

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Zoologie

Mögliche Interaktionen des endocannabinoiden Systems
mit dem 5-HT₃-Rezeptor in der Amygdala: Untersuchungen zur
Bedeutung für die Modulation der GABAergen synaptischen
Transmission und Furchtkonditionierung

Daniela Höfelmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Klingenspor

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. H. Luksch

2. apl. Prof. G. K. Rammes, PhD.

Die Dissertation wurde am 02.04.2012 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 03.07.2012 angenommen.

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das endocannabinoide System.....	1
1.1.1	Endocannabinoide steuern die neuronale Aktivität	3
1.1.2	Bedeutung des ECS für somatische und psychiatrische Erkrankungen... ..	7
1.2	Das serotonerge System.....	9
1.2.1	Serotonin (5-HT) und seine Rezeptoren.....	10
1.2.2	Bedeutung des 5-HT ₃ -Rezeptors für somatische und psychiatrische Erkrankungen.....	12
1.3	Hinweise auf eine Interaktion zwischen dem ECS und dem 5-HT ₃ -Rezeptor	14
1.4	Die Amygdala.....	15
1.4.1	Bedeutung der Amygdala in der Verarbeitung von Schmerz und Angst .	17
1.5	Synaptische Plastizität	20
1.6	Synaptische Transmission	21
1.7	Zielsetzung der Arbeit	24
2	Material und Methoden.....	25
2.1	Herstellung von Hirnschnittpräparaten der Amygdala.....	25
2.2	Infrarot-Videomikroskopie	27
2.3	Infrarotmikroskopisch kontrollierte Photostimulation.....	29
2.3.1	Laser-Photostimulation	29
2.4	Elektrophysiologie	31
2.4.1	Versuchsaufbau	31
2.4.2	Ganzzelleableitung und Stimulation	33
2.5	Verhaltensversuche	38
2.5.1	Tiere.....	38
2.5.2	Durchführung der Verhaltenstests.....	38
2.5.3	Analyse und Statistik der Verhaltenstests	39
2.5.4	Pharmazeutika und Experimentaufbau.....	39
2.6	Auswertung und Statistik.....	40

3	Ergebnisse	45
3.1	Spielen 5-HT ₃ -Rezeptoren eine Rolle bei der Modulation der GABAergen Transmission in der BLA?	45
3.2	Besteht auf der Ebene der GABAergen synaptischen Transmission eine Interaktion zwischen ECS und 5-HT ₃ -Rezeptoren?	47
3.2.1	5-HT ₃ -Rezeptor Antagonist Ondansetron reduziert eGABA _A -IPSCs und pGABA _A -ICs	47
3.2.2	Tropisetron (50 nM) reduziert eGABA _A -IPSCs ohne direkten Antagonismus an GABA _A -Rezeptoren.....	48
3.2.3	Tropisetron (50 nM) reduziert eGABA _A -IPSCs über den nikotinergen Acetylcholin (nAch)-Rezeptor	50
3.2.4	mIPSCs.....	51
3.3	Sind 5-HT ₃ -Rezeptoren an der Kontrolle von Cannabinoid-vermittelter synaptischer Aktivität (LTDi) beteiligt?	53
3.3.1	5-HT ₃ -Rezeptoren haben keinen Einfluss auf die Induktion von LTDi.....	53
3.4	Welche Bedeutung hat der 5-HT ₃ -Rezeptor für Akquisition und Extinktion furchtbezogener Gedächtnisinhalte in Verhaltensuntersuchungen?	55
3.4.1	Die Aktivierung von 5-HT ₃ -Rezeptoren dämpft die Extinktion	56
3.4.2	Die pharmakologische Modifikation von 5-HT ₃ -Rezeptoren beeinflusst nicht die Extinktion aversiver Gedächtnisinhalte.....	57
4	Diskussion.....	60
4.1	Einfluss von 5-HT ₃ -Rezeptor-Antagonisten auf die Modulation der GABAergen Transmission in der BLA.....	60
4.2	Auf Ebene der GABAergen synaptischen Transmission besteht keine Interaktion zwischen ECS und 5-HT ₃ -Rezeptoren.....	63
4.3	Einfluss der 5-HT ₃ -Rezeptoren auf die Kontrolle von Cannabinoid-vermittelter synaptischer Aktivität (LTDi)	65
4.4	Die Aktivierung von 5-HT ₃ -Rezeptoren inhibiert die Extinktion	66
4.5	Die pharmakologische Modifikation von 5-HT ₃ - und CB1-Rezeptoren zeigt keine gegenseitige Beeinflussung der Extinktion aversiver Gedächtnisinhalte	69
4.6	Klinische Implikation.....	71
5	Zusammenfassung.....	74

Literaturverzeichnis	76
Anhang.....	1
Abkürzungsverzeichnis	1
Verwendete Substanzen.....	4
Danksagung	7
Verzeichnis eigener Publikationen	8

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Chemische Strukturformel der zwei Endocannabinoide.....	2
Abb. 2: Signaltransduktion des CB1-Rezeptors.....	4
Abb. 3: Schematische Darstellung von DSI (Depolarisations-induzierte Suppression der Inhibition).....	6
Abb. 4: Schematische Darstellung des 5-HT ₃ -Rezeptors und chemische Strukturformel des Neurotransmitters Serotonin	12
Abb. 5: Schematische Darstellung der Verschaltung der Amygdala bei der Furchtkonditionierung.....	17
Abb. 6: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen ECS und 5-HT ₃ -Rezeptor	19
Abb. 7: A: Überführen des präparierten Gehirns auf den Metallblock B: Aufgeklebtes Gehirn ..	26
Abb. 8: A: Vibratom B: Anfertigen der Hirnschnitte.....	27
Abb. 9: Versuchsaufbau des Infrarot-Videomikroskops mit IR-gelenkter Photostimulation	28
Abb. 10: UV-Laser.....	30
Abb. 11: Patch-Clamp Meßplatz	32
Abb. 12: Schematische Darstellung der Amygdala.....	33
Abb. 13: Berechnung der Messgrößen aus dem abgeleiteten Stromzeitverlauf	43
Abb. 14: 5-HT ₃ -Rezeptor-Antagonist Ondansetron reduziert dosisabhängig GABAerge eIPSCs	46
Abb. 15: 5-HT ₃ -Rezeptor Antagonist Ondansetron reduziert eGABBA _A -IPSCs nicht über die Inhibition von 5-HT ₃ -Rezeptoren	48
Abb. 16: 5-HT ₃ -Rezeptor Antagonist Tropisetron reduziert eGABA _A -IPSCs ohne direkten Einfluss auf pGABA _A -ICs.....	49
Abb. 17: Die Reduktion der eGABA _A -IPSCs ist abhängig von dem α ₇ -nAch-Rezeptor.....	51
Abb. 18: 5-HT ₃ -Rezeptor Antagonist Tropisetron verändert in Gegenwart von TTX weder die Frequenz noch die Amplitude von mIPSCs	52
Abb. 19: 5-HT ₃ -Rezeptor Antagonist Tropisetron hat keinen Einfluss auf die Induktion von LTDi	54
Abb. 20: 5-HT ₃ -Rezeptor Agonist SR57227 hat keinen Einfluss auf die Induktion von LTDi	55
Abb. 21: In Verhaltensuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass 5-HT ₃ -Rezeptoren die Extinktion dämpfen.....	57
Abb. 22: Die pharmakologische Modifikation von 5-HT ₃ -Rezeptoren beeinflusst nicht die Extinktion aversiver Gedächtnisinhalte	58
Abb. 23: Schematische Darstellung: Tropisetron, ein partieller Agonist des α ₇ -nAch-Rezeptor, moduliert IPSCs in der Amygdala über den α ₇ -nAch-Rezeptor	65

1 Einleitung

1.1 Das endocannabinoide System

Schon seit frühester Menschheitsgeschichte interessierte man sich für die spezifische Wirkung von Extrakten und Präparaten aus der Pflanzen- und Tierwelt, um Krankheiten und Wunden zu heilen. Die Fortschritte in der Chemie und Medizin steigerten dabei zunehmend das Bedürfnis, die aktiven Substanzen der Naturstoffe in reiner Form zu gewinnen, um sie gezielt für therapeutische Zwecke zu nutzen. Das pharmakologische Wirkungsspektrum dieser Substanzen basiert darauf, dass sie definiert in den Stoffwechsel modulierend eingreifen, der für die Aufrechterhaltung der Homöostase des Körpers von großer Bedeutung ist. Wird dieses Gleichgewicht gestört, kommt es zu pathologischen Symptomen (Steinert und Lutz, 2006).

Eine dieser ältesten Kulturpflanzen ist die Hanfpflanze *Cannabis sativa*. Ihre Fasern sind beliebte Rohstoffe, die zur Produktion von Stoffen und Seilen bereits in der Antike verwendet wurden (Nicoll et al., 2005). Das aus ihr gewonnene Cannabis-Extrakt wird seit über 4000 Jahren für therapeutische Zwecke (Steinert und Lutz, 2006) und für den gelegentlichen Drogenkonsum genutzt (Ashton, 1999). Neben der bewusstseinsverändernden Wirkung von Cannabis sind auch analgetische, anxiolytische, antispastische und appetitfördernde Effekte beschrieben (Baker et al., 2000; Breivogl et al., 2001; Nelson et al., 1994). Im Jahre 1964 konnte erstmals die psychoaktive Komponente Delta-9-Tetrahydro-cannabinol (THC) aus der Hanfpflanze isoliert werden (Gaoni und Mechoulam, 1964), wodurch es möglich wurde, die Wirkungsweise dieser Substanz detailliert zu untersuchen. 1990 wurde der Cannabinoid-Rezeptor Typ 1 (CB1) als spezifische Bindungsstelle im Gehirn beschrieben (Matsuda et al., 1990). Das körpereigene Cannabinoid Anandamid, auch als N-Arachidonylethanolamin bekannt (Devane et al., 1992), ein weiterer Cannabinoid-Rezeptor Typ 2 (CB2) (Munro et al., 1993) und ein zweites körpereigenes Cannabinoid, Arachidonoylglycerol (2-AG) (Wiley et al., 2002), wurden in den darauffolgenden Jahren identifiziert.

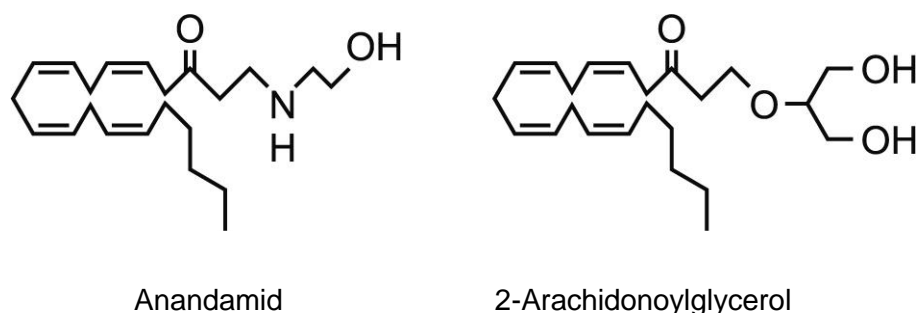


Abb. 1: Chemische Strukturformel der zwei Endocannabinoide

Darstellung der chemischen Strukturformel der beiden körpereigenen Cannabinoide: Anandamid und 2-Arachidonoylglycerol. Bei diesen beiden Liganden handelt es sich um fettlösliche Moleküle, die im zentralen Nervensystem (ZNS) bei Bedarf enzymatisch gebildet und freigesetzt werden.

Diese beiden Liganden gehören zu zwei Klassen von Lipiden, den N-Acyl-Ethanolaminen und den Monoacylglycerolen (Abb. 1) (Devane et al., 1992; Mechoulam et al., 1995; Stella et al., 1997). Da sie fettlöslich sind, können sie nicht wie der Neurotransmitter Serotonin in Vesikeln gespeichert werden, sondern müssen bei Bedarf aus inaktiven, in die Zellmembran eingelagerten Vorläufermolekülen enzymatisch gebildet und freigesetzt werden (Nicoll, 2005).

Der CB1- und der CB2-Rezeptor sind metabotrop (G-Protein-gekoppelt) und gehören zur Klasse der Sieben-Transmembran-Rezeptoren (Matsuda et al., 1990). Der CB1-Rezeptor wird in vielen Regionen des zentralen Nervensystems (ZNS) und des peripheren Nervensystems (PNS) exprimiert (Devane et al., 1988). Des Weiteren werden auch im Gefäßsystem, in der Leber, im Fettgewebe und in Zellen des Immunsystems CB1-Rezeptoren exprimiert (Munro et al., 1993). Der CB2-Rezeptor ist vorwiegend in peripheren, immunkompetenten Zellen von Milz, Lymphsystem, Thymus und Knochenmark, wie auch in der Mikroglia sowie den Immunzellen des Gehirns zu finden (Munro et al., 1993). Darüber hinaus können auch Hautzellen und Neurone des Stammhirns CB2-Rezeptoren exprimieren (Steinert und Lutz, 2006).

Die CB1- und CB2-Rezeptoren mit ihren beiden Liganden Anandamid und 2-AG bezeichnet man heute als das sog. endocannabinoide System (ECS) (Hill et al., 2010). Gemeinsam mit ihren synthetisierenden Enzymen, N-Acyl-Phosphatidyl-Ethanolamin-Phospholipase D (NAPE-PLD) und Diacyl-Glycerol-Lipase (DAGL), und mit ihren

abbauenden Enzymen, Fettsäureamid-Hydrolase (fatty acid amide hydrolase, FAAH) und Mono-Acylglycerol-Lipase (MAGL), gehört das ECS zu den wichtigen regulatorischen Systemen im menschlichen und tierischen Organismus (Akiraw, 2011). Seit der Entdeckung des ECS gewinnen Cannabinoide zunehmend an Bedeutung.

1.1.1 Endocannabinoide steuern die neuronale Aktivität

Im ZNS führt eine neuronale Depolarisation zu einer erhöhten intrazellulären Kalzium (Ca^{2+}) Konzentration, wodurch Anandamid und 2-AG enzymatisch gebildet und freigesetzt werden (Piomelli, 2003). Nach ihrer Synthese und Freisetzung binden sie als retrograde Botenstoffe an CB1-Rezeptoren, die hauptsächlich präsynaptisch lokalisiert sind. Eine CB1-Rezeptoraktivierung führt, über die am CB1-Rezeptor gekoppelten $G_{i/o}$ -Proteine, zur Inhibition der Adenylatcyclase-Proteinkinase A (AC-PKA)-Signaltransduktionskaskade (Abb. 2) (Howlett et al., 1986). G-Proteine sind sog. „second-messenger“, über welche Rezeptoren unterschiedliche biochemische Signalkaskaden aktivieren bzw. hemmen, die wiederum verändernd auf Ionenkanäle einwirken können (Nicoll, 2005).

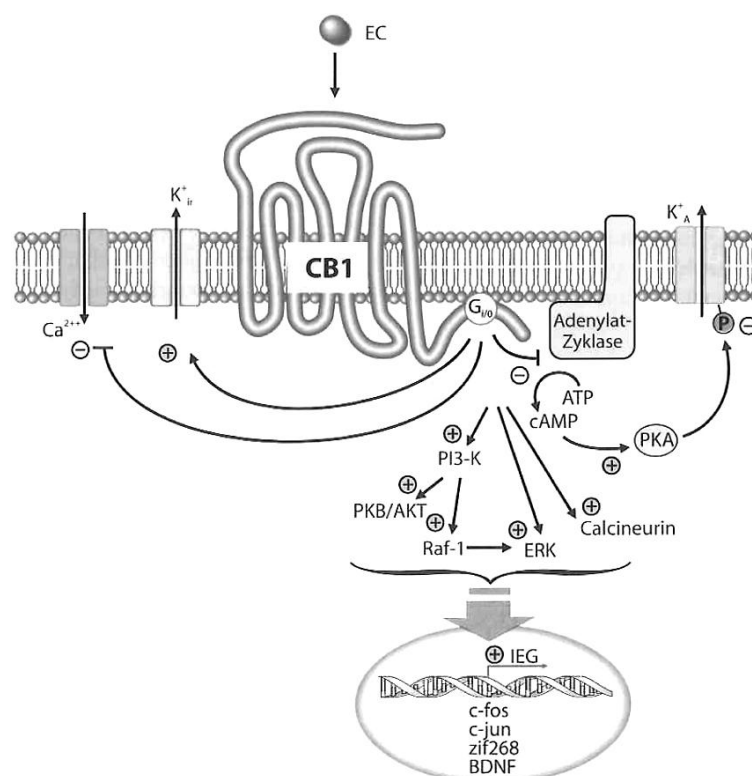


Abb. 2: Signaltransduktion des CB1-Rezeptors

„Durch die Bindung von Cannabinoiden wird der CB1-Rezeptor aktiviert. Dies führt zu einer Vielzahl von Ereignissen, die unterschiedliche Signaltransduktionsketten in der Zelle beeinflussen können. In der Zellmembran werden verschiedene Kalium- (Ca^{2+}) und Kaliumkanäle (K_{ir} , K_A) in ihrer Aktivität beeinflusst, was schließlich zur Verringerung der neuronalen Erregbarkeit führt (Bisogno et al., 2005). **EC**: Endocannabinoid; **CB1**: Cannabinoid-Rezeptor Typ 1; **G_{i/o}**: inhibitorisch wirkendes G-Protein; **cAMP**: zyklisches Adenosinmonophosphat; **PKA**: Protein-Kinase A; **PKB/AKT**: Protein-Kinase B; **PI3-K**: Phosphoinositol-3-Kinase; **Raf-1**: Raf-1-Kinase; **ERK**: Extrazellulär regulierte Kinase; **IEG**: immediate early gene (d.h. Gene, deren Transkription durch Signalketten schnell gesteigert wird); **c-fos**, **c-jun** und **zif268**: verschiedene Transkriptionsfaktoren; **BDNF**: Wachstumsfaktor „brain derived neurotrophic factor“ (M. Steiner und B. Lutz, 2006)

In Abhängigkeit von der Hirnregion modulieren CB1-Rezeptoren Ca^{2+} - oder Kalium (K^+)-Kanäle (Bisogno et al., 2005), was zu einer Verringerung der neuronalen Erregbarkeit führt. CB1-Rezeptoren wirken in Hippocampus und dorsalem Striatum über eine Hemmung von Ca^{2+} -Kanälen (Hoffmann und Lupica, 2000; Gerdeman und Lovinger, 2001). Im Nucleus accumbens und in der Amygdala hingegen beeinflussen sie die neuronale Aktivität über eine Aktivierung von K^+ -Kanälen (Robbe et al., 2001; Azad et al., 2003). Durch eine Beeinflussung dieser Ionenkanäle reduzieren CB1-Rezeptoren die Freisetzung von Neurotransmittern aus präsynaptischen Terminalen (Clapper et al., 2009). Initial wurde die Expression des CB1-Rezeptorproteins nur auf inhibitorischen Interneuronen nachgewiesen (Hajo et al., 2000; Katona et al., 2001), so

dass man davon ausging, dass Cannabinoide in verschiedenen Hirnregionen zu einer Hemmung der GABAergen (γ -Aminobuttersäure) synaptischen Transmission führen (Hoffman and Lupica, 2000; Katona et al., 2001; Azad et al., 2003). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass CB1-Rezeptoren auch auf glutamatergen Neuronen exprimiert werden (Katona et al., 2006), was die Vermutung bestätigt, dass Cannabinoide in Hippocampus, Amygdala und Cortex auch die glutamaterge synaptische Transmission inhibieren (Hoffman et al., 2005; Domenici et al., 2006; Takahashi und Castillo, 2006). Über diesen Mechanismus nehmen Cannabinoide in vielen Regionen des ZNS Einfluss und können sowohl die exzitatorische wie auch die inhibitorische synaptische Transmission hemmen (Misner und Sullivan, 1999; Hoffman und Lupica, 2000; Katona et al., 2001; Azad et al., 2003; Robbe et al., 2003; Melis et al., 2004). So führt die Depolarisation von Cornu ammonis-(CA)-1-Pyramidenneuronen im Hippocampus und von Neuronen im Cerebellum zu einer CB1-Rezeptor-abhängigen transienten Inhibition der präsynaptischen GABA-Freisetzung aus inhibitorischen Interneuronen (Kreitzer et al., 2002). Dieses Phänomen wird als Depolarisations-induzierte Unterdrückung der Inhibition (DSI) bezeichnet (Abb. 3). DSI führt zu einer Unterdrückung der Inhibition (Disinhibition) von glutamatergen Pyramidenneuronen. Dadurch werden Mechanismen der synaptischen Plastizität wie z.B. die Langzeitpotenzierung (LTP), ein neuronales *in vitro* Korrelat von Lern- und Gedächtnisprozessen, begünstigt (Kreitzer et al., 2002; Marsicano et al., 2002; Azad et al., 2004). McMahon und Kauer stellten fest, dass die hochfrequente Stimulierung der CA3 Afferenzen im Hippocampus in den exzitatorischen Synapsen von Interneuronen eine Langzeitdepression (LTD) auslöst, welche sie als Interneuron LTD (iLTD) bezeichneten (McMahon und Kauer, 1997). Somit führt eine LTP, ausgelöst in den Pyramidenneuronen der CA3 Region, zu einer iLTD in den Interneuronen in der CA1 Region. iLTD ist nicht synapsenspezifisch und schwächt somit nicht nur die aktivierten Synapsen des Interneurons, sondern auch die inaktivierten Synapsen. Dies führt zu einer gesteigerten Erregbarkeit der nachgeschalteten CA1-Pyramidenneuronen, welche vom vorgeschalteten Interneuron innerviert werden (McMahon und Kauer, 1997). Weitere Studien zeigten, dass die spezifische niederfrequente Stimulation von Afferenzen in der basolateralen Amygdala (BLA) zur inhibitorischen Langzeit-depression (LTDi), einer anhaltenden Abnahme der GABAergen Transmission, führte (Marsicano et al., 2002; Azad et al., 2004). Auch

dieses Phänomen begünstigt Lern- und Gedächtnisprozesse, da die LTDi der BLA zur Langzeitpotenzierung in der zentralen Amygdala (CeA) führt.

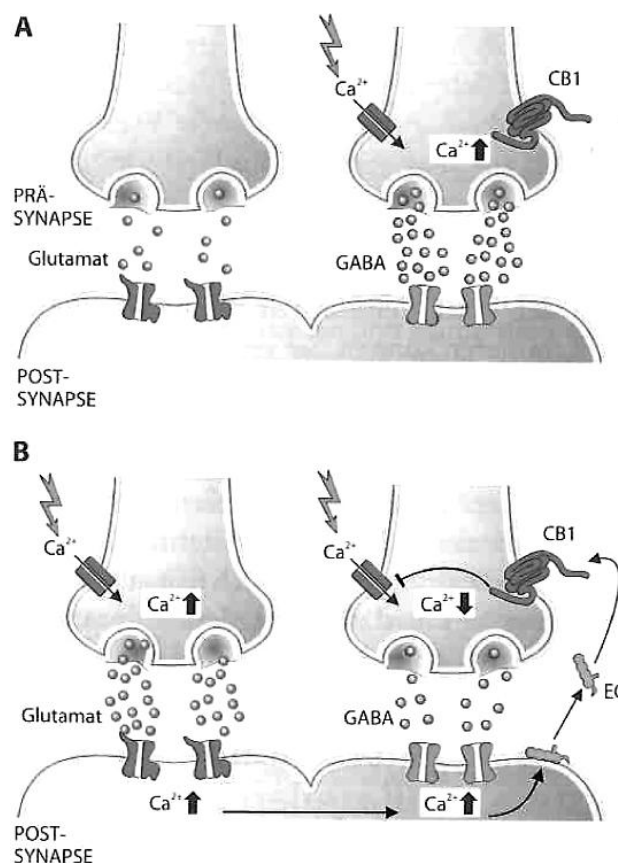


Abb. 3: Schematische Darstellung von DSI (Depolarisations-induzierte Suppression der Inhibition)

A: „Zustand beim Eintreffen eines Aktionspotentials an einer GABAergen Synapse.“ **B:** „Zustand nach zusätzlichem Eintreffen einer aktivierenden (glutamatergen) synaptischen Übertragung an der Postsynapse der GABAergen Synapse. Die Stimulation der Postsynapse löst den Einstrom von Ca^{2+} aus, der die Endocannabinoid (EC)-Synthese stimuliert. Diese bewegen sich zurück zu einer GABAergen Präsynapse, aktivieren dort den Cannabinoid-Rezeptor Typ 1 (CB1) und unterdrücken die GABA-Freisetzung. Das gleiche Phänomen kann auch an einer glutamatergen Synapse stattfinden und würde dort als DSE (Depolarisations-induzierte Suppression der Exzitation) bezeichnet werden.“ (M. Steiner und B. Lutz, 2006)

1.1.2 Bedeutung des ECS für somatische und psychiatrische Erkrankungen

Seit der Isolierung von THC und der Entdeckung des ECS gewinnen Cannabinoide aufgrund ihrer analgetischen, spasmolytischen, antiemetischen, appetitfördernden und anxiolytischen Wirkung (Breivogel und Childers, 1998; Baker et al., 2000; Pertwee, 2001; Porter & Felder, 2001) in der Medizin zunehmend an Bedeutung.

Das ECS spielt eine wichtige Rolle bei der Schmerzverarbeitung (Martin et al., 1999; Manning et al., 2001) und scheint bei der Entstehung von chronischen Schmerzen beteiligt zu sein (Azad et al., 2005; Paulson et al., 2002). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die exogene Gabe von Cannabinoiden die Nozizeption beeinflusst (Azad, 2006; Petwee et al., 2001; Porter et al., 2001; Cravatt et al., 2004). Sie führte im Tiermodell zur Analgesie (Martin et al., 1999). Studien mit CB1-*knock-out* (CB1^{-/-})-Mäusen zeigten, dass die Cannabinoid-induzierte Analgesie über CB1-Rezeptoren vermittelt wird (Ledent et al., 1999; Zimmer et al., 1999). In Bezug auf akute Schmerzen bestätigen Untersuchungen am Menschen den analgetischen Effekt von Cannabinoiden (Azad, 2005; Ware et al., 2003). Die analgetische Wirkung bei chronischen Schmerzen wird kontrovers diskutiert. Eine in den 70er Jahren durchgeführte Studie an Patienten mit Tumorschmerzen zeigte, dass eine einmalige orale Dosis (20 mg) von Cannabinoiden eine vergleichbare analgetische Wirkung hatte wie Codein (120 mg) (Noyes et al., 1975). Jedoch führte diese einmalige orale Dosis von Cannabinoiden zu unerwünschten Nebenwirkungen wie beispielsweise Schwindel, Ataxie, Sehstörungen und Schläfrigkeit (Noyes et al., 1975). In einer weiteren klinischen Studie konnte nach der oralen Gabe von THC (16,6 ± 6,5 mg/Tag) keine analgetische Wirkung festgestellt werden (Attal et al., 2004). Hingegen führte die orale Verabreichung des synthetischen Cannabinoids CT-3 (40 mg/Tag) zu einer signifikanten Verbesserung chronisch neuropathischer Schmerzen (Azad, 2006; Karst et al., 2003).

Patienten mit Multipler Sklerose leiden oft unter schmerzhaften, spastischen Symptomen (Zajicek et al., 2003). Untersuchungen an einem Multiple Sklerose Tiermodell zeigten, dass die spastischen Symptome bei der Multiplen Sklerose durch ein Ungleichgewicht des ECS ausgelöst werden (Baker et al., 2001). Eine Studie an Patienten mit Multipler Sklerose beschreibt, dass eine orale Verabreichung eines

Cannabis-Extrakte die schmerzhaften, spastischen Symptome verbesserte (Svendsen et al., 2004; Wade et al., 2004). Trotzdem wird der therapeutische Einsatz von Cannabis in kontrollierten Studien immer noch widersprüchlich beurteilt (Campbell et al., 2001).

Krebspatienten in den USA, die sich einer Chemotherapie unterziehen mussten und unter Übelkeit und Erbrechen litten, fanden in den 70er Jahren zufällig heraus, dass sich ihre Symptome verbesserten, wenn sie Marihuana rauchten (Sallan et al., 1975). In Untersuchungen am Tiermodell konnten CB1-Rezeptoren als für die Vermittlung des antiemetischen Effekts ausschlaggebend identifiziert werden (Elsner, 2005; Darmani, 2001, 2004; Simoneau, 2001; Parker et al., 2003; van Sickle et al., 2003). Der therapeutische Einsatz von Cannabinoiden als wirksames Antiemetikum nach einer Chemotherapie ist auch am Menschen gut untersucht (Elsner, 2005; Tramer et al., 2001). Da jedoch nach der Gabe von Cannabinoiden häufig mit psychotropen (Elsner, 2005; Tramer et al., 2001) und vegetativen (Ashton, 1999) Nebenwirkungen zu rechnen ist, sollten Cannabinoide als Antiemetika nur dann eingesetzt werden, wenn die Patienten mit den herkömmlichen Mitteln, 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten, nicht ausreichend therapiert werden können (Elsner, 2005; Tramer et al., 2001).

Die appetitanregende und stimmungsaufhellende Wirkung von Cannabinoiden wäre bei der Behandlung der chronischen Übelkeit bei Krebs- und AIDS-Patienten einsetzbar (Schnelle, 2005; Beal et al., 1995, 1997; Nelson et al., 1994). Für beide Patientengruppen (Schnelle, 2005) wurde beschrieben, dass die Verabreichung von Cannabinoiden appetitanregend und gewichtsstabilisierend wirkt (Schnelle, 2005; Beal et al., 1995, 1997; Nelson et al., 1994).

Obwohl schon lange bekannt ist, dass Cannabis-Extrakte eine stimmungsaufhellende Wirkung haben (Mechoulam, 1998; Chait et al., 1992), weiß man erst seit kurzer Zeit, dass das ECS die Pathophysiologie von Angst und Depression beeinflusst (Lutz, 2007). Untersuchungen am Tiermodell zeigten, dass das Rezeptorsystem des ECS für die Extinktion von konditionierten aversiven Gedächtnisinhalten unabdingbar ist und eine wichtige Rolle in der Modulation der synaptischen Plastizität spielt (Marsicano et al., 2002; Azad et al., 2004). Das ECS scheint also bei der Bildung von Gedächtnisinhalten eine entscheidende Rolle zu spielen. Somit könnte bei Angst und Depression mit der Gabe von Cannabinoiden therapeutisch interveniert werden (Lutz,

2007). Die Wirkung von Cannabinoiden ist dosisabhängig. Niedrige Dosen wirken eher angstlösend und euphorisierend als hohe Dosen (Ashton et al., 1981). Diese dosisabhängige Wirkung lässt sich auch im Tiermodell im Bezug auf Exploration und Motorik nachweisen (Steiner und Lutz, 2006; Sanuda-Pena et al., 2000; Lutz, 2002).

Untersuchungen im Tiermodell und an Schizophrenie-Patienten zeigten eine pathophysiologische Veränderung des ECS (Wodbrock, 2009). In der mesolimbischen Region konnte eine erhöhte CB1-Rezeptordichte sowie eine erhöhte Anandamid-Konzentration im Liquor nachgewiesen werden (Lewke und Koethe, 2008). Die erhöhte Anandamid-Konzentration wird im Moment als kompensatorischer protektiver Mechanismus bei beginnender Psychose gedeutet (Wodbrock, 2009). Es konnte festgestellt werden, dass Patienten, die eine höhere Anandamid-Konzentration im Liquor aufwiesen, geringere Symptome zeigten (Lewke et al., 2008). Dieser Mechanismus scheint durch einen Cannabismissbrauch negativ beeinflusst zu werden (Wodbrock, 2009; Lewke und Koethe, 2008). Die Hypothese, dass Cannabinoide die Negativsymptome der Schizophrenie wie Apathie, Anhedonie und sozialen Rückzug reduzieren (Schnelle, 2005; Fernandez-Artamendi et al., 2011), wurde in den letzten Jahren widerlegt (Rey et al., 2004; Degenhardt et al., 2006).

Für die Palliativmedizin jedoch scheint der therapeutische Einsatz von Cannabis-Extrakten wegen seines gleichzeitig stimmungsaufhellenden, übelkeitshemmenden, schlaf- und appetitfördernden Effekts durchaus nützlich zu sein (Schnelle, 2005).

1.2 Das serotonerge System

Wie das ECS spielt auch das serotonerge System eine wichtige Rolle in Bezug auf Angst (Costall et al., 2004; Jones et al., 1994, 1988) und Schmerz (McCleane et al., 2003; Okamoto et al., 2004). Untersuchungen im Tiermodell zeigten, dass eine Applikation von Serotonin-Wiederaufnahmehemmern zu abnehmendem aggressivem Verhalten und Analgesie bei den betroffenen Tieren führte (Fuller et al., 1995). Das serotonerge System reguliert zudem den Schlaf-Wach-Rhythmus, den Appetit und kognitive Prozesse wie Lernen und Gedächtnisbildung (Southwick et al., 1999;

Meneses et al., 1999). Ähnliche Effekte sind auch nach Gabe von Cannabinoiden zu beobachten (Breivogel & Childers, 1998; Baker et al., 2000; Pertwee, 2001; Porter & Felder, 2001). Diese Gemeinsamkeiten legen eine Interaktion zwischen ECS und serotonerger System nahe. Die Neurone des serotonergen Systems befinden sich hauptsächlich in den Raphe Kernen des Hirnstammes. Sie bilden die mediane Zone der Formatio reticularis und projizieren von dort in das gesamte zentrale Nervensystem (O'Mahony et al., 2006). Im limbischen System modulieren sie emotionales Verhalten, im Rückenmark inhibieren sie die Weiterleitung aufsteigender Schmerzimpulse aus dem Rückenmark (Trepel, 2004).

1.2.1 Serotonin (5-HT) und seine Rezeptoren

Serotonin ist ein Neurotransmitter und gehört zur Klasse der Monoamine (Reichert, 1990). Da Serotonin die Blut-Hirn-Schranke wegen seiner Größe nicht überwinden kann, wird es im Gehirn aus der Aminosäure Tryptophan synthetisiert und dort in den synaptischen Endigungen vesikulär gespeichert (Jockisch et al., 2005). Bei einer Depolarisation der synaptischen Endigung wird Serotonin in den synaptischen Spalt freigesetzt und bindet an seine Rezeptoren. Serotonin zeigt, je nach Rezeptorsubtyp, unterschiedliche Wirkmechanismen (Jokisch, 2005; Frank et al., 2004). Es wirkt an präsynaptisch- wie auch an postsynaptisch lokalisierten, exzitatorischen und inhibitorischen Rezeptoren, da diese cholinerge (Jokische, 2005; Cassel et al., 1995), GABAerge (Lu und Perl, 2007) und glutamaterge (Aghajanian et al., 1997) Neurone modulieren.

