: capsule part, CEAl: lateral part, CEAm: medial part, HPF: Hippocampal formation, CA: Ammon's Horn, DG: Dentate gyrus.

Linke Bildhälfte: Darstellung der wichtigsten neuronalen Projektionen bei der Furchtkonditionierung. Haupteingangspforte für sensorische Reize ist der LA, der weiter in den BLA, CEA und BMA projiziert. BLA und BMA projizieren ebenfalls in den CEA, der als Hauptauskangskern fungiert (LeDoux 2000) (geändert nach Franklin und Paxinos 2007).

1.4 γ -Aminobuttersäure

Bevor im Speziellen die hippocampo-amygdalären Projektionen beschrieben werden, soll zunächst die γ -Aminobuttersäure (GABA) näher charakterisiert werden. GABA ist der wichtigste inhibitorische Transmitter des zentralen Nervensystems bei Säugetieren (Krnjevic und Schwartz 1967; Storm-Mathisen 1977; Brioni et al. 1989; Castellano und McGaugh 1989), obgleich auch in nicht neuronalen Geweben wie Niere und Pankreas eine GABA-Synthese nachgewiesen wurde (Storm-Mathisen 1977; Adeghate und Ponery 2002; Takano et al. 2014). Die Synthese von GABA aus Glutamat erfolgt unter der Entstehung von CO_2 durch zwei Isoformen der Glutamatdecarboxylase (GAD), der Abbau erfolgt durch GABA-Transaminasen. Die beiden Isoformen der GAD heißen entsprechend ihrem geschätzten

molekularen Gewicht (65000 Da, 67000 Da) GAD65 bzw. GAD67 und machen rund 99 % der GABA-Synthese im Hirn aus (Asada et al. 1996; Soghomonian und Martin 1998). Dies macht GAD zu einem optimalen Marker für die Detektion von GABAergen Neuronen (Storm-Mathisen 1977). Die Isoformen werden von zwei unterschiedlichen Genen exprimiert, die unabhängig voneinander reguliert werden. In den meisten GABAergen Neuronen sind beide Isoformen zu finden, wobei GAD67 eher zytosolisch lokalisiert und für die metabolische GABA-Synthese notwendig ist, wohingegen GAD65 membranassoziiert und für die aktivitätsabhängige GABA-Synthese verantwortlich ist (Erlander und Tobin 1991; Stone et al. 1999).

Die GABAerge Wirkung wird durch drei Hauptrezeptorgruppen vermittelt, den GABA_A-, GABA_B- und GABA_C-Rezeptoren. Die GABA_A- und GABA_C-Rezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, deren Aktivierung zu einem Chlorideinstrom führt und somit zu einer Hyperpolarisation der Zelle. Der GABA_B-Rezeptor ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, dessen Aktivierung K⁺- und Ca²⁺-Kanäle öffnet. Der GABA_A-Rezeptor ist am häufigsten im Hirn zu finden (Pirker et al. 2000) und besitzt zusätzlich eine Ligandenstelle für Benzodiazepine, Barbiturate, Steroide und Alkohol (Bormann 2000; Stephenson 2006).

Der GABA_A-Rezeptor ist auch an der Angstgedächtnisbildung beteiligt und spielt somit sowohl in der Amygdala als auch im Hippocampus eine entscheidende Rolle. Es konnte unter der Verwendung von GABA-Agonisten und -Antagonisten gezeigt werden, dass GABA den Wissenserwerb, die Konsolidierung, Rekonsolidierung und Extinktion angstassoziiertes Gedächtnisinhalte stört (Quirk und Mueller 2008; Makkar et al. 2010) und „Vergessen“ ermöglicht (Kim et al. 2006). Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass die GABAerge Transmission bei der Angstgedächtnisbildung in der Amygdala und im Hippocampus herunterreguliert wird (Makkar et al. 2010). Diese Herabregulation findet in der Amygdala im basolateralen Amygdalakern statt (Akirav et al. 2006; Belau und McGaugh 2006).

1.5 GABAerge Interneurone

Hauptbildungsort der neuronalen GABA sind Interneurone, die die Aktivität von Projektionsneuronen und anderen Interneuronen modulieren. Dies geschieht entweder durch eine direkte Inhibition oder durch eine indirekte Disinhibition, wenn durch die Transmission von GABA ein anderes GABAerges Interneuron gehemmt wird und infolgedessen eine glutamaterge Exzitation keine Hemmung erfährt. Dadurch sind GABAerge Interneurone in der Lage, die Aktivität von Exzitationsneuronen zu synchronisieren, und schaffen damit die Grundlage für synaptische Plastizität (Traub et al. 2004; Mann et al. 2005). Durch diese Synchronisation entstehen rhythmische Oszillationen, die den Informationsfluss zwischen Hirnarealen erleichtern. Im Hippocampus führt dies unter anderem zur

Entstehung einer γ -Oszillation (40 bis 100 Hz), die bei der Gedächtnisbildung von Bedeutung ist (Buzsaki und Chrobak 1995; Lisman und Idiart 1995; Traub et al. 2004).

GABAerge Interneurone des Hippocampus können in axo-somatische Korbzellen, axo-axonale Kandelaberzellen, axo-dendritische Zellen (weitere Unterteilung möglich) sowie selektive Interneurone, die Synapsen mit anderen Interneuronen bilden, eingeteilt werden (Freund und Buzsaki 1996; Benes und Berretta 2001; Klausberger und Somogyi 2008). Ihr Anteil an der Gesamtpopulation aller Neurone im Hippocampus wird zwischen 7 % (Aika et al. 1994) bis 11 % (Woodson et al. 1989) beziffert.

Die Entdeckung, dass Neuropeptide wie Somatostatin, Cholecystokin (CCK) und Neuropeptid Y (NPY) (Hökfelt et al. 1980; Swanson 1983; Somogyi et al. 1984) sowie Calcium-bindende Proteine wie Parvalbumin (PARV), Calbindin und Calretinin (Celio 1986; Baimbridge et al. 1992) als Modulatoren bzw. Kotransmitter in GABAergen Neuronen agieren, führte zu einer weiteren Subklassifizierung der Interneurone (Freund und Buzsaki 1996). Weiterhin können sie anhand ihrer Morphologie, elektrophysiologischen Eigenschaften und synaptischen Konnektivität unterschieden werden (Benes und Berretta 2001). Der Fokus dieser Arbeit liegt allerdings auf der biochemischen Charakterisierung der GABAergen Neurone anhand ihres Gehalts an Calcium-bindenden Peptiden bzw. Neuropeptiden, im Speziellen PARV, NPY und CCK. Diese drei Peptide sollen im Folgenden vorgestellt werden. Abbildung 3 zeigt die Verteilung der PARV-, NPY- und CCK-exprimierenden GABAergen Neurone im Hippocampus nach Freund und Buzsaki (1996).

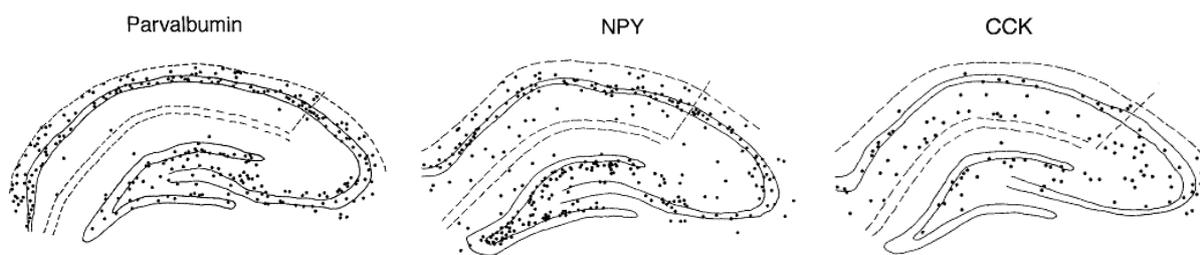


Abbildung 3 Verteilung der PARV-, NPY- bzw. CCK-exprimierenden GABAergen Neurone im Hippocampus nach (Freund und Buzsaki 1996).

1.5.1 Parvalbumin

Parvalbumin (PARV, PV) gehört zu den Calcium-bindenden Proteinen mit einem molekularen Gewicht von 12000 Da (Berchtold et al. 1985). Es wird in Muskelgewebe, Hirn und endokrinen Drüsen wie Hoden exprimiert und ist zytosolisch lokalisiert (Heizmann 1984; Kosaka et al. 1987). Aufgrund seiner Calcium-bindenden Eigenschaften ist es an der Calciumhomöostase beteiligt (Kosaka et al. 1987;

Vreugdenhil et al. 2003), wodurch PARV indirekt Einfluss auf die GABAerge Neurotransmission nimmt (Andressen et al. 1993). PARV weist Bindungsstellen für Ca^{2+} und Magnesium $^{2+}$ auf. Im Ruhezustand ist Magnesium an PARV gebunden. Bei einem Calciumanstieg in der Zelle wird Magnesium verdrängt und Calcium bindet an PARV. So kommt es zu einer Abnahme der zytosolischen Calciumkonzentration und konsekutiv zu einer verminderten GABA-Transmission (Vreugdenhil et al. 2003). Indes bleibt die intrazelluläre Calciumkonzentration in Ruhe oder der Peak bei maximaler Aktivierung unbeeinflusst von diesem Mechanismus (Lee et al. 2000), da die Calciumbindungsrate von PARV durch die langsame Dissoziation von Magnesium limitiert ist und es zu den langsam-Calcium-puffernden Proteinen zählt (Schwaller et al. 1999; McGaugh 2004; Lee et al. 2000; Vreugdenhil et al. 2003).

Bei niederen Wirbeltieren existieren mehrere Isoformen von PARV, wohingegen bei Nagetieren und beim Menschen bisher nur eine Isoform nachgewiesen wurde (Heizmann 1984; Schwaller et al. 1999). Celio et al. konnten bei der Ratte erstmalig zeigen, dass rund 70 % der GABAergen Neurone im Cortex PARV exprimieren (Celio 1986). Dabei handelt es sich meist um schnell feuernde Neurone mit dick myelinisiertem Axon (Kawaguchi et al. 1987; Celio 1990). Auch im Hippocampus wurden PARV-exprimierende GABAerge Neurone nachgewiesen, die eine wichtige Subpopulation der Interneurone darstellen und zur Synchronisierung des neuronalen Netzwerks beitragen (Freund 2003; Klausberger et al. 2005). Sie sind hauptsächlich im Stratum oriens und Stratum pyramidale lokalisiert, wohingegen im Stratum moleculare kaum PARV-exprimierende GABAerge Neurone nachgewiesen wurden (Freund und Buzsaki 1996). Entsprechend ihrer Verteilung und Morphologie handelt es sich dabei hauptsächlich um Korb- bzw. Kandelaberzellen (Kosaka et al. 1987), deren Axone meist perisomatisch terminieren (Vreugdenhil et al. 2003). Wie auch andere Calcium-bindende Proteine schützt PARV im Hippocampus vor zu hohen intrazellulären Calciumkonzentrationen und Ischämie-bedingtem Zelltod (Freund et al. 1992). Immunhistochemische Färbungen haben gezeigt, dass die Verteilung der PARV-positiven GABAergen Neurone im Hippocampus der Ratte der des Menschen ähnelt (Berchtold et al. 1985).

1.5.2 Neuropeptid Y

Das Neuropeptid Y (NPY) besteht aus 36 Aminosäuren und ist strukturell eng verwandt mit dem pankreatischen Polypeptid (PP) und dem Peptid YY (PYY) (Tatemoto et al. 1982). Die Peptidsequenz ist evolutionär sehr gut konserviert und weist sowohl am N- als auch am C-Terminus Tyrosin (Einzelbuchstabencode Y) auf, weshalb es Neuropeptid Y genannt wurde (Tatemoto et al. 1982). Es wird ausschließlich von Nervenzellen synthetisiert und ist im zentralen wie auch im peripheren

Nervensystem nachweisbar, wo NPY generell mit anderen Transmittern kolokalisiert ist (Colmers und Bleakman 1994).

Die Funktion von NPY ist abhängig von der Lokalisation und Koexistenz mit anderen Peptiden. Es beeinflusst zahlreiche physiologische Prozesse, wie z. B. Nahrungsaufnahme, Blutdruck, Sexualverhalten, Krampfbereitschaft, Schmerz, Neurogenese, Hormonfreisetzung und zirkadiane Rhythmik (Pedrazzini et al. 2003; Lin et al. 2004; Decressac und Barker 2012). Zudem verbessert es die Merkfähigkeit (Flood et al. 1987; Morley und Flood 1990) und ist von Bedeutung in Stress- bzw. Angstsituationen (Thorsell et al. 1998; Conrad und McEwen 2000; Gutman et al. 2008). Darüber hinaus wirkt es anxiolytisch und fördert die Extinktion von konditionierter Furcht (Gutman et al. 2008). NPY hat dabei nicht nur postsynaptische, sondern auch präsynaptische Effekte und entfaltet seine Wirkung über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Grundemar et al. 1992; Larhammar et al. 1993; Pedrazzini et al. 2003). Bei Säugetieren sind fünf solcher NPY-Rezeptoren (Y_1 , Y_2 , Y_4 , Y_5 , Y_6) bekannt, von denen vier (Y_1 , Y_2 , Y_4 , Y_5) beim Menschen nachgewiesen wurden (Michel et al. 1998). Ihre Aktivierung hat die Inhibition der cAMP-Synthese zur Folge, mobilisiert intrazelluläres Calcium und moduliert Ca^{2+} - und K^+ -Kanäle (Holliday et al. 2004). Die Rezeptoren Y_1 und Y_2 sind sowohl im zentralen als auch peripheren Nervensystem zu finden. Der Y_1 -Rezeptor vermittelt hauptsächlich die Vasokonstriktion und Nahrungsaufnahme. Ferner ist er an der Aktivierung und Regulierung der neuroendokrinen Achse beteiligt. Der Y_2 -Rezeptor ist der einzige Rezeptor, der auch präsynaptisch lokalisiert ist. Seine präsynaptische Aktivierung führt zur Hemmung der Transmitterfreisetzung, z. B. von GABA, Glutamat sowie Noradrenalin, und hemmt auch die eigene Freisetzung (Wahlestedt et al. 1990; Colmers et al. 1991; Michel et al. 1998; Pedrazzini et al. 2003). Des Weiteren sind beide Rezeptoren (Y_1 , Y_2) wichtig für die anxiolytische Wirkung von NPY, wobei eine Stimulierung von Y_1 und Inhibition von Y_2 diesen Effekt erzielen (Verma et al. 2012; Lach und de Lima, Thereza Christina Monteiro 2013). An den Y_4 -Rezeptor bindet hauptsächlich PP. Er wird beim Menschen vor allem im Gastrointestinaltrakt exprimiert und reduziert die Nahrungsaufnahme, indem das Sättigungsgefühl gesteigert wird (McLaughlin und Baile 1981; Pedrazzini et al. 2003). Der Y_5 -Rezeptor ähnelt strukturell dem Y_1 -Rezeptor und fördert die Nahrungsaufnahme. Er wird hauptsächlich im Hirn exprimiert (Michel et al. 1998; Pedrazzini et al. 2003).

Im autonomen Nervensystem wird NPY gehäuft in noradrenergen und adrenergen sympathischen Neuronen exprimiert und ist daher nahezu in allen Geweben, die sympathisch innerviert werden, nachzuweisen. Dazu gehören unter anderem das kardiovaskuläre, endokrine und neuroendokrine System sowie der Gastrointestinal-, Respirations- und Urogenitaltrakt (Lundberg et al. 1983; Allen et al. 1983a). Dennoch ist NPY nicht ausschließlich mit Katecholaminen kolokalisiert (Allen und Bloom

1986; McDonald 1988). Im zentralen Nervensystem wird NPY vornehmlich in GABAergen Interneuronen exprimiert und ist in vielen Hirnarealen zu finden (Hendry et al. 1984a; Sperk et al. 2007; Karagiannis et al. 2009). Besonders hohe NPY-Konzentrationen wurden im Hypothalamus, Hippocampus, in der Amygdala und im Nucleus accumbens detektiert (Adrian et al. 1983; Allen et al. 1983b). Auch zentral existiert eine Kollokalisierung mit Noradrenalin, vor allem in Neuronen des Hirnstamms, die kaudal projizieren (Colmers und Bleakman 1994). Im Cortex und Hippocampus wurde außerdem eine Kollokalisierung von NPY mit dem Peptidhormon Somatostatin nachgewiesen (Hendry et al. 1984b; Allen und Bloom 1986; Chan-Palay 1987; Finsen et al. 1992; Freund und Buzsaki 1996). Trotz dieser zum Teil gemeinsamen Expression von NPY und Somatostatin in einem Neuron, handelt es sich um unabhängige neuronale Systeme, da die meisten Neurone entweder NPY oder Somatostatin exprimieren (Hendry et al. 1984b). NPY-exprimierende Neurone im Hippocampus sind vorrangig im Stratum oriens und Stratum pyramidale, vereinzelt auch im Stratum radiatum lokalisiert (Freund und Buzsaki 1996). NPY als solches hat im Hippocampus eine wichtige Bedeutung als endogenes Antiepileptikum via Stimulierung von Y_2 -Rezeptoren und konsekutiver Hemmung der Glutamatausschüttung (Baraban et al. 1997; Wu und Li 2005).

1.5.3 Cholecystokinin

Cholecystokinin (CCK) oder auch Pankreozymine ist ein Peptidhormon, das von den I-Zellen des Duodenums und Jejunums nach protein- und fettreicher Nahrung sezerniert wird. Ivy und Oldberg entdeckten es 1928 und bezeichneten es gemäß seiner Funktion als „Cholecystokinin“, was wörtlich übersetzt „Gallenblasenbeweger“ bedeutet (Ivy und Oldberg 1928). 1943 extrahierten Harper und Raper eine Substanz aus der Dünndarmschleimhaut, welche die Sekretion von Pankreasenzymen fördert und nannten sie Pankreozymine (Harper und Raper 1943). Mutt und Jorpes gelang in den 1960er Jahren der Nachweis, dass es sich dabei um dasselbe 33 Aminosäuren lange Polypeptid handelt (Jorpes et al. 1964; Jorpes und Mutt 1966; Mutt und Jorpes 1968), das fortan hauptsächlich als CCK bezeichnet wurde. Im Verlauf gelang zudem der Nachweis von CCK als Neurotransmitter im Hirn, jedoch in Form eines Octapeptids (Vanderhaeghen et al. 1975; Dockray et al. 1978; Beinfeld 1983). Es existieren mehrere molekulare Formen von CCK, z. B. CCK-58, CCK-33, CCK-8 und CCK-4, die aus dem Prohormon Procholecystokinin prozessiert werden und deren biologisch aktiver Teil die ersten acht Aminosäuren des Carboxylteils darstellen (Saito et al. 1980; Beinfeld 1983; Deschenes et al. 1984; Sayegh 2013). Davon ist das sulfatierte Octapeptid CCK-8 die biologisch aktivste Form, die im zentralen Nervensystem am häufigsten vorkommt und als Neurotransmitter agiert (Saito et al. 1980; Acosta 2001).

CCK entfaltet seine vielfältige Wirkung über zwei Rezeptoren, die CCK_A- und CCK_B-Rezeptoren. Der CCK_A-Rezeptor wurde in Pankreasazinuszellen entdeckt (A - „alimentary“) und wird auch als CCK₁-Rezeptor bezeichnet (Sankaran et al. 1980). Der CCK_B-Rezeptor wurde erstmals im Hirn (B - „brain“) nachgewiesen und wird auch CCK₂-Rezeptor genannt (Innis und Snyder 1980). Die beiden Rezeptoren unterscheiden sich in ihrem Verteilungsmuster und in ihren pharmakologischen Eigenschaften, gehören allerdings beide zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und bestehen aus sieben transmembranären Domänen (Noble et al. 1999). Beide Rezeptoren werden zum Teil überlappend exprimiert, auch wenn CCK₁-Rezeptoren hauptsächlich im Gastrointestinaltrakt und CCK₂-Rezeptoren vorrangig im Hirn lokalisiert sind. Die Effekte der CCK-Rezeptoren sind sehr heterogen und so vielfältig wie die zahlreichen physiologischen Prozesse, die durch CCK beeinflusst werden. Die Aktivierung von CCK₁-Rezeptoren führt unter anderem zur Kontraktion der Gallenblase, Sezernierung von Pankreasenzymen und Steigerung des Sättigungsgefühls. An der Zunahme der Peristaltik sind sowohl CCK₁- als auch CCK₂-Rezeptoren beteiligt. Zentral wirken beide Rezeptoren modulierend auf Angst, Depression, Psyche, Kognition und Nozizeption. Der anxiogene Effekt von CCK wird vornehmlich über CCK₂-Rezeptoren vermittelt und führt konsekutiv zu Herzfrequenz-, Blutdruck- und Atemfrequenzsteigerung. Des Weiteren kommt es zur Aktivierung der hypothalamisch-hypophysären Achse. Darüber hinaus konnte eine vermehrte Expression von CCK₂-Rezeptoren bei Depressionen gezeigt werden. Auch bei der Pathogenese von Schizophrenie ist CCK durch die Interaktion mit Dopamin beteiligt. Bei Gedächtnisprozessen sind sowohl CCK₁- als auch CCK₂-Rezeptoren beteiligt, wobei ihre genaue Funktion noch nicht abschließend geklärt ist (Noble et al. 1999; Li et al. 2002; Dolatabadi und Reisi 2014).

Die Konzentration von CCK im zentralen Nervensystem ist abhängig vom Hirnareal. Hohe Konzentrationen im Rattenhirn konnten insbesondere im Cortex, Striatum, Hippocampus, zentralen Höhlengrau, in der Amygdala und in Teilen des Hirnstamms gezeigt werden. Untersuchungen an Schweinen, Rindern, Affen und Menschen zeigten größtenteils mit dem Rattenhirn übereinstimmende Verteilungsmuster (Beinfeld 1983). Ähnlich wie NPY ist CCK häufig mit anderen Transmittern kolokalisiert, so z. B. im Nucleus accumbens mit Dopamin (Höckfelt et al. 1980) oder mit der Substanz P im zentralen Höhlengrau (Crawley und Corwin 1994). Im Hippocampus ist CCK ausschließlich in GABAergen Korbzellen lokalisiert (Somogyi et al. 1984; Kosaka et al. 1985; Freund und Buzsaki 1996) und in allen Schichten zu finden (Nunzi et al. 1985). Zugleich konnten Kosaka et al. eine Kolokalisation von CCK mit dem vasoaktiven intestinalen Peptid (VIP) im Hippocampus zeigen. Eine gleichzeitige Expression beider Peptide (CCK, VIP) findet in ca. 1 % der GABAergen Neuronen statt (Kosaka et al. 1985). CCK führt im Hippocampus via CCK₂-Rezeptoren zu einer Steigerung der Erregbarkeit (Bohme et al. 1988; Deng et al. 2010) und moduliert die GABAerge Transmission. Ob

CCK dabei die GABAerge Transmission eher inhibiert oder fördert, ist nicht abschließend geklärt, da die Datenlage nicht einheitlich ist und CCK vermutlich beide Effekte erzielen kann (Foldy et al. 2007; Karson et al. 2008).

1.6 Hippocampo-amygdaläre Projektionen

In den vorangegangenen Abschnitten wurde hauptsächlich die intrinsische Konnektivität, das heißt Konnektionen zwischen Subregionen einer Hirnstruktur, im Speziellen des Hippocampus und der Amygdala, beschrieben. Amygdala und Hippocampus kommunizieren jedoch gleichermaßen mit multiplen anderen Hirnstrukturen. So projiziert der Hippocampus beispielsweise ipsilateral in den Bulbus olfactorius, Hypothalamus, Nucleus accumbens und in die Septumkerne. Aber auch kontralaterale Projektionen zum Cortex und zur kontralateralen CA1-Region konnten nachgewiesen werden (van Groen und Wyss 1990). Die Amygdala weist unter anderem Interaktionen mit dem Hirnstamm, Hypothalamus und sensorischen Cortexarealen auf (LeDoux et al. 1988; Pitkänen et al. 1997; McDonald 1998). Beide Strukturen, Hippocampus und Amygdala, interagieren vor allem aber auch miteinander. Sie sind sowohl funktionell als auch anatomisch fest verknüpft und von herausragender Bedeutung bei der Bildung, Mitteilung und Speicherung von emotionalen Gedächtnisinhalten, insbesondere jenen, die mit Angst assoziiert sind (Donley et al. 2005; Rudy und Matus-Amat 2005; Sierra-Mercado et al. 2011). Besonders bei der Untersuchung der kontextuellen Furchtkonditionierung konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen basolateraler Amygdala und ventraler CA1-Region sowie angrenzendem Subiculum von großer Wichtigkeit ist (Phillips und LeDoux 1992; Kim und Fanselow 1992; Frankland et al. 1998; Donley et al. 2005; LeDoux 2000; Donley et al. 2005) und reziproke Projektionen zwischen diesen beiden Hirnarealen existieren (Ottersen 1982; Saunders et al. 1988; van Groen und Wyss 1990; Canteras und Swanson 1992; Pitkänen et al. 2000; Kishi et al. 2006). Untersuchungen an Ratten haben gezeigt, dass die hippocampo-amygdalären Projektionen ipsilateral sind (Kishi et al. 2006) und in nahezu alle Kerne der Amygdala projizieren (Canteras und Swanson 1992). Die meisten hippocampo-amygdalären Projektionen terminieren allerdings im Nucleus basalis, lateralis und basalis accessorius (van Groen und Wyss 1990; McDonald 1998). Die Amygdala wiederum projiziert hauptsächlich von den basolateralen und medialen Kerngruppen zum Hippocampus (Saunders et al. 1988; Petrovich et al. 2001).

1.6.1 GABAerge Projektionsneurone

GABAerge Neurone üben eine essentielle Funktion als Interneurone aus, indem sie das Aktivitätsmuster der glutamatergen Projektionsneurone maßgeblich beeinflussen (Ribak et al. 1978;

Klausberger und Somogyi 2008). Diese Eigenschaft galt in den Anfängen der Hirnforschung als einzige Beteiligung GABAerger Neurone an der Modulation von Projektionen und an der Verarbeitung kognitiver und emotionaler Informationen (Brioni et al. 1989; Bergado-Acosta et al. 2008; Sangha et al. 2009; Makkar et al. 2010). In den letzten Jahrzehnten mehrten sich allerdings die Hinweise, dass GABAerge Neurone nicht nur als Interneurone, sondern auch als eigene Projektionsneurone agieren. Sowohl durch anterograde als auch durch retrograde Tracingstudien wurde gezeigt, dass nicht nur, wie initial angenommen, Pyramidenzellen in entfernte Hirngebiete projizieren, sondern auch GABAerge Neurone. Retrograde Tracingmethoden dienten dabei zur Identifizierung jener Zellen, die in das Injektionsgebiet projizierten, und markierten außer Pyramidenzellen auch polymorphe Zellen, die sich nicht ausschließlich im Stratum pyramidale befanden (Chronister und DeFrance 1979). Immunhistochemische Färbemethoden zeigten, dass es sich dabei um GABAerge Neurone handelt (Freund und Antal 1988; Jinno und Kosaka 2002). Die GABAergen Neurone, die in andere Hirnstrukturen projizieren, werden auch als „long-range“-Neurone (lange Projektionsneurone) bezeichnet, im Gegensatz zu den lokalen GABAergen „short-range“-Neuronen. Lokal bilden die langen GABAergen Projektionsneurone gleichermaßen mit exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen synaptische Kontakte, währenddessen sie distal vorrangig an inhibitorischen Neuronen terminieren (Caputi et al. 2013). So konnten im Verlauf GABAerge Projektionen zwischen Septum und Hippocampus (Chronister und DeFrance 1979; Alonso und Köhler 1982; Freund und Antal 1988; Jinno und Kosaka 2002), Hippocampus und entorhinalem Cortex (Melzer et al. 2012), zwischen den Hippocampusformationen (Schwerdtfeger und Buhl 1986; Zappone und Sloviter 2001; Jinno 2009) und innerhalb des Neocortex (Higo et al. 2009; Tamamaki und Tomioka 2010) nachgewiesen werden. Im Jahr 2012 gelang Müller et al. durch Verwendung anterograder sowie retrograder Tracer der Nachweis einer GABAergen Projektion vom ventralen Hippocampus (CA1/ Subiculum) zur Amygdala, wenngleich die Mehrzahl der Projektionen von glutamatergen Neuronen ausging. Hierbei terminierten die hippocampalen Axone in allen Amygdalakernen, wobei der Nucleus basomedialis die höchste Dichte an Faserstrukturen aufwies. Elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigten, dass die meisten anterograd markierten synaptischen Kontakte im Nucleus basomedialis asymmetrisch sind. Interessanterweise waren vereinzelt jedoch auch symmetrische Synapsen markiert, die eine GABAerge Beteiligung an der Projektion vom Hippocampus zur Amygdala nahelegten (Müller et al. 2012).

1.7 Zielstellung

Diese Arbeit dient der weiteren biochemischen Charakterisierung der von Müller et al. nachgewiesenen GABAergen Projektion vom Hippocampus zur Amygdala. Die Verwendung von

GAD67-GFP knock-in Mäusen ermöglicht hierbei die Detektion von GABAergen Neuronen und eine Analyse ihres Verteilungsmusters in der CA1-Region und dem angrenzenden Subiculum ohne weitere Markierungstechnik. Zur Identifizierung der Projektionsneurone des ventralen Hippocampus erfolgten Injektionen eines retrograden Tracers in die Amygdala. In dieser Studie wurde dafür Fluoro-Gold (FG) verwendet. FG wird retrograd axonal transportiert und markiert die Zielzelle, ohne in umliegende Areale zu diffundieren (Schmued und Fallon 1986). Aufgrund der guten Kompatibilität von FG mit anderen histochemischen Techniken war es möglich, zusätzlich immunhistochemische Färbungen durchzuführen. Diese ermöglichten eine weitere Klassifizierung und Charakterisierung der GABAergen Neurone. Im Speziellen wurden immunhistochemische Färbungen zur Beurteilung der Expression von PARV, NPY und CCK durchgeführt. Die Zusammenschau aller erhobenen Daten sollte folgende Fragen klären:

1. Wie hoch ist der Anteil der vom ventralen Hippocampus in die Amygdala projizierenden GABAergen Neurone?
2. Existiert eine schichtspezifische Verteilung der hippocampo-amygdalären GABAergen Projektionsneurone oder sind diese in allen Schichten gleichermaßen zu finden?
3. Handelt es sich bei den GABAergen Projektionsneuronen vom Hippocampus zur Amygdala um eine eigene Klasse von Projektionsneuronen oder lassen sich Parallelen zu bereits beschriebenen langen GABAergen Projektionsneuronen des Hippocampus erkennen?
4. Ist es möglich, die GABAergen Projektionsneurone anhand ihrer Peptidexpression in Subpopulationen zu unterteilen und lassen sich dadurch womöglich Rückschlüsse auf ihre Funktion ziehen? Oder handelt es sich vielmehr um eine homogene Gruppe GABAerger Projektionsneurone?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

2.1.1 Ethische Grundlagen

Alle Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium Dessau (AZ: 42502-2-813 UniMD, 42502-2-1130 UniMD) genehmigt und entsprechend dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Die Europäische Richtlinie „zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere“ (2010/63/EU) wurde bei allen tierexperimentellen Handlungen eingehalten.

2.1.2 Mausmutanten und Tierhaltung

Als Versuchstiere wurden GAD67-GFP knock-in Mäuse (C57BL/6 Inzucht Stamm) verwendet. Dabei handelt es sich um Mausmutanten mit einer homologen Insertion des Green Fluorescent Proteins (GFP) im Gen der 67 kD Isoform der Glutamatdecarboxylase (GAD67, Gen ID 14415) (Tamamaki et al. 2003). GABAerge Zellen sind bereits ab einem sehr frühen Stadium in der Entwicklung positiv für GAD67 (DeDiego et al. 1994). Daher ermöglicht die Expression von GFP unter der Kontrolle des GAD67-Promotors eine Detektion von GABAergen Zellen im Allgemeinen sowie insbesondere von retrograd markierten GABAergen Projektionsneuronen des Hippocampus, die hier im Fokus stehen.

