

Tandemporenkaliumkanäle in der Amygdala
Tandem Pore Potassium Channels in the Amygdala

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorgelegt von

Tina Melanie Dobler

aus

Tübingen

Würzburg, 2011

Eingereicht am:.....

Mitglieder des Promotionskomitees:

1. Gutachter(in):.....

2. Gutachter(in):.....

Tag des Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunden ausgehändigt am:.....

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2007 bis März 2010 am Institut für Physiologie der Universität Würzburg angefertigt.

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Weiterhin versichere ich, dass die Dissertation bisher nicht in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat und ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Neu-Isenburg, den

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
TABELLENVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGEN	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 Furchtverhalten, Amygdala und Ionenkanäle	1
1.2 Kaliumkanäle	1
1.3 K _{2P} -Kanäle	2
1.4 TASK-3	4
1.5 Amygdala	5
1.5.1 Die Anatomische Organisation der Amygdala	5
1.5.2 Die Konnektivität der Amygdala	5
1.5.3 Rezeptoren innerhalb der Amygdala	6
1.5.4 Die Funktionen der Amygdala	7
1.5.5 Die Mediale Amygdala	7
1.6 Fragestellung	8
2 MATERIAL UND METHODEN	10
2.1 Elektrophysiologie	10
2.1.1 Versuchsaufbau	10
2.1.2 Lösungen	10
2.1.3 Elektroden	12
2.1.4 Hirnschnittpräparation	13
2.2 <i>In situ</i> -Hybridisierung	14
2.3 Single-Cell-PCR	14
2.4 Verhaltensversuche	16
2.5 Statistik	16
3 ERGEBNISSE	17
3.1 Untersuchung des TASK-3-Stroms in der medialen Amygdala von Ratten	17
3.1.1 <i>In situ</i> -Hybridisierung an Zellen der medialen Amygdala von Ratten	17
3.1.2 Elektrophysiologische Untersuchungen der medialen Amygdala von Ratten	17
3.1.2.1 Vergleich von Typ-A-/Typ-B-Zellen	18
3.1.2.1.1 Ruhemembranpotenzial & Erregbarkeit von Typ-A- & Typ-B-Zellen	18
3.1.2.1.2 Der Gesamtstrom von Typ-A- und Typ-B-Zellen	19
3.1.2.1.3 Aktionspotenzialform von Typ-A- und Typ-B-Zellen	20
3.1.2.2 Isolation des TASK-3-Strom durch pH-Änderung	22
3.1.2.2.1 Der Differenzstrom von Typ-A-Zellen nach pH-Änderung	22
3.1.2.2.2 Ruhemembranpotenzial & Erregbarkeit der Typ-A- & Typ-B-Zellen bei pH-Änderung	23

3.1.2.2.3	Aktionspotenzialform von Typ-A-Zellen nach pH-Änderung	24
3.1.2.3	Inhibition des TASK-3-Stroms durch Ruthenium Rot.....	25
3.1.2.3.1	Der Differenzstrom von Typ-A-Zellen nach Ruthenium-Rot-Behandlung.....	26
3.1.2.3.2	Ruhemembranpotenzial & Erregbarkeit von Typ-A- & Typ-B-Zellen nach Ruthenium-Rot-Behandlung.....	26
3.1.2.3.3	Aktionspotenzialform in Typ-A-Zellen nach Ruthenium-Rot-Behandlung.....	28
3.1.2.4	Ausschluss anderer Kaliumströme.....	28
3.1.2.5	Modulation des TASK-3-Stroms über G _q -gekoppelte Signaltransduktionswege	29
3.1.2.6	TASK-3-Expressionsnachweis über Single-Cell-RT-PCRs	31
3.2	Untersuchung des TASK-3-Stroms in Wildtyp-Mäusen und TASK-3-Knockout-Mäusen..	32
3.2.1	<i>In situ</i> -Hybridisierung an Zellen der medialen Amygdala von Mäusen.....	33
3.2.2	Elektrophysiologische Untersuchungen der medialen Amygdala von Mäusen	33
3.2.2.1	Vergleich von Typ-A-/Typ-B-Zellen	33
3.2.2.2	Vergleich von Wildtyp- und TASK-3-Knockout-Mäusen	34
3.2.2.2.1	Der Gesamtstrom von Typ-A-Wildtyp- und TASK-3-Knockoutzellen.....	34
3.2.2.2.2	Ruhemembranpotenzial & Erregbarkeit von Typ-A-Wildtyp- & Knockoutzellen	35
3.2.2.2.3	Aktionspotenzialform von Typ-A-Wildtyp- und TASK-3-Knockoutzellen.....	36
3.2.2.3	Inhibition des TASK-3-Stroms durch pH-Änderung	37
3.2.2.3.1	Der Differenzstrom von Typ-A-Wildtypzellen nach pH-Änderung.....	37
3.2.2.3.2	Ruhemembranpotenzial & Erregbarkeit von Typ-A-Wildtyp- & TASK-3-Knockoutzellen bei pH-Änderung.....	38
3.2.2.3.3	Aktionspotenzialform von Typ-A-Wildtypzellen bei pH-Änderung.....	39
3.2.2.4	Isolation des TASK-3-Stroms in Wildtyp-Neuronen durch Ruthenium Rot.....	40
3.2.2.4.1	Der Differenzstrom von Typ-A-Wildtypzellen nach Ruthenium-Rot-Behandlung	40
3.2.2.4.2	Ruhemembranpotenzial & Erregbarkeit von Typ-A-Wildtyp- & TASK-3-Knockoutzellen nach Ruthenium-Rot-Behandlung	41
3.2.2.4.3	Aktionspotenzialform von Typ-A-Wildtypzellen nach Ruthenium-Rot-Behandlung	42
3.3	Verhaltensversuche	43
4	DISKUSSION.....	47
4.1	Physiologie des TASK-3 auf zellulärer Ebene innerhalb der medialen Amygdala.....	47
4.1.1	Physiologie des TASK-3 auf zellulärer Ebene innerhalb der medialen Amygdala von Ratten.....	47
4.1.2	Physiologie des TASK-3 auf zellulärer Ebene innerhalb der medialen Amygdala von Mäusen...	51
4.2	Die TASK-3-Regulation der angeborenen Furcht über die Neuronen der medialen Amygdala	53
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	56
6	SUMMARY	58
7	LITERATUR.....	60
	DANKSAGUNG	68
	LEBENS LAUF	69

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1 Die Struktur der Untereinheit der Tandemporenkaliumkanäle	2
Abbildung 1.2 Dendrogramm über die K_{2P} -Kanäle	3
Abbildung 1.3 Amygdalaein- und -ausgänge	6
Abbildung 3.1 TASK-3-in-situ-Hybridisierung an Ratten.....	17
Abbildung 3.2 Das Ruhemembranpotenzial und die Erregbarkeit von Typ-A- und Typ-B-Zellen.....	19
Abbildung 3.3 Der Gesamtstrom von Typ-A- und Typ-B-Zellen	20
Abbildung 3.4 Die Form der Aktionspotenziale von Typ-A- und Typ-B-Zellen.....	21
Abbildung 3.5 Der Differenzstrom von Typ-A-Zellen nach pH-Änderung	23
Abbildung 3.6 Das Ruhemembranpotenzial und die Erregbarkeit von Typ-A-Zellen nach pH-Änderung	24
Abbildung 3.7 Die Form der Aktionspotenziale in Typ-A-Zellen nach pH-Änderung ..	25
Abbildung 3.8 Der Differenzstrom von Typ-A-Zellen nach Ruthenium-Rot-Behandlung.....	26
Abbildung 3.9 Das Ruhemembranpotenzial und die Erregbarkeit von Typ-A-Zellen nach Ruthenium-Rot-Behandlung	27
Abbildung 3.10 Die Form der Aktionspotenziale von Typ-A-Zellen nach Ruthenium-Rot-Behandlung	28
Abbildung 3.11 Ausschluss anderer Ströme.....	29
Abbildung 3.12 Modulation des TASK-3 Strom über Serotonin.....	30
Abbildung 3.13 Single-Cell-RT-PCR mit elektrophysiologischem Vergleich von Typ-A- und Typ-B-Neuronen	32
Abbildung 3.14 TASK-3-in-situ-Hybridisierung an Mäusen	33
Abbildung 3.15 Der Gesamtstrom von Typ-A- und Typ-B-Zellen in Mäusen.....	34
Abbildung 3.16 Der Gesamtstrom von Typ-A-Wildtyp- und Knockoutzellen.....	35
Abbildung 3.17 Das Ruhemembranpotenzial und die Erregbarkeit von Typ-A-Wildtyp- und Knockoutzellen.....	36
Abbildung 3.18 Die Form der Aktionspotenziale von Typ-A-Wildtyp- und Knockoutneuronen.....	37
Abbildung 3.19 Der Differenzstrom von Typ-A-Wildtypzellen nach pH-Änderung	38
Abbildung 3.20 Das Ruhemembranpotenzial und die Erregbarkeit von Typ-A-Wildtypzellen nach pH-Änderung.....	39
Abbildung 3.21 Die Form der Aktionspotenziale von Typ-A-Wildtypzellen nach pH-Änderung	40
Abbildung 3.22 Der Differenzstrom von Typ-A-Wildtypzellen nach Ruthenium-Rot-Behandlung.....	41
Abbildung 3.23 Das Ruhemembranpotenzial und die Erregbarkeit von Typ-A-Wildtypzellen nach Ruthenium-Rot-Behandlung.....	42
Abbildung 3.24 Die Form der Aktionspotenziale von Typ-A-Wildtypzellen nach Ruthenium-Rot-Behandlung.....	43
Abbildung 3.25 Freezingverhalten in Wildtyp- und Knockouttieren nach TMT-Präsentation.....	46
Abbildung 4.1 Die angeborene Furchtreaktion bei Prädatorenduftpräsentation	54

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1 Zusammensetzung der künstlichen Zerebrospinalflüssigkeit.....	11
Tabelle 2.2 Zusammensetzung der Messlösung für die pH-Experimente	11
Tabelle 2.3 Zusammensetzung der Messelektrodenlösung	12
Tabelle 2.4 Zusammensetzung der Präparationslösung	13
Tabelle 2.5 Zusammensetzung der Polymerasenkettenreaktion.....	15
Tabelle 2.6 Cyclingparameter der Polymerasenkettenreaktion	15
Tabelle 2.7 Primersequenzen für die Polymerasekettenreaktion	15

ABKÜRZUNGEN

4-AP	4-Aminopyridin
5HT	Serotonin
ACSF	artificial cerebrospinal fluid = künstliche Zerebrospinalflüssigkeit
ATP	Adenosintriphosphat
BNST	bed nucleus of the stria terminalis
cDNA	complementary DNA
COS7-Zellen	Nierenzellen der grünen Meerkatze
CRF	Corticotrophin-releasing Hormon
DHPG	Dihydroxyphenylglycine
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraessigsäure
GABA	γ -Aminobuttersäure
GIRK	G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HEK293-Zellen	human embryonic kidney cell
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2ethansulfonsäure
K _{2P} -Kanal	Tandemporenkaliumkanal
KO	Knockout
MeA	mediale Amygdala
mGlu	Metabotropic glutamate receptor group I
NPY	Neuropeptid Y
NTP	Nukleosidtriphosphat
p14	postnataler Tag 14
PBS	phosphate buffered saline
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
RNA	Ribonukleinsäure
TALK	TWIK-related alkaline pH activated K ⁺ channel
TASK	TWIK-related acid-sensitive K ⁺ channel
TEA	Tetraethylammonium
THIK	tandem pore domain halothane inhibited K ⁺ channel
TMT	Trimethylthiazoline
TOK-1	tandem outward K ⁺ channel
TRAAK	TWIK-related arachidonic acid stimulated K ⁺ channel
TREK	TWIK-related K ⁺ channel
TRESK	TWIK-related spinal cord K ⁺ channel
TTX	Tetrodotoxin
TWIK	two pore domain weak inward rectifying K ⁺ channel
WT	Wildtyp

1 EINLEITUNG

1.1 Furchtverhalten, Amygdala und Ionenkanäle

Furcht gehört neben Glück, Trauer, Wut, Überraschung und Ekel zu den primären Emotionen. Diese primären Emotionen haben sich phylogenetisch wahrscheinlich als Reaktionen auf das Eintreten (Glück) oder Ausbleiben (Wut) von positiven verstärkenden Reizen bzw. auf das Eintreten (Furcht) oder Ausbleiben (Glück) von Bestrafungen entwickelt (Deetjen, Speckmann & Hescheler, 2004). Furcht ist hierbei eine emotionale Bewertung von Reizen, die dazu dient Gefahr und Schmerzen zu vermeiden (Dudel, Menzel & Schmidt, 2000). Furcht kann entweder durch einen gefährlichen Stimulus konditioniert (erlernt) oder unkonditioniert (angeboren) sein (Müller & Fendt, 2006). Die Gehirnstruktur, welche die Furcht prozessiert wird Amygdala genannt. Sie ist die wichtigste Gehirnstruktur beim Lernen, Speichern und Erinnern von Furcht (Ehrlich et al., 2009). Zusätzlich moduliert die Amygdala furchtbezogenes Lernen in anderen Gehirnstrukturen wie dem Kortex und dem Hippocampus (McGaugh et al., 2004). Das Angstverhalten kann auf molekularer Ebene der Amygdala auch mit Kaliumkanälen in Verbindung gebracht werden. So führt z.B. eine Nullmutation des GIRK2, ein $G_{i/o}$ -gekoppelter einwärtsgerichteter Kaliumkanal, zu einem reduzierten Angstverhalten in Mäusen (Blednov et al., 2001).

1.2 Kaliumkanäle

Kaliumkanäle treten bereits sehr früh in der Evolution auf (Franciolini & Petris, 1989). Sie konnten in primitiven Organismen wie Protozoen (Eckert & Brehm, 1979) und Coelenteraten (Anderson & Schwab 1982) nachgewiesen werden. Sie kommen in zellulären Membranen des gesamten Tier- und Pflanzenreichs vor und gestatten spezifisch eine passive Diffusion von Kaliumionen durch eine Membran. Die Diffusionsrichtung wird durch die elektrochemische Triebkraft bestimmt. Die Kaliumleitfähigkeit ist involviert in die Membranleitfähigkeit und verantwortlich für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotenzials (O'Connell et al., 2002). Kaliumkanäle lassen sich nach ihrer Funktion einteilen. Somit gibt es spannungsabhängige Kaliumkanäle zur Repolarisation nach einem Aktionspotenzial und einwärtsgerichtete Kaliumkanäle sowie Hintergrundkaliumkanäle zur Stabilisierung des Ruhemembranpotenzials (O'Connell et al., 2002). Eine weitere

Einteilung in drei Superfamilien erfolgt anhand der Struktur ihrer Untereinheiten: (1) vier Untereinheiten mit sechs Transmembrandomänen und einer Porendomäne, (2) vier Untereinheiten mit zwei Transmembrandomänen und einer Porendomäne und (3) zwei Untereinheiten mit vier Transmembrandomänen und zwei Porendomänen als Tandem angeordnet (K_{2P} -Kanäle = Tandemporenkaliumkanäle) (Kindler & Yost, 2005).

1.3 K_{2P} -Kanäle

In der vorliegenden Arbeit wurde die physiologische Funktion eines K_{2P} -Kanals elektrophysiologisch untersucht. Die K_{2P} -Kanäle wurden erstmals 1995 erwähnt (Ketchum et al., 1995). Hier wurde der TOK-1 (= tandem outward K⁺-channel) in *Drosophila melanogaster* beschrieben. K_{2P} leitet sich aus ihrer molekularen Struktur ab (siehe Abbildung 1.1). Sie besitzen pro Untereinheit zwei porenbildende Domänen und vier Transmembrandomänen und assemblieren sich als Dimere. Diese Dimerisation erfolgt wahrscheinlich über Disulfid-Brücken unter Aminosäuren innerhalb der großen extrazellulären Schleife zwischen der Transmembranregion M1 und der Porenregion P1. Beide Porenregionen einer einzelnen K_{2P} -Untereinheit haben ein konserviertes TXG(Y/F)G-Motiv, welches als Selektivitätsfilter dient. Einige K_{2P} -Kanäle haben einen Phenylalaninrest (F), andere einen Tyrosinrest (Y) innerhalb des TXG(Y/F)G-Motives des Selektivitätsfilters in der zweiten Porendomäne. Trotzdem wird die Ionenselektivität durch eine Interaktion des (Y/F)-Restes im TXG(Y/F)G-Motiv und einem konservierten Aspartatrest (D) kurz nach dem TXG(Y/F)G-Motiv gesichert (O'Connell et al., 2002).

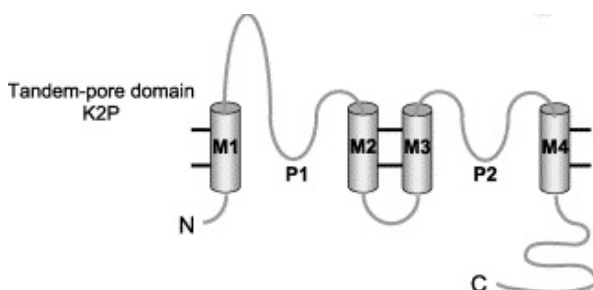


Abbildung 1.1 Die Struktur der Untereinheit der Tandemporenkaliumkanäle

Abgeleitete Sekundärstruktur der Untereinheit eines Tandemporenkaliumkanals (O'Connell et al., 2002).

Man einigte sich bei der Nomenklatur der K_{2P} -Kanäle auf Namen, welche charakteristische pharmakologische oder funktionelle Eigenschaften beschreiben, wie z. B. TWIK-1 für two pore domain weak inward rectifying K⁺ channel. Die Nummer steht für die chronologische Reihenfolge, in welcher verwandte Kanäle kloniert wurden. Kanäle innerhalb einer funktionellen Gruppe sind sich in ihrer Struktur nicht unbedingt ähnlich. So hat z. B. die Struktur des TASK-2 mehr mit der Struktur der TALK-Kanäle gemeinsam als der des TASK-1 (O'Connell et al., 2002).

Es gibt 15 Mitglieder der Tandemporenkaliumkanalfamilie in Säugetieren, welche anhand ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften in sechs Unterfamilien eingeteilt werden können (siehe Abbildung 1.2). Dies sind die TWIK-Unterfamilie mit TWIK-1, TWIK-2 und KCNK7, die TASK-Unterfamilie mit TASK-1, TASK-3 und TASK-5, die TREK-Unterfamilie mit TREK-1, TREK-2 und TRAAK, die TALK-Unterfamilie mit TALK-1, TALK-2 und TASK-2, die THIK-Unterfamilie mit THIK-1 und THIK-2 und die TRESK-Unterfamilie (Goldstein et al., 2001, O'Connell et al., 2002, Lesage, 2003).

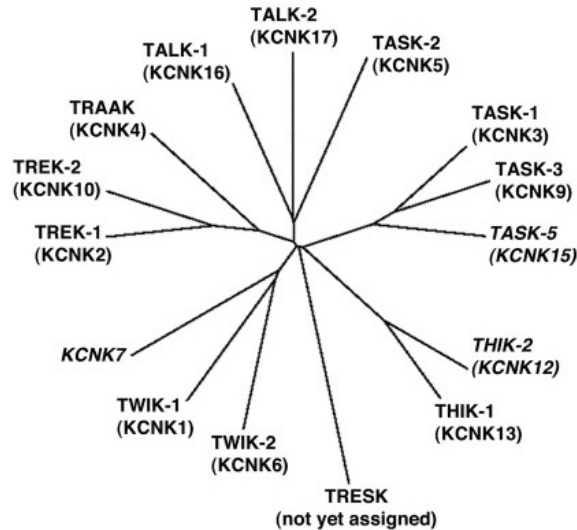


Abbildung 1.2 Dendrogramm über die K_{2P} -Kanäle

Dendrogramm der 15 in Säugetieren bekannten K_{2P} -Kanäle (Kindler and Yost, 2005).

K_{2P} -Kanäle operieren wie kaliumselektive Poren in einem elektrischen Feld. Das heißt sie zeigen Eigenschaften von Leckkanälen. Ferner zeigen sie eine so genannte „Goldman-Hodgkin-Katz-Geichrichtung“ oder „open-rectification“, da diese Ströme eine lineare Funktion zur Spannung darstellen, sobald die Kaliumkonzentration auf

beiden Seiten der Membran identisch ist. Jedoch unter physiologischen Bedingungen, also wenn die intrazelluläre Kaliumkonzentration hoch und die extrazelluläre Kaliumkonzentration niedrig ist, zeigt sich ein größerer Auswärtsstrom (Goldstein et al., 2001). Außerdem sind sie an allen Membranpotenzialen aktiv und nicht sensitiv für die klassischen Kaliumkanal-Blocker wie z.B. Tetraethylammonium und 4-Aminopyridine (Mathie et al., 1998). Durch diese Eigenschaften wurden sie als Hintergrundkaliumkanäle bezeichnet. Man geht davon aus, dass sie eine große Rolle bei der Festlegung des Ruhemembranpotenzials spielen (Lesage & Lazdunski, 2000). K_{2P} -Kanäle werden durch Pharmaka, physiologische Mediatoren und eine Anzahl von G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Aktivierungswegen reguliert (Mathie, 2006).

1.4 TASK-3

Der in dieser Arbeit untersuchte K_{2P} -Kanal TASK-3 wurde erstmals 2000 zeitgleich von Kim et al. und Rajan et al. beschrieben. Sein Name TASK (= twik-related acid-sensitive K⁺ channel) leitet sich von seiner Säuresensitivität ab. Dieser Kanal reagiert hochsensibel auf Veränderungen des extrazellulären pH-Werts. Eine pH-Veränderung von 7,2 zu 6,4 bzw. 6,0 inhibiert 74 % bzw. 96 % des TASK-3-Stroms. Aus dem Gehirngewebe von Meerschweinchen wurde die cDNA des TASK-3-Kanals isoliert, die für ein 365 Aminosäuren langes Protein codiert, welches eine Homologie von 62 % zu dem verwandten K_{2P} -Kanal TASK-1 aufweist. Seine Untereinheit hat zwei porenbildende Domänen und vier Transmembrandomänen. Eine orthologe Sequenz wurde aus der humanen Genbank kloniert, in den Säugerzelllinien HEK293- (HEK = human embryonic kidney cell) und COS-7-Zellen (= Nierenzellen der grünen Meerkatze) exprimiert und elektrophysiologisch analysiert. Die elektrophysiologischen Messungen in HEK293-Zellen zeigten einen einwärts rektifizierenden Strom mit einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit bei Depolarisation. In COS-7-Zellen wurde ein zeitunabhängiger, nicht-aktivierender, kaliumselektiver Strom gezeigt. Reverse-Transkriptase-PCR zeigte eine starke Expression in mehreren Geweben der Ratte einschließlich Gehirn, Nieren, Leber, Lunge, Grimmdarm (Kolon), Magen, Milz, Hoden und Skelettmuskulatur sowie in geringerer Anzahl im Herzen und kleineren Eingeweiden.

1.5 Amygdala

Der Amygdaloidkomplex ist ein kleines, kugelförmiges Areal, das bei den meisten Säugetieren in den medialen Wänden der Temporallappen des Gehirns lokalisiert ist (Knapska et al., 2007). Zahlreiche Aufgaben wie z.B. die Furchtkonditionierung (Rogan & LeDoux, 1996) oder das belohnungsorientierte Verhalten (Lu et al., 2005; Will et al., 2004) werden ihr zugeschrieben.

1.5.1 Die Anatomische Organisation der Amygdala

Schnitte durch den temporalen Pol der menschlichen cerebralen Hemisphäre enthüllen eine mandelförmige Masse von grauer Substanz, die Karl Friedrich Burdach, ein Leipziger Anatom, im frühen 19. Jahrhundert entdeckte und es auf Grund seiner Form Amygdala (dt. Mandelkern) nannte (Burdach, 1826).

Ungefähr 50 Jahre später wurde mit der mikroskopischen Untersuchung von histologischem Amygdalagewebe begonnen. Dies enthüllte immer mehr strukturelle Unterschiede der Amygdala in Bezug auf ihre Ausdehnung, ihre Anzahl und Klassifizierung von Unterkernen (Swanson & Petrovich, 1998).

Der Amygdaloidkomplex in Ratten setzt sich aus 13 Regionen zusammen. Diese beinhalten spezifische Kerne und den periamygdalären Kortex. Jeder Kern besteht aus einzelnen Unterkernen welche über bereichsübergreifende Pfade miteinander verbunden sind. Diese unterschiedlichen Kerne und ihre Unterkerne stellen die separaten funktionellen und anatomischen Einheiten der Amygdala dar (Pitkänen et al., 1997).

1.5.2 Die Konnektivität der Amygdala

Die Konnektivität innerhalb der Amygdala kann in drei Ebenen eingeteilt werden: internuclear, also zwischen zwei Nuclei; interdivisional, innerhalb eines Nucleus; und intradivisional, innerhalb eines Unterbereichs eines Nucleus (Pitkänen et al., 1997).

Die laterale Amygdala wird im Allgemeinen als Regulator von Informationen in die Amygdala betrachtet. Es ist der Hauptkern für Eingänge aus dem sensorischen System. Der zentrale Nucleus ist eine wichtige Ausgabestelle der Amygdala. Diese Ausgabestelle leitet Informationen in zwei Richtungen weiter. Zum einen zum Kortex (höhere kognitive Funktionen) und zum anderen zu hierarchisch niedrigeren

Hirnregionen, um das vegetative Nervensystem von Sympathikus und Parasympathikus zu regulieren. Ebenfalls gibt es mehrere internucleäre Verbindungen (LeDoux, 2007).

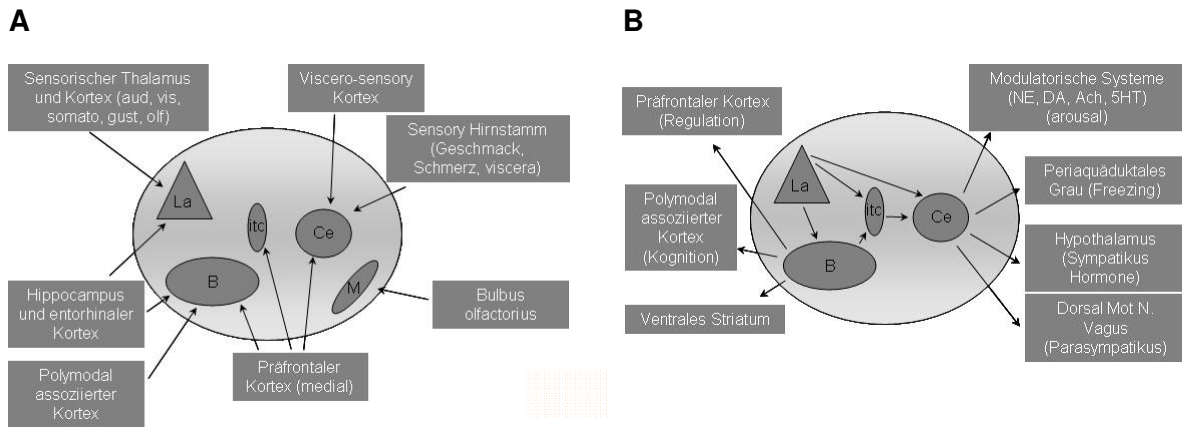


Abbildung 1.3 Amygdalaein- und -ausgänge

A zeigt die Eingänge zu einigen spezifischen Amygdalakernen. B zeigt die Ausgänge von einigen spezifischen Amygdalakernen (nach LeDoux, 2007).