Die 5-HT-Rezeptoren werden im zentralen Nervensystem (ZNS) und peripheren Körpergewebe exprimiert (Pharmakologie und Toxikologie, 1996). Sie werden in sieben Gruppen eingeteilt: 5-HT₁ - 5-HT₇. Die 5-HT-Rezeptoren sind überwiegend metabotrop, nur der 5-HT₃-Rezeptor ist ein ligandengesteuerter Ionenkanal (Van Hooft, 1998). Genetisch unterscheidet man mehrere 5-HT₃-Subtypen mit einer hohen Sequenzhomologie: 5-HT_{3A-E} (Miyake et al., 1995; Belelli et al., 1995). Die Gene der Untergruppe 5-HT_{3A} und 5-HT_{3B} liegen auf dem Chromosom 11q23.1 nahe beieinander (Miyake et al., 1995; Belelli et al., 1995). Beide Subtypen werden in diversen

cerebralen (Hippocampus, Basalganglien und Amygdala) und intestinalen Regionen exprimiert und bilden dort einen heteromeren 5-HT₃-Komplex (Davies et al., 1999; Dubin et al., 1999; Bruss et al., 2000; Gothert et al., 1998; Rueffert et al., 2009; Houtani et al., 2005; Pharmakologie und Toxikologie, 1996; Jokisch et al., 2005). Der ionotrope 5-HT₃-Rezeptor besteht aus mehreren Transmembranprotein-Komplexen, die pentamer zusammengesetzt sind. Diese Transmembranprotein-Komplexe wiederum sind aus unterschiedlichen Untereinheiten (UE) aufgebaut: α_3 -UE und β_2 -UE (Abb. 4). Jede dieser Untereinheiten besteht dabei aus vier Transmembransegmenten und einem extrazellulären N-terminalen Bereich mit einer Bindungsstelle für den Transmitter (Rammes et al., 2004). Bindet Serotonin an den 5-HT₃-Rezeptor, nimmt dieser dadurch eine offene Konformation ein und wird permeabel für Natrium (Na⁺) und Ca²⁺. Durch den Einstrom dieser Kationen wird die Zellmembran depolarisiert. Die Aktivierung postsynaptischer 5-HT₃-Rezeptoren führt dabei zu einer schnellen exzitatorischen synaptischen Transmission im Neocortex (Roerig et al., 1997) und der lateralen Amygdala (Sugita et al., 1992). Präsynaptische 5-HT₃-Rezeptoren modulieren die Freisetzung unterschiedlicher Neurotransmitter (Deiml et al., 2004).

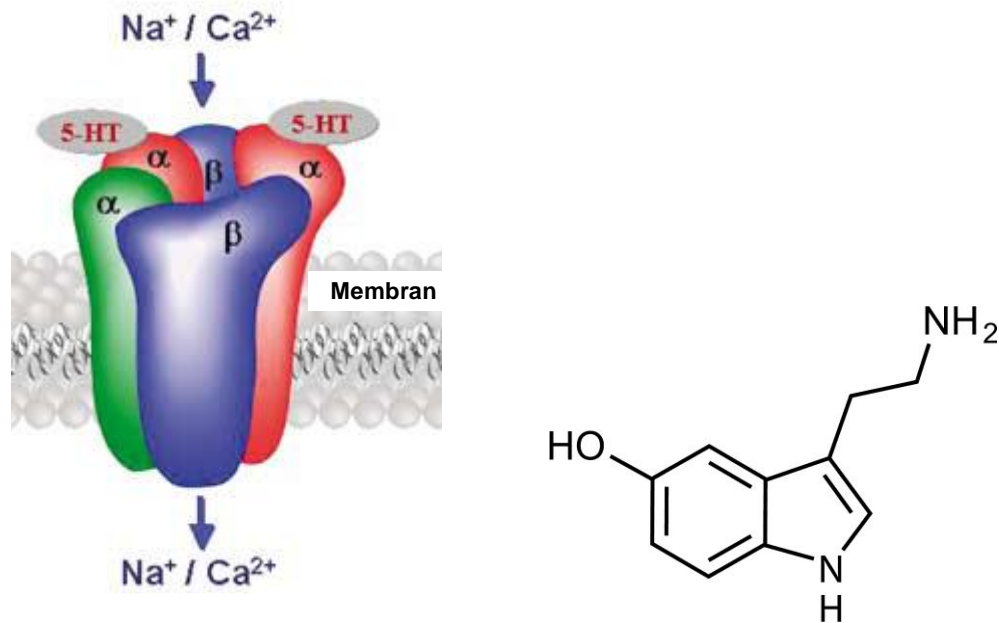


Abb. 4: Schematische Darstellung des 5-HT₃-Rezeptors und chemische Strukturformel des Neurotransmitters Serotonin

Der 5-HT₃-Rezeptor ist ein ligandengesteuerter Ionenkanal. Er besitzt eine Bindungsstelle für den Neurotransmitter Serotonin. Der Rezeptor ist ein Pentamer aus 5 UE, die zentral eine Ionenpore bilden. Der 5-HT₃-Rezeptorsubtyp setzt sich aus den α_3 - und β_2 -UE zusammen. Zwei α -UE bilden die Serotonin Bindungsstelle. Bei Bindung von Serotonin öffnet sich der Ionenkanal und wird permeabel für Na⁺ und Ca²⁺. Somit führt die Öffnung des Kanals unter physiologischen Bedingungen durch einen Na⁺- und Ca²⁺-Einstrom zur Depolarisation. (5-HT₃-Rezeptor verändert nach Rammes et al., 2004)

1.2.2 Bedeutung des 5-HT₃-Rezeptors für somatische und psychiatrische Erkrankungen

Der 5-HT₃-Rezeptor spielt eine wichtige Rolle bei der Modulation von Lern- und Gedächtnisvorgängen (Jokisch, 2005; Meneses et al., 1999, 1998), bei der Entstehung von Übelkeit und Erbrechen (Kaiser et al., 2004; Tremblay et al., 2003), der Regulation von Schmerzempfinden (Okamoto et al., 2004; Ali et al., 1996), sowie bei neurologischen Erkrankungen, wie z.B. Schizophrenie (Melke et al., 2003; Frank et al., 2004) und Depression (Rammes et al., 2004; Frank et al., 2004).

Tierexperimentelle Studien zeigten, dass 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten zur Stabilisation von Gedächtnisinhalten beitragen und das Lernen in Stresssituationen

unterstützen (Jokisch, 2005; Meneses et al., 1999; Buhot et al., 2000). 5-HT₃-Rezeptor-Agonisten dagegen haben eine entgegengesetzte Wirkung (Jokisch, 2005; Meneses et al., 1999; Buhot et al., 2000).

Eine einmalige intravenöse Gabe von Ondansetron, einem 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten, führte bei Patienten mit chronischen neuropathischen Schmerzen zu einer signifikanten, aber nur kurz anhaltenden Analgesie (McCleane et al., 2003) ohne wesentliche Nebenwirkungen. Bei Fibromyalgie-Patienten bewirkte die Gabe von Tropisetron, einem weiteren 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten, nach einer Woche eine Reduktion von Schmerz, Erschöpfung und Schlafstörungen (Papadopoulos et al., 2000). Eine weitere Untersuchung bei Patienten mit Reizdarmsyndrom zeigte, dass der 5-HT₃-Rezeptor-Antagonist Alosetron eine Besserung der Symptome herbeiführte (Cremonini et al., 2003).

Auch im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass das serotonerge System eine wichtige Rolle bei der Regulation von Schmerzempfinden spielt. In Ratten wurden durch eine Formalininjektion Schmerzen induziert. Die Verabreichung des 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten Tropisetron reduzierte das Schmerzverhalten (Okamoto et al., 2004). Eine weitere Studie in Ratten beschreibt, dass intrathekal verabreichte 5-HT₃-Rezeptor-Agonist mCPBG (m-Chlorophenylbiguanide) die Reaktion von Neuronen des Hinterhorns auf noxische Reize signifikant erhöht (Ali et al., 1996).

Ondansetron und Tropisetron haben eine antiemetische Wirkung und werden vor allem bei Chemotherapie-induzierter Übelkeit und Erbrechen verabreicht (Rueffert et al., 2009). Sie führen zu einer Blockierung der 5-HT₃-Rezeptoren im Brechzentrum des Hirnstammes und im Gastrointestinaltrakt (Forth et al., 1996). Da Serotonin sehr eng mit anderen Neurotransmitter-Systemen interagiert (van Hooft et al., 2000; Siarey et al., 1995; Zouh et al., 1999; MacDermott et al., 1999; Koyama et al., 2000), werden bei Depression, Angst und Schizophrenie häufig Medikamente verabreicht, die in den Serotoninhaushalt eingreifen (Förstl et al., 2006). Vor allem Serotonin-Wiederaufnahmehemmer zeichnen sich aus durch einen antidepressiven und angstlösenden Effekt (Förstl et al., 2006). 5-HT₃-Rezeptoren beeinflussen die Aktivität unterschiedlicher Neurotransmitter wie Norepinephrin (Matsumoto et al., 1995), Acetylcholin (Giovannini et al., 1998), Dopamin (Melke et al., 2003; Benloucif et al., 1993) und GABA (Bloom et al., 1998). Da der 5-HT₃-Rezeptor im Hippocampus, in der

Amygdala und in den Basalganglien in hoher Dichte exprimiert wird (Barnes et al., 1999; Costall et al., 2000), scheint er möglicherweise die Symptome bei Psychosen (Sirota et al., 2000) und Angsterkrankungen (Olivier et al., 2000) zu vermitteln. Aufgrund dieser Ergebnisse gewinnen 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten für therapeutische Zwecke im psychiatrischen Bereich zunehmend an Bedeutung (Barnes et al., 1999; Silverstone et al., 1996).

1.3 Hinweise auf eine Interaktion zwischen dem ECS und dem 5-HT₃-Rezeptor

5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten und Cannabinoide haben einen analgetischen und antiemetischen Effekt. Außerdem nehmen der 5-HT₃-Rezeptor wie auch das ECS Einfluss auf psychiatrische Erkrankungen sowie auf Lernen und Gedächtnisbildung. Eine Cannabinoid-5-HT₃-Interaktion erscheint als wahrscheinlich. So konnte gezeigt werden, dass im dorsalen Raphe Kern, der Quelle der Serotoninproduktion für das Vorderhirn, das Anandamid abbauende Enzym Fettsäureamid-Hydroxylase (fatty acid amide hydroxylase, FAAH) exprimiert wird (Egertova et al., 1998, 2003), sowie in Ratten der CB1-Rezeptor (Moldrich und Wenger, 2000) und in Mäusen CB1-Rezeptor-Ribonukleinsäure (RNA) vorhanden ist (Häring et al., 2007). Des Weiteren konnte im Tiermodell nachgewiesen werden, dass CB1-Rezeptor-Agonisten über 5-HT_{1A}- und 5-HT_{2A}-Rezeptor-vermittelte Verhaltensantworten verändern (Hill et al., 2006) und die Serotoninaufnahme *in vitro* unterdrücken (Banerjee et al., 1975; Johnson et al., 1976). Die Vermutung liegt deshalb nahe, dass die antidepressiven Effekte von Cannabinoiden über Serotonin vermittelt werden (Gobbi et al., 2005; Häring et al., 2007; Bambico et al., 2007). Da die pharmakologische Aktivität von Anandamid teilweise über 5-HT-Rezeptoren induziert werden kann und der 5-HT₃-Rezeptor eine Bindungsstelle für Cannabinoide besitzt (Kimura et al., 1998; Barran 2002), scheint eine Interaktion zwischen dem CB1- und dem 5-HT₃-Rezeptor wahrscheinlich. Die Funktion von 5-HT₃-Rezeptoren kann direkt durch Cannabinoide inhibiert werden (Barran et al., 2002). Diese Inhibition erfolgt über eine allosterische Bindungsstelle (Barran et al., 2002). Darüber hinaus konnte eine Kollokalisierung der mRNA von 5-HT₃-

und CB1-Rezeptoren mittels *in situ* Hybridisierung in GABAergen und glutamatergen Neuronen des Hippocampus, der Amygdala und des Neocortex gezeigt werden (Morales & Backman, 2002; Hermann et al., 2002).

Aufgrund dieser Ergebnisse erscheint eine Interaktion zwischen ECS und dem 5-HT₃-Rezeptor möglich.

1.4 Die Amygdala

Die Amygdala (Mandelkern) ist ein Teil des limbischen Systems und liegt im rostro-medialen Temporallappen. Sie ist paarig angelegt und besteht aus zahlreichen Kernen (Amaral et al., 1992), welche reziprok mit weiteren limbischen, aber auch neocortikalen Zentren verbunden sind (Abb. 5). Die Amygdala spielt eine wichtige Rolle in der Verarbeitung von Angst und Schmerz (Martin et al., 1999). Sie speichert emotional betonte Gedächtnisinhalte (Marsicano et al., 2002; Martin et al., 1999), vermittelt Verhaltensweisen wie Flucht- und Angstreaktionen und ist an der Regulation des vegetativen Nervensystems beteiligt (Trepel, 2004). Nach ihren Funktionen unterscheidet man drei Hauptkerngebiete: die laterale Amygdala (LA), die basolaterale Amygdala (BLA) und die zentrale Amygdala (CeA) (Sah et al., 2003). Die LA ist das „Eingangstor“ der Amygdala. Hier treffen die meisten somatosensorischen, viszerosensorischen, auditiven, olfaktorischen und gustatorischen Informationen ein (Sah et al., 2003, Dudel, 2004). Diese eintreffenden Informationen stammen aus zwei unterschiedlichen Strukturen: den sensorischen Kernen des Thalamus und den primären sensorischen Feldern des Cortex (Phelps et al., 2005; Kandel, 1995). Die thalamische Projektion ist für verschiedene Emotionen von Bedeutung, insbesondere für die Furcht. Sensorische Informationen aus dem Thalamus werden schneller an die Amygdala weitergeleitet als sensorische Informationen, die aus der Großhirnrinde stammen (LeDoux et al., 1984, 1994, 2000). Diese schnelle Aktivierung der Amygdala über den Thalamus hilft, gefährliche Situation abzuwenden und bereitet die Amygdala auf komplexere Informationen aus der sensorischen Großhirnrinde vor (Phelps et al., 2005). Von der LA ziehen Efferenzen reziprok zur BLA und zur CeA (Pare et al., 2004). In die BLA projizieren zudem Afferenzen aus dem Hippocampus und dem

orbitofrontalen Cortex. Efferenzen ziehen aus der BLA in die CeA und den Nucleus accumbens (Manella et al., 2008). Man hat herausgefunden, dass bei Läsionen der BLA eine klassische Furchtkonditionierung nicht möglich ist (Campeau et al., 1995; LeDoux et al., 1990; Maren et al., 1996). Bei dieser Form der Konditionierung wird ein neutraler Reiz, ein Ton, mit einem aversiven Reiz, einem mehrmals hintereinander verabreichten elektrischen Stimulus, zusammen dargeboten. Dies führt dazu, dass ab einer gewissen Wiederholung des elektrischen aversiven Reizes in Kombination mit dem Ton, der Ton alleine genügt, um in dem Tier eine Angststarre und Veränderungen von Herzschlag, Blutdruck und Atemfrequenz hervorzurufen (Medina et al., 2002). Wird der neutrale Reiz wiederholt ohne den aversiven Reiz dargeboten, kommt es zur Extinktion dieser Verknüpfung (Davis et al., 2001). Die Angstreaktion ist folglich nicht mehr zu beobachten. Da Experimente gezeigt haben, dass eine Läsion der BLA die klassische Furchtkonditionierung unterbinden kann (Campeau et al., 1995; LeDoux et al., 1990; Maren et al., 1996), geht man davon aus, dass in der BLA die Speicherung erlernter emotionaler Zustände wie Angst und Furcht stattfindet (Maren, 2000; Muramoto et al., 1993; Nishijo et al., 1988; Quirk et al., 1995; Sanghera et al., 1979).

Aus der BLA gelangen die Informationen unter anderem in die CeA, den „Hauptausgang“ der Amygdala. Von der CeA aus wiederum werden die Informationen in den lateralen und paraventriculären Hypothalamus weitergeleitet (Medina et al., 2002, Phelps et al., 2005). Diese Strukturen regulieren autonome und hormonelle Reaktionen als Folge von Reizen mit emotionaler Komponente (LeDoux, 1996; McGaugh, 2000). Tierversuche haben gezeigt, dass durch elektrische Stimulierung der CeA Herzfrequenz, Blutdruck und Atemfrequenz zunehmen (Roozendaal, 1991). Entsprechend unterdrücken Läsionen der CeA die autonomen und hormonellen Veränderungen, die durch Furcht entstehen (Phelps et al., 2005). Für bewusstes emotionales Erleben ist die Projektion der CeA in die kortikalen Assoziationsfelder wichtig. Läsionen in diesen Feldern führen entsprechend zu einem veränderten Reaktionsvermögen auf Emotionen (Kalin et al., 2004).

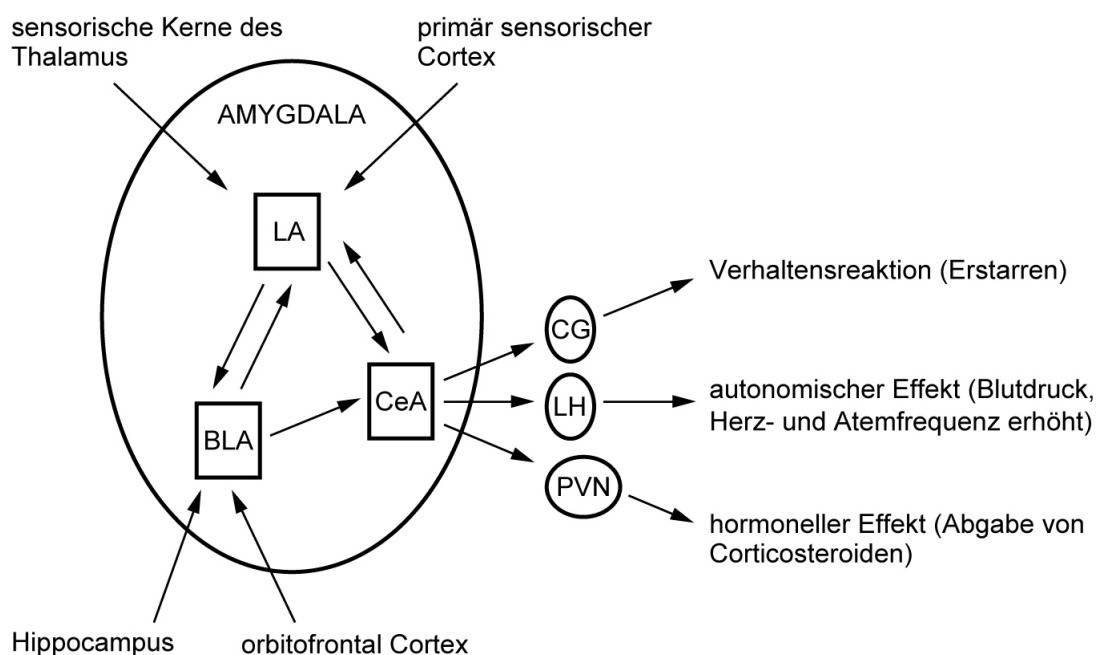


Abb. 5: Schematische Darstellung der Verschaltung der Amygdala bei der Furchtkonditionierung

Die LA ist das „Eingangstor“ der Amygdala. Hier treffen Informationen aus zwei unterschiedlichen Strukturen ein: den sensorischen Kernen des Thalamus und den primären sensorischen Feldern des Cortex. Die thalamische Projektion ist für verschiedene Emotionen von Bedeutung, insbesondere für die Furcht. Sensorische Informationen aus dem Thalamus helfen, gefährliche Situationen abzuwenden. Von der LA ziehen Efferenzen reziprok zur BLA und zur CeA. Die BLA spielt eine wichtige Rolle in der Furchtkonditionierung. In die BLA projizieren zudem Afferenzen aus dem Hippocampus und dem orbitofrontalen Cortex. Efferenzen ziehen aus der BLA in die CeA, den „Hauptausgang“ der Amygdala. Von der CeA aus wiederum werden die Informationen in den lateralen und paraventriculären Hypothalamus weitergeleitet. Diese Strukturen regulieren autonome und hormonelle Reaktionen als Folge von Reizen mit emotionaler Komponente. **LA:** laterale Amygdala; **BLA:** basolaterale Amygdala; **CeA:** zentrale Amygdala; **CG:** zentrale Grau; **LH:** lateraler Hypothalamus; **PVN:** paraventriculärer Hypothalamus. (verändert nach Medina et al., 2002)

1.4.1 Bedeutung der Amygdala in der Verarbeitung von Schmerz und Angst

Die Amygdala scheint eine entscheidende Struktur für die Vermittlung von Cannabinoid-induzierter Analgesie darzustellen (Azad, 2005). Eine Mikroinjektion von Cannabinoiden in die Amygdala führte im Tiermodell zu Analgesie. Im sog. „Tail-flick-Test“ war eine signifikante Anhebung der Schmerzschwelle erkennbar (Martin et al., 1999). Eine Untersuchung an Primaten ergab, dass bilaterale Läsionen der Amygdala die Cannabinoid- und Opioid-induzierte Analgesie drastisch vermindern (Manning et al., 1999). Die Amygdala besitzt eine hohe Dichte an CB1-Rezeptoren und scheint

besonders bei der Entstehung von chronischem Schmerz beteiligt zu sein (Paulson et al., 2002). Es ist bekannt, dass im Menschen chronische Schmerzen durch emotionale Komponenten beeinflusst werden (Villemure et al., 2002). Bei chronischen Schmerzen kommt es zu einer gesteigerten neuronalen Aktivität (Ziegelgänsberger et al., 1993), die zur LTP führen kann. Elektrophysiologische Untersuchungen ergaben, dass Cannabinoide die Ausbildung der LTP verhindern (Azad et al., 2004). In Verhaltensuntersuchungen an $CB1^{-/-}$ -Mäusen wurde herausgefunden, dass die initiale Schmerzschwelle eines akuten aversiven Reizes genauso hoch war wie bei Wildtyp ($CB1^{+/+}$)-Mäusen (Azad et al., 2005). Bei wiederholter Darbietung des aversiven Reizes sank jedoch die Schmerzschwelle der $CB1^{-/-}$ -Mäuse. Azad et al. vermuten, dass durch eine andauernde Störung des ECS die akuten nozizeptiven Prozesse nicht beeinflusst werden, sondern die Wahrscheinlichkeit einer Chronifizierung von Schmerzen erhöht ist (Azad et al., 2005). Es ist bekannt, dass der $5-HT_3$ -Rezeptor in der Amygdala auf GABAergen Interneuronen exprimiert wird (Mascagni et al., 2007) und dass das serotonerge System in Analogie zum ECS ebenfalls eine wichtige Funktion bei der Regulation des Schmerzes hat (Okamoto et al., 2004; Ali et al., 1996). So führte die Gabe von $5-HT_3$ -Rezeptor Antagonisten bei Patienten mit chronischen Schmerzen zu Analgesie (McCleane et al., 2003). Da $5-HT_3$ -Rezeptoren und $CB1$ -Rezeptoren in der Amygdala auf GABAergen Interneuronen koexprimiert werden (Hermann et al., 2002; Morales et al., 2004), vermutet man, dass die $5-HT_3$ -Rezeptor-vermittelte GABA-Freisetzung von $CB1$ -Rezeptoren kontrolliert wird (Abb.6) (Katona et al., 1999, 2001; Marsicano et al., 1999; Hajos et al., 2000; Bodor et al., 2005, Freund, 2003). Somit scheint ein Zusammenspiel dieser beiden Rezeptorsysteme bei der Verarbeitung von Schmerzen wahrscheinlich.

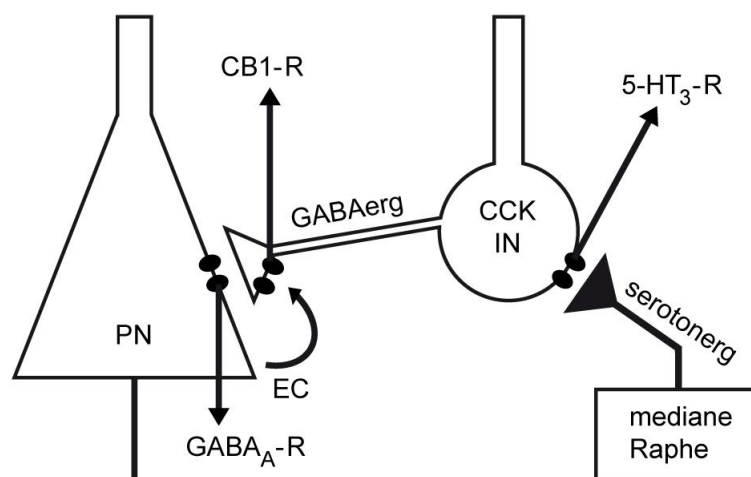


Abb. 6: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen ECS und 5-HT₃-Rezeptor

Serotonerge Fasern aus der medianen Raphe ziehen in die Amygdala und aktivieren dort postsynaptische 5-HT₃-Rezeptoren (**5-HT₃-R**), die auf dem CCK-beinhaltenden GABAergen Interneuron (**CCK-IN**) lokalisiert sind. Dies führt zu einer 5-HT₃-Rezeptor-vermittelten GABA-Freisetzung. Dadurch werden postsynaptische GABA_A-Rezeptoren (**GABA_A-R**) auf dem Projektionsneuron (**PN**) aktiviert. Dies wiederum führt zu einer Endocannabinoid (**EC**)-Ausschüttung, die retrograd von CB1-Rezeptoren (**CB1-R**) kontrolliert wird. (verändert nach Freund, 2003 und Mikics et al., 2009)

Die Amygdala hat außerdem eine wichtige Funktion bei der Extinktion von furchtkonditionierten Gedächtnisinhalten (Lutz, 2007). Im Tiermodell konnte auf Verhaltensebene gezeigt werden, dass Endocannabinoide eine entscheidende Rolle bei der Extinktion aversiver Gedächtnisinhalte spielen. CB1^{-/-}-Mäuse konnten, im Gegensatz zu CB1^{+/+}-Mäusen, nach Konditionierung aversive Gedächtnisinhalte nicht mehr löschen (Marsicano et al., 2002). Dies spricht für die Aktivierung des ECS während der Extinktion. In der Extinktionsphase wurden erhöhte Anandamid- und 2-AG-Konzentrationen in der BLA beschrieben (Azad, 2006; Marsicano et al., 2002).

Interessanterweise konnte in Verhaltenstests gezeigt werden, dass aktivierte 5-HT₃-Rezeptoren die Angstreaktion reduzieren und Cannabinoide diesen Effekt in CB1^{+/+}-Mäusen, aber nicht in CB1^{-/-}-Mäusen dämpfen konnten (Mikics et al., 2009). Aufgrund der Koexpression beider Rezeptoren (Hermann et al., 2002; Morales et al., 2004) und da sowohl das ECS als auch der 5-HT₃-Rezeptor in die Verarbeitung von Schmerz und Angst involviert sind, wird vermutet, dass beide Komponenten in der Amygdala möglicherweise miteinander interagieren. Es stellt sich die Frage, inwiefern die

gleichzeitige Gabe von CB1-Agonisten und 5-HT₃-Antagonisten eine Auswirkung auf die zellulären Vorgänge und die Verhaltensreaktionen hat.

1.5 Synaptische Plastizität

Das Gehirn verarbeitet differenzierte Sinneseindrücke und koordiniert dabei hochgradig flexibel komplexe Verhaltensweisen. Synaptische Verbindungen und neuronale Schaltkreise werden ständig durch Umwelteinflüsse modifiziert. Dies ist von großer Bedeutung für Lern- und Gedächtnisvorgänge. Hierdurch werden strukturelle Umbauprozesse ausgelöst, wie der Auf- und Abbau von postsynaptisch lokalisierten Rezeptoren oder die Bildung bzw. Reduktion von synaptischen Verbindungen einzelner Neurone untereinander (Gerdeman und Lovinger, 2003). LTP und LTD sind zwei bekannte Mechanismen, die diese Prozesse einleiten können (Silva, 2003). Die morphologisch-strukturellen Vorgänge, die im Zusammenhang mit Lernprozessen im Gehirn stattfinden, fasst man unter dem Oberbegriff der synaptischen Plastizität zusammen (Barnes und McNaughton, 1985). Als LTP bezeichnet man *in vitro* den Effekt, den eine tetanische hochfrequente Impulsfolge auf präsynaptische Endigungen hat (Bliss und Collingridge, 1993). Dabei kommt es in der postsynaptischen Membran des Neurons zu einer langanhaltenden Verstärkung der Effizienz der synaptischen Übertragung (Kelso et al., 1986). Eine relativ niederfrequente Impulsfolge führt dagegen in der postsynaptischen Membran des Neurons zu einer langanhaltenden Abschwächung der Effizienz der synaptischen Übertragung, und somit zu einer LTD (Cummings et al., 1996). Beiden Mechanismen gemein ist, dass sie morphologische Umbauprozesse auslösen. Erlernte emotionale Zustände, wie die Furchtkonditionierung (siehe Punkt 1.3), werden vermutlich über LTP vermittelt (Heifets und Castillo, 2009). LTD hingegen führt zur Extinktion dieser aversiven Gedächtnisinhalte (Martin et al., 2000). Elektrophysiologische Untersuchungen zur synaptischen Plastizität im Hirnschnittpräparat ergaben, dass eine niederfrequente afferente Reizung (1 Hz / 900 Pulse) in der BLA LTD induziert (Rammes et al., 2000; DeBock et al., 2003). Hierbei kam es über präsynaptische Mechanismen zu einer anhaltenden Abnahme der synaptischen Transmission. Die Gabe des GABA_A-Rezeptor-Antagonisten Picotoxin

blockierte LTD vollständig. Es wird vermutet, dass vorgeschaltete GABAerge Interneurone bei der Induktion von LTD ausschlaggebend sind (Rammes et al., 2001). Weitere Untersuchungen zeigten, dass eine spezifische niederfrequente Stimulation (1 Hz / 100 Pulse) von Afferenzen in der BLA zu einer anhaltenden Abnahme der GABAergen Transmission führte, die als LTD_i bezeichnet wird (Azad et al., 2004). Diese Disinhibition im zentralen Nucleus der Amygdala kann wiederum zur LTP führen. Dies sind erste Hinweise dafür, dass das Rezeptorsystem des ECS für die Extinktion von konditionierten aversiven Gedächtnisinhalten unabdingbar und bei der Entstehung von synaptischer Plastizität beteiligt ist. Diese Form der Endocannabinoid-vermittelten Langzeitplastizität stellt eine zelluläre Komponente eines aktiven mnemonischen Prozesses dar, was die Vermutung bestätigt, dass dem ECS bei der Prozessierung von Gedächtnisinhalten eine entscheidende Rolle zukommt. Tatsächlich konnte in Verhaltensversuchen mit CB1^{-/-}-Mäusen gezeigt werden, dass Endocannabinoide eine führende Rolle bei der Extinktion von aversiven Gedächtnisinhalten zukommt (Marsicano et al., 2002).

1.6 Synaptische Transmission

Die Informationsübertragung zwischen den Nervenzellen geschieht über die Synapsen. Diese vermitteln den Kontakt zwischen zwei oder mehreren Neuronen, wobei ein Neuron zwischen 1000 und 10000 Synapsen ausbilden kann (Reichert, 1990). Zwischen dem präsynaptischen und dem postsynaptischen Neuron befindet sich der sog. synaptische Spalt. Der Informationsfluss zwischen prä- und postsynaptischem Neuron kann entweder über elektrische oder aber über chemische Synapsen erfolgen.

Bei den elektrischen Synapsen sind die Neurone direkt über Kanäle, die „Gap Junctions“, in der Zellmembran miteinander verbunden. Die elektrische Information kann direkt, ohne Zeitverzögerung, dafür aber meist abgeschwächt, von Neuron zu Neuron übermittelt werden. Diese Art Synapse spielt in der vorliegenden Arbeit jedoch nur eine geringe Rolle.

Bei der chemischen Synapse sind die beiden Nervenzellen nicht direkt miteinander gekoppelt, und die elektrische Information muss zuerst in chemische und später wieder zurück in elektrische Information umgewandelt werden.

Durch das Eintreffen eines Aktionspotentials an den präsynaptischen Terminalen kommt es zu einer Potentialänderung, die zu einem Ca^{2+} -Einstrom führt. Als Folge davon verschmelzen Transmitter-Vesikel mit der synaptischen Membran, und es werden Neurotransmitter in den synaptischen Spalt ausgeschüttet. Die Neurotransmitter diffundieren über den Spalt zu den Rezeptoren der postsynaptischen Seite und binden dort an. Binden die Transmitter an ionotrope Rezeptoren, führt dies abhängig von der spezifischen Rezeptorwirkung zu einer Depolarisation oder einer Hyperpolarisation des postsynaptischen Neurons. Da ein Neuron meistens von mehreren anderen Neuronen innerviert wird, kommt es zur Integration von exzitatorischen postsynaptischen Strömen (EPSC) und inhibitorischen postsynaptischen Strömen (IPSC). Je nach Stärke des dadurch entstehenden Reizes verändert sich das Membranpotential des Neurons. Überschreitet eine Depolarisation den Schwellenwert (-50 bis -55 mV), kommt es zu einem Aktionspotential (AP), dem sog. Nervenimpuls (Campbell, 1997).

Transmitter-Vesikel können auch ohne vorausgehendes AP aus den synaptischen Terminalen freigesetzt werden und an die postsynaptischen Rezeptoren binden. Als Folge dieser spontanen Ausschüttung von Neurotransmittern entstehen am postsynaptischen Neuron Ionenströme. Abhängig von der Art des Neurotransmitters kommt es zu sog. „miniatur exzitatorischen postsynaptischen Strömen“ (mEPSC) bzw. „miniatur inhibitorischen postsynaptischen Strömen“ (mIPSC).

