

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Physiologie
Institut für Physiologie II (Sinnes- und Neurophysiologie)
Direktor: Prof. Dr. Jochen Roeper

**Anatomische und elektrophysiologische Eigenschaften
identifizierter Subpopulationen
im Locus coeruleus-noradrenergen System.
Eine Studie an der adulten Maus**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Tobias Alexander Wagner-Altendorf

aus Darmstadt

Frankfurt am Main, 2015

Dekan:

Prof. Dr. Josef M. Pfeilschifter

Referent:

Prof. Dr. Jochen Roeper

Korreferent:

Prof. Dr. Georg Auburger

Tag der mündlichen Prüfung:

27. 10. 2016

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Überblick: Der Locus coeruleus und der Neurotransmitter Noradrenalin .	6
1.1.1	Der Locus coeruleus	6
1.1.1.1	Lokalisation und basale anatomische Eigenschaften des Locus coeruleus	6
1.1.1.2	Efferente Topographie des Locus coeruleus	7
1.1.1.3	Afferente Topographie des Locus coeruleus	8
1.1.2	Der Neurotransmitter Noradrenalin	9
1.1.2.1	Synthese	9
1.1.2.2	Noradrenalin als Hormon und Neurotransmitter	10
1.1.2.3	Adrenerge Rezeptoren	10
1.2	Die funktionelle Rolle des Locus coeruleus und des zentralen noradrenergen Systems	11
1.2.1	Der Locus coeruleus als Schlüssel-Struktur für den Schlaf-Wach-Zyklus, für Aufmerksamkeit, Stress und <i>arousal</i>	11
1.2.2	Das Zusammenspiel mit dem dopaminergen System	14
1.2.3	Pathophysiologie des Locus coeruleus	16
1.3	Elektrophysiologie des Locus coeruleus	16
1.4	Zielsetzung der Arbeit	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Versuchstiere	19
2.1.2	Chemikalien und Geräte	19
2.1.3	Lösungen	19
2.1.3.1	Lösungen der Histologie	19
2.1.3.2	Lösungen der Elektrophysiologie	20
2.1.4	Antikörper und Nissl-Farbstoffe	22

Inhaltsverzeichnis

2.1.4.1	Primäre Antikörper	22
2.1.4.2	Sekundäre Antikörper	24
2.1.4.3	Nissl-Farbstoffe	24
2.1.4.4	Behandlung der Autofluoreszenz mit Kupfersulfat	25
2.2	Methoden	25
2.2.1	Retrogrades Tracing & Mapping	25
2.2.1.1	Verwendete Tracersubstanz	26
2.2.1.2	Ablauf des Tracing-Eingriffs	26
2.2.1.3	Injektionsareale und Koordinaten	28
2.2.1.4	Gewebsfixierung durch intrakardiale Perfusion mit Paraformaldehyd	29
2.2.1.5	Anfertigung der Hirnschnitte	30
2.2.1.6	Histologische Aufarbeitung der Schnitte von Pons und Mittelhirn	30
2.2.1.7	Histologische Aufarbeitung der Injektionsstellen durch Nissl-Färbung	31
2.2.1.8	Konfokale Mikroskopie und topographische Kartierung	32
2.2.2	Elektrophysiologische Methoden	33
2.2.2.1	Gewinnung akuter Hirnschnitte von adulten Mäusen	33
2.2.2.2	Die Patch-Clamp-Technik	33
2.2.2.3	Histologische Aufarbeitung der Injektionsstellen und der Patcheschnitte, konfokale Mikroskopie	43
3	Ergebnisse	44
3.1	Ergebnisse der Tracing-Experimente	44
3.1.1	Neuroanatomische Rekonstruktion der Injektionsareale	44
3.1.2	Topographie retrograd markierter Zellen im Locus coeruleus	48
3.1.2.1	Tracing des Präfrontalen Cortex	48
3.1.2.2	Tracing des dorsalen Hippocampus	49
3.1.2.3	Tracing des ventralen Hippocampus	51
3.1.2.4	Tracing des Cerebellum	52
3.1.2.5	Zusammenfassung	52
3.1.2.6	Ergebnisse der Doppeltracing-Studien	54
3.1.3	Quantitativer Vergleich mit dem dopaminergen Mittelhirn	56
3.2	Ergebnisse der Patch-Clamp-Experimente	58

Inhaltsverzeichnis

3.2.1	Elektrophysiologische Grundcharakterisierung coeruleo-präfrontaler und coeruleo-hippocampaler Neurone	58
3.2.1.1	Spontanfrequenz	58
3.2.1.2	Rebound Delay	59
3.2.1.3	Maximalfrequenz	61
3.2.1.4	Parameter des einzelnen Aktionspotentials: Breite, Schwellenpotential, Maximum, Minimum	63
3.2.2	Überprüfung des α_2 -Autorezeptorstatus in coeruleo-präfrontalen und coeruleo-hippocampalen Neuronen mit dem α_2 -Antagonisten Yohimbin	63
3.2.2.1	Spontanfrequenz	64
3.2.2.2	Rebound Delay	66
3.2.2.3	Maximalfrequenz	67
3.2.2.4	Parameter des einzelnen Aktionspotentials: Breite, Schwellenpotential, Maximum, Minimum	68
3.2.2.5	Haltestrom	69
4	Diskussion	73
4.1	Diskussion der Tracing-Experimente	73
4.2	Diskussion der Patch-Clamp-Experimente	75
4.2.1	Elektrophysiologische Charakterisierung coeruleo-präfrontaler und coeruleo-hippocampaler Neurone ohne und mit α_2 -Autorezeptor-Blockade	75
4.2.2	Funktionelle Implikationen	82
5	Zusammenfassung	84
6	Summary	85
	Literaturverzeichnis	86
7	Anlage	94
7.1	Abkürzungs- und Abbildungsverzeichnis	94
7.2	Tabellarischer Lebenslauf	98
7.3	Danksagung	99

1 Einleitung

1.1 Überblick: Der Locus coeruleus und der Neurotransmitter Noradrenalin

1.1.1 Der Locus coeruleus

1.1.1.1 Lokalisation und basale anatomische Eigenschaften des Locus coeruleus

Im Hirnstamm in der dorsalen Brücke liegt beidseits in der seitlichen Wand des vierten Ventrikels dicht gepackt das Kerngebiet, das als *Locus coeruleus* bezeichnet wird – und in der Tat ist der Nucleus, bedingt durch den hohen Melanin Gehalt, zumindest beim Menschen makroskopisch „himmelblau“ (Abb. 1.1).

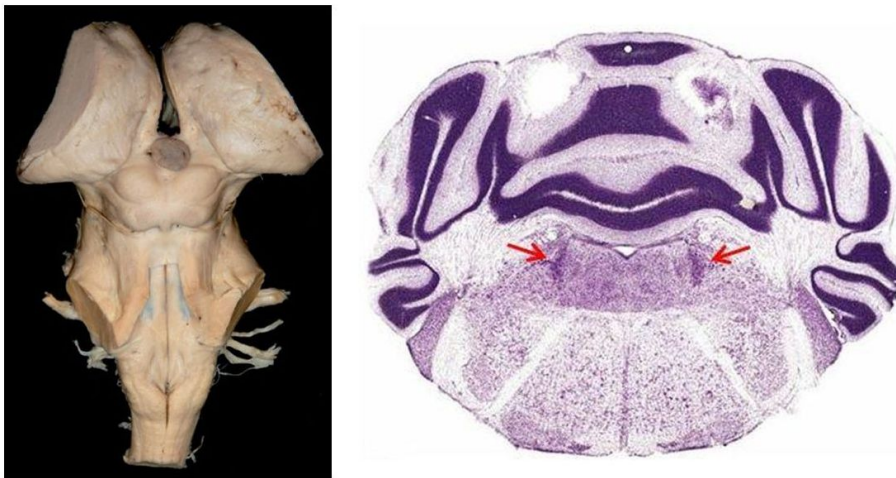


Abbildung 1.1: Links: Menschlicher Hirnstamm in der Ansicht von dorsal. Im Pons schimmern beidseits blau die pigmentierten Zellen des Locus coeruleus hindurch. (Abbildung aus: Deller & Sebestény, 2007.) Rechts: Coronerer Schnitt durch Pons und Cerebellum der Maus auf Höhe des Locus coeruleus (rote Pfeile); Nissl-Färbung. (Abbildung aus: Franklin & Paxinos, 2007.)

1 Einleitung

Der Locus coeruleus (LC) besteht aus einer verhältnismäßig kleinen Anzahl an Nervenzellen – etwa 1500 pro Seite im Nager, und 22.000-51.000 im Menschen –, die, als noradrenerge Zellen, alle das Synthesenzym des Neurotransmitters Noradrenalin, die Dopamin- β -Hydroxylase (DBH), enthalten (Grzanna & Molliver, 1980; Mouton et al., 1994). Ebenso enthalten sie das entscheidende Enzym der Synthese der Vorstufe des Noradrenalins, des Dopamins: die Tyrosin-Hydroxylase (TH) (vgl. zur Katecholaminsynthese Abschn. 1.1.2.1). Im Gegensatz zur DBH, die sich in den Exozytose-Vesikeln befindet, ist die TH zytosolisch lokalisiert.

Der Locus coeruleus stellt die größte Gruppe von Noradrenalin-produzierenden Zellen im ZNS dar (Foote et al., 1983). Trotz seiner kleinen Zellzahl verfügt er über weitreichende Projektionen mit einer ausgeprägten axonalen Verästelung und somit einem großen terminalen Feld, und so stellt er die Quelle für einen Großteil des zentralen Noradrenalins dar (Sara, 2009; s. Abschn. 1.1.1.2).

Neben dem Neurotransmitter Noradrenalin, dem die größte Bedeutung zukommt und auf dem der Fokus dieser Arbeit liegt, kann der Locus coeruleus eine Vielzahl anderer, v.a. peptidischer, Transmittermoleküle als Co-Transmitter ausschütten, etwa Vasopressin, Somatostatin, Neuropeptid Y und Galanin (Berridge & Waterhouse, 2003).

Der Locus coeruleus ist die größte, wenn auch nicht die einzige Quelle von Noradrenalin im ZNS. Auch die Kerngebiete des lateralen tegmentalen Feldes (zu dem u.a. der dorsale Vagus Kern und der Nucleus tractus solitarii gehören), stellen die zentrale Versorgung mit Noradrenalin sicher (Moore & Bloom, 1979). Der zum limbischen System gehörende Nucleus accumbens beispielsweise wird größtenteils nicht durch den Locus coeruleus, sondern durch den Nucleus tractus solitarii mit Noradrenalin versorgt (Delfs et al., 1998).

1.1.1.2 Efferente Topographie des Locus coeruleus

Die Neurone des Locus coeruleus projizieren in zahlreiche Gebiete des ZNS: Sowohl weite Teile des cerebralen Cortex und des Vorderhirns, als auch Thalamus und Hypothalamus sowie Kleinhirn, Hirnstamm und Rückenmark erhalten noradrenerge Afferenzen vom Locus coeruleus (Kobayashi et al., 1974; Moore & Bloom, 1979; Sara, 2009). Die Efferenzen des Locus coeruleus sind in Abb. 1.2 dargestellt.

Die Zellen des Locus coeruleus können dabei sich sehr weit verzweigende Axone ausbilden, sodass das terminale Feld einer einzelnen Zelle – d.h. der Bereich, der von ihren Axonkollateralen innerviert wird – mitunter mehrere Gebiete des ZNS umfassen kann (Room et al., 1981; Steindler, 1981). Eine Ausnahme vom dichten Innervationsnetz der LC-Fasern scheinen die Basalganglien darzustellen, die nur eine sehr spärliche bis gar

1 Einleitung

keine Innervation durch den Locus coeruleus erfahren (Room et al., 1981; Berridge & Waterhouse, 2003; Sara, 2009).

Eine grobe Topographie innerhalb des Locus coeruleus je nach Projektionsareal ist vorbeschrieben; die im Rahmen dieser Arbeit selbst erhobenen Ergebnisse bezüglich der topographischen Gliederung der LC-Zellen werden in Abschnitt 3.1.2 vorgestellt.

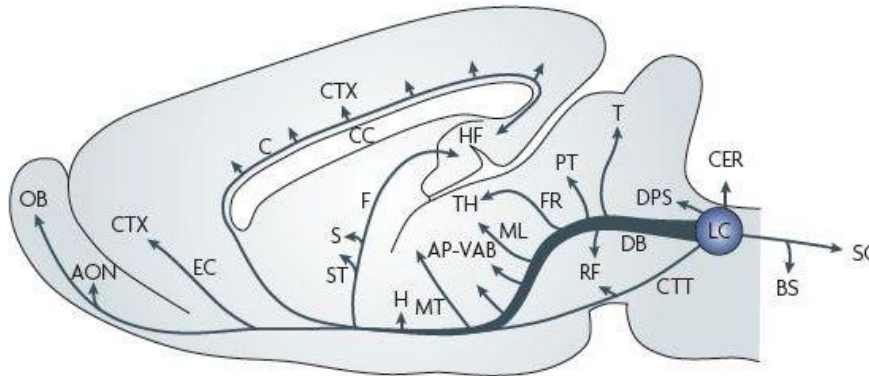


Abbildung 1.2: Zielgebiete von Locus-coeruleus-Projektionen im Nagerhirn.

AON, anteriorer olfactorischer Nucleus; AP-VAB, Ansa peduncularis – ventrales amygdaloides Bündel; BS, Hirnstammkerne; C, Cingulum; CC, Corpus callosum; CER, Cerebellum; CTT, zentraler tegmentaler Tract; CTX, Cortex; DB, dorsales Bündel; DPS, dorsales periventriculäres System; F, Fornix; FR, Fasciculus retroflexus; H, Hypothalamus; HF, hippocampale Formation; ML, medialer Lemiscus; MT, mamillothalamischer Trakt; OB, Bulbus olfactorius; PT, prätektale Region; RF, Formatio reticularis; S, Septum; SC, Rückenmark; ST, Stria terminalis; T, Tectum; TH, Thalamus (Abbildung aus: Sara, 2009).

1.1.1.3 Afferente Topographie des Locus coeruleus

Ebenso wie der Locus coeruleus axonale Projektionen in viele Gebiete aufweist, erhält er selbst neuronalen Input von einer Vielzahl von Strukturen und ist so in verschiedene neuronale Schaltkreise involviert. Eingänge in den Locus coeruleus entspringen u.a. im präfrontalen Cortex, in der Amygdala, im lateralen Hypothalamus und im dorsalen Raphe-Kern, sowie in vielen tiefer gelegenen Regionen im Rückenmark (Benarroch, 2009). Vielfach ist der LC auch als eine Art Schaltstelle betrachtet worden, die zwischen Rückenmark und „höheren“ Zentren des ZNS vermittelt, und dabei Input sowohl von „niederen“ als auch, rückkoppelnd, „höheren“ Kerngebieten erhält.

1.1.2 Der Neurotransmitter Noradrenalin

1.1.2.1 Synthese

Noradrenalin gehört, zusammen mit Adrenalin und Dopamin, zur Gruppe der Katecholamine, die in einem gemeinsamen Syntheseweg aus der Aminosäure Tyrosin hergestellt werden (s. Abb. 1.3). Der Name, Katechol-amine, ist Programm: Es handelt sich jeweils um ein Amin, das mit einem Katecholring (einem aromatischen Alkohol) verknüpft ist.

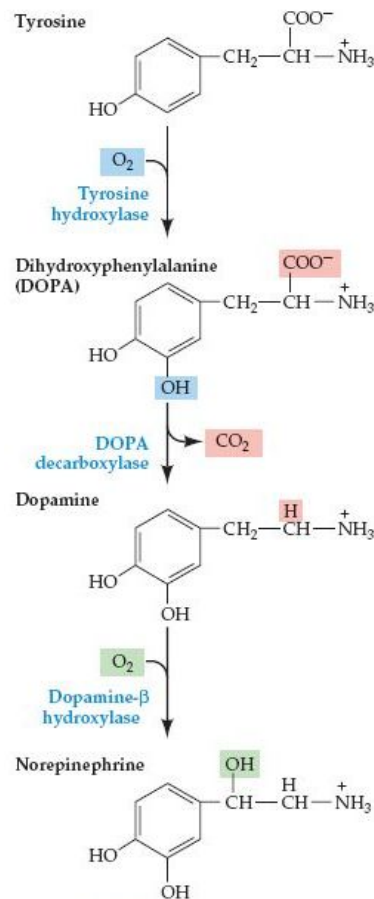


Abbildung 1.3: Syntheseweg von Noradrenalin. (Abbildung aus: Purves et al., 2004.)

Zur Katecholaminsynthese kann Tyrosin von den Nervenzellen aus dem Extrazellularraum aufgenommen oder aus Phenylalanin (einer essentiellen Aminosäure, die über die Nahrung aufgenommen wird) gebildet werden. In einem ersten Schritt wird Tyrosin zu L-Dopa (3,4-Dihydroxyphenylalanin) hydroxyliert. Diese Reaktion, die der Synthese aller Katecholamine gemeinsam ist, wird durch das Enzym Tyrosin-Hydroxylase (TH) katalysiert, und somit enthalten alle katecholaminergen Zellen die Tyrosin-Hydroxylase (sind also „TH-positiv“). In einem nächsten Schritt erfolgt die Decarboxylierung von L-DOPA

1 Einleitung

zu Dopamin (durch die Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase). Anschließend wird Dopamin durch die Dopamin- β -Hydroxylase (DBH) am ersten C-Atom hydroxyliert, und so entsteht Noradrenalin. Die DBH ist somit das entscheidende Enzym für noradrenerge Zellen, und sie wurde in der vorliegenden Arbeit als Markerprotein für Färbungen verwendet. In einem nächsten Schritt kann, in adrenergen Zellen, aus Noradrenalin nun noch Adrenalin gebildet werden, durch die Phenylethanolamin-N-methyltransferase. Verglichen mit Noradrenalin spielt Adrenalin im ZNS funktionell eher eine untergeordnete Rolle (Fuller, 1982).

Einige Zeit galt Dopamin „nur“ als Vorläufermolekül für Noradrenalin und Adrenalin, bis 1958 durch Arvid Carlsson die Rolle des Dopamins als eigener Neurotransmitter entdeckt wurde (Benes, 2001). Der Unterschied im molekularen Aufbau zwischen Dopamin und Noradrenalin ist recht klein – Noradrenalin hat nur eine OH-Gruppe mehr –, und in der Tat gibt es sich überschneidende Rezeptoraffinitäten (Zhang et al., 2004; Wedemeyer et al., 2007).

1.1.2.2 Noradrenalin als Hormon und Neurotransmitter

Noradrenalin spielt im ganzen Körper bei der Steuerung von Herz-Kreislauf-Prozessen und Stressreaktionen eine wichtige Rolle. Peripher wird es, zusammen mit Adrenalin, von den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks hergestellt. Im vegetativen Nervensystem ist Noradrenalin der Botenstoff des zweiten sympathischen Neurons. Noradrenalin vermittelt so die Wirkung des Sympathikus an den Endorganen (mit Ausnahme der Schweißdrüsen), so beispielsweise eine Gefäßkontraktion der Arteriolen und damit eine Blutdrucksteigerung, oder eine Aktivierung des Herzens (positiv ino-, chrono- und dromotrop).

Therapeutisch findet Noradrenalin in Anästhesie und Notfallmedizin in seiner Rolle als potenter Vasopressor zur Blutdruckanhebung Anwendung, evtl. auch als lokale Zugabe zur Blutungsstillung im Rahmen einer Lokalanästhesie.

1.1.2.3 Adrenerge Rezeptoren

Adrenerge Rezeptoren finden sich im gesamten Körper. Auf sie wirken vor allem Adrenalin und Noradrenalin, wobei dem Adrenalin eine eher untergeordnete Rolle als Neurotransmitter an Synapsen zukommt, es aber dafür im Nebennierenmark und damit frei im Blut überwiegt. Es werden drei klassische Subtypen adrenerger Rezeptoren unterschieden: α_1 -, α_2 - und β -Rezeptoren. Sie alle sind metabotrope Rezeptoren. Während

es sich bei α_1 - und β -Rezeptoren um postsynaptische Rezeptoren handelt, kommen α_2 -Rezeptoren sowohl prä- als auch postsynaptisch vor. Präsynaptische α_2 -Rezeptoren kommen z.B. auf den Neuronen des Locus coeruleus selbst vor, und werden daher als *Autorezeptoren* bezeichnet. Sie haben einen inhibitorischen Effekt auf die Zellen und dienen so einer negativen Rückkopplung. Je nach Lokalität der postsynaptischen Rezeptoren variiert erstens die Dichte des jeweiligen Rezeptor-Subtyps, aber auch der funktionelle Effekt, den die Rezeptoraktivierung durch Noradrenalin auslöst.

Im PNS wird der blutdrucksteigernde Effekt beispielsweise über α_1 -Rezeptoren vermittelt, während β_1 -Rezeptoren die Wirkungen am Herzen vermitteln. Die Dilatation der Bronchien, ein weiterer wichtiger peripherer Effekt des Sympathikus (wenn auch primär durch Adrenalin und nicht Noradrenalin bewirkt) wird über β_2 -Rezeptoren vermittelt.

Im ZNS vermitteln adrenerge Rezeptoren eine Vielzahl von Funktionen, die vor allem auf Noradrenalin als Transmitter zurückzuführen sind, da Adrenalin die Bluthirnschranke nicht passieren kann und im ZNS, verglichen mit Noradrenalin, in geringeren Maßen produziert wird (Fuller, 1982). Die zentralen noradrenergen Effekte – und damit zu einem Gutteil die Effekte des Locus coeruleus – werden im nächsten Abschnitt vorgestellt.

1.2 Die funktionelle Rolle des Locus coeruleus und des zentralen noradrenergen Systems

Aus der beschriebenen weit verzweigten Anatomie des Locus coeruleus und seinen vielen Projektionsgebieten ergibt sich seine sehr generelle funktionelle Rolle bei der Steuerung zerebraler Abläufe. Häufig gilt der LC als *Neuromodulator*, der, anstatt primär selbst exzitatorische oder inhibitorische Effekte auf postsynaptische Neurone auszuüben, andere Neurotransmitter, etwa Glutamat oder GABA, in ihrer Wirkung moduliert, und damit über ein „Tuning“ bzw. „Shifting“ von funktionellen Netzwerken eine Verhaltensadaptation bewirkt (Aston-Jones & Cohen, 2005; Bouret & Sara, 2005). So können die ganz grundlegenden Funktionen, die dem LC in Koordinierung und Aufrechterhaltung kognitiver und nicht-kognitiver Prozesse zugeschrieben werden, verständlich werden.

1.2.1 Der Locus coeruleus als Schlüssel-Struktur für den Schlaf-Wach-Zyklus, für Aufmerksamkeit, Stress und *arousal*

Als Teil der *Formatio reticularis* – einer netzartigen Neuronenstruktur im Hirnstamm, die von der Medulla oblongata bis zum Diencephalon reicht, und der etwa auch die

1 Einleitung

Raphe-Kerne angehören – kommen dem Locus coeruleus wichtige Steuerungsfunktionen vegetativer Prozesse sowie eine Vermittlung zwischen Rückenmark und „höheren“ Zentren des ZNS zu.

Bereits recht früh wurde die Rolle des Locus coeruleus bei der Schlaf-Wach-Koordination entdeckt (Jouvet, 1969; Hobson et al., 1975; Aston-Jones & Bloom, 1981). Die (tonische) Aktivität der LC-Neurone korreliert sehr genau mit den Stadien des Schlaf-Wach-Zyklus: Die höchste Feuerungsrate entwickeln die Neurone im Wachzustand, im *slow-wave sleep* (SWS) nimmt die Feuerungsrate ab, und im REM-Schlaf (sog. „paradoxe Schlaf“, da es hier zu schnellen Augenbewegungen – rapid eye movements – kommt), sind die LC-Neurone fast gänzlich inaktiv. Auch im wachen Organismus gibt es natürlich Abstufungen an coeruleärer Aktivität; im entspannten Wachzustand sind die Neurone weniger aktiv als unter Stress, der die maximale LC-Aktivierung darstellt. Der Locus coeruleus ist so einer der primären Stress-Sensoren des ZNS und wird parallel mit der Stressreaktion des vegetativen Nervensystems aktiviert (Valentino & Van Bockstaele, 2008). Die Stressreaktion wird vom LC dann z.B. an den präfrontalen Cortex (PFC) oder die dopaminerge VTA weiter vermittelt (Sara & Bouret, 2012). Im Schlaf-Wach-Zyklus *antizipiert* die LC-Aktivität jeweils den entsprechenden Schlaf-Wach-Zustand, und spätere Experimente haben die kausale Rolle des Locus coeruleus-noradrenergen Systems in der Regulation von Wachheit und Schlaf unterstrichen (Berridge, 2008); dem Locus coeruleus ist dabei häufig das Schlagwort „arousal“ zugeordnet, was in etwa Erweckung oder Erregung bedeutet. Die Rolle des „promoting arousal & stress“ realisiert der LC, entsprechend seinen Projektionen, über β - und α_1 -Rezeptoraktivierung in vielen subkortikalen Regionen.

Auch die kortikalen Projektionen des Locus coeruleus (der LC ist die fast ausschließliche Quelle des neokortikalen Noradrenalins) sind für wichtige Funktionen entscheidend: Je nach Ausmaß an *arousal* ist der LC stark oder weniger stark aktiv; und entsprechend ändert sich der Noradrenalin-Gehalt in den Zielregionen. Es hat sich gezeigt, dass, beispielsweise im PFC, der für Aufmerksamkeitsprozesse entscheidend ist, für die optimale Leistung ein richtiges Mittelmaß an Noradrenalin-Konzentration erforderlich ist – zu viel und zu wenig ist der Funktion jeweils abträglich, wie es in der sog. Yerkes-Dodson-Relation (der „umgedrehten U-Kurve“) zwischen Locus-coeruleus-Aktivierung und kognitiver Leistungsfähigkeit in einem „working memory task“ zum Ausdruck kommt (vgl. Abb. 1.4). Dies bedeutet also, dass die kognitive Leistungsfähigkeit (auch) vom Level an *arousal* abhängt: Schläfrigkeit oder Müdigkeit, die sich in verminderter Locus-coeruleus-Aktivität niederschlagen, sind ebenso schädlich wie Hyperaktivität im Rahmen von star-

1 Einleitung

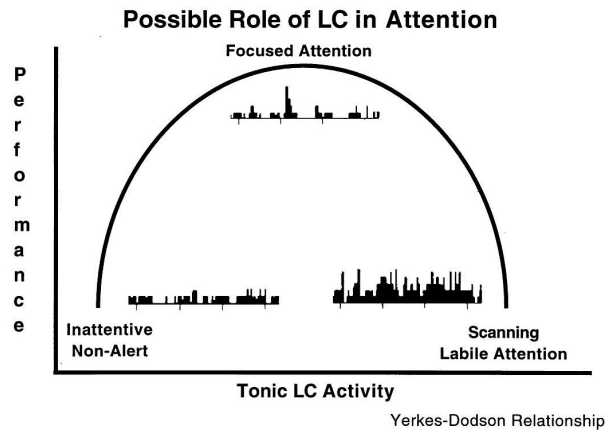


Abbildung 1.4: Beziehung zwischen Locus-coeruleus-Aktivität und Leistung in einem *focused attention task*. (Abbildung aus: Aston-Jones et al., 1999.)

kem Stress (Valentino & Van Bockstaele, 2008). LC und PFC sind hierbei wechselseitig sehr eng (exzitatorisch) reguliert (Sara & Bouret, 2012).

Andere Bereiche des Gehirns, z.B. posterior kortikale oder subkortikale Gebiete, zeigen eine gänzlich andere Korrelation von NA-Spiegel und Funktion, die hier durch sehr hohes NA, d.h. durch sehr hohe LC-Aktivität, gerade befördert wird. Dem liegen Unterschiede in den beteiligten adrenergen Rezeptoren zu Grunde: Im PFC wird der begünstigende Effekt über postsynaptische α_2 -Rezeptoren vermittelt, während die Aktivierung von α_1 -Rezeptoren einen negativen Effekt aufweist (Arnsten, 1997, 2000); in den anderen Regionen ist genau umgekehrt (vgl. Abb. 1.5). Gegeben die unterschiedliche Rezeptor-

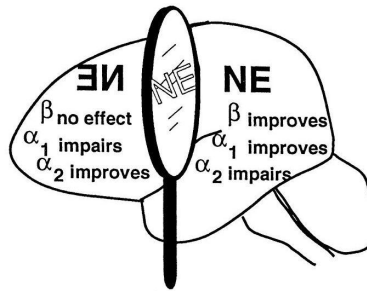


Abbildung 1.5: Zentrale Effekte von Noradrenalin (NE) über adrenerge Rezeptoren. (Abbildung aus: Arnsten, 2000.)

Affinität des Substrats – in niedrigen Konzentrationen bindet Noradrenalin bevorzugt an α_2 -Rezeptoren, während es in hohen Konzentrationen auch an α_1 -Rezeptoren bindet – wird verständlich, dass hohe NA-Spiegel die im PFC realisierten Prozesse gewisserma-

ßen zugunsten anderer Gebiete „herunterfahren“, um z.B. evolutionär tiefer verwurzelte Fight-or-Flight-Reaktionen zu begünstigen (Arnsten, 2000).

Ungeachtet der zentralen generellen Rolle, die der Locus coeruleus für *arousal* und Wachheit spielt, hat sich in den vergangenen Jahren ein zunehmend komplexeres Bild der funktionalen Einbettung des LC auch in spezifischere kognitive Prozesse entwickelt. Namentlich wurde dem LC eine zentrale Rolle bei Entscheidungsprozessen und der Optimierung von Belohnungssituationen zugeschrieben (Aston-Jones & Cohen, 2005). Demnach sorgt der Locus coeruleus für das Umschalten bzw. für die Balance von *exploitation*, d.h. dem effektiven Ausschöpfen einer bekannten Belohnungsquelle, und *exploration*, d.h. dem Ausschau-Halten nach neuen Belohnungsquellen. Dies spiegelt sich wider in seinem Feuerungsmodus: Phasische Aktivität (salvenartiges Feuern) der coeruleären Neurone optimiert das Arbeiten an einer aktuellen Aufgabe (*exploitation*), wohingegen tonische Aktivität (gleichmäßiges Feuern mit konstanter Frequenz) die Suche nach neuen, womöglich ertragreicheren, Aufgaben erleichtert (*exploration*). Dem phasischen Modus ist also die fokussierte, selektive Aufmerksamkeit zugeordnet, dem tonischen Modus das „Scannen“ der Umwelt bei behavioraler Flexibilität. Darüber hinaus wurde dem LC eine „Reset“-Funktion, d.h. die Gewährleistung einer Neuausrichtung für z.B. optimale Aufmerksamkeit, insbesondere für kortikale Netzwerke zugeschrieben (Bouret & Sara, 2005; Sara & Bouret, 2012).

Neben seiner Regulation von Aufmerksamkeit und Arbeitsgedächtnis spielt der Locus coeruleus auch bei der Konsolidierung von Inhalten im Langzeitgedächtnis eine Rolle. Über die Aktivierung von β - Rezeptoren kann der LC Langzeitpotentierung (LTP) im Hippocampus erleichtern, d.h. plastische Veränderungen der Synapsen hippocampaler Neurone, und so die Gedächtnisbildung und auch die Wiederauffindung (*retrieval*) von Gedächtnisinhalten beeinflussen (Harley, 2007; Benarroch, 2009; Sara, 2009).

1.2.2 Das Zusammenspiel mit dem dopaminergen System

Das Locus coeruleus-noradrenerge System arbeitet bei der Modulation kognitiver Funktionen eng zusammen mit den anderen monoaminergen Systemen – dem dopaminergen und dem serotonergen System (Arnsten & Li, 2005; Briand et al., 2007).

Insbesondere das noradrenerge und das dopaminerge System sind anatomisch und funktionell eng verzahnt und agieren häufig „konzertiert“. Neben seiner Rolle bei der Steuerung motorischer Prozesse, der die Projektionen in die Basalganglien entsprechen, entsendet das dopaminerge Mittelhirn, v.a. die Ventrale Tegmentale Area (VTA), auch

1 Einleitung

Projektionen in den präfrontalen Kortex, die kognitive Funktionen beeinflussen, und die etwa bei der Schizophrenie oder bei Suchterkrankungen verändert sind.