Es wurden ausschließlich heterozygote Tiere verwendet, da eine Homozygotie zur Ausbildung einer schwerwiegenden Gaumenspalte führt und kurze Zeit nach der Geburt letal ist (Asada et al. 1997). Nach Absetzung der Jungtiere von der Mutter erfolgte die Genotypisierung. Tamamaki et al. stellten bei den genveränderten Tieren keine Auffälligkeiten hinsichtlich des Größenwachstums, des reproduktiven Verhaltens und der makroskopischen Hirnarchitektur fest (Tamamaki et al. 2003). Insgesamt wurden 17 heterozygote knock-in Mäuse, sowohl männliche als auch weibliche (9 ♂, 8 ♀), im Alter von 3-5 Monaten untersucht. 45 Hirnschnitte von 8 Tieren konnten für die Auswertung verwendet werden, die übrigen Tiere dienten der Etablierung des Verfahrens und neuer Antikörper.

Die Mäuse wurden in der zentralen Tierhaltung der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität gezüchtet. Die Haltung erfolgte spezifisch pathogenfrei (SPF Barrierehaltung) und geschlechtergetrennt in Makrolon-Käfigen, Größe (26,5 cm (L) x 20 cm (B) x 14 cm (H)), mit Standard-Einstreu bei einer Temperatur von 22 bis 25 °C. Wasser und Standard-Pelletdiät (Typ 2018, Harlan Winkelmann, Borcheln, Deutschland) standen ad libitum zur Verfügung. Die Tiere unterlagen einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus mit einer automatischen Beleuchtungseinschaltung um 06:00 Uhr und jeweils einer zweistündigen Dämmerungsphase vor dem Einschalten beziehungsweise vor dem Ausschalten.

2.1.3 Tracing

Die Mäuse wurden vor der intracerebralen Tracerinjektion mit einer Mischung aus Ketamin (10 mg/ml, Ketavet®, Pfizer) und Xylazin (1 mg/ml, Xylazin, CEVA) narkotisiert, wobei eine Dosierung von 0,1 ml je 10 g Körpergewicht gewählt wurde. Die Injektion des Anästhetikums erfolgte intraperitoneal. Als retrograder Vitaltracer zur selektiven Darstellung der Verbindungen zwischen Hippocampus und Amygdala wurde Fluoro-Gold (FG, Fluochrome Inc., Englewood, CO, USA; 4 % in destilliertem Wasser) verwendet. Der Tracer wurde unilateral (n = 6) beziehungsweise bilateral (n = 2) stereotaktisch gestützt, druckkontrolliert mit einer 1- μ l-Hamilton®-Spritze in die Amygdala (anterior-posterior Koordinaten (AP) - 1.8, medio-lateral (ML) Koordinaten \pm 2.8, dorso-ventral Koordinaten (DV) - 4) injiziert. Die AP-Werte wurden von Bregma als Nullpunkt bestimmt, die ML Werte orientierten sich an der Sutura sagittalis und zur Ermittlung der DV-Werte wurde die Hirnoberfläche als Ausgangspunkt verwendet. Die stereotaktischen Koordinaten wurden mit Hilfe des Atlas von Franklin und Paxinos festgelegt (Franklin und Paxinos 2007). Die anfänglichen unilateralen Injektionen zeigten, dass der Tracertransport streng ipsilateral erfolgte, daher wurden im Verlauf bilaterale Tracerinjektionen zur besseren Materialausschöpfung vorgenommen und die Hirnhälften als unabhängig voneinander betrachtet. Die Injektionsmenge betrug 50 nl vor dem Hintergrund möglichst viele hippocampale Zellen zu markieren und die gesamte Amygdala mit der Injektion zu erfassen (Abbildung 4).

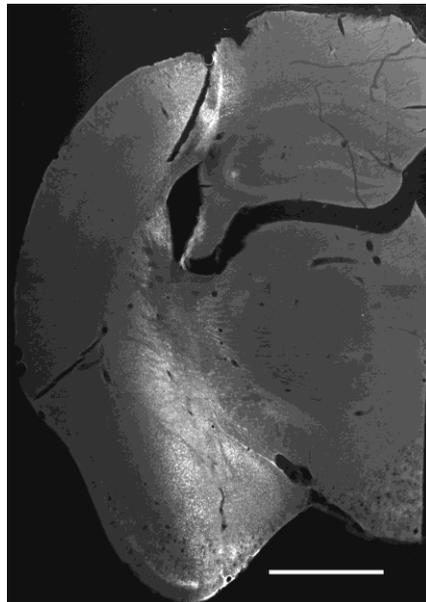


Abbildung 4 Typische, druckkontrollierte Injektionsstelle der Amygdala am Ort der maximalen Ausdehnung. Cortexareale wie z. B. piriformer Cortex wurden weitestgehend ausgespart. Maßstabsbalken: 1 mm (Lübke, Eberhardt et al. 2015).

2.2 Histologie

2.2.1 Perfusion und Fixation

Nach einer Überlebenszeit von 7 bis 14 Tagen erhielten die Tiere eine letale Dosis Pentobarbital-Natrium (Narcoren®, 16 g/ 100 ml, Merial, Halbergmoos, Deutschland). Anschließend erfolgte die transkardiale Perfusion mit 30 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung, gefolgt von 200 ml Immunfixans (4 % Paraformaldehyd und 15 % gesättigter Pikrinsäure in 0,1 M Phosphatpuffer (PB), pH 7,4). Nach Dekapitation der Mäuse wurden die Hirne entnommen, präpariert und für 5 Stunden bei Raumtemperatur in Immunfixans fixiert. Im Folgenden wurden die Hirne für eine Nacht mit 20 %iger Saccharoselösung zur Verhinderung von Gefrierartefakten inkubiert, daraufhin bei –40 °C in Methylbutan kryokonserviert und bei –80 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.2.2 Immunhistochemische Aufarbeitung

Die tiefgefrorenen Hirne wurden mit Hilfe eines Gefriermikrotoms (Leica CM3050 S, Leica) bei –20 °C und einer Schnittdicke von 40 µm ausgehend vom Vorderhirn coronar geschnitten, die Schnitte in Phosphatpuffer gesammelt und in 4 äquidistante Serien aufgeteilt. Sofern keine unmittelbare Weiterverarbeitung erfolgte, wurden die Schnitte in kryoprotektiver Lösung (30 % Ethylenglycol und 25 % Glycerin in 0,05 M PB) bei –20 °C aufbewahrt.

Zur Charakterisierung der Subpopulationen GFP-positiver Neurone wurde in „Free-Floating-Technik“ die Streptavidin-Biotin-Methode für die Immunfluoreszenzfärbungen gegen Neuropeptid Y (NPY), Cholezystokinin (CCK) und das Calcium-bindende Protein Parvalbumin (PARV) genutzt. Die tabellarischen Färbeprotokolle sind dem Anhang beigelegt (Anlage 1). Als primäre Antikörper wurden verwendet: polyklonaler Kaninchenantikörper gegen Neuropeptid Y (Verdünnung 1:16000; GTX10980; GeneTex, San Antonio, TX, USA), polyklonaler Kaninchenantikörper gegen Cholezystokinin (Verdünnung 1:1000; 20078; ImmunoStar, Hudson, WI, USA), monoklonaler Mausantikörper gegen Parvalbumin (Verdünnung 1:5000; 235; SWant, Bellinzona, TI, Schweiz). Für alle Verdünnungen wurde 0,1 M PB bei einem pH-Wert von 7,4 verwendet.

Nach dem Auftauen der Schnitte und dreimaligem Spülen mit PB wurden die Schnitte für 30 Minuten mit BSA (Bovines Serumalbumin) blockiert (bei PARV wurde dieser Schritt ausgelassen). Hiernach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper für 2 Tage bei 4 °C. Im Anschluss wurden die Schnitte erneut in PB gespült und mit dem biotinylierten Sekundärantikörper 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Folgende sekundäre Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:200 genutzt: biotinyliertes Anti-Kaninchen IgG und biotinyliertes Anti-Maus IgG (beide Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Zuletzt wurde nach vorherigem Spülen mit PB Cy3-konjugiertes

Streptavidin (Verdünnung 1:1000 in 0,1 M PB pH 7,4; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) zur Visualisierung der Antikörperkomplexe hinzugefügt. Nach der Färbung wurden die Hirnschnitte auf Objektträger (SuperFrost Plus, Thermo-Scientific, Menzel-Gläser) aufgebracht, über Nacht in einem Wärmeschrank bei 37 °C getrocknet und am Folgetag mit Mowiol (Hoechst, Frankfurt am Main, Deutschland) eingedeckt.

2.3 Zellzählung und Flächenbestimmung

2.3.1 Verwendete Technik

Die gefärbten Schnitte wurden an einem Axioplan 2-Mikroskop (Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen, Deutschland) unter der Verwendung einer AxioCam HRc-Kamera (Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen, Deutschland) und einer AxioCam MRm-Kamera (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland), der Software AxioVision 4.8.2.0 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland) und Benutzung geeigneter Filter bei einer Vergrößerung von 100x bis 200x fotografiert. Nachstehende Filtersets wurden verwendet: FG (Zeiss 01: BP 365/12, FT 395, LP 397), GFP (Zeiss 10: BP 450-490, FT 510, BP 515-565), Cy3 (Zeiss 15: BP 546/12, FT 580, LP 590). Zur Einbindung der Kamera in das Analyseprogramm AxioVision diente das Modul Spot Advanced (Version 4.0.9, Diagnostic Instruments Inc., Burroghs, Michigan, USA). Alle Systeme waren an einen Computer mit dem Betriebssystem Microsoft Windows XP Professional (Version 2002) angeschlossen.

2.3.2 Kartierung

Innerhalb des Bereichs von der ventralen Hippocampusregion CA1 bis zum Übergang in das ventrale Subiculum (im Folgenden ROI, „Region of Interest“) wurde die Anzahl der Tracer-positiven, GABAergen und peptidergen (PARV-, NPY-, CCK-positiven) Neurone analysiert (Abbildung 5). Zur Orientierung und zur Lokalisierung der ROI wurde der Atlas von Franklin und Paxinos benutzt (Franklin und Paxinos 2007). Mit Hilfe von GIMP 2 (GNU Image Manipulation Program, 2.6.8) wurde eine Fotomontage aus 4 bis 7 (bei 100x Vergrößerung) oder 12 bis 16 (bei 200x Vergrößerung) Bildern erstellt, welche die ROI unter dem entsprechenden Filtersatz in ihrer Gesamtheit darstellt. Die obere Grenze der ROI wurde mit einer horizontalen Linie durch den perirhinalen Sulcus festgelegt, um eine standardisierte Auswertung zu ermöglichen. Anschließend wurden die Schichten des Hippocampus eingezeichnet. Aufgrund der unzureichenden Abgrenzbarkeit des Stratum radiatum zum Stratum lacunosum wurden diese beiden Schichten als Stratum moleculare (= Stratum radiatum-lacunosum-moleculare) zusammengefasst. So kam es zur Einteilung der ROI in drei

Schichten, die sich von außen nach innen wie folgt gliederten: Stratum oriens, Stratum pyramidale und Stratum moleculare.

Nun folgte die Kartierung und Zählung der FG-positiven (Tracer-markierten), GFP-markierten und peptidergen Neurone jeweils in einer eigenen Ebene in GIMP 2 mit entsprechender Farbe und entsprechendem Symbol. Fluoro-Gold-markierte Neurone wurden mit einem blauen Rechteck markiert, GAD67-positive Zellen wurden mit einem grünen Kreis gekennzeichnet und die für die jeweilige peptiderge Subpopulation positiven Zellen wurden mit einem roten Kreuz versehen. Daraufhin konnten durch Übereinanderlegen der jeweiligen Ebenen Doppel- und Dreifachmarkierungen registriert werden (siehe Abbildung 5). Es wurden demnach nicht nur die FG-positiven, GFP-markierten und peptidergen Neurone registriert, sondern auch jene, die für FG und GAD67 positiv waren, sowie außerdem noch folgende: FG und Peptid, GFP und Peptid, FG und GFP und Peptid. Abbildung 5A-B zeigt die Verteilung der retrograd markierten Projektionsneurone sowie der GABAergen Neurone in der ROI.

Das Zählen der Neurone wurde manuell mit einem Handzählgerät durchgeführt. Gezählt wurden nur markierte Neurone mit eindeutig erkennbarem Zellkörper und neuronaler Form. Bei fragwürdigen Doppel- beziehungsweise Dreifachmarkierungen erfolgte eine Reevaluation unter dem Mikroskop bei 400x Vergrößerung. Pro Serie, das heißt je Versuchstier und durchgeführter immunhistochemischer Färbung, wurden nach Möglichkeit drei Schnitte nach diesem Schema ausgewertet. Vereinzelt waren jedoch nur zwei Schnitte oder ein Schnitt auswertbar (z. B. Serie 222_NPY). Der Abstand zwischen den Schnitten betrug 160 µm. Nach erfolgtem Mapping und Zählen der Neurone wurden die Absolutzahlenwerte je Hippocampuschicht und Hirnschnitt in Prozent umgerechnet. Anschließend wurden die Mittelwerte je Serie berechnet. Dies ermöglichte Aussagen über die Verteilung und den prozentualen Anteil doppel- bzw. dreifachmarkierter Neurone.

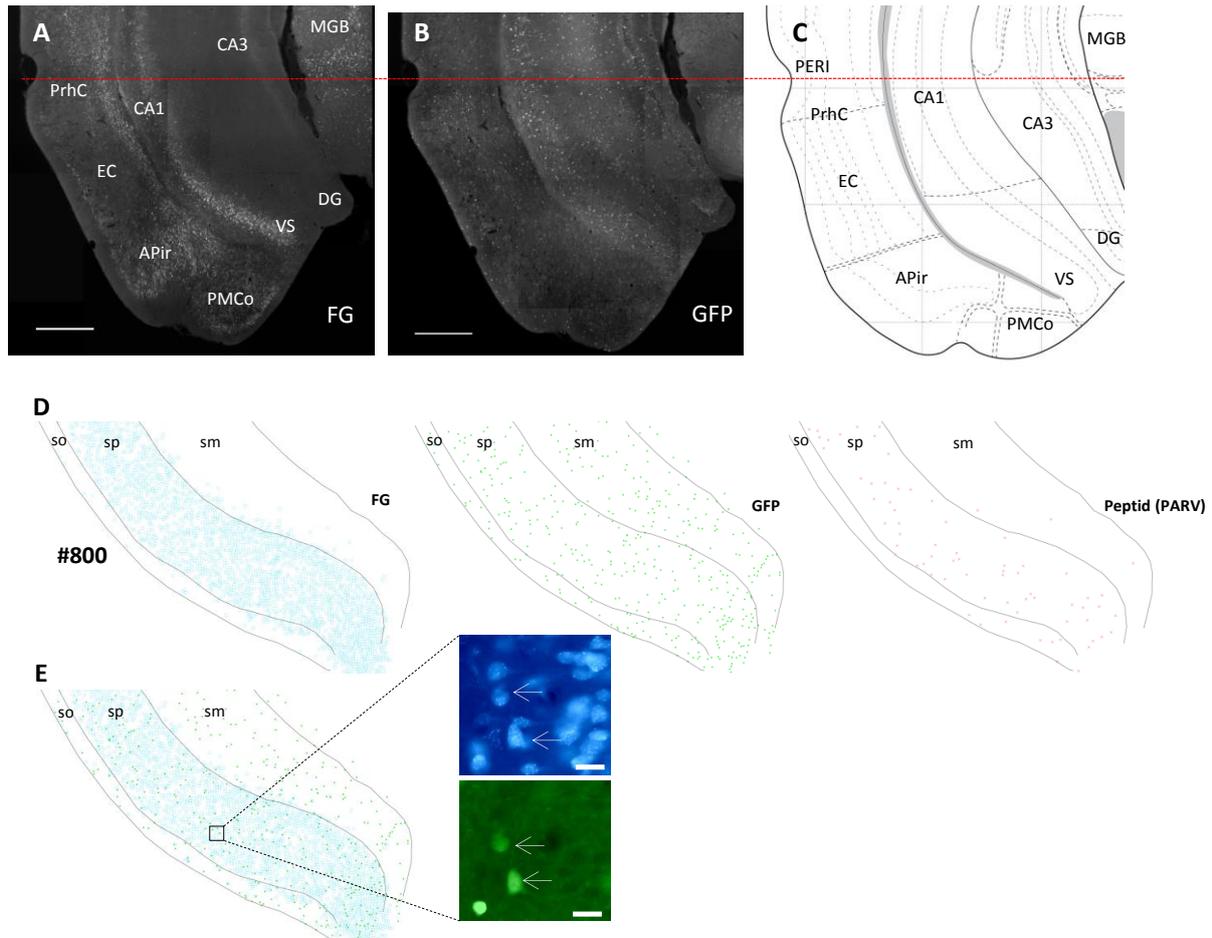


Abbildung 5 ROI mit angrenzenden Arealen und Kartierungsbeispiel

Die rot gepunktete Linie durch den perirhinalen Sulcus (PERI) stellt die Obergrenze der ROI dar. CA: Cornu ammonis, Feld CA1/ CA3, VS: ventrales Subiculum, DG: Gyrus dentatus, PrhC: perirhinaler Cortex, EC: entorhinaler Cortex, APir: amygdalo-piriforme Übergangszone, PMCo: Nucleus corticalis posteromedialis der Amygdala, MGB: Corpus geniculatum mediale.

(A) Verteilung der retrograd markierten Projektionsneurone im ventralen Hippocampus und im angrenzenden Subiculum. Maßstabsbalken: 500 μ m.

(B) Verteilung der GFP-markierten GABAergen Neurone in der ROI. Maßstabsbalken: 500 μ m.

(C) Schematische Darstellung der ROI geändert nach Franklin und Paxinos (2007).

(D) Ausschnitt eines Kartierungsbeispiels; weiter dorsal liegende Markierungen sind nicht abgebildet. Nach Zusammenfügen der Mikroskopierbilder und Einzeichnen der Hippocampuschichten (so, sp, sm) erfolgte die Markierung der Neurone mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware GIMP 2. FG-positive Neurone: blaues Rechteck. GFP-exprimierende Neurone: grüner Punkt. Peptiderge Neurone: rotes Kreuz.

(E) Fusionierung der FG- und GFP-Ebenen zur Erkennung von Doppelmarkierungen. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt ein Beispiel einer Doppelmarkierung. In diesem Fall handelt es sich um projizierende GABAerge Neurone. Maßstabsbalken: 20 μ m (Abbildung geändert nach Lübke, Eberhardt et al. 2015).

2.3.3 Injektionsflächen und Volumenberechnung

Als Folge des vergleichsweise großen Injektionsvolumens wurde nicht nur die Amygdala Tracer-markiert, sondern auch der darüber liegende Cortex und das Striatum. Zur Überprüfung, ob die Injektionsmenge des Tracers bzw. die mit markierten Strukturen die Anzahl retrograd markierter Neurone im Hippocampus erhöhen, wurde das Diffusionsvolumen bestimmt. Hierfür wurde zunächst die größte Fluoro-Gold-Injektionsfläche im Bereich der Amygdala aufgesucht. Von dieser Fläche wurde bei 25x Vergrößerung mit einer CCD-Kamera und unter Verwendung der Software AxioVision (genauere Angaben siehe S. 20) eine digitale Bildaufnahme angefertigt und die Injektionsfläche mit dem Cursor umfahren. Die sich daraus ergebende Fläche wurde nach erfolgter Skalierung in μm^2 ausgegeben. Von dem Ort der größten Injektion wurde die Tracer-Diffusion in je zwei weiteren Schnitten sowohl nach rostral als auch nach kaudal erneut digital fotografiert und gemessen, sodass letztendlich die fünf größten Injektionsflächen je Injektion ermittelt wurden. Unter Benutzung folgender Formel $V = A_1 \cdot h + A_2 \cdot h + A_3 \cdot h + A_4 \cdot h + A_5 \cdot h$ (V = Volumen; A = Fläche der Tracer-Diffusion ausgehend von der Amygdala; h = Distanz zwischen den Schnitten, bei einer Schnittdicke von $40 \mu\text{m}$ und vier Serien ist $h = 160 \mu\text{m}$; 1-5 = Anzahl der Schnitte) wurde das Diffusionsvolumen näherungsweise berechnet.

2.4 Statistik

Zur Korrelationsanalyse der Diffusionsvolumina des Tracers mit der Anzahl der retrograd markierten Projektionsneurone wurde der Rangkorrelationskoeffizient r_s nach Spearman ermittelt. Das Alphaniveau wurde dabei auf 0,05 festgelegt. Das Diffusionsvolumen je Injektion, berechnet aus den jeweils fünf größten Injektionsflächen, wurde dabei der mittleren Gesamtzellzahl der retrograd markierten Projektionsneurone je Injektion gegenübergestellt.

Des Weiteren wurden zur quantitativen Auswertung der registrierten Neurone das arithmetische Mittel, die Standardabweichung, der Standardfehler des Mittelwertes und der entsprechende prozentuale Anteil berechnet. Die Berechnungen wurden mit SAS® Version 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

Ziel war es, GABAerge Projektionsneurone im ventralen Hippocampus und dem angrenzenden Subiculum mit Hilfe der Verwendung von GAD67-GFP knock-in Mäusen und FG-Injektionen in die Amygdala zu identifizieren. Durch die Nutzung der GAD67-GFP knock-in Mäuse konnten GABAerge Zellen ohne zusätzliche Färbemethoden mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie lokalisiert und gezählt werden. Sie werden in den folgenden Abbildungen entsprechend ihrer Emissionsfarbe unter dem Fluoreszenzmikroskop grün dargestellt. Die FG-Injektionen in die Amygdala führten zu einer retrograden Markierung von Projektionsneuronen in der ventralen Hippocampusformation. Ferner wurden Neurone des perirhinalen Cortex, der amygdalo-piriformen Übergangszone, des Thalamus und des Corpus geniculatum mediale markiert (siehe Abbildung 5A). Projektionsneurone werden nachfolgend blau dargestellt. Die immunhistochemischen Färbungen dienten der näheren Charakterisierung der GABAergen Projektionsneurone und gaben Aufschluss darüber, welche Neurone PARV, NPY oder CCK exprimieren. Die peptidergen Neurone werden in den sich anschließenden Abbildungen rot (PARV), orange (NPY) bzw. gelb (CCK) dargestellt. Die Originaldaten sind dem Anhang beigelegt.

3.1 Allgemeine Verteilung der Neurone

Bevor im Speziellen die GABAergen hippocampo-amygdalären Projektionsneurone beschrieben werden, wird zunächst auf die allgemeine Verteilung der GABAergen Neurone, der Projektionsneurone und der Peptid-exprimierenden Neurone im ventralen Hippocampus eingegangen. Um eine Aussage über die Verteilung jener Neurone auf Schichten des Hippocampus treffen zu können, wurden die Absolutwerte je Hippocampuschicht und Hirnschnitt zunächst in Prozent umgerechnet. Dann wurden die Mittelwerte je Versuchstier und durchgeführter, immunhistochemischer Färbung (entspricht einer Serie) ermittelt. Die Serienbezeichnung ergibt sich aus der Nummer des Tiers (222, 342, 386re, 386li, 411, 360re, 800, 1512, 1523) und der angewandten immunhistochemischen Färbung für PARV, NPY oder CCK. Insgesamt wurden 21 Injektionen bei 17 Versuchstieren durchgeführt. Davon konnten 16 Serien (7 x PARV, 7 x NPY, 2 x CCK) von 8 Tieren mit jeweils 1 bis 3 Schnitten (insgesamt 45 Schnitte) für die Auswertung verwendet werden.

3.1.1 Verteilung der GABAergen Neurone auf Schichten des Hippocampus

Als GABAerge Neurone wurden jene gewertet, die GFP exprimierten. Es wurden zunächst alle GABAergen Neurone je Hippocampuschicht gezählt. Dabei variierten die Absolutzahlenwerte zwischen 2 im Stratum oriens (222_NPY) und 423 als Maximum im Stratum pyramidale (800_NPY).

Anschließend wurde der prozentuale Mittelwert je Hippocampusschicht und Serie nach oben genannter Vorgehensweise ermittelt. Abbildung 6 zeigt den prozentualen Mittelwert der GABAergen Neuronenverteilung auf Schichten des Hippocampus von insgesamt 16 Serien. GABA-positive Neurone waren nahezu gleichmäßig über das ventrale Hippocampusgebiet zwischen den Schichten des Hippocampus verteilt (Abbildung 5B). Das Stratum pyramidale weist zwar mit 56 % den größten Anteil auf, gefolgt von 33 % im Stratum moleculare und 11 % im Stratum oriens (Abbildung 6). Jedoch ist diese Größenverteilung eher den unterschiedlichen Schichtgrößen geschuldet als einer vermehrten bzw. verminderten Anhäufung GABAerger Zellen in den jeweiligen Hippocampusschichten. Abbildung 7 stellt die Variation der detektierten GABAergen Neurone im Stratum oriens, Stratum pyramidale und Stratum moleculare zwischen den Versuchstieren und Serien dar. Sie zeigt eine weitestgehend homogene Verteilung der GABA-positiven Neurone zwischen den Serien. Tabelle 3 im Anhang (S. 87) listet die GABAerge Neuronenverteilung auf Schichten des Hippocampus je Serie auf.

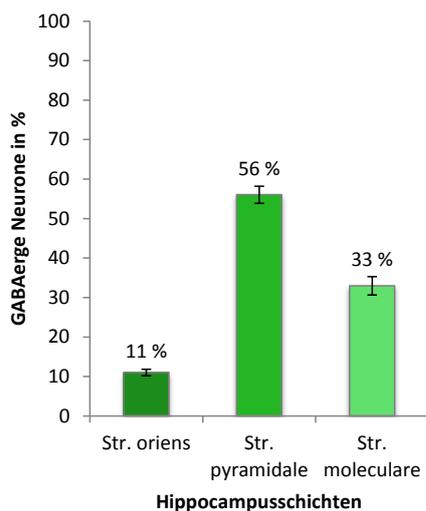


Abbildung 6 Verteilung der GABAergen Neurone auf Schichten des Hippocampus in %. Dargestellt sind MW \pm SEM aus n = 16 Serien.

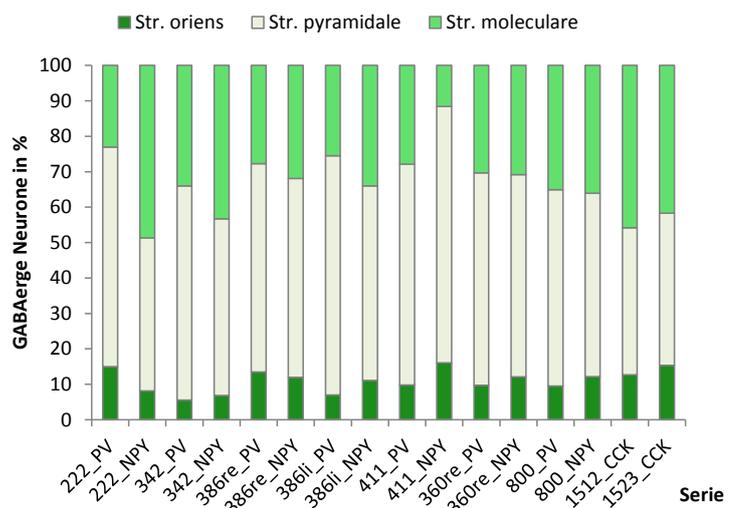


Abbildung 7 Variation der GABAergen Neuronenverteilung auf Schichten des Hippocampus zwischen den Serien. Dargestellt sind die MW in % von n = 16 Serien.

3.1.2 Verteilung der Projektionsneurone auf Schichten des Hippocampus

Um eine Aussage über die Verteilung der retrograd markierten Projektionsneurone im Hippocampus treffen zu können, erfolgten FG-Injektionen in die Amygdala. Abbildung 8 zeigt eine Zusammenschau der Injektionen in die Amygdala. Für die Auswertung konnten acht Tiere mit neun Injektionen berücksichtigt werden. Bei den Versuchstieren 386 und 360 erfolgten zur besseren

Materialausschöpfung Doppelinjektionen, das heißt, FG wurde sowohl in die rechte als auch in die linke Amygdala injiziert (386li, 386re, 360re). Der Datensatz entspricht dem der allgemeinen GABAergen Verteilung (n = 16 Serien, insgesamt 45 Schnitte). Tabelle 4 im Anhang (S. 88) zeigt die prozentualen Mittelwerte der retrograd markierten Projektionsneurone je Hippocampusschicht und Serie. In Abbildung 9 ist zu sehen, dass die überwiegende Mehrheit der Projektionsneurone sich mit einem Anteil von 89 % im Stratum pyramidale befindet, dementsprechend gering ist der Anteil im Stratum oriens und Stratum pyramidale mit jeweils 5 %. Mikroskopisch konnte beobachtet werden, dass sich viele Projektionsneurone des Stratum moleculare in der Nähe zum Stratum pyramidale befinden. Weder im dorsalen Hippocampus, in der CA3-Region oder im Gyrus dentatus des ventralen Hippocampus noch in der kontralateralen Hemisphäre wurden retrograd markierte Projektionsneurone beobachtet, es sei denn, es kam zu einer akzidentiellen Verletzung der Fimbria bzw. des Fornix mit der Injektionsnadel. Infolge der individuellen Injektionen (Größe, Lokalisation) und des unterschiedlichen axonalen Transports variierten die Absolutwerte der Projektionsneurone von Tier zu Tier stark. Die wenigsten Projektionsneurone mit dem Absolutwert 2 wurden im Stratum moleculare der Serie 386li_PV registriert. Die meisten Projektionsneurone in Höhe von 3651 wurden im Stratum pyramidale der Serie 411_NPY gezählt. Die Variation der prozentualen Verteilung der Projektionsneurone auf Schichten des Hippocampus zwischen den Versuchstieren und Serien zeigt Abbildung 10. Hier wird deutlich, dass trotz der großen interindividuellen Unterschiede die prozentuale Verteilung annähernd gleich bleibt.