1.5.3 Rezeptoren innerhalb der Amygdala

In der Amygdala sind Rezeptoren für verschiedenartige Hormone, einschließlich Glucocorticoidrezeptoren und Östrogenrezeptoren, unterschiedlich verteilt. Außerdem finden sich zahlreiche Peptidrezeptoren, wie etwa die Rezeptoren für Oxytocin, Vasopressin, Corticotropin-releasing Hormon (CRF) und Neuropeptid Y (NPY). Der Informationsfluss durch die Amygdalareisläufe wird moduliert durch eine Vielzahl von Neurotransmittersystemen. Demnach beeinflusst die Freisetzung von Noradrenalin, Adrenalin, Dopamin, Serotonin und Acetylcholin in der Amygdala die Interaktion zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen (LeDoux, 2007).

Die meisten Eingänge in die Amygdala über den lateralen oder den basalen Kern sind exzitatorisch und glutamaterg. Die Projektionsneurone im zentralen Kern sind von inhibitorischer Natur. Anatomische Anzeichen und elektrophysiologische Daten weisen darauf hin, dass die extrinsische Projektion der zentralen und der medialen Amygdala in erster Linie GABAerg ist. Dagegen sind die extrinsischen Hauptverbindungen der restlichen Amygdalakerne vermutlich glutamaterg (Swanson & Petrovich, 1998).

1.5.4 Die Funktionen der Amygdala

Am besten wurde bisher die Rolle der Amygdala bei der Verarbeitung von Furcht und Furchtkonditionierung untersucht (LeDoux, 1998; Fendt & Fanselow, 1999; Maren, 2001). Untersuchungen der letzten Jahre haben klar begründet, dass innerhalb der Amygdala der basolaterale Komplex und der zentrale Nucleus die Hauptrollen bei der Entstehung und dem Ausdruck von furchtähnlichem Verhalten spielen. Die aktuelle Sicht ist, dass während der Furchtkonditionierung die sensorische Information den basolateralen Komplex über den lateralen Nucleus erreicht. Der basolaterale Komplex kontrolliert dann die Ausgänge aus dem zentralen Kern um Verhaltensantworten und autonome Antworten zu generieren (Sah et al., 2003).

Obwohl Furcht der am bestverstandenste Vorgang in Zusammenhang mit der Amygdala ist, wird sie noch mit einer Vielzahl von anderen emotionalen Funktionen in Verbindung gebracht. Ein großer Teil der Forschung richtet das Augenmerk auf die Rolle der Amygdala bei der Verarbeitung und der Nutzung von Belohnungen, um bestimmtes Verhalten zu motivieren und zu verstärken, ebenso wie bei der Drogenabhängigkeit. Die Amygdala ist auch in emotionalen Situationen wie Aggression, mütterliches, sexuelles und ingestives Verhalten ebenso involviert wie in die Regulation und Modulation einer Vielzahl von kognitiven Funktionen wie Aufmerksamkeit, Wahrnehmung und explizites Gedächtnis (LeDoux, 2007; Sarter & Markowitsch, 1985).

1.5.5 Die Mediale Amygdala

In dieser Doktorarbeit wurden Messungen in einem Unterkern der Amygdala, der medialen Amygdala, vorgenommen.

Der mediale Kern der Amygdala (MeA) integriert chemosensorische Stimuli aus vomeronasal bzw. olfaktorischen Signalwegen und genito- bzw. somatosensorischen Eingängen (Scalia & Winans, 1975; Krettek & Price, 1978b; Lehman & Winans, 1982; Canteras et al., 1992a; Rowe & Erskine, 1993) und wird direkt durch gonadale Steroidhormone beeinflusst (Pfaff & Keiner 1973; Stumpf & Sar, 1975).

Eine der spannendsten Funktionen der medialen Amygdala ist die Verarbeitung von unkonditionierter oder angeborener Furcht. Diese Form der Furcht kann über einen Prädatoren-Duftstimulus untersucht werden. Anfängliche Studien zeigten, dass

weder die laterale Amygdala noch der zentrale Kern an der Verarbeitung von unconditionierter Furcht beteiligt sind, dass aber der BNST (=bed nucleus of the stria terminalis) bei der Weiterverarbeitung von Belang ist (Wallace & Rosen, 2001; Fendt et al., 2003). Messungen der cFos-Aktivierung, die ein indirekter Marker für neuronale Aktivität ist, sowie elektrophysiologische Untersuchungen nach der Präsentation eines Prädatorendufts, enthüllten die Beteiligung der medialen und der basalen Amygdala bei der Verarbeitung solcher Reize (Vazdarjanova et al., 2001; Li et al., 2004; Fendt & Müller, 2006).

Eine weitere bemerkenswerte Funktion der medialen Amygdala ist ihre Rolle beim Aggressionskreislauf von Nagetieren. Hierbei ist hervorzuheben, dass die mediale Amygdala ihre Information direkt aus dem olfaktorischen Bulbus erhält. Dies bedeutet, dass Nagetiere Duftinformation am olfaktorischen Bulbus wahrnehmen, die Information direkt an die mediale Amygdala weitergeleitet wird und von dort aus zum lateralen Septum, zum BNST und zum anterioren hypothalamischen Areal gestreut wird. Handelt es sich bei dem Duftstoff um den eines Feindes, kann die Information vom anterioren hypothalamischen Areal zum perinukleären Grau weitergeleitet werden und dies kann eine aggressive Verhaltensantwort hervorrufen (Nelson & Trainor, 2007).

1.6 Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Rolle des TASK-3-Stroms bei der Steuerung angeborenen Furchtverhaltens zu erarbeiten. Hierfür wurde zunächst die Expression von TASK-3-Kanälen in der Amygdala von Ratten und Mäusen überprüft und anschließend eine erste, generelle elektrophysiologische Beschreibung von Neuronen der medialen Amygdala der Ratte bzw. Maus angefertigt. Aus Publikationen (Karschin et al., 2001) war bekannt, dass in adulten Ratten TASK-3 in der medialen Amygdala exprimiert wird. Wir setzten voraus, dass TASK-3 auch in der medialen Amygdala von Jungtieren exprimiert wird und, dass die elektrophysiologischen Messungen die Rolle des TASK-3 in der medialen Amygdala bei der Stabilisierung des Ruhemembranpotenzials und der Erregbarkeit erklären würden. Die elektrophysiologischen Mäuseexperimente wurden zwischen Wildtyp- und TASK-3-Knockouttieren verglichen und später mit Verhaltensversuchen korreliert. Da TASK-3 wesentlich zur Stabilisierung des Ruhemembranpotenzial

beiträgt gingen wir davon aus, dass in den Knockout-Neuronen das Ruhemembranpotenzial verändert ist und die Neuronen leichter erregbar sind als die Wildtyp-Neurone. Uns interessierte, ob in den Mäusen eine veränderte Expression von TASK-3 in der medialen Amygdala zu einer Verhaltensveränderung führt. Da die mediale Amygdala einen direkten Informationseingang vom Bulbus olfactorius (Riechkolben) erhält, musste der Verhaltensaufbau einen Duftstimulus enthalten. Die Vermutung lag nahe, dass eine Verhaltensveränderung am besten anhand des Angstverhaltens zu sehen sein würde. Deshalb wurde der genotypische Unterschied des Furchtverhaltens über den Duftstimulus Trimethylthiazoline (=TMT), der unkonditionierte bzw. angeborene Furcht auslöst, beschrieben (Wallace et al, 2000). Die Hypothese lag darin, dass die Neurone in der medialen Amygdala der Knockouttiere ohne TASK-3 leichter erregbar sind, als in den Wildtyptieren und somit die Tiere schneller und stärker auf Prädatorengerüche reagieren und daher ängstlicher sind.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Elektrophysiologie

2.1.1 Versuchsaufbau

Die Experimente wurden mit Wistar Ratten (Alter: postnataler Tag 14-21 = p14-p21) und TASK-3 Knockout bzw. Wildtypmäusen (p14-p21) durchgeführt. Die Tötung zur Organentnahme wurde dem Regierungspräsidium Unterfranken, Würzburg, Deutschland angezeigt.

Alle elektrophysiologischen Versuche wurden an einer Messapparatur für die Patch-Clamp-Technik durchgeführt. Diese, in den Neurowissenschaften etablierte Technik, wird ausführlich in Publikationen beschrieben (Hamill 1981, Sakmann & Neher 1997).

Messungen erfolgten an akuten Hirnschnitten, in einer mit ACSF (engl. artificial cerebrospinal fluid = künstliche Zerebrospinalflüssigkeit) durchspülten Ableitkammer (Durchflussrate ca. 2 ml/min, Raumtemperatur), unter optischer Kontrolle eines Auflichtmikroskopes (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit Infrarot-Differenzial-Interferenz-Optik und einer Infrarot sensitiven Kamera (Kappa, Gleichen, Deutschland).

2.1.2 Lösungen

Die Experimente an Rattenschnitten wurden in einer ACSF mit geringer Calciumkonzentration (200 μ M) durchgeführt. Die Experimente an Mäuseschnitten wurden unter normalen Calciumbedingungen (2 mM) durchgeführt. Beide Lösungen wurden konstant mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂) begast.

Tabelle 2.1 Zusammensetzung der künstlichen Zerebrospinalflüssigkeit

2	mM	Kaliumchlorid
1,2	mM	Kaliumhydrogencarbonat
1,3	mM	Magnesiumsulfat-Heptahydrat
26	mM	Natriumhydrogencarbonat
124	mM	Natriumchlorid
10	mM	Dextrose
2 mM/200 µM)		Calciumchlorid

Bei Messungen unter Behandlung mit Ruthenium Rot wurde der ACSF 30 µM Ruthenium Rot (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Deutschland) hinzugeführt.

Für Messungen unter Ansäuerung wurden zwei PIPES-gepufferte Lösungen mit unterschiedlichem pH Wert (7,4 und 6,4 bzw. 6,0) verwendet (siehe Tabelle 2.2). Die pH-Werte wurden durch HCl-Zugabe eingestellt.

Tabelle 2.2 Zusammensetzung der Messlösung für die pH-Experimente

150	mM	Natriumchlorid
2,5	mM	Kaliumchlorid
1	mM	Magnesiumchlorid
2	mM	Calciumchlorid
10	mM	Glucose
25	mM	PIPES

Um spannungsgesteuerte Kalium- und Natriumkanäle zu blockieren, wurden Kontrollversuche mit einer ACSF durchgeführt, der 10 mM Tetraethylammonium (TEA), 100 µM 4-Aminopyridine (4-AP) und 1 µM Tetrodotoxin (TTX) beigesetzt war. TEA, TTX und 4-AP wurden von der Firma SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Deutschland bezogen.

Auch die Lösung für die Messelektroden wurde direkt im Labor angesetzt und setzte sich folgendermaßen zusammen:

Tabelle 2.3 Zusammensetzung der Messelektrodenlösung

140 mM Kaliumchlorid
5 mM Natriumchlorid
2 mM Magnesiumchlorid-Hexahydrat
1 mM Calciumchlorid-Dihydrat
10 mM EGTA
10 mM Hepes
2 mM K_2 -ATP
0,5 mM Na-GTP

Der pH-Wert wurde mithilfe von HCl auf 7,22 und eine Osmolarität von 292 mosmol/L eingestellt.

Kaliumchlorid, Magnesiumsulfat-Heptahydrat, Natriumhydrogencarbonat, Magnesiumchlorid-Hexahydrat, Calciumchlorid-Dihydrat, Kaliumhydrogencarbonat, Natriumchlorid und Dextrose wurden von der Firma Merck GmbH, Darmstadt, Deutschland bezogen. ATP (Adenosintriphosphat), GTP (Guanosintriphosphat), HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) und EGTA (Ethylendiamintetraessigsäure) stammten von der Firma SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Deutschland.

2.1.3 Elektroden

Die Glaselektroden für die Ableitelektroden wurden mithilfe des Flaming/Brown Mikropipette Puller Model P-97 der Firma Sutter Instruments Co., Novato, CA, USA, aus Borosilikatkapillaren mit Filament der Firma Science Products, Laasdorf, Deutschland, gezogen.

Als Referenzelektrode diente ein Silber-Chlorid-Pellet im Bad der Ableitkammer (wpi, Berlin, Deutschland). Die Signale der Ableitelektrode wurden zunächst am

Vorverstärker und anschließend am Hauptverstärker EPC-9 der Firma HEKA, Lambrecht, Deutschland verstärkt.

2.1.4 Hirnschnittpräparation

Die Versuchstiere wurden mit Halothan narkotisiert und anschließend dekapitiert. Das Gehirn wurde zügig herauspräpariert und der rostrale Teil bis zum Cerebellum in eiskalte Präparationslösung (siehe Tabelle 2.4) gegeben.

<i>Tabelle 2.4 Zusammensetzung der Präparationslösung</i>	
<i>2 mM</i>	<i>Kaliumchlorid</i>
<i>1,2 mM</i>	<i>Kaliumdihydrogenphosphat</i>
<i>1,3 mM</i>	<i>Magnesiumsulfat-Heptahydrat</i>
<i>26 mM</i>	<i>Natriumhydrogencarbonat</i>
<i>10 mM</i>	<i>Glucose</i>
<i>210 mM</i>	<i>Saccharose</i>
<i>3 mM</i>	<i>Myoinositol</i>
<i>2 mM</i>	<i>Natriumpyruvat</i>
<i>0,4 mM</i>	<i>Ascorbinsäure</i>
<i>2 mM</i>	<i>Calciumchlorid</i>
<i>2 mM</i>	<i>Magnesiumchlorid</i>

Anschließend wurde mit Hilfe eines Vibratoms (Leica VT 1000 S, Solms, Deutschland) 250 µm dicke Hirnschnitte auf Höhe der Amygdala angefertigt. Dazu wurde das Gehirn mit Gewebekleber (Histoacryl, Braun Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) auf die Objektplattform im Schlitten geklebt und ventral durch einen Agarblock abgestützt. Der Schlitten war stets ca. 1 cm hoch mit tiefgefrorener Präparationslösung gefüllt und wurde nach der Platzierung des Hirnblocks mit eiskalter, Carbogen begaster, Präparationslösung aufgefüllt. Die fertigen Hirnschnitte wurden sofort in die Aufbewahrungskammer überführt. Diese war mit ACSF gefüllt und wurde auf ca. 34 °C erhitzt, sowie fortwährend mit Carbogen begast. Die Hirnschnitte ruhten für mindestens 30 Minuten bei dieser Temperatur und wurden dann bei Raumtemperatur in ACSF elektrophysiologisch untersucht.

2.2 *In situ*-Hybridisierung

Wistar Ratten wurden mit Halothan anästhesiert und dekapitiert. Die Gehirne wurden entnommen, in Tissue Tek (Sekura Fintek, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und bis zum Schneiden bei -20 °C eingefroren. 16 µm dicke Schnitte wurden am Cryostat geschnitten, auf Polylysin beschichteten Objektträger (Thermoscientific, Schwerte, Deutschland) angetaut und luftgetrocknet. Nach einer 5minütigen Fixation in 4% Paraformaldehyd in PBS wurden die Schnitte in PBS gewaschen, getrocknet und bis zur Hybridisierung in Ethanol aufbewahrt.

Digoxigenin-markierte sense und antisense cRNA Sonden wurden *in vitro* aus cDNA Fragmenten transkribiert und in pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA, USA) kloniert (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Die Fragmente korrespondierten zu den Basenpaaren 574-1242 von rTASK-1 (offenes Leseraster) und Basenpaaren 502-1431 von rTASK-3 (offenes Leseraster bis 3'-untranslatierte Region). Die Hybridisierungen wurden nach dem Protokoll von Bartsch et al. (1992) durchgeführt und die Markierung durch alkalische Phosphatase-gebundene Antikörper (Nucleic Acid Detection Kit; Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) erfasst. Zur Identifizierung von Gehirnregionen wurden einige Schnitte mit Thionin Nissl gegengefärbt. Kontrollschnitte wurden hybridisiert mit der sense cRNA Sonde.

2.3 Single-Cell-PCR

Die Single-Cell Reverse Transkription wurde mit Hilfe des iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, München, Deutschland) durchgeführt. Hierfür wurden gewöhnliche Patch-Clamp-Messungen durchgeführt und am Ende der Messung die Zelle ausgesaugt. Glaspipetten wurden bei 200 °C gebacken, um RNAsen zu zerstören und mit genau 6 µl Intrazellulärlösung befüllt. Am Ende der Messung wurde für wenige Sekunden Unterdruck an die Pipette angelegt und somit die Zelle leicht ausgesaugt. Der Inhalt der Glaspipette wurde in die Auffanglösung (9 µl RNase-freies Wasser und 0,5 µl RNase Inhibitor) überführt und direkt im Anschluss eine Reverse Transkription, anhand des Kit-Protokolls der Firma Bio-Rad, durchgeführt.

Zum Nachweis von TASK-3 und dem Serotoninrezeptor 5HT_{2c} wurde die Polymerasekettenreaktion eingesetzt. Der Reaktionsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

Tabelle 2.5 Zusammensetzung der Polymerasekettenreaktion	
14 μ l	RT template
+ 2 μ l	10 x Taq-Polymerasepuffer
+ 1 μ l	Primer ss (25 μ M)
+ 1 μ l	Primer as (25 μ M)
+ 1 μ l	dNTPs (10 μ M)
+ 1 μ l	Taq-Polymerase
20 μ l	Gesamtvolumen

Die Reaktion lief unter folgenden Cycling-Bedingungen im T3-Thermocycler der Firma Biometra, Göttingen, Deutschland, ab:

Tabelle 2.6 Cyclingparameter der Polymerasekettenreaktion			
4	Minuten	94	°C
45	Sekunden	94	°C
45	Sekunden	58	°C 35 X
45	Sekunden	72	°C
7	Minuten	72	°C
∞		4	°C

Die Primer für die Polymerasekettenreaktion, siehe *Tabelle 2.7*, wurden von der Firma Operon Biotechnologies GmbH, Köln, Deutschland, hergestellt. Taq-Polymerasepuffer, Taq-Polymerase und dNTPs wurden von der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland, bezogen.

Tabelle 2.7 Primersequenzen für die Polymerasekettenreaktion	
Genname	Primersequenz
rTASK-3	ss CTC AGA GGC AAG TAC AAC ATC AGC as CCC AGC ACA GCA TAG AAC ATA CA
r5-HT _{2C}	ss CCG ATG GTG GAC GCT TGT T as GCA TGA TGG ACG CAG TTG AAA ATA

2.4 Verhaltensversuche

Für die Verhaltensversuche wurden 16 erwachsene TASK-3 Knockouttiere und 16 erwachsene TASK-3 Wildtypiere verwendet. Die TASK-3 Knockoutmäuse haben den genetischen Hintergrund von C57Bl6/6J x 129S1/SvJ (Brickley et al., 2007).

Die Geruchsexposition fand in einer engen PVC Box (30 x 30 x 30 cm) statt, die mit einem dünnen Plexiglas[®] Dach bedeckt war, um das Verhalten mit einer darüber installierten Kamera zu beobachten. Die gesamte Versuchsanordnung wurde nach Vorschlägen von bisherigen Studien (Day et al., 2004; Janitzky et al., 2009) für eine optimale Ermittlung von TMT-induziertem Verhalten aufgebaut. Einen Tag vor den Verhaltenstests wurden die Tiere für 15 Minuten an die neue Umwelt gewöhnt. Am Folgetag wurden je 16 Tiere, darunter acht Knockout- und acht Wildtypiere einzeln, nacheinander in die Box gesetzt und dann 15 Minuten entweder TMT (35µl) oder destilliertem Wasser (35µl) ausgesetzt, welches auf ein Filterpapier getropft und durch einen Seitenschlitz in die Box gelegt wurde.

Um Geruchsinterferenzen zu vermeiden, wurde die Kontrollgruppe in einem anderen Labor als die TMT-Gruppe untersucht. Bei beiden Räumen wurde auf gleiche Einrichtung, Größe, Geräuschkulisse und Helligkeit geachtet.

Das Verhalten wurde computerbasiert mithilfe des Programms EthoLog2.2 (Ottonin, 2000) ausgewertet. Ausgewertet wurde die Häufigkeit der Verhaltensweisen „Springen (jumping)“, „Bewegungslosigkeit (freezing)“, „Schnüffeln (sniffing)“, „Putzen (grooming)“ und die Berührung des Filterpapiers.

2.5 Statistik

Die Statistik wurde bis auf die Verhaltensversuche mit Hilfe des Programms Ms-Excel 2003 durchgeführt. Es wurden T-Tests zur Berechnung der Signifikanz durchgeführt. Diese T-Tests waren immer zweiseitig und entweder gepaart oder ungepaart. Die Verhaltensversuche wurden mit dem Programm „SPSS17“ statistisch geprüft. Hierbei wurden 2x2 Anovas mit und ohne Messwiederholungen und T-Tests durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Untersuchung des TASK-3-Stroms in der medialen Amygdala von Ratten

3.1.1 *In situ*-Hybridisierung an Zellen der medialen Amygdala von Ratten

Weil bisher nur *in situ*-Hybridisierungen an adulten Ratten publiziert wurden (Karschin et al., 2001), elektrophysiologische Messungen aber methodisch bedingt nur an Jungtieren durchzuführen sind, wurde eine *in situ*-Hybridisierung mit einer TASK-3-Sonde an jungen Ratten angefertigt (siehe Abbildung 3.1). Mehrere frontale Schnitte zeigten im Durchschnitt in 344,4 Zellen \pm 11,17 von insgesamt 404,8 Zellen \pm 15,57 (n=5) der medialen Amygdala eine TASK-3 Expression, was einer TASK-3-Verteilung von 85 % entspricht.

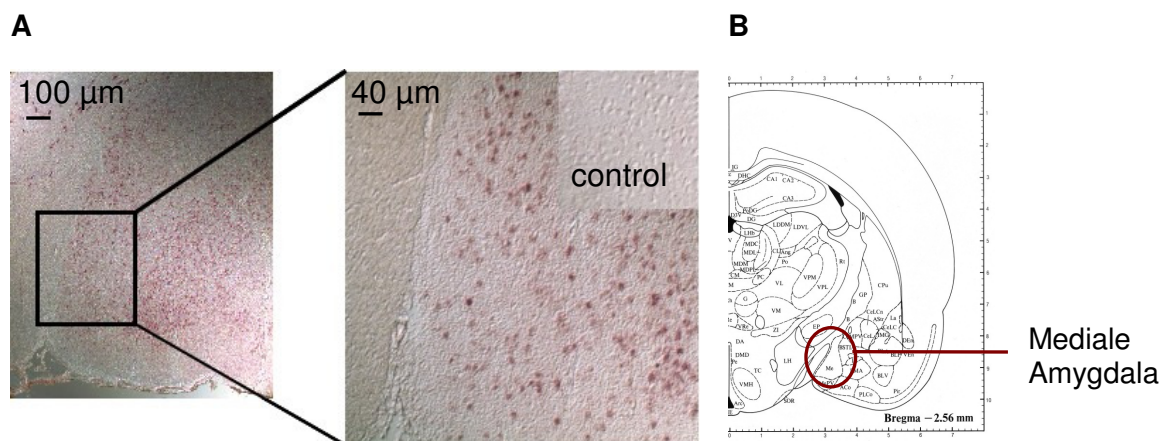


Abbildung 3.1 TASK-3-in-situ-Hybridisierung an Ratten

In situ-Hybridisierung der medialen Amygdala von jungen Wistarratten (p14-p21) mit einer TASK-3-Sonde (A). In ca. 85 % aller Zellen wird TASK-3 exprimiert. Übersichtsschema aus Paxinos & Watson 1998 (B).

3.1.2 Elektrophysiologische Untersuchungen der medialen Amygdala von Ratten

Elektrophysiologische Messungen wurden an akuten Gehirnschnitten von Ratten vorgenommen. Um die elektrische Erregbarkeit unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen und Rückschlüsse auf das physiologische Erregungsmuster dieser Zellen ziehen zu können, wurden Messungen in der Stromklemme (engl. Current-

Clamp) und der Spannungsklemme (engl. Voltage-Clamp) durchgeführt. Bei Messungen in der Spannungsklemme wurden die Zellen auf eine Soll-Spannung von -70 mV geklemmt. Während der Messungen im Stromklemme-Modus wurden die Zellen nicht auf ein bestimmtes Potenzial geklemmt, sondern unter physiologischen Bedingungen, bei ihrem physiologischen Ruhemembranpotenzial gemessen. Somit kann die Erregbarkeit der Zellen über das Ruhemembranpotenzial und den Rheobasestrom beobachtet werden.

3.1.2.1 Vergleich von Typ-A-/Typ-B-Zellen

3.1.2.1.1 Ruhemembranpotenzial & Erregbarkeit von Typ-A- & Typ-B-Zellen

Zur Bestimmung des Ruhemembranpotenzials wurden die Zellen über 50 ms unbehandelt gemessen. Hierbei fiel auf, dass es zwei, sich anhand des Ruhemembranpotenzials unterscheidende Zellpopulationen innerhalb der medialen Amygdala von Ratten gibt. Ein solcher Unterschied wurde bereits für die Neurone der zentralen Amygdala gezeigt und dabei die Neurone in Typ-A- und Typ-B-Zellen eingeteilt (Sah et al., 2003). Im weiteren Textverlauf wird diese Nomenklatur übernommen und die Zellen der medialen Amygdala in Typ-A- und Typ-B-Zellen eingeteilt. Die Typ-A-Zellen haben ein Ruhemembranpotenzial von $-56,31 \text{ mV} \pm 1,51$ ($n=17$) und die Typ-B-Zellen ein etwas depolarisierteres Ruhemembranpotenzial von $-48,39 \text{ mV} \pm 1,55$ ($n=13$; $p=0.001$). Insgesamt traten mehr Typ-A-Zellen (62 %) auf als Typ-B-Zellen (38 %). Dieses Verhältnis, verglichen mit dem Verhältnis von TASK-3-exprimierenden-Zellen zu Zellen, die TASK-3 nicht exprimieren in den *in situ*-Hybridisierungen führte zu der Hypothese, dass es sich bei den Typ-A-Zellen um TASK-3-positive und bei den Typ-B-Zellen um TASK-3-negative Zellen handelt und sollte im Folgenden getestet werden.