Zwischen LC und VTA besteht eine enge reziproke Regulation; beide antworten auf ähnliche Stimuli und haben ähnliche Effekte auf die jeweiligen Zielzellen (Sara, 2009; Benarroch, 2009). Beispielsweise hat Dopamin im PFC einen ähnlichen Effekt auf das Arbeitsgedächtnis wie Noradrenalin (vgl. Abschn. 1.2.1) – ein mittlerer DA-Spiegel sorgt für eine gesteigerte „working memory performance“, während zu hohe und zu niedrige Spiegel der Funktion abträglich sind. Auch im Hippocampus bestehen funktionelle Überlappungen von NA- und DA-Wirkung bei der Steuerung von LTP (Yang et al., 2002). Aufgrund der engen strukturellen Verwandtschaft der beiden Katecholamine – nur eine OH-Gruppe macht den Unterschied; s. Abschn. 1.1.2.1 – können sie auch jeweils durch Terminalen des anderen Systems aufgenommen und auch wieder freigesetzt werden (Gu et al., 1994; Pozzi et al., 1994; Yamamoto & Novotney, 1998; Morón et al., 2002). Auch für die jeweiligen Rezeptoren – adrenerge und dopaminerge Rezeptoren – wurden überlappende Rezeptoraffinitäten für NA und DA zumindest *in vitro* nachgewiesen (Zhang et al., 2004; Wedemeyer et al., 2007).

Angesichts des engen Zusammenspiels noradrenerger und dopaminergerefferenzen und in manchen Gebieten verhältnismäßig spärlicher dopaminergere Innervation ist die Hypothese aufgestellt worden, der Locus coeruleus setze neben Noradrenalin, quasi als „Co-Transmitter“, auch Dopamin frei, etwa im PFC (Devoto & Flore, 2006; Devoto et al., 2008) oder im Hippocampus (Smith & Greene, 2012), wo für NA und DA, ähnlich wie im PFC, synergistische Effekte nachgewiesen wurden (Guiard et al., 2008). Dem liegt der Gedanke zugrunde, dass das DA, das in noradrenergen Neuronen in Vesikel verpackt und dort durch die DBH zu NA umgewandelt wird, wegen Sättigung der DBH nicht komplett konvertiert wird, und so die noradrenergen LC-Terminalen auch DA freisetzen. Die Ergebnisse der Tracing-Studien der vorliegenden Arbeit stützen die These des Co-Release von DA aus noradrenergen Zellen insofern, als dass, besonders für den Hippocampus, eine starke Differenz zwischen noradrenerger (LC-) und dopaminergere (VTA-) Innervation sowohl des ventralen als auch des dorsalen Hippocampus nachgewiesen werden konnte (s. Abschn. 3.1.3), also ein Kontrast besteht zwischen der äußerst spärlichen dopaminergere Innervation des Hippocampus und der nachgewiesenen hohen funktionellen Relevanz von hippocampalem DA (Lisman & Grace, 2005; O’Carroll et al., 2006; Rossato et al., 2009; Bethus et al., 2010).

1.2.3 Pathophysiologie des Locus coeruleus

Veränderungen des Locus coeruleus finden sich bei verschiedenen neurologischen und psychiatrischen Krankheitsbildern.

Eine ausgeprägte Degeneration erfährt der LC etwa bei der Alzheimer'schen Erkrankung; ein Zellverlust von bis zu 80% ist beschrieben (Bondareff et al., 1982; Zarow et al., 2003). Pathophysiologisch wird u.a. ein Einfluss des LC auf mikrogliale Clearance-Funktionen und mikrovaskuläre Prozesse diskutiert (Haglund et al., 2006; Heneka et al., 2010), auch wenn die genaue kausale Einbettung der coeruleären Degeneration in den Kontext der ganzen Erkrankung noch unklar ist (Benarroch, 2009).

Ähnliches gilt für den Morbus Parkinson, auch hier kommt es zu einer markanten Degeneration des LC. Diese ist quantitativ sogar bedeutender als die Degeneration der – bei Parkinson symptomatisch und therapeutisch primär im Fokus stehenden – dopaminergen Neurone im Mittelhirn (Substantia nigra pars compacta), und geht dieser zeitlich voraus (Zarow et al., 2003; Benarroch, 2009). Dem LC wird weiterhin eine kompensatorische Rolle bei der Parkinson-Erkrankung zugeschrieben, da er einen neuroprotektiven Einfluss auf die Substantia nigra nimmt – eine coeruleäre Degeneration würde so einen Untergang dopaminergen Neurone im Mittelhirn begünstigen (Rommelfanger & Weinschenker, 2007; Berglöf & Strömberg, 2009).

Auch beim Down-Syndrom (Trisomie 21) steht eine deutliche Beteiligung des Locus coeruleus im Raum (Lockrow et al., 2011).

Im Rahmen seiner Rolle bei der Steuerung von Aufmerksamkeit, *arousal* und Stress ist eine Funktionsstörung des LC mit entsprechenden psychiatrischen Krankheitsbildern assoziiert. Eine Beteiligung wird u.a. vermutet bei Angsterkrankungen und affektiven Störungen, beim Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitätssyndrom (ADHS) und bei Stress-induzierten Erkrankungen wie der posttraumatischen Belastungsstörung (PTSD) (Berridge & Waterhouse, 2003; Bracha et al., 2005).

1.3 Elektrophysiologie des Locus coeruleus

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit stehen elektrophysiologische Analysen einzelner Neurone des Locus coeruleus.

Vorbeschrieben ist eine große Homogenität der grundlegenden elektrophysiologischen Parameter coeruleärer Neurone *in vitro* (Williams et al., 1984; Berridge & Waterhouse, 2003; de Oliveira et al., 2010), die jedoch bislang nur vereinzelt nach Subpopulationen bzw. Projektionsgebieten differenziert wurden. Die beschriebene Homogenität lässt

1 Einleitung

ähnliche Kanalprozesse bei der Aktionspotentialgenerierung und -weiterleitung in den verschiedenen LC-Subpopulationen vermuten.

Die Zellen des Locus coeruleus sind spontan aktiv, mit einer Frequenz von 1-5 Hz, die zeitliche Breite eines Aktionspotential wurde mit 1-2 ms beschrieben, bei einem Schwellenpotential (*threshold*) von -55 mV (Williams et al., 1984). Die Spontanaktivität des LC gewährleistet eine tonische Noradrenalin-Ausschüttung und so einen basalen Tonus in den kortikalen und subkortikalen Zielregionen des LC.

Kanalphysiologisch liegt der Spontanaktivität die Balance von zumindest zwei Strömen zugrunde: einem permanenten Einwärts- Na^+ -Strom und einem Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Strom. Der Ca^{2+} -Influx erfolgt durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle, die etwa auf threshold-Level aktiv werden (Williams et al., 1984, 1991).

Für die vorliegende Arbeit sehr bedeutsam waren die α_2 -Autorezeptoren, die im Locus coeruleus selbst exprimiert werden. Diese verhindern eine Übererregung des LC, indem sie für einen negativen Rückkopplungsmechanismus sorgen: Das Noradrenalin, das von der Zelle selbst und benachbarten Zellen ausgeschüttet wird, bindet an die Autorezeptoren, deren Aktivierung inhibitorisch auf die Zelle wirkt. Realisiert wird die Inhibition über die Aktivierung sog. GIRKs, G-Protein-gekoppelter K^+ -Kanäle, die für eine Hyperpolarisation, und damit eine verminderte Erregbarkeit, der Zellmembran sorgen (Arima et al., 1998; Lüscher & Slesinger, 2010); zudem ist auch die Inhibition von Ca^{2+} -Kanälen an der Hyperpolarisation beteiligt (Chieng & Bekkers, 1999).

Neben der Homogenität der LC-Neurone *in vitro* ermöglicht eine ausgeprägte sog. elektrotonische Kopplung der Neurone auch eine homogene Antwort des Locus coeruleus auf einen Stimulus *in vivo*: Über *gap junctions* ist ein rascher Austausch von elektrischen Ladungsträgern zwischen den Zellen möglich, und die Zellen können im Bedarfsfall auf afferenten Input – z.B. auf einen Stress vermittelnden Input – mit einem nahezu synchronen Feuermuster antworten (Berridge & Waterhouse, 2003). Hierdurch wird die simultane Ausschüttung von Noradrenalin in verschiedenen Regionen des ZNS ermöglicht. Die elektrotonische Kopplung erlaubt beispielsweise auch den schnellen Wechsel von tonischem und phasischem Feuermuster im kompletten LC (Aston-Jones et al., 1999). Dieser Wechsel ist funktionell bedeutsam für die „behavioral flexibility“ des Organismus: Ausgeprägte elektrotonische Koppelung erleichtert das Auftreten phasischer „Bursts“, die mit fokussierter Aufmerksamkeit des Organismus korreliert sind (Aston-Jones et al., 1999; Aston-Jones & Cohen, 2005; s.o.).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das Locus coeruleus-noradrenerge System ist elektrophysiologisch bislang im Wesentlichen *in toto*, ohne Klassifizierung eventueller Subpopulationen, beschrieben worden.

Für das dopaminerge System hingegen, das funktionell eng mit dem noradrenergen verknüpft ist, konnten zwei Subtypen mit projektionsspezifisch unterschiedlichem elektrophysiologischen Phänotyp klassifiziert werden (Lammel et al., 2008, 2011; Roeper, 2013). Den langsam feuernden, „klassischen“ dopaminergen meso-striatalen Neuronen stehen die in den PFC und Teile des Nucleus accumbens projizierenden, schnell feuernden dopaminergen Neurone entgegen. Innerhalb dieses dualen Systems sind die meso-cortikalen Neurone insofern einzigartig, als dass sie keine funktionellen D₂-Autorezeptoren besitzen (Lammel et al., 2008).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte nun geprüft werden, inwiefern die beschriebene projektionsspezifische Diversität des dopaminergen Mittelhirns auch auf den Locus coeruleus – das andere große katecholaminerge System des Gehirns – zutrifft.

Hierzu wurden in einem ersten Schritt vier nach Zielregionen klassifizierte Subpopulationen von Nervenzellen im Locus coeruleus durch retrogrades Tracing *in vivo* topographisch erfasst: LC-Neurone projizierend in den PFC, den dorsalen Hippocampus, den ventralen Hippocampus und das Cerebellum.

Anschließend erfolgte mittels der Patch-Clamp-Technik im Hirnschnitt (*in vitro*) die selektive elektrophysiologische Grundcharakterisierung zweier Subpopulationen, derjenigen der in den PFC und derjenigen der in den ventralen Hippocampus projizierenden LC-Neurone (coeruleo-präfrontale vs. coeruleo-hippocampale Projektion). Zwei Fragen waren dabei leitend: Erstens, bestehen Unterschiede hinsichtlich der grundlegenden elektrophysiologischen Eigenschaften zwischen den beiden Populationen (etwa hinsichtlich Spontan- und Maximalfrequenz, oder in Bezug auf das einzelne Aktionspotential)? Zweitens, gibt es Hinweise auf eine differentielle Regulation des α_2 -Autorezeptors bei den beiden Populationen (analog zur funktionellen Abwesenheit von D₂-Rezeptoren in meso-cortikalen dopaminergen Neuronen)?

Zur Beantwortung der ersten Frage erfolgte eine Grundcharakterisierung der Neurone der jeweiligen Subpopulation im *current clamp*-Modus, zur Beantwortung der zweiten Frage wurden, ebenfalls im *current clamp*, Messungen mit dem α_2 -Blocker Yohimbin vorgenommen und mit den vorher erhobenen Daten kontrastiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Die Experimente wurden an männlichen, adulten Mäusen des Stamms C57BL/6 (Charles River Laboratories, Sulzfeld) durchgeführt. Die Tiere waren zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns 12-13 Wochen alt und 24-26 g schwer. Sie wurden präoperativ im Tierraum des Instituts in einem ventilierten Schrank (ScantainerClassic, Scanbur BK A/S, Karlslunde, Dänemark) in Gruppen von bis zu fünf Tieren gehalten und mindestens einmal pro Woche in saubere Käfige umgesetzt. Postoperativ erfolgte die Unterbringung in Einzelkäfigen. Futter (Standarddiät (Ssniff, Soest)) und Wasser stand den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Bei einer Temperatur von 25 °C und etwa 50% relativer Luftfeuchte wurden sie in einem zwölf Stunden Hell-Dunkel-Zyklus gehalten.

2.1.2 Chemikalien und Geräte

Die verwendeten Chemikalien und Geräte sind jeweils bei Beschreibung der einzelnen Methoden genannt. Sofern nicht anders angegeben, wurden Chemikalien von Sigma Aldrich (München) bezogen. Standardgeräte sowie Einweg- und Verbrauchsmaterialien werden nicht gesondert aufgeführt.

2.1.3 Lösungen

2.1.3.1 Lösungen der Histologie

1. PBS:
 - 150 mM NaCl
 - 5 mM KCl
 - 200 mM NaH₂PO₄
 - 200 mM Na₂HPO₄

2 Material und Methoden

in Reinstwasser

pH 7,4 (eingestellt mit 0,1 M HCl)

2. Blocklösung:

10% Pferde-Serum (Vector Laboratories, Burlingame, USA)

0,2% BSA (Roth, Karlsruhe, D)

0,5% Triton X-100

in PBS

3. Carrierlösung:

1% Pferde-Serum

0,2% BSA

0,5% Triton X-100

in PBS

4. Aufbewahrungslösung:

10% Saccharose

0,05% NaN_3

in 0,1 M PBS

5. Fixierungslösung:

4% Paraformaldehyd

15% Pikrinsäure

in 0,1 M PBS

pH 7,4

6. Kupfersulfat-Lösung:

1 mM CuSO_4

in 0,01 M Ammonium-Acetat-Puffer

pH 5,0

2.1.3.2 Lösungen der Elektrophysiologie

1. Reinstwasser:

Millipore S.A.S, Molsheim, Frankreich

2. ACSF-Perfusionslösung:

125 mM NaCl

2 Material und Methoden

2,5 mM KCl
25 mM NaHCO₃
1,25 mM NaH₂PO₄
0,1 mM CaCl₂
6,174 mM MgCl₂
2,5 mM Glucose
50 mM Saccharose
2,96 mM Kynurensäure
in Reinstwasser
pH 7,4 mit 95% O₂/ 5% CO₂
500 ml für 1h bei -80 °C

3. ACSF-Badlösung:

125 mM NaCl
2,5 mM KCl
25 mM NaHCO₃
1,25 mM NaH₂PO₄
2 mM CaCl₂
1 mM MgCl₂
2,5 mM Glucose
22,5 mM Saccharose
in Reinstwasser
pH 7,4 mit 95% O₂/ 5% CO₂

4. Pipettenlösung:

140 mM KCl
10 mM HEPES
0,1 mM EGTA
2 mM MgCl₂
0,1% Neurobiotin
in Reinstwasser

2.1.4 Antikörper und Nissl-Farbstoffe

2.1.4.1 Primäre Antikörper

Im Rahmen der Neu-Etablierung eines Antikörpers gegen das Noradrenalin synthetisierende Enzym, die Dopamin- β -Hydroxylase (DBH), wurden in dieser Arbeit verschiedene primäre Antikörper auf die Anfärbung des Locus coeruleus in Hirnschnitten von C57bl/6 Mäusen hin getestet. Es erfolgte jeweils auch eine Kontrollfärbung der dopaminergen Regionen des Mittelhirns, um eine noradrenalin-unselektive Anfärbung katecholaminerger Neurone auszuschließen.

Folgende vier anti-DBH-Antikörper wurden getestet (der mit dem Stern markierte Antikörper ist der schlussendlich verwendete):

Antikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Anti-DBH, c-terminal	Kaninchen	Millipore	1:500
Anti-DBH, n-terminal	Kaninchen	Millipore	1:750
Anti-DBH	Kaninchen	Abcam (ab43868)	1:750*
Anti-DBH	Schaf	Abcam (ab19353)	1:250

Zwei der getesteten anti-DBH-Antikörper, Millipore rabbit anti-DBH c-terminal und Abcam sheep anti-DBH „ab19353“, zeigten in Verdünnungen zwischen 1:250 und 1:1000 keinerlei Signal im Locus coeruleus. Als Zweitantikörper wurden Alexa Fluor®488 goat anti-rabbit bzw. Alexa Fluor®647 goat anti-sheep in 1:750 Verdünnung verwendet, die konjugiert mit anderen Erstantikörpern einwandfreie Ergebnisse liefern. Die anti-DBH-Antikörper Millipore rabbit anti-DBH c-terminal und Abcam sheep anti-DBH „ab19353“ wurden daraufhin verworfen.

Die beiden anderen getesteten anti-DBH-Antikörper, Millipore rabbit anti-DBH n-terminal und Abcam rabbit anti-DBH „ab43868“, zeigten in Verdünnungen von 1:500 bzw. 1:750 eine deutliche Anfärbung der Zellkörper im Locus coeruleus (Abb. 2.1 bzw. Abb. 2.2), die der Anfärbung durch die TH-Färbung entsprach. Der Antikörper Millipore rabbit anti-DBH n-terminal zeigte zusätzlich, wenn auch schwächer, eine Signalanhebung bei lateral des Locus coeruleus gelegenen, nicht-noradrenergen Neuronen (Pfeil), mithin eine unspezifische Anfärbung. Aus diesem Grund wurde der Antikörper Millipore rabbit anti-DBH n-terminal ebenfalls für die weiteren Experimente verworfen. Verwendet wurde ausschließlich Abcam rabbit anti-DBH „ab43868“.

Die dopaminergen Regionen des Mittelhirns, Substantia nigra und VTA, zeigten keine Signalanhebung. Die Tests erfolgten mit verschiedenen fluoreszierenden Zweitantikörpern.

2 Material und Methoden

pern, die alle dasselbe Ergebnis zeigten: Alexa Fluor®488 goat anti-rabbit (grün), Alexa Fluor®568 goat anti-rabbit (rot), Alexa Fluor®647 goat anti-rabbit (blau dargestellt).

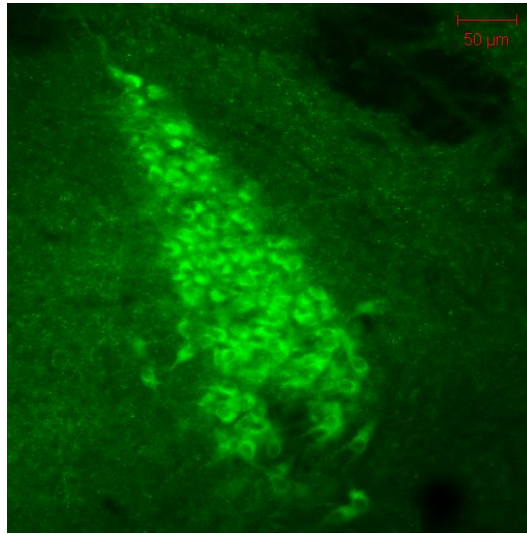


Abbildung 2.1: rechter Locus coeruleus, DBH-Färbung mit Abcam rabbit anti-DBH „ab43868”

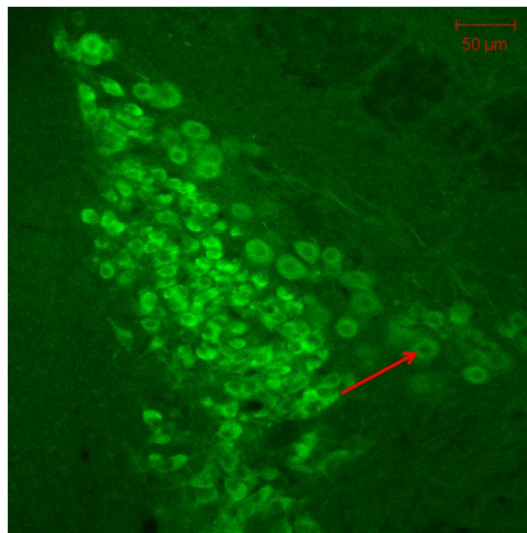


Abbildung 2.2: rechter Locus coeruleus, DBH-Färbung mit Millipore rabbit anti-DBH n-terminal; unspezifische Färbung mit Pfeil markiert

Ein definitiver Test der Spezifität der verwendeten Antikörper erfolgte anhand von DBH-knockout-Gewebe (zur Verfügung gestellt von D. Weinshenker, Emory University, Atlanta, USA). Der Locus coeruleus zeigte in der DBH-Färbung mit Abcam rabbit anti-DBH „ab43868” keine Anfärbung (Abb. 2.3).

2 Material und Methoden

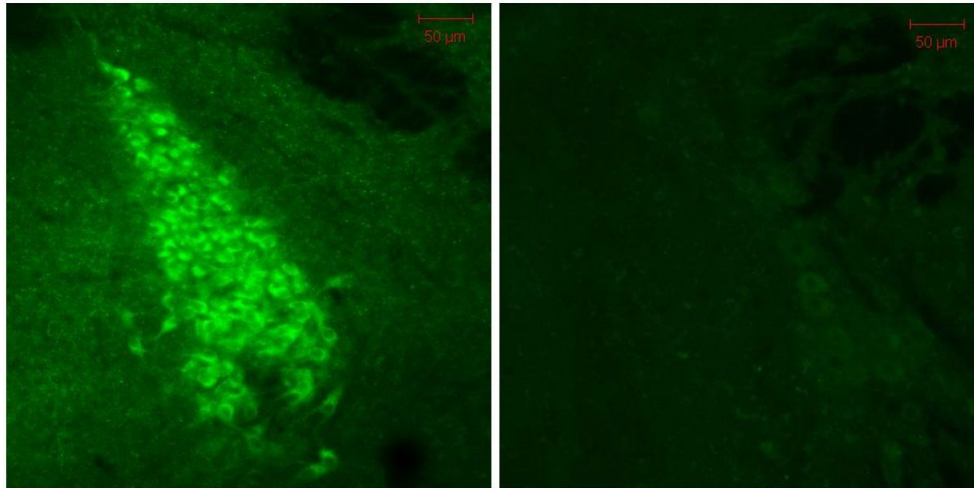


Abbildung 2.3: DBH-Färbung des Locus coeruleus (Abcam rabbit anti-DBH „ab43868“) im Wildtyp (links) und DBH-knock-out (rechts)

Für die TH-Färbung wurde folgender Primärantikörper verwendet:

Antikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Anti-TH	Maus	Millipore	1:2000

2.1.4.2 Sekundäre Antikörper

Folgende Sekundärantikörper wurden verwendet:

Antikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Alexa Fluor®405	Ziege gegen Maus	Invitrogen Molecular Probes	1:750
Alexa Fluor®488	Ziege gegen Kaninchen	Invitrogen Molecular Probes	1:750
Alexa Fluor®568	Ziege gegen Kaninchen	Invitrogen Molecular Probes	1:750
Alexa Fluor®647	Ziege gegen Maus	Invitrogen Molecular Probes	1:750
Alexa Fluor®647	Ziege gegen Kaninchen	Invitrogen Molecular Probes	1:750
Alexa Fluor®647	Ziege gegen Schaf	Invitrogen Molecular Probes	1:750
Streptavidin Alexa Fluor®568		Invitrogen Molecular Probes	1:1000

2.1.4.3 Nissl-Farbstoffe

Für die Nissl-Färbungen der Injektionsstellen wurden folgende Farbstoffe verwendet:

Farbstoff	Hersteller	Verdünnung
NeuroTrace®530/615 red fluoresc. Nissl stain	Invitrogen Molecular Probes	1:100
NeuroTrace®500/525 green fluoresc. Nissl stain	Invitrogen Molecular Probes	1:100

2.1.4.4 Behandlung der Autofluoreszenz mit Kupfersulfat

Aufgrund färbungsunabhängiger, in allen Kanälen sichtbarer, granulärer Signale in verschiedenen Kerngebieten, die als Autofluoreszenz des Gewebes identifiziert werden konnten, wurde ein Protokoll zur Löschung der Autofluoreszenz mit Kupfersulfatlösung etabliert (vgl. Zhang et al., 2010). Nach 15-minütiger Inkubation waren die beschriebenen Signale nicht mehr zu sehen (Abb. 2.4).

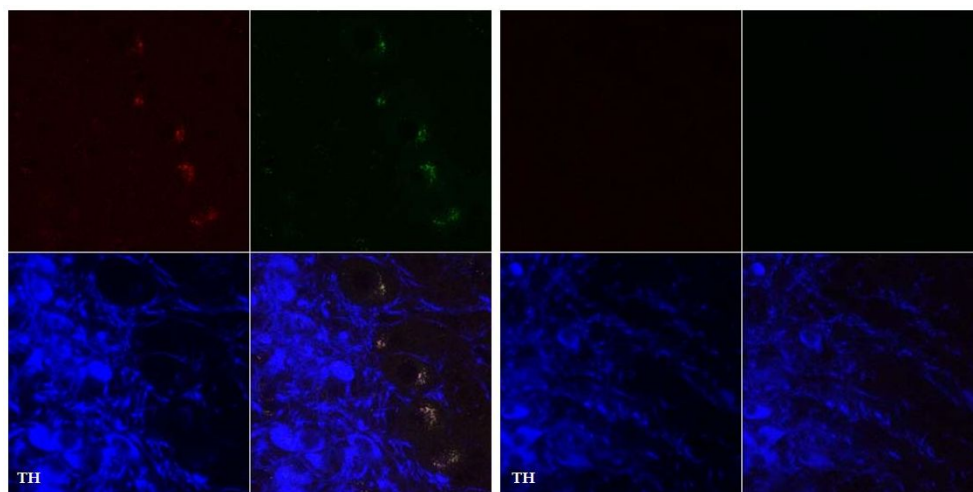


Abbildung 2.4: Autofluoreszenz im Locus coeruleus, ohne (links) und mit (rechts) Kupfersulfat-Bleaching. Konkordante Autofluoreszenz-Signale im (ungefärbten) roten und grünen Kanal, TH-Färbung im blau dargestellten Kanal. Die 15-minütige Behandlung mit Kupfersulfat sorgt für eine vollständige Extinktion der Autofluoreszenz.

2.2 Methoden

2.2.1 Retrogrades Tracing & Mapping

Tracing-Experimente erlauben die präzise anatomische Identifizierung von Faserverbindungen innerhalb des Nervensystems. Grundlage stellt der aktive Transport von Molekülen entlang des Axons der Nervenzelle dar, der sowohl in anterograder – vom Soma

weg, zu den Synapsen hin –, als auch in retrograder – von den Synapsen weg, zum Soma hin – Richtung stattfindet. Vermittelt wird er, im anterograden Fall, durch Proteine der Kinesin-Familie bzw., im retrograden Fall, durch Proteine der Dynein-Familie, die sich jeweils in ATP verbrauchenden Prozessen entlang der Zytoskelettstruktur – den Mikrotubuli – bewegen können und dabei andere Moleküle als „Fracht“ mittransportieren können. Dies macht man sich beim Tracing zu Nutze. Zu unterscheiden sind, analog den Transportformen, anterogrades und retrogrades Tracing. Bei dem in der vorliegenden Arbeit ausschließlich angewandten retrograden Tracing wird die Tracersubstanz in eine von vielen Axonterminalen innervierte Region injiziert, anschließend Endozytose-vermittelt von den dortigen Synapsen aufgenommen, und schließlich über die beschriebenen zelleigenen Mechanismen retrograd zum Soma transportiert. Hierbei können Geschwindigkeiten bis zu 2 cm/d erreicht werden (Köbber et al., 2000). In nachfolgenden histologischen Analysen kann die Tracersubstanz dann im Soma sichtbar gemacht werden; es ist somit eine genaue Identifikation derjenigen Neurone möglich, die in die entsprechende terminale Region der Tracer-Injektion axonal projizieren („Mapping“).

2.2.1.1 Verwendete Tracersubstanz

In der vorliegenden Arbeit wurden als retrograde Tracersubstanz ausschließlich fluoreszierende Latexpartikel (sogenannte Beads) verwendet (Lumafluor corp., Naples, USA). Es handelt sich um Rhodamin-gefüllte Partikel mit einem Durchmesser von 0,02-0,2 μm , die in wässriger Lösung vorliegen. Es wurden Injektionsmengen zwischen 50 nl und 200 nl injiziert. Verwendet wurden primär grün fluoreszierende Latexbeads; im Rahmen von Doppeltracing-Studien war aber auch ein kombinierter Einsatz von grün und rot fluoreszierenden Beads möglich, sodass eventuelle Neurone identifiziert werden konnten, die Axonkollaterale in beide Injektionsgebiete entsenden.

Neben der hohen Effizienz der fluoreszierenden Beads (hohe Anzahl markierter Zellen) liegt ein weiterer Vorteil darin, dass diejenigen Beads, die nicht von Axonterminalen aufgenommen werden, gut abgrenzbar im Injektionsgebiet verbleiben. Es ist somit für jedes Tier möglich, eine exakte Rekonstruktion der Injektionsstelle vorzunehmen und etwaiges unselektives Tracing auszuschließen (s. Abschn. 2.2.1.7).

2.2.1.2 Ablauf des Tracing-Eingriffs

Die Applikation der Tracersubstanz erfolgte unter stereotaktischer Kontrolle am anästhesierten Tier. Eine perioperative Schmerzprophylaxe (beginnend ein Tag präoperativ,

2 Material und Methoden

endend am ersten Folgetag des Eingriffs) mit Paracetamol (Ben-u-ron®-Saft, bene Arzneimittel GmbH, München, 800 µl auf 200 ml Trinkwasser) wurde standardmäßig vorgenommen. Die Tiere wurden am Tag des Eingriffs gewogen, um eine dem Körpergewicht entsprechende Medikation zu gewährleisten. Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Tiere waren 24-26 g schwer. 20 Minuten vor Narkosebeginn erfolgte die intraperitoneale Applikation des Parasympatholytikums Atropin (0,1 mg/kg Körpergewicht; 50 µl einer 50 µg/ml Atropinsulfatlösung (Braun, Melsungen)), um einer Engstellung der Bronchiolen sowie einer Hypersalivation im Rahmen der Anästhesie vorzubeugen. Die Anästhesie der Versuchstiere erfolgte durch Inhalationsnarkose mit Isofluran. Die Tiere wurden zunächst in eine mit Isofluran (3,5%) geflutete Box gesetzt und nach eingesetzter Narkose am Kopf rasiert, desinfiziert (Braunol®, Braun, Melsungen) und in eine stereotaktische Apparatur (David Kopf Instruments, Tujunga, USA) eingespannt. Zur Vermeidung von Unterkühlung wurden die Tiere auf einer beheizbaren Platte platziert. Die Isoflurankonzentration wurde nach Einspannen auf ca. 1,5-2% reduziert. Die Anpassung der Narkosetiefe erfolgte unter stetiger Kontrolle des Vitalparameters der Atemfrequenz. Nach topischer Applikation von Lidocain-Crème (Emla®-Crème, AstraZeneca GmbH, Wedel) und Augensalbe (Vidisc®, Bausch & Lomb GmbH, Berlin) sowie subkutaner Applikation von 500 µl 5%-Glucose-Lösung (Braun, Melsungen) wurden mit einem kurzen rostro-caudalen Schnitt die Schädelnähte Bregma und Lambda freigelegt und anschließend der Schädel in medial-lateral- sowie rostro-caudaler Ebene justiert. Ausgehend von Bregma (Kreuzungspunkt von Sagittal- und Koronarnaht) wurde an den vorher bestimmten stereotaktischen Koordinaten der jeweiligen Injektionsregion (s. Abschnitt 2.2.1.3) ein 600 µm Durchmesser messendes Loch durch die Schädeldecke gebohrt (Bohrer: Twister® Miniature Drill, EDP 32157, # 75, M.A. Ford, Derby, England). Die Schädeldecke wurde mit 400 µm über präfrontalem Cortex sowie dorsalem und ventralem Hippocampus und mit 550 µm über dem Cerebellum bestimmt. Eventuelle Blutungen durch die Bohrung wurden mit chirurgischen Pfeiltupfern (# 501789, WPI, Sarasota, USA) gestillt. Anschließend erfolgte die Injektion der Latexbeads mit einer automatischen Spritze (Spritze: 10 µl NanoFil Syringe, WPI Instruments, Berlin; Pumpe: Micro 4® MicroSyringe Pump Controller, WPI Instruments, Berlin). Die Funktion der Spritze wurde jeweils vor und nach Absenkung in das jeweilige Injektionsareal überprüft. Nach abgeschlossener Injektion und fünfminütiger Wartezeit wurden die Spritze wieder herausgefahren, die Wunde mit Ringer-Lösung gespült (Braun, Melsungen) und der Hautschnitt per Naht verschlossen (Ethicon Nahtmaterial, Ethilon II, EH 7930H 5-0, 45 cm, Ethicon, Norderstedt, D). Die Tiere wurden anschließend auf einem Heizkissen

(Heat solution®), Prism Enterprises, USA) wieder in den Käfig gesetzt; die postoperative Erholung erfolgte in aller Regel innerhalb weniger Stunden.