Im ZNS ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter Glutamat, der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter GABA. GABA wird aus Glutamat mit Hilfe des Enzyms Glutamat Decarboxylase (GAD) synthetisiert und über ein Transporterprotein in die Vesikel transportiert (Shi und Li, 2011). GABAerge Projektionen werden vor allem von Interneuronen gebildet, wobei sich im Striatum auch schnell feuernde GABA-Projektionsneurone finden (Planert et al., 2010). Man unterscheidet zwei Gruppen von GABA-Rezeptoren, die ionotrope (GABA_A und GABA_C) und die metabotrope (GABA_B) Gruppe. Wie auch der nikotinische Acetylcholin (nAch)- und 5-HT_3 -Rezeptor besteht der GABA_A -Rezeptor aus mehreren Transmembranprotein-Komplexen, die pentamer

zusammengesetzt sind und eine zentrale Ionenpore bilden. Die Transmembranprotein-Komplexe wiederum sind aus unterschiedlichen Untereinheiten aufgebaut: α_1 , β_2 und γ_2 . Jede dieser Untereinheiten besteht dabei aus vier Transmembransegmenten und einem extrazellulären N-terminalen Bereich mit einer Bindungsstelle für den Transmitter (Reichert, 1990). Der GABA_A-Rezeptor verfügt über zwei weitere Bindungsstellen, eine für Benzodiazepine und eine für Barbiturate (Kandel, 1995). Wird der Rezeptor aktiviert, kommt es zur Konformationsänderung, zum Chlorid (Cl⁻)-Einstrom und somit zur Hyperpolarisation des Neurons.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Im ZNS besitzen ECS und 5-HT₃-Rezeptoren viele überschneidende Wirkungen. So sind beide Komponenten in die Verarbeitung von Schmerz und Angst involviert und spielen vermutlich eine Rolle bei der Pathophysiologie der Schizophrenie. Zusätzlich kontrollieren beide Komponenten aktivitätsabhängig die zentral bedingte Emesis. Ebenso wurde eine pharmakologische Interaktion beschrieben, bei der Cannabinoide eine antagonistische Wirkung auf den 5-HT₃-Rezeptor ausüben. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auf GABAergen Interneuronen der BLA CB1-Rezeptoren mit 5-HT₃-Rezeptoren in hoher Dichte koexprimiert werden (Hermann et al., 2002; Morales et al., 2004). Es wird daher vermutet, dass beide Komponenten in der Amygdala interagieren. Jedoch fehlen auf neuronaler Ebene für diese Interaktion bisher Hinweise.

Mit einer Kombination aus elektrophysiologischen Methoden und Verhaltensversuchen an Mäusen sollen folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Spielen 5-HT₃-Rezeptoren eine Rolle bei der Modulation der GABAergen synaptischen Transmission in der BLA?
2. Besteht auf der Ebene der GABAergen synaptischen Transmission eine Interaktion zwischen dem ECS und 5-HT₃-Rezeptoren?
3. Sind 5-HT₃-Rezeptoren an der Kontrolle von Cannabinoid-vermittelter synaptischer Aktivität (LTDi) beteiligt?
4. Beeinflussen 5-HT₃-Rezeptoren die Akquisition und Extinktion von aversiven Gedächtnisinhalten?
5. Beeinflusst die pharmakologische Modifikation von 5-HT₃- und CB1-Rezeptoren die Extinktion aversiver Gedächtnisinhalte?

2 Material und Methoden

2.1 Herstellung von Hirnschnittpräparaten der Amygdala

Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden männliche C57BL/6N Mäuse im Alter zwischen sechs und acht Wochen verwendet. Durch die Verwendung junger Tiere ist eine höhere Hypoxietoleranz sichergestellt. Auch sind dadurch bessere Bedingungen für die Ableitungen der Patch-Clamp Technik gewährleistet. Die Ableitungen aus der Amygdala wurden an Koronarschnitten (Bregma – 2,06 bis 2,18 mm) durchgeführt.

Für die Präparation der Koronarschnitte wurden die Tiere mit Isofluran narkotisiert und anschließend dekapitiert. Alle weiteren Präparationsschritte erfolgten in eisgekühlter und mit Carbogengas (95% Sauerstoff/5% Kohlendioxid) gesättigter künstlicher Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF, artificial cerebrospinal fluid, Zusammensetzung (mM): NaCl 125; KCl 2,5; NaH₂PO₄ 1,25; MgCl₂ 1; Glucose 25; NaHCO₃ 25; CaCl₂ 2; pH≈ 7,37). Nach Freilegung der Schädelkalotte wurde diese von kaudal mit zwei Transversalschnitten und einem flach geführten Sagittalschnitt entlang der Mittellinie des Schädels nach rostral eröffnet. Um den Zugang zum Gehirn zu ermöglichen, wurde die Schädelkalotte mit einer Pinzette beidseitig abgehoben. Nach der Durchtrennung der Nervi optici mit einem abgerundeten Spatel wurde das Gehirn vorsichtig aus der Schädelhöhle herausgelöst und in das Gefäß mit eisgekühlter und Carbogen-begaster ACSF überführt. Anschließend wurde das Gehirn mit der Basis nach unten auf ein mit ACSF getränktes Filterpapier gelegt. Mit einer Rasierklinge wurde das Kleinhirn in koronarer Schnitfführung entfernt, um eine saubere Schnittfläche zu erzeugen, mit der das restliche Gehirn auf einen Metallblock, auf dem ein Agarblock befestigt war, geklebt werden konnte (Abb. 7). Als Kleber wurde Cyanoakrylatklebstoff (Histoakryl, B. Braun, Melsungen, Deutschland) verwendet. Nach Fixieren des Gehirns auf dem Metallblock wurde dieser in ein Schneidegefäß gelegt, das mit gekühlter und Carbogen-gesättigter ACSF gefüllt war. Anschließend wurden mit einem Vibratom (HM 650 V, Microm International, Walldorf, Deutschland)

350 µm dicke Koronarschnitte angefertigt (Abb. 8). Danach wurden die Koronarschnitte mit dem weiten Ende einer Pasteurpipette in ein Gefäß mit Carbogen-gesättigter ACSF überführt und für 40 min bei 34°C inkubiert. Bis zur Überführung der Koronarschnitte in die Ableitkammer wurden die Schnitte bei Raumtemperatur (22-25°C) unter ständiger Zufuhr von Carbogen in ACSF aufbewahrt.

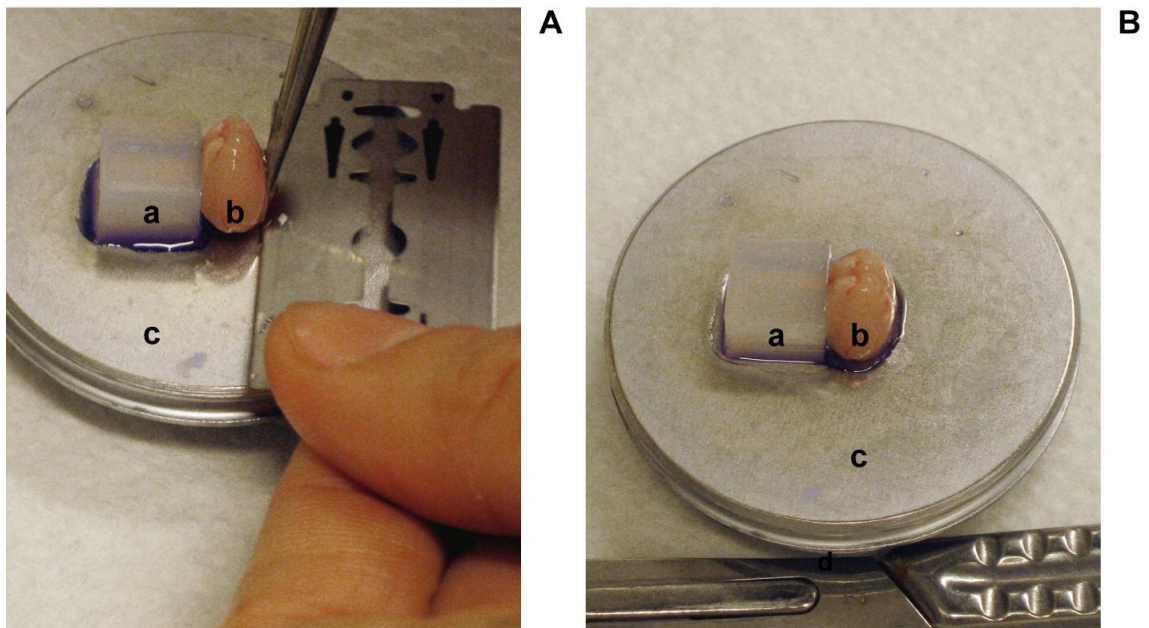


Abb. 7: A: Überführen des präparierten Gehirns auf den Metallblock B: Aufgeklebtes Gehirn

Das Kleinhirn wird mit einer Rasierklinge in koronarerer Schnitfführung entfernt und vorsichtig auf einen Metallblock, auf dem ein Agarblock befestigt ist, geklebt. Als Kleber wurde Cyanoakrylatklebstoff verwendet. **a:** Agarblock; **b:** Gehirn; **c:** Metallblock

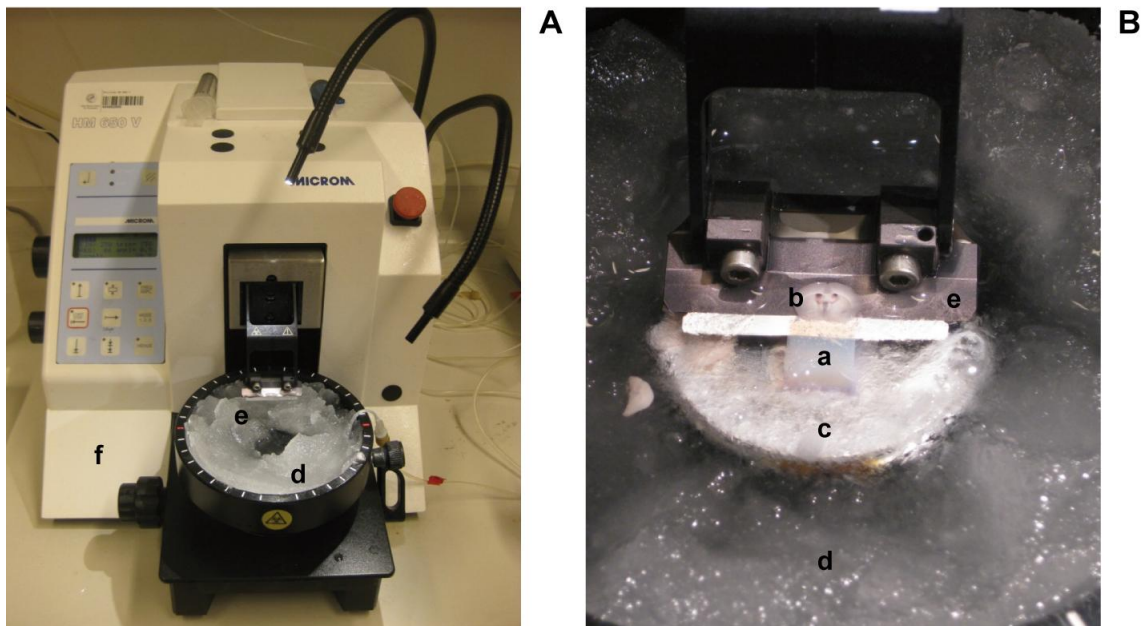


Abb. 8: A: Vibratom B: Anfertigen der Hirnschnitte

Nach Fixieren des Gehirns auf dem Metallblock wurde dieser in ein Schneidegefäß gelegt, das mit gekühlter und Carbogen-gesättigter ACSF gefüllt war. Anschließend wurden mit einem Vibratom 350 μm dicke Koronarschnitte angefertigt. Die Koronarschnitte wurden danach mit dem weiten Ende einer Pasteurpipette in ein Gefäß mit Carbogen-gesättigter ACSF überführt und für 40 min bei 34°C inkubiert. Die Koronarschnitte wurden bis zur Überführung in die Ableitkammer bei Raumtemperatur (22-25°C) unter ständiger Zufuhr von Carbogen in ACSF aufbewahrt. **a:** Agarblock; **b:** Hirnschnitt auf Rasierklinge; **c:** Metallblock; **d:** Schneidegefäß gefüllt mit ACSF; **e:** Rasierklinge, **f:** Vibratom

2.2 Infrarot-Videomikroskopie

Durch die Infrarot-(IR)-Videomikroskopie (Abb. 9) können im vitalen Hirnschnitt Neurone visualisiert werden (MacVicar 1984; Dodt et al., 1990; Dodt und Zieglgänsberger, 1994). Sichtbares Licht wird durch die im Hirnschnitt dicht beieinander liegenden Neurone sehr stark gestreut. Deshalb wird statt sichtbaren Lichts langwelliges Licht im Infrarotbereich eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Experimente Infrarot-Licht mit einer Wellenlänge von 780 nm verwendet (Dodt und Zieglgänsberger, 1994). Durch einen in die Videokamera integrierten Kontrastverstärker, dem sog. Gradientenkontrast-(GC)-Verfahren (Dodt et al., 2002), wurde eine Intensivierung des Kontrasts erreicht. Die Reduzierung von Streulicht und die Erzeugung eines Beleuchtungsgradienten in zwei orthogonale Richtungen stellen das Prinzip des GC-Verfahrens dar. Hierdurch können eine größere

Visualisierungstiefe und ein höherer Kontrast erzielt werden. Als Mikroskop wurde ein Axioskop (Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit einem 60x Wasser-Immersionsobjektiv (numerische Apertur 0,9; Olympus, Tokio, Japan) eingesetzt. Zwischen der Halogenlampe und dem Kondensator des Mikroskops ist dabei ein Infrarot-Interferenzfilter eingebaut, so dass nur Infrarotlicht mit der gewünschten Wellenlänge von 780 nm in den Strahlengang gelangen kann. Nach zweifacher Vergrößerung durch eine Streuungslinse wird das Bild auf eine infrarotsensitive Videokamera abgebildet und auf einem Monitor visualisiert.

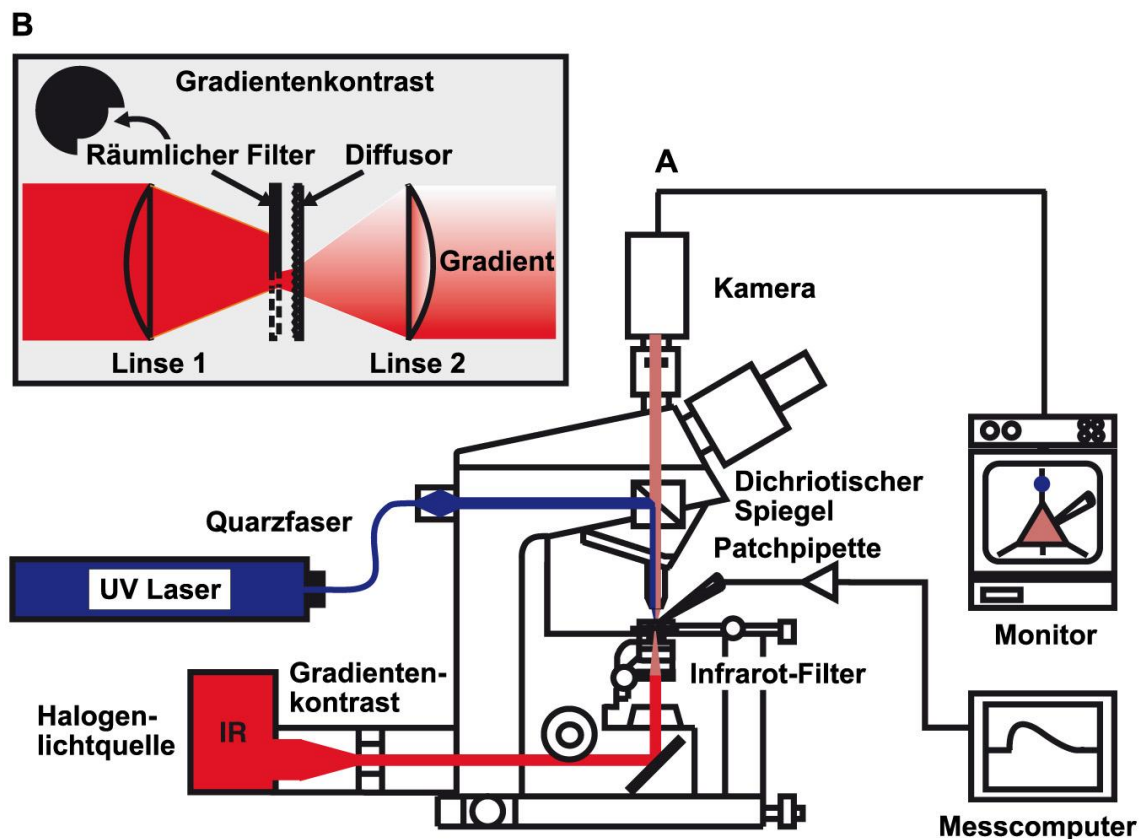


Abb. 9: Versuchsaufbau des Infrarot-Videomikroskops mit IR-gelenkter Photostimulation

A Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus: Die Neurone werden mit Hilfe der IR-Videomikroskopie visualisiert. Gleichzeitig wird ein Laserimpuls über eine Quarzfaser in das Mikroskop geleitet und durch einen dichroitischen Spiegel und das Objektiv auf das abgeleitete Neuron fokussiert. **B** Prinzip des Gradientenkontrasts: Das Streulicht wird durch eine Viertelfeldbeleuchtung und einen nachgeschalteten Diffusor minimiert. Dadurch kann ein höherer Kontrast und eine größere Visualisierungstiefe erreicht werden. (verändert nach Dodt et al., 2002)

2.3 Infrarotmikroskopisch kontrollierte Photostimulation

Mit Hilfe der Infrarot-videomikroskopisch-gestützten Photostimulation können an bestimmten Strukturen der Neurone, beispielsweise den Dendriten, Substanzen unter visueller Überwachung freigesetzt werden. Diese Methode zeichnet sich durch eine sehr hohe zeitliche und räumliche Auflösung aus und ist daher besonders geeignet, um synaptische Transmissionsabläufe zu imitieren (Dodt et al., 2002).

2.3.1 Laser-Photostimulation

Bei der Laser-Photostimulation wird eine biologisch aktive Substanz, die durch eine Veresterung als inaktive Verbindung vorliegt („caged“), photolytisch freigesetzt. Wird die kovalente Esterbindung mit energiereichem ultraviolettem (UV) Licht bestrahlt, wird diese inaktive, sog. „caged“-Verbindung, gespalten und die aktive Substanz freigesetzt. Dadurch wird eine präsynaptische Transmitterfreisetzung unter kontrollierten und somit während des Experiments konstanten Bedingungen imitiert, die dann die gezielte Untersuchung einer postsynaptischen Stromantwort ermöglicht. Mit dieser Methode lässt sich ein sofortiger Konzentrationsanstieg von Neurotransmitter im synaptischen Spalt hervorrufen (McCray et al., 1989; Adams et al., 1993; Hess et al., 1995). Die Freisetzung der aktiven Substanz kann durch die Fokussierung des UV-Lichtes räumlich begrenzt werden. Hierdurch können einzelne, definierte Neurone oder kleinere neuronale Bereiche gezielt pharmakologisch manipuliert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Photostimulation ein UV-Laser (Abb. 10) mit einer Ausgangsleistung von 1 Watt (Nd: YVO₄, 100 kHz Pulswiederholungsrate; DPSS Lasers, San Jose, USA) eingesetzt, dessen Strahlung über eine Quarzfaser mit einem Durchmesser von 25 µm in den Auflichtstrahlengang des Mikroskops eingeleitet wurde. Der UV-Strahl des Lasers wurde von oben, über einen dichroitischen Strahlenleiter (FT 460), in das Objektiv eingespiegelt, so dass durch den dichroitischen Spiegel lediglich Licht mit einer Wellenlänge von weniger als 460 nm den Hirnschnitt erreichte. Der UV-Laser emittierte Licht mit einer Wellenlänge von 355 nm. Dieses Licht wurde in der

Fokalebene gebündelt, nachdem der Lichtstrahl in den Brennpunkt des Objektivs (60x, numerische Apertur 0,9; Olympus, Tokio, Japan) geleitet wurde. Dadurch entstand ein Lichtpunkt mit einem Durchmesser von 5 μm . Der Lichtpunkt wurde vor dem Experiment mit fluoreszierendem Papier auf eine Markierung am Bildschirm festgelegt, um die Strahlung des Lasers während des Experimentes im Hirnschnitt genau lokalisieren zu können. Hierdurch konnte der Bereich der photolytischen Stimulation exakt definiert werden. Durch einen Polarisationsfilter konnte die Lichtleistung des Lasers während des Experiments verändert werden. In der vorliegenden Arbeit lag die Leistung des Laserlichtes zwischen 50 und 100 mW. Über einen Computer mit entsprechender Software und einem Analog-Digital-(AD)-Wandler wurden die Dauer des Lichtpulses sowie die Öffnung des sog. „Shutters“, eine vertikal bewegliche Klappe, genau festgelegt. Der „Shutter“ war zwischen Laser und Mikroskop geschaltet. Daraus ergab sich ein Lichtpuls mit der Dauer von 3-5 ms.

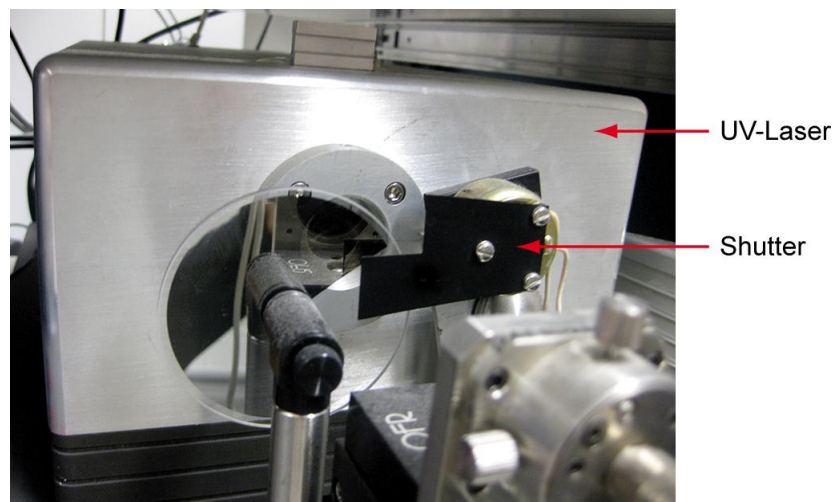


Abb. 10: UV-Laser

Für die Photostimulation wurde ein UV-Laser eingesetzt. Die Dauer des Lichtpulses wurde über einen Computer mit entsprechender Software sowie über die Öffnung des „Shutters“, eine vertikale bewegliche Klappe, genau festgelegt. Der „Shutter“ ist zwischen Laser und Mikroskop geschaltet.

Für die photolytische Spaltung wurde in der vorliegenden Arbeit verestertes, sog. O-(CNB-caged) GABA (γ -aminobuttersäure, α -carboxy-2-nitrobenzyl ester, trifluoroacetat; Invitrogen) in einer Konzentration von 125 μM verwendet.

2.4 Elektrophysiologie

2.4.1 Versuchsaufbau

Für die elektrophysiologischen Experimente war das Infrarot-Mikroskop mit einem System motorisierter Mikromanipulatoren (Luigs und Neumann, Ratingen, Deutschland) ausgestattet (Abb. 11). Hierdurch war die unabhängige Positionierung von Patchpipette, Ableitkammer und Mikroskop in alle drei Raumrichtungen möglich. Die Ableitkammer wurde mit Carbogen-gesättigter ACSF perfundiert. Die Zirkulation wurde über Teflonschläuche, die über eine Schlauchpumpe vom Vorratsbehälter zur Ableitkammer liefen, gewährleistet. Dadurch waren die Substanzzugabe und Reoxygenierung außerhalb der Ableitkammer möglich. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 0,3-0,5 l/min und das Kammervolumen umfasste 1,5 ml.

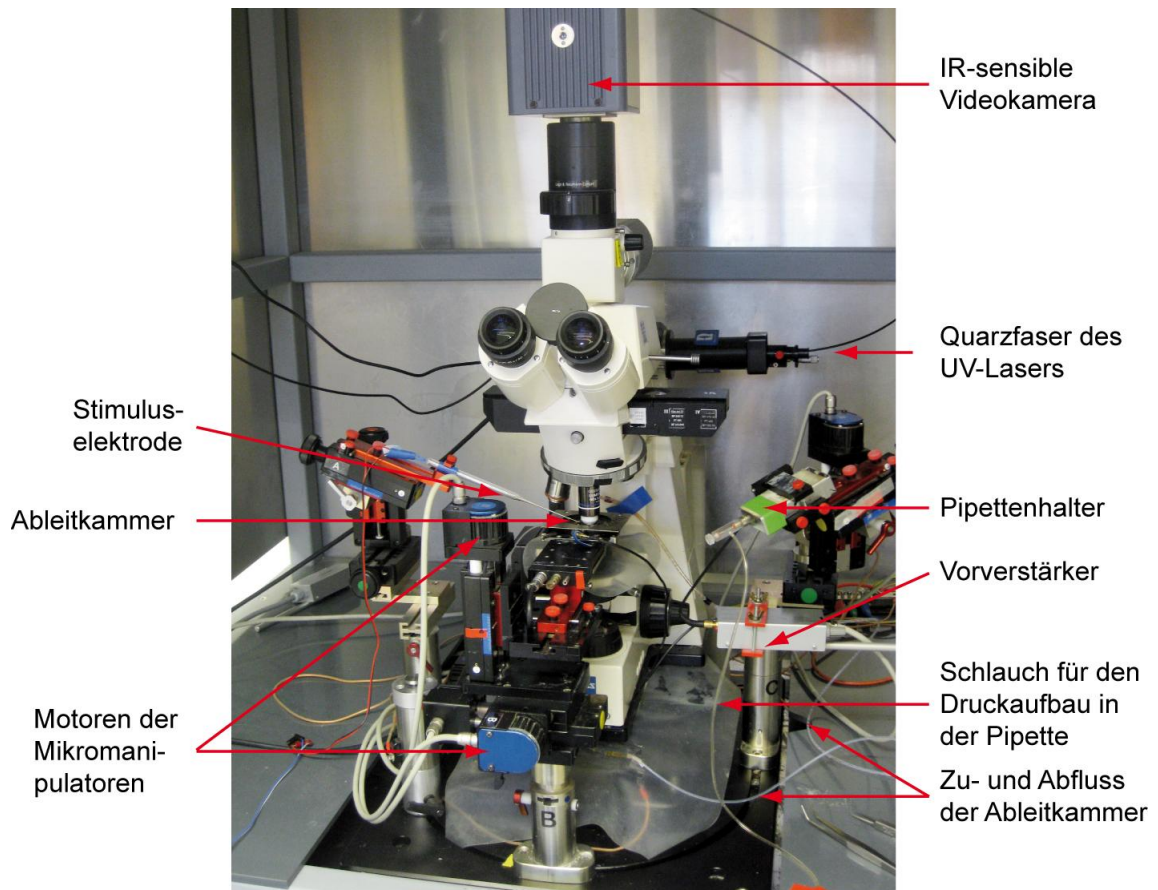


Abb. 11: Patch-Clamp Meßplatz

Für die elektrophysiologischen Experimente war das Infrarot-Mikroskop mit einem System motorisierter Mikromanipulatoren ausgestattet. Hierdurch war die unabhängige Positionierung von Patchpipette, Ableitkammer und Mikroskop in alle drei Raumrichtungen möglich. Die mit Intrazellulärlösung gefüllte Patchpipette war über einen chlorierten Silberdraht mit einem Vorverstärker verbunden. Damit die Patchpipette bei der Annäherung an das Projektionsneuron durch den Hirnschnitt nicht verstopft, wurde über eine 50 ml Spritze ein Überdruck auf der Patchpipette aufgebaut. Die Ableitkammer wurde mit Carbogen-gesättigter ACSF perfundiert. Die Zirkulation wurde über Teflonschläuche, die über eine Schlauchpumpe vom Vorratsbehälter zur Ableitkammer liefern, gewährleistet.

Nach Herstellen und Verbringen der Hirnschnitte in die Ableitkammer (s. Punkt 2.1), wurden die Schnitte mit einem Platindraht, der mit dünnen Nylonfäden bespannt war, fixiert. Die Amygdala wurde lichtmikroskopisch aufgesucht und die Stimulations-elektrode entsprechend auf der LA positioniert (Abb. 12). Anschließend wurde die BLA fokussiert.

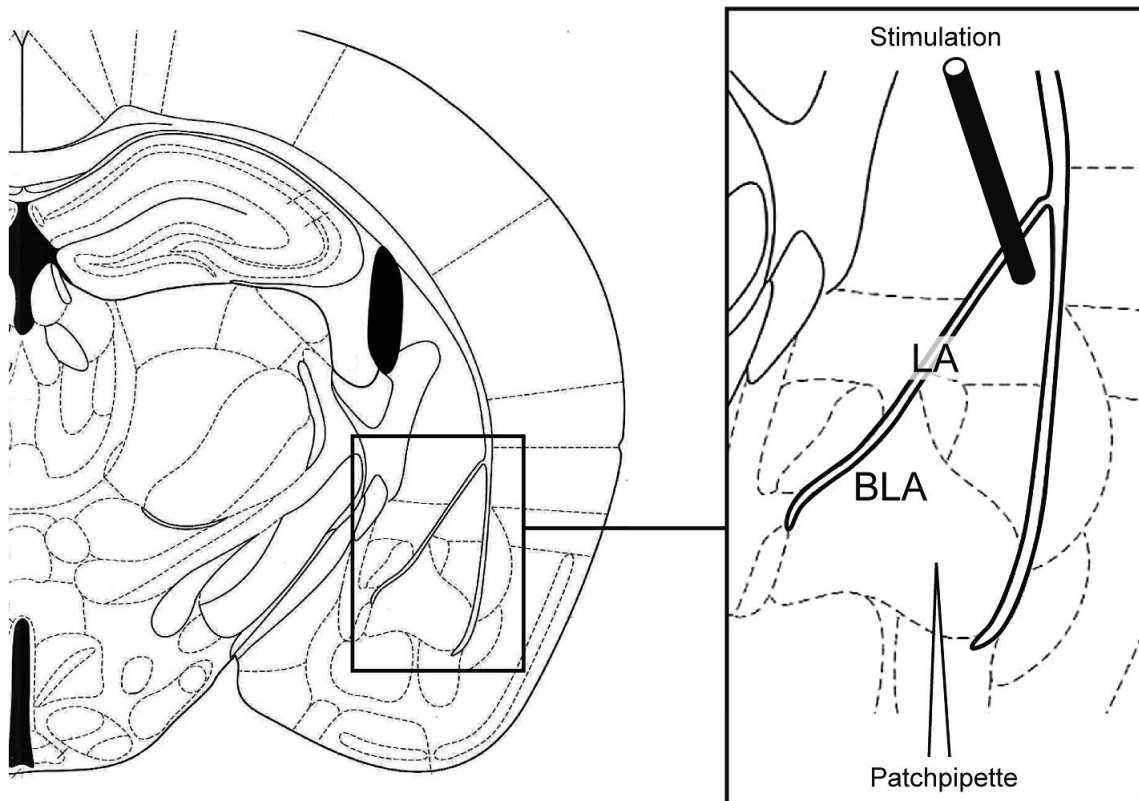


Abb. 12: Schematische Darstellung der Amygdala

Die Amygdala wurde lichtmikroskopisch aufgesucht und die Stimulationselektrode entsprechend auf der LA positioniert. Anschließend wurde die BLA fokussiert. Nach videomikroskopischer Identifizierung eines geeigneten Projektionsneurons wurde die Patchpipette an die Zelle herangebracht. eGABA_A-IPSCs wurden durch die Stimulation der LA evoziert und im Ganzzellmodus in der BLA an Projektionsneuronen abgeleitet. **LA:** laterale Amygdala; **BLA:** basolaterale Amygdala. (verändert nach K. Franklin und G. Paxinos, 1997)

2.4.2 Ganzzelleitung und Stimulation

Alle Experimente in der vorliegenden Arbeit wurden mit der Patch-Clamp Technik in der „Whole-Cell“ Konfiguration durchgeführt (Stuart et al., 1993). Bei dieser Methode wird die elektrische Aktivität der gesamten Zelle und nicht nur die Aktivität einzelner Ionenkanäle gemessen (Ganzzelleitung; Blanton et al., 1989; Edwards et al., 1989). Um diese Ganzzelleitung zu ermöglichen, musste zuerst eine sog. „Cell-Attached“ Konfiguration hergestellt werden, um anschließend die Membran unter der Patchpipettenöffnung zu durchbrechen. Dadurch tauscht sich die Patchpipettenlösung in kürzester Zeit mit dem Zytoplasma aus. Durch diese Methode können gezielt die intrazelluläre Zusammensetzung verändert, und intrazelluläre Ionenkanäle durch die

Zugabe bestimmter Pharmaka blockiert werden. Diese Technik führt zu einem sehr hohen Abdichtungswiderstand zwischen Patchpipettenspitze und Zellmembran. Man spricht dabei vom sog. „giga-seal“, der im Gigaohm (G Ω) Bereich liegt. Dadurch entsteht ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis, welches die Messung kleiner synaptischer Ströme zulässt. Kleinste Potentialänderungen können so detektiert werden (Numberger und Draguhn, 1996).