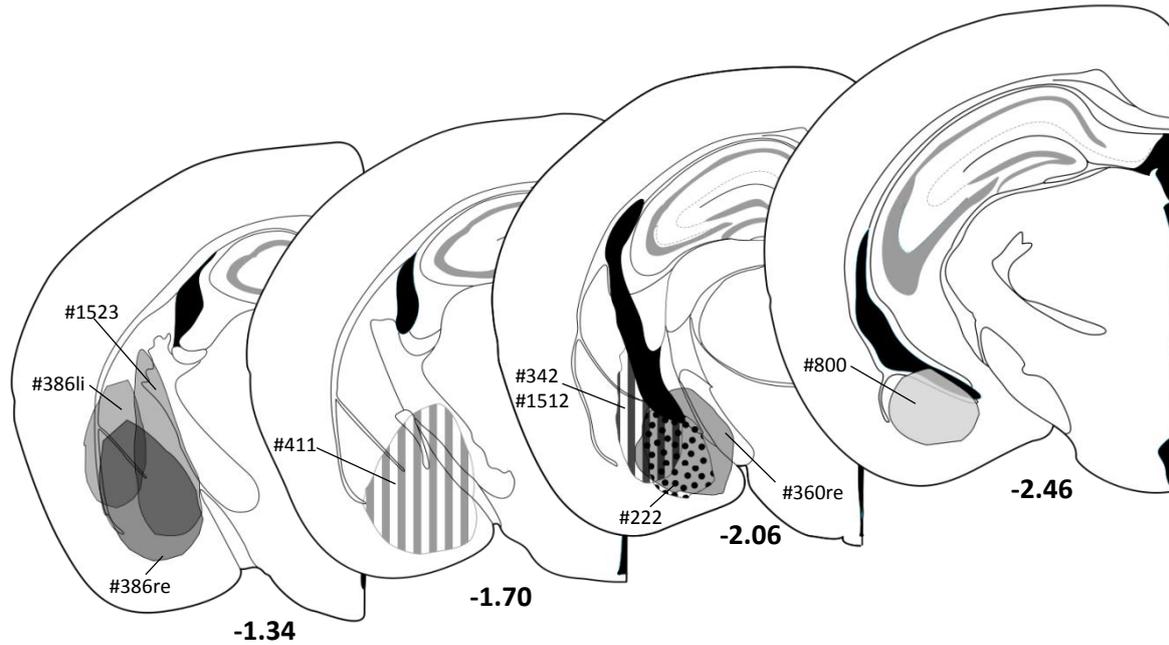


Abbildung 8 Zusammenfassung der druckkontrollierten Injektionsstellen in der Amygdala

Die Injektionsflächen wurden in Atlasbilder von Franklin und Paxinos eingezeichnet (2007) und markieren die größte Ausdehnung des nekrotischen Kerns. Rostrale und caudale Ausdehnungen der jeweiligen Injektion sind nicht abgebildet. Jede Injektion ist mit der dazugehörigen Fallnummer gekennzeichnet. Die Nummern unter den Hirnschnitten geben den Abstand zum Bregma in mm an (Abbildung geändert nach Lübke, Eberhardt et al. 2015).

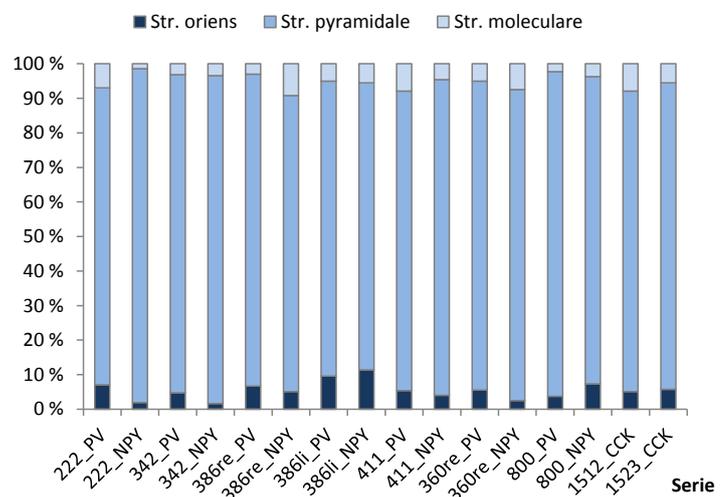
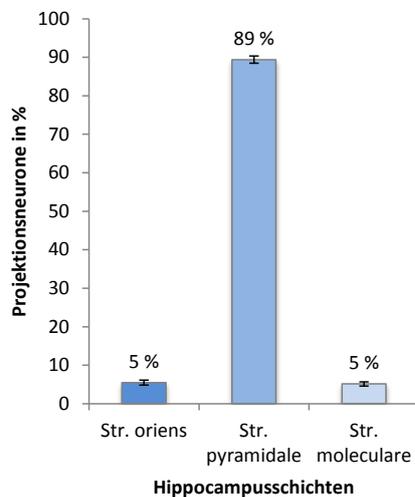


Abbildung 9 Verteilung der retrograd markierten Projektionsneurone auf Schichten des Hippocampus in %. Dargestellt sind MW \pm SEM aus n = 16 Serien.

Abbildung 10 Variation der Verteilung retrograd markierter Projektionsneurone auf Schichten des Hippocampus zwischen den Serien. Dargestellt sind die MW in % von n = 16 Serien.

3.1.2.1 Tracerinjektion, Diffusionsvolumen und retrograd markierte Projektionsneurone

In Anbetracht der Tatsache, dass die Injektionen von FG interindividuell in Größe und Lokalisation variierten und damit auch die Diffusionsvolumina, stellte sich die Frage, ob die Anzahl der retrograd markierten Projektionsneurone mit der Größe der Diffusionsvolumina korreliert und dadurch von außen beeinflussbar ist.

Es erfolgte daher eine Korrelationsanalyse des Diffusionsvolumens pro Injektion zum Mittelwert aller Projektionsneurone je Injektion nach Spearman. Das Diffusionsvolumen wurde mit Hilfe der zuvor genannten Formel (siehe S. 23) aus den fünf größten Injektionsflächen je Injektion berechnet. Dann wurde der Mittelwert aus der Summe aller Projektionsneurone je Schnitt und Injektion ermittelt und mit dem Diffusionsvolumen korreliert. Bei neun durchgeführten Tracerinjektionen an acht Versuchstieren (386 Doppelinjektion: 386li, 386re) ergaben sich neun Wertepaare, die in einem Diagramm aufgetragen wurden (Abbildung 11). Die Punktwolke lässt unter Berücksichtigung aller Werte keine klare Struktur bzw. Linearität erkennen und spricht gegen eine Abhängigkeit der beiden Parameter. Der Rangkorrelationskoeffizienten r_s nach Spearman in Höhe von $-0,183$ ($p = 0,6368$) bestätigt diese Beobachtung und zeigt, dass die Anzahl der retrograd markierten Projektionsneurone nicht mit dem Diffusionsvolumen korreliert.

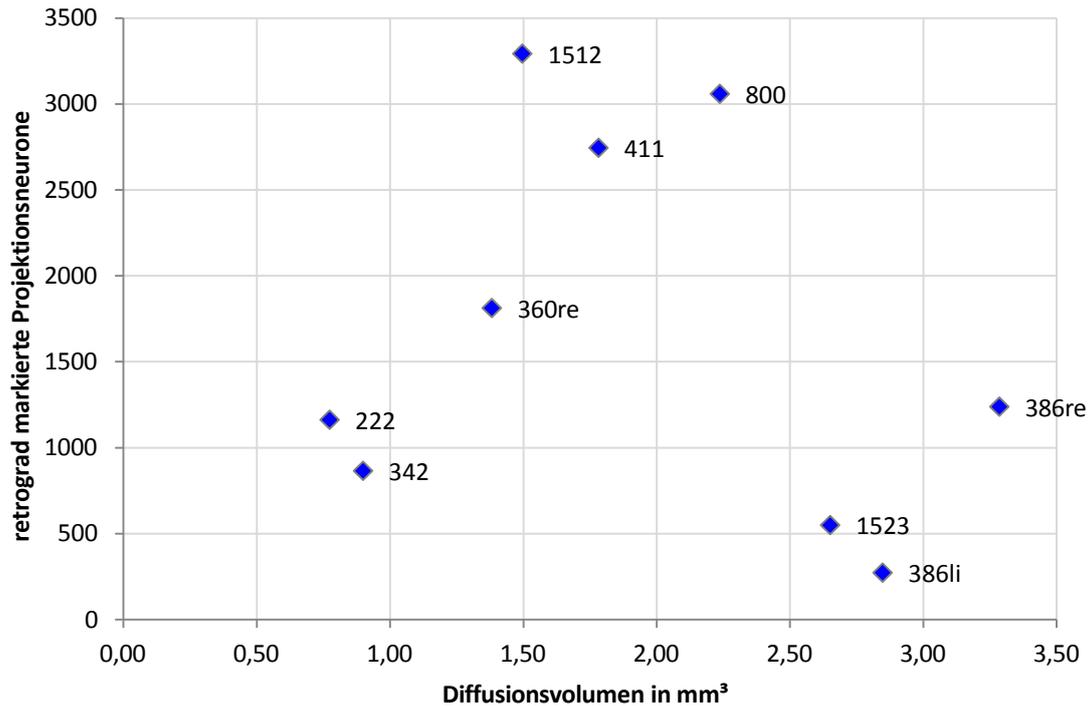


Abbildung 11 Korrelationsanalyse der retrograd markierten Projektionsneurone zum Diffusionsvolumen von FG

Dargestellt sind das Diffusionsvolumen und der mittlere Absolutwert der retrograd markierten Projektionsneurone je Injektion. Aus den zur Verfügung stehenden Daten ergaben sich neun Wertepaare, die in dem Diagramm aufgetragen sind. Die Beschriftung der Datenpunkte entspricht der durchgeführten Tracerinjektion mit dem entsprechenden Versuchstier. Es erfolgte eine Korrelationsanalyse nach Spearman, die zeigte, dass das Diffusionsvolumen und die Anzahl der retrograd markierten Projektionsneurone nicht korrelieren. $r_s = -0,183$ ($p = 0,6368$).

3.1.3 Verteilung der Peptid-positiven Neurone auf Schichten des Hippocampus

Die immunhistochemischen Färbungen für PARV, NPY und CCK wurden durchgeführt, um Subpopulationen der GABAergen Projektionsneurone zu identifizieren. Im Folgenden soll die allgemeine Verteilung der PARV-, NPY- bzw. CCK-exprimierenden Neurone auf die Schichten des Hippocampus beschrieben werden. Für PARV konnten dafür sieben Serien mit 21 Schnitten ausgewertet werden, für NPY sieben Serien mit 18 Schnitten und für CCK zwei Serien mit 6 Schnitten. Beim Zählen der immunhistochemisch positiven Neurone kam es manchmal vor, dass insbesondere im Stratum moleculare kein einziges peptiderges Neuron markiert war (z. B. 342_PV). Der größte Absolutwert mit 146 positiven Neuronen für PARV war im Stratum pyramidale der Serie 411_PV zu finden. Tabelle 5 im Anhang (S. 89) zeigt die prozentualen Mittelwerte der PARV-, NPY- bzw. CCK-positiven Neurone je Hippocampusschicht und Serie. Wie man der Abbildung 12 entnehmen kann, weisen die PARV-, NPY- bzw. CCK-exprimierenden Neurone kein identisches Verteilungsmuster auf. Dessen ungeachtet haben alle Peptide (PARV, NPY, CCK) ihren größten Anteil im Stratum pyramidale.

PARV-positive Neurone sind mit einem Anteil von 89 % mehrheitlich im Stratum pyramidale zu finden. Rund ein Zehntel der PARV-exprimierenden Zellen befinden sich im Stratum oriens, wohingegen im Stratum moleculare kaum PARV-positive Neuronen zu finden sind (2 %) (Abbildung 12). In Abbildung 12 sind die PARV-positiven Neurone rot dargestellt. Die orangen Balken stellen die NPY-exprimierenden Neurone dar. Ihr Verteilungsmuster ähnelt dem der PARV-positiven Neurone, allerdings sind sie mit 18 % etwas häufiger als PARV-positive Neurone im Stratum oriens zu finden. Im Stratum pyramidale befinden sich 73 % der NPY-exprimierenden Zellen und im Stratum moleculare rund 9 %. Bei der Färbung von CCK, in Abbildung 12 gelb dargestellt, ist nur jedes zweite markierte Neuron im Stratum pyramidale (53 %) lokalisiert. CCK-positive Neurone sind mit 27 % im Stratum oriens und 20 % im Stratum moleculare häufiger präsent als PARV- oder NPY-exprimierende Neurone in diesen beiden Schichten.

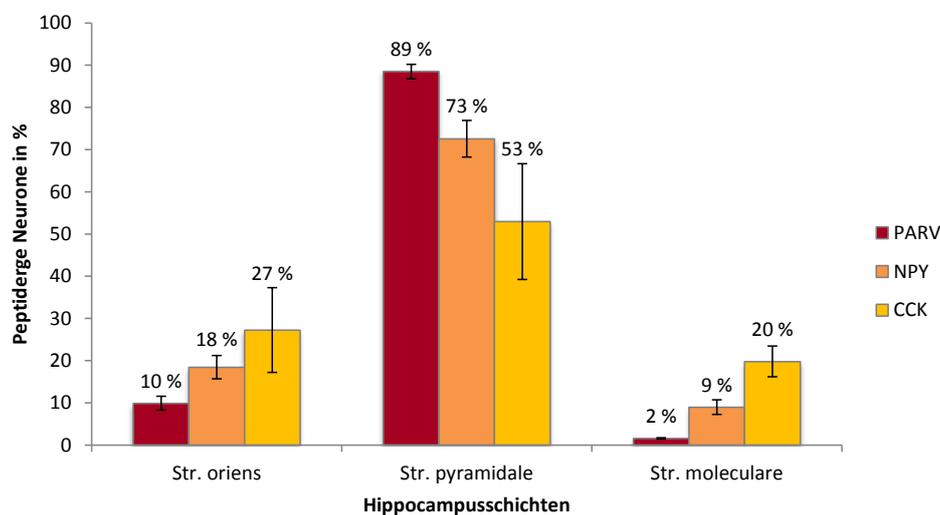


Abbildung 12 Verteilung der immunohistochemisch positiven Neurone für PARV, NPY und CCK auf Schichten des Hippocampus in %. Dargestellt sind MW \pm SEM aus n = 7 Serien, 21 Schnitten bei PARV; n = 7 Serien, 18 Schnitten bei NPY; n = 2 Serien, 6 Schnitten bei CCK.

In Abbildung 13 ist die Variation der PARV-, NPY- und CCK-exprimierenden Neurone zwischen den Serien zu sehen. Orange steht in dieser Abbildung für das Stratum oriens, Rot für das Stratum pyramidale und Gelb für das Stratum moleculare. PARV und NPY zeigen eine relativ homogene Verteilung zwischen den Serien. Bei CCK ist eine Aussage über die Homogenität der Verteilung bei zwei Serien dagegen nur eingeschränkt möglich.

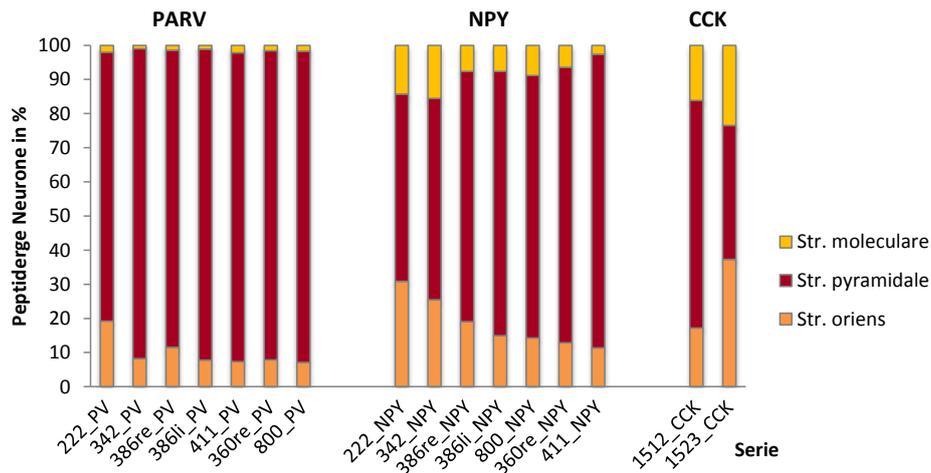


Abbildung 13 Variation der peptidergen Neuronenverteilung von PARV-, NPY- und CCK-positiven Neuronen auf Schichten des Hippocampus zwischen den Serien. Dargestellt sind die MW je Serie in %. PARV: n = 7 Serien, 21 Schnitte; NPY: n = 7 Serien, 18 Schnitte; CCK: n = 2 Serien, 6 Schnitte.

3.1.3.1 Etablierung eines CCK-Färbeprotokolls

Wie aus den bisherigen Abbildungen ersichtlich, standen zur Beurteilung der CCK-Subpopulation nur zwei Tiere mit jeweils drei Schnitten zur Verfügung. Diese geringe Anzahl ergibt sich aus den anfänglichen Schwierigkeiten ein gutes CCK-Färberesultat zu erhalten. Daher war zunächst die Etablierung eines Färbeprotokolls zur Detektion von CCK-positiven Neuronen notwendig.

Anfangs wurde die CCK-Färbung mit einem primären Antikörper der Firma AbD Serotec durchgeführt. Die Signale waren sehr schwach, sodass zunächst versucht wurde, die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen des polyklonalen Antikörpers zu verbessern. Dazu wurden verschiedene Möglichkeiten der Blockierung getestet, wie z. B. die Verwendung von Fischgelatine, Milchpulver oder einer größeren Menge Rinderserumalbumin (BSA). Die unterschiedlichen Blockierungen, die in der Abbildung 14 grün dargestellt sind, führten zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis. Zudem wurden verschiedene Verdünnungen getestet, die auch keine Verbesserung brachten. Daraufhin folgte ein Herstellerwechsel von AbD Serotec (#2050-0004) zu ImmunoStar (#20078). Dies erwies sich als günstig, da erstmals differenzierte Neurone in der Hippocampusformation erkennbar waren. Es wurden weitere Optimierungsversuche unternommen, die in Abbildung 14 orange dargestellt sind. Anfangs wurden verschiedene Verdünnungen getestet. Hier erwies sich eine 1:1000 Verdünnung am günstigsten. Zur weiteren Signalamplifikation wurde bei der Cholecystokininfärbung zusätzlich die Avidin-Biotin-Komplexmethode (ABC Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame CA, USA) verwendet, die jedoch lediglich zu einer verstärkten Hintergrundfärbung führte und nicht zur Verstärkung des spezifischen Signals beitrug, sodass sie letztendlich nicht zur Anwendung kam. Auch die Verwendung

von TSA Rhodamin (TSA Kit, T20933, Molecular Probes, Paisley, UK) anstelle von Cy3-konjugiertem Streptavidin erbrachte im Vergleich zur Standardmethode keine Verbesserung. Eine Verlängerung der Inkubationszeit mit Cy3-konjugiertem Streptavidin stellte sich allerdings als vorteilhaft heraus.

Bei dem letztlich verwendeten Färbeprotokoll, in Abbildung 14 lila dargestellt, wurde der primäre Antikörper für CCK von der Firma ImmunoStar in einer Verdünnung 1:1000 verwendet und die Fluochrominkubationszeit auf eine Stunde erhöht.

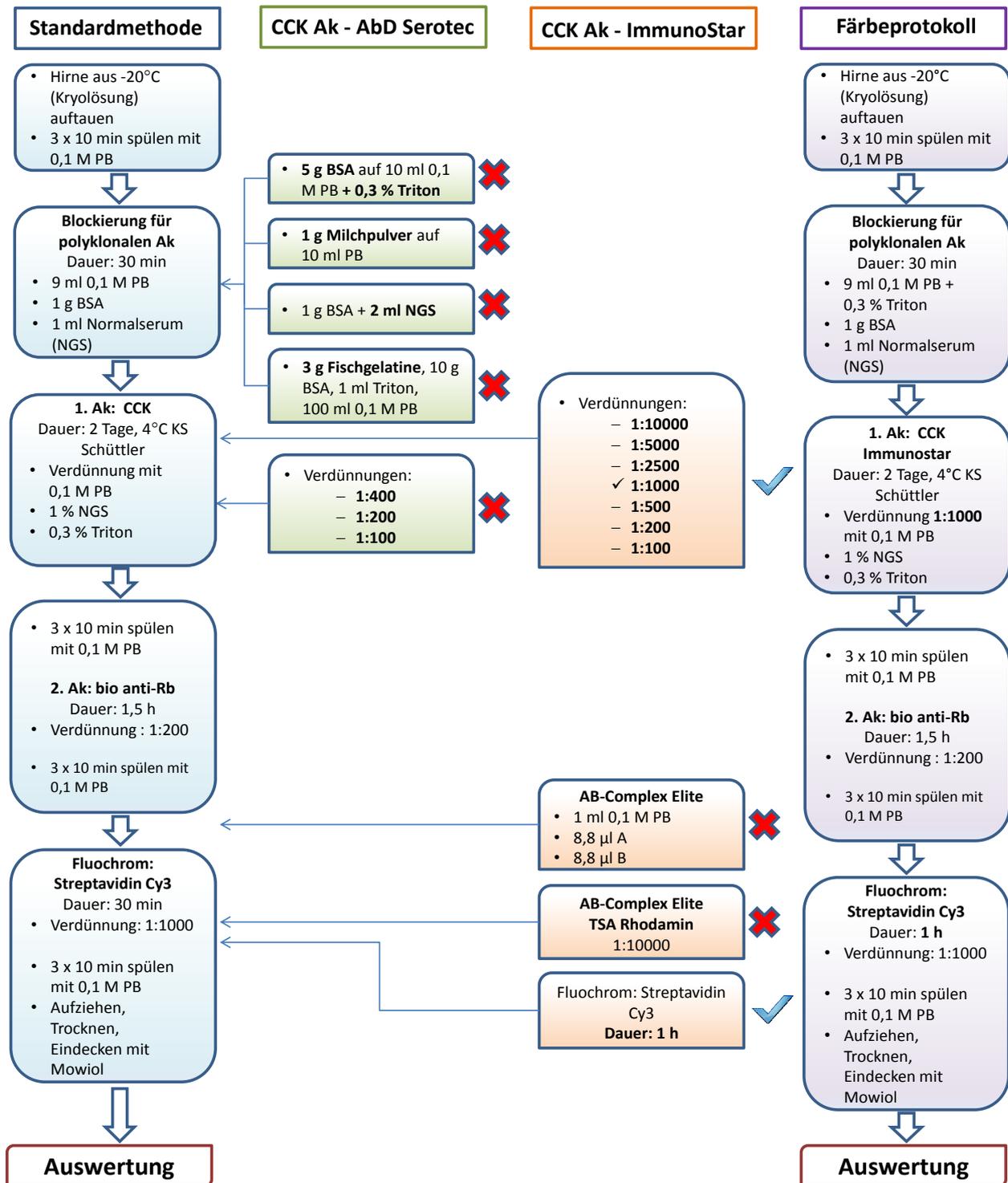


Abbildung 14 Etablierung eines Färbeprotokolls zur Detektion von CCK

Alle Verdünnungen wurden mit 0,1 M PB hergestellt. Blau hinterlegt ist die Standardfärbemethode, die nur zu sehr schwachen Signalen führte. In den grünen Kästen sind die Optimierungsversuche unter Verwendung des CCK-Antikörpers von Abd Serotec abgebildet. Aufgrund ausbleibender Verbesserung erfolgte ein Herstellerwechsel zu ImmunoStar. Die orange hinterlegten Felder enthalten Optimierungsversuche unter Verwendung des CCK Antikörpers von ImmunoStar. Ein rotes Kreuz bedeutet, dass die Änderung keine signifikante Verbesserung erbrachte oder gar zu einer Verschlechterung führte. Ein blaues Häkchen steht für ein gutes Färbesresultat. Das endgültige und letztlich angewandte Färbeprotokoll ist lila markiert.

Zusammenfassend kann man sagen, dass GABAerge Neurone annähernd homogen über die Schichten des Hippocampus verteilt sind. Die meisten Projektionsneurone hingegen befinden sich unabhängig von der Schichtgröße mit 89 % im Stratum pyramidale. Auch die Peptid-positiven Neurone sind hauptsächlich im Stratum pyramidale lokalisiert. PARV- und NPY-exprimierende Neurone zeigen ein sehr ähnliches Verteilungsmuster, indem sie hauptsächlich im Stratum pyramidale zu finden sind, gefolgt vom Stratum oriens und schließlich dem Stratum moleculare. CCK weicht von dieser Verteilung geringfügig ab: Obgleich auch hier der größte Anteil im Stratum pyramidale präsent ist, befindet sich mit 27 % bzw. 20 % ein nicht unerheblicher Teil im Stratum oriens bzw. Stratum moleculare.

3.2 GABAerge Projektionsneurone

Im folgenden Abschnitt soll das Augenmerk auf die GABAergen Projektionsneurone der ventralen CA1-Region und des angrenzenden Subiculus gelenkt werden. Als GABAerge Projektionsneurone wurden Neurone gezählt, die sowohl GFP exprimierten als auch retrograd mit FG markiert waren. GABAerge Projektionsneurone sind somit doppelmarkierte Neurone für FG und GFP. Zur weiteren Charakterisierung der GABAergen Projektionsneurone erfolgten PARV-, NPY- und CCK-Immunfluoreszenzfärbungen. So konnte ein Neuron dreifach markiert sein (Triple, T), wenn es positiv war sowohl für FG als Projektionsmarker und GFP zur Identifizierung GABAerger Neurone als auch für das jeweils gefärbte Peptid.

3.2.1 Doppelmarkierte Neurone: FG + GFP

Zunächst wurde die Verteilung der GABAergen Projektionsneurone auf Schichten des Hippocampus untersucht. Wie bei der allgemeinen Verteilung der GABAergen Neurone und Projektionsneurone wurde zunächst der prozentuale Anteil je Hirnschnitt und Hippocampusschicht ermittelt und anschließend der Mittelwert je Serie berechnet. Tabelle 1 zeigt die prozentuale Verteilung der GABAergen Projektionsneurone auf Schichten des Hippocampus je Serie und die mittlere Verteilung von allen Serien. Die meisten GABAergen Projektionsneurone befinden sich mit 76 % im Stratum pyramidale, 16 % sind im Stratum oriens lokalisiert und 8 % im Stratum moleculare (Tabelle 1). Diese Verteilung ähnelt der allgemeinen Verteilung der Projektionsneurone (vgl. Abbildung 9). In Abbildung 15 ist die Variation der Verteilung der GABAergen Projektionsneurone auf Schichten des Hippocampus zwischen den Serien und Versuchstieren zu sehen. Wie man der Abbildung 15 entnehmen kann, ist die Verteilung überwiegend homogen und die Variation am ehesten der biologischen Individualität geschuldet.

Tabelle 1 Verteilung der GABAergen Projektionsneurone auf Schichten des Hippocampus

Angegeben sind die Mittelwerte je Hippocampuschicht und Serie in %. GABAerge Projektionsneurone sind Neurone, die sowohl FG als auch GFP markiert sind. In der Spalte Versuchstier ist das entsprechende Tier (Zahl) mit der jeweils durchgeführten Färbung (PV, NPY, CCK) vermerkt (= eine Serie). Es wurden 16 Serien (n = 16) mit insgesamt 45 Schnitten ausgewertet. Die verwendete Anzahl der Schnitte je Serie ist in der Spalte Versuchstier in Klammern vermerkt. so - Stratum oriens, sp - Stratum pyramidale, sm - Stratum moleculare.

GABAerge Projektionsneurone in %			
Versuchstier	Hippocampuschichten		
	Or	Py	Mo
222_PV (3)	17	80	3
222_NPY (2)	17	83	0
342_PV (3)	4	94	2
342_NPY (3)	5	95	0
386re_PV (3)	4	94	1
386re_NPY (3)	11	78	10
386li_PV (3)	8	88	4
386li_NPY (3)	31	63	6
411_PV (3)	15	78	7
411_NPY (3)	14	79	7
360re_PV (3)	13	68	20
360re_NPY (1)	14	75	11
800_PV (3)	17	74	9
800_NPY (3)	18	77	5
1512_CCK (3)	29	56	15
1523_CCK (3)	30	38	32
Mittelwert in %	16	76	8

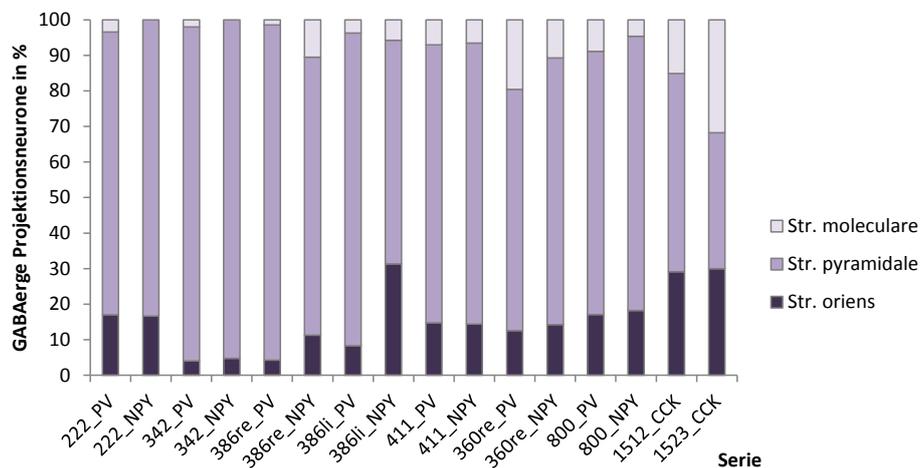


Abbildung 15 Variation der Verteilung GABAerger Projektionsneurone

auf Schichten des Hippocampus zwischen den Serien. Dargestellt sind die MW in % von n = 16 Serien.

Als nächstes stellte sich die Frage, wie viele GABAerge Zellen an den Projektionen in die Amygdala beteiligt sind und wie viele der hippocampo-amygdalären Projektionen GABAerg sind? Um diese

Fragen zu beantworten, wurden die GABAergen Projektionsneurone in Relation zu den GABAergen Neuronen (Abbildung 16) und den Projektionsneuronen (Abbildung 17) betrachtet.

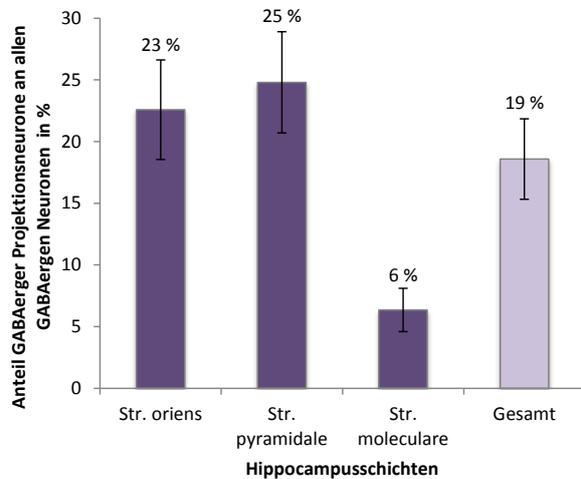


Abbildung 16 Anteil GABAerger Projektionsneurone an allen GABAergen Neuronen in den Schichten des Hippocampus und bezogen auf die Gesamtzahl aller GABAergen Neurone. Dargestellt sind MW \pm SEM in % aus n = 16 Serien.

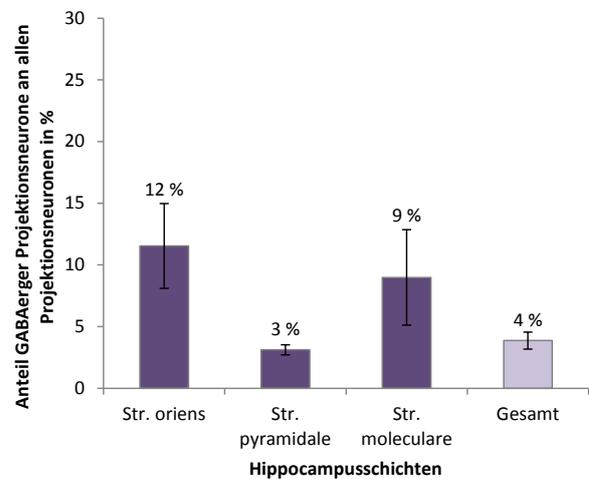


Abbildung 17 Anteil der GABAergen Projektionsneurone an allen Projektionsneuronen in den Schichten des Hippocampus und bezogen auf die Gesamtzahl aller Projektionsneurone. Dargestellt sind MW \pm SEM in % aus n = 16 Serien.

Abbildung 16 zeigt, dass sich die meisten projizierenden GABAergen Neurone mit einem Anteil von 23 % bzw. 25 % im Stratum oriens bzw. Stratum pyramidale befinden. Diese beiden Hippocampusschichten weisen fast einen identisch hohen Anteil an projizierenden GABAergen Zellen auf. Im Stratum moleculare projizieren nur 6 % der GABAergen Neurone in die Amygdala. Vergleicht man diese Zahlen mit der allgemeinen Verteilung GABAergen Neurone (vgl. Abbildung 6), wird deutlich, dass sich unabhängig von der Schichtgröße die meisten projizierenden GABAergen Zellen im Stratum oriens und Stratum pyramidale befinden, obwohl prozentual mehr GABAerge Zellen im Stratum moleculare lokalisiert sind als im Stratum oriens. Insgesamt projizieren rund 19 % aller GABAergen Neurone der ventralen Hippocampusregion in die Amygdala.

In der Abbildung 17 ist der Anteil GABAerger Projektionsneurone an allen hippocampo-amygdalären Projektionsneuronen dargestellt. Im Stratum oriens weisen die GABAergen Projektionsneurone mit 12 % ihren größten Anteil an allen Projektionsneuronen auf, wohingegen im Stratum pyramidale nur 3 % der Projektionsneurone GABA exprimieren. Rund ein Zehntel der vom Stratum moleculare ausgehenden Projektionen werden von einem GABAergen Neuron initiiert (9 %) (Abbildung 17). Die GABAergen Projektionsneurone machen insgesamt 4 % aller gezählten Projektionsneurone aus

(heller Balken Abbildung 17). Bei genauerer Betrachtung verwundert es nicht, dass im Stratum pyramidale der Anteil GABAerger Projektionsneurone an allen Projektionsneuronen am geringsten ist. Denn hier sind die Projektionsneurone am häufigsten vertreten und ihre Absolutzahlenwerte unterscheiden sich zum Teil bis zu einer Zehnerpotenz von denen der GABAergen Zellen (Abbildung 18). Im Stratum oriens und Stratum moleculare relativiert sich dieses Übergewicht der Projektionsneuronenanzahl und die Spannweite zwischen den Absolutwerten der Projektionsneurone und denen der GABAergen Neurone ist geringer (Abbildung 18).

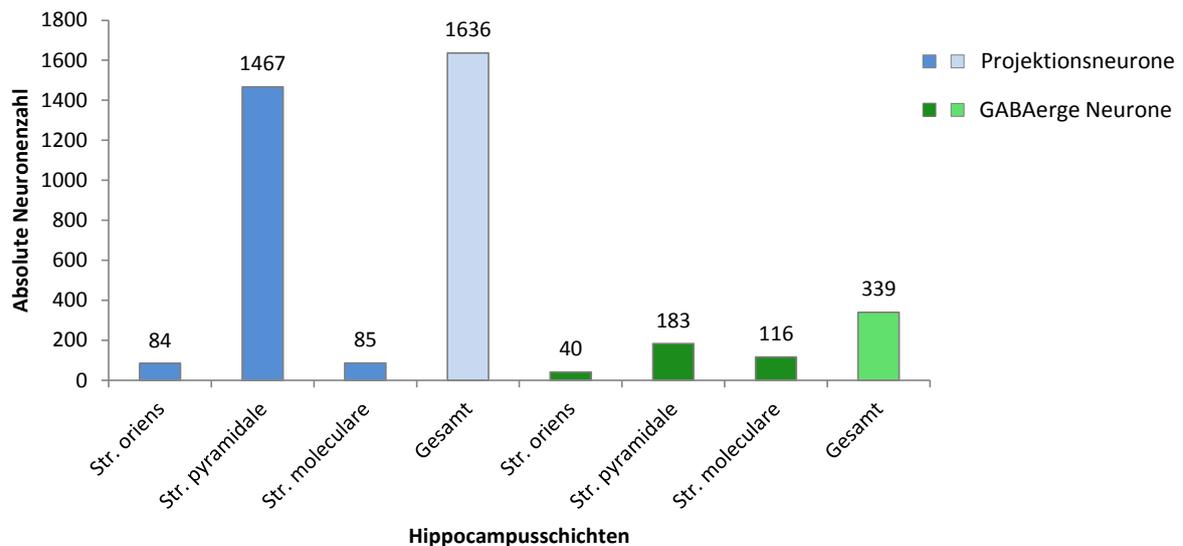


Abbildung 18 Absolute Neuronenzahl der Projektionsneurone und GABAergen Neurone

je Hippocampuschicht und Gesamtsumme aus allen drei Hippocampuschichten. Dargestellt ist der Mittelwert der absoluten Neuronenzahl pro Schicht und die Summe aller drei Hippocampuschichten ermittelt aus 45 Schnitten. Die blauen Balken stellen die Projektionsneurone dar, die grünen Balken repräsentieren die GABAergen Neurone.

3.2.2 Dreifachmarkierte Neurone: FG + GFP + Peptid

Dreifachmarkierte Neurone sind GABAerge Projektionsneurone, die darüber hinaus PARV, NPY oder CCK exprimieren. Abbildung 19A veranschaulicht schematisch die möglichen Markierungen eines Neurons. Die gemeinsame Schnittmenge aller drei Kreise sind die GABAergen Projektionsneurone mit dem jeweiligen Peptid. In Abbildung 19B sind Beispielbilder von GABAergen Projektionsneuronen, die PARV, NPY oder CCK exprimieren, zu sehen.

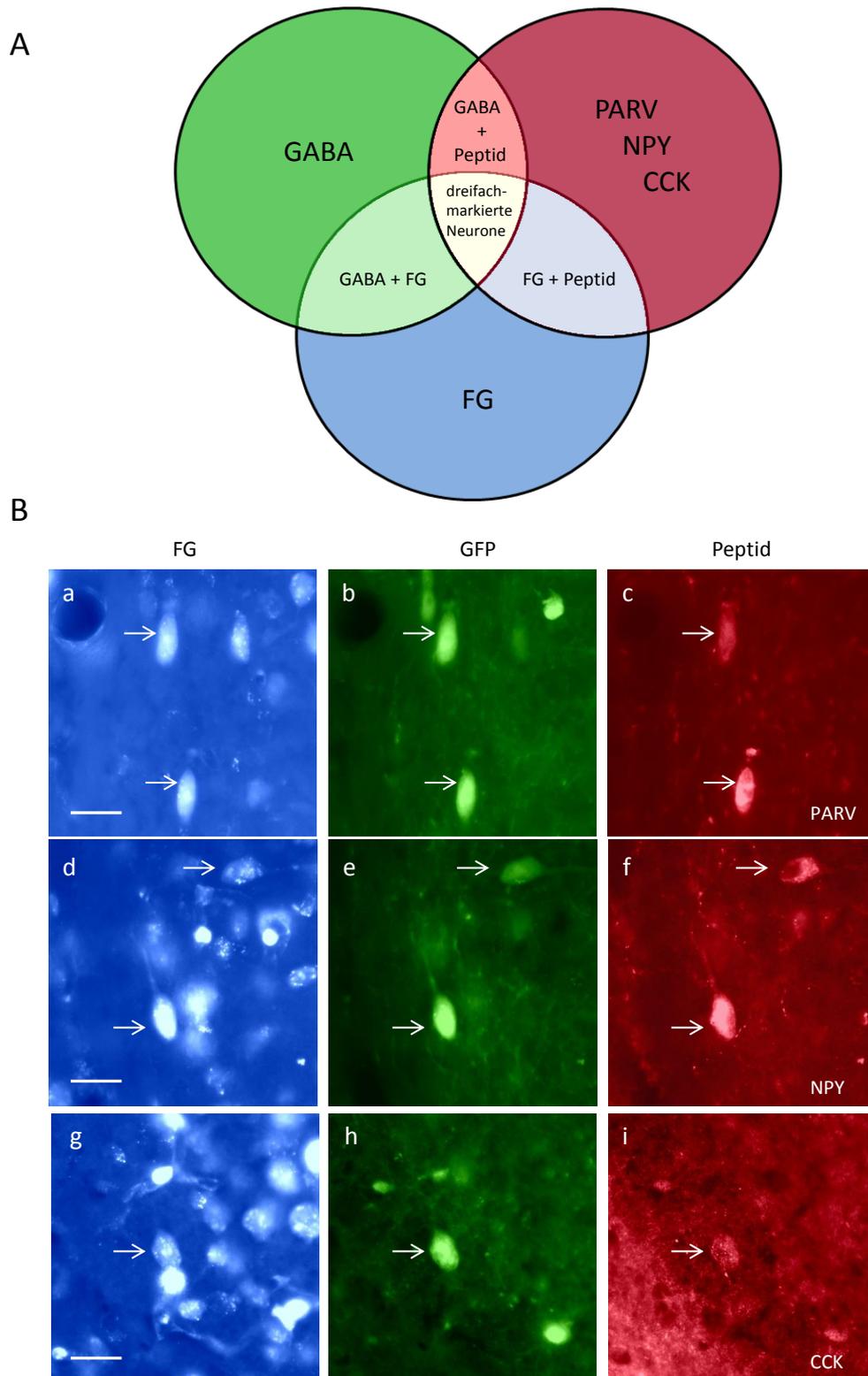


Abbildung 19 Dreifachmarkierte Neurone

(A) Schematische Darstellung der möglichen Markierungen eines Neurons, GABA (GFP) - grün, FG - blau, Peptid (PARV, NPY, CCK) - rot, dreifachmarkierte Neurone - gelb sowie Doppelmarkierungen (GABA + FG, FG + Peptid, GABA + Peptid).

(B) Beispielbilder von dreifachmarkierten Neuronen im ventralen Hippocampus für FG, GFP und PARV (a, b, c), NPY (d, e, f) und CCK (g, h, i). Maßstabsbalken: 20 μ m (Abbildung geändert nach Lübke, Eberhardt et al. 2015).

Tabelle 2 zeigt die Verteilung der PARV-, NPY- bzw. CCK-positiven GABAergen Projektionsneurone in den drei Schichten des Hippocampus in %. Des Weiteren wurden die dreifachmarkierten Neurone in Relation zu den GABAergen Projektionsneuronen, den Projektionsneuronen, den GABAergen Neuronen und den Peptid-positiven Neuronen gesetzt. Die Tabelle soll eine Übersicht der ermittelten Werte geben, die im Folgenden genauer beschrieben werden.

Tabelle 2 PARV-, NPY- bzw. CCK-positive GABAerge Projektionsneurone in %

Dargestellt sind die MW in % in den jeweiligen Schichten des Hippocampus. Die verwendete Anzahl der Schnitte je Serie ist in Klammern vermerkt. Zur Charakterisierung von PARV- und NPY-exprimierenden GABAergen Projektionsneuronen wurden je sieben Serien ausgewertet, für CCK zwei Serien. Angegeben sind: die allgemeine Verteilung der dreifachmarkierten Neurone (T = FG + GFP + Peptid); Schnitte, bei denen keine Dreifachmarkierung vorlag, wurden bei der allgemeinen Verteilung nicht berücksichtigt; darüber hinaus T in Relation zu den GABAergen Projektionsneuronen (FG + GFP), den Projektionsneuronen (FG), den GABAergen Neuronen (GFP) und den Peptid-exprimierenden Neuronen (PARV; NPY; CCK).

PARV in %				
	Hippocampusschichten			Gesamt
	so	sp	sm	
T \triangleq FG + GFP + PARV (20)	10,7	89,3	0,0	100,0
T / FG + GFP (21)	20,0	41,8	0,0	39,1
T / FG (21)	1,7	1,2	0,0	1,2
T / GFP (21)	9,6	14,3	0,0	9,7
T / PARV (21)	15,0	17,5	0,0	16,8
NPY in %				
	Hippocampusschichten			Gesamt
	so	sp	sm	
T \triangleq FG + GFP + NPY (17)	22,9	73,5	3,6	100,0
T / FG + GFP (18)	16,3	14,5	9,5	14,6
T / FG (18)	1,7	0,5	0,9	0,6
T / GFP (18)	2,8	3,6	0,4	2,5
T / NPY (18)	19,7	22,0	11,5	18,8
CCK in %				
	Hippocampusschichten			Gesamt
	so	sp	sm	
T \triangleq FG + GFP + CCK (6)	42,6	48,9	8,5	100,0
T / FG + GFP (6)	17,6	10,6	5,0	12,0
T / FG (6)	9,3	0,4	3,9	1,3
T / GFP (6)	4,3	1,8	0,5	1,6
T / CCK (6)	38,3	23,4	11,4	27,9

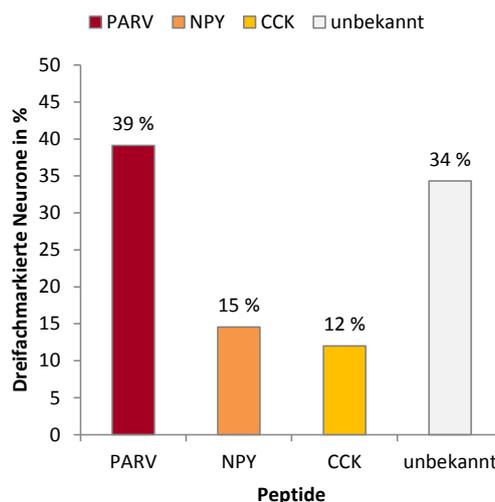


Abbildung 20 Gesamtanteil der dreifachmarkierten Neurone an den GABAergen Projektionsneuronen in %

Es wurde die Gesamtsumme der dreifachmarkierten Neurone (FG + GFP + Peptid) in Relation zu der Gesamtanzahl der GABAergen Projektionsneurone je Schnitt berechnet (FG + GFP). Anschließend wurde der Mittelwert je Serie ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert in % für alle sieben (PARV - rot, NPY - orange) bzw. zwei (CCK - gelb) Serien. Der graue Balken zeigt den Anteil GABAerger Projektionsneurone, die im Rahmen dieser Studie nicht näher charakterisierbar sind, die aber zum Teil Somatostatin, Calbindin oder Calretinin enthalten (Lübke, Eberhardt et al. 2015).

Abbildung 20 veranschaulicht, dass GABAerge Projektionsneurone PARV mit einem Anteil von über 30 % am häufigsten von den drei untersuchten Peptiden exprimieren. Aber auch NPY und CCK werden mit einem Anteil von 15 % und 12 % nennenswert von den GABAergen Projektionsneuronen synthetisiert. Der graue Balken in Abbildung 20 stellt den Anteil der GABAergen Projektionsneurone dar, die im Rahmen dieser Studie nicht näher charakterisierbar sind, weil sie weder für PARV und NPY noch für CCK positiv waren.

In Abbildung 21 ist der Anteil PARV-, NPY- und CCK-exprimierender GABAerger Projektionsneurone in den drei Hippocampuschichten dargestellt. Auch hier steht der graue Balken für den Anteil der nicht näher charakterisierbaren GABAergen Projektionsneurone. Im Stratum pyramidale ist der Anteil PARV-positiver GABAerger Projektionsneurone mit 42 % am größten (roter Balken Abbildung 21). Im Gegensatz dazu finden sich im Stratum moleculare keine PARV-exprimierenden GABAergen Projektionsneurone. Im Stratum oriens werden alle drei untersuchten Peptide ungefähr gleichhäufig von den GABAergen Projektionsneuronen synthetisiert (16 % - 20 %). NPY- und CCK-exprimierende GABAerge Projektionsneurone sind am häufigsten im Stratum oriens lokalisiert, gefolgt vom Stratum pyramidale. Weiterhin werden NPY und CCK auch von GABAergen Projektionsneuronen im Stratum moleculare exprimiert. Trotzdem konnte von den 6 % der GABAergen Neurone, die aus dem Stratum moleculare projizieren (vgl. Abbildung 16), nur ein kleiner Anteil genauer charakterisiert werden, da

die untersuchten Peptide von 85 % der GABAergen Projektionsneurone in dieser Schicht nicht exprimiert werden.

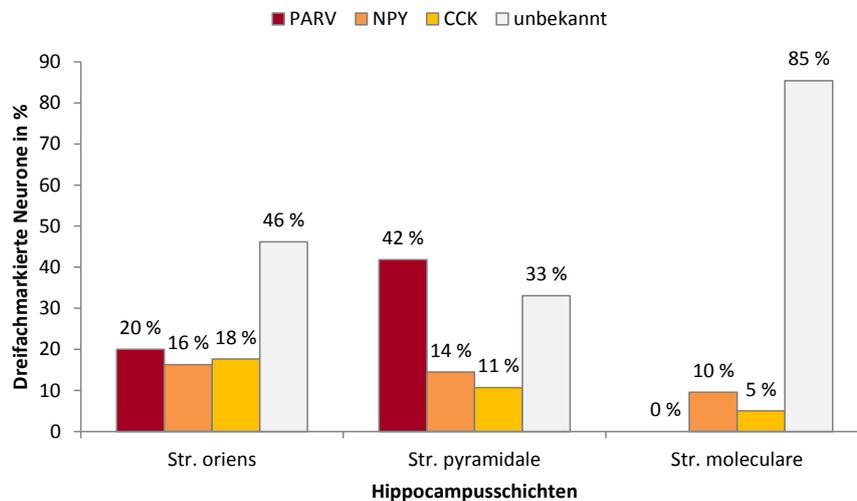


Abbildung 21 Anteil der dreifachmarkierten Neurone an den GABAergen Projektionsneuronen in der jeweiligen Hippocampuschicht

Es wurden die Absolutwerte der dreifachmarkierten Neurone (FG + GFP + Peptid) in Relation zu den Absolutwerten der GABAergen Projektionsneurone (FG + GFP) je Schnitt in % berechnet. Anschließend wurde der Mittelwert je Serie ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert in % aller sieben (PARV - rot, NPY - orange) bzw. zwei (CCK - gelb) Serien. Der graue Balken zeigt den Anteil GABAerger Projektionsneurone, die im Rahmen dieser Studie nicht näher charakterisierbar sind.

Abbildung 22 zeigt die allgemeine Verteilung der Peptid-positiven GABAergen Projektionsneurone auf den drei Schichten des Hippocampus. PARV-, NPY- und CCK-exprimierende GABAerge Projektionsneurone (dreifachmarkierte Neurone) sind am häufigsten im Stratum pyramidale lokalisiert. Hierbei entspricht die Verteilung der PARV-, NPY- und CCK-positiven GABAergen Projektionsneurone auf den Schichten des Hippocampus weitestgehend der allgemeinen Verteilung der Peptid-positiven Neurone (vgl. Abbildung 12). Lediglich bei den CCK-exprimierenden GABAergen Projektionsneuronen weicht die Verteilung der dreifachmarkierten Neurone leicht von der allgemeinen Verteilung der CCK-markierten Neurone ab. Denn CCK-synthetisierende GABAerge Projektionsneurone sind fast zu gleichen Teilen im Stratum oriens und Stratum pyramidale mit einem Anteil von 43 % bzw. 49 % zu finden, wobei CCK-positive Neurone nur zu 27 % im Stratum oriens und zu 53 % im Stratum pyramidale (vgl. Abbildung 12) lokalisiert sind. Allerdings sollte stets berücksichtigt werden, dass zur Beurteilung der CCK-Subpopulation nur zwei Serien ausgewertet wurden und daher die Aussagekraft eingeschränkt ist (siehe auch Diskussion).

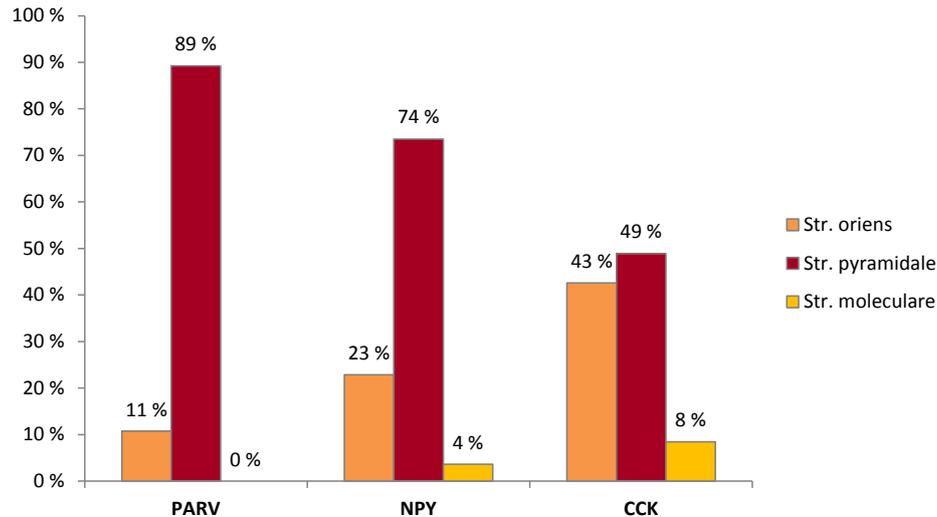


Abbildung 22 Allgemeine Verteilung der PARV-, NPY- und CCK-exprimierenden GABAergen Projektionsneurone auf Schichten des Hippocampus

Dargestellt sind die Mittelwerte in %. Für PARV wurden sieben Serien mit insgesamt 20 Hirnschnitten, für NPY sieben Serien mit insgesamt 17 Hirnschnitten und für CCK zwei Serien mit insgesamt 6 Hirnschnitten ausgewertet.

Der Anteil der PARV-, NPY- bzw. CCK-positiven GABAergen Projektionsneurone an der Gesamtheit der Projektionsneurone, der GABAergen Neurone und der Peptid-markierten Neurone ist in Abbildung 24 dargestellt. Unabhängig vom exprimierten Peptid haben die dreifachmarkierten Neurone jeweils nur einen Anteil von rund 1 % an allen Projektionsneuronen (siehe jeweils erstes Diagramm Abbildung 24, T/FG). Bei den hohen Absolutwerten der Projektionsneurone (vgl. Abbildung 18) und der vergleichsweise niedrigen Anzahl der dreifachmarkierten Neurone (Abbildung 23), verwundert dies jedoch nicht. CCK-exprimierende GABAerge Projektionsneurone weisen im Stratum oriens mit 9 % im Vergleich zu PARV und NPY einen hohen Anteil an den Projektionsneuronen in dieser Schicht auf (siehe jeweils erstes Diagramm Abbildung 24).

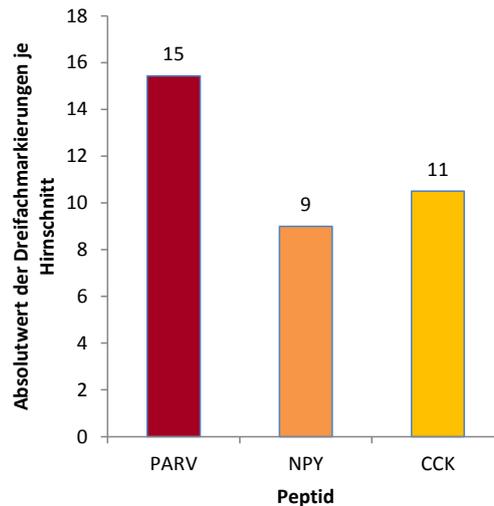


Abbildung 23 Absolute Anzahl der Dreifachmarkierungen je Hirnschnitt und Peptid

Dargestellt ist der Mittelwert der Dreifachmarkierungen je Schnitt und Peptid (PARV, NPY, CCK) ermittelt aus 21 Schnitten für PARV, 18 Schnitten für NPY und 6 Schnitten für CCK.

Der Anteil PARV-positiver GABAerger Projektionsneurone an allen GABAergen Neuronen (Abbildung 24, 2. Diagramm T/GFP, rot) macht immerhin ein Zehntel der GABAergen Gesamtpopulation aus, währenddessen NPY und CCK mit 3 % bzw. 2 % einen vergleichsweise geringen Anteil haben (Abbildung 24, 2. Diagramm NPY und CCK). Von den CCK-positiven Neuronen sind knapp 30 % gleichzeitig GABAerge Projektionsneurone (siehe Abbildung 24 3. Diagramm, gelb), bei PARV und NPY sind dies ca. 20 % (Abbildung 24, 3. Diagramm, rot & orange). PARV- und NPY- positive Neurone sind im Stratum oriens und Stratum pyramidale nahezu gleich häufig an GABAergen Projektionen in die Amygdala beteiligt (Abbildung 24, jeweils 3. Diagramm). Auch CCK-markierte Neurone sind in diesen beiden Schichten am häufigsten dreifach markiert, allerdings weisen sie mit 38 % die meisten Dreifachmarkierungen im Stratum oriens auf, gefolgt vom Stratum pyramidale mit 23 %.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass 19 % der GABAergen Neurone vom ventralen Hippocampus in die Amygdala projizieren und rund 4 % aller Projektionsneurone GABAerg sind. Diese GABAergen Projektionsneuronen exprimieren von den drei untersuchten Peptiden mit über 30 % am häufigsten PARV, obgleich auch NPY und CCK nennenswert synthetisiert werden (vgl. Abbildung 20).

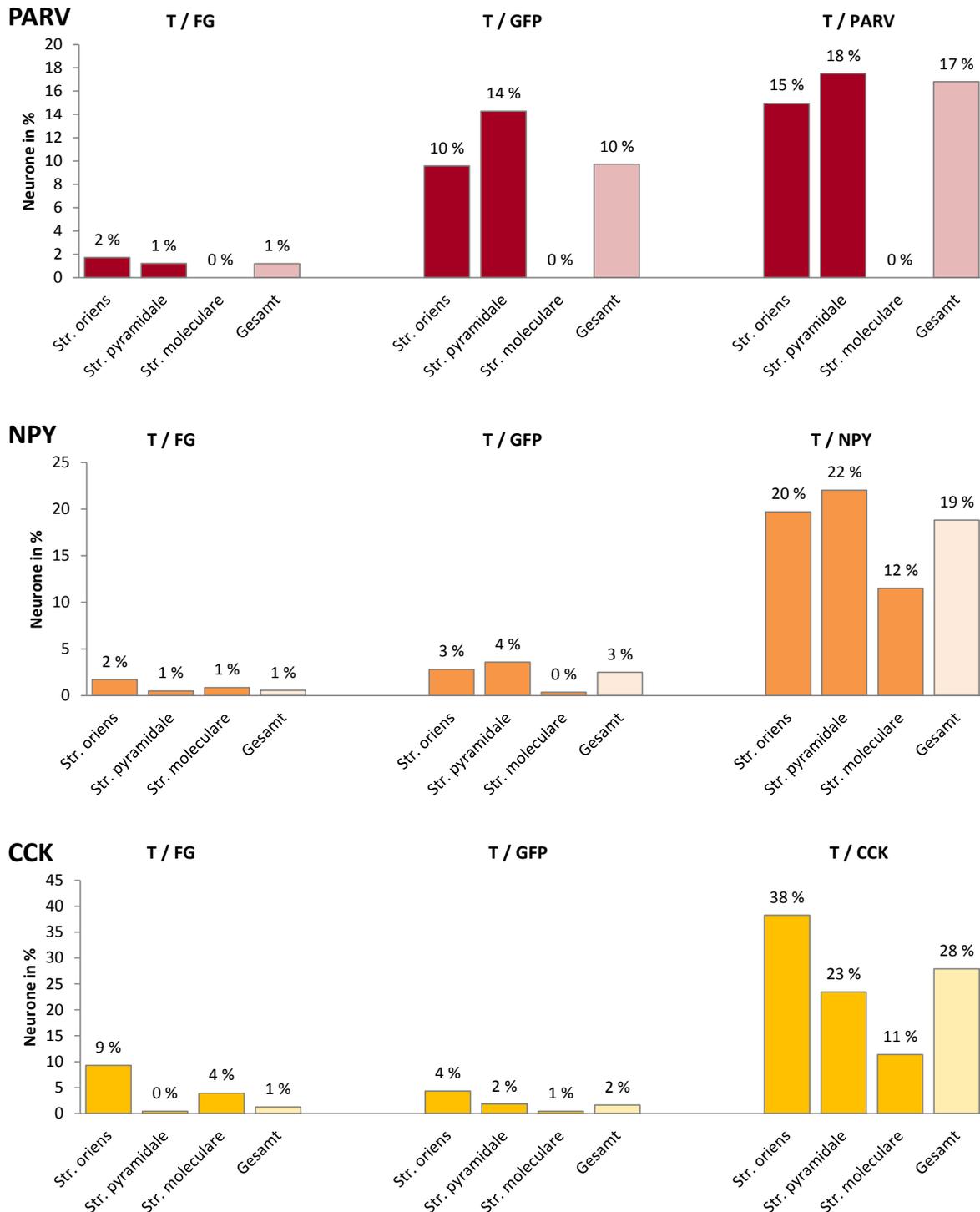


Abbildung 24 **Dreifachmarkierte Neurone in Relation zu allen Projektionsneuronen (T / FG), GABAergen Neuronen (T / GFP) und Peptid-positiven Neuronen (T / Peptid)**

Rot stellt die PARV dreifachmarkierten Neurone in Relation zu FG, GFP und PARV dar. Orange stellt die NPY dreifachmarkierten Neurone in Relation zu FG, GFP und NPY dar. Gelb stellt die CCK dreifachmarkierten Neurone in Relation zu FG, GFP und CCK dar. Dargestellt sind die MW in % je Hippocampuschicht und in Summe über alle drei Schichten. Die Werte wurden aus jeweils sieben Serien von PARV und NPY und zwei Serien von CCK berechnet (weitere Details siehe Tabelle 2).

3.3 Peptiderge Neurone

Die Komplexität der Daten erlaubt auch Aussagen über das allgemeine Vorkommen der untersuchten Peptide PARV, NPY und CCK in Projektionsneuronen und GABAergen Neuronen. Um eine Aussage darüber treffen zu können, wurden doppelmarkierte Neurone, die positiv für das jeweilige Peptid waren und entweder in die Amygdala projizierten oder GABAerg waren (FG + Peptid, GFP + Peptid), in Relation zu allen Projektionsneuronen, GABAergen Neuronen und Peptid-positiven Neuronen betrachtet.

3.3.1 PARV-Doppelmarkierungen: FG + PV, GFP + PV

Von den Projektionsneuronen (FG-positiven Neuronen) sind insgesamt rund 2 % positiv für PARV, die größten Anteile finden sich mit 3 % und 2 % im Stratum oriens und Stratum pyramidale. Im Stratum moleculare finden sich keine PARV-positiven Projektionsneurone (vgl. Abbildung 25A). 20 % aller PARV-exprimierenden Neurone sind an den Projektionen in die Amygdala beteiligt, die Mehrheit befindet sich auch hier im Stratum oriens und Stratum pyramidale (Abbildung 25B).

Rund ein Viertel der GABAergen Neurone exprimieren PARV (Abbildung 25C). Hiervon sind die meisten im Stratum pyramidale (37 %) lokalisiert, gefolgt vom Stratum oriens (23 %) (grüne Balken Abbildung 25C). Von den PARV-positiven Neuronen sind mehr als die Hälfte (65 %) gleichzeitig GABAerg, dies trifft insbesondere für das Stratum oriens und Stratum pyramidale zu (Abbildung 25D). Im Stratum moleculare ist der Anteil mit rund 21 % weitaus niedriger, obwohl GABAerge Zellen hier häufiger vertreten sind als im Stratum oriens (vgl. Abbildung 6).

