

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Physiologie I

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. Hans-Christian Pape -

**Modulation neuronaler Aktivität durch Neuropeptid S
im Nucleus paraventricularis anterior thalami der Maus**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von:

Dreesen, Anna Frieda Maria

aus Leonberg

2019

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Mathias Herrmann

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Kay Jüngling

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Guiscard Seebohm

Tag der mündlichen Prüfung: 18.01.2019

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Physiologie I

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Hans-Christian Pape

Referent: Priv.-Doz. Dr. Kay Jüngling

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Guiscard Seebohm

ZUSAMMENFASSUNG

Modulation neuronaler Aktivität durch Neuropeptid S
im Nucleus paraventricularis anterior thalami der Maus

Dreesen

Anna Frieda Maria

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die elektrophysiologischen Effekte des Neuropeptid S (NPS) auf die Neurone des Nucleus paraventricularis anterior thalami (aPVT) der Maus zu untersuchen (Genehmigung zur Organentnahme vom 15.11.2010, 8.87-51.05.20.10.218, LANUV NRW). In vorangegangenen Studien konnte das Wirkprofil des NPS als einerseits anxiolytisch, andererseits Aufmerksamkeit und Wachheit sowie die Freisetzung von Stresshormonen steigernd, Lern- und Gedächtnisprozesse sowie Nahrungsaufnahme und Suchtverhalten beeinflussend charakterisiert werden (3,7,36,44,59,62,73,78,87). Zudem stehen Polymorphismen des NPS-Rezeptors in Zusammenhang mit psychiatrischen Erkrankungen, insbesondere Angsterkrankungen, sowie mit chronisch entzündlichen Erkrankungen und dem zirkadianen Phänotyp (10,11,15,25,41,58). Darüber hinaus exprimieren die Neurone des aPVT neben zahlreichen anderen Arealen des ZNS Rezeptoren für NPS (8,87,88). Dem paraventriculären Thalamus wird eine Rolle in der Verarbeitung emotionaler und viserosensorischer Reize mit anschließender Modulation von Wachheit und Aufmerksamkeit zur Generierung eines adaptiven Verhaltens zugeschrieben (83,86). Das Ziel ist es folglich, die auf zellulärer Ebene zugrunde liegenden Effekte zu verstehen.

Es wurde festgestellt, dass eine Subpopulation von 40 - 50 % der Neurone des aPVT eine Reaktion auf das NPS zeigt. Vom Vorliegen verschiedener Zelltypen ist jedoch aufgrund weitreichender Übereinstimmung der elektrophysiologischen Charakteristika nicht auszugehen. Bei den NPS-responsiven Neuronen kam es durch die Applikation von NPS zu einer Depolarisation des Membranpotentials und einer deutlichen Steigerung der spontanen Aktionspotentialfrequenz. Eine Beeinflussung der synaptischen Übertragung in vitro konnte nicht beobachtet werden.

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Applikation von NPS zu einer Aktivitätssteigerung der Neurone des aPVT führt.

Tag der mündlichen Prüfung: 18.01.2019

Eidesstattliche Erklärung

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel „Modulation neuronaler Aktivität durch Neuropeptid S im Nucleus paraventricularis anterior thalami der Maus“ im Institut für Physiologie I unter Anleitung von PD Dr. rer. nat. Kay Jüngling:

- 1) selbständig angefertigt,
- 2) nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
- 3) keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
- 4) sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Memmingen, 20.02.2019

.....
Anna Dreesen

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Neuropeptid S.....	1
1.1.1	Chemische Struktur.....	1
1.1.2	Vorkommen.....	2
1.2	Neuropeptid S-Rezeptoren.....	2
1.2.1	G-Protein gekoppelte Rezeptoren.....	3
1.2.2	G-Proteine.....	3
1.2.3	Desensibilisierung.....	4
1.2.4	Zelluläre Effekte der Aktivierung des Neuropeptid S-Rezeptors.....	5
1.2.5	Vorkommen.....	5
1.3	Effekte des Neuropeptid S in vivo und in vitro.....	6
1.3.1	Neuropeptid-S-Rezeptor-Defizienz.....	8
1.3.2	Neuropeptid-S-Rezeptor-Varianten.....	8
1.4	Der paraventriculäre Thalamus.....	9
1.4.1	Afferente Neurone.....	10
1.4.2	Efferente Neurone.....	10
1.4.3	Funktionen des paraventriculären Thalamus.....	10
1.4.3.1	Nucleus paraventricularis anterior thalami.....	11
1.4.3.2	Aufmerksamkeit und Wachheit regulierende Systeme.....	13
1.4.3.3	Furchtgedächtnis und -reaktionen.....	14
1.5	Glutamat-Rezeptoren.....	14
1.5.1	Ionotrope Glutamat-Rezeptoren.....	14
1.5.1.1	Ampa- und Kainat-Typ.....	14
1.5.1.2	NMDA-Typ.....	15
1.5.2	Metabotrope Glutamat-Rezeptoren.....	15
1.6	GABA-Rezeptoren.....	16
1.6.1	Ionotrope GABA-Rezeptoren.....	16
1.6.2	Metabotrope GABA-Rezeptoren.....	16
1.7	Zielsetzung der Arbeit.....	16
2	Material und Methoden.....	18
2.1	Lösungen.....	18
2.2	Pharmaka.....	21

2.3	Präparation der Gehirnschnitte	22
2.4	Elektrophysiologische Untersuchungen	22
2.4.1	Methodik der Patch-Clamp-Technik	22
2.4.2	Der Versuchsaufbau	23
2.4.3	Experimente in der Cell-attached-Konfiguration	26
2.4.3.1	Spontane Aktionspotentialfrequenz	26
2.4.4	Experimente in der Whole-cell-Konfiguration	27
2.4.4.1	Charakterisierung der Neurone des aPVT	27
2.4.4.2	Potentialverlauf und spontane Aktionspotentialfrequenz	28
2.4.4.3	Spontane exzitatorische postsynaptische Ströme (sEPSC)	29
2.4.4.4	Spontane inhibitorische postsynaptische Ströme (sIPSC)	29
2.4.5	Auswertung	30
3	Ergebnisse	31
3.1	Verlauf des Membranpotentials	31
3.2	Spontane Aktionspotentialfrequenz	33
3.3	Aktive und passive Membraneigenschaften	47
3.4	Spontane exzitatorische postsynaptische Ströme (sEPSC)	49
3.5	Spontane inhibitorische postsynaptische Ströme (sIPSC)	53
4	Diskussion	57
4.1	Vorkommen von NPS-positiven Fasern und Npsr1 im aPVT der Maus	57
4.2	Effekte des NPS auf Neurone des aPVT	58
4.2.1	Vorkommen NPS-responsiver und NPS-nicht-responsiver Neurone	58
4.2.2	Elektrophysiologische Charakteristika der Neurone des aPVT	58
4.2.3	Depolarisation des Membranpotentials durch NPS	60
4.2.4	Steigerung der spontanen Aktionspotentialfrequenz durch NPS	62
4.2.5	Spontane postsynaptische Ströme	64
4.2.5.1	Spontane exzitatorische postsynaptische Ströme	64
4.2.5.2	Spontane inhibitorische postsynaptische Ströme	64
4.2.5.3	Synaptische Übertragung	65
4.3	Bedeutung der NPS-Effekte im aPVT für neuronale Netzwerke	66
4.3.1	Steigerung von Wachheit und Aufmerksamkeit	66
4.3.2	Beeinflussung des Furchtgedächtnisses sowie der Furchtreaktionen	67
4.4	Pathophysiologische Relevanz	68

4.4.1	Erkrankungen mit Dysregulation von Aufmerksamkeit und Wachheit	68
4.4.2	Angsterkrankungen	70
5	Zusammenfassung	73
6	Literaturverzeichnis	75
7	Anhang	I
7.1	Abkürzungsverzeichnis	I
7.2	Lebenslauf	III
7.3	Danksagung	IV
7.4	Genehmigung der Organentnahme	V

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Aminosäuresequenzen des NPS der Maus, der Ratte und des Menschen.....	1
Abbildung 1-2: Anatomische Lokalisation des paraventriculären Thalamus.....	9
Abbildung 1-3: Anatomie des Nucleus paraventricularis anterior thalami	11
Abbildung 1-4: Morphologie eines Neurons des Nucleus paraventricularis anterior thalami.....	12
Abbildung 1-5: Nachweis von NPS im aPVT	13
Abbildung 2-1: Aufbau einer Patch-clamp-Ableitung in Cell-attached-Technik.....	24
Abbildung 2-2: Aufbau einer Patch-clamp-Ableitung in Whole-cell-Technik	25
Abbildung 2-3: Stimulationsprotokoll zur Charakterisierung	28
Abbildung 3-1: Whole-cell-Messungen des Membranpotentials	33
Abbildung 3-2: Beispielspuren der Cell-attached-Messungen	35
Abbildung 3-3: Cell-attached-Messungen der spontanen Aktionspotentialfrequenz (Absolutwerte).....	38
Abbildung 3-4: Cell-attached-Messungen der spontanen Aktionspotentialfrequenz (normierte Werte).....	39
Abbildung 3-5: Beispielspuren der spontanen Aktionspotentialfrequenzen	41
Abbildung 3-6: Whole-cell-Messungen der spontanen Aktionspotentialfrequenz.....	44
Abbildung 3-7: Whole-cell-Messungen der spontanen Aktionspotentialfrequenz (ausschließlich spontan aktive Neurone)	46
Abbildung 3-8: Charakterisierung der NPS-responsiven und NPS-nicht-responsiven Neurone	47
Abbildung 3-9: Beispielspuren der sEPSC bei 0,5 μ M NPS.....	50
Abbildung 3-10: sEPSC bei 0,25 μ M NPS.....	52
Abbildung 3-11: sEPSC bei 0,5 μ M NPS.....	53
Abbildung 3-12: Beispielspuren der sIPSC	54
Abbildung 3-13: sIPSC bei 0,5 μ M NPS	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Präparationslösung.....	18
Tabelle 2-2: Präinkubationslösung (Stammlösung wird 10fach verdünnt).....	19
Tabelle 2-3: Artificielle cerebro-spinale Flüssigkeit (ACSF).....	19
Tabelle 2-4: Intrazelluläre Lösung Nr. 2 (Kaliumgluconat).....	20
Tabelle 2-5: Intrazelluläre Lösung Nr. 7 (Kaliumchlorid).....	21
Tabelle 2-6: Pharmaka.....	21
Tabelle 3-1: Passive Membraneigenschaften.....	48
Tabelle 3-2: Aktive Membraneigenschaften.....	49

1 Einleitung

Eine wichtige Rolle in der Regulierung vielfältiger physiologischer Funktionen innerhalb des menschlichen Körpers liegt bei dem zentralen Nervensystem (ZNS). Im Rahmen einer Dysregulation von verschiedensten Regelkreisen kann es zur Entwicklung sehr unterschiedlicher medizinischer Krankheitsbilder kommen. Um sowohl die physiologischen als auch die pathologischen Funktionsweisen zu verstehen, erfordert es zunächst ein grundlegendes Verständnis der betroffenen Regelkreise.

Die Kommunikation der Neurone des ZNS basiert auf der Ausschüttung verschiedenster Neurotransmitter. Diese Botenstoffe können anhand ihrer chemischen Beschaffenheit in drei große Gruppen unterteilt werden: Aminosäuren, Monoamine und Peptide. Zu letzteren gehört auch das Neuropeptid S, dessen Wirkung auf die Neurone des Nucleus paraventricularis anterior thalami untersucht wurde.

1.1 Neuropeptid S

Das Neuropeptid S und sein zugehöriger spezifischer Rezeptor wurden erstmals 2004 von Xu und Mitarbeitern als ein neues Transmittersystem innerhalb des ZNS beschrieben (87).

1.1.1 Chemische Struktur

Das Neuropeptid S (NPS) ist ein Peptid, welches aus 20 Aminosäuren aufgebaut und nach seinem aminoterminalen Serinrest benannt ist (87). Eine Analyse von Genom-Datenbanken verschiedener Spezies zeigte, dass das Gen für NPS nur in Landwirbeltieren, nicht aber in Fischen nachgewiesen werden kann (72). Zudem weist die Aminosäuresequenz des NPS verschiedener Spezies nur geringe Unterschiede auf und somit scheint das NPS erst relativ spät im Verlauf der Evolution entstanden zu sein (72). Die Abbildung 1-1 zeigt eine Gegenüberstellung der Aminosäuresequenz des NPS von Maus, Ratte und Mensch. Hier wird die weitestgehende Homologie der Primärstrukturen sichtbar.

S F R N G V G S G A K K T S F R R A K Q	Maus
S F R N G V G S G V K K T S F R R A K Q	Ratte
S F R N G V G T G M K K T S F Q R A K S	Mensch

Abbildung 1-1: Aminosäuresequenzen des NPS der Maus, der Ratte und des Menschen
Zwischen den Spezies abweichende Aminosäuren sind grau hinterlegt (87)

1.1.2 Vorkommen

Das NPS wird größtenteils zentralnervös, hauptsächlich von Neuronen des Hirnstamms, aus einem Vorläuferprotein gebildet (87,88). Mit Hilfe von In-Situ-Hybridisierung der mRNA des NPS-Vorläuferpeptids konnte nachgewiesen werden, dass NPS bei Mäusen innerhalb des Hirnstamms insbesondere in zwei Regionen synthetisiert wird (8). Die eine Region liegt in der Nähe des Locus coeruleus, genauer gesagt zwischen diesem und dem pontinen Miktionszentrum (Barrington's nucleus) (8). Hierbei handelt es sich vor allem um Neurone, welche ebenfalls Glutamat und in geringem Maße Acetylcholin enthalten (48,88). Die andere Region befindet sich in der Nähe des Nucleus parabrachialis lateralis und wird auch als Nucleus subparabrachialis (Kölliker-Fuse) bezeichnet (8). Für diese Neurone konnte eine Koexpression von Corticoliberin (Synonym: corticotropin releasing hormone / factor (CRH / CRF)) nachgewiesen werden (48,88). Bei Ratten kommt noch eine dritte Region, der sensorische Nucleus principalis des Nervus trigeminus, hinzu (87). Diese Neurone exprimieren zusätzlich Glutamat (88). Insgesamt wird somit deutlich, dass das NPS hauptsächlich in Neuronen nachgewiesen werden konnte, welche exzitatorische Neurotransmitter synthetisieren. Bei Ratten wird NPS zudem von einzelnen, außerhalb des Hirnstamms gelegenen Neuronen exprimiert. Diese sind in der Amygdala und dem Hypothalamus lokalisiert (88). Bei Mäusen konnte dies nicht festgestellt werden (8).

Außerhalb des zentralen Nervensystems kommt das NPS vor allem in endokrinen Geweben vor (64,87).

1.2 Neuropeptid S-Rezeptoren

Der Neuropeptid S-Rezeptor (NPSR) ist ein typischer G-Protein gekoppelter Rezeptor. Er weist eine spezifische Bindungsstelle mit hoher Affinität für das oben beschriebene NPS auf und wird bereits durch nanomolare NPS-Konzentrationen aktiviert (69,87). Diese Eigenschaften der hohen Rezeptor-Affinität und der hohen Potenz treffen auch auf andere typische Neuropeptide zu (70).

Bei Mäusen und Ratten wurde nur eine Isoform des NPS-Rezeptors nachgewiesen, die in der Literatur üblicherweise als Npsr1 bezeichnet wird (87). Beim Menschen entstehen durch alternatives Splicing der mRNA verschiedene Isoformen des NPSR1 (85).

1.2.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Ein typischer G-Protein gekoppelter Rezeptor setzt sich aus bestimmten Grundkomponenten zusammen.

Das eigentliche Rezeptorprotein, dessen N-terminales Ende extrazellulär gelegen ist, durchspannt mit sieben transmembranösen Abschnitten die Zellmembran (33). Das C-terminale Ende befindet sich auf der intrazellulären Seite der Zellmembran und bildet zusammen mit der zweiten und dritten zytoplasmatischen Schleife des Rezeptorproteins die Interaktionsstelle für das G-Protein (24).

Bindet der spezifische Ligand des G-Protein gekoppelten Rezeptors, so erfolgt eine Aktivierung des G-Protein gekoppelten Rezeptors (33). Das somit generierte Aktivierungssignal wird im Folgenden über die transmembranöse Domäne des Rezeptors fortgeleitet und schließlich an zytoplasmatische Signalmoleküle weitergegeben (33). Im Rahmen dieser Weiterleitung wird zunächst die Bindung von GTP an das G-Protein, welches über diesen Mechanismus aktiviert wird, begünstigt (75). Dadurch wird die Aktivität verschiedenster Effektorproteine beeinflusst, sodass es zu einer Verstärkung des ursprünglichen Signals kommt (75). Darüber hinaus ist es möglich, dass mit Hilfe eines G-Proteins Informationen verschiedener Rezeptoren integriert werden, ebenso wie es zu einer divergenten Weiterleitung des Signals eines Rezeptors an mehrere Effektoren kommen kann (75). Zu den Effektorproteinen zählen sowohl Enzyme, die zytoplasmatische second messenger synthetisieren, als auch Ionenkanäle und verschiedenste Transportproteine (75).

Somit spielen die G-Proteine eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Synthese und Ausschüttung von Neurotransmittern, der Sensitivität synaptischer Rezeptoren, dem allgemeinen Zellstoffwechsel, der Zelldifferenzierung und dem Zellwachstum (75).

1.2.2 G-Proteine

Jedes G-Protein setzt sich aus drei Untereinheiten zusammen. Die α -Untereinheit bindet GTP, wird hierdurch aktiviert und löst sich von der $\beta\gamma$ -Untereinheit (23,75). Nun können sowohl die α - als auch die $\beta\gamma$ -Untereinheit verschiedene Effektorproteine oder Ionenkanäle aktivieren (23). Je nach dem Subtyp der α -Untereinheit wird das G-Protein auch als G_s -, G_i - oder G_q -Protein bezeichnet (23). Liegt eine α_s -Untereinheit vor, so stimuliert diese die Adenylatzyklase (52). In der Folge kommt es zu einem Anstieg der Konzentration des zyklischen

Adenosinmonophosphats (cAMP) (52). Dieses wiederum steigert die Aktivität der Proteinkinase A, beeinflusst Transkriptionsfaktoren und Ionenkanäle (52). Die α_i -Untereinheit hingegen hemmt die Adenylatzyklase und führt dadurch zu einer verminderten Konzentration des cAMP (52). Die α_q -Untereinheit aktiviert die Phospholipase β (52). Hierdurch wird einerseits vermehrt Inositoltriphosphat (IP_3) synthetisiert, welches eine Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern bewirkt (52). Andererseits wird vermehrt Diacylglycerol (DAG) gebildet, welches die Proteinkinase C aktiviert (52).

Die durch die GTP-Bindung ausgelöste Aktivierung der α -Untereinheit ist allerdings nur transient. Nach einer gewissen zeitlichen Latenz wandelt diese das GTP zu GDP, das nicht zu einer Aktivierung führt, um (75).

1.2.3 Desensibilisierung

Die Desensibilisierung der G-Protein gekoppelten Rezeptoren vollzieht sich auf verschiedenen Ebenen.

Einerseits werden transkriptionelle und translationelle Vorgänge beeinflusst und die Dichte der Rezeptorproteine in der Zellmembran über die Degradierung durch Proteasen herabgesetzt (43). Andererseits führen kovalente Modifikationen der Rezeptoren und ihre Assoziation mit anderen Proteinen bzw. ihre Lokalisation in der Zelle zu einer schnellen Veränderung der Sensitivität des Rezeptorweges (43). Im Mittelpunkt stehen drei Gruppen modulatorischer Proteine, welche sich aus durch second messenger regulierten Kinasen, G-Protein-regulierten Kinasen und Arrestinen zusammensetzen.

Die durch second messenger regulierten Kinasen führen über den Mechanismus des negativen Feedbacks zu einer heterologen bzw. nicht Agonisten-spezifischen Desensibilisierung des Rezeptorweges. Kommt es durch die Stimulation eines G_s -Protein gekoppelten Rezeptors zur Aktivierung der Proteinkinase A, so phosphoryliert eben diese aktivierte Proteinkinase A im Folgenden Serinreste der intrazellulären Abschnitte des Rezeptors und führt damit zu einer Hemmung der Anlagerung eines G-Proteins. Dieser Ablauf kann ebenso für die durch ein G_q -Protein aktivierte Proteinkinase C angenommen werden (43).

Der Prozess der schnellen, homologen bzw. Agonist-spezifischen Desensibilisierung erfolgt durch das Zusammenspiel von G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK) und β -Arrestinen. Zunächst wird der Agonist-besetzte Rezeptor durch eine GRK phosphoryliert, um

die anschließende Bindung des β -Arrestins, welches die Anlagerung eines G-Proteins sterisch verhindert, zu ermöglichen (43).

Zudem kann es zur Endozytose der Rezeptoren kommen, sodass eine Bindung des extrazellulär befindlichen Liganden an den Rezeptor unterbunden wird (43).

1.2.4 Zelluläre Effekte der Aktivierung des Neuropeptid S-Rezeptors

Der aktivierte Rezeptor koppelt sowohl an ein G_s - als auch ein G_q -Protein (71). In der Folge kommt es so vermittelt durch ein G_q -Protein zu einer Aktivierung der Phospholipase C- β sowie vermittelt über ein G_s -Protein zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase (71). Durch die aktivierte Phospholipase C- β wird ein Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration ausgelöst. Durch die Aktivierung der Adenylatzyklase wird vermehrt cAMP synthetisiert (71). Dieses kann wiederum Proteinkinasen aktivieren, beispielsweise die MAP-Kinase (mitogen-activated protein) durch Phosphorylierung, und damit die Transkription beeinflussen (71).

1.2.5 Vorkommen

Die Verteilung der Neuropeptid S-Rezeptor-mRNA (Npsr1-mRNA) innerhalb des ZNS wurde zunächst 2004 und 2007 von Xu und Mitarbeitern an Ratten mit Hilfe von In-situ-Hybridisierung untersucht (87,88). Sie wiesen die NPS-Rezeptor-mRNA in Bereichen nach, welche im Zusammenhang mit Angst und Stress stehen. Hierbei handelt es sich um die Amygdala, bestimmte Kerngebiete des Hypothalamus, gewisse Raphe-Kerne und die Area tegmentalis ventralis. Darüber hinaus fand sich die Npsr1-mRNA in Arealen, welche für die Regulation von Aufmerksamkeit und Wachheit zuständig sind. Hier sind verschiedene thalamische Mittellinienkerne, Orexin exprimierende Kerngebiete des Hypothalamus, Histamin synthetisierende Neurone des Nucleus tuberomamillaris und dopaminerge Neurone der Substantia nigra sowie der Area tegmentalis ventralis zu nennen. Zudem wird die Npsr1-mRNA in hypothalamischen Kernen, welche den Schlaf regulieren, exprimiert. Des Weiteren ließ sich die Npsr1-mRNA in Arealen des Hippocampus, welcher eine zentrale Rolle für Lern- und Gedächtnisprozesse besitzt, nachweisen. Dabei handelt es sich einerseits um afferente Neurone des lateralen entorhinalen Kortex sowie des endopiriformen Kortex und andererseits um efferente Neurone des Subiculum sowie des Prä- und Parasubiculum. Hinzu kommt, dass Npsr1-mRNA in hypothalamischen Kerngebieten exprimiert wird, welche die Ernährung/Nahrungszufuhr regulieren. Schließlich muss noch das Vorkommen der Npsr1-mRNA in

Neuronen des olfaktorischen Systems, wie beispielsweise dem Bulbus olfactorius oder der Inselrinde genannt werden.

Clark und Mitarbeiter publizierten 2011 die Ergebnisse ihrer Studie über die anatomische Lokalisation des NPS und *Npsr1* bei Mäusen. Auch sie wiesen die Expression der *Npsr1*-mRNA mittels In-situ-Hybridisierung nach. Der Vergleich mit den Erkenntnissen aus vorangegangenen Studien an Ratten zeigte eine weitestgehende Übereinstimmung der *Npsr1*-mRNA exprimierenden Areale des ZNS. Insgesamt konnte allerdings für die Maus eine umfassendere Expression der *Npsr1*-mRNA als bei der Ratte beobachtet werden. Die relevantesten Unterschiede betreffen die Amygdala und den Kortex. Bei Mäusen wird die *Npsr1*-mRNA im Gegensatz zur Ratte beispielsweise in der basolateralen Amygdala, nicht aber in der Gruppe der interkalierten Neurone exprimiert. Zudem wurde eine dichtere und zugleich ausgedehntere kortikale Expression der *Npsr1*-mRNA festgestellt (8).

Ob diese Unterschiede zwischen den Spezies durch das Vorliegen verschiedener neuronaler Regelkreise oder sogar unterschiedlicher Funktionen bedingt sind, kann zurzeit noch nicht beantwortet werden (8).

1.3 Effekte des Neuropeptid S in vivo und in vitro

Bei der Analyse der anatomischen Lokalisation des NPS und *Npsr1* innerhalb des ZNS fiel auf, dass diese in Arealen vorkommen, welche für die Regulation des Schlaf-Wach-Zyklus sowie der Aufmerksamkeit und der Nahrungsaufnahme, für Lern- und Gedächtnisprozesse und nicht zuletzt für die Verarbeitung von Emotionen und Gerüchen von Bedeutung sind (8).

In mehreren Verhaltensexperimenten an Nagern wurden die Effekte des NPS in vivo untersucht. Die ersten Ergebnisse von Verhaltensstudien bei Mäusen wurden von Xu und Mitarbeitern 2004 veröffentlicht. Nach intracerebroventrikulärer (i.c.v.) Applikation von NPS zeigten die Mäuse eine erhöhte lokomotorische Aktivität (mit und ohne vorherige Gewöhnung an die Umgebung) sowie Wachheit. Zudem beschrieben Xu und Mitarbeiter 2004 einen anxiolytischen Effekt des NPS nach i.c.v.-Applikation. Sie verwendeten anerkannte Tests zur Quantifizierung von Furcht wie „open field test“, „elevated plus maze“ oder „light-dark box“. Nach i.c.v.-Applikation des NPS verbrachten die Mäuse mehr Zeit in den ungeschützten Bereichen. Um einen von der gesteigerten lokomotorischen Aktivität unabhängigen anxiolytischen Effekt nachzuweisen, untersuchten sie zusätzlich den Effekt des NPS im „marble burying“-Test. Nach i.c.v.-Applikation des NPS zeigte sich die reduzierte Angst über eine

Verkürzung der Zeit, in der die Mäuse die Murmeln vergruben. In dieser ersten Verhaltensstudie zeigte sich folglich ein Wirkungsprofil, welches bisher bei keinem anderen Neurotransmitter in dieser Art beobachtet werden konnte. NPS vereint sowohl einen anxiolytischen als auch einen Wachheit und Aufmerksamkeit steigernden Effekt (87). Im Gegensatz hierzu weisen viele klassische Anxiolytika einen sedierenden Nebeneffekt auf und viele Stimulantien wirken gleichzeitig anxiogen.

Der Effekt der gesteigerten lokomotorischen Aktivität nach i.c.v.-Applikation von NPS auf Mäuse konnte mehrfach reproduziert werden (73,76). In einer weiteren Studie an Ratten beobachtete man nach i.c.v.-Applikation von NPS ebenfalls eine Steigerung der lokomotorischen Aktivität, eine Reduktion des Schlafes und zusätzlich eine erhöhte Aufzuchtaktivität (78). Darüber hinaus gelang es, den anxiolytischen Effekt bei Mäusen in weiteren Tests („four-plate test“, „elevated zero maze“, stressinduzierte Hyperthermie) zu reproduzieren (44). Zusätzlich wurden sowohl der anxiolytische als auch der Aktivität steigernde Effekt des NPS im Vergleich zu einem typischen Anxiolytikum und Stimulans untersucht. Die i.c.v.-Applikation von NPS und die intraperitoneale Gabe von Coffein, einem typischen Stimulans, lösten gleichermaßen eine Steigerung der lokomotorischen Aktivität der Mäuse aus. Ebenso war die anxiolytische Wirkung nach i.c.v.-Applikation mit der nach intraperitonealer Gabe von Diazepam, einem typischen Anxiolytikum, vergleichbar (73).

Allerdings beobachtete man in weiteren Studien zusätzliche Effekte des NPS. Durch Stress oder lokale Depolarisation kommt es in der Amygdala zu einem Anstieg der NPS-Konzentration (18). Es wurde gezeigt, dass NPS über die Amygdala die Bildung und Löschung von Inhalten des Furchtgedächtnisses beeinflusst (7,35,51). Die Applikation von N-[(4-fluorophenyl)methyl]-3-oxo-1,1-diphenyl-5,6,8,8a-tetrahydro-[1,3]oxazolo[3,4-a]pyrazin-7-carboxamid (SHA 68), eines NPSR-Antagonisten (60), führte zum gegenteiligen Ergebnis (7,35). In weiteren Experimenten wurde deutlich, dass NPS nicht nur die Konsolidierung aversiver, sondern auch nicht aversiver Gedächtnisinhalte fördert (62). Somit spielt NPS eine Rolle bei Lern- und Gedächtnisprozessen. Darüber hinaus zeigte sich ein Einfluss auf die Nahrungsaufnahme, der in der Regel zu einer Gewichtsreduktion der Versuchstiere führte (3,54,78). Dieser Effekt wird möglicherweise über eine Depolarisation von Neuronen des ventromedialen Hypothalamus, ausgelöst durch NPS, vermittelt (90). Zudem stimuliert NPS die Freisetzung von Stresshormonen über die Hypothalamus-Hypophysenachse und es kommt zu einem Anstieg von Corticoliberin und Vasopressin (78). Des Weiteren stellte man fest, dass NPS das Suchtverhalten substanzabhängiger Versuchstiere beeinflusst. Es führte im

Gegensatz zu den NPSR-Antagonisten (SHA 68 und [D-Cys(tBu)(5)]NPS), welche einen verminderten bedingten Wiedereinsatz des Konsums hervorriefen, zu einer Steigerung desselben (36). Durch die Gabe von NMDA-Rezeptorantagonisten kann es zur Entwicklung psychotischer Verhaltensmuster kommen. NPS wirkte neuroprotektiv auf zuvor durch den NMDA-Rezeptorantagonisten MK-801 geschädigte Neurone des retrosplenialen Kortex (61).

1.3.1 Neuropeptid-S-Rezeptor-Defizienz

In Studien an homozygot und heterozygot *Npsr1* defizienten Mäusen, deren Verhalten mit dem der Wildtyp-Mäuse verglichen wurde, konnten wichtige Rückschlüsse auf die Auswirkungen des Fehlens eines funktionsfähigen NPS-Systems gezogen werden.