2.2.1.3 Injektionsareale und Koordinaten

In der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden Hirnareale durch retrogrades Tracing markiert: Präfrontaler Cortex, dorsaler Hippocampus, ventraler Hippocampus, Cerebellum. Die stereotaktischen Koordinaten der Hirnareale wurden hierbei mit Hilfe des Hirnatlas der Maus von Franklin und Paxinos (Franklin & Paxinos, 2007) ermittelt. Ausgehend vom Referenzpunkt Bregma werden sie in medio-lateraler (x-Koordinate) und rostro-caudaler (y-Koordinate) Richtung sowie ausgehend von der Hirnoberfläche in die Tiefe als z-Koordinate angegeben. Die Injektion wurde stets auf der rechten Seite vorgenommen (positive x-Koordinate). Für die caudal von Bregma gelegenen Injektionsstellen (dorsaler Hippocampus, ventraler Hippocampus, Cerebellum) wurde die y-Koordinate zusätzlich an die von Tier zu Tier leicht unterschiedliche Bregma-Lambda-Distanz (BL) angepasst (vgl. Schiemann, 2005). Der Quotient aus tatsächlicher BL und „idealer“ BL von 4,2 mm wurde mit der anhand des Atlas festgelegten y-Koordinate multipliziert, anschließend wurde eine von Injektionsgebiet zu Injektionsgebiet variierende und jeweils experimentell festgelegte Konstante (0,25 mm für dorsalen und ventralen Hippocampus, 0,2 mm für das Cerebellum) addiert.

Die Menge an injizierten Beads betrug für dorsalen und ventralen Hippocampus je 60 nl, für das Cerebellum 50 nl. Im Fall des präfrontalen Cortex wurden – aufgrund der spärlicheren katecholaminergen Innervation – jeweils zwei mal zwei Injektionen à 50 nl vorgenommen, d.h. insgesamt 200 nl injiziert. Die Injektionen erfolgten jeweils in zwei Tiefen (Koordinaten s.u.), einmal am rostralen Rand des Bohrlochs und einmal 100 µm weiter caudal. Folgende Koordinaten, in mm, wurden verwendet:

1. Präfrontaler Cortex:

$$x = 0,27$$

$$y = 2,20$$

$$z = -2,10 \text{ und } -1,60$$

2. Dorsaler Hippocampus:

$$x = 1,25$$

$$y = -2,06$$

$$z = -1,50$$

Der reell verwendete y-Wert lag bei $-2,06 \times \text{BL}/4,2 + 0,25$

3. Ventraler Hippocampus:

$$x = 2,90$$

$$y = -3,08$$

$$z = -4,00$$

Der reell verwendete y-Wert lag bei $-3,08 \times \text{BL}/4,2 + 0,25$

4. Cerebellum:

$$x = 1,50$$

$$y = -6,30$$

$$z = -0,90$$

Der reell verwendete y-Wert lag bei $-6,3 \times \text{BL}/4,2 + 0,2$

2.2.1.4 Gewebefixierung durch intrakardiale Perfusion mit Paraformaldehyd

Nach einer Latenzzeit von rund 3 Wochen, in denen die Beads an den Axonterminalen aufgenommen und retrograd zum Zellsoma im Locus coeruleus transportiert wurden, erfolgte die Tötung der Tiere zur histologischen Aufarbeitung.

Nach terminaler Narkotisierung des Tiers durch intraperitoneale Applikation von 100 μl Natrium-Pentobarbital (Eutha®77, Essex Tierarzney, München, D) und Ausschluss noch vorhandener Schmerzreflexe wurden das Mediastinum frei präpariert und nach Abklemmung der Aorta descendens zunächst 50 μl Heparin-Lösung (Heparin-Natrium-25000, ratiopharm®, Ratiopharm, Ulm) zur Vermeidung thrombembolischer Ereignisse kardial linksventrikulär injiziert. Anschließend erfolgte für sechs Minuten die linksventrikuläre Perfusion mit paraformaldehyd-haltiger, 4 °C kalter Fixierungslösung. Die Perfusion erfolgte unter gleichmäßigem Druck (45 bis 60 ml/min) mit einer über eine Saugflasche verbundenen Schlauchpumpe (Abimed Gilson®Minipuls 3, Langenfeld). Die Fixierung mit Formaldehyd sorgt durch Quervernetzung der Proteine für eine sofortige Unterbrechung der Stoffwechselprozesse und eine Konservierung des Gehirns durch Verhinderung postmortalen Zerfallsprozesse. So kann der augenblickliche Zustand des Gehirns erhalten werden. Anschließend wurde das Gehirn herauspräpariert und über Nacht bei 4 °C in Fixierungslösung gelagert. Am nächsten Tag erfolgte der Wechsel in Aufbewahrungslösung.

2.2.1.5 Anfertigung der Hirnschnitte

Nach Abtrennung der caudal des Locus coeruleus und der rostral des Mittelhirns gelegenen Hirnabschnitte durch koronare Schnitte mittels einer Rasierklinge wurde das Gehirn mit Sekundenkleber auf einer Objektträgerplatte fixiert. Anschließend wurden mit einem Vibratom (VT1000S, Leica, Wetzlar) von dorsaler in ventraler Richtung 60 μm dicke koronare Hirnschnitte von Pons und Mesencephalon angefertigt. Diese wurden in Gläschen mit PBS gesammelt.

2.2.1.6 Histologische Aufarbeitung der Schnitte von Pons und Mittelhirn

Nach gründlichem mehrmaligen Auswaschen (4 x 10 Minuten mit PBS) der Fixierungslösung wurden die Schnitte für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit Blocklösung inkubiert. Diese verhindert ein späteres unspezifisches Binden der Antikörper. Anschließend erfolgte, nach einem weiteren Waschschrift, die Applikation der Primärantikörper (anti-DBH und anti-TH). Diese wurden in der jeweils oben angegebenen Konzentration in Carrierlösung gelöst. Die Inkubation der Hirnschnitte mit den Primärantikörpern in Carrierlösung erfolgte bei Raumtemperatur und über Nacht. Am nächsten Tag wurden nach nochmaligem Auswaschen (4 x 10 Minuten mit PBS) die Sekundärantikörper appliziert. Wiederum wurden sie in der oben jeweils angegebenen Konzentration in Carrierlösung gelöst. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur und über Nacht. Am nächsten Tag erfolgte nach nochmaligem Auswaschen (4 x 10 Minuten mit PBS) für 15 Minuten die Behandlung der Schnitte mit Kupfersulfat-Lösung zur Ausschaltung der Autofluoreszenz (vgl. Abb. 2.4). Nach Auswaschen der Kupfersulfat-Lösung (2 x 10 Minuten mit PBS) wurden die Hirnschnitte auf Objektträger aufgezogen. Die getrockneten Schnitte wurden auf dem Objektträger eingedeckelt (VectaShield®, Vector Laboratories, Burlingame, USA) und mit Nagellack versiegelt. Die Präparate wurden bis zur zeitnahen Auswertung bei 4 °C gelagert.

Im Rahmen des Mappings wurden für einfarbiges Tracing grüne Beads verwendet, die bei der konfokalen Mikroskopie auf einer Wellenlänge von 488 nm angeregt wurden. Der verwendete anti-DBH-Primärantikörper (Abcam rabbit anti-DBH, „ab43868“) wurde mit einem im roten Wellenlängenbereich fluoreszierenden Zweitantikörper (Alexa Fluor®goat anti-rabbit 568) gekoppelt. Auf den in den Abbildungen blau dargestellten Kanal (Wellenlänge 647 nm) wurde die TH-Färbung gelegt; der Primärantikörper (Millipore mouse anti-TH) wurde mit einem Alexa Fluor®goat anti-mouse 647 Zweitantikörper gekoppelt. Für das zweifarbiges Tracing (rote und grüne Beads) im Rahmen

der Doppeltracing-Studien wurde die DBH-Färbung im blauen Kanal (Zweitantikörper Alexa Fluor®goat anti-rabbit 647) und die TH-Färbung im weißen Kanal (Zweitantikörper Alexa Fluor®goat anti-mouse 405) dargestellt.

2.2.1.7 Histologische Aufarbeitung der Injektionsstellen durch Nissl-Färbung

Zusätzlich zur Aufarbeitung von Pons und Mittelhirn zur Darstellung der gelabelten Nervenzellsomata erfolgte die genaue histologische Rekonstruktion der Injektionsstelle zum Nachweis der Selektivität des Tracing-Eingriffs. Zur Hintergrund-Darstellung wurde eine Nissl-Färbung vorgenommen, die durch Bindung an basophile Zellstrukturen wie DNA und RNA für eine unspezifische Anfärbung der Zellkörper sorgt. Zunächst wurden vom Gebiet der Injektionsstelle, soweit dies möglich war, 100 µm dicke Schnitte angefertigt, analog zu dem unter Abschnitt 2.2.1.5 beschriebenen Procedere. Für die Injektionsareale Cerebellum und ventraler Hippocampus war ein Schneiden in 100 µm dicken Schnitten nicht möglich, da – auf coronaren Schnitten – das Cerebellum in unmittelbarer Nachbarschaft des Locus coeruleus bzw. der ventrale Hippocampus in unmittelbarer Nachbarschaft des dopaminergen Mittelhirns liegt. Die beiden Areale wurden somit beim Schneiden von Pons und Mittelhirn in 60 µm dicken Schnitten gleich mit geschnitten. Nach dem Schneiden der Hirnschnitte der Injektionsstelle und 40-minütigem Waschen in PBS erfolgte für 20 Minuten die Inkubation mit dem 1:100 in PBS verdünnten Nissl-Farbstoff. Für das einfarbige (grün fluoreszierende) Tracing im Rahmen des Mappings und der Patch-Clamp-Experimente wurde ein rot fluoreszierender Nissl-Farbstoff verwendet (NeuroTrace®530/615 red fluorescent Nissl stain, Molecular Probes®, Invitrogen, Eugene, USA). Im Falle durch zweifarbiges Tracing (rote und grüne Beads) behandelte Tiere wurde ein grün fluoreszierender Nissl-Farbstoff verwendet (NeuroTrace®500/525 green fluorescent Nissl stain, Molecular Probes®, Invitrogen, Eugene, USA), da mit diesem die Beads beider Farben gut sichtbar sind. Die gefärbten Schnitte wurden anschließend für mindestens zwei Stunden erneut in PBS gewaschen und dann ebenfalls auf Objektträgern eingedeckelt (VectaShield®, Vector Laboratories, Burlingame, USA), mit Nagellack versiegelt und bis zur zeitnahen Auswertung bei 4 °C gelagert. Die Selektivität der Tracing-Experimente wurde am Fluoreszenzmikroskop (BX 61, Olympus, Hamburg) überprüft und mithilfe der Neurolucida®Software dokumentiert (Version 6.0, MFB Bioscience, Magdeburg).

2.2.1.8 Konfokale Mikroskopie und topographische Kartierung

Die Analyse der Immunfluoreszenzfärbungen der Mittelhirn- und Locus-coeruleus-Schnitte erfolgte durch ein konfokales Laser Scanning Mikroskop (Zeiss LSM 510). Die konfokale Mikroskopie ermöglicht eine selektive Darstellung der einzelnen Ebenen des Präparats. Durch die Verwendung mehrerer monochromatischer Laser, die das Präparat nacheinander mit je unterschiedlicher Wellenlänge in der festgelegten Ebene anregen und scannen, können Kolokalisationsstudien durchgeführt werden. Die Bilder werden von einer Software jeweils einzeln und als Überlagerungsbild wiedergegeben, und es ist erkennbar, dass z.B. eine mit grünen Beads markierte Zelle im roten Kanal DBH-positiv ist. Bei Verwendung eines normalen Lichtmikroskops könnte nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass z.B. eine mit Beads markierte, DBH-negative Zelle zufällig genau über einer DBH-positiven Zelle liegt und dadurch fälschlich DBH-positiv scheint.

Für das „Mapping“, d.h. die topographische Kartierung der vier untersuchten efferenten Bahnen des Locus coeruleus (projizierend in den PFC, den dorsalen und ventralen Hippocampus sowie in das Kleinhirn), wurde der LC entlang der dorso-ventralen Achse in fünf gleich breite Schichten unterteilt, und die Anzahl an mit Beads markierten („gelabelten“), d.h. ins jeweilige Injektionsgebiet projizierenden, Zellen insgesamt und in jeder Schicht analysiert. Abb. 2.5 zeigt die Aufteilung des LC im coronaren Schnitt in fünf Schichten von dorsal (Schicht 1) nach ventral (Schicht 5).

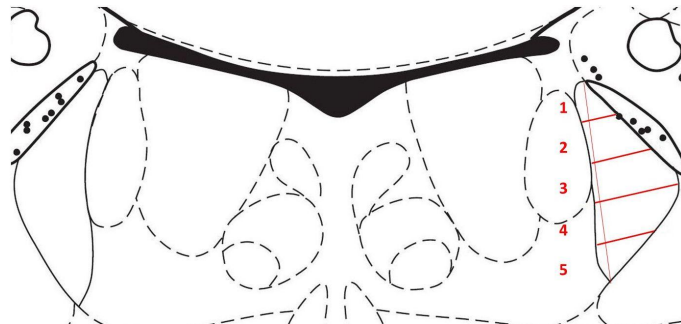


Abbildung 2.5: Schema der Schichtenanalyse. Coronarer Schnitt durch den Pons auf Höhe des LC. Aufteilung des rechten LC in fünf Schichten (rot). Schicht 1 = dorsalste Schicht, Schicht 5 = ventralste Schicht. Rostro-caudale Lokalisation: Bregma -5,4 mm.

2.2.2 Elektrophysiologische Methoden

Mit der sog. Patch-Clamp-Technik wurden elektrophysiologische Analysen einzelner Nervenzellen im Locus coeruleus durchgeführt. In Kombination mit vorangehenden Tracing-Experimenten konnten einzelne Subpopulationen je nach Projektionsareal identifiziert und selektiv „gepatcht“, d.h. elektrophysiologisch untersucht werden.

2.2.2.1 Gewinnung akuter Hirnschnitte von adulten Mäusen

Für die Gewinnung der akuten Hirnschnitte wurden die Tiere zunächst durch intraperitoneale Injektion von 100 μ l einer unverdünnten 1:1-Mischung aus Ketamin und Medetomidin terminal anästhesiert (Ketavet® und Dormitor®, Pfizer GmbH, Berlin). Im areflexiven Stadium erfolgten anschließend nach Freilegung des Mediastinums und intrakardialer Injektion von 50 μ l Heparin-Lösung (Heparin-Natrium-25000, ratiopharm®, Ratiopharm, Ulm) die intrakardiale Perfusion mit eiskalter, zuvor ca. eine Stunde auf -80 °C gekühlter ACSF-Lösung mit Hilfe einer Schlauchpumpe (Ismatech, Zürich, Schweiz) und die Herauspräparation des Gehirns. Die die Injektionsareale des retrograden Tracings enthaltenden Hirnareale wurden anschließend zunächst abgetrennt und in Paraformaldehydlösung fixiert. Der den Locus coeruleus enthaltende Abschnitt wurde auf einer Objektträgerplatte fixiert, mit Hilfe eines Vibratoms (VT1200S, Leica, Wetzlar) wurden 220 μ m dicke Schnitte angefertigt. Die Hirnschnitte wurden anschließend sofort in ein Becherglas mit ACSF-Lösung überführt und dort für 90 Minuten bei 37 °C in mit Carbogen (95% O₂/ 5% CO₂) begaster ACSF-Badlösung und im Folgenden bis zu Messbeginn bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.2.2 Die Patch-Clamp-Technik

Die von Erwin Neher und Bert Sakmann in den siebziger Jahren in Göttingen entwickelte Patch-Clamp-Methode – zu deutsch etwa „Membranfleck-Klemme“ – erlaubt es, Ströme über Zell-Membranen mit einer sehr hohen Signalauflösung zu erfassen. Hierzu wird eine stumpfe Glaspipette, in der sich eine leitende Flüssigkeit und eine Messelektrode befinden, unter mikroskopischer Kontrolle an eine Zelle im Hirnschnitt herangeführt. Durch leichtes Ansaugen kann es gelingen, einen überaus dichten Kontakt zwischen Pipette und Zellmembran herzustellen, der Widerstände im Bereich eines Giga-Ohms ($10^9 \Omega$) und mehr aufweist – der sog. *Gigaseal*. Die hohe Abdichtung kann wirkungsvoll Leckströme und damit das elektrische Hintergrundrauschen reduzieren, wodurch die beschriebene hohe Signalauflösung – im pA-Bereich – möglich wird.

2.2.2.2.1 Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik

Abbildung 2.6 zeigt mögliche Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik. Es existieren vier Grundkonfigurationen mit jeweils unterschiedlichen Möglichkeiten zur Messung der Elektrophysiologie der Zelle.

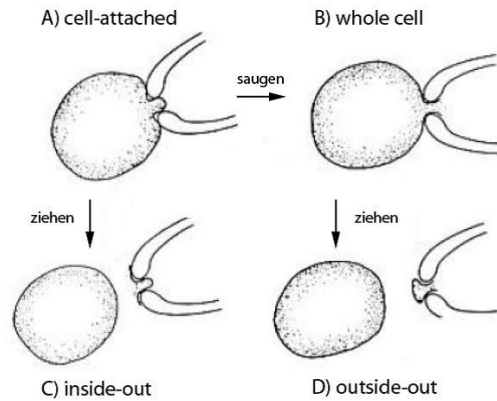


Abbildung 2.6: Die unterschiedlichen Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik (Abbildung aus: Hille, 2001).

Ausgangspunkt ist die **cell-attached-Konfiguration (A)**, auch *on-cell*-Konfiguration genannt, die man wie beschrieben durch Aufsetzen der Pipette auf die Zelle und leichtes Ansaugen erreicht. Die *cell-attached*-Konfiguration erlaubt ein „Beobachten“ der Zelle in ihrem unveränderten physiologischen Milieu: Es besteht kein Kontakt zwischen dem Zellinneren und dem Inneren der Pipette, sodass intrazelluläre Proteine oder zweite Botenstoffe nicht „ausgewaschen“ werden. Der *cell-attached*-Modus erfasst ausschließlich Ströme, die das kleine Membranstück unter der Pipette passieren.

Ausgehend von der *cell-attached*-Konfiguration kann durch einen kurzen Saugimpuls die Zelle geöffnet und damit die **whole-cell-Konfiguration (B)** erreicht werden. Das Zellinnere steht hierbei in Kontakt mit der Pipettenflüssigkeit, sodass es bei zunehmender Messdauer zu einer Vermischung (d.h. bei den gegebenen Mengenverhältnissen zu einem Austausch von Intrazellularflüssigkeit durch Pipettenlösung und damit zu einem Auswaschen kleinerer Proteine und Moleküle) kommt. Die Pipettenlösung sollte also möglichst der Intrazellularlösung entsprechen. Im *whole-cell*-Modus wird der Strom über die gesamte Zellmembran erfasst. Im *current-clamp* („Stromklemme“) kann eine Manipulation des Stromflusses über die Zellmembran erfolgen, und die elektrophysiologische Reaktion der Zelle untersucht werden. Der *voltage-clamp* („Spannungsklemme“) erlaubt, ebenfalls über eine Strominjektion, das Einstellen definierter Membranpotentiale und die Analyse der zellulären Stromantwort.

Bewegt man, ebenfalls ausgehend von der *cell-attached*-Konfiguration, die Pipette vorsichtig von der Zelle weg, so bleibt an der Pipettenspitze ein Membranfleck haften, wobei das Zellinnere nun nach außen zeigt – die sog. ***inside-out*-Konfiguration (C)**. Diese erlaubt das isolierte Untersuchen kleinerer Membranflecken, bis hin zur Einzelkanalauflösung; verglichen mit der *whole-cell*-Konfiguration sind nur wenige Ionenkanäle in dem betreffenden Membranstück enthalten.

Gleiches gilt für die ***outside-out*-Konfiguration (D)**, die ausgehend vom *whole-cell*-Modus durch vorsichtiges Zurückziehen der Pipette erreicht wird. Die ursprünglich zytosolische Seite des Membranflecks schließt sich zur Pipettenlösung hin. Die Verteilung von Innen und Außen bleibt somit gewahrt, und die *outside-out*-Konfiguration erlaubt – insbesondere, wenn der Zellkern mit herausgesogen wird, beim sog. *Nucleated-outside-out* – die Untersuchung einer nahezu idealtypisch kugelrunden Zelle unter Umgehung des Space-Clamp-Problems (hoher Spannungsabfall bei stark verzweigten Neuronen an den distalen Ausläufern der Fortsätze).

In der vorliegenden Arbeit wurden sämtliche Patch-Clamp-Messungen im *whole-cell*-Modus durchgeführt.

2.2.2.2 Selektives Patchen von Zellpopulationen nach Projektionsareal durch vorangehendes retrogrades Tracing

Das selektive Patchen von Subpopulationen des Locus coeruleus wurde möglich durch die vorangehende Injektion fluoreszierender Beads in die jeweilige Zielregion, die nach Injektion retrograd in die Somata der entsprechenden LC-Zellen transportiert wurden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Population der in den PFC projizierenden LC-Neurone und die Population der in den ventralen Hippocampus projizierenden LC-Neurone untersucht (coeruleo-präfrontale bzw. coeruleo-hippocampale Zellen). Abb. 2.7 zeigt das Patchen einer mit Beads gefüllten Zelle und die nachfolgende histologische Analyse.

2.2.2.3 Aufbau des Patch-Clamp-Messstandes

Der Messstand für die elektrophysiologischen Patch-Clamp-Messungen (s. Abb. 2.8) bestand aus den nachfolgend aufgeführten Komponenten.

Zur elektrischen Abschirmung war der Messplatz von einem Faraday-Käfig umgeben. Die gesamte Apparatur stand auf einem schwingungsgedämpften Tisch (Newport GmbH, Darmstadt). Die Begutachtung des Hirnschnittpräparats erfolgte durch ein inverses Mikroskop (Axioskop 2 FS plus®, Zeiss, Göttingen), das mit einem vierfach Objektiv (Achroplan 4x/ 0,10, Zeiss, Göttingen) und einem vierzigfach Wasserimmersionsobjek-

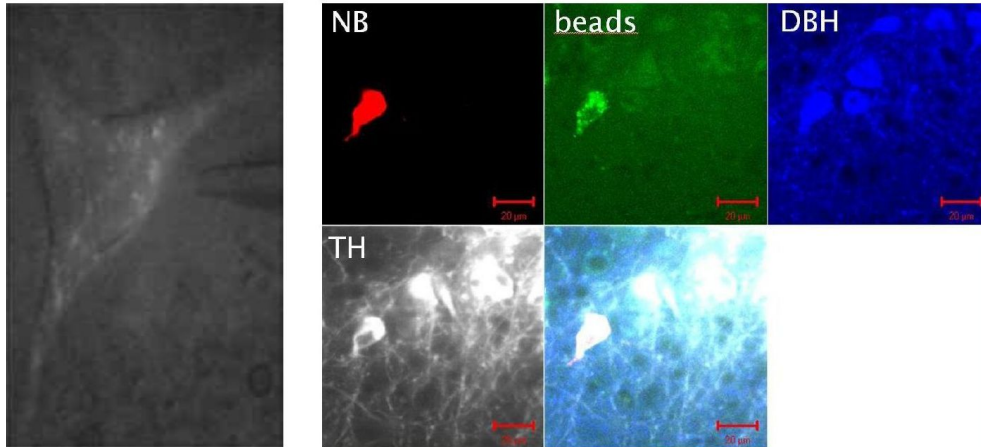


Abbildung 2.7: Links: Annäherung der Patch-Pipette an eine mit Beads gefüllte, „gelabelte“ Zelle. Die Fluoreszenzanregung wurde immer nur kurz angeschaltet, um ein Ausbleichen der Beads und etwaige phototoxische Reaktionen zu minimieren. (Abbildung aus: Liss et al., 2005.) Rechts: Histologische Aufarbeitung eines Patch-Schnittes. Man sieht mehrere DBH- und TH-positive LC-Zellen (blau bzw. weiß), eine Zelle ist mit Beads gefüllt (grün) und wurde gepatcht, und dabei mit Neurobiotin gefüllt (rot). Scale-Bar = 20 µm. (Eigene Abbildung.)

tiv (Achromplan 40x/ 0,80 E Ph 2, Zeiss, Göttingen) ausgestattet war. Bei Verwendung des Wasserimmersionsobjektivs wurde zusätzlich ein Kontrastverstärker (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan) zur besseren Darstellung der Zellstruktur verwendet. Über eine Infrarotkamera (Newvicon C2400®, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan) konnten die Hirnschnittpräparate auf einem Videomonitor (Panasonic Video Monitor WV-BM1410, Kadoma City, Osaka, Japan) dargestellt werden. Die Navigation von Pipette und Elektrode in X-, Y- und Z-Richtung erfolgte mit einem Mikromanipulator (Mini 25®, Luigs und Neumann GmbH, Ratingen). Zur Identifizierung der fluoreszierenden Latexbeads unter dem Mikroskop wurden diese mit einer Fluoreszenzlampe (FluoArc®, Leistungselektronik, Jena) angeregt. Die beheizbare Badkammer wurde mittels einer Kontrolleinheit (Badkontroller V, Luigs und Neumann GmbH, Ratingen) konstant bei 37 °C gehalten. Das Hirnschnittpräparat wurde permanent von carbogenisierter ACSF-Badlösung umspült; der Zu- und Abfluss erfolgte bei einer Flussrate von 2-5 ml/min über eine Zwei-Wege-Pumpe (Ismatec, Zürich, Schweiz).

2.2.2.2.4 Funktionsprinzip des Patch-Clamp-Verstärkers

Der Patch-Clamp-Verstärker besteht aus einem Vorverstärker (dem sog. *headstage*), der



Abbildung 2.8: Der Elektrophysiologische Messstand. Links Mikroskop auf schwingungs-
gedämpftem Tisch mit Badkammer, Mikromanipulator und Lichtquelle;
rechts Steuerungseinheit für Mikromanipulator, Kontrastverstärker und
Licht, Bildschirm für die Mikroskopausgabe und PC zur Datenerfassung.

Stromsignal und Spannung misst, und einem nachgeschalteten Hauptverstärker, der das Signal verstärkt und filtert. Abb. 2.9 zeigt schematisch die Verschaltung des Vorverstärkers.

In der Pipette befindet sich die Messelektrode, die mit dem Vorverstärker verbunden ist. Die Spannungsdifferenz zwischen Messelektrode und Badelektrode entspricht der Membranspannung der Zelle U_m . Diese wird dem negativen Eingang eines Operationsverstärkers (*operational amplifier*, OPA1) übermittelt, der sie mit der Sollspannung U_{soll} am positiven Eingang abgleicht. Es entsteht am Ausgang des OPA1 (am spitzen Ende im Schema) eine Spannung, die proportional ist zur Spannungsdifferenz zwischen U_m und U_{soll} . Dies bewirkt einen Stromfluss über den Rückkopplungswiderstand R_f , der aufgrund des hohen Eingangswiderstands des OPA1 nur in die Elektrode fließen kann. Dieser Strom wird so lange fließen, bis die Differenz zwischen U_m und U_{soll} null ist; da dieser Vorgang sehr schnell abläuft, entspricht U_m nahezu zu jedem Zeitpunkt dem Kommandopotential U_{soll} . Der aufgebrachte Kompensationsstrom kann am zweiten Operationsverstärker OPA2 ermittelt und über einen Analog-Digital-Wandler an einen Computer weitergeleitet werden.

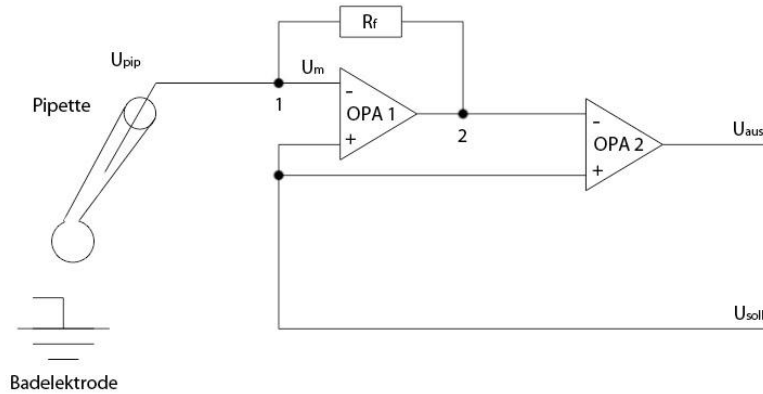


Abbildung 2.9: Schematisches Schaltbild eines Vorverstärkers. Im *voltage clamp* wird U_{soll} vorgegeben; OPA1 vergleicht U_{soll} mit der tatsächlichen Membranspannung U_m und R_f erzeugt eine Strominjektion, um die Differenz auszugleichen. Der Kompensationsstrom wird von OPA2 gemessen. (Abbildung aus: Numberger & Draguhn, 1996.)

Heat	variabel	Delay Pull 1 t(F1)	090
Force F(TH)	018	Force Pull 1 F1	140
Distance s(TH)	010	Distance Pull 2 s(F2)	000
Delay Heatstop t(H)	030	Force Pull 2 F2	145
Distance Heatstop s(H)	000	Adjust AD	045

Tabelle 2.1: Das verwendete Programm P10 des DMZ-Universal Puller.

2.2.2.2.5 Pipetten und Elektroden

Als Patchpipette wurden Glaspipetten verwendet, die über einen Pipettenhalter direkt am Vorverstärker befestigt waren. Sie wurden unmittelbar vor dem Gebrauch aus Borosilicatglaskapillaren (GC150TF-10, Harvard Apparatur LTD, Kent, UK) mit einem temperaturkontrollierten, horizontal ziehenden Pipettenziehgerät (DMZ-Universal Puller, Zeitz, Martinsried) in zwei Schritten hergestellt. Die verwendeten Parameter sind in Tab. 2.1 angegeben. Die einzustellende Hitze wurde an jedem Versuchstag empirisch ermittelt, da das Heizfilament je nach Gebrauchsdauer und Umgebungstemperatur Schwankungen unterliegt; die Temperatur wurde so eingestellt, dass sich ein konstanter Pipettenwiderstand zwischen 5 und 6 M Ω ergab.

Als Mess- bzw. Badelektrode kamen chlorierte Silberdrähte zum Einsatz. Zur Minimierung sog. Offset-Potentiale – artifizielle Spannungen, die an den Übergängen zwischen

Silberdraht, Pipettenlösung und Badlösung entstehen – wurden die Silberdrähte regelmäßig neu chloriert.

2.2.2.2.6 Korrekturstellungen und Kompensation

Die elektrische Kapazität C eines Objekts ist diejenige Ladungsmenge Q , die benötigt wird, um das Objekt mit einer vorgegebenen Spannung U zu versehen: $C = Q/V$. Bei jeder Änderung der Spannung an der Zellmembran fließen für kurze Zeit kapazitive Ströme; diese exponentiellen Ströme, die zu Beginn und Ende eines Testpulses sichtbar werden, können die Messung verfälschen und werden deshalb im Vorverstärker elektronisch kompensiert. Dabei ist die Komponente C_{fast} von der Komponente C_{slow} zu unterscheiden. C_{fast} kompensiert diejenigen kapazitiven Ströme die im cell-attached-Modus, nach Ausbildung des Gigaseals, sichtbar werden, d.h. diejenigen Ströme, die von der Umladung des kleinen Membranflecks unter der Pipettenspitze herrühren. C_{slow} hingegen kompensiert diejenigen Ströme, die beim Öffnen der Zelle (beim Übergang in den whole-cell-Modus) durch die Umladung der gesamten Fläche der Zellmembran anfallen.

Der Serienwiderstand R_s ist derjenige Widerstand, der in Serie zwischen der Zellmembran und dem Verstärkereingang liegt. Im Idealfall entspricht er also dem Öffnungswiderstand der Pipette. Allerdings ist R_s in der Praxis zumeist mindestens doppelt so groß, da beim Öffnen der Zelle kleine Membranstücke oder sogar ganze Zellorganellen in die Pipettenöffnung gesogen werden können, die den Widerstand vergrößern. Durch das sog. *Resealing* – die gegenseitige Annäherung der Membranränder während einer Messung – kann R_s ebenfalls zunehmen. Ist der Serienwiderstand sehr groß, fällt ein Teil der Kommandospannung U_{soll} an ihm ab, und an der Zelle liegt nur ein Bruchteil von U_{soll} an. Auch die Umladungsprozesse werden durch einen hohen Serienwiderstand verfälscht; eine Stromänderung kommt zeitverzögert im Verstärker an, und der entgegengerichtete Strom ebenso verzögert in der Zelle. Aus diesen Gründen ist in den Verstärker ein automatischer Kompensationsmechanismus für R_s integriert: Zur vorgegebenen Kommandospannung wird eine Spannung addiert, die proportional zum injizierten Strom ist und so den Spannungsabfall an R_s zumindest teilweise ausgleicht (zu 100% kann der Abfall aufgrund positiver Rückkopplungseffekte nicht ausgeglichen werden).

