



# Neuropeptid S: Ein neues Transmittersystem im Gehirn

Kay Jüngling, Thomas Seidenbecher, Jörg Lesting, Rainer K. Reinscheid und Hans-Christian Pape

## Zusammenfassung

Das vor wenigen Jahren entdeckte Neuropeptid S stellt zusammen mit seinem Rezeptor ein hochinteressantes System der Neuromodulation mit einzigartigem Wirkungsspektrum dar. NPS steigert zum einen Wachheit und Aufmerksamkeit. Das NPS-System wirkt zum anderen anxiolytisch (angstlösend), sowohl akut auf Ängstlichkeit als auch anhaltend auf spezifische Aspekte des Furchtgedächtnisses (Verminderung von Kontextfurcht; Verbesserung von Furchtextinktion). Die Hauptquelle von NPS im Gehirn sind NPS-positive Neurone im Hirnstamm. NPS bindet an einen in Vertebraten hochkonservierten, G-Protein gekoppelten Rezeptor, dessen Stimulation zur Mobilisierung von intrazellulärem  $Ca^{2+}$  und Aktivierung von Proteinkinasen führt. In synaptischen Schaltkreisen der Amygdala, die für die Expression von Furcht sowie die Bildung und die Expression des Furchtgedächtnisses relevant sind, führen diese Wirkungen zu einer gesteigerten Freisetzung des exzitatorischen Transmitters Glutamat, vor allem in synaptischen Verbindungen zu bestimmten Populationen GABAerger Interneurone. Polymorphismen des NPSR-Gens im Menschen sind mit Veränderungen im Schlafzyklus sowie Panikerkrankungen assoziiert. Insgesamt zeigt das NPS-System ein einzigartiges Profil bezüglich Spezifität und Zeitkonstanten der Wirkung, das zum einen für die Grundlagenforschung und zum anderen für potenzielle klinische Anwendungen von großem Interesse ist.

## Abstract

**Neuropeptide S: a new transmitter system in the brain.**

The recently discovered Neuropeptide S represents – together with its cognate receptor – a highly interesting system of neuromodulation with a unique spectrum of effects. On one hand, NPS promotes wakefulness and arousal. On the other, NPS produces anxiolytic (fear reducing) effects, both on acute fear expression as well as persistent effects on specific aspects of fear memories (by reducing contextual fear memory and enhancing fear extinction). The main source of NPS in the brain are NPS-positive neurons in the brainstem. NPS is binding to a G-protein-coupled receptor that has been highly conserved among vertebrates and receptor binding stimulates mobilization of intracellular  $Ca^{2+}$  and activation of protein kinases. In synaptic circuits of the amygdala that are relevant for expression of fear or formation and recall of fear memories these effects produce enhanced release of the excitatory transmitter glutamate, especially in synaptic junctions to specialized populations of GABAergic interneurons. Polymorphisms in the human NPSR gene have been associated with changes in sleep behaviors as well as panic disorders. Overall, the NPS system displays a unique profile of specificity and temporal activity that could be highly interesting for both basic research as well as possible clinical applications.

**Keywords:** neuropeptide S; G-Protein-coupled receptor; amygdala; fear behaviour; anxiety disorder

## Einleitung

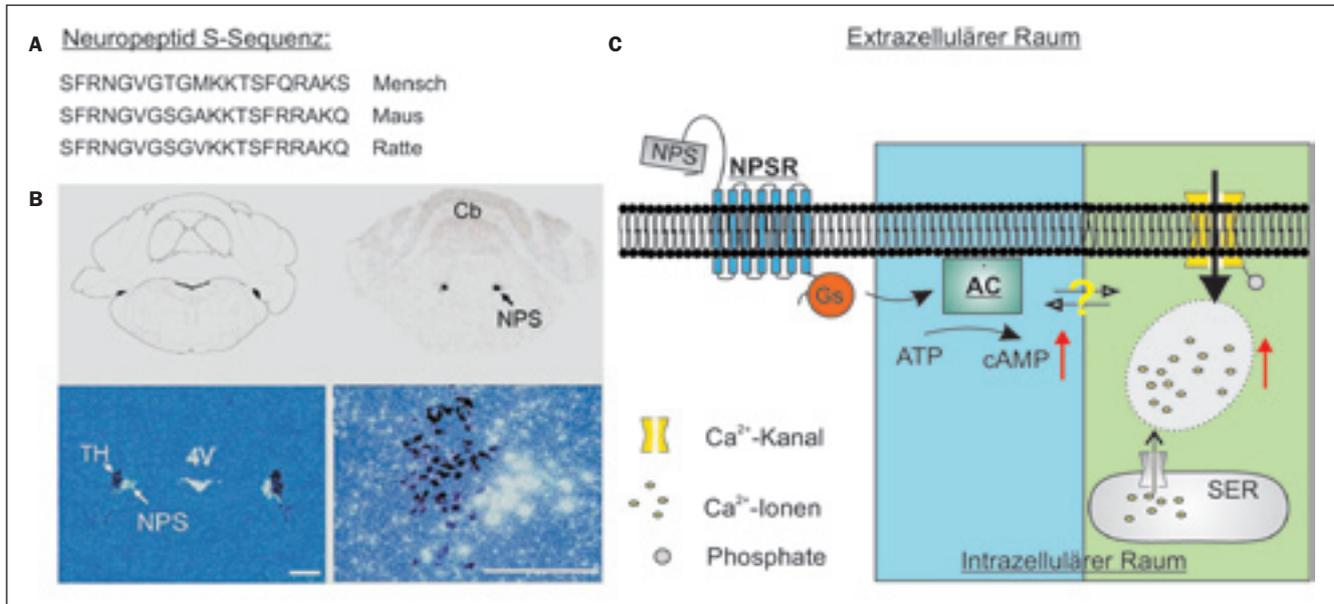
Etwa 10 bis 15% der Menschen im Alter zwischen 18 bis 65 Jahren leiden in Deutschland unter klinisch relevanten Angsterkrankungen oder posttraumatischem Stress. Chronische Angsterkrankungen führen zu erheblichen Einbußen der Lebensqualität der Betrof-

fenen. Die Erforschung der neurobiologischen Grundlagen von Angst und Stress ist demzufolge gleichsam wissenschaftlich als auch klinisch und gesundheitspolitisch von großem Interesse. Vor allem in ein besseres Verständnis intra- und interzellulärer Signalwege in den kritisch involvierten synaptischen Netzwerken des Gehirns wer-

den große Erwartungen für die Entwicklung gezielter medikamentöser Therapieansätze gesetzt. Neben der Rolle der „klassischen“ Neurotransmitter treten immer mehr die Neuropeptidsysteme in den Fokus der Forschung. Diese spielen offenbar eine zentrale Rolle bei der Modulation der Informationsübertragung in Hirnabschnitten, die mit der Äußerung von Angst und Stress in engem Zusammenhang stehen. Ein vor wenigen Jahren entdecktes Neuropeptidsystem, bestehend aus dem Neuropeptid S (NPS) und seinem Rezeptor, zeigte in ersten Verhaltensstudien ein für die Angstforschung interessantes Wirkungsspektrum. NPS wirkt in Mäusen und Ratten anxiolytisch („angstlösend“) und steigert die Wachheit der Versuchstiere (Xu et al. 2004). Darüber hinaus erbrachten genetische Studien erste Hinweise auf eine Rezeptorvariante mit deutlich reduzierter NPS - Wirksamkeit, die mit Panikerkrankungen in Verbindung zu stehen scheint (Gottlieb et al. 2007). Im Folgenden werden neue Erkenntnisse der NPS -Wirkung vorgestellt, die die Mechanismen auf molekularer, zellulärer und Verhaltensbene aufschlüsseln.