Die *Npsr1* defizienten Mäuse zeigten eine Reduktion der Aktivität (17,20). Darüber hinaus beobachteten Duangdao und Mitarbeiter eine Steigerung angstassoziierter Verhaltensweisen als auch der motorischen Leistungsfähigkeit (17). Fendt und Mitarbeiter konnten keinen relevanten anxiogenen Effekt nachweisen (20). In einer weiteren Studie zeigten männliche *Npsr1* defiziente Mäuse ein vermehrt depressives Verhalten sowie eine verminderte akustische Schreckreaktion. Dies wurde als reduzierte Reaktion auf aversive Stimuli gedeutet. Zudem wiesen sie ein schlechteres räumliches Lernen auf (93). Übereinstimmend wurde in allen Studien festgestellt, dass die typischerweise durch i.c.v. Applikation von NPS ausgelösten Effekte bei den *Npsr1* defizienten Mäusen im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen ausblieben (17,20,93).

1.3.2 Neuropeptid-S-Rezeptor-Varianten

Der größte Anteil der genetischen Variabilität verschiedener Individuen besteht in dem Austausch einzelner Basenpaare der DNA. Diese werden als Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP: „single nucleotide polymorphism“) bezeichnet. Befinden sie sich in kodierenden Bereichen der DNA und führen sie zu einem Austausch der kodierten Aminosäure, können sich auch die Eigenschaften des kodierten Proteins, wie beispielsweise eines Rezeptors, verändern.

Beim Menschen wurde bereits nachgewiesen, dass gewisse Polymorphismen des NPSR1 mit bestimmten Krankheiten assoziiert sind. Dies wurde bei einigen chronisch entzündlichen Erkrankungen wie Asthma bronchiale (41), chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (10) und rheumatoider Arthritis (11) beobachtet. Zudem wurde eine Assoziation einer NPSR1-Isoform mit Panikerkrankungen gefunden (15,58). In einer weiteren Studie konnte eine

Häufung bestimmter Persönlichkeitsmerkmale, wie sie bei Patienten mit Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom (ADHS) vorkommen, und eine vermehrte Impulsivität in Assoziation mit einer bestimmten NPSR1-Isoform beobachtet werden (39,40). Darüber hinaus wurde ein Zusammenhang zwischen verschiedenen NPSR1-Isoformen und dem circadianen Phänotyp beobachtet (25).

1.4 Der paraventriculäre Thalamus

Der paraventriculäre Thalamus (PVT) ist ein Teil der thalamischen Mittellinienkerne und erstreckt sich rostral von der Massa intermedia und dem Nucleus reuniens bis dorsal zu den Nuclei habenulares. Dabei verläuft er direkt ventral entlang des dritten Ventrikels und wird laterodorsal vom Nucleus mediodorsalis begrenzt (83). Die Abbildung 1-2 verdeutlicht die anatomische Lokalisation des PVT anhand einer Schemazeichnung des Mausgehirns.

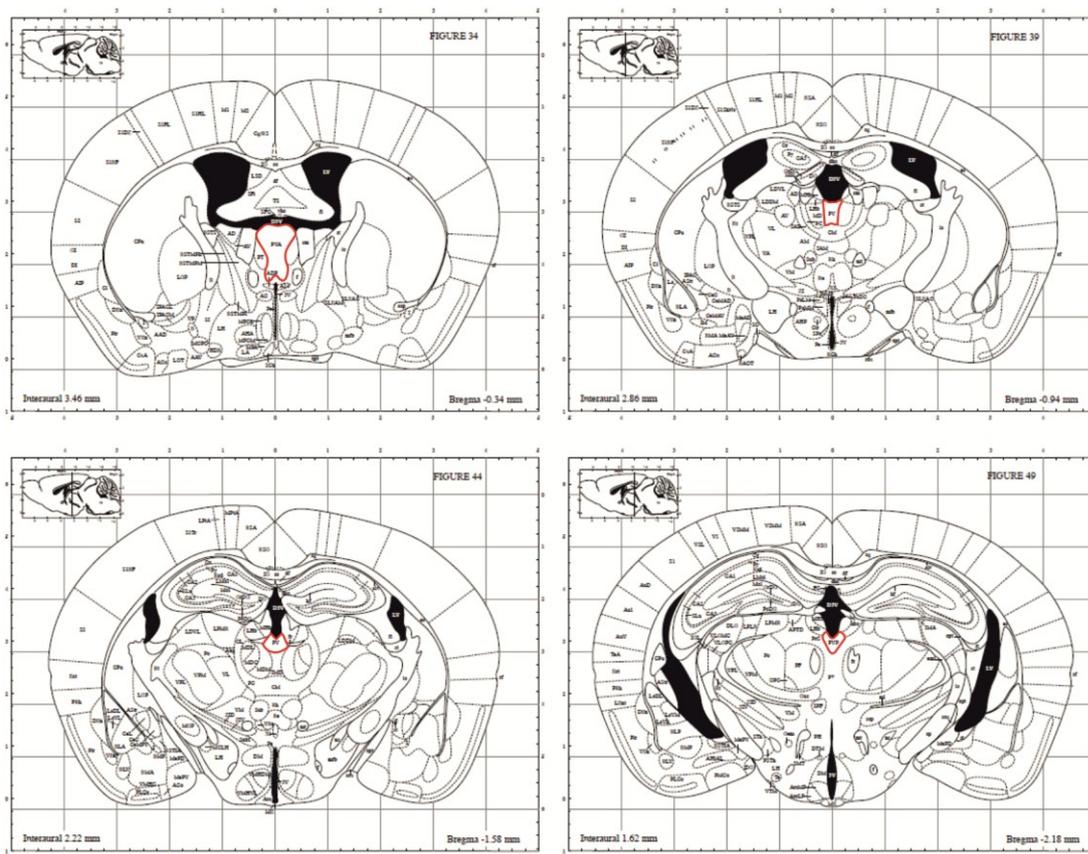


Abbildung 1-2: Anatomische Lokalisation des paraventriculären Thalamus

Schematische Darstellung der Ausdehnung des PVT (rote Umrandung) im Mausgehirn im Koronarschnitt (links oben: rostral; rechts unten kaudal; jeweils 6 mm Abstand zwischen den Schnittebenen) (66)

1.4.1 Afferente Neurone

Der PVT von Ratten erhält sehr viele aminerge Afferenzen. Darunter befinden sich sehr viele dopaminerge Eingänge aus der Area tegmentalis ventralis und der retrorubralen Region. Weiterhin gibt es noradrenerge Eingänge, die vom Locus coeruleus und dem Nucleus tractus solitarii ausgehen, histaminerge Afferenzen vom Nucleus tuberomamillaris, und serotonerge Afferenzen aus dem Nucleus dorsalis raphe. Darüber hinaus erreichen den PVT kortikale Afferenzen aus dem Subiculum und dem infralimbischen Kortex. Schließlich empfängt er ebenfalls Informationen aus dem Nucleus parabrachialis, dem Nucleus interstitialis der Stria terminalis, dem dorsomedialen Hypothalamus, den Nuclei supramamillares und dem Nucleus centralis der Amygdala (83).

1.4.2 Efferente Neurone

Die Informationen des PVT werden in dienzephalen, subkortikale und kortikale Bereiche des Rattengehirns weitergeleitet.

Die dienzephalen Efferenzen erstrecken sich in verschiedene Kerne des Thalamus, darunter die Nuclei parataenialis, (inter-)mediodorsalis, rhomboideus, reuniens et reticularis. Zudem werden im Hypothalamus die Area praeoptica, der Nucleus suprachiasmaticus, die Nuclei paraventricularis, dorsomedialis, ventromedialis, posteromedialis, posterior et anterior hypothalami, das laterale Gebiet des Hypothalamus, sowie der Nucleus arcuatus efferent innerviert (83).

Subkortikale Zielgebiete sind das Striatum, der Nucleus accumbens, das Putamen, subkommissural gelegene Neurone des Striatum, die Amygdala, der Nucleus interstitialis der Stria terminalis und das Claustrum (83).

Schließlich erreichen kortikale Efferenzen vor allem den präfrontalen Kortex, aber auch den anterioren cingulären Kortex, den medialen orbitalen Kortex, den anterioren olfactorischen Kern, die Taenia tecta, den entorhinalen und teils perirhinalen Kortex, das Prä-, Para- und das ventrale Subiculum (83).

1.4.3 Funktionen des paraventriculären Thalamus

Anhand der weitreichenden Analogie der Anatomie bezüglich der Afferenzen und Efferenzen bestimmter Gehirnareale bei verschiedenen Spezies können der paraventriculäre, der

in ventrolateraler Richtung zum lateralen Hypothalamus. Von dort aus gibt es drei hauptsächliche Bahnen. Die hauptsächlichen Zielgebiete sind die Amygdala und umgebende Kortex-Anteile, das Striatum und der präfrontale Kortex im Vorderhirn und schließlich weitere Anteile des Hypothalamus (86).

Die Abbildung 1-4 zeigt beispielhaft ein Neuron des aPVT, welches mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefüllt wurde.

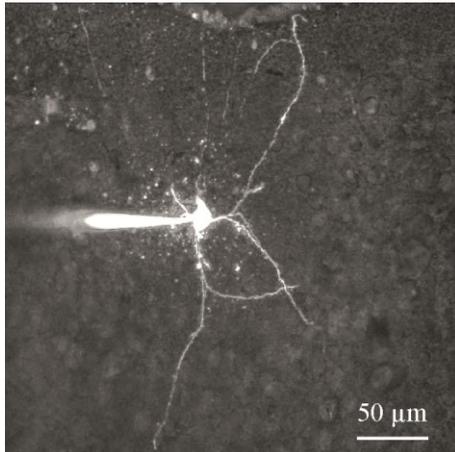


Abbildung 1-4: Morphologie eines Neurons des Nucleus paraventricularis anterior thalami

Darstellung eines Neurons im aPVT nach Injektion von Alexa 594 über die Pipette, die links im Bild noch zu erkennen ist (zur Verfügung gestellt von PD Dr. Kay Jüngling/Dr. Michael Döngi).

In vorangegangenen elektrophysiologischen Untersuchungen zeigte sich ein zirkadianer Rhythmus, innerhalb dessen sich die Eigenschaften der Neurone veränderten. Während der aktiven Phase, das heißt nachts, gewonnene Neurone wiesen eine verminderte Membranleitfähigkeit unter anderem für Kalium auf. Zudem nahm ihr Membranpotential weniger negative Werte an und sie generierten mehr Aktionspotentiale, sowohl in Salven als auch tonisch. Diese Veränderungen der spontanen Aktivität der Neurone gingen mit einer Erhöhung niederschwelliger, durch geringe Potentialveränderungen aktivierter Calcium-Ströme sowie durch Hyperpolarisation aktivierter Kationen-Ströme einher (38).

Dieser Bereich weist innerhalb des Thalamus die höchste Dichte an NPS-positiven Fasern auf und seine Neurone exprimieren den Npsr1 (8). Mit Hilfe einer transgenen Mauslinie, welche das NPS und EGFP (grün fluoreszierendes Protein) koexprimiert, ließ sich die Lokalisation NPS-positiver Fasern bestimmen (48). Die Abbildung 1-5 zeigt den Nachweis NPS-positiver Fasern im aPVT einer solchen Maus.

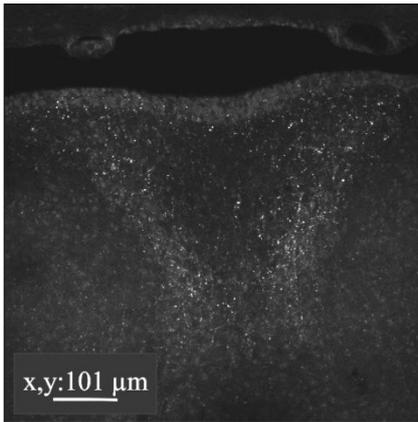


Abbildung 1-5: Nachweis von NPS im aPVT

Die Koexpression von NPS und EGFP ermöglicht den Nachweis von NPS anhand der Detektion des grünen Fluoreszenzsignals des EGFP (Zur Verfügung gestellt von PD Dr. Kay Jüngling).

1.4.3.2 Aufmerksamkeit und Wachheit regulierende Systeme

Wie bereits beschrieben ist der PVT mit verschiedenen Arealen verbunden, welche zu den Aufmerksamkeit und Wachheit regulierenden Systemen gezählt werden (34).

Hierzu gehören Regionen des Hirnstamms, des Thalamus, des Hypothalamus und des basalen Vorderhirns. Innerhalb des Hirnstamms sind die Formatio reticularis mit ihren größtenteils glutamatergen Neuronen, die cholinergen ponto-mesencephalen Neurone, der noradrenerge Locus coeruleus, die dopaminergen Kerne des ventralen Mesencephalon sowie der serotonerge Raphe-Kern zu nennen. Diese innervieren wiederum mit einem Teil ihrer Efferenzen direkt oder indirekt den Thalamus. Ebenso erreichen den Thalamus histaminerge als auch Orexin exprimierende Neurone, deren Ursprung im Hypothalamus liegt (34).

Diese Vielfalt an Regelkreisen ermöglicht die Generierung von Aufmerksamkeit und Wachheit unter bestimmten Bedingungen bzw. mit jeweils spezifischen Nebeneffekten. So kann die Aufmerksamkeit als Reaktion auf einen sensorischen Stimulus aber auch unabhängig von äußeren Reizen aufrecht erhalten oder das Erwachen aus dem Schlaf ausgelöst werden. Über descendierende Bahnen innerhalb des Rückenmarks kann beispielsweise der Muskeltonus reguliert werden. Des Weiteren erfolgt über Stresshormone und das sympathische Nervensystem eine zusätzliche Modulation der Aufmerksamkeit und Wachheit (34).

1.4.3.3 Furchtgedächtnis und -reaktionen

Wie zuvor erwähnt, erhält der PVT sowohl viszerosensorische als auch emotionale Informationen und leitet diese an verschiedene Strukturen des limbischen Systems weiter (86). Hier sind insbesondere der Hippocampus, der präfrontale Kortex und die Amygdala, welche die zentrale Rolle in der Entwicklung eines Furchtgedächtnisses spielt, zu nennen (49).

Zunächst konnte nachgewiesen werden, dass bestimmte Verbindungen u.a. des PVT zur Amygdala für das Abrufen eines zuvor gebildeten Furchtgedächtnisses notwendig sind (63). Später wurde gezeigt, dass der posteriore PVT über efferente Projektionen zur zentralen Amygdala die Entwicklung eines Furchtgedächtnisses unterstützt und ebenso Furchtreaktionen bahnt (67). Es wird vermutet, dass der PVT durch seine vielfältigen Verbindungen zu anderen Arealen die Voraussetzung für eine an den bedrohlichen Reiz angepasste Reaktion schafft (63).

1.5 Glutamat-Rezeptoren

L-Glutamat ist der bedeutsamste exzitatorische Transmitter des ZNS. Die Rezeptoren für Glutamat können in ionotrope und metabotrope Rezeptoren unterteilt werden (53).

1.5.1 Ionotrope Glutamat-Rezeptoren

Bei den ionotropen Glutamat-Rezeptoren handelt es sich um tetramere Ionenkanäle, welche infolge der Bindung von Glutamat ihre Konformation so verändern, dass Natrium- und Calcium-Ionen passieren können.

Anhand der Selektivität für verschiedene Agonisten können innerhalb der Gruppe der ionotropen Glutamat-Rezeptoren drei verschiedene Typen unterschieden werden (53).

1.5.1.1 Ampa- und Kainat-Typ

Die Rezeptoren bestehen aus tetrameren Komplexen. Sie vermitteln schnelle exzitatorische postsynaptische Potentiale (53) und werden durch das in dieser Arbeit verwendete 6,7-Dinitroquinoxalin-2,3-dion (DNQX) spezifisch blockiert (29).

1.5.1.2 NMDA-Typ

Dies sind die Rezeptoren mit der höchsten Affinität für Glutamat. Sie unterliegen einer sehr strengen Regulation und benötigen Glycin als Coagonisten, um aktiviert zu werden. Darüber hinaus weisen sie Bindungsstellen für Polyamine und Kationen wie Mg^{2+} , Zn^{2+} und H^+ auf. Neben Glutamat, dem potentesten Agonist an diesem Rezeptor, vermögen auch andere kurz-kettige Aminodicarboxylsäuren, darunter N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) und Aspartat, den Rezeptor zu aktivieren. Die in dieser Arbeit verwendete 2-Amino-5-phosphonovaleriansäure (AP5) ist ein für den NMDA-Rezeptor spezifischer kompetitiver Antagonist. Extrazelluläre Mg^{2+} -Ionen verschließen spannungsabhängig die Pore des geöffneten Kanals, damit die Passage von Kationen vermieden wird. Die von NMDA-Rezeptoren generierten exzitatorischen postsynaptischen Potentiale sind deutlich langanhaltender als die der Ampa- oder Kainat-Rezeptoren und können mehrere hundert Millisekunden andauern (53).

1.5.2 Metabotrope Glutamat-Rezeptoren

Wird ein metabotroper Glutamatrezeptor (mGluR), der mit seinen sieben transmembranösen Abschnitten ein typischer G-Protein gekoppelter Rezeptor ist, erregt, so kommt es vermittelt durch ein G-Protein zu einer Aktivierung oder Inhibierung von second messenger-Systemen. Somit kann es zu einer Beeinflussung der synaptischen Aktivität und Plastizität kommen. Die einzelnen mGluR sind mit den Ziffern 1-8 nummeriert und können anhand der jeweiligen Effektoren in drei Gruppen unterteilt werden (53).

Die Aktivierung der Phospholipase C durch mGluR1 und mGluR5 führt zur Synthese von einerseits Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3), welches die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern bewirkt, und andererseits Diacylglycerol (DAG), welches die Proteinkinase C aktiviert. Sowohl mGluR2 und mGluR3 als auch mGluR4 und mGluR6 bis mGluR8 koppeln an ein inhibitorisches G-Protein, welches über die Hemmung der Adenylatzyklase beziehungsweise der Proteinkinase A zu einem verminderten cAMP-Spiegel führt. Über diesen Mechanismus kann abhängig von der Art des G-Proteins letztlich die Aktivität verschiedenster Ionenkanäle an der postsynaptischen Membran in positiver oder negativer Weise beeinflusst werden. Bei präsynaptischer Lage der mGluR wurde eine Verminderung der exzitatorischen glutamatergen und inhibitorischen gabaergen Übertragung gleichzeitig beobachtet, welche vermutlich über die Beeinflussung präsynaptischer spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle hervorgerufen wird (53).

1.6 GABA-Rezeptoren

Gamma-Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste inhibitorische Transmitter des ZNS und verfügt in Analogie zu Glutamat ebenfalls über zwei Arten von Rezeptoren, ionotrope und metabotrope GABA-Rezeptoren (12).

1.6.1 Ionotrope GABA-Rezeptoren

Zu dieser Gruppe zählen der GABA_A- und GABA_C-Rezeptor (6). GABA_A-Rezeptoren sind die bedeutsamsten, inhibitorische Effekte vermittelnden Rezeptoren des ZNS. Bei diesen ionotropen GABA-Rezeptoren handelt es sich um Ionenkanäle, welche bei extrazellulärer Bindung von GABA ihre Konformation so verändern, dass Chlorid-Ionen passieren können. Der hierdurch ausgelöste Chlorid-Einstrom entlang des Konzentrationsgradienten hyperpolarisiert das betroffene Neuron und übt somit einen inhibitorischen Effekt aus. Diese inhibitorischen postsynaptischen Potentiale sind von sehr kurzer Dauer im Bereich weniger Millisekunden. Die Aktivität der GABA_A-Rezeptoren kann durch Benzodiazepine, Barbiturate, Steroide, Anästhetika, Antikonvulsiva und viele andere Substanzen über einen allosterischen Mechanismus reguliert werden. Als spezifischer Antagonist wirkt das in dieser Arbeit verwendete Gabazin (12). Die im Gegensatz zu GABA_A-Rezeptoren nicht Bicucullin sensitiven GABA_C-Rezeptoren finden sich in hoher Dichte in retinalen Zellen (6).

1.6.2 Metabotrope GABA-Rezeptoren

Die metabotropen GABA_B-Rezeptoren sind mit K⁺- und Ca²⁺-Kanälen verbunden. Sie rufen langsame, langanhaltende inhibitorische postsynaptische Potentiale hervor, indem sie die Eigenschaften von diesen Ionenkanälen beeinflussen. Dies wird entweder direkt oder indirekt über intrazelluläre second messenger-Systeme vermittelt (6,12).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Das NPS-System weist durch seinen insbesondere anxiolytischen und zugleich Aufmerksamkeit und Wachheit vermittelnden Effekt ein bisher einzigartiges Wirkspektrum auf (7,44,59,73,78,87). Bisher liegen allerdings nur eingeschränkte Erkenntnisse darüber vor, wie diese Effekte auf Ebene der Neurone vermittelt werden.

Der Ursprung NPS-produzierender Neurone befindet sich im Hirnstamm und deren Projektionen erstrecken sich neben anderen Zielgebieten auch in den aPVT (8). Innerhalb des aPVT

konnten eine hohe Dichte NPS-positiver Fasern sowie eine starke Expression der Npsr1-mRNA nachgewiesen werden (8). Dem PVT wird eine Rolle in der Verarbeitung emotionaler und viserosensorischer Reize, der Modulation von Wachheit und Aufmerksamkeit und somit der Generierung eines adaptiven Verhaltens zugesprochen (83,86). Zusätzlich beeinflusst der PVT die Bildung und Löschung eines Furchtgedächtnisses sowie die Art der Furchtreaktion (49,63,67,86). Somit könnte eine Wirkung des NPS auf Neurone des aPVT die Grundlage für die Steigerung von Wachheit und Aufmerksamkeit sowie den anxiolytischen Effekt des NPS sein. Um die Effekte des NPS auf die Neurone des aPVT zu untersuchen, wurden verschiedene elektrophysiologische Methoden angewendet. Das Ziel bestand darin zu zeigen, ob das NPS das Membranpotential und die Frequenz der sAP oder die synaptische Übertragung beeinflusst. Für letztere wurden sEPSC und sIPSC aufgezeichnet, da eine Änderung deren Amplitude oder Frequenz auf eine Modulation der synaptischen Übertragung hinweist. Es wurde bereits beschrieben, dass der aPVT insbesondere glutamaterge Neurone enthält (21,30,65). Eine Modulation der Aktivität der Neurone des aPVT hätte somit relevante Auswirkungen auf die Aktivität nachgeschalteter Neurone beispielsweise in der Amygdala, dem präfrontalen Kortex, dem Hippocampus, dem Neokortex und anderen wichtigen Zentren (83,86).

Insgesamt bildet die Entschlüsselung der neuronalen Veränderungen, welche die Effekte des NPS in vivo vermitteln, die Grundlage für ein weitreichendes Verständnis pathophysiologischer Zusammenhänge mit Blick auf Angsterkrankungen und der Dysregulation von Aufmerksamkeit und Wachheit. In der Folge sollen auf dieser Basis neue therapeutische Ansätze entwickelt und somit die Therapie dieser Erkrankungen optimiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Lösungen

Es folgt eine genaue Auflistung der in der Arbeit verwendeten Lösungen.

Es wurde eine spezielle Lösung für die Präparation der Hirnschnitte verwendet. In der Tabelle 2-1 sind die einzelnen Inhaltsstoffe der Präparationslösung und deren Konzentrationen aufgeführt.

Substanz	Konzentration [mM]
KCl	2,5
NaH ₂ PO ₄	1,25
MgSO ₄	10
PIPES	20
Glucose	10
Saccharose	200
CaCl ₂	0,5
pH 7,35; ~305 mOsmol/kg	

Tabelle 2-1: Präparationslösung

Nach Präparation der Hirnschnitte wurden diese vorsichtig in eine Präinkubationslösung überführt. Die Zusammensetzung der Präinkubationslösung ist in der Tabelle 2-2 auf der folgenden Seite aufgelistet.

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	1250
NaHCO ₃	240
NaH ₂ PO ₄	12,5
KCl	25
Für 500 ml vor Gebrauch zugeben	Menge
Glucose	0,99 g
MgSO ₄	1 ml 1M Lösung
CaCl ₂	1 ml 1M Lösung
pH 7,35-7,4; ~305 mOsmol/kg	

Tabelle 2-2: Präinkubationslösung (Stammlösung wird 10fach verdünnt)

Während aller Versuche wurde der jeweils in der Messkammer befindliche Hirnschnitt von einer artifiziellen cerebro-spinalen Flüssigkeit umspült. Zudem wurde diese Lösung bei den Versuchen in der Cell-attached-Technik als Pipettenlösung verwendet. Die Tabelle 2-3 zeigt die Zusammensetzung der artifiziellen cerebro-spinalen Flüssigkeit.

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	120
KCl	2,5
NaH ₂ PO ₄	1,25
MgSO ₄	2
NaHCO ₃	22
C ₆ H ₁₂ O ₆	20
CaCl ₂	2
pH 7,35; ~305 mOsmol/kg	

Tabelle 2-3: Artifizielle cerebro-spinale Flüssigkeit (ACSF)

Je nachdem, welche Parameter in der Whole-cell-Technik erfasst werden sollen, ist die Verwendung einer speziellen intrazellulären Lösung notwendig. Die intrazelluläre Lösung wurde vor Beginn der Messung in die Pipette eingefüllt.

Für die Charakterisierung der Neurone mit anschließender Messung des Membranpotentials und der spontanen Aktionspotentialfrequenz sowie zur Messung der spontanen exzitatorischen postsynaptischen Ströme wurde eine Kaliumgluconat-Lösung verwendet. In der Tabelle 2-4 ist die Zusammensetzung dieser Kaliumgluconat-Lösung aufgeführt.

Substanz	Konzentration [mM]
K-Gluconat	88
NaCl	10
K ₃ -Citrat	20
HEPES	10
BAPTA	3
Phosphocreatin	15
MgCl ₂	1
CaCl ₂	0,5
Mg-ATP	3
Na-GTP	0,5
pH 7,25; ~290-300 mOsmol/kg	

Tabelle 2-4: Intrazelluläre Lösung Nr. 2 (Kaliumgluconat)

Für die Messung der inhibitorischen postsynaptischen Ströme wurde eine Kaliumchlorid-lösung zur Füllung der Pipette benutzt. Die Konzentrationen der einzelnen Bestandteile dieser Lösung sind der Tabelle 2-5 auf der folgenden Seite zu entnehmen.

Substanz	Konzentration [mM]
KCl	110
NaCl	10
EDTA	11
HEPES	10
MgCl ₂	1
CaCl ₂	0,5
Phosphocreatin	15
Mg-ATP	3
Na-GTP	0,5
pH 7,25; ~300 mOsmol/kg	

Tabelle 2-5: Intrazelluläre Lösung Nr. 7 (Kaliumchlorid)

2.2 Pharmaka

Im Rahmen der verschiedenen Experimente wurden unterschiedliche Pharmaka eingesetzt. Welche Pharmaka bei welchen Experimenten verwendet wurden, wird in den Abschnitten 2.4.3 (Experimente in der Cell-attached-Konfiguration) und 2.4.4 (Experimente in der Whole-cell-Konfiguration) erläutert.

In der Tabelle 2-6 sind alle verwendeten Pharmaka aufgelistet.

Substanz	Konzentration [μ M]	Hersteller
AP5	25	Tocris
DNQX	10	Abcam
Gabazin	10	Abcam
NPS	0,25 / 0,5	Gene script

Tabelle 2-6: Pharmaka

2.3 Präparation der Gehirnschnitte

Die Versuche wurden hauptsächlich an männlichen, selten an weiblichen, Black-Six Mäusen am 13. - 34. postnatalen Tag durchgeführt. Diese Mäuse wurden, nachdem sie eine Anästhesie mit Isofluran (Forene® 2,5 % (V/V)) erhalten hatten, dekapitiert, um im Anschluss das Gehirn entnehmen zu können. Der Kopf der Maus wurde für die Präparation stets auf einer gekühlten Metallplatte gelagert. Es wurden zwei koronare Schnitte, etwas kaudal von Bregma und an der hinteren Schädelnaht, gesetzt. Daraufhin wurde der Knochen längs eröffnet, das Gehirn zügig entnommen und dieses unmittelbar in die vorbereitete, 3 - 4 °C kalte Präparationslösung, welche eine protektive Wirkung gegen Hypoxieschäden aufweist, gelegt. Anschließend wurden unter Zuhilfenahme eines Vibratoms (Leica VT 1200s) 300 µm dicke Koronarschnitte des Gehirns angefertigt. Die Schnitte, in denen makroskopisch der Bereich des aPVT identifiziert werden konnte, wurden in die vorbereitete, mit Carbogen begaste Präinkubationslösung übertragen. Die Schnittdicke von 300 µm wurde gewählt, um einerseits möglichst viele neuronale Verbindungen zu erhalten. Andererseits erhielt man eine genügend dünne Schicht für die notwendige Versorgung des Gewebes mit Glucose und Sauerstoff per Diffusion und für die geplante Verwendung einer Infrarot-Videooptik. Im Folgenden wurde die Präinkubationslösung 15 Minuten auf 30 °C erwärmt, um die durch die Präparation geschädigten Zellen vor der Messung zu zerstören. Schließlich wurden die Schnitte zur Erholung von der mechanischen Belastung während der Präparation und zur Einstellung des Zellmetabolismus auf die veränderten Bedingungen zusätzlich 60 Minuten bei Raumtemperatur gelagert.

Für die Versuche wurde stets ein einzelner Schnitt mit Hilfe einer Pipette in die von ACSF durchflossene Messkammer transportiert. Der pH-Wert der ACSF wurde durch eine Begasung mit Carbogen eingestellt.

2.4 Elektrophysiologische Untersuchungen

2.4.1 Methodik der Patch-Clamp-Technik

Die Spannungsklemme (voltage clamp) wurde gegen Ende der 30er Jahre des 20. Jahrhunderts von Kenneth S. Cole und Howard J. Curtis entwickelt und ermöglichte es ihnen den Anstieg der Membranleitfähigkeit einer Nervenzelle bei Erregung zu beobachten (55). Studien von Hodgkin und Huxley ermöglichten das Verständnis des Zustandekommens des Aktionspotentials ausgehend vom Ruhepotential (55). Im Zeitraum von 1973 bis 1976 gelang

es Bert Sakmann und Erwin Neher unter Verwendung der von ihnen entwickelten Patch-Clamp-Technik, welche das Rauschen auf ein sehr niedriges Maß reduzieren konnte, den Stromfluss durch einzelne Ionenkanäle zu registrieren (55). Diese neue Technik bot die Möglichkeit das Potential einer Nervenzelle konstant bei einem bestimmten Wert zu halten, indem ein jeweils notwendiger Kompensationsstrom in die Nervenzelle injiziert wurde (56). Gleichzeitig lässt eine Veränderung in der zur Kompensation nötigen Strompulsstärke Rückschlüsse auf die Membranleitfähigkeit des betrachteten Neurons zu (56). Im Rahmen der Auswertung der Änderungen der Membranleitfähigkeit lassen sich ebenso Veränderungen im Aktivitätszustand der Ionenkanäle des Neurons ableiten (56).