2.2.2.2.7 Durchführung der Patch-Clamp-Messungen

Nach Ablauf der Inkubationszeit von 90 Minuten wurde das jeweilige Hirnschnittpräparat in die Badkammer überführt und mit einem Gitter fixiert. Der ACSF-Badlösung wurden synaptische Blocker zugesetzt, um die intrinsischen Eigenschaften der Zelle un-

abhängig von synaptischen Eingängen untersuchen zu können. CNQX (10 μM) und DL-AP5 (50 μM) blockierten, als Antagonisten am AMPA/Kainat- bzw. NMDA-Rezeptor, glutamaterge synaptische Eingänge, Gabazine (4 μM), als GABA_A-Antagonist, GABAerge Eingänge. Für die Experimente zur Evaluierung des Autorezeptor-Tonus wurde für die α_2 -Autorezeptor-Blockade Yohimbin (10 μM) verwendet. Alle Blockersubstanzen stammten von Tocris Cookson, Ellisville, USA. Zunächst wurde mit dem 4x-Objektiv eine Übersicht über den Schnitt gewonnen, und der Locus coeruleus zentriert. Mit einem leichten Überdruck (um ein Verstopfen der Pipette sowie ein Vermischen von Pipetten- und Badlösung zu verhindern) wurde die Pipette in das Bad eingetaucht, und durch wiederholtes Anlegen eines rechteckförmigen Testpulses (Spannungspuls) und Registrierung der Stromantwort über das Ohm'sche Gesetz der jeweilige Widerstand der verwendeten Pipette ermittelt (5 - 6 M Ω). Die Pipette wurde mit Hilfe des Mikromanipulators an eine mit Beads gefüllte („gelabelte“) Locus-coeruleus-Zelle herangefahren. Bei der Annäherung der Pipette an die Zelle wird die Stromantwort auf den Testpuls immer kleiner, der Serienwiderstand steigt. In unmittelbarer Nähe zur Zielzelle wurde das Offset-Potential korrigiert. Durch Anlegen eines Unterdrucks kam es zur Ausbildung des Gigaseals, und die Stromantwort wurde nahezu null, d.h. eine waagerechte Linie. Nach Kompensation der schnellen kapazitiven Ströme konnte die Zelle bei -50 mV (nahe ihres physiologischen „Ruhepotentials“ zwischen zwei Spikes) geklemmt und durch einen erneuten kurzen Saugimpuls geöffnet werden. Wiederum wurden die kapazitiven Artefakte kompensiert. Vom *voltage clamp* wurde nun in den *current clamp* gewechselt, und die Messungen (s.u.) konnten durchgeführt werden. Durch den Austausch von Pipetten- und Intrazellulärflüssigkeit kam es zu einer Anreicherung von Neurobiotin in den gemessenen Zellen, die nach entsprechenden Färbungen (vgl. Abschn. 2.2.2.3) eine spätere Identifizierung der Zellen unter dem Mikroskop erlaubte. Nach Abschluss der Messungen wurde die Pipette langsam von der Zelle weg bewegt, damit diese sich ordnungsgemäß schließen konnte. Evtl. konnten nun weitere Zellen im selben Hirnschnittpräparat „gepatcht“ werden; anschließend wurde das Hirnschnittpräparat in ein Schnappdeckelglas mit PFA überführt, und bei 4 °C über Nacht fixiert.

2.2.2.2.8 Verwendete Protokolle im *current clamp*-Modus

In der vorliegenden Arbeit wurden zur elektrophysiologischen Grundcharakterisierung der Neurone im Locus coeruleus ausschließlich Protokolle im *current clamp* verwendet.

Nach Öffnen der Zelle im *voltage clamp* wurde in den *current clamp* gewechselt, und zunächst bei einer Strominjektion von 0 pA die Spontanaktivität der Zelle aufgezeichnet.

Die Neurone des Locus coeruleus sind aufgrund intrinsischer Schrittmacheraktivitäten unabhängig von synaptischen Eingängen mit einer Frequenz von wenigen Hertz spontan aktiv. Die Registrierung der Daten erfolgte kontinuierlich, in einem Zeitfenster von jeweils zehn Sekunden pro Datenspur. Zudem erfolgte die Aufzeichnung der einzelnen Aktionspotentiale in höherer zeitlicher Auflösung (20 kHz), in einem Zeitfenster von jeweils 500 Millisekunden, um Parameter wie Aktionspotentialbreite, Nachhyperpolarisation oder den Threshold des Aktionspotentials bestimmen zu können.

Anschließend wurden je ein Hyperpolarisations- und ein Depolarisationsprotokoll gefahren (Abb. 2.10). Beim Hyperpolarisationsprotokoll (A) wurden über eine Zeitspanne von je zwei Sekunden hyperpolarisierende Ströme injiziert. Die Hyperpolarisation wurde schrittweise um -25 pA gesteigert, bis zum Erreichen der Schwelle von -80 mV Membranpotential Spannungsantwort der Zelle. Hierdurch konnte der Rebound Delay einer Zelle – der zeitliche Verzug nach einer Hyperpolarisation bis zum nächsten Aktionspotential – analysiert werden. Beim Depolarisationsprotokoll (B) wurden, ausgehend von einer Strominjektion, die die Zelle bei ca. -60 mV Membranpotential klemmte, schrittweise für je eine Sekunde depolarisierende Ströme injiziert (Schrittgröße 50 pA). Bei Eintritt eines Depolarisationsblocks wurde die Aufzeichnung gestoppt. Dies erlaubte eine Auswertung der maximalen Feuerungsfrequenz der Nervenzelle, sowie weiterer Parameter.

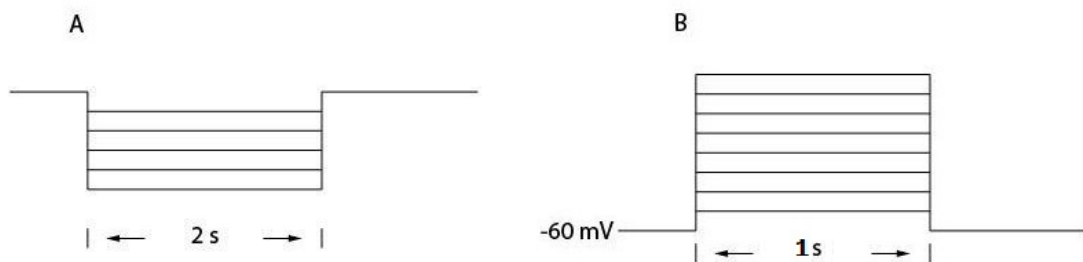


Abbildung 2.10: Hyperpolarisations- und Depolarisationsprotokoll im *current clamp*.

2.2.2.2.9 Auswertung der Patch-Clamp-Messungen

Die Auswertung und Darstellung der elektrophysiologischen Daten erfolgte mit Hilfe der Programme Fitmaster (Version 2x65; Heka Elektronik, Lambrecht), IgorPro (Version 6.0.2.4; WaveMetrics, Lake Oswego, USA) und NeuroMatic (Version 2.0; Jason Rothman, London). Es wurden nur Zellen für die Auswertung berücksichtigt, die eine regelmäßige, kontinuierliche Spontanaktivität zeigten.

Die spontane Feuerungsrate der gemessenen Neurone wurde als Durchschnittswert der kontinuierlich aufgezeichneten Datenspuren ermittelt. Hochaufgelöste Aktionspotentiale

wurden hinsichtlich der Parameter Breite des Aktionspotentials, Schwellenpotential (sog. Threshold; definiert als Punkt, an dem die Steigung 50 mV/ms überschreitet), Maximum und Minimum (Nachhyperpolarisation) analysiert und jeweils die Mittelwerte der einzelnen Parameter einer Zelle angegeben (vgl. Abb. 2.11). Als Ausschlusskriterium wurde ein Maximum von mindestens 10 mV festgesetzt; Zellen, deren Aktionspotentiale geringere Maxima aufwiesen, wurden für die Auswertung nicht berücksichtigt. Der *Rebound Delay* wurde definiert als Zeit zwischen dem Ende der hyperpolarisierenden Strominjektion, die die Zelle auf -80 mV hyperpolarisierte, und dem Peak des ersten Aktionspotentials. Die Maximalfrequenz der Neurone wurde, unmittelbar vor dem Depolarisationsblock, aus dem Intervall zwischen zwei aufeinanderfolgenden Aktionspotentialen (*interspike interval*, ISI) berechnet. Für die Analyse der frequency-current-plots wurde die Steigung zwischen dem ersten Depolarisationsschritt (50 pA) und demjenigen Schritt, bei dem der Depolarisationsblock eintrat, bestimmt. Trat kein Depolarisationsblock ein, wurde Schritt 15 (750 pA) genommen. Ebenfalls im Depolarisationsprotokoll bestimmt wurde der sog. „Haltestrom“, der nötig war, um die jeweilige Zelle auf ein Potential von -60 mV zu bringen (das Potential, von dem aus die Depolarisationsschritte gestartet wurden).

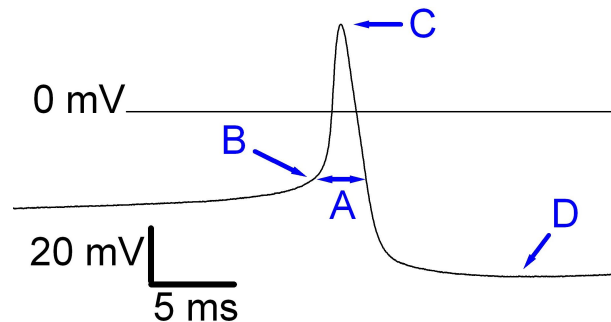


Abbildung 2.11: Aktionspotential einer beispielhaften (in den PFC projizierenden) LC-Zelle. Gekennzeichnet sind: Breite des Aktionspotentials auf Höhe des Threshold (A), Schwellenpotential = Threshold (B), Maximum (C) und Minimum = Nachhyperpolarisation (D).

Die Darstellung und statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism (Version 5.0; GraphPad Software, La Jolla, USA). Die einzelnen Parameter der beiden Gruppen – coeruleo-präfrontale und coeruleo-hippocampale Neurone – wurden jeweils mit einem T-Test mit Welch-Korrektur miteinander verglichen. Als Signifikanzniveaustufen definiert wurden $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) .

2.2.2.3 Histologische Aufarbeitung der Injektionsstellen und der Patchschnitte, konfokale Mikroskopie

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Populationen noradrenerger Neurone im Locus coeruleus elektrophysiologisch untersucht; solche, die in den präfrontalen Cortex, und solche, die in den ventralen Hippocampus projizieren (coeruleo-präfrontale bzw. coeruleo-hippocampale Neurone).

Die Aufarbeitung der 220 μm dicken Patchschnitte erfolgte analog zur Färbung der Hirnschnitte im Rahmen des Mappings (vgl. Abschn. 2.2.1.6). Aufgrund der größeren Schnittdicke wurde die Inkubationszeit der Blocklösung auf drei Stunden verlängert. Wie beschrieben wurden die gemessenen Zellen während der Messung mit Neurobiotin gefüllt, in Koppelung mit Streptavidin-568 konnten sie so rot angefärbt werden. Die verwendeten Beads waren im grünen Kanal darstellbar. Die DBH-Färbung konnte auf den blauen (mithilfe eines auf 647 nm Wellenlänge fluoreszierenden Zweitantikörpers) und die TH-Färbung auf den weißen Kanal (mithilfe eines auf 405 nm Wellenlänge fluoreszierenden Zweitantikörpers) gelegt werden. Vgl. Abb. 2.7, rechter Teil. Der mikroskopische Nachweis der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte analog zur Mikroskopie im Rahmen des Mappings am konfokalen Mikroskop (Zeiss LSM 510).

Die histologische Aufarbeitung der Injektionsstellen in PFC und Hippocampus erfolgte ebenfalls analog zur Aufarbeitung im Rahmen des Mappings (vgl. Abschn. 2.2.1.7). Sowohl für den PFC als auch für den V.HC wurde eine Schnittdicke von 100 μm gewählt. Da das Tracing mit grün fluoreszierenden Beads erfolgte, wurden die Injektionsstellen mit Nissl-rot gefärbt. Mikroskopischer Nachweis und Dokumentation der Injektionsstellen erfolgten am Fluoreszenzmikroskop (BX 61, Olympus, Hamburg) und mithilfe der NeuroLucida® Software (Version 6.0, MFB Bioscience, Magdeburg).

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Tracing-Experimente

Die Axonterminalen des Locus coeruleus innervieren weite Teile des ZNS und stellen die hauptsächliche, wenn auch nicht einzige, Quelle für das zentrale Noradrenalin dar (Berridge & Waterhouse, 2003; Sara, 2009). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Tracing-Experimente mit retrograd transportierten Latexbeads belegen eine dichte Versorgung aller untersuchten terminalen Areale (Präfrontaler Cortex, dorsaler Hippocampus, ventraler Hippocampus, Cerebellum) durch den Locus coeruleus.

3.1.1 Neuroanatomische Rekonstruktion der Injektionsareale

Für eine präzise neuroanatomische Rekonstruktion axonaler Projektionen durch retrogrades Tracing ist eine hohe Selektivität bei der Injektion der Latexbeads nötig, um eine Kontamination benachbarter Hirnareale (und damit falsch-positiv markierte Zellen) zu vermeiden. Zur Demonstration der Selektivität der vorgenommenen Injektionen wurde für die vorliegende Arbeit zu jedem der vier Injektionsareale die Injektionsstelle in einer Schnittserie neuroanatomisch rekonstruiert. Für alle nachfolgenden neuroanatomischen und elektrophysiologischen Untersuchungen wurden ausschließlich Tiere verwendet, bei denen die Selektivität der Injektion anhand einer solchen Schnittserie nachgewiesen werden konnte.

Die Schnittserien (Abb. 3.1 und Abb. 3.2) zeigen jeweils fluoreszenzmikroskopische Fotos der Injektionsstelle für ein exemplarisches Tier. Die PFC- und Hippocampus-Schnitte wurden mit Nissl-rot gefärbt (vgl. Abschn. 2.2.1.7); die cerebellären Schnitte, aufgrund der gleichzeitigen Mit-Färbung des benachbarten Locus coeruleus, mit dem normalen TH/DBH-Protokoll (vgl. Abschn. 2.2.1.6).

Abb. 3.3 zeigt zur besseren topografischen Einordnung für jede der vier Injektionsstellen jeweils einen 100 μm dicken Schnitt (Cerebellum: 60 μm dicker Schnitt) zusammen mit einer schematischen Darstellung aus dem Mouse Brain Atlas.

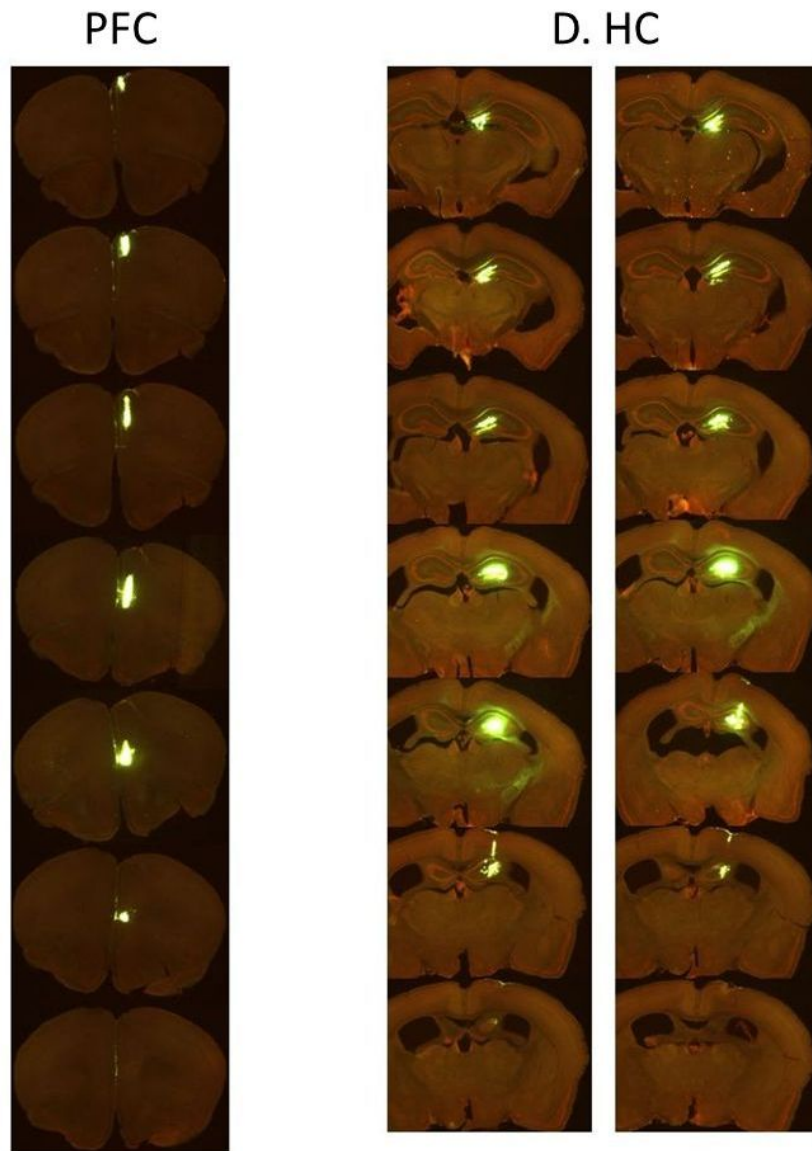


Abbildung 3.1: Histologische Aufarbeitung der Injektionsstellen Präfrontaler Cortex (links; von rostral nach caudal) und dorsaler Hippocampus (rechts; von caudal nach rostral). Färbung mit Nissl-rot. Schnittdicke = 100 μm .

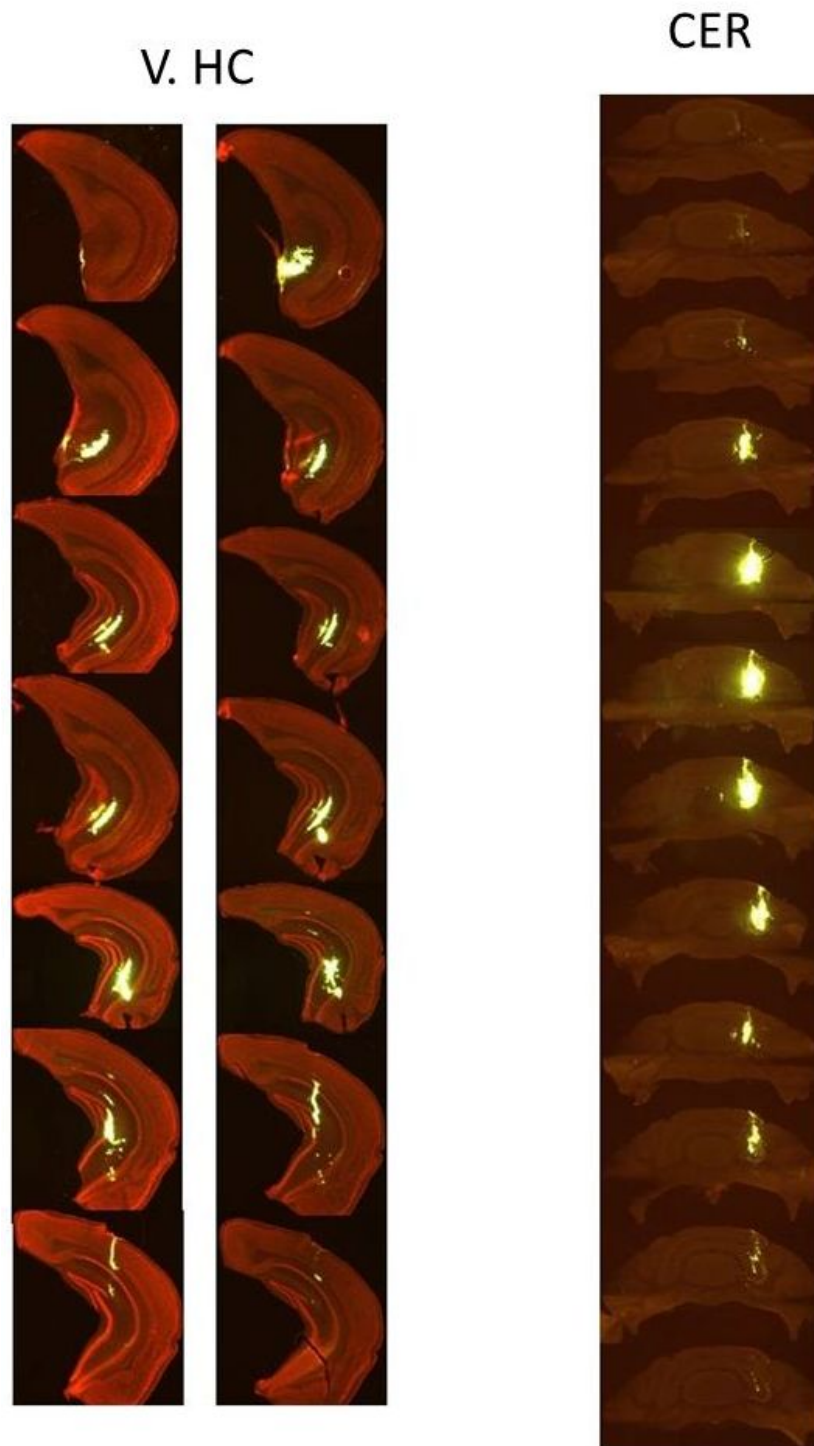


Abbildung 3.2: Histologische Aufarbeitung der Injektionsstellen ventraler Hippocampus (links) und Cerebellum (rechts); von caudal nach rostral. Färbung mit Nissl-rot bzw. TH-/DBH-Hintergrund-Färbung. Schnittdicke = 100 μm bzw. 60 μm .

3 Ergebnisse

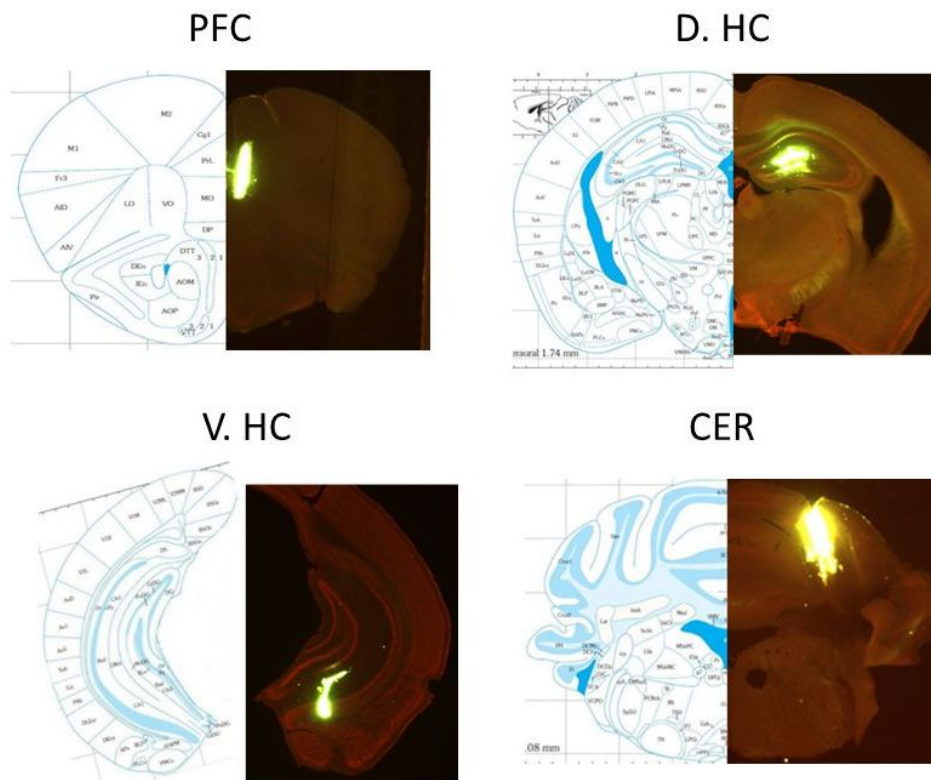


Abbildung 3.3: Nissl-rot-Färbung (jeweils rechte Bildhälfte) und schematische Atlas-Darstellung (linke Bildhälfte) der vier Injektionsstellen PFC, D.HC, V.HC und CER. Atlas-Bilder aus: Franklin & Paxinos, 2007.

3.1.2 Topographie retrograd markierter Zellen im Locus coeruleus

Für das Mapping, d.h. die topographische Kartierung der Ursprungsgebiete im Locus coeruleus, wurden die pontinen Schnitte auf gelabelte (also somit ins jeweilige Injektionsgebiet projizierende) Zellen hin untersucht. Die kommenden Abbildungen zeigen Anfärbungen des Locus coeruleus für die verschiedenen Injektionsstellen für jeweils ein exemplarisches Tier. Für alle Injektionsorte zeigte sich eine Verteilung gelabelter Zellen entlang der gesamten rostro-caudalen Achse des Locus coeruleus.

Die Stückzahlen der für die neuroanatomischen Analysen verwendeten Tiere betragen für den Präfrontalen Cortex N=4, für den dorsalen Hippocampus N=4, für den ventralen Hippocampus N=3 und für das Cerebellum N=3.

3.1.2.1 Tracing des Präfrontalen Cortex

Abb. 3.4 zeigt zwei histologisch aufgearbeitete Schnitte durch den ipsilateralen Locus coeruleus in präfrontal „getraceten“ Tieren, drei Wochen nach Injektion, einmal in 20x und einmal in 40x Vergrößerung.

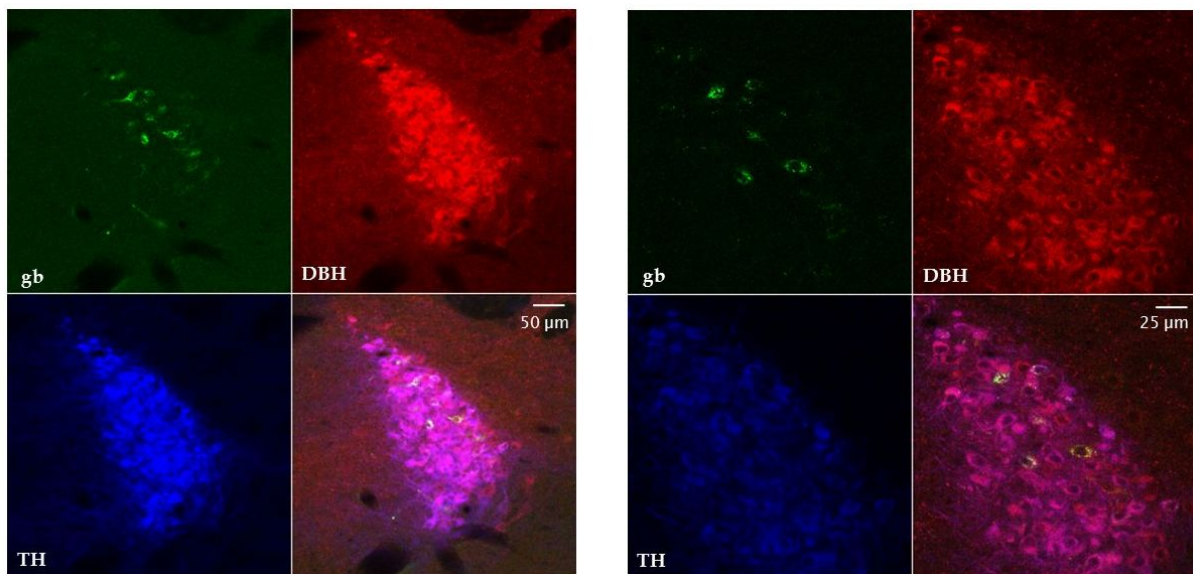


Abbildung 3.4: Ipsilateraler Locus coeruleus in zwei coronaren Schnittebenen nach Tracing des PFC. Oben links: grüne Latex-Beads; oben rechts: DBH-Färbung; unten links: TH-Färbung; unten rechts: grüner, roter und blauer Kanal übereinander gelegt („merged“). Schnittdicke = 60 µm. Vergrößerung: 20x bzw. 40x.

3 Ergebnisse

Es zeigte sich eine große Anzahl an deutlich gelabelten LC-Zellen (ca. 6-16 Zellen pro 60- μ m-Schnitt, zwischen 5,68 und 5,34 mm caudale Bregma-Distanz, ipsilateraler LC), die signifikant v.a. im dorsalen Bereich des Locus coeruleus gelegen waren, soweit eine Differenzierung in dorsalen und ventralen LC möglich war, d.h. eher in den rostralen Abschnitten. Es fanden sich gelabelte Zellen über die gesamte rostro-caudale Achse des LC. Abb. 3.5 zeigt eine Schichtenanalyse des LC zur Evaluierung der dorso-ventralen Verteilung zum PFC projizierender coeruleärer Neurone, auf Höhe von ca. Bregma -5,4 mm. (Zur schematischen Darstellung der Schichtenanalyse vgl. Abb. 2.5.) Kontralateral präfrontal projizierende Zellen fanden sich nur sehr wenige (ca. 1% kontralateral projizierend; 4 von 381 Zellen in N=4 Tieren).

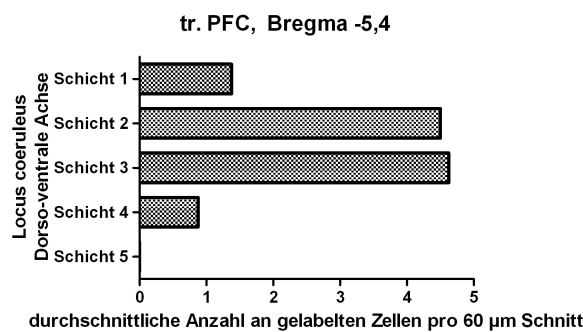


Abbildung 3.5: Schichtenanalyse des LC nach Tracing des PFC. Der LC wurde auf der dorso-ventralen Achse in fünf gleich breite Schichten unterteilt, und diese auf gelabelte Zellen hin untersucht. Schicht 1 = dorsalste Schicht; Schicht 5 = ventralste Schicht. Nach präfrontal projizierende Zellen liegen überwiegend mittig bis dorsalseitig.

3.1.2.2 Tracing des dorsalen Hippocampus

Abb. 3.6 zeigt zwei histologisch aufgearbeitete Schnitte durch den ipsilateralen Locus coeruleus in dorsal hippocampal „getraceten“ Tieren, drei Wochen nach Injektion, in 20x Vergrößerung.