Um die Erregbarkeit der Neuronen in der medialen Amygdala zu beschreiben, wurde über einen Zeitraum von 200 ms stufenweise Strom in die Neuronen injiziert. Es wurde entweder aufsteigend von -40 pA bis +20 pA in 5 pA-Schritten oder von -60 pA bis +60 pA in 10 pA-Schritten Strom injiziert. Anhand dieser Messungen wurden der Rheobasestrom und die Spontanaktivität ausgewertet. Unter einem Rheobasestrom versteht man die minimale Strommenge, die injiziert werden muss, um ein Aktionspotenzial auszulösen. Der Rheobasestrom ist in Typ-A-Zellen größer als in Typ-B-Zellen; allerdings nicht signifikant. Der Rheobasestrom der Typ-A-Zellen

liegt bei $7,94 \text{ pA} \pm 7,19$ ($n=17$) und der, der Typ-B-Zellen bei $0,42 \text{ pA} \pm 3,61$ ($n=12$; $p=0,416$).

Unterschiede in der Spontanaktivität bei den Typ-A- bzw. Typ-B-Zellen, d. h. die Generierung von Aktionspotenzialen im Ruhezustand, geben Rückschlüsse auf die Erregbarkeit der Neurone. Insgesamt wurden 30 Zellen untersucht. Unter diesen 30 Zellen waren 17 Typ-A-Zellen. Von diesen Typ-A Zellen waren 4 spontanaktiv und 13 nicht spontanaktiv, was einem Verhältnis von 23 % zu 77 % entspricht. Die restlichen 13 Zellen waren Typ-B-Zellen. Von ihnen waren 4 spontanaktiv und 9 nicht spontanaktiv. Dadurch ergibt sich ein Verhältnis von 30 % zu 70 %. Somit entsteht kein signifikanter Unterschied zwischen Typ-A- und Typ-B-Zellen bei der Spontanaktivität.

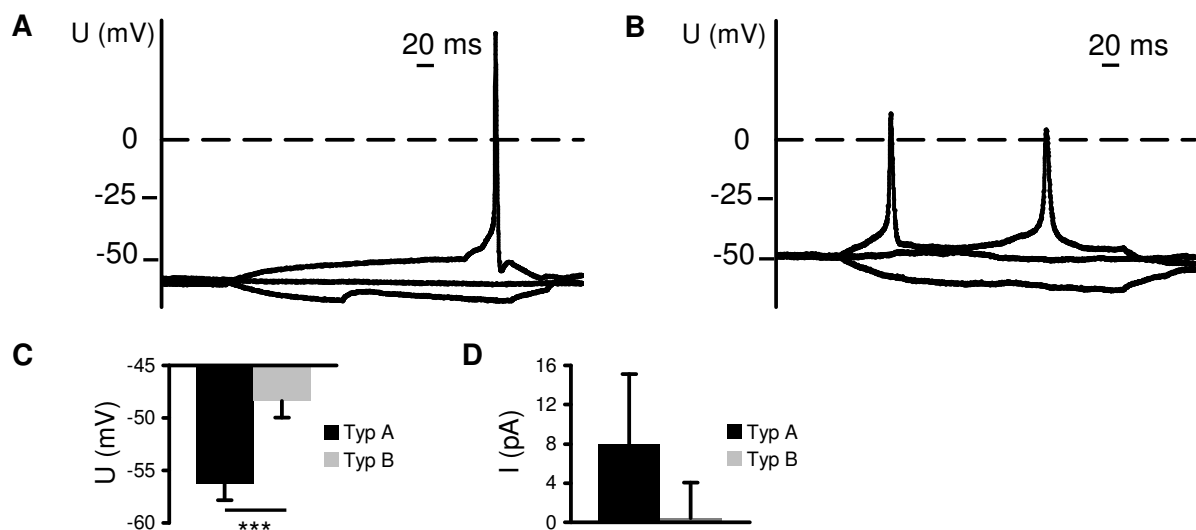


Abbildung 3.2 Das Ruhemembranpotenzial und die Erregbarkeit von Typ-A- und Typ-B-Zellen

Stromapplikationen von -20 pA, 0 pA und 20 pA an Typ-A- (A) und Typ-B-Zellen (B) der medialen Amygdala von Ratten. Typ-B-Zellen zeigen ein zu den Typ-A-Zellen depolarisiertes Ruhemembranpotenzial (C). Die Rheobase ist in den Typ-B-Zellen geringer, unterscheidet sich aber nicht signifikant von der, der Typ-A-Zellen (D).

3.1.2.1.2 Der Gesamtstrom von Typ-A- und Typ-B-Zellen

Der Gesamtzellstrom wurde im Spannungsklemme-Modus gemessen. Hierbei wurde die Zelle permanent auf einer Spannung von -70 mV gehalten und dann 200 ms andauernde Spannungssprünge von -130 mV bis 30 mV im Abstand von 10 mV durchgeführt. Der verbleibende Strom wurde nach ca. 150 ms abgelesen, da hier

bereits alle spannungsgesteuerten Natriumkanäle geschlossen waren und als Strom-Spannungs-Kurve aufgetragen (siehe Abbildung 3.3). Der Gesamtstrom von Typ-A- (n=16) und Typ-B-Zellen (n=12) unterschied sich trotz unterschiedlicher TASK-3-Expression nicht messbar, weil der TASK-3-Anteil am Gesamtstrom sehr klein ist.

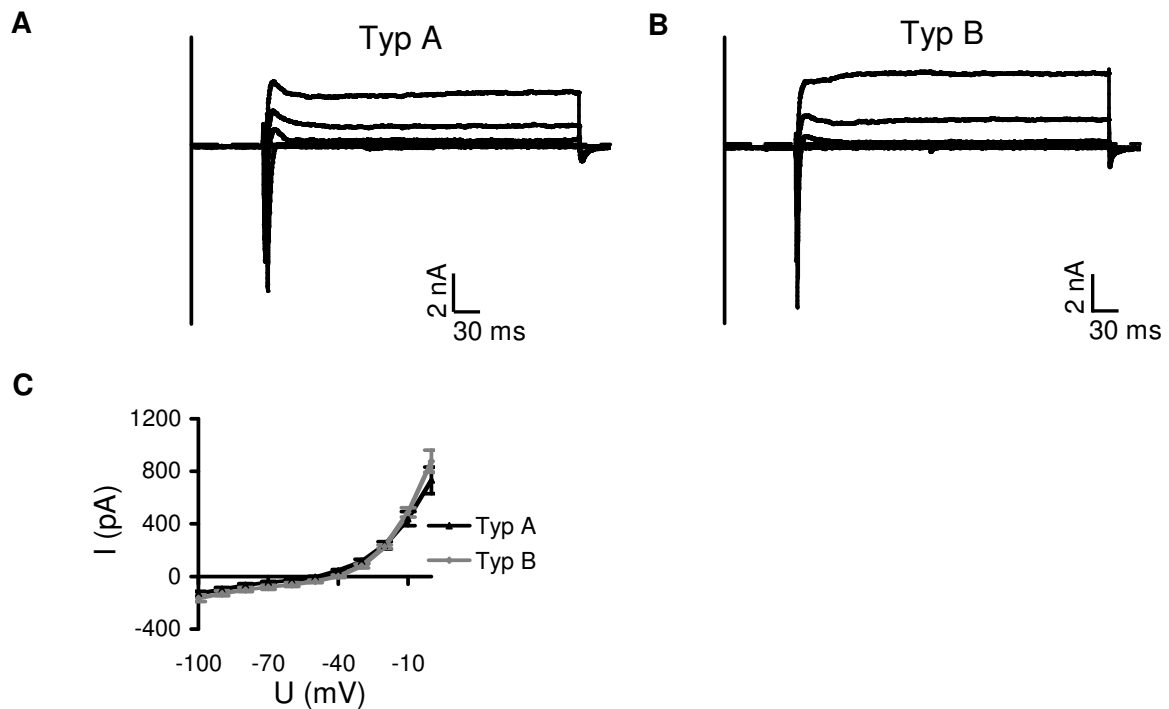


Abbildung 3.3 Der Gesamtstrom von Typ-A- und Typ-B-Zellen

200 ms andauernde Spannungssprünge von -100 mV, -60 mV, -30 mV, 0 mV und 30 mV an einer Typ-A- (A) und einer Typ-B-Zelle (B). Die aus den Spannungssprüngen resultierenden Gesamtströme von Typ-A- und Typ-B-Zellen unterscheiden sich nicht voneinander (C).

3.1.2.1.3 Aktionspotenzialform von Typ-A- und Typ-B-Zellen

Um genauere Rückschlüsse auf die Erregung zu erhalten, wurden Aktionspotenziale vermessen. Hierbei wurde Strom in die Zellen injiziert und pro Zelle ein Aktionspotenzial ausgewählt. Zur Auswahl wurden folgende Kriterien herangezogen: Das Aktionspotenzial muss bei einem Membranpotenzial von ca. -40 mV ausgelöst worden sein und muss das erste ausgelöste einer Aktionspotenzial-Folge sein. Aktionspotenzialamplitude, Aktionspotenzialovershoot (=Anteil eines Aktionspotenzials im positiven Spannungsbereich) und die Aktionspotenzialbreite bei Zweidrittel-Repolarisation wurden ausgemessen.

Da die K_{2P} -Kanäle innerhalb eines Aktionspotenzials für die Wiederherstellung des Ruhemembranpotenzials zuständig sind (Dobler et al., 2007), ist die Zeit in der die Zelle wieder zu ihrem Ruhemembranpotenzial zurückkehrt, in den Typ-B-Zellen ohne TASK-3 verändert (siehe Abbildung 3.4). Die Repolarisation dauert länger und die Aktionspotenzialbreite ist somit signifikant verändert. Die Typ-A-Zellen haben eine Zweidrittel-Breite von $3,21 \text{ ms} \pm 0,24$ ($n=17$) und die Aktionspotenzialbreite der Typ-B-Zellen ist breiter und liegt bei $4,32 \text{ ms} \pm 0,52$ ($n=12$; $p=0,041$). Bei der Amplitude ergab sich ein tendenzieller aber statistisch nicht signifikanter Unterschied zwischen Typ-A- und Typ-B-Zellen. Die Typ-A-Zellen hatten eine Amplitude von $57,93 \text{ mV} \pm 2,73$ ($n=17$) und die Typ-B-Zellen eine geringere Amplitude von $49,49 \text{ mV} \pm 3,17$ ($n=12$; $p=0,055$). Auch beim Overshoot trat ein tendenzieller, nicht signifikanter, Unterschied auf. Die Typ-A-Zellen hatten einen Overshoot von $21,36 \text{ mV} \pm 2,85$ ($n=15$) und die Typ-B-Zellen hatten einen geringeren Overshoot von $14,97 \text{ mV} \pm 3$ ($n=11$; $p=0,142$).

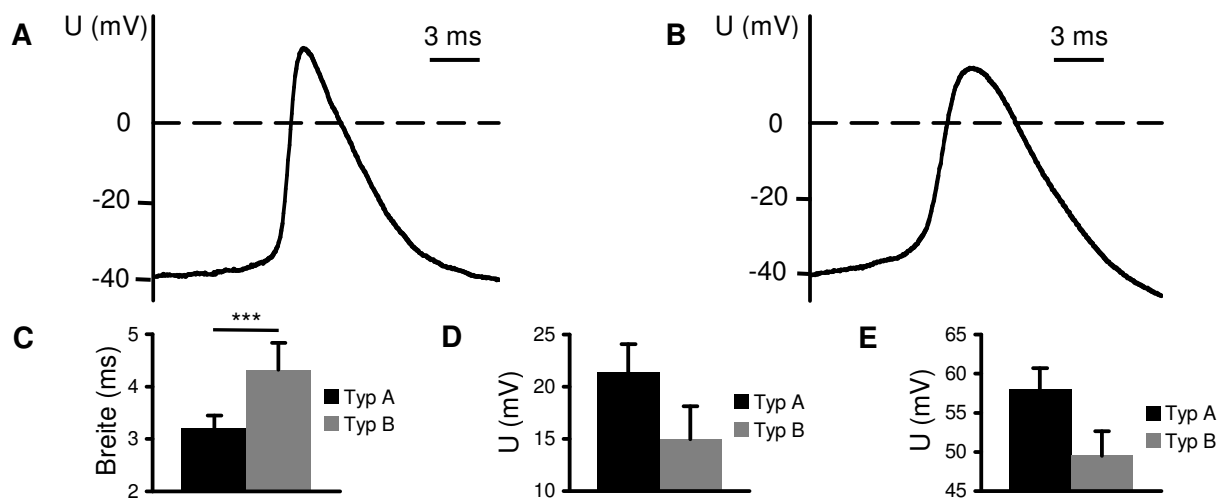


Abbildung 3.4 Die Form der Aktionspotenziale von Typ-A- und Typ-B-Zellen

(A) Aktionspotenzial eines Typ-A-Neurons. (B) Aktionspotenzial eines Typ-B-Neurons. (C) Die Aktionspotenzialbreite von Typ-A- und Typ-B-Zellen unterscheidet sich signifikant. Die Aktionspotenziale von Typ-B-Zellen sind im Vergleich zu den Typ-A-Zellen breiter. (D) Aktionspotenzialovershoot von Typ-A- und Typ-B-Neuronen. (E) Aktionspotenzialamplitude von Typ-A- und Typ-B-Neuronen.

Zusammenfassend ließ sich erkennen, dass sich in Neuronen der medialen Amygdala anhand des Ruhemembranpotenzials und der Aktionspotenzialbreite Typ-A- und Typ-B-Zellen unterscheiden lassen. Auch bei der Rheobase, dem Aktionspotenzialovershoot und der gesamten Aktionspotenzialhöhe gab es

tendenzielle Unterschiede. Lediglich der Gesamtstrom fiel nur geringfügig unterschiedlich aus, da der TASK-3-Anteil am Gesamtstrom sehr gering ist.

3.1.2.2 Isolation des TASK-3-Strom durch pH-Änderung

Um den Anteil des TASK-3-Stroms am Gesamtzellstrom zu messen, wurde die Badlösung angesäuert (von pH 7,4 auf pH 6,0), was eine Inaktivierung des Stroms auslöst. Es wurden dabei wieder das Ruhemembranpotenzial, die Erregbarkeit über den Rheobasestrom und die Aktionspotenzialfrequenz sowie die Aktionspotenziale und der Differenzstrom untersucht.

3.1.2.2.1 Der Differenzstrom von Typ-A-Zellen nach pH-Änderung

Subtrahiert man den Gesamtstrom unter pH 6 in Typ-A-Zellen vom Gesamtstrom unter pH 7,4 der Typ-A-Zellen, erhält man einen Differenzstrom mit einem Umkehrpotenzial von -51,11 mV (siehe Abbildung 3.5). Dieser Differenzstrom stellt den durch Ansäuerung inhibierten und säuresensitiven Strom dar. Das Umkehrpotenzial von -51,11 mV deutet darauf hin, dass es sich hierbei nicht um einen reinen Kaliumstrom handelt, sondern auch noch Komponenten von Strömen mit einem positiveren Umkehrpotenzial beteiligt sind. Das errechnete Umkehrpotenzial für Kalium lag hier bei -102,03 mV.

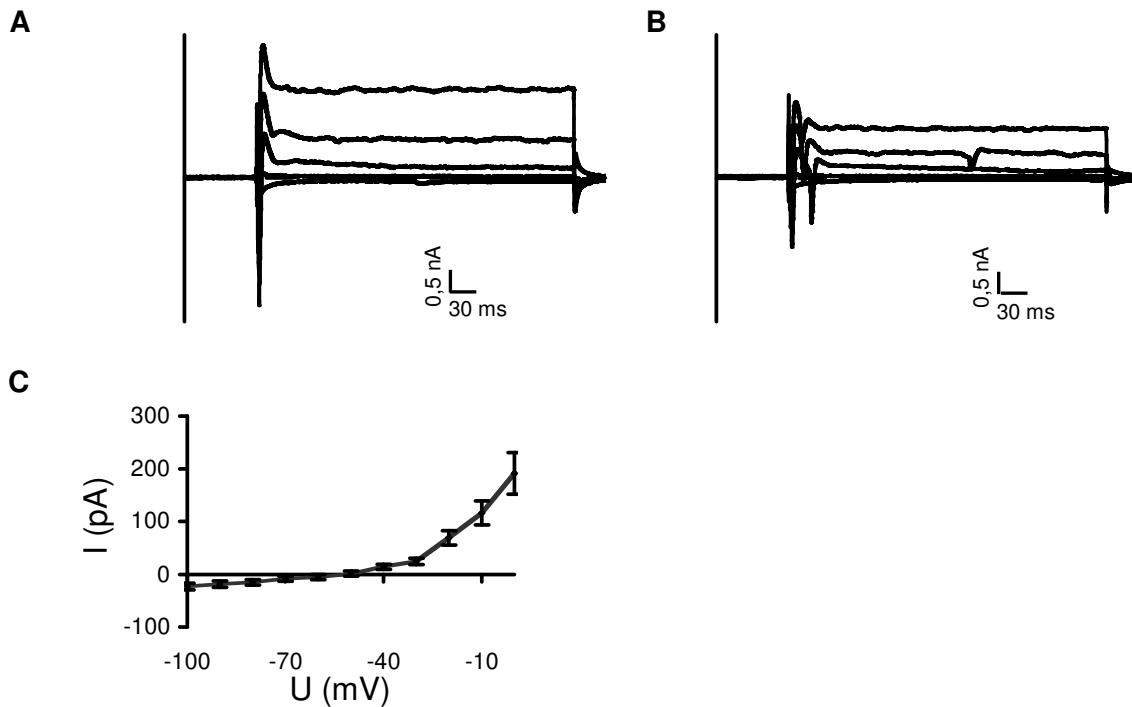


Abbildung 3.5 Der Differenzstrom von Typ-A-Zellen nach pH-Änderung

200 ms andauernde Spannungssprünge von -100 mV, -60 mV, -30 mV, 0 mV und 30 mV an einer Typ-A-Zelle bei pH 7,4 (A) und pH (B). (C) Differenzstrom nach Ansäuerung von pH 7,4 auf pH 6 (n=12) mit einem Umkehrpotenzial von -51,11 mV.

3.1.2.2.2 Ruhemembranpotenzial & Erregbarkeit der Typ-A- & Typ-B-Zellen bei pH-Änderung

Es wurden insgesamt 18 Zellen mit Ansäuerung behandelt. Das Ruhemembranpotenzial von Typ-A-Zellen (n=11) unterschied sich signifikant von dem der Typ-B-Zellen (n=7; $p=0,002$), allerdings zeigte die Ansäuerung keine Effekte. Das Ruhemembranpotenzial der Typ-A-Zellen wurde von $-57,73 \text{ mV} \pm 2,58$ negativer zu $-59,15 \text{ mV} \pm 2,83$ (n=11; $p=0,485$) und auch das der Typ-B-Zellen sank von $-42,25 \text{ pA} \pm 3,44$ auf $-44,78 \text{ pA} \pm 3,2$ (n=7; $p=0,356$). Es war zu erwarten, dass Ansäuerung keine Auswirkung auf das Ruhemembranpotenzial hat, da das Umkehrpotenzial des durch Ansäuerung isolierten Stroms in 3.2.2.1 ungefähr beim Ruhepotenzial der Zellen lag.

Der Rheobasestrom lag bei den Typ-A-Zellen bei $34,3 \text{ pA} \pm 9,98$, wurde durch Ansäuerung nicht verändert und betrug dann immer noch $35,5 \text{ pA} \pm 7,31$ (n=10; $p=0,942$). Bei den Typ-B-Zellen lag der Rheobasestrom nicht signifikant ($p=0,052$)

negativer bei $-12,14 \text{ pA} \pm 22,30$, wurde durch Ansäuerung noch geringer und lag dann bei $-3,57 \text{ pA} \pm 22,46$ ($n=7$; $p=0,628$).

Eine weitere Möglichkeit die Erregbarkeit von Neuronen zu beschreiben ist die Auswertung der Aktionspotenzialfrequenz. Hierfür wurde ausgezählt wie viele Aktionspotenziale ein Neuron bei einer 200 ms lange Stromstimulation von 20 pA generiert. Die Anzahl der Aktionspotenziale bei einer Stromapplikation von 20 pA wurden durch Ansäuerung nicht signifikant verändert. Bei pH 7,4 generierten die Typ-A-Zellen innerhalb 200 ms $1,25 \pm 0,65$ Aktionspotenziale und nach Ansäuerung auf pH 6,0 $1 \pm 0,33$ Aktionspotenzial ($n=8$; $p=0,699$).

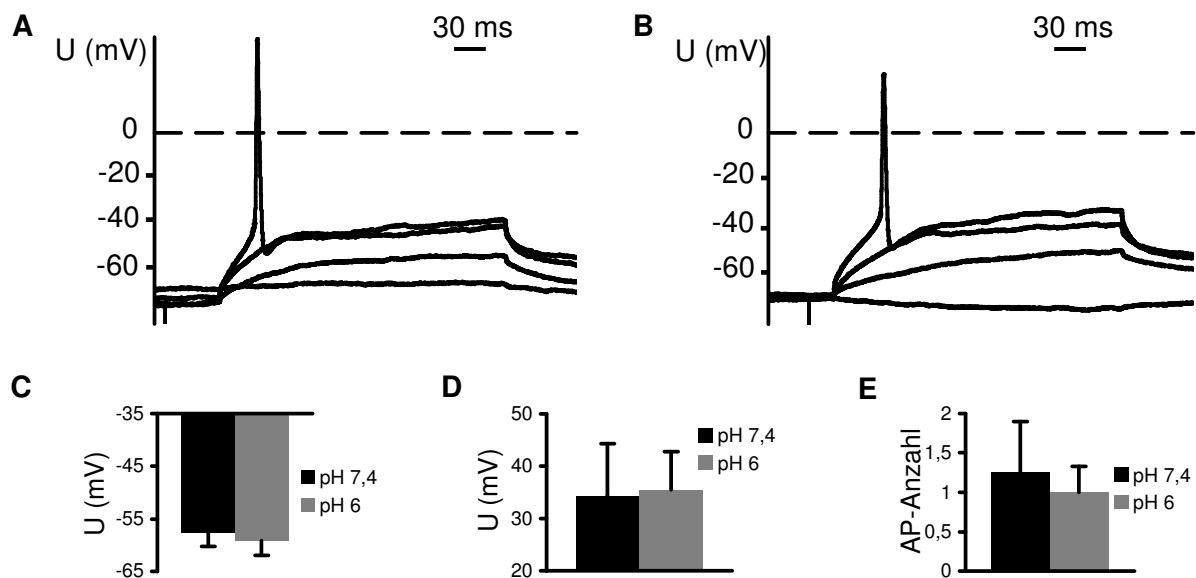


Abbildung 3.6 Das Ruhemembranpotenzial und die Erregbarkeit von Typ-A-Zellen nach pH-Änderung

Ruhemembranpotenzial, Rheobase und Anzahl der Aktionspotenziale von Typ-A-Zellen bei pH 7,4 (A) und pH 6 (B) innerhalb der medialen Amygdala von Ratten. Die Zellen wurden 50 ms lang an ihrem Ruhemembranpotenzial gemessen und dann 200 ms andauernde Stromapplikationen (-10 pA, +10 pA, +30 pA und +50 pA) durchgeführt und anschließend wieder 50 ms am Ruhemembranpotenzial belassen. Das Ruhemembranpotenzial (C) der Rheobasestrom (D) und die Aktionspotenzialanzahl innerhalb 200 ms (E) wurden durch Ansäuerung nicht verändert.

3.1.2.2.3 Aktionspotenzialform von Typ-A-Zellen nach pH-Änderung

Die Typ-A-Zellen waren bei Zweidrittel-Repolarisation unter pH 7,4 $2,33 \text{ ms} \pm 0,26$ breit. Durch Behandlung mit Ansäuerung wurden sie geringfügig breiter und erreichten eine Breite von $2,43 \text{ ms} \pm 0,27$ ($n=8$; $p=0,743$). Die Amplitude der

Aktionspotenziale der Typ-A-Zellen lag bei $73,93 \text{ mV} \pm 6,62$. Durch Ansäuerung sank sie auf $65,95 \text{ mV} \pm 4,42$ ($n=8$; $p=0,181$). Dieser Unterschied ist nicht signifikant. Der Aktionspotenzialovershoot in Typ-A-Zellen betrug $35,06 \text{ mV} \pm 6,22$ und veränderte sich nicht signifikant durch Ansäuerung auf $27,1 \text{ mV} \pm 3,29$ ($n=8$; $p=0,117$).

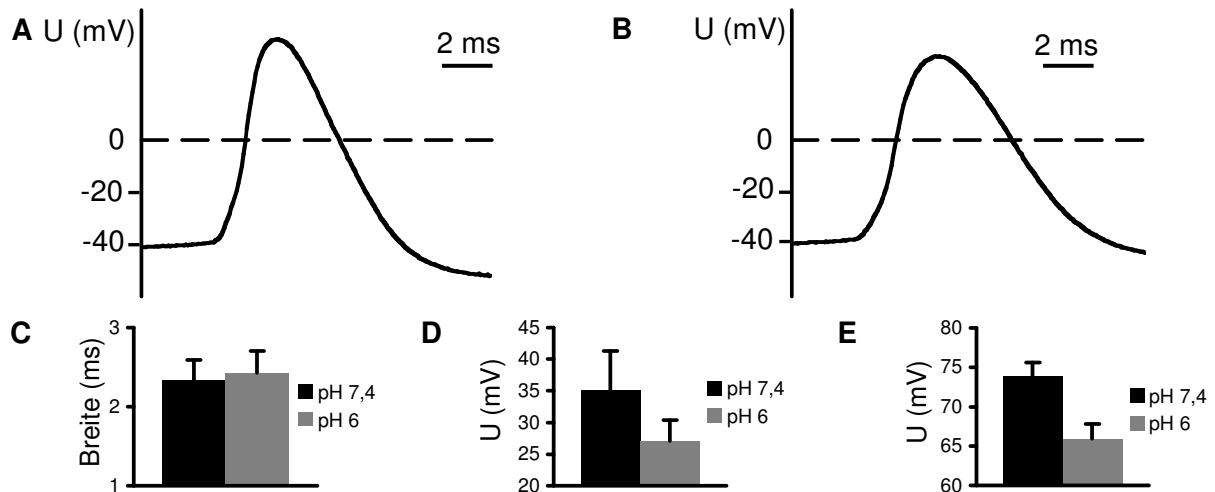


Abbildung 3.7 Die Form der Aktionspotenziale in Typ-A-Zellen nach pH-Änderung

Aktionspotenzial eines Typ-A-Neurons unter pH 7,4 (A) und unter Ansäuerung (B). Die Aktionspotenzialbreite verändert sich nicht durch Ansäuerung (C). Der Aktionspotenzialovershoot wird durch Ansäuerung kleiner (D). Die Aktionspotenzialamplitude wird durch Ansäuerung kleiner (E). Die Unterschiede in D und E sind nicht signifikant.

Bei der hier durchgeführten Blockierung des TASK-3-Stroms durch pH-Veränderung zeigte sich, dass die Aktionspotenzialform nach Ansäuerung tendenziell der, der Typ-B-Zellen ähnelte (erhöhte Aktionspotenzialbreite, -höhe und -overshoot). Bei der Rebase, der Aktionspotenzialanzahl und des Ruhemembranpotenzials wurde keine Veränderung erkannt. Der geringe Einfluss einer pH-Veränderung lässt sich damit erklären, dass nicht nur TASK-3 sondern auch sehr viele andere pH-sensitive Kanäle durch die pH-Veränderung beeinflusst wurden.