2.4.2.1 Patchpipetten

Mit einem Horizontalziehgerät (DMZ-Universalpuller, Zeitz, Martinsried, Deutschland) werden die Patchpipetten aus Borosilikatglas-Kapillaren mit Innenfilament (Hugo-Sachs Elektronik-Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland) hergestellt und hitzepoliert. Ihr Innendurchmesser misst dabei 1,17 mm, der Außendurchmesser 1,5 mm. Der Durchmesser der Patchpipettenöffnung kann durch das gezielte Einstellen einzelner Parameter am Horizontalziehgerät variiert werden. Bei einem Durchmesser von 1 μ m betrug der Gleichstromwiderstand der mit Intrazellulärlösung gefüllten Patchpipette 4,5-5 M Ω . Die Intrazellulärlösung hatte folgende Zusammensetzung (mM): CsCH₄SO₄ 130, EGTA 0,05, HEPES 5, MgCl₂ 1, NaCl 1, Lidocain 5. Der pH-Wert wurde mit 0,1 molaren KOH auf 7,3 eingestellt. Die Osmolarität betrug 275,05 mosM. Für die Messung von LTDi und mIPSCs wurde die Konzentration von Chloridionen in der Intrazellulärlösung mit folgender Zusammensetzung erhöht (mM): CsCH₄SO₄ 100, EGTA 0,2, HEPES 10, MgCl₂ 1, CsCl 60, Lidocain 5; Mg-ATP 1; Na₃-GTP 0,3. Der pH-Wert wurde mit CsOH auf 7,3 eingestellt. Die Osmolarität betrug 341,4 mosM. Das Umkehrpotential für Chlorid-Ionen betrug -20 mV.

2.4.2.2 Herstellung der Ganzzelleableitung

In der Whole-Cell Konfiguration werden die Neurone im „Voltage-Clamp-Modus“ abgeleitet. Dabei entsprach das eingestellte Haltepotential -70 mV oder -60 mV. Die mit Intrazellulärlösung gefüllte Patchpipette war über einen chlorierten Silberdraht mit

einem Patch-Clamp-Verstärker (SEC 10L, NPI electronic, Tamm, Deutschland) verbunden. Der Verstärker arbeitete im diskontinuierlichen Einzelelektroden-„Voltage-Clamp“-Verfahren (dSEVC, „discontinuous single electrode voltage clamp“). Das bedeutet, dass zur Erhaltung des definierten Membranpotentials der Verstärker mit einer voreingestellten Frequenz (75-80 Hz) zwischen Spannungsmessung und Injektion des Kompensationsstroms hin und her wechselt. Dadurch kann die tatsächliche Spannung über der Zellmembran gemessen und genau der Strom injiziert werden, der notwendig ist, um das definierte Haltepotential zu halten.

Nach videomikroskopischer Identifizierung eines geeigneten Projektionsneurons wurde die Patchpipette an die Zelle herangebracht. Damit die Patchpipette bei der Annäherung durch den Hirnschnitt nicht verstopft, wurde über eine 50 ml Spritze ein Überdruck auf der Patchpipette aufgebaut. Kapazität und Widerstand der Patchpipette wurden, vor Erreichen des Somas, im sog. „Bridge-Mode“ (Wheatstone`sche Brücke) abgeglichen, um den Anteil der Patchpipette an der Gesamt-Kapazitätsumladung (Zellmembran und Patchpipette) auszuschalten. Die Wheatstone`sche Brücke ist eine Messeinrichtung zur Messung elektrischer Widerstände. Sobald die Patchpipette die Zellmembran des Somas erreichte, wurde dieser Druck vorsichtig abgelassen. Durch den entstehenden Unterdruck wurde die sog. „Cell-Attached“ Konfiguration hergestellt. Durch einen nachfolgenden, sanften und kontinuierlichen Unterdruck wurde die Zellmembran durchbrochen und damit die „Whole-Cell“ Konfiguration hergestellt. Die Patchpipette und das Zellinnere wurden dadurch leitend miteinander verbunden. Die Zellmembran wird durch die zwei leitenden Flüssigkeiten (Intra- und Extrazellulärlösung) zum umladbaren Widerstand und wirkt als Kondensator. Sie hat neben ihrem Membranwiderstand (R_M) jetzt auch kapazitative Eigenschaften (C_M). Dem Membranwiderstand ist der Serienwiderstand (R_S) in Serie geschaltet. Der Serienwiderstand setzt sich aus dem Patchpipettenwiderstand und dem Widerstand der Zellfragmente zusammen, die die Patchpipettenöffnung verstopfen. Aufgrund der Verstärkereigenschaften spielt der Serienwiderstand für die elektrophysiologischen Messungen allerdings nur eine untergeordnete Rolle.

2.4.2.3 Elektrische und photolytische Stimulation

Die GABAergen IPSC wurden alternierend im Abstand von 15 sec elektrisch und photolytisch gemessen. GABA_A-IPSCs wurden durch die Stimulation der LA evoziert und im Ganzzellmodus in der BLA an Projektionsneuronen abgeleitet. Die elektrische Stimulation erfolgte über eine bipolare, konzentrische Stimulations-Elektrode aus Wolfram (Außendurchmesser 200 µm, Innendurchmesser 100 µm, SNEX-100X, Hugo-Sachs-Elektronik-Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland). Mit Hilfe von Mikromanipulatoren wurde die Stimuluselektrode auf die LA positioniert, so dass Axone, die dem abgeleiteten Neuron vorgeschaltet waren, stimuliert werden konnten. Das Stimulationsgerät, mit dem die Stimuluselektrode verbunden war, wurde über einen Computer mit einem AD-Wandler von der Aufzeichnungssoftware (HEKA Pulse, Heka Elektronik, Lambrecht, Deutschland) ausgelöst. Dauer (0,05-0,5 ms) und Intensität (0,1-100 mV) des Strompulses konnten am Stimulationsgerät eingestellt werden. Die Zellen wurden im Voltage-Clamp Modus bei -60 mV gehalten. Zusätzlich zur elektrischen Stimulation wurden die abgeleiteten Zellen durch photolytische Freisetzung von GABA stimuliert. Hierzu wurde 125 µM O-(CNB-caged) GABA appliziert. Nach ca. 10 min Einwaschzeit wurde mit der photolytischen Stimulation begonnen. Der Laserpunkt wurde so positioniert, dass er auf den Dendrit des abzuleitenden Neurons zeigte. Die Laserintensität wurde so eingestellt, dass eine Stromantwort von ca. 50-100 pA abgeleitet werden konnte. Die abgeleiteten Antworten wurden durch Zugabe von spezifischen Antagonisten modifiziert, um elektrisch (eGABA_A-IPSCs) und photolytisch (pGABA_A-IC) evozierte GABA_A-Ströme durch bestimmte Rezeptortypen isolieren zu können. In dieser Arbeit wurden folgende Antagonisten eingesetzt: *D*-AP-5 (d(-)-2-Amino-5-phosphonopentansäure; NMDA-Rezeptor-Blocker; 50 µM), NBQX (2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydro-benzof]quinoxaline-7-sulfonamide; AMPA-Rezeptor-Blocker; 5 µM) und CGP 35348 (35348-aminopropyl (diethoxymethyl) phosphinsäure; GABA_B-Rezeptor-Blocker; 200 µM). Waren die eGABA_A-IPSCs bezüglich ihrer Amplitude und Kinetik für mindestens zehn Minuten lang stabil, wurden die pharmakologischen Substanzen, die untersucht werden sollten, appliziert.

2.4.2.4 Auslösen LTDi

eGABA_A-IPSCs wurden durch die Stimulation der LA evoziert und an Pyramidenzellen der basolateralen Amygdala (BLA) abgeleitet. Die Zellen wurden im Voltage-Clamp Modus bei -70 mV gehalten. Durch die Zugabe von *D*-AP-5, NBQX und CGP 35348, wurden eGABA_A-IPSCs isoliert. Waren eGABA_A-IPSCs bezüglich ihrer Amplitude und Kinetik für mindestens zehn Minuten lang stabil, wurde LTDi induziert. Hierzu wurde eine niederfrequente afferente Reizung (1 Hz/100 Pulse) ausgelöst, welche in der BLA eine anhaltende Abnahme der synaptischen Transmission zur Folge hat.

2.4.2.5 mPSCs

GABA kann auch ohne vorausgehendes Aktionspotential aus den synaptischen Terminalen freigesetzt werden und an postsynaptische Rezeptoren binden. Durch diese spontanen Neurotransmitterausschüttungen kommt es am postsynaptischen Neuron zu den sog. mIPSCs. Um diese isolieren zu können, wurden zur ACSF *D*-AP-5, NBQX und CGP hinzugegeben. Um die synaptische Transmitterfreisetzung durch ein spontanes Aktionspotential zu verhindern, wurde der spezifische Natriumkanalantagonist Tetrodotoxin (TTX; 1 µM) während der Messung der mIPSCs appliziert. Dadurch wurde sichergestellt, dass die gemessenen mIPSCs lediglich durch spontane Neurotransmitterfreisetzung aus der präsynaptischen Endigung hervorgerufen wurden. Verändert ein Pharmakon die Frequenz der mIPSCs, spricht das für eine Verminderung der präsynaptischen Vesikelfreisetzung und ist somit ein Indiz, dass die eingesetzte pharmakologische Substanz präsynaptische Effekte auslöst. Verändert sich hingegen isoliert die Amplitude, spricht man von einem postsynaptischen Effekt. Die Substanz wirkt direkt auf die Rezeptoren des postsynaptischen Neurons. Die mIPSCs wurden bei einem Haltestrom von -70 mV aufgezeichnet.

2.5 Verhaltensversuche

Ergänzend zu den elektrophysiologischen Experimenten der vorliegenden Arbeit wurden im Labor von PD Dr. Carsten Wotjak Verhaltensuntersuchungen durchgeführt.

2.5.1 Tiere

Männliche C57BL6/N (B6N, 7-8 Wochen alt, Charles River, Sulzfeld) Mäuse (n= 9-14 pro Gruppe) wurden einzeln gehalten, Futter und Wasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung, und die Tiere hatten vor Beginn der Verhaltensuntersuchung zwei Wochen Zeit, sich an einem veränderten Hell-Dunkel-Rhythmus (12:12 Stunden, Dunkelphase beginnend um 9 Uhr vormittags) zu gewöhnen. Alle Verhaltensuntersuchungen wurden während der aktiven Phase der Mäuse zwischen 9:30 und 17 Uhr durchgeführt.

2.5.2 Durchführung der Verhaltenstests

2.5.2.1 Furchtkonditionierung

An Tag null (Tag 0) wurde die Furchtkonditionierung der Tiere durchgeführt: Drei Minuten nach Einsetzen des jeweiligen Tieres in die Versuchsarena wurde für 20 ms ein Ton präsentiert (80 dB, 9 kHz Sinusoid mit 10 ms Anstieg und 10 ms Abfall). Beendet wurde dieser Ton gekoppelt mit einem 2 s lang anhaltenden elektrischen Schlag (0,7 mA) auf die Fußsohle der Tiere. 60 Sekunden später wurden die Tiere wieder zurück in ihren gewohnten Käfig gesetzt.

2.5.2.2 Extinktionstraining

Die Tiere wurden in diesem Versuchsaufbau in eine andere, zweite Versuchsarena gesetzt, die sich von der oben beschriebenen in Material, Form, Oberfläche und Geruch unterschied. Nach einer dreiminütigen Habituationsphase wurden die Mäuse mit einem 180 s langen Ton (80 dB, 9 kHz Sinusoid, permanenter Ton) konfrontiert. Auch hier wurden die Tiere 60 Sekunden später wieder zurück in ihren gewohnten Käfig gesetzt. Das Extinktionstraining wurde 24 h nach der oben beschriebenen Furchtkonditionierung (Tag 0) an Tag 1, 2, und 3 durchgeführt.

2.5.3 Analyse und Statistik der Verhaltenstests

Das Verhalten der Mäuse wurde per Videokamera aufgezeichnet und von einem geblindeten Beobachter ausgewertet (EVENTLOG, Robert Henderson, 1986). Angststarre wurde dabei definiert als das Fehlen jeglicher Bewegung.

Die Ergebnisse der Verhaltenstests wurden mit einfachen ANOVAs anhand von GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) ausgewertet. Newman-Keuls Test wurden als post hoc Test angewendet, falls zutreffend. Die Daten sind als Mittelwert und Standardfehler (SEM) angegeben. Das Signifikanzniveau war festgelegt auf $p < 0,05$.

2.5.4 Pharmazeutika und Experimentaufbau

SR57227 und Tropisetron wurde von Sigma-Aldrich (Jungferninseln, USA) erworben und in physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Rimonabant wurde freundlicherweise vom „Chemical Synthesis and Drug Supply Program“ des National Institute of Mental Health zur Verfügung gestellt.

Es wurden insgesamt zwei verschiedene Experimente durchgeführt: Im ersten Aufbau wurde der 5-HT₃-Rezeptor-Agonist SR57227 (1 oder 3 mg/kg) eine Stunde vor dem Extinktionstraining intraperitoneal (i.p.) in einem Volumen von 10 ml/kg injiziert. Im zweiten Aufbau wurde Rimonabant (3 mg/kg) in einer Trägerstofflösung (2,5 % DMSO und einem Tropfen Tween 80 pro 3 ml Kochsalzlösung) gelöst und jeweils eine Stunde vor jedem Extinktionstraining entweder alleine subkutan (s.c.) injiziert oder i.p. in Kombination mit Tropisetron (1 mg/kg) gegeben.

2.6 Auswertung und Statistik

Die Rezeptor-vermittelten Ströme wurden verstärkt, tiefpass gefiltert und dann digitalisiert. Für die Digitalisierung wurde eine Sampling-Frequenz von 9 kHz verwendet (ITC-16 Computer Interface, Instrutech Corp., Port Washington, USA). Aufgezeichnet wurden die Stromantworten mit der „HEKA Pulse“ Software (HEKA Pulse, Heka Elektronik, Lambrecht, Deutschland). Die Auswertung wurde mit der Software Igor Pro 5 (Wave Metrics, Lake Oswego, USA) durchgeführt.

Die Kommandospannung des Verstärkers wurde vor jeder elektrischen Stimulation für die Dauer von 200 ms um 10 mV gesenkt. Es handelt sich dabei um einen Testpuls. Dadurch wurde die Zelle hyperpolarisiert. Das hatte zur Folge, dass die Zellmembran umgeladen wurde. Dies ist als kapazitative Stromspitze in Abb. 13 zu erkennen. Der Testpuls ist wichtig, um während des Experimentes die Membraneigenschaften des Neurons (R_M , C_M) und damit die Qualität der Ganzzelleableitung nachvollziehen zu können. Nach der Stimulation des Neurons wurden die Amplitude des Stromflusses durch die Membran und der Zeitverlauf der Stromantwort (Deaktivierungskonstante, Ladungstransfer) ausgewertet.

Folgende Parameter wurden definiert:

Stromamplitude (peak):

Die maximale Auslenkung der Stromantwort wird durch die Stromamplitude beschrieben.

Ladungstransfer:

Den Ionenstrom, der fließt, während die Kanäle geöffnet sind, bezeichnet man als Ladungstransfer. Er entspricht der Fläche unter der Kurve, die bei der Stromantwort gebildet wird. Integriert man die Fläche, kann der Ladungstransfer bestimmt werden. Er wird in pAs angegeben.

Deaktivierungskonstante (τ ; Decay):

Die Deaktivierung wird mit einer Zeitkonstante τ (in ms) angegeben und beschreibt den Stromabfall. Die Zeitkonstante wird computergestützt mit einem Iterationsverfahren berechnet. Dabei wird eine auf einer Exponentialfunktion basierende Kurve der Messkurve solange angenähert, bis die Distanz zwischen den beiden Kurven so klein wie möglich ist. Mit der folgenden Kurve kann dann die Deaktivierungskonstante berechnet werden:

$$I(\tau) = I_0 \cdot 1/e$$

Bei Stromantworten, die durch GABA_A-Rezeptoren vermittelt werden, liegt ein biexponentieller Verlauf mit zwei Zeitkonstanten vor. Hierbei wird das Iterationsverfahren mit einer Biexponentialfunktion basierten Kurve berechnet.

Membranwiderstand (R_M):

Der Membranwiderstand bildet sich durch den Ohm'schen Widerstand der Zellmembran. Errechnet wird der Membranwiderstand aus der Stromdifferenz vor und nach der kapazitiven Stromspitze nach Auslösen des Testpulses. Sobald die Zellmembran vollständig vom Testpuls umgeladen ist, vergrößert sich der kapazitive Widerstand. Der Erhaltungsstrom (I_{offset}), der das eingestellte Potential gegenüber dem Bad aufrechterhalten soll, fließt nun durch den Membranwiderstand. Dieser kann durch die folgende Gleichung ermittelt werden:

$$R_m = U / I_{\text{offset}}$$

Voraussetzung dafür ist, dass der Serienwiderstand (R_S) so viel kleiner ist als der Membranwiderstand, dass R_S vernachlässigt werden kann.

Serienwiderstand (R_S):

Der Widerstand der Patchpipette sowie der Widerstand von Zellfragmenten, die die Patchpipettenöffnung ausfüllen, bilden den Serienwiderstand R_S . Während des Umladeprozesses hat der Kondensator einen vernachlässigbar geringen Widerstand. Dadurch wird der Membranwiderstand kurzgeschlossen, und es wirkt nur noch der R_S . Da während der Spannungsmessung mit dem dSEVC kein Strom injiziert wird ($I = 0$) und somit kein Spannungsteiler existiert, spielt R_S keine Rolle. Durch eine ausreichend große Spannungsquelle (15 V) wird eine korrekte Spannungsklemme des in dieser Arbeit abgeleiteten Neuronentyps gewährleistet (Polder und Swandulla, 2001).

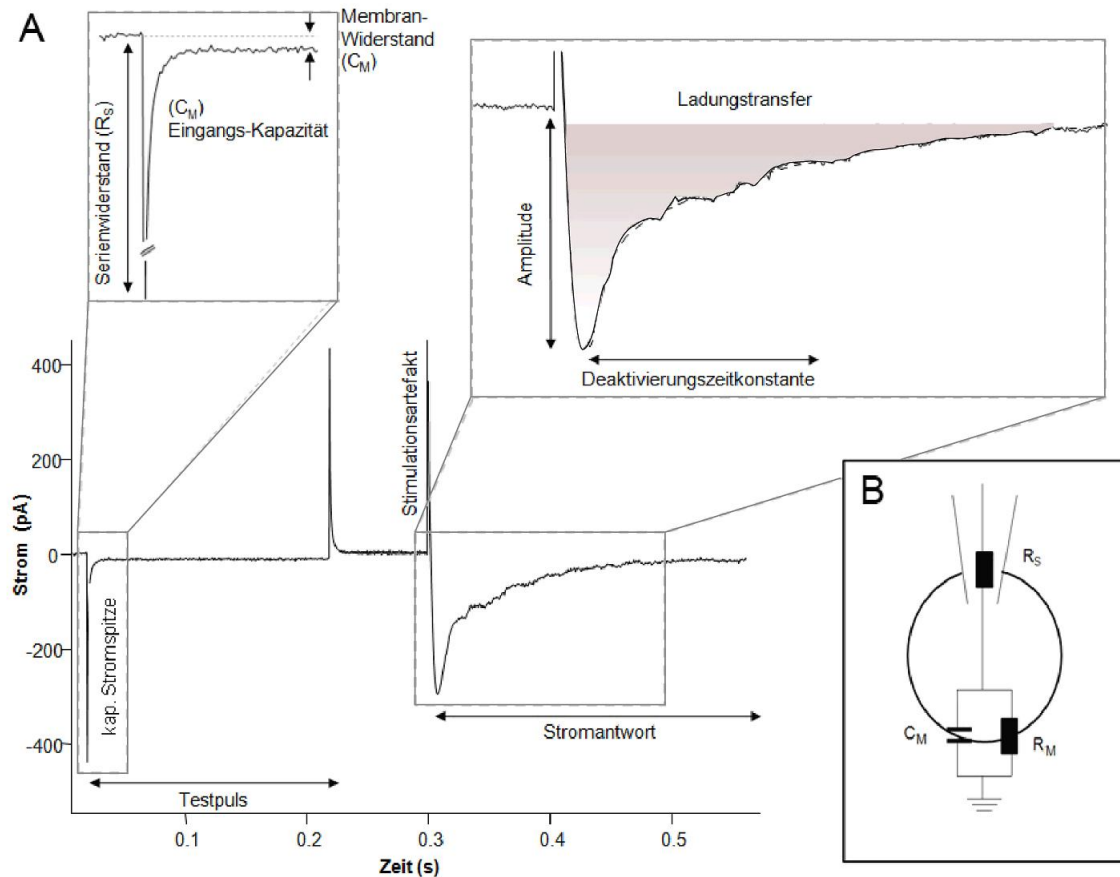


Abb. 13: Berechnung der Messgrößen aus dem abgeleiteten Stromzeitverlauf

A: Das Kommandopotential des Verstärkers wurde vor jeder Stimulation sprunghaft für die Dauer von 200 ms um 10 mV, dem sog. Testpuls, reduziert. Dies hat eine Umladung der Zellmembran zur Folge, die an den kapazitiven Stromspitzen sichtbar ist. Der Serienwiderstand (R_S) kann durch Bestimmung der Länge dieser kapazitiven Stromspitzen ermittelt werden. Der kapazitative Widerstand ist nach völliger Umladung der Zellmembran sehr hoch, so dass der Potentialerhaltungsstrom (I_{offset}) über den Membranwiderstand abfließt. Über die Bestimmung der Differenz zwischen dem Strom vor und nach Umladung der Zelle kann der I_{offset} bestimmt werden. Nach einer kurzen Latenzphase erfolgt die Stimulation. Die Stimulation der synaptischen Verbindung zum abgeleiteten Neuron führt folglich zur synaptischen Transmitterausschüttung und somit zum Ionenfluss durch die konsekutiv offenen ligandengesteuerten Ionenkanäle. Der Ionenfluss ist in der Abbildung als Stromantwort wiedergegeben. Die absolute Amplitude lässt sich anhand der dargestellten Stromantwort erkennen. Durch Annäherung einer auf einer Exponential- bzw. Biexponentialfunktion basierenden Kurve an die Messkurve ist die Berechnung der Deaktivierungszeitkonstante möglich. Der Ladungstransfer (in pAs) kann durch Integration der Fläche unterhalb der Stromantwort errechnet werden. **B:** Bildhafte Darstellung der Ganzzellableitung. In der Ganzzellableitung ist die Zelle mit dem Zellinneren leitend verbunden. Die Zellmembran stellt einen umladbaren Widerstand zwischen zwei leitenden Medien dar und hat somit die Eigenschaft eines Kondensators mit einer bestimmten Kapazität (C_M). Des Weiteren hat sie einen eigenen Widerstand (R_M ; Membranwiderstand), mit dem der Serienwiderstand (R_S) in Serie geschaltet ist. (S. Kratzer, 2012)

Um die einzelnen Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, wurden die letzten 5 Minuten, bevor eine pharmakologische Substanz appliziert bzw. ein LTDi induziert wurde, auf 1,0 normalisiert. Die Änderung der Amplitude wurde als relative

Veränderung zu diesen normalisierten Anfangswerten berechnet. Der ermittelte Wert entspricht der „relativen Amplitude“.

mIPSC wurden computergestützt mit dem Mini-Analysis Program 6.03. (Synaptosoft, New Jersey, USA) detektiert und danach visuell verifiziert. Anschließend wurden die mittlere Frequenz und die mittlere Amplitude der Ereignisse mit Hilfe der Gaußschen Verteilungskurve berechnet.

Die Zusammenfassung der Daten und die statistische Analyse erfolgten über Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA). Mit Hilfe des Student's t-Test für unabhängige und abhängige Daten wurden die Messwerte auf signifikante Unterschiede überprüft. Das Signifikanzniveau war festgelegt auf $p < 0,05$. In der vorliegenden Arbeit werden die Mittelwerte mit dem zugehörigen SEM („standard error of the mean“)-Wert angegeben.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die mögliche Interaktion des ECS mit dem 5-HT₃-Rezeptor in der Amygdala untersucht. Mit Hilfe elektrophysiologischer Methoden und Verhaltensversuchen soll die Bedeutung dieser Interaktion für die Modulation der GABAergen synaptischen Transmission und der Furchtkonditionierung erforscht werden.

3.1 Spielen 5-HT₃-Rezeptoren eine Rolle bei der Modulation der GABAergen Transmission in der BLA?

Um die Hypothese einer Interaktion zu bestätigen, wurde zunächst der Einfluss des 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten Ondansetron auf GABAerge eIPSCs mit Patch-Clamp Technik (siehe Kapitel 2.4.2) an Hirnschnittpräparaten in der BLA untersucht. Die Stimuluselektrode wurde in der LA gesetzt. Bei einem Haltepotential von -60 mV wurde in der BLA abgeleitet. Durch die Zugabe von N-methyl-D-aspartat (NMDA)-, GABA_B- und Glutamat-Rezeptorblocker (siehe Kapitel 2.4.2.3) wurde die Isolierung der eGABA_A-IPSCs gesichert. Die Zugabe von Ondansetron erfolgte, sobald die GABAergen eIPSCs bezüglich ihrer Amplitude und Kinetik mindestens zehn Minuten lang stabil waren. Diese Voruntersuchungen zeigten, dass Ondansetron die Amplitude von GABAergen eIPSCs in der BLA dosisabhängig ($IC_{50} = 12,9 \mu M$) vermindert (Abb. 14).

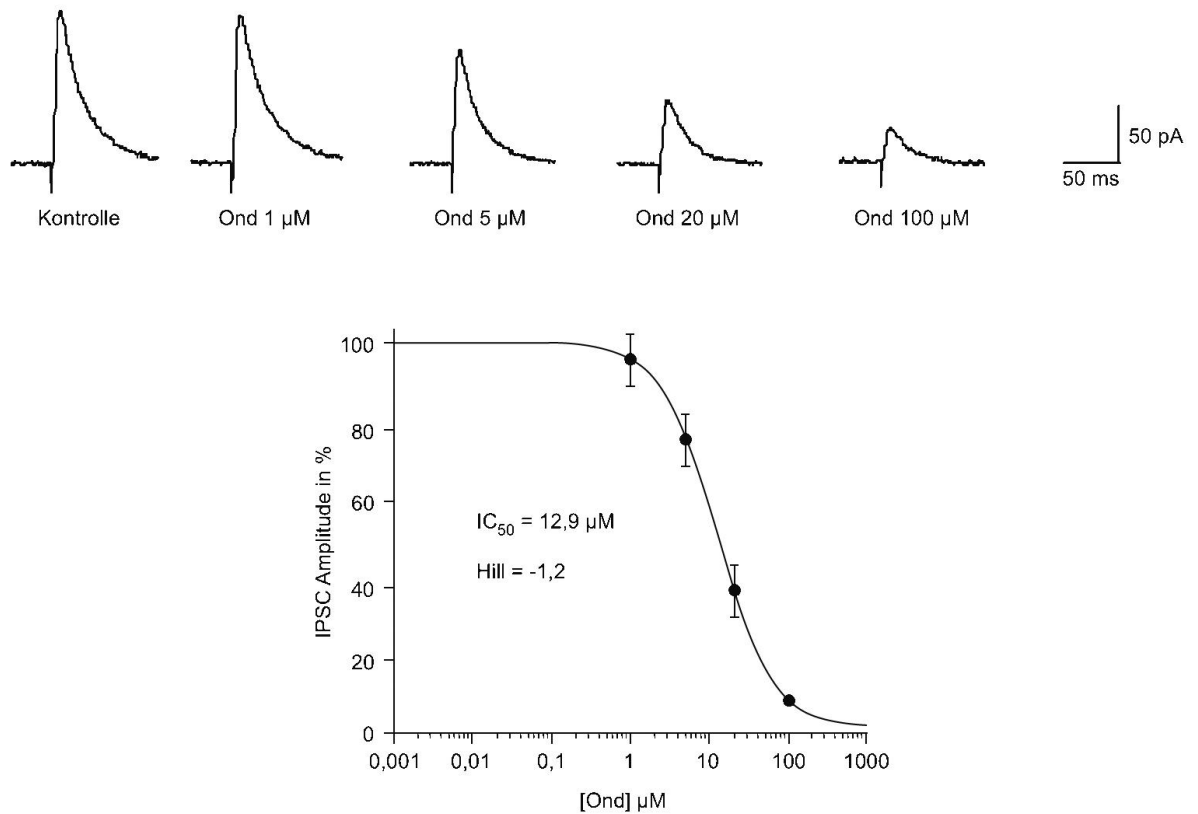


Abb. 14: 5-HT₃-Rezeptor-Antagonist Ondansetron reduziert dosisabhängig GABAerge eIPSCs

Mit der Patch-Clamp-Technik wurden an Hirnschnittpräparaten in der BLA GABAerge eIPSCs gemessen, die pharmakologisch mit spezifischen Rezeptorantagonisten, *D*-AP-5, NBQX und CGP 35348, isoliert wurden. Die Stimuluselektrode wurde in der LA gesetzt und bei einem Haltepotential von -60 mV in der BLA abgeleitet. Die repräsentativen Stromspuren kennzeichnen die dosisabhängige Abnahme der GABAergen eIPSCs, abgeleitet von Projektionsneuronen in der BLA, nach der Applizierung von Ondansetron. Die Dosis-Wirkungskurve zeigt, dass Ondansetron GABAerge eIPSCs in der BLA konzentrationsabhängig mit einem IC₅₀ von 12,9 µM hemmt. Die IPSCs wurden alle 15 s stimuliert, wobei vier IPSCs gemittelt wurden und einem Datenpunkt entsprechen. Die Ondansetronkonzentration ist in µM angegeben.

3.2 Besteht auf der Ebene der GABAergen synaptischen Transmission eine Interaktion zwischen ECS und 5-HT₃-Rezeptoren?

3.2.1 5-HT₃-Rezeptor Antagonist Ondansetron reduziert eGABA_A-IPSCs und pGABA_A-ICs

Aufgrund der in Kapitel 3.1 beschriebenen Ergebnisse sollte mit Hilfe der Laser-induzierten Photostimulation (siehe Punkt 2.3.2.3) überprüft werden, ob in der BLA die Ondansetron-vermittelte Inhibition der GABAergen eIPSCs über aktivierte 5-HT₃-Rezeptoren am präsynaptischen Neuron hervorgerufen wird. Während bei der Erzeugung der eIPSCs sowohl prä- als auch postsynaptische Mechanismen beteiligt sind, kann eine Laser-induzierte photolytische GABA-Freisetzung (pGABA-IPSCs) weitgehend unabhängig von Mechanismen der präsynaptischen Terminale erzielt werden (Dodt et al., 1999, Rammes et al., 2007). Werden nur die eGABA_A-IPSCs reduziert und die pGABA_A-ICs bleiben unverändert, weist dies auf einen präsynaptischen Effekt hin.

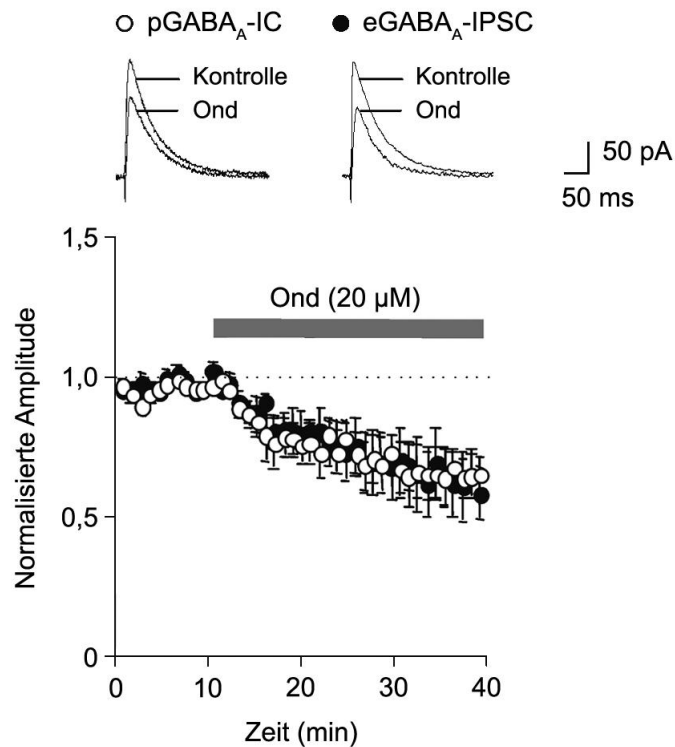


Abb. 15: 5-HT₃-Rezeptor Antagonist Ondansetron reduziert eGABA_A-IPSCs nicht über die Inhibition von 5-HT₃-Rezeptoren

Schematische Darstellung von Experimenten, in denen Rezeptorströme alternierend durch elektrische Stimulation und photolytische GABA-Freisetzung hervorgerufen wurden. Ondansetron (20 μM) bewirkt eine Abnahme der eGABA_A-IPSCs (66,3±11,3 %; n=7; p<0,05) und gleichzeitig die Abnahme der pGABA_A-IC (67,5±8,7 %; n=7; p<0,05). Die IPSCs wurden alle 30 s alternierend stimuliert, wobei zwei IPSCs gemittelt wurden und einem Datenpunkt entsprechen. Repräsentative Stromspuren sind dargestellt. Weiße Kreise repräsentieren pGABA_A-ICs und schwarze Kreise eGABA_A-IPSCs. pGABA_A-ICs wurden durch die Spaltung von caged GABA hervorgerufen.

Das Experiment zeigt, dass der 5-HT₃-Rezeptor-Antagonist Ondansetron (20 μM) sowohl die eGABA_A-IPSCs als auch die pGABA_A-ICs reduziert (Abb. 15).

3.2.2 Tropisetron (50 nM) reduziert eGABA_A-IPSCs ohne direkten Antagonismus an GABA_A-Rezeptoren

Im Gegensatz zu Ondansetron (IC₅₀=12,9 μM) ist Tropisetron (IC₅₀=470 nM, Peters et al., 1993) ein potenterer 5-HT₃-Antagonist. Mit Hilfe der Laser-induzierten

Photostimulation soll getestet werden, ob Tropisetron eGABA_A-IPSCs über 5-HT₃-Rezeptoren am präsynaptischen Neuron reduziert.