2.4.2 Der Versuchsaufbau

Für die genaue Betrachtung der Hirnschnitte wurde ein aufrechtes Mikroskop (Axioskop 2 FS plus, Zeiss) mit zwei Objektiven von 5-facher (EC Plan NEOFLUAR, Zeiss) und 40-facher (IR-ACHROPLAN, Zeiss) Vergrößerung verwendet. Zudem wurden ein Lupensystem (Luigs und Neumann) mit ein- bis vierfacher Vergrößerung und zur Identifizierung der Neurone innerhalb des Gewebes ein in das Mikroskop integriertes Infrarot-Licht verwendet. Mit Hilfe einer Kamera (Camera Head C2400, Hamamatsu) konnte das Zwischenbild registriert und auf einen separaten Monitor (Video Monitor WV-BM 1400, Panasonic) übertragen werden. Das Mikroskop befand sich auf einem durch Stickstoff schwingungsgedämpften Tisch. Die Pipette ließ sich mit Hilfe eines Mikromanipulators (Luigs und Neumann) unabhängig vom Mikroskop und somit der Messkammer bewegen. Die Messkammer wiederum konnte per Hand gegenüber dem Mikroskop ausgerichtet werden. Eine elektrische Verbindung der Pipettenlösung zum Vorverstärker (CV 203 BU, Axon Instruments) wurde durch die Verwendung eines Silberchlorid-Drahtes erreicht. Die Messwerte wurden mit Hilfe des Axopatch 200B (Axon Instruments) gewonnen und über einen Datenwandler (Digidata 1440A, Axon Instruments) digitalisiert. Zur Herstellung der Pipetten wurden Borsilikatglasröhrchen (Harvard Apparatus LTD, GC150TF-10) eingesetzt, aus denen für jeden Versuchstag mit einem Puller (PA-10 Patch Pipette Puller, E.S.F. electronics) die Pipetten einzeln vorbereitet wurden. Der ausgewählte Gehirnschnitt wurde in der Messkammer ständig von mit Carbogen begaster ACSF umspült, wozu eine Perfusionspumpe (Ismatec) benötigt wurde. Unter optischer Kontrolle erfolgte die Einstellung eines Neuron des aPVT im Blickfeld. Daraufhin wurde ein Überdruck zur Vermeidung einer Verstopfung der Spitzenöffnung auf die Pipette gegeben und diese unter Verwendung eines Mikromanipulators in der Lösung der Messkammer über dem Hirnschnitt ausgerichtet. Das Pipettenpotential wurde mit dem Potential der in der Lösung

befindlichen Referenz an der Messkammer ausgeglichen, sodass zwischen diesen beiden Komponenten kein Stromfluss mehr vorlag. Außerdem wurde ein rechteckiger Strompuls von -10 pA appliziert, um bei Annäherung an das Neuron die Güte der Abdichtung zwischen Pipette und Membran, das heißt des „seals“, bewerten zu können. Nun wurde die Pipettenspitze vorsichtig, wieder unter Zuhilfenahme des Mikromanipulators, in das Gewebe gesteuert und einer Zelle angenähert. Im Moment, in dem sich eine dezente Eindellung der Zellmembran erkennen ließ, wurde der Überdruck entfernt und stattdessen ein leichter Unterdruck auf die Pipette gegeben, um einen guten Abdichtungswiderstand im $\text{G}\Omega$ -Bereich („Giga-seal“) zu erreichen. Ist dieses Kriterium erfüllt, kann von einer ausreichenden elektrischen Isolierung des unter der Pipettenspitze liegenden Membranabschnittes ausgegangen werden.

Wird die Membran unter der Pipettenspitze nicht eröffnet, so liegt die Cell-attached-Konfiguration vor. Hier kann es hilfreich sein, einen etwas niederohmigeren Seal anzustreben, da sich die Zellmembran ansonsten während des Versuchs spontan öffnen kann.

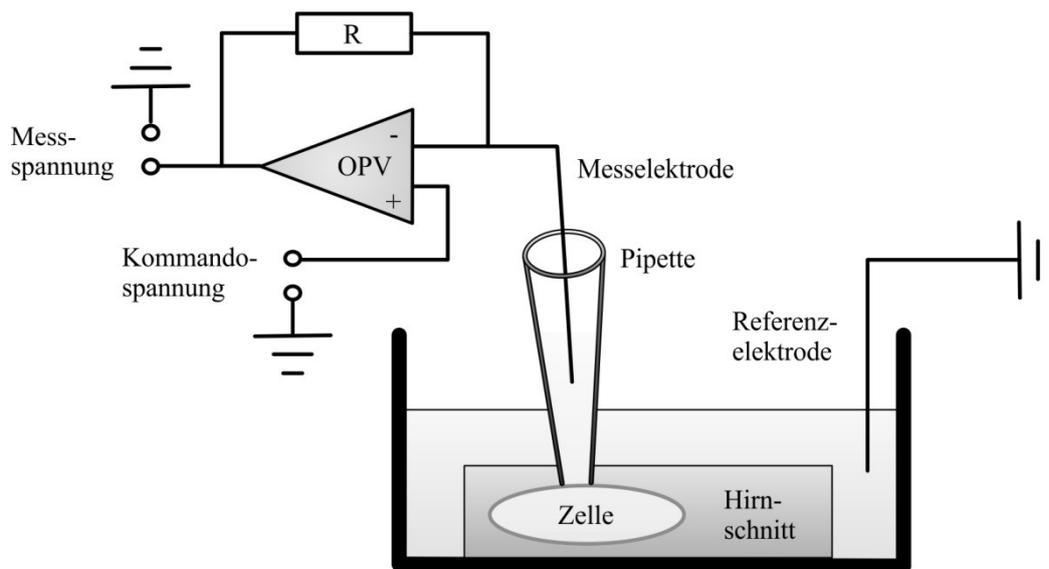


Abbildung 2-1: Aufbau einer Patch-clamp-Ableitung in Cell-attached-Technik

Schematische Darstellung einer Messkammer, darin enthaltener Hirnschnitt, umgeben von artifizierter cerebrospinaler Flüssigkeit (ACSF). Die Zellmembran unter der Pipettenspitze bleibt intakt. Mittels der Messelektrode wird das Membranpotential im Bereich der Pipettenspitze abgeleitet. Der Operationsverstärker (OPV) registriert die Differenz zwischen Kommandospannung und Membranpotential, verstärkt diese und gibt sie als Messspannung weiter. Über einen Rückkopplungswiderstand (R) erfolgt eine Strominjektion zum Ausgleich der Spannungsdifferenz.

Der Großteil der Messungen allerdings wurde in der Whole-cell-Konfiguration vorgenommen. Hierzu muss die unter der Pipettenspitze liegende Zellmembran durch einen kurzen Unterdruckimpuls eröffnet werden, sodass die Trennung zwischen der Pipettenlösung und

dem Zellplasma aufgehoben wird. Je nach Zusammensetzung der so in die Zelle diffundierenden Pipettenlösung, kann das intrazelluläre Medium verändert werden.

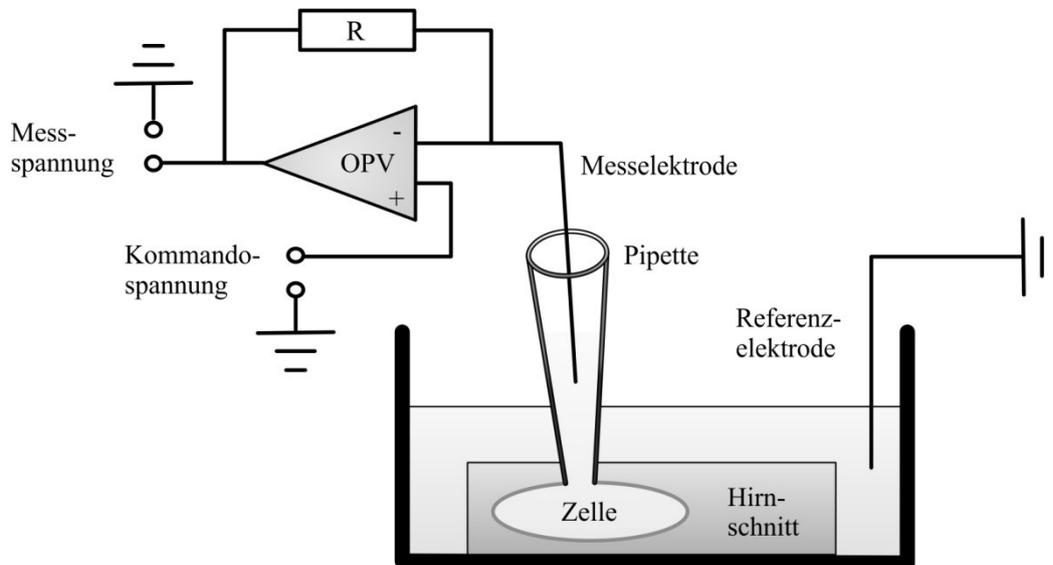


Abbildung 2-2: Aufbau einer Patch-clamp-Ableitung in Whole-cell-Technik

Schematische Darstellung einer Messkammer, darin enthaltenen Hirnschnitt, umgeben von artifizierter cerebrospinaler Flüssigkeit (ACSF). Die Zellmembran unter der Pipettenspitze ist eröffnet, die Zusammensetzungen des Zellplasma und der Pipettenlösung gleichen sich einander an. Mittels der Messelektrode wird das Membranpotential des Neurons abgeleitet. Der Operationsverstärker (OPV) registriert die Differenz zwischen Kommandospannung und Membranpotential, verstärkt diese und gibt sie als Messspannung weiter. Über einen Rückkopplungswiderstand (R) erfolgt eine Strominjektion zum Ausgleich der Spannungsdifferenz.

In jeder der beiden Messanordnungen können im Folgenden Spannungsdifferenzen mit Hilfe des Vorverstärkers, der den Operationsverstärker (OPV) beinhaltet, registriert werden. Der OPV verfügt hierfür über zwei Eingänge, welche die anliegenden Spannungen quantifizieren. Die Kommandospannung wird am (+) - Eingang und das Membranpotential am (-) - Eingang erfasst. Ein sehr hoher Eingangswiderstand verhindert, dass ein Strom durch den OPV fließen kann und so wird am Ausgang des OPV eine zur Spannungsdifferenz der zwei Eingänge proportionale Spannung abgegeben. Zudem wird zum Ausgleich der Differenz zwischen Membranpotential und Kommandospannung ein Strom über einen Rückkopplungswiderstand in die Zelle injiziert. So wird verständlich, dass der Operationsverstärker als Strom-Spannungs-Wandler fungiert.

Insgesamt kann dadurch gewährleistet werden, dass das Membranpotential zu keinem Zeitpunkt der Messung von der gewünschten Kommandospannung abweicht. Dieses Vorgehen bezeichnet man als Spannungsklemme („voltage clamp“). Durch die Höhe des Kompensationsstroms, der zum Ausgleich der Spannungsdifferenz notwendig ist, lassen sich wichtige Rückschlüsse auf Veränderungen der Membranleitfähigkeit ziehen. Diese kann so-

wohl durch eine veränderte Kommandospannung als auch durch die Effekte eines Transmitters beispielsweise beeinflusst werden.

Darüber hinaus besteht umgekehrt die Möglichkeit, die Höhe des injizierten Stroms festzusetzen und die hierdurch resultierenden Veränderungen des Membranpotentials zu registrieren. Dieses Vorgehen bezeichnet man folglich als Stromklemme („current clamp“). So beobachtete Veränderungen des Membranpotentials resultieren beispielsweise auf Ionenströmen durch Ionenkanäle der Zellmembran wie bei einem Aktionspotential.

2.4.3 Experimente in der Cell-attached-Konfiguration

Bei dieser Methode wurde wie oben beschrieben die Zellmembran nicht eröffnet, sodass das Zellplasma in seiner Zusammensetzung und dadurch ebenfalls das Verhalten des Neurons unbeeinflusst blieben.

2.4.3.1 Spontane Aktionspotentialfrequenz

Die spontane Aktionspotentialfrequenz der Projektionsneurone des aPVT, welche zuvor mit Hilfe des Mikroskops optisch identifiziert worden waren, wurde in der Cell-attached-Konfiguration registriert. Hierzu wurde der Voltage-clamp-Modus verwendet, der es ermöglicht eine konstante Spannung an der Zellmembran anzulegen und gleichzeitig Veränderungen im Stromfluss bei Änderung des Membranpotentials wahrzunehmen. Das Haltepotential wurde so angepasst, dass zwischen Ableitelektrode und Zellmembran ein möglichst geringer Strom floss. In dieser Konstellation sollte das Haltepotential näherungsweise dem Zellmembranpotential entsprechen, was eine externe Beeinflussung des Zellmembranpotentials durch ein davon abweichendes Haltepotential verhindern sollte. Darüber hinaus wurden keine Blocker eingesetzt, um die spontane Aktivität des Netzwerkes nicht im Vorfeld zu beeinflussen. Weiterhin wurde die Pipette mit der ACSF gefüllt, da diese externe Lösung die hier benötigte charakteristische Zusammensetzung des extrazellulären Mediums aufweist. Während der Messungen entsprach die Temperatur der ACSF in der Messkammer der Raumtemperatur. Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug etwa 1 - 1,5 ml/Minute. Die Applikation des NPS (0,5 μ M) erfolgte mit Ausnahme der Kontrollexperimente, in denen kein NPS verwendet wurde, nach 5 Minuten für einen Zeitraum von 10 Minuten über die Perfusion.

Die in der Cell-attached-Konfiguration aufgezeichneten Ströme wurden schließlich mit der Software Clampfit 10.0 (Axon CNS, Molecular Devices), getrennt nach Versuchen mit und ohne NPS-Applikation, ausgewertet.

2.4.4 Experimente in der Whole-cell-Konfiguration

Die Whole-cell-Konfiguration wurde wie oben beschrieben durch Eröffnung der Zellmembran unter der Pipettenspitze nach Ausbildung des Giga-Seals erreicht.

2.4.4.1 Charakterisierung der Neurone des aPVT

Im Current Clamp Modus ist es möglich die passiven und aktiven Membraneigenschaften eines Neurons zu ermitteln. Dies geschieht, indem ein vorgegebener Strom über die Zellmembran fließt und das sich daraus ergebende Membranpotential aufgezeichnet wird. Die Charakterisierung wurde bei einer Temperatur von 32 °C vorgenommen. Der extrazellulären Lösung wurde DNQX (10 µM), welches als kompetitiver Antagonist an AMPA- und Kainat-Typ Glutamat-Rezeptoren wirkt, zugesetzt. Ebenfalls zugesetzt wurden AP5 (25 µM), ein kompetitiver Antagonist an NMDA-Typ Glutamat-Rezeptoren, und Gabazin (10 µM), ein kompetitiver Antagonist des GABA_A-Rezeptors. Als intrazelluläre Lösung wurde die Kaliumgluconatlösung (Intrazelluläre Lösung Nr. 2) mit einer Kaliumgluconat-Konzentration von 88 mM eingesetzt. An jedem Neuron wurden zwei Messungen, zunächst bei einem Haltepotential von -55 bis -60 mV und dann -75 mV, durchgeführt. Das Messprotokoll beinhaltete repetitive Strompulse mit einer Dauer von 500 ms, welche im Abstand von 3 s appliziert wurden. Der Strompuls betrug -100 pA im ersten Durchgang und wurde bei jedem folgenden Durchgang um jeweils 10 pA angehoben, bis die maximale Aktionspotentialfrequenz des Neurons erreicht schien. Die Abbildung 2-3 veranschaulicht den Aufbau des Stimulationsprotokolls zur Charakterisierung der Neurone.

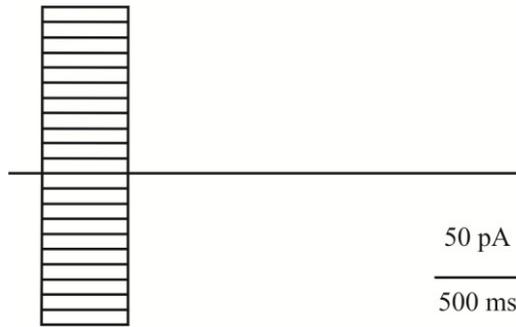


Abbildung 2-3: Stimulationsprotokoll zur Charakterisierung

Ausgehend von der gleichbleibenden basalen Strominjektion zur Einstellung des Haltepotentials werden 500 ms andauernde zusätzliche Strompulse injiziert. Der erste Strompuls liegt bei -100 pA und dieser Wert erhöht sich in jedem Durchgang, folglich im Abstand von 3 s, um 10 pA.

Die Messungen wurden mit Hilfe der Software Clampfit 10.0 (Axon CNS, Molecular Devices) ausgewertet.

2.4.4.2 Potentialverlauf und spontane Aktionspotentialfrequenz

Die Potentialveränderungen wurden in der Whole-cell-Konfiguration im Current-clamp-Modus bei einer Temperatur von 32 °C und einer Perfusionsgeschwindigkeit von 2 ml/Minute gemessen. Hierbei kann das Membranpotential durch Injektion eines Strompulses auf einen gewünschten Wert eingestellt werden. Bei den durchgeführten Messungen wurde zunächst keine Strominjektion vorgenommen und somit das alleinig von dem vermessenen Neuron vorgegebene Potential erfasst. Der ACSF wurde Gabazin (10 μ M), ein kompetitiver Antagonist des GABA_A-Rezeptors zugesetzt. Ebenso wurden DNQX (10 μ M), welches als kompetitiver Antagonist an AMPA- und Kainat-Typ Glutamat-Rezeptoren wirkt, und AP5 (25 μ M), ein kompetitiver Antagonist an NMDA-Typ Glutamat-Rezeptoren, zugesetzt. Mit Hilfe dieser drei Blocker wurden dementsprechend die erregenden glutamatergen und der Großteil der inhibitorischen gabaergen Ströme ausgeschaltet, um daraus resultierende Potentialveränderungen zu vermeiden. Für die intrazelluläre Lösung der Pipette wurde eine Kaliumgluconat-Lösung (Intrazelluläre Lösung Nr. 2) mit einer Kaliumgluconat-Konzentration von 88 mM verwendet. Die NPS-Applikation (0,5 μ M) erfolgte nach 3:20 Minuten mit einer Dauer von 10 Minuten über die Perfusion und wurde bei den Kontrollversuchen unterlassen.

Abschließend wurden unter Verwendung der Software Clampfit 10.0 (Axon CNS, Molecular Devices) die gewonnenen Daten getrennt nach Kontrollversuchen und Versuchen mit NPS-Applikation ausgewertet.

2.4.4.3 Spontane exzitatorische postsynaptische Ströme (sEPSC)

Die sEPSC wurden in der Whole-cell-Konfiguration im Voltage-clamp-Modus bei Raumtemperatur registriert. Das Haltepotential betrug dabei -70 mV. Der ACSF wurde zur Blockierung gabaerger, inhibitorischer Ströme Gabazin (10 μM), welches als kompetitiver Antagonist des GABA_A-Rezeptors fungiert, zugesetzt. Als intrazelluläre Lösung wurde eine Kaliumgluconat-Lösung (Intrazelluläre Lösung Nr. 2) mit einer Kaliumgluconat-Konzentration von 88 mM verwendet. Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug etwa 1 - 1,5 ml/Minute. Es wurden zwei verschiedene Konzentrationen des NPS, nämlich 0,25 μM und 0,5 μM , verwendet. Das NPS wurde nach etwa 7 Minuten über die Perfusion für eine Dauer von 10 Minuten eingewaschen.

Die registrierten sEPSC wurden abschließend unter Verwendung der Software Clampfit 10.0 (Axon CNS, Molecular Devices), getrennt nach den Versuchen mit einer NPS-Konzentration von 0,25 μM bzw. 0,5 μM , ausgewertet.

2.4.4.4 Spontane inhibitorische postsynaptische Ströme (sIPSC)

Die sIPSC wurden ebenfalls in der Whole-cell-Konfiguration im Voltage-clamp-Modus bei Raumtemperatur registriert. Das Haltepotential wurde bei -70 mV eingestellt. Der ACSF wurde DNQX (10 μM), ein kompetitiver Antagonist an AMPA- und Kainat-Typ Glutamat-Rezeptoren, und AP5 (25 μM), ein kompetitiver Antagonist an NMDA-Typ Glutamat-Rezeptoren, beigelegt. Somit wurden Glutamat-vermittelte, exzitatorische Ströme unterbunden. Als intrazelluläre Lösung wurde hier eine Kaliumchlorid-Lösung (Intrazelluläre Lösung Nr. 7) mit einer Kaliumchlorid-Konzentration von 110 mM eingesetzt. Die hohe Chloridkonzentration bedingt einen Ausgleich der Chloridionen-Konzentration zwischen Zellinnerem und der extrazellulären Lösung. Somit strömen die Chloridionen während des Versuches dem Chlorid-Gleichgewichtspotential folgend ins Zellinnere anstatt die Zelle wie bei dem üblichen Chloridionen-Gradienten zu verlassen. Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug etwa 1 - 1,5 ml/Minute. Der Einwasch von NPS (0,5 μM) erfolgte nach etwa 5 Minuten über die Perfusion für eine Dauer von 10 Minuten.

Die Auswertung der aufgezeichneten sIPSC geschah unter Verwendung der Software Clampfit 10.0 (Axon CNS, Molecular Devices).

2.4.5 Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe von der Software Excel (Microsoft Office 2007) vorgenommen. Die Zahl der Neurone bzw. Tiere ist nach folgender Formel angegeben ($n = \text{Zahl der Neurone} / \text{Zahl der Tiere}$). Zur Signifikanzprüfung der gewonnenen Mittelwerte kam der Man-Whitney-U-Test zum Einsatz, wobei ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ zugrunde gelegt wurde.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden verschiedene experimentelle Ansätze der Elektrophysiologie gewählt, um zu entschlüsseln, welche Effekte die Applikation von NPS auf die Neurone des aPVT ausübt. Hierbei wurden die Verläufe des Membranpotentials, der Frequenz der sAP, der sEPSC und sIPSC sowie die elektrophysiologischen Charakteristika der Neurone des aPVT analysiert.

3.1 Verlauf des Membranpotentials

In der Whole-cell-Konfiguration wurde der Verlauf des Membranpotentials der Neurone aufgezeichnet, um mögliche Einflüsse des NPS (0,5 μM) im Sinne einer Depolarisation oder Hyperpolarisation der Neurone zu erfassen.

Bei der Analyse der Potentialverläufe jedes einzelnen Neurons konnte bei einer Subpopulation der Neurone (50 %) des aPVT eine partiell reversible Depolarisation des Membranpotentials in Zusammenhang mit der Applikation des NPS beobachtet werden. Dieser Gruppe der NPS-responsiven Neurone (Resp.) steht eine Subpopulation NPS-nicht-responsiver Neurone (N.-Resp., 50 %) gegenüber, welche den oben genannten Effekt nicht zeigten. Um zu untermauern, dass der beobachtete Effekt durch NPS bedingt war und um einen Einfluss des Lösungswechsels auszuschließen, wurden ergänzend Kontrollexperimente (Kont.) mit einem Wechsel zu NPS-freier Lösung durchgeführt.

Die mittleren Potentiale wurden für jeweils drei Zeitintervalle berechnet: das erste Intervall direkt vor Beginn der NPS-Applikation als Referenz bezeichnet, das zweite Intervall während der NPS-/ACSF-Applikation als NPS bzw. ACSF bezeichnet und das dritte Intervall mit Beginn nach 1-2 Minuten Auswasch der NPS-/ACSF-Applikation.

Die NPS-responsiven Neurone zeigten einen Anstieg des mittleren Potentials von anfänglich -48,03 mV ($\pm 1,70$, $n = 9/7$) auf -44,25 mV ($\pm 1,18$, $n = 9/7$) während der Applikation des NPS. Anschließend kam es nach dem Auswasch des NPS zu einem Abfall des mittleren Potentials der NPS-responsiven Neurone auf -47,03 mV ($\pm 2,04$, $n = 8/7$).

Bei den NPS-nicht-responsiven Neuronen wurde eine Reduktion des mittleren Potentials von -53,76 mV ($\pm 2,55$, $n = 9/6$) vor auf -55,60 mV ($\pm 2,66$, $n = 9/6$) während der NPS-Applikation beobachtet. Im weiteren Verlauf sank das mittlere Potential der NPS-nicht-

responsiven Neurone erneut und erreichte nach dem Auswasch des NPS einen Wert von $-56,92 \text{ mV} (\pm 3,98, n = 7/4)$.

Die Neurone der Kontrollgruppe wiesen ein mittleres Potential von $-58,15 \text{ mV} (\pm 2,52, n = 11/4)$ vor und von $-58,91 \text{ mV} (\pm 2,62, n = 11/4)$ unter der Applikation der NPS-freien Lösung auf. Nach dem Auswasch des NPS betrug das mittlere Potential der Neurone der Kontrollgruppe $-58,47 \text{ mV} (\pm 2,80, n = 11/4)$.

Um die Veränderung des mittleren Potentials zu beschreiben, wurde die mittlere Potentialdifferenz, gemessen zwischen den mittleren Potentialen vor und bei der Applikation des NPS, berechnet.

Die mittlere Potentialdifferenz der NPS-responsiven Neurone betrug $3,78 \text{ mV} (\pm 0,86, n = 9/7)$ im Unterschied zu $-1,84 \text{ mV} (\pm 0,58, n = 9/6)$ bei den NPS-nicht-responsiven Neuronen. Diese Differenz erwies sich als statistisch signifikant ($p < 0,001$). Ebenso ergab sich ein statistisch signifikanter ($p < 0,001$) Unterschied zwischen der mittleren Potentialdifferenz der NPS-responsiven Neurone von $3,78 \text{ mV} (\pm 0,86, n = 9/7)$ im Gegensatz zu $-0,76 \text{ mV} (\pm 0,48, n = 11/4)$ bei den Kontrollmessungen. Zwischen der Potentialdifferenz der NPS-nicht-responsiven Neurone ($-1,84 \text{ mV} (\pm 0,58, n = 9/6)$) und der Kontrollgruppe ($-0,76 \text{ mV} (\pm 0,48, n = 11/4)$) gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,25$).

Die Abbildung 3-1 veranschaulicht die Potentialdifferenz zwischen den Referenzwerten und den Messwerten unter NPS-/ACSF-Applikation für die NPS-responsiven und NPS-nicht-responsiven Neurone sowie für die zur Kontrolle vermessenen Neurone.

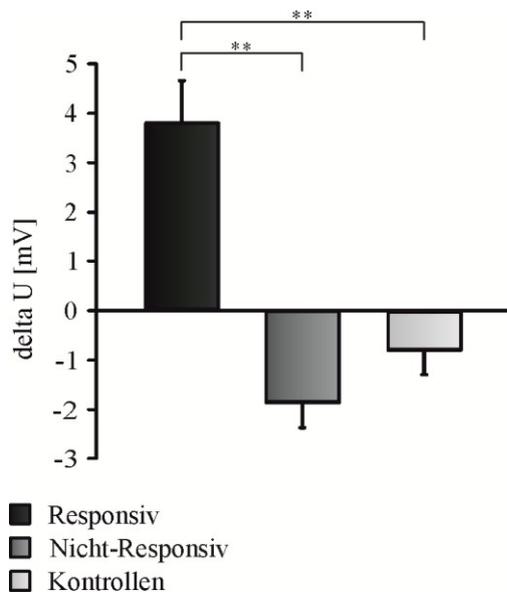


Abbildung 3-1: Whole-cell-Messungen des Membranpotentials

Mittlere Differenzen der gemittelten Membranpotentiale zwischen der Phase der NPS-Applikation und der Phase vor Applikation in Gegenüberstellung der NPS-responsiven Neurone ($n = 9/7$) und NPS-nicht-responsiven Neurone ($n = 9/6$) sowie der Neurone der Kontrollgruppe ($n = 11/4$)

Zusammenfassend kommt es durch die Applikation von NPS bei den NPS-responsiven Neuronen zu einer partiell reversiblen Depolarisation des Membranpotentials. Im Gegensatz hierzu fällt das mittlere Potential der NPS-nicht-responsiven Neurone und der Neurone der Kontrollgruppe unabhängig von der NPS-Applikation, kontinuierlich im Verlauf der Messung ab.

3.2 Spontane Aktionspotentialfrequenz

Zudem wurde neben dem Einfluss des NPS auf das Potential der untersuchten Neurone ebenfalls der Verlauf der spontan generierten AP analysiert, um mögliche Einflüsse der Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ NPS auf die sAP-Frequenz der Neurone des aPVT zu erfassen.

Zunächst wurden Experimente in der wenig invasiven Cell-attached-Konfiguration durchgeführt, bei der die Zellmembran unterhalb der Pipettenspitze nicht eröffnet wird. Somit wird eine Beeinflussung des intrazellulären Milieus und in der Folge von intrazellulären Signalkaskaden vermieden.

Bei einem Teil der Neurone kam es während der Applikation des NPS zu einer sAP-Frequenzsteigerung, welche bei den übrigen Neuronen nicht beobachtet werden konnte. Daher wurde die Differenzierung in NPS-responsive (Resp., 42 %) und NPS-nicht-responsive Neurone (N.-Resp., 58 %) vorgenommen. Zudem wurden Kontrollexperimente (Kont.) ohne

Applikation von NPS durchgeführt, um zu untermauern, dass die beobachteten Veränderungen durch die NPS-Applikation bedingt sind.

In der Abbildung 3-2 sind jeweils repräsentative Beispielspuren der mittleren sAP-Frequenzen eines NPS-responsiven und eines NPS-nicht-responsiven Neurons sowie eines zur Kontrolle untersuchten Neurons dargestellt.