3.1.2.3 Inhibition des TASK-3-Stroms durch Ruthenium Rot

Da Ansäuerung als TASK-3-Strom-Inhibitor in Zellen der medialen Amygdala offensichtlich zu unspezifisch ist, wurde ein weiterer TASK-3-Modulator, Ruthenium Rot ($c = 30 \mu\text{M}$), eingesetzt, um den TASK-3-Strom elektrophysiologisch zu isolieren. Ruthenium Rot inhibiert TASK-3, nicht aber TASK-1-Kanäle (Czirjak & Enyedi, 2002).

3.1.2.3.1 Der Differenzstrom von Typ-A-Zellen nach Ruthenium-Rot-Behandlung

Subtrahiert man den Gesamtstrom nach Ruthenium-Rot-Behandlung vom Gesamtstrom der Typ-A-Zellen (n=17), erhält man einen Differenzstrom mit einem Umkehrpotenzial von -66,67 mV (siehe Abbildung 3.8). Dieser Differenzstrom stellt den durch Ruthenium-Rot-Behandlung inhibierten Strom dar. Das Umkehrpotenzial von -66,67 mV deutet darauf hin, dass es sich hierbei um einen Kaliumstrom, genauer einen TASK-3-Strom, handelt (errechneter Wert: $E_K = -107,61 \text{ mV}$).

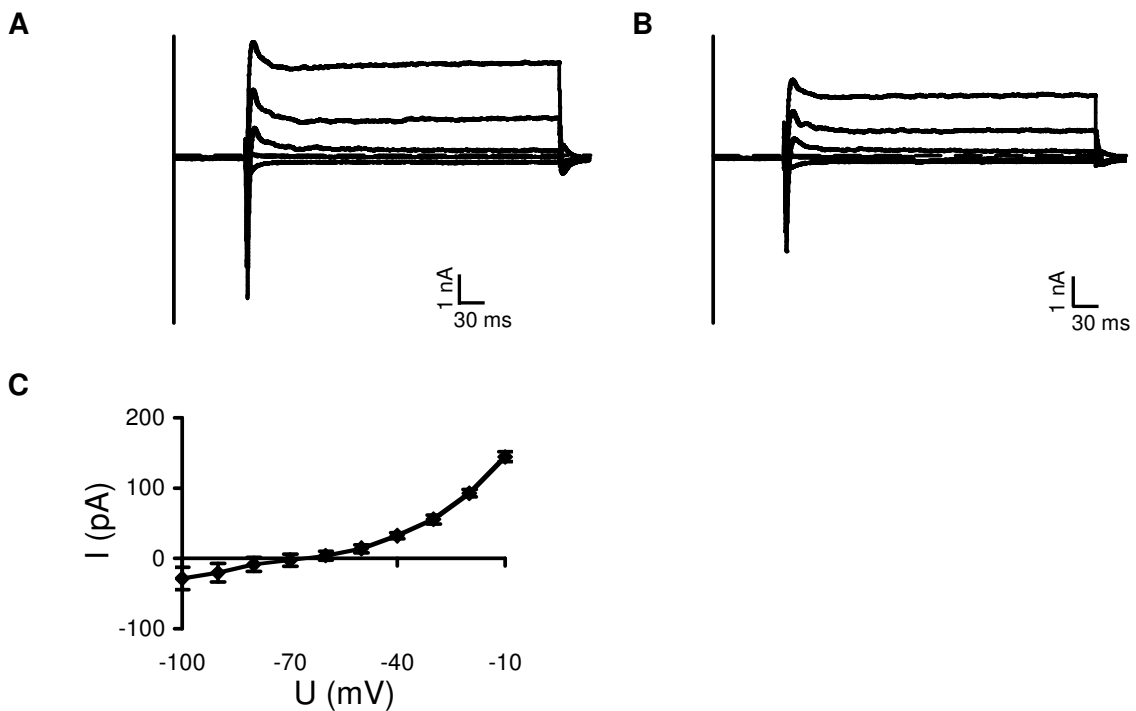


Abbildung 3.8 Der Differenzstrom von Typ-A-Zellen nach Ruthenium-Rot-Behandlung

200 ms andauernde Spannungssprünge von -100 mV, -60 mV, -30 mV, 0 mV und 30 mV an einer Typ-A-Zelle unter Kontrollbedingungen (A) und bei Behandlung mit Ruthenium Rot (B). (C) Differenzstrom einer Typ-A-Zelle durch Behandlung mit Ruthenium Rot.

3.1.2.3.2 Ruhemembranpotenzial & Erregbarkeit von Typ-A- & Typ-B-Zellen nach Ruthenium-Rot-Behandlung

Es wurden 17 Typ-A-Zellen und 13 Typ-B-Zellen untersucht. Die Typ-A-Zellen hatten ein Ruhemembranpotenzial von $-56,31 \text{ mV} \pm 0,18$ (n=17) und die Typ-B-Zellen ein depolarisiertes Ruhemembranpotenzial von $-48,39 \text{ mV} \pm 1,55$ (n=13; p=0,001). Das Ruhemembranpotenzial von Typ-A-Zellen depolarisierte durch die Ruthenium-Rot-Behandlung leicht auf $-54,56 \text{ mV} \pm 1,23$ (n=17; p=0,176) und das

Ruhemembranpotenzial von Typ-B-Zellen depolarisierte ebenfalls geringfügig auf $-46,33 \text{ mV} \pm 3,18$.

In der Rheobase unterschieden sich Typ-A- und Typ-B-Zellen zunächst nicht voneinander ($p=0,523$). Allerdings sank die Rheobase bei Ruthenium-Rot-Behandlung. Die Rheobase von Typ-A-Zellen lag bei $7,94 \text{ pA} \pm 7,19$ und sank durch Ruthenium-Rot-Behandlung signifikant auf $-7,06 \text{ pA} \pm 5,06$ ($n=17$; $p=0,006$). Bei Typ-B-Zellen lag die Rheobase bei nur $1,82 \text{ pA} \pm 3,65$ und blieb durch Behandlung mit Ruthenium Rot unverändert ($I_{\text{Rheobase}} = -11,36 \text{ pA} \pm 5,14$) ($n=11$; $p=0,086$). Die negativen Rheobasewerte deuten an, dass durch Ruthenium-Rot-Behandlung eine Spontanaktivität ausgelöst wurde.

Eine Strominjektion von 20 pA induzierte in Typ-A-Neuronen $1,59 \pm 0,35$ Aktionspotenziale innerhalb von 200 ms . Nach Ruthenium-Rot-Behandlung stieg die Frequenz signifikant auf $3,12$ Aktionspotenziale $\pm 0,44$ ($n=17$; $p=0,0002$) an.

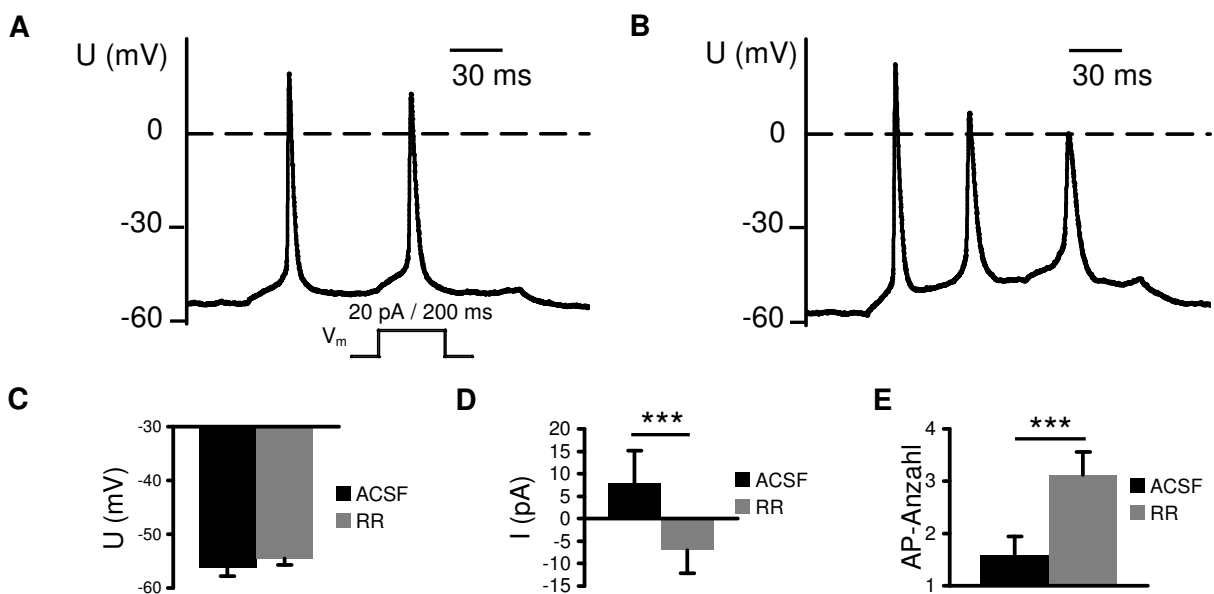


Abbildung 3.9 Das Ruhemembranpotenzial und die Erregbarkeit von Typ-A-Zellen nach Ruthenium-Rot-Behandlung

Strominjektion von 20 pA über einen Zeitraum von 200 ms in Typ-A-Neurone unter Kontrollbedingungen (ACSF; A) und bei Behandlung mit Ruthenium Rot (B). Das Ruhemembranpotenzial wird in Typ-A-Neurone durch Ruthenium Rot nicht beeinflusst (C). In den Typ-A-Neuronen wird die Rheobase (D) und die Anzahl der Aktionspotenziale (E) signifikant durch Behandlung mit Ruthenium Rot verändert.

3.1.2.3.3 Aktionspotenzialform in Typ-A-Zellen nach Ruthenium-Rot-Behandlung

Die Zweidrittelbreite lag bei den Aktionspotenzialen der Typ-A-Zellen unter Kontrollbedingungen bei $3,21 \text{ ms} \pm 0,24$. Diese verbreiterte sich signifikant durch Behandlung mit Ruthenium Rot auf $5,03 \text{ ms} \pm 0,67$ ($n=17$; $p=0,004$). Was bedeutet, dass durch Inhibition des TASK-3 aus einer Typ-A-Zelle eine Typ-B-Zelle nachgeahmt werden kann. Die Aktionspotenzialamplitude bei Typ-A-Neuronen betrug $57,93 \text{ mV} \pm 2,73$. Durch Behandlung mit Ruthenium Rot veränderte sie sich nicht signifikant auf $54,22 \text{ mV} \pm 2,99$ ($n=17$; $p=0,169$). Der Overshoot lag unter Kontrollbedingungen in Typ-A-Zellen bei $21,36 \text{ mV} \pm 2,85$ und wurde durch Behandlung mit Ruthenium Rot etwas geringer und erreichte $16,72 \text{ mV} \pm 3,01$ ($n=15$; $p=0,078$).

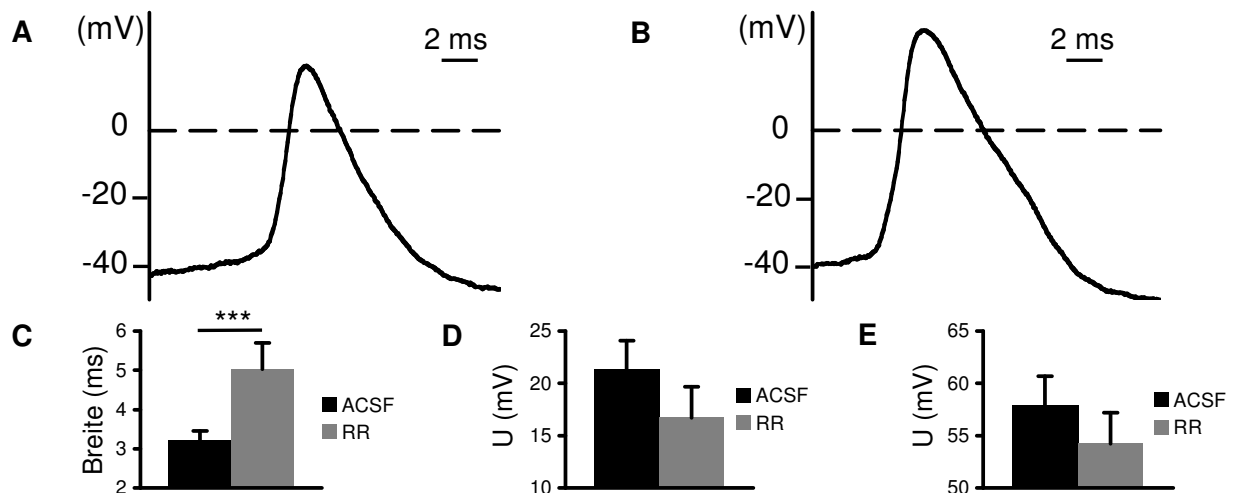


Abbildung 3.10 Die Form der Aktionspotenziale von Typ-A-Zellen nach Ruthenium-Rot-Behandlung

Aktionspotenziale von Typ-A-Neuronen unter Kontrollbedingungen (ACSF; A) und bei Behandlung mit Ruthenium Rot (B). Die Aktionspotenzialbreite wird signifikant breiter durch Behandlung mit Ruthenium Rot (C). Aktionspotenzialamplitude (E) und -overshoot (D) verändern sich durch die Behandlung mit Ruthenium Rot nicht signifikant.

Ruthenium Rot erwies sich als spezifisch zur Blockierung der TASK-3-Kanäle. So zeigten die mit Ruthenium Rot behandelten Zellen eine erhöhte Erregbarkeit durch eine signifikant erhöhte Rheobase, Aktionspotenzialanzahl und -breite.

3.1.2.4 Ausschluss anderer Kaliumströme

Um deutlich zu zeigen, dass der durch Ruthenium Rot inhibierte Strom ein K_{2P^-} , genauer ein TASK-3-Strom ist, wurde die Wirkung von Ruthenium Rot in sechs

Zellen unter Anwesenheit von den Kaliumkanalblockern TEA und 4-AP und dem Natriumkanalblocker TTX untersucht (=Blocker-Mix; BM). Darunter waren fünf Typ-A-Zellen und eine Typ-B-Zelle. Bei den Typ-A-Zellen konnte ein Kaliumstrom durch Ruthenium Rot inhibiert werden. Dieser Strom unterschied sich nach der Behandlung mit Ruthenium Rot innerhalb eines Spannungsbereichs von -130 mV bis -80 mV signifikant vom Grundstrom.

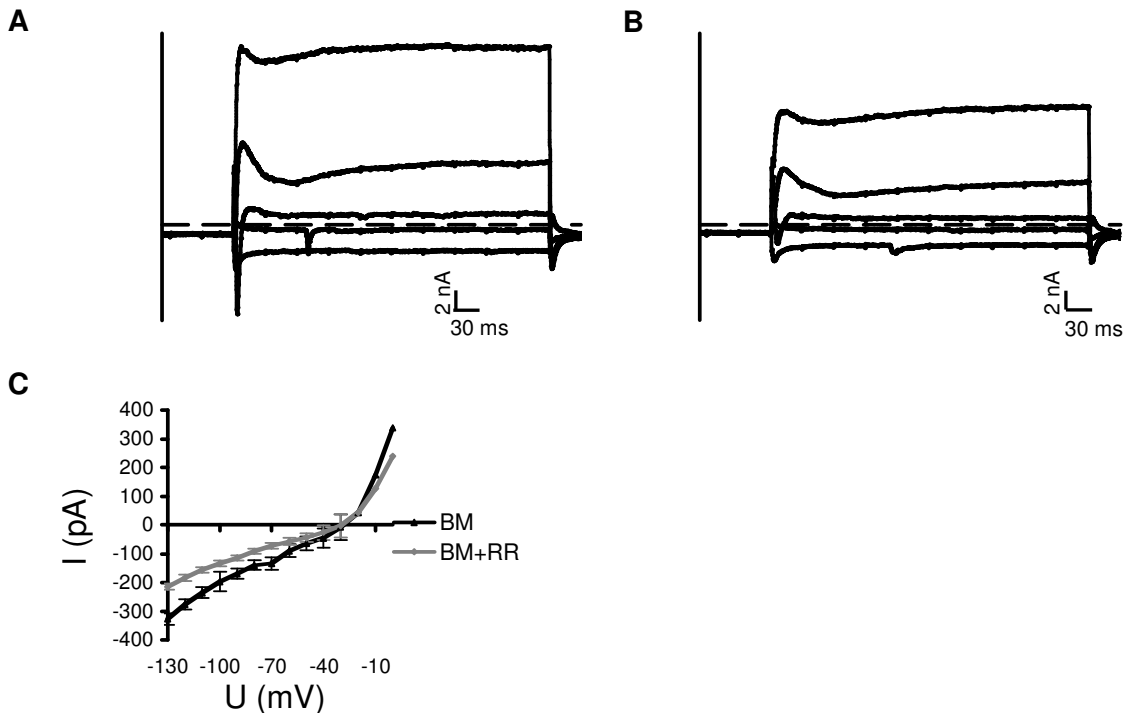


Abbildung 3.11 Ausschluss anderer Ströme

200 ms andauernde Spannungssprünge von -100 mV, -60 mV, -30 mV, 0 mV und 30 mV an einer Typ-A-Zelle unter Kontrollbedingungen mit TEA, TTX und 4-AP (A) und bei Behandlung mit Ruthenium Rot in der in A verwendeten Kontrolllösung (B). (C) Gesamtstrom ($n=5$) unter Kontrolllösung mit TEA, TTX und 4-AP (BM), sowie unter Ruthenium Rot Behandlung in TEA, TTX und 4-AP (BM+RR).

3.1.2.5 Modulation des TASK-3-Stroms über G_q -gekoppelte Signaltransduktionswege

Der TASK-3-Strom kann über einen G_q -gekoppelten Rezeptor-Aktivierungsweg inhibiert werden (Chen et al., 2006). Daher wurde untersucht, ob über Rezeptoragonisten die nachgeschaltete G_q -Signaltransduktion aktiviert und der TASK-3-Strom inhibiert werden kann.

In der medialen Amygdala werden $5HT_2$ -Rezeptoren exprimiert die $G_{q/11}$ -gekoppelt sind (Morilak et al., 1993; Pompeiano et al., 1994; Wright et al., 1995; Cornea-Hérbert

et al., 1999). Als selektiven 5HT_{2c}-Rezeptor-Agonist wurde α -methyl-Serotonin (c = 20 μ M) eingesetzt. Von fünf Zellen zeigten sich drei Zellen sensitiv für α -methyl-Serotonin indem durch die Behandlung der Gesamtstrom inhibiert wurde, die verbleibenden zwei Zellen reagierten nicht. Bei den sensitiven Zellen wurde ein Strom mit einem Umkehrpotenzial von -50 mV inhibiert. Dies entspricht nicht einem reinen Kaliumstrom (berechnetes Umkehrpotenzial -107,61 mV). Allerdings war aufgrund methodischer Limitierungen (Leckstrom, Serienwiderstände u. a.) ein geringfügig schwächeres Potenzial an der Messung zu erwarten.

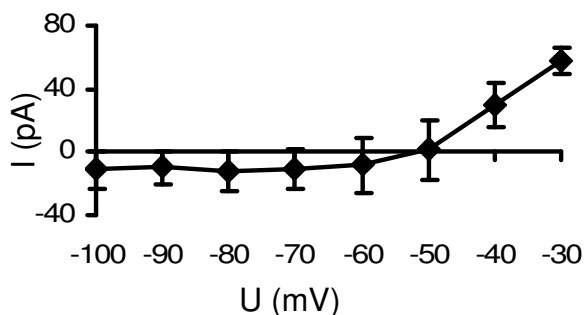


Abbildung 3.12 Modulation des TASK-3 Strom über Serotonin

Der Differenzstrom nach Behandlung mit α -methyl-5HT mit einem Umkehrpotenzial von -50 mV (n=3).

Um zu überprüfen, ob der TASK-3-Strom in den Zellen der medialen Amygdala auch über muskarinische Acetylcholinrezeptoren moduliert wird, wurden neun Zellen mit Muskarin (c = 30 μ M) behandelt. Von diesen neun Zellen reagierten fünf nicht auf Muskarin. Bei drei Zellen wurde ein Strom mit einem Umkehrpotenzial von -35 mV aktiviert und bei einer Zelle ein Strom mit einem Umkehrpotenzial von -50 mV inhibiert.

Um den TASK-3-Strom über einen metabotropen Glutamatrezeptor der Gruppe I (=mGlu1-Rezeptoren) zu inhibieren wurden sechs Zellen mit einem selektiven Agonisten für die mGlu1-Rezeptoren, S-3,5-DHPG, behandelt. Fünf Zellen zeigten sich sensitiv für diesen Agonisten. Es wurde ein Strom mit einem Umkehrpotenzial von -50 mV inhibiert. Dieses Umkehrpotenzial ist zu positiv für einen reinen Kaliumstrom. Andere Ströme wurden daher durch S-3,5-DHPG ebenfalls beeinflusst. Eine Zelle war nicht sensitiv für S-3,5-DHPG.

Eine Isolation des TASK-3-Stroms aus dem Gesamtstrom über Agonisten für 5HT_{2c}, muskarinische Acetylcholin- oder mGluR-Rezeptoren zeigte sich als sehr unspezifisch, da bisher kaum Daten zur Expression dieser Rezeptoren innerhalb der medialen Amygdala von jungen Ratten vorliegen.

3.1.2.6 TASK-3-Expressionsnachweis über Single-Cell-RT-PCRs

Um deutlich nachzuweisen, dass der Unterschied zwischen Typ-A- und Typ-B-Zellen in der Expression von TASK-3 liegt, wurde die TASK-3-Expression in sieben, zuvor elektrophysiologisch gemessenen Zellen mit einer Single-Cell-RT-PCR untersucht. Ruthenium-Rot-sensitive Zellen exprimierten TASK-3 und Ruthenium-Rot-insensitive Zellen nicht. Die Abbildung 3.13 zeigt exemplarisch je eine Typ-A- und eine Typ-B-Zelle.

In adulten Ratten wird der 5HT_{2c}-Rezeptor in der medialen Amygdala leicht exprimiert (Morilak et al., 1993; Pompeiano et al., 1994; Wright et al., 1995; Cornea-Hérbert et al., 1999). Parallel wurde in dieser Arbeit die Expression des Serotonin-Rezeptors 5HT_{2c} in Jungtieren überprüft. In 13 untersuchten Zellen konnte kein einziges Mal 5HT_{2c} nachgewiesen werden. Deshalb ist davon auszugehen, dass 5HT_{2c} in der medialen Amygdala von Ratten dieses Alters nicht exprimiert wird, und die Kopplung an den TASK-3-Kanal über einen anderen 5HT₂-Rezeptor erfolgt.

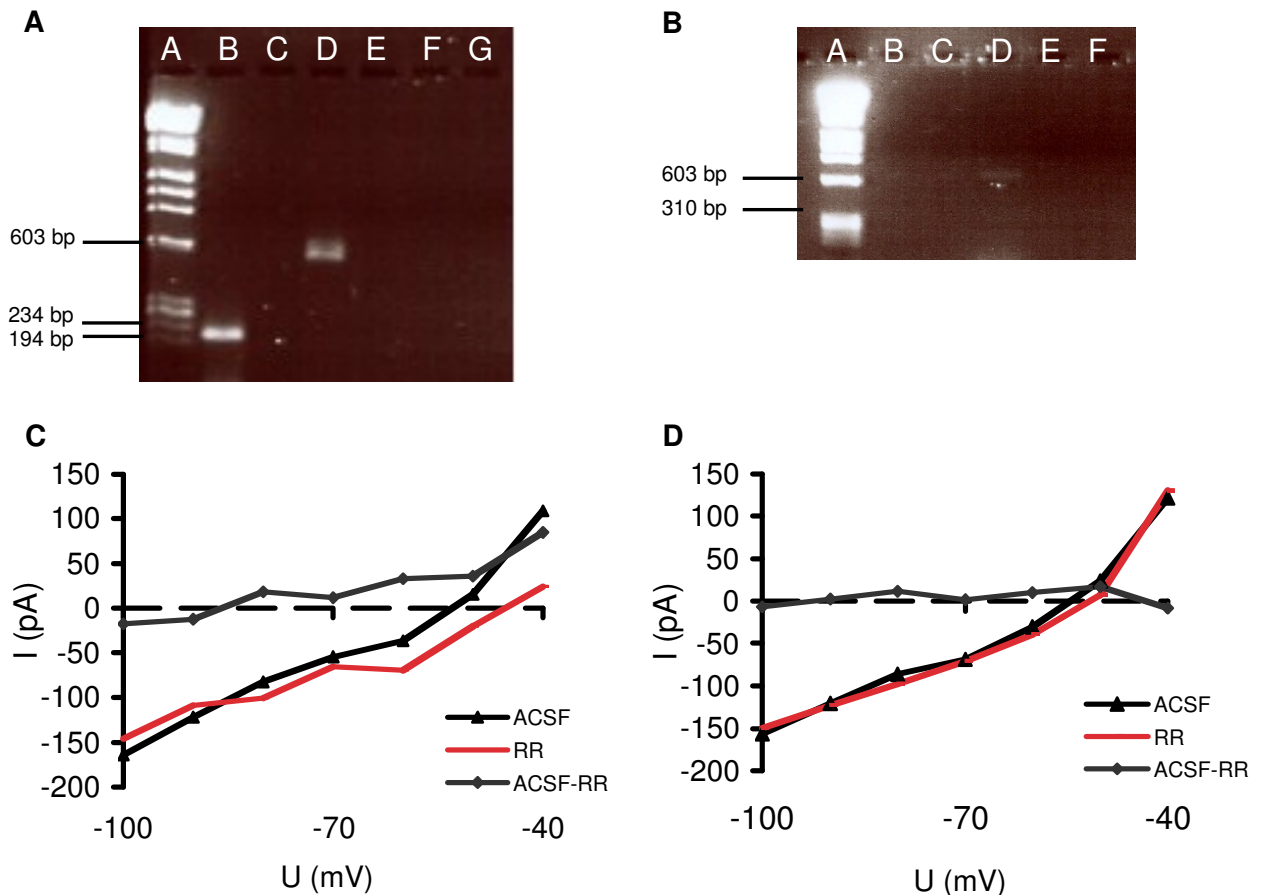


Abbildung 3.13 Single-Cell-RT-PCR mit elektrophysiologischem Vergleich von Typ-A- und Typ-B-Neuronen

Single-Cell-RT-PCR von Typ-A- (A) und Typ-B-Zelle (B). Beschriftung der PCR: A=Marker, B=rTASK-3, C=r5HT_{2c}, D=β-Actin, E=rTASK-3, F=5HT_{2c}, G=β-Actin. B, C und D wurden mit den Produkten der Reversen Transkription angesetzt. E, F und G sind die dazugehörigen Wasserproben. Aus Strom-Spannungs-Kurven gewonnene elektrophysiologische Ableitung von Typ-A- (C) und Typ-B-Zelle (D). Ruthenium-Rot-sensitive Typ-A-Zelle exprimiert TASK-3. Ruthenium-Rot-insensitive Typ-B-Zelle exprimiert TASK-3 nicht. r5HT_{2c} wird in keiner der beiden Zelltypen exprimiert.

3.2 Untersuchung des TASK-3-Stroms in Wildtyp-Mäusen und TASK-3-Knockout-Mäusen

Für die Untersuchung des TASK-3-Stroms in Mäusen wurde uns die TASK-3-Knockout-Maus mit einem C57/Bl6-Hintergrund von Bill Wisden zur Verfügung gestellt.

3.2.1 *In situ*-Hybridisierung an Zellen der medialen Amygdala von Mäusen

In einer *in situ*-Hybridisierung mit einer Maussonde gegen TASK-3 zeigte sich, dass TASK-3 in der medialen Amygdala auch in jungen Mäusen exprimiert wird (siehe Abbildung 3.14).

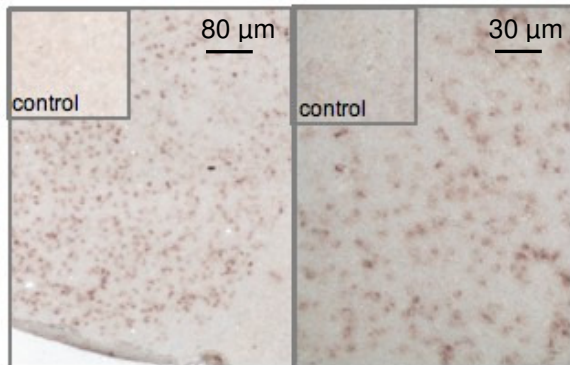


Abbildung 3.14 TASK-3-in-situ-Hybridisierung an Mäusen

In situ-Hybridisierung von Mäusen mit TASK-3-Sonde in der medialen Amygdala.

3.2.2 Elektrophysiologische Untersuchungen der medialen Amygdala von Mäusen

3.2.2.1 Vergleich von Typ-A-/Typ-B-Zellen

Es wurde überprüft, ob es analog zu den Ergebnissen der Rattenexperimente auch die Unterscheidung in Typ-A- und Typ-B-Zellen der medialen Amygdala in Wildtyp-Mäusen gibt. Sieben Zellen zeigten sich sensitiv für eine pH-Veränderung oder Behandlung durch Ruthenium Rot und wurden als Typ-A-Neurone definiert. Drei Zellen reagierten weder auf pH-Veränderungen oder Ruthenium-Rot-Behandlung und wurden als Typ-B-Neurone definiert. Vergleicht man den Stromverlauf während einer Spannungsrampe von -130 mV bis -20 mV zwischen Typ-A- und Typ-B-Zellen so zeigt sich, dass die Typ-B-Zellen weniger Strom generieren (siehe Abbildung 3.15). Die zwei Stromkurven schneiden sich in einem Spannungsbereich von ca. -70 mV. Dies deutet daraufhin, dass es auch in den Zellen der Wildtyp-Mäuse zwei unterschiedliche Zellpopulationen gibt, die sich in der Expression eines Kaliumkanals, höchstwahrscheinlich des TASK-3-Kanals, unterscheiden. Weitere Untersuchungen zur Erregbarkeit dieser Zellen zeigten keine Unterschiede zwischen

Typ-A- und Typ-B-Zellen beim Ruhemembranpotenzial, der Form der Aktionspotenziale und dem Rheobasestrom.

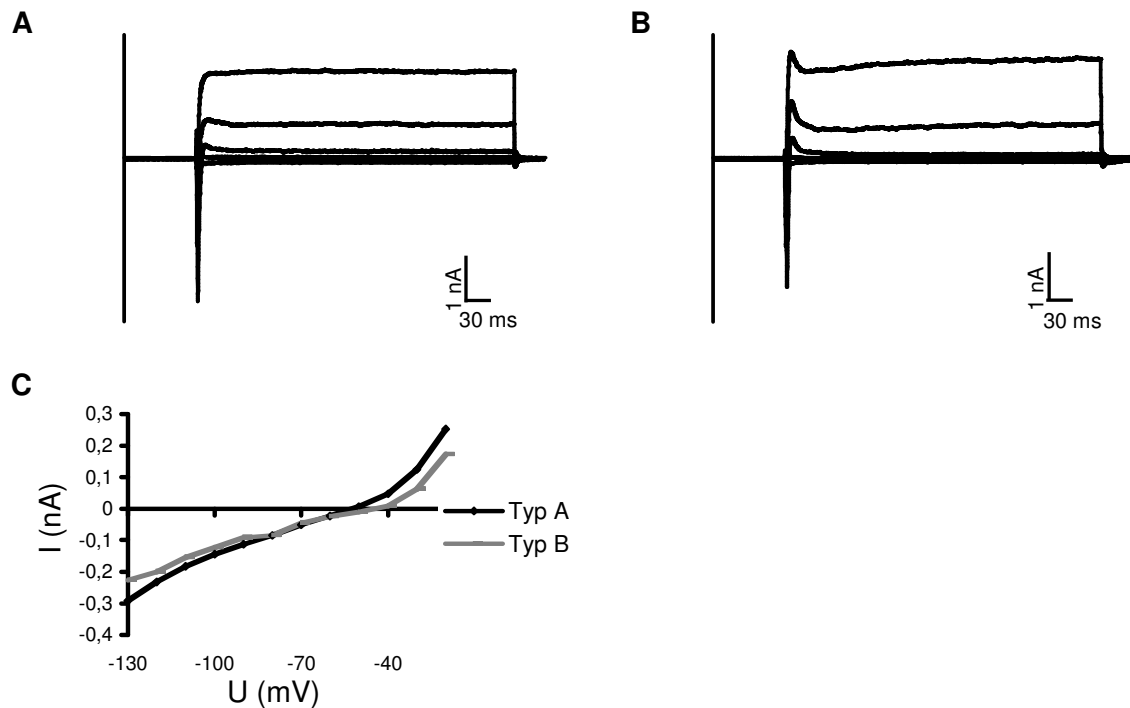


Abbildung 3.15 Der Gesamtstrom von Typ-A- und Typ-B-Zellen in Mäusen

200 ms andauernde Spannungssprünge von -100 mV, -60 mV, -30 mV, 0 mV und 30 mV an einer Typ-A-Wildtyp-Zelle (A) und einer Typ-B-Wildtyp-Zelle(B). Der Gesamtstrom von Typ-A- und Typ-B-Zellen in der medialen Amygdala von Wildtyp-Mäusen. Die Typ-B-Zellen generieren weniger Strom als die Typ-A-Zellen (C).

3.2.2.2 Vergleich von Wildtyp- und TASK-3-Knockout-Mäusen

In der Annahme, dass TASK-3 in Mäusen eine ähnliche Rolle in der Amygdala wie in Ratten spielt, wurden Neurone dieser Region auf dieselben Parameter untersucht. Besonderer Fokus war dabei auf den Vergleich von Wildtyp- und Knockoutneurone gerichtet, die sich wie Typ-A- und Typ-B-Neurone verhalten sollten.

3.2.2.2.1 Der Gesamtstrom von Typ-A-Wildtyp- und TASK-3-Knockoutzellen

Der Gesamtstrom von Typ-A-Wildtyp- (n=7) und Knockoutneuronen (n=17) unterscheidet sich nicht voneinander.

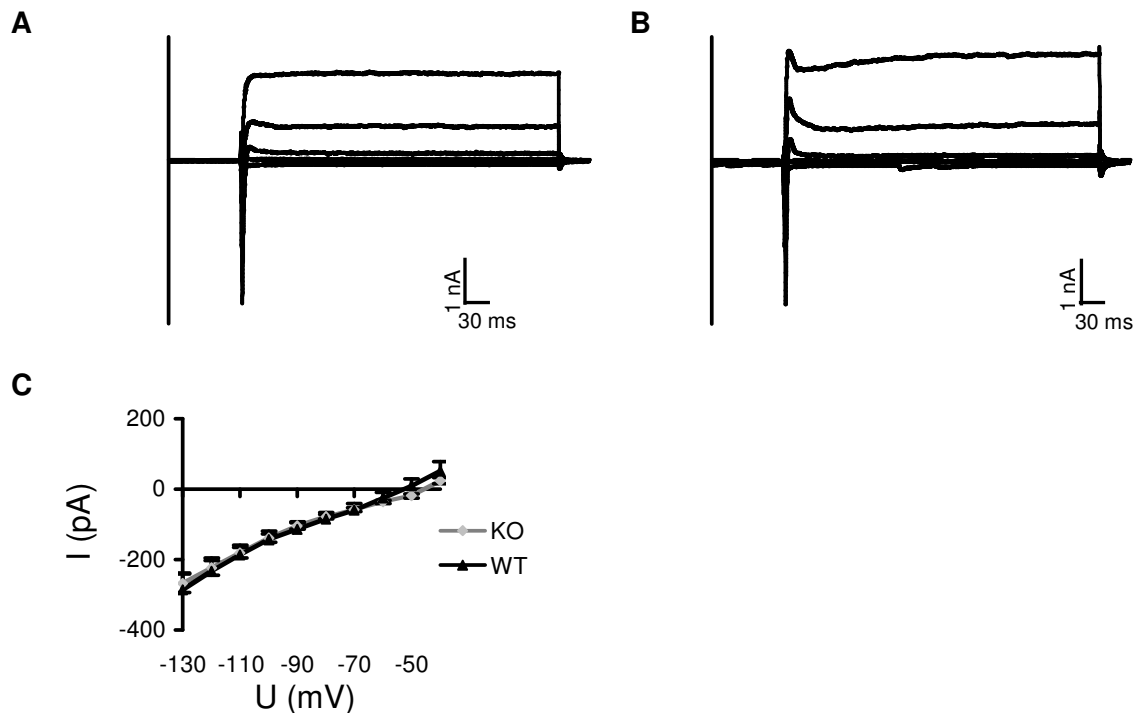


Abbildung 3.16 Der Gesamtstrom von Typ-A-Wildtyp- und Knockoutzellen

200 ms andauernde Spannungssprünge von -100 mV, -60 mV, -30 mV, 0 mV und 30 mV an einer Typ-A-Wildtypzelle (A) und einer Knockoutzelle (B). Der Gesamtstrom von Wildtyp- (n=7) und Knockoutneuronen (n=17) unterscheidet sich nicht (C).

3.2.2.2 Ruhemembranpotenzial & Erregbarkeit von Typ-A-Wildtyp- & Knockoutzellen

Das Ruhemembranpotenzial in Wildtyp- und Knockoutmäusen unterschied sich nicht signifikant voneinander. Es betrug bei Wildtypzellen $-53,89 \text{ mV} \pm 3,18$ (n=8) und bei Knockoutzellen $-51,95 \text{ mV} \pm 1,22$ (n=17; p=0,493).

Die Rheobase unterschied sich zwischen den Wildtyp- und Knockoutzellen leicht. Dieser Unterschied ist nicht signifikant, ging aber tendenziell in die erwartete Richtung. In den Wildtypzellen werden $10 \text{ pA} \pm 10,35$ (n=8), in den Knockoutzellen nur noch $5,83 \text{ pA} \pm 8,16$ (n=18; p=0,770) benötigt, um das erste Aktionspotenzial auszulösen.

Wildtypneurone generierten in einem Zeitraum von 200 ms, bei einer Stromapplikation von 20 pA $1 \pm 0,41$ Aktionspotenzial (n=7). Dies unterschied sich nicht von den Knockoutneuronen. Diese generierten $1,17 \pm 0,32$ Aktionspotenziale (n=16; p=0,769).

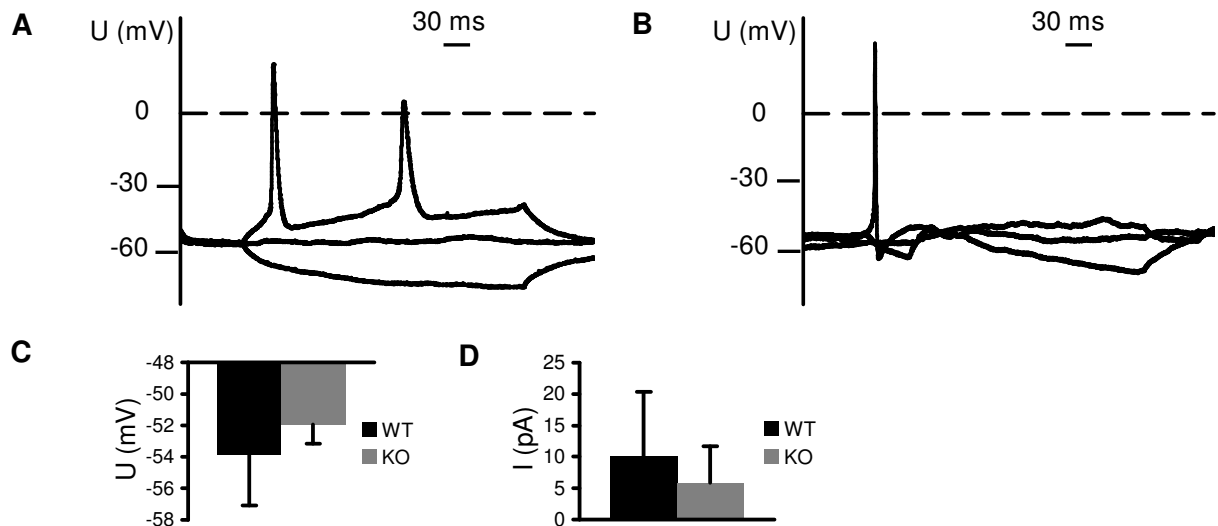


Abbildung 3.17 Das Ruhemembranpotenzial und die Erregbarkeit von Typ-A-Wildtyp- und Knockoutzellen

Stromsprünge von -20 pA, 0 pA und 20 pA im Current-Clamp-Modus über einen Zeitraum von 200 ms. Das Ruhemembranpotenzial von Wildtyp- (A) und Knockoutzellen (B) innerhalb der medialen Amygdala von Mäusen wird in den 50 ms vor den Stromapplikationen gemessen. Das Ruhemembranpotenzial (C) und der Rheobasestrom (D) unterscheiden sich nicht zwischen Wildtyp- mit Knockoutzellen.

3.2.2.2.3 Aktionspotenzialform von Typ-A-Wildtyp- und TASK-3-Knockoutzellen

Bei der Aktionspotenzialbreite gab es einen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockoutneuronen. Die Aktionspotenziale der Wildtypneurone waren $3,02 \text{ ms} \pm 0,48$ ($n=5$) breit und die der Knockoutneurone schmäler und nur $2 \text{ ms} \pm 0,15$ breit ($n=16$; $p=0,012$). Dieser Unterschied ist genau konträr zu den Ergebnissen aus den Rattenexperimenten. Hier waren die Aktionspotenziale der Typ-B-Zellen, also der Zellen ohne TASK-3, signifikant breiter. Die Aktionspotenzialamplitude der Wildtyp-Neurone betrug $61,83 \text{ mV} \pm 3,04$ ($n=5$); die der Knockoutneurone betrug $63,33 \text{ mV} \pm 2,33$ ($n=16$; $p=0,745$). Der Aktionspotenzialovershoot lag in den Wildtypneuronen bei $25,59 \text{ mV} \pm 3,19$ ($n=5$) und bei den Knockoutneuronen bei $29,75 \text{ mV} \pm 2,14$ ($n=16$; $p=0,338$). Diese geringen Unterschiede waren nicht signifikant.

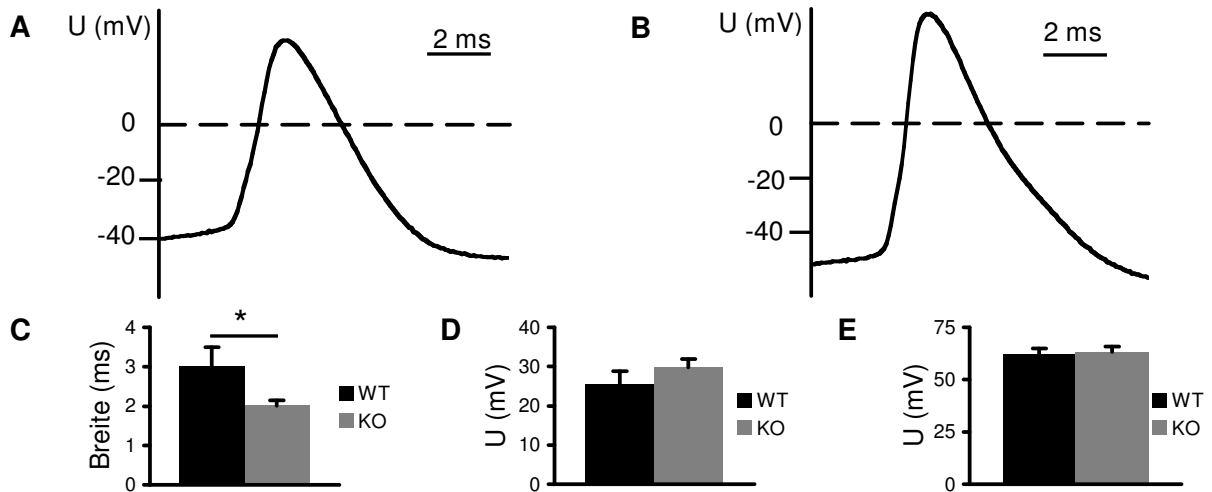


Abbildung 3.18 Die Form der Aktionspotenziale von Typ-A-Wildtyp- und Knockoutneuronen

Aktionspotential eines Wildtypneurons (A) und eines Knockoutneurons (B). Die Aktionspotenziale der Knockout-Zellen sind signifikant schmaler als die der Wildtypzellen (B). Die Aktionspotenzialamplitude (D) und der Aktionspotenzialovershoot (C) unterscheiden sich nicht zwischen Wildtyp- und Knockout-Neuronen.

Wir erwarteten, dass sich das Verhalten der Typ-A-Wildtypneuroen zu dem der Knockoutneurone ähnlich darstellt wie das der Ratten Typ-A zu den Rattentyp-B-Neuronen. Allerdings kam es in den Mäusezellen zu keinem Unterschied beim Gesamtstrom, Ruhemembranpotenzial und der Aktionspotenzialhöhe und –overshoot. Sicherlich, weil der fehlende TASK-3-Kanal in den Knockoutmäusen durch Hochregulierung anderer Kanäle kompensiert, vielleicht sogar überkompensiert, wird. Diese Überkompensation würde das konträre Ergebnis der Rheobase erklären.

3.2.2.3 Inhibition des TASK-3-Stroms durch pH-Änderung

Um die TASK-3-Kanäle in Wildtyp-Tieren zu inaktivieren, wurde eine Lösung mit angesäuertem pH-Wert eingesetzt, d. h. nach der Behandlung mit der Kontrolllösung (pH 7,4) wurden die Zellen mit einer Lösung von pH 6,4 behandelt.

3.2.2.3.1 Der Differenzstrom von Typ-A-Wildtypzellen nach pH-Änderung

Subtrahiert man den Gesamtstrom der Typ-A-Zellen der Wildtyp-Mäuse unter pH-6,4-Bedingungen von ihrem Gesamtstrom unter pH-7,4-Bedingungen, erhält man einen Differenzstrom mit einem Umkehrpotenzial von -76,88 mV (n=6) (siehe Abbildung 3.19). Dies liegt unter Berücksichtigung methodischer Limitationen im

Bereich des Umkehrpotenzials von Kaliumströmen (Errechneter Wert: $E_K = -101,96$ mV).

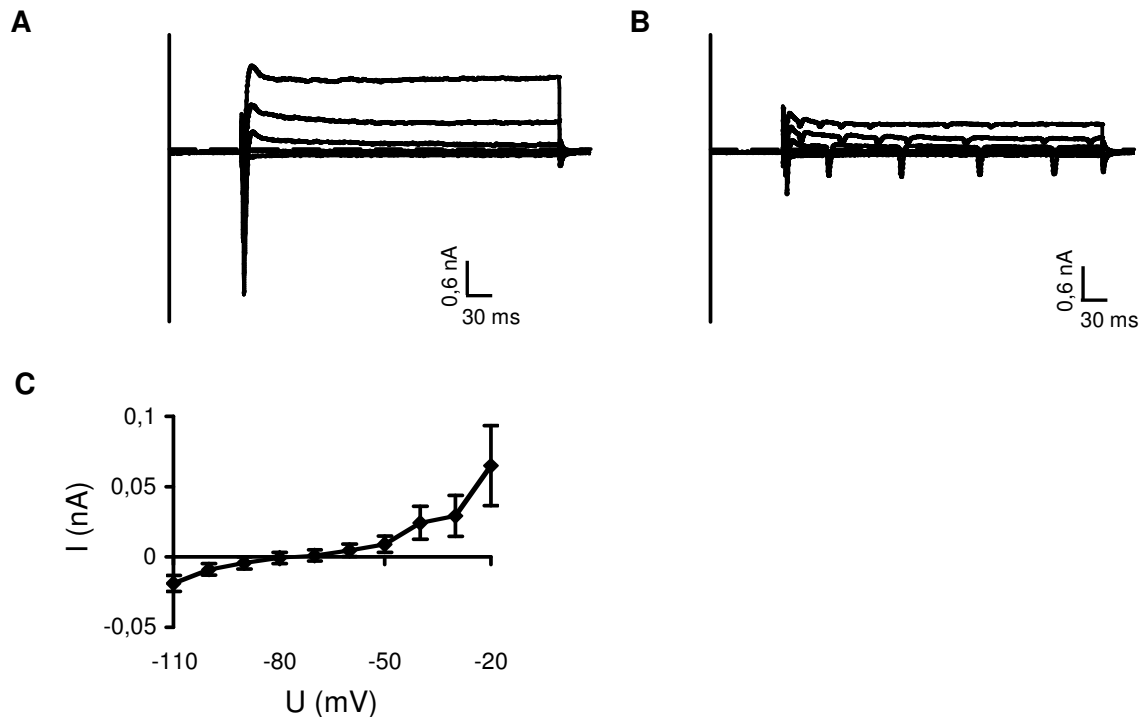


Abbildung 3.19 Der Differenzstrom von Typ-A-Wildtypzellen nach pH-Änderung

200 ms andauernde Spannungssprünge von -100 mV, -60 mV, -30 mV, 0 mV und 30 mV an einer Typ-A-Zelle unter pH 7,4 (A) und bei pH 6,4 (B). (C) Differenzstrom von $I_{pH7,4} - I_{pH6,4}$ (n=6).

3.2.2.3.2 Ruhemembranpotenzial & Erregbarkeit von Typ-A-Wildtyp- & TASK-3-Knockoutzellen bei pH-Änderung

Das Ruhemembranpotenzial der Typ-A-Zellen in Wildtyp-Mäusen lag bei $-52,19$ mV $\pm 4,05$ und wurde wie erwartet durch Ansäuerung signifikant depolarisiert auf $-46,72$ mV $\pm 4,63$ (n=7; p=0,032). Bei den Knockoutneuronen ist dies nicht der Fall. Deren Ruhemembranpotenzial lag bei $-47,65$ mV $\pm 2,04$ und wurde durch Ansäuerung auf $-38,12$ mV $\pm 5,57$ depolarisiert (n=8; p=0,06). Dieser Unterschied war nicht signifikant.

Die Rheobase verringerte sich in Typ-A-Zellen von Wildtyp-Mäusen durch Ansäuerung leicht, aber nicht signifikant. Unter Kontrollbedingungen lag die Rheobase bei $21,43$ pA $\pm 8,57$. Unter pH-6,4-Behandlung waren nur noch $17,86$ pA $\pm 6,35$ (n=7; p=0,454) nötig, um ein Aktionspotenzial auszulösen.

Die Anzahl der Aktionspotenziale, die bei einer Strominjektion von 20 pA über 200 ms abgegeben wurden, veränderte sich nicht durch Ansäuerung. Unter Kontrollbedingungen wurden $1,29 \pm 0,41$ Aktionspotenziale abgegeben, nach Ansäuerung $1,07 \pm 0,35$ Aktionspotenziale ($n=5$; $p=0,589$).

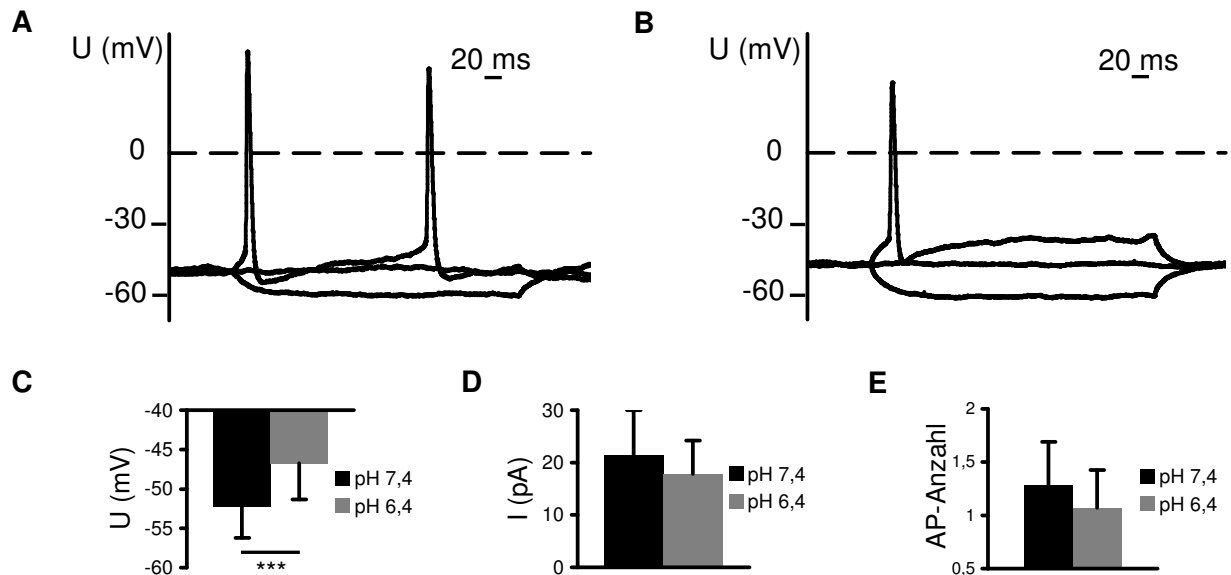


Abbildung 3.20 Das Ruhemembranpotenzial und die Erregbarkeit von Typ-A-Wildtypzellen nach pH-Änderung

200 ms andauernde Stromapplikationen an Typ-A-Zellen von Wildtyp-Mäusen unter Kontrollbedingungen (A) und nach Ansäuerung (B). Durch Ansäuerung wird das Ruhemembranpotenzial depolarisiert (C), der Rheobasestrom sinkt (D) und es werden weniger Aktionspotenziale generiert (E). Die Unterschiede in D und E sind nicht signifikant.