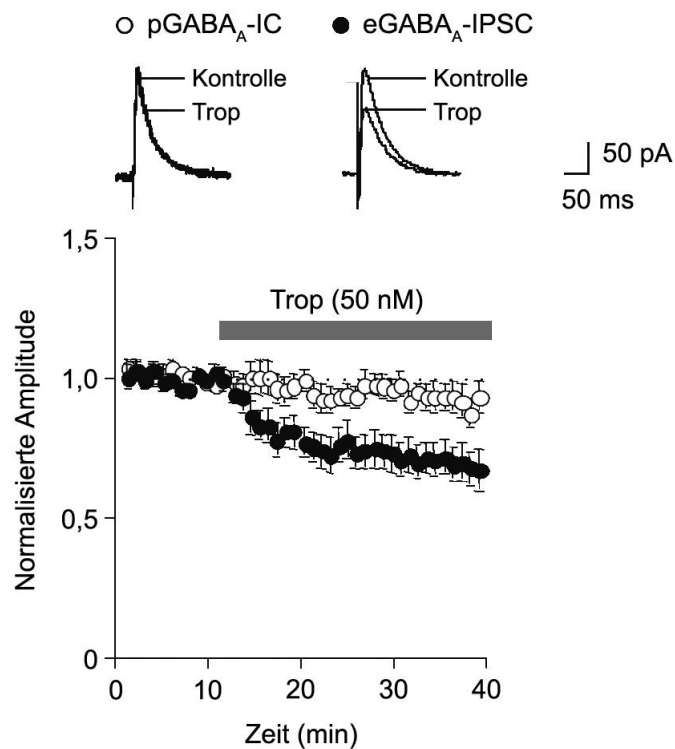


Abb. 16: 5-HT₃-Rezeptor Antagonist Tropisetron reduziert eGABA_A-IPSCs ohne direkten Einfluss auf pGABA_A-ICs

Schematische Darstellung von Experimenten, in denen Rezeptorströme alternierend durch elektrische Stimulation und photolytische GABA-Freisetzung erzeugt wurden. Tropisetron (50 nM) bewirkt eine Abnahme der eGABA_A-IPSCs ($71 \pm 7,1$ %; $n=8$; $p < 0,05$), ohne gleichzeitig die pGABA_A-IC ($96,3 \pm 5,5$ %; $n=8$; $p > 0,05$) zu beeinflussen. Die IPSCs wurden alle 30 s stimuliert, wobei zwei IPSCs gemittelt wurden und einem Datenpunkt entsprechen. Repräsentative Stromspuren sind dargestellt. Weiße Kreise repräsentieren pGABA_A-ICs und schwarze Kreise eGABA_A-IPSCs. pGABA_A-ICs wurden durch die Spaltung von caged GABA hervorgerufen.

Tropisetron (50 nM) führte zu einer signifikanten Reduktion der eGABA_A-IPSCs ($71 \pm 7,1$ %; $n=8$; $p < 0,05$; Abb. 16), zeigte jedoch keinen Effekt auf pGABA_A-ICs ($96,3 \pm 5,5$ %; $n=8$; $p > 0,05$; Abb. 16).

3.2.3 Tropisetron (50 nM) reduziert eGABA_A-IPSCs über den nikotinergen Acetylcholin (nAch)-Rezeptor

Da bekannt ist, dass Tropisetron auch ein partieller Agonist an der α_7 -UE des nAch-Rezeptors und ein $\alpha_3\beta_4$ - sowie ein $\alpha_2\beta_4$ -nAch-Rezeptor-Antagonist ist (Papke et al., 2005), wurde im folgenden Experiment untersucht, ob die Pharmakologie von Tropisetron für eine Modulation der eGABA_A-IPSCs durch den α_7 -nAch- und nicht den 5-HT₃-Rezeptor spricht. Da eine längere Aktivierung des nAch-Rezeptors eine schnelle Desensibilisierung hervorruft, führt die ständige Präsenz eines Agonisten zu einer Antagonisierung. Demnach müsste die Applikation des α_7 -UE selektiven Antagonisten Methyllycaconitin (MLA 1nM) den gleichen Effekt auf die eIPSCs-Amplitude zeigen wie Tropisetron.

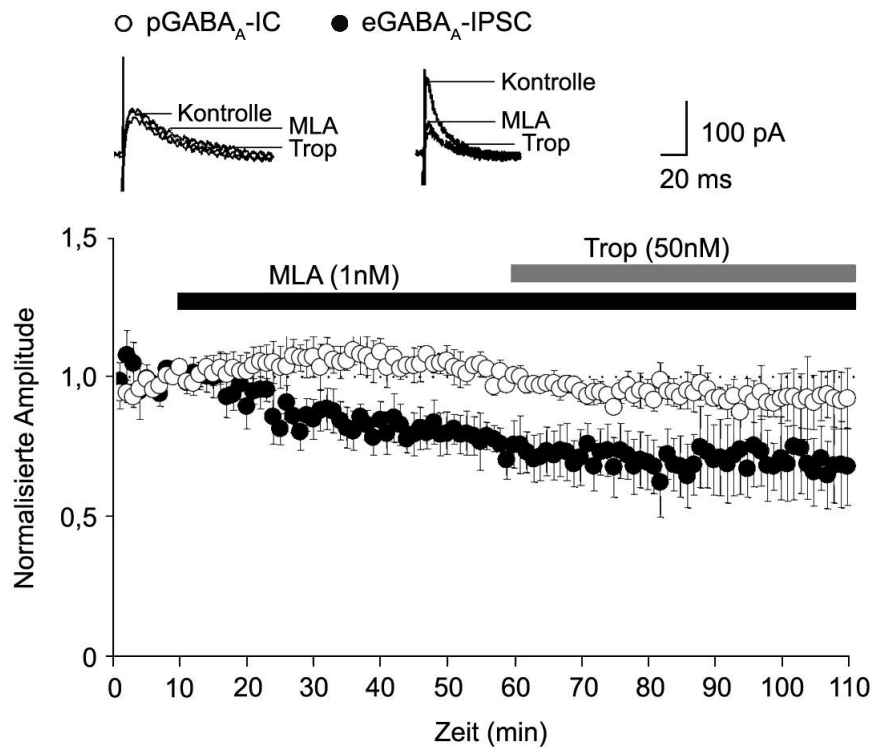


Abb. 17: Die Reduktion der eGABA_A-IPSCs ist abhängig von dem α₇-nAch-Rezeptor

Schematische Darstellung von Experimenten, in denen Rezeptorströme alternierend durch elektrische Stimulation und photolytischer GABA-Freisetzung erzeugt wurden. Der α₇-UE selektive Antagonist Methyllycaconitin (MLA; 1 nM) reduzierte signifikant die eGABA_A-IPSC Amplitude (76±0,1 %; n=4; p<0,05), ohne gleichzeitig die pGABA_A-ICs (96±1 %; n=4; p>0,05) zu beeinflussen. Die darauffolgende Gabe von Tropisetron (50 nM) reduzierte die eGABA_A-IPSCs nicht mehr weiter (66±1 %; n=4; p>0,05) und deutet somit auf eine gemeinsame pharmakologische Wirkung beider Substanzen hin. Die IPSCs wurden alle 30 s alternierend stimuliert, wobei zwei IPSCs gemittelt wurden und einem Datenpunkt entsprechen. Repräsentative Stromspuren sind dargestellt. Weiße Kreise repräsentieren pGABA_A-ICs und schwarze Kreise eGABA_A-IPSCs. pGABA_A-ICs wurden durch die Spaltung von caged GABA hervorgerufen.

Der α₇-UE selektive Antagonist MLA reduzierte signifikant eGABA_A-IPSCs (76±0,1 %; n=4; p<0,05; Abb. 17). Tropisetron konnte keine zusätzliche Reduktion der eGABA_A-IPSCs herbeiführen (96±1 %; n=4; p>0,05; Abb. 17). Bei beiden Substanzen zeigte sich kein Effekt auf pGABA_A-ICs.

3.2.4 mIPSCs

Um festzustellen, ob der in Kapitel 3.2.2 beschriebene Effekt prä- oder postsynaptisch ist, wurden im folgenden Versuch mIPSCs (siehe Punkt 2.3.2.3) aufgenommen. Damit

die mIPSCs isoliert aufgezeichnet werden konnten, wurden die NMDA- und die Glutamat-Rezeptoren pharmakologisch antagonisiert. Eine synaptische Transmitter-Freisetzung durch ein spontanes AKP wurde durch die Applikation von TTX (1 μ M) verhindert. Verändert sich nach der Zugabe von Tropisetron die Frequenz der mIPSCs, spricht dies für einen präsynaptischen Effekt, verändert sich hingegen die Amplitude, ist dies ein Beweis für einen postsynaptischen Effekt.

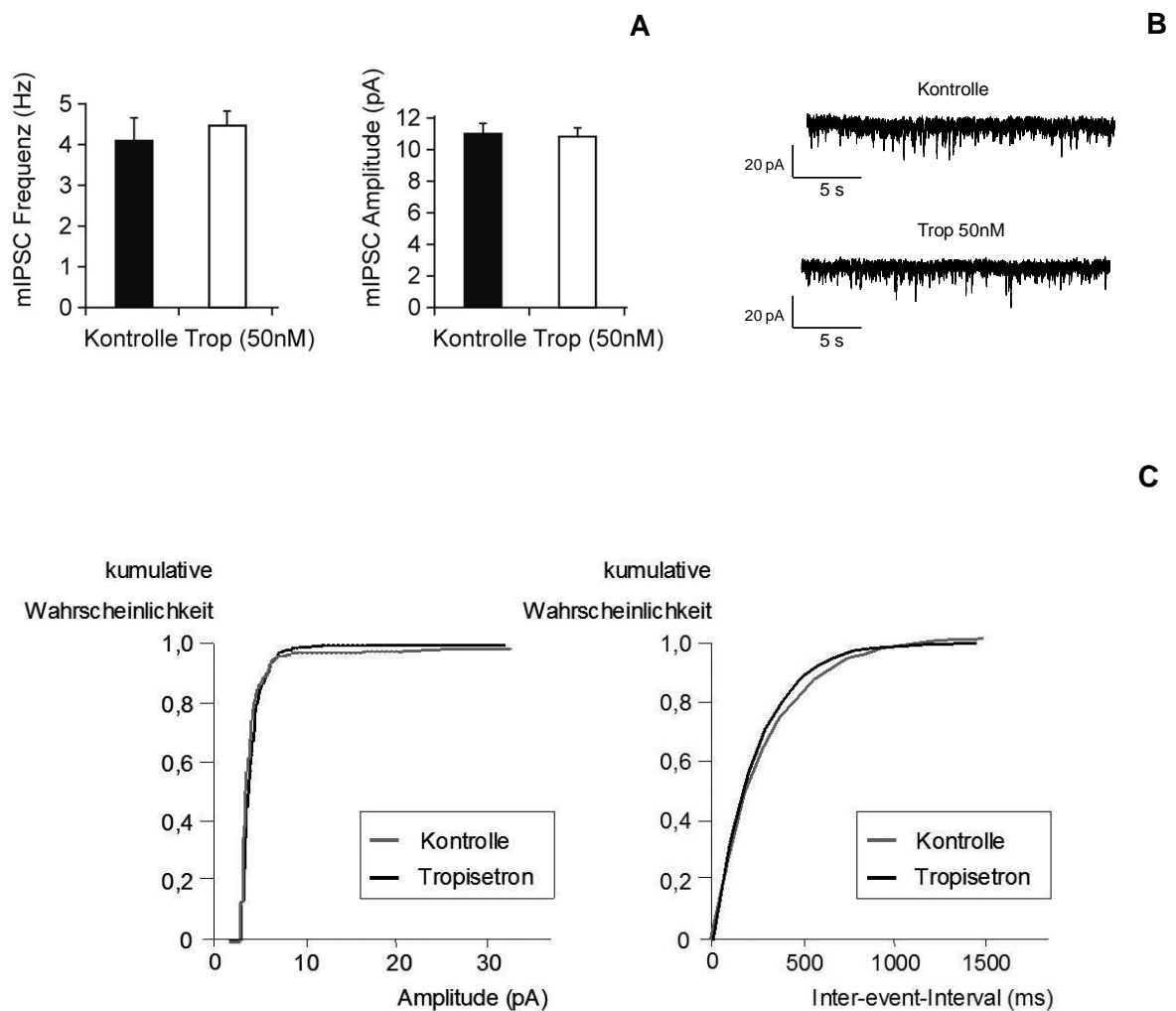


Abb. 18: 5-HT₃-Rezeptor Antagonist Tropisetron verändert in Gegenwart von TTX weder die Frequenz noch die Amplitude von mIPSCs

A) Balkendiagramm für den Effekt von Tropisetron (50 nM) auf Frequenz (Kontrolle: 4,2±0,3 Hz vs. Tropisetron: 4,5±0,3 Hz; n=6; p>0,05) und Amplitude (Kontrolle: 11,2±1,1 pA vs. Tropisetron; 10,8±0,9 pA; n=6; p>0,05) der mIPSCs. Weder die Frequenz noch die Amplitude verändert sich signifikant nach der Gabe von Tropisetron. B) Repräsentative Ströme von spontanen mIPSCs. C) Kumulative Verteilung der Amplitude und des Inter-event-Intervals eines Experiments.

Weder die Frequenz noch die Amplitude verändert sich nach der Gabe von Tropisetron (Abb. 18). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass vorgeschaltete cholinerge Synapsen die Reduktion der Amplitude von IPSCs vermitteln.

3.3 Sind 5-HT₃-Rezeptoren an der Kontrolle von Cannabinoid-vermittelter synaptischer Aktivität (LTDi) beteiligt?

Es konnte gezeigt werden, dass eine definierte niederfrequente afferente Reizung (1 Hz/900 Pulse und 1 Hz/100 Pulse) in der BLA über präsynaptische Mechanismen eine anhaltende Abnahme der synaptischen Transmission, eine sog. LTD (Rammes et al., 2000, 2001) und eine LTDi (Azad et al., 2004), induziert. Da nach Zugabe des GABA_A-Rezeptor-Antagonisten Picotoxin LTD und LTDi vollständig blockiert werden konnten, deuten die Ergebnisse dieser Experimente darauf hin, dass bei diesen beiden Effekten vorgeschaltete GABAerge Interneurone eine wichtige Funktion haben.

3.3.1 5-HT₃-Rezeptoren haben keinen Einfluss auf die Induktion von LTDi

Es wird vermutet, dass LTDi in der BLA eine wichtige zelluläre Komponente bei der Extinktion von furchtkonditionierten Gedächtnisinhalten darstellt (Marsicano et al., 2002; Azad et al., 2004). Im folgenden Experiment soll geklärt werden, ob eine 5-HT₃-Rezeptor Inhibierung oder Aktivierung die Induktion von LTDi beeinflusst. Eine niederfrequente afferente Reizung (1 Hz/100 Pulse) konnte in der BLA LTDi auslösen (48±6 %; n=7; p<0,05; Abb. 19). Die Vorbehandlung der Hirnschnittpräparate mit Tropisetron hatte keinen signifikanten Effekt auf die Induktion von LTDi (53±9 %; n=7; p<0,05; Abb. 19). Die kombinierte Zugabe von Tropisetron (50 nM) und Rimonabant (5 µM), einem CB1-Rezeptor Antagonist, unterdrückte die Induktion von LTDi (96±0,6 %; n=6; p>0,05; Abb. 19).

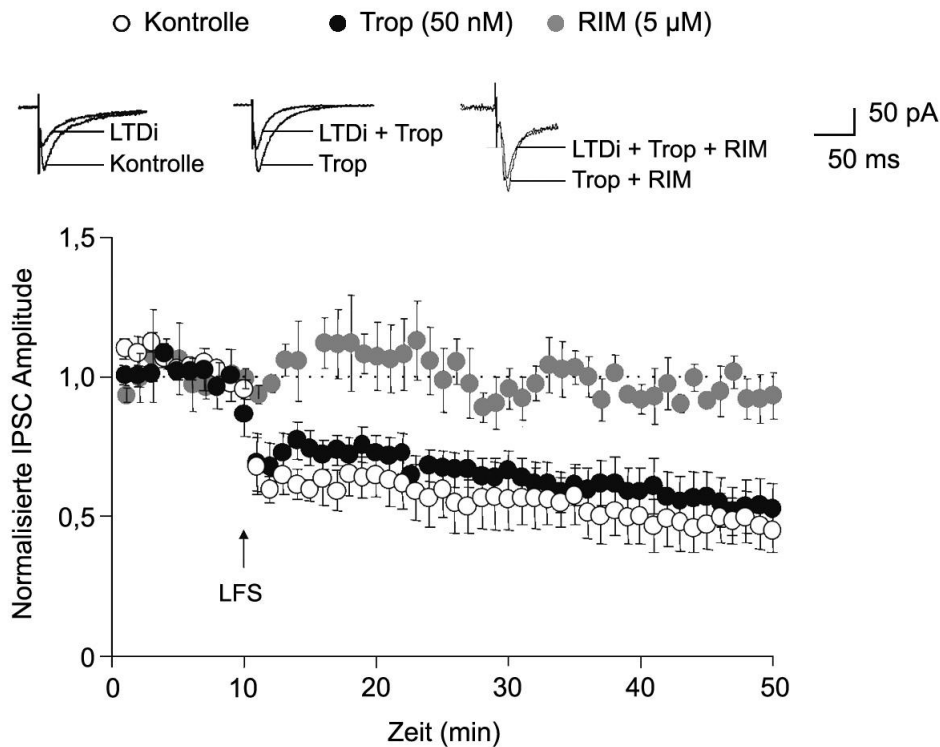


Abb. 19: 5-HT₃-Rezeptor Antagonist Tropisetron hat keinen Einfluss auf die Induktion von LTDi

Unter Kontrollbedingungen führte eine niederfrequente afferente Reizung (1 Hz/100 Pulse) in der BLA zu LTDi (48 ± 6 %; $n=7$; $p < 0,05$). Tropisetron (50 nM) hatte keinen Einfluss auf die Endocannabinoid-abhängige LTDi evozierter IPSCs (53 ± 9 %; $n=7$; $p < 0,05$). Die gemeinsame Gabe von Tropisetron und dem CB1-Rezeptor-Antagonist Rimonabant (RIM; 5 μM) unterdrückte die Induktion von LTDi ($96 \pm 0,6$ %; $n=6$; $p > 0,05$). Die IPSCs wurden alle 15 s alternierend stimuliert, wobei vier IPSCs gemittelt wurden und einem Datenpunkt entsprechen. Repräsentative Stromspuren sind dargestellt. Weiße Kreise repräsentieren die Kontrolle, schwarze Kreise Tropisetron und graue Kreise die gemeinsame Gabe von Tropisetron und Rimonabant.

Die Kontrollgruppe zeigt, dass eine niederfrequente afferente Reizung (1 Hz/100 Pulse) in der BLA LTDi auslöst (59 ± 5 %; $n=6$; $p < 0,05$; Abb. 20). Als die Hirnschnittpräparate mit dem 5-HT₃-Rezeptor-Agonisten SR57227 (10 μM) kurz vor und während der Auslösung von LTDi behandelt wurden, um eine Desensibilisierung zu verhindern, hatte dies keinen Effekt auf die Induktion von LTDi (63 ± 11 %; $n=6$; $p < 0,05$; Abb. 20). Die eGABA_A-IPSCs zeigten keinen signifikanten Unterschied zu der Kontrollgruppe (59 ± 5 %; $n=5$; $p < 0,05$; Abb. 20).

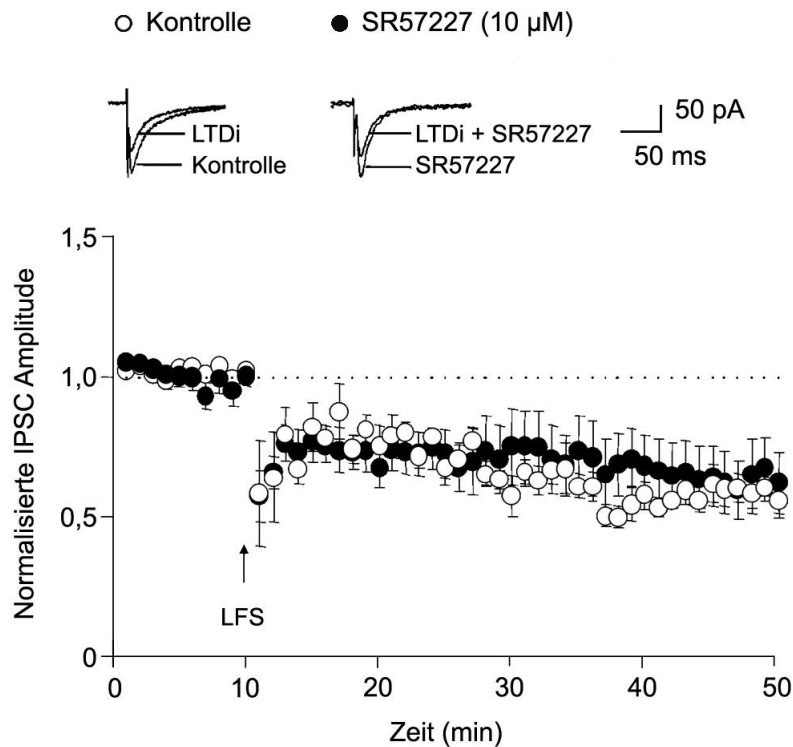


Abb. 20: 5-HT₃-Rezeptor Agonist SR57227 hat keinen Einfluss auf die Induktion von LTDi

Die Kontrollgruppe zeigt, dass eine niederfrequente afferente Reizung (1 Hz/100 Pulse) in der BLA LTDi auslöst ($59 \pm 5\%$; $n=6$; $p < 0.05$). Der 5-HT₃-Rezeptor-Agonist SR57227 (10 μ M) hatte keinen Einfluss auf die Induktion von LTDi ($63 \pm 11\%$; $n=6$; $p < 0,05$). Um eine Desensibilisierung der 5-HT₃-Rezeptoren zu vermeiden, wurde SR57227 nur kurz vor und während der 1 Hz Stimulation (100 Pulse; LFS) ins Bad appliziert. Die IPSCs wurden alle 15 s alternierend stimuliert, wobei vier IPSCs gemittelt wurden und einem Datenpunkt entsprechen. Repräsentative Stromspuren sind dargestellt. Weiße Kreise repräsentieren die Kontrolle und schwarze Kreise SR57227.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass weder die Inhibition noch die Aktivierung von 5-HT₃-Rezeptoren Einfluss auf die Endocannabinoid-abhängige synaptische Plastizität nehmen.

3.4 Welche Bedeutung hat der 5-HT₃-Rezeptor für Akquisition und Extinktion furchtbezogener Gedächtnisinhalte in Verhaltensuntersuchungen?

Ergänzend zu den Experimenten, beschrieben in Kapitel 3.3.1, wurde im Labor von PD Dr. Wotjak an Mäusen *in vivo* untersucht, inwiefern 5-HT₃-Rezeptoren Einfluss auf die

Akquisition und Extinktion furchtbezogener Gedächtnisinhalte nehmen. Die Tiere wurden einer Furchtkonditionierung unterzogen, gefolgt von einem dreitägigen Extinktionstraining (siehe Punkt 2.5). Jeweils eine Stunde vor dem Extinktionstraining wurde den Tieren eine pharmakologische Substanz, SR57227, Rimonabant oder Rimonabant mit Tropisetron, gespritzt.

3.4.1 Die Aktivierung von 5-HT₃-Rezeptoren dämpft die Extinktion

Nach auditorischer Furchtkonditionierung an pharmakologisch behandelten C57/Bl6 Mäusen sollte der Einfluss des serotonergen Systems auf die Akquisition und die Extinktion von Gedächtnisinhalten untersucht werden. Einfaktorielle ANOVAs zeigen nur an Tag 3 einen Effekt nach der Behandlung mit SR57227 ($F_{2,38}=5,51$, $p<0,01$; Abb. 21 A). Die Erstarrungsrate an Tag 1 ($F_{2,38}=0,34$, $p=n.s$) und 2 ($F_{2,38}=0,69$, $p=n.s$) war für alle drei Gruppen gleich (Abb. 21 A). Die Placebo Gruppe zeigte eine Extinktion des Furchtgedächtnisses und die Gruppe, die mit SR57227 (1 mg/kg) behandelt wurde zeigte lediglich eine Dämpfung der Extinktion. Zudem ergab der Post Hoc Test, dass die Gruppe mit der höchsten Dosierung SR57227 (3 mg/kg) an Tag 3 im Vergleich zur Placebo-Gruppe eine verstärkte Angstantwort gezeigt hat ($p<0,05$; Abb. 21 B).

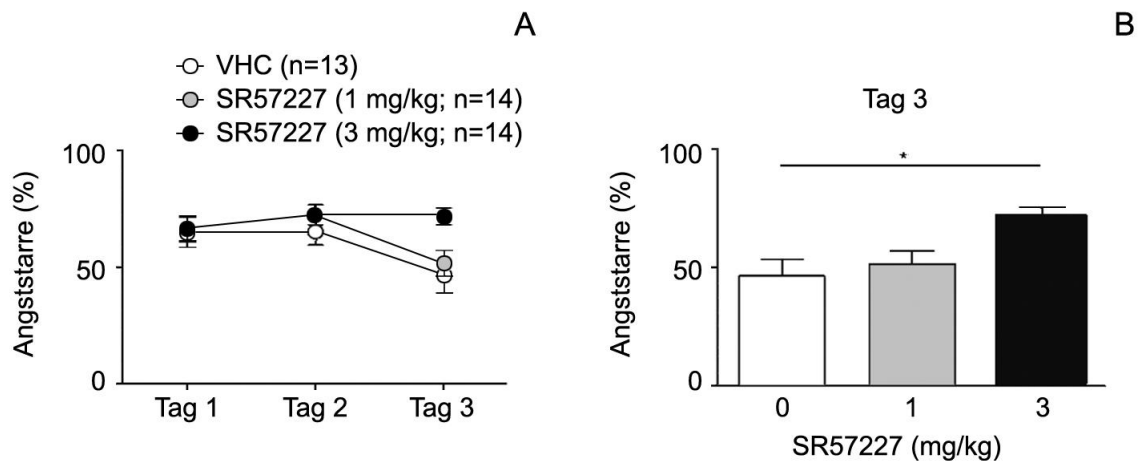


Abb. 21: In Verhaltensuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass 5-HT₃-Rezeptoren die Extinktion dämpfen

Einfaktorielle ANOVAs zeigen den Haupteffekt der Behandlung mit SR57227 nur an Tag 3 des Extinktionstrainings ($F_{2,38}=5,51$, $p<0,01$; Abb.: 21 A). Für Tag 1 ($F_{2,38}=0,34$, $p=n.s.$; Abb. 21 A) und Tag 2 ($F_{2,38}=0,69$, $p=n.s.$; Abb. 21 A) ergibt sich kein Effekt. Post Hoc Tests haben zudem ergeben, dass die Gruppe mit der höchsten Dosierung SR57227 (3 mg/kg) an Tag 3 im Vergleich zur Placebo-Gruppe eine verstärkte Angst-Antwort gezeigt hat ($p<0,05$; Abb. 21 B).

Diese Ergebnisse demonstrieren eine gedämpfte Extinktion, wenn 5-HT₃-Rezeptoren aktiviert werden. Die Akquisition wird nicht durch die 5-HT₃-Rezeptoren beeinflusst.

3.4.2 Die pharmakologische Modifikation von 5-HT₃-Rezeptoren beeinflusst nicht die Extinktion aversiver Gedächtnisinhalte

Aufgrund der unter Punkt 3.4.1 beschriebenen Ergebnisse sollte eine mögliche Interaktion des ECS mit 5-HT₃-Rezeptoren bei der Regulation von Extinktion eruiert werden. Einfaktorielle ANOVAs zeigen an allen 3 Tagen einen Effekt der Tropisetron und Rimonabant Behandlung auf das Extinktionstraining (Tag 1: $F_{3,48}=29,687$, $p<0,001$; Tag 2: $F_{3,48}=8,48$, $p<0,001$; Tag 3: $F_{3,48}=12,11$, $p<0,001$; Abb. 22 A). Post Hoc Tests haben ergeben, dass Tropisetron an Tag 1 die Extinktion beschleunigte (1 mg/kg i.p.; $p<0,001$; Abb. 22 B) und dass die ausschließliche Gabe von Rimonabant (3 mg/kg i.p.; $p<0,001$; Abb. 22 B) wie die gemeinsame Gabe von Rimonabant und Tropisetron ($p<0,001$; Abb. 22 B) die Extinktion inhibieren. An Tag 2 führt lediglich die alleinige Gabe von Rimonabant, verglichen zur Kontrollgruppe, zu einer verstärkten Angstantwort (3 mg/kg i.p.; $p<0,05$; Abb. 22 C). An Tag 3 verstärkte die gemeinsame

Gabe von Tropisetron und Rimonabant (1 mg/kg und 3 mg/kg i.p; $p < 0,05$; Abb. 22 D) wie die ausschließliche Behandlung mit Rimonabant (3 mg/kg i.p; $p < 0,001$; Abb. 22 D) die Angstantwort.

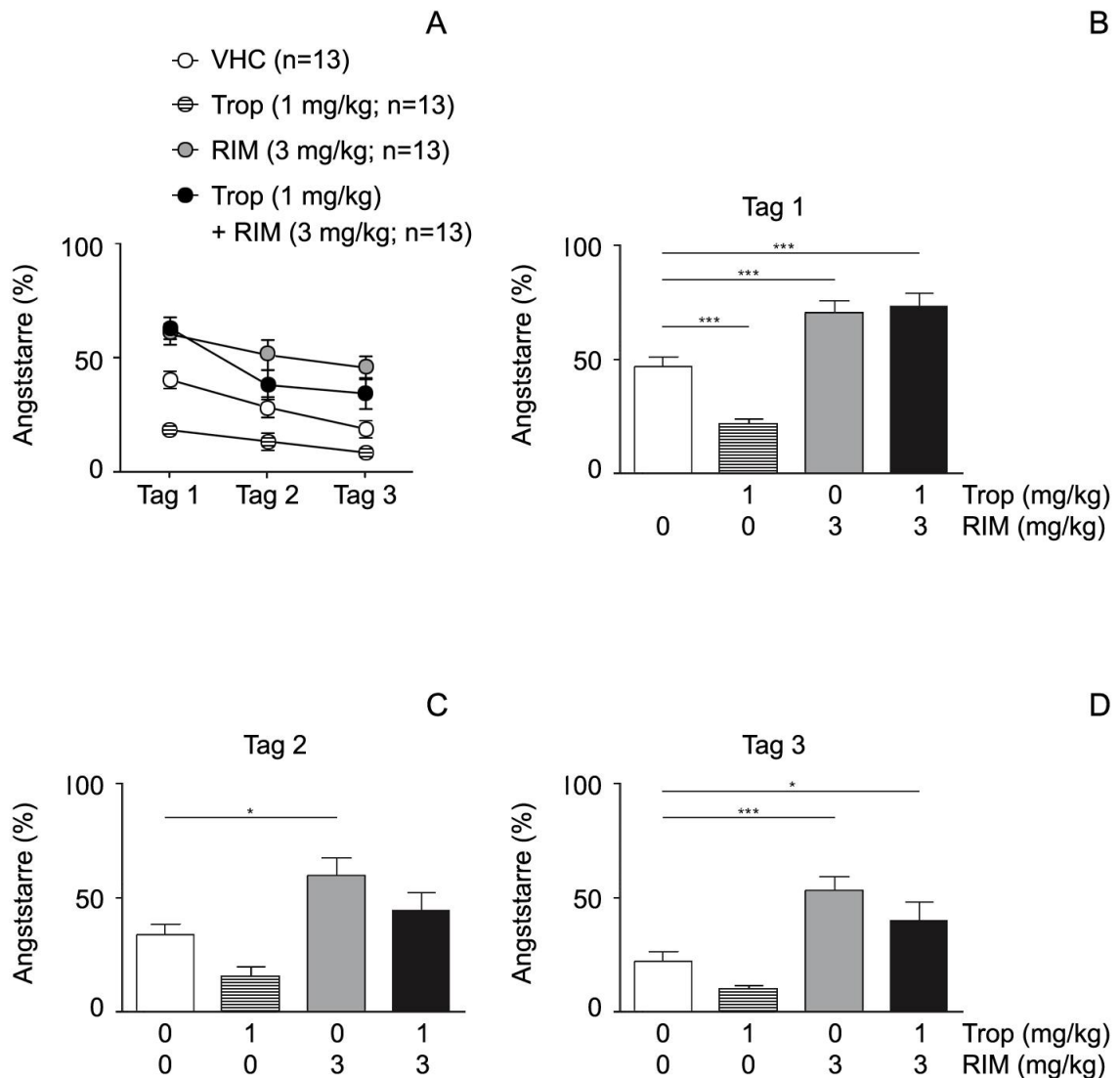


Abb. 22: Die pharmakologische Modifikation von 5-HT₃-Rezeptoren beeinflusst nicht die Extinktion aversiver Gedächtnisinhalte

Einfaktorielle ANOVAs zeigen einen Effekt der Tropisetron und Rimonabant Behandlung auf das Extinktionstraining: Tag 1: $F_{3,48}=29,687$, $p < 0,001$, Abb. 22 A; Tag 2: $F_{3,48}=8,48$, $p < 0,001$, Abb. 22 A; Tag 3: $F_{3,48}=12,11$, $p < 0,001$, Abb. 22 A. Post Hoc Tests haben zudem ergeben, dass an Tag 1 die Gabe von Tropisetron die Extinktion beschleunigte ($p < 0,001$; Abb. 22 B), die ausschließliche Gabe von Rimonabant, wie die gemeinsame Gabe von Rimonabant und Tropisetron, die Extinktion inhibierte (RIM: $p < 0,001$; RIM+Trop: $p < 0,001$; Abb. 22 B). An Tag 2 verstärkte die alleinige Gabe von Rimonabant, verglichen zur Kontrollgruppe, die Angstreaktion ($p < 0,05$; Abb. 22 C). An Tag 3 verstärkte die Gabe von Rimonabant, bzw. Rimonabant in Kombination mit Tropisetron, die Angstreaktion der Tiere (RIM: $p < 0,001$; RIM+Trop: $p < 0,05$; Abb. 22 D).