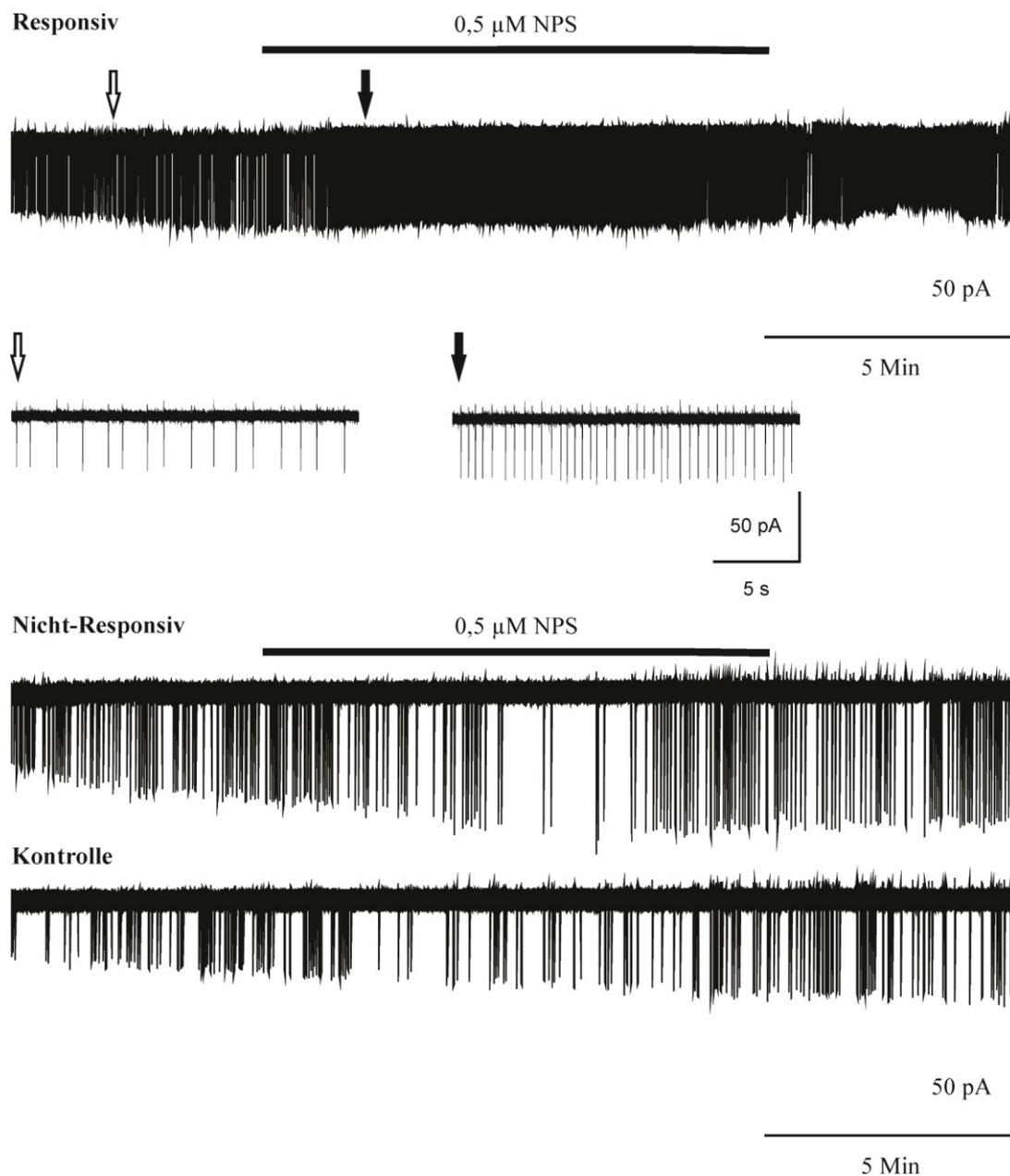


Abbildung 3-2: Beispielspuren der Cell-attached-Messungen

Gegenüberstellung der Stromspuren eines NPS-responsiven Neurons, eines NPS-nicht-responsiven Neurons und eines Neurons der Kontrollgruppe mit unterschiedlichen Verläufen der sAP-Frequenzen. Die Pfeile zeigen beispielhafte Verläufe der sAP-Frequenz des NPS-responsiven Neurons von je 20s vor und während der Applikation des NPS zur besseren Differenzierbarkeit des Frequenzunterschieds. Der Balken gibt den Zeitpunkt der NPS-Applikation an.

Die mittleren sAP-Frequenzen wurden für jeweils drei Zeitintervalle berechnet: das erste Intervall (5 Minuten) direkt vor Beginn der NPS-Applikation als Referenz bezeichnet, das zweite Intervall während bis kurze Zeit nach der NPS-/ACSF-Applikation als NPS bzw. ACSF bezeichnet und das dritte Intervall mit Beginn nach 10 Minuten Auswasch.

Die Abbildung 3-3 veranschaulicht die mittleren sAP-Frequenzen der NPS-responsiven und der NPS-nicht-responsiven Neurone sowie der zur Kontrolle untersuchten Neurone jeweils vor, während und nach dem Auswasch von NPS bzw. NPS-freier Lösung.

Unter der Applikation von NPS ergab sich ein statistisch signifikanter ($p = 0,02$) Anstieg der mittleren sAP-Frequenz der NPS-responsiven Neurone von $0,93 \text{ Hz}$ ($\pm 0,32$, $n = 10/7$) auf $1,97 \text{ Hz}$ ($\pm 0,35$, $n = 10/7$). Die Reduktion der mittleren sAP-Frequenz der NPS-responsiven Neurone von $1,97 \text{ Hz}$ ($\pm 0,35$, $n = 10/7$) während der Applikation auf $1,20 \text{ Hz}$ ($\pm 0,28$, $n = 10/7$) nach dem Auswasch des NPS erreichte noch keine statistische Signifikanz ($p = 0,16$). Ebenso fand sich kein statistisch signifikanter ($p = 0,38$) Unterschied zwischen der mittleren sAP-Frequenz der NPS-responsiven Neurone vor der Applikation des NPS ($0,93 \text{ Hz}$ ($\pm 0,32$, $n = 10/7$)) und nach dem Auswasch des NPS ($1,20 \text{ Hz}$ ($\pm 0,28$, $n = 10/7$)). Insgesamt entspricht dies einer partiell reversiblen Steigerung der mittleren sAP-Frequenz während der Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ NPS.

Die mittleren sAP-Frequenzen der nicht-responsiven Neurone vor ($0,77 \text{ Hz}$ ($\pm 0,20$, $n = 14/8$)) und bei Applikation von NPS ($0,53 \text{ Hz}$ ($\pm 0,20$, $n = 14/8$)) wiesen keinen signifikanten ($p = 0,32$) Unterschied auf. Auch der Vergleich der mittleren sAP-Frequenzen der nicht-responsiven Neurone bei der NPS-Applikation ($0,53 \text{ Hz}$ ($\pm 0,20$, $n = 14/8$)) und nach dem Auswasch des NPS ($0,30 \text{ Hz}$ ($\pm 0,12$, $n = 14/8$)) ergab keinen signifikanten ($p = 0,12$) Unterschied. Allerdings konnte eine signifikante ($p = 0,02$) Abnahme der mittleren sAP-Frequenz der nicht-responsiven Neurone von $0,77 \text{ Hz}$ ($\pm 0,20$, $n = 14/8$) vor der NPS-Applikation auf $0,30 \text{ Hz}$ ($\pm 0,12$, $n = 14/8$) nach dem Auswasch des NPS beobachtet werden.

Die Neurone der Kontrollgruppe wiesen eine mittlere sAP-Frequenz von $0,39 \text{ Hz}$ ($\pm 0,05$, $n = 6/2$) vor und von $0,39 \text{ Hz}$ ($\pm 0,12$, $n = 6/2$) unter der Applikation der NPS-freien Lösung auf. Hier bestand kein signifikanter ($p = 0,94$) Unterschied. Zwischen den mittleren Messwerten unter der Applikation der NPS-freien Lösung ($0,39 \text{ Hz}$ ($\pm 0,12$, $n = 6/2$)) und nach dem Auswaschen der NPS-freien Lösung ($0,40 \text{ Hz}$ ($\pm 0,17$, $n = 6/2$)) war keine signifikante ($p = 0,81$) Differenz festzustellen. Auch die Gegenüberstellung der mittleren Messwerte vor der Applikation der NPS-freien Lösung ($0,39 \text{ Hz}$ ($\pm 0,05$, $n = 6/2$)) und nach dem Auswaschen der NPS-freien Lösung ($0,40 \text{ Hz}$ ($\pm 0,17$, $n = 6/2$)) ergab keinen signifikanten ($p = 0,87$) Unterschied.

Zunächst wurden die gemessenen mittleren sAP-Frequenzen der NPS-responsiven und NPS-nicht-responsiven Neurone verglichen. Vor Applikation von NPS lauteten die Messwerte

0,93 Hz ($\pm 0,32$, n = 10/7) für die NPS-responsiven Neurone und 0,77 Hz ($\pm 0,20$, n = 14/8) für die NPS-nicht-responsiven Neurone ($p = 0,88$). Während der NPS-Applikation kam es zu einem statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,001$) zwischen der mittleren sAP-Frequenz der NPS-responsiven (1,97 Hz ($\pm 0,35$, n = 10/7)) und der NPS-nicht-responsiven Neurone (0,53 Hz ($\pm 0,20$, n = 14/8)). Diese statistisch signifikante ($p < 0,01$) Differenz blieb bis zum Auswasch bestehen (Resp.: 1,20 Hz ($\pm 0,28$, n = 10/7); N.-Resp.: 0,30 Hz ($\pm 0,12$, n = 14/8)).

Daraufhin wurde die Gruppe der NPS-responsiven Neurone mit den Neuronen der Kontrollgruppe (Kont.) verglichen. Vor der Applikation des NPS bzw. der NPS-freien Lösung waren die mittleren sAP-Frequenzen der NPS-responsiven Neurone (0,93 Hz ($\pm 0,32$, n = 10/7)) und der Kontrollgruppe (0,39 Hz ($\pm 0,05$, n = 6/2)) nicht statistisch signifikant ($p = 0,42$) voneinander abzugrenzen. Bei Applikation des NPS bzw. der NPS-freien Lösung unterschieden sich die mittleren sAP-Frequenzen statistisch signifikant ($p = 0,002$) zwischen den NPS-responsiven Neuronen (1,97 Hz ($\pm 0,35$, n = 10/7)) und der Kontrollgruppe (0,39 Hz ($\pm 0,12$, n = 6/2)). Nach dem Auswasch von NPS bzw. der NPS-freien Lösung war kein statistisch signifikanter ($p = 0,09$) Unterschied mehr zwischen den mittleren sAP-Frequenzen der beiden Gruppen (Resp.: 1,19 Hz ($\pm 0,28$, n = 10/7); Kont.: 0,40 Hz ($\pm 0,17$, n = 6/2)) zu beobachten.

Weiterhin konnten beim Vergleich der NPS-nicht-responsiven Neurone und der Neurone der Kontrollgruppe keine statistisch signifikanten Differenzen zwischen den mittleren sAP-Frequenzen nachgewiesen werden. Vor Applikation des NPS bzw. der NPS-freien Lösung betragen die mittleren sAP-Frequenzen 0,77 Hz ($\pm 0,20$, n = 14/8) für die NPS-nicht-responsiven Neurone und 0,39 Hz ($\pm 0,05$, n = 6/2) in der Kontrollgruppe ($p = 0,88$). Unter der Applikation von NPS bzw. der NPS-freien Lösung wurden mittlere sAP-Frequenzen von 0,53 Hz ($\pm 0,20$, n = 14/8) für die NPS-nicht-responsiven Neurone und von 0,39 Hz ($\pm 0,12$, n = 6/2) für die Kontrollgruppe gemessen ($p = 0,87$). Zum Versuchsende nach dem Auswasch des NPS bzw. der NPS-freien Lösung unterschieden sich die mittleren sAP-Frequenzen ebenfalls nicht (N.-Resp.: 0,30 Hz ($\pm 0,12$, n = 14/8); Kont.: 0,40 Hz ($\pm 0,17$, n = 6/2); $p = 0,44$).

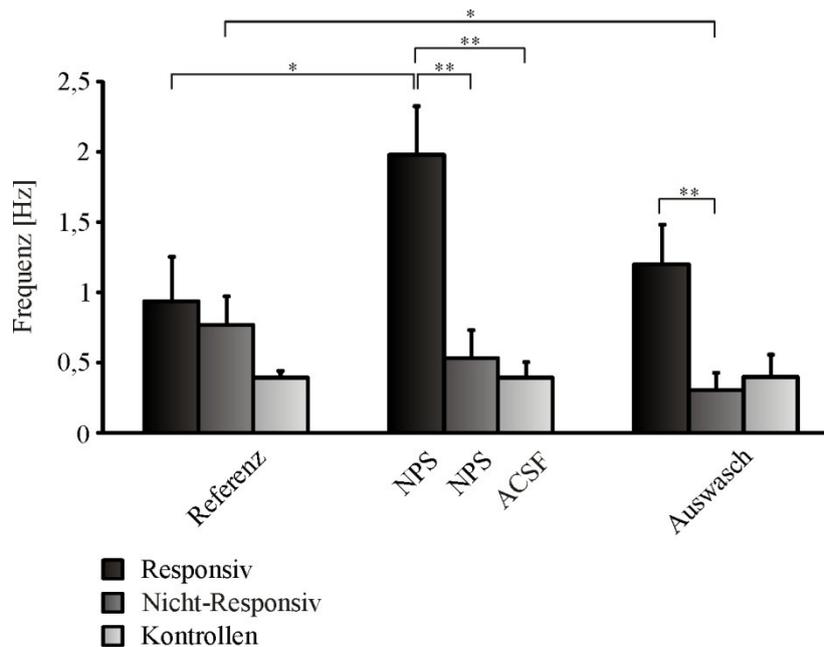


Abbildung 3-3: Cell-attached-Messungen der spontanen Aktionspotentialfrequenz (Absolutwerte)

Dargestellt sind die mittleren sAP-Frequenzen sowohl der NPS-responsiven Neurone (10/7), der NPS-nicht-responsiven Neurone (14/8) als auch der Kontrollgruppe (6/2) zu jeweils drei verschiedenen Zeitpunkten (vor, während der Applikation von NPS bzw. NPS-freier Lösung über das Perfusionssystem und nach dem Auswasch von NPS bzw. NPS-freier Lösung).

Aufgrund der Variabilität der sAP-Frequenzen der Neurone bereits vor der Applikation des NPS wurden in einer weiteren Analyse der sAP-Frequenzen die Verläufe der auf die Ausgangsfrequenz normierten Werte errechnet. Somit konnten die relativen Veränderungen der sAP-Frequenz unabhängig vom konkreten Ausgangswert verglichen werden. Die vor Applikation des NPS registrierte mittlere Frequenz der jeweiligen Gruppe wurde hierfür als 100 % definiert.

Die Abbildung 3-4 stellt die mittleren, auf die Ausgangswerte normierten, sAP-Frequenzen der NPS-responsiven und NPS-nicht-responsiven Neurone sowie der zur Kontrolle vermessenen Neurone jeweils vor sowie während der Applikation von 0,5 μ M NPS bzw. NPS-freier Lösung und nach dem Auswasch des NPS bzw. der NPS-freien Lösung dar.

Die mittlere, normierte sAP-Frequenz der NPS-responsiven Neurone stieg signifikant ($p < 0,001$) von 100 % ($n = 10/7$) vor Applikation auf 413,32 % ($\pm 101,96$, $n = 10/7$) bei Applikation an. Die mittlere, normierte sAP-Frequenz von 228,96 % ($\pm 78,51$, $n = 10/7$) nach dem Auswasch unterschied sich sowohl nicht signifikant ($p = 0,14$) von dem mittleren, normierten Messwert unter Applikation (413,32 % ($\pm 101,96$, $n = 10/7$)) als auch nicht signifikant ($p = 0,10$) vom mittleren, normierten Ausgangswert (100 %, $n = 10/7$).

Bei den NPS-nicht-responsiven Neuronen zeigte sich kein signifikanter ($p = 0,21$) Unterschied der mittleren normierten sAP-Frequenz vor (100 %, $n = 14/8$) und bei NPS-Applikation (87,84 % ($\pm 16,46$, $n = 14/8$)). Der Vergleich der mittleren, normierten sAP-Frequenzen der NPS-nicht-responsiven Neurone bei der Applikation des NPS (87,84 % ($\pm 16,46$, $n = 14/8$)) und nach dem Auswasch des NPS (56,88 % ($\pm 23,25$, $n = 14/8$)) ergab eine grenzwertige Signifikanz ($p = 0,05$). Ein statistisch signifikanter ($p = 0,01$) Unterschied zeigte sich zwischen den mittleren, normierten sAP-Frequenzen der NPS-nicht-responsiven Neurone vor der NPS-Applikation (100 %, $n = 14/8$) und nach dem Auswaschen des NPS (56,88 % ($\pm 23,25$, $n = 14/8$)).

Die Neurone der Kontrollgruppe wiesen eine mittlere, normierte sAP-Frequenz von 100 % ($n = 6/2$) vor und von 102,10 % ($\pm 31,30$, $n = 6/2$) unter der Applikation der NPS-freien Lösung auf. Hier bestand kein signifikanter ($p = 0,94$) Unterschied. Zwischen den mittleren, normierten Messwerten unter der NPS-Applikation (102,10 % ($\pm 31,30$, $n = 6/2$)) und nach dem Auswasch der NPS-freien Lösung (109,36 % ($\pm 48,56$, $n = 6/2$)) war keine signifikante ($p = 0,94$) Differenz festzustellen. Auch die Gegenüberstellung der mittleren, normierten Messwerte vor der NPS-Applikation (100 % ($n = 6/2$)) und nach dem Auswasch der NPS-freien Lösung (109,36 % ($\pm 48,56$, $n = 6/2$)) ergab keinen signifikanten ($p = 0,94$) Unterschied.

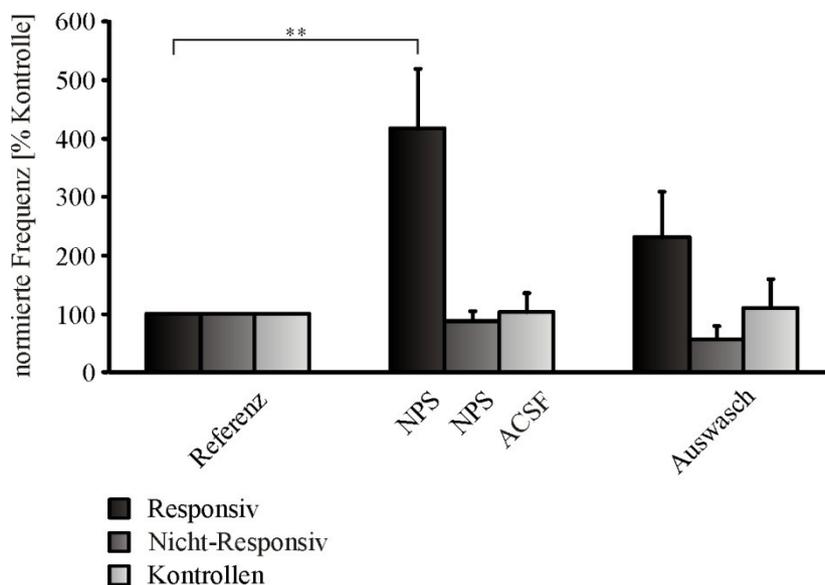


Abbildung 3-4: Cell-attached-Messungen der spontanen Aktionspotentialfrequenz (normierte Werte)

Dargestellt sind die mittleren, normierten sAP-Frequenzen sowohl der NPS-responsiven Neurone (10/7), der NPS-nicht-responsiven Neurone (14/8) als auch der Kontrollgruppe (6/2) zu jeweils drei verschiedenen Zeitpunkten (vor, während der Applikation von NPS bzw. NPS-freier Lösung über das Perfusionssystem und nach dem Auswasch von NPS bzw. NPS-freier Lösung).

Folglich kann festgestellt werden, dass eine Subpopulation von Neuronen (42 %) des aPVT NPS-responsiv ist und dass diese NPS-responsiven Neurone mit einer signifikanten sAP-Frequenzsteigerung auf die NPS-Applikation (0,5 μ M) reagierten. Dieser Effekt war nach dem Auswasch des NPS partiell reversibel. Die Gruppen der NPS-nicht-responsiven Neurone und der zur Kontrolle untersuchten Neurone zeigten keine Veränderungen der mittleren sAP-Frequenz durch die Applikation von NPS. Jedoch konnte eine von der NPS-Applikation unabhängige, stetige Abnahme der mittleren sAP-Frequenz der NPS-nicht-responsiven Neurone im Verlauf der Messung beobachtet werden. Die mittlere sAP-Frequenz der Neurone der Kontrollgruppe blieb auf einem annähernd konstanten Niveau.

Ergänzend wurden Experimente in der Whole-cell-Konfiguration durchgeführt, in denen gleichzeitig der Verlauf der sAP-Frequenz und des Membranpotentials registriert werden konnte. Die Veränderungen des Membranpotentials durch NPS wurden bereits oben beschrieben. Wie bei den Experimenten in der Cell-attached-Konfiguration führte die Applikation von 0,5 μ M NPS in einer Subpopulation der Neurone des aPVT zu einer partiell reversiblen sAP-Frequenzsteigerung, die in einer anderen Subpopulation der Neurone des aPVT nicht beobachtet werden konnte. Daher wurde auch hier die Differenzierung in NPS-responsive (Resp., 50 %) und NPS-nicht-responsive Neurone (N.-Resp., 50 %) vorgenommen. Zusätzlich wurden Kontrollexperimente (Kont.) mit einem Wechsel zu NPS-freier Lösung durchgeführt, um zu bestätigen, dass der beobachtete Effekt durch NPS ausgelöst wurde und ein Einfluss des Lösungswechsels auszuschließen ist.

Die Abbildung 3-5 zeigt exemplarisch repräsentative Messspuren eines NPS-responsiven Neurons, eines NPS-nicht-responsiven Neurons sowie eines Neurons der Kontrollgruppe.

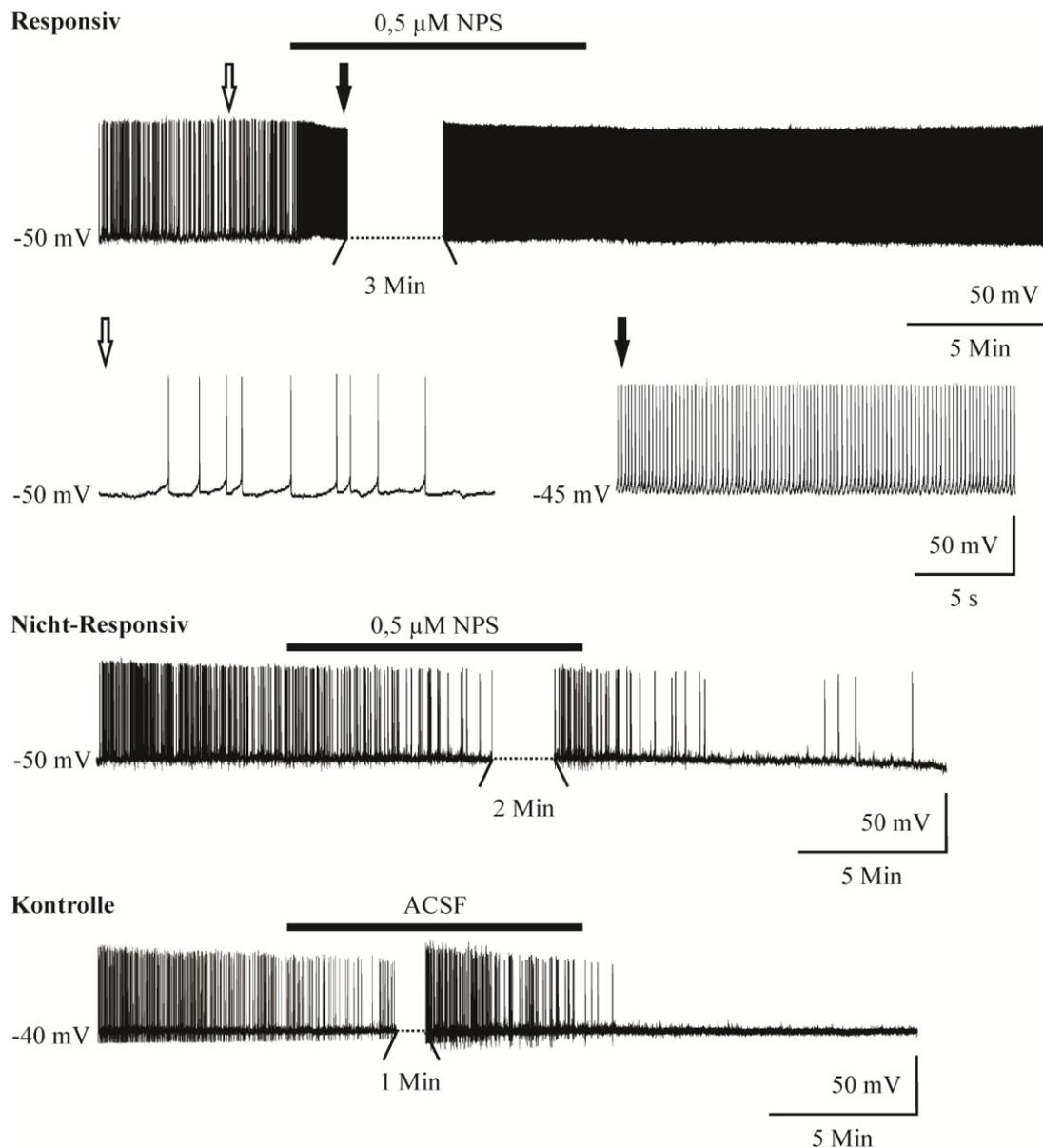


Abbildung 3-5: Beispielspuren der spontanen Aktionspotentialfrequenzen

Gegenüberstellung der Stromspuren eines NPS-responsiven Neurons, eines NPS-nicht-responsiven Neurons und eines Neurons der Kontrollgruppe mit unterschiedlichen Verläufen der sAP-Frequenzen. Die Pfeile zeigen beispielhafte Verläufe der sAP-Frequenz des NPS-responsiven Neurons von je 20s vor und während der Applikation des NPS zur besseren Differenzierbarkeit des Frequenzunterschieds. Der Balken gibt den Zeitpunkt der NPS-/ACSF-Applikation an.

Bei der Analyse der Aktionspotentialfrequenzen fiel auf, dass nicht alle Neurone spontan aktiv sind. Innerhalb der Gruppe der NPS-responsiven Neurone konnte ein Neuron beobachtet werden, welches zunächst keine Spontanaktivität aufwies, allerdings durch die NPS-Applikation eine spontane Aktivität entwickelte. Die sAP-Frequenz dieses Neurons betrug vor der NPS-Applikation 0 Hz und stieg unter der NPS-Applikation auf 0,14 Hz an. Somit wurden auch die Neurone ohne Spontanaktivität vor der NPS-Applikation in die Auswertung einbezogen und es wurde eine zweite Auswertung ausschließlich für die spontan aktiven Neurone angefertigt.

Die mittleren sAP-Frequenzen wurden für jeweils drei Zeitintervalle berechnet: das erste Intervall direkt vor Beginn der NPS-Applikation als Referenz bezeichnet, das zweite Intervall während der NPS-/ACSF-Applikation als NPS bzw. ACSF bezeichnet und das dritte Intervall mit Beginn 1-2 Minuten nach Beginn des Auswasch von NPS.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Auswertung aller Neurone aufgeführt. Die Abbildung 3-6 stellt den Verlauf der sAP-Frequenz der NPS-responsiven und NPS-nicht-responsiven Neurone sowie der zur Kontrolle vermessenen Neurone dar.

Die mittlere sAP-Frequenz der NPS-responsiven Neurone stieg signifikant ($p = 0,01$) durch Zugabe von NPS von anfänglich $0,33 \text{ Hz}$ ($\pm 0,16$, $n = 9/7$) auf $3,27 \text{ Hz}$ ($\pm 0,76$, $n = 9/7$). Nach dem Auswasch des NPS kam es zu einer signifikanten ($p < 0,05$) Abnahme der mittleren sAP-Frequenz der NPS-responsiven Neurone von $3,27 \text{ Hz}$ ($\pm 0,76$, $n = 9/7$) auf $1,29 \text{ Hz}$ ($\pm 0,60$, $n = 8/7$). Die mittleren sAP-Frequenzen der NPS-responsiven Neurone zeigten vor der NPS-Applikation ($0,33 \text{ Hz}$ ($\pm 0,16$, $n = 9/7$)) und nach dem Auswasch von NPS ($1,29 \text{ Hz}$ ($\pm 0,60$, $n = 8/7$)) keine signifikante ($p = 0,66$) Differenz.

Die mittleren Messwerte der NPS-nicht-responsiven Neurone lagen bei $0,13 \text{ Hz}$ ($\pm 0,07$, $n = 9/6$) vor Applikation und bei $0,04 \text{ Hz}$ ($\pm 0,03$, $n = 9/6$) während der Applikation und unterschieden sich damit nicht signifikant ($p = 0,86$). Darüber hinaus gab es für die Gruppe der NPS-nicht-responsiven Neurone keine signifikanten Unterschiede zwischen den mittleren Werten bei der NPS-Applikation ($0,04 \text{ Hz}$ ($\pm 0,03$, $n = 9/6$)) und nach dem Auswasch des NPS ($0,01 \text{ Hz}$ ($\pm 0,01$, $n = 7/4$); $p = 0,40$) als auch zwischen den mittleren Werten vor der NPS-Applikation ($0,13 \text{ Hz}$ ($\pm 0,07$, $n = 9/6$)) und nach dem Auswasch des NPS ($0,01 \text{ Hz}$ ($\pm 0,01$, $n = 7/4$); $p = 0,67$).

Die Neurone der Kontrollgruppe wiesen eine mittlere sAP-Frequenz von $0,12 \text{ Hz}$ ($\pm 0,07$, $n = 11/4$) vor und von $0,05 \text{ Hz}$ ($\pm 0,04$, $n = 11/4$) unter der Applikation der NPS-freien Lösung auf. Hier bestand kein signifikanter ($p = 0,94$) Unterschied. Zwischen den mittleren Messwerten unter der NPS-Applikation ($0,05 \text{ Hz}$ ($\pm 0,04$, $n = 11/4$)) und nach dem Auswasch der NPS-freien Lösung (0 Hz (± 0 , $n = 11/4$)) war keine signifikante ($p = 0,26$) Differenz festzustellen. Auch die Gegenüberstellung der mittleren Messwerte vor der NPS-Applikation ($0,12 \text{ Hz}$ ($\pm 0,07$, $n = 11/4$)) und nach dem Auswasch der NPS-freien Lösung (0 Hz (± 0 , $n = 11/4$)) ergab keinen signifikanten ($p = 0,43$) Unterschied.

Vor der Applikation des NPS konnte keine signifikante ($p = 0,16$) Differenz der mittleren sAP-Frequenzen der NPS-responsiven und NPS-nicht-responsiven Neurone (R: 0,33 Hz ($\pm 0,16$, $n = 9/7$); NR: 0,13 Hz ($\pm 0,07$, $n = 9/6$)) festgestellt werden. Während der Applikation von NPS unterschieden sich die mittleren sAP-Frequenzen signifikant ($p < 0,01$) zwischen den NPS-responsiven (3,27 Hz ($\pm 0,76$, $n = 9/7$)) und NPS-nicht-responsiven Neuronen (0,04 Hz ($\pm 0,03$, $n = 9/6$)). Nach dem Auswasch des NPS konnte kein signifikanter ($p = 0,09$) Unterschied zwischen den Mittelwerten der Gruppe der NPS-responsiven (1,29 Hz ($\pm 0,60$, $n = 8/7$)) und der NPS-nicht-responsiven Neurone (0,01 Hz ($\pm 0,01$, $n = 7/4$)) mehr beobachtet werden.

Weiterhin wurden die mittleren sAP-Frequenzen der NPS-responsiven Neurone und der Neurone der Kontrollgruppe miteinander verglichen. Vor Applikation des NPS bzw. der NPS-freien Lösung betragen die mittleren sAP-Frequenzen 0,33 Hz ($\pm 0,16$, $n = 9/7$) für die NPS-responsiven Neurone und 0,12 Hz ($\pm 0,07$, $n = 11/4$) in der Kontrollgruppe ($p = 0,16$). Unter der Applikation von NPS wurden signifikant ($p < 0,01$) höhere mittlere sAP-Frequenzen von 3,27 Hz ($\pm 0,76$, $n = 9/7$) für die NPS-responsiven Neurone im Gegensatz zu 0,05 Hz ($\pm 0,04$, $n = 11/4$) für die Kontrollgruppe unter der Applikation der NPS-freien Lösung gemessen. Zum Versuchsende nach dem Auswasch des NPS bzw. der NPS-freien Lösung unterschieden sich die mittleren sAP-Frequenzen ebenfalls signifikant (Resp.: 1,29 Hz ($\pm 0,60$, $n = 8/7$); Kont.: 0 Hz (± 0 , $n = 11/4$); $p = 0,02$).