3.2.2.3.3 Aktionspotenzialform von Typ-A-Wildtypzellen bei pH-Änderung

Die Breite der Typ-A-Zellen-Aktionspotenziale verbreiterte sich durch Ansäuerung nicht signifikant von $3,53 \text{ ms} \pm 0,42$ auf $4,02 \text{ ms} \pm 0,3$ ($n=5$; $p=0,466$). Die Amplituden der Typ-A-Zellen von Wildtyp-Mäusen waren unverändert ($67,16 \text{ mV} \pm 0,69$ unter pH 7,4 und $58,27 \text{ mV} \pm 5,13$ bei pH 6,4; $n=5$; $p=0,086$). Der Aktionspotenzialovershoot lag bei Typ-A-Zellen der Wildtypmäuse mit $32,17 \text{ mV} \pm 0,89$ ähnlich hoch wie durch Ansäuerung mit $26,88 \text{ mV} \pm 3,39$ ($n=5$; $p=0,113$).

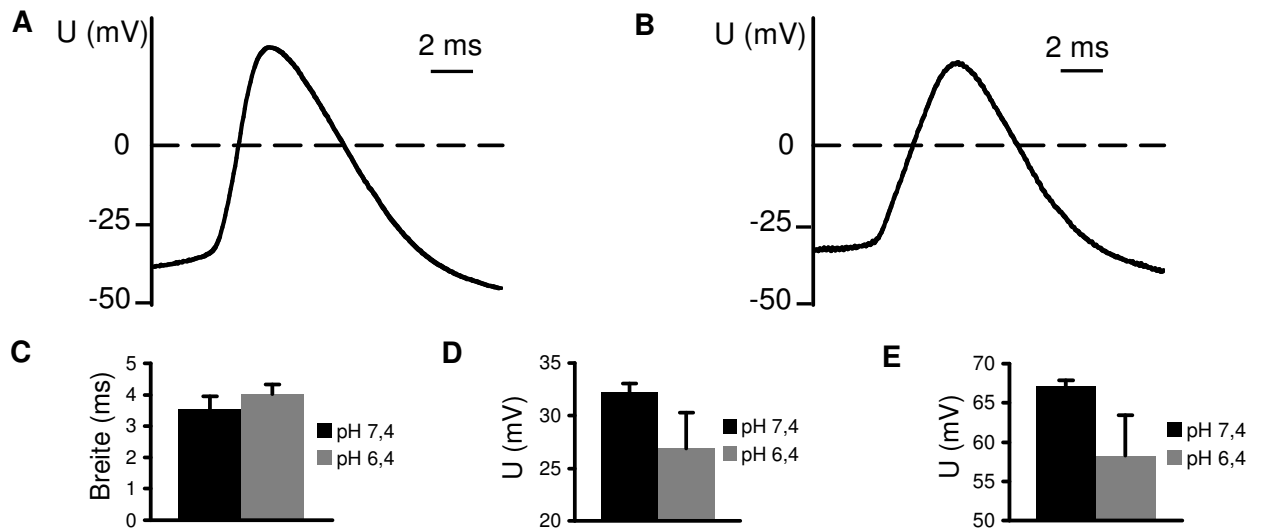


Abbildung 3.21 Die Form der Aktionspotenziale von Typ-A-Wildtypzellen nach pH-Änderung

Aktionspotential eines Typ-A-Neurons aus der medialen Amygdala von Wildtyp-Mäusen unter Kontrollbedingungen (A) und nach Ansäuerung auf pH 6,4 (B). Die Breite (C) der Aktionspotenziale verändert sich durch Ansäuerung kaum. Die Aktionspotenzialamplitude (E) und der Aktionspotenzialovershoot (D) werden durch Ansäuerung kleiner. Dieser Unterschied ist nicht signifikant.

3.2.2.4 Isolation des TASK-3-Stroms in Wildtyp-Neuronen durch Ruthenium Rot

Wie bei den Ratten wurde auch in den Wildtypmäusen die Inhibition des TASK-3-Stroms mit Ruthenium Rot untersucht. In vier Zellen von Wildtypmäusen wurde ein Kaliumstrom durch Ruthenium Rot inhibiert, ähnlich wie in den Rattenexperimenten.

3.2.2.4.1 Der Differenzstrom von Typ-A-Wildtypzellen nach Ruthenium-Rot-Behandlung

Zieht man den Gesamtstrom unter Ruthenium-Rot-Behandlung ($c = 30 \mu\text{M}$) vom Gesamtstrom unter Kontrollbedingungen voneinander ab, so erhält man einen Differenzstrom mit einem Umkehrpotenzial von $-45,67 \text{ mV}$ ($n=4$) (siehe Abbildung 3.22). Dies ist kein reiner Kaliumstrom, da das Umkehrpotenzial zu positiv ist. Das für diesen Versuchsaufbau berechnete Umkehrpotenzial für Kalium lag bei $-107,61 \text{ mV}$.

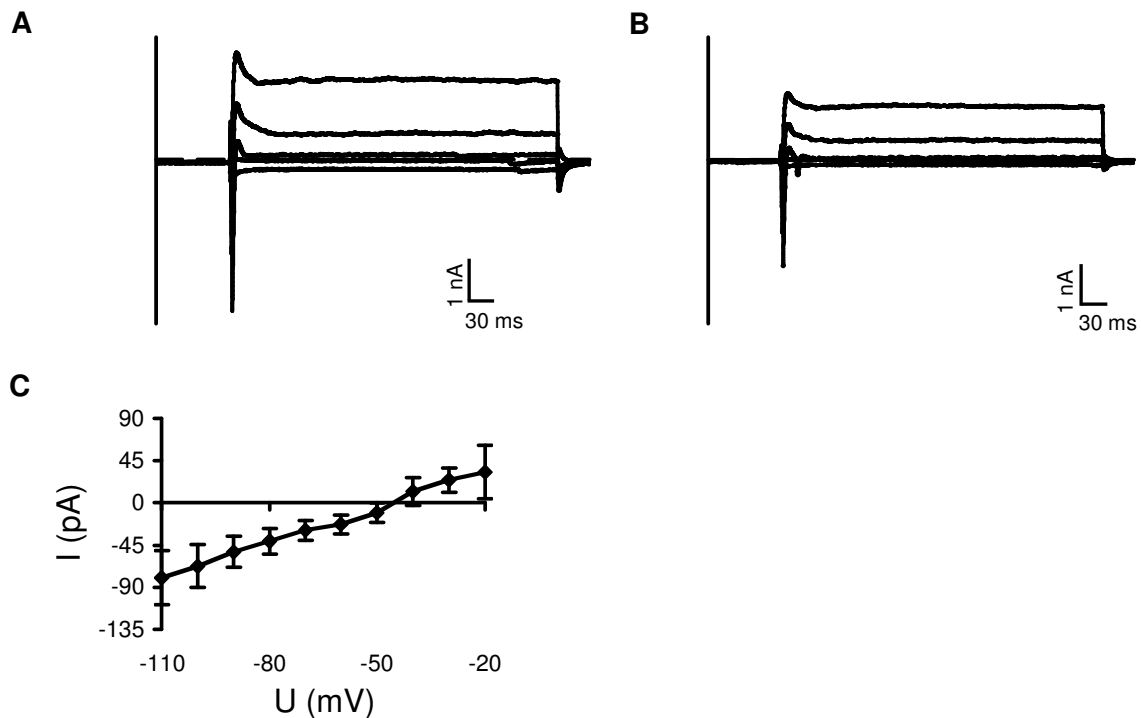


Abbildung 3.22 Der Differenzstrom von Typ-A-Wildtypzellen nach Ruthenium-Rot-Behandlung

200 ms andauernde Spannungssprünge von -100 mV, -60 mV, -30 mV, 0 mV und 30 mV an einer Typ-A-Zelle unter Kontrollbedingungen (A) und bei Behandlung mit Ruthenium Rot (B). (C) Differenzstrom von $I_{ACSF} - I_{RR}$ ($n=4$).

3.2.2.4.2 Ruhemembranpotenzial & Erregbarkeit von Typ-A-Wildtyp- & TASK-3-Knockoutzellen nach Ruthenium-Rot-Behandlung

Das Ruhemembranpotenzial wurde durch Ruthenium Rot nicht signifikant verändert. Es lag im Kontrollzustand (ACSF) bei $-51,61 \text{ mV} \pm 3,44$ und wurde durch Ruthenium Rot leicht auf $-53,86 \text{ mV} \pm 1,49$ hyperpolarisiert ($n=4$; $p=0,57$).

Die Rheobase reduzierte sich, war aber aufgrund der starken Schwankungen nicht signifikant. Im Kontrollzustand waren $25 \text{ pA} \pm 19,47$ nötig, um ein Aktionspotenzial auszulösen. Nach der Behandlung mit Ruthenium Rot waren nur noch $-1,25 \text{ pA} \pm 20,31$ ($n=4$; $p=0,348$) nötig.

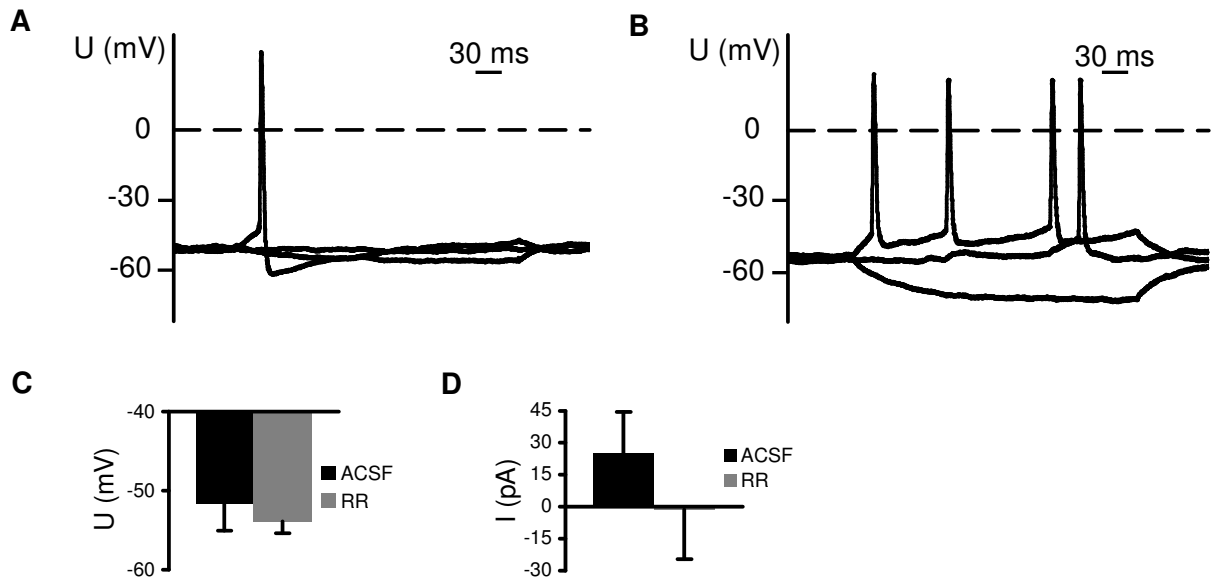


Abbildung 3.23 Das Ruhemembranpotenzial und die Erregbarkeit von Typ-A-Wildtypzellen nach Ruthenium-Rot-Behandlung

200 ms andauernde Stromapplikationen von -20 pA, 0 pA und 20 pA in Typ-A-Zellen der medialen Amygdala von Wildtypmäusen unter Kontrollbedingungen (A) und nach Behandlung mit Ruthenium Rot (B). Das Ruhemembranpotenzial wird durch Ruthenium-Rot-Behandlung nicht verändert (C). Der Rheobasestrom sinkt unter Ruthenium-Rot-Behandlung (D). Dieser Unterschied ist nicht signifikant.

3.2.2.4.3 Aktionspotenzialform von Typ-A-Wildtypzellen nach Ruthenium-Rot-Behandlung

Die Aktionspotenziale wurden bei Behandlung mit Ruthenium Rot etwas breiter. Zu Beginn waren sie $2,37 \text{ ms} \pm 2,22$ breit und durch die Behandlung dehnten sie sich auf $2,93 \text{ ms} \pm 0,34$ ($n=3$; $p=0,235$) aus. Die Aktionspotenzialamplitude wurde durch Ruthenium Rot nicht beeinflusst. Sie betrug in den Kontrollmessungen $62,86 \text{ mV} \pm 5,05$ und nach Ruthenium-Rot-Behandlung $61,64 \text{ mV} \pm 5,74$ ($n=3$; $p=0,881$). Auch der Overshoot wurde durch Ruthenium Rot nicht signifikant verändert. Er lag innerhalb der Kontrollmessungen bei $27,32 \text{ mV} \pm 4,9$ und unter Ruthenium Rot bei $25,48 \text{ mV} \pm 5,52$ ($n=3$; $p=0,815$).

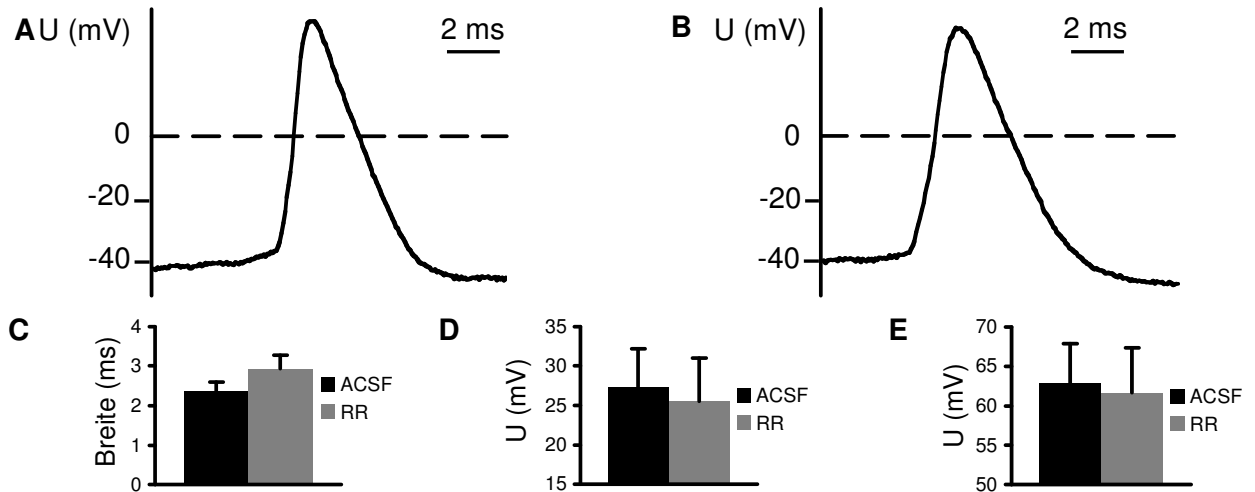


Abbildung 3.24 Die Form der Aktionspotenziale von Typ-A-Wildtypzellen nach Ruthenium-Rot-Behandlung

Aktionspotential eines Typ-A-Neurons der medialen Amygdala von Wildtyp-Mäusen unter Kontrollbedingungen (A) und nach Behandlung mit Ruthenium Rot (B). Die Aktionspotenziale werden durch die Behandlung mit Ruthenium Rot etwas breiter (C). Dieser Unterschied ist nicht signifikant. Die Aktionspotenzialamplitude (D) und der Aktionspotenzialovershoot (E) werden durch Ruthenium Rot nicht beeinflusst.

Konträr zu den Experimenten mit Rattenneuronen zeigte sich in den Mäuseuronen eine pH-Veränderung als spezifischere Methode um den TASK-3-Strom herauszuarbeiten als eine Behandlung mit Ruthenium Rot. Durch die Behandlung mit Ruthenium Rot veränderte sich das Ruhemembranpotenzial, die Erregbarkeit und die Aktionspotenzialform nicht signifikant. Aber durch eine Ansäuerung auf pH 6,4 konnte der TASK-3-Strom in Typ-A-Wildtypzellen herausgearbeitet werden und das Ruhemembranpotenzial in Typ-A-Wildtypzellen signifikant depolarisiert werden was in Knockoutzellen nicht möglich war.

3.3 Verhaltensversuche

Für die Verhaltensversuche wurden 16 Wildtyptiere und 16 Knockouttiere verwendet. Während der Experimente mussten zwei Knockouttiere aus der Versuchsgruppe entfernt werden. Die Tiere wurden an die Versuchsapparatur habituiert und anschließend die Tiere der Gruppe I Wasser exponiert (8 Wildtyptiere und 8 Knockouttiere) und die Tiere der Gruppe II TMT exponiert (8 Wildtyptiere und 6 Knockouttiere). Für die statistische Auswertung wurde zunächst eine dreifach Interaktion zwischen Genotyp, Habituation/Exposition und einer der fünf Variablen

(Springen, Schnüffeln, Putzen, mit dem Filterpapier spielen und Freezing) mithilfe einer ANOVA untersucht.

Die Wildtyptiere ($75,26 \text{ s} \pm 14,33$) putzten sich während der Habituation genau so häufig wie die Knockouttiere ($67,08 \text{ s} \pm 14,27$). Während der Exposition mit Wasser putzten sich die Wildtyptiere deutlich häufiger ($159,13 \text{ s} \pm 41,88$) und die Knockouttiere veränderten ihr Putzverhalten nicht ($71,79 \text{ s} \pm 21,83$). Als TMT exponiert wurde putzten sich die Wildtyptiere kaum noch ($15,53 \text{ s} \pm 6,96$) und die Knockouttiere putzten sich deutlich weniger ($20,86 \text{ s} \pm 7,23$). Es konnte keine signifikante Dreifachinteraktion zwischen Genotyp, Habituation/Exposition und Putzen festgestellt werden ($F=2,929$; $df=26$; $p=0,099$).

Die Wildtyptiere spielten während der Habituation $6,99 \text{ s} \pm 3,2$ mit dem Filterpapier. Die Knockouttiere spielten gleich lang mit dem Filterpapier ($7,87 \text{ s} \pm 4,32$). Im Laufe der Exposition von Wasser spielten die Wildtyptiere $4,8 \text{ s} \pm 2,27$ mit dem Filterpapier und die Knockouttiere mit $28 \text{ s} \pm 12,54$ deutlich häufiger. Bei der TMT-Exposition spielten die Wildtyptiere ($1,13 \text{ s} \pm 1,13$) und die Knockouttiere ($0,95 \pm 0,95$) nicht mehr mit dem Filterpapier. Es kam bei der Variablen „mit dem Filterpapier spielen“ zu keiner signifikanten Interaktion ($F=1,544$; $df=26$; $p=0,225$).

Während der Habituation versuchten die Wildtyptiere $11,94 \pm 3,93$ mal aus der Versuchsbox herauszuspringen. Die Knockouttiere versuchten es häufiger ($22,29 \pm 6,86$). Bei der Exposition von Wasser sprangen die Wildtyptiere ($3,13 \pm 1,65$) und die Knockouttiere ($6,25 \pm 2,28$) seltener. Während der Exposition von TMT sprangen die Wildtyptiere ($30,25 \pm 21,24$) und die Knockouttiere ($50 \pm 15,21$) häufiger um vor der vermeintlichen Bedrohung zu fliehen. Beim Springen konnte keine signifikante Interaktion beobachtet werden ($F=0,012$; $df=26$; $p=0,915$).

Die Wildtyptiere ($786,09 \text{ s} \pm 15,87$) erschnüffelten ihre Umwelt während der Habituation genauso intensiv wie die Knockouttiere ($801,8 \text{ s} \pm 12,29$). Während der Exposition von Wasser schnüffelten die Wildtyptiere ($694,6 \text{ s} \pm 46,93$) und die Knockouttiere ($780,54 \text{ s} \pm 26,33$) etwas weniger. Deutlich weniger schnüffelten die Wildtyptiere bei der Exposition von TMT ($565,78 \text{ s} \pm 37,91$). Die Knockouttiere schnüffelten auch weniger während der Exposition von TMT ($702,08 \text{ s} \pm 31,27$). Auch beim Schnüffeln konnte keine signifikante Dreifachinteraktion beobachtet werden ($F=0,457$; $df=26$; $p=0,505$).

Die Wildtypmäuse zeigten während der Habituation kaum Freezing-Verhalten (dt. Schockstarre) ($28,2 \text{ s} \pm 9,06$), die Knockouttiere zeigten dieses Verhalten noch weniger ($14,09 \text{ s} \pm 3,15$). Während der Exposition von Wasser befanden sich die Wildtyptiere $45,9 \text{ s} \pm 9,67$ in Schockstarre und die Knockouttiere $20,99 \text{ s} \pm 6,18$. Durch die Exposition mit TMT erhöhte sich die Zeit in der sich die Tiere in einer Schockstarre befanden stark. Wildtyptiere „freezten“ $306,25 \text{ s} \pm 44,06$ und Knockouttiere mit $150,22 \text{ s} \pm 23,77$ weniger, als die Wildtyptiere aber deutlich stärker als während der Exposition von Wasser. Dadurch konnte bei der Variablen „Schockstarre“ eine signifikante Dreifachinteraktion beobachtet werden ($F=6,521$; $df=26$; $p=0,017$). Weitere ANOVAS ergaben, dass es in der Gruppe I (Habituation mit anschließender Exposition von Wasser) keine signifikante Wechselwirkung beim Genotyp mit Habituation/Exposition gibt. Aber in der Gruppe II (Habituation mit anschließender Exposition von TMT) konnte eine signifikante Wechselwirkung sowohl beim Genotyp, wie auch bei Habituation/Exposition beobachtet werden. Post-hoc-Analysen dieser Wechselwirkungen innerhalb der Gruppe II über tTests ergaben keinen signifikanten Unterschied des Genotyps innerhalb der Habituation ($p=0,158$), jedoch einen signifikanten Unterschied zwischen Habituation/TMT-Exposition bei Wildtyp- ($p<0,001$) und Knockoutmäusen ($p<0,001$) sowie eine signifikant höhere Reaktion auf die Exposition von TMT innerhalb der Wildtyp-Gruppe im Vergleich zur Knockout-Gruppe ($p=0,015$) (siehe Abbildung 3.25).

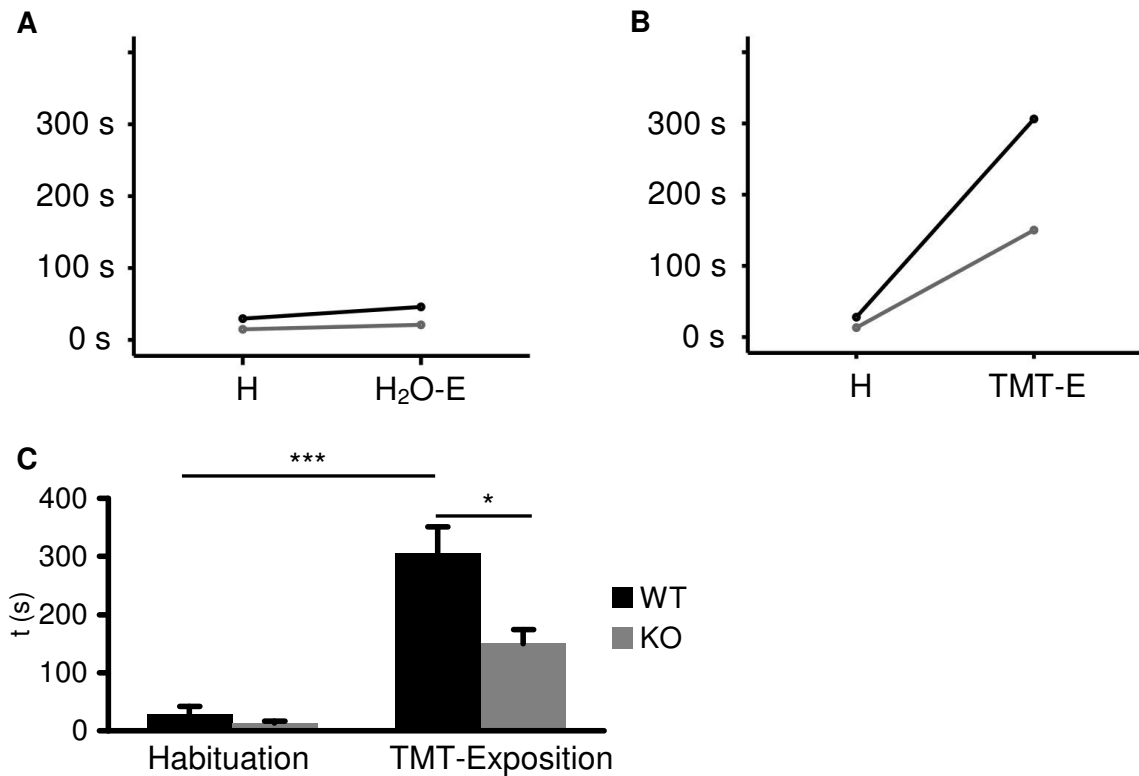


Abbildung 3.25 Freezingverhalten in Wildtyp- und Knockouttieren nach TMT-Präsentation

Post-Hoc-Ergebnisse der Verhaltenstests innerhalb der Variablen Freezing (C) während der Habituation=H (A) an die Versuchsanlage und der Exposition=E von TMT (B). Während der Habituation kommt es zu keinem unterschiedlichen Freezing-Verhalten zwischen Wildtyp- und Knockouttieren. Die Schockstarre nimmt bei TMT-Exposition innerhalb der Wildtyp- und der Knockoutgruppe signifikant zu. Das Freezingverhalten der Wildtypiere ist innerhalb der TMT-Exposition signifikant stärker als das der Knockouttiere.

Zusammenfassend ließ sich in den Verhaltensversuchen beobachten, dass Verhaltensmuster, die nur in einer sicheren und entspannten Umgebung durchgeführt werden, wie sich Putzen, Exploration in Form von Schnüffeln und Entdecken der Umwelt in Form von mit dem Filterpapier spielen bei der Habituation stärker gezeigt wurden als bei der Exposition von Wasser oder TMT, da sich bei der Habituation die Tiere schon leicht an die neue Umgebung gewöhnt hatten und sich deshalb wohler fühlten. Andersherum stiegen Flucht- (Springen) und Tarnungsverhalten (Freezing) bei Exposition von TMT stark an.