## Neuropeptid S und der Neuropeptid S-Rezeptor

Das im Jahre 2004 erstmalig beschriebene NPS und der NPS-Rezeptor (NPSR) repräsentieren ein neues Transmittersystem, das in verschiedenen Spezies vorkommt und dort vor allem - aber nicht ausschließlich - im Gehirn wirkt. Das NPS ist ein 20 Aminosäuren langes Peptid mit einer in verschiedenen Wirbeltierspezies hoch konservierten Sequenz, dessen Benennung nach dem aminoterminalen Serinrest (S) erfolgte (Abbildung 1 A). NPS entsteht durch Spaltung eines längeren Vorläuferpeptids (89 Aminosäuren in der Ratte (Xu et al. 2004)). Im Gehirn von Ratte und Maus wird NPS-mRNA mittels *in situ*-Hybridisierung vor allem in drei Kerngebieten des Hirnstammes nachgewiesen: einem Areal zwischen dem *Locus coeruleus* und *Barrington's Nucleus* (Abbildung 1 B), einer Region nahe dem *Nucleus parabrachialis lateralis*, sowie in der Nähe des sensorischen Hauptkerns (*Nucleus principalis*) des trigeminalen Systems (Xu et al. 2004). NPS wird in Neuronen exprimiert, die zusätzlich erregende bzw. stimulierende Neurotransmitter wie z.B. Glutamat, Acetylcholin oder CRF („corticotropine-releasing factor“) bilden. Welche Areale im zentralen Nervensystem von diesen NPS-positiven Neuronen innerviert werden, bleibt unbekannt und ist Gegenstand aktueller Forschungsaktivitäten. Außerhalb des ZNS wird das NPS-Vorläuferpeptid hauptsächlich in endokrinen Geweben gebildet.



**Abb. 1: NPS und der NPS-Rezeptor.** A) Das 20 Aminosäuren lange Peptid Neuropeptid S besitzt zwischen Mensch, Ratte und Maus eine hohe Sequenzhomologie. Das NPS kann in allen bisher untersuchten Tetrapoden gefunden werden, fehlt allerdings bei den Fischen. B) Nachweis von NPS-exprimierenden Zellen im Hirnstamm der Ratte mittels *in situ* Hybridisierung gegen die mRNA des NPS-Vorläuferpeptids (weiß). Die NPS-positiven Zellen liegen neben den Tyrosinhydroxylase-positiven (TH) Zellen des *Locus coeruleus*, colokalisieren aber nicht mit diesen. 4V = 4. Ventrikel, Cb = Cerebellum. C) Die Bindung von NPS an den NPS-Rezeptor (NPSR) führt über ein stimulierendes G-Protein (Gs) und der Aktivierung einer Adenylatcyclase (AC) intrazellulär zu einer vermehrten Synthese von cAMP. Des Weiteren führt die Aktivierung des NPSR zu einem Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. Diese Zunahme der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration kann durch Öffnen von Kalziumkanälen in der Zellmembran und/oder von Kanälen im endoplasmatischen Retikulum (SER) vermittelt werden. (A bis C modifiziert nach Xu et al. 2004).

Der NPSR gehört zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Weitere Bezeichnungen des Rezeptors sind: GPR154, VRR1 oder GPRA. Der NPSR wird vorwiegend im ZNS exprimiert. NPSR-mRNA findet sich zum einen in Regionen, die mit der Informationsverarbeitung des Geruchssinnes in Zusammenhang stehen (z.B. anteriore Teile des *Bulbus olfactorius*, prä-/endopiriformer Kortex). Zum anderen wurde NPSR-mRNA in Arealen des ZNS nachgewiesen, die essenziell für die Verarbeitung von furcht- und angstrelevanten Informationen sind (z.B. Amygdala und paraventriculäre Kerngebiete des Hypothalamus), sowie in Regionen, denen eine regulierende Rolle im Wach-Schlaf-Rhythmus zukommt (z.B. intralaminäre Kerne des Thalamus, präoptische und suprachiasmatische Kerne des Hypothalamus) (Xu et al. 2004). Der NPSR ist intrazellulär an G<sub>s</sub>- und G<sub>12</sub>-Proteine gekoppelt. Die Bindung des Agonisten an den Rezeptor führt auf zellulärer Ebene zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und zu einer Zunahme der cAMP-Konzentration über Aktivierung einer Adenylatcyclase (Abbildung 1 C). Zusätzlich erfolgt eine Phosphorylierung der MAPK („mitogen-activated protein kinase“). Die Bindung von NPS an seinen Rezeptor aktiviert also eine Reihe von essenziellen intrazellulären Signalkaskaden, welche ein

umfangreiches Wirkungsspektrum innerhalb der Zelle haben. Der NPSR kann durch erst kürzlich entwickelte bicyclische Piperazine (z.B. SHA66 und SHA68) effektiv blockiert werden (Okamura et al. 2008). Die Abläufe der an die Rezeptoraktivierung angeschlossenen intrazellulären Signaltransduktion sind im Detail noch nicht bekannt und bieten Anlass für weitere Untersuchungen.

Das humane NPSR-Gen enthält mindestens neun Exone und ist auf dem Chromosom 7p14 lokalisiert. Eine Reihe von Polymorphismen des NPSR sind bislang bekannt, die den Rezeptor mit einem erhöhten Risiko für Asthmaerkrankungen oder Störungen des zirkadianen Rhythmus (Gottlieb et al. 2007) in Zusammenhang bringen. Ein spezifischer Polymorphismus betrifft einen Asn-Ile-Austausch an Position 107, der zu einer veränderten Wirksamkeit des Agonisten am Rezeptor bei unveränderter Bindungsaffinität führt. Die klinische Bedeutung dieses Polymorphismus zeigen Ergebnisse einer kürzlich publizierten Studie, in der das Allel mit der weniger aktiven Isoform (NPSR Asn (107)) in einer männlichen Population von Panikpatienten unterrepräsentiert gefunden wurde, während Vergleichskohorten von Patienten mit Schizophrenie oder Aufmerksamkeitsdefizitssyndrom keine Assoziation mit einem der NPSR-Allele zeigten. Demzufolge

scheint der NPS-Rezeptor für die Pathogenese von Angst- und Panikerkrankungen von Bedeutung zu sein, möglicherweise in einer geschlechtspezifischen Anlage (Okamura et al. 2007).