Daraufhin wurde die Gruppe der NPS-nicht-responsiven Neurone mit den Neuronen der Kontrollgruppe verglichen. Vor der Applikation des NPS bzw. der NPS-freien Lösung waren die mittleren sAP-Frequenzen der NPS-nicht-responsiven Neurone (0,13 Hz ($\pm 0,07$, $n = 9/6$)) und der Kontrollgruppe (0,12 Hz ($\pm 0,07$, $n = 11/4$)) nicht statistisch signifikant ($p = 0,82$) voneinander abzugrenzen. Bei Applikation des NPS bzw. der NPS-freien Lösung unterschieden sich die mittleren sAP-Frequenzen ebenfalls nicht statistisch signifikant ($p = 0,47$) zwischen den NPS-nicht-responsiven Neuronen (0,04 Hz ($\pm 0,03$, $n = 9/6$)) und der Kontrollgruppe (0,05 Hz ($\pm 0,04$, $n = 11/4$)). Nach dem Auswasch von NPS bzw. der NPS-freien Lösung war auch kein statistisch signifikanter ($p = 0,47$) Unterschied zwischen den mittleren sAP-Frequenzen der beiden Gruppen (N.-Resp.: 0,01 Hz ($\pm 0,01$, $n = 7/4$); Kont.: 0 Hz (± 0 , $n = 11/4$)) zu beobachten.

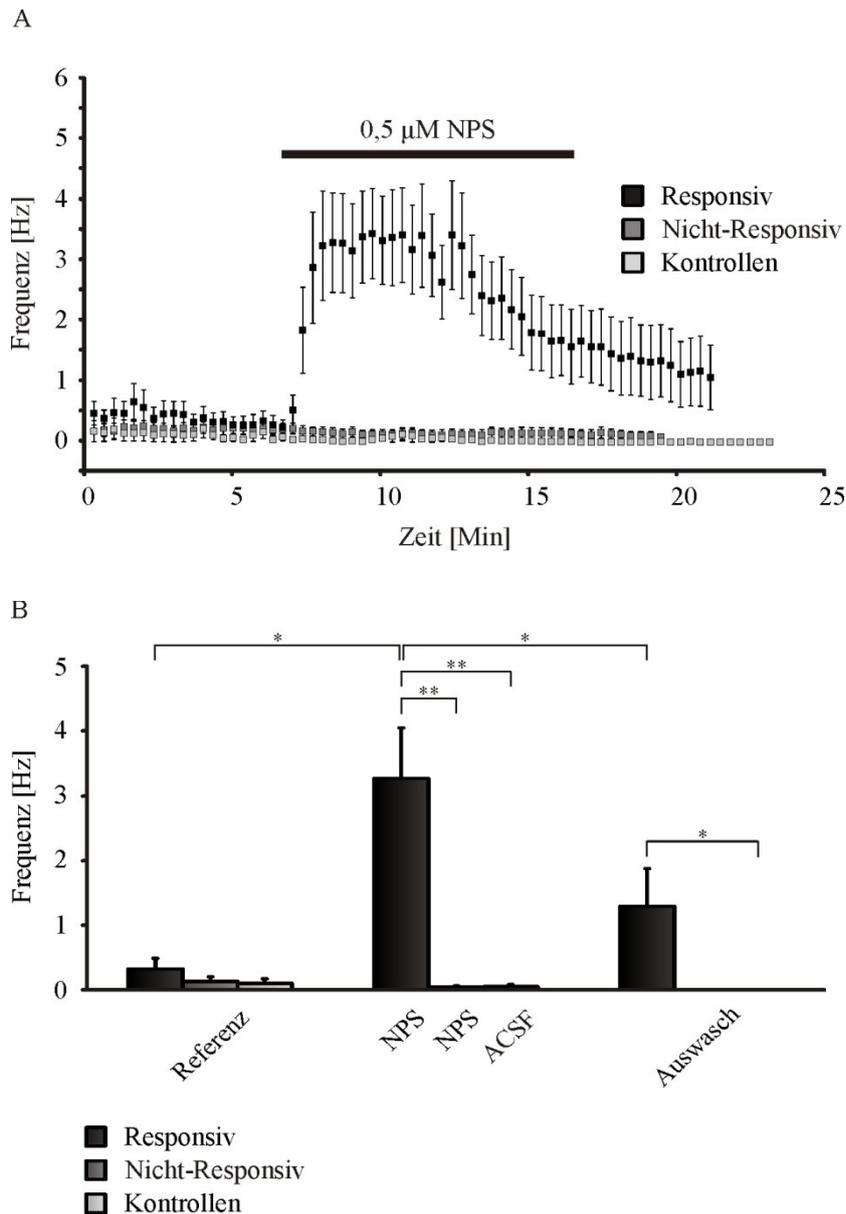


Abbildung 3-6: Whole-cell-Messungen der spontanen Aktionspotentialfrequenz

Gegenüberstellung der Verläufe der mittleren sAP-Frequenzen der NPS-responsiven Neurone ($n = 9/7$, ab 14. Minute $n = 8/7$) und der NPS-nicht-responsiven Neurone ($n = 9/6$) sowie der Neurone der Kontrollgruppe ($n = 11/4$); B: Vergleich der mittleren sAP-Frequenzen der NPS-responsiven ($n = 9/7$; Auswasch: $n = 8/7$) und NPS-nicht-responsiven Neurone ($n = 9/6$; Auswasch: $n = 7/4$) sowie der Neurone der Kontrollgruppe ($n = 11/4$) vor sowie während der NPS-Applikation über das Perfusionssystem und nach dem Auswasch von NPS

Wie oben bereits erwähnt wurde eine zweite Auswertung mit ausschließlicher Berücksichtigung der spontan aktiven Neurone durchgeführt, deren Ergebnisse hier zusammengefasst sind.

Die mittlere sAP-Frequenz der NPS-responsiven Neurone stieg durch Zugabe von NPS von anfänglich 0,42 Hz ($\pm 0,19$, $n = 7/5$) auf 4,18 Hz ($\pm 0,61$, $n = 7/5$) an. Nach dem Auswasch

des NPS kam es zu einer Abnahme der mittleren sAP-Frequenz der NPS-responsiven Neurone von 4,18 Hz ($\pm 0,61$, $n = 7/5$) auf 1,72 Hz ($\pm 0,71$, $n = 6/5$).

Die mittleren Messwerte der NPS-nicht-responsiven Neurone sanken von 0,40 Hz ($\pm 0,10$, $n = 3/3$) vor Applikation auf 0,12 Hz ($\pm 0,06$, $n = 3/3$) während der Applikation des NPS ab. Darüber hinaus kam es für die Gruppe der NPS-nicht-responsiven Neurone zu einer weiteren Reduktion der mittleren sAP-Frequenz von 0,12 Hz ($\pm 0,06$, $n = 3/3$) unter NPS auf sAP-Frequenzen von 0,02 Hz bzw. 0,06 Hz ($n = 2/2$) nach dem Auswasch des NPS.

Vor der Applikation des NPS betrug die mittleren sAP-Frequenzen der NPS-responsiven Neurone 0,42 Hz ($\pm 0,19$, $n = 7/5$) und die der NPS-nicht-responsiven Neurone 0,40 Hz ($\pm 0,10$, $n = 3/3$). Während der Applikation von NPS unterschieden sich die mittleren sAP-Frequenzen zwischen den NPS-responsiven (4,18 Hz ($\pm 0,61$, $n = 7/5$)) und NPS-nicht-responsiven Neuronen (0,12 Hz ($\pm 0,06$, $n = 3/3$)). Nach dem Auswasch des NPS verringerte sich der Unterschied zwischen dem Mittelwert der Gruppe der NPS-responsiven Neurone (1,72 Hz ($\pm 0,71$, $n = 6/5$)) und den sAP-Frequenzen der NPS-nicht-responsiven Neurone 0,02 Hz bzw. 0,06 Hz ($n = 2/2$) wieder.

Die Neurone der Kontrollgruppe wiesen eine sAP-Frequenz von 0,08 Hz bzw. 0,80 Hz ($n = 2/2$) vor und von 0,03 Hz bzw. 0,47 Hz ($n = 2/2$) unter der Applikation der NPS-freien Lösung auf. Die Messwerte unter der Applikation der NPS-freien Lösung von 0,03 Hz bzw. 0,47 Hz ($n = 2/2$) sanken nach dem Auswasch dieser auf 0 Hz bzw. 0 Hz ($n = 2/2$) ab.

Die Abbildung 3-7 stellt den Verlauf der sAP-Frequenz der spontan aktiven Neurone der NPS-responsiven und NPS-nicht-responsiven Neurone sowie der zur Kontrolle vermessenen Neurone dar.

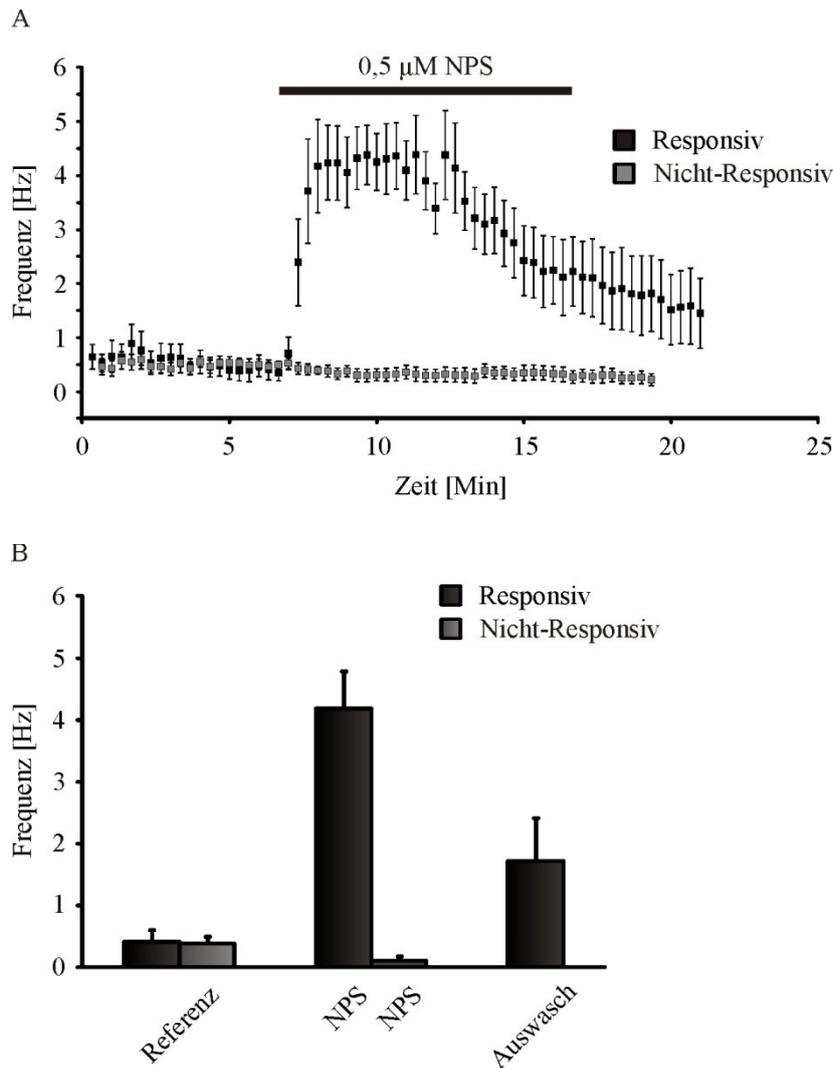


Abbildung 3-7: Whole-cell-Messungen der spontanen Aktionspotentialfrequenz (ausschließlich spontan aktive Neurone)

A: Gegenüberstellung der Verläufe der mittleren sAP-Frequenzen der NPS-responsiven Neurone ($n = 7/5$, ab 14. Minute $n = 6/5$) und der NPS-nicht-responsiven Neurone ($n = 3/3$); B: Vergleich der mittleren sAP-Frequenzen der NPS-responsiven Neurone ($n = 7/5$; Auswasch: $n = 6/5$) und NPS-nicht-responsiven Neurone ($n = 3/3$; Auswasch: $n = 2/2$, nicht dargestellt) vor sowie während der Applikation von NPS über das Perfusionsystem und nach dem Auswasch des NPS

Zusammenfassend ließ sich bei den NPS-responsiven Neuronen eine deutliche Erhöhung der mittleren sAP-Frequenz durch die NPS-Applikation beobachten, welche nach dem Auswasch des NPS partiell reversibel war. Zudem konnte ein NPS-responsives Neuron, welches zunächst keine spontane Aktivität zeigt, durch die Applikation von NPS in einen spontan aktiven Zustand versetzt werden. Die mittlere sAP-Frequenz der NPS-nicht-responsiven Neurone und der Neurone der Kontrollgruppe fiel unabhängig von der NPS-Applikation, kontinuierlich im Verlauf der Messung ab.

3.3 Aktive und passive Membraneigenschaften

Da nicht alle Neurone eine Antwort auf das NPS zeigten, wurden die elektrophysiologischen Charakteristika der NPS-responsiven und NPS-nicht-responsiven Neurone bei einem Haltepotential von -55 bis -60 mV untersucht, um mögliche Unterschiede zwischen beiden Gruppen festzustellen. Im sogenannten Current-clamp-Modus konnten Veränderungen des Membranpotentials bei vorgegebener Strominjektion aufgezeichnet und damit Informationen sowohl über die passiven als auch über die aktiven Membraneigenschaften gewonnen werden.

Die Abbildung 3-8 zeigt beispielhafte Messspuren eines NPS-responsiven und eines NPS-nicht-responsiven Neurons bei zwei verschiedenen Haltepotentialen (-55 mV bzw. -75 mV).

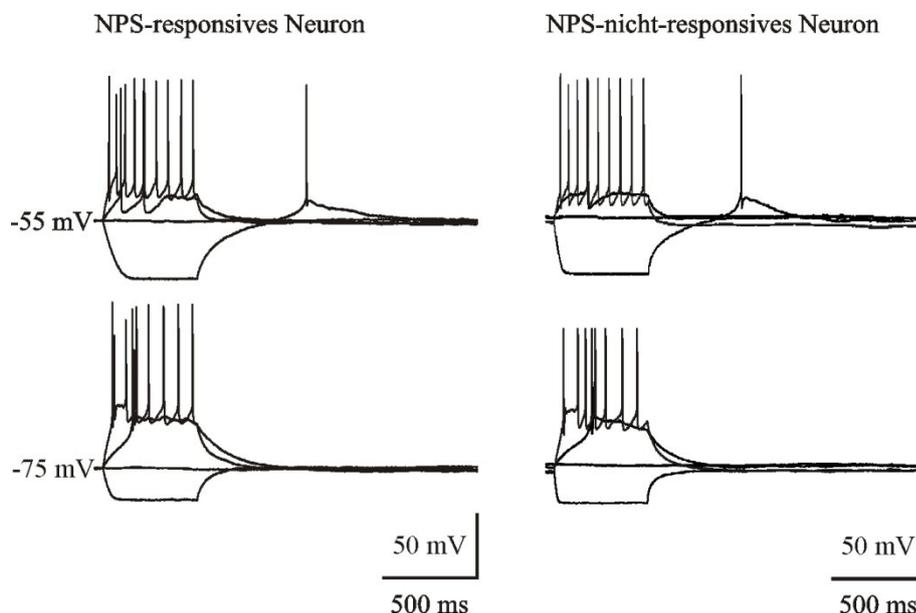


Abbildung 3-8: Charakterisierung der NPS-responsiven und NPS-nicht-responsiven Neurone

Gegenüberstellung von repräsentativen Stromspuren in der Charakterisierung der NPS-responsiven und NPS-nicht-responsiven Neurone bei zwei verschiedenen Haltepotentialen (-55 mV bzw. -75 mV)

In einem ersten Schritt wurden die passiven Membraneigenschaften ausgewertet. Analysiert wurden der Eingangswiderstand, die Membrankapazität und der Voltage Sag. Der Voltage Sag entsteht durch einen in Folge einer Hyperpolarisation aktivierten Einwärtsstrom (I_h) über Kationen-Kanäle (HCN). Dieser führt zu einer geringen Depolarisation des Membranpotentials. Die jeweiligen mittleren Messwerte und deren Standardfehler sind in der Tabelle 3-1 dargestellt.

Die NPS-responsiven Neurone wiesen im Gegensatz zu den NPS-nicht-responsiven Neuronen einen signifikant ($p = 0,04$) geringeren mittleren Voltage Sag auf. Darüber hinaus zeigten sich

keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den NPS-responsiven und NPS-nicht-responsiven Neuronen.

	Responsives Neuron	Nicht-Responsives Neuron
Eingangswiderstand [M Ω]	407,78 \pm 14,20	361,67 \pm 17,70
Membrankapazität [pF]	45,56 \pm 2,53	45,95 \pm 4,79
Voltage Sag [mV]	0,4 \pm 0,05 *	0,77 \pm 0,13 *

Tabelle 3-1: Passive Membraneigenschaften

Mittelwerte und Standardfehler des Eingangswiderstands, der Membrankapazität und des Voltage Sag der NPS-responsiven (n = 9/7) und NPS-nicht-responsiven Neurone (n = 9/6)

In einem zweiten Schritt wurden die aktiven Membraneigenschaften untersucht. Analysiert wurden die Frequenz zwischen den ersten zwei APs, die Zahl der APs, die Amplitude der ersten zwei APs und deren Quotient (2/1), die AP-Schwelle und AP-Halbbreite und die Nachhyperpolarisation. Die jeweiligen Messwerte sind in der Tabelle 3-2 dargestellt.

Hier zeigte sich ein signifikanter ($p < 0,01$) Unterschied zwischen den NPS-responsiven und den NPS-nicht-responsiven Neuronen bezüglich der mittleren Amplitude des ersten APs. Bezogen auf die anderen Kriterien ließen sich keine signifikanten Differenzen zwischen den beiden Gruppen feststellen. Insbesondere die Frequenz zwischen den ersten beiden APs unterlag einer starken Streuung.

	Responsives Neuron	Nicht-Responsives Neuron
AP-Frequenz (1-2) [Hz]	47,44 ± 14,55	58,67 ± 15,91
AP-Anzahl	7,78 ± 0,80	6,56 ± 0,78
1. AP-Amplitude [mV]	83,56 ± 1,47 **	75,52 ± 2,05 **
2. AP-Amplitude [mV]	68,63 ± 3,01	58,06 ± 4,70
AP-Amplituden-Quotient (2/1) [mV]	0,82 ± 0,03	0,76 ± 0,05
Schwelle [mV]	33,46 ± 0,37	31,88 ± 0,70
Halbbreite [ms]	1,22 ± 0,04	1,12 ± 0,07
AHP [mV]	-11,19 ± 0,64	-13,18 ± 0,89

Tabelle 3-2: Aktive Membraneigenschaften

Mittelwerte und Standardfehler der Frequenz der ersten beiden APs, der maximalen Zahl der APs, der Amplitude des ersten und zweiten APs sowie deren Quotient, der Schwelle zur Auslösung eines APs, der Halbbreite des APs und der Amplitude des nachhyperpolarisierenden Potentials der NPS-responsiven (n = 9/7) und NPS-nicht-responsiven Neurone (n = 9/6)

Im Vergleich der Messwerte der NPS-responsiven und NPS-nicht-responsiven Neurone ergab sich eine weitestgehende Übereinstimmung der elektrophysiologischen Eigenschaften. Dennoch fanden sich signifikante Unterschiede bezogen auf zwei Kriterien. Die NPS-responsiven Neurone weisen im Vergleich zu den NPS-nicht-responsiven Neuronen eine größere mittlere Amplitude des ersten APs und eine geringere mittlere Amplitude des Voltage Sag auf. Zudem kann man eine deutliche Streuung der Messwerte innerhalb der Gruppen, insbesondere bei der Frequenz zwischen den ersten beiden APs, beobachten.

3.4 Spontane exzitatorische postsynaptische Ströme (sEPSC)

Die glutamatergen sEPSC entstehen durch die präsynaptische Freisetzung von Glutamat, welches in der Folge an seine postsynaptischen Rezeptoren bindet und so einen depolarisierenden Strom im postsynaptischen Neuron auslöst. Hierbei kann die

Glutamatfreisetzung beispielsweise durch die Bindung eines Neurotransmitters an seinen präsynaptischen Rezeptor oder durch präsynaptisch ankommende AP beeinflusst werden. Die glutamatergen sEPSC wurden dementsprechend aufgezeichnet, um einen möglichen Effekt des NPS auf die exzitatorische, glutamaterge synaptische Übertragung der Neurone des aPVT zu untersuchen.

Die Abbildung 3-9 veranschaulicht beispielhafte Messspuren der registrierten sEPSC vor sowie während der Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ NPS und schließlich nach dem Auswaschen des NPS.

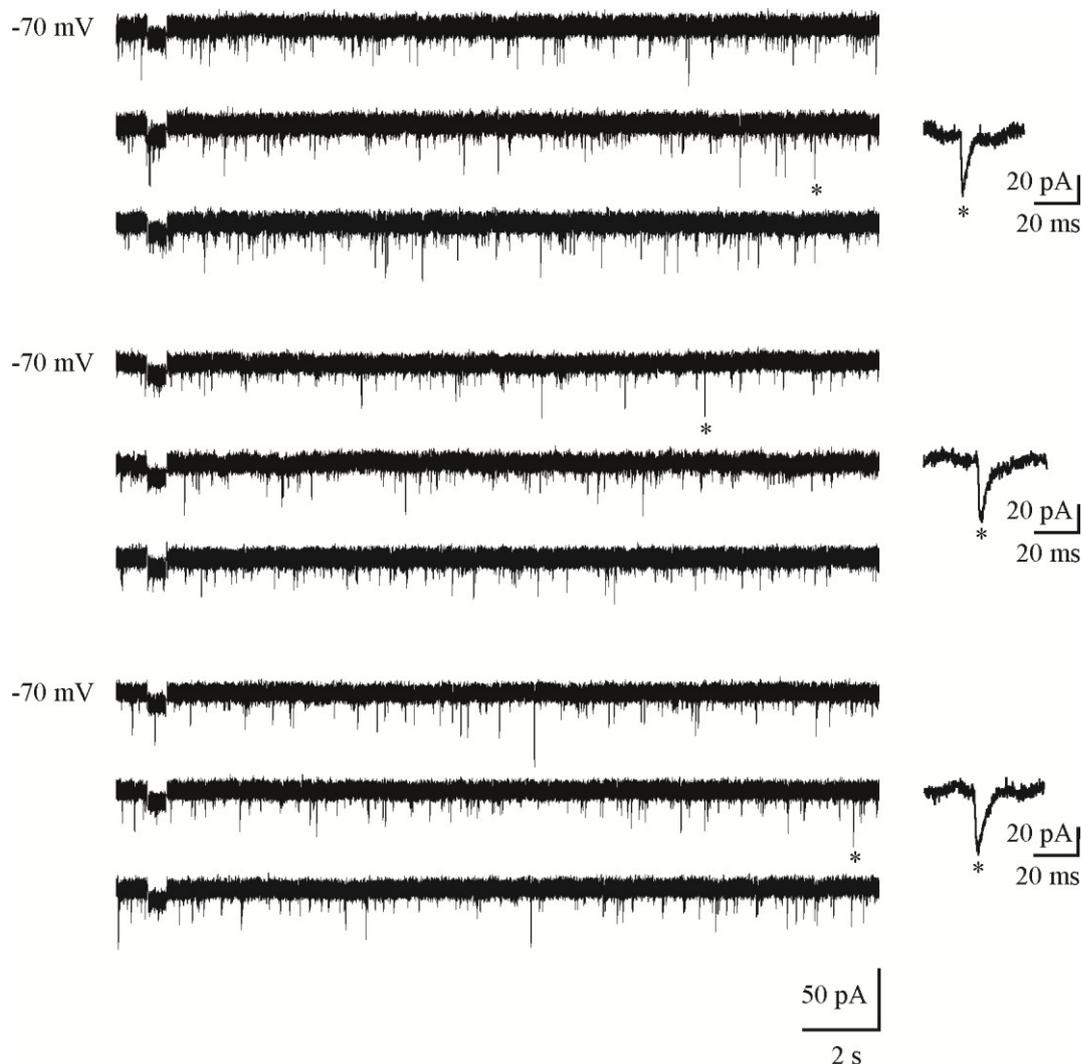


Abbildung 3-9: Beispielspuren der sEPSC bei $0,5 \mu\text{M}$ NPS

Beispielspuren der sEPSC vor sowie während der Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ NPS über das Perfusionssystem und nach dem Auswasch des NPS

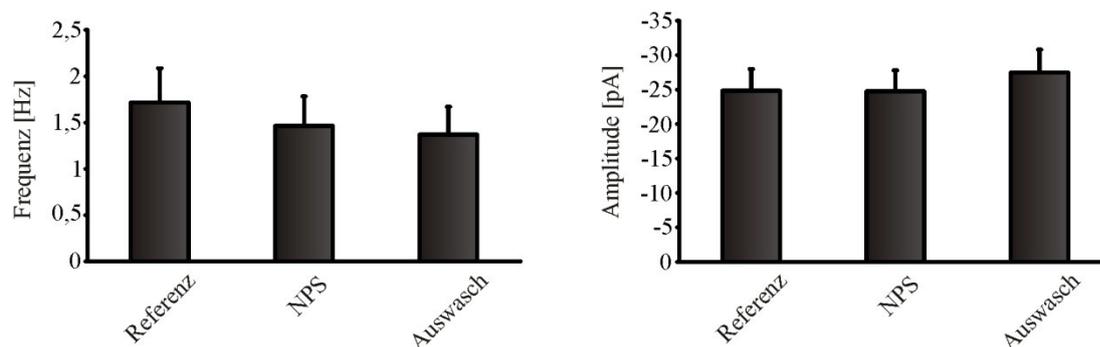
Die Analyse der so registrierten Stromverläufe berücksichtigt die Frequenz und die Amplitude der sEPSC, um festzustellen, ob diese durch die Applikation von NPS beeinflusst werden. Die oben genannten Messwerte wurden für jeweils drei Zeitintervalle berechnet: das

erste Intervall direkt vor Beginn der NPS-Applikation als Referenz bezeichnet, das zweite Intervall während der NPS-Applikation als NPS bezeichnet und das dritte Intervall mit Beginn nach 6 Minuten Auswasch des NPS. Bezüglich der NPS-Konzentration ergaben sich insgesamt zwei Versuchsgruppen (0,25 μ M NPS n = 8/4; 0,5 μ M NPS n = 13/8).

In der Abbildung 3-10 sind die mittleren Frequenzen und mittleren Amplituden der sEPSC vor sowie bei der Applikation von 0,25 μ M NPS über das Perfusionssystem und nach dem Auswasch des NPS dargestellt.

In der Versuchsreihe mit einer Konzentration des NPS von 0,25 μ M wurde eine mittlere Frequenz der sEPSC von 1,72 Hz (\pm 0,35, n = 8/4) vor Applikation gemessen. Unter der Applikation von 0,25 μ M NPS kam es zu einem statistisch nicht signifikanten ($p = 0,57$) Abfall der mittleren sEPSC-Frequenz auf 1,46 Hz (\pm 0,30, n = 8/4). Im weiteren Verlauf kam es erneut zu einem statistisch nicht signifikanten ($p = 0,96$) Abfall der mittleren sEPSC-Frequenz von der NPS-Applikation (1,46 Hz (\pm 0,30, n = 8/4)) auf 1,37 Hz (\pm 0,28, n = 8/4) nach dem Auswasch des NPS. Schließlich ergab auch der Vergleich der mittleren sEPSC-Frequenz vor der Applikation des NPS (1,72 Hz (\pm 0,35, n = 8/4)) und nach dem Auswasch des NPS (1,37 Hz (\pm 0,28, n = 8/4)) keinen statistisch signifikanten ($p = 0,51$) Unterschied.

Es konnte eine mittlere Amplitude der sEPSC von -24,84 pA (\pm 2,93, n = 8/4) vor Applikation gemessen werden. Unter der Applikation des NPS stieg dieser Wert statistisch nicht signifikant ($p = 0,96$) auf eine mittlere Amplitude von -24,76 pA (\pm 2,83, n = 8/4) an. Der Vergleich der mittleren Amplitude unter der NPS-Applikation (-24,76 pA (\pm 2,83, n = 8/4)) mit dieser nach dem Auswasch des NPS (-27,46 pA (\pm 3,12, n = 8/4)) zeigte einen statistisch nicht signifikanten ($p = 0,51$) Abfall. Auch die Gegenüberstellung des Ausgangswertes (-24,84 pA (\pm 2,93, n = 8/4)) und der mittleren Amplitude nach dem Auswasch des NPS (-27,46 pA (\pm 3,12, n = 8/4)) erbrachte keinen statistisch signifikanten ($p = 0,65$) Unterschied.

sEPSC bei 0,25 μ M NPS**Abbildung 3-10: sEPSC bei 0,25 μ M NPS**

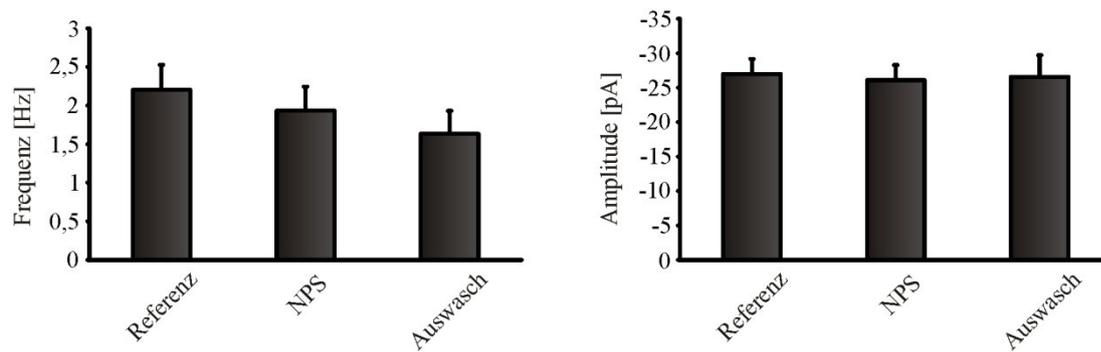
Darstellung der mittleren Frequenzen und mittleren Amplituden der sEPSC vor sowie während der Applikation von 0,25 μ M NPS über das Perfusionssystem und nach dem Auswasch des NPS (n = 8/4)

In der zweiten Versuchsreihe wurde eine NPS-Konzentration von 0,5 μ M gewählt, um einen ausbleibenden Effekt durch eine möglicherweise zu niedrige Konzentration des NPS am Wirkort auszuschließen.