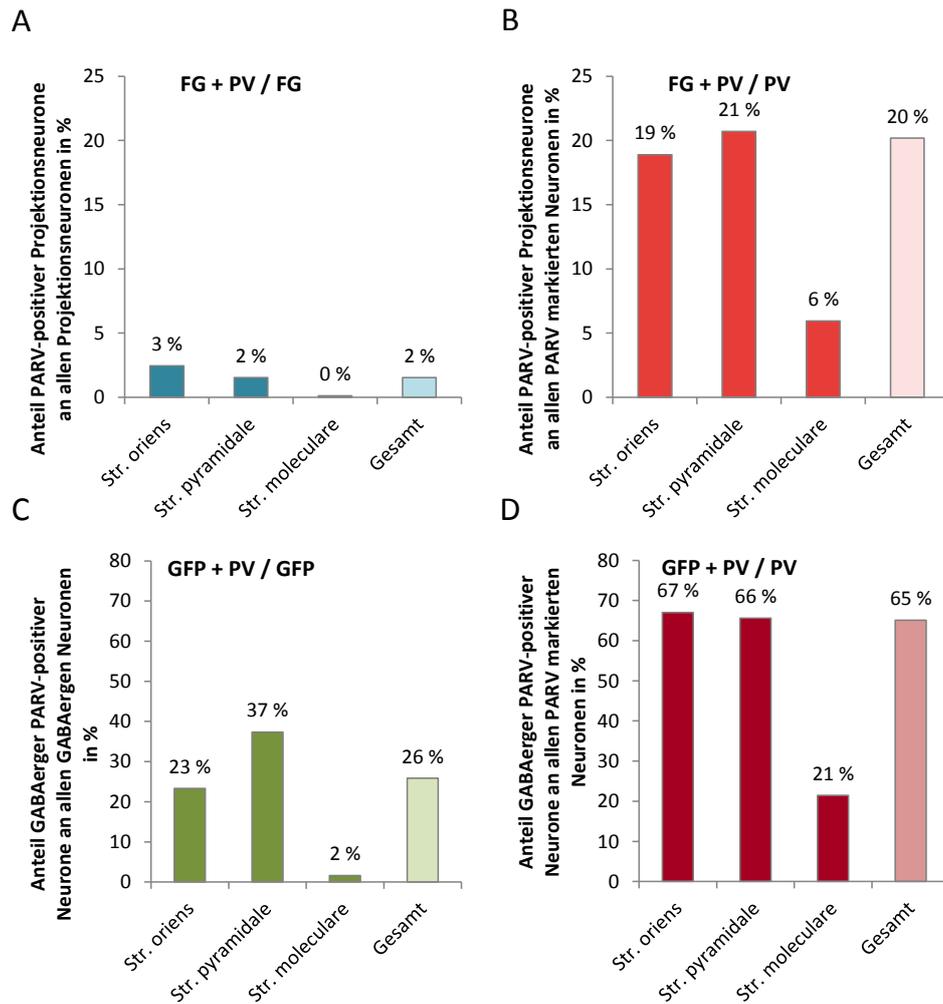


Abbildung 25 PARV-Doppelmarkierungen: FG + PV, GFP + PV

Dargestellt sind die MW in % von n=7 Serien, 21 Schnitte. **A** zeigt PARV-positive Projektionsneurone im Verhältnis zu allen Projektionsneuronen. **B** zeigt PARV-positive Projektionsneurone in Relation zu allen PARV-markierten Neuronen. **C** zeigt das Verhältnis der GABAergen Neurone, die PARV exprimieren, zu allen GABAergen Neuronen. **D** stellt die GABAergen Neurone, die PARV exprimieren, im Verhältnis zu allen PARV-positiven Neuronen dar.

3.3.2 NPY-Doppelmarkierungen: FG + NPY, GFP + NPY

NPY-positive Projektionsneurone machen nur einen Anteil von ca. 1 % an allen Projektionsneuronen aus (Abbildung 26A). Auch hier ist dieser geringe Anteil bei der Masse an Projektionsneuronen nicht überraschend. Von den NPY-markierten Neuronen projizieren rund ein Viertel in die Amygdala (Abbildung 26B). Die Mehrheit davon (30 %) befindet sich im Stratum pyramidale, gefolgt vom Stratum oriens (22 %) und schließlich dem Stratum moleculare (13 %). Diese Verteilung ähnelt derjenigen der PARV-positiven Projektionsneurone, allerdings sind NPY-markierte Projektionsneurone etwas häufiger im Stratum moleculare lokalisiert.

5 % der GABAergen Neurone exprimieren NPY, das Maximum liegt mit 14 % im Stratum oriens. Im Stratum pyramidale sind 7 % der GABAergen Neurone positiv für NPY und im Stratum moleculare 2 % (Abbildung 26C). Von allen NPY-exprimierenden Neuronen sind 37 % auch GABAerg, dabei weisen das Stratum oriens und Stratum moleculare mit jeweils 45 % den größten Anteil auf. Aber auch im Stratum pyramidale ist der Anteil mit 37 % recht hoch (Abbildung 26D). Dieser verhältnismäßig gleiche Anteil der GABAergen Neurone an allen NPY-markierten Neuronen über alle drei Schichten des Hippocampus unterscheidet sich von den PARV-exprimierenden Neuronen, die hauptsächlich im Stratum oriens und Stratum pyramidale gleichzeitig GABAerg sind (Abbildung 25D).

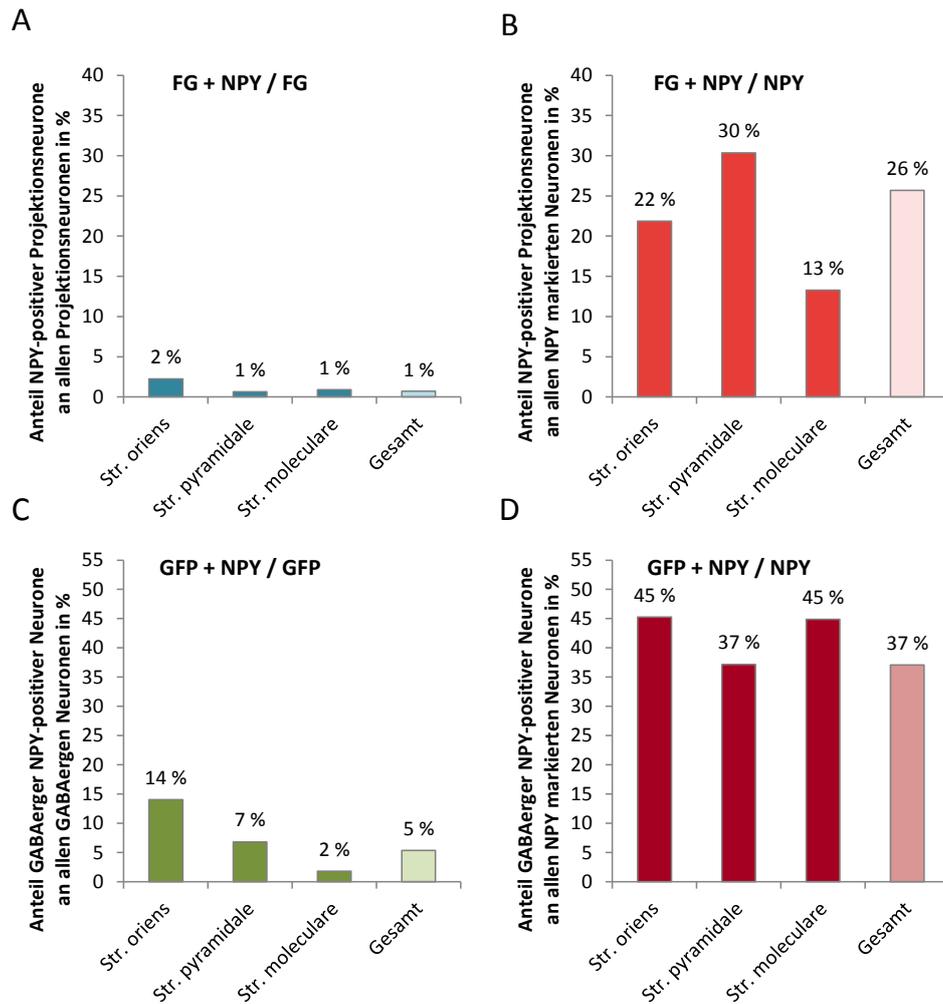


Abbildung 26 NPY-Doppelmarkierungen: FG + NPY, GFP + NPY

Dargestellt sind die MW in % von $n=7$ Serien, 18 Schnitte. **A** zeigt NPY-positive Projektionsneurone im Verhältnis zu allen Projektionsneuronen. **B** zeigt NPY-positive Projektionsneurone in Relation zu allen NPY-markierten Neuronen. **C** zeigt das Verhältnis der GABAergen Neurone, die NPY exprimieren, zu allen GABAergen Neuronen. **D** stellt die GABAergen Neurone, die NPY exprimieren, im Verhältnis zu allen NPY-positiven Neuronen dar.

3.3.3 CCK-Doppelmarkierungen: FG + CCK, GFP + CCK

CCK-positive Projektionsneurone haben wie die PARV- und NPY-positiven Projektionsneurone nur einen sehr geringen Anteil an den Projektionsneuronen (1 %) (Abbildung 27A). Allerdings weisen sie mit 10 % im Stratum oriens von den drei untersuchten Peptiden den größten Anteil an den Projektionsneuronen in dieser Schicht auf (Abbildung 27A). Von allen CCK-markierten Neuronen projizieren 34 % in die Amygdala, damit weisen sie einen höheren Anteil als PARV- und NPY-markierte Neurone auf (Abbildung 27B). Die meisten projizierenden CCK-positiven Neurone sind mit 43 % im Stratum oriens lokalisiert.

Von den GABAergen Zellen exprimieren nur 4 % CCK, damit wird CCK am seltensten von den drei untersuchten Peptiden synthetisiert (Abbildung 27C). Am häufigsten sind CCK-positive GABAerge Neurone wie bei NPY im Stratum oriens zu finden (Abbildung 27C). Mehr als zwei Drittel (71 %) der CCK-markierten Neurone sind gleichzeitig GABAerg (Abbildung 27D). Dabei zeigt sich annähernd eine homogene Verteilung über die drei Schichten des Hippocampus (75 % Str. oriens, 67 % Str. pyramidale, 74 % Str. moleculare) ähnlich wie bei den NPY-positiven GABAergen Neuronen (Abbildung 26D), jedoch mit einem etwas höheren Prozentsatz in den einzelnen Schichten.

In Zusammenschau der Daten zeigt sich, dass alle drei untersuchten Peptide einen sehr geringen Anteil an den Projektionsneuronen haben. Dagegen haben die PARV-, NPY- und CCK-positiven Neurone, die in die Amygdala projizieren, mit 20 % bis 34 % (vgl. Abbildung 25B, 26B, 27B) einen nennenswerten Anteil an projizierenden Neuronen. PARV wird im Vergleich zu NPY und CCK am häufigsten in GABAergen Neuronen synthetisiert. Betrachtet man hingegen, welche Peptid-positiven Neurone am häufigsten gleichzeitig GABAerg sind, weisen CCK-markierte Neurone mit 71 % den größten Anteil auf (Abbildung 27D).

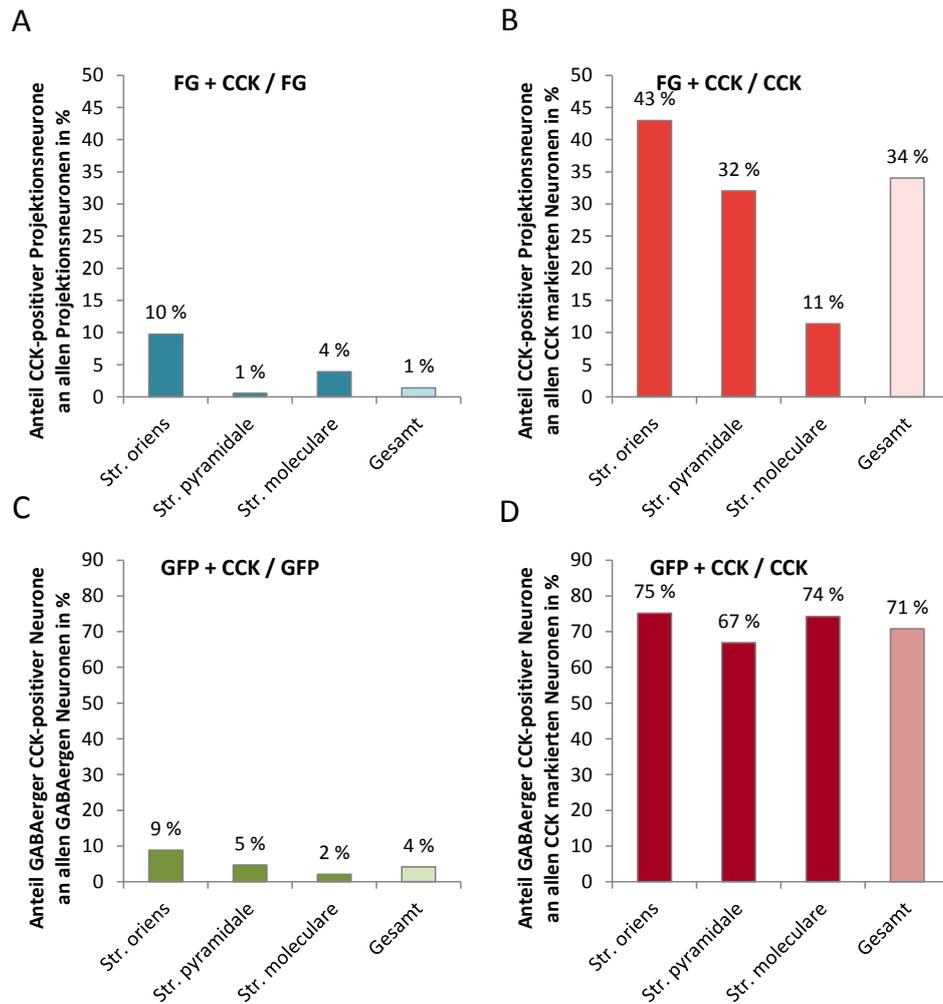


Abbildung 27 CCK-Doppelmarkierungen: FG + CCK, GFP + CCK

Dargestellt sind die MW in % von n=2 Serien, 6 Schnitte. **A** zeigt CCK-positive Projektionsneurone im Verhältnis zu allen Projektionsneuronen. **B** zeigt CCK-positive Projektionsneurone in Relation zu allen CCK-markierten Neuronen. **C** zeigt das Verhältnis der GABAergen Neurone, die CCK exprimieren, zu allen GABAergen Neuronen. **D** stellt die GABAergen Neurone, die CCK exprimieren, im Verhältnis zu allen CCK-positiven Neuronen dar.

4 Diskussion

Die Bedeutung GABAerger Interneurone als Taktgeber im zentralen Nervensystem und Modulator lokaler neuronaler Netzwerke ist allgemein bekannt. Speziell im Hippocampus ist ihre Aktivität essentiell für Gedächtnisbildung und Entstehung rhythmischer Oszillationen (Buzsaki und Chrobak 1995; Chamberland und Topolnik 2012). In den letzten Jahrzehnten konnte gezeigt werden, dass GABAerge Neurone jedoch nicht nur lokal, sondern auch als lange Projektionsneurone agieren, das heißt als Neurone, die in andere Hirnstrukturen projizieren. Chronister et al. zeigten bereits 1979, dass GABAerge Neurone, die bis dato nur als Interneurone betrachtet wurden, vom Hippocampus ins Septum projizieren (Chronister und DeFrance 1979). Es folgten zahlreiche weitere Arbeiten, die dies bestätigten (Alonso und Köhler 1982; Freund und Buzsaki 1996). Darüber hinaus konnte auch in anderen Hirnregionen eine Beteiligung GABAerger Neurone an langen Projektionen gezeigt werden. Dazu zählen unter anderem Projektionen vom Hippocampus zum entorhinalen Cortex (Melzer et al. 2012), zum kontralateralen Hippocampus (Schwerdtfeger und Buhl 1986; Jinno 2009) oder innerhalb des Neocortex (Higo et al. 2009; Tamamaki und Tomioka 2010). Auch wenn ihr Anteil an distalen Projektionen verglichen mit den exzitatorischen Projektionen eher gering ist (Müller et al. 2012), scheinen sie doch von fundamentaler Bedeutung für den Informationsfluss zwischen verschiedenen Hirnarealen zu sein. Auf ihre mögliche Funktion soll in einem späteren Abschnitt expliziter eingegangen werden (siehe 4.6.1).

Die vorliegende Arbeit diene der weiteren Charakterisierung der von Müller et al. 2012 beschriebenen GABAergen Projektion vom Hippocampus in die Amygdala. Die Existenz von glutamatergen Projektionen zwischen Hippocampus und Amygdala ist vielfach beschrieben worden und von elementarer Bedeutung für die Generierung und Konsolidierung von emotionalen Gedächtnisinhalten (Saunders et al. 1988; van Groen und Wyss 1990; McDonald 1998; LeDoux 2000). Über hippocampo-amygdaläre GABAerge Projektionen ist hingegen weitaus weniger bekannt. Zur Identifizierung und biochemischen Charakterisierung jener wurden GAD67-GFP knock-in Mäuse verwendet, denen der retrograde Tracer FG in die Amygdala injiziert wurde. Hierdurch war es möglich, die Projektionsneurone des Hippocampus zu detektieren. Nachfolgende immunhistochemische Färbungen dienten der Beurteilung, ob außer GABA das Calcium-bindende Protein PARV oder die Neuropeptide NPY bzw. CCK in den Neuronen exprimiert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass 19 % der GABAergen Neurone von der CA1-Region und dem angrenzenden Subiculum in die Amygdala projizieren. Die meisten langen GABAergen Projektionen erfolgen aus dem Stratum oriens und Stratum pyramidale. Dabei wird von über 30 % der GABAergen hippocampo-amygdalären Projektionsneurone PARV exprimiert, wenngleich auch NPY und CCK mit 15 % und 12 %

einen nennenswerten Anteil aufweisen. Von allen projizierenden Neuronen des Hippocampus in die Amygdala beträgt der Anteil GABAerger Neurone nur 4 %, wobei hier der größte Anteil im Stratum oriens zu verzeichnen ist.

4.1 Auswertung

Bevor die Zellzählung durchgeführt wurde, mussten die Schichten des Hippocampus in die Fotokollage der ROI eingezeichnet werden. Die obere Grenze war eine virtuelle Linie, die durch den Sulcus perirhinalis gezogen wurde. Einzeichnung und Unterscheidung der drei Schichten, Str. oriens, Str. pyramidale, Str. moleculare, erfolgten anhand der Zellarchitektur und -dichte. Die Neurone wurden anschließend entsprechend der eingezeichneten Grenzen einer Hippocampusschicht zugeordnet. Da alle weiteren Analysen bezogen auf die jeweilige Hippocampusschicht durchgeführt wurden, war es von besonderer Bedeutung, die Schichten so exakt wie möglich einzuzichnen. Die Abgrenzung zwischen Str. pyramidale und Str. moleculare war ebenso gut zu erkennen wie die mediale Grenze des Str. moleculare, die durch Gefäßquerschnitte markiert war. Schwieriger gestaltete sich hingegen die Abgrenzung zwischen Str. oriens und Str. pyramidale. Daher wurde für jeden Filtersatz kontrolliert, ob die eingezeichneten Schichten zutreffen und die Fotoebenen identisch übereinander liegen, um kleinste Verschiebungen zu vermeiden und eine genaue Schichteneinzeichnung zu gewährleisten.

Die Zählung der Neurone erfolgte anschließend manuell anhand der erstellten Kollagen aus den Mikroskopierbildern. Als Neuron wurden jene Strukturen gezählt, die eindeutig ein Perikaryon aufwiesen und hinreichend markiert waren, um sich vom Hintergrund abzugrenzen. Diese Bedingungen erfüllte die Mehrheit der Neurone. Jedoch existierten auch vereinzelt Markierungen, die weniger eindeutig waren. Hierbei konnte es sich zum einen um Artefakte handeln oder um markierte, (schräg) angeschnittene Axone. Konnte auch bei genauerer Betrachtung nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden, dass es sich um eine nichtneuronale Markierung handelt, wurde die entsprechende Struktur nicht als Neuron gezählt. Dadurch kann es vereinzelt zu einer Unterschätzung der Neuronenzahl gekommen sein. Die GABA-exprimierenden Neurone wiesen größtenteils eine homogene GFP-Markierung auf. Obwohl die GFP-Expression nicht immer von gleicher Intensität war, konnten GABAerge Neurone gut identifiziert werden. Die Projektionsneurone waren meist in großer Zahl und kompakten Zellverbänden vorhanden, was zum Teil eine Differenzierung zwischen den Neuronen erschwerte. Hier kann es bei sehr dicht gepackten Zellverbänden zu einer Unterschätzung der Neuronenzahl gekommen sein. Hinzu kommt, dass FG axonal in Vesikeln ins Zielgebiet transportiert wird und sich sowohl im Perikaryon als auch in Dendriten anreichert (Schmued und Fallon 1986), wodurch nicht nur Zellkörper, sondern auch

Zellfortsätze markiert wurden. Allerdings war eine Differenzierung zwischen Zellsoma und -fortsatz meist gut möglich. Die Detektion der Peptid-exprimierenden Neurone unterlag den gleichen oben genannten Kriterien und war unter Anwendung etablierter Färbeprotokolle gut möglich. Insgesamt ist die Zellzählung in gewissem Umfang vom Untersucher abhängig, obgleich andere Personen der Arbeitsgruppe Neuroanatomie des Instituts für Anatomie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg zu ähnlichen Ergebnissen gekommen sind (Lübke, Eberhardt et al. 2015). Die vorliegende Arbeit ermöglicht vor allem eine qualitative Analyse der GABAergen hippocampo-amygdalären Projektionsneurone. Die Erhebung der prozentualen Anteile nutzt die erfassten Daten und gibt einen Eindruck, um welche Größenrelationen es sich dabei handelt. Daher wird der Begriff einer semiquantitativen Analyse dieser Studie am ehesten gerecht.

Um möglichst viele Projektionsneurone zu markieren, wurde ein verhältnismäßig großes Injektionsvolumen gewählt. Zur Durchführung der Korrelationsanalyse von Diffusionsvolumen und Projektionsneuronen musste zunächst das Diffusionsvolumen näherungsweise bestimmt werden. Gemäß der Annahme, dass das Volumen das Produkt aus Grundfläche und Höhe ist, wurden die fünf größten Diffusionsflächen gemessen und mit dem Abstand der Schnitte (= Höhe) multipliziert. Diese vereinfachte Herangehensweise ermöglichte ein Abschätzen des Volumens und zeigte keine Abhängigkeit zwischen Diffusionsvolumen und Anzahl der Projektionsneurone. Allerdings ist es durch diese Art der Berechnung nicht möglich, das Diffusionsvolumen in seiner Gesamtheit zu erfassen, da der Tracer auch über die fünf Schnitte hinaus diffundiert ist. Ob eine gesamte Erfassung des Diffusionsvolumens das Ergebnis der Korrelationsanalyse maßgeblich beeinflussen würde, bleibt offen. Allerdings scheint dies unwahrscheinlich, da der größte Teil des Diffusionsvolumens mit der angewandten Formel erfasst wird.

Zur Ermittlung der prozentualen Anteile wurden in dieser Arbeit zunächst alle Werte je Schnitt in Prozent berechnet und anschließend je Serie gemittelt. Diese Vorgehensweise unterscheidet sich von jener in der Publikation (Lübke, Eberhardt et al. 2015), wo zunächst die Mittelwerte je Serie ermittelt wurden und anschließend der prozentuale Anteil berechnet wurde. Die Ergebnisse unterscheiden sich hierdurch nur marginal und die Rechenweise hat keinen Einfluss auf die biologische Aussage der Resultate. Die Daten der Publikation sind das Ergebnis einer Kooperation von zwei Hauptuntersuchern. Zunächst wurde von einer konsistenten Datenlage ausgegangen, sodass die in der Publikation gewählte Rechenweise angewendet wurde. Betrachtet man jedoch nur einen Teil der Daten, nämlich jenen, der in dieser Arbeit vorgestellt wurde, zeigen sich zum Teil große Unterschiede zwischen den einzelnen Schnitten einer Serie (z. B. bei Versuchstier 222). Um dieser Tatsache gerecht zu werden und alle ausgewerteten Tiere in die Ergebnisse mit einfließen zu lassen,

wurden die Werte einer Serie erst nach Ermittlung des prozentualen Anteils je Schnitt gemittelt. Weiterhin wurden die Daten durchgehend je Serie betrachtet und nicht je Injektion bzw. Versuchstier. Denn zum einen wurden die Serien einer Injektion nicht immer zum gleichen Zeitpunkt ausgewertet, weil dies zu einer Verzerrung der Ergebnisse führen könnte. Zum anderen ist die Auswertung je Serie bei der Betrachtung aller Teilaspekte möglich, wohingegen eine Betrachtung je Injektion nicht für alle Betrachtungsweisen möglich ist. Bei den Dreifachmarkierungen (FG + GFP + Peptid) wurde auf die Darstellung der Varianzen verzichtet, da es sich um sehr kleine Anteile handelt und häufiger der Wert „Null“ auftritt. Kleinste Abweichungen wirken sich hier extrem auf die Varianzen aus und erlauben keine vernünftige Interpretation der Verteilungen. Kam es bei den Anteilsberechnungen zur Division mit „Null“, führte dies formal zu Fehlwerten im Statistikprogramm. Hier erfolgte die inhaltliche Interpretation, dass es keinen Anteil gibt bzw. der Anteil 0 % beträgt.

4.2 GABAerge Neurone im ventralen Hippocampus und angrenzendem Subiculum

Zur Detektion der GABAergen Neurone wurden GAD67-GFP knock-in Mäuse verwendet, die heterozygot für die Insertion des GFP im Gen der 67 kD Isoform der Glutamatdecarboxylase (GAD) waren. Dadurch war es möglich, GABA-exprimierende Neurone mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie ohne zusätzliche Arbeitsschritte zu detektieren, was außerdem die Kombination mit anderen Methoden erlaubte. Es zeigte sich eine homogene Verteilung der GABAergen Neurone zwischen den Schichten des Hippocampus. Jedoch stellt sich die Frage, ob der Gehalt an GABA durch den Genknock-in in irgendeiner Weise verändert wurde. Tamamaki et al. konnten zeigen, dass sich der GABA-Gehalt in GAD67-GFP knock-in Mäusen und Wildtyp-Mäusen nicht signifikant unterscheidet, obgleich er bei den genveränderten Tieren zum Teil geringfügig niedriger ist. Mit Hilfe von In-situ-Hybridisierung bestätigten sie außerdem, dass nahezu alle GAD67-exprimierenden Neurone GFP exprimieren. Ferner zeigten die knock-in Mäuse keine Auffälligkeiten hinsichtlich des Größenwachstums, des reproduktiven Verhaltens und der makroskopischen Hirnarchitektur (Tamamaki et al. 2003). Allerdings existieren Hinweise, dass eine heterozygote Deletion des GAD67-Gens die Stressvulnerabilität erhöht (Uchida et al. 2011). Da die Versuchstiere weder exogenem Stress noch anderen Versuchsexperimenten ausgesetzt waren, sollte dieser Punkt vernachlässigbar sein. Die Intensität der emittierten Fluoreszenz ist abhängig von der GFP-Akkumulation im Soma und unterliegt Schwankungen, die der biologischen Varianz geschuldet sind (Tamamaki et al. 2003). So könnten GABAerge Neurone, bei denen GFP nur in geringem Maße exprimiert wurde, als vermeintlich nicht GABAerg gezählt worden sein. Somit besteht die Möglichkeit eines zu niedrig quantifizierten GABAergen Anteils. Des Weiteren stellt sich die Frage, ob die alleinige Markierung der GAD67-Expression zur Detektion GABAerger Neurone ausreichend ist, da die GAD65-Isoform nicht

miterfasst wurde. Für eine ausreichende Markierung GABAerger Zellen spricht zum einen, dass GAD67 im Vergleich zu GAD65 hauptsächlich zytosolisch lokalisiert ist, wohingegen GAD65 vornehmlich axonal exprimiert wird (Erlander und Tobin 1991). Zur Detektion der GABAergen Neurone ist es wichtig, dass das Perikaryon eindeutig erkennbar und markiert ist. Diese Bedingung wird durch die physiologische Verteilung von GAD67 besser erfüllt als durch GAD65. Zum anderen konnten Asada et al. zeigen, dass eine homozygote Deletion von GAD65 zu keiner Veränderung des GABA-Gehalts führt und somit die GABA-Synthese durch GAD67 komplett aufrechterhalten werden kann (Asada et al. 1996). Darüber hinaus zeigten Stone et al. beim Rattenhippocampus, dass einige Interneurone der CA-Region vorrangig GAD67 exprimieren. Dementsprechend scheint die Erfassung der GAD67-Expression hinreichend für die Registrierung GABAerger Neurone zu sein. Indes sollte nicht unerwähnt bleiben, dass die meisten GABAergen Neurone trotz alledem beide Isoformen exprimieren (Stone et al. 1999).

4.3 Projektionsneurone im ventralen Hippocampus und angrenzendem Subiculum

Zur Identifikation der hippocampo-amygdalären Projektionsneurone erfolgten FG-Injektionen in die Amygdala, die zu einer retrograden Markierung von Neuronen im ventralen Hippocampus, im perirhinalen Cortex, in der amygdalo-piriformen Übergangszone, im paralaminaren Thalamus und im angrenzenden Corpus geniculatum mediale führten, wohingegen in der CA3-Region und dem Gyrus dentatus des ventralen Hippocampus sowie im dorsalen Hippocampus keine retrograde Markierung zu beobachten war. Auch in der kontralateralen Hemisphäre waren keine Markierungen zu erkennen. Daher wurden zur effektiveren Materialausschöpfung im Verlauf nicht nur einseitige Injektionen, sondern auch doppelseitige Injektionen durchgeführt. Die meisten Projektionsneurone wurden erwartungsgemäß im Str. pyramidale (89 %) detektiert, wohingegen das Str. oriens und Str. moleculare mit einem Anteil von jeweils 5 % einen nur geringen Anteil aufwiesen.

Die Verwendung von FG als retrograder Tracer ist den zahlreichen positiven Eigenschaften dieses Tracers geschuldet. Dazu zählen seine intensiv golden fluoreszierenden Eigenschaften, die verhältnismäßig lange andauern (Schmued und Fallon 1986) und somit eine gute Zellmarkierung und -detektion ermöglichen. Um die Emissionsfarbe von FG eindeutig von GFP abzugrenzen, erfolgte die Anwendung eines Filters, der den Grünanteil herausfiltert und FG blau erscheinen lässt (vgl. Abbildung 19). Darüber hinaus erfolgt keine FG Diffusion von markierten Zellen in umliegende Areale und der Tracer wird nicht von unbeschädigten, benachbarten Fasern aufgenommen (Schmued und Fallon 1986), was die Wahrscheinlichkeit der Markierung nicht projizierender Neurone minimal erscheinen lässt. Ferner ist er kommerziell gut verfügbar und mit anderen neurohistochemischen Techniken problemlos kombinierbar (Schmued und Fallon 1986).

Zur Ermittlung der Koordinaten der Injektionsstelle wurde der Mäusehirn-Atlas von Franklin und Paxinos (Franklin und Paxinos 2007) verwendet. Die hirmorphologischen Ausgangspunkte zur Einstellung der Koordinaten waren das Bregma, die Sutura sagittalis und die Hirnoberfläche der Tiere. Da jedes Tier interindividuelle morphologische Unterschiede aufwies, war es nicht möglich, absolut identische Injektionen zu reproduzieren. Hinzu kommt, dass die individuell durchgeführten druckkontrollierten Tracerinjektionen in Größe und Lokalisation von Tier zu Tier leicht variierten und auch die axonale Aufnahme des Tracers Schwankungen unterliegt, wodurch die Neurone unterschiedlich stark markiert wurden. Diese Schwankungen resultieren aus den ungleichen Zugangsmöglichkeiten der Axone zum Tracerdepot. Um trotzdem den Anteil GABAerger Projektionen von der ventralen CA1-Region und dem angrenzenden Subiculum in die Amygdala abschätzen zu können, erfolgten großflächige Injektionen, welche die gesamte Amygdala ausfüllten. Dies wirft allerdings folgende Fragen auf:

1. Führen die großflächigen Injektionen zu einer Markierung GABAerger Projektionsneurone des Hippocampus, die nicht in die Amygdala projizieren?
2. Existiert ein topographischer Zusammenhang zwischen der Lokalisation der Tracerinjektionsstelle und der Anzahl der markierten Projektionsneurone im Hippocampus?