4 DISKUSSION

4.1 Physiologie des TASK-3 auf zellulärer Ebene innerhalb der medialen Amygdala

4.1.1 Physiologie des TASK-3 auf zellulärer Ebene innerhalb der medialen Amygdala von Ratten

Um ein elektrophysiologisches Profil der Neurone in der medialen Amygdala und des TASK-3-Stroms in diesen Zellen zu erstellen, wurden akute Hirnschnitte mit der Patch-Clamp-Technik untersucht. Hierbei wurden zunächst in Ratten zwei Zellpopulationen identifiziert und charakterisiert. Der Unterschied im durchschnittlichen Ruhemembranpotenzial für MeA-Neurone, wie berichtet von $-56,31 \text{ mV} \pm 1,51$ (Typ A) und $-48,38 \text{ mV} \pm 1,55$ (Typ B), ist die Folge eines unterschiedlichen Expressionsmusters von TASK-3. Über *in situ*-Hybridisierungen, Single-Cell-PCR und elektrophysiologische Isolation des TASK-3-Stroms konnte gezeigt werden, dass Typ-A-Neurone TASK-3 exprimieren und Typ-B-Neurone TASK-3 nicht exprimieren. Es treten mehr Typ-A-Neurone als Typ-B-Neurone auf. In den elektrophysiologischen Experimenten stellten sich 62 % der Zellen als Typ-A- und 38 % der Zellen als Typ-B-Neurone heraus. Die *in situ*-Hybridisierungen zeigten 85 % Typ-A- und 15 % Typ-B-Neurone. Dieser Ruthenium-Rot- bzw. säuresensitive Strom wird nicht durch die klassischen Kaliumkanalblocker TEA und 4-AP inhibiert und ist somit nicht der Strom von spannungsgesteuerten Kaliumkanälen.

Neuronentypen, die sich im Ruhepotenzial und der Aktionspotenzialfrequenz unterscheiden, konnten auch schon in der zentralen Amygdala beobachtet werden (Nose et al., 1991; Schiess et al., 1993; Schiess et al., 1999). In diesen Studien wurde die Nomenklatur von Typ-A- und Typ-B-Zellen verwendet und in dieser Arbeit übernommen. Die Zellen der zentralen Amygdala zeigen zudem einen Unterschied in der Nachhyperpolarisation.

K_{2P} -Kanäle sind wichtig bei der Generierung und Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotenzials (Kim, 2005). Die Inaktivierung der K_{2P} -Kanäle depolarisiert das Ruhemembranpotenzial, da eine Kaliumkomponente fehlt und somit sich das Ruhemembranpotenzial in die Richtung des Natriumkehrpotenzials, also zum Positiven hin, verschiebt (Goldstein et al., 2001; Bayliss et al., 2003; Davies et al.,

2008). Diese Depolarisation zeigte sich in den Typ-B-Zellen dieser Arbeit, bzw. konnte durch Inaktivierung des TASK-3-Stroms in Typ-A-Zellen induziert werden.

Eine Depolarisation führt zu einer erhöhten Erregbarkeit. Jedoch wirkte dies sich bei den Typ-B-Zellen nur leicht auf den Rheobasestrom aus. Dieser war zu dem der Typ-A-Zellen nicht signifikant verändert sondern nur leicht reduziert. Höchstwahrscheinlich übernehmen andere Kanäle in dieser Zellpopulation die Kontrolle der Erregbarkeit. Der Gesamtstrom der Typ-B-Neurone unterschied sich nicht offensichtlich von dem der Typ-A-Neurone. Es gibt also offensichtlich andere Kanäle, z.B. andere K_{2P} -, K_{ir} - oder K_v -Kanäle, die teilweise die Rolle des TASK-3 in den Typ-B-Neuronen übernehmen. Ein weiterer Unterschied der Typ-A- und Typ-B-Neurone war die Aktionspotenzialbreite von im Durchschnitt nur $3,21 \text{ ms} \pm 0,24$ in den Typ-A-Neuronen und $4,32 \text{ ms} \pm 0,52$ in den Typ-B-Neuronen. Bisher besteht die Theorie, dass spannungsgesteuerte Kaliumkanäle maßgeblich für die Repolarisation eines Aktionspotenzials zuständig sind (Bean, 2007). Diese Arbeit trägt zu der Hypothese, dass auch K_{2P} -Kanäle an der Repolarisation beteiligt sind, bei. Denn es konnte bereits in Rattenherzzellen gezeigt werden, dass durch die Inhibition des K_{2P} -Kanals TASK-1 die Aktionspotenzialdauer um ca. 20 % verlängert werden konnte (Charpentier, 2007; Putzke et al, 2007). Dass die Aktionspotenzialamplitude und der Aktionspotenzialovershoot sich in ihrer Höhe zwischen Typ-A- und Typ-B-Neuronen nicht unterschieden ist so zu erklären, dass am Aktionspotenzialaufstrich spannungsgesteuerte Natriumkanäle beteiligt sind (Hodgkin & Huxley, 1952).

TASK-3 kann über Ansäuerung oder Behandlung mit Ruthenium Rot aus dem Gesamtstrom isoliert werden. Eine Isolierung des TASK-3-Stroms durch Ansäuerung war in den Neuronen der medialen Amygdala von Ratten nicht möglich. Die pH-Inhibition verlief zu unspezifisch, da noch weitere, in der medialen Amygdala exprimierten Ionenkanäle wie z.B. ASICs (Wemmie et al., 2002; Coryell et al., 2007), säuresensitiv sind und auch die Verschiebung von H^+ zu Potenzialänderungen führen kann. Somit hatte die Behandlung mit pH 6,4 keine signifikante Auswirkung auf das Ruhemembranpotenzial, den Rheobasestrom, die Aktionspotenzialform und die Anzahl der Aktionspotenziale in den Zellen der medialen Amygdala. Der TASK-3-Strom konnte allerdings über Ruthenium Rot in einer calciumarmen Lösung isoliert werden. Die Reduktion von Calcium ist wichtig hinsichtlich der Interaktion von Ruthenium Rot mit Calciumpumpen. Durch die Inhibition des TASK-3 in Typ-A-

Neuronen über Ruthenium Rot zeigten diese Zellen Charakteristika von Typ-B-Neuronen und zeigten verbreiterte Aktionspotenziale. Obwohl sich das Ruhemembranpotenzial nicht signifikant veränderte, wurden die Typ-A-Neurone durch Behandlung mit Ruthenium Rot erregbarer. Sie hatten eine geringere Rheobase und eine erhöhte Aktionspotenzialfrequenz. Der in den Typ-A-Zellen durch Behandlung mit Ruthenium Rot entstandene, negative Rheobasewert zeigt, dass die Inaktivierung der Kanäle nicht nur dazu führen kann, dass die Neurone bei eingehenden Reizen ein stärkeres Ausgangssignal erzeugen, sondern auch, dass sie spontanaktiv werden. Das Umkehrpotenzial des durch Ruthenium-Rot-Behandlung entstandenen Differenzstroms liegt mit $-66,67$ mV nicht direkt beim Umkehrpotenzial von Kalium, sondern etwas zu sehr im positiven Spannungsbereich, aber mit Rücksicht auf methodische Limitierungen ist davon auszugehen, dass es sich hier um einen Kaliumstrom handelt. Um sicherzustellen, dass durch die Behandlung mit Ruthenium Rot keine anderen Kaliumkanäle inhibiert wurden, wurden die Experimente in einer ACSF wiederholt, die den Natriumkanalblocker TTX und die klassischen Kaliumkanalblocker TEA und 4-AP beinhalteten. In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass auch nach Inhibition der Natriumkanäle und der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle noch ein Ruthenium-Rot-sensitiver Strom vorhanden ist. Dieser Strom hat allerdings ein Umkehrpotenzial von $-21,33$ mV, was deutlich positiver als das Kaliumumkehrpotenzial ist. Deshalb ist davon auszugehen, dass doch noch andere Kanäle durch Ruthenium Rot inhibiert wurden.

Immunohistochemische Experimente in Affen und Ratten zeigten, dass die Neuronen der medialen Amygdala und die der zentralen Amygdala GABAerg und somit inhibitorisch sind (McDonald & Augustine, 1993; Sun & Cassell, 1993). Des Weiteren wird eine Vielzahl von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren innerhalb der medialen Amygdala exprimiert. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren leiten Signale über heterotrimere G-Proteine weiter und zeichnen sich durch ihre Struktur aus 7 Transmembrandomänen aus. Heterotrimere G-Proteine werden nach der Familienzugehörigkeit der α -Untereinheit in vier Hauptklassen unterteilt: $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ und $G\alpha_{12}$. Dass TASK-Kanäle durch diverse $G\alpha_q$ -gekoppelte Rezeptoren inhibiert werden ist mittlerweile etabliert. Die Inhibition dient als Mechanismus um die neuronale Erregbarkeit zu verstärken oder die Hormonfreisetzung zu kontrollieren (Goldstein et al., 2001; Lesage, 2003; Talley et al., 2003). Die TASK-Kanalkopplung

über $G\alpha_q$ -Proteine verläuft entweder direkt über $G\alpha_q$ -Proteine oder über Second-Messenger wie z.B. PIP_2 (Veale et al, 2007; Chen et al, 2006; Chemin, 2003; Mathie, 2007). Zur Klasse der $G\alpha_q$ -Hererotrimere gehören α_q , α_{11} , α_{14} , α_{15} und α_{16} (Harmar et al., 2009). Es konnte gezeigt werden, dass TASK-3 auch durch $G\alpha_{11}$ -Proteine inhibiert werden kann (Chen et al., 2006). Darum wurde in dieser Arbeit versucht, den TASK-3-Strom über einen Gq-Protein-gekoppelten Signalweg zu inhibieren. Gq-Protein-gekoppelte Rezeptoren in der medialen Amygdala sind u.a. Oxytocinrezeptoren (Veinante & Freund-Mercier, 1997; Ferguson et al., 2001), Serotoninrezeptoren, α_1 -adrenerge Rezeptoren (Domyancic & Morilak, 1997; Acosta-Martinez et al., 1999), H1-Histamin-Rezeptoren (Brown et al., 2001) und muskarinische Acetylcholinrezeptoren (van der Zee et al., 1997; Mash & Potter 2003). Calcitoninrezeptoren sind in Katzen innerhalb der Amygdala vorhanden (Guidobono et al., 1987). Dies gibt allerdings keinen Aufschluss über die genaue Expression in der medialen Amygdala; insbesondere in Ratten. Eine Expression von metabotropen Glutamatrezeptoren der Gruppe I (mGluR1 und mGluR5) ist von Ratten im basolateralen Komplex (Rudy & Matus-Amat, 2009) und der lateralen Amygdala (Rodrigues et al., 2002) bekannt und deshalb für die mediale Amygdala sehr wahrscheinlich. Von den Serotoninrezeptoren sind nur die Rezeptoren der Gruppe $5HT_2$ Gq-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Hoyer et al., 2002). In dieser Arbeit konnte ein α -methyl-Serotonin-sensitiver Strom in den Typ-A-Neuronen der medialen Amygdala von Ratten gezeigt werden. α -methyl-Serotonin ist ein Agonist für die $5HT_2$ -Rezeptoren. Über Single-Cell-RT-PCR konnte keine mRNA für den $5HT_{2c}$ -Rezeptor nachgewiesen werden. Dies führt zu dem Schluss, dass die Neuronen der medialen Amygdala $5HT_{2a}$ - oder $5HT_{2b}$ -Rezeptoren exprimieren. Von erwachsenen Ratten ist bekannt, dass sie die $5HT_{2a}$ - und $5HT_{2c}$ -Rezeptoren schwach exprimieren (Morilak et al., 1993; Pompeiano et al, 1994; Wright et al., 1995; Cornea-Hérbert et al., 1999). Da in Ratten keine Expression von $5HT_{2b}$ -Rezeptoren bekannt ist, ist davon auszugehen, dass in Jungtieren nur $5HT_{2a}$ -Rezeptoren exprimiert werden und deswegen TASK-3 möglicherweise über $5HT$ reguliert sein könnte (Weber et al. 2007). Eine Ankopplung des TASK-3 innerhalb der medialen Amygdala von Ratten an Rezeptoren der metabotropen Glutamatrezeptoren Gruppe I oder an muskarinische Acetylcholinrezeptoren war in dieser Arbeit nicht möglich. Die Reaktionen auf Agonisten dieser Rezeptoren waren

zu unspezifisch. Dies liegt daran, dass vermutlich noch weitere Kanäle bzw. Pumpen über die dadurch ausgelösten Second-Messenger-Wege reguliert werden.

4.1.2 Physiologie des TASK-3 auf zellulärer Ebene innerhalb der medialen Amygdala von Mäusen

Um die physiologische Rolle des TASK-3-Stroms noch besser beschreiben zu können, untersuchten wir TASK-3-defiziente Mäuse. In C57/Bl6-Wildtypmäusen gab es ebenfalls Typ-A- und Typ-B-Neurone. In *in situ*-Hybridisierungen konnte man sehen, dass in der medialen Amygdala nicht alle Zellen TASK-3 exprimieren und elektrophysiologische Messungen zeigten, dass es innerhalb der medialen Amygdala Ruthenium-Rot- bzw. säuresensitive Zellen und -insensitive Zellen gibt. In diesen murinen MeA-Zellen war es nicht möglich, den TASK-3 durch Ruthenium Rot zu isolieren. Dies lag daran, dass zu diesem Zeitpunkt noch eine Lösung mit normaler Calcium-Konzentration ($C_{Ca^{2+}}=2mM$) verwendet wurde und Ruthenium Rot neben TASK-3 auch mit einer Vielfalt von Calciumkanälen und Calciumpumpen wie z.B. die TRPV-Kanäle interferiert (Garcia-Martinez et al., 2000). Diese veränderten Calciumströme überdeckten die Effekte der TASK-3-Inaktivierung. Somit kam es zu keinem signifikanten Unterschied nach Ruthenium-Rot-Behandlung beim Ruhemembranpotenzial, der Erregbarkeit und der Form der Aktionspotenziale. Hingegen konnte in Wildtypmäusen zu Ratten vergleichbare Typ-A-Zellen isoliert werden, deren TASK-3-Strom mit Hilfe von Ansäuerung inhibierbar war. Diese Säuresensibilität gegenüber extrazellulären pH-Veränderungen ist eine wichtige Eigenschaft des TASK-3-Kanals. TASK-3-Kanäle inaktivieren erst ab einem pH-Wert von 4,5 komplett; sind aber bereits innerhalb des physiologischen pH-Bereichs pH-sensitiv (Rajan et al., 2000). In dieser Arbeit wurde trotzdem nur bis pH 6 angesäuert, da die Qualität der Verbindung Pipette-Zellmembran durch stärkere Ansäuerung schlechter wurde. Dennoch sollten die TASK-3-Kanäle in dieser Studie zu 50 % inaktiviert sein. Die funktionell ähnlichen K_{2P} -Kanäle TASK-1, TASK-2 und TASK-5 werden ebenfalls durch pH-Veränderungen beeinflusst und sind möglicherweise Teil der in dieser Arbeit durch pH-Änderung entstandenen Veränderungen der physiologischen Eigenschaften. Allerdings spricht folgendes dagegen: (1) TASK-1 wird in der medialen Amygdala von adulten Ratten nur schwach exprimiert (Karschin et al., 2001) (2) TASK-2 wurde bisher nur in der Peripherie, Hinterwurzelganglien und Rückenmark von humaner mRNA

nachgewiesen (Medhurst et al., 2001). (3) TASK-5 wird nur im auditorischen System, dem olfaktorischen System und den Purkinjezellen des Kleinhirn exprimiert (Karschin et al., 2001). Die Modulation durch externe Protonen hat wichtige Folgeerscheinungen für die physiologische Funktion der TASK-Kanäle (Duprat et al., 1997). Durch Stimuli ausgelöste, kurzzeitige pH-Veränderungen konnten in einer Vielzahl von neuronalem Gewebe nachgewiesen werden (Chesler 1990; Chesler & Kaila, 1992). Diese pH-Veränderungen können auch in pathophysiologischen Situation wie z.B. Epilepsien oder Depressionen, denen pH-Verschiebungen durch basische Ströme vorausgegangen sind, beobachtet werden (Siesjö et al., 1985; Nedergaard et al., 1991). Unter physiologischen Bedingungen treten diese pH-Veränderungen sehr schnell (1-30 ms) und in einem pH-Bereich von $7,4 \pm 0,3$ auf. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass der säuresensitive TASK-3-Strom in Wildtypneuronen zum Ruhemembranpotenzial ($V_m = -52,19 \text{ mV} \pm 4,05$) beiträgt und bei Inhibition das Ruhemembranpotenzial depolarisiert ($V_m = -46,72 \text{ mV} \pm 4,63$). In den Neuronen der TASK-3-defizienten Mäuse führte die Ansäuerung nicht zu einer signifikanten Veränderung des Ruhemembranpotenzials, da hier TASK-3 nicht vorhanden ist. Allerdings hatte diese leichte Veränderung des Ruhemembranpotenzials der Typ-A-Wildtypneurone keine Auswirkung auf die Erregbarkeit. Der Rheobasestrom, die Aktionspotenzialanzahl und die Aktionspotenzialform blieben trotz Ansäuerung unverändert.

Allgemein gab es beim Vergleich des Gesamtstroms von Wildtypneuronen mit dem der Knockoutneurone keine großen Unterschiede. Das Ruhemembranpotenzial, die Erregbarkeit, die Aktionspotenzialamplitude und der Aktionspotenzialovershoot unterschieden sich nicht voneinander. Dies liegt höchstwahrscheinlich daran, dass die Knockouttiere die fehlende TASK-3-Leitfähigkeit von ihrer Entstehung an kompensieren, indem andere Kaliumkanäle hochreguliert wurden und stärker exprimiert sind. Die Kanäle sind höchstwahrscheinlich in größerer Anzahl und verändertem Mengenverhältnis vorhanden. Dadurch entstehen unterschiedliche Kinetiken. Die kompensatorischen Kanäle könnten z. B. K_{ir} -Kanäle oder K_v -Kanäle sein. Eine K_{ir} -Kompensation würde dazu führen, dass wie in diesen Ergebnissen das Ruhemembranpotenzial nicht beeinflusst wird. Aber im Bereich von positiven Spannungen wie z. B. die Aktionspotenzialbreite, sind die K_{ir} -Kanäle bereits geschlossen. Doch die Breite der Aktionspotenziale war unterschiedlich. Aber im Unterschied zu den Rattenexperimenten waren die Aktionspotenziale der

Knockoutneurone schmäler als die der Wildtypneurone was durch eine Überkompensation durch K_v -Kanäle hervorgerufen werden kann.

4.2 Die TASK-3-Regulation der angeborenen Furcht über die Neuronen der medialen Amygdala

TASK-3-defiziente Mäuse wurden bereits in ihrem Verhalten studiert. Sie sind nachtaktiver, reagieren weniger sensitiv auf die TASK-3-Inhibitoren Halothan (Inhalationsanästhetikum) und WIN55212-2 (Cannabinoidrezeptoragonist) und ihr Arbeitsgedächtnis ist beeinträchtigt. Beim Verhalten innerhalb von Lichtphasen gibt es aber genauso wenige Unterschiede zwischen Wildtyp- und Knockouttieren wie bei ihrer Sensibilität auf den α_2 adrenozeptor Agonist Dexmedetomidin, Propofol, Morphin und Lidokain (Linden et al., 2007).

Die mediale Amygdala vermittelt angeborene Furcht. Wird die angeborene Furcht durch einen Duftstoff ausgelöst, werden diese Stimuli mittels sensorischen Neuronen des Hauptriechkolben wahrgenommen (Rosen et al., 2008) und direkt an die mediale Amygdala und den BNST projiziert. Daher wollten wir die Rolle des TASK-3 in der medialen Amygdala mithilfe der Präsentation eines Prädatorendufts testen. In dieser Arbeit wurden Verhaltensänderungen aufgrund der Exposition von lebensbedrohlichen Umständen, wie hier dem Prädatorenduft TMT, untersucht. Über die letzten Jahre wurde TMT immer häufiger als Werkzeug, um Angst bzw. Furcht und Stress zu untersuchen genutzt und somit konnte etabliert werden, dass die Exposition von TMT das Freezing-Verhalten erhöht (Fendt et al., 2005). Deshalb konnte auch in dieser Studie gezeigt werden, dass das Freezing-Verhalten von Mäusen durch Exposition von TMT erhöht wird. Spannend ist die Beobachtung, dass TASK-3-Knockouttiere weniger stark auf TMT reagieren als Wildtyptiere. Möglicherweise ist dies die Folge der erhöhten Erregbarkeit medialer Amygdalaneurone in den TASK-3-defizienten Mäuse. Ob das unterschiedliche Freezing-Verhalten tatsächlich am unterschiedlichen Expressionsmuster von TASK-3 innerhalb der medialen Amygdala liegt, ist jedoch kontrovers zu diskutieren. Hierzu muss man sich den neuronalen Ablauf bei der Präsentation eines Prädatorendufts genauer anschauen. Das bisherige Modell sieht vor, dass die Duftinformation vom olfaktorischen Bulbus registriert und an die mediale Amygdala und den BNST weitergeleitet wird. Von dort wird die Information innerhalb eines Komplexes, der

normalerweise dem angeborenen Verteidigungsverhalten dienlich ist und aus anteriorem und ventromedialem hypothalamischen Nucleus, sowie dorsalem premammilärem Nucleus besteht, verarbeitet und an das periaquäduktale Grau weitergeleitet. Von dort aus wird dann die Schreckstarre ausgelöst (Canteras et al., 2001; Rosen et al., 2008).

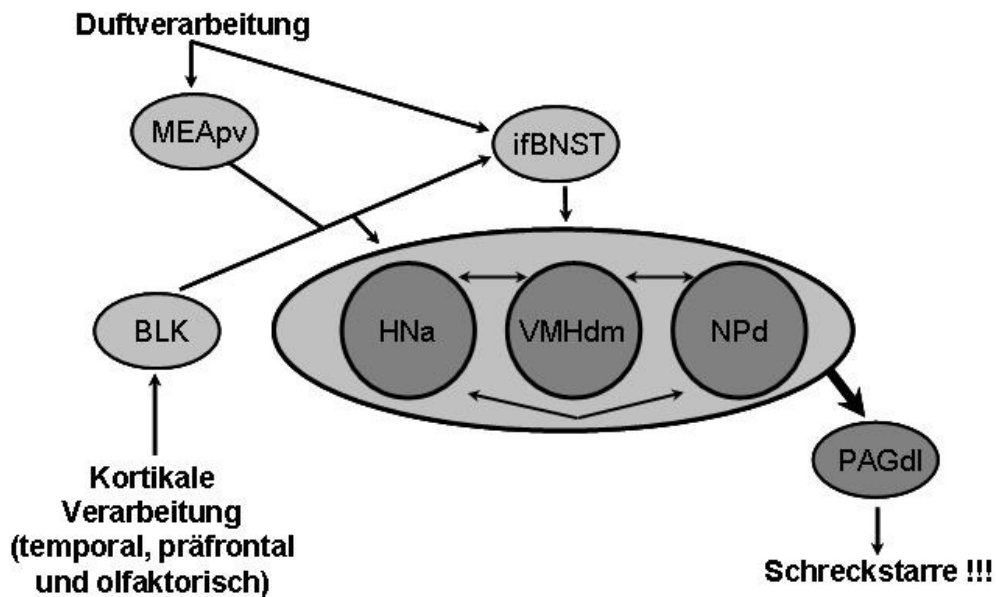


Abbildung 4.1 Die angeborene Furchtreaktion bei Prädatorenduftpräsentation

MEApv: mediale Amygdala, posterior-ventraler Teil. ifBNST: Interfaszikulärer Nucleus des BNST. BLK: Basolateraler Amygdalakomplex. HNa: Hypothalamischer Nucleus, anteriorer Teil. VMHdm: Ventromedialer hypothalamischer Nucleus, dorsomedialer Teil. NPd: Nucleus premammillaris dorsalis. PAGdl: Periaquäduktales Grau, dorsolateraler Teil. Schaubild nach Canteras et al., 2001 und Rosen et al., 2008.

Über die Expression von TASK-Kanälen bei Mäusen gibt es bisher nur eine Studie in der gezeigt wurde, dass im Hippocampus sowohl prä- als auch postnatal TASK-3 stark und TASK-1 schwach exprimiert wird und im Kleinhirn TASK-3 und TASK-1 postnatal exprimiert wird (Aller & Wisden, 2008). Genaue Angaben zur Amygdala werden nicht gemacht. In dieser Arbeit konnte mithilfe von *in situ*-Hybridisierungen gezeigt werden, dass TASK-3 in den Zellen der medialen Amygdala exprimiert wird. Unsere Erklärung dafür, dass die Knockouttiere weniger stark auf TMT reagieren liegt nach den Experimenten darin, dass die GABAergen Neurone innerhalb der medialen Amygdala leichter erregbar sind und somit die Inhibition erhöht ist und die Tiere letztlich schwächer auf den Prädatorenduft reagieren. Die Zellen der medialen

Amygdala projizieren zu den olfaktorischen Bahnen und des Weiteren zur: a) intrahippokampalen Bahn; b) ventralem Striatum, ventralem Pallidum und BNST im basalen Telencephalon; c) Hypothalamus; d) Teile des Thalamus und e) Periaquäduktalem Grau, ventralem Tegmentum und Raphekern des Mittelhirns (Canteras et al., 1995). Eine stärkere Aktivität der medialen Amygdala führt demnach möglicherweise zu einer schwächeren Ausprägung von angeborener Angst. Denkbar ist hingegen aber auch ein genotypischer Unterschied in der Wahrnehmung von TMT innerhalb des olfaktorischen Bulbus. Von erwachsenen Ratten ist bekannt, dass im olfaktorischen System TASK-3 exprimiert wird und somit bei TASK-3-Knockoutmäusen eine veränderte Geruchswahrnehmung vorstellbar ist (Karschin et al., 2001). Allerdings wird TASK-1 im olfaktorischen System ebenfalls exprimiert und könnte bei einem TASK-3-Knockouttier kompensatorisch hochreguliert sein. Aber auch die veränderte TASK-3-Expression innerhalb des BNST, dem anteriorem und ventromedialem hypothalamischen Nucleus, dem dorsalen premammilärem Nucleus, sowie dem periaquäduktalem Grau, könnte zu einem veränderten Verhalten geführt haben. Insbesondere, da bereits bekannt ist, dass TASK-3 bei adulten Ratten im BNST und ventromedialen hypothalamischen Nucleus stark und im dorsalen premammilären Nucleus sehr stark exprimiert wird. In diesen drei Kernen wird aber TASK-1 auch schwach exprimiert, was bei einem Knockouttier zu einer kompensatorischen Hochregulation führen könnte. Schließlich könnte das veränderte Verhalten der Knockouttiere auch von Muskel- oder Muskelinnervationsveränderung her rühren. Dies ist allerdings unwahrscheinlich, da erstens laut Karschin et al. 2001 Ratten im Muskelgewebe TASK-3 nicht exprimieren und zweitens, dann in der hier vorliegenden Arbeit bei der Variablen Springen ein unterschiedliches Verhalten zu beobachten gewesen wäre. Allerdings beschreibt O'Connell 2002 eine Expression von TASK-3 im Skelettmuskel von Ratten, Hamstern und Menschen.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass der TASK-3-Strom in Zellen der medialen Amygdala von Ratten und Mäusen eine große Rolle bei deren Erregbarkeit spielt und somit auch bei der Verarbeitung von angeborener Furcht wichtig ist.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Neurone der medialen Amygdala spielen eine wichtige Rolle bei der Verarbeitung von unkonditionierter Angst und aggressivem Verhalten (Nelson and Trainor, 2007). Ihre Erregbarkeit wird höchstwahrscheinlich durch eine Hintergrundleitfähigkeit von K_{2P} -Kanälen und ihrem molekularen Korrelat reguliert. Bisher sind 15 dieser K_{2P} -Kanäle bekannt. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Expression und die physiologische Funktion des TASK-3, einem säure-sensitivem K_{2P} -Kanal, in dieser Gehirnregion untersucht.