In dorsal hippocampal injizierten Tieren fand sich, verglichen mit dem PFC-Tracing, ein noch deutlicheres Labeling, ebenfalls überwiegend in der dorsalen Hälfte des ipsilateralen Locus coeruleus (ca. 9-33 Zellen pro 60- μ m-Schnitt, zwischen 5,68 und 5,34 mm caudaler Bregma-Distanz, ipsilateraler LC). Abb. 3.7 zeigt eine Schichtenanalyse des LC zur Evaluierung der dorso-ventralen Verteilung zum D.HC projizierender coeruleärer Neurone, auf Höhe von ca. Bregma -5,4 mm. Kontralateral zum dorsalen Hippocampus

3 Ergebnisse

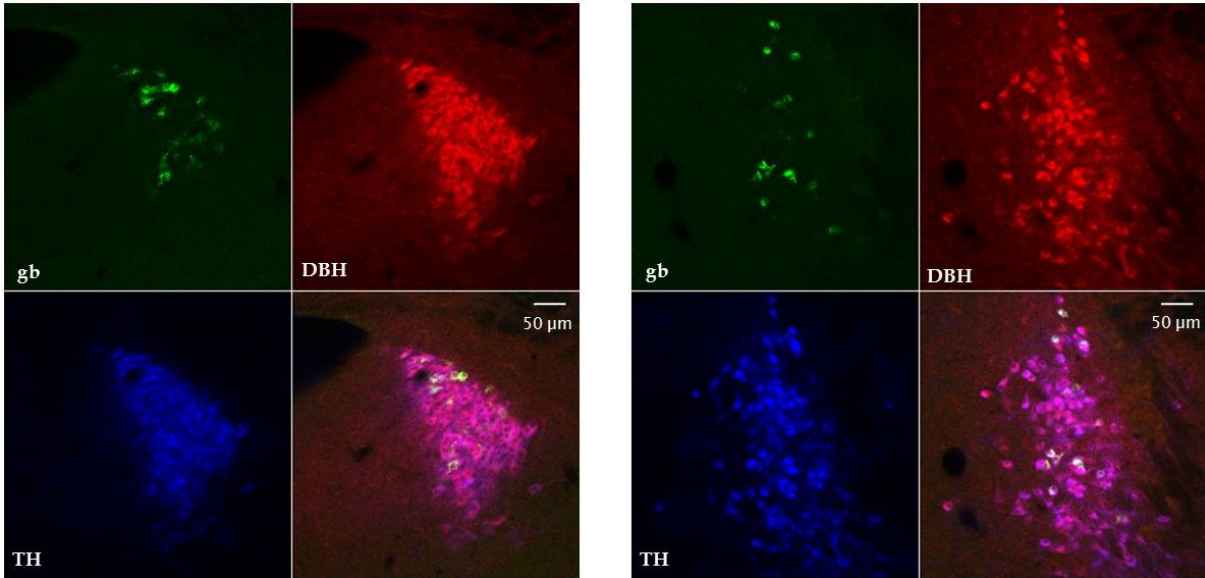


Abbildung 3.6: Ipsilateraler Locus coeruleus in zwei coronaren Schnittebenen nach Tracing des D.HC. Oben links: grüne Latex-Beads; oben rechts: DBH-Färbung; unten links: TH-Färbung; unten rechts: grüner, roter und blauer Kanal übereinander gelegt („merged“). Schnittdicke = 60 µm. Vergrößerung: 20x. Links caudaler, rechts rostraler Schnitt.

projizierende Zellen waren in der Minderheit, wenn auch relativ deutlich häufiger als im Falle des präfrontalen Tracings (ca. 15% kontralateral projizierend; 93 von 633 Zellen in N=4 Tieren).

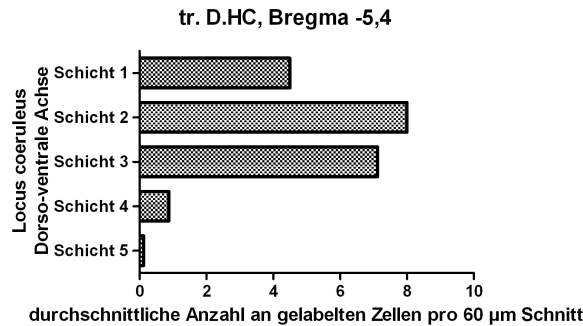


Abbildung 3.7: Schichtenanalyse des LC nach Tracing des D.HC. Der LC wurde auf der dorso-ventralen Achse in fünf gleich breite Schichten unterteilt, und diese auf gelabelte Zellen hin untersucht. Schicht 1 = dorsalste Schicht; Schicht 5 = ventralste Schicht. Nach dorsal hippocampal projizierende Zellen liegen überwiegend mittig bis dorsalseitig.

3.1.2.3 Tracing des ventralen Hippocampus

Abb. 3.8 zeigt zwei histologisch aufgearbeitete Schnitte durch den ipsilateralen Locus coeruleus in ventral hippocampal „getraceten“ Tieren, drei Wochen nach Injektion, in 20x Vergrößerung.

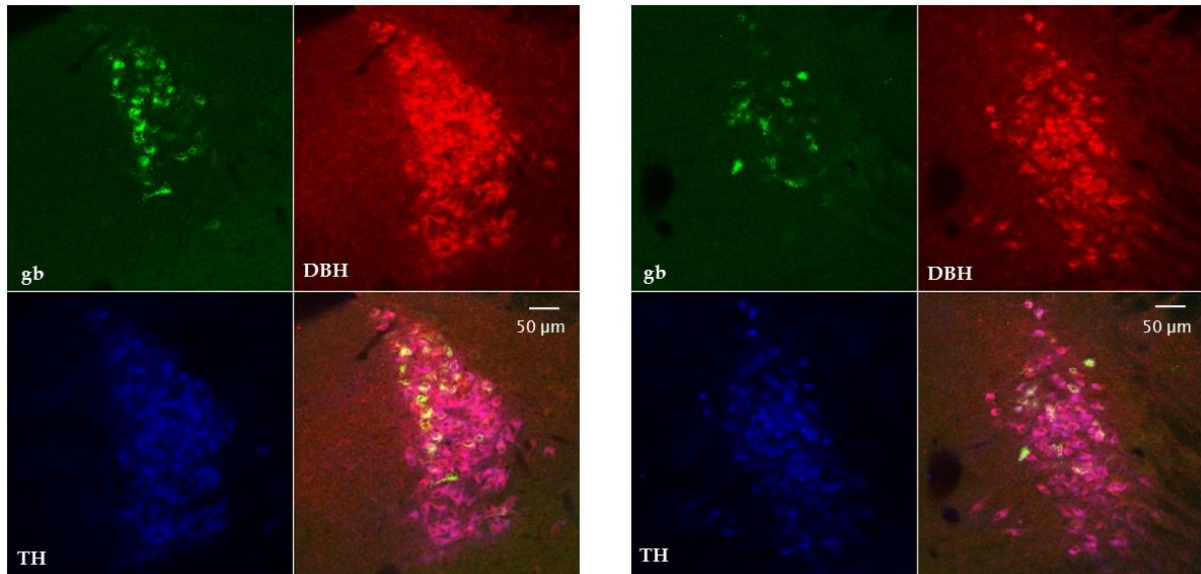


Abbildung 3.8: Ipsilateraler Locus coeruleus in zwei coronaren Schnittebenen nach Tracing des V.HC. Oben links: grüne Latex-Beads; oben rechts: DBH-Färbung; unten links: TH-Färbung; unten rechts: grüner, roter und blauer Kanal übereinander gelegt („merged“). Schnittdicke = 60 µm. Vergrößerung: 20x. Links caudaler, rechts rostraler Schnitt.

Die Tiere, bei denen ein retrogrades Tracing des ventralen Hippocampus vorgenommen wurde, zeigten insgesamt die größte Anzahl an gelabelten Zellen im Locus coeruleus (ca. 11-39 Zellen pro 60-µm-Schnitt, zwischen 5,68 und 5,34 mm caudaler Bregma-Distanz, ipsilateraler LC), und lagen ebenfalls überwiegend im dorsalen Teil des LC. Abb. 3.9 zeigt eine Schichtenanalyse des LC zur Evaluierung der dorso-ventralen Verteilung zum V.HC projizierender coerulärer Neurone, auf Höhe von ca. Bregma -5,4 mm. Gelabelte Zellen lagen ebenfalls mehrheitlich ipsilateral (ca. 11% kontralateral projizierend; 77 von 698 Zellen in N=3 Tieren).

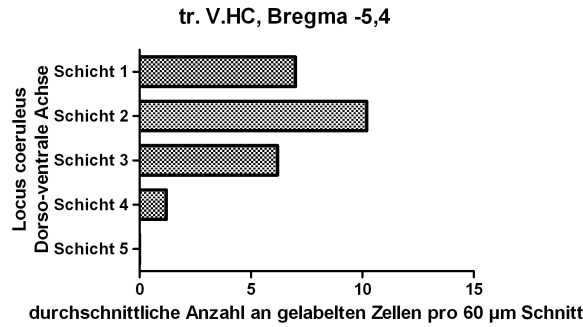


Abbildung 3.9: Schichtenanalyse des LC nach Tracing des V.HC. Der LC wurde auf der dorso-ventralen Achse in fünf gleich breite Schichten unterteilt, und diese auf gelabelte Zellen hin untersucht. Schicht 1 = dorsalste Schicht; Schicht 5 = ventralste Schicht. Nach ventral hippocampal projizierende Zellen liegen überwiegend mittig bis dorsalseitig.

3.1.2.4 Tracing des Cerebellum

Abb. 3.10 zeigt zwei histologisch aufgearbeitete Schnitte durch den Locus coeruleus, ipsi- und kontralateral, in cerebellär „getraceten“ Tieren, drei Wochen nach Injektion, in 20x Vergrößerung.

Das Ergebnis des cerebellären Tracings hob sich in mehrererlei Hinsicht vom Ergebnis der drei übrigen Tracing-Regionen ab. Die cerebellär projizierenden Neurone im Locus coeruleus (ca. 1-15 Zellen pro 60-µm-Schnitt, zwischen 5,68 und 5,34 mm caudaler Bregma-Distanz, ipsilateraler LC) fanden sich zu gleichen Teilen dorsal und ventral. Abb. 3.11 zeigt eine Schichtenanalyse des LC zur Evaluierung der dorso-ventralen Verteilung zum Cerebellum projizierender coeruleärer Neurone, auf Höhe von ca. Bregma -5,4 mm. Kontralateral projizierende Zellen waren häufiger als in den drei Vergleichsprojektionen (ca. 36% kontralateral projizierend; 107 von 298 Zellen in N=3 Tieren).

3.1.2.5 Zusammenfassung

Abb. 3.12 zeigt noch einmal zusammenfassend eine Übersicht über die relative Verteilung der retrograd markierten Neurone im Locus coeruleus nach einfachem Tracing der vier Injektionsareale PFC, D.HC, V.HC und CER.

Während coeruleo-präfrontale und coeruleo-hippocampale Neurone ein sehr ähnliches topographisches Verteilungsmuster zeigen, nämlich ausschließlich im mittleren und dorsalen LC lokalisiert sind, finden sich coeruleo-cerebelläre Neurone zu gleichen Teilen dorsal wie ventral.

3 Ergebnisse

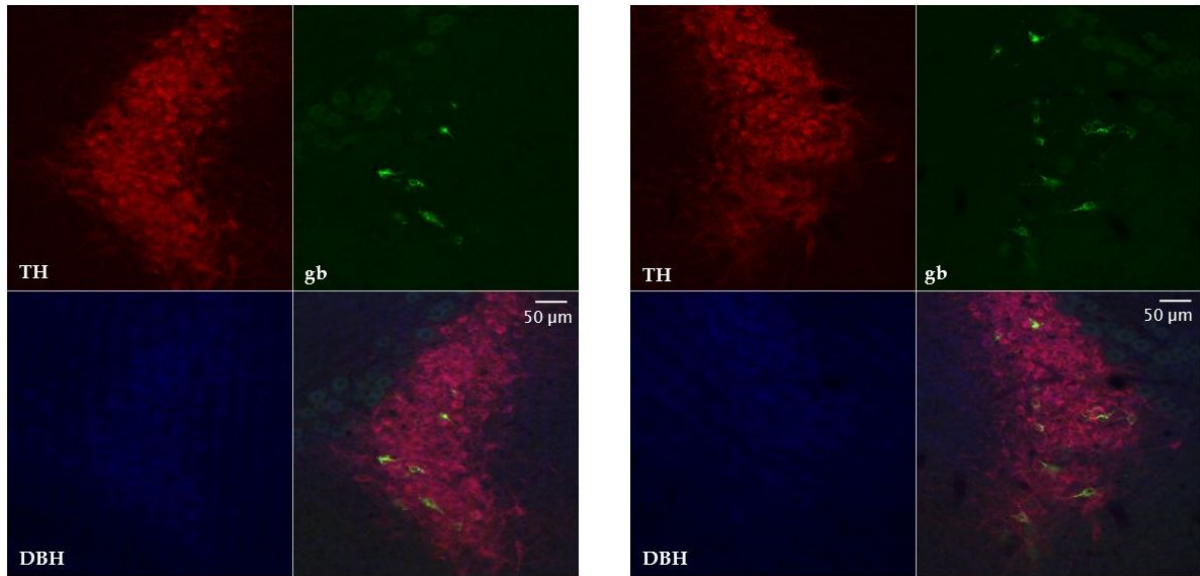


Abbildung 3.10: Kontralateraler (links) und ipsilateraler (rechts) Locus coeruleus in zwei coronaren Schnittebenen nach Tracing des Cerebellums. Oben links: TH-Färbung; oben rechts: grüne Latex-Beads; unten links: DBH-Färbung; unten rechts: grüner, roter und blauer Kanal übereinander gelegt („merged“). Schnittdicke = 60 µm. Vergrößerung: 20x.

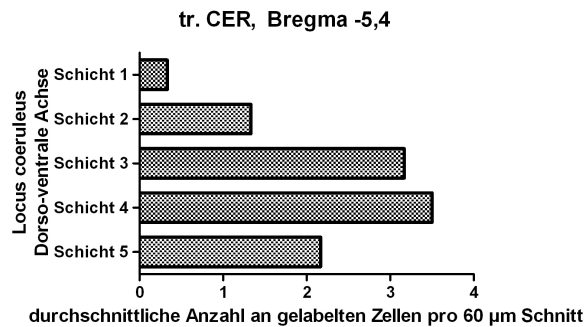


Abbildung 3.11: Schichtenanalyse des LC nach Tracing des Cerebellums. Der LC wurde auf der dorso-ventralen Achse in fünf gleich breite Schichten unterteilt, und diese auf gelabelte Zellen hin untersucht. Schicht 1 = dorsalste Schicht; Schicht 5 = ventralste Schicht. Nach cerebellär projizierende Zellen liegen sowohl dorsal- als auch ventralseitig.

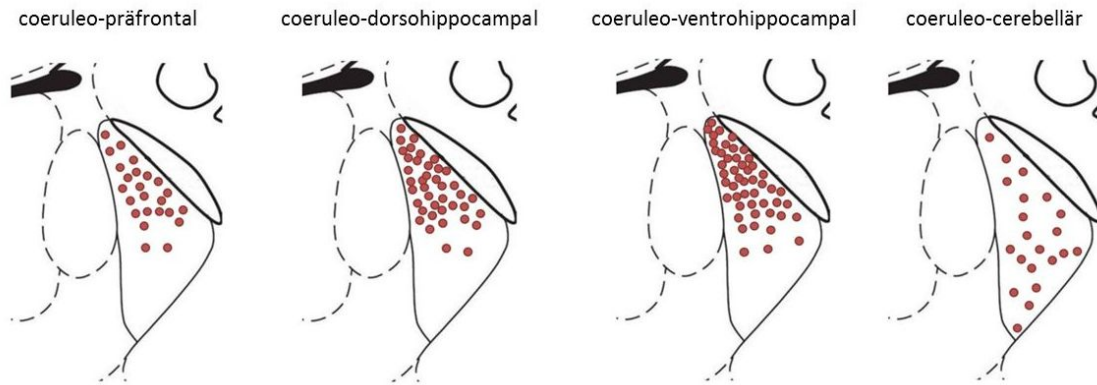


Abbildung 3.12: Relative Verteilung retrograd markierter präfrontal, ventro- und dorsohippocampal sowie cerebellär projizierender Neurone im LC. Ein roter Punkt entspricht einer halben „gelabelten“ Zelle pro 60- μ m-Schnitt. Beachte das unterschiedliche Verteilungsmuster der coeruleo-cerebellären Subpopulation im Vergleich zu den coeruleo-präfrontalen und coeruleo-hippocampalen Neuronen.

3.1.2.6 Ergebnisse der Doppeltracing-Studien

Die Neurone des Locus coeruleus weisen weite Axon-Verzweigungen auf, und dementsprechend hat jedes Neuron ein potentiell großes terminales Feld (Room et al., 1981; Steindler, 1981; Sara, 2009). Aus diesem Grund wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Doppeltracing-Studien mit grünen und roten Beads durchgeführt, um so etwaige LC-Zellen identifizieren zu können, die in *beide* Injektionsgebiete Axonkollateralen entsenden, um also die Frage zu klären, inwieweit sich einzelne LC-Subpopulationen „überschneiden“ können.

Abb. 3.13 zeigt den Locus coeruleus nach Doppeltracing des dorsalen und ventralen Hippocampus (D.HC rot, V.HC grün). Es zeigt sich ein sehr deutliches bicolores Labeling im dorsalen bis mittleren LC. Es finden sich einige Neurone, die rote und grüne Beads aufweisen, und somit Axonkollateralen sowohl in den dorsalen als auch den ventralen Hippocampus aussenden.

Abb. 3.14 zeigt den Locus coeruleus nach Doppeltracing von Cerebellum (grün) und ventralem Hippocampus (rot). Es zeigt sich ein deutliches bicolores Labeling; rote Beads überwiegend dorsal, grüne Beads im gesamten LC. Nach cerebellär und nach hippocampal projizierende Zellen liegen aber häufig direkt nebeneinander. Sehr vereinzelt, aber vorhanden (1 Zelle in N=1 Tier) findet sich ein doppeltes Labeling.

3 Ergebnisse

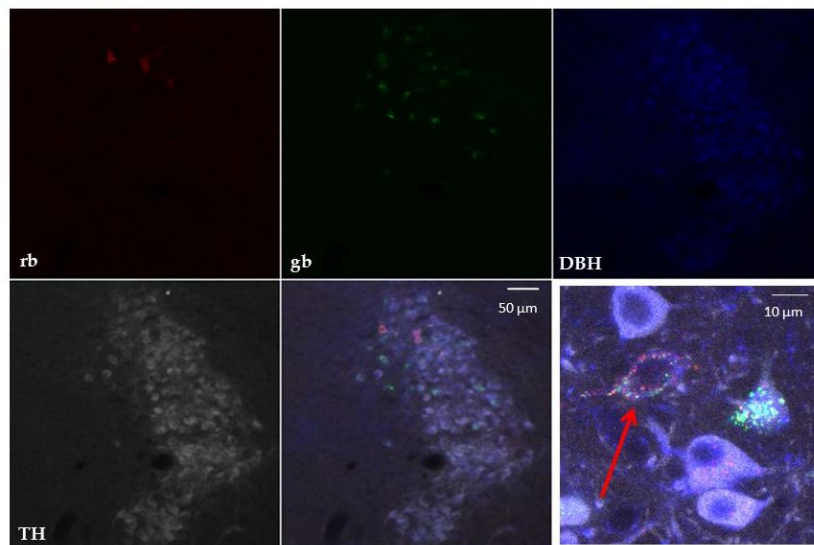


Abbildung 3.13: Ipsilateraler Locus coeruleus nach Tracing des D.HC (rote Beads) und des V.HC (grüne Beads). DBH-Färbung im blauen, TH-Färbung im weißen Kanal. Doppelt gelabelte Zelle mit Pfeil markiert. Vergrößerung 20x bzw. 63x.

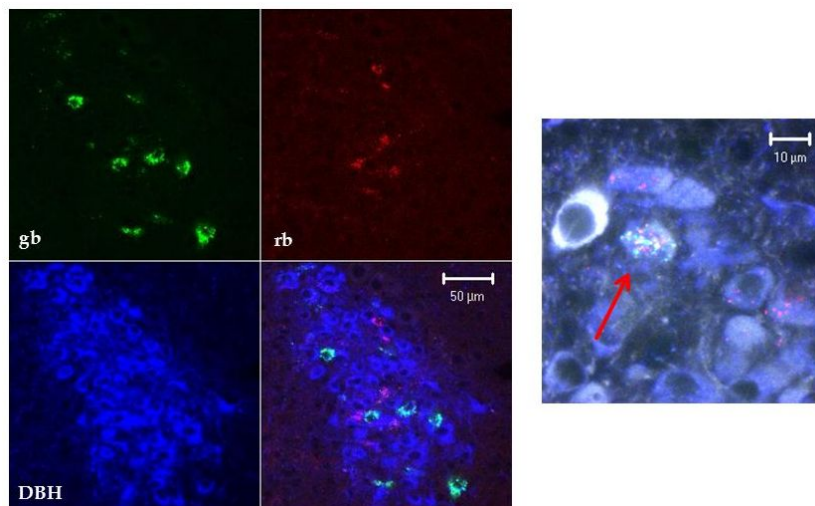


Abbildung 3.14: Ipsilateraler Locus coeruleus nach Tracing des CER (grüne Beads) und des V.HC (rote Beads). DBH-Färbung im blauen Kanal. Doppelt gelabelte Zelle mit Pfeil markiert. Vergrößerung 40x bzw. 63x.

3 Ergebnisse

Abb. 3.15 zeigt den Locus coeruleus nach Doppeltracing von Präfrontalem Cortex (grün) und ventralem Hippocampus (rot). Es zeigt sich ein sehr deutliches bicolores Labeling im dorsalen bis mittleren LC. „Rot“ und „grün“ gelabelte Zellen liegen durchmischt nebeneinander („salt and pepper“). Vereinzelt, aber vorhanden (3 Zellen in N=2 Tieren) findet sich ein doppeltes Labeling.

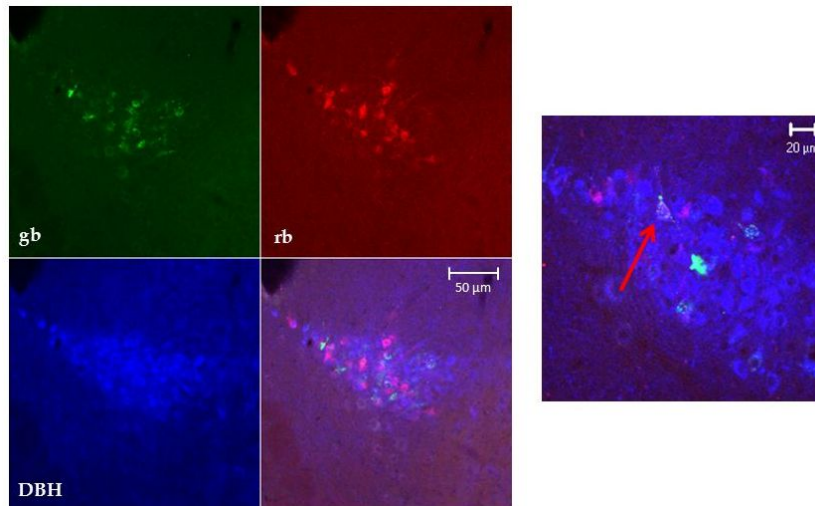


Abbildung 3.15: Ipsilateraler Locus coeruleus nach Tracing des PFC (grüne Beads) und des V.HC (rote Beads). DBH-Färbung im blauen Kanal. Doppelt gelabelte Zelle mit Pfeil markiert. Vergrößerung 20x bzw. 40x.

3.1.3 Quantitativer Vergleich mit dem dopaminergen Mittelhirn

Zur zusätzlichen Evaluation der Projektionen aus dem dopaminergen Mittelhirn (Substantia nigra und VTA) in die untersuchten Zielregionen wurden neben den LC-Schnitten auch die Hirnschnitte aus dem Bereich des Mittelhirns jeweils orientierend mit untersucht. Insgesamt ergab sich für alle Projektionsorte (PFC, dorsaler und ventraler Hippocampus, Kleinhirn) ein deutlich schwächeres Labeling in SN und VTA als im LC.

Während die Projektionen der VTA in den PFC gut charakterisiert sind (Lammel et al., 2008, 2011), sind hippocampal nur spärliche rein dopaminerge Innervationen vorbeschrieben (Moudy et al., 1993). Abb. 3.16 zeigt zwei gelabelte Zellen im paranigralen Nucleus der VTA nach Tracing des ventralen Hippocampus. In der Summe fanden sich in diesem Tier 4 gelabelte TH-positive Zellen im gesamten Mittelhirn. Nach Tracing des dorsalen Hippocampus fand sich mitunter keine einzige gelabelte Zelle in SN und VTA. Dies steht in starkem Kontrast zur Anzahl der gelabelten Zellen im LC (> 230 Zellen pro Tier bei V.HC-Tracing; > 155 Zellen pro Tier bei D.HC-Tracing).

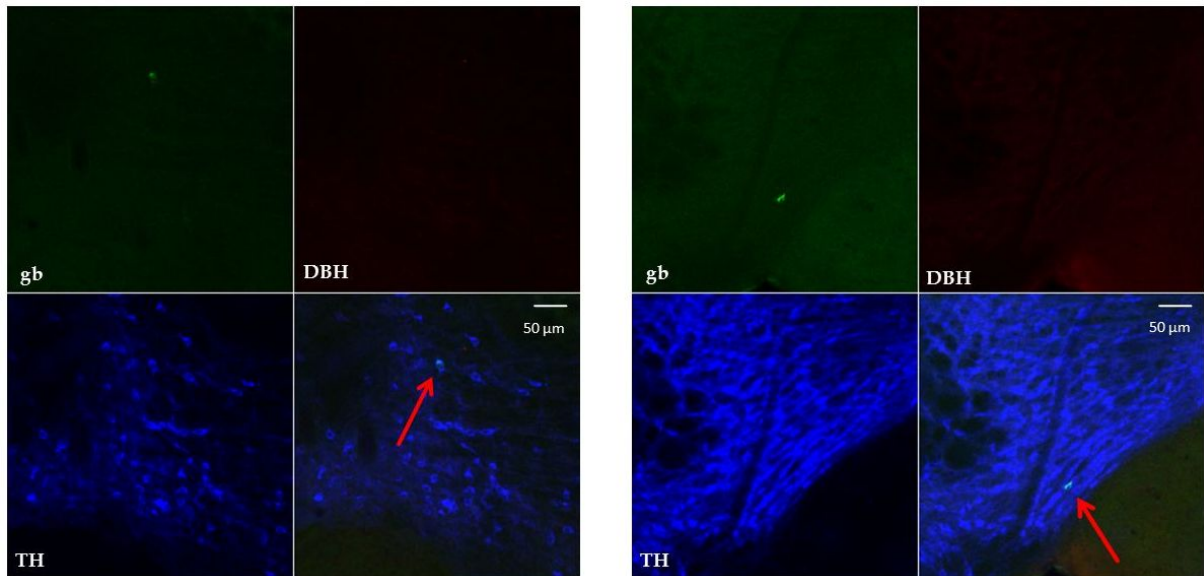


Abbildung 3.16: Mittelhirn im Bereich der VTA in zwei coronaren Schnittebenen nach Tracing des V.HC. Oben links: grüne Latex-Beads; oben rechts: DBH-Färbung (kein Signal bei dopaminergen Zellen); unten links: TH-Färbung; unten rechts: grüner, roter und blauer Kanal übereinander gelegt („merged“). Gelabelte Zellen im paranigralen Nucleus mit Pfeilen markiert. Schnittdicke = 60 μm . Vergrößerung: 20x. Links caudaler, rechts rostraler Schnitt.

3.2 Ergebnisse der Patch-Clamp-Experimente

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Subpopulationen des Locus coeruleus, die in unterschiedliche Zielareale axonal projizieren, selektiv *in vitro* elektrophysiologisch im *current clamp*-Modus charakterisiert. Hierbei wurden die intrinsischen Eigenschaften der Zellen (ohne synaptischen Input) studiert. Die erste Subpopulation bilden die in den PFC projizierenden LC-Neurone (coeruleo-präfrontal), die zweite diejenigen Neurone, die in den ventralen Hippocampus projizieren (coeruleo-hippocampal).

Vorgenommen wurde zum einen eine Charakterisierung der grundlegenden elektrophysiologischen Eigenschaften der beiden Zellgruppen (ohne α_2 -Blockade), zum anderen eine Evaluierung des α_2 -Autorezeptorstatus mithilfe des α_2 -Antagonisten Yohimbin.

3.2.1 Elektrophysiologische Grundcharakterisierung coeruleo-präfrontaler und coeruleo-hippocampaler Neurone

3.2.1.1 Spontanfrequenz

Alle gemessenen für die Datenerhebung verwendeten LC-Zellen zeigten eine regelmäßige spontane Aktivität (Ausschlusskriterium). Abb. 3.17 zeigt die Gegenüberstellung einer coeruleo-präfrontalen und einer coeruleo-hippocampalen Zelle. Die Auswertung ergab für die Gruppe der coeruleo-präfrontalen Neurone eine mittlere Spontanfrequenz von 2,38 Hz ($\pm 0,24$; n=16), für die Gruppe der coeruleo-hippocampalen Neurone eine mittlere Spontanfrequenz von 2,27 Hz ($\pm 0,24$; n=19). Abb. 3.18 zeigt ein Balkendiagramm, das die Spontanfrequenz der beiden Populationen vergleicht.

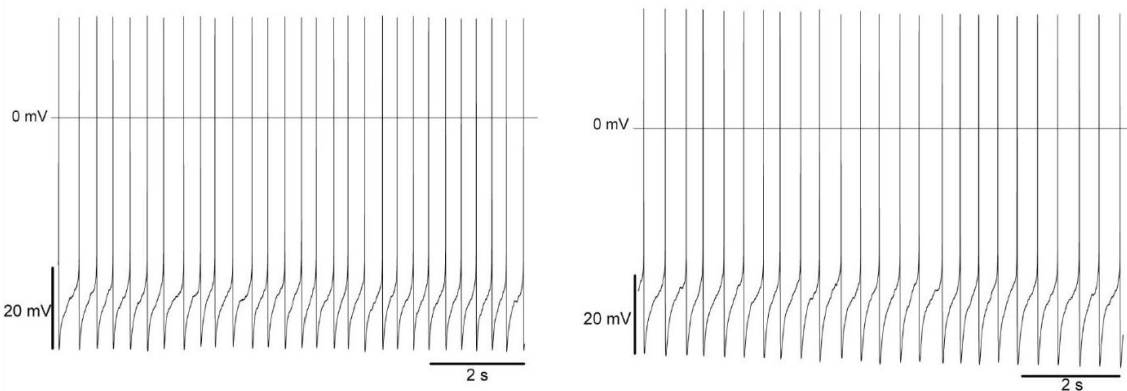


Abbildung 3.17: Spontanaktivität im *current-clamp*-Modus (Strominjektion = 0 pA) einer coeruleo-präfrontalen (links) und einer coeruleo-hippocampalen Zelle (rechts).

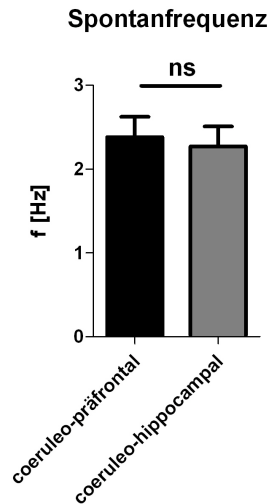


Abbildung 3.18: Spontanfrequenz coeruleo-präfrontaler und coeruleo-hippocampaler Neurone. Nicht-signifikanter Unterschied; $p = 0,746$. Die Daten werden, wie auch in den folgenden Abbildungen, als Mittelwerte \pm Standardfehler (S.E.M.) präsentiert.

3.2.1.2 Rebound Delay

Auf hyperpolarisierende Strominjektionen antworteten alle gemessenen LC-Neurone mit einem unterschiedlich langen sog. *Rebound Delay*, d.h. einer Latenzzeit zwischen dem Ende des hyperpolarisierenden Stromimpulses und dem ersten nachfolgenden Spike. Eine Analyse des Rebound Delays gibt Aufschluss über zugrunde liegende Kanalprozesse, v.a. den sog. A-Strom, einen Auswärts- K^+ -Strom, der bei unterschwelligen Potentialen aktiviert wird und so die Depolarisation antagonisiert, d.h. das nachfolgende Aktionspotential verzögert. Es wurde jeweils derjenige Hyperpolarisationsstep analysiert, der bei der Zelle eine Spannungsantwort von ca. -80 mV auslöste. Abb. 3.19 zeigt die Gegenüberstellung der Antwort auf einen Hyperpolarisationspuls einer coeruleo-präfrontalen und einer coeruleo-hippocampalen Zelle. Die Auswertung ergab für die Gruppe der coeruleo-präfrontalen Neurone einen mittleren Rebound Delay von 1700 ms ($\pm 149,6$; $n=10$), für die Gruppe der coeruleo-hippocampalen Neurone einen mittleren Rebound Delay von 1787 ms ($\pm 260,1$; $n=11$). Abb. 3.20 zeigt ein Balkendiagramm, das den Rebound Delay der beiden Populationen vergleicht.