#### Gezielte Kontrolle der Transmitterfreisetzung in der Amygdala durch NPS

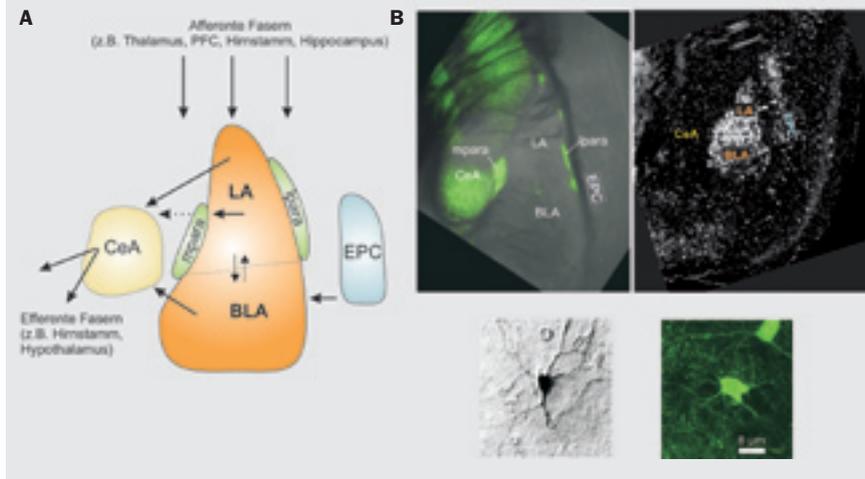
Die Amygdala stellt eine Schlüsselstation des sogenannten limbischen Systems dar, die im Temporallappen des Gehirns lokalisiert ist und aus einer Reihe anatomisch-funktionell differenzierbarer Kerngruppen aufgebaut ist (Exkurs 1). Sie spielt eine zentrale Rolle für die Verarbeitung und Äußerung von Emotionen, insbesondere für die Bildung und die Stabilisierung angstrelevanter Gedächtnisspuren. Für die Signalverarbeitung innerhalb der Amygdala sind neben exzitatorischen Projektions- oder Prinzipalneuronen vor allem Interneurone von Bedeutung, die den inhibitorischen Transmitter Gamma-Aminobuttersäure (GABA) enthalten. Diese GABAergen Interneurone existieren in zwei Hauptpopulationen: zum einen als lokale Interneurone, die inhibitorische Wechselwirkungen innerhalb der Kerngruppen vermitteln, und zum anderen in Gruppen von Neuronen, die zwischen den Kerngruppen angeordnet sind und die demzufolge als interka-



## Exkurs 1

### Funktionelle und strukturelle Organisation der Amygdala in der Maus

A) Kernstrukturen der Amygdala. Die Amygdala, eine im Temporallappen des Gehirns gelegene Struktur, besteht aus einer Reihe von Kerngebieten und Regionen. Hier stark vereinfacht dargestellt: die laterale Amygdala (LA), und die basolaterale Amygdala (BLA), die zusammen mit der basomedialen Amygdala den basolateralen Komplex bildet, sowie die zentrale Amygdala (CeA). Lateral und medial des basolateralen Komplexes befinden sich Ansammlungen von inhibitorischen Interneuronen in den sogenannten interkalierten oder paracapsulären Gruppen, die in einen lateralen und medialen Teil untergliedert werden (lpara und mpara). Die LA erhält afferenten Zustrom aus verschiedenen Hirnregionen (z.B. Thalamus, präfrontaler Kortex (PFC), Hirnstamm, Hippocampus) und projiziert ihrerseits sowohl in die BLA als auch in die CeA. Eine Subpopulation von Neuronen der LA innerviert die mpara-Interneurone, die ihrerseits inhibitorisch auf die Neurone der CeA verschaltet sind. Die BLA erhält Informationen aus der LA, dem



lierte oder parakapsuläre Neurone bezeichnet werden. Diese interkalierten, parakapsulären Neurone werden wiederum in zwei Teilgruppen unterschieden: eine laterale parakapsuläre Gruppe, die vor der Haupteingangsstation der Amygdala, dem lateral/basolateralen Kernkomplex (LA/BLA), gelegen ist, sowie einer medialen parakapsulären Gruppe, die vor der Hauptaussgangsstation der Amygdala, dem zentralen Kernkomplex (CeA), angesiedelt ist (Exkurs 1). Aus dieser anatomischen Lage wird bereits die Hauptfunktion der lateralen

endopiriformen Kortex (EPC) und anderen Hirnregionen und sendet Informationen in die LA und CeA. Die zentrale Amygdala ist der Hauptaussgang der Information aus der Amygdala und sendet Fasern zum Beispiel in den Hirnstamm und Hypothalamus.

B) Identifizierung von GABAergen Neuronen und NPS-Rezeptoren in der Amygdala der Maus. In einer transgenen GAD67-GFP-Maus (oben links) sind GABAerge Neurone selektiv über das GABA-Syntheseenzym „Glutamic Acid Decarboxylase“ (GAD) durch das „Green Fluorescent Protein“ (GFP) markiert (Tamamaki et al. 2003). In einem Himschnittpräparat der Amygdala sind die GABAergen Neurone durch die GFP-Markierung gut identifizierbar, vor allem die der parakapsulären Areale (mpara und lpara) und die der CeA. Bei höherer Vergrößerung sind die Projektionsneurone (unten links; intrazellulär gefärbt mit Biocytin) und die GABAergen Interneurone (unten rechts; Fluoreszenzaufnahme eines GAD67-GFP positiven Interneurons) morphologisch unterscheidbar. Der Nachweis der NPS-RezeptormRNA mittels *in situ*-Hybridisierung (oben rechts) zeigt, dass der NPSR vorwiegend in Bereichen der lateralen Amygdala und dem endopiriformen Kortex lokalisiert ist.

und parakapsulären GABAergen Neurone angezeigt: Kontrolle der Eingangs- und Ausgangssignale der Amygdala. Wichtige afferente Eingangssysteme der Amygdala vermitteln sensorische Signale, vor allem aus dem Thalamus und aus dem Kortex. Der Transmitter NPS greift modulierend in dieses Netzwerk der Signalverarbeitung ein. Der NPSR wird von exzitatorischen Projektionsneuronen in LA und BLA sowie von den Projektionsneuronen des endopiriformen Kortex (EPC) exprimiert (Exkurs 1 B). In