Diese Ergebnisse zeigen, dass 5-HT₃-Rezeptoren an der Modulation von Extinktion beteiligt sind und dass das ECS diese Modulation dominiert. Eine Interaktion von 5-HT₃-Rezeptoren und dem ECS konnte in diesem Verhaltensparadigma allerdings nicht festgestellt werden.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine mögliche Interaktion des ECS mit dem 5-HT₃-Rezeptor in der Amygdala elektrophysiologisch *in vitro* wie auch mit Verhaltensversuchen *in vivo* zu untersuchen. In *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass 5-HT₃-Rezeptoren in der BLA weder an der Modulation der GABAergen Transmission noch an der Kontrolle von Cannabinoid-vermittelter synaptischer Plastizität (LTDi) beteiligt sind. Ondansetron und Tropisetron reduzierten eGABA_A-IPCSs in der BLA unabhängig vom 5-HT₃-Rezeptor. Die Reduktion der eGABA_A-IPCSs durch Tropisetron entstand vermutlich über die Antagonisierung des α_7 -nACh-Rezeptors. Die Ergebnisse der Verhaltensversuche deuten darauf hin, dass 5-HT₃-Rezeptoren die Extinktion aversiver Gedächtnisinhalte modulieren, diese Modulation aber vom ECS dominiert wird. Die erhobenen Daten sprechen dafür, dass dem 5-HT₃-Rezeptor auf der Ebene der GABAergen synaptischen Transmission in der BLA eher eine geringe Rolle zukommt. Dies würde die fehlende Interaktion zwischen ECS und 5-HT₃-Rezeptoren möglicherweise erklären.

4.1 Einfluss von 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten auf die Modulation der GABAergen Transmission in der BLA

Mehrfach konnte gezeigt werden, dass Endocannabinoide einen hemmenden Einfluss auf exzitatorische (Hajos et al., 2000; Robbe et al., 2001) und inhibitorische (Katona et al., 2001; Hoffman und Lupica, 2000, 2001) Neurotransmitter haben. In der Amygdala wurden dabei immunhistochemisch CB1-Rezeptoren hauptsächlich auf GABAergen Interneuronen nachgewiesen (Katona et al., 2001). In der LA führt eine Aktivierung von CB1-Rezeptoren allerdings zu einer Inhibition der glutamatergen und GABAergen synaptischen Transmission (Azad et al., 2003). Neben CB1-Rezeptoren werden auch die serotonergen 5-HT₃-Rezeptoren auf den Interneuronen der BLA exprimiert (Steward et al., 1993, Mascagni et al., 2007). Das serotonerge System ist, ähnlich dem ECS, an zahlreichen physiologischen Vorgängen beteiligt. So kontrolliert es

Verhaltensantworten und beeinflusst emotionale Zustände, wie zum Beispiel Angst, Aggression und Hunger, oder Analgesie (Lucki, 1998; Linthorst, 2005). Es liegen Studien vor, die darauf hindeuten, dass eine funktionale Interaktion zwischen ECS und serotonerger System (Evertova et al., 1998, 2003; Moldrich and Wenger, 2000; Häring et al., 2007; Hill et al., 2006), vor allem in der Neurotransmission der 5-HT₃-Rezeptoren (Freund 2003; Mikics et al., 2009) vorliegen könnte. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung präsynaptischer 5-HT₃-Rezeptoren in der BLA die spontane GABAerge synaptische Transmission kurzzeitig steigern kann (Koyama et al., 2000). Man vermutet, dass die 5-HT₃-Neurotransmission einen wichtigen Mechanismus darstellt, über den Cannabinoide Angst regulieren (Freund 2003). Dies lässt eine mögliche Interaktion zwischen ECS und 5-HT₃-Rezeptor vermuten.

In der vorliegenden Arbeit reduzierte der 5-HT₃-Rezeptor-Antagonist Ondansetron dosis-abhängig die IPSC-Amplitude in der BLA mit einem IC₅₀ von 12,9 µM (Abb. 14).

Allerdings antagonisiert Ondansetron 5-HT₃-Rezeptoren mit hoher Affinität (IC₅₀ 570 nM; Peters et al., 1993) und der errechnete IC₅₀ für eine Inhibition an GABA_A-IPSCs erscheint deshalb zu hoch, um tatsächlich über eine 5-HT₃-vermittelte Wirkung verursacht zu sein. Es stellte sich nun die Frage, ob präsynaptische 5-HT₃-Rezeptoren zu dieser Ondansetron-vermittelten Inhibition der IPSCs in der BLA führen oder ob Ondansetron über einen direkten Antagonismus an postsynaptischen GABA_A-Rezeptoren wirkt. Während bei elektrisch evozierten Stromantworten sowohl prä- als auch postsynaptische Mechanismen beteiligt sind, werden durch Laser-induzierte photolytische GABA-Freisetzung hervorgerufene Ströme weitgehend unabhängig von Mechanismen der präsynaptischen Terminale ausgelöst (Dodt et al., 1999; Rammes et al., 2007). eGABA_A-IPSCs und pGABA_A-ICs wurden gleichermaßen durch Ondansetron reduziert. Dies spricht eher für einen direkten Antagonismus an GABA_A-Rezeptoren und gegen eine 5-HT₃-Rezeptor-induzierte Modulation der inhibitorischen synaptischen Transmission in der BLA. Tatsächlich konnte auch an frisch dissoziierten hippocampalen und hypothalamischen Neuronen eine Inhibition von GABA-evozierten Strömen durch Ondansetron gezeigt werden (Ye et al., 1997). Ondansetron wurde hierbei in einem ähnlichen Konzentrationsbereich appliziert und die IC₅₀ lag, abhängig von der GABA-Konzentration, bei 7 bzw. 28 µM.

Interessanterweise zeigten geringere Konzentrationen Ondansetron (1 μM ; Abb. 14) keine Wirkung auf GABA-IPSCs. Gleichzeitig werden 5-HT₃-Rezeptoren in diesem Konzentrationsbereich aber antagonisiert. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine Blockade von 5-HT₃-Rezeptoren die GABAerge synaptische Transmission in der BLA nicht moduliert.

Jedoch konnten Koyama und Kollegen, mit Hilfe der sog. „Nystatin-perforierenden-Patch-Clamp Technik“, die GABAerge synaptische Transmission durch 5-HT₃-Rezeptoren in der Amygdala von Ratten verstärken (Koyama et al., 2000). Es wird vermutet, dass die Applikation von 5-HT₃-Rezeptor-Agonisten schnell zu einer Desensibilisierung führt (van Hooft et al., 1998). Wird jedoch das Intervall zwischen den Applikationen groß genug gesetzt, kommt es zu einer vollkommenen Reaktivierungsfähigkeit des 5-HT₃-Rezeptors (Boddeke et al., 1996). Die Gabe des 5-HT₃-Rezeptor-Agonisten CPBG (1 μM) erhöhte die Frequenz von GABAergen mIPSCs. Dieser Effekt konnte durch die Applikation des 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten Tropisetron (30 nM) inhibiert werden (Koyama et al., 2000). Der Widerspruch der beiden Ergebnisse könnte in den unterschiedlichen Methoden liegen. Koyama und Kollegen führten ihre Experimente an akut dissoziierten BLA Neuronen durch. Diese Methode könnte zu einer Reorganisation von Synapsen und den zugehörigen Rezeptoren führen, die im Vergleich zum naiven Zustand verändert ist. 5-HT₃-Rezeptoren könnten sich präsynaptisch dort ausbilden, wo sie im naiven Zustand nicht vorzufinden waren. Ein weiterer Unterschied liegt in der Spezies: Koyama et al. setzten Ratten für ihre Experimente ein, in der vorliegenden Arbeit wurden hingegen Mäuse verwendet. In Verhaltensversuchen konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Spezies gegensätzliche Resultate hervorbringen können (Mikics et al., 2009). Die Applikation des potenteren 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten Tropisetron (IC₅₀ von 460 nM; Peters et al., 1993) bewirkte in der vorliegenden Studie eine Abnahme der eGABA_A-IPSCs bei unveränderten pGABA_A-ICs (Abb. 16). Dies deutet darauf hin, dass Tropisetron keine direkte Wirkung auf GABA_A-Rezeptoren hat. Da die Experimente mit Ondansetron eine Modulation durch 5-HT₃-Rezeptoren ausschließen, sind möglicherweise andere ionotrope Rezeptoren verantwortlich für die Tropisetron-vermittelte Inhibition der IPSCs in der BLA. Tropisetron wirkt auch als partieller Agonist an der α_7 -UE des nACh-Rezeptors und als Antagonist an $\alpha_3\beta_4$ - und $\alpha_4\beta_2$ -UE der nACh-Rezeptoren (Macor et al., 2001; Papke et al., 2005). Somit könnte die Inhibition der

IPSCs durch Tropisetron auch über den α_7 -nAch-Rezeptor vermittelt sein. Tatsächlich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der α_7 -UE selektiver Antagonist Methyllycaconitin den gleichen Effekt auf die eIPSCs-Amplitude zeigt wie Tropisetron (Abb. 16).

4.2 Auf Ebene der GABAergen synaptischen Transmission besteht keine Interaktion zwischen ECS und 5-HT₃-Rezeptoren

Es wird vermutet, dass eine längere Aktivierung von nAch-Rezeptoren eine schnelle Desensibilisierung hervorruft, und somit die ständige Präsenz eines Agonisten paradoxerweise zu einer Antagonisierung führen könnte (Quick et al., 2002; Gentry et al., 2002; Reitstetter et al., 1999). Somit würden der Agonist gleichwie der Antagonist einen inhibierenden Effekt bewirken. Eine Inhibition des nAch-Rezeptors würde dann zu einer Reduktion der IPSC Amplitude in der BLA führen.

Um den synaptischen Wirkungsort von Tropisetron zu untersuchen, wurden mIPSCs aufgezeichnet. Eine Änderung der Frequenz der Ereignisse spräche dabei für einen präsynaptischen Wirkungsort von Tropisetron, eine Änderung der mIPSC Amplitude hingegen für einen postsynaptischen Wirkungsort. Es zeigte sich allerdings, dass Tropisetron in Gegenwart des Natriumkanalantagonisten TTX keinen Einfluss auf Frequenz oder Amplitude der mIPSCs hat (Abb. 18) und somit nicht die GABAerge synaptische Transmission über die Inhibition von 5-HT₃-Rezeptoren beeinflusst. Da bekannt ist, dass Tropisetron auch ein partieller Agonist des α_7 -nAch-Rezeptors ist (Papke et al., 2005), könnte Tropisetron eine Modulation der IPSCs durch den α_7 -nAch-Rezeptor, und nicht durch den 5-HT₃-Rezeptor hervorrufen. Dies lässt vermuten, dass die Reduktion der eGABA_A-IPCS Amplitude in der BLA über eine vorgeschaltete cholinerge Synapse vermittelt wird (Abb. 23). Tropisetron bindet an α_7 -nAch-Rezeptoren einer cholinergen Synapse (Macor et al., 2000), die dem GABAergen Interneuron vorgeschaltet zu sein scheint. Diese α_7 -nAch-Rezeptorblockade durch Tropisetron vermindert die Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter durch das cholinerge Neuron (Quick et al., 2002), wodurch die GABA-Ausschüttung durch das nachgeschaltete GABAerge Interneuron inhibiert wird. Über diesen Mechanismus kann

die Reduktion der IPSC-Amplitude im Projektionsneuron der BLA erklärt werden. Diese Ergebnisse lassen eine direkte Beeinflussung der inhibitorischen synaptischen Transmission durch 5-HT₃-Rezeptoren in der BLA, und somit eine Interaktion zwischen ECS und 5-HT₃-Rezeptoren, unwahrscheinlich erscheinen. Studien zeigen, dass Endocannabinoide die α_7 -Rezeptor-vermittelte synaptische Transmission inhibieren können (Oz et al., 2003, 2004). Außerdem konnte festgestellt werden, dass die systematische Applikation von selektiven α_7 -nACh-Rezeptor Antagonisten das substanzbedingte Verhalten und den neurochemischen Effekt von Cannabinoiden unterdrückt (Solinas et al., 2007). Mittels *in situ* Hybridisierung konnte eine Ko-Lokalisation der mRNA von α_7 -nACh- und CB1-Rezeptor auf GABAergen Interneuronen festgestellt werden (Morales et al., 2008). Dies deutet daraufhin, dass sich die inhibitorische Wirkung von Tropicam auf eGABA_A-IPSCs auf eine Antagonisierung von α_7 -nACh Rezeptoren zurückführen lässt. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Beeinflussung der GABAergen synaptischen Transmission durch 5-HT₃-Rezeptoren in der BLA unwahrscheinlich ist und eher die α_7 -nACh-Rezeptoren eine Rolle spielen. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um diese Zusammenhänge abschließend zu klären.

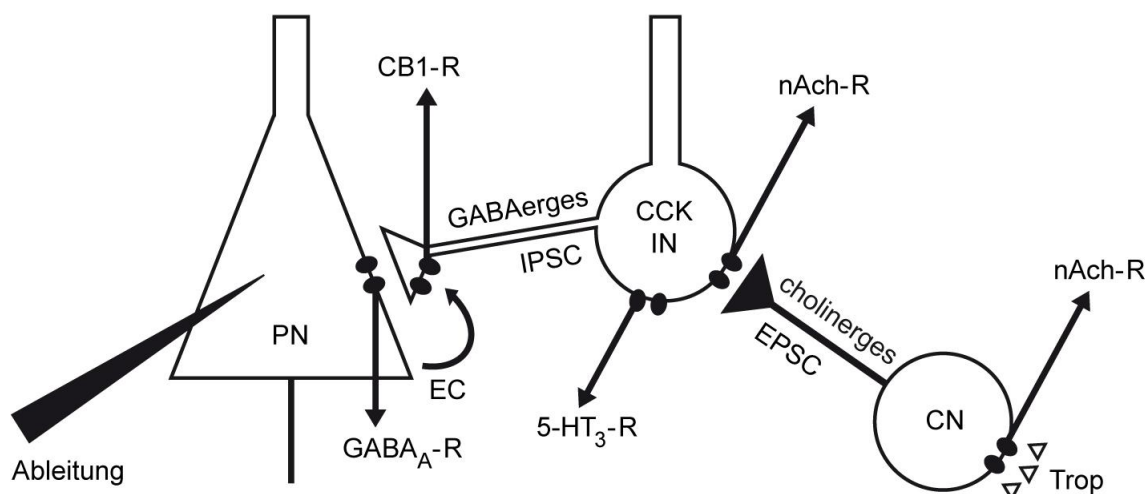


Abb. 23: Schematische Darstellung: Tropisetron, ein partieller Agonist des α_7 -nACh-Rezeptor, moduliert IPSCs in der Amygdala über den α_7 -nACh-Rezeptor

Tropisetron bindet an den α_7 -nACh-Rezeptor (**nACh-R**), der postsynaptisch auf einem cholinergen Neuron (**CN**) lokalisiert ist, das dem Cholezystokin-in-beinhaltenen GABAergen Interneuron (**CCK-IN**) vorgeschaltet ist. Die Blockierung des α_7 -nACh-Rezeptors durch Tropisetron hat eine reduzierte Neurotransmitter-Freisetzung zur Folge. Dies führt zu einer geringeren GABA-Ausschüttung durch die nachgeschalteten CCK-beinhaltenen GABAergen Interneurone. Über diesen Mechanismus kommt es zu einer Reduktion der IPSC-Amplitude in der BLA. **5-HT₃-R**: 5-HT₃-Rezeptor; **GABA_A-R**: GABA_A-Rezeptor; **EC**: Endocannabinoide; **PN**: Projektionsneuron; **Trop**: Tropisetron (verändert nach Freund, 2003 und Mikics et al., 2009).

4.3 Einfluss der 5-HT₃-Rezeptoren auf die Kontrolle von Cannabinoid-vermittelter synaptischer Aktivität (LTDi)

Endocannabinoide sind in verschiedenen Hirnregionen an der Entstehung von synaptischer Plastizität wie LTD (Heifets et al., 2009), LTDi (Rammes et al., 2000, 2001; Azad et al., 2004), DSI (Kreitzer et al., 2002) und iLTD (McMahon und Kauer, 1997; Chevaleyre und Costillo, 2003) beteiligt. Da in der Amygdala eine sehr hohe Dichte an CB1-Rezeptoren exprimiert wird (Marsicano und Lutz, 1999) und der Amygdala eine wichtige Rolle bei der Angstverarbeitung zukommt (Martin et al., 1999; Marsicano et al., 2002), erscheint das ECS für die Akquisition und Extinktion von konditionierten aversiven Gedächtnisinhalten wichtig zu sein (Marsicano et al., 2002). Elektrophysiologische Untersuchungen in der BLA zeigten, dass LTDi von einer Endocannabinoid-Ausschüttung abhängig ist (Azad et al., 2004) und dieser Vorgang ein möglicher Bestandteil der Extinktion furchtkonditionierter Gedächtnisinhalte ist

(Marsicano et al., 2002). Die detaillierten zellulären Mechanismen sind dabei noch unklar. Ebenso wie das ECS spielt das serotonerge System eine wichtige Rolle bei der Angstverarbeitung (Olivier et al., 2000). Es wird vermutet, dass serotonerge Fasern aus den Raphe Kernen in die BLA ziehen und dort über 5-HT₃-Rezeptoren die GABA-Ausschüttung erhöhen. Dieser Effekt wiederum wird über Endocannabinoide retrograd kontrolliert (Abb.6) (Freund, 2003). Mittels *in situ* Hybridisierung wurde eine Kollokalisation der mRNA von CB1- und 5-HT₃-Rezeptoren auf GABAergen Interneuronen der Amygdala festgestellt (Herman et al., 2002). Darüber hinaus können Endocannabinoide über eine allosterische Bindungsstelle 5-HT₃-Rezeptoren inhibieren (Barran et al., 2002). Somit ist eine Interaktion zwischen ECS und 5-HT₃-Rezeptor in der BLA möglich. Da Verhaltensversuche (Marsicano et al., 2002) und elektrophysiologische Experimente (Azad et al., 2004) zeigen konnten, dass LTDi abhängig von der Endocannabinoid-Ausschüttung ist, eignet sich LTDi gut, um eine mögliche Interaktion zwischen dem ECS und 5-HT₃-Rezeptoren zu untersuchen.

In dieser Arbeit beeinflussten weder der 5-HT₃-Rezeptor-Antagonist Tropicsetron (50 nM; Abb. 19) noch der 5-HT₃-Rezeptor-Agonist SR57227 (10 µM; Abb. 20) die Induktion von LTDi. Um eine Desensibilisierung der 5-HT₃-Rezeptoren durch den 5-HT₃-Rezeptor-Agonist SR57227 zu vermeiden, wurde SR57227 (10 µM) nur kurz vor und während der LTDi Induktion appliziert. Somit scheinen 5-HT₃-Rezeptoren bei der Modulation von LTDi keine Rolle zu spielen. Diese Ergebnisse werden durch die durchgeführten Verhaltensversuche (siehe Punkt 4.4) unterstützt.

4.4 Die Aktivierung von 5-HT₃-Rezeptoren inhibiert die Extinktion

Die auditive Furchtkonditionierung wird größtenteils über die Amygdala vermittelt (McKernan and Shinnik-Gallagher, 1997; LeDoux, 2000; Walker and Davis, 2002). In Verhaltensversuchen konnte gezeigt werden, dass die Akquisition und die Konsolidierung aversiver Gedächtnisinhalte unabhängig vom ECS stattfindet (Marsicano et al., 2002), ihre Extinktion jedoch vom ECS kontrolliert wird (Marsicano et al., 2002). Bisher ist allerdings unbekannt, welche genauen zellulären Mechanismen dieser Kontrolle unterliegen. Auch der 5-HT₃-Rezeptor spielt eine wichtige Rolle bei der

Modulation von Gedächtnisvorgängen (Jockische et al., 2005; Meneses et al., 1999) und psychiatrischen Erkrankungen (Jockische et al., 2005; Frank et al., 2004; Melke et al., 2003). Es ist bekannt, dass Cannabinoide 5-HT₃-Rezeptoren blockieren (Fan, 1995) und dass die pharmakologische Aktivität des Endocannabinoids Anandamid teilweise über 5-HT-Rezeptoren vermittelt werden kann (Kimura et al., 1998). Diese Beobachtungen führten zu den Annahmen, dass der 5-HT₃-Rezeptor eine Bindungsstelle für Cannabinoide besitzt oder dass eine kooperative Interaktion zwischen CB1- und 5-HT₃-Rezeptor besteht (Hermann et al., 2002). Tatsächlich zeigten Barran et al., dass Endocannabinoide über eine allosterische Bindungsstelle die Funktion von 5-HT₃-Rezeptoren inhibieren können (Barran et al., 2002). Somit ist auf der Ebene der Verarbeitung von aversiven Gedächtnisinhalten eine Interaktion von 5-HT₃-Rezeptoren und dem ECS sehr wahrscheinlich. Eine erhöhte GABA-Ausschüttung kann Angst reduzieren (Davidson et al., 2002), und auf GABAergen Interneuronen in der BLA werden 5-HT₃-Rezeptoren exprimiert, wo sie die GABA-Freisetzung modulieren (Mascagni und McDonald, 2007). Da auf Interneuronen in der BLA auch CB1-Rezeptoren exprimiert werden (Katona et al., 2001), könnte die 5-HT₃-Rezeptorvermittelte GABA-Freisetzung über CB1-Rezeptoren kontrolliert werden. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte belegt werden, dass die Aktivierung von 5-HT₃-Rezeptoren zu einer erhöhten GABA-Freisetzung führt, was wiederum Angst reduzieren konnte, wobei dieser angst-reduzierende Effekt durch CB1-Rezeptoren abgeschwächt wird (Mikics et al., 2009). In CB1-Rezeptor-*knock-out* Mäusen konnten Mikics und Kollegen eine Dämpfung des angstreduzierenden Effektes nicht beobachten.

Parallel zu den *in vitro* Experimenten wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Bedeutung des 5-HT₃-Rezeptors für Akquisition und Extinktion furchtbezogener Gedächtnisinhalte *in vivo* in C57/Bl6 Mäusen untersucht. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Akquisition der aversiven Gedächtnisinhalte nicht durch den 5-HT₃-Rezeptor-Agonist SR57227 (1 mg/kg i.p.; 3 mg/kg i.p.; Abb. 21) beeinflusst wird. Die Aktivierung der 5-HT₃-Rezeptoren mit dem Agonisten SR57227 (1 mg/kg i.p.; Abb. 21) dämpft lediglich tendenziell die Extinktion. Eine höhere Konzentration des 5-HT₃-Rezeptor-Agonisten SR57227 (3 mg/kg i.p.; Abb. 21) dagegen erhöht die Angststarre

und inhibiert somit die Extinktion. Dies wiederum steht im Widerspruch zu dem Befund von Mikics et al., in deren Untersuchung beschrieben wurde, dass die Aktivierung von 5-HT₃-Rezeptoren Angst reduzieren kann (Mikics et al., 2009). In dieser Studie wurden CB1^{-/-}-Mäuse mit dem 5-HT₃-Rezeptor-Agonisten mCPBG (0, 1, 3 und 10 mg/kg i.p.) behandelt. Sowohl im „plus maze“ als auch im „open field“ Verhaltenstests zeigten die CB1^{-/-}-Mäuse ein angstreduziertes Verhalten. Die Tatsache, dass im „plus maze“ wie auch im „open field“ Verhaltenstest keine Lernprozesse benötigt werden, im Gegensatz zur Extinktion furchtbezogener Gedächtnisinhalte (Barad et al., 2006), könnte die widersprüchlichen Befunde erklären.

Mikics et al. folgerten aus ihren Befunden, dass die Aktivierung der 5-HT₃-Rezeptoren einen angstlösenden Effekt hat und dass dieser Effekt über CB1-Rezeptoren gedämpft wird. In CD1^{+/+}-Mäusen hatte der 5-HT₃-Rezeptor-Agonist keinen Effekt (Mikics et al., 2009). Jedoch zeigen Experimente im Tiermodell mit dem 5-HT₃-Rezeptor-Agonisten widersprüchliche Befunde (Costall et al., 1988; Eguchi et al., 2001). Die für die Experimente verwendeten unterschiedlichen Methoden (unterschiedliche 5-HT₃-Rezeptor-Agonisten und verschiedene Mauslinien) könnten die gegensätzlichen Befunde ebenso erklären wie die Tatsache, dass 5-HT₃-Rezeptoren schnell desensibilisieren (Van Hooft et al., 1998). So kann der 5-HT₃-Rezeptor-Agonist, je nach Anwendungszeit, als 5-HT₃-Rezeptor-Antagonist wirken.

Bei der Verarbeitung von Angst haben Cannabinoide, in Menschen und Versuchstieren, oftmals komplexe und widersprüchliche Effekte. Sowohl im Menschen (Ashton et al., 1981) als auch im Tiermodell (Sanuda-Pena et al., 2000) konnte gezeigt werden, dass abhängig von der Dosis die Wirkung von Cannabinoiden bidirektional sein kann. Eine niedrige Dosis THC wirkte angstlösend (Berrendero und Maldonado, 2002), eine hohe Dosis THC wiederum angstfördernd (Onaivi, 1990). Des Weiteren deuten tierexperimentelle Studien daraufhin hin, dass für den Cannabinoid-vermittelten Effekt auf Emotionen vor allem die Umweltfaktoren im Vordergrund stehen (Lutz, 2007). Unterschiedliche Verhaltenstests können demnach zu unterschiedlichen Befunden führen. Man hat festgestellt, dass der „elevated plus-maze“ Test und der „social-interaction“ Test zwei verschiedene Formen von Angst ermittelt (File, 1992). Im „elevated plus-maze“ führte eine niedrige Dosis des CB1-Rezeptor-Agonisten CP 55-940 zu einer Reduktion der Angstreaktion (Genn et al., 2004b). Diese Reaktion konnte

im „social-interaction“ Test nicht reproduziert werden (Genn et al., 2004a). Es wird vermutet, dass das ECS, je nach Ausprägung und Stadium der Angst, ganz unterschiedliche neuronale Schaltkreise im Gehirn aktiviert (Viveros et al., 2005). Ratten, die chronischem Stress ausgesetzt wurden, zeigten eine verstärkte Cannabinoid-vermittelte Angstreaktion (Hill und Gorzalka, 2004). Dieser Effekt konnte auch im Menschen beobachtet werden (Viveros, 2005). Es wird deshalb vermutet, dass, abhängig vom Signalweg, die entsprechenden Verhaltensantworten unterschiedlich stark abgerufen werden (Steiner und Lutz, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde die Extinktion furchtbezogener Gedächtnisinhalte untersucht. Die Extinktion beschreibt einen Lernprozess, für den die BLA unabdingbar ist (Barad et al., 2006).

4.5 Die pharmakologische Modifikation von 5-HT₃- und CB1-Rezeptoren zeigt keine gegenseitige Beeinflussung der Extinktion aversiver Gedächtnisinhalte

Sowohl im Tiermodell als auch am Menschen konnte gezeigt werden, dass 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten in geringen Dosierungen eine angstlösende Wirkung haben können. Diese anxiolytische Wirkung wurde für Ondansetron (Costall et al., 1987 a) sowie Granisetron, Bemesetron und Tropisetron (Kilpatrick et al., 1990) beschrieben. Jedoch gibt es auch Daten, die diese anxiolytische Wirkung in Frage stellen (Olivier et al., 2000). Um zu dokumentieren, inwieweit 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten angstlösend wirken können, haben sich furchtkonditionierte Verhaltensparadigmen am besten bewährt (Olivier et al., 2000). In diesen Experimenten konnte festgehalten werden, dass 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten in einer sehr geringen Dosis einen angstlösenden Effekt haben. Vor allem Tropisetron zeigte eine zuverlässige Wirkung (Gleeson et al., 1989; Colpaert und Koek, 1991; Artaiz et al., 1995). Aber auch im Rahmen der furchtkonditionierten Verhaltensparadigmen gibt es Studien, die keinen Effekt durch 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten zeigen konnten (Jones et al., 1988; Dunn et al., 1991; Higgins et al., 1991). Ähnliches gilt für unkonditionierte Verhaltenstests, wie z.B. den „elevated plus-maze“ Test. Costall et al. beschreiben einen angstlösenden Effekt für

die 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten Odansetron und Tropisetron im „elevated plus-maze“ (Costall et al., 1989 a, 1989 b, 1993). Seine Ergebnisse werden durch weitere Experimente mit 5-HT₃-Rezeptor Antagonisten im „elevated plus-maze“ belegt (Dunn et al., 1991; Sivestre et al., 1996). Bisher ist aber nicht geklärt, ob dieser anxiolytische Effekt über eine erhöhte GABA-Ausschüttung vermittelt wird. Es wird vermutet, dass die 5-HT₃-Rezeptor-vermittelte serotonerge Neurotransmitter-Ausschüttung einen wichtigen Mechanismus für die Cannabinoid-induzierte Angstreaktion darstellt (Freund et al., 2003). Man geht davon aus, dass die 5-HT₃-Rezeptor-vermittelte GABA-Ausschüttung von CB1-Rezeptoren kontrolliert wird (Bodor et al., 2005). Mikics et al. konnten zeigen, dass eine 5-HT₃-Rezeptor Aktivierung einen angstlösenden Effekt hat und dass dieser Effekt über CB1-Rezeptoren gedämpft werden kann (Mikics et al., 2009). Jedoch sind die pharmakologischen (Olivier et al., 1998, 2000), genetischen (Harrel und Allan, 2003; Bhatnagar et al., 2004a, b) und elektrophysiologischen (Koyama et al., 2000) Befunde bezüglich des Einflusses des 5-HT₃-Rezeptors auf Angstreaktionen widersprüchlich. Darüber hinaus können andere Untersuchungen, durchgeführt ebenfalls mit „elevated plus maze“ und 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten, diese Befunde nicht bestätigen (File und Johnston, 1989; Piper et al., 1988; Kshama et al., 1990; Rodgers et al., 1995).

Die in dieser Studie hervorgerufene Inhibition der 5-HT₃-Rezeptoren durch Tropisetron scheint eine Beschleunigung der Extinktion zu bedingen. Die Angststarre nach Ko-Applikation der CB1-Rezeptor-Antagonisten Rimonabant (Abb. 22) und Tropisetron (Abb. 22) zeigte keine Unterschiede zur alleinigen Gabe von Rimonabant (Abb. 22). *In vivo* Untersuchungen haben gezeigt, dass die Extinktion nach Rimonabant-Gabe einer Extinktion entspricht, wie sie bei CB1-Rezeptor-*knock-out* Mäusen zu sehen ist (Marsicano et al., 2002). Im Experiment hat der 5-HT₃-Rezeptor Agonist SR57227 (3 mg/kg i.p.) die Extinktion verzögert, Tropisetron (1 mg/kg i.p.) beschleunigt sie. Diese widersprüchlichen Ergebnisse lassen sich dadurch erklären, dass der 5-HT₃-Rezeptoren Agonist SR57227 eine Desensibilisierung hervorrufen kann und so als 5-HT₃-Rezeptor Antagonist wirkt. Tropisetron dagegen wirkt nach einer Desensibilisierung als Antagonist an $\alpha 7$ -nAch-Rezeptoren und nicht an 5-HT₃-Rezeptoren.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass 5-HT₃-Rezeptoren an der Modulation von Extinktion zwar beteiligt sind, diese Modulation aber vom endocannabinoiden System dominiert wird.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass 5-HT₃-Rezeptoren GABAerge Aktivität modulieren, dies aber mit Hilfe von elektrophysiologischen und pharmakologischen Experimenten schwer detektierbar ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass der naive Zustand der synaptischen Kontakte, aufgrund der experimentiellen Methoden, aufgehoben wird und dies zu unvorhersehbarer Reorganisation der synaptischen Kontakte und den zugehörigen Rezeptoren kommt, könnte die widersprüchlichen Befunde erklären. Elektrophysiologische Untersuchungen wurden entweder anhand dissoziierter BLA Neuronen durchgeführt (Koyama et al., 2000, 2002) oder es wurde hochfrequent stimuliert (Sukita et al., 1992).

Auch die *in vivo*-Untersuchungen zur Furchtkonditionierung stellen eine Interaktion des ECS mit den 5-HT₃-Rezeptoren in Frage. Beweise für eine Interaktion beider Systeme wurde in Verhaltensversuchen an CB1-*knock-out*-Mäusen durchgeführt (Mikics et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden die CB1-Rezeptoren pharmakologisch blockiert. Möglicherweise ist dies ein weiterer Punkt, der die widersprüchlichen Ergebnisse erklärt.

4.6 Klinische Implikation

Im klinischen Alltag werden Cannabinoide aufgrund ihrer analgetischen (Cravatt et al., 2004), antiemetischen (Parker et al., 2003) und appetitfördernden Wirkung vor allem in der Palliativmedizin eingesetzt. Beispielsweise kommen sie bei Krebserkrankungen zur Linderung von therapiefraktärem Erbrechen und Appetitlosigkeit zum Einsatz (Beal et al., 1997). Routinemäßig wird begleitend zur Chemotherapie Ondansetron zur Bekämpfung von Übelkeit und Erbrechen verabreicht (Rueffert et al., 2009). Darüber hinaus werden Cannabinoide auch bei Spastik-induzierten Schmerzzuständen bei Multipler Sklerose (Zajicek et al., 2003) eingesetzt. Experimentelle Daten zeigen einen erfolgreichen Einsatz der Cannabinoide bei Morbus Crohn und anderen entzündlichen

Darmerkrankungen (Lal et al., 2011). Der 5HT₃-Rezeptor Antagonist Alosetron führt zu einer Besserung der Symptome bei Patienten mit Reizdarmsyndrom (Cremonini et al., 2003). Sowohl Cannabinoide als auch 5HT₃-Rezeptor Antagonisten haben analgetische und antiemetische Eigenschaften (Okamoto et al., 2004; Cravatt et al., 2004; Rueffert et al., 2009; Parker et al., 2003).

Da sowohl das endocannabinoide wie auch das serotonerge System bei der Verarbeitung von Angst eine wichtige Rolle spielen, stellt sich die Frage, inwieweit sie im Rahmen dieser Angstverarbeitung synergistisch agieren.

Beide Systeme spielen eine entscheidende Rolle bei psychischen Erkrankungen (Lutz, 2007; Rammes et al., 2004;) und der Verarbeitung von Angst sowie Schmerz (Lutz, 2007; Manning et al., 2001; McCleane et al., 2003). Da die Amygdala als Schnittstelle dieser beiden Ereignisse eine wichtige Struktur für die Extinktion furchtkonditionierter Gedächtnisinhalte darstellt (Martin et al., 1999; Marsicano et al., 2002), wurde der Frage der möglichen synergistischen oder indifferenten Wirkung beider Systeme hinsichtlich anxiolytischer Prozesse in der basolateralen Amygdala (BLA) in dieser Arbeit nachgegangen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch, dass das endocannabinoide und das serotonerge System durch Furchtkondition induzierter anxiolytischer Prozesse in der BLA nicht interagieren. Tropisetron zeigt zwar einen anxiolytischen Effekt, dieser beruht aber eher auf einem Antagonismus des nikotineren α_7 -Acetylcholinrezeptors, als auf einer Inhibition von 5HT₃-Rezeptoren.

