

Differentielle Expression von Kaliumkanälen
in *Substantia nigra* Neuronen der Maus (*Mus musculus* L.)

Eine kombinierte Patch-Clamp- und Einzelzell-PCR-Studie an Hirnschnitten

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Birgit Liß

aus Flensburg

Hamburg 1999

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. M. Gewecke

Hamburg, den 23. März 1999



A handwritten signature in black ink, appearing to read "R. Lieberei".

Professor Dr. R. Lieberei
Dekan

1. Gutachter: Professor Dr. Michael Gewecke

2. Gutachter: Professor Dr. Hannah Monyer

Disputation: 09.04.1999

dissertation.de

Verlag im Internet

Sonderausgabe des Werkes mit der ISBN-Nummer: 3-933342-48-1

dissertation.de

Verlag im Internet

Leonhardtstr. 8-9

D-14 057 Berlin

Email: dissertation.de@snafu.de

Internetadresse: <http://www.dissertation.de>

Für Gunda

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Die Parkinson-Krankheit.....	1
1.1.1 Symptomatik und Biochemie der Parkinson-Krankheit.....	1
1.1.2 Funktionelle Anatomie der Basalganglien.....	2
1.1.3 Metabolischer Streß und Neurodegeneration.....	6
1.2 Mausmodellsysteme der Parkinson-Krankheit.....	8
1.2.1 Die <i>weaver</i> -Maus.....	8
1.2.2 Die MPTP-Maus.....	10
1.3 Einzelzelltechniken.....	10
1.3.1 Die Patch-Clamp Technik.....	11
1.3.2 Die Detektion von Einzelzell-mRNA.....	13
1.4 Kaliumselektive Ionenkanäle.....	16
1.4.1 Einwärtsrektifizierende Kaliumkanäle.....	18
1.4.1.1 G-Protein regulierte Kaliumkanäle.....	19
1.4.1.2 ATP-sensitive Kaliumkanäle.....	21
1.4.1.2.1 Struktur und Funktion von K_{ATP} -Kanälen.....	22
1.4.1.2.2 Physiologie nativer neuronaler K_{ATP} -Kanäle.....	25
1.5 Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit.....	26
2 MATERIAL UND METHODEN.....	27
2.1 Material.....	27
2.1.1 Versuchstiere.....	27
2.1.2 Chemikalien und Geräte.....	27
2.1.3 Lösungen.....	27
2.1.3.1 Lösungen Molekularbiologie.....	27
2.1.3.2 Lösungen Elektrophysiologie.....	28
2.1.3.3 Lösungen Immuncytochemie.....	28
2.1.4 Enzyme / Antikörper / dNTPs.....	28
2.1.5 Oligonukleotide.....	29
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	29

2.2.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	29
2.2.2	Gelelektrophoresen von Nukleinsäuren	29
2.2.2.1	Auftrennung von DNA	29
2.2.2.2	Auftrennung von RNA	30
2.2.3	Aufreinigung von Nukleinsäuren	30
2.2.3.1	Phenol/Chloroform-Aufreinigung von DNA	30
2.2.3.2	Natriumacetatfällung	30
2.2.3.3	PCR-Produktaufreinigung	30
2.2.4	genomische DNA-Isolierung aus Mausschwanz-Biopsien	31
2.2.5	poly(A) ⁺ -RNA-Isolierung aus Gewebe	31
2.2.6	Synthese des cDNA-Erststrangs	32
2.2.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
2.2.7.1	Standard PCR-Protokoll	32
2.2.7.2	Multiplex-PCR-Protokoll	33
2.2.7.3	Nested-PCR-Protokoll	33
2.2.7.4	PCR-Protokoll zur Amplifikation von genomischer DNA	33
2.2.7.5	Auswahl der Primersequenzen für die PCR-Reaktionen	34
2.2.8	Durchführung eines Einzelzell-RT-PCR-Experiments	36
2.2.9	Klonierung von PCR-Produkten	36
2.2.9.1	Ligation von Plasmidvektor und DNA	37
2.2.9.2	Transformation	37
2.2.9.3	Isolation von Plasmid-DNA aus 3 ml Bakterienkulturen	37
2.2.9.4	Restriktion von DNA	38
2.2.10	Sequenzierung von PCR-Produkten	38
2.3	Elektrophysiologische Methoden	39
2.3.1	Hirnschnitt-Präparation	39
2.3.2	Aufbau und Ausstattung des Meßplatzes	39
2.3.2.1	Bildgebendes Verfahren	39
2.3.2.2	Applikationsverfahren	40
2.3.2.3	Pipetten/Pipettenhalterung	40
2.3.3	Datenaufnahme	41
2.3.3.1	Voltage-Clamp Messung	42
2.3.3.2	Current-Clamp Messung	43
2.3.3.3	Kapazitätskorrektur	43
2.3.3.4	R _s -Kompensation	44
2.3.3.5	P/4-Leckkorrektur	45
2.3.4	Durchführung der Patch-Clamp Messung	46
2.3.4.1	Die Cell-Attached Konfiguration	46
2.3.4.2	Die Whole-Cell Ableitung	46
2.3.4.3	Meßprotokolle	47
2.3.4.3.1	Current-Clamp	47