Hirnschnittpräparaten von Mäusen konnten Meis et al. (2008) mittels elektrophysiologischer Messungen an einzelnen Neuronen des EPC zeigen, dass nach Applikation von NPS in diesen Zellen ein depolarisierender Membranstrom ausgelöst wird, der eine Steigerung der Zellerregbarkeit zur Folge hat (Abbildung 2 EPC). Die Projektionsneurone des EPC (EPC PN) wirken über den Transmitter Glutamat erregend auf die Zielneurone in der Amygdala. Die gesteigerte Aktivität der EPC PN hat innerhalb des basolateralen Komplexes der Amygdala zwei Auswirkungen (Abbildung 2 BLA): zum einen eine gesteigerte Antwort in den direkt monosynaptisch verbundenen Projektionsneuronen sowie in den lokalen inhibitorischen Interneuronen, die als erhöhte Frequenz spontaner exzitatorischer postsynaptischer Ströme (sEPSCs) in beiden Neuronentypen im Experiment bestimmt werden kann (Abbildung 2 BLA 1). Zum anderen sind die lokalen Interneurone über die GABAergen Synapsen mit den Projektionsneuronen der BLA verschaltet, sodass sich die NPS-Wirkung in den Projektionsneuronen auch in einer Erhöhung der durch die Interneurone vermittelten inhibitorischen (di-)synaptischen, postsynaptischen Ströme (sIPSCs) abbildet (Abbildung 2 BLA 2).

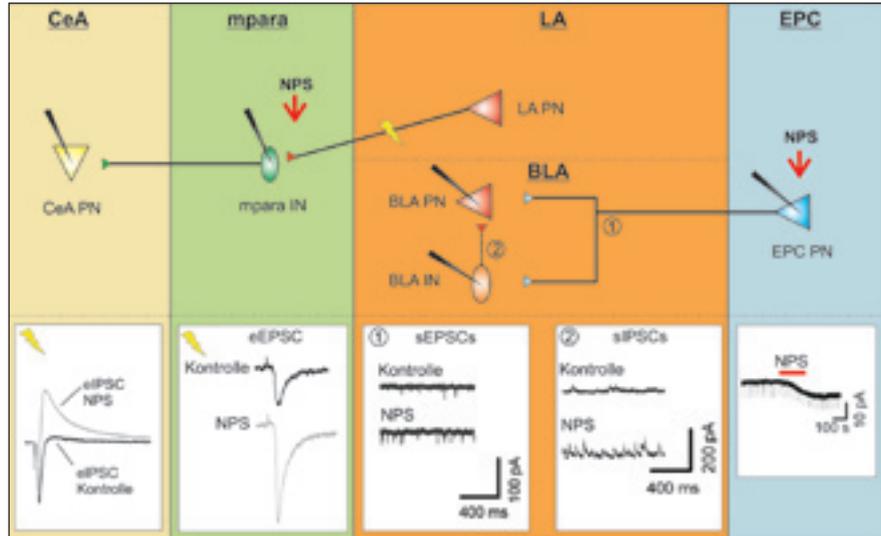
In einer zweiten Arbeit im selben Jahr zeigten Jüngling et al. (2008) einen spezifisch-regulierenden Effekt von NPS direkt im synaptischen Netzwerk der Amygdala. Wichtige Grundlage war der Nachweis einer zelltypspezifischen Expression von NPSR in den Projektionsneuronen der Amygdala, insbesondere von LA/BLA. In den GABAergen Interneuronen selbst wird der NPSR nicht exprimiert. Eine Subpopulation der LA-PN bildet erregende Synapsen auf die medial parakapsulären Interneurone (mpara) aus, die zwischen dem LA/BLA-Komplex und der zentralen Amygdala (CeA) lokalisiert sind (Exkurs 1). Durch elektrische Stimulation mittels einer extrazellulären Reizelektrode innerhalb der LA konnte die synaptische Übertragung auf die mpara-Interneurone ausgelöst und die postsynaptische Antwort (eEPSC) registriert werden (Abbildung 2 mpara). Die Aktivierung des NPSR durch Applikation von NPS führte zu einer deutlichen Zunahme der evozierten postsynaptischen Ströme an den mpara-IN. Gleichzeitig erhöhte sich die Freisetzungswahrscheinlichkeit des Transmitters an den präsynaptischen Endigungen der LA-PN. Diese Befunde deuten auf eine spezifische Modulation der synaptischen Übertragung zwischen LA-PN und mpara-IN hin. Der genaue Mechanismus der erhöhten Transmitterausschüttung ist bisher ungeklärt. Denkbar ist, dass eine Aktivierung der präsynaptischen Proteinkinase A

(PKA) durch cAMP zu einer veränderten Freisetzungswahrscheinlichkeit führt. Dieser Mechanismus konnte bereits an präsynaptischen Terminalen des LA/BLA-Komplexes nachgewiesen werden. Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass eine gesteigerte synaptische Exzitation der mpara-IN eine Erhöhung ihrer eigenen Aktivität zur Folge hat. Diese Vermutung konnte indirekt durch Ableitungen von biphasischen, postsynaptischen Strömen an Projektionsneuronen der zentralen Amygdala (CeA) bestätigt werden. Biphasische Ströme setzen sich aus einem monosynaptischen, (direkt) erregenden und einer di-synaptischen (vermittelt durch ein zwischengeschaltetes Interneuron), inhibitorischen Stromkomponente (IPSC) zusammen (Abbildung 2 CeA). Bei Ableitungen dieser biphasischen Ströme an CeA-PN, die durch extrazelluläre Reizung innerhalb der LA evoziert wurden, zeigte sich, dass die Applikation von NPS spezifisch die IPSC-Komponente der postsynaptischen Antwort erhöht, während die exzitatorische Komponente unverändert bleibt. Es tritt demnach eine verstärkte vorwärtsgerichtete Inhibition der CeA-PN auf, welche wahrscheinlich durch die mpara-IN vermittelt wird.

Die Arbeiten von Meis et al. (2008) und Jüngling et al. (2008) verdeutlichen in einem ersten Ansatz, dass NPS über den NPSR in der Lage ist, sowohl den afferenten als auch den efferenten Informationsfluss der Amygdala gezielt zu modulieren.

### Verringerte Ängstlichkeit und moduliertes Furchtgedächtnis unter Wirkung von NPS

Welche system- und verhaltensphysiologischen Konsequenzen hat diese sehr spezifische Regulation der synaptischen Funktionen in der Amygdala durch NPS? In ersten experimentellen Studien wurde die Wirkung von NPS in Verhaltenstests in Nagetieren untersucht. Die intracerebroventrikuläre Injektion (i.c.v.) von NPS führte bei Mäusen zu einer erhöhten Ausschüttung von „Corticotropine-releasing hormone“ (CRH) und Adrenocorticotropin in das Plasma über eine Aktivierung der sogenannten Stressachse (Smith et al. 2006) sowie zu einer verringerten Dauer verschiedener Schlafstadien (Xu et al. 2004). Begleitend zeigte sich eine unter NPS dosisabhängig erhöhte lokomotorische Aktivität (Abbildung 3 A). Jüngere Studien verwendeten anstelle der i.c.v. - Injektion eine bilateral lokale Applikation von NPS in die Amygdala und benachbarte Regionen in Kombination mit spezifischen Verhaltenstests auf Ängstlichkeit und Furchtgedächtnis.



