

Abstract

As an important center for neuroendocrine and autonomic function in the central nervous system (CNS), the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) is involved in the modulation of a variety of physiological and behavioural processes. Inter alia, the activity of individual neuron populations within the PVN have been correlated with complex social behaviour during pregnancy and the regulation of blood pressure or energy homeostasis. In accordance with its widespread modulatory implications, the PVN is subject to an abundance of modulatory input itself. One of the major centers associated with the regulation of PVN neuron activity is the noradrenergic (NA) system. The locus coeruleus (LC) contains ~50% of NA neurons in the brain that extend their projections throughout the entire CNS and have been shown to functionally connect to the PVN and other hypothalamic nuclei associated with the modulation of energy homeostasis and feeding behaviour. While numerous studies have investigated the effect of NA mediated modulation of PVN neurons on feeding behaviour and energy homeostasis, the molecular and cellular basis of these systems are still largely unknown.

To unravel the role of the PVN in the modulation of complex neuronal networks it is essential to first identify the different neuronal populations within the nucleus. Previous studies of the PVN described different neurons types based on the expression of five Neuropeptides. In combination with their neuroanatomy, these neuron types could be roughly correlated with three types of electrophysiologically identified neurons. However, most studies on the electrophysiological properties of distinct PVN neuron types were performed in rats. Since the mouse has been established as one of the most commonly used model organisms in biological sciences today, it is important to review these data as ground for future investigations. In addition, the perforated patch-clamp technique was used to investigate the modulation of their intrinsic electrophysiology by NA without disrupting intracellular processes.

In line with the literature, three electrophysiologically distinct types of neurons could be identified in the PVN of mice: Type I, Type II and Type III. The neurons could be reliably classified using a combination of distinct electrophysiological characteristics. Most prominently, a delayed onset of action potentials (AP) and the generation of short burst of AP following a hyperpolarising current pulse were observed in Type I and Type III PVN neurons respectively. In contrast, no comparable responses could be elicited in Type II neurons. Bath application of NA induced either excitatory and inhibitory responses in all PVN neurons tested. While Type III neurons were exclusively inhibited by NA, Type I and Type II PVN neurons were differentially modulated with both excitatory and inhibitory effects in response to NA application. Pharmacological experiments using specific adrenoceptor (AR) antagonists uncovered all inhibitory effects on PVN neurons to be mediated by α_{2A} -AR. In contrast, excitatory NA effects on PVN neurons are mediated by α_{1A} -AR in Type I but not Type II PVN neurons. Most interestingly, the differential NA modulation in Type I and Type II PVN neurons was found to correlate with distinct electrophysiological variations within the respective neuron populations.

In order to verify the effect of NA mediated PVN neuron modulation at near physiological concentrations, a series of optogenetic experiments were performed. Optical stimulation of ChR2 expressing NA terminals was utilized to induce the release of endogenous NA in the PVN. Simultaneous electrophysiological recordings of identified PVN neurons verified the modulatory effects observed previously. In addition, preliminary immunohistochemical stainings of the recorded cells suggest a differential expression of neuropeptides oxytocin and vasopressin in NA excited and NA inhibited Type I and Type II PVN neurons.

Taken together, the prevailing basic electrophysiological classification established in rats could be verified for PVN neurons in mice. The differential expression of NA receptors and their opposing modulatory effects observed in the identified neuron populations is in line with previous behavioural experiments described in the literature. In combination, the electrophysiological, pharmacological and immunohistochemical data are in accordance with the widespread physiological functions of the PVN and provide the foundation for further identification of distinct neuron subtypes.

Zusammenfassung

Der Paraventriculäre Nucleus des Hypothalamus (PVN) ist eines der wichtigsten neuroendokrinen und autonomen Regionen im zentralen Nervensystem (ZNS). Als solches ist er an einer Vielzahl physiologischer und verhaltensbiologischer Prozesse beteiligt. Die Aktivität einzelner PVN Neuronenpopulation moduliert unter anderem komplexe soziale Verhalten während der Schwangerschaft und reguliert wichtige physiologische Parameter wie den Blutdruck oder die Aufrechterhaltung des Energiehaushaltes. Als Teil verschiedener komplexer neuronaler Netzwerke erhält der PVN eine Vielzahl an synaptischen Eingängen. Eines der wichtigsten regulativen Zentren von PVN Aktivität ist das noradrenerge (NA) System. Der Locus Coeruleus (LC) ist mit ~50% aller zentralen NA Neurone der wichtigste NA Nucleus im ZNS. Projektionen des LC erstrecken sich in durch das gesamte Nervensystem. Funktionelle NA Verbindungen im PVN wurden in einer Vielzahl an Studien im Zusammenhang mit Essverhalten und Energie Homöostase beschrieben. Dennoch sind die zugrundeliegenden molekularen und zellulären Bestandteile des PVN, die an diesen Netzwerken beteiligt sind, weitestgehend unbekannt.