Zu 1.: Aufgrund der verhältnismäßig großflächigen Tracerinjektionen (50 nl) kam es zu einer unvermeidlichen FG-Markierung darüber liegender striataler und corticaler Areale, die möglicherweise auch GABAerge Projektionen vom Hippocampus erhalten. Cenquizca und Swanson wiesen eine corticale Projektion der CA1-Region in gustatorische, visuelle, auditorische, olfaktorische, viszerale und somatosensorische Areale nach (Cenquizca und Swanson 2007). Mit Hilfe von kleineren, iontophoretischen Injektionen zum einen in das Striatum, zum anderen in die über der Zielinjektionsstelle (Amygdala) liegende Cortexregion wurde gezeigt, dass es zu keiner retrograden Markierung von Neuronen im ventralen Hippocampus kommt (Lübke mann, Eberhardt et al. 2015). Diese Beobachtung wird durch anterograde Tracingstudien bestätigt (van Groen und Wyss 1990; Kishi et al. 2006; Müller et al. 2012). Daraus kann geschlossen werden, dass die mit der Injektionsnadel penetrierten corticalen Anteile (hauptsächlich primär somatosensorischer Cortex) sich von denen, die Projektionen vom Hippocampus erhalten, unterscheiden und eine Markierung der über der Amygdala liegenden striatalen und corticalen Areale nicht zu einer kritischen Veränderung der Projektionsneuronenzahl führt. Außer der Markierung von über der Amygdala liegenden Hirnarealen besteht auch die Möglichkeit der Tracerdiffusion in umliegende Gebiete. Hier ist der sich lateral von der Amygdala befindende piriforme Cortex von besonderer Bedeutung, da er nachweislich wesentliche Projektionen vom ventralen Hippocampus empfängt (Cenquizca und

Swanson 2007). Eine Markierung dieses Areal mit FG wurde bei allen druckkontrollierten Injektionen vermieden. Darüber hinaus wurden Injektionen, bei denen es zur Verletzung des medial von der Amygdala gelegenen Fornix kam, generell von der Analyse ausgeschlossen. Folglich konnte durch Ausschluss von Fehlinjektionen und iontophoretische Kontrolle von zwangsläufig markierten Hirnarealen eine Markierung von nicht in die Amygdala projizierenden GABAergen Neuronen weitestgehend ausgeschlossen werden.

Zu 2.: Um den topographischen Zusammenhang zwischen der Lokalisation der Tracerinjektionsstelle und der Anzahl der markierten Projektionsneurone im Hippocampus zu untersuchen, erfolgten iontophoretische Injektionen in gezielte Kernstrukturen der Amygdala. Diese führten zu einer sehr viel kleineren Anzahl von markierten Neuronen im Hippocampus als die druckkontrollierten Tracerinjektionen, obgleich das Verteilungsmuster der markierten Neurone identisch zu den druckkontrollierten Injektionen war (Lübke mann, Eberhardt et al. 2015). Hier bestätigte sich, dass die Anzahl der markierten Projektionsneurone im Hippocampus stark vom Ort der Injektion innerhalb der Amygdala, das heißt vom Kerngebiet der Amygdala, beeinflusst wurde. So führten iontophoretische Injektionen in den zentralen, medialen und ventralen Anteil des basolateralen Amygdalakerns beispielsweise zur Markierung von 42 bis 195 Neuronen, von denen keines oder maximal vier doppelmarkiert waren, das heißt GABA exprimierten (Lübke mann, Eberhardt et al. 2015). Diese geringe Anzahl wurde für eine quantitative Einschätzung der GABAergen Projektionsneurone als nicht ausreichend erachtet, weshalb letztendlich druckkontrollierte Tracerinjektionen durchgeführt wurden. Dennoch blieb die Frage, ob die verhältnismäßig großen druckkontrollierten Injektionen, die mehr oder weniger die gesamte Amygdala erreichten, die Anzahl der Projektionsneurone im Hippocampus kritisch beeinflussten. Daher wurde eine Korrelationsanalyse des Diffusionsvolumens pro Injektion zum Mittelwert aller Projektionsneurone je Injektion nach Spearman durchgeführt. Hier zeigte sich interessanterweise, dass das Injektionsvolumen und die Anzahl retrograd markierter Projektionsneurone nicht miteinander korrelieren. Insgesamt lässt sich sagen, dass die großen Injektionen und die dadurch bedingte Markierung von um- oder überliegenden Strukturen, die Erkenntnisse über die hippocampo-amygdalären Projektionsneurone nicht verfälschen bzw. numerisch verzerren.

4.4 Peptid-exprimierende Neurone im ventralen Hippocampus und angrenzendem Subiculum

Die immunzytochemischen Färbungen dienten der weiteren Einteilung der GABAergen Projektionsneurone in Subpopulationen, die durch die Expression von Calcium-bindenden Proteinen oder Neuropeptiden gekennzeichnet sind. In dieser Arbeit wurde die Expression von PARV, NPY und

CCK untersucht. Darüber hinaus erfolgten am Institut für Anatomie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg Untersuchungen, ob außerdem Somatostatin, Calbindin oder Calretinin in GABAergen Projektionsneuronen nachweisbar sind (Lübke, Eberhardt et al. 2015). Allen Peptiden gemeinsam ist die Tatsache, dass sie am häufigsten von Neuronen exprimiert werden, die sich im Str. pyramidale befinden. PARV ist kaum im Str. moleculare zu finden, wohingegen NPY und CCK auch in dieser Schicht exprimiert werden (vgl. Abbildung 12). Zur Darstellung der Peptid-exprimierenden Neurone wurde Cy3-konjugiertes Streptavidin als Fluochrom verwendet. Aufgrund der unterschiedlichen Emissionswellenlängen von Cy3, FG und GFP konnten diese drei Marker in einem Schnitt gleichzeitig ausgewertet werden. Ein Nachteil der Fluoreszenzmethode ist allerdings das verhältnismäßig schnelle Ausbleichen (sog. fading) der Fluoreszenz, was ein zeitnahes Mikroskopieren und Auswerten der Schnitte erforderlich macht.

4.5 GABAerge Neurone und ihre Subpopulationen

GABAerge Neurone können mit Hilfe ihres Gehalts an Calcium-bindenden Proteinen bzw. Neuropeptiden weiter klassifiziert werden (Freund und Buzsaki 1996). 26 % der GABAergen Neurone des ventralen Hippocampus und des angrenzenden Subiculus exprimierten PARV, hierbei zeigte sich der größte Anteil mit 37 % im Str. pyramidale, gefolgt vom Str. oriens mit 23 %. Im Str. moleculare wiesen nur 2 % der GABAergen Neurone eine PARV-Expression auf (vgl. Abbildung 25). Die erhobenen Daten decken sich mit den Erkenntnissen von Kosaka et al., die bei 20 % der GABAergen Neurone im Hippocampus von Ratten eine PARV-Expression registrierten. Im Str. pyramidale stellten sie eine 40 bis 50 %ige PARV-Expression der GABAergen Neurone fest. Im Str. oriens betrug diese 20 bis 30 % und im Str. moleculare ebenfalls nur 1 bis 4 % (Kosaka et al. 1987). Obwohl es sich bei Kosaka um Untersuchungen an Ratten handelt, erweisen sich die Anteile der PARV-exprimierenden GABAergen Neurone als durchaus konsistent. Hingegen zeigt sich ein Unterschied, wenn man den Anteil der GABA-exprimierenden Neurone an den PARV-positiven Neuronen betrachtet. Waren bei Kosaka et al. nahezu alle PARV-exprimierenden Neurone GABAerg (Kosaka et al. 1987), wiesen in der vorliegenden Arbeit nur 65 % der PARV-exprimierenden Neurone eine GABA-Synthese auf. Diese Diskrepanz kann durch eine zu schwache bzw. ungleich starke GFP-Expression bedingt sein, die konsekutiv zu einer verminderten Registrierung GABAerger Neurone führte. Infolgedessen wurden weniger Doppelmarkierungen (GABA + PARV) registriert, was einen geringeren Anteil GABAerger Neurone an PARV-exprimierenden Neuronen zur Folge hatte. Weiterhin kann der Prozess der Immunfärbung zu einem Verblässen des GFP-Signals geführt haben, was ebenfalls eine Unterschätzung der GABAergen Population zur Folge hätte. Allerdings ist dies eher unwahrscheinlich, da bei einem mikroskopischen Vergleich von Hirnschnitten bezüglich ihres GFP-

Signals vor und nach immunzytochemischer Färbung subjektiv kein Unterschied der GFP-Intensität ersichtlich war. Dafür, dass die Ursache der Diskrepanz eher in der verminderten Detektion der GABAergen Neurone begründet liegt, sprechen die übereinstimmenden Daten bezogen auf die GABAerge Population. Denn wenn Neurone als GABAerg detektiert wurden, wiesen sie einen ähnlich hohen PARV-Anteil auf wie ihn auch Kosaka et al. beschrieben. Eine andere Möglichkeit wäre, dass PARV nicht nur in GABAergen Neuronen synthetisiert wird, sondern auch in glutamatergen Neuronen. Für diese Behauptung existieren jedoch keinerlei Daten. Ganz im Gegenteil, diese Hypothese wird durch Erkenntnisse von Kosaka et al. und Nitsch et al. widerlegt, denn PARV wurde bislang noch nie in Pyramiden- oder Körnerzellen nachgewiesen (Kosaka et al. 1987; Nitsch et al. 1990) und auch die morphologische Struktur PARV-exprimierender Neurone ist identisch mit derjenigen der GABAergen Neurone (Kosaka et al. 1987; Nitsch et al. 1990).

Über den Anteil NPY-exprimierender GABAerger Neurone liegen weitaus weniger Daten vor. In dieser Studie war bei 5 % der GABAergen Neurone eine NPY-Expression nachweisbar, wobei der größte Anteil mit 14 % im Str. oriens lag, gefolgt vom Str. pyramidale mit 7 % und Str. moleculare mit 2 %. Ähnlich wie bei PARV ist der Anteil der GABAergen Neurone an der NPY-Neuronenpopulation mit 37 % höher als der NPY-Anteil an der GABAergen Gesamtpopulation (5 %). Dabei exprimieren jeweils 45 % der NPY-positiven Neurone des Str. oriens und des Str. moleculare GABA. Im Str. pyramidale beträgt die GABA-Synthese immerhin noch 37 % (vgl. Abbildung 26). Freund und Buzsaki beschrieben eine ähnliche Verteilung der NPY-exprimierenden Interneurone in der CA1-Region, allerdings ohne Angaben von genauen Prozentzahlen. Auch sie beobachteten, dass die Mehrheit der NPY-positiven Neurone sich im Str. oriens und Str. pyramidale befindet sowie ein geringerer Anteil im Str. radiatum zu finden ist (Freund und Buzsaki 1996).

Der prozentuale Anteil CCK-synthetisierender GABAerger Neurone ist mit 4 % ähnlich hoch wie der NPY-Anteil und weist eine nahezu identische Verteilung auf die Schichten des Hippocampus auf. Die meisten CCK-exprimierenden GABAergen Neurone befinden sich mit 9 % im Str. oriens. Im Str. pyramidale beträgt der Anteil 5 % und im Str. moleculare 2 %. Der GABAerge Anteil an der CCK-Neuronenpopulation ist mit 71 % noch höher als bei den PARV-exprimierenden Neuronen, wobei CCK-Neurone im Gegensatz zu PARV und NPY in allen drei Hippocampusschichten einen konstant hohen GABA-Anteil aufweisen (Str. oriens 75 %, Str. pyramidale 67 %, Str. moleculare 74 %). Diese Erkenntnis wird durch Daten von Kosaka et al. und Somogyi et al. bestätigt, nach denen fast alle CCK-Neurone GABAerg sind (Somogyi et al. 1984; Kosaka et al. 1985). Ungeachtet dessen, dass Kosaka et al. Ratten und Somogyi et al. Katzen als Versuchstiere verwendeten, sind die Ergebnisse konsistent und weitgehend speziesunabhängig. Untersuchungen von Freund und Buzsaki ergaben, dass 10 %

der GABAergen Neurone des Hippocampus CCK exprimieren und dies mit 12,5 % am häufigsten in der CA1-Region erfolgt (Freund und Buzsaki 1996). Der verglichen zu dieser Arbeit höhere Anteil CCK-exprimierender GABAerger Neurone bei Freund und Buzsaki kann zum einen in den bereits im Zusammenhang mit PARV diskutierten Fehlerquellen begründet sein. Zum anderen standen in der vorliegenden Studie zur Analyse von CCK nur zwei Versuchstiere zur Verfügung. Daher handelt es sich weniger um eine repräsentative Wiedergabe anatomischer Verhältnisse, sondern vielmehr um die Wiedergabe eines Status quo, der weiterer Verifizierung bedarf. Darüber hinaus gestaltete sich die Markierung CCK-exprimierender Neurone schwierig, sodass womöglich nicht alle CCK-exprimierenden Neurone mit dem durchgeführten immunhistochemischen Färbeprotokoll hinreichend markiert und gezählt wurden. Hierin begründet sich womöglich auch die differente Verteilung der CCK-exprimierenden GABAergen Neurone verglichen zu den Daten von Kosaka et al. Denn dort zeigte sich eine komplementäre Verteilung zu den NPY-synthetisierenden GABAergen Neuronen mit dem größten Anteil im Str. radiatum (15-20 %), gefolgt vom Str. pyramidale mit 10 % und rund 6 % im Str. oriens (Kosaka et al. 1985; Freund und Buzsaki 1996). Trotz der konträren Verteilung lässt sich auch hier eine laminare Abhängigkeit der Neuronenverteilung erkennen (Kosaka et al. 1985).

Zusammenfassend kann man sagen, dass PARV von den drei untersuchten Peptiden am häufigsten von GABAergen Neuronen der CA1-Region und des angrenzenden Subiculum synthetisiert wird. NPY und CCK stellen mit jeweils rund 5 % ebenfalls eine nicht zu vernachlässigende Subpopulation dar. Zusammen haben PARV, NPY und CCK einen Anteil von 35 % an der GABAergen Zellpopulation. Dabei bleibt allerdings unberücksichtigt, dass die Peptide möglicherweise in einer Zelle kolokalisiert sind. Untersuchungen auf eine Expression der Peptide im selben Neuron wurden in dieser Studie nicht durchgeführt, jedoch existieren Daten anderer Autoren, wonach gewisse Peptide gemeinsam exprimiert werden. Hinweise darauf existieren zum Beispiel für Somatostatin und NPY (Chan-Palay 1987; Freund und Buzsaki 1996). Kosaka et al. beschrieben zudem, dass einige PARV-exprimierende GABAerge Neurone auch Somatostatin synthetisieren (Kosaka et al. 1987). Bei Ratten konnte gezeigt werden, dass rund 10 % der CCK-Neurone auch vasoaktives Intestinalpeptid (VIP) synthetisieren bzw. CCK in 35 % der VIP-Neuronenpopulation zu finden ist. Demnach wird von rund 1 % der GABAergen Neurone sowohl CCK als auch VIP exprimiert (Kosaka et al. 1985). Eine Koexistenz von PARV und CCK (Kosaka et al. 1987) sowie CCK und Somatostatin (Somogyi et al. 1984) konnte hingegen nicht beobachtet werden. Inwiefern gewisse Kolokalisationen von Peptiden eigene Subpopulationen GABAerger Neurone darstellen, kann an dieser Stelle nicht abschließend geklärt werden. Die Möglichkeit etwaiger Konstellationen sollte indes nicht außer Acht gelassen werden.

4.6 GABAerge Projektionsneurone des Hippocampus

Die hippocampo-amygdalären GABAergen Projektionsneurone haben einen Anteil von 19 % an allen GABAergen Neuronen des Hippocampus und weisen einen Gesamtanteil von 4 % an allen hippocampalen Projektionsneuronen auf. Bezogen auf die GABAerge Population weisen sowohl das Str. oriens als auch das Str. pyramidale mit ca. 25 % einen hohen Anteil projizierender Neurone auf. Betrachtet man die Population der Projektionsneurone, erfolgen die meisten langen GABAergen Projektionen aus dem Str. oriens. Außer den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen GABAergen Projektionsneuronen sind wie bereits zuvor erwähnt weitere GABAerge Projektionen in andere Hirnstrukturen bekannt. Die beste Datenlage existiert zu den GABAergen Projektionen zwischen Septum und Hippocampus (Chronister und DeFrance 1979; Alonso und Köhler 1982; Freund und Antal 1988; Jinno und Kosaka 2002). Darüber hinaus konnten GABAerge Projektionen vom Hippocampus zum entorhinalen Cortex (Melzer et al. 2012), Retrosplenium (Jinno 2009) und zwischen den Hippocampusformationen (Schwerdtfeger und Buhl 1986; Zappone und Sloviter 2001; Jinno 2009) nachgewiesen werden. Es stellt sich die Frage, ob die in dieser Arbeit charakterisierten hippocampo-amygdalären GABAergen Projektionsneurone ein Teil der bereits identifizierten langen GABAergen Projektionsneurone des Hippocampus darstellen oder eine eigene Klasse bilden. Bei den GABAergen Projektionen zwischen Septum und Hippocampus handelt es sich um reziproke Projektionen, die sowohl im Ammonshorn als auch im Gyrus dentatus nachgewiesen wurden (Alonso und Köhler 1982; Freund und Antal 1988; Jinno und Kosaka 2002). Jinno und Kosaka registrierten bei der Maus die meisten GABAergen Projektionsneurone im Str. oriens der CA1- und CA3-Region, wiesen aber auch vereinzelt Projektionen ausgehend vom Str. radiatum, Str. lucidum und Str. pyramidale der CA3-Region sowie vom Hilus des Gyrus dentatus nach (Jinno und Kosaka 2002). Im Gegensatz zu den hippocampo-amygdalären Projektionsneuronen, welche nur in der CA1-Region und dem angrenzenden Subiculum nachweisbar waren, sind die hippocampo-septalen GABAergen Projektionsneurone in der gesamten Hippocampusformation zu finden. Indes bleibt festzuhalten, dass sich auch hier ein schichtenspezifisches Vorkommen der GABAergen Projektionsneurone hauptsächlich im Str. oriens zeigt. Darüber hinaus führten Jinno und Kosaka eine immunzytochemische Charakterisierung der hippocampo-septalen GABAergen Projektionsneurone der Maus durch, bei der sich ein außerordentlich hoher Anteil von Somatostatin-exprimierenden Neuronen mit 93 % zeigte. Zudem wurde in 38 % der GABAergen Projektionsneurone Calbindin und in 5,8 % PARV nachgewiesen, eine Calretinin-Expression wurde nicht festgestellt. Die PARV-Expression liegt damit weit unter jener der hippocampo-amygdalären Projektionsneurone (39,1 %) und auch die Somatostatin- (4,86 %) sowie Calbindin-Expression (5,13 %) unterscheiden sich von den im Institut für Anatomie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg erhobenen Daten

(Lübke, Eberhardt et al. 2015). Untersuchungen an Ratten zeigten, dass in 80 % der hippocampo-septalen GABAergen Projektionsneuronen Calbindin exprimiert wird und in 20 % eine NPY-Synthese erfolgt (Toth und Freund 1992). Für diese Diskrepanz verglichen zu Jinnos Daten gibt es keine offensichtliche Erklärung, doch könnten die Differenzen möglicherweise durch den Speziesunterschied und die unterschiedliche Verarbeitung der Gewebe bedingt sein (Jinno und Kosaka 2002). Der von Toth und Freund beschriebene 20 %ige NPY-Anteil an den GABAergen Projektionen deutet interessanterweise auf ein ähnliches NPY-Expressionsmuster der hippocampo-septalen und hippocampo-amygdalären (15 %) GABAergen Projektionsneurone hin. Untersuchungen zu kommissuralen GABAergen Projektionen zwischen den beiden Hippocampi mit Hilfe von FG-Injektionen in den dorsalen Hippocampus führten zum Nachweis von projizierenden Interneuronen vor allem ausgehend vom Gyrus dentatus. Im Str. oriens und Str. radiatum der CA1- und CA3-Region wurden nur vereinzelt projizierende Interneurone entdeckt (Zappone und Sloviter 2001). Zappone und Sloviter registrierten einen außerordentlich hohen Anteil Somatostatin-exprimierender Neurone, die in den kontralateralen Hippocampus projizierten. Zudem konnten eine signifikante PARV-Expression und in geringerem Maße eine Calretinin-Synthese der projizierenden Neurone nachgewiesen werden (Zappone und Sloviter 2001). Lange GABAerge Projektionen zwischen Hippocampus und entorhinalen Cortex zeigen wiederum eine starke Beteiligung der CA1-Region. Ähnlich wie die hippocampo-septalen Projektionsneurone sind die hippocampo-entorhinalen GABAergen Projektionsneurone vor allem im Str. oriens und Str. radiatum lokalisiert und auch in der Hilusregion des Gyrus dentatus zu finden (Melzer et al. 2012). Eine Somatostatin-Expression in den GABAergen Projektionsneuronen wurde auch von Melzer et al. nachgewiesen. Ebenso gab es aufgrund eines unterschiedlichen Erregungsmusters Hinweise auf weitere Peptide. Zielneurone der GABAergen Projektionen des Hippocampus waren unter anderem PARV-exprimierende Interneurone des entorhinalen Cortex (Melzer et al. 2012).

Im Allgemeinen lässt sich festhalten, dass alle GABAergen Projektionsneurone des Hippocampus anhand ihrer Peptidexpression in Subpopulationen unterteilt werden können. Häufig wird ein bestimmtes Peptid vorrangig exprimiert wie zum Beispiel Somatostatin von den hippocampo-septalen GABAergen Projektionsneuronen oder PARV von den hippocampo-amygdalären GABAergen Projektionsneuronen. Des Weiteren lässt sich nicht nur eine schichtspezifische Lokalisation sondern auch ein kompartimentspezifisches Vorkommen der GABAergen Projektionsneurone erkennen. Dabei unterscheidet sich die Lokalisation der GABAergen Projektionsneurone in Abhängigkeit vom Zielgebiet, wobei sich vereinzelt Überschneidungen erkennen lassen, beispielsweise im Str. oriens der CA1-Region der hippocampo-septalen, hippocampo-entorhinalen und hippocampo-amygdalären Projektionen. Beim Vergleich dieser Daten darf nicht außer Acht gelassen werden, dass sich die

untersuchten Spezies zum Teil unterscheiden, worin Unterschiede begründet sein können. Ob es sich bei den bisher identifizierten GABAergen Projektionsneuronen des Hippocampus um unterschiedliche Klassen handelt, lässt sich daher anhand der derzeitigen Datenlage nicht abschließend klären und bedarf weiterer Untersuchungen.

4.6.1 Hippocampo-amygdaläre GABAerge Projektionsneurone

Die GABAergen Projektionen vom Hippocampus in die Amygdala wurden mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen für PARV, NPY und CCK näher charakterisiert. Mit 39 % weist PARV den größten Anteil an den hippocampo-amygdalären Projektionen auf, wenngleich NPY und CCK mit 15 % bzw. 12 % ebenfalls nennenswert nachweisbar waren. Hier stellt sich die Frage, ob man anhand der jeweiligen Peptidanteile auf deren vermeintliche Funktion bei den GABAergen Projektionen schlussfolgern kann. Bevor diese Frage näher beleuchtet wird, ist zu klären, welche allgemeine Rolle die hippocampo-amygdalären GABAergen Projektionsneurone ausüben. Caputi et al. sehen GABAerge Projektionsneurone als eine Art Taktgeber. Durch die GABAergen Projektionen kommt es zu einer Inhibition von Interneuronen entfernter Hirnstrukturen, wodurch neuronale Netzwerke synchronisiert werden und die neuronale Aktivität zeitlich koordiniert wird (Caputi et al. 2013). Bezogen auf die GABAergen Projektionen zwischen Hippocampus und Amygdala bedeutet dies, dass bei der Verarbeitung emotionaler Gedächtnisinhalte und insbesondere bei angst- und furchtassoziierten Zuständen (Donley et al. 2005; Rudy und Matus-Amat 2005; Sierra-Mercado et al. 2011), die GABAergen Projektionsneurone einen schnellen Informationsfluss zwischen Hippocampus und Amygdala ermöglichen und dadurch die Grundvoraussetzung für eine zeitgemäße und physiologische Verarbeitung schaffen. Diese Annahme wird durch die Tatsache gestärkt, dass Veränderungen bzw. eine Dysbalance der GABAergen Kommunikation mit psychiatrischen Erkrankungen, insbesondere affektiven Störungen, assoziiert sind (Jinno 2009; Kalueff und Nutt 2007). Unterstützt wird diese Annahme durch die Erkenntnis, dass Mäuse mit einer Defizienz der 65 kD Isoform von GAD und infolgedessen verminderter GABA-Synthese gestörte θ -Frequenzen aufweisen (Bergado-Acosta et al. 2008; Sangha et al. 2009). Diese θ -Frequenzen sind wiederum von herausragender Bedeutung für die Synchronisation von Amygdala und Hippocampus während des Abrufens von angstbehafteten Langzeitgedächtnisinhalten (Seidenbecher et al. 2003; Narayanan et al. 2007). Kommt es hierbei zu Störungen, resultiert eine Generalisierung auditorisch induzierter Furchtgedächtnisinhalte sowie eine Störung der Furchtextinktion (Bergado-Acosta et al. 2008; Sangha et al. 2009). Hobin et al. (2006) belegten zudem in Studien, dass GABAerge Mechanismen des ventralen Hippocampus beim Abrufen kontextassoziiertes Furchtgedächtnisinhalte nach Extinktion beteiligt sind. Aus all diesen Erkenntnissen lässt sich daher eine direkte klinische Relevanz der

untersuchten GABAergen Projektionsneurone schlussfolgern. Denn eben jenes Gleichgewicht zwischen Konsolidierung und Extinktion von Angst ist beispielsweise bei Patienten, die an posttraumatischer Belastungsstörung (PTSD) leiden, gestört. Deshalb ist ein wesentlicher Therapieansatz, die Extinktion der angstbehafteten Gedächtnisinhalte zu fördern, sei es durch verhaltenstherapeutische Ansätze oder medikamentös (Milad et al. 2009). Hier vermag ein genauer Kenntnisstand der neuronalen Organisation und Struktur womöglich zu einer Optimierung der vorhandenen Therapieoptionen beizutragen.

Es bleibt die Frage, inwiefern die Peptidexpression in den hippocampo-amygdalären Neuronen deren Funktion moduliert. PARV-exprimierende GABAerge Projektionsneurone sind vor allem im Str. pyramidale und Str. oriens lokalisiert. Sie gehören zu den schnell feuernden Neuronen, die in der Lage sind, repetitive Aktionspotentiale zu generieren, um einen schnellen Informationsfluss zu ermöglichen (Kawaguchi et al. 1987; Celio 1990). PARV-exprimierende Korbzellen führen postsynaptisch zu inhibitorischen Potentialen (IPSPs) mit hohen Amplituden und formen synzyttenartig zahlreiche Konnektionen untereinander (Freund 2003). Durch diese physiologischen Eigenschaften ist es ihnen möglich, neuronale Aktivität effizient zu synchronisieren (Klausberger et al. 2005), weshalb sie eine essentielle Rolle bei der Entstehung von γ -Oszillationen einnehmen (Freund 2003). Jene Oszillationen sind die Grundlage für eine Gedächtnisbildung (Andressen et al. 1993; Benes und Berretta 2001; Buzsaki und Chrobak 1995; Lisman und Idiart 1995; Traub et al. 2004), wobei PARV-exprimierende Neurone als eine Art Uhrwerk die exakte zeitliche und räumliche Koordination bedingen (Freund 2003). Übertragen auf die PARV-exprimierenden hippocampo-amygdalären GABAergen Projektionsneurone ermöglicht PARV am ehesten eine rasche Verarbeitung emotionaler Gedächtnisinhalte, indem es die neuronale Aktivität von Hippocampus und Amygdala synchronisiert und hierdurch eine effiziente Signalübermittlung ermöglicht. Hinweise auf die herausragende Bedeutung PARV- und NPY-synthetisierender Interneurone des Hippocampus zur Aufrechterhaltung der kognitiven und emotionalen Integrität gab es bei einer Studie zum Golfkriegssyndrom, im Rahmen dessen viele Betroffene an Posttraumatischen Belastungsstörungen leiden (Megahed et al. 2014). Ratten wurden für vier Wochen Stress und chemischen Kampfmitteln, die auch im Golfkrieg eingesetzt wurden, ausgesetzt. Im Verlauf konnte eine Reduzierung PARV- und NPY-exprimierender GABAerger Neurone im Hippocampus nachgewiesen werden, was die oben genannte Behauptung bezüglich ihrer Bedeutung stützt (Megahed et al. 2014). Eine ausgewogene NPY-Homöostase scheint dabei ebenso von Bedeutung zu sein wie PARV. NPY weist bei den hippocampo-amygdalären GABAergen Projektionsneuronen mit 10 bis 16 % (vgl. Tabelle 2) in Abhängigkeit von der jeweiligen Hippocampuschicht einen signifikanten Anteil auf. Aufgrund seiner anxiolytischen Wirkung durch Stimulierung von Y_1 - und Inhibition von Y_2 -Rezeptoren (Verma et al.

2012; Lach und de Lima, Thereza Christina Monteiro 2013) vermag es vor einer Akzentuierung angstassoziierter Gedächtnisinhalte und gegebenenfalls Ausbildung krankhafter Zustände zu schützen. Darüber hinaus ermöglicht die Fähigkeit zur Hemmung der Transmitterfreisetzung via präsynaptischer Y_2 -Rezeptoren (Wahlestedt et al. 1990; Pedrazzini et al. 2003) eine Protektion vor Hyperexzitation (Baraban et al. 1997) und trägt somit wahrscheinlich zum reibungslosen Informationsaustausch zwischen Hippocampus und Amygdala bei. Die Funktion CCK-exprimierender GABAerger Projektionsneurone unterscheidet sich von jenen der PARV-exprimierenden Neurone. Wenngleich CCK-exprimierende Neurone ebenso wie PARV-synthetisierende Neurone vielfach Konnektionen miteinander ausbilden, scheinen diese nicht so zahlreich zu sein (Freund 2003). Klausberger et al. konnten mit Hilfe von elektrophysiologischen Untersuchungen an Ratten zeigen, dass die CCK-exprimierenden Neurone eher der Synchronisierung einzelner Neuronengruppen dienen und weniger eines ganzen Netzwerks (Klausberger et al. 2005). Unterstützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass CCK-exprimierende Neurone eher zu den regulär feuernenden Neuronen zählen und nicht in der Lage sind, repetitiv ohne entsprechende Akkommodation Aktionspotentiale zu generieren (Freund 2003). Mehrere Untersuchungen ergaben, dass CCK die Depolarisation PARV-exprimierender Neurone verstärkt und andererseits die GABAerge Transmission von CCK-exprimierenden Korbzellen via Cannabinoid-Rezeptoren hemmt (Foldy et al. 2007; Karson et al. 2008). Somit fördert es die Bildung verschiedener Subpopulationen, indem es einerseits die perisomatische Inhibition verstärkt und andererseits die GABA-Freisetzung vermindert (Foldy et al. 2007). So ist es gut vorstellbar, dass CCK im Rahmen der hippocampo-amygdalären GABAergen Projektionen, ähnlich seiner lokalen Funktion (Freund 2003; Klausberger et al. 2005), der Feinabstimmung sowie Modulation neuronaler Aktivität dient, wodurch eine differenzierte, zeitlich genaue Informationsübermittlung gewährleistet wird.

Ob die oben genannten Vermutungen zur Funktion der hippocampo-amygdalären GABAergen Projektionsneurone und der jeweiligen Peptide zutreffen, wird sich erst im Verlauf weiterer Untersuchungen zeigen. Grundvoraussetzung dafür ist allerdings ein genauer Kenntnisstand der anatomischen Gegebenheiten, wozu die vorliegende Arbeit beiträgt.

5 Zusammenfassung

GABAerge Neurone sind nicht nur als Interneurone von großer Bedeutung, sondern erlangen zunehmend Beachtung als lange Projektionsneurone zwischen entfernten Hirnstrukturen (Caputi et al. 2013). Im Rahmen dessen wurden GABAerge Projektionen zwischen Septum und Hippocampus (Chronister und DeFrance 1979; Alonso und Köhler 1982; Freund und Antal 1988; Jinno und Kosaka 2002), Hippocampus und entorhinalen Cortex (Melzer et al. 2012), den Hippocampusformationen (Schwerdtfeger und Buhl 1986; Zappone und Sloviter 2001; Jinno 2009) und innerhalb des Neocortex (Higo et al. 2009; Tamamaki und Tomioka 2010) nachgewiesen. Jüngst entdeckten Müller et al. (2012) eine GABAerge Projektion vom ventralen Hippocampus in die Amygdala. Die vorliegende Arbeit dient der näheren biochemischen Charakterisierung dieser GABAergen hippocampo-amygdalären Projektion. Hierfür wurden GAD67-GFP knock-in Mäuse verwendet, denen FG als retrograder Tracer in die Amygdala injiziert wurde. Mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen wurde zusätzlich die Expression von PARV, NPY und CCK als Kotransmitter geprüft. Zusammenfassend kann man sagen, dass 19 % aller GABAerger Neurone vom ventralen Hippocampus in die Amygdala projizieren und sie 4 % aller Projektionsneurone des ventralen Hippocampus ausmachen. Davon ist die Mehrheit mit 23 % bzw. 25 % im Str. oriens bzw. Str. pyramidale lokalisiert. Verglichen zu bereits beschriebenen langen GABAergen Projektionen, lässt sich daher auch bei den hippocampo-amygdalären GABAergen Projektionsneuronen eine schichtspezifische Verteilung erkennen, wenngleich diese im Gegensatz z. B. zu den hippocampo-septalen Projektionen nicht in der gesamten Hippocampusformation (Jinno und Kosaka 2002) zu finden sind, sondern auf die CA1-Region und das angrenzende Subiculum des ventralen Hippocampus beschränkt sind. Eine weitere Gemeinsamkeit der GABAergen Projektionsneurone des Hippocampus ist die Expression von peptidergen Kotransmittern, wodurch jene in Subpopulationen unterteilt werden können. Hierbei besteht eine Vielfalt an Möglichkeiten, wobei ein Peptid oftmals vorrangig exprimiert wird. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass mit 39 % PARV am häufigsten von den GABAergen hippocampo-amygdalären Projektionsneuronen exprimiert wird. Darüber hinaus haben NPY und CCK mit 15 % bzw. 12 % ebenfalls einen beachtlichen Anteil an den GABAergen Projektionsneuronen. Die Kotransmitter wirken am ehesten supportiv und dienen der weiteren Modulation des neuronalen Netzwerks. Es ist unumstritten, dass eine Dysbalance dieses feinabgestimmten Systems insbesondere zur Entwicklung von affektiven Störungen führt (Jinno 2009; Kalueff und Nutt 2007; Megahed et al. 2014). Daher ist anzunehmen, dass diese GABAerge Projektion essentiell für die Kommunikation zwischen Hippocampus und Amygdala ist und zur Aufrechterhaltung der physiologischen Integrität emotional gefärbter Gedächtnisinhalte beiträgt.

6 Literaturverzeichnis

- Acosta GB: A possible interaction between CCKergic and GABAergic systems in the rat brain. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 128. pp. 11–17 (2001).
- Adeghate E, Ponery AS: GABA in the endocrine pancreas: cellular localization and function in normal and diabetic rats. *Tissue Cell* 34. pp. 1–6 (2002).
- Adrian TE, Allen JM, Bloom SR, Ghatei MA, Rossor MN, Roberts GW, Crow TJ, Tatemoto K, Polak JM: Neuropeptide Y distribution in human brain. *Nature* 306. pp. 584–586 (1983).
- Aika Y, Ren JQ, Kosaka K, Kosaka T: Quantitative analysis of GABA-like-immunoreactive and parvalbumin-containing neurons in the CA1 region of the rat hippocampus using a stereological method, the disector. *Exp. Brain Res.* 99. pp. 267–276 (1994).
- Akirav I, Raizel H, Maroun M: Enhancement of conditioned fear extinction by infusion of the GABA(A) agonist muscimol into the rat prefrontal cortex and amygdala. *Eur. J. Neurosci.* 23. pp. 758–764 (2006).
- Allen JM, Bircham PM, Edwards AV, Tatemoto K, Bloom SR: Neuropeptide Y (NPY) reduces myocardial perfusion and inhibits the force of contraction of the isolated perfused rabbit heart. *Regul. Pept.* 6. pp. 247–253 (1983a).
- Allen JM, Bloom SR: Neuropeptide Y: a putative neurotransmitter. *Neurochem. Int.* 8. pp. 1–8 (1986).
- Allen YS, Adrian TE, Allen JM, Tatemoto K, Crow TJ, Bloom SR, Polak JM: Neuropeptide Y distribution in the rat brain. *Science* 221. pp. 877–879 (1983b).
- Alonso A, Köhler C: Evidence for separate projections of hippocampal pyramidal and non-pyramidal neurons to different parts of the septum in the rat brain. *Neurosci. Lett.* 31. pp. 209–214 (1982).
- Amaral DG, Price JL, Pitkänen A, Carmichael T: Anatomical organization of the primate amygdaloid complex. In: Aggleton, J. (Hg.): *The Amygdala. Neurobiological Aspects of Emotion, Memory, and Mental Dysfunction.* pp. 1–66. New York: Wiley-Liss, Inc. 1992.
- Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P: The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog. Brain Res.* 163. pp. 3–22 (2007).
- Amaral DG, Witter MP: The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neurosciences* 31. pp. 571–591 (1989).
- Andersen P, Bliss TV, Lomo T, Olsen LI, Skrede KK: Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Acta Physiol. Scand.* 76. pp. 4–5A (1969).
- Andressen C, Blumcke I, Celio MR: Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. *Cell Tissue Res.* 271. pp. 181–208 (1993).
- Asada H, Kawamura Y, Maruyama K, Kume H, Ding R, Ji FY, Kanbara N, Kuzume H, Sanbo M, Yagi T, Obata K: Mice lacking the 65 kDa isoform of glutamic acid decarboxylase (GAD65) maintain normal levels of GAD67 and GABA in their brains but are susceptible to seizures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229. pp. 891–895 (1996).

- Asada H, Kawamura Y, Maruyama K, Kume H, Ding R, Kanbara N, Kuzume H, Sanbo M, Yagi T, Obata K: Cleft palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* pp. 6496–6499 (1997).
- Baimbridge KG, Celio MR, Rogers JH: Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci.* 15. pp. 303–308 (1992).
- Bannerman DM, Rawlins, J N P, McHugh SB, Deacon, R M J, Yee BK, Bast T, Zhang W, Pothuizen, H H J, Feldon J: Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28. pp. 273–283 (2004).
- Baraban SC, Hollopeter G, Erickson JC, Schwartzkroin PA, Palmiter RD: Knock-out mice reveal a critical antiepileptic role for neuropeptide Y. *J. Neurosci.* 17. pp. 8927–8936 (1997).
- Bast T: Toward an integrative perspective on hippocampal function: from the rapid encoding of experience to adaptive behavior. *Rev. Neurosci.* 18. pp. 253–281 (2007).
- Bast T, Wilson IA, Witter MP, Morris, Richard G M: From rapid place learning to behavioral performance: a key role for the intermediate hippocampus. *PLoS Biol.* 7. pp. e1000089 (2009).
- Beinfeld MC: Cholecystokinin in the central nervous system: a minireview. *Neuropeptides* 3. pp. 411–427 (1983).
- Benes FM, Berretta S: GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 25. pp. 1–27 (2001).
- Berchtold MW, Celio MR, Heizmann CW: Parvalbumin in human brain. *J. Neurochem.* 45. pp. 235–239 (1985).
- Bergado-Acosta JR, Sangha S, Narayanan RT, Obata K, Pape H, Stork O: Critical role of the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase in consolidation and generalization of Pavlovian fear memory. *Learn. Mem.* 15. pp. 163–171 (2008).
- Berlau DJ, McGaugh JL: Enhancement of extinction memory consolidation: the role of the noradrenergic and GABAergic systems within the basolateral amygdala. *Neurobiol. Learn. Mem.* 86. pp. 123–132 (2006).
- Blackstad TW: Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. *J. Comp. Neurol.* 105. pp. 417–537 (1956).
- Bliss TV, Gardner-Medwin AR: Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232. pp. 357–374 (1973).
- Bohme GA, Stutzmann JM, Blanchard JC: Excitatory effects of cholecystokinin in rat hippocampus: pharmacological response compatible with 'central'- or B-type CCK receptors. *Brain Res.* 451. pp. 309–318 (1988).
- Bormann J: The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 21. pp. 16–19 (2000).
- Brioni JD, Nagahara AH, McGaugh JL: Involvement of the amygdala GABAergic system in the modulation of memory storage. *Brain Res.* 487. pp. 105–112 (1989).

- Burdach KF: Vom Baue und Leben des Gehirns. Dyk'sche Buchhdl. Leipzig 1819-1822.
- Burwell RD: The parahippocampal region: corticocortical connectivity. *Ann. N Y Acad. Sci.* 911. pp. 25–42 (2000).
- Buzsaki G, Chrobak JJ: Temporal structure in spatially organized neuronal ensembles: a role for interneuronal networks. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5. pp. 504–510 (1995).
- Canteras NS, Swanson LW: Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 324. pp. 180–194 (1992).
- Caputi A, Melzer S, Michael M, Monyer H: The long and short of GABAergic neurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23. pp. 179–186 (2013).
- Castellano C, McGaugh JL: Retention enhancement with post-training picrotoxin: lack of state dependency. *Behav. Neural Biol.* 51. pp. 165–170 (1989).
- Celio MR: Parvalbumin in most gamma-aminobutyric acid-containing neurons of the rat cerebral cortex. *Science* 231. pp. 995–997 (1986).
- Celio MR: Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neurosciences* 35. pp. 375–475 (1990).
- Cenquizca LA, Swanson LW: Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Res. Rev.* 56. pp. 1–26 (2007).
- Chamberland S, Topolnik L: Inhibitory control of hippocampal inhibitory neurons. *Front. Neurosci.* 6. pp. 165 (2012).
- Chan-Palay V: Somatostatin immunoreactive neurons in the human hippocampus and cortex shown by immunogold/silver intensification on vibratome sections: coexistence with neuropeptide Y neurons, and effects in Alzheimer-type dementia. *J. Comp. Neurol.* 260. pp. 201–223 (1987).
- Chrobak JJ, Amaral DG: Entorhinal cortex of the monkey: VII. intrinsic connections. *J. Comp. Neurol.* 500. pp. 612–633 (2007).
- Chronister RB, DeFrance JF: Organization of projection neurons of the hippocampus. *Exp. Neurol.* 66. pp. 509–523 (1979).
- Collingridge G: Synaptic plasticity. The role of NMDA receptors in learning and memory. *Nature* 330. pp. 604–605 (1987).
- Colmers WF, Bleakman D: Effects of neuropeptide Y on the electrical properties of neurons. *Trends Neurosci.* 17. pp. 373–379 (1994).
- Colmers WF, Klapstein GJ, Fournier A, St-Pierre S, Treherne KA: Presynaptic inhibition by neuropeptide Y in rat hippocampal slice in vitro is mediated by a Y2 receptor. *Br. J. Pharmacol.* 102. pp. 41–44 (1991).
- Conrad CD, McEwen BS: Acute stress increases neuropeptide Y mRNA within the arcuate nucleus and hilus of the dentate gyrus. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 79. pp. 102–109 (2000).

- Corkin S: Lasting Consequences of Bilateral Medial Temporal Lobectomy: Clinical Course and Experimental Findings in H.M. *Semin. Neurol.* 4. pp. 249–259 (1984).
- Crawley JN, Corwin RL: Biological actions of cholecystokinin. *Peptides* 15. pp. 731–755 (1994).
- Davis M: The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu. Rev. Neurosci.* 15. pp. 353–375 (1992).
- Davis M, Whalen PJ: The amygdala: vigilance and emotion. *Mol. Psychiatry.* 6. pp. 13–34 (2001).
- Decressac M, Barker RA: Neuropeptide Y and its role in CNS disease and repair. *Exp. Neurol.* 238. pp. 265–272 (2012).
- DeDiego I, Smith-Fernández A, Fairén A: Cortical Cells That Migrate Beyond Area Boundaries: Characterization of an Early Neuronal Population in the Lower Intermediate Zone of Prenatal Rats. *Eur. J. Neurosci.* 6. pp. 983–997 (1994).
- Deng P, Xiao Z, Jha A, Ramonet D, Matsui T, Leitges M, Shin H, Porter JE, Geiger JD, Lei S: Cholecystokinin facilitates glutamate release by increasing the number of readily releasable vesicles and releasing probability. *J. Neurosci.* 30. pp. 5136–5148 (2010).
- Deschenes RJ, Lorenz LJ, Haun RS, Roos BA, Collier KJ, Dixon JE: Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding rat preprocholecystokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 81. pp. 726–730 (1984).
- Dockray GJ, Gregory RA, Hutchison JB, Harris JI, Runswick MJ: Isolation, structure and biological activity of two cholecystokinin octapeptides from sheep brain. *Nature* 274. pp. 711–713 (1978).
- Dolatabadi LK, Reisi P: Acute effect of cholecystokinin on short-term synaptic plasticity in the rat hippocampus. *Res. Pharm. Sci.* 9. pp. 331–336 (2014).
- Donley MP, Schulkin J, Rosen JB: Glucocorticoid receptor antagonism in the basolateral amygdala and ventral hippocampus interferes with long-term memory of contextual fear. *Behav. Brain Res.* 164. pp. 197–205 (2005).
- Eichenbaum H: What H.M. taught us. *J. Cogn. Neurosci.* 25. pp. 14–21 (2013).
- Erlander MG, Tobin AJ: The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: a review. *Neurochem. Res.* 16. pp. 215–226 (1991).
- Fanselow MS, Dong H: Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65. pp. 7–19 (2010).
- Fendt M, Fanselow MS: The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23. pp. 743–760 (1999).
- Finsen BR, Tonder N, Augood S, Zimmer J: Somatostatin and neuropeptide Y in organotypic slice cultures of the rat hippocampus: an immunocytochemical and in situ hybridization study. *Neurosciences* 47. pp. 105–113 (1992).
- Flood JF, Hernandez EN, Morley JE: Modulation of memory processing by neuropeptide Y. *Brain Res.* 421. pp. 280–290 (1987).
- Foldy C, Lee SY, Szabadics J, Neu A, Soltesz I: Cell type-specific gating of perisomatic inhibition by cholecystokinin. *Nat. Neurosci.* 10. pp. 1128–1130 (2007).

- Frankland PW, Cestari V, Filipkowski RK, McDonald RJ, Silva AJ: The dorsal hippocampus is essential for context discrimination but not for contextual conditioning. *Behav. Neurosci.* 112. pp. 863–874 (1998).
- Franklin KBJ, Paxinos G: *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. pp. 1 v. (various) Elsevier. New York 2007.
- Freund TF: Interneuron Diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends Neurosci.* 26. pp. 489–495 (2003).
- Freund TF, Antal M: GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature* 336. pp. 170–173 (1988).
- Freund TF, Buzsaki G: Interneurons of the Hippocampus. *Hippocampus*. pp. 347–470 (1996).
- Freund TF, Ylinen A, Miettinen R, Pitkanen A, Lahtinen H, Baimbridge KG, Riekkinen PJ: Pattern of neuronal death in the rat hippocampus after status epilepticus. Relationship to calcium binding protein content and ischemic vulnerability. *Brain Res. Bull.* 28. pp. 27–38 (1992).
- Grundemar L, Jonas SE, Mörner N, Högestätt ED, Wahlestedt C, Håkanson R: Characterization of vascular neuropeptide Y receptors. *Br. J. Pharmacol.* 105. pp. 45–50 (1992).
- Gutman AR, Yang Y, Ressler KJ, Davis M: The role of neuropeptide Y in the expression and extinction of fear-potentiated startle. *J. Neurosci.* 28. pp. 12682–12690 (2008).
- Harper AA, Raper HS: Pancreozymin, a stimulant of the secretion of pancreatic enzymes in extracts of the small intestine. *J. Physiol.* 102. pp. 115–125 (1943).
- Heizmann CW: Parvalbumin, an intracellular calcium-binding protein; distribution, properties and possible roles in mammalian cells. *Experientia* 40. pp. 910–921 (1984).
- Hendry SH, Jones EG, DeFelipe J, Schmechel D, Brandon C, Emson PC: Neuropeptide-containing neurons of the cerebral cortex are also GABAergic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 81. pp. 6526–6530 (1984a).
- Hendry SH, Jones EG, Emson PC: Morphology, distribution, and synaptic relations of somatostatin- and neuropeptide Y-immunoreactive neurons in rat and monkey neocortex. *J. Neurosci.* 4. pp. 2497–2517 (1984b).
- Higo S, Akashi K, Sakimura K, Tamamaki N: Subtypes of GABAergic neurons project axons in the neocortex. *Front. Neuroanat.* 3. pp. 25 (2009).
- Hobin JA, Ji J, Maren S: Ventral hippocampal muscimol disrupts context-specific fear memory retrieval after extinction in rats. *Hippocampus* 16. pp. 174–182 (2006).
- Hökfelt T, Johansson O, Ljungdahl Å, Lundberg JM, Schultzberg M: Peptidergic neurones. *Nature* 284. pp. 515–521 (1980).
- Holliday ND, Michel MC, Cox HM: NPY Receptor Subtypes and Their Signal Transduction. In: Starke, K. und Michel, M. (Hg.): *Neuropeptide Y and Related Peptides*. pp. 45–73. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 2004.

-
- Innis RB, Snyder SH: Distinct cholecystokinin receptors in brain and pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 77. pp. 6917–6921 (1980).
- Isaacson RL: *The Limbic System*. pp. 1-54 Springer US. Boston, MA 1982.
- Ivy AC, Oldberg E: A HORMONE MECHANISM FOR GALL-BLADDER CONTRACTION AND EVACUATION. *Am. J. Physiol.* 86. pp. 599–613 (1928).
- Jinno S: Structural organization of long-range GABAergic projection system of the hippocampus. *Front. Neuroanat.* 3. pp. 13 (2009).
- Jinno S, Kosaka T: Immunocytochemical characterization of hippocamposeptal projecting GABAergic nonprincipal neurons in the mouse brain: a retrograde labeling study. *Brain Res.* 945. pp. 219–231 (2002).
- Johnston JB: Further contributions to the study of the evolution of the forebrain. *J. Comp. Neurol.* 35. pp. 337–481 (1923).
- Jorpes E, Mutt V: Cholecystokinin and pancreozymin, one single hormone? *Acta Physiol. Scand.* 66. pp. 196–202 (1966).
- Jorpes E, Mutt V, Toczko K, Sparrow DR: Further Purification of Cholecystokinin and Pancreozymin. *Acta Chem. Scand.* 18. pp. 2408–2410 (1964).
- Kalueff AV, Nutt DJ: Role of GABA in anxiety and depression. *Depress. Anxiety* 24. pp. 495–517 (2007).
- Karagiannis A, Gallopin T, David C, Battaglia D, Geoffroy H, Rossier J, Hillman, Elizabeth M C, Staiger JF, Cauli B: Classification of NPY-expressing neocortical interneurons. *J. Neurosci.* 29. pp. 3642–3659 (2009).
- Karson MA, Whittington KC, Alger BE: Cholecystokinin inhibits endocannabinoid-sensitive hippocampal IPSPs and stimulates others. *Neuropharmacology* 54. pp. 117–128 (2008).
- Kawaguchi Y, Katsumaru H, Kosaka T, Heizmann CW, Hama K: Fast spiking cells in rat hippocampus (CA1 region) contain the calcium-binding protein parvalbumin. *Brain Res.* 416. pp. 369–374 (1987).
- Kentros C: Hippocampal place cells: the \"where\" of episodic memory? *Hippocampus* 16. pp. 743–754 (2006).
- Kim JH, McNally GP, Richardson R: Recovery of fear memories in rats: role of gamma-amino butyric acid (GABA) in infantile amnesia. *Behav. Neurosci.* 120. pp. 40–48 (2006).
- Kim JJ, Fanselow MS: Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 256. pp. 675–677 (1992).
- Kishi T, Tsumori T, Yokota S, Yasui Y: Topographical projection from the hippocampal formation to the amygdala: a combined anterograde and retrograde tracing study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 496. pp. 349–368 (2006).
- Klausberger T, Marton LF, O'Neill J, Huck, Jojanneke H J, Dalezios Y, Fuentealba P, Suen WY, Papp E, Kaneko T, Watanabe M, Csicsvari J, Somogyi P: Complementary roles of cholecystokinin- and parvalbumin-expressing GABAergic neurons in hippocampal network oscillations. *J. Neurosci.* 25. pp. 9782–9793 (2005).

- Klausberger T, Somogyi P: Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* 321. pp. 53–57 (2008).
- Kosaka T, Katsumaru H, Hama K, Wu JY, Heizmann CW: GABAergic neurons containing the Ca²⁺-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus and dentate gyrus. *Brain Res.* 419. pp. 119–130 (1987).
- Kosaka T, Kosaka K, Tateishi K, Hamaoka Y, Yanaihara N, Wu JY, Hama K: GABAergic neurons containing CCK-8-like and/or VIP-like immunoreactivities in the rat hippocampus and dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 239. pp. 420–430 (1985).
- Krnjevic K, Schwartz S: The action of gamma-aminobutyric acid on cortical neurones. *Exp. Brain Res.* 3. pp. 320–336 (1967).
- Lach G, de Lima, Thereza Christina Monteiro: Role of NPY Y1 receptor on acquisition, consolidation and extinction on contextual fear conditioning: dissociation between anxiety, locomotion and non-emotional memory behavior. *Neurobiol. Learn. Mem.* 103. pp. 26–33 (2013).
- Larhammar D, Blomqvist AG, Soderberg C: Evolution of neuropeptide Y and its related peptides. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 106. pp. 743–752 (1993).
- LeDoux JE: Emotion circuits in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 23. pp. 155–184 (2000).
- LeDoux JE, Cicchetti P, Xagoraris A, Romanski LM: The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J. Neurosci.* 10. pp. 1062–1069 (1990a).
- LeDoux JE, Farb C, Ruggiero DA: Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. *J. Neurosci.* 10. pp. 1043–1054 (1990b).
- LeDoux JE, Iwata J, Cicchetti P, Reis DJ: Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J. Neurosci.* 8. pp. 2517–2529 (1988).
- Lee SH, Schwaller B, Neher E: Kinetics of Ca²⁺ binding to parvalbumin in bovine chromaffin cells: implications for Ca²⁺ transients of neuronal dendrites. *J. Physiol.* 525 Pt 2. pp. 419–432 (2000).
- Li XL, Aou S, Hori T, Oomura Y: Spatial memory deficit and emotional abnormality in OLETF rats. *Physiol. Behav.* 75. pp. 15–23 (2002).
- Lin S, Boey D, Herzog H: NPY and Y receptors: lessons from transgenic and knockout models. *Neuropeptides* 38. pp. 189–200 (2004).
- Lisman JE, Idiart MA: Storage of 7 +/- 2 short-term memories in oscillatory subcycles. *Science* 267. pp. 1512–1515 (1995).
- Lorente De Nó R.: Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neurol.* pp. 113–177 (1934).
- Lübke R, Eberhardt J, Röhl F, Janitzky K, Nullmeier S, Stork O, Schwegler H, Linke R: Identification and Characterization of GABAergic Projection Neurons from Ventral Hippocampus to Amygdala. *Brain Sci.* 5. pp. 299–317 (2015).

- Lundberg JM, Terenius L, Hokfelt T, Goldstein M: High levels of neuropeptide Y in peripheral noradrenergic neurons in various mammals including man. *Neurosci. Lett.* 42. pp. 167–172 (1983).
- MacLean PD: Psychosomatic disease and the visceral brain; recent developments bearing on the Papez theory of emotion. *Psychosom. Med.* 11. pp. 338–353 (1949).
- Makkar SR, Zhang SQ, Cranney J: Behavioral and neural analysis of GABA in the acquisition, consolidation, reconsolidation, and extinction of fear memory. *Neuropsychopharmacology* 35. pp. 1625–1652 (2010).
- Mann EO, Radcliffe CA, Paulsen O: Hippocampal gamma-frequency oscillations: from interneurons to pyramidal cells, and back. *J. Physiol.* 562. pp. 55–63 (2005).
- Maren S, Baudry M: Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationships to learning and memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 63. pp. 1–18 (1995).
- Maren S, Fanselow MS: Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal formation stimulation in vivo. *J. Neurosci.* 15. pp. 7548–7564 (1995).
- McDonald AJ: Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog. Neurobiol.* 55. pp. 257–332 (1998).
- McDonald JK: NPY and related substances. *Crit. Rev. Neurobiol.* 4. pp. 97–135 (1988).
- McGaugh JL: Memory--a Century of Consolidation. *Science* 287. pp. 248–251 (2000).
- McGaugh JL: The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu. Rev. Neurosci.* 27. pp. 1–28 (2004).
- McLaughlin CL, Baile CA: Obese mice and the satiety effects of cholecystokinin, bombesin and pancreatic polypeptide. *Physiol. Behav.* 26. pp. 433–437 (1981).
- Megahed T, Hattiangady B, Shuai B, Shetty AK: Parvalbumin and neuropeptide Y expressing hippocampal GABA-ergic inhibitory interneuron numbers decline in a model of Gulf War illness. *Front. Cell. Neurosci.* 8. pp. 447 (2014).
- Melzer S, Michael M, Caputi A, Eliava M, Fuchs EC, Whittington MA, Monyer H: Long-range-projecting GABAergic neurons modulate inhibition in hippocampus and entorhinal cortex. *Science* 335. pp. 1506–1510 (2012).
- Michel MC, Beck-Sickinger A, Cox H, Doods HN, Herzog H, Larhammar D, Quirion R, Schwartz T, Westfall T: XVI. International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. *Pharmacol. Rev.* 50. pp. 143–150 (1998).
- Milad MR, Pitman RK, Ellis CB, Gold AL, Shin LM, Lasko NB, Zeidan MA, Handwerker K, Orr SP, Rauch SL: Neurobiological basis of failure to recall extinction memory in posttraumatic stress disorder. *Biol. Psychiatry* 66. pp. 1075–1082 (2009).
- Morley JE, Flood JF: Neuropeptide Y and memory processing. *Ann. N Y Acad. Sci.* 611. pp. 226–231 (1990).

- Moser MB, Moser EI, Forrest E, Andersen P, Morris RG: Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92. pp. 9697–9701 (1995).
- Müller 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. *Brain Struct. Funct.* 217. pp. 5–17 (2012).
- Mutt V, Jorpes JE: Structure of porcine cholecystokinin-pancreozymin. 1. Cleavage with thrombin and with trypsin. *Eur. J. Biochem.* 6. pp. 156–162 (1968).
- Narayanan RT, Seidenbecher T, Sangha S, Stork O, Pape H: Theta resynchronization during reconsolidation of remote contextual fear memory. *Neuroreport* 18. pp. 1107–1111 (2007).
- Nitsch R, Soriano E, Frotscher M: The parvalbumin-containing nonpyramidal neurons in the rat hippocampus. *Anat. Embryol. (Berl)* 181. pp. 413–425 (1990).
- Noble F, Wank SA, Crawley JN, Bradwejn J, Seroogy KB, Hamon M, Roques BP: International Union of Pharmacology. XXI. Structure, distribution, and functions of cholecystokinin receptors. *Pharmacol. Rev.* 51. pp. 745–781 (1999).
- Nunzi MG, Gorio A, Milan F, Freund TF, Somogyi P, Smith AD: Cholecystokinin-immunoreactive cells form symmetrical synaptic contacts with pyramidal and nonpyramidal neurons in the hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 237. pp. 485–505 (1985).
- O'Keefe J, Nadel L: Précis of O'Keefe & Nadel's *The hippocampus as a cognitive map*. *Behav. Brain Sci.* 2. pp. 487–494 (1979).
- Ottersen OP: Connections of the amygdala of the rat. IV: Corticoamygdaloid and intraamygdaloid connections as studied with axonal transport of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* 205. pp. 30–48 (1982).
- Pastalkova E, Serrano P, Pinkhasova D, Wallace E, Fenton AA, Sacktor TC: Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science* 313. pp. 1141–1144 (2006).
- Pedrazzini T, Pralong F, Grouzmann E: Neuropeptide Y: the universal soldier. *Cell Mol. Life Sci.* 60. pp. 350–377 (2003).
- Petrovich GD, Canteras NS, Swanson LW: Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 38. pp. 247–289 (2001).
- Phillips RG, LeDoux JE: Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav. Neurosci.* 106. pp. 274–285 (1992).
- Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G: GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neurosciences* 101. pp. 815–850 (2000).
- Pitkänen A, Pikkarainen M, Nurminen N, Ylinen A: Reciprocal Connections between the Amygdala and the Hippocampal Formation, Perirhinal Cortex, and Postrhinal Cortex in Rat: A Review. *Ann. N Y Acad. Sci.* 911. pp. 369–391 (2000).
- Pitkänen A, Savander V, LeDoux JE: Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci.* 20. pp. 517–523 (1997).

-
- Pothuizen, H H J, Zhang W, Jongen-Relo AL, Feldon J, Yee BK: Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. *Eur. J. Neurosci.* 19. pp. 705–712 (2004).
- Quirk GJ, Mueller D: Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology* 33. pp. 56–72 (2008).
- Ribak CE, Vaughn JE, Saito K: Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in neuronal somata following colchicine inhibition of axonal transport. *Brain Res.* 140. pp. 315–332 (1978).
- Rudy JW, Matus-Amat P: The ventral hippocampus supports a memory representation of context and contextual fear conditioning: implications for a unitary function of the hippocampus. *Behav. Neurosci.* 119. pp. 154–163 (2005).
- Saito A, Sankaran H, Goldfine ID, Williams JA: Cholecystokinin receptors in the brain: characterization and distribution. *Science* 208. pp. 1155–1156 (1980).
- Sangha S, Narayanan RT, Bergado-Acosta JR, Stork O, Seidenbecher T, Pape H: Deficiency of the 65 kDa isoform of glutamic acid decarboxylase impairs extinction of cued but not contextual fear memory. *J. Neurosci.* 29. pp. 15713–15720 (2009).
- Sankaran H, Goldfine ID, Deveney CW, Wong KY, Williams JA: Binding of cholecystokinin to high affinity receptors on isolated rat pancreatic acini. *J. Biol. Chem.* 255. pp. 1849–1853 (1980).
- Saunders RC, Rosene DL, Van Hoesen, G W: Comparison of the efferents of the amygdala and the hippocampal formation in the rhesus monkey: II. Reciprocal and non-reciprocal connections. *J. Comp. Neurol.* 271. pp. 185–207 (1988).
- Sayegh AI: The role of cholecystokinin receptors in the short-term control of food intake. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 114. pp. 277–316 (2013).
- Schmued LC, Fallon JH: Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res.* 377. pp. 147–154 (1986).
- Schwaller B, Dick J, Dhoot G, Carroll S, Vrbova G, Nicotera P, Pette D, Wyss A, Bluethmann H, Hunziker W, Celio MR: Prolonged contraction-relaxation cycle of fast-twitch muscles in parvalbumin knockout mice. *Am. J. Physiol.* 276. pp. C395-403 (1999).
- Schwerdtfeger WK, Buhl E: Various types of non-pyramidal hippocampal neurons project to the septum and contralateral hippocampus. *Brain Res.* 386. pp. 146–154 (1986).
- Scoville WB, Milner B: Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. 1957. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 12. pp. 103–113 (1957).
- Seidenbecher T, Laxmi TR, Stork O, Pape H: Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. *Science* 301. pp. 846–850 (2003).
- Sierra-Mercado D, Padilla-Coreano N, Quirk GJ: Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology* 36. pp. 529–538 (2011).