In keiner der gemessenen Nervenzellen im Locus coeruleus konnte eine sog. *sag amplitude* beobachtet werden, d.h. eine zeitabhängige Verringerung des Membranpotenti-

3 Ergebnisse

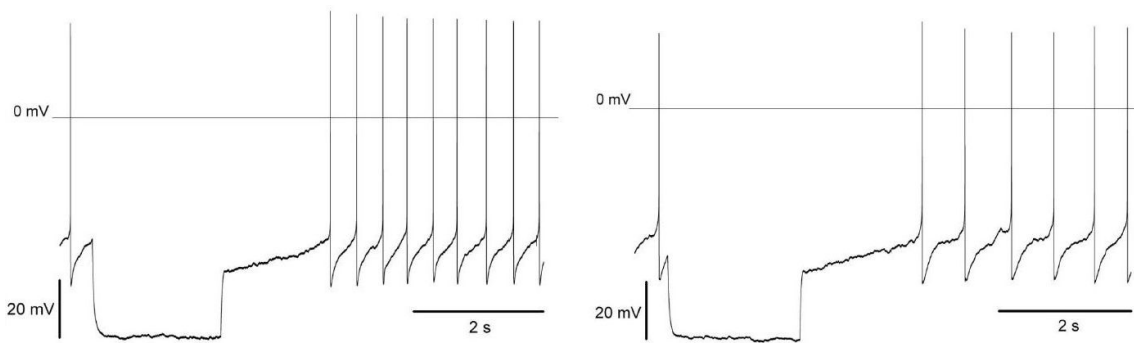


Abbildung 3.19: Hyperpolarisationsprotokoll eines coeruleo-präfrontalen (links) und eines coeruleo-hippocampalen Neurons (rechts).

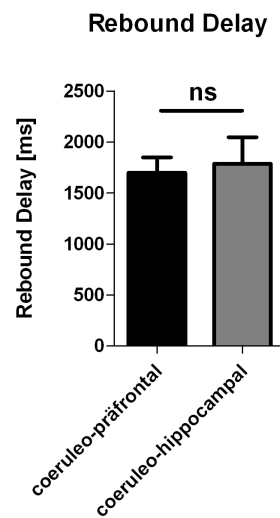


Abbildung 3.20: Rebound Delay coeruleo-präfrontaler und coeruleo-hippocampaler Neurone. Nicht-signifikanter Unterschied; $p = 0,776$.

als (hin zur Depolarisation) während des Hyperpolarisationspulses (bedingt durch die Aktivierung unselektiver Kationenkanäle), wie sie – ebenso wie der A-Strom – z.B. in dopaminergen Neuronen der VTA auftritt (Neuhoff et al., 2002).

3.2.1.3 Maximalfrequenz

Auf depolarisierende Strominjektionen antworteten die untersuchten LC-Zellen mit einem schrittweisen Anstieg der Aktionspotentialfrequenz bis hin zum Depolarisationsblock. Nach Eintreten des Depolarisationsblocks wurde die Aufzeichnung gestoppt. Abb. 3.21 zeigt die Gegenüberstellung eines Depolarisationssteps einer coeruleo-präfrontalen und einer coeruleo-hippocampalen Zelle. Die Auswertung ergab für die Gruppe der coeruleo-präfrontalen Neurone eine mittlere Maximalfrequenz von 61,54 Hz ($\pm 7,34$; $n=14$), für die Gruppe der coeruleo-hippocampalen Neurone eine mittlere Maximalfrequenz von 59,61 Hz ($\pm 5,89$; $n=13$). Abb. 3.22 zeigt ein Balkendiagramm, das die Maximalfrequenz der beiden Populationen vergleicht.

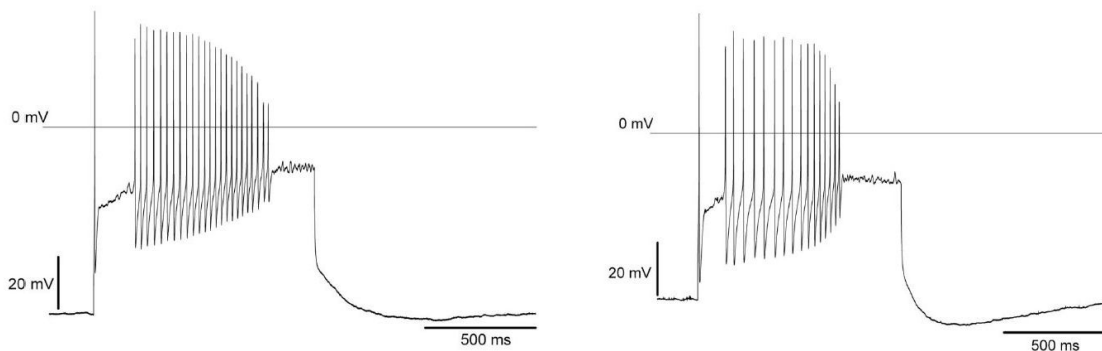


Abbildung 3.21: Depolarisationsstep eines coeruleo-präfrontalen (links) und eines coeruleo-hippocampalen Neurons (rechts) kurz vor dem (vollständigen) Depolarisationsblock.

Die Depolarisationsprotokolle wurden neben der Maximalfrequenz desweiteren hinsichtlich des Verhältnisses von Frequenz zu injiziertem Strom ausgewertet. Dieses wird im sog. frequency-current-plot dargestellt. Es zeigte sich eine mittlere Frequenz-Strom-Relation der coeruleo-präfrontalen Neurone von 0,052 Hz/pA ($\pm 0,004$; $n=12$) und der coeruleo-hippocampalen Neurone von 0,087 Hz/pA ($\pm 0,012$; $n=13$). Abb. 3.23 zeigt die Frequenzantwort coeruleo-präfrontaler und coeruleo-hippocampaler Neurone aufgetragen gegen die Strominjektion, sowie ein Balkendiagramm, das die durchschnittliche Steigung Frequenz pro Strominjektion der beiden Gruppen vergleicht (f-i-slope).

3 Ergebnisse

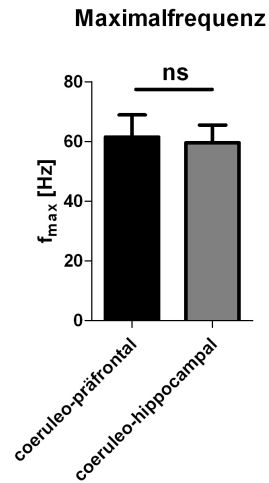


Abbildung 3.22: Maximalfrequenz coeruleo-präfrontaler und coeruleo-hippocampaler Neurone. Nicht-signifikanter Unterschied; $p = 0,839$.

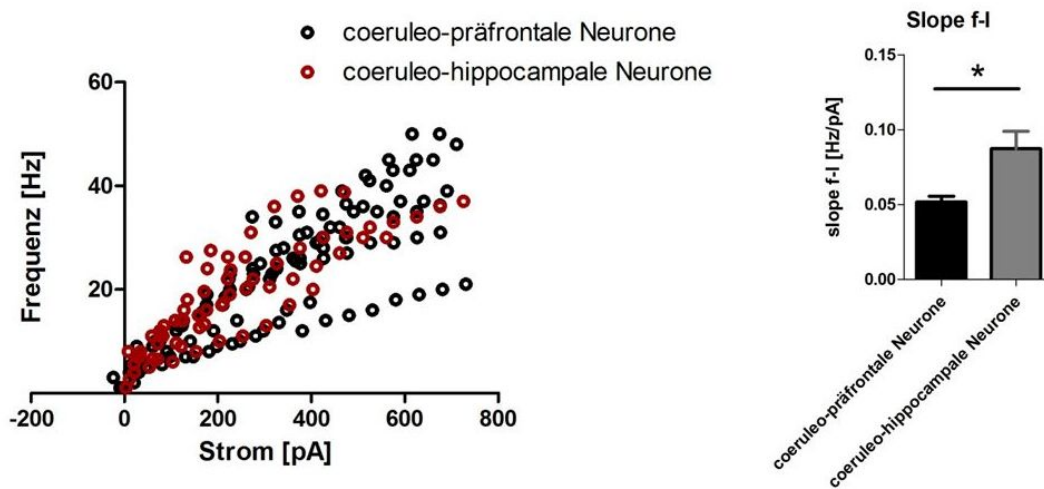


Abbildung 3.23: Links: Frequency-current-plot im Depolarisationsprotokoll bei coeruleo-präfrontalen (schwarz) und coeruleo-hippocampalen Neuronen (rot). Rechts: Frequency-current-slope der beiden Gruppen im Balkendiagramm. Signifikanter Unterschied; $p = 0,01$.

3.2.1.4 Parameter des einzelnen Aktionspotentials: Breite, Schwellenpotential, Maximum, Minimum

In Bezug auf das einzelne, hoch aufgelöste Aktionspotential der jeweiligen LC-Subpopulation wurden vier verschiedene Parameter ausgewertet: Die Breite, d.h. die zeitliche Dauer, des Aktionspotentials, das Schwellenpotential (der sog. *Threshold*), das Maximum und das Minimum (das der Nachhyperpolarisation entspricht) (vgl. Abb. 2.11).

Abb. 3.24 zeigt ein einzelnes Aktionspotential einer coeruleo-präfrontalen und einer coeruleo-hippocampalen Zelle. Die Auswertung der beiden Gruppen ergab folgende Mittelwerte: Eine mittlere AP-Breite der coeruleo-präfrontalen Neurone von 3,41 ms ($\pm 0,36$; n=13) und der coeruleo-hippocampalen Neurone von 3,00 ($\pm 0,13$; n=15); einen mittleren Threshold von -31,33 mV ($\pm 0,96$; n=16) und -34,12 mV ($\pm 0,90$; n=17); ein mittleres Maximum von 30,98 mV ($\pm 1,99$; n=16) und 32,09 mV ($\pm 1,39$; n=17); ein mittleres Minimum (= Nachhyperpolarisation, AHP) von -63,29 mV ($\pm 1,18$; n=16) und -67,96 mV ($\pm 0,99$; n=17). Abb. 3.25 zeigt vier Balkendiagramme, die die einzelnen AP-Parameter der beiden Populationen von LC-Zellen vergleichen.

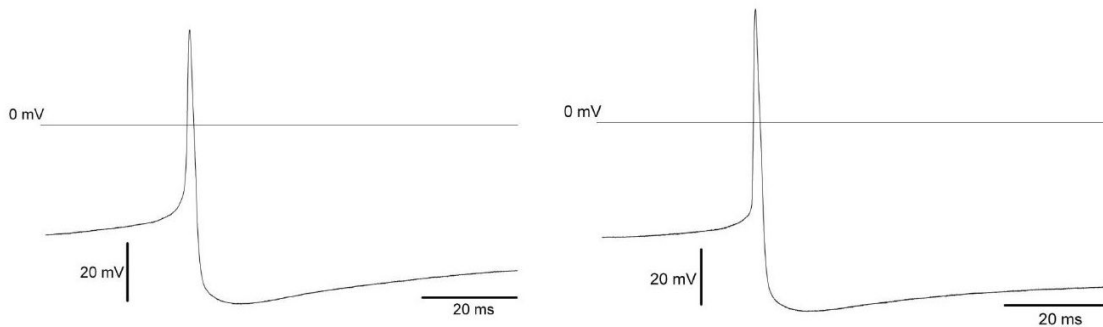


Abbildung 3.24: Einzelnes Aktionspotential eines coeruleo-präfrontalen (links) und eines coeruleo-hippocampalen Neurons (rechts).

3.2.2 Überprüfung des α_2 -Autorezeptorstatus in coeruleo-präfrontalen und coeruleo-hippocampalen Neuronen mit dem α_2 -Antagonisten Yohimbin

In einem zweiten elektrophysiologischen Untersuchungsschritt wurden *current clamp*-Experimente mit einem zusätzlichen Blocker in der Badlösung, dem α_2 -Autorezeptor-Antagonisten Yohimbin, durchgeführt. Bei einem gegebenen Basaltonus an Noradrenalin

3 Ergebnisse

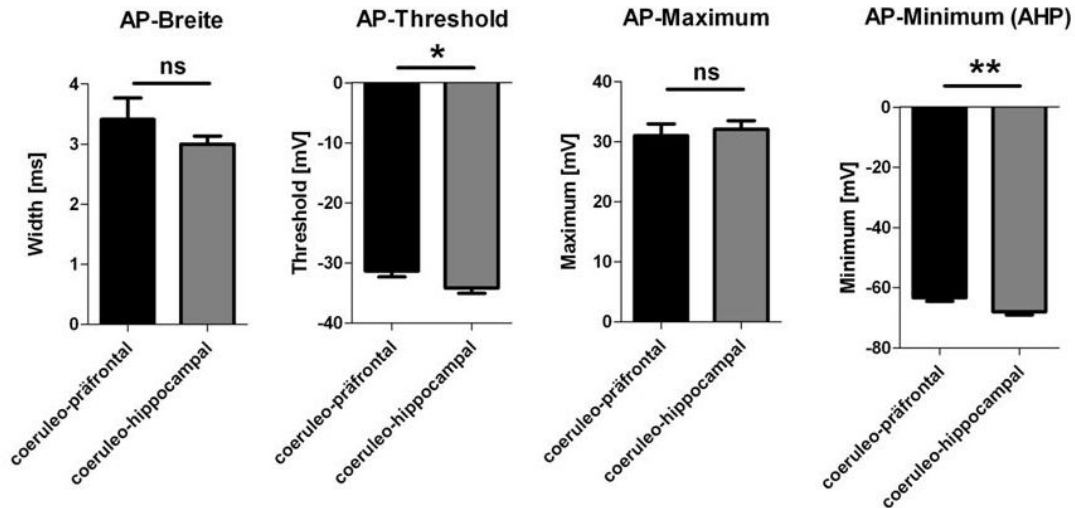


Abbildung 3.25: Parameter des einzelnen Aktionspotentials coeruleo-präfrontaler und coeruleo-hippocampaler Neurone. AP-Breite: Nicht-signifikanter Unterschied; $p = 0,299$. Threshold: Signifikanter Unterschied (*); $p = 0,042$. Maximum: Nicht-signifikanter Unterschied; $p = 0,65$. Minimum (AHP): Signifikanter Unterschied (**); $p = 0,005$.

im Bad (ausgeschüttet durch benachbarte LC-Zellen) konnte so evaluiert werden, ob und wie die jeweilige Subpopulation auf Ausschaltung des inhibitorischen Inputs über α_2 -Autorezeptoren reagiert.

Im folgenden wird jeweils eine Gegenüberstellung der Messung der jeweiligen Population ohne und mit Autorezeptor-Blockade vorgenommen.

3.2.2.1 Spontanfrequenz

Die mittlere Spontanfrequenz der coeruleo-präfrontalen Neurone ohne Yohimbin-Applikation (s. oben) betrug 2,38 Hz ($\pm 0,24$; $n=16$), die mittlere Spontanfrequenz der coeruleo-präfrontalen Neurone mit Yohimbin-Applikation betrug 2,23 Hz ($\pm 0,22$; $n=13$). Die mittlere Spontanfrequenz der coeruleo-hippocampalen Neurone ohne Yohimbin-Applikation betrug 2,27 Hz ($\pm 0,24$; $n=19$), die mittlere Spontanfrequenz der coeruleo-hippocampalen Neurone mit Yohimbin-Applikation betrug 3,04 Hz ($\pm 0,28$; $n=13$). Abb. 3.26 zeigt ein Balkendiagramm, das die Spontanfrequenzen ohne und mit Yohimbin der beiden Populationen vergleicht.

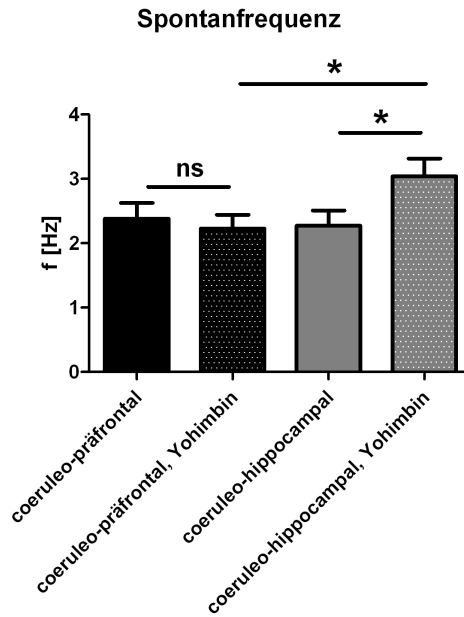


Abbildung 3.26: Spontanfrequenz coeruleo-präfrontaler und coeruleo-hippocampaler Neurone, jeweils ohne und mit Applikation des α_2 -Autorezeptor-Antagonisten Yohimbin über die Badlösung. Coeruleo-präfrontale Neurone: Nicht-signifikanter Unterschied ohne und mit Yohimbin; $p = 0,634$. Coeruleo-hippocampale Neurone: Signifikant (*) höhere Frequenz in der Gruppe mit Yohimbin; $p = 0,046$. Vergleich der coeruleo-präfrontalen und der coeruleo-hippocampalen Population unter Applikation von Yohimbin: Signifikanter Unterschied (*) zwischen beiden Gruppen; $p = 0,031$.

3.2.2.2 Rebound Delay

Für die Bestimmung des Rebound Delay wurde wiederum derjenige Hyperpolarisationsstep analysiert, der die Zelle auf -80 mV hyperpolarisierte. Der mittlere Rebound Delay der coeruleo-präfrontalen Neurone ohne Yohimbin-Applikation betrug 1700 ms ($\pm 149,6$; $n=10$), der mittlere Rebound Delay der coeruleo-präfrontalen Neurone mit Yohimbin-Applikation betrug 1530 ms (± 109 ; $n=12$). Der mittlere Rebound Delay der coeruleo-hippocampalen Neurone ohne Yohimbin-Applikation betrug 1787 ms ($\pm 260,1$; $n=11$), der mittlere Rebound Delay der coeruleo-hippocampalen Neurone mit Yohimbin-Applikation betrug 1178 ms ($\pm 145,4$; $n=13$). Abb. 3.27 zeigt ein Balkendiagramm, das den jeweiligen Rebound Delay ohne und mit Yohimbin der beiden Populationen vergleicht.

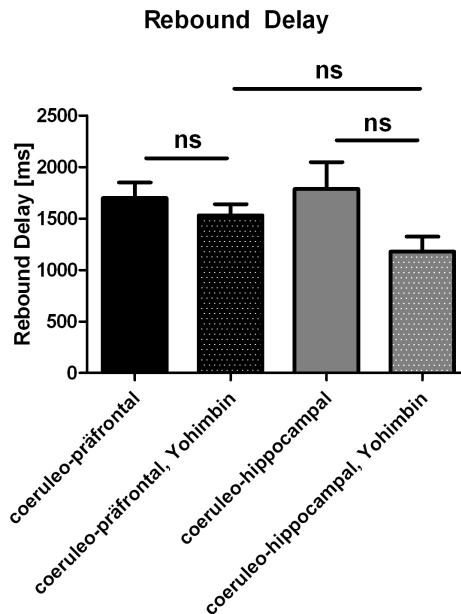


Abbildung 3.27: Rebound Delay coeruleo-präfrontaler und coeruleo-hippocampaler Neurone, jeweils ohne und mit Applikation des α_2 -Autorezeptor-Antagonisten Yohimbin über die Badlösung. Coeruleo-präfrontale Gruppe: Nicht-signifikanter Unterschied; $p = 0,373$. Coeruleo-hippocampale Gruppe: Nicht-signifikanter Unterschied; $p = 0,059$. Vergleich der coeruleo-präfrontalen und der coeruleo-hippocampalen Population unter Applikation von Yohimbin: Nicht-signifikanter Unterschied; $p = 0,066$.

3.2.2.3 Maximalfrequenz

Die mittlere Maximalfrequenz (bestimmt über das Interspike Interval) der coeruleo-präfrontalen Neurone ohne Yohimbin-Applikation betrug 61,54 Hz ($\pm 7,34$; n=14), die mittlere Maximalfrequenz der coeruleo-präfrontalen Neurone mit Yohimbin-Applikation betrug 38,93 Hz ($\pm 2,67$; n=12). Die mittlere Maximalfrequenz der coeruleo-hippocampalen Neurone ohne Yohimbin-Applikation betrug 59,61 Hz ($\pm 5,89$; n=13), die mittlere Maximalfrequenz der coeruleo-hippocampalen Neurone mit Yohimbin-Applikation betrug 38,67 Hz ($\pm 3,06$; n=13). Abb. 3.28 zeigt ein Balkendiagramm, das die Maximalfrequenzen ohne und mit Yohimbin der beiden Populationen vergleicht.

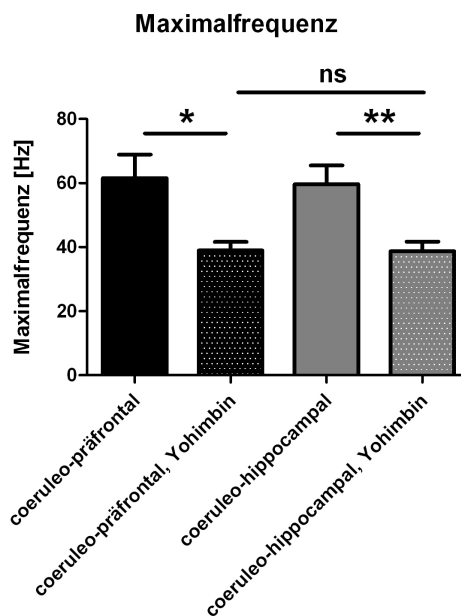


Abbildung 3.28: Maximalfrequenz coeruleo-präfrontaler und coeruleo-hippocampaler Neurone, jeweils ohne und mit Applikation des α_2 -Autorezeptor-Antagonisten Yohimbin über die Badlösung. Coeruleo-präfrontale Gruppe: Signifikanter Unterschied (*); $p = 0,011$. Coeruleo-hippocampale Gruppe: Signifikanter Unterschied (**); $p = 0,006$. Vergleich der coeruleo-präfrontalen und der coeruleo-hippocampalen Population unter Applikation von Yohimbin: Nicht-signifikanter Unterschied; $p = 0,949$.

Auch die Depolarisationsprotokolle mit Yohimbin-Applikation wurden hinsichtlich der frequency-current-plots ausgewertet. Es zeigte sich eine mittlere Frequenz-Strom-

3 Ergebnisse

Relation der coeruleo-präfrontalen Gruppe von 0,053 Hz/pA ($\pm 0,0045$; n=12) und der coeruleo-hippocampalen Gruppe von 0,07 Hz/pA ($\pm 0,012$; n=13).

Abb. 3.29 zeigt die Frequenzantwort coeruleo-präfrontaler und coeruleo-hippocampaler Neurone unter Yohimbin-Applikation aufgetragen gegen die Strominjektion, sowie ein Balkendiagramm, das die durchschnittliche Steigung Frequenz pro Strominjektion der beiden Gruppen vergleicht (f-i-slope).

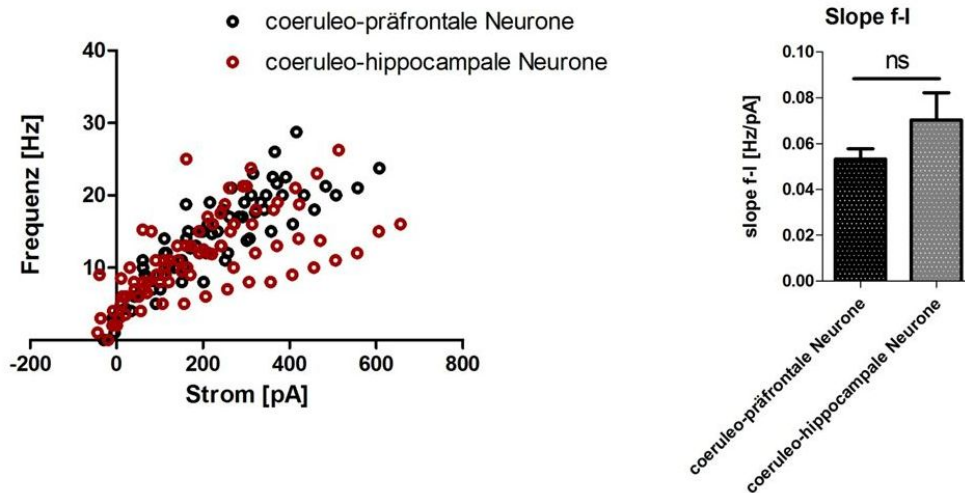


Abbildung 3.29: Links: Frequency-current-plot im Depolarisationsprotokoll bei coeruleo-präfrontalen (schwarz) und coeruleo-hippocampalen Neuronen (rot), unter α_2 -Blockade mit Yohimbin. Rechts: Frequency-current-slope der beiden Gruppen im Balkendiagramm. p = 0,2.

3.2.2.4 Parameter des einzelnen Aktionspotentials: Breite, Schwellenpotential, Maximum, Minimum

Die Auswertung der einzelnen AP-Parameter – Breite des AP, Schwellenpotential (Threshold), Maximum und Minimum (AHP) – ergab folgende Werte: Eine mittlere AP-Breite der coeruleo-präfrontalen Neurone ohne Yohimbin-Applikation von 3,41 ms ($\pm 0,36$; n=13) und der coeruleo-präfrontalen Neurone mit Yohimbin-Applikation von 3,81 ms ($\pm 0,20$; n=13), eine mittlere AP-Breite der coeruleo-hippocampalen Neurone ohne Yohimbin-Applikation von 3,00 ms ($\pm 0,13$; n=15) und der coeruleo-hippocampalen Neurone mit Yohimbin-Applikation von 3,52 ms ($\pm 0,11$; n=13); einen mittleren Threshold (definiert als Steigung > 50 mV/ms) der coeruleo-präfrontalen Neurone ohne Yohimbin-

3 Ergebnisse

Applikation von $-31,33 \text{ mV}$ ($\pm 0,96$; $n=16$) und der coeruleo-präfrontalen Neurone mit Yohimbin-Applikation von $-28,26 \text{ mV}$ ($\pm 0,84$; $n=13$), einen mittleren Threshold der coeruleo-hippocampalen Neurone ohne Yohimbin-Applikation von $-34,12 \text{ mV}$ ($\pm 0,90$; $n=17$) und der coeruleo-hippocampalen Neurone mit Yohimbin-Applikation von $-28,29 \text{ mV}$ ($\pm 0,90$; $n=13$); ein mittleres Maximum der coeruleo-präfrontalen Neurone ohne Yohimbin-Applikation von $30,98 \text{ mV}$ ($\pm 1,99$; $n=16$) und der coeruleo-präfrontalen Neurone mit Yohimbin-Applikation von $15,54$ ($\pm 0,96$; $n=13$), ein mittleres Maximum der coeruleo-hippocampalen Neurone ohne Yohimbin-Applikation von $32,09 \text{ mV}$ ($\pm 1,39$; $n=17$) und der coeruleo-hippocampalen Neurone mit Yohimbin-Applikation von $17,75 \text{ mV}$ ($\pm 1,13$; $n=13$); ein mittleres Minimum der coeruleo-präfrontalen Neurone ohne Yohimbin-Applikation von $-63,29 \text{ mV}$ ($\pm 1,18$; $n=16$) und der coeruleo-präfrontalen Neurone mit Yohimbin-Applikation von $-59,55 \text{ mV}$ ($\pm 1,06$; $n=13$), ein mittleres Minimum der coeruleo-hippocampalen Neurone ohne Yohimbin-Applikation von $-67,96 \text{ mV}$ ($\pm 0,99$; $n=17$) und der coeruleo-hippocampalen Neurone mit Yohimbin-Applikation von $-59,88 \text{ mV}$ ($\pm 1,59$; $n=13$). Abb. 3.30 und Abb. 3.31 zeigen Balkendiagramme, die die einzelnen AP-Parameter der beiden Populationen jeweils ohne und mit Yohimbin-Applikation vergleichen.

3.2.2.5 Haltestrom

Für alle in beiden Versuchsreihen (ohne und mit Yohimbin) im Depolarisationsprotokoll gemessenen Zellen wurde weiterhin der sog. „Haltestrom“ bestimmt, d.h. derjenige Strom, der zu injizieren notwendig war, um die Zelle auf einem bestimmten Membranpotential, in diesem Fall -60 mV , zu „halten“. Für die coeruleo-präfrontale Gruppe zeigte sich ohne und mit α_2 -Blockade ein mittlerer Haltestrom von $-37,58 \text{ mV}$ ($\pm 4,76$; $n=12$) bzw. $-43,92 \text{ mV}$ ($\pm 4,73$; $n=12$). Für die coeruleo-hippocampale Gruppe zeigte sich ohne und mit α_2 -Blockade ein mittlerer Haltestrom von $-29,24 \text{ mV}$ ($\pm 2,53$; $n=17$) bzw. $-55,85 \text{ mV}$ ($\pm 6,47$; $n=13$). Abb. 3.32 zeigt ein Balkendiagramm, das die Halteströme in den vier Gruppen miteinander vergleicht.

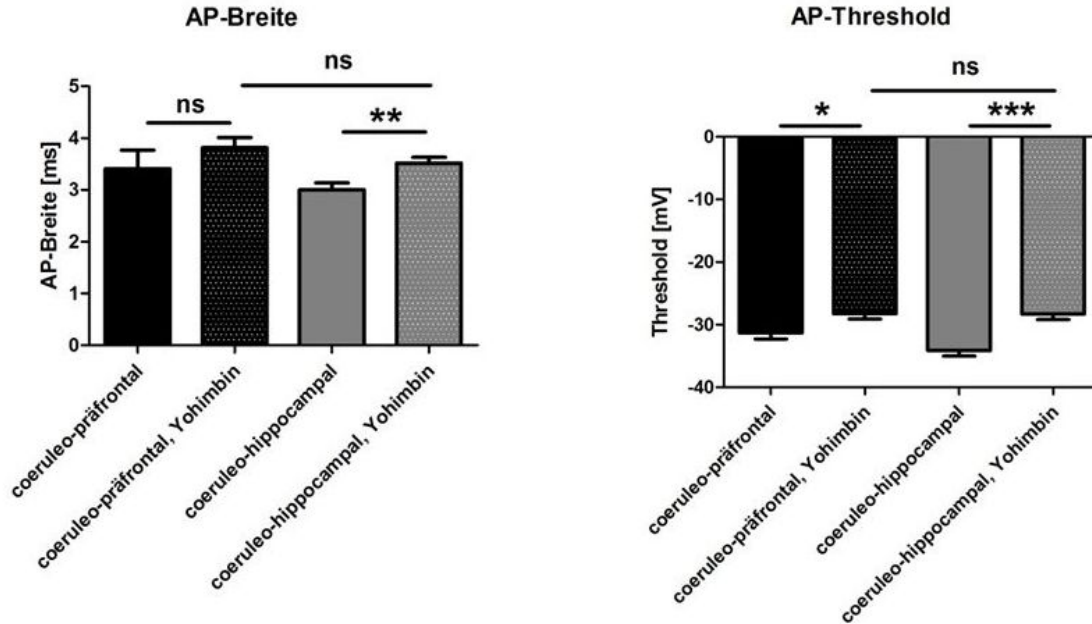


Abbildung 3.30: Parameter des einzelnen Aktionspotentials coeruleo-präfrontaler und coeruleo-hippocampaler Neurone, jeweils ohne und mit Applikation des α_2 -Autorezeptor-Antagonisten Yohimbin über die Badlösung (1). AP-Breite: Coeruleo-präfrontale Gruppe: Nicht-signifikanter Unterschied; $p = 0,337$. Coeruleo-hippocampale Gruppe: Signifikanter Unterschied (**); $p = 0,006$. Vergleich der coeruleo-präfrontalen und der coeruleo-hippocampalen Population unter Applikation von Yohimbin: Nicht-signifikanter Unterschied, $p = 0,211$. AP-Threshold: Coeruleo-präfrontale Gruppe: Signifikanter Unterschied (*); $p = 0,024$. Coeruleo-hippocampale Gruppe: Signifikanter Unterschied (***) ; $p < 0,0001$. Vergleich der coeruleo-präfrontalen und der coeruleo-hippocampalen Population unter Applikation von Yohimbin: Nicht-signifikanter Unterschied; $p = 0,979$. Der signifikante Unterschied zwischen den beiden Subpopulationen ohne Yohimbin (s.o.) verschwindet unter Yohimbin-Gabe.