Bisher konnte die TASK-3-Expression durch *in situ*-Hybridisierungen in erwachsenen Ratten gezeigt werden (Karschin et al., 2001). Entsprechend konnten wir einen, dem TASK-3 ähnlichen Strom, durch elektrophysiologische Ganzzellmessungen in akuten Hirnschnitten nachweisen. Um die Beteiligung des TASK-3 an diesem Gesamtstrom zu überprüfen, verwendeten wir den selektiven TASK-3 Antagonisten Ruthenium Rot oder veränderten den extrazellulären pH-Wert auf pH 6,4. Ruthenium-Rot- bzw. pH-sensitive Neurone zeigten ein negativeres Ruhemembranpotential ($-56.31 \text{ mV} \pm 1.51$; $n = 17$) als die Neurone, die nicht sensitive für Ruthenium-Rot oder pH-Veränderungen waren ($-48.39 \text{ mV} \pm 1.55$; $n = 13$; $p = 0.001$). Zusätzlich verstärkte Ruthenium Rot die Aktionspotenzialfrequenz und die Aktionspotenzialbreite bei Stromapplikation in den Zellen mit einem positiveren Ruhemembranpotential.

Unsere *in situ*-Hybridisierungen in C57/Bl6 Mäusen zeigten eine starke Expression des TASK-3-Kanals in den Neuronen der medialen Amygdala. Darum wurde die Erregbarkeit von TASK-3 Wildtypneuronen mit denen von TASK-3-Knockoutneuronen verglichen. Wir konnten einen säuresensitiven Kaliumstrom in den TASK-3 Wildtypzellen identifizieren, welche in den TASK-3 Knockoutzellen abwesend war. Überraschenderweise tauchten keine Unterschiede in der Aktionspotenzialform, dem Ruhemembranpotential oder des Rheobasestrom auf.

Verhaltenstests zeigten, dass TASK-3 Wildtyp Mäuse auf die Präsentation von TMT, ein Duftstoff aus den Fäkalien von Füchsen, stärker freeze, als TASK-3-Knockoutmäuse. Dies zeigt, dass ein Fehlen des TASK-3 zu einer geringeren Furchtantwort beiträgt.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass TASK-3 bei der zellulären Erregbarkeit von Neuronen der medialen Amygdala von Ratten eine große Rolle spielt. Diese TASK-3-Kanäle sind in der medialen Amygdala von Mäusen ebenso exprimiert, wo sie zur Verarbeitung von Furchtverhalten beitragen.

6 SUMMARY

Neurons of the medial amygdala play an important role in processing unconditioned fear and aggressive behaviour (Nelson and Trainor, 2007). Their excitability is supposed to be regulated by a background conductance with two-pore domain potassium channels (K_{2P}) as its molecular correlate. So far, there are 15 K_{2P} -channels known. In this thesis the expression and the physiological function of TASK-3, an acid-sensitive K_{2P} -channel, in this brain region was investigated.

Previously, there was a TASK-3 channel expression in the medial amygdala from adult rats demonstrated by *in situ*-hybridisation (Karschin et al., 2001). Correspondingly, we also detected a TASK-3-like current by electrophysiological whole-cell measurements in acute brain slices. To identify the contribution of TASK-3 to the standing outward current (I_{Kso}) upon depolarising pulses we used the selective TASK-3 antagonist ruthenium red (RR) or acidification to pH 6.4. RR- or pH-sensitive neurons showed a more hyperpolarised resting membrane potential ($-56.31 \text{ mV} \pm 1.51$; $n = 17$) compared to neurons lacking TASK-3-like currents ($-48.39 \text{ mV} \pm 1.55$; $n = 13$; $p = 0.001$). In addition, Ruthenium Red enhanced action potential frequency and action potential width during current injections in the more hyperpolarised cells.

Our *in situ*-hybridizations in C57/Bl6 mice indicate that the same member of the K_{2P} , acid sensitive TASK-3 channel, is also strongly expressed in neurons of the medial amygdala of mice. We therefore compared medial amygdaloid excitability in TASK-3 wildtype and TASK-3 knockout mice. We could detect an acid sensitive potassium current in the TASK-3 wildtype mice, which was absent in the TASK-3 knockout mice. Surprisingly, we could not detect significant differences in parameters defining the shape of an action potential, the resting membrane potential or the rheobase current.

Behavioural tests analyzing the freezing behaviour showed that TASK-3 wildtype mice do react stronger to the frightful odour of TMT than TASK-3 knockout mice. Indicating, that TASK-3 knockout mice do have less fear response.

Taken together, these data suggest that TASK-3 channels are very important in controlling cellular excitability of medial amygdaloid neurons in rats. These TASK-3

channels are also expressed in mice where they contribute to the fear behaviour of freezing.

7 LITERATUR

- ACOSTA-MARTINEZ M, FIBER JM, BROWN RD AND ETGEN AM (1999) Localization of α_{1B} -adrenergic receptor in female rat brain regions involved in stress and neuroendocrine function. *Neurochem. Internat.* **35**, 383-391.
- ANDERSON PAV AND SCHWAB WE (1982) Recent advances and model systems in coelenterate neurobiology. *Prog. Neurobiol.* **19(4)**, 213-236.
- ALLER MI AND WISDEN W (2008) Changes in expression of some two-pore domain potassium channel genes (KCNK) in selected brain regions of developing mice. *Neuroscience* **151**, 1154-1172.
- BARTSCH S, BARTSCH U, DÖRRIES U, FAISSNER A, WELLER A, EKBLUM P AND SCHACHNER M (1992) Expression of tenascin in the developing and adult cerebellar cortex. *J. Neurosci.* **12(3)**, 736-749.
- BAYLISS DA, SIROIS JE, TALLEY EM (2003) The TASK family: Two-pore domain background K channels. *Mol. Interv.* **3**, 205-219, and erratum (2003) **3**, 252.
- BEAN BP (2007) The action potential in mammalian central neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 451-465.
- BLEDNOV Y, STOFFEL M, CHANG SR AND HARRIS A (2001) GIRK2 deficient mice: Evidence for hyperactivity and reduced anxiety. *Physiology & Behavior* **74**, 109-117.
- BRICKLEY SG, ALLER MI, SANDU C, VEALE EL, ALDER FG, SAMBI H, MATHIE A AND WISDEN W (2007) TASK-3 two-pore domain potassium channels enable sustained high-frequency firing in cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.* **35**, 9329-9340.
- BROWN RE, STEVENS DR AND HAAS HL (2001) The physiology of brain histamine. *Progress of Neurobiology* **63**, 637-672.
- BURDACH KF (1819) Vom Baue und Leben des Gehirns. *Leipzig* **1**.
- CANTERAS NS, RIBEIRO-BARBOSA ER, COMOLI E (2001) Tracing from the dorsal premammillary nucleus prosencephalic systems involved in the organization of innate fear responses. *Neurosci. Biobehav. Review* **25**, 661-668.
- CANTERAS NS, SIMERLY RB AND SWANSON LW (1992a) Connections of the posterior nucleus of the amygdala. *J. Comp. Neurol.* **324**, 143-179.
- CANTERAS NS, SIMERLY RB AND SWANSON LW (1995) Organization of Projections From the Medial Nucleus of the Amygdala: A PHAL study in the rat. *J. Comp. Neurol.* **360**, 213-245.

- CHARPENTIER F (2007) Understanding the cardiac role of K₂P channels: A new TASK for electrophysiologists. *Cardiovasc. Res.* **75**, 5-7.
- CHEMIN J, GIRARD C, DUPRAT F, LESAGE F, ROMEY G AND LAZDUNSKI M (2003) Mechanisms underlying excitatory effects of group I metabotropic glutamate receptors via inhibition of 2P domain K⁺ channels. *EMBO J.* **22(20)**, 5403-5411.
- CHEN X, TALLEY EM, PATEL N, GOMIS A, MCINTIRE WE, DONG B, VIANA F, GARRISON JC AND BAYLISS DA (2006) Inhibition of a background potassium channel by Gq protein α -subunits. *PNAS* **103**, 3422-3427.
- CHESLER M (1990) The regulation and modulation of pH in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* **34**, 401-427.
- CHESLER M AND KAILA K (1992) Modulation of pH by neuronal activity. *Trends Neurosci.* **15**, 386-402.
- CORNEA-HÉRBERT V, RIAD M, WU C, SINGH SK AND DESCARRIES L (1999) Cellular and Subcellular Distribution of the Serotonin 5-HT_{2A} Receptor in the Central Nervous System of Adult Rat. *J. Comp. Neurol.* **409**, 187-209.
- CORYELL MW, ZIEMANN AE, WESTMORELAND PJ, HAENFLER JM, KURJAKOVIC, XZ, PRICE M, SCHNIZLER MK AND WEMMIE JA (2007) Targeting ASIC1a reduces innate fear and alters neuronal activity in the fear circuit. *Biol. Psychiatry* **62**, 1140-1140.
- CZIRJÁK G AND ENYEDI P (2002) Ruthenium red inhibits TASK-3 potassium channel by interconnecting glutamate 70 of the two subunits. *Mol. Pharmacol.* **63**, 646-652.
- DAVIES LA, HU C, GUAGLIARDO NA, SEN N, CHEN X, TALLEY E, CAREY RM, BAYLISS DA AND BARRETT PQ (2008) TASK channel deletion in mice causes primary hyperaldosteronism. *PNAS* **105(6)**, 2203-2208.
- DAY HE, MASINI CV AND CAMPEAU S (2004) The pattern of brain c-fos mRNA induced by a component of fox odour, 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT), in rats, suggests both systemic and processive stress characteristics. *Brain Res.* **1025**, 139-151.
- DEETJEN, SPECKMANN AND HESCHELER (2004) Physiologie.
- DOBLER T, SPRINGAU F, TOVORNIK S, WEBER M, SCHMITT A, SEDLMEIER R, WISCHMEYER E AND DÖRING F (2007) TREK two-pore-domain K⁺ channels constitute a significant component of background potassium currents in murine dorsal root ganglion neurones. *J. Physiol.* **585.3**, 867-879.
- DOMYANCIC AV AND MORILAK DA (1997) Distribution of α_{1A} Adrenergic Receptor mRNA in the Rat Brain Visualized by In Situ Hybridization. *J. Comp. Neurol.* **386**, 358-378.

DUDEL, MENZEL AND SCHMIDT (2000) Neurowissenschaft. Vom Molekül zur Kognition.

DUPRAT F, LESAGE F, FINK M, REYES R, HEURTEAUX C AND LAZDUNSKI M (1997) TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *The EMBO J.* **16(17)**, 5464-5471.

ECKERT R AND BREHM P (1979) Ionic mechanisms of excitation in Paramecium. *Annu. Rev. Bioeng.* **8**, 353-383.

EHRlich I, HUMEAU Y, GRENIER F, CIOCCHI S, HERRY C AND LÜTHI A (2009) Amygdala Inhibitor Circuits and the Control of Fear Memory. *Neuron* **62**, 757-771.

FENDT M AND FANSELOW MS (1999) The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **23**, 743-760.

FENDT M, ENDRES T AND APFELBACH R (2003) Temporary inactivation of the bed nucleus of the stria terminalis but not of the amygdala blocks freezing induced by trimethylthiazoline, a component of fox feces. *J. Neurosci.* **23**, 23-27.

FERGUSON JN, ALDAG JM, INSEL TR AND YOUNG LJ (2001) Oxytocin in the Medial Amygdala is Essential for Social Recognition in the Mouse. *The J. of Neurosci.* **21(20)**, 8278-8285.

FRANCIOLINI F AND PETRIS A (1989) Evolution of Ionic Channel of Biological Membranes. *Mol. Biol. Evol.* **6(5)**, 503-513.

GARCIA-MARTINEZ C, MORENILLA-PALAO C, PLANELLS-CASES R, MERINO JM AND FERRER-MONTIEL A (2000) Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties. *J. Biol. Chem.* **275(42)**, 32552-32558.

GOLDSTEIN SAN, BOCKENHAUER D, O'KELLY I AND ZILBERBERGER N (2001) Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 175-184

GUIDOBONO F, NETTI C, PECILE A, GRITTI I AND MANCIA M (1987) Calcitonin binding site distribution in the cat central nervous system: a wider insight of the peptide involvement in brain functions. *Neuropeptides* **10(3)**, 265-273.

HAMILL OP, MATY A, NEHER E, SAKMANN B AND SIGWORTH FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* **391(2)**, 85-100.

HARMAR AJ, HILLS RA, ROSSER EM, JONES M, BUNEMAN OP, DUNBAR DR, GREENHILL SD, HALE VA, SHARMAN JL, BONNER TI, CATTERALL WA, DAVENPORT AP, DELAGRANGE P, DOLLERY CT, FOORD SM, GUTMAN GA, LAUDET V, NEUBIG RR, OHLSTEIN EH, OLSEN RW, PETERS J, PIN JP, RUFFOLO RR, SEARLS DB, WRIGHT MW AND SPEDDING M (2009) IUPHAR-DB: the IUPHAR database of G protein-coupled receptors and ion channels. *Nucleic Acids Res.* **37**, 680-685.

HODGIN AL AND HUXLEY AF (1952) A quantitative description of membrane current and its application on conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* **117**, 500-544.

HOYER D, HANNON JP AND MARTIN GR (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharm., Biochem. and Behav.* **71**, 533-554.

JANITZKY K, STORK O, LUX A, YANAGAWA Y, SCHWEGLER H AND LINKE R (2009) Behavioural effects and pattern of brain c-fos mRNA induced by 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline, a component of fox feces odour in GAD67-GFP knock-in C57BL/6 mice. *Behav. Brain Res.* **202**, 218-224.

KARSCHIN C, WISCHMEYER E, PREISING-MÜLLER R, RAJAN S, DERST C, GRZESCHIK KH, DAUT J AND KARSCHIN A (2001) Expression pattern in brain of TASK-1, TASK-3, and a tandem pore domain K(+) channel subunit, TASK-5, associated with the central auditory nervous system. *Mol. Cell. Neurosci.* **18**, 632-648.

KETCHUM KA, JOINER WJ, SELLERS AJ, KACZMAREK LK AND GOLDSTEIN SAN (1995) A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* **376**, 690-695.

KIM D (2005) Physiology and pharmacology of two-pore domain potassium channels. *Curr. Pharm. Des.* **11(21)**, 2717-2736.

KIM Y, BANG H AND KIM D (2000) TASK-3, a new member of the tandem pore K(+) channel family. *J. Biol. Chem.* **275**, 9340-9347.

KINDLER CH AND YOST CS (2005) Two-Pore Domain Potassium Channels: New Sites of Local Anesthetic Action and Toxicity. *Reg. Anesth. Pain Med.* **30**, 260-274.

KNAPSKA E, RADWANSKA K, WERKA T AND KACZMAREK L (2007) Functional Internal Complexity of Amygdala: Focus on Gene Activity Mapping After Behavioural Training and Drugs of Abuse. *Physiol. Rev.* **87**, 1113-1173

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

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

- LEDOUX JE (1996) The Emotional Brain. *Annu. Rev. Neurosci.* **23**, 155-184.
- LEDOUX JE (2007) The amygdala. *Curr Biol* **17(20)**, R868-874.
- LEHMAN MN AND WINANS SS (1982) Vomeronasal and olfactory pathways to the amygdala controlling male hamster sexual behaviour: autoradiographic and electrolytic analyses. *Brain Res.* **240**, 27-41.
- LESAGE F (2003) Pharmacology of neuronal background potassium channels. *Neuropharm.* **44**, 1-7.
- LESAGE F AND LAZDUNSKI M (2000) Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **279(5)**, 793-801.
- LI CI, MAGLINAO TL AND TAKAHASHI LK (2004) Medial amygdala modulation of predator odour-induced unconditioned fear in the rat. *Behav. Neurosci* **118**, 324-332.
- LINDEN AM, SANDU C, ALLER MI, VEKOVISCHEVA OY, ROSENBERG PH, WISDEN W AND KORPI ER (2007) TASK-3 knockout mice exhibit exaggerated nocturnal activity, impairments in cognitive functions, and reduced sensitivity to inhalation anaesthetics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **323**, 924-934.
- LU L, HOPE BT, DEMPSEY J, LIU SY, BOSSERT JM AND SHAHAM Y (2005) Central amygdala ERK electrolyte pathway is critical to incubation of cocaine craving. *Nat. Neurosci.* **8**, 212-219.
- MAREN S (2001) Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 897-931.
- MASH DC AND POTTER LT (2003) Autoradiographic localization of M1 and M2 muscarine receptors in the rat brain. *Neuroscience* **19(2)**, 551-564.
- MATHIE A (2007) Neuronal two pore domain potassium channels and their regulation by G protein coupled receptors. *J. Physiol.* **578**, 377-385.
- MATHIE A, WOOLTORTON JRA AND WATKINS S (1998) Voltage-activated potassium channels in mammalian neurons and their block by novel pharmacological agents. *Gen. Pharmac.* **30**, 13-24.
- MCDONALD AJ AND AUGUSTINE JR (1993) Localization of GABA-like immunoreactivity in the monkey amygdala. *Neuroscience* **52(2)**, 281-294.
- MC GAUGH JL (2004) The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu. Rev. Neurosci.* **27**, 1-28.

MEDHURST AD, RENNIE G, CHAPMAN CG, MEADOWS H, DUCKWORTH MD, KELSELL RE, GLOGER II AND PANGALOS MN (2001) Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **86(1-2)**, 101-114.

MORLIAK DA, GARLOW SJ AND CIARANELLO RD (1993) Immunocytochemical localization and description of neurons expressing serotonin₂ receptors in the rat brain. *Neuroscience* **54(3)**, 701-717.

MÜLLER M AND FENDT M (2006) Temporary inactivation of the medial and basolateral amygdala differentially affects TMT-induced fear behaviour in rats. *Behav. Brain Res.* **167.**, 57-62.

NEDERGAARD M, KRAIG RP, TANABE J AND PULSINELLI WA (1991) Dynamics of interstitial and intracellular pH in evolving brain infarct. *Am. J. Physiol.* **260**, R581-R588.

NELSON RJ AND TRAINOR BC (2007) Neural mechanisms of aggression. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**,536-546.

NOSE I, HIGASHI H, INOKUCHI H AND NISHI S (1991) Synaptic responses of Guinea pig and rat central amygdala neurons, in vitro. *J. Neurophysiol.* **5**, 1227-1241.

O'CONNELL AD, MORTON MJ AND HUNTER M (2002) Two-pore domain K⁺ channels-molecular sensors. *Biochim. Biophys. Acta* **1566**, 152-161.

OTTONI EB (2000) EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behav. Res. Methods Instrum. Comput.* **32**, 446-449.

PFAFF D AND KEINER M (1973) Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat. *J. Comp. Neurol.* **151**, 121-158.

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

POMPEIANO M, PALACIOS JM AND MENGOD G (1994) Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Mol. Brain Res.* **23**, 163-178.

PUTZKE C, WEMHONER K, SACHSE FB, RINNE S, SCHLICHTHORL G AND LI XT (2007) The acid-sensitive potassium channel TASK-1 in rat cardiac muscle. *Cardiovasc. Res.* **75**, 59-68.

RAJAN S, WISCHMEYER E, XIN LIU G, PREISIG-MÜLLER R, DAUT J, KARSCHIN A AND DERST C (2000) TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K⁺ channel. An extracellular histiding as pH sensor. *J. Biol. Chem.* **275**, 16650-16657.

RODRIGUES SM, BAUER EP, FARB CR, SCHAFE GE AND LEDOUX JE (2002) The Group I metabotropic glutamate receptor mGluR5 is required for fear memory formation and long-term potentiation in the lateral amygdala. *J. Neurosci.* **22(12)**, 5219-5229.

ROGAN MT AND LEDOUX JE (1996) Emotion: systems, cells, synaptic plasticity. *Cell* **85**, 469-475.

ROSEN JB, PAGANI JH, ROLLA KLG, DAVIS C (2008) Analysis of behavioural constraints and the neuroanatomy of fear to the predator odor trimethylthiazoline: A model for animal phobias. *Neurosci. And Behav. Rev.* **32**, 1267-1276.

ROWE DW AND ERSKINE MS (1993) c-Fos proto-oncogene activity induced by mating in the preoptic area, hypothalamus and amygdala in the female rat: role of afferent input via the pelvic nerve. *Brain Res.* **621**, 25-34.

RUDY JW AND MATUS-AMAT P (2009) DHPG activation of group 1 mGluRs in BLA enhances fear conditioning. *Learn. Mem.* **16**, 421-425.

SAH P, FABER ESL, LOPEZ DE ARMENTIA M AND POWER J (2003) The Amygdaloid Complex: Anatomy and Physiology. *Physiol. Rev.* **80**, 803-834.

SAKMANN B AND NEHER E (1997) Single-Channel Recording. *Springer US*.

SARTER M AND MARKOWITSCH HJ (1985) Involvement of the amygdala in learning and memory: a critical review, with emphasis on anatomical relations. *Behav. Neurosci.* **99**, 342-380.

SCALIA F AND WINANS SS (1975) The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J. Comp. Neurol.* **161**, 31-55.

SCHIESS MC, ASPRODINI EK, RAINNIE DG, SHINNICKER-GALLAGHER P (1993) The central nucleus of the rat amygdala: in vitro intracellular recordings. *Brain Research* **604**, 283-297.

SCHIESS MC, CALLAHAN PM AND ZHENG H (1999) Characterization of the electrophysiological and morphological properties of rat central amygdala neurons in vitro. *J. Neurosci. Res.* **58**, 663-673.

SIESJÖ BK, VON HANWEHR R, NERGLIUS G, NEVANDER G AND INGVAR M (1985) Extra- and intracellular pH in the brain during seizures and in the recovery period following the arrest of seizure activity. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **5**, 47-57.

STUMPF WE AND SAR M (1975) Autoradiographic techniques for localizing steroid hormones. *Methods Enzymol.* **36**, 135-156.

SUN N AND CASSELL MD (1993) Intrinsic GABAergic neurons in the rat central extended amygdala. *J. Comp. Neurol.* **330(3)**, 381-404.

- SWANSON LW AND PETROVICH GD (1998) What is the amygdala? *Trends Neurosci.* **21**, 323-331.
- TALLEY EM, SIROIS JE, LEI Q AND BAYLISS DA (2003) Two-pore-Domain (KCNK) potassium channel: dynamic roles in neuronal function. *Neuroscientist* **9**, 46-56.
- VAN DER ZEE EA, ROOZENDAAL B, BOHUS B, KOOLHAAAS JM AND LUITEN PGM (1997) Muscarinic acetylcholine receptor immunoreactivity in the amygdala – I. Cellular distribution correlated with fear-induced behavior. *Neuroscience* **76(1)**, 63-73.
- VAZDARJANOVA A, CAHILL L AND MCGAUGH JL (2001) Disrupting basolateral amygdala function impairs unconditioned freezing and avoidance in rats. *European J. of Neurosci.* **14**, 709-718.
- VEALE EL, KENNARD LE, SUTTON GL, MACKENZIE G, SANDU C AND MATHIE A (2007) G α_q -mediated regulation of TASK-3 two-pore domain potassium channels: the role of protein kinase C. *Mol. Pharmacol.* **71(6)**, 1666-1675.
- VEINANTE P AND FREUND-MERCIER MJ (1997) Distribution of Oxytocin- and Vasopressin-Binding Sites in the Rat Extended Amygdala: A Histoautoradiographic Study. *The J. of Comp. Neurol.* **383**, 305-325.
- WALLACE KJ AND ROSEN JB (2000) Predator odor as an unconditioned fear stimulus in rats: elicitation of freezing by trimethylthiazoline, a component of fox feces. *Behav. Neurosci* **114**, 912-922.
- WALLACE KJ AND ROSEN JB (2001) Neurotoxic lesions of the lateral nucleus of the amygdala decrease conditioned fear but not unconditioned fear of a predator odor comparison with electrolytic lesions. *J. Neurosci.* **21**, 3619-3627.
- WEBER M, SCHMIDT A, WISCHMEYER E AND DÖRING F (2008) Excitability of pontine startle processing neurons is regulated by the two-pore domain K⁺ channel TASK-3 coupled to 5HT-2c receptors. *Euro. J. Neurosci.* **28(5)**, 931-940.
- WEMMIE JA, ASKWITH CC, LAMANI E, CASSELL MD, FREEMAN JHJ AND WELSH MJ (2003) Acid-sensing ion channel 1 is localized in brain regions with high synaptic density and contributes to fear conditioning. *J. Neurosci.* **23**, 5496-5502.
- WILL MJ, FRANZBLAU EB AND KELLEY AE (2004) The amygdala is critical for opioid-mediated binge eating of fat. *Neuroreport* **15**, 1857-1860.
- WRIGHT DE, SEROOGY KB, LUNDGRAN KH, DAVIS BM AND JENNES L (1995) Comparative Localization of Serotonin_{1A}, _{1C}, and ₂ Receptor Subtype mRNAs in Rat Brain. *J. Comp. Neurol.* **351**, 357-373.

Danksagung

Ich danke Prof. Andreas Karschin und Prof. Manfred Heckman, dass ich am Lehrstuhl für Neurophysiologie des Physiologischen Instituts Würzburg meine Doktorarbeit anfertigen durfte und der Fakultät für Biologie, dass ich dort mein Promotionsverfahren durchführen durfte.

Mein Dank gilt meinen drei principle investigators Prof. Erhard Wischmeyer, Prof. Esther Asan und Prof. Joseph Claßen für die Betreuung meiner Doktorarbeit.

Für die wissenschaftliche und finanzielle Unterstützung meiner Doktorarbeit danke ich dem RTG 1253/1. Für weitere finanzielle Unterstützung danke ich dem Frauenbüro der Universität Würzburg, dem physiologischen Institut der Universität Würzburg, meiner Familie und Verwandtschaft und Herrn Martin Rumbocic.

Mein größter Dank gilt Dr. Maruschka Weber für die Betreuung meiner Doktorarbeit, die sehr gute Einführung in die Elektrophysiologie und die konstante und ehrliche Motivation.

Danken möchte ich auch den technischen Mitarbeitern des Lehrstuhls für ihre fachliche Unterstützung. Ganz besonders Frau Ursula Herbot-Brandt für ihre Hilfe in der Elektrophysiologie und der Single-Cell-PCR und Frau Brigitte Trost für ihre Hilfe bei der *in situ*-Hybridisierung.

Die Verhaltensversuche konnten mit Hilfe von Dr. Kathrin Janitzky durchgeführt werden. Vielen Dank für die Einführung in die Verhaltensbiologie und die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Für ihre Hilfe bei der Statistik möchte ich Prof. Peter Weyers, Dr. Marta Andreatta und ganz besonders Herrn Matthias Michalik danken.

Korrektur gelesen haben meine Dissertation Frau Monika Grasmannsdorf und Herr Martin Rumbocic. Dank dafür.