- Soghomonian JJ, Martin DL: Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol. Sci.* 19. pp. 500–505 (1998).
- Somogyi P, Hodgson AJ, Smith DA, Nunzi MG, Gorio A, Wu J: Different populations of GABAergic neurons in the visual cortex and hippocampus of cat contain somatostatin- or cholecystokinin-immunoreactive material. *J. Neurosci.* Vol. 4. pp. 2590–2603 (1984).
- Sperk G, Hamilton T, Colmers WF: Neuropeptide Y in the dentate gyrus. *Prog. Brain Res.* 163. pp. 285–297 (2007).
- Stephenson FA: Structure and trafficking of NMDA and GABAA receptors. *Biochem. Soc. Trans.* 34. pp. 877–881 (2006).
- Stone DJ, Walsh J, Benes FM: Localization of cells preferentially expressing GAD(67) with negligible GAD(65) transcripts in the rat hippocampus. A double in situ hybridization study. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 71. pp. 201–209 (1999).
- Storm-Mathisen J: Localization of transmitter candidates in the brain: the hippocampal formation as a model. *Prog. Neurobiol.* 8. pp. 119–181 (1977).
- Strange BA, Witter MP, Lein ES, Moser EI: Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat. Rev. Neurosci.* 15. pp. 655–669 (2014).
- Suzuki WA, Amaral DG: Cortical inputs to the CA1 field of the monkey hippocampus originate from the perirhinal and parahippocampal cortex but not from area TE. *Neurosci. Lett.* 115. pp. 43–48 (1990).
- Swanson LW: Neuropeptides — new vistas on synaptic transmission. *Trends Neurosci.* 6. pp. 294–295 (1983).
- Swanson LW, Köhler C, Björklund A: *Handbook of Chemical Neuroanatomy. The Limbic Region.* pp. 25–277 Elsevier. Amsterdam 1987.
- Swanson LW, Petrovich GD: What is the amygdala? *Trends Neurosci.* 21. pp. 323–331 (1998).
- Takano K, Yatabe MS, Abe A, Suzuki Y, Sanada H, Watanabe T, Kimura J, Yatabe J: Characteristic expressions of GABA receptors and GABA producing/transporting molecules in rat kidney. *PLoS ONE* 9. pp. e105835 (2014).
- Tamamaki N, Tomioka R: Long-Range GABAergic Connections Distributed throughout the Neocortex and their Possible Function. *Front. Neurosci.* 4. pp. 202 (2010).
- Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki J, Obata K, Kaneko T: Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J. Comp. Neurol.* 467. pp. 60–79 (2003).
- Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V: Neuropeptide Y—a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* 296. pp. 659–660 (1982).
- Thorsell A, Svensson P, Wiklund L, Sommer W, Ekman R, Heilig M: Suppressed neuropeptide Y (NPY) mRNA in rat amygdala following restraint stress. *Regul. Pept.* 75–76. pp. 247–254 (1998).

-
- Toth K, Freund TF: Calbindin D28k-containing nonpyramidal cells in the rat hippocampus: their immunoreactivity for GABA and projection to the medial septum. *Neurosciences* 49. pp. 793–805 (1992).
- Traub RD, Bibbig A, LeBeau, Fiona E N, Buhl EH, Whittington MA: Cellular mechanisms of neuronal population oscillations in the hippocampus in vitro. *Annu. Rev. Neurosci.* 27. pp. 247–278 (2004).
- Trepel M: *Neuroanatomie. Struktur und Funktion.* pp. 233-240 Elsevier. München 2008.
- Uchida T, Oki Y, Yanagawa Y, Fukuda A: A heterozygous deletion in the glutamate decarboxylase 67 gene enhances maternal and fetal stress vulnerability. *Neurosci. Res.* 69. pp. 276–282 (2011).
- van Groen T, Miettinen P, Kadish I: The entorhinal cortex of the mouse: organization of the projection to the hippocampal formation. *Hippocampus* 13. pp. 133–149 (2003).
- van Groen T, Wyss JM: Extrinsic projections from area CA1 of the rat hippocampus: olfactory, cortical, subcortical, and bilateral hippocampal formation projections. *J. Comp. Neurol.* 302. pp. 515–528 (1990).
- Vanderhaeghen JJ, Signeau JC, Gepts W: New peptide in the vertebrate CNS reacting with antigestrin antibodies. *Nature* 257. pp. 604–605 (1975).
- Verma D, Tasan RO, Herzog H, Sperk G: NPY controls fear conditioning and fear extinction by combined action on Y(1) and Y(2) receptors. *Br. J. Pharmacol.* 166. pp. 1461–1473 (2012).
- Vreugdenhil M, Jefferys, John G R, Celio MR, Schwaller B: Parvalbumin-deficiency facilitates repetitive IPSCs and gamma oscillations in the hippocampus. *J. Neurophysiol.* 89. pp. 1414–1422 (2003).
- Wahlestedt C, Grundemar L, Hakanson R, Heilig M, Shen GH, Zukowska-Grojec Z, Reis DJ: Neuropeptide Y receptor subtypes, Y1 and Y2. *Ann. N Y Acad. Sci.* 611. pp. 7–26 (1990).
- Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF: Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313. pp. 1093–1097 (2006).
- Witter MP, Amaral DG: Hippocampal formation. *The rat nervous system.* pp. 443–494 (1995).
- Witter MP, Amaral DG: Hippocampal Formation. In: *The Rat Nervous System.* pp. 635–704: Elsevier 2004.
- Woodson W, Nitecka L, Ben-Ari Y: Organization of the GABAergic system in the rat hippocampal formation: a quantitative immunocytochemical study. *J. Comp. Neurol.* 280. pp. 254–271 (1989).
- Wu Y, Li S: Neuropeptide Y expression in mouse hippocampus and its role in neuronal excitotoxicity. *Acta Pharmacol. Sin.* 26. pp. 63–68 (2005).
- Zappone CA, Sloviter RS: Commissurally projecting inhibitory interneurons of the rat hippocampal dentate gyrus: a colocalization study of neuronal markers and the retrograde tracer Fluoro-gold. *J. Comp. Neurol.* 441. pp. 324–344 (2001).

7 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Herbert Schwegler und Herrn Prof. Dr. Rüdiger Linke für die hervorragende wissenschaftliche und mentale Betreuung, Frau Andrea Kröber für die intensive Unterstützung im Labor und allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Anatomie für die freundliche Arbeitsatmosphäre. Herrn Robert Lübke danke ich für den fachlichen Austausch und die angenehme Zusammenarbeit, Herrn Dr. Friedrich Wilhelm Röhl für die statistische Beratung, Herrn Prof. Dr. Oliver Stork für die gute Kooperation und dem SFB 779 TP5 der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung des Projekts.

Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Thomas Fischer für die Unterstützung bei der Beendigung der Dissertation neben dem Beruf sowie dem Laborteam der Klinik für Hämatologie und Onkologie und der Arbeitsgruppe Heidel für manchen guten Rat.

Meiner Freundin Anna danke ich für die vielen anregenden Diskussionen und hilfreichen Tipps.

Besonderer Dank gilt meinem Mann und meiner Familie, die zum Zustandekommen der Arbeit ganz wesentlich beigetragen haben.

8 Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**„Identifikation und Charakterisierung von GABAergen hippocampo-amygdalären
Projektionsneuronen“**

im Institut für Anatomie

mit Unterstützung durch Prof. Dr. Herbert Schwegler und

 Prof. Dr. Rüdiger Linke

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 01.06.2016

J. Eberhardt

9 Darstellung des Bildungsweges

- seit 11.2014** Assistenzärztin in der Klinik für Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Magdeburg
- 05.2014** Abschluss des Studiengangs Humanmedizin mit dem 2. Staatsexamen
- 2013 – 2014** Praktisches Jahr
1. Terial: Anästhesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Magdeburg, Deutschland
 2. Terial: Innere Medizin/Abteilung Kardiologie, Health Sciences Centre, St. John's, Kanada sowie Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Magdeburg, Deutschland
 3. Terial: Chirurgie, AMEOS Klinikum Schönebeck, Deutschland
- seit 03.2010** Doktorandin am Institut für Anatomie, Arbeitsgruppe Neuroanatomie
- 2007 – 2014** Studium der Humanmedizin an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg und der Medizinischen Universität Innsbruck
- 07.2007** Abitur

wissenschaftliche Vorleistungen

Publikation mit geteilter Erstautorenschaft: Lübke, R.; **Eberhardt**, J.; Röhl, F.; Janitzky, K.; Nullmeier, S.; Stork, O. et al. (2015): Identification and Characterization of GABAergic Projection Neurons from Ventral Hippocampus to Amygdala. In: *Brain sciences* 5 (3), S. 299–317.

Poster: **Fuchs**, J.; Lübke, R.; Stork, O.; Linke, R.; Schwegler, H. (2010): Characterization of gabaergic hippocampal-amygdalar projection neurons. Im Rahmen der 27. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg 2010.

Magdeburg, den 01.06.2016

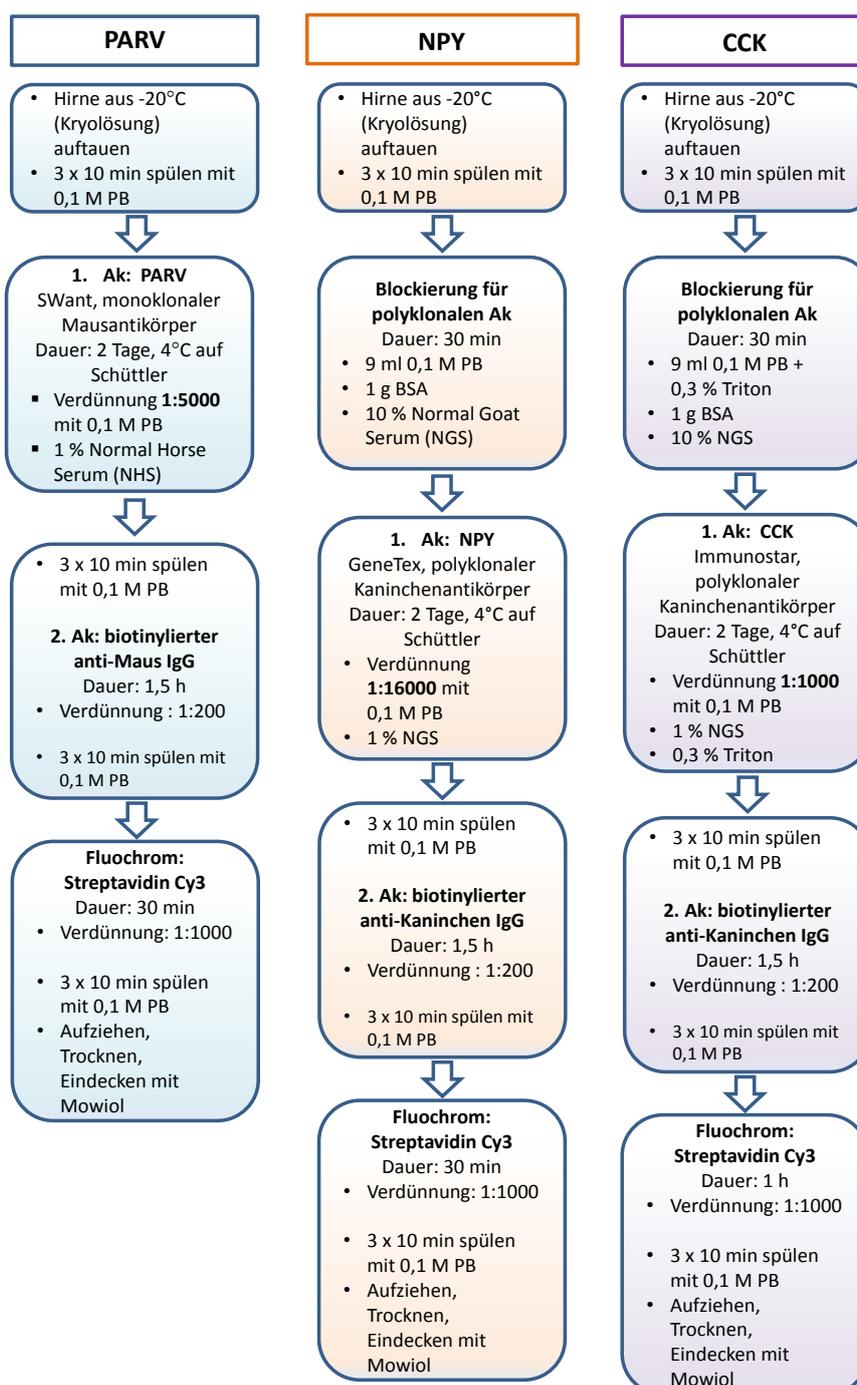
J. Eberhardt

10 Anhang

Anlage 1 - Protokolle der Immunfluoreszenzfärbungen

Allgemeines Vorgehen:

- Hirne in 40 µm dicke Schnitte schneiden, in 4 Serien aufteilen und in 0,1 M PB aufnehmen
- 3x in 0,1 M PB spülen
- direkt mit der Immunfluoreszenzfärbung beginnen oder in kryoprotektiver Lösung bei -20 °C einfrieren, Hinweis: alle Verdünnungen wurden mit 0,1 M PB hergestellt



Anlage 2 – Originaldaten

PARV	FG				GAD			
	Schnitt-Nr.	Str. oriens	Str. pyramidale	Str. moleculare	Summe	Str. oriens	Str. pyramidale	Str. moleculare
222_2-3-4_PARV	153	892	118	1163	24	73	35	132
222_3-1-1-li_PARV	16	590	17	623	7	36	4	47
222_3-1-1_PARV	87	1362	127	1576	14	63	40	117
342_2-3-4_PARV	58	781	50	889	6	46	18	70
342_3-1-1_PARV	16	973	26	1015	7	71	55	133
342_3-1-3_PARV	46	692	9	747	5	112	63	180
386re_2-1-1_PARV	83	1069	57	1209	85	258	122	465
386re_2-1-2_PARV	96	1307	26	1429	47	143	82	272
386re_2-1-3_PARV	57	797	21	875	14	199	78	291
386li_1_3_4_PARV	28	267	7	302	20	115	56	191
386li_1_3_7_PARV	22	155	2	179	13	143	41	197
386li_1_3_8_PARV	22	246	35	303	7	125	47	179
411_4-1-7_PARV	238	1835	328	2401	40	221	179	440
411_4-2-5_PARV	81	1790	129	2000	42	241	55	338
411_4-2-6_PARV	53	2308	87	2448	25	210	85	320
360re_1-3-7_PARV	197	1772	179	2148	24	105	59	188
360re_1-3-8_PARV	56	1699	55	1810	23	139	82	244
360re_1-3-9_PARV	67	1439	58	1564	18	175	68	261
800_3-1-2_PARV	118	2790	85	2993	64	385	309	758
800_3-1-3_PARV	144	2880	57	3081	79	361	264	704
800_3-1-4_PARV	81	2934	70	3085	56	411	172	639
NPY	FG				GAD			
Schnitt-Nr.	Str. oriens	Str. pyramidale	Str. moleculare	Summe	Str. oriens	Str. pyramidale	Str. moleculare	Summe
222_3-1-1_NPY	33	1263	15	1311	8	23	31	62
222_3-1-2_NPY	15	1102	20	1137	2	29	28	59
342_3-1-1-li_NPY	14	1023	36	1073	5	27	27	59
342_3-1-1-re_NPY	11	1116	9	1136	8	59	85	152
342_3-1-3_NPY	9	294	20	323	11	106	46	163
386re_2-1-1_NPY	81	1073	268	1422	27	140	61	228
386re_2-1-2_NPY	68	933	62	1063	32	131	65	228
386re_2-1-3_NPY	48	1340	43	1431	25	124	101	250
386li_1-3-2_NPY	25	298	16	339	19	106	71	196
386li_1-3-5_NPY	13	138	8	159	26	183	90	299
386li_2-1-1_NPY	65	260	24	349	58	193	139	390
800_2-3-3_NPY	235	2485	229	2949	64	423	277	764
800_2-3-4_NPY	187	2635	65	2887	110	346	268	724
800_3-1-3_NPY	255	3057	43	3355	99	398	267	764
360re_2-1-5_NPY	44	1549	129	1722	29	137	74	240
411_4-1-1_NPY	107	2377	97	2581	59	176	36	271
411_4-1-2_NPY	196	2779	260	3235	57	207	39	303
411_4-1-4_NPY	72	3651	78	3801	17	184	19	220
CCK	FG				GAD			
Schnitt-Nr.	Str. oriens	Str. pyramidale	Str. moleculare	Summe	Str. oriens	Str. pyramidale	Str. moleculare	Summe
1512_3-3-1_CCK	241	2633	471	3345	119	361	259	739
1512_3-3-2_CCK	120	2899	157	3176	34	194	273	501
1512_3-3-3_CCK	143	3055	157	3355	84	204	264	552
1523_3-2-1_CCK	27	551	19	597	106	242	252	600
1523_3-2-2_CCK	20	407	33	460	69	257	304	630
1523_3-2-3_CCK	50	501	37	588	123	337	247	707

PARV Schnitt-Nr.	PARV				Doppelmarkierung FG + GAD			
	Str. oriens	Str. pyramidale	Str. moleculare	Summe	Str. oriens	Str. pyramidale	Str. moleculare	Summe
222_2-3-4_PARV	31	99	1	131	22	62	2	86
222_3-1-1-li_PARV	16	109	3	128	2	21	2	25
222_3-1-1_PARV	30	105	4	139	8	38	0	46
342_2-3-4_PARV	5	61	1	67	6	40	3	49
342_3-1-1_PARV	8	42	0	50	0	11	0	11
342_3-1-3_PARV	1	66	1	68	0	18	0	18
386re_2-1-1_PARV	9	56	0	65	1	20	0	21
386re_2-1-2_PARV	11	62	1	74	1	26	0	27
386re_2-1-3_PARV	6	91	3	100	1	21	1	23
386li_1_3_4_PARV	9	47	2	58	1	3	0	4
386li_1_3_7_PARV	3	45	0	48	0	8	1	9
386li_1_3_8_PARV	1	61	0	62	0	11	0	11
411_4-1-7_PARV	8	44	1	53	19	80	12	111
411_4-2-5_PARV	3	55	2	60	6	41	4	51
411_4-2-6_PARV	3	146	2	151	6	32	1	39
360re_1-3-7_PARV	11	74	2	87	8	23	11	42
360re_1-3-8_PARV	3	73	0	76	6	26	11	43
360re_1-3-9_PARV	6	76	2	84	2	38	3	43
800_3-1-2_PARV	11	100	6	117	15	86	6	107
800_3-1-3_PARV	6	106	0	112	9	30	7	46
800_3-1-4_PARV	9	123	0	132	3	13	1	17
NPY Schnitt-Nr.	NPY				Doppelmarkierung FG + GAD			
	Str. oriens	Str. pyramidale	Str. moleculare	Summe	Str. oriens	Str. pyramidale	Str. moleculare	Summe
222_3-1-1_NPY	6	12	4	22	2	4	0	6
222_3-1-2_NPY	10	16	3	29	0	14	0	14
342_3-1-1-li_NPY	0	8	2	10	1	6	0	7
342_3-1-1-re_NPY	4	7	4	15	0	12	0	12
342_3-1-3_NPY	2	2	0	4	0	14	0	14
386re_2-1-1_NPY	9	26	4	39	14	84	14	112
386re_2-1-2_NPY	6	22	1	29	11	62	9	82
386re_2-1-3_NPY	9	51	6	66	2	21	2	25
386li_1-3-2_NPY	7	34	5	46	3	5	1	9
386li_1-3-5_NPY	3	28	2	33	3	12	1	16
386li_2-1-1_NPY	7	25	2	34	18	25	0	43
800_2-3-3_NPY	8	67	8	83	17	161	8	186
800_2-3-4_NPY	5	38	3	46	15	82	3	100
800_3-1-3_NPY	11	33	5	49	14	29	3	46
360re_2-1-5_NPY	4	25	2	31	4	21	3	28
411_4-1-1_NPY	8	45	2	55	13	36	2	51
411_4-1-2_NPY	6	39	0	45	29	114	21	164
411_4-1-4_NPY	3	43	2	48	0	68	2	70
CCK Schnitt-Nr.	CCK				Doppelmarkierung FG + GAD			
	Str. oriens	Str. pyramidale	Str. moleculare	Summe	Str. oriens	Str. pyramidale	Str. moleculare	Summe
1512_3-3-1_CCK	6	27	4	37	85	185	27	297
1512_3-3-2_CCK	5	21	3	29	20	53	19	92
1512_3-3-3_CCK	4	12	6	22	26	33	11	70
1523_3-2-1_CCK	11	20	7	38	13	13	9	35
1523_3-2-2_CCK	9	17	12	38	13	23	28	64
1523_3-2-3_CCK	32	11	11	54	29	37	23	89

PARV Schnitt-Nr.	Dreifachmarkierung FG + GAD + PARV				FG + PARV			
	Str. oriens	Str. pyramidale	Str. moleculare	Summe	Str. oriens	Str. pyramidale	tr. molecular	Summe
222_2-3-4_PARV	14	51	0	65	20	65	0	85
222_3-1-1-li_PARV	0	11	0	11	0	20	0	20
222_3-1-1_PARV	8	33	0	41	15	45	1	61
342_2-3-4_PARV	3	23	0	26	5	38	1	44
342_3-1-1_PARV	0	9	0	9	0	10	0	10
342_3-1-3_PARV	0	14	0	14	0	14	0	14
386re_2-1-1_PARV	0	10	0	10	0	9	0	9
386re_2-1-2_PARV	0	17	0	17	0	18	0	18
386re_2-1-3_PARV	0	8	0	8	0	9	0	9
386li_1_3_4_PARV	1	0	0	1	1	1	0	2
386li_1_3_7_PARV	0	1	0	1	0	1	0	1
386li_1_3_8_PARV	0	2	0	2	0	2	0	2
411_4-1-7_PARV	4	17	0	21	4	17	0	21
411_4-2-5_PARV	1	5	0	6	1	6	0	7
411_4-2-6_PARV	1	20	0	21	1	21	0	22
360re_1-3-7_PARV	2	11	0	13	2	11	0	13
360re_1-3-8_PARV	0	8	0	8	0	9	0	9
360re_1-3-9_PARV	0	7	0	7	0	7	0	7
800_3-1-2_PARV	4	31	0	35	4	30	0	34
800_3-1-3_PARV	0	8	0	8	0	8	0	8
800_3-1-4_PARV	0	0	0	0	0	0	0	0
NPY Schnitt-Nr.	Dreifachmarkierung FG + GAD + NPY				FG + NPY			
	Str. oriens	Str. pyramidale	Str. moleculare	Summe	Str. oriens	Str. pyramidale	tr. molecular	Summe
222_3-1-1_NPY	0	0	0	0	0	0	0	0
222_3-1-2_NPY	0	3	0	3	0	4	0	4
342_3-1-1-li_NPY	0	1	0	1	0	4	0	4
342_3-1-1-re_NPY	0	2	0	2	1	3	0	4
342_3-1-3_NPY	0	2	0	2	0	2	0	2
386re_2-1-1_NPY	2	7	2	11	3	13	3	19
386re_2-1-2_NPY	2	5	1	8	2	7	1	10
386re_2-1-3_NPY	1	4	1	6	1	9	1	11
386li_1-3-2_NPY	0	2	0	2	0	3	0	3
386li_1-3-5_NPY	1	2	1	4	1	2	1	4
386li_2-1-1_NPY	1	4	0	5	1	4	0	5
800_2-3-3_NPY	4	53	2	59	4	54	3	61
800_2-3-4_NPY	2	11	0	13	2	13	0	15
800_3-1-3_NPY	2	7	0	9	3	11	0	14
360re_2-1-5_NPY	2	0	0	2	2	2	0	4
411_4-1-1_NPY	2	6	0	8	2	10	0	12
411_4-1-2_NPY	1	16	0	17	1	20	0	21
411_4-1-4_NPY	0	10	0	10	0	13	0	13
CCK Schnitt-Nr.	Dreifachmarkierung FG + GAD + CCK				FG + CCK			
	Str. oriens	Str. pyramidale	Str. moleculare	Summe	Str. oriens	Str. pyramidale	tr. molecular	Summe
1512_3-3-1_CCK	5	12	0	17	5	16	0	21
1512_3-3-2_CCK	1	7	0	8	1	10	0	11
1512_3-3-3_CCK	1	2	0	3	2	3	0	5
1523_3-2-1_CCK	3	1	0	4	3	2	0	5
1523_3-2-2_CCK	3	7	6	16	3	7	6	16
1523_3-2-3_CCK	13	0	2	15	14	1	2	17

PARV	GAD + PARV			
Schnitt-Nr.	Str. oriens	Str. pyramidale	Str. moleculare	Summe
222_2-3-4_PARV	16	59	0	75
222_3-1-1-li_PARV	3	25	1	29
222_3-1-1_PARV	9	50	0	59
342_2-3-4_PARV	3	24	0	27
342_3-1-1_PARV	0	24	0	24
342_3-1-3_PARV	0	38	1	39
386re_2-1-1_PARV	9	45	0	54
386re_2-1-2_PARV	11	53	0	64
386re_2-1-3_PARV	4	80	1	85
386li_1_3_4_PARV	7	25	0	32
386li_1_3_7_PARV	1	34	0	35
386li_1_3_8_PARV	1	47	0	48
411_4-1-7_PARV	8	36	1	45
411_4-2-5_PARV	3	39	0	42
411_4-2-6_PARV	3	96	0	99
360re_1-3-7_PARV	9	50	1	60
360re_1-3-8_PARV	3	58	0	61
360re_1-3-9_PARV	5	66	1	72
800_3-1-2_PARV	9	71	5	85
800_3-1-3_PARV	4	62	0	66
800_3-1-4_PARV	5	64	0	69
NPY	GAD + NPY			
Schnitt-Nr.	Str. oriens	Str. pyramidale	Str. moleculare	Summe
222_3-1-1_NPY	0	2	1	3
222_3-1-2_NPY	2	4	0	6
342_3-1-1-li_NPY	0	2	0	2
342_3-1-1-re_NPY	0	2	1	3
342_3-1-3_NPY	0	2	0	2
386re_2-1-1_NPY	5	9	3	17
386re_2-1-2_NPY	5	13	1	19
386re_2-1-3_NPY	2	7	4	13
386li_1-3-2_NPY	3	6	0	9
386li_1-3-5_NPY	2	8	2	12
386li_2-1-1_NPY	4	12	1	17
800_2-3-3_NPY	4	64	6	74
800_2-3-4_NPY	4	29	1	34
800_3-1-3_NPY	6	16	4	26
360re_2-1-5_NPY	3	2	1	6
411_4-1-1_NPY	4	17	2	23
411_4-1-2_NPY	4	17	0	21
411_4-1-4_NPY	2	16	1	19
CCK	GAD + CCK			
Schnitt-Nr.	Str. oriens	Str. pyramidale	Str. moleculare	Summe
1512_3-3-1_CCK	5	21	2	28
1512_3-3-2_CCK	2	12	2	16
1512_3-3-3_CCK	2	5	5	12
1523_3-2-1_CCK	13	14	5	32
1523_3-2-2_CCK	9	14	10	33
1523_3-2-3_CCK	19	8	10	37

Tabelle 3 **GABAerge Neuronenverteilung auf Schichten des Hippocampus**

Angegeben sind die Mittelwerte je Hippocampuschicht und Serie in %. In der Spalte Versuchstier ist das entsprechende Tier (Zahl) mit der jeweils durchgeführten Färbung (PV, NPY, CCK) vermerkt (= eine Serie). Es wurden 16 Serien (n = 16) mit insgesamt 45 Schnitten ausgewertet. Die verwendete Anzahl der Schnitte je Serie ist in der Spalte Versuchstier in Klammern vermerkt. so - Stratum oriens, sp - Stratum pyramidale, sm - Stratum moleculare.

GABAerge Neurone in %			
Versuchstier	Hippocampuschichten		
	so	sp	sm
222_PV (3)	15	62	23
222_NPY (2)	8	43	49
342_PV (3)	6	60	34
342_NPY (3)	7	50	43
386re_PV (3)	13	59	28
386re_NPY (3)	12	56	32
386li_PV (3)	7	68	25
386li_NPY (3)	11	55	34
411_PV (3)	10	62	28
411_NPY (3)	16	72	12
360re_PV (3)	10	60	30
360re_NPY (1)	12	57	31
800_PV (3)	9	55	35
800_NPY (3)	12	52	36
1512_CCK (3)	13	42	46
1523_CCK (3)	15	43	42
Mittelwert in %	11	56	33

Tabelle 4

Verteilung der retrograd markierten Projektionsneurone auf Schichten des Hippocampus

Angegeben sind die Mittelwerte je Hippocampuschicht und Serie in %. In der Spalte Versuchstier ist das entsprechende Tier (Zahl) mit der jeweils durchgeführten Färbung (PV, NPY, CCK) vermerkt (= eine Serie). Es wurden 16 Serien (n = 16) mit insgesamt 45 Schnitten ausgewertet. Die verwendete Anzahl der Schnitte je Serie ist in der Spalte Versuchstier in Klammern vermerkt. so - Stratum oriens, sp - Stratum pyramidale, sm - Stratum moleculare.

Projektionsneurone in %			
Versuchstier	Hippocampuschichten		
	so	sp	sm
222_PV (3)	7	86	7
222_NPY (2)	2	97	1
342_PV (3)	5	92	3
342_NPY (3)	2	95	3
386re_PV (3)	7	90	3
386re_NPY (3)	5	86	9
386li_PV (3)	10	85	5
386li_NPY (3)	11	83	6
411_PV (3)	5	87	8
411_NPY (3)	4	91	5
360re_PV (3)	6	89	5
360re_NPY (1)	3	90	7
800_PV (3)	4	94	2
800_NPY (3)	7	89	4
1512_CCK (3)	5	87	8
1523_CCK (3)	6	89	6
Mittelwert in %	5	89	5

Tabelle 5 Verteilung der PARV-, NPY- bzw. CCK-positiven Neurone auf Schichten des Hippocampus
 Angegeben sind die Mittelwerte in % je Serie und Hippocampuschicht. Die verwendeten Schnitte je Serie sind in Klammern vermerkt. Für die Auswertung standen zur Verfügung: PARV - 7 Serien mit 21 Schnitten, NPY - 7 Serien mit 18 Schnitten, CCK - 2 Serien mit 6 Schnitten.

PARV-positive Neurone in %				NPY-positive Neurone in %			
Versuchstier	Hippocampuschichten			Versuchstier	Hippocampuschichten		
	so	sp	sm		so	sp	sm
222_PV (3)	19	79	2	222_NPY (2)	31	55	14
342_PV (3)	8	91	1	342_NPY (3)	26	59	16
386re_PV (3)	12	87	1	386re_NPY (3)	19	73	8
386li_PV (3)	8	91	1	386li_NPY (3)	15	77	8
411_PV (3)	7	90	2	800_NPY (3)	14	77	9
360re_PV (3)	8	91	2	360re_NPY (1)	13	81	6
800_PV (3)	7	91	2	411_NPY (3)	11	86	3
MW in %	10	89	2	MW in %	18	73	9

CCK-positive Neurone in %			
Versuchstier	Hippocampuschichten		
	so	sp	sm
1512_CCK (3)	17	67	16
1523_CCK (3)	37	39	23
MW in %	27	53	20