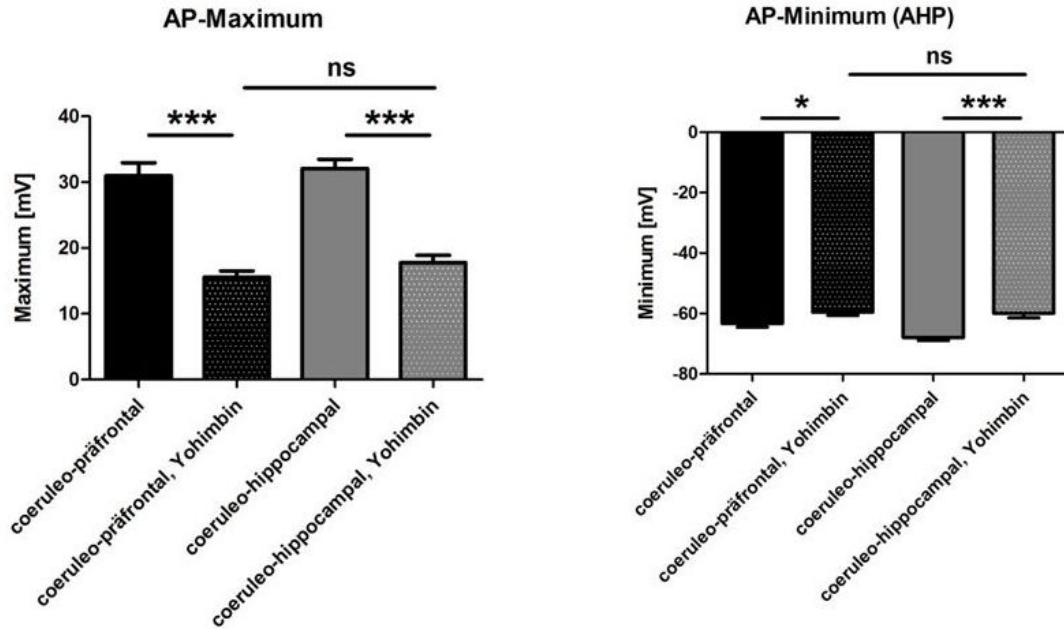


Abbildung 3.31: Parameter des einzelnen Aktionspotentials coeruleo-präfrontaler und coeruleo-hippocampaler Neurone, jeweils ohne und mit Applikation des α_2 -Autorezeptor-Antagonisten Yohimbin über die Badlösung (2). AP-Maximum: Coeruleo-präfrontale Gruppe: Signifikanter Unterschied (***) ; $p < 0,0001$. Coeruleo-hippocampale Gruppe: Signifikanter Unterschied (***) ; $p < 0,0001$. Vergleich der coeruleo-präfrontalen und der coeruleo-hippocampalen Population unter Applikation von Yohimbin: Nicht-signifikanter Unterschied; $p = 0,151$. AP-Minimum (AHP): Coeruleo-präfrontale Gruppe: Signifikanter Unterschied (*); $p = 0,026$. Coeruleo-hippocampale Gruppe: Signifikanter Unterschied (***) ; $p = 0,0003$. Vergleich der coeruleo-präfrontalen und der coeruleo-hippocampalen Population unter Applikation von Yohimbin: Nicht-signifikanter Unterschied; $p = 0,864$. Der signifikante Unterschied zwischen den beiden Subpopulationen ohne Yohimbin (s.o.) verschwindet unter Yohimbin-Gabe.

3 Ergebnisse

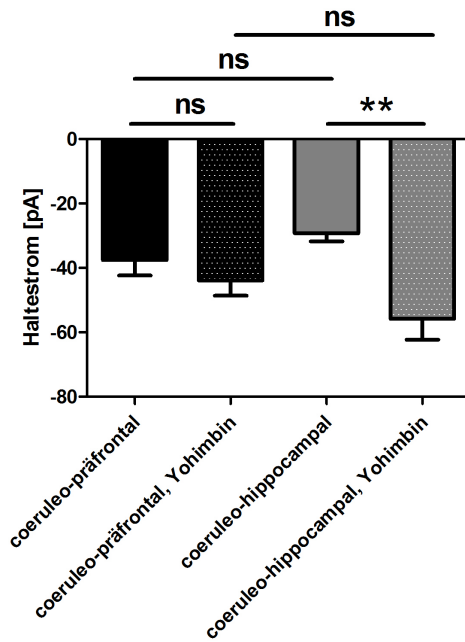


Abbildung 3.32: Haltestrom coeruleo-präfrontaler und coeruleo-hippocampaler Neurone, jeweils ohne und mit Applikation des α_2 -Autorezeptor-Antagonisten Yohimbin über die Badlösung. Coeruleo-präfrontale Gruppe: Nicht-signifikanter Unterschied; $p = 0,36$. Coeruleo-hippocampale Gruppe: Signifikanter Unterschied (**); $p = 0,002$. Vergleich der coeruleo-präfrontalen und der coeruleo-hippocampalen Population, ohne und mit Yohimbin: Nicht-signifikante Unterschiede; $p = 0,14$ bzw. $p = 0,15$. Angegeben ist der Haltestrom für ein Membranpotential von -60 mV.

4 Diskussion

Im folgenden sollen nun die im vorangegangenen Teil präsentierten Ergebnisse und ihre Bedeutung für die Physiologie des Locus coeruleus diskutiert und in den Kontext relevanter Literatur eingeordnet werden.

4.1 Diskussion der Tracing-Experimente

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Tracing-Experimente belegen eine, in der Literatur teilweise gut vorbeschriebene (Mason & Fibiger, 1979; Waterhouse et al., 1983; Loughlin et al., 1986; Berridge & Waterhouse, 2003; Sara & Bouret, 2012), sehr grobe anatomisch-topographische Gliederung der efferenten Bahnen des Locus coeruleus im Hinblick auf die vier untersuchten Projektionsgebiete: Präfrontaler Cortex, dorsaler Hippocampus, ventraler Hippocampus, und Cerebellum.

In Bezug auf die rostro-caudale Achse ergab sich für keine der vier untersuchten Zielregionen eine topographische Gliederung der jeweiligen LC-Neurone. Gelabelte, d.h. ins jeweilige Injektionsareal projizierende, Zellen waren jeweils vom rostralen bis zum caudalen Pol des Locus coeruleus zu finden.

LC-Neurone projizierend in den PFC sowie D.HC und V.HC zeigten auf der dorso-ventralen Achse eine klare topographische Gliederung: Sie fanden sich nahezu ausschließlich im dorso-medialen Bereich des LC (soweit eine Differenzierung in dorsal und ventral möglich ist; am caudalen Pol kann eine solche Differenzierung nicht gemacht werden, da der LC dort klein und sehr dicht gedrängt ist). Die in das Cerebellum projizierenden Neurone hingegen fanden sich im Bereich des gesamten LC, sowohl dorsal als auch ventral. Diese beiden Befunde decken sich mit älteren Studien an der Ratte (Mason & Fibiger, 1979; Loughlin et al., 1982, 1986).

Die nach präfrontal und hippocampal (dorsal und ventral) projizierenden Neurone waren überwiegend ipsilateral zur Projektionsstelle lokalisiert. Am ausgeprägtesten war der Befund im Fall der coeruleo-präfrontalen Neurone (nur ca. 1 % der Zellen kontralateral projizierend; auch dies ist für die Ratte ähnlich vorbeschrieben, Waterhouse et al.,

1983). Coeruleo-cerebelläre Neurone hingegen zeigten, wenngleich ebenfalls mehrheitlich ipsilateral projizierend, einen deutlich höheren Anteil an kontralateralen Projektionen: mehr als ein Drittel der Zellen senden ihre Axone (auch) kontralateral cerebellär.

Zusammenfassend können im Hinblick auf die topographische Gliederung der Efferenzen des Locus coeruleus also zwei Gruppen unterschieden werden: Die nach präfrontal und (dorsal und ventral) hippocampal projizierenden Nervenzellen, die überwiegend im dorsalen Bereich des LC lokalisiert sind, sowie die nach cerebellär projizierenden Neurone, die sowohl im dorsalen als auch im ventralen LC lokalisiert sind. Vgl. zur Übersicht Abb. 3.12. Die Zellen der ersteren Gruppe (coeruleo-präfrontal und coeruleo-hippocampal) sind zu 85-99% (ausschließlich) ipsilateral projizierend, während die Zellen der zweiten Gruppe (coeruleo-cerebellär) nur zu 66% (ausschließlich) ipsilateral projizieren. Eine unterschiedliche Verteilung auf der rostro-caudalen oder der medio-lateralen Achse findet sich in beiden Fällen nicht.

Funktionell kann diese recht grobe efferente Topographie erklärbar sein im Rahmen der generellen Rolle, die dem LC bei Steuerung und Aufrechterhaltung kognitiver Prozesse zugeschrieben wird, beispielsweise in Stresssituationen und bei der Schlaf-Wach-Koordination (vgl. Abschn. 1.2.1). Gerade eine eher grobe Gliederung der Efferenzen in „vordere“ Hirnareale wie PFC oder Hippocampus und „hintere“ Areale wie Cerebellum oder Rückenmark ermöglicht so vermutlich eine homogene Antwort auf einen externen Stimulus.

Die zusätzliche histologische Untersuchung des dopaminergen Mittelhirns – Substantia nigra und VTA – ergab einen geringeren Anteil an gelabelten Zellen als im Locus coeruleus; insbesondere im Fall des Tracing des (dorsalen und ventralen) Hippocampus fanden sich nur sehr vereinzelt gelabelte Neurone in der VTA. Die meso-hippocampalen Projektionen sind teilweise als sehr spärlich vorbeschrieben bzw. es konnte eine weitgehende Deckungsgleichheit zwischen dopaminergen und noradrenergen Fasern zum Hippocampus gezeigt werden, was bedeutet, dass diese Fasern nicht aus SN oder VTA stammen können (die rein dopaminerg sind), sondern z.B. aus dem Locus coeruleus-noradrenergen System (Moudy et al., 1993). Daten zu substantiellen meso-hippocampalen Projektionen sind eher spärlich zu finden (Gasbarri et al., 1994, 1996, 1997). In jedem Fall besteht ein relevantes Mismatch zwischen der bedeutenden funktionellen Rolle von Dopamin im Hippocampus und auch der Dichte hippocampaler postsynaptischer Dopamin-Rezeptoren einerseits (O’Carroll et al., 2006; Bethus et al., 2010), und der tatsächlichen (rein) dopaminergen Innervation andererseits. Vor diesem Hintergrund wurde die These formuliert, der überwiegende Anteil des hippocampalen DA stamme gar nicht aus den eigentli-

chen dopaminergen Gebieten im Mittelhirn, sondern aus noradrenergen Gebieten mit reichen Projektionen in den Hippocampus, d.h. v.a. aus dem Locus coeruleus (Guiard et al., 2008; Smith & Greene, 2012), zumal gezeigt werden konnte, dass nach Läsion des Locus coeruleus der Dopamin-Gehalt im hippocampalen Gewebe signifikant absinkt (Arvin et al., 1992). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten lassen diese Hypothese insoweit plausibel erscheinen, als dass die parallele histologische Analyse von Pons und Mesencephalon nach retrogradem Tracing des dorsalen und ventralen Hippocampus eine denkbar große Differenz in der Projektionsdichte zwischen coeruleo-hippocampalen und meso-hippocampalen Fasern zugunsten der coeruleo-hippocampalen Fasern ergab.

4.2 Diskussion der Patch-Clamp-Experimente

4.2.1 Elektrophysiologische Charakterisierung coeruleo-präfrontaler und coeruleo-hippocampaler Neurone ohne und mit α_2 -Autorezeptor-Blockade

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei Versuchsreihen zur elektrophysiologischen Charakterisierung zweier Subpopulationen im Locus coeruleus – der coeruleo-präfrontalen und der coeruleo-hippocampalen Projektion – durchgeführt: einmal jeweils ohne und mit Applikation von Yohimbin über die Badlösung. Über den α_2 -Autorezeptor-Antagonisten Yohimbin sollte der Status der α_2 -Rezeptoren in den beiden Subpopulationen dargestellt sowie geprüft werden, ob die für das dopaminerge Mittelhirn vorbeschriebene selektive Abwesenheit von Autorezeptoren in den nach präfrontal projizierenden Neuronen (Lammel et al., 2008) auch auf den LC zutrifft.

Die Bindung eines Agonisten an α_2 -Autorezeptoren vermittelt u.a. über die Aktivierung G-Protein-gekoppelter K^+ -Kanäle („GIRKs“) eine Hyperpolarisation der Zelle, und damit eine Abnahme der Feuerungsrate der LC-Zellen (Arima et al., 1998); auch die inhibitorische Modulation von Ca^{2+} -Kanälen spielt im LC eine Rolle (Chieng & Bekkers, 1999). Dies dient physiologisch als negativer Feedback-Mechanismus: Wenn die Zellen selbst (und benachbarte Zellen) sehr aktiv sind, also viel Noradrenalin ausschütten, drosseln sie selbst über Autorezeptoraktivierung durch das Noradrenalin ihre Feuerungsrate. Umgekehrt ist bei Anwesenheit eines α_2 -Antagonisten wie Yohimbin eine Disinhibition – eine Abnahme der Hemmung –, also eine Zunahme der coeruleären Feuerungsrate zu erwarten. Die Beobachtung der Spontanfrequenz und der Vergleich zwischen den

vier Gruppen – coeruleo-präfrontale und coeruleo-hippocampale Projektion, jeweils ohne und mit Yohimbin – war also entscheidend und stellt einen der zentralen Befunde der vorliegenden Arbeit dar.

Die beiden untersuchten Gruppen zeigten unter Abwesenheit des α_2 -Autorezeptor-Blockers Yohimbin keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer Spontanfrequenz in synaptischer Isolation. Die mittlere Spontanfrequenz betrug 2,4 Hz für die coeruleo-präfrontale Population und 2,3 Hz für die coeruleo-hippocampale Population. Diese Daten, wie auch einige weitere erhobene Parameter, decken sich mit den vorbeschriebenen elektrophysiologischen Analysen des gesamten Locus coeruleus, ohne selektive projektionsspezifische Identifizierung einzelner Subpopulationen (Williams et al., 1984; Berridge & Waterhouse, 2003; de Oliveira et al., 2010).

Es zeigte sich nun aber, dass die beiden Projektionen bei Yohimbin-Applikation nicht gleichsinnig verändert sind: Die coeruleo-präfrontalen Zellen unterscheiden sich nicht ohne und mit Applikation des α_2 -Blockers Yohimbin. Die coeruleo-hippocampalen Neurone hingegen feuern bei Yohimbin-Applikation, d.h. bei Blockade der inhibierenden α_2 -Rezeptoren, signifikant schneller: 2,4 Hz vs. 2,2 Hz (coeruleo-präfrontal) bzw. 2,3 vs. 3,0 Hz (coeruleo-hippocampal). Vergleicht man die coeruleo-präfrontale und die coeruleo-hippocampale Projektion unter Anwesenheit von Yohimbin, so zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Spontanfrequenz zwischen den beiden Subpopulationen: 2,2 Hz (coeruleo-präfrontal) vs. 3,0 Hz (coeruleo-hippocampal; vgl. Abb. 3.26).

Zusammenfassend besteht also ein fehlendes Ansprechen auf α_2 -Blockade in der coeruleo-präfrontalen Gruppe, während es eine signifikante Steigerung der Spontanfrequenz auf Yohimbin in der coeruleo-hippocampalen Gruppe gibt. Dies spricht für eine, wenn nicht ganz fehlende, zumindest *reduzierte funktionale Rolle von α_2 -Autorezeptoren selektiv in nach präfrontal projizierenden LC-Neuronen*; analog zu den meso-präfrontalen Zellen der VTA. Dies stellt einen für den Locus coeruleus neuen Befund dar, und gibt trotz der vielfach vorbeschriebenen elektrophysiologischen Homogenität im Locus coeruleus-noradrenergen System einen Hinweis auf eine (projektionsspezifische) Heterogenität der Subpopulationen. Für die sympathischen Neurone im Ganglion cervicale superius ist ein teilweises (subpopulationsspezifisches) Fehlen der α_2 -vermittelten Antwort auf Noradrenalin-Applikation belegt (Li & Horn, 2008), im Fall des Locus coeruleus ist aber zumeist ein homogenes Ansprechen der Zellpopulation auf α_2 -Autorezeptor-Aktivierung vorbeschrieben (Williams et al., 1985; Arima et al., 1998).

Die Ursachen im einzelnen der differentiellen α_2 -Autorezeptor-Regulation in den verschiedenen LC-Subpopulationen können verschiedene sein: Es ist zum einen möglich,

dass die coeruleo-präfrontale Population prinzipiell keine funktionalen α_2 -Autorezeptoren *besitzt* (ähnlich wie die meso-präfrontalen Zellen der VTA). Dies wäre die stärkste Hypothese. Eine „schwächere“ Erklärung des erhobenen Befundes besteht darin, dass die verschiedenen LC-Populationen die funktionelle Rolle der α_2 -Autorezeptoren unterschiedlich *regulieren* – z.B. durch eine unterschiedliche Kopplung an GIRK- bzw. Ca^{2+} -Kanäle.

Es ist denkbar, dass die unterschiedlichen Subpopulationen verschieden auf Stress reagieren – der Locus coeruleus ist ja einer der primären Stress-Sensoren des ZNS (Valentino & Van Bockstaele, 2008) –, und es konnte gezeigt werden, dass chronischer Stress zu einer Herabregulierung der α_2 -Autorezeptoren im LC führt (Jedema et al., 2008). Andere Arbeiten sehen auch Hinweise auf eine heterogene Antwort (nicht weiter identifizierter) LC-Zellen beispielsweise auf oxidativen Stress (de Oliveira et al., 2012). Der Stress könnte also auch die α_2 -Autorezeptor-Regulation je nach Subpopulation unterschiedlich beeinflussen. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit kann ein Stress-Faktor, der in den beiden Subpopulationen unterschiedliche Anpassungsprozesse der α_2 -Autorezeptor-Regulation auslöst, auf verschiedenen Ebenen vorliegen: Zunächst bedeuten Narkose und Operation natürlich Stress für den Gesamt-Organismus. Es ist denkbar, dass hierdurch mittelfristige plastische Veränderungen induziert werden, die zum Zeitpunkt der Patch-Clamp-Experimente – zwei bis drei Wochen später – entsprechende selektive Regulationsprozesse bewirkt haben. Auf der Ebene des ZNS besteht zudem durch das mechanische Einführen der Kanüle und die Injektion der Beads mechanischer Stress, der Zelluntergang und damit zwangsläufig plastische Veränderungen zur Folge hat. Schließlich kann die populationsspezifische differentielle Regulation der α_2 -Autorezeptoren auch durch Stress auf Ebene der LC-Zelle selbst ausgelöst sein: Auch wenn eine Überprüfung der elektrophysiologischen Basisparameter ungelabelter LC-Zellen keine signifikanten Unterschiede zu den mit Beads gefüllten Zellen ergab, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Latexbeads einen intrazellulären Stressfaktor für die Zellen darstellten, auf den coeruleo-präfrontale und coeruleo-hippocampale Zellen in Bezug auf die α_2 -Autorezeptor-Regulation je unterschiedlich reagiert haben.– In jedem Fall besteht ein, hier erstmalig beschriebener, Unterschied zwischen projektionsspezifisch verschiedenen Subpopulationen des Locus coeruleus hinsichtlich der funktionellen Rolle ihrer α_2 -Autorezeptoren. Die weiteren erhobenen Befunde weisen ebenfalls in diese Richtung.

Die Analyse des mittleren Rebound Delay im Hyperpolarisationsprotokoll zeigte sowohl ohne als auch mit Yohimbin-Applikation keinen signifikanten Unterschied zwischen coeruleo-präfrontalen und coeruleo-hippocampalen Neuronen (ohne Yohimbin: 1,7 s vs. 1,8 s; mit Yohimbin: 1,5 s vs. 1,2 s). Vgl. Abb. 3.27.

Ein Rebound Delay zeigte sich in allen gemessenen LC-Zellen. Ursächlich zu Grunde liegt dem der *A-Strom*, ein durch niederschwellige Potentiale aktivierter K^+ -Ausstrom, der das Auftreten des ersten Aktionspotentials nach dem Hyperpolarisationspuls verzögert. Die beiden untersuchten Populationen scheinen sich also hinsichtlich des A-Stroms nicht signifikant zu unterscheiden. Eine *sag amplitude*, d.h. ein depolarisierender Strom während des Hyperpolarisationspulses, fehlte im Gegensatz zum A-Strom in allen gemessenen LC-Neuronen. Dies kann auf die Abwesenheit von HCN-Kanälen – Hyperpolarisations-aktivierten unspezifischen Kationenkanälen – im LC hindeuten, die in verschiedenen Zellpopulationen in Herz und Gehirn (z.B. in der dopaminergen VTA; Neuhoff et al., 2002) zur Rhythmogenese beitragen.

Bei α_2 -Blockade ergaben die Messungen in beiden Gruppen eine gleichsinnige Veränderung des Rebound Delay: Coeruleo-präfrontale Neurone zeigen unter Yohimbin einen leichten ($p = 0,37$), coeruleo-hippocampale Neurone hingegen einen deutlicheren Trend ($p = 0,06$) zur Abnahme des Rebound Delay. Die in der coeruleo-hippocampalen Subpopulation unter Yohimbin (knapp nicht signifikant) reduzierte Verzögerung bis zum ersten Aktionspotential nach Hyperpolarisation der Zelle könnte durch die signifikant erhöhte Spontanfrequenz der coeruleo-hippocampalen Zellen bedingt sein (s. oben).

Die Auswertung der Maximalfrequenz der coeruleo-präfrontalen und der coeruleo-hippocampalen Nervenzellen ergab ohne und mit Yohimbin-Applikation keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Populationen (ohne Yohimbin: 61,5 Hz vs. 59,6 Hz; mit Yohimbin: 38,9 Hz vs. 38,7 Hz). Vgl. Abb. 3.28. Dies spricht dafür, dass sich die zugrunde liegenden Kanalprozesse, d.h. vor allem die schnellen Na^+ -Kanäle, in den beiden Populationen nicht stark unterscheiden.

Es zeigte sich allerdings, in beiden Gruppen, eine signifikante Reduktion der Maximalfrequenz unter α_2 -Blockade mit Yohimbin. Dies kann bedingt sein durch unspezifische Kanalveränderungen durch Yohimbin, auch ein Effekt des Lösungsmittels für Yohimbin, DMSO, kann nicht ausgeschlossen werden. Entscheidend ist, dass beide Gruppen gleichsinnig mit und ohne Yohimbin verändert sind. Ein Unterschied zwischen den beiden Populationen zeigte sich in beiden Versuchsreihen diesbezüglich nicht.

Weiterhin wurden aus dem Depolarisationsprotokoll der Haltestrom sowie die Frequenz-Strom-Kurven („f-i-plots“) ausgewertet.

Eine Analyse des Haltestroms (der notwendig war, um die Zelle auf -60 mV zu „halten“) gibt Aufschluss über die permanent stattfindenden Ionenbewegungen über die Zellmembran bzw. die Kanalprozesse. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.32 dargestellt. Es zeigte sich, dass in der coeruleo-hippocampalen Gruppe nach Yohimbin-Applikation ein

deutlich signifikant ($p = 0,002$) negativerer Strom notwendig war, um das Potential zu erreichen ($-29,2$ mV vs. $-55,9$ mV). In der coeruleo-präfrontalen Gruppe zeigte sich keine signifikante Veränderung ($-37,6$ mV vs. $-43,9$ mV; $p = 0,36$). Dies ist erklärbar dadurch, dass coeruleo-hippocampale Neurone normalerweise zu einem gewissen Grad durch Aktivierung ihrer α_2 -Autorezeptoren hyperpolarisiert werden, bei Blockade dieser Rezeptoren durch Yohimbin aber dann deutlich negativere artifizielle Strominjektionen notwendig sind, um dasselbe Potential zu erreichen. In der coeruleo-präfrontalen Gruppe gibt es bei funktionell herabregulierten α_2 -Rezeptoren keinen solchen Effekt bzw. er ist unterhalb der Signifikanzschwelle.

Vergleicht man den Haltestrom coeruleo-präfrontaler und coeruleo-hippocampaler Neurone miteinander, so zeigen coeruleo-präfrontale Neurone, ohne α_2 -Blockade, einen (Trend zu einem) niedrigeren Haltestrom ($37,6$ mV vs. $29,2$ mV; $p = 0,14$). Dies deutet darauf hin, dass das im Hirnschnitt vorhandene Noradrenalin in der coeruleo-hippocampalen Gruppe über α_2 -Rezeptoren die Zellen ein Stück weit hyperpolarisiert, sodass, verglichen mit der coeruleo-präfrontalen Gruppe, weniger injizierter Haltestrom nötig ist. Dies sollte nach Blockade der α_2 -Autorezeptoren nicht mehr zu erwarten sein: die Gabe von Yohimbin kehrt diesen Trend um ($-43,9$ mV vs. $-55,9$ mV; $p = 0,15$).

Eine Auswertung der frequency-current-plots (eine Auftragung der Feuerungsrate einer Zelle gegen den jeweils injizierten Strom im Depolarisationsprotokoll) ergab, ohne α_2 -Blockade, einen signifikant steileren Anstieg ($p = 0,01$) in der coeruleo-hippocampalen Gruppe, verglichen mit der coeruleo-präfrontalen Gruppe ($0,09$ Hz/pA vs. $0,05$ Hz/pA). Vgl. Abb. 3.23. Dies spricht für eine relative Übererregbarkeit der coeruleo-hippocampalen Subpopulation. Dies geht zusammen mit dem signifikant niedrigeren AP-Threshold – dem Schwellenpotential, das ebenfalls ein Maß für die Erregbarkeit einer Zelle darstellt – in dieser Gruppe (s. Abschn. 3.2.1.4, sowie unten). Unter Yohimbin-Applikation findet sich in der coeruleo-hippocampalen Gruppe ebenfalls ein leicht steilerer f-i-slope, verglichen mit der coeruleo-präfrontalen Gruppe ($0,07$ Hz/pA vs. $0,05$ Hz/pA); dieser Unterschied ist aber nicht signifikant ($p = 0,2$). Vgl. Abb. 3.29. Analog findet sich beim AP-Threshold ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (s. Abschn. 3.2.2.4, sowie unten). Die signifikante relative Übererregbarkeit coeruleo-hippocampaler Zellen bei Abwesenheit der α_2 -Blockade mit Yohimbin, verglichen mit coeruleo-präfrontalen Zellen, ist bedingt möglicherweise durch Kompensationsmechanismen bei aufgrund der α_2 -Aktivierung-bedingten Hyperpolarisation niedrigem AP-Minimum (s. Abschn. 3.2.2.4, sowie unten).

4 Diskussion

In hoher zeitlicher Auflösung wurden die einzelnen Aktionspotentiale der beiden LC-Subpopulationen hinsichtlich der Parameter zeitliche Breite des Aktionspotentials, Threshold, Maximum und Minimum analysiert. Die Breite sowie das Maximum coeruleo-präfrontaler und coeruleo-hippocampaler Neurone unterschieden sich zwischen den Subpopulationen jeweils ohne und mit Yohimbin-Applikation nicht signifikant (AP-Breite: Ohne Yohimbin: 3,4 ms vs. 3,0 ms. Mit Yohimbin: 3,8 ms vs. 3,5 ms. AP-Maximum: Ohne Yohimbin: 31,0 mV vs. 32,1 mV. Mit Yohimbin: 15,5 mV vs. 17,6 mV). Innerhalb der coeruleo-hippocampalen Gruppe zeigte sich ein signifikanter Anstieg der AP-Breite bei Yohimbin-Applikation; in der coeruleo-präfrontalen Gruppe zeigte sich keine signifikante Reaktion in Bezug auf die AP-Breite nach Yohimbin-Applikation. Es zeigte sich aber ein deutlich signifikanter, subpopulationsunabhängiger Effekt der Yohimbin-Applikation auf das AP-Maximum mit einer deutlichen Reduktion desselben. Ursächlich zugrunde liegen kann hier z.B. eine unspezifische Blockade von Na^+ -Kanälen durch Yohimbin; auch ein Effekt des Lösungsmittels (DMSO) kann nicht ausgeschlossen werden. Wichtig ist, dass hier kein Unterschied zwischen den Populationen besteht: Coeruleo-präfrontale und coeruleo-hippocampale Neurone sind hinsichtlich des AP-Maximums, jeweils mit und ohne Yohimbin-Applikation, gleich.

In Bezug auf Schwellenpotential (Threshold) und Minimum (das der Nachhyperpolarisation, AHP, entspricht) des einzelnen Aktionspotentials zeigten sich, in der Versuchsreihe ohne Yohimbin, signifikante Unterschiede zwischen den beiden Populationen. Coeruleo-präfrontale Neurone hatten mit -31,3 mV und -63,3 mV signifikant höhere Werte für Threshold bzw. Minimum als coeruleo-hippocampale Neurone mit -34,1 mV und -68,0 mV. Zum Hippocampus projizierende LC-Neurone haben also ein niedrigeres Schwellenpotential ($p = 0,04$), d.h. eine niedrigere Erregbarkeitsschwelle, sowie eine ausgeprägtere Nachhyperpolarisation ($p = 0,005$) als nach präfrontal projizierende LC-Zellen. In der zweiten Versuchsreihe zeigte sich nun, dass diese Unterschiede durch α_2 -Blockade mit Yohimbin *aufgehoben werden*: -28,3 mV und -59,6 mV für coeruleo-präfrontale Zellen vs. -28,3 mV und -59,9 mV für coeruleo-hippocampale Zellen; vgl. Abb. 3.25, sowie Abb. 3.30 und Abb. 3.31. Dies stellt einen weiteren zentralen Befund der vorliegenden Arbeit dar, und soll im folgenden kurz eingeordnet werden.

Eine Analyse der Spontanfrequenzen coeruleo-präfrontaler und coeruleo-hippocampaler Neurone ohne und mit Yohimbin-Applikation erbrachte, wie oben beschrieben, den Verdacht auf eine differentielle α_2 -Autorezeptor-Regulation in den beiden Subpopulationen. Ausgehend hiervon können auch die Unterschiede in Threshold und Minimum des einzelnen Aktionspotentials der beiden Gruppen verstanden werden. Wenn es so ist,

dass selektiv coeruleo-präfrontale Neurone in ihren α_2 -Autorezeptoren herunterreguliert sind, dann werden sie auf den sich in der Badlösung befindlichen Noradrenalin-Tonus im Gegensatz zu coeruleo-hippocampalen Neuronen schwächer bzw. gar nicht reagieren. Die Aktivierung von α_2 -Rezeptoren bewirkt über GIRK-Kanäle – G-Protein-gekoppelte K^+ -Kanäle – eine Hyperpolarisation der Zelle (Williams et al., 1985; Arima et al., 1998; Lüscher & Slesinger, 2010), zudem spielen Ca^{2+} -Kanäle eine Rolle im LC bei der Vermittlung der inhibitorischen Antwort auf α_2 -Stimulation (Chieng & Bekkers, 1999); sowohl T- als auch L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle beeinflussen die Amplitude der Nachhyperpolarisation (und auch die Spontanfrequenz) im LC (Matschke et al., 2015). Dies deckt sich also mit dem Befund eines signifikant niedrigeren Minimums in coeruleo-hippocampalen Zellen verglichen mit den coeruleo-präfrontalen: Coeruleo-hippocampale Zellen weisen (stärkere) hyperpolarisierende Ströme im Rahmen der permanenten GIRK-Aktivierung und inhibitorischen Modulation von Ca^{2+} -Kanälen durch α_2 -Rezeptoren (aktiviert durch sich im Bad befindliches Noradrenalin) auf, sodass die Nachhyperpolarisation bis in negativere Potentialwerte reicht. Durch die Verschiebung des Minimums hin zu negativeren Potentialen bei coeruleo-hippocampalen Neuronen erklärt sich auch der signifikant niedrigere Threshold verglichen mit coeruleo-präfrontalen Neuronen.

Bei Durchführung einer α_2 -Blockade durch Yohimbin zeigte sich folgerichtig eine Nivellierung dieses Unterschieds zwischen der coeruleo-präfrontalen und der coeruleo-hippocampalen Subpopulation. Eine α_2 -Blockade macht also die beiden Gruppen in dieser Hinsicht „gleich“.

Vergleicht man die beiden Subpopulationen unter sich, jeweils ohne und mit Yohimbin-Applikation, zeigt sich in beiden Gruppen für Threshold und Minimum jeweils eine gleichsinnige Änderung (in Richtung positiverer Potentiale), die in der coeruleo-hippocampalen Subpopulation in beiden Fällen stärker ausfällt ($p < 0,05$ für die coeruleo-präfrontale Gruppe, $p < 0,001$ für die coeruleo-hippocampale Gruppe). Der in coeruleo-hippocampalen Neuronen stärker beobachtbare Anstieg von Threshold und Minimum ist erklärbar durch die beschriebenen unterschiedlichen hyperpolarisierenden Ströme in den beiden Populationen: Durch die reduzierte funktionelle Rolle der α_2 -Autorezeptoren bzw. ggf. ihre reduzierte Kopplung an GIRK- und Ca^{2+} -Kanäle in coeruleo-präfrontalen Neuronen fällt eine α_2 -Blockade durch Yohimbin, und damit eine Abnahme der hyperpolarisierenden Ströme, weniger ins Gewicht als in coeruleo-hippocampalen Neuronen, sodass Threshold und Minimum in coeruleo-präfrontalen Zellen weniger stark ansteigen.