**Abb. 2: NPS moduliert die synaptische Transmission in furchtrelevanten Arealen. EPC:** Die Applikation von NPS im endopiriformen Kortex (EPC) führt in den Projektionsneuronen (EPC PN) zu einem depolarisierenden Einwärtsstrom und erhöht die Erregbarkeit dieser Zellen. **BLA:** In der basolateralen Amygdala (BLA) kommt es dadurch zu einer Zunahme der spontanen exzitatorischen postsynaptischen Ströme (sEPSCs) in den BLA-Projektionsneuronen und Interneuronen (1; BLA PN und BLA IN). Getrieben durch diese Erhöhung der erregenden Eingänge steigt auch die Frequenz der inhibitorischen postsynaptischen Ströme (sIPSCs) in den BLA PN (2; EPC und BLA modifiziert nach Meis et al. 2008). **mpara:** In Anwesenheit von NPS steigt die Amplitude von eEPSCs, die durch Stimulation in der LA ausgelöst werden, in mpara-Interneuronen (mpara) signifikant um mehr als 200% an. NPS wirkt hier direkt auf die präsynaptische Transmitterfreisetzung. **CeA:** In Projektionsneuronen der zentralen Amygdala (CeA PN) kommt es bei Stimulation in der LA in Anwesenheit von NPS zu einer deutlichen Zunahme der inhibitorischen Komponente (eIPSC) disynaptischer Ereignisse. Dies deutet auf eine verstärkte vorwärtsgerichtete Hemmung hin, die wahrscheinlich über die mpara-IN vermittelt wird. (mpara und CeA modifiziert nach Jüngling et al. 2008).

Ängstlichkeit und Furchtverhalten lassen sich zuverlässig mit einer Reihe von standardisierten Verhaltenstests in Nagetieren überprüfen (Exkurs 2). Zur Überprüfung der generellen Ängstlichkeit wird zum Beispiel der sogenannte Test im offenen Feld („*open field test*“) verwendet. In diesem Test haben die Tiere in einem wandumgebenen Terrain die Möglichkeit, entweder die „geschützten und sicheren“ Randbereiche oder die „ungeschützten und unsicheren“ Areale des Zentrums aufzusuchen. Als akuter Effekt von NPS zeigte sich sowohl nach i.c.v. - Injektion (Xu et al. 2004) als auch nach lokaler bilateraler Applikation in den LA/BLA-Komplex (Jüngling et al. 2008) eine signifikante Abnahme der generellen Ängstlichkeit. Indikatoren dieses anxiolytischen Effekts sind vermehrte Aufenthaltsdauer und Aktivität der Tiere im zentralen „ungeschützten“ Bereich im „open field“-Test. Nach i.c.v.-Injektion bewirkt NPS darüber hinaus eine gesteigerte lokomotorische Aktivität (Abbildung 3 A unten), die nach lokaler Applikation in die amygdalären Kerngebiete nicht auftritt (Jüngling et al. 2008). Andere Tests auf Ängstlichkeit,

wie „elevated plus maze“ oder „light-dark avoidance“, bestätigten die anxiolytische Wirkung von NPS in der Amygdala (Jüngling et al. 2008). Um zwischen der Wirkung des exogenen NPS und der Wirkung des endogenen NPS-Systems zu unterscheiden wurde ein spezifischer NPSR-Antagonist (SHA68) in die Amygdala injiziert. Tatsächlich zeigte dieser eine anxiogene Wirkung in den verschiedenen Verhaltenstests, sodass von einer endogen-anxiolytischen Wirkung des NPS-Systems ausgegangen werden kann (Jüngling et al. 2008). Die Bedingungen und Mechanismen, unter denen NPS freigesetzt wird, bleiben allerdings unbekannt.

Ein etabliertes Modell für emotionales Gedächtnis ist die Pawlowsche Furchtkonditionierung, die in tierexperimentellen Ansätzen sowie – in modifizierter Form – auch im Menschen angewendet wird (LeDoux 2000). In diesem Paradigma wird ein aversiver Stimulus (unkonditionierter Reiz, US; z.B. kurzer elektrischer Fußreiz) mit einem neutralen Stimulus (konditionierter Reiz, CS) assoziiert, wenn diese zeitlich korrelieren (Exkurs 2). Der konditionierte Stimulus kann



## Exkurs 2

### Generelle Ängstlichkeit und konditionierte Furcht im Verhaltensversuch

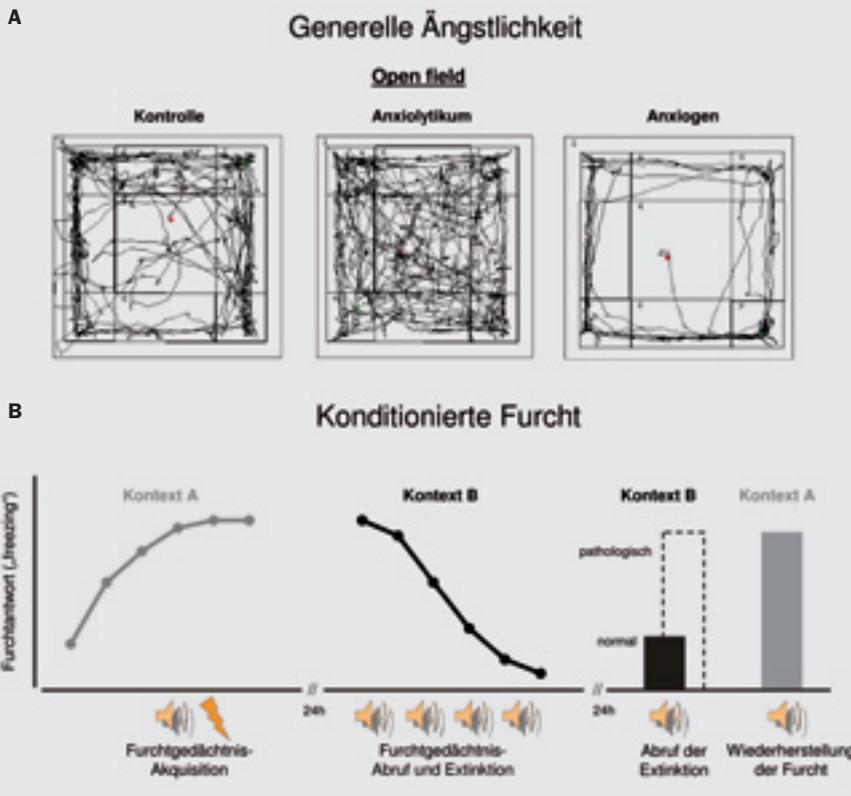
A) Eine Reihe von etablierten Verhaltenstests dient der Überprüfung genereller Ängstlichkeit. Hier ist der „open-field“-Test dargestellt: Das Zentrum der Versuchsanordnung stellt für das Tier ein aversives, ungeschütztes Areal dar. Die Tendenz, diesen Bereich zu meiden, gilt als Maß für die Ängstlichkeit eines Tieres. Dargestellt sind die Laufwege einer Maus mit Blick auf die Testarena von oben. Der Startpunkt ist rot markiert. Unter Kontrollbedingungen hält sich das Versuchstier bevorzugt in den Randbereichen der Versuchsanordnung auf, unterbrochen durch kurzzeitige Explorationen im Zentrum. Unter der Wirkung angstlösender Pharmaka (Anxiolytika) erhöhen sich Aufenthaltsdauer und Laufwege im Zentrum, während Angst induzierende Pharmaka (Anxiogene) eine entgegengesetzte Wirkung entfalten.