Die Abbildung 3-11 zeigt die mittlere Frequenz und mittlere Amplitude der sEPSC vor sowie bei der Applikation von 0,5 μ M NPS über das Perfusionssystem und nach dem Auswasch des NPS.

Hierbei waren die mittleren Frequenzen der sEPSC mit einem Wert von 2,36 Hz (\pm 0,29, n = 13/8) vor Applikation und 2,06 Hz (\pm 0,29, n = 13/8) bei Applikation nicht statistisch signifikant (p = 0,43) unterschiedlich. Der Vergleich der mittleren sEPSC-Frequenz unter NPS (2,06 Hz (\pm 0,29, n = 13/8)) und nach dem Auswasch des NPS (1,75 Hz (\pm 0,29, n = 13/8)) ergab eine nicht statistisch signifikante (p = 0,44) Abnahme. Weiterhin statistisch nicht signifikant (p = 0,20) unterschiedlich zeigten sich die mittleren sEPSC-Frequenzen vor der NPS-Applikation (2,36 Hz (\pm 0,29, n = 13/8)) und nach dem Auswasch des NPS (1,75 Hz (\pm 0,29, n = 13/8)).

Ebenfalls statistisch nicht signifikant (p = 0,62) unterschiedlich stellten sich die mittleren Amplituden der sEPSC mit einem Wert von -27,69 pA (\pm 2,15, n = 13/8) vor NPS-Applikation und von -26,67 pA (\pm 2,19, n = 13/8) bei Applikation des NPS dar. Die mittlere Amplitude der sEPSC fiel statistisch nicht signifikant (p = 0,68) von -26,67 pA (\pm 2,19, n = 13/8) unter NPS auf -27,23 pA (\pm 3,19, n = 13/8) nach dem Auswasch des NPS ab. Die Gegenüberstellung der mittleren Amplitude der sEPSC vor der NPS-Applikation (-27,69 pA (\pm 2,15, n = 13/8)) und nach dem Auswasch des NPS (-27,23 pA (\pm 3,19, n = 13/8)) ergab keinen statistisch signifikanten (p = 0,47) Unterschied.

sEPSC bei 0,5 μM NPS**Abbildung 3-11: sEPSC bei 0,5 μM NPS**

Darstellung der mittleren Frequenzen und mittleren Amplituden der sEPSC vor sowie während der Applikation von 0,5 μM NPS über das Perfusionssystem und nach dem Auswasch des NPS ($n = 13/8$)

Es konnte somit bei beiden Konzentrationsstufen des NPS (0,25 μM und 0,5 μM) kein signifikanter Einfluss des NPS auf die mittlere Frequenz oder die mittlere Amplitude der sEPSC und damit auf die exzitatorische, glutamaterge synaptische Übertragung gefunden werden.

3.5 Spontane inhibitorische postsynaptische Ströme (sIPSC)

Durch die präsynaptische Freisetzung von GABA und dessen Bindung an seinen spezifischen postsynaptischen Rezeptor, entsteht ein hyperpolarisierender Strom im postsynaptischen Neuron. Dieser wird als sIPSC bezeichnet. Wie bei den sEPSC kann die Freisetzung von GABA aus der Präsynapse durch die Bindung eines Neurotransmitters an seinen präsynaptischen Rezeptor oder durch präsynaptisch ankommende AP moduliert werden. Die sIPSC wurden aufgezeichnet, um einen möglichen Effekt des NPS auf die inhibitorische, gabaerge synaptische Übertragung der Neurone des aPVT zu untersuchen.

Die Abbildung 3-12 veranschaulicht beispielhafte Messspuren der registrierten sIPSC vor sowie während der Applikation von 0,5 μM NPS und schließlich nach dem Auswaschen des NPS.

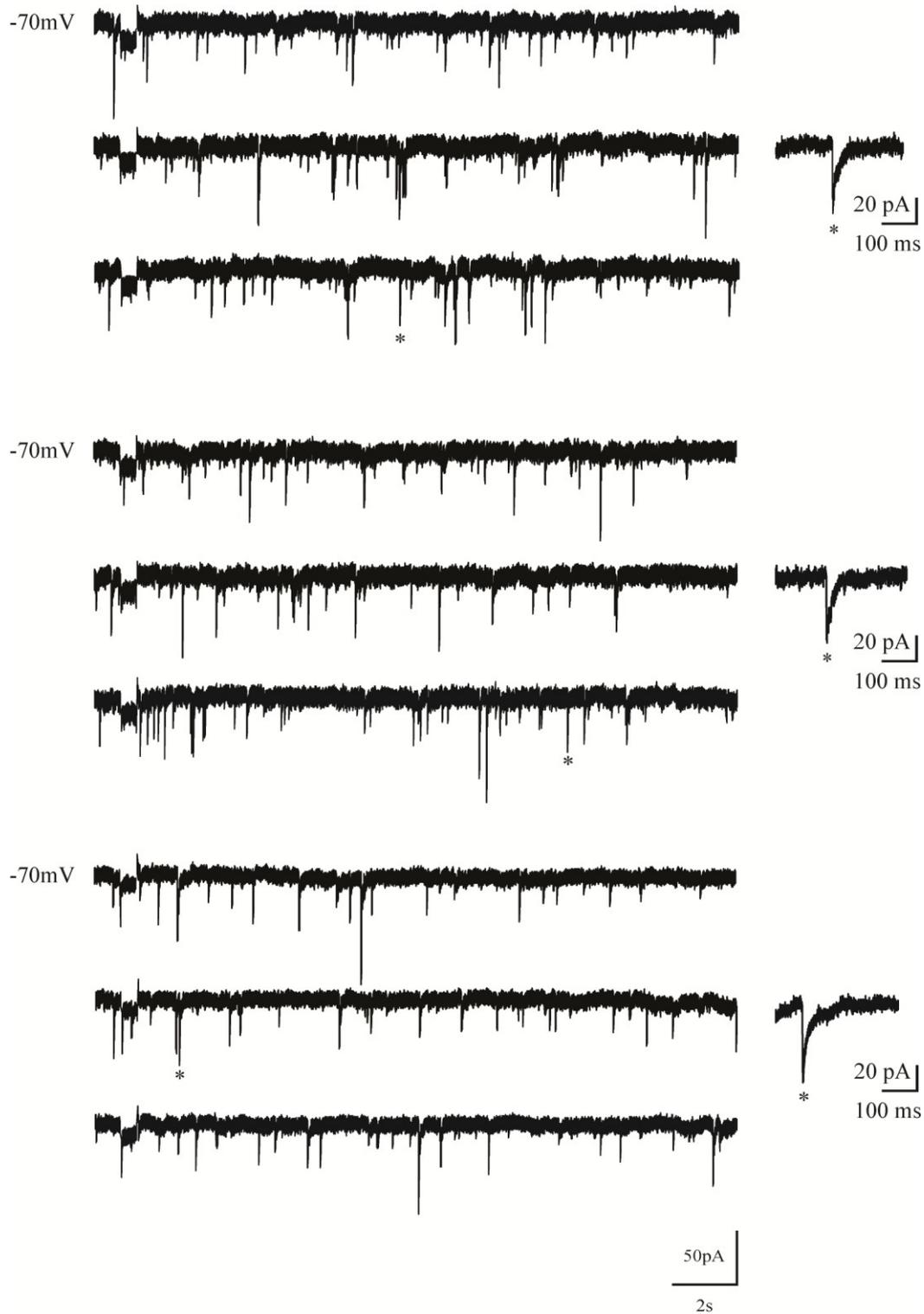


Abbildung 3-12: Beispielspuren der sIPSC

Beispielspuren der sIPSC vor sowie während der Applikation von 0,5 μM NPS über das Perfusionsystem und nach dem Auswasch des NPS

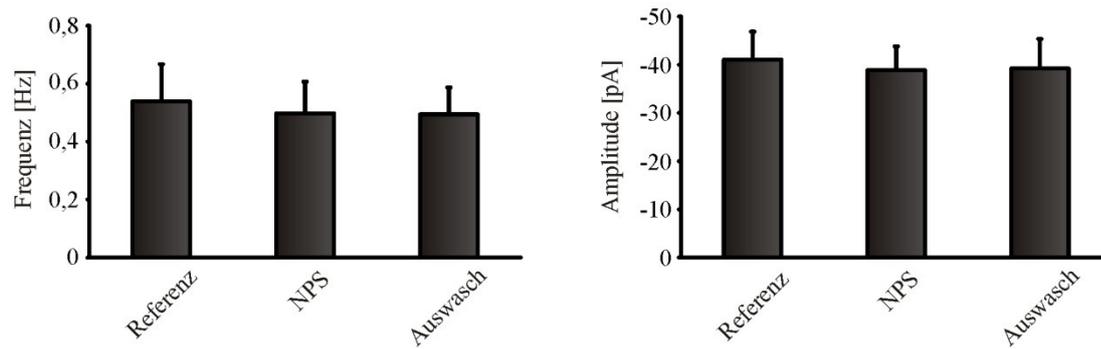
Bei der Analyse der so registrierten Stromverläufe wurden die Frequenz und die Amplitude der sIPSC ausgewertet, um festzustellen, ob diese durch die Applikation von NPS beeinflusst werden. Die oben genannten Messwerte wurden für jeweils drei Zeitintervalle berechnet: das erste Intervall direkt vor Beginn der NPS-Applikation als Referenz bezeichnet, das zweite

Intervall während der NPS-Applikation als NPS bezeichnet und das dritte Intervall mit Beginn nach 10 Minuten Auswasch des NPS. Für die Werte nach Auswasch des NPS musste bei drei Zellen ein geringerer Abstand zur Applikation gewählt werden, da diese später instabil wurden.

In der Abbildung 3-13 sind die mittlere Frequenz und mittlere Amplitude der sIPSC vor sowie bei der Applikation von NPS über das Perfusionssystem und nach dem Auswasch des NPS dargestellt.

Die mittlere Frequenz der sIPSC betrug vor Applikation des NPS 0,54 Hz ($\pm 0,13$, $n = 9/5$) und bei Applikation 0,50 Hz ($\pm 0,11$, $n = 9/5$). Diese Abnahme der mittleren Frequenz der sIPSC erwies sich als statistisch nicht signifikant ($p = 0,73$). Die Gegenüberstellung der mittleren Frequenzen der sIPSC unter Applikation des NPS (0,50 Hz ($\pm 0,11$, $n = 9/5$)) und nach dem Auswasch des NPS (0,49 Hz ($\pm 0,09$, $n = 9/5$)) ergab keinen statistisch signifikanten ($p = 0,80$) Unterschied. Schließlich zeigte auch der Vergleich der mittleren Werte vor Applikation NPS (0,54 Hz ($\pm 0,13$, $n = 9/5$)) und nach dem Auswasch des NPS (0,49 Hz ($\pm 0,09$, $n = 9/5$)) keinen statistisch signifikanten ($p = 0,93$) Unterschied.

Vor Applikation des NPS konnte eine mittlere Amplitude der sIPSC von -41,03 pA ($\pm 5,83$, $n = 9/5$) und bei Applikation von -38,90 pA ($\pm 4,89$, $n = 9/5$) gemessen werden. Dieser Anstieg erwies sich als statistisch nicht signifikant ($p = 0,8$). Von der mittleren Amplitude der sIPSC unter NPS (-38,90 pA ($\pm 4,89$, $n = 9/5$)) kam es zu einer statistisch nicht signifikanten ($p = 0,55$) Abnahme auf -39,20 pA ($\pm 6,15$, $n = 9/5$) nach dem Auswasch des NPS. Der Vergleich der mittleren Werte vor der NPS-Applikation (-41,03 pA ($\pm 5,83$, $n = 9/5$)) und nach dem Auswasch des NPS (-39,20 pA ($\pm 6,15$, $n = 9/5$)) ergab einen statistisch nicht signifikanten ($p = 1$) Unterschied.

sIPSC bei 0,5 μM NPS**Abbildung 3-13: sIPSC bei 0,5 μM NPS**

Darstellung der mittleren Frequenzen und mittleren Amplituden der sIPSC vor sowie während der Applikation von NPS über das Perfusionssystem und nach dem Auswasch des NPS (n = 9/5)

Es konnte somit kein signifikanter Einfluss auf die mittlere Frequenz oder die mittlere Amplitude der sIPSC und damit auf die inhibitorische, gabaerge synaptische Übertragung durch die Applikation des NPS gefunden werden.

4 Diskussion

Zum Verständnis der Wirkungsweise eines spezifischen Neuropeptids, hier des NPS, ist es zunächst notwendig sowohl seinen Bildungsort als auch das Vorkommen seiner spezifischen Rezeptoren zu kennen. Daraufhin ist es möglich, die Effekte des NPS auf zellulärer Ebene mit Hilfe elektrophysiologischer Verfahren zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden die Effekte des NPS auf die Neurone des aPVT, einem Teil der thalamischen Mittellinienkerne, analysiert. Diesem wird eine zentrale Rolle in der Generierung eines adaptiven Verhaltens zugeschrieben (63,83). Zusätzlich konnten bereits mehrere Arbeitsgruppen mit Hilfe von Verhaltensstudien die Effekte des NPS in vivo charakterisieren. Hier zeigten sich insbesondere eine gesteigerte Aufmerksamkeit und Wachheit sowie ein anxiolytischer Effekt, aber auch ein Einfluss auf Lern- und Gedächtnisprozesse, Nahrungsaufnahme und Suchtverhalten (3,7,36,44,59,62,73,78,87). Darüber hinaus wurde eine Assoziation bestimmter Polymorphismen des NPSR1 mit chronisch entzündlichen Erkrankungen und psychiatrischen Erkrankungen, insbesondere Angsterkrankungen, und dem zirkadianen Phänotyp festgestellt (10,11,15,25,41,58). Im Kontext mit den Verhaltensstudien besteht die Zielsetzung darin, die umfassende Funktion und die möglichen Einflüsse des NPS auf die Entwicklung und den Verlauf von Krankheiten zu verstehen, um in der Folge gezielte Therapieansätze entwickeln zu können.

4.1 Vorkommen von NPS-positiven Fasern und Npsr1 im aPVT der Maus

Innerhalb des ZNS von Ratten und Mäusen wird das NPS insbesondere innerhalb zweier Kerngebiete des Hirnstamms aus einem Vorläuferpeptid gebildet (8,87,88). Hierbei handelt es sich bei Mäusen um ein Kerngebiet in der Nähe des Locus coeruleus und den Nucleus subparabrachialis (Kölliker-Fuse) (8). Zudem wurden die Zielgebiete der Projektionen der NPS-positiven Fasern mit Hilfe von zwei spezifischen Antikörperfärbungen gegen NPS untersucht. Hierbei fand sich eine hohe Dichte NPS-positiver Fasern innerhalb des aPVT (8). Darüber hinaus wurde die Expression der Npsr1-mRNA im PVT bereits von Xu und Mitarbeitern an Rattengehirnen beschrieben (87,88). Später konnten Clark und Mitarbeiter die dichte Expression der Npsr1-mRNA ebenfalls an Gehirnschnitten von Mäusen nachweisen (8). Allerdings waren die Effekte des NPS auf die Neurone des aPVT bisher nicht bekannt, sodass diese in der vorliegenden Studie mit elektrophysiologischen Methoden untersucht wurden.

4.2 Effekte des NPS auf Neurone des aPVT

4.2.1 Vorkommen NPS-responsiver und NPS-nicht-responsiver Neurone

In dieser Studie stellte sich zunächst heraus, dass die Applikation von 0,5 μ M NPS deutliche Effekte auf eine Subpopulation der Neurone des aPVT hervorruft. Der Anteil der NPS-responsiven Neurone betrug insgesamt 40-50 % und der der NPS-nicht-responsiven Neurone folglich 50-60 %. Andere Angaben hierzu sind in der Literatur bisher nicht verfügbar. In weiteren Studien mit einer höheren Zahl getesteter Neurone ließe sich der Anteil der NPS-responsiven und NPS-nicht-responsiven Neurone noch genauer bestimmen.

Unabhängig vom aPVT wurde das Vorkommen NPS-responsiver (81,4 %) und NPS-nicht-responsiver Neurone (18,6 %) bereits für den ventromedialen Hypothalamus beschrieben (90). Innerhalb des Nucleus endopiriformis zeigten ebenfalls nicht alle Neurone einen Effekt durch die NPS-Applikation (51). Bezogen auf die Neurone des aPVT liegen nur Daten zur Responsivität auf andere Neurotransmitter vor. Etwa 35 % der Neurone des aPVT zeigen eine Reaktion auf die Applikation von Vasopressin (91). Huang und Mitarbeiter beobachteten während der Applikation von Orexin B einen Anteil von 71 % responsiven Neuronen innerhalb des aPVT (30).

Der PVT ist mit seiner Zugehörigkeit zu verschiedensten Regelkreisen an der Regulierung unterschiedlichster Funktionen beteiligt. Seine afferenten und efferenten Projektionen stehen somit nicht alleinig in Zusammenhang mit dem NPS-System, sodass es verständlich erscheint, dass nicht alle Neurone eine NPS-Responsivität aufweisen. Um konkrete Nachweise darüber zu erlangen, welche Neurone mit welchen Verbindungen diese NPS-Responsivität besitzen, sind weitere Studien notwendig.

4.2.2 Elektrophysiologische Charakteristika der Neurone des aPVT

Da es sowohl NPS-responsive als auch NPS-nicht-responsive Neurone innerhalb des aPVT gibt, stellte sich die Frage, ob sich diese zwei Gruppen anhand ihrer elektrophysiologischen Charakteristika unterscheiden.

Bei der Analyse der passiven und aktiven Membraneigenschaften ergab sich bezogen auf zwei Kriterien ein signifikanter Unterschied. Hinsichtlich der passiven Membraneigenschaften wiesen die NPS-responsiven Neurone einen signifikant niedrigeren mittleren Voltage Sag auf. Hierbei handelt es sich um einen durch Hyperpolarisation ausgelösten depolarisierenden

Kationenstrom (I_h), welcher über bestimmte Kationen-Kanäle (HCN) vermittelt wird. Dieser ist im Vergleich zu anderen Kerngebieten des Thalamus allerdings in der Amplitude gering ausgeprägt (16). Hinzu kommt eine tageszeitliche Variabilität mit einer Abschwächung am Tag (38). Des Weiteren ist die Amplitude des Voltage Sag abhängig von der Stärke der Hyperpolarisation, sodass sich bei moderater Hyperpolarisation deutlich geringere Amplituden ergeben (38,68). Ein signifikanter Unterschied der Amplitude des Voltage Sag könnte durch die differentielle Expression dieser Kationen-Kanäle mit geringerer Expression in den NPS-responsiven Neuronen bedingt sein. Allerdings wären weitere Studien notwendig, um mit molekulargenetischen Methoden die Stärke der Expression genau zu quantifizieren. Bezogen auf die aktiven Membraneigenschaften zeigten die NPS-responsiven Neurone eine signifikant größere mittlere Amplitude des ersten AP. Dies könnte beispielsweise durch die differentielle Expression von spannungsabhängigen Natrium-Kanälen, deren Öffnung durch eine Depolarisation des Membranpotentials getriggert wird, erklärt werden. Allerdings wären auch hier weitere Studien notwendig, um die Ursache für die unterschiedliche Amplitude des ersten AP zu finden. Alle übrigen Kriterien, das heißt gleichzeitig die Mehrzahl der Kriterien, zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den NPS-responsiven und den NPS-nicht-responsiven Neuronen. Folglich stimmten die elektrophysiologischen Charakteristika der Neurone beider Gruppen im Wesentlichen überein, sodass man nicht davon ausgehen kann, dass es sich hierbei um zwei differente Zelltypen handelt. Auch in anderen Studien gibt es bisher keine Hinweise darauf, dass innerhalb des PVT unterschiedliche Zelltypen vorkommen (16,37,38,91,92).

In der Literatur finden sich verschiedene Studien, in denen die elektrophysiologischen Charakteristika der Neurone des aPVT an Gehirnschnitten von Ratten oder seltener Mäusen untersucht wurden. Kolaj und Mitarbeiter wiesen nach, dass die elektrophysiologischen Eigenschaften der Neurone des aPVT einem zirkadianen Rhythmus unterliegen (38). Bei Präparation der Gehirnschnitte während der inaktiven Phase der Ratten, das heißt am Tag, beschrieben sie eine Hyperpolarisation des Ruhemembranpotentials und eine Abnahme des Anteils der spontan aktiven Neurone im Vergleich zur Nacht (38). Die Präparation der Gehirnschnitte in dieser Studie erfolgte während der inaktiven Phase der Tiere. Kolaj und Mitarbeiter maßen einen Anteil von 92 % inaktiven Zellen am Tag. Huang und Mitarbeiter beschreiben bei Mäusen einen Anteil von je etwa 50 % aktiven bzw. inaktiven Zellen bei Präparation der Gehirnschnitte am Tag. In dieser Studie betrug der Anteil der inaktiven Neurone 59 %. Das Ruhemembranpotential der Neurone des aPVT am Tag wird in der Literatur im

Mittel bei etwa -66 mV (Ratten) und etwa -58 mV (Mäusen) angegeben (16,30,37,38,91,92). In dieser Studie betrug das mittlere Ruhemembranpotential etwa -54 mV. Da in den Studien verschiedene intrazelluläre Lösungen verwendet, bei unterschiedlichen Temperaturen gemessen und hier Mäuse anstatt Ratten untersucht wurden, könnten sich dadurch Unterschiede in den Messwerten ergeben (89).

Als typisches Charakteristikum der Neurone des PVT wird ein, ausgehend von einem Membranpotential von etwa -60 mV, durch Hyperpolarisation ausgelöster Calcium-Einstrom über T-Typ Calcium-Kanäle mit Auslösung von AP beschrieben (16,38). Durch den hyperpolarisierenden Strompuls kommt es ebenfalls zur Aktivierung von Kationenkanälen, die zur Ausbildung eines sogenannten Voltage Sag führen (16,91). Bei der Präparation der Gehirnschnitte am Tag zeigte die Mehrzahl der Neurone bei einem Haltepotential von etwa -60 mV ein tonisches Muster der durch Depolarisation ausgelösten AP (38,91). Diese Beobachtungen konnten auch in der vorliegenden Studie gemacht werden.

Zusammenfassend erscheint das Vorliegen verschiedener Zelltypen innerhalb des PVT durch die weitreichende Übereinstimmung der elektrophysiologischen Charakteristika der Neurone unwahrscheinlich. Somit ist es alleinig durch die Analyse der elektrophysiologischen Charakteristika eines Neurons nicht möglich, dieses entweder der Gruppe der NPS-responsiven oder der NPS-nicht-responsiven Neurone sicher zuzuordnen. Zudem konnten die zuvor beschriebenen elektrophysiologischen Charakteristika der Neurone des aPVT auch in der vorliegenden Studie beobachtet werden.

4.2.3 Depolarisation des Membranpotentials durch NPS

In den Whole-cell-Experimenten ergab sich bei den NPS-responsiven Neuronen eine Depolarisation des Membranpotentials um 3,78 mV ($\pm 0,86$) während der NPS-Applikation. Hier bestand ein signifikanter Unterschied zu der Hyperpolarisation des Membranpotentials der NPS-nicht-responsiven Neurone und der Neurone der Kontrollgruppe. Allerdings ist die Messung des Membranpotentials durch den gleichzeitigen Anstieg der AP-Frequenz erschwert, da es zu einer direkten Abfolge der AP ohne zwischenzeitliche Stabilisierung des Potentials bei einem festen Wert kommt. Daher könnte es hilfreich sein, den Verlauf des Membranpotentials in einem anderen Experiment mit Unterdrückung der AP zu untersuchen (37). Mit Hilfe von Tetrodotoxin (TTX) ließen sich Natrium-Kanäle, welche essentiell für die Generierung von AP sind, blockieren (2). So könnte der Einfluss des NPS auf das Membranpotential der

Neurone des aPVT präziser bestimmt werden. Dieser Ansatz wurde bereits in anderen Studien gewählt, in denen eine Depolarisation der Neurone des PVT durch die Applikation anderer Neurotransmitter bzw. der Neurone des ventromedialen Hypothalamus durch die NPS-Applikation nachgewiesen wurde (30,37,90,91). Die der registrierten Depolarisation der Neurone des aPVT durch NPS zugrundeliegenden Mechanismen konnten in dieser Studie noch nicht identifiziert werden.

Zu diesem Zeitpunkt liegen keine weiteren Studien vor, die die elektrophysiologischen Veränderungen der Neurone des aPVT durch die Applikation von NPS untersucht haben. Yoshida und Mitarbeiter wiesen nach, dass die NPS-responsiven Neurone (81,4 %) des ventromedialen Hypothalamus durch NPS zum größten Anteil reversibel depolarisiert und zu einem kleineren Anteil reversibel hyperpolarisiert werden (90). Als der Depolarisation zugrundeliegenden Effekt, fanden sie eine Öffnung von R- und T-Typ Calcium-Kanälen sowie nichtselektiver Kationenkanäle (90). In vorangegangenen Studien, welche den Effekt anderer Neurotransmitter auf die Neurone des PVT untersucht haben, wurde eine Depolarisation mit einer daraufhin erhöhten Aktivität der Neurone nachgewiesen (16,37,91). Unter der Applikation von Vasopressin kam es zu einer reversiblen Depolarisation von 10 mV (± 1) mit folgender Steigerung der neuronalen Aktivität (91). Die Grundlage für die Veränderung des Membranpotentials durch die Vasopressin-Applikation war das Schließen einwärtsrekifizierender Kalium-Kanäle mit einer hierdurch bedingten Reduktion der Membranleitfähigkeit (91). Kolaj bzw. Huang und Mitarbeiter untersuchten den Effekt von Orexinen auf Neurone des PVT. Sie beobachteten eine graduell reversible und dosisabhängige Depolarisation, die zu erhöhter Aktivität mit einem veränderten AP-Muster führte (30,37). In dem Großteil der Neurone konnte eine erniedrigte Membranleitfähigkeit durch den Schluss von pH-sensitiven Kalium-Kanälen (The acid sensitive K^+ -(TASK)-channel), in einem kleineren Teil eine erhöhte Membranleitfähigkeit durch die Öffnung nichtselektiver Kationen-Kanäle oder gar keine Änderung der Membranleitfähigkeit beobachtet werden (16,30,37). Die oben beschriebenen Mechanismen könnten auch bei der durch NPS ausgelösten Depolarisation der Neurone des aPVT eine Rolle spielen. Jedoch sind weitere Studien notwendig, um dies zu klären.

Darüber hinaus ergab sich in den Whole-cell-Experimenten sowohl bei den NPS-nicht-responsiven Neuronen als auch bei den Neuronen der Kontrollmessungen eine Hyperpolarisation des Membranpotentials während der Applikation des NPS bzw. der NPS-freien Lösung im Vergleich zum Referenzwert vor der Applikation (N.-Resp.: -1,84 mV ($\pm 0,58$); Kont.:

-0,76 mV ($\pm 0,48$)). Diese Hyperpolarisation des Membranpotentials wies einen stetigen Verlauf auf und setzte sich auch nach Beendigung der Applikation von NPS bzw. NPS-freier Lösung fort. Yoshida und Mitarbeiter konnten zwar bei einem Teil der Neurone des ventromedialen Hypothalamus eine Hyperpolarisation des Membranpotentials durch NPS beobachten, allerdings war diese im Gegensatz zu der hier gemessenen Hyperpolarisation nach Beendigung der NPS-Applikation reversibel (90). Zudem bestand in dieser Studie kein signifikanter Unterschied zwischen den NPS-nicht-responsiven Neuronen und den Neuronen der Kontrollmessungen. Daher wird hier nicht von einem Effekt des NPS auf die nicht-responsiven Neurone im Sinne einer Hyperpolarisation des Membranpotentials ausgegangen.

4.2.4 Steigerung der spontanen Aktionspotentialfrequenz durch NPS

Um herauszufinden, ob die Applikation des NPS die Aktivität der Neurone des aPVT moduliert, wurde in zwei verschiedenen experimentellen Ansätzen der Verlauf der sAP-Frequenz aufgezeichnet.

Zunächst erfolgte die Durchführung von Messungen in der Cell-attached-Konfiguration. Bei dieser Methode kommt es durch die intakte Zellmembran an der Pipettenspitze nicht zu einer Beeinflussung der spontanen Aktivität der Neurone durch eine Vermischung der Pipettenlösung und des intrazellulären Milieus. Somit stellt sie eine weniger invasive Methode als die Messungen in Whole-cell-Konfiguration dar. Bei den NPS-responsiven Neuronen bewirkte die Applikation von 0,5 μ M NPS eine etwa vierfache Steigerung der sAP-Frequenz, die durch das Auswaschen wiederum partiell reversibel war. Der Anstieg der sAP-Frequenz begann sehr schnell, nach etwa 1 Minute, und die sAP-Frequenz erreichte nach ähnlicher Latenzzeit ihr Maximum. Auch die NPS-nicht-responsiven Neurone und die Neurone der Kontrollgruppe zeigten eine spontane Aktivität, welche im Verlauf der Messung allerdings kontinuierlich abnahm. Diese stetige Reduktion der Spontanaktivität der NPS-nicht-responsiven Neurone wurde nicht als eine Wirkung des NPS gedeutet. Die Gründe hierfür waren ein fehlender zeitlicher Zusammenhang zur Applikation mit einer fehlenden Reversibilität der Veränderung während des Auswaschens und die Übereinstimmung der Veränderung mit dieser der Kontrollmessungen. Eine Ursache für die stetige Abnahme der Spontanaktivität der Neurone könnte beispielsweise eine reduzierte Zahl exzitatorischer Signale durch die übrigen, im Gehirnschnitt enthaltenen Neurone im Verlauf der Messung sein.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Verlauf der sAP-Frequenzen nun in der Whole-cell-Konfiguration registriert, um parallel weitere Parameter wie das Membranpotential zu

erfassen. Die Effekte des NPS auf das Membranpotential der NPS-responsiven Neurone wurden bereits oben diskutiert. Der Anteil der spontan aktiven Neurone war im Vergleich zu den Experimenten in der Cell-attached Konfiguration hier geringer. Eine gewisse Variabilität des Anteils der spontan aktiven Neurone innerhalb des PVT zwischen den Whole-cell- bzw. Cell-attached-Experimenten wurde bereits in der Literatur beschrieben (38). Zudem beschrieben Hermes und Mitarbeiter die Unterdrückung von spontanen Aktionspotentialen durch die Applikation von NBQX bei Neuronen des PVT. Dieses hemmt die glutamaterge Übertragung an Ampa- und Kainat-Typ Glutamat-Rezeptoren wie das hier verwendete DNQX (28,29). Die NPS-responsiven Neurone reagierten auf die NPS-Applikation in Analogie zu den Cell-attached Messungen mit einer deutlichen Steigerung der sAP-Frequenz. Die oben beschriebene, teilweise Reversibilität des Effektes sowie die kurze Latenzzeit zwischen dem Beginn der NPS-Applikation und der Frequenzsteigerung konnten hier bestätigt werden. Die NPS-nicht-responsiven Neurone und die Neurone der Kontrollgruppe zeichneten sich durch eine kontinuierliche Reduktion der spontanen Aktivität im Verlauf der Messung aus. Diese Beobachtung entspricht dem Ergebnis der Cell-attached Messungen und wurde daher aus selbigen Gründen bei den NPS-nicht-responsiven Neuronen nicht als ein Effekt des NPS interpretiert.