So erscheinen die hier vorgestellten Ergebnisse zu möglichen synergistischen oder indifferenten anxiolytischen Wirkungen von serotonergen und cannabinoiden Wirkstoffen in der BLA für eine klinische Anwendung eher entmutigend. Allerdings bietet die Rolle des ECS im Zusammenhang mit der Entstehung chronischer Schmerzen einen interessanten Ansatzpunkt weiterer Studien. Es konnte gezeigt werden, dass die Schmerzschwelle von CB1^{-/-}-Mäusen nach wiederholter Darbietung eines aversiven Reizes sank (Azad et al., 2005) und Cannabinoide die Ausbildung der hippocampalen LTP verhindern können (Azad et al., 2004). Da die hippocampale LTP ein wesentliches *in vitro* Korrelat für Vorgänge synaptischer Plastizität ist, vermutet man, dass eine persistierende Störung des ECS nicht nur die Prozesse der akuten

Schmerzwahrnehmung beeinflussen, sondern auch die Wahrscheinlichkeit einer Schmerzchronifizierung erhöhen kann (Azad et al., 2005). Daher sollte im weiteren Verlauf vor allem die Bedeutung des ECS bei der Entstehung von chronischem Schmerz und der Ausbildung des sog. „Schmerzgedächtnis“ näher untersucht werden, um so gerade für Patienten, die unter chronischen Schmerzen leiden, erfolgversprechendere Therapiestrategien entwickeln zu können.

5 Zusammenfassung

Das endocannabinoide (ECS) und serotonerge System spielen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Schmerz, Angst und Furcht. Zentrale Schaltstelle für das aversive Gedächtnis ist die Amygdala, ein Bereich mit sehr hoher CB1-Rezeptordichte. Dort kontrolliert das ECS die synaptische Aktivität und Extinktion furchtkonditionierter Gedächtnisinhalte. Auf GABAergen Interneuronen der basolateralen Amygdala (BLA) kolokalisieren CB1-Rezeptoren mit serotonergen Typ 3 (5-HT₃)-Rezeptoren. Da in der BLA 5-HT₃-Rezeptoren ebenfalls die synaptische Transmission modulieren, ist eine synergistische Interaktion von ECS und 5-HT₃-Rezeptoren wahrscheinlich.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Interaktion von ECS und 5-HT₃-Rezeptoren bzw. den Einfluss dieser Interaktion auf die GABAerge synaptischer Transmission und Furchtkonditionierung mit Hilfe der Patch-Clamp Technik und im Verhaltensversuch *in vivo* zu untersuchen.

In Patch-Clamp Untersuchungen konnte weder der 5-HT₃-Rezeptor Antagonist Tropisetron noch der 5-HT₃-Rezeptor Agonist SR57227 die Induktion von Endocannabinoid-vermittelter synaptischer Plastizität (LTDi) beeinflussen. Ebenso reduzierte der 5-HT₃-Rezeptor Antagonist Ondansetron eGABA_A-IPSCs (IC₅₀=12,9 µM) nur in hohen Konzentrationen. Zudem zeigte die Laser-induzierte GABA Freisetzung, dass diese Reduktion durch eine direkte Antagonisierung von GABA_A-Rezeptoren erfolgt. Interessanterweise reduzierte Tropisetron lediglich eGABA_A-IPSCs, was einen postsynaptischen Effekt an GABA_A-Rezeptoren ausschließt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass in den untersuchten Neuronen 5-HT₃-Rezeptoren keinen Einfluss auf die GABAerge synaptische Transmission ausüben und vermutlich deshalb auch kein Synergismus zwischen ECS und 5-HT₃-Rezeptoren zu beobachten ist.

Es gibt Hinweise, dass Tropisetron neben der inhibitorischen Wirkung an 5-HT₃-Rezeptoren ebenso als partieller α₇-nAch-Rezeptor Agonist wirkt. Permanente Aktivierung von α₇-nAch-Rezeptoren lassen diese sehr schnell desensibilisieren. Tatsächlich reduzierte der α₇-nAch-Rezeptor Agonist Methyllycaconitin (1 nM) in der BLA eGABA_A-IPSCs im gleichen Maße wie Tropisetron. Diese Ergebnisse deuten

darauf hin, dass sich die inhibitorische Wirkung von Tropicsetron auf eGABA_A-IPSCs auf eine durch Tropicsetron induzierte Desensibilisierung - und damit Antagonisierung - von α_7 -nAch Rezeptoren zurückführen lässt.

Die Verhaltensuntersuchungen haben gezeigt, dass die Aktivierung von 5-HT₃-Rezeptoren die Extinktion aversiver Gedächtnisinhalte inhibiert, während Tropicsetron diese verstärkt. Allerdings führte die gleichzeitige Gabe des CB1-Rezeptor Antagonisten Rimonabant in Kombination mit Tropicsetron, und die Gabe von Rimonabant alleine zu keiner Reduktion der Angststarre und damit der Extinktionsrate. Somit dominiert das ECS die Modulation der Extinktion, was eine Interaktion zwischen ECS und 5-HT₃-Rezeptoren auf der Ebene der Extinktion aversiver Gedächtnisinhalte ausschließen lässt.

Die zellulären Untersuchungen deuten stark daraufhin, dass die GABAerge synaptische Transmission in der BLA unabhängig von der Aktivität von 5-HT₃-Rezeptoren ist. Eine mögliche Erklärung für die Wirkung von Tropicsetron auf die Extinktion wäre eine durch dauerhafte Aktivierung hervorgerufene Desensibilisierung von α_7 -nAch-Rezeptoren und nicht eine Inhibition von 5-HT₃-Rezeptoren.

Im Hinblick auf den klinischen Einsatz zeigen sowohl Cannabinoide als auch Substanzen, die mit 5-HT₃-Rezeptoren interagieren, analgetische und anxiolytische Eigenschaften. Eine mögliche synergistische Wirkung dieser beiden Substanzklassen erscheint in Anbetracht der hier vorgestellten Arbeit eher unwahrscheinlich.

Literaturverzeichnis

- Adams, S. R., Tsien, R. Y. (1993). "Controlling cell chemistry with caged compounds." Annu Rev Physiol **55**: 755-784.
- Aghajanian, G. K., Marek, G. J. (1997). "Serotonin induces excitatory postsynaptic potentials in apical dendrites of neocortical pyramidal cells." Neuropharmacology **36**(4-5): 589-599.
- Akirav, I. (2011). "The role of cannabinoids in modulating emotional and non-emotional memory processes in the hippocampus." Front Behav Neurosci **5**: 34.
- Ali, Z., Wu, G., Kozlov, A., Barasi, S. (1996). "The role of 5HT3 in nociceptive processing in the rat spinal cord: results from behavioural and electrophysiological studies." Neurosci Lett **208**(3): 203-207.
- Amaral, D. G., Price J.L., Pitkanen, A. , Carmichael, S.T. (1992). Anatomical organization of the primate amygdaloid complex. New York, Wiley.
- Artaiz, I., Romero, G., Zazpe, A., Monge, A., Caldero, J. M., Roca, J., Lasheras, B., Del Rio, J. (1995). "The pharmacology of VA21B7: an atypical 5-HT3 receptor antagonist with anxiolytic-like properties in animal models." Psychopharmacology (Berl) **117**(2): 137-148.
- Ashton, C. H. (1999). "Adverse effects of cannabis and cannabinoids." Br J Anaesth **83**(4): 637-649.
- Ashton, H., Golding, J., Marsh, V. R., Millman, J. E., Thompson, J. W. (1981). "The seed and the soil: effect of dosage, personality and starting state on the response to delta 9 tetrahydrocannabinol in man." Br J Clin Pharmacol **12**(5): 705-720.
- Attal, N., Brasseur, L., Guirimand, D., Clermond-Gnamien, S., Atlami, S., Bouhassira, D. (2004). "Are oral cannabinoids safe and effective in refractory neuropathic pain?" Eur J Pain **8**(2): 173-177.
- Azad, S. C. (2005). Das Endocannabinoidsystem: Cannabinoidrezeptoren und Endocannabinoid. Bremen, Uni-Med Verlag AG.
- Azad, S. C. (2006). Cannabinoid in der Schmerztherapie. Bremen, UNI-MED Verlag AG.
- Azad, S. C., Eder, M., Marsicano, G., Lutz, B., Zieglgansberger, W., Rammes, G. (2003). "Activation of the cannabinoid receptor type 1 decreases glutamatergic and GABAergic synaptic transmission in the lateral amygdala of the mouse." Learn Mem **10**(2): 116-128.
- Azad, S. C., Hüge, V., Schops, P., Hilf, C., Beyer, A., Dodt, H. U., Rammes, G., Zieglgansberger, W. (2005). "[Endogenous cannabinoid system. Effect on neuronal plasticity and pain memory]." Schmerz **19**(6): 521-527.
- Azad, S. C., Kurz, J., Marsicano, G., Lutz, B., Zieglgansberger, W., Rammes, G. (2008). "Activation of CB1 specifically located on GABAergic interneurons inhibits LTD in the lateral amygdala." Learn Mem **15**(3): 143-152.

- Azad, S. C., Monory, K., Marsicano, G., Cravatt, B. F., Lutz, B., Zieglgansberger, W., Rammes, G. (2004). "Circuitry for associative plasticity in the amygdala involves endocannabinoid signaling." J Neurosci **24**(44): 9953-9961.
- Azad, S. C., Rammes, G. (2005). "Cannabinoids in anaesthesia and pain therapy." Curr Opin Anaesthesiol **18**(4): 424-427.
- Baker, D., Pryce, G., Croxford, J. L., Brown, P., Pertwee, R. G., Huffman, J. W., Layward, L. (2000). "Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model." Nature **404**(6773): 84-87.
- Bambico, F. R., Katz, N., Debonnel, G., Gobbi, G. (2007). "Cannabinoids elicit antidepressant-like behavior and activate serotonergic neurons through the medial prefrontal cortex." J Neurosci **27**(43): 11700-11711.
- Banerjee, S. P., Snyder, S. H., Mechoulam, R. (1975). "Cannabinoids: influence on neurotransmitter uptake in rat brain synaptosomes." J Pharmacol Exp Ther **194**(1): 74-81.
- Barad, D. M., Otto, M., Southwick, S. (2006). "Combining pharmacotherapy with cognitive behavioral therapy: traditional and new approaches." J Trauma Stress **19**(5): 571-81.
- Barann, M., Molderings, G., Bruss, M., Bonisch, H., Urban, B. W., Gothert, M. (2002). "Direct inhibition by cannabinoids of human 5-HT_{3A} receptors: probable involvement of an allosteric modulatory site." Br J Pharmacol **137**(5): 589-596.
- Barnes, C. A., McNaughton, B. L. (1985). "An age comparison of the rates of acquisition and forgetting of spatial information in relation to long-term enhancement of hippocampal synapses." Behav Neurosci **99**(6): 1040-1048.
- Barnes, N. M., Sharp, T. (1999). "A review of central 5-HT receptors and their function." Neuropharmacology **38**(8): 1083-1152.
- Beal, J. E., Olson, R., Laubenstein, L., Morales, J. O., Bellman, P., Yangco, B., Lefkowitz, L., Plasse, T. F., Shepard, K. V. (1995). "Dronabinol as a treatment for anorexia associated with weight loss in patients with AIDS." J Pain Symptom Manage **10**(2): 89-97.
- Beal, J. E., Olson, R., Lefkowitz, L., Laubenstein, L., Bellman, P., Yangco, B., Morales, J. O., Murphy, R., Powderly, W., Plasse, T. F., Mosdell, K. W., Shepard, K. V. (1997). "Long-term efficacy and safety of dronabinol for acquired immunodeficiency syndrome-associated anorexia." J Pain Symptom Manage **14**(1): 7-14.
- Belelli, D., Balcerek, J. M., Hope, A. G., Peters, J. A., Lambert, J. J., Blackburn, T. P. (1995). "Cloning and functional expression of a human 5-hydroxytryptamine type 3A receptor subunit." Mol Pharmacol **48**(6): 1054-1062.
- Benloucif, S., Keegan, M. J., Galloway, M. P. (1993). "Serotonin-facilitated dopamine release in vivo: pharmacological characterization." J Pharmacol Exp Ther **265**(1): 373-377.
- Berrendero, F., Maldonado, R. (2002). "Involvement of the opioid system in the anxiolytic-like effects induced by Delta(9)-tetrahydrocannabinol." Psychopharmacology (Berl) **163**(1): 111-117.

- Bhatnagar, S., Nowak, N., Babich, L., Bok, L. (2004). "Deletion of the 5-HT₃ receptor differentially affects behavior of males and females in the Porsolt forced swim and defensive withdrawal tests." Behav Brain Res **153**(2): 527-535.
- Bhatnagar, S., Sun, L. M., Raber, J., Maren, S., Julius, D., Dallman, M. F. (2004). "Changes in anxiety-related behaviors and hypothalamic-pituitary-adrenal activity in mice lacking the 5-HT-3A receptor." Physiol Behav **81**(4): 545-555.
- Bianchi, C., Siniscalchi, A., Beani, L. (1990). "5-HT_{1A} agonists increase and 5-HT₃ agonists decrease acetylcholine efflux from the cerebral cortex of freely-moving guinea-pigs." Br J Pharmacol **101**(2): 448-452.
- Bisogno, T., Ligresti, A., Di Marzo, V. (2005). "The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects." Pharmacol Biochem Behav **81**(2): 224-238.
- Blanton, M. G., Lo Turco, J. J., Kriegstein, A. R. (1989). "Whole cell recording from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex." J Neurosci Methods **30**(3): 203-210.
- Bliss, T. V., Collingridge, G. L. (1993). "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus." Nature **361**(6407): 31-39.
- Bloom, F. E., Morales, M. (1998). "The central 5-HT₃ receptor in CNS disorders." Neurochem Res **23**(5): 653-659.
- Boddeke, H. W., Meigel, I., Boeijinga, P., Arbuckle, J., Docherty, R. J. (1996). "Modulation by calcineurin of 5-HT₃ receptor function in NG108-15 neuroblastoma x glioma cells." Br J Pharmacol **118**(7): 1836-1840.
- Bodor, A. L., Katona, I., Nyiri, G., Mackie, K., Ledent, C., Hajos, N., Freund, T. F. (2005). "Endocannabinoid signaling in rat somatosensory cortex: laminar differences and involvement of specific interneuron types." J Neurosci **25**(29): 6845-6856.
- Breivogel, C. S., Childers, S. R. (1998). "The functional neuroanatomy of brain cannabinoid receptors." Neurobiol Dis **5**(6 Pt B): 417-431.
- Breivogel, C. S., Griffin, G., Di Marzo, V., Martin, B. R. (2001). "Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain." Mol Pharmacol **60**(1): 155-163.
- Bruss, M., Barann, M., Hayer-Zillgen, M., Eucker, T., Gothert, M., Bonisch, H. (2000). "Modified 5-HT_{3A} receptor function by co-expression of alternatively spliced human 5-HT_{3A} receptor isoforms." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **362**(4-5): 392-401.
- Buhot, M. C., Martin, S., Segu, L. (2000). "Role of serotonin in memory impairment." Ann Med **32**(3): 210-221.
- Campbell, F. A., Tramer, M. R., Carroll, D., Reynolds, D. J., Moore, R. A., McQuay, H. J. (2001). "Are cannabinoids an effective and safe treatment option in the management of pain? A qualitative systematic review." BMJ **323**(7303): 13-16.
- Campbell, N. A. (2000). Biologie. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.

- Campeau, S., Davis, M. (1995). "Involvement of subcortical and cortical afferents to the lateral nucleus of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli." J Neurosci **15**(3 Pt 2): 2312-2327.
- Campeau, S., Davis, M. (1995). "Involvement of the central nucleus and basolateral complex of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli." J Neurosci **15**(3 Pt 2): 2301-2311.
- Cassel, J. C., Jeltsch, H. (1995). "Serotonergic modulation of cholinergic function in the central nervous system: cognitive implications." Neuroscience **69**(1): 1-41.
- Chait, L. D., Zacny, J. P. (1992). "Reinforcing and subjective effects of oral delta 9-THC and smoked marijuana in humans." Psychopharmacology (Berl) **107**(2-3): 255-262.
- Chevalleyre, V., Castillo, P. E. (2003). "Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability." Neuron **38**(3): 461-472.
- Clapper, J. R., Mangieri R.A., Piomelli D. (2009). "The endocannabinoid system as a target for the treatment of cannabis dependence." Neuropharmacology **56**: 235-243.
- Colpaert, F. C., Koeck, W. (1991). 5-HT receptor ligands and conflict behaviour. Second Polish-Swedish Symposium on Neurotransmitters and Neuropharmacology. Zakopane: 5.
- Costall, B., Domeney, A. M., Gerrard, P. A., Kelly, M. E., Naylor, R. J. (1988). "Zacopride: anxiolytic profile in rodent and primate models of anxiety." J Pharm Pharmacol **40**(4): 302-305.
- Costall, B., Domeney, A.M., Hendrie, C.A., Kelly, M.E., Naylor, R.J., Tyres, M.B. (1987). "The anxiolytic activity of GR 38032F in the mouse and marmoset." Br. J. Pharmacol. **90**: 257.
- Costall, B., Jones, B. J., Kelly, M. E., Naylor, R. J., Oakley, N. R., Onaivi, E. S., Tyers, M. B. (1989). "The effects of ondansetron (GR38032F) in rats and mice treated subchronically with diazepam." Pharmacol Biochem Behav **34**(4): 769-778.
- Costall, B., Jones, B.J., Kelly, M.E., Naylor, R.J., Tomkins, D.M. (1989). "Profile of action of diazepam and 5-HT₃ receptor antagonist in the elevated X-maze." J. Psychopharmacol. **3**: 10.
- Costall, B., Kelly, M. E., Naylor, R. J., Onaivi, E. S. (1988). "Actions of buspirone in a putative model of anxiety in the mouse." J Pharm Pharmacol **40**(7): 494-500.
- Costall, B., Naylor, R. J. (2004). "5-HT₃ receptors." Curr Drug Targets CNS Neurol Disord **3**(1): 27-37.
- Cravatt, B. F., Lichtman, A. H. (2004). "The endogenous cannabinoid system and its role in nociceptive behavior." J Neurobiol **61**(1): 149-160.

- Cremonini, F., Delgado-Aros, S., Camilleri, M. (2003). "Efficacy of alosetron in irritable bowel syndrome: a meta-analysis of randomized controlled trials." Neurogastroenterol Motil **15**(1): 79-86.
- Cummings, J. A., Mulkey, R. M., Nicoll, R. A., Malenka, R. C. (1996). "Ca²⁺ signaling requirements for long-term depression in the hippocampus." Neuron **16**(4): 825-833.
- Darmani, N. A. (2001). "The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR 141716A reverses the antiemetic and motor depressant actions of WIN 55, 212-2." Eur J Pharmacol **430**(1): 49-58.
- Davidson, J. R., Foa, E. B., Connor, K. M., Churchill, L. E. (2002). "Hyperhidrosis in social anxiety disorder." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **26**(7-8): 1327-1331.
- Davidson, R. J. (2002). "Anxiety and affective style: role of prefrontal cortex and amygdala." Biol Psychiatry **51**(1): 68-80.
- Davies, P. A., Pistis, M., Hanna, M. C., Peters, J. A., Lambert, J. J., Hales, T. G., Kirkness, E. F. (1999). "The 5-HT_{3B} subunit is a major determinant of serotonin-receptor function." Nature **397**(6717): 359-363.
- Davis, M., Whalen, P. J. (2001). "The amygdala: vigilance and emotion." Mol Psychiatry **6**(1): 13-34.
- DeBock, F., Kurz, J., Azad, S. C., Parsons, C. G., Hapfelmeier, G., Zieglgansberger, W., Rammes, G. (2003). "Alpha₂-adrenoreceptor activation inhibits LTP and LTD in the basolateral amygdala: involvement of Gi/o-protein-mediated modulation of Ca²⁺-channels and inwardly rectifying K⁺-channels in LTD." Eur J Neurosci **17**(7): 1411-1424.
- Degenhardt, L., Hall, W., (2006). "Is Cannabis Use a Contributory Cause of Psychosis?" Canadian Journal of Psychiatry **51**(9): 556-565.
- Deiml, T., Haseneder, R., Zieglgansberger, W., Rammes, G., Eisensamer, B., Rupprecht, R., Hapfelmeier, G. (2004). "Alpha-thujone reduces 5-HT₃ receptor activity by an effect on the agonist-reduced desensitization." Neuropharmacology **46**(2): 192-201.
- Devane, W. A., Dysarz, F. A., 3rd, Johnson, M. R., Melvin, L. S., Howlett, A. C. (1988). "Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain." Mol Pharmacol **34**(5): 605-613.
- Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., Mechoulam, R. (1992). "Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor." Science **258**(5090): 1946-1949.
- Dotz, H., Eder, M., Frick, A., Zieglgansberger, W. (1999). "Precisely localized LTD in the neocortex revealed by infrared-guided laser stimulation." Science **286**(5437): 110-113.
- Dotz, H. U., Eder, M., Schierloh, A., Zieglgansberger, W. (2002). "Infrared-guided laser stimulation of neurons in brain slices." Sci STKE **2002**(120): pl2.

- Dodt, H. U., Zieglgansberger, W. (1990). "Visualizing unstained neurons in living brain slices by infrared DIC-videomicroscopy." Brain Res **537**(1-2): 333-336.
- Dodt, H. U., Zieglgansberger, W. (1994). "Infrared videomicroscopy: a new look at neuronal structure and function." Trends Neurosci **17**(11): 453-458.
- Domenici, M. R., Azad, S. C., Marsicano, G., Schierloh, A., Wotjak, C. T., Dodt, H. U., Zieglgansberger, W., Lutz, B., Rammes, G. (2006). "Cannabinoid receptor type 1 located on presynaptic terminals of principal neurons in the forebrain controls glutamatergic synaptic transmission." J Neurosci **26**(21): 5794-5799.
- Dubin, A. E., Huvar, R., D'Andrea, M. R., Pyati, J., Zhu, J. Y., Joy, K. C., Wilson, S. J., Galindo, J. E., Glass, C. A., Luo, L., Jackson, M. R., Lovenberg, T. W., Erlander, M. G. (1999). "The pharmacological and functional characteristics of the serotonin 5-HT_{3A} receptor are specifically modified by a 5-HT_{3B} receptor subunit." J Biol Chem **274**(43): 30799-30810.
- Dudel, J., Menzel, R., Schmidt R.F. (2001). Neurowissenschaften: Vom Molekül zur Kognition. Berlin, Springer Verlag.
- Dunn, R. W., Carlezon, W.A., Corbett, R. (1991). "Preclinical anxiolytic versus antipsychotic profiles of the 5-HT₃ antagonist ondansetron, zacopride, 3a-tropanyl-1H-indole-3-carboxylic acid ester, and 1aH, 3a, 5aH-tropan-3-yl-3,5-dichlorobenzoate." Drug Devl. Res. **23**: 289-300.
- Edwards, F. A., Konnerth, A., Sakmann, B., Takahashi, T. (1989). "A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system." Pflugers Arch **414**(5): 600-612.
- Egertova, M., Cravatt, B. F., Elphick, M. R. (2003). "Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and cb(1) cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling." Neuroscience **119**(2): 481-496.
- Egertova, M., Giang, D. K., Cravatt, B. F., Elphick, M. R. (1998). "A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain." Proc Biol Sci **265**(1410): 2081-2085.
- Eguchi, J., Inomata, Y., Saito, K. (2001). "The anxiolytic-like effect of MCI-225, a selective NA reuptake inhibitor with 5-HT₃ receptor antagonism." Pharmacol Biochem Behav **68**(4): 677-683.
- Elsner, F. (2005). Cannabinoide in der Behandlung von Übelkeit und Erbrechen. Bremen, UNI-MED Verlag AG.
- Fan, P. (1995). "Cannabinoid agonists inhibit the activation of 5-HT₃ receptors in rat nodose ganglion neurons." J Neurophysiol **73**(2): 907-910.
- Fernandez-Artamendi, S., Fernandez-Hermida, J.R., Secades-Villa, R., Garcia-Portilla, P. (2011). "Canabis and Mental Health." Actas Esp Psiquiatr **39**(3): 180-190.
- File, S. E. (1992). Behavioural detection of anxiolytic action. New York, Wiley.

- File, S. E., Johnston, A. L. (1989). "Lack of effects of 5HT₃ receptor antagonists in the social interaction and elevated plus-maze tests of anxiety in the rat." Psychopharmacology (Berl) **99**(2): 248-251.
- Förstl, H., Hautzinger, M., Roth, G. (2006). Neurobiologie psychischer Störungen. Heidelberg, Springer Verlag.
- Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K. (1996). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag
- Frank, B., Niesler, B., Bondy, B., Spath, M., Pongratz, D. E., Ackenheil, M., Fischer, C., Rappold, G. (2004). "Mutational analysis of serotonin receptor genes: HTR3A and HTR3B in fibromyalgia patients." Clin Rheumatol **23**(4): 338-344.
- Frank, B., Niesler, B., Nothen, M. M., Neidt, H., Propping, P., Bondy, B., Rietschel, M., Maier, W., Albus, M., Rappold, G. (2004). "Investigation of the human serotonin receptor gene HTR3B in bipolar affective and schizophrenic patients." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **131B**(1): 1-5.
- Franklin, K., Paxinos, G., (1997). The Mousebrain in Stereotaxic Coordinates. San Diego, Academic Press
- Freund, T. F., Katona, I., Piomelli, D. (2003). "Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling." Physiol Rev **83**(3): 1017-1066.
- Freund, T. F. (2003). "Interneuron Diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition." Trends Neurosci **26**(9):489-95.
- Frick, A. A. (1999). "Untersuchungen zur glutamatergen Informationsübertragung an Pyramidenneuronen des Neocortex mit Hilfe infrarotgeleimter Photostimulation."
- Fuller, R. W. (1995). "Serotonin uptake inhibitors: uses in clinical therapy and in laboratory research." Prog Drug Res **45**: 167-204.
- Genn, R. F., Tucci, S., Marco, E. M., Viveros, M. P., File, S. E. (2004). "Unconditioned and conditioned anxiogenic effects of the cannabinoid receptor agonist CP 55,940 in the social interaction test." Pharmacol Biochem Behav **77**(3): 567-573.
- Genn, R. F., Tucci, S., Parikh, S., File, S. E. (2004). "Effects of nicotine and a cannabinoid receptor agonist on negative contrast: distinction between anxiety and disappointment?" Psychopharmacology (Berl) **177**(1-2): 93-99.
- Gentry, C. L., Lukas, R. J. (2002). "Regulation of nicotinic acetylcholine receptor numbers and function by chronic nicotine exposure." Curr Drug Targets CNS Neurol Disord **1**(4): 359-385.
- Gerdeman, G., Lovinger, D. M. (2001). "CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum." J Neurophysiol **85**(1): 468-471.
- Giovannini, M. G., Ceccarelli, I., Molinari, B., Cecchi, M., Goldfarb, J., Blandina, P. (1998). "Serotonergic modulation of acetylcholine release from cortex of freely moving rats." J Pharmacol Exp Ther **285**(3): 1219-1225.

- Gleeson, S., Ahlers, S. T., Mansbach, R. S., Foust, J. M., Barrett, J. E. (1989). "Behavioral studies with anxiolytic drugs. VI. Effects on punished responding of drugs interacting with serotonin receptor subtypes." J Pharmacol Exp Ther **250**(3): 809-817.
- Gobbi, G., Bambico, F. R., Mangieri, R., Bortolato, M., Campolongo, P., Solinas, M., Cassano, T., Morgese, M. G., Debonnel, G., Duranti, A., Tontini, A., Tarzia, G., Mor, M., Trezza, V., Goldberg, S. R., Cuomo, V., Piomelli, D. (2005). "Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(51): 18620-18625.
- Gothert, M., Propping, P., Bonisch, H., Bruss, M., Nothen, M. M. (1998). "Genetic variation in human 5-HT receptors: potential pathogenetic and pharmacological role." Ann N Y Acad Sci **861**: 26-30.
- Hajos, N., Katona, I., Naiem, S. S., MacKie, K., Ledent, C., Mody, I., Freund, T. F. (2000). "Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations." Eur J Neurosci **12**(9): 3239-3249.
- Hajos, N., Nusser, Z., Rancz, E. A., Freund, T. F., Mody, I. (2000). "Cell type- and synapse-specific variability in synaptic GABAA receptor occupancy." Eur J Neurosci **12**(3): 810-818.
- Häring, M., Marsicano, G., Lutz, B., Monory, K. (2007). "Identification of the cannabinoid receptor type 1 in serotonergic cells of raphe nuclei in mice." Neuroscience **146**(3): 1212-1219.
- Harrell, A. V., Allan, A. M. (2003). "Improvements in hippocampal-dependent learning and decremental attention in 5-HT(3) receptor overexpressing mice." Learn Mem **10**(5): 410-419.
- Heifets, B. D., Castillo, P. E. (2009). "Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity." Annu Rev Physiol **71**: 283-306.
- Hermann, H., Marsicano, G., Lutz, B. (2002). "Coexpression of the cannabinoid receptor type 1 with dopamine and serotonin receptors in distinct neuronal subpopulations of the adult mouse forebrain." Neuroscience **109**(3): 451-460.
- Hess, G. P., Niu, L., Wieboldt, R. (1995). "Determination of the chemical mechanism of neurotransmitter receptor-mediated reactions by rapid chemical kinetic methods." Ann N Y Acad Sci **757**: 23-39.
- Higgins, G. A., Jones, B. J., Oakley, N. R., Tyers, M. B. (1991). "Evidence that the amygdala is involved in the disinhibitory effects of 5-HT3 receptor antagonists." Psychopharmacology (Berl) **104**(4): 545-551.
- Hill, M. N., Gorzalka, B. B. (2004). "Enhancement of anxiety-like responsiveness to the cannabinoid CB(1) receptor agonist HU-210 following chronic stress." Eur J Pharmacol **499**(3): 291-295.
- Hill, M. N., Patel, S., Campolongo, P., Tasker, J.G., Wotjak, C.T., Bains, J.S. (2010). "Functional Interactions between Stress and the Endocannabinoid System: From synaptic signaling to Behavioral Output." The Journal of Neuroscience **30**(45): 14980-14986.

- Hill, M. N., Sun, J. C., Tse, M. T., Gorzalka, B. B. (2006). "Altered responsiveness of serotonin receptor subtypes following long-term cannabinoid treatment." Int J Neuropsychopharmacol **9**(3): 277-286.
- Hoffman, A. F., Lupica, C. R. (2000). "Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA(A) synaptic transmission in the hippocampus." J Neurosci **20**(7): 2470-2479.
- Hoffman, A. F., Lupica, C. R. (2001). "Direct actions of cannabinoids on synaptic transmission in the nucleus accumbens: a comparison with opioids." J Neurophysiol **85**(1): 72-83.
- Hoffman, A. F., Macgill, A. M., Smith, D., Oz, M., Lupica, C. R. (2005). "Species and strain differences in the expression of a novel glutamate-modulating cannabinoid receptor in the rodent hippocampus." Eur J Neurosci **22**(9): 2387-2391.
- Houtani, T., Munemoto, Y., Kase, M., Sakuma, S., Tsutsumi, T., Sugimoto, T. (2005). "Cloning and expression of ligand-gated ion-channel receptor L2 in central nervous system." Biochem Biophys Res Commun **335**(2): 277-285.
- Howlett, A. C., Qualy, J. M., Khachatrian, L. L. (1986). "Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs." Mol Pharmacol **29**(3): 307-313.
- Johnson, K. M., Ho, B. T., Dewey, W. L. (1976). "Effects of delta9-tetrahydrocannabinol on neurotransmitter accumulation and release mechanisms in rat forebrain synaptosomes." Life Sci **19**(3): 347-356.
- Jokisch, D., Bellebaum, C., Daum, I. (2005). Das serotonerge System und Kognition.
- Jones, B. J., Costall, B., Domeney, A. M., Kelly, M. E., Naylor, R. J., Oakley, N. R., Tyers, M. B. (1988). "The potential anxiolytic activity of GR38032F, a 5-HT3-receptor antagonist." Br J Pharmacol **93**(4): 985-993.
- Jones, B. J., Piper, D.C. (1994). "5-HT3 receptor antagonist in anxiety." CRC Press, Boca Raton: 155-181.
- Kaiser, R., Tremblay, P. B., Sezer, O., Possinger, K., Roots, I., Brockmoller, J. (2004). "Investigation of the association between 5-HT3A receptor gene polymorphisms and efficiency of antiemetic treatment with 5-HT3 receptor antagonists." Pharmacogenetics **14**(5): 271-278.
- Kalin, N. H., Shelton, S. E., Davidson, R. J. (2004). "The role of the central nucleus of the amygdala in mediating fear and anxiety in the primate." J Neurosci **24**(24): 5506-5515.
- Kandel, E. R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. (1996). Neurowissenschaften: Eine Einführung. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Karst, M., Salim, K., Burstein, S., Conrad, I., Hoy, L., Schneider, U. (2003). "Analgesic effect of the synthetic cannabinoid CT-3 on chronic neuropathic pain: a randomized controlled trial." JAMA **290**(13): 1757-1762.

- Katona, I., Rancz, E. A., Acsady, L., Ledent, C., Mackie, K., Hajos, N., Freund, T. F. (2001). "Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission." J Neurosci **21**(23): 9506-9518.
- Katona, I., Sperlagh, B., Sik, A., Kafalvi, A., Vizi, E. S., Mackie, K., Freund, T. F. (1999). "Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons." J Neurosci **19**(11): 4544-4558.
- Katona, I., Urban, G. M., Wallace, M., Ledent, C., Jung, K. M., Piomelli, D., Mackie, K., Freund, T. F. (2006). "Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses." J Neurosci **26**(21): 5628-5637.
- Kelso, S. R., Ganong, A. H., Brown, T. H. (1986). "Hebbian synapses in hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(14): 5326-5330.
- Kilpatrick, G. J., Bunce, K. T., Tyers, M. B. (1990). "5-HT₃ receptors." Med Res Rev **10**(4): 441-475.
- Kimura, T., Ohta, T., Watanabe, K., Yoshimura, H., Yamamoto, I. (1998). "Anandamide, an endogenous cannabinoid receptor ligand, also interacts with 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptor." Biol Pharm Bull **21**(3): 224-226.
- Koyama, S., Kubo, C., Rhee, J. S., Akaike, N. (1999). "Presynaptic serotonergic inhibition of GABAergic synaptic transmission in mechanically dissociated rat basolateral amygdala neurons." J Physiol **518** (Pt 2): 525-538.
- Koyama, S., Matsumoto, N., Kubo, C., Akaike, N. (2000). "Presynaptic 5-HT₃ receptor-mediated modulation of synaptic GABA release in the mechanically dissociated rat amygdala neurons." J Physiol **529** Pt 2: 373-383.
- Kratzer, S. (2012). Der Einfluss des Inhalationsanästhetikums Xenon auf die synaptische Transmission. Untersuchungen mit der Patch-Clamp-Technik in vitalen ZNS-Schnittpräparaten.
- Kreitzer, A. C., Carter, A. G., Regehr, W. G. (2002). "Inhibition of interneuron firing extends the spread of endocannabinoid signaling in the cerebellum." Neuron **34**(5): 787-796.
- Kshama, D., Hrishikeshavan, H. J., Shanbhogue, R., Munonyedi, U. S. (1990). "Modulation of baseline behavior in rats by putative serotonergic agents in three ethoexperimental paradigms." Behav Neural Biol **54**(3): 234-253.
- Lal, S., Prasad, N., Tangri, S., Silverberg, M. S., Gordon, A., Steinhart, H. (2011) "Cannabis use amongst patients with inflammatory bowel disease." Eur J Gastroenterol Hepatol **23**(10):891-6.
- Ledent, C., Valverde, O., Cossu, G., Petitot, F., Aubert, J. F., Beslot, F., Bohme, G. A., Imperato, A., Pedrazzini, T., Roques, B. P., Vassart, G., Fratta, W., Parmentier, M. (1999). "Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice." Science **283**(5400): 401-404.
- LeDoux, J. E. (1994). "Emotion, memory and the brain." Sci Am **270**(6): 50-57.
- LeDoux, J. E. (2000). "Emotion circuits in the brain." Annu Rev Neurosci **23**: 155-184.

- LeDoux, J. E., Cicchetti, P., Xagoraris, A., Romanski, L. M. (1990). "The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning." J Neurosci **10**(4): 1062-1069.
- LeDoux, J. E., Farb, C., Ruggiero, D. A. (1990). "Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala." J Neurosci **10**(4): 1043-1054.
- LeDoux, J. E., Sakaguchi, A., Reis, D. J. (1984). "Subcortical efferent projections of the medial geniculate nucleus mediate emotional responses conditioned to acoustic stimuli." J Neurosci **4**(3): 683-698.
- Lewekw, F. M., Koethe, D. (2008). "Cannabis and psychiatric disorders: it is not only addiction." Addict Biol **13**(2): 1117-1127.
- Linthorst, A. C. (2005). Interactions between corticotropin-releasing hormone and serotonin: implications for the aetiology and treatment of anxiety disorders.
- Lu, Y., Perl, E. R. (2007). "Selective action of noradrenaline and serotonin on neurones of the spinal superficial dorsal horn in the rat." J Physiol **582**(Pt 1): 127-136.
- Lucki, I. (1998). "The spectrum of behaviors influenced by serotonin." Biol Psychiatry **44**(3): 151-162.
- Lutz, B. (2002). "Molecular biology of cannabinoid receptors." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **66**(2-3): 123-142.
- Lutz, B. (2007). "The endocannabinoid system and extinction learning." Mol Neurobiol **36**(1): 92-101.
- Lutz, M. S. u. B. (2006). "Physiologie und Pharmakologie des Endocannabinoid-Systems." Uni-Med Verlag AG(Das Endocannabinoid-System-Physiologie und klinische Bedeutung): 12-43.
- MacDermott, A. B., Role, L. W., Siegelbaum, S. A. (1999). "Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release." Annu Rev Neurosci **22**: 443-485.
- Macor, J. E., Gurley, D., Lanthorn, T., Loch, J., Mack, R. A., Mullen, G., Tran, O., Wright, N., Gordon, J. C. (2001). "The 5-HT₃ antagonist tropisetron (ICS 205-930) is a potent and selective alpha₇ nicotinic receptor partial agonist." Bioorg Med Chem Lett **11**(3): 319-321.
- MacVicar, B. A. (1984). "Infrared video microscopy to visualize neurons in the in vitro brain slice preparation." J Neurosci Methods **12**(2): 133-139.
- Manning, B. H., Merin, N. M., Meng, I. D., Amaral, D. G. (2001). "Reduction in opioid- and cannabinoid-induced antinociception in rhesus monkeys after bilateral lesions of the amygdaloid complex." J Neurosci **21**(20): 8238-8246.
- Maren, S., Aharonov, G., Fanselow, M. S. (1996). "Retrograde abolition of conditional fear after excitotoxic lesions in the basolateral amygdala of rats: absence of a temporal gradient." Behav Neurosci **110**(4): 718-726.

- Marsicano, G., Lutz, B. (1999). "Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain." Eur J Neurosci **11**(12): 4213-4225.
- Marsicano, G., Wotjak, C. T., Azad, S. C., Bisogno, T., Rammes, G., Cascio, M. G., Hermann, H., Tang, J., Hofmann, C., Zieglgansberger, W., Di Marzo, V., Lutz, B. (2002). "The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories." Nature **418**(6897): 530-534.
- Martin, W. J., Coffin, P. O., Attias, E., Balinsky, M., Tsou, K., Walker, J. M. (1999). "Anatomical basis for cannabinoid-induced antinociception as revealed by intracerebral microinjections." Brain Res **822**(1-2): 237-242.
- Mascagni, F., McDonald, A. J. (2007). "A novel subpopulation of 5-HT type 3A receptor subunit immunoreactive interneurons in the rat basolateral amygdala." Neuroscience **144**(3): 1015-1024.
- Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., Bonner, T. I. (1990). "Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA." Nature **346**(6284): 561-564.
- Matsumoto, M., Yoshioka, M., Togashi, H., Tochihara, M., Ikeda, T., Saito, H. (1995). "Modulation of norepinephrine release by serotonergic receptors in the rat hippocampus as measured by in vivo microdialysis." J Pharmacol Exp Ther **272**(3): 1044-1051.
- McCleane, G. J., Suzuki, R., Dickenson, A.H. (2003). "Does a single intravenous injection of the 5HT3-receptor antagonist ondansetron have an analgetic effect in neuropathic pain? A double-blinded, placebo-controlled cross-over study." Anesth Analg **97**: 1474-1478.
- McCray, J. A., Trentham, D. R. (1989). "Properties and uses of photoreactive caged compounds." Annu Rev Biophys Biophys Chem **18**: 239-270.
- McKernan, M. G., Shinnick-Gallagher, P. (1997). "Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro." Nature **390**(6660): 607-611.
- McMahon, L. L., Kauer, J. A. (1997). "Hippocampal interneurons express a novel form of synaptic plasticity." Neuron **18**(2): 295-305.
- Mechoulam, R. (1986). "Interview with Prof. Raphael Mechoulam, codiscoverer of THC.. Interview by Stanley Einstein." Int J Addict **21**(4-5): 579-587.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B. R., Compton, D. R., et al. (1995). "Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors." Biochem Pharmacol **50**(1): 83-90.
- Mechoulam, R., Fride, E., Di Marzo, V. (1998). "Endocannabinoids." Eur J Pharmacol **359**(1): 1-18.
- Medina, J. F., Repa, J. C., Mauk, M. D., LeDoux, J. E. (2002). "Parallels between cerebellum- and amygdala-dependent conditioning." Nat Rev Neurosci **3**(2): 122-131.

- Melis, M., Pistis, M., Perra, S., Muntoni, A. L., Pillolla, G., Gessa, G. L. (2004). "Endocannabinoids mediate presynaptic inhibition of glutamatergic transmission in rat ventral tegmental area dopamine neurons through activation of CB1 receptors." J Neurosci **24**(1): 53-62.
- Melke, J., Westberg, L., Nilsson, S., Landen, M., Soderstrom, H., Baghaei, F., Rosmond, R., Holm, G., Bjornorp, P., Nilsson, L. G., Adolfsson, R., Eriksson, E. (2003). "A polymorphism in the serotonin receptor 3A (HTR3A) gene and its association with harm avoidance in women." Arch Gen Psychiatry **60**(10): 1017-1023.
- Meneses, A. (1998). "Physiological, pathophysiological and therapeutic roles of 5-HT systems in learning and memory." Rev Neurosci **9**(4): 275-289.
- Meneses, A. (1999). "5-HT system and cognition." Neurosci Biobehav Rev **23**(8): 1111-1125.
- Mikics, E., Vas, J., Aliczki, M., Halasz, J., Haller, J. (2009). "Interactions between the anxiogenic effects of CB1 gene disruption and 5-HT3 neurotransmission." Behav Pharmacol **20**(3): 265-272.
- Misner, D. L., Sullivan, J. M. (1999). "Mechanism of cannabinoid effects on long-term potentiation and depression in hippocampal CA1 neurons." J Neurosci **19**(16): 6795-6805.
- Miyake, A., Mochizuki, S., Takemoto, Y., Akuzawa, S. (1995). "Molecular cloning of human 5-hydroxytryptamine3 receptor: heterogeneity in distribution and function among species." Mol Pharmacol **48**(3): 407-416.
- Moldrich, G., Wenger, T. (2000). "Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study." Peptides **21**(11): 1735-1742.
- Morales, M., Backman, C. (2002). "Coexistence of serotonin 3 (5-HT3) and CB1 cannabinoid receptors in interneurons of hippocampus and dentate gyrus." Hippocampus **12**(6): 756-764.
- Morales, M., Hein, K., Vogel, Z. (2008). "Hippocampal interneurons co-express transcripts encoding the alpha7 nicotinic receptor subunit and the cannabinoid receptor 1." Neuroscience **152**(1): 70-81.
- Morales, M., Wang, S. D., Diaz-Ruiz, O., Jho, D. H. (2004). "Cannabinoid CB1 receptor and serotonin 3 receptor subunit A (5-HT3A) are co-expressed in GABA neurons in the rat telencephalon." J Comp Neurol **468**(2): 205-216.
- Munro, S., Thomas, K. L., Abu-Shaar, M. (1993). "Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids." Nature **365**(6441): 61-65.
- Nelson, K., Walsh, D., Deeter, P., Sheehan, F. (1994). "A phase II study of delta-9-tetrahydrocannabinol for appetite stimulation in cancer-associated anorexia." J Palliat Care **10**(1): 14-18.
- Nicoll, R. A. (2005). "Das Gehirn und sein Marihuana." Spektrum der Wissenschaft Juli: 49-55.

- Noyes, R., Jr., Brunk, S. F., Avery, D. A., Canter, A. C. (1975). "The analgesic properties of delta-9-tetrahydrocannabinol and codeine." Clin Pharmacol Ther **18**(1): 84-89.
- O`Mahony, S., Dinan, T.G., Keeling, P.W., Chua, A.S.B. (2006). "Central serotonergic and noradrenergic receptors in functional dyspepsia." World J. Gastroenterol **12**(17): 2681-2687.
- Okamoto, K., Imbe, H., Tashiro, A., Kumabe, S., Senba, E. (2004). "Blockade of peripheral 5HT₃ receptor attenuates the formalin-induced nocifensive behavior in persistent temporomandibular joint inflammation of rat." Neurosci Lett **367**(2): 259-263.
- Olivier, B., Molewijk, H. E., van der Heyden, J. A., van Oorschot, R., Ronken, E., Mos, J., Miczek, K. A. (1998). "Ultrasonic vocalizations in rat pups: effects of serotonergic ligands." Neurosci Biobehav Rev **23**(2): 215-227.
- Olivier, B., van Wijngaarden, I., Soudijn, W. (2000). "5-HT₃ receptor antagonists and anxiety; a preclinical and clinical review." Eur Neuropsychopharmacol **10**(2): 77-95.
- Onaivi, E. S., Green, M. R., Martin, B. R. (1990). "Pharmacological characterization of cannabinoids in the elevated plus maze." J Pharmacol Exp Ther **253**(3): 1002-1009.
- Oz, M., Ravindran, A., Diaz-Ruiz, O., Zhang, L., Morales, M. (2003). "The endogenous cannabinoid anandamide inhibits alpha₇ nicotinic acetylcholine receptor-mediated responses in *Xenopus* oocytes." J Pharmacol Exp Ther **306**(3): 1003-1010.
- Oz, M., Zhang, L., Ravindran, A., Morales, M., Lupica, C. R. (2004). "Differential effects of endogenous and synthetic cannabinoids on alpha₇-nicotinic acetylcholine receptor-mediated responses in *Xenopus* Oocytes." J Pharmacol Exp Ther **310**(3): 1152-1160.
- Papadopoulos, I. A., Georgiou, P. E., Katsimbri, P. P., Drosos, A. A. (2000). "Treatment of fibromyalgia with tropisetron, a 5HT₃ serotonin antagonist: a pilot study." Clin Rheumatol **19**(1): 6-8.
- Papke, R. L., Schiff, H. C., Jack, B. A., Horenstein, N. A. (2005). "Molecular dissection of tropisetron, an alpha₇ nicotinic acetylcholine receptor-selective partial agonist." Neurosci Lett **378**(3): 140-144.
- Pare, D., Quirk, G. J., Ledoux, J. E. (2004). "New vistas on amygdala networks in conditioned fear." J Neurophysiol **92**(1): 1-9.
- Parker, L. A., Mechoulam, R., Schlievert, C., Abbott, L., Fudge, M. L., Burton, P. (2003). "Effects of cannabinoids on lithium-induced conditioned rejection reactions in a rat model of nausea." Psychopharmacology (Berl) **166**(2): 156-162.
- Paulson, P. E., Casey, K. L., Morrow, T. J. (2002). "Long-term changes in behavior and regional cerebral blood flow associated with painful peripheral mononeuropathy in the rat." Pain **95**(1-2): 31-40.

- Pertwee, R. G. (2001). "Cannabinoid receptors and pain." Prog Neurobiol **63**(5): 569-611.
- Peters, J. A., Malone, H. M., Lambert, J. J. (1993). "An electrophysiological investigation of the properties of 5-HT₃ receptors of rabbit nodose ganglion neurones in culture." Br J Pharmacol **110**(2): 665-676.
- Phelps, E. A., LeDoux, J. E. (2005). "Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior." Neuron **48**(2): 175-187.
- Piomelli, D. (2003). "The molecular logic of endocannabinoid signalling." Nat Rev Neurosci **4**(11): 873-884.
- Piper, D., Upton, N., Thomas, D., Nicholas, J. (1988). "The effects of the 5-HT₃ receptor antagonist BRL 43694 and GR38032F in animal behavioural models of anxiety." Br. J. Pharmacol **94**: 314.
- Polder, H., Dieter Swandulla, D. (2001). "The use of control theory for the design of voltage clamp systems: a simple and standardized procedure for evaluating system parameters." J Neurosci Methods **109**(2): 97-109.
- Porter, A. C., Felder, C. C. (2001). "The endocannabinoid nervous system: unique opportunities for therapeutic intervention." Pharmacol Ther **90**(1): 45-60.
- Quick, M. W., Lester, R. A. (2002). "Desensitization of neuronal nicotinic receptors." J Neurobiol **53**(4): 457-478.
- R., G. Y. a. M. (1964). "Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish." J. Am. Chem. Soc. **86**: 1646-1647.
- Rammes, G., Eder, M., Dodt, H. U., Kochs, E., Zieglgansberger, W. (2001). "Long-term depression in the basolateral amygdala of the mouse involves the activation of interneurons." Neuroscience **107**(1): 85-97.
- Rammes, G., Eder, M., Zieglgansberger, W., Dodt, H. U. (2007). "Infrared-guided laser stimulation as a tool for elucidating the synaptic site of expression of long-term synaptic plasticity." Methods Mol Biol **403**: 113-122.
- Rammes, G., Eisensamer, B., Ferrari, U., Shapa, M., Gimpl, G., Gilling, K., Parsons, C., Riering, K., Hapfelmeier, G., Bondy, B., Zieglgansberger, W., Holsboer, F., Rupprecht, R. (2004). "Antipsychotic drugs antagonize human serotonin type 3 receptor currents in a noncompetitive manner." Mol Psychiatry **9**(9): 846-858, 818.
- Rammes, G., Palmer, M., Eder, M., Dodt, H. U., Zieglgansberger, W., Collingridge, G. L. (2003). "Activation of mGlu receptors induces LTD without affecting postsynaptic sensitivity of CA1 neurons in rat hippocampal slices." J Physiol **546**(Pt 2): 455-460.
- Rammes, G., Steckler, T., Kresse, A., Schutz, G., Zieglgansberger, W., Lutz, B. (2000). "Synaptic plasticity in the basolateral amygdala in transgenic mice expressing dominant-negative cAMP response element-binding protein (CREB) in forebrain." Eur J Neurosci **12**(7): 2534-2546.
- Reichert, H. (1990). Neurobiologie. Stuttgart, Thieme.

- Reitstetter, R., Lukas, R. J., Gruener, R. (1999). "Dependence of nicotinic acetylcholine receptor recovery from desensitization on the duration of agonist exposure." J Pharmacol Exp Ther **289**(2): 656-660.
- Rey, J. M., Martin, A., Krabman, P. (2004). "Is the party over? Cannabis and juvenile psychiatric disorder: the past 10 years." J Am Acad Child Adolesc Psychiatry **43**(10): 1194-1205.
- Robbe, D., Alonso, G., Duchamp, F., Bockaert, J., Manzoni, O. J. (2001). "Localization and mechanisms of action of cannabinoid receptors at the glutamatergic synapses of the mouse nucleus accumbens." J Neurosci **21**(1): 109-116.
- Rodgers, R. J., Cole, J. C., Tredwell, J. M. (1995). "Profile of action of 5-HT₃ receptor antagonists, ondansetron and WAY 100289, in the elevated plus-maze test of anxiety of mice." Psychopharmacology (Berl) **117**(3): 306-312.
- Roerig, B., Nelson, D. A., Katz, L. C. (1997). "Fast synaptic signaling by nicotinic acetylcholine and serotonin 5-HT₃ receptors in developing visual cortex." J Neurosci **17**(21): 8353-8362.
- Rooszendaal, B., Koolhaas, J. M., Bohus, B. (1991). "Central amygdala lesions affect behavioral and autonomic balance during stress in rats." Physiol Behav **50**(4): 777-781.
- Rueffert, H., Thieme, V., Wallenborn, J., Lemnitz, N., Bergmann, A., Rudlof, K., Wehner, M., Olthoff, D., Kaisers, U. X. (2009). "Do variations in the 5-HT_{3A} and 5-HT_{3B} serotonin receptor genes (HTR3A and HTR3B) influence the occurrence of postoperative vomiting?" Anesth Analg **109**(5): 1442-1447.
- Sah, P., Faber, E. S., Lopez De Armentia, M., Power, J. (2003). "The amygdaloid complex: anatomy and physiology." Physiol Rev **83**(3): 803-834.
- Sallan, S. E., Zinberg, N. E., Frei, E., 3rd (1975). "Antiemetic effect of delta-9-tetrahydrocannabinol in patients receiving cancer chemotherapy." N Engl J Med **293**(16): 795-797.
- Sanudo-Pena, M. C., Romero, J., Seale, G. E., Fernandez-Ruiz, J. J., Walker, J. M. (2000). "Activational role of cannabinoids on movement." Eur J Pharmacol **391**(3): 269-274.
- Schnelle, M. (2005). Indikation für Cannabis und THC - eine Übersicht. Bremen, UNI-MED Verlag AG.
- Shi, F., Li, Y. (2011). "Synthesis of gamma-aminobutyric acid by expressing *Lactobacillus brevis*-derived glutamate decarboxylase in the *Corynebacterium glutamicum* strain ATCC 13032." Biotechnol Lett.
- Siarey, R. J., Andreasen, M., Lambert, J. D. (1995). "Serotonergic modulation of excitability in area CA1 of the in vitro rat hippocampus." Neurosci Lett **199**(3): 211-214.
- Silva, A. J. (2003). "Molecular and cellular cognitive studies of the role of synaptic plasticity in memory." J Neurobiol **54**(1): 224-237.
- Silverstone, P. H., Greenshaw, A.J. (1995). "5-HT₃ receptor antagonists." Exp Opin Ther Pathol(6): 471-481.

- Silvestre, J. S., Fernandez, A. G., Palacios, J. M. (1996). "Effects of 5-HT₄ receptor antagonists on rat behaviour in the elevated plus-maze test." Eur J Pharmacol **309**(3): 219-222.
- Simoneau, II, Hamza, M. S., Mata, H. P., Siegel, E. M., Vanderah, T. W., Porreca, F., Makriyannis, A., Malan, T. P., Jr. (2001). "The cannabinoid agonist WIN55,212-2 suppresses opioid-induced emesis in ferrets." Anesthesiology **94**(5): 882-887.
- Sirota, P., Mosheva, T., Shabtay, H., Giladi, N., Korczyn, A. D. (2000). "Use of the selective serotonin 3 receptor antagonist ondansetron in the treatment of neuroleptic-induced tardive dyskinesia." Am J Psychiatry **157**(2): 287-289.
- Solinas, M., Scherma, M., Fattore, L., Stroik, J., Wertheim, C., Tanda, G., Fratta, W., Goldberg, S. R. (2007). "Nicotinic alpha 7 receptors as a new target for treatment of cannabis abuse." J Neurosci **27**(21): 5615-5620.
- Southwick, S. M., Paige, S., Morgan, C. A., 3rd, Bremner, J. D., Krystal, J. H., Charney, D. S. (1999). "Neurotransmitter alterations in PTSD: catecholamines and serotonin." Semin Clin Neuropsychiatry **4**(4): 242-248.
- Steiner, M., Lutz, B. (2006). Endocannabinoid-System und zentrales Nervensystem. Bremen, MED-UNI Verlag AG.
- Stella, N., Schweitzer, P., Piomelli, D. (1997). "A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation." Nature **388**(6644): 773-778.
- Steward, L. J., West, K. E., Kilpatrick, G. J., Barnes, N. M. (1993). "Labelling of 5-HT₃ receptor recognition sites in the rat brain using the agonist radioligand [³H]meta-chlorophenylbiguanide." Eur J Pharmacol **243**(1): 13-18.
- Stuart, G. J., Dodt, H. U., Sakmann, B. (1993). "Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy." Pflugers Arch **423**(5-6): 511-518.
- Sugita, S., Shen, K. Z., North, R. A. (1992). "5-hydroxytryptamine is a fast excitatory transmitter at 5-HT₃ receptors in rat amygdala." Neuron **8**(1): 199-203.
- Svensen, K. B., Jensen, T.S., Bach, F.W. (2004). "Does the cannabinoid dronabinol reduce central pain in multiple sclerosis? Randomised double blind placebo controlled crossover trial." BMJ: 329-253.
- Takahashi, K. A., Castillo, P. E. (2006). "The CB₁ cannabinoid receptor mediates glutamatergic synaptic suppression in the hippocampus." Neuroscience **139**(3): 795-802.
- Tramer, M. R., Carroll, D., Campbell, F. A., Reynolds, D. J., Moore, R. A., McQuay, H. J. (2001). "Cannabinoids for control of chemotherapy induced nausea and vomiting: quantitative systematic review." BMJ **323**(7303): 16-21.
- Tremblay, P. B., Kaiser, R., Sezer, O., Rosler, N., Schelenz, C., Possinger, K., Roots, I., Brockmoller, J. (2003). "Variations in the 5-hydroxytryptamine type 3B receptor gene as predictors of the efficacy of antiemetic treatment in cancer patients." J Clin Oncol **21**(11): 2147-2155.
- Trepel, M. (2004). Neuroanatomie: Struktur und Funktion. München, Urban & Fischer.

- van Hooft, J. A., Spier, A. D., Yakel, J. L., Lummis, S. C., Vijverberg, H. P. (1998). "Promiscuous coassembly of serotonin 5-HT₃ and nicotinic alpha₄ receptor subunits into Ca(2+)-permeable ion channels." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(19): 11456-11461.
- Van Hooft, J. A., Vijverberg, H.P. (2000). "5-HT₃ receptors and neurotransmitter release in the CNS: a nerve ending story?" Trend Neurosci(23): 605-610.
- Van Sickle, M. D., Oland, L.D., Mackie, K., Davison, J.S., Sharkey, K.A. (2003). "Delta-9-Tetrahydrocannabinol selectively acts on CB1 receptors in specific regions of dorsal vagal complex to inhibit emesis in ferrets." Am J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol. **285**: 566-576.
- Villemure, C., Bushnell, M. C. (2002). "Cognitive modulation of pain: how do attention and emotion influence pain processing?" Pain **95**(3): 195-199.
- Wade, D. T., Makela, B., Robson, P., House, H., Bateman, C. (2004). "Do cannabis-based medicinal extracts have general or specific effects on symptoms in multiple sclerosis? A double-blind, randomized, placebo-controlled study on 160 patients." Mult Scler **10**: 434-441.
- Walker, D. L., Davis, M. (2002). "The role of amygdala glutamate receptors in fear learning, fear-potentiated startle, and extinction." Pharmacol Biochem Behav **71**(3): 379-392.
- Ware, M. A., Doyle, C.R., Woods, R., Lynch, M.E. (2003). "Cannabis use for chronic non-cancer PAIN: results of a prospective survey." Pain **102**: 211-216.
- Wiley, J. L., Martin, B. R. (2002). "Cannabinoid pharmacology: implications for additional cannabinoid receptor subtypes." Chem Phys Lipids **121**(1-2): 57-63.
- Wobrock, T. (2009). "Cannabismisbrauch und Schizophrenie - eine komplexe Wechselbeziehung." Suchtmed **11**(3): 85-86.
- Ye, J. H., Hunt, T., Wu, W. H., McArdle, J. J. (1997). "Ondansetron modulates GABA(A) current of rat central nervous system neurons." Eur J Pharmacol **337**(1): 87-94.
- Zajicek, J., Fox, P., Sanders, H., Wright, D., Vickery, J., Nunn, A., Thompson, A. (2003). "Cannabinoids for treatment of spasticity and other symptoms related to multiple sclerosis (CAMS study): multicentre randomised placebo-controlled trial." Lancet **362**(9395): 1517-1526.
- Zhou, F. M., Hablitz, J. J. (1999). "Activation of serotonin receptors modulates synaptic transmission in rat cerebral cortex." J Neurophysiol **82**(6): 2989-2999.
- Zieglgänsberger, W., Tolle, T. R. (1993). "The pharmacology of pain signalling." Curr Opin Neurobiol **3**(4): 611-618.
- Zimmer, A., Zimmer, A. M., Hohmann, A. G., Herkenham, M., Bonner, T. I. (1999). "Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(10): 5780-5785.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

2-AG	Arachidonoylglycerol
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
AC-PKA	Adenylatcyclase-Proteinkinase A
ACSF	Künstliche Cerebrospinalflüssigkeit (artificial cerebrospinal fluid)
AD	Analog-Digital
AKP	Aktionspotential
Anandamid	N-Arachidonylethanolamin
BLA	Basolaterale Amygdala
CA	Cornu ammonis
CB	Cannabinoid
CB1 ^{-/-}	CB1- <i>knock-out</i> -Mäuse
CB1 ^{+/+}	CB1 Wildtyp-Mäuse
CeA	Zentrale Amygdala (C entral...)
CGP	353483-Aminopropyl(diethoxymethyl)phosphinsäure)
CM	Membrankapazität (C apacity...)
DAGL	Diacyl-Glycerol-Lipase
<i>D</i> -AP-5	d-(-)-2-Amino-5-phosphonopentansäure
DSI	Depolarisations-induzierte Unterdrückung der Inhibition
ECS	Endocannabinoides System
EGTA	bis-(Aminoethyl)-glycolether-N,N,N',N'-tetraacetat

eIPSC	Elektrisch evozierter inhibitorischer postsynaptischer Strom (...current)
EPSC	Exzitatorischer postsynaptischer Strom (...current)
FAAH	Fettsäureamid-Hydrolase (fatty acid amide hydrolase)
GABA	γ -Aminobuttersäure (...acid)
GAD	Glutamat Decarboxylase
GC	Gradientenkontrast (...contrast)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethan-sulfonsäure
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration (...concentration)
ILTD	Langzeitdepression der Interneurone
I _{offset}	Potentialerhaltungsstrom
i.p.	Intraperitoneal
IPSC	Inhibitorischer postsynaptischer Strom
IR	Infrarot
LA	Laterale Amygdala
LTD	Langzeitdepression
LTDi	Inhibitorische Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung
MAGL	Mono-Acylglycerol-Lipase
mCPBG	m-Chlorophenylbiguanide
mEPSC	Miniatur Exzitatorische Postsynaptische Ströme (...current)
mIPSC	Miniatur Inhibitorische Postsynaptische Ströme (...current)
MLA	Methyllycaconitin
nAch	Nikotinisches Acetylcholin
NAPE-PLD	N-Acyl-Phosphatidyl-Ethanolamin-Phospholipase d

NBQX	1,2,3,4-Tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide
NMDA	N-methyl-D-aspartat
p-IC	Photolytisch evozierter inhibitorischer Strom (... c urrent)
PNS	Peripheres Nervensystem
RNA	Ribonukleinsäure (... a cid)
R_M	Spezifischer Membranwiderstand (R esitant...)
R_s	Serienwiderstand (R esitant...)
RMP	Ruhemembranpotential
s.c.	Subkutan (... c utan)
SEM	Standardfehler (s tandard e rror of the m ean)
THC	Delta-9-Tetrahydro-cannabinol
TTX	Tetrodotoxin
UE	Untereinheit
UV	Ultraviolett
ZNS	Zentrales Nervensystem

Verwendete Substanzen**ACSF:**

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration (mM)</u>	<u>Hersteller</u>
CaCl ₂	2	Sigma Aldrich
Glucose	25	Sigma Aldrich
KCl	2,5	Sigma Aldrich
MgCl ₂	1	Sigma Aldrich
NaCl	125	Sigma Aldrich
NaHCO ₃	25	Sigma Aldrich
NaH ₂ PO ₄	1,25	Sigma Aldrich

pH \approx 7,37 (unter Sättigung mit Carbogen)

Intrazellulärlösung:

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration (mM)</u>	<u>Hersteller</u>
EGTA	0,05	Sigma Aldrich
CsCH ₄ SO ₄	130	Sigma Aldrich
HEPES	5	Sigma Aldrich
NaCl	1	Sigma Aldrich
MgCl ₂	1	Sigma Aldrich
Lidocain-Na-N-ethylchlorid	5	Sigma Aldrich

pH \approx 7,3 (mit KOH eingestellt)

Hochchloride Intrazellulärlösung:

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration (mM)</u>	<u>Hersteller</u>
EGTA	0,2	Sigma Aldrich
CsCH ₄ SO ₄	100	Sigma Aldrich
CsCl	60	Sigma Aldrich
MgCl ₂	1	Sigma Aldrich
Na ₃ -GTP	125	Sigma Aldrich
HEPES	10	Sigma Aldrich
Mg-ATP	1	Sigma Aldrich

pH ≈ 7,3 (mit CsOH eingestellt)

Weitere Chemikalien:

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Hersteller</u>
<i>D</i> -AP-5	50 µM	Ascent Scientific
O-(CNB-caged) GABA	125 µM	Invitrogen
Rimonabant	5 µM; 3 mg/kg	NIHM Chemical Synthesis and Drug Supply Program
CGP	200 µM	Novartis
NBQX	5 µM	Sigma Aldrich
Ondansetron	1, 5, 20 und 100 µM	Sigma Aldrich
Tetrodotoxin	1 µM	Sigma Aldrich
SR57227 hydrochlorid	10 µM; 1 und 3 mg/kg	Tocris Biotrend

Danksagung

Ich danke allen, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit behilflich waren, insbesondere:

Herrn Prof. Dr. Kochs für die Möglichkeit, diese Promotion an der Klinik für Anaesthesiologie durchführen zu können.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. H. Luksch, für die unkomplizierte Form der externen Betreuung sowie für die Durchsicht, Korrektur und Begutachtung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. G. Rammes für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, diese Promotion an der Klinik für Anaesthesiologie durchführen zu können, die hervorragende Betreuung meiner experimentellen Arbeit sowie für die Durchsicht, Korrektur und Begutachtung der Arbeit.

Herrn PD Dr. C. Wotjak für die Überlassung der Verhaltensdaten.

Herrn Prof. Dr. Dr. F. Holsboer, Herrn Prof. Dr. Zieglgänsberger und Herrn Dr. M. Eder, dass ich die Räumlichkeiten der AG Zieglgänsberger/Eder im Max-Planck-Institut für Psychiatrie nutzen konnte.

Dem gesamten Team der Arbeitsgruppen Zieglgänsberger/Eder am Max-Planck-Institut für Psychiatrie für die harmonische Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt vor allem Kristine und Stephan, die sehr kritisch und sorgfältig meine Arbeit durchlasen und korrigierten sowie Jens, der in der Endphase der Doktorarbeit für mich eine große Unterstützung war.

Andrea, Claudia, Coco und meinen Eltern für Ihre Hilfsbereitschaft und moralische Unterstützung.

Verzeichnis eigener Publikationen

- Haseneder, R., Kratzer, S., Kochs, E., Höfelmann, D., Auberson, Y., Eder, M., Rammes, G. (2009). "The xenon-mediated antagonism against the NMDA receptor is non-selective for receptors containing either NR2A or NR2B subunits in the mouse amygdala." Eur J Pharmacol **619**(1-3): 33-37.
- Laska, M., Bautista, R. M., Höfelmann, D., Sterlemann, V., Salazar, L. T. (2007). "Olfactory sensitivity for putrefaction-associated thiols and indols in three species of non-human primate." J Exp Biol **210**(Pt 23): 4169-4178.
- Laska, M., Höfelmann, D., Huber, D., Schumacher, M. (2006). "The frequency of occurrence of acyclic monoterpene alcohols in the chemical environment does not determine olfactory sensitivity in nonhuman primates." J Chem Ecol **32**(6): 1317-1331.