Um die Rolle des PVN in der Modulation komplexer Netzwerke aufzudecken ist es essenziell zunächst die verschiedenen neuronalen Populationen innerhalb des Nucleus zu identifizieren. In früheren Studien wurden einzelne Neurone des PVN anhand der Expression fünf verschiedener Neuropeptide beschrieben. In Kombination mit Neuroanatomischen Experimenten konnten die so beschriebenen Neurone mit drei elektrophysiologisch identifizierten Neuronentypen korreliert werden. Allerdings wurden die meisten elektrophysiologischen Studien an PVN Neuronen in Ratten durchgeführt. In Biologischen Studien ist heute die Maus eines der am weitesten verbreiteten Modellorganismen. In Hinblick auf künftige Studien ist es daher wichtig die bestehende Datenlage für die Maus zu verifizieren. Durch die Anwendung der "perforated patch-clamp" Technik war es zudem möglich die NA Modulation elektrophysiologischer parameter in einzelnen Neuronen zu untersuchen, ohne empfindliche intrazelluläre Abläufe zu beeinträchtigen.

Im Einklang mit früheren Studien aus der Ratte konnten im PVN der Maus drei elektrophysiologisch distinkte Neuronentypen identifiziert werden: Typ I, Typ II und Typ III. Anhand ihrer Charakteristischen elektrophysiologischen Eigenschaften war es möglich alle abgeleiteten Neurone eindeutig zu klassifizieren. Während sich Typ I Neurone durch einen verzögerten Ansatz des ersten Aktionspotentials (AP) auszeichnen, generieren Typ III Neurone schnell aufeinanderfolgende AP salven in Folge einer Hyperpolarisierung. Im Gegensatz dazu zeigen Typ II Neurone kein vergleichbares Rebound Verhalten. Bad Applikation von NA hatte je nach Zelltyp unterschiedliche modulatorische Effekte. Während in Typ III Neuronen NA ausschließlich inhibitorische Effekte hat, wurden bei Type I und Typ II Neuronen sowohl exzitatorisch als auch inhibitorisch modulierte Neurone identifiziert. Pharmakologische Experimente mit spezifischen Adrenozeptor (AR) Antagonisten zeigen, dass alle inhibitorischen NA induzierten effekte in PVN Neuronen durch α_{2A} -AR Aktivierung vermittelt werden. Interessanterweise werden exzitatorische Effekte in Typ I, nicht aber in Typ II Neuronen, durch α_{1A} -AR Aktivierung vermittelt.

Zudem konnte die unterschiedliche NA Modulation in Typ I und Typ II PVN Neuronen mit distinkten Variationen der charakteristischen elektrophysiologischen Parameter korreliert werden.

Mit Hilfe von Optogenetischen Experimenten konnte die NA Modulation von PVN Neuronen bei annähernd physiologischen Konzentrationen überprüft werden. Optische Stimulation von ChR2 exprimierenden NA Projektionen wurde verwendet um die Freilassung von endogenem NA in den PVN zu induzieren. Durch gleichzeitig durchgeführte elektrophysiologische Experimente wurden die zuvor beobachteten Effekte verifiziert. Vorläufige Immunhistochemische Färbungen deuten zudem auf eine differentielle Expression der Neuropeptide Oxytocin und Vasopressin in von NA erregten und inhibierten Typ I und Typ II Neurone hin. Zusammengefasst konnte die grundlegende elektrophysiologische Klassifizierung von PVN Neuronen in der Ratte für die Maus bestätigt werden. Die differentielle Expression adrenerger Rezeptor Subtypen sowie deren gegensätzliche modulatorischen Effekte in identifizierten PVN Neuronenpopulationen passt zu den Ergebnissen früherer verhaltensbiologischer und pharmakologischer Experimente. Die hier präsentierten Ergebnisse ermöglichen die zuverlässige Klassifizierung heterogener PVN Neuronenpopulationen mit elektrophysiologischen, pharmakologischen und immunhistochemischen Mitteln und bilden die Grundlage für die Identifizierung individueller Neuronentypen.