Diese Studie konnte als erste und bisher einzige nachweisen, dass die Applikation des NPS in den NPS-responsiven Neuronen des aPVT zu einer Aktivitätssteigerung führt, die sich in einer deutlichen und partiell reversiblen Zunahme der sAP-Frequenz widerspiegelt. Mit Hilfe der Applikation eines spezifischen NPSR-Antagonisten wie beispielsweise des SHA 68 könnte in weiteren Studien untermauert werden, dass dieser Effekt durch die Aktivierung des NPSR vermittelt wird (60).

In der Literatur finden sich alleinig Studien, in denen ähnliche Effekte auf die Spontanaktivität der Neurone des PVT durch andere Botenstoffe beschrieben werden. Die Applikation von Orexinen führt wie oben beschrieben zu einer reversiblen Depolarisation der Neurone des PVT (37). Diese ist verbunden mit einer gesteigerten Spontanaktivität, die sich auf unterschiedliche Weise ausdrücken kann. Entweder konvertierte ein AP-Muster von Salven zu einem tonischen Muster oder die Frequenz des bereits zu Beginn tonischen Musters nahm zu oder aber die Frequenz, Dauer und Zahl der superponierten AP der Salven stieg an (37). Die an anderer Stelle bereits erwähnte Depolarisation der Neurone in Folge der Applikation von Vasopressin, geht mit einer reversiblen Konversion der AP-Folgen von Salven zu einem tonischen Muster einher (91).

4.2.5 Spontane postsynaptische Ströme

Die spontanen postsynaptischen Ströme wurden analysiert, um eine mögliche Wirkung des NPS auf die synaptische Übertragung im Sinne einer Veränderung der registrierten sEPSC oder sIPSC zu detektieren. In diesem Rahmen wurden die Frequenzen und Amplituden der spontanen postsynaptischen Ströme untersucht.

4.2.5.1 Spontane exzitatorische postsynaptische Ströme

Um Einflüsse des NPS auf die exzitatorische, glutamaterge synaptische Übertragung zu untersuchen, wurden zunächst die sEPSC unter Verwendung von Gabazin zur Blockierung von sIPSC registriert. Bei der Analyse der Frequenz und Amplitude der sEPSC konnten keine Veränderungen durch die Applikation von 0,25 μM und 0,5 μM NPS festgestellt werden. Allerdings konnte eine nicht signifikante, stetige Reduktion der Frequenz der sEPSC im Verlauf der Messung beobachtet werden. Diese ist vermutlich auf eine generelle Abnahme der neuronalen Aktivität bzw. der Zahl der vitalen Neurone im Zeitverlauf zurückzuführen. Des Weiteren wäre bei dem oben beschriebenen aktivitätssteigernden Effekt des NPS auf Neurone des aPVT nicht eine Abnahme, sondern eine Zunahme der sEPSC-Frequenz oder -Amplitude plausibel.

4.2.5.2 Spontane inhibitorische postsynaptische Ströme

Unter Verwendung von DNQX und AP5 zur Blockade von sEPSC wurden anschließend die sIPSC registriert, um mögliche Veränderungen der inhibitorischen, gabaergen synaptischen Übertragung zu analysieren. Hierbei zeigte sich kein Effekt der NPS-Applikation (0,5 μM) auf die Frequenz oder Amplitude der sIPSC. Im Verlauf der Messung kam es dennoch zu einem nicht signifikanten, stetigen Abfall der Frequenz der sIPSC. Eine Reduktion der sIPSC-Frequenz stünde zwar nicht im Gegensatz zu dem erregenden Effekt des NPS auf Neurone des aPVT, dennoch würde man einen zeitlichen Zusammenhang zur NPS-Applikation mit einer anschließenden Steigerung der sIPSC-Frequenz während des Auswaschens, also einer zumindest partiellen Reversibilität, erwarten.

4.2.5.3 Synaptische Übertragung

Wie oben beschrieben ließ sich in dieser Studie kein Einfluss des NPS auf die Frequenz oder Amplitude der sEPSC und sIPSC nachweisen. Zu diesem Zeitpunkt liegen keine weiteren Studien vor, welche den Effekt des NPS auf die synaptische Übertragung des aPVT untersucht haben. Jüngling und Mitarbeiter wiesen nach, dass NPS die glutamaterge synaptische Übertragung von Projektionsneuronen der lateralen Amygdala zu inhibitorischen, interkaliereten Neuronen steigert. Hierdurch wird eine vorwärtsgerichtete Inhibition der Neurone der zentralen Amygdala ausgelöst (35). Da NPS die Frequenz der EPSC beeinflusste, handelte es sich um einen präsynaptischen Effekt (35). Meis und Mitarbeiter maßen eine verstärkte glutamaterge synaptische Übertragung innerhalb des endopiriformen Nucleus durch die Applikation von NPS (51). Hierbei kam es zu einer Steigerung sowohl der Frequenz als auch der Amplitude der EPSC. Dieser Effekt wiederum führte zu einer Modulation der synaptischen Übertragung in der Amygdala (51).

Durch das Anfertigen der Hirnschnitte und die damit verbundene Durchtrennung neuronaler Verbindungen bleibt immer nur ein Teil des neuronalen Netzwerkes erhalten. Wird also ein Teil des Netzwerkes durchtrennt, der bei intakten Verbindungen die synaptische Übertragung der Neurone des aPVT beeinflusst, so würde dieser Effekt unterbunden. Meis und Mitarbeiter nutzten dieses Vorgehen bezogen auf ein anderes neuronales Netzwerk und durchtrennten die Verbindung zwischen dem Nucleus endopiriformis und der Amygdala. Hiernach blieb der zuvor beobachtete Effekt auf die synaptische Übertragung in der Amygdala aus (51). Daher wäre es möglich, dass durch die Durchtrennung afferenter Fasern des aPVT die Ausbildung eines Effektes auf die synaptische Übertragung unterbunden wurde. Folglich lässt sich eine Beeinflussung der synaptischen Übertragung durch NPS *in vivo*, das heißt bei einem intakten neuronalen Netzwerk, nicht mit letzter Sicherheit ausschließen. Allerdings ist anzunehmen, dass ein relevanter Teil der Afferenzen aus anderen Kerngebieten des Thalamus oder aus dem PVT selbst bei der Anfertigung der Hirnschnitte erhalten bleibt. In mehreren Tracer-Studien wurde bereits beschrieben, dass sowohl afferente als auch efferente Fasern des PVT ihren Ursprung hauptsächlich in verschiedenen extrathalamischen Kerngebieten und Kortexarealen nehmen. Die afferenten Verbindungen des PVT entspringen dem Hirnstamm, dem Hypothalamus, Strukturen des limbischen Systems und kortikalen Arealen (83). Die efferenten Verbindungen erreichen hauptsächlich subkortikale Zentren, hierunter einen Teil der Basalganglien sowie des limbischen Systems, den Hypothalamus und kortikale Areale (83). Nur wenige efferente Fasern des PVT erstrecken sich in andere Kerngebiete des Thalamus oder

gar in den PVT selbst. Innerhalb des PVT bzw. zwischen dem PVT und anderen thalamischen Kerngebieten scheint es folglich keine ausgeprägten Verbindungen der Neurone untereinander zu geben (83,86). Dies kann in Einklang mit dem Ausbleiben eines Effektes des NPS auf die synaptische Übertragung der Neurone des aPVT gesehen werden.

4.3 Bedeutung der NPS-Effekte im aPVT für neuronale Netzwerke

Ausgehend von den in anderen Studien beschriebenen Verbindungen des PVT mit spezifischen neuronalen Netzwerken und dem in dieser Arbeit gezeigten Effekt des NPS auf Neurone des aPVT können die Auswirkungen der auf zellulärer Ebene beobachteten Effekte auf das Verhalten diskutiert werden.

4.3.1 Steigerung von Wachheit und Aufmerksamkeit

Wie in der Einleitung beschrieben weist der PVT Verbindungen zu Strukturen des Hirnstamms, des Thalamus, des Hypothalamus und des basalen Vorderhirns auf, welche zu den Aufmerksamkeit und Wachheit regulierenden Systemen gezählt werden (34). Es sind bereits andere Neuropeptide wie die Orexine oder Vasopressin bekannt, welche die Aktivität der Neurone des PVT modulieren können (38,91). In dieser Studie wurde erstmalig gezeigt, dass die Applikation von NPS *in vitro* zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung der Neurone des aPVT führt. Da es sich hierbei um exzitatorische, glutamaterge Neurone handelt, bedingt eine Aktivitätssteigerung dieser Neurone wiederum einen gesteigerten exzitatorischen Einfluss auf die nachgeschalteten Neurone (21,30,65). So kann NPS durch seinen erregenden Effekt auf Neurone des aPVT beispielsweise eine Aktivierung des Kortex auslösen, welche anhand eines veränderten EEG-Musters messbar wird (34). Außerdem ist über deszendierende Bahnen zum Rückenmark eine Beeinflussung des Muskeltonus, der motorischen Reaktion auf sensorische Stimuli und der motorischen Aktivität möglich (34). Des Weiteren kann eine Modulation des zirkadianen Rhythmus durch Verbindungen zum Nucleus suprachiasmaticus erfolgen (77). Insgesamt könnte somit die Aktivitätssteigerung der Neurone des aPVT *in vivo* eine Steigerung von Wachheit und Aufmerksamkeit durch eine Verstärkung der exzitatorischen Transmission bedeuten. Dieses Konzept steht in Einklang mit den in Verhaltensstudien erhobenen Beobachtungen einer Steigerung der lokomotorischen Aktivität sowie Wachheit und Aufmerksamkeit durch die Applikation von NPS (73,76,78,87).

4.3.2 Beeinflussung des Furchtgedächtnisses sowie der Furchtreaktionen

Für die Entwicklung und Löschung eines Furchtgedächtnisses sowie die Bahnung von Furchtreaktionen ist ein komplexes neuronales Netzwerk verantwortlich. Als wichtige Komponenten werden insbesondere die Amygdala, der Hippocampus und der mediale Anteil des präfrontalen Kortex angesehen (82). Die Amygdala lässt sich in drei Anteile untergliedern: eine basolaterale, eine zentromediale und eine kortikale Kerngruppe. Die afferenten Signale erreichen die basolaterale Amygdala und werden über eine Vielzahl modulatorischer Verbindungen durch inhibitorische Interneurone schließlich an die zentromediale Amygdala weitergeleitet (4,19,32,49). Die Interneurone wiederum werden durch multiple Faktoren wie Neuropeptide beeinflusst und sie sind essentiell für die Entwicklung synaptischer Plastizität, der Grundlage des Furchtgedächtnisses (19). Darüber hinaus gibt es weitere wichtige Strukturen innerhalb des medialen präfrontalen Kortex: der prälimbische Kortex ist essentiell für den Erwerb, der infralimbische Kortex für die Löschung von konditionierter Furcht (4,49,82). Schließlich wurde bereits eine Modulation insbesondere der Extinktion von Furcht durch den Hippocampus beschrieben (49).

Über Verbindungen zu diesem neuronalen Netzwerk ist eine Einflussnahme des PVT als Teil des mediodorsalen Thalamus auf die Entwicklung eines Furchtgedächtnisses und von Furchtreaktionen möglich (13,42,46,47,63,67,84,86). Nur wenige Studien beziehen sich spezifisch auf den PVT. Es wurde bereits gezeigt, dass der PVT insbesondere eine Rolle bei der Festigung und beim Abrufen eines Furchtgedächtnisses in der späteren Phase spielt (13,67). Diese Effekte werden über erregende Impulse des PVT zur zentralen Amygdala vermittelt (67). Bezogen auf die vorliegende Studie, welche einen erregenden Effekt des NPS auf einige Neurone des aPVT nachweist, wäre folglich eine Angst-steigernde Wirkung zu erwarten. Dies stünde jedoch in Widerspruch zu dem beobachteten anxiolytischen Effekt des NPS in Verhaltensstudien. Allerdings ist zu beachten, dass zwar der größte Teil der Efferenzen des PVT zur zentralen Amygdala gerichtet ist, jedoch auch efferente Projektionen zu anderen Untereinheiten der Amygdala bestehen (14,86). Zudem setzt sich der PVT aus Neuronen mit unterschiedlichen efferenten Zielgebieten zusammen (86) und nicht alle Neurone des PVT zeigen eine Aktivitätssteigerung durch NPS. Somit wäre es möglich, dass die Neurone des PVT, welche durch die Applikation von NPS erregt werden, nicht denen entsprechen, welche über Projektionen zur zentralen Amygdala die Festigung und das Abrufen eines Furchtgedächtnisses vermitteln. Träfen die Projektionen der NPS-responsiven Neurone des aPVT auf Neurone der Amygdala, welche direkt oder indirekt einen inhibitorischen Effekt auf die zen-

trale Amygdala ausüben, wäre eine anxiolytische Wirkung die Folge. Zudem bestehen efferente Projektionen des PVT zum Hippocampus, welcher wie oben beschrieben insbesondere die Extinktion von Furcht modulieren kann (49,86). Weitere Efferenzen erreichen den medialen präfrontalen Kortex, dessen infralimbischer Teil wie oben beschrieben eine Rolle bei der Löschung konditionierter Furcht spielt (82,83,86). Ein weiterer Aspekt ist, dass eine zentrale Aufgabe des PVT die Generierung eines adaptiven Verhaltens ist. Das heißt, dass eine stärkende und schwächende Modulation von Angst notwendig ist, um je nach gegebenem Kontext ein adäquates Verhalten zu ermöglichen (14,82). So scheint es logisch, dass nicht alle Verbindungen des PVT eine Angst-steigernde Wirkung aufweisen sollten.

Eine mögliche Erklärung wäre letztlich auch, dass der anxiolytische Effekt unabhängig vom PVT über eine Freisetzung von NPS in der Amygdala und die dortige direkte Wirkung ausgelöst wird. So führt eine Injektion von NPS in die Amygdala zu einer verminderten Angstreaktion bzw. verbesserten Angst-Löschung bei Mäusen (35).

Hier liegt die Aufgabe künftiger Studien zunächst darin, die genauen Zielgebiete der durch NPS erregten Neurone des aPVT zu benennen und die genannten Hypothesen zu prüfen.

4.4 Pathophysiologische Relevanz

Die Erforschung der Funktion neuronaler Regelkreise ist eine essentielle Grundlage für das Verständnis pathophysiologischer Zusammenhänge bestimmter Krankheitsbilder, welche diese neuronalen Regelkreise betreffen. Diese Arbeit soll dazu beitragen, die Mechanismen zu verstehen, welche den in Verhaltensstudien beobachteten Effekten des NPS zugrunde liegen. Das Ziel ist es, durch ein besseres Verständnis dieser Zusammenhänge Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Therapien zu entwickeln.

4.4.1 Erkrankungen mit Dysregulation von Aufmerksamkeit und Wachheit

Insgesamt betrachtet, unterscheiden sich die Strukturen des Wachheit und Aufmerksamkeit regulierenden Systems anhand ihrer afferenten Verbindungen und der von ihnen exprimierten Neurotransmitter (34). Zusätzlich nehmen verschiedene Neurotransmitter wie das NPS Einfluss auf die Aktivität der ihnen nachgeschalteten Neurone des PVT. Insgesamt entsteht so eine Vielfalt an Regelkreisen und modulatorischen Einflüssen, die es ermöglicht, Aufmerksamkeit und Wachheit genau an die gegebene Situation anzupassen (34). Jedoch gibt es Erkrankungen, in denen es zu einer Fehlregulation von Wachheit und Aufmerksamkeit

kommt. Hier sind einerseits das Krankheitsbild der Narkolepsie und andererseits der Insomnie zu nennen. Die typischen Symptome der Narkolepsie bestehen aus Schlafattacken während des Tages, Kataplexie, Wachlähmung und hypnagogen Halluzinationen (5,45). Die Kataplexie äußert sich durch einen plötzlichen Tonusverlust der Muskulatur und wird meist durch emotionale Reaktionen ausgelöst. Während des Wiedererwachens können Betroffene sich oft nicht äußern oder bewegen, was als Wachlähmung bezeichnet wird. Unter hypnagogen Halluzinationen versteht man Halluzinationen, welche in der Einschlaf- oder Aufwachphase auftreten. Als Ursache wird ein Mangel der Neurotransmitter Orexin A und B angenommen (5,45). Die Prävalenz der Narkolepsie beträgt 20 - 50 / 100.000 Personen und die Erstmanifestation betrifft vor allem Jugendliche und junge Erwachsene (5,45). Bisher gelang es nicht, Orexin-Agonisten zu entwickeln, welche die Blut-Hirnschranke überwinden können, sodass weiterhin auf andere Pharmaka zurückgegriffen werden muss (45). Die medikamentöse Therapie verfolgt zwei Ziele. Verschiedene Stimulanzien wie Modafinil, Methylphenidat oder Amphetamine werden eingesetzt, um die Schlafattacken zu unterbinden (5,45). Problematisch hierbei sind die kardialen und psychiatrischen Nebenwirkungen und der Wirkungsverlust bei manchen Patienten durch Habituation (45). Gegen die anderen Manifestationen werden Pharmaka eingesetzt, welche den REM-Schlaf unterdrücken. Hierzu zählen bestimmte Antidepressiva sowie γ -Hydroxybutyrat (GHB) oder Pregabalin (5,45). Doch auch hier gibt es ein breites Spektrum an Nebenwirkungen. Die Atemdepression des GHB beispielsweise wird durch gleichzeitigen Alkoholkonsum verstärkt und kann lebensbedrohlich sein (45). Des Weiteren besteht bei einer Kombinationstherapie immer das Risiko von Interaktionen. In Verhaltensstudien an Nagetieren bewirkte die Applikation von NPS eine Steigerung von Wachheit und Aufmerksamkeit sowie eine Unterdrückung aller Schlafstadien inklusive des REM-Schlafes (73,78,87). Ahnaou und Mitarbeiter beobachteten ebenfalls eine Reduktion aller Schlafstadien in den ersten Stunden nach der NPS-Applikation. Zusätzlich kam es zu einem verzögerten Einschlafen sowie einer Reduktion der Übergänge zwischen Wachheit und Schlaf (1). Im Wachzustand steigerte das NPS das Vorkommen von Theta-Wellen und im anschließenden kompensatorischen Tiefschlaf das Vorkommen von Delta-Wellen, was die positiven Effekte des NPS auf die Kognition erklären könnte (1). Übereinstimmend diskutieren Oishi und Mitarbeiter, dass das NPS-System an der Regulation des natürlichen Schlafprofils beteiligt sei (57). Dieses Wirkprofil kann daher einen interessanten Ansatz zur Entwicklung neuer Therapeutika darstellen.

Im Gegensatz zur Narkolepsie steht das Krankheitsbild der Insomnie. Sie kann sich als Einschlafstörung, Durchschlafstörung, vorzeitiges Erwachen aus dem Schlaf oder eine Kombination der genannten Schlafstörungen manifestieren (50). Der Verlauf ist entweder akut oder chronisch (> 3 Monate) (5,50). Die Ursachen sind sehr vielfältig und reichen von exogenen Faktoren (z.B. Lärm, Zeitumstellung, Schichtarbeit, Medikamente) zu endogenen Faktoren (psychophysiologische Dysregulation = primäre Insomnie, psychiatrische / somatische Erkrankungen = sekundäre Insomnie) (5,50). Eine erfolgreiche Therapie insbesondere der chronischen Insomnie ist sehr wichtig, da diese mit weiteren Erkrankungen wie Depression, Angsterkrankungen, Konzentrations- und Gedächtnisstörungen sowie mit einer Risikoerhöhung für kardiovaskuläre Erkrankungen und Diabetes einhergeht (50). In der medikamentösen Therapie werden beispielsweise Benzodiazepine und Nicht-Benzodiazepine wie Zolpidem, welche die gabaerge Übertragung steigern, aber auch Antidepressiva oder Melatoninrezeptor-Agonisten eingesetzt (50). Allerdings bringen viele dieser Therapeutika erhebliche Nebenwirkungen mit sich. Bei den Benzodiazepinen beispielsweise kann es unter anderem zu motorischer Unsicherheit, anterograder Amnesie, Atemdepression und nicht zuletzt zur Toleranzentwicklung kommen (50). Aus diesem Grund wäre es vorteilhaft neue Therapeutika zu entwickeln, die effektiv wirksam und dabei nebenwirkungsärmer sind. Hier könnten therapeutische Ansätze im Sinne einer Blockierung des Wachheit vermittelnden NPS-Systems ein möglicher Ausgangspunkt für weitere Studien sein.

Zusammenfassend tragen die in dieser Studie erhobenen Ergebnisse zusätzlich zu den bereits in anderen Studien gewonnenen Erkenntnissen über die Wirkungen des NPS und die Rolle des PVT weiter dazu bei, neue und effektivere Therapien für Erkrankungen zu entwickeln, die das Aufmerksamkeit- und Wachheit regulierende System betreffen.

4.4.2 Angsterkrankungen

Trotz gewisser Unterschiede gibt es dennoch eine relevante Überlappung der neuronalen Strukturen, die in Zusammenhang mit Furcht oder Angst stehen (82). Ebenfalls gibt es eine weitreichende Übereinstimmung der Regelkreise zwischen Tieren und Menschen (32,82). Die bisher gewonnenen Erkenntnisse aus Verhaltensstudien an Tieren zu den Themen Furcht und Angst könnten sich somit durchaus auf den Menschen übertragen lassen. Für den Menschen wurde bereits gezeigt, dass ein bestimmter Polymorphismus des NPSR1 gehäuft bei Patienten mit einer Panikstörung zu finden ist (15,58). Darüber hinaus stellten Ionescu und Mitarbeiter fest, dass nasal appliziertes NPS nach Internalisierung mitsamt dem Rezeptor in verschiedene

Zielbereiche des ZNS wie auch den PVT gelangt. In den Verhaltensbeobachtungen ergab sich ein anxiolytischer Effekt sowohl bei Mäusen ohne als auch bei Mäusen mit pathologischer Angst (31). Insgesamt ergibt sich für das NPS folglich ein großes Potential für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze mit Blick auf Angsterkrankungen. Grundsätzlich stellt Angst eine physiologische Reaktion auf eine potentielle Bedrohung dar (26,79,82). Sie geht einher mit einer Steigerung von Wachheit und Aufmerksamkeit, einer Reaktion des vegetativen Nervensystems und einer Reaktion zum Schutz oder zur Verteidigung (79,82). Ist diese Reaktion allerdings zu ausgeprägt oder tritt sie zu häufig auf, sodass sie das alltägliche Leben des Betroffenen nachhaltig negativ beeinflusst, spricht man von pathologischer Angst (26). Bei den Angsterkrankungen werden die Phobien, welche sich auf einen konkreten Stimulus beziehen, von Panik- und generalisierten Angststörungen, denen dieser Bezug zu einem konkreten Stimulus fehlt, differenziert (26,79). Bei einer Lebenszeitprävalenz von 15 %, häufiger Erstmanifestation im frühen Erwachsenenalter und einer starken Tendenz zur Chronifizierung zählen die Angststörungen zu den relevantesten psychiatrischen Krankheitsbildern (26,79). Die therapeutischen Möglichkeiten umfassen im Wesentlichen die Verhaltenstherapie und eine begleitende medikamentöse Therapie, bei der hauptsächlich Antidepressiva und Benzodiazepine zur Anwendung kommen (26,74,79). Allerdings kann trotz dieser kombinierten Behandlung oft keine komplette Remission erreicht werden und in manchen Fällen kann durch eine alleinige Pharmakotherapie gar kein Erfolg erzielt werden (22,31,74). Hinzu kommen erhebliche Nachteile der medikamentösen Therapieoptionen. Problematisch bei den Antidepressiva sind insbesondere die Latenz von mehreren Wochen bis zum Eintritt der Wirkung sowie das breite Spektrum an Nebenwirkungen und Interaktionen (9,31,80). Zu den möglichen Nebenwirkungen zählen beispielsweise anticholinerge Symptome wie Mundtrockenheit und Obstipation, aber auch Tachykardien bis hin zu gefährlichen Herzrhythmusstörungen, Gewichtszunahme oder auch Sedierung (80). Benzodiazepine weisen zwar eine kurze Latenzzeit bis zum Eintritt der Wirkung auf, bergen aber das Risiko der Toleranzentwicklung und damit einer Abhängigkeit (9,26,31,79). Daher wird ihre Anwendung nur im Akutfall oder für die initiale Therapiephase zur Überbrückung der Latenz bis zum Wirkbeginn der Antidepressiva empfohlen (9,26,79). Darüber hinaus sind Nebenwirkungen wie Müdigkeit, Konzentrationsstörungen, Ataxie und muskuläre Schwäche möglich (9,27,81). Aufgrund der hohen Prävalenz sowie der enormen Auswirkungen von Angsterkrankungen auf das alltägliche Leben der Betroffenen und der oben aufgeführten Nachteile der aktuell etablierten medikamentösen Therapie besteht ein großes Interesse an der Entwicklung neuer, nebenwirkungsärmerer Medikamente mit gesteigerter Effektivität. Doch

im Vorfeld ist es notwendig die zugrundeliegenden Mechanismen und in der Folge mögliche Angriffspunkte für die Entwicklung neuer Medikamente genauer zu entschlüsseln.

Diese Studie konnte als Erste nachweisen, welche Effekte das NPS auf Neurone des aPVT in elektrophysiologischen Untersuchungen hat. Zunächst fiel auf, dass eine Subpopulation von 40 - 50 % der Neurone des aPVT NPS-responsiv ist. Im Vergleich der elektrophysiologischen Charakteristika ergaben sich weitreichende Übereinstimmungen zwischen den NPS-responsiven und NPS-nicht-responsiven Neuronen, sodass hierbei nicht von zwei differenten Zelltypen ausgegangen werden kann. Die Applikation des NPS führte bei den NPS-responsiven Neuronen zu einer deutlichen und partiell reversiblen Aktivitätssteigerung über eine Depolarisation des Membranpotentials und eine erhöhte sAP-Frequenz. In vorangegangenen Verhaltensstudien an Mäusen und Ratten zeigte sich, dass die Wirkung von NPS unter anderem anxiolytisch, Wachheit und Aufmerksamkeit steigernd, Lern- und Gedächtnisprozesse sowie die Sekretion von Stresshormonen beeinflussend ist (7,44,59,62,73,78,87). Zudem wurde eine Assoziation zwischen einem bestimmten Polymorphismus des NPSR1 bei Patienten mit einer Panikstörung beobachtet (15,58). Da der PVT sowohl eine Rolle in der Generierung von Wachheit und Aufmerksamkeit als auch eine Verbindung zu den für Furcht und Angst relevanten neuronalen Regelkreisen hat, könnten diese Effekte des NPS über die Modulation der Aktivität der Neurone des aPVT durch NPS bedingt sein. Somit ergibt sich für das NPS-System ein vielversprechendes Potential zur Entwicklung neuer Therapeutika mit Blick auf Angsterkrankungen oder Krankheitsbilder in denen es zu einer Dysregulation von Wachheit und Aufmerksamkeit kommt.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die elektrophysiologischen Effekte des NPS auf die Neurone des aPVT der Maus unter Verwendung der Patch-Clamp-Technik untersucht. In Verhaltensstudien wurden die Wirkungen des NPS als eine bisher einzigartige Kombination von Anxiolyse, Steigerung von Wachheit und Aufmerksamkeit, Beeinflussung von Gedächtnisbildung und von Lernprozessen, Suchtverhalten sowie Nahrungsaufnahme beschrieben (3,7,36,44,59,62,73,78,87). Zudem stehen Polymorphismen des NPSR1 in Zusammenhang mit psychiatrischen Erkrankungen, insbesondere mit Angsterkrankungen, sowie mit chronisch entzündlichen Erkrankungen und dem zirkadianen Phänotyp (10,11,15,25,41,58). Des Weiteren wurde das Vorkommen von NPS-Rezeptoren im aPVT bereits in mehreren Studien zur anatomischen Lokalisation *Npsr1* exprimierender Neurone nachgewiesen (8,87,88). Zudem wird dem PVT als Teil der thalamischen Mittellinienkerne wiederholt eine Rolle in der Regulation von Wachheit und Aufmerksamkeit in Anpassung an externe Reize zur Generierung eines adaptiven Verhaltens zugeschrieben (83,86). Das Ziel ist, zu verstehen, welche Mechanismen den Verhaltensänderungen der Tiere auf zellulärer Ebene zugrunde liegen.

Im Rahmen der elektrophysiologischen Experimente wurde offenbar, dass eine Subpopulation von 40 - 50 % aller untersuchten Neurone des aPVT eine Reaktion auf das NPS zeigte. Bei dem Vergleich der passiven und aktiven Membraneigenschaften der NPS-responsiven und NPS-nicht-responsiven Neurone wurden weitreichende Übereinstimmungen festgestellt. Folglich handelt es sich hierbei sehr wahrscheinlich nicht um differente Zelltypen. Die Effekte des NPS auf NPS-responsive Neurone bestanden in einer Depolarisation des Membranpotentials und einer Steigerung der spontanen Aktivität, die sich in einer deutlich erhöhten sAP-Frequenz äußerte. Um eine Beeinflussung der synaptischen Übertragung durch das NPS zu erfassen, wurden spontane postsynaptische Ströme sowohl exzitatorischer als auch inhibitorischer Art gemessen. Hier konnte kein NPS-abhängiger Effekt auf die Amplitude oder die Frequenz der spontanen postsynaptischen Ströme gemessen werden, sodass zumindest *in vitro* keine Wirkung des NPS auf die synaptische Übertragung vorlag. Ein möglicher Einfluss auf die synaptische Übertragung *in vivo* lässt sich dennoch nicht mit letzter Sicherheit ausschließen.

Zusammenfassend konnten in dieser Studie einerseits das Vorkommen einer Subpopulation NPS-responsiver Neurone innerhalb des aPVT und andererseits eine Steigerung der Aktivität der NPS-responsiven Neurone durch NPS gezeigt werden. Es sind weitere Studien notwendig,

um die der Aktivitätssteigerung der NPS-responsiven Neurone durch NPS zugrundeliegenden Mechanismen zu entschlüsseln. Zudem könnte bei den NPS-responsiven Neuronen durch eine Applikation eines spezifischen NPSR-Antagonisten während des Effektes die Wirkung des NPS über den Npsr1 zusätzlich untermauert werden.