4.2.2 Funktionelle Implikationen

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass die elektrophysiologische Grundcharakterisierung coeruleo-präfrontaler und coeruleo-hippocampaler Neurone für beide Gruppen bei den meisten Merkmalen ähnliche Parameter ergeben hat. Dies deckt sich mit der vorbeschriebenen elektrophysiologischen Homogenität des Locus coeruleus-noradrenergen Systems (Williams et al., 1984; Berridge & Waterhouse, 2003; de Oliveira et al., 2010). Da die Nervenzellen des Locus coeruleus zudem über sog. *gap junctions* elektrotonisch gekoppelt sind (Ishimatsu & Williams, 1996; Aston-Jones et al., 1999), können sie auf afferenten Input mit einem nahezu synchronen Feuermuster antworten (Berridge & Waterhouse, 2003). Dies ist physiologisch sinnvoll in Anbetracht der sehr generellen Rolle, die dem Locus coeruleus bei der Vermittlung von Stress und „Arousal“ zukommt. So kann *in vivo* eine koordinierte LC-Antwort sichergestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit beschrieben wurden aber auch Hinweise auf *Unterschiede* zwischen den LC-Populationen, zwischen coeruleo-präfrontalen und coeruleo-hippocampalen Neuronen. Die coeruleo-präfrontale Gruppe zeigte im Gegensatz zur coeruleo-hippocampalen ein fehlendes Ansprechen auf eine Blockade der α_2 -Autorezeptoren durch Yohimbin, das am ehesten erklärbar ist im Rahmen des kompletten Fehlens oder der selektiven Down-Regulation (z.B. durch unterschiedliche Kopplung an GIRK-Kanäle) von α_2 -Rezeptoren. Hinweise auf eine Heterogenität bzw. verschiedene Subpopulationen im Locus coeruleus bzw. im zentralen noradrenergen System finden sich verschiedentlich in der Literatur (Matschke, 2011; de Oliveira et al., 2012; Robertson et al., 2013), projektionsspezifische Unterschiede in der funktionalen Rolle der α_2 -Rezeptoren sind unseres Wissens bislang aber nicht beschrieben. Die funktionellen Implikationen des Befundes könnten, sofern das beobachtete Phänomen auf der *in vivo*-Ebene relevant ist, in einer *selektiven Akzentuierung der coeruleo-präfrontalen Bahn in Stresssituationen* liegen: Bei der mit Stress einhergehenden hohen LC-Aktivierung sind coeruleo-präfrontale Neurone vom negativen Rückkopplungsmechanismus über α_2 -Autorezeptor-Aktivierung ausgeschlossen bzw. vermindert betroffen, coeruleo-hippocampale Neurone hingegen nicht. Coeruleo-präfrontale Neurone können durch Noradrenalin-Ausschüttung benachbarte coeruleo-hippocampale Neurone hemmen; aber nicht, oder nur eingeschränkt, *vice versa*. Es kommt somit zu einer *relativen Bevorzugung des coeruleo-präfrontalen Pathways*. Übersetzt in funktionelle Zusammenhänge könnte dies bedeuten, dass, bei hohem Stress-Level, die im PFC realisierten kognitiven Funktionen gegenüber den im Hippocampus realisierten Priorität erhalten. Beispielsweise könnte die Aktivierung des Arbeitsgedächtnisses zur Bewältigung einer aktuellen Aufgabe gegenüber der Langzeit-Gedächtniskonso-

4 Diskussion

lidierung priorisiert werden. Bei Aufgabenbewältigung unter starkem Stress würden also alle Ressourcen mobilisiert, um die Situation bestmöglich zu bewältigen, anstelle eines genauen Abspeicherns im Gedächtnis. Die Herausbildung einer solchen Konstellation kann durch einen mit ihr einhergehenden evolutionären Selektionsvorteil bedingt sein.

5 Zusammenfassung

Das Locus coeruleus-noradrenerge System ist die primäre Quelle für zentrales corticales und subcorticales Noradrenalin. Die noradrenergen Projektionen des LC sind an der Modulation einer Vielzahl von funktionellen zentralen Abläufen beteiligt, u.a. an Aufmerksamkeitsprozessen, der Vermittlung von Stress und der Schlaf-Wach-Koordination, aber auch an der Koordination spezifischerer kognitiver Funktionen im Rahmen von Belohnungs-orientiertem Verhalten.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit im anatomisch-topographischen Teil durchgeführten Experimente belegen eine dichte noradrenerge Innervation des präfrontalen Cortex, des dorsalen und ventralen Hippocampus, und des Kleinhirns durch Neurone des Locus coeruleus. Innerhalb des LC sind die nach präfrontal und hippocampal projizierenden Neurone vorwiegend im dorsalen Anschnitt über die gesamte rostro-caudale Achse zu finden. Der Anteil ipsilateral gelabelter Zellen überwiegt deutlich. Coeruleocerebelläre Neurone sind innerhalb des LC sowohl in den dorsalen als auch ventralen Abschnitten, ebenfalls über die gesamte rostro-caudale Achse, zu finden. Der Anteil kontralateral gelabelter Zellen ist relativ höher als bei den anderen Projektionen.

Die im ersten elektrophysiologischen Teil der Arbeit durchgeführten Experimente belegen ein in den Grundeigenschaften ähnliches Feuermuster selektiv identifizierter coeruleo-präfrontaler und coeruleo-hippocampaler Nervenzellen. Einzelne Aktionspotential-Parameter waren signifikant unterschiedlich, hinweisend auf unterschiedliche hyperpolarisierende Ströme in beiden Populationen. Eine Überprüfung des α_2 -Autorezeptor-Status im zweiten elektrophysiologischen Teil der Arbeit ergab ein fehlendes Ansprechen der coeruleo-präfrontalen Neurone auf α_2 -Blockade (im Gegensatz zu den coeruleo-hippocampalen Neuronen); dieser Befund ist vereinbar am ehesten mit fehlenden oder funktionell down-regulierten α_2 -Rezeptoren selektiv in nach präfrontal projizierenden Neuronen des Locus coeruleus. Hierbei handelt es sich um einen in der Literatur nicht vorbeschriebenen Befund.

6 Summary

The locus coeruleus-noradrenergic system is the primary source for central cortical and subcortical norepinephrine. The noradrenergic projections of the LC play a crucial role in the modulation of basal cognitive processes such as stress, arousal and the regulation of the sleep-wake-cycle, but as well in modulating more specific cognitive functions such as balancing exploitation and exploration in reward-related behavior.

The results obtained in the anatomical-topographical part of the present study prove a dense noradrenergic innervation of the prefrontal cortex, both dorsal and ventral hippocampus, and the cerebellum by LC neurons. Within the LC, prefrontal and hippocampal projecting neurons are predominantly located in the dorsal part of the ipsilateral LC, throughout the whole rostro-caudal axis. Coeruleo-cerebellar neurons in contrast are located in both dorsal and ventral LC, throughout the whole rostro-caudal axis. They show contralateral projections to a significantly greater extent.

The experiments carried out in the first electrophysiological part of the study revealed a strong similarity of basic electrophysiological properties of coeruleo-prefrontal and coeruleo-hippocampal projecting neurons. However, single action potential parameters differed significantly, indicating differences in hyperpolarizing membrane currents between the two groups. Testing, in the second electrophysiological part, the α_2 -autoreceptor status in both populations revealed a lack of response to α_2 -blockade (by application of yohimbine) in coeruleo-prefrontal neurons, in contrast to coeruleo-hippocampal neurons. This might be due to an absolute lack or a relative functional down-regulation of α_2 -autoreceptors selectively in prefrontal projecting locus coeruleus neurons. This finding has not been described yet.

Literaturverzeichnis

- Arima, J., C. Kubo, H. Ishibashi, & N. Akaike (1998, Apr). alpha2-adrenoceptor-mediated potassium currents in acutely dissociated rat locus coeruleus neurones. *J Physiol* 508 (Pt 1), 57–66.
- Arnsten, A. F. (1997). Catecholamine regulation of the prefrontal cortex. *J Psychopharmacol* 11(2), 151–162.
- Arnsten, A. F. (2000). Through the looking glass: differential noradrenergic modulation of prefrontal cortical function. *Neural Plast* 7(1-2), 133–146.
- Arnsten, A. F. & B.-M. Li (2005, Jun). Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biol Psychiatry* 57(11), 1377–1384.
- Arvin, B., E. Le Peillet, N. Dürmüller, A. G. Chapman, & B. S. Meldrum (1992, May). Electrolytic lesions of the locus coeruleus or 6-hydroxydopamine lesions of the medial forebrain bundle protect against excitotoxic damage in rat hippocampus. *Brain Res* 579(2), 279–284.
- Aston-Jones, G. & F. E. Bloom (1981, Aug). Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J Neurosci* 1(8), 876–886.
- Aston-Jones, G. & J. D. Cohen (2005). An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: adaptive gain and optimal performance. *Annu Rev Neurosci* 28, 403–450.
- Aston-Jones, G., J. Rajkowski, & J. Cohen (1999, Nov). Role of locus coeruleus in attention and behavioral flexibility. *Biol Psychiatry* 46(9), 1309–1320.
- Benarroch, E. E. (2009, Nov). The locus ceruleus norepinephrine system: functional organization and potential clinical significance. *Neurology* 73(20), 1699–1704.

- Benes, F. M. (2001, Jan). Carlsson and the discovery of dopamine. *Trends Pharmacol Sci* 22(1), 46–47.
- Berglöf, E. & I. Strömberg (2009, Mar). Locus coeruleus promotes survival of dopamine neurons in ventral mesencephalon. an in oculo grafting study. *Exp Neurol* 216(1), 158–165.
- Berridge, C. W. (2008, Jun). Noradrenergic modulation of arousal. *Brain Res Rev* 58(1), 1–17.
- Berridge, C. W. & B. D. Waterhouse (2003, Apr). The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Brain Res Rev* 42(1), 33–84.
- Bethus, I., D. Tse, & R. G. M. Morris (2010, Feb). Dopamine and memory: modulation of the persistence of memory for novel hippocampal nmda receptor-dependent paired associates. *J Neurosci* 30(5), 1610–1618.
- Bondareff, W., C. Q. Mountjoy, & M. Roth (1982, Feb). Loss of neurons of origin of the adrenergic projection to cerebral cortex (nucleus locus ceruleus) in senile dementia. *Neurology* 32(2), 164–168.
- Bouret, S. & S. J. Sara (2005, Nov). Network reset: a simplified overarching theory of locus coeruleus noradrenaline function. *Trends Neurosci* 28(11), 574–582.
- Bracha, H. S., E. Garcia-Rill, R. E. Mraz, & R. Skinner (2005). Postmortem locus coeruleus neuron count in three american veterans with probable or possible war-related ptsd. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 17(4), 503–509.
- Briand, L. A., H. Gritton, W. M. Howe, D. A. Young, & M. Sarter (2007, Oct). Modulators in concert for cognition: modulator interactions in the prefrontal cortex. *Prog Neurobiol* 83(2), 69–91.
- Chieng, B. & J. M. Bekkers (1999, Aug). Gaba(b), opioid and alpha2 receptor inhibition of calcium channels in acutely-dissociated locus coeruleus neurones. *Br J Pharmacol* 127(7), 1533–1538.
- de Oliveira, R. B., F. S. Gravina, R. Lim, A. M. Brichta, R. J. Callister, & D. F. van Helden (2012). Heterogeneous responses to antioxidants in noradrenergic neurons of the locus coeruleus indicate differing susceptibility to free radical content. *Oxid Med Cell Longev* 2012, 820285.

- de Oliveira, R. B., M. C. H. Howlett, F. S. Gravina, M. S. Imtiaz, R. J. Callister, A. M. Brichta, & D. F. van Helden (2010, Sep). Pacemaker currents in mouse locus coeruleus neurons. *Neuroscience* 170(1), 166–177.
- Delfs, J. M., Y. Zhu, J. P. Druhan, & G. S. Aston-Jones (1998, Sep). Origin of noradrenergic afferents to the shell subregion of the nucleus accumbens: anterograde and retrograde tract-tracing studies in the rat. *Brain Res* 806(2), 127–140.
- Deller, T. & T. Sebestény (2007). *Fotoatlas Neuroanatomie*. Elsevier.
- Devoto, P. & G. Flore (2006, Apr). On the origin of cortical dopamine: is it a co-transmitter in noradrenergic neurons? *Curr Neuropharmacol* 4(2), 115–125.
- Devoto, P., G. Flore, P. Saba, M. P. Castelli, A. P. Piras, W. Luesu, M. C. Viaggi, M. G. Ennas, & G. L. Gessa (2008, May). 6-hydroxydopamine lesion in the ventral tegmental area fails to reduce extracellular dopamine in the cerebral cortex. *J Neurosci Res* 86(7), 1647–1658.
- Foote, S. L., F. E. Bloom, & G. Aston-Jones (1983, Jul). Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol Rev* 63(3), 844–914.
- Franklin, K. B. J. & G. Paxinos (2007). *The Mouse Brain in Stereotactic Coordinates* (3 ed.). Academic Press.
- Fuller, R. W. (1982). Pharmacology of brain epinephrine neurons. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 22, 31–55.
- Gasbarri, A., A. Sulli, R. Innocenzi, C. Pacitti, & J. D. Brioni (1996, Oct). Spatial memory impairment induced by lesion of the mesohippocampal dopaminergic system in the rat. *Neuroscience* 74(4), 1037–1044.
- Gasbarri, A., A. Sulli, & M. G. Packard (1997, Jan). The dopaminergic mesencephalic projections to the hippocampal formation in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 21(1), 1–22.
- Gasbarri, A., C. Verney, R. Innocenzi, E. Campana, & C. Pacitti (1994, Dec). Mesolimbic dopaminergic neurons innervating the hippocampal formation in the rat: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study. *Brain Res* 668(1-2), 71–79.
- Grzanna, R. & M. E. Molliver (1980). The locus coeruleus in the rat: an immunohistochemical delineation. *Neuroscience* 5(1), 21–40.

- Gu, H., S. C. Wall, & G. Rudnick (1994, Mar). Stable expression of biogenic amine transporters reveals differences in inhibitor sensitivity, kinetics, and ion dependence. *J Biol Chem* 269(10), 7124–7130.
- Guiard, B. P., M. El Mansari, & P. Blier (2008, Nov). Cross-talk between dopaminergic and noradrenergic systems in the rat ventral tegmental area, locus ceruleus, and dorsal hippocampus. *Mol Pharmacol* 74(5), 1463–1475.
- Haglund, M., M. Sjöbeck, & E. Englund (2006, Dec). Locus ceruleus degeneration is ubiquitous in alzheimer's disease: possible implications for diagnosis and treatment. *Neuropathology* 26(6), 528–532.
- Harley, C. W. (2007). Norepinephrine and the dentate gyrus. *Prog Brain Res* 163, 299–318.
- Heneka, M. T., F. Nadrigny, T. Regen, A. Martinez-Hernandez, L. Dumitrescu-Ozimek, D. Terwel, D. Jardanhazi-Kurutz, J. Walter, F. Kirchhoff, U. Hanisch, & M. P. Kummer (2010, Mar). Locus ceruleus controls alzheimer's disease pathology by modulating microglial functions through norepinephrine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(13), 6058–6063.
- Hille, B. (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates.
- Hobson, J. A., R. W. McCarley, & P. W. Wyzinski (1975, Jun). Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science* 189(4196), 55–58.
- Ishimatsu, M. & J. T. Williams (1996, Aug). Synchronous activity in locus coeruleus results from dendritic interactions in pericoerulear regions. *J Neurosci* 16(16), 5196–5204.
- Jedema, H. P., S. J. Gold, G. Gonzalez-Burgos, A. F. Sved, B. J. Tobe, T. Wensel, & A. A. Grace (2008, May). Chronic cold exposure increases rgs7 expression and decreases alpha(2)-autoreceptor-mediated inhibition of noradrenergic locus coeruleus neurons. *Eur J Neurosci* 27(9), 2433–2443.
- Jouvet, M. (1969, Jan). Biogenic amines and the states of sleep. *Science* 163(3862), 32–41.
- Kobayashi, R. M., M. Palkovits, I. J. Kopin, & D. M. Jacobowitz (1974, Sep). Biochemical mapping of noradrenergic nerves arising from the rat locus coeruleus. *Brain Res* 77(2), 269–279.

- Köbbert, C., R. Apps, I. Bechmann, J. L. Lanciego, J. Mey, & S. Thanos (2000, Nov). Current concepts in neuroanatomical tracing. *Prog Neurobiol* 62(4), 327–351.
- Lammel, S., A. Hetzel, O. Häckel, I. Jones, B. Liss, & J. Roeper (2008, Mar). Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. *Neuron* 57(5), 760–773.
- Lammel, S., D. I. Ion, J. Roeper, & R. C. Malenka (2011, Jun). Projection-specific modulation of dopamine neuron synapses by aversive and rewarding stimuli. *Neuron* 70(5), 855–862.
- Li, C. & J. P. Horn (2008, Dec). Differential inhibition of ca²⁺ channels by alpha₂-adrenoceptors in three functional subclasses of rat sympathetic neurons. *J Neurophysiol* 100(6), 3055–3063.
- Lisman, J. E. & A. A. Grace (2005, Jun). The hippocampal-vta loop: controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron* 46(5), 703–713.
- Liss, B., O. Haeckel, J. Wildmann, T. Miki, S. Seino, & J. Roeper (2005, Dec). K-atp channels promote the differential degeneration of dopaminergic midbrain neurons. *Nat Neurosci* 8(12), 1742–1751.
- Lockrow, J., H. Boger, G. Gerhardt, G. Aston-Jones, D. Bachman, & A.-C. Granholm (2011). A noradrenergic lesion exacerbates neurodegeneration in a down syndrome mouse model. *J Alzheimers Dis* 23(3), 471–489.
- Loughlin, S. E., S. L. Foote, & F. E. Bloom (1986, Jun). Efferent projections of nucleus locus coeruleus: topographic organization of cells of origin demonstrated by three-dimensional reconstruction. *Neuroscience* 18(2), 291–306.
- Loughlin, S. E., S. L. Foote, & J. H. Fallon (1982). Locus coeruleus projections to cortex: topography, morphology and collateralization. *Brain Res Bull* 9(1-6), 287–294.
- Lüscher, C. & P. A. Slesinger (2010, May). Emerging roles for g protein-gated inwardly rectifying potassium (girk) channels in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 11(5), 301–315.
- Mason, S. T. & H. C. Fibiger (1979, Oct). Regional topography within noradrenergic locus coeruleus as revealed by retrograde transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 187(4), 703–724.

- Matschke, L. (2011). *Charakterisierung elektrischer Leitfähigkeiten in Locus coeruleus Neuronen der Maus*. Diplomarbeit, Marburg.
- Matschke, L. A., M. Bertoune, J. Roeper, T. P. Snutch, W. H. Oertel, S. Rinne, & N. Decher (2015, Aug). A concerted action of l- and t-type ca(2+) channels regulates locus coeruleus pacemaking. *Mol Cell Neurosci* 68, 293–302.
- Moore, R. Y. & F. E. Bloom (1979). Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems. *Annu Rev Neurosci* 2, 113–168.
- Morón, J. A., A. Brockington, R. A. Wise, B. A. Rocha, & B. T. Hope (2002, Jan). Dopamine uptake through the norepinephrine transporter in brain regions with low levels of the dopamine transporter: evidence from knock-out mouse lines. *J Neurosci* 22(2), 389–395.
- Moudy, A. M., D. D. Kunkel, & P. A. Schwartzkroin (1993, Dec). Development of dopamine-beta-hydroxylase-positive fiber innervation of the rat hippocampus. *Synapse* 15(4), 307–318.
- Mouton, P. R., B. Pakkenberg, H. J. Gundersen, & D. L. Price (1994, Aug). Absolute number and size of pigmented locus coeruleus neurons in young and aged individuals. *J Chem Neuroanat* 7(3), 185–190.
- Neuhoff, H., A. Neu, B. Liss, & J. Roeper (2002, Feb). I(h) channels contribute to the different functional properties of identified dopaminergic subpopulations in the midbrain. *J Neurosci* 22(4), 1290–1302.
- Numberger, M. & A. Draguhn (1996). *Patch-Clamp-Technik*. Spektrum Akademischer Verlag.
- O’Carroll, C. M., S. J. Martin, J. Sandin, B. Frenguelli, & R. G. M. Morris (2006). Dopaminergic modulation of the persistence of one-trial hippocampus-dependent memory. *Learn Mem* 13(6), 760–769.
- Pozzi, L., R. Invernizzi, L. Cervo, F. Vallebuona, & R. Samanin (1994, Jul). Evidence that extracellular concentrations of dopamine are regulated by noradrenergic neurons in the frontal cortex of rats. *J Neurochem* 63(1), 195–200.

- Purves, D., G. Augustine, D. Fitzpatrick, W. Hall, A. LaMantia, J. McNamara, & S. Williams (2004). *Neuroscience* (3 ed.). Sinauer Associates.
- Robertson, S. D., N. W. Plummer, J. de Marchena, & P. Jensen (2013, Aug). Developmental origins of central norepinephrine neuron diversity. *Nat Neurosci* 16(8), 1016–1023.
- Roeper, J. (2013, Jun). Dissecting the diversity of midbrain dopamine neurons. *Trends Neurosci* 36(6), 336–342.
- Rommelfanger, K. S. & D. Weinshenker (2007, Jul). Norepinephrine: The redheaded stepchild of parkinson’s disease. *Biochem Pharmacol* 74(2), 177–190.
- Room, P., F. Postema, & J. Korf (1981, Sep). Divergent axon collaterals of rat locus coeruleus neurons: demonstration by a fluorescent double labeling technique. *Brain Res* 221(2), 219–230.
- Rossato, J. I., L. R. M. Bevilaqua, I. Izquierdo, J. H. Medina, & M. Cammarota (2009, Aug). Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science* 325(5943), 1017–1020.
- Sara, S. J. (2009, Mar). The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nat Rev Neurosci* 10(3), 211–223.
- Sara, S. J. & S. Bouret (2012, Oct). Orienting and reorienting: the locus coeruleus mediates cognition through arousal. *Neuron* 76(1), 130–141.
- Schiemann, J. (2005). *In vivo Aktivität von identifizierten DA Neuronen im Mittelhirn*. Diplomarbeit, Marburg.
- Smith, C. C. & R. W. Greene (2012, May). Cns dopamine transmission mediated by noradrenergic innervation. *J Neurosci* 32(18), 6072–6080.
- Steindler, D. A. (1981, Nov). Locus coeruleus neurons have axons that branch to the forebrain and cerebellum. *Brain Res* 223(2), 367–373.
- Valentino, R. J. & E. Van Bockstaele (2008, Apr). Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. *Eur J Pharmacol* 583(2-3), 194–203.
- Waterhouse, B. D., C. S. Lin, R. A. Burne, & D. J. Woodward (1983, Jul). The distribution of neocortical projection neurons in the locus coeruleus. *J Comp Neurol* 217(4), 418–431.

- Wedemeyer, C., J. D. Goutman, M. E. Avale, L. F. Franchini, M. Rubinstein, & D. J. Calvo (2007, May). Functional activation by central monoamines of human dopamine d(4) receptor polymorphic variants coupled to girk channels in xenopus oocytes. *Eur J Pharmacol* 562(3), 165–173.
- Williams, J. T., D. H. Bobker, & G. C. Harris (1991). Synaptic potentials in locus coeruleus neurons in brain slices. *Prog Brain Res* 88, 167–172.
- Williams, J. T., G. Henderson, & R. A. North (1985, Jan). Characterization of alpha 2-adrenoceptors which increase potassium conductance in rat locus coeruleus neurones. *Neuroscience* 14(1), 95–101.
- Williams, J. T., R. A. North, S. A. Shefner, S. Nishi, & T. M. Egan (1984, Sep). Membrane properties of rat locus coeruleus neurones. *Neuroscience* 13(1), 137–156.
- Yamamoto, B. K. & S. Novotney (1998, Jul). Regulation of extracellular dopamine by the norepinephrine transporter. *J Neurochem* 71(1), 274–280.
- Yang, H.-W., Y.-W. Lin, C.-D. Yen, & M.-Y. Min (2002, Sep). Change in bi-directional plasticity at ca1 synapses in hippocampal slices taken from 6-hydroxydopamine-treated rats: the role of endogenous norepinephrine. *Eur J Neurosci* 16(6), 1117–1128.
- Zarow, C., S. A. Lyness, J. A. Mortimer, & H. C. Chui (2003, Mar). Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in alzheimer and parkinson diseases. *Arch Neurol* 60(3), 337–341.
- Zhang, W.-P., M. Ouyang, & S. A. Thomas (2004, Sep). Potency of catecholamines and other l-tyrosine derivatives at the cloned mouse adrenergic receptors. *Neuropharmacology* 47(3), 438–449.
- Zhang, Y., W. Zhang, A. H. Johnston, T. A. Newman, I. Pyykkö, & J. Zou (2010, Oct). Improving the visualization of fluorescently tagged nanoparticles and fluorophore-labeled molecular probes by treatment with cuso(4) to quench autofluorescence in the rat inner ear. *Hear Res* 269(1-2), 1–11.

7 Anlage

7.1 Abkürzungs- und Abbildungsverzeichnis

Abkürzungssverzeichnis

Nicht gesondert aufgeführt werden Abkürzungen und Maßeinheiten der *International Federation for Clinical Chemistry* (IFCC) und der *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), sowie *Système International d'Unités*- (SI-)Einheiten.

Abb.	Abbildung
Abschn.	Abschnitt
ACSF	artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit
ADHS	Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitätssyndrom
AHP	Nachhyperpolarisation
AK	Antikörper
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure
AP	Aktionspotential
ATP	Adenosintriphosphat
BL	Bregma-Lambda-Distanz
BSA	Bovines Serum-Albumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CER	Cerebellum
CNQX	6-Cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion
D.HC	Dorsaler Hippocampus
DA	Dopamin
DBH	Dopamin- β -Hydroxylase
DL-AP5	DL-2-Amino-5-phosphonopentanoinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EGTA	Ethylen-glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat

7 Anlage

f	Frequenz
f_{\max}	Maximalfrequenz
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GIRK	G-Protein gekoppelter einwärtsrektifizierender Kaliumkanal
GTP	Guanosintriphosphat
HCN	Hyperpolarisations-aktivierter zyklisch Nukleotid-modulierter Ionenkanal
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-Ethansulfonsäure)
ISI	Interspike Interval
k.o.	knock-out
Ktr.	Kontrolle
LC	Locus coeruleus
L-DOPA	3,4,-Dihydroxyphenylalanin
LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung
NA	Noradrenalin
Ncl.	Nucleus
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
ns	nicht signifikant
OPA	operational amplifier – Operationsverstärker
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFC	präfrontaler Cortex
PNS	Peripheres Nervensystem
PTSD	Posttraumatische Belastungsstörung
R_f	Rückkopplungswiderstand
R_s	Serienwiderstand
REM	Rapid Eye Movement
RNA	Ribonucleinsäure
SN	Substantia nigra
TH	Tyrosin-Hydroxylase
U_{aus}	Ausgangsspannung
U_m	Membranspannung
U_{pip}	Pipettenspannung
U_{soll}	Sollspannung, Kommandopotential
V.HC	Ventraler Hippocampus
VTA	Area tegmentalis ventralis

WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

1.1	LC: Menschlicher Hirnstamm und Koronarschnitt der Maus	6
1.2	Projektionsgebiete des LC	8
1.3	Noradrenalin Biosynthese	9
1.4	LC und Aufmerksamkeit	13
1.5	Noradrenalin und adrenerge Rezeptoren	13
2.1	LC im Wildtyp, Färbung ab43868	23
2.2	LC im Wildtyp, Färbung Millipore n-terminal	23
2.3	LC im Wildtyp und DBH-k.o., Färbung ab43868	24
2.4	Autofluoreszenz im LC	25
2.5	Schichtenanalyse des LC	32
2.6	Patch-clamp-Konfigurationen	34
2.7	Patch-Clamp: Labeling	36
2.8	Elektrophysiologischer Messstand	37
2.9	Schaltbild Vorverstärker	38
2.10	Hyperpolarisations- und Depolarisationsprotokoll	41
2.11	Aktionspotential, Analyseparameter	42
3.1	Injektionsstellen PFC und D.HC	45
3.2	Injektionsstellen V.HC und CER	46
3.3	Injektionsstellen mit Atlas-Bild	47
3.4	LC, PFC-Tracing	48
3.5	LC-Schichtenanalyse, PFC-Tracing	49
3.6	LC, D.HC-Tracing	50
3.7	LC-Schichtenanalyse, D.HC-Tracing	50
3.8	LC, V.HC-Tracing	51
3.9	LC-Schichtenanalyse, V.HC-Tracing	52

3.10 LC, CER-Tracing	53
3.11 LC-Schichtenanalyse, CER-Tracing	53
3.12 Tracing, relative Verteilung im LC	54
3.13 LC, Doppeltracing D.HC und V.HC	55
3.14 LC, Doppeltracing CER und V.HC	55
3.15 LC, Doppeltracing PFC und V.HC	56
3.16 Mittelhirn, Tracing V.HC	57
3.17 Spontanfrequenz	58
3.18 Spontanfrequenz, Balkendiagramm	59
3.19 Rebound Delay	60
3.20 Rebound Delay, Balkendiagramm	60
3.21 Maximalfrequenz	61
3.22 Maximalfrequenz, Balkendiagramm	62
3.23 frequency-current-plot	62
3.24 Einzel-Aktionspotential	63
3.25 Einzel-Aktionspotential, Balkendiagramme	64
3.26 Spontanfrequenz Yohimbin, Balkendiagramm	65
3.27 Rebound Delay Yohimbin, Balkendiagramm	66
3.28 Maximalfrequenz Yohimbin, Balkendiagramm	67
3.29 frequency-current-plot Yohimbin	68
3.30 Einzel-Aktionspotential Yohimbin, Balkendiagramme (1)	70
3.31 Einzel-Aktionspotential Yohimbin, Balkendiagramme (2)	71
3.32 Haltestrom, Balkendiagramm	72

7.2 Tabellarischer Lebenslauf

25. 07. 1987	Geburt in Darmstadt als Tobias Alexander Wagner
13. 06. 2006	Abitur an der Edith-Stein-Schule, Darmstadt
2006 – 2013	Studium der Humanmedizin und der Philosophie in Frankfurt a.M., Fribourg/Schweiz und Lübeck
2009 – 2014	Förderung durch das Cusanuswerk (Begabtenförderungswerk)
04. 12. 2013	Approbation als Arzt
14. 01. 2014	M.A. in Philosophie
seit 02/2014	Tätigkeit als Assistenzarzt, Neurologische Klinik der Universität Hei- delberg und Abteilung für Psychiatrie am Asklepios Westklinikum Hamburg

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

7.3 Danksagung

Herzlicher Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Jochen Roeper für die Unterstützung und die motivierende Begleitung meiner Arbeit, der es immer wieder geschafft hat, hinter den Widrigkeiten des experimentellen Alltags die Vision des wissenschaftlichen Verstehens aufzuzeigen. Ich danke ihm weiterhin für die Durchführung von weiterführenden Patch-Clamp-Untersuchungen im Locus coeruleus, die eine Veröffentlichung des Datensatzes möglich machen.

Herzlich danke ich auch Dr. Sabine Krabbe für das engagierte und kompetente Coaching im ersten Teil der Arbeit, das mir einen Begriff davon gegeben hat, was es heißt, (natur-)wissenschaftlich zu arbeiten.

Alois Kreuzer danke ich für sein Engagement für das LC-Projekt, und die Durchführung von ergänzenden Patch-Clamp-Experimenten.

Ich danke weiterhin allen Mitarbeitern des Instituts für Neurophysiologie für eine nette und kollegiale Arbeitsatmosphäre, und für die schnelle Unterstützung bei Problemen jeder Art. Sylvie Kutterer und Alois Kreuzer danke ich insbesondere dafür, dass sie mich beim Erlernen der Patch-Clamp-Technik sehr unterstützt haben.

Bea Kern danke ich für die kompetente Durchführung von Tracing-Operationen, die für die abschließenden ergänzenden Patch-Clamp-Experimente nötig waren.

Annika Parg danke ich herzlich für die Unterstützung bei der histologischen Aufarbeitung der Hirnschnitte.

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Anatomische und elektrophysiologische Eigenschaften identifizierter Subpopulationen im Locus coeruleus-noradrenergen System. Eine Studie an der adulten Maus

im Institut für Physiologie II (Sinnes- und Neurophysiologie) unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Jochen Roeper ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)