B) Die Pawlowsche Furchtkonditionierung ist ein etabliertes experimentelles Modell für erlernte Furcht („Furchtge-

dächtnis“). Während der Akquisition wird z.B. ein Ton (bedingter Reiz, conditioned stimulus CS) wiederholt mit einem aversiven Reiz (unbedingter Reiz, unconditioned stimulus US) in einem spezifischen Kontext (Kontext A) gepaart. Die Paarung von bedingtem und unbedingtem Reiz führt zu einer konditionierten Furchtantwort („freezing“), selbst bei alleiniger Präsentation des bedingten Reizes (conditioned response) in einem neutralem Kontext (Kontext B). Die typischerweise hohe Furchtantwort nach Abruf des Furchtgedächtnisses nimmt bei wiederholter (alleiniger) Präsentation des konditionierten CS ab, den Vorgang des Extinktionslernens anzeigend. Die Konsolidierung der Extinktion kann wiederum zu einem späteren Zeitpunkt überprüft werden (Abruf der Extinktion). Nach erfolgreicher Extinktion bewirkt die Konfrontation mit dem CS im initialen Kontext A eine Wiederherstellung („renewal“) der Furcht, angezeigt durch die Steigerung der konditionierten Furchtantwort. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis darauf, dass die initiale Gedächtnisspur durch Extinktion nicht gelöscht wurde, sondern kontextabhängig abrufbar bleibt. (modifiziert nach Jüngling et al. 2008, Quirk und Mueller 2008).

spezifisch objekt- (Verwendung z.B. eines Tons oder Lichtreizes) oder kontextbezogen (Verwendung z.B. olfaktorischer, visueller, taktiler Umgebungsreize) sein. Nach dem Training (CS-US-Paarungen) wird das assoziative Furchtgedächtnis durch Präsentation des CS überprüft, wobei ein Furchtverhalten sehr zuverlässig durch das sogenannte „freezing“ (Schreckstarre) angezeigt wird. Beobachtungen zu unterschiedlichen Zeiten nach Training lassen Kurz- und Langzeitgedächtnisphasen erkennen. Bei wiederholter Präsentation des CS ohne aversiven Reiz wird typischerweise eine abklingende Furchtreaktion beobachtet, die die sogenannte Gedächtnisextinktion anzeigt. Gängige Theorien weisen der Extinktion einen erneuten Lern- und Gedächtnisvorgang zu, demzufolge Extinktion weniger ein „Löschen“ von Gedächtnisinhalten als eine Neuanlage einer Gedächtnisspur darstellt, die mit der initialen Gedächtnisspur quasi konkurriert. Für diese Hypothese spricht das auch nach Extinktion zu beobachtende, spontane oder induzierte Wiederauftreten der initialen Gedächtnisinhalte. Dieses Wiederauftreten ist für Furcht und Ängstlichkeit zum Beispiel im Rahmen des Wiedererlebens von traumatischen Ereignissen von erheblicher klinischer Bedeutung.

Demzufolge wurde die Wirkung von NPS auf das emotionale Gedächtnis in tierexperimentellen Ansätzen unter Anwendung der Pawlowschen Furchtkonditionierung erfasst. Dabei wurden einerseits spezifisch objektbezogene und kontextbezogene Aspekte des Furchtgedächtnisses unterschieden, und andererseits die Gedächtnisbildung, -stabilisierung und -extinktion vergleichend betrachtet. Nach Kontextkonditionierung in Mäusen führte die lokale Injektion von NPS in den endopiriformen Kortex (EPC) zu einer deutlichen Abnahme des konditionierten Furchtverhaltens über die Zeit (Abbildung 3 B). Im Gegensatz dazu trat kein Effekt von NPS auf die Bildung, die Konsolidierung und den Abruf des spezifisch objektbezogenen Furchtgedächtnisses auf (Meis et al. 2008; Jüngling et al. 2008). Erst in den Experimenten zur Extinktion des Furchtgedächtnisses zeigte sich ein spezifischer Einfluss dieses Transmitters. Nach lokaler Injektion von NPS in den LA/BLA-Komplex der Amygdala wurde eine beschleunigte Abnahme der konditionierten Furchtantwort bei wiederholter Präsentation des furchtkonditionierten Reizes (CS) beobachtet, ein beschleunigtes Extinktionslernen andeutend. Entsprechend zeigten Mäuse, in denen das endogene NPS-System durch den spezifischen NPSR-Antagonisten SHA68 blockiert wurde, ein deutlich verzögertes Extinktionslernen sowie eine Verschlechterung von Konsolidierung und Abruf der Extinktion



nach 24 Stunden (Abbildung 3 C; Jüngling et al. 2008). Weder die Expression der Furcht noch die Bildung des Furchtgedächtnisses als solche waren unter Wirkung von NPS beeinflusst.

Zusammengefasst wirkt das NPS-System sowohl akut anxiolytisch als auch anhaltend auf spezifische Aspekte des Furchtgedächtnisses (Verminderung von Kontextfurcht; Verbesserung von Furchtextinktion) und besitzt damit ein für potenzielle klinische Anwendungen höchst interessantes Wirkprofil.

**Literatur**

Gottlieb, D.J., O'Connor, G.T. und Wilk, J.B. (2007): Genome-wide association of sleep and circadian phenotypes. *BMC Med Genet.* 19:8;

Jüngling, K., Seidenbecher, T., Sosulina, L., Lesting, J., Sangha, S., Clark, S.D., Okamura, N., Duangdao, D.M., Xu, Y.L., Reinscheid, R.K. und Pape, H.C. (2008): Neuropeptide S-mediated control of fear expression and extinction: role of intercalated GABAergic neurons in the amygdala. *Neuron* 31;59(2): 298-310.

LeDoux, J. (2000): Emotion circuits in the brain. *Annual Reviews Neuroscience* 23: 727-738.

Meis, S., Bergado-Acosta, J.R., Yanagawa, Y., Obata, K., Stork, O. und Munsch, T. (2008): Identification of a neuropeptide S responsive circuitry shaping amygdala activity via the endopiriform nucleus. *PLoS ONE* 16;3(7): e2695.

Okamura, N., Hashimoto, K., Iyo, M., Shimizu, E., Dempfle, A., Friedel, S. und Reinscheid, R.K. (2007): Gender-specific association of a functional coding polymorphism in the Neuropeptide S receptor gene with panic disorder but not with schizophrenia or attention-deficit/hyperactivity disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1;31(7): 1444-8.

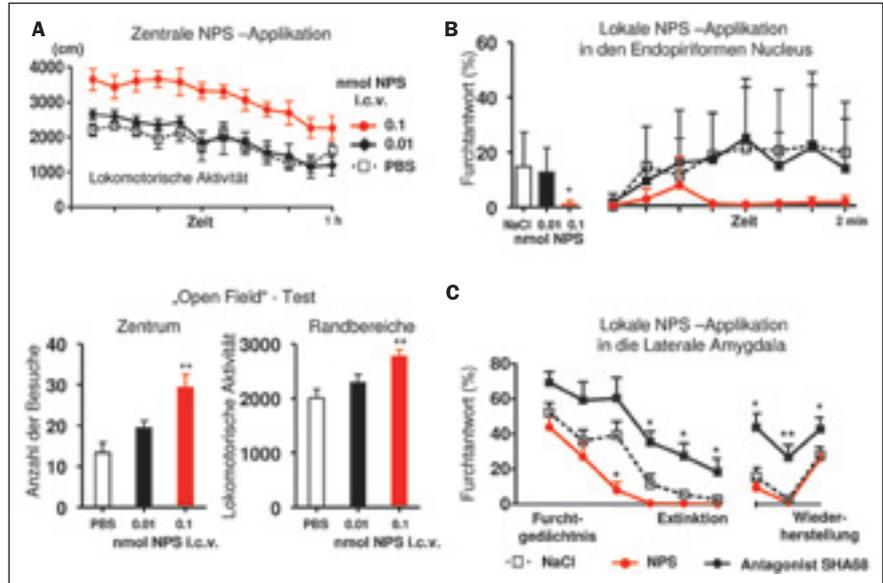
Okamura, N., Habay, S.A., Zeng, J., Chamberlin, A.R. und Reinscheid, R.K. (2008): Synthesis and pharmacological in vitro and in vivo profile of 3-oxo-1,1-diphenyl-tetrahydro-oxazolo[3,4-a]pyrazine-7-carboxylic acid 4-fluoro-benzylamide (SHA 68), a selective antagonist of the neuropeptide S receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 325(3): 893-901.

Quirk, G.J. und Mueller, D. (2008): Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology* 33(1): 56-72.

Smith, K.L., Patterson, M., Dhillon, W.S., Patel, S.R., Semjonous, N.M., Gardiner, J.V., Ghatei, M.A. und Bloom, S.R. (2006): Neuropeptide S stimulates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and inhibits food intake. *Endocrinology* 147(7): 3510-8.

Tamamaki, N., Yanagawa, Y., Tomioka, R., Miyazaki, J., Obata, K. und Kaneko, T. (2003): Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J Comp Neurol* 1;467(1): 60-79.

Xu, Y.L., Reinscheid, R.K., Huitron-Resendiz, S., Clark, S.D., Wang, Z., Lin, S.H., Brucher, F.A., Zeng, J., Ly, N.K., Henriksen, S.J., de Lecea, L. und Civelli, O. (2004): Neuropeptide S: a neu-



**Abb. 3: Effekte zentraler und lokaler Applikation von NPS auf das Verhalten. A) Oberer Teil: Die zentrale Gabe von NPS (intracerebroventriculäre [i.c.v.] Applikation, fünf Minuten vor Testbeginn) induziert eine signifikante konzentrationsabhängige Hyperlokomotion in naiven Mäusen in einer neuen und unbekanntem neutralen Testapparatur. Unterer Teil: Im sogenannten „open-field“-Test bewirkt die i.c.v.-Gabe von NPS einen anxiolytischen Effekt, der in einem (dosisabhängig) signifikant häufigeren Aufsuchen des „ungeschützten“ Zentrums sichtbar wird (Mittelwerte ± SEM; \*\* p<0.01 im Vergleich zum Vehikel PBS). Darüber hinaus nehmen die Laufwege in den „geschützten“ Randbereichen zu, vermutlich aufgrund des lokomotorischen Effektes von NPS (modifiziert nach Xu et al. 2004). B) Die lokale Injektion von NPS in den endopiriformen Nucleus führt zu einer dosisabhängigen Verringerung kontextkonditionierter Furchtantworten. Im Zeitverlauf des Abrufs des kontextuellen Furchtgedächtnisses über zwei Minuten (30 min nach NPS-Gabe) werden signifikant verringerte Furchtantworten im Vergleich zu Kontrolltieren nach NaCl-Injektion deutlich (0.1 nmol, roter Balken und rote Spur, Mittelwerte + SEM; \* p<0.05) (modifiziert nach Meis et al. 2008). C) Während des Extinktionslernens nehmen objektbezogene (CS) konditionierte Furchtantworten (Furchtgedächtnis) kontinuierlich ab (Extinktion), können allerdings kontextabhängig wieder hergestellt werden (Wiederherstellung). Lokale Injektion von NPS in die Amygdala hat keine Veränderung der initialen konditionierten Furchtantwort zur Folge, bewirkt allerdings eine signifikant beschleunigte Furchtextinktion. Der NPSR-Antagonist (SHA68) bewirkt dagegen eine signifikante Beeinträchtigung der Furchtextinktion. Dargestellt sind gemittelte Ergebnisse (+ S.E.M.) von Furchtantworten in Mäusen nach Pawlowscher Furchtkonditionierung. \* p < 0,05, \*\* p<0.01 (modifiziert nach Jüngling et al. 2008).**

ropeptide promoting arousal and anxiolytic-like effects. *Neuron* 19;43(4): 487-97.

**Kurzbiografien**

**Kay Jüngling:** 1997 bis 2002 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum mit dem Schwerpunkt Zellbiologie. Von 2002 bis 2006 Promotion in Biologie an der Ruhr-Universität Bochum in der Arbeitsgruppe von Dr. K. Gottmann. Titel der Dissertation: „Molekulare Mechanismen von Synaptogenese Prozessen“. Während der Promotion Stipendiat im DFG-Graduiertenkolleg 736: „Development and Plasticity of the Nervous System“. Anschließend Post-Doc bei K. Gottmann an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Seit Mitte 2006 Post-Doc bei

Prof. H.-C. Pape an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster.

**Thomas Seidenbecher:** studierte von 1981-1986 Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. 1995 promovierte er am Institut für Neurobiologie und Hirnforschung in Magdeburg in der Abteilung von K. Reymann und war anschließend als Postdoktorand im Institut für Physiologie der Otto-von-Guericke-Universität in Magdeburg bei Hans-Christian Pape tätig (1996-2004). Seit 2005 ist er wiss. Assistent im Institut für Physiologie I der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster. Gemeinsam mit Hans-Christian Pape und Kai Jüngling erhielt er 2008 den Forschungspreis der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster.



**Jörg Lesting:** hat Biologie an der Universität Bielefeld studiert und in der Abteilung für Neuroanatomie von Gertraud Teuchert-Noodt an der biologischen Fakultät promoviert (2005). Seit 2006 arbeitet er als Postdoc am Institut für Physiologie I (Neurophysiologie) an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster.

**Rainer K. Reinscheid:** hat an der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster von 1983-1988 Pharmazie studiert und dann 1993 am Zentrum für Molekulare Neurobiologie der Universität Hamburg promoviert. Nach einer Zeit als Postdoktorand bei Hoffmann-La Roche in Basel (1993-1997) wurde er für kurze Zeit Nachwuchsgruppenleiter an der Universität Hamburg bevor er im Jahr 1999 zur University of California in Irvine ging. Dort ist er derzeit Associate Professor im Department of Pharmaceutical Sciences. Auszeichnungen: 2004 Young Investigator Award der National Alliance for Research on Schizophrenia and Depression (NARSAD).

**Hans-Christian Pape:** hat Biologie an der Ruhr-Universität Bochum studiert, in der Abteilung für Neurophysiologie von Ulf Eysel an der Medizinischen Fakultät promoviert (1986) und in Physiologie habilitiert (1993). Er war von 1994 bis 2004 Direktor des Instituts für Physiologie an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg und dort Sprecher des SFB 426 „Limbische Strukturen und Funktionen“. Seit Ende 2004 leitet er das Institut für Physiologie I (Neurophysiologie) an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, wo er 2008 den transregionalen SFB-TRR58 „Furcht, Angst, Angsterkrankungen“ gemeinsam mit Christian Büchel/Hamburg und Jürgen Deckert/Würzburg initiierte und als Sprecher vertritt. Auszeichnungen: 1990 Bennigsen-Förderpreis NRW, 1993 Heisenberg-Stipendium der DFG, 1997 Forschungspreis der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, 1999 Gottfried-Wilhelm-Leibniz-Preis der DFG, 2006 Lehrer des Jahres Universität Münster, 2007 Max-Planck-Forschungspreis, 2008 Forschungspreis der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster (gemeinsam mit Kay Jüngling und Thomas Seidenbecher).

#### Korrespondenzadresse

**Hans-Christian Pape**  
 Institut für Physiologie I  
 Westfälische Wilhelms-Universität Münster  
 Robert-Koch-Str. 27A, 48149 Münster  
 E-Mail: papechris@ukmuenster.de  
 homepage: <http://physiologie1.klinikum.uni-muenster.de>

## ARTIKEL DES QUARTALS

Vorgestellt von Dietmar Schmitz, Stephan Sigrist, Sarah Shoichet, Neurowissenschaftliches Forschungszentrum der Charité, Charitéplatz 1, 10117 Berlin

### Functional proteomics identify cornichon proteins as auxiliary subunits of AMPA receptors.

Schwenk, J.\*, Harmel, N.\*, Zolles, G.\*, Bildl, W., Kulik, A., Heimrich, B., Chisaka, O., Jonas, P., Schulte, U., Fakler, B., Klöcker, N.

\* these authors contributed equally to this work

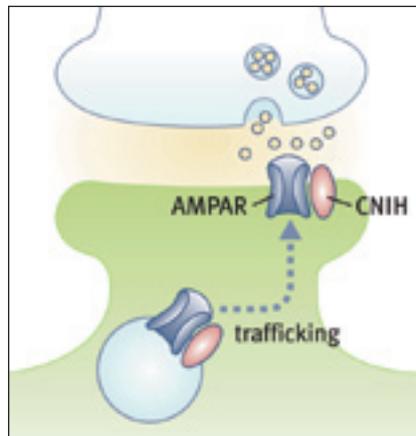
Erschienen in: *Science*. 2009 Mar 6;323(5919):1313-9.

Synaptische Kommunikation wird im zentralen Nervensystem vornehmlich von AMPA-Rezeptoren (AMPA-Rs) vermittelt. Die Regulierung synaptischer AMPARs ist von besonderem Interesse, weil plastische Veränderungen in der Lokalisation und Funktion dieser Rezeptoren vermutlich bestimmten Formen von Lernen und Gedächtnis zugrunde liegen.

AMPA-Rezeptoren interagieren robust mit einer Familie von Proteinen, den sogenannten *Transmembranären AMPAR-Regulatorischen Proteinen* (TARPs). TARPs regulieren sowohl die Oberflächenexpression als auch die biophysikalischen Eigenschaften von AMPARs (Nicoll et al. 2006; Ziff 2007). Stargazin, das prototypische TARP, wurde ursprünglich als

entscheidend notwendig für die Oberflächenexpression von AMPARs und deren postsynaptische Lokalisation in den Körnerzellen des Kleinhirns identifiziert (Chen et al. 2000). Zusätzlich zu Stargazin, auch  $\gamma$ -2 genannt, umfasst die TARP-Familie noch  $\gamma$ -3, -4, -5, -7 und -8. Diese transmembranären Proteine sind im ZNS weit verbreitet und ihre biologische Funktion ist eng mit der der AMPARs verbunden – von der Synthese bis hin zur Oberflächenexpression und zur synaptischen Lokalisation. TARP-Proteine werden durch Sequenzmotive in ihrem intrazellulären Carboxy-Terminus, die an PDZ-Domänen von Gerüstproteinen wie z.B. PSD-95 binden, an die Postsynapse lokalisiert. Darüber hinaus sind TARPs potente Modulatoren der Biophysik und Pharmakologie von AMPAR: Sie verlangsamen die Deaktivierung und Desensibilisierung der Kanäle, und vergrößern ihre Einzelkanal-Leitfähigkeit; sie konvertieren den partiellen Agonisten Kainat in einen vollständigen Agonisten und bewirken, dass der kompetitive Antagonist CNQX sich als partieller Agonist verhält (Milstein and Nicoll 2007).

In *Science* beschreiben nun Schwenk et al. die unerwartete Interaktion zwischen AMPARs und einer neuen Familie von Transmembranproteinen, die mit dem französischen Wort für ‚Gewürzgurke‘ bezeichnet werden: Cornichons. Ähnlich den TARPs scheinen Cornichons den intrazellulären Transport und die biophysikalischen Eigenschaften von AMPARs zu beeinflussen (siehe Abbildung 1). Die Autoren hatten eine proteomanalytische Herangehensweise gewählt, um die Bestandteile nativer AMPAR-Komplexe umfassend zu bestimmen. Dazu haben sie mithilfe von Antikörpern hochmolekulare



**Abb. 1: Cornichon-Homologe (CNIH) sind beta-Untereinheiten der Glutamaterezeptoren vom AMPA Subtyp (AMPA-R). Sie fördern die Expression von AMPARs an der Zelloberfläche und verändern deren biophysikalischen Eigenschaften.**