6 Literaturverzeichnis

- (1) Ahnaou A, Drinkenburg WH (2012) Neuropeptide-S evoked arousal with electroencephalogram slow-wave compensatory drive in rats. *Neuropsychobiology* 65: 195-205. DOI: 10.1159/000336998
- (2) Bane V, Lehane M, Dikshit M, O'Riordan A, Furey A (2014) Tetrodotoxin: chemistry, toxicity, source, distribution and detection. *Toxins (Basel)* 6: 693-755. DOI: 10.3390/toxins6020693
- (3) Beck B, Fernetto B, Stricker-Krongrad A (2005) Peptide S is a novel potent inhibitor of voluntary and fast-induced food intake in rats. *Biochem.Biophys.Res.Communic.* 332: 859-865. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.05.029
- (4) Benarroch EE (2015) The amygdala: functional organization and involvement in neurologic disorders. *Neurology* 84: 313-324. DOI: 10.1212/WNL.0000000000001171
- (5) Berlit P (2014) Schlafstörungen und Tagesschläfrigkeit. In: *Schlafstörungen und Tagesschläfrigkeit. Basiswissen Neurologie*. Springer, Berlin Heidelberg, 6. Auflage, S. 915-924
- (6) Bormann J (2000) The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol.Sci.* 21: 16-19. DOI: 10.1016/S0165-6147(99)01413-3
- (7) Chauveau F, Lange MD, Jüngling K, Lesting J, Seidenbecher T, Pape HC (2012) Prevention of stress-impaired fear extinction through neuropeptide s action in the lateral amygdala. *Neuropsychopharmacology* 37: 1588-1599. DOI: 10.1038/npp.2012.3
- (8) Clark SD, Duangdao DM, Schulz S, Zhang L, Liu X, Xu YL, Reinscheid RK (2011) Anatomical characterization of the neuropeptide S system in the mouse brain by in situ hybridization and immunohistochemistry. *J.Comp.Neurol.* 519: 1867-1893. DOI: 10.1002/cne.22606
- (9) Cloos JM, Ferreira V (2009) Current use of benzodiazepines in anxiety disorders. *Curr.Opin.Psychiatry.* 22: 90-95. DOI: 10.1097/YCO.0b013e32831a473d
- (10) D'Amato M, Bruce S, Bresso F, Zucchelli M, Ezer S, Pulkkinen V, Lindgren C, Astegiano M, Rizzetto M, Gionchetti P, Riegler G, Sostegni R, Daperno M, D'Alfonso S, Momigliano-Richiardi P, Torkvist L, Puolakkainen P, Lappalainen M, Paavola-Sakki P, Halme L, et al. (2007) Neuropeptide s receptor 1 gene polymorphism is associated with susceptibility to inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 133: 808-817. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.06.012
- (11) D'Amato M, Zucchelli M, Seddighzadeh M, Anedda F, Lindblad S, Kere J, Alfredsson L, Klareskog L, Padyukov L (2010) Analysis of neuropeptide S receptor gene (NPSR1) polymorphism in rheumatoid arthritis. *PLoS One* 5: e9315. DOI: 10.1371/journal.pone.0009315

-
- (12) D'Hulst C, Atack JR, Kooy RF (2009) The complexity of the GABA_A receptor shapes unique pharmacological profiles. *Drug Discov.Today* 14: 866-875. DOI: 10.1016/j.drudis.2009.06.009
- (13) Do Monte FH, Quinones-Laracuenta K, Quirk GJ (2015) A temporal shift in the circuits mediating retrieval of fear memory. *Nature* 519: 460-463. DOI: 10.1038/nature14030
- (14) Do-Monte FH, Quirk GJ, Li B, Penzo MA (2016) Retrieving fear memories, as time goes by... *Mol.Psychiatry* 21: 1027-1036. DOI: 10.1038/mp.2016.78
- (15) Domschke K, Reif A, Weber H, Richter J, Hohoff C, Ohrmann P, Pedersen A, Bauer J, Suslow T, Kugel H, Heindel W, Baumann C, Klauke B, Jacob C, Maier W, Fritze J, Bandelow B, Krakowitzky P, Rothermundt M, Erhardt A, et al. (2011) Neuropeptide S receptor gene -- converging evidence for a role in panic disorder. *Mol.Psychiatry* 16: 938-948. DOI: 10.1038/mp.2010.81
- (16) Doroshenko P, Renaud LP (2009) Acid-sensitive TASK-like K⁺ conductances contribute to resting membrane potential and to orexin-induced membrane depolarization in rat thalamic paraventricular nucleus neurons. *Neuroscience* 158: 1560-1570. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.12.008
- (17) Duangdao DM, Clark SD, Okamura N, Reinscheid RK (2009) Behavioral phenotyping of neuropeptide S receptor knockout mice. *Behav.Brain Res.* 205: 1-9. DOI: 10.1016/j.bbr.2009.07.024
- (18) Ebner K, Rjabokon A, Pape HC, Singewald N (2011) Increased in vivo release of neuropeptide S in the amygdala of freely moving rats after local depolarisation and emotional stress. *Amino Acids* 41: 991-996. DOI: 10.1007/s00726-011-1058-0
- (19) Ehrlich I, Humeau Y, Grenier F, Ciochi S, Herry C, Luthi A (2009) Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. *Neuron* 62: 757-771. DOI: 10.1016/j.neuron.2009.05.026
- (20) Fendt M, Buchi M, Burki H, Imobersteg S, Ricoux B, Suply T, Sailer AW (2011) Neuropeptide S receptor deficiency modulates spontaneous locomotor activity and the acoustic startle response. *Behav.Brain Res.* 217: 1-9. DOI: 10.1016/j.bbr.2010.09.022
- (21) Frasconi C, Spreafico R, Bentivoglio M (1997) Glutamate, aspartate and co-localization with calbindin in the medial thalamus. An immunohistochemical study in the rat. *Exp.Brain Res.* 115: 95-104. DOI: 10.1007/PL00005689
- (22) Furukawa TA, Watanabe N, Churchill R (2006) Psychotherapy plus antidepressant for panic disorder with or without agoraphobia: systematic review. *Br.J.Psychiatry* 188: 305-312. DOI: 10.1192/bjp.188/4/305
- (23) Gainetdinov RR, Premont RT, Bohn LM, Lefkowitz RJ, Caron MG (2004) Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu.Rev.Neurosci.* 27: 107-144. DOI: 10.1146/annurev.neuro.27.070203.144206
-

-
- (24) Gether U, Kobilka BK (1998) G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J.Biol.Chem.* 273: 17979-17982. DOI: 10.1074/jbc.273.29.17979
- (25) Gottlieb DJ, O'Connor GT, Wilk JB (2007) Genome-wide association of sleep and circadian phenotypes. *BMC Med.Genet.* 8 Suppl. 1: S9. DOI: 10.1186/1471-2350-8-S1-S9
- (26) Grözinger M, Röschke J (2011) Psychiatrische Syndrome und Erkrankungen. In: Berlit P (Hrsg) *Klinische Neurologie*. Springer, Berlin Heidelberg, 3. Auflage, S. 1459-1461
- (27) Grözinger M, Röschke J (2011) Pharmakotherapie. In: Berlit P (Hrsg) *Klinische Neurologie*. Springer, Berlin Heidelberg, 3. Auflage, S. 1465
- (28) Hermes ML, Renaud LP (2011) Postsynaptic and presynaptic group II metabotropic glutamate receptor activation reduces neuronal excitability in rat midline paraventricular thalamic nucleus. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 336: 840-849. DOI: 10.1124/jpet.110.176149
- (29) Honore T, Davies SN, Drejer J, Fletcher EJ, Jacobsen P, Lodge D, Nielsen FE (1988) Quinoxalinediones: potent competitive non-NMDA glutamate receptor antagonists. *Science* 241: 701-703. DOI: 10.1126/science.2899909
- (30) Huang H, Ghosh P, van den Pol AN (2006) Prefrontal cortex-projecting glutamatergic thalamic paraventricular nucleus-excited by hypocretin: a feedforward circuit that may enhance cognitive arousal. *J.Neurophysiol.* 95: 1656-1668. DOI: 10.1152/jn.00927.2005
- (31) Ionescu IA, Dine J, Yen YC, Buell DR, Herrmann L, Holsboer F, Eder M, Landgraf R, Schmidt U (2012) Intranasally administered neuropeptide S (NPS) exerts anxiolytic effects following internalization into NPS receptor-expressing neurons. *Neuropsychopharmacology* 37: 1323-1337. DOI: 10.1038/npp.2011.317
- (32) Janak PH, Tye KM (2015) From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature* 517: 284-292. DOI: 10.1038/nature14188
- (33) Ji TH, Grossmann M, Ji I (1998) G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J.Biol.Chem.* 273: 17299-17302. DOI: 10.1074/jbc.273.28.17299
- (34) Jones BE (2003) Arousal systems. *Front.Biosci.* 8: s438-51. DOI: 10.2741/1074
- (35) Jüngling K, Seidenbecher T, Sosulina L, Lesting J, Sangha S, Clark SD, Okamura N, Duangdao DM, Xu YL, Reinscheid RK, Pape HC (2008) Neuropeptide S-mediated control of fear expression and extinction: role of intercalated GABAergic neurons in the amygdala. *Neuron* 59: 298-310. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.07.002
- (36) Kallupi M, Cannella N, Economidou D, Ubaldi M, Ruggeri B, Weiss F, Massi M, Marugan J, Heilig M, Bonnavion P, de Lecea L, Ciccocioppo R (2010) Neuropeptide S facilitates cue-induced relapse to cocaine seeking through activation of the hypothalamic hypocretin system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 107: 19567-19572. DOI: 10.1073/pnas.1004100107
-

- (37) Kolaj M, Doroshenko P, Yan Cao X, Coderre E, Renaud LP (2007) Orexin-induced modulation of state-dependent intrinsic properties in thalamic paraventricular nucleus neurons attenuates action potential patterning and frequency. *Neuroscience* 147: 1066-1075. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2007.05.018
- (38) Kolaj M, Zhang L, Ronnekleiv OK, Renaud LP (2012) Midline thalamic paraventricular nucleus neurons display diurnal variation in resting membrane potentials, conductances, and firing patterns in vitro. *J.Neurophysiol.* 107: 1835-1844. DOI: 10.1152/jn.00974.2011
- (39) Laas K, Reif A, Kiive E, Domschke K, Lesch KP, Veidebaum T, Harro J (2014) A functional NPSR1 gene variant and environment shape personality and impulsive action: a longitudinal study. *J.Psychopharmacol.* 28: 227-236. DOI: 10.1177/02698811142472562
- (40) Laas K, Eensoo D, Paaver M, Lesch KP, Reif A, Harro J (2015) Further evidence for the association of the NPSR1 gene A/T polymorphism (Asn107Ile) with impulsivity and hyperactivity. *J.Psychopharmacol.* 29: 878-883. DOI: 10.1177/0269881115573803
- (41) Laitinen T, Polvi A, Rydman P, Vendelin J, Pulkkinen V, Salmikangas P, Makela S, Rehn M, Pirskanen A, Rautanen A, Zucchelli M, Gullsten H, Leino M, Alenius H, Petays T, Haahtela T, Laitinen A, Laprise C, Hudson TJ, Laitinen LA, et al. (2004) Characterization of a common susceptibility locus for asthma-related traits. *Science* 304: 300-304. DOI: 10.1126/science.1090010
- (42) Lee S, Ahmed T, Lee S, Kim H, Choi S, Kim DS, Kim SJ, Cho J, Shin HS (2011) Bidirectional modulation of fear extinction by mediodorsal thalamic firing in mice. *Nat.Neurosci.* 15: 308-314. DOI: 10.1038/nn.2999
- (43) Lefkowitz RJ (1998) G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J.Biol.Chem.* 273: 18677-18680. DOI: 10.1074/jbc.273.30.18677
- (44) Leonard SK, Dwyer JM, Sukoff Rizzo SJ, Platt B, Logue SF, Neal SJ, Malberg JE, Beyer CE, Schechter LE, Rosenzweig-Lipson S, Ring RH (2008) Pharmacology of neuropeptide S in mice: therapeutic relevance to anxiety disorders. *Psychopharmacology (Berl)* 197: 601-611. DOI: 10.1007/s00213-008-1080-4
- (45) Leschziner G (2014) Narcolepsy: a clinical review. *Pract.Neurol.* 14: 323-331. DOI: 10.1136/practneurol-2014-000837
- (46) Li XB, Inoue T, Nakagawa S, Koyama T (2004) Effect of mediodorsal thalamic nucleus lesion on contextual fear conditioning in rats. *Brain Res.* 1008: 261-272. DOI: 10.1016/j.brainres.2004.02.038
- (47) Li Y, Dong X, Li S, Kirouac GJ (2014) Lesions of the posterior paraventricular nucleus of the thalamus attenuate fear expression. *Front.Behav.Neurosci.* 8: 94. DOI: 10.3389/fnbeh.2014.00094

- (48) Liu X, Zeng J, Zhou A, Theodorsson E, Fahrenkrug J, Reinscheid RK (2011) Molecular fingerprint of neuropeptide S-producing neurons in the mouse brain. *J.Comp.Neurol.* 519: 1847-1866. DOI: 10.1002/cne.22603
- (49) Maren S, Quirk GJ (2004) Neuronal signalling of fear memory. *Nat.Rev.Neurosci.* 5: 844-852. DOI: 10.1038/nrn1535
- (50) Masters PA (2014) In the clinic. *Insomnia. Ann.Intern.Med.* 161: ITC2-14. DOI: 10.7326/0003-4819-161-7-201410070-01004
- (51) Meis S, Bergado-Acosta JR, Yanagawa Y, Obata K, Stork O, Munsch T (2008) Identification of a neuropeptide S responsive circuitry shaping amygdala activity via the endopiriform nucleus. *PLoS One* 3: 1-11. DOI: 10.1371/journal.pone.0002695
- (52) Neves SR, Ram PT, Iyengar R (2002) G protein pathways. *Science* 296: 1636-1639. DOI: 10.1126/science.1071550
- (53) Niciu MJ, Kelmendi B, Sanacora G (2012) Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 100: 656-664. DOI: 10.1016/j.pbb.2011.08.008
- (54) Niimi M (2006) Centrally administered neuropeptide S activates orexin-containing neurons in the hypothalamus and stimulates feeding in rats. *Endocrine* 30: 75-79. DOI: 10.1385/ENDO:30:1:75
- (55) Numberger M, Draguhn A (1996) Historische Grundlagen. In: *Historische Grundlagen. Patch-Clamp-Technik.* Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin Oxford, S. 1-15
- (56) Numberger M, Draguhn A (1996) Die praktische Durchführung von Patch-Clamp-Experimenten. In: *Spektrum Akademischer Verlag GmbH (Hrsg) Patch-Clamp-Technik., Heidelberg Berlin Oxford, S. 67-68, 88*
- (57) Oishi M, Kushikata T, Niwa H, Yakoshi C, Ogasawara C, Calo G, Guerrini R, Hirota K (2014) Endogenous neuropeptide S tone influences sleep-wake rhythm in rats. *Neurosci.Lett.* 581: 94-97. DOI: 10.1016/j.neulet.2014.08.031
- (58) Okamura N, Hashimoto K, Iyo M, Shimizu E, Dempfle A, Friedel S, Reinscheid RK (2007) Gender-specific association of a functional coding polymorphism in the neuropeptide S receptor gene with panic disorder but not with schizophrenia or attention-deficit/hyperactivity disorder. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* 31: 1444-1448. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2007.06.026
- (59) Okamura N, Reinscheid RK (2007) Neuropeptide S: a novel modulator of stress and arousal. *Stress* 10: 221-226. DOI: 10.1124/jpet.107.135103

-
- (60) Okamura N, Habay SA, Zeng J, Chamberlin AR, Reinscheid RK (2008) Synthesis and pharmacological in vitro and in vivo profile of 3-oxo-1,1-diphenyl-tetrahydro-oxazolo[3,4-a]pyrazine-7-carboxylic acid 4-fluoro-benzylamide (SHA 68), a selective antagonist of the neuropeptide S receptor. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 325: 893-901. DOI: 10.1124/jpet.107.135103
- (61) Okamura N, Reinscheid RK, Ohgake S, Iyo M, Hashimoto K (2010) Neuropeptide S attenuates neuropathological, neurochemical and behavioral changes induced by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Neuropharmacology* 58: 166-172. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2009.06.027
- (62) Okamura N, Garau C, Duangdao DM, Clark SD, Jüngling K, Pape HC, Reinscheid RK (2011) Neuropeptide S enhances memory during the consolidation phase and interacts with noradrenergic systems in the brain. *Neuropsychopharmacology* 36: 744-752. DOI: 10.1038/npp.2010.207
- (63) Padilla-Coreano N, Do-Monte FH, Quirk GJ (2012) A time-dependent role of midline thalamic nuclei in the retrieval of fear memory. *Neuropharmacology* 62: 457-463. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2011.08.037
- (64) Pape HC, Jüngling K, Seidenbecher T, Lesting J, Reinscheid RK (2010) Neuropeptide S: a transmitter system in the brain regulating fear and anxiety. *Neuropharmacology* 58: 29-34. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2009.06.001
- (65) Parsons MP, Li S, Kirouac GJ (2007) Functional and anatomical connection between the paraventricular nucleus of the thalamus and dopamine fibers of the nucleus accumbens. *J.Comp.Neurol.* 500: 1050-1063. DOI: 10.1002/cne.21224
- (66) Paxinos G, Franklin KBJ (2001) The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic press, San Diego San Francisco New York Boston London Sydney Tokyo, 2. Auflage
- (67) Penzo MA, Robert V, Tucciarone J, De Bundel D, Wang M, Van Aelst L, Darvas M, Parada LF, Palmiter RD, He M, Huang ZJ, Li B (2015) The paraventricular thalamus controls a central amygdala fear circuit. *Nature* 519: 455-459. DOI: 10.1038/nature13978
- (68) Putrenko I, Schwarz SK (2011) Lidocaine blocks the hyperpolarization-activated mixed cation current, I(h), in rat thalamocortical neurons. *Anesthesiology* 115: 822-835. DOI: 10.1097/ALN.0b013e31822ddf08
- (69) Reinscheid RK, Xu YL (2005) Neuropeptide S as a novel arousal promoting peptide transmitter. *FEBS J.* 272: 5689-5693. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2005.04982.x
- (70) Reinscheid RK, Xu YL (2005) Neuropeptide S and its receptor: a newly orphanized G protein-coupled receptor system. *Neuroscientist* 11: 532-538. DOI: 10.1177/1073858405276405
- (71) Reinscheid RK, Xu YL, Okamura N, Zeng J, Chung S, Pai R, Wang Z, Civelli O (2005) Pharmacological characterization of human and murine neuropeptide s receptor variants. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 315: 1338-1345. DOI: 10.1124/jpet.105.093427
-

- (72) Reinscheid RK (2007) Phylogenetic appearance of neuropeptide S precursor proteins in tetrapods. *Peptides* 28: 830-837. DOI: 10.1016/j.peptides.2007.01.008
- (73) Rizzi A, Vergura R, Marzola G, Ruzza C, Guerrini R, Salvadori S, Regoli D, Calo G (2008) Neuropeptide S is a stimulatory anxiolytic agent: a behavioural study in mice. *Br.J.Pharmacol.* 154: 471-479. DOI: 10.1038/bjp.2008.96
- (74) Rodrigues H, Figueira I, Goncalves R, Mendlowicz M, Macedo T, Ventura P (2011) CBT for pharmacotherapy non-remitters -- a systematic review of a next-step strategy. *J.Affect.Disord.* 129: 219-228. DOI: 10.1016/j.jad.2010.08.025
- (75) Ross EM (1989) Signal sorting and amplification through G protein-coupled receptors. *Neuron* 3: 141-152. DOI: 10.1016/0896-6273(89)90027-5
- (76) Roth AL, Marzola E, Rizzi A, Arduin M, Trapella C, Corti C, Vergura R, Martinelli P, Salvadori S, Regoli D, Corsi M, Cavanni P, Calo G, Guerrini R (2006) Structure-activity studies on neuropeptide S: identification of the amino acid residues crucial for receptor activation. *J.Biol.Chem.* 281: 20809-20816. DOI: 10.1074/jbc.M601846200
- (77) Salazar-Juarez A, Escobar C, Aguilar-Roblero R (2002) Anterior paraventricular thalamus modulates light-induced phase shifts in circadian rhythmicity in rats. *Am.J.Physiol.Regul.Integr.Comp.Physiol.* 283: R897-904. DOI: 10.1152/ajpregu.00259.2002
- (78) Smith KL, Patterson M, Dhillon WS, Patel SR, Semjonous NM, Gardiner JV, Ghatei MA, Bloom SR (2006) Neuropeptide S stimulates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and inhibits food intake. *Endocrinology* 147: 3510-3518. DOI: 10.1210/en.2005-1280
- (79) Tölle R, Windgassen K (2014) Phobische und Angststörungen (ICD 10: F 40/41). In: *Phobische und Angststörungen (ICD 10: F 40/41). Psychiatrie.* Springer, Berlin Heidelberg, 17. Auflage, S. 81-88
- (80) Tölle R, Windgassen K (2014) Antidepressiva. In: *Antidepressiva. Psychiatrie.* Springer, Berlin Heidelberg, 17. Auflage, S. 363-367
- (81) Tölle R, Windgassen K (2014) Tranquilizer/Anxiolytika. In: *Tranquilizer/Anxiolytika. Psychiatrie.* Springer, Berlin Heidelberg, 17. Auflage, S. 370-373
- (82) Tovote P, Fadok JP, Luthi A (2015) Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat.Rev. Neurosci.* 16: 317-331. DOI: 10.1038/nrn3945
- (83) Van der Werf YD, Witter MP, Groenewegen HJ (2002) The intralaminar and midline nuclei of the thalamus. Anatomical and functional evidence for participation in processes of arousal and awareness. *Brain Res. Brain Res.Rev.* 39: 107-140. DOI: 10.1016/S0165-0173(02)00181-9
- (84) Veinante P, Freund-Mercier MJ (1998) Intrinsic and extrinsic connections of the rat central extended amygdala: an in vivo electrophysiological study of the central amygdaloid nucleus. *Brain Res.* 794: 188-198. DOI: 10.1016/S0006-8993(98)00228-5

- (85) Vendelin J, Pulkkinen V, Rehn M, Pirskanen A, Raisanen-Sokolowski A, Laitinen A, Laitinen LA, Kere J, Laitinen T (2005) Characterization of GPRA, a novel G protein-coupled receptor related to asthma. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 33: 262-270. DOI: 10.1165/rcmb.2004-0405OC
- (86) Vertes RP, Hoover WB (2008) Projections of the paraventricular and paratenial nuclei of the dorsal midline thalamus in the rat. *J.Comp.Neurol.* 508: 212-237. DOI: 10.1002/cne.21679
- (87) Xu YL, Reinscheid RK, Huitron-Resendiz S, Clark SD, Wang Z, Lin SH, Brucher FA, Zeng J, Ly NK, Henriksen SJ, de Lecea L, Civelli O (2004) Neuropeptide S: a neuropeptide promoting arousal and anxiolytic-like effects. *Neuron* 43: 487-497. DOI: 10.1016/j.neuron.2004.08.005
- (88) Xu YL, Gall CM, Jackson VR, Civelli O, Reinscheid RK (2007) Distribution of neuropeptide S receptor mRNA and neurochemical characteristics of neuropeptide S-expressing neurons in the rat brain. *J.Comp.Neurol.* 500: 84-102. DOI: 10.1002/cne.21159
- (89) Yeoh JW, James MH, Graham BA, Dayas CV (2014) Electrophysiological characteristics of paraventricular thalamic (PVT) neurons in response to cocaine and cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART). *Front.Behav.Neurosci.* 8: 1-11. DOI: 10.3389/fnbeh.2014.00280
- (90) Yoshida K, Kim J, Nakajima K, Oomura Y, Wayner MJ, Sasaki K (2010) Electrophysiological effects of neuropeptide S on rat ventromedial hypothalamic neurons in vitro. *Peptides* 31: 712-719. DOI: 10.1016/j.peptides.2009.11.006
- (91) Zhang L, Doroshenko P, Cao XY, Irfan N, Coderre E, Kolaj M, Renaud LP (2006) Vasopressin induces depolarization and state-dependent firing patterns in rat thalamic paraventricular nucleus neurons in vitro. *Am.J.Physiol.Regul.Integr.Comp.Physiol.* 290: R1226-32. DOI: 10.1152/ajpregu.00770.2005
- (92) Zhang L, Kolaj M, Renaud LP (2010) Ca²⁺-dependent and Na⁺-dependent K⁺ conductances contribute to a slow AHP in thalamic paraventricular nucleus neurons: a novel target for orexin receptors. *J.Neurophysiol.* 104: 2052-2062. DOI: 10.1152/jn.00320.2010
- (93) Zhu H, Mingler MK, McBride ML, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Williams MT, Vorhees CV, Rothenberg ME (2010) Abnormal response to stress and impaired NPS-induced hyperlocomotion, anxiolytic effect and corticosterone increase in mice lacking NPSR1. *Psychoneuroendocrinology* 35: 1119-1132. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2010.01.012

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatzyklase
ACSF	artifizielle cerebro-spinale Flüssigkeit
AHP	„After Hyperpolarizing Potential“
AP	Aktionspotential
AP5	2-Amino-5-phosphonovaleriansäure
aPVT	Nucleus paraventricularis anterior thalami
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CRF	Corticotropin releasing factor
CRH	Corticotropin releasing hormone
DAG	Diacylglycerol
DNQX	6,7-Dinitroquinoxalin-2,3-dion
EGFP	„Enhanced Green Fluorescent Protein“
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
G-Protein	Guanosinnukleotid-abhängiges Protein
i.c.v.	intra-cerebro-ventriculär
IP ₃	Inositol-1,4,5- triphosphat
Kont.	Neuron der Kontrollgruppe
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
NBQX	2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]chinoxalin-2,3-dion
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat

NPS	Neuropeptid S
NPSR	Neuropeptid S-Rezeptor (allgemein)
Npsr1	Neuropeptid S-Rezeptor (Maus oder Ratte)
NPSR1	Neuropeptid S-Rezeptor (Mensch)
Npsr1-mRNA	Neuropeptid S-Rezeptor-mRNA (Maus oder Ratte)
N.-Resp.	NPS-nicht-responsives Neuron
PVT	Paraventriculärer Thalamus
Resp.	NPS-responsives Neuron
sAP	spontanes Aktionspotential
sEPSC	„spontaneous excitatory postsynaptic current“, spontaner exzitatorischer postsynaptischer Strom
sIPSC	„spontaneous inhibitory postsynaptic current“, spontaner inhibitorischer postsynaptischer Strom
TTX	Tetrodotoxin
ZNS	zentrales Nervensystem

7.2 Lebenslauf

7.3 Danksagung

Professor Dr. Hans-Christian Pape danke ich für die Vergabe des interessanten Promotions-themas und für die Möglichkeit, die Experimente im neurophysiologischen Institut durchzuführen.

Mein größter Dank gilt Privat-Dozent Dr. Kay Jüngling, der mir als mein Hauptansprechpart-ner stets zur Seite stand und mich bei allen Herausforderungen unterstützt hat. Sein Wissen und seine Erfahrung haben mich sicher durch die Experimente und deren Auswertung gelei-tet.

Zudem danke ich Dr. Maren Lange, die mich ebenfalls sehr gut unterstütz hat. Ich erinnere mich gerne an die Zeit zurück, die ich mit Ihr und Dr. Manuela Cerina im Labor verbracht habe.

Des Weiteren vielen Dank an alle anderen Mitarbeiter des Instituts für jegliche Hilfestellung und die freundschaftliche Aufnahme.

Nicht zuletzt gilt meiner Familie und meinen Freunden ein herzlicher Dank für ihre fortwäh-rende Unterstützung und ihr Interesse an meiner Arbeit.

7.4 Genehmigung der Organentnahme

Landesamt für Natur,
Umwelt und Verbraucherschutz
Nordrhein-Westfalen



LANUV NRW, Postfach 10 10 52, 45610 Recklinghausen

Herrn
Dr. Kay Jüngling
Institut für Physiologie I
Westfälische Wilhelms-Universität Münster
Robert-Koch-Straße 27a
48149 Münster

Tierschutz;

Anzeige nach § 6 Abs. 1 Satz 2 Nr. 4 Tierschutzgesetz (TSchG)

- a) Zuständigkeitsverordnung vom 26. September 1989 (GV NW 1989 S. 508)
- b) Ihre Anzeige vom 22.10.2010; eingegangen am 09.11.2010

Sehr geehrter Herr Dr. Jüngling,

Ihre o. g. Anzeige zu dem Versuchsvorhaben

**„Analyse der synaptischen Übertragung und ihrer Modulation in
furchtrelevanten Strukturen des zentralen Nervensystems“**

wird hiermit bestätigt.

Verantwortlicher Versuchsleiter: Herr Dr. rer. nat. Kay Jüngling

Stellvertretender Versuchsleiter: Herr Dr. rer. nat. Michael Döngi

Weitere beteiligte Person: Frau Dipl.-Biol. Maren Lange

Art und Zahl der Tiere: 1350 Mäuse

Dauer des Versuchsvorhabens: bis zum 30.11.2013

Ort: Institut für Physiologie I der Universität Münster

Ändern sich während des Versuchsvorhabens die von Ihnen in Ihrer Anzeige
angegebenen Sachverhalte, so sind mir diese unverzüglich anzuzeigen.

Auskunft erteilt:

Herr Salert

Direktwahl 02361/305-3709

Fax 02361/305-3439

poststelle@lanuv.nrw.de

Aktenzeichen

8.87-51.05.20.10.218

bei Antwort bitte angeben

Ihre Nachricht vom:

Ihr Aktenzeichen:

Datum: 15.11.2010

Hauptsitz:

Leibnizstraße 10
45659 Recklinghausen

Telefon 02361 305-0

Fax 02361 305-3215

poststelle@lanuv.nrw.de

www.lanuv.nrw.de

Dienstgebäude:

Hauptsitz Recklinghausen

Öffentliche Verkehrsmittel:

Ab Recklinghausen Hbf mit

Buslinie 236 oder 237 bis

Haltestelle "LANUV" und 5 Min.

Fußweg oder mit Buslinie SB 20

bis Haltestelle "Hohenhorster

Weg" und 15 Min. Fußweg in

Richtung Trabrennbahn bis

Leibnizstraße

Bankverbindung:

Landeskasse Düsseldorf

Konto-Nr.: 41 000 12

West LB AG

(BLZ 300 500 00)

BIC-Code: WELADED3

IBAN-Code: DE 41 3005

0000 0004 1000 12

Nach § 8 a Abs. 3 Tierschutzgesetz ist mir am Ende eines jeden Jahres die Zahl der durchgeführten Versuchsvorhaben sowie bei Wirbeltieren Art und Zahl der insgesamt verwendeten Wirbeltiere anzugeben.

Von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr wird abgesehen, da die Tierversuche überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgen.

Rechtsbehelfsbelehrung:

Gegen diesen Bescheid kann nunmehr innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Klage erhoben werden. Die Klage ist schriftlich vor dem Verwaltungsgericht Münster (Piusallee 38, 48147 Münster) oder zur Niederschrift beim Urkundsbeamten der Geschäftsstelle zu erklären.

Falls die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden sollte, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag

Dr. Hieronymus
(Dr. Hieronymus)