2.3.4.3.2 Voltage-Clamp	47
2.3.5 Datenanalyse	47
2.3.5.1 Bestimmung eines Umkehrpotentials	48
2.3.5.2 Bestimmung von Leitfähigkeiten	48
2.3.5.3 Bestimmung eines EC/IC ₅₀ -Wertes und des entsprechenden Hill-Koeffizienten	49
2.3.5.4 Bestimmung von Signifikanzen	50
2.4 Immuncytochemische Methoden.....	50
2.4.1 Perfusion und Präparation der Hirnschnitte	50
2.4.2 Antikörperreaktionen und DAB-Färbung	51
3 ERGEBNISSE	52
3.1 Etablierung eines multiplex-RT-PCR-Protokolls	52
3.1.1 Sensitivität des RT-PCR-Protokolls; Positivkontrollen	53
3.1.2 Spezifität des RT-PCR-Protokolls; Negativkontrollen	54
3.2 Einzelzell-PCR-Analyse der Substantia nigra Neuronen.....	55
3.2.1 Korrelation von Markergenexpression und elektrophysiologischen Eigenschaften.....	55
3.2.1.1 TH positive SN Neuronen	56
3.2.1.2 GAD ₆₇ positive SN Neuronen	57
3.2.2 mRNA-Expression von K _{ATP} -Kanal Untereinheiten in SN Neuronen	58
3.2.2.1 GABAerge SNpc Neuronen	58
3.2.2.2 GABAerge SNpr Neuronen.....	59
3.2.2.3 Dopaminerge SNpc Neuronen.....	59
3.2.2.4 Differenzierung zwischen SUR2A- und SUR2B-Expression	60
3.3 Funktionelle Charakterisierung von K_{ATP}-Kanälen in SN Neuronen.....	62
3.3.1 Effekte der K _{ATP} -Kanalöffner	63
3.3.1.1 Diazoxidsensitivität und K _{ATP} -Kanal Expression dopaminerger SN Neuronen	63
3.3.1.2 Pinazidilsensitivität und K _{ATP} -Kanal Expression dopaminerger SN Neuronen	64
3.3.2 Metabolische Sensitivität von SN Neuronen	66
3.3.2.1 Rotenonsensitivität dopaminerger Neuronen bei akuter Applikation.....	66
3.3.2.2 Effekte nach Präinkubation mit Rotenon	68
3.3.2.3 Kombination von Rotenon-Präinkubation und scPCR.....	70
3.3.3 Tolbutamidsensitivität der rotenoninduzierten Kaliumleitfähigkeit.....	73
3.3.3.1 Tolbutamidsensitivität dopaminerger SN Neuronen	73
3.3.3.2 Tolbutamidsensitivität GABAerger SNpr Neuronen	75
3.4 Charakterisierung von dopaminergen SN Neuronen in <i>weaver</i>-Mäusen	77
3.4.1 Genotypisierung der <i>weaver</i> -Mäuse.....	77
3.4.2 Tyrosinhydroxylase Immuncytochemie.....	78
3.4.3 Elektrophysiologische Charakterisierung der dopaminergen <i>wv</i> Neuronen.....	80
3.4.3.1 Elektrophysiologische Grundcharakterisierung	80

3.4.3.2	GTP γ S-Effekt.....	82
3.4.3.3	QX314-Effekt	83
3.4.3.4	Tolbutamid-Effekt	84
3.4.4	Molekularbiologische Charakterisierung der dopaminergen <i>vv</i> Neuronen.....	86
3.4.4.1	scPCR-Detektion von Girik1-4-Kanälen	86
3.4.4.2	scPCR-Detektion von K _{ATP} -Kanal Untereinheiten	88
3.4.4.3	scPCR-Detektion von Calbindin in Kombination mit K _{ATP} -Kanal Untereinheiten	89
4	DISKUSSION	91
4.1	Methodische Aspekte	91
4.1.1	Etablierung eines RT-mPCR-Protokolls zum mRNA-Nachweis aus Einzelzellen.....	91
4.1.2	Aussagekraft von positiven und negativen scPCR-Ergebnissen.....	92
4.1.3	Limitationen der scPCR-Methode	93
4.1.4	Alternative Amplifikationsmethoden zur Einzelzell-Analyse differentieller Genexpression..	94
4.2	Markergenexpression und elektrophysiologischer Phänotyp von SN Neuronen	95
4.3	K_{ATP}-Kanäle in SN Neuronen.....	95
4.3.1	Unterschiedliche Typen von K _{ATP} -Kanälen in dopaminergen SN Neuronen	95
4.3.1.1	Heterogene Pharmakologie der K _{ATP} -Kanäle.....	96
4.3.1.2	Unterschiedliche K _{ATP} -Kanäle mit differentieller metabolische Sensitivität	97
4.3.2	Heteromere SUR1/SUR2B vermittelte K _{ATP} -Kanäle in dopaminergen SN Neuronen?	98
4.4	Charakterisierung der dopaminergen SN Neuronen in <i>weaver</i>-Mäusen	99
4.4.1	Gain-of-function Phänotyp dopaminerges SN Neuronen in homozygoten <i>weaver</i> -Mäusen ...	99
4.4.2	Phänotyp dopaminerges SN Neuronen in heterozygoten <i>weaver</i> -Mäusen	100
4.4.3	Girik1-4-Koexpression in dopaminergen SN Neuronen.....	101
4.4.4	Überlebende dopaminerge <i>weaver</i> Neuronen exprimieren ausschließlich SUR1.....	101
4.5	Funktionelle Bedeutung der K_{ATP}-Kanäle in SN Neuronen	102
4.5.1	K _{ATP} -Kanäle als metabolische Sensoren in dopaminergen SN Neuronen?.....	103
4.5.2	Schützen aktivierte K _{ATP} -Kanäle in <i>weaver</i> selektiv vor dopaminerges Degeneration?	103
4.5.3	K _{ATP} -Kanäle als molekulares Korrelat für differentielle Vulnerabilität?	104
4.6	Ausblick.....	106
5	ZUSAMMENFASSUNG	108
6	LITERATURVERZEICHNIS	111
	Danksagung.....	128
	Lebenslauf.....	129

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	PCR-Primer: Sequenzen, Lokalisationen und Amplifikatgröße	35
Tab. 3.1:	Pharmakologische und metabolische Eigenschaften ausgewählter rekombinanter K_{ATP} -Kanäle	62
Tab. 3.2:	Leitfähigkeiten dopaminergener SN Neuronen nach Präinkubation mit Rotenon und Tolbutamid	74
Tab. 3.3:	Elektrophysiologische Eigenschaften von dopaminergen SNpc Neuronen des <i>weaver</i> -Stamms	81
Tab. 3.4:	Aktionspotentiale und Spontanaktivität von dopaminergen SNpc Neuronen	81

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Synthese der Neurotransmitter Dopamin und GABA.....	3
Abb. 1.2:	Funktionelle Neuroanatomie der Basalganglien	4
Abb. 1.3:	Konfigurationen der Patch-Clamp Technik	12
Abb. 1.4:	Zwei Detektionsmethoden zum Nachweis von Einzelzell-mRNA	15
Abb. 1.5:	Untereinheitenstruktur der zwei Hauptfamilien von Kaliumkanälen.....	17
Abb. 1.6:	G-Protein abhängige Aktivierung von Girk-Kanälen	20
Abb. 1.7:	Untereinheitenstruktur der K_{ATP} -Kanäle	22
Abb. 2.1:	Schematisches Schaltbild eines Patch-Clamp Verstärkers.....	41
Abb. 3.1:	Positivkontrolle für K_{ATP} -Kanal- bzw. Girk1-4-multiplex-PCR.....	53
Abb. 3.2:	Korrelation von Markergenexpression und elektrophysiologischen Eigenschaften	56
Abb. 3.3:	K_{ATP} -Kanal Untereinheiten Expression in GABAergen SNpc Neuronen.....	58
Abb. 3.4:	K_{ATP} -Kanal Untereinheiten Expression in GABAergen SNpr Neuronen	59
Abb. 3.5:	Heterogene K_{ATP} -Kanal Untereinheiten Expression in dopaminergen SNpc Neuronen.....	60
Abb. 3.6:	Identifikation der Splicevarianten SUR2A und SUR2B	61
Abb. 3.7:	Diazoxid aktiviert K_{ATP} -Kanäle mit hoher Tolbutamidsensitivität in DA SNpc Neuronen.....	63
Abb. 3.8:	Pinazidil aktiviert K_{ATP} -Kanäle mit variablen Tolbutamidsensitivitäten in DA SNpc Neuronen.....	65
Abb. 3.9:	Kombination von pharmakologischen Experimenten und Einzelzell-PCR	66
Abb. 3.10:	Rotenon aktiviert K_{ATP} -Kanäle in dopaminergen SNpc Neuronen	67
Abb. 3.11:	Quantitative Analyse unterschiedlicher Rotenonsensitivitäten DA SNpc Neuronen.....	69
Abb. 3.12:	Kombination von Rotenon-Präinkubation und Einzelzell-PCR	71
Abb. 3.13:	Korrelation von metabolischer Sensitivität und alternativer SUR-Expression	72
Abb. 3.14:	Quantitative Analyse der Tolbutamidsensitivitäten der K_{ATP} -Kanäle in DA SNpc Neuronen.....	75

Abb. 3.15: SN Neuronen exprimieren K _{ATP} -Kanäle mit unterschiedlichen Tolbutamid-sensitivitäten	76
Abb. 3.16: Genotypisierung der weaver-Mäuse	78
Abb. 3.17: Tyrosinhydroxylase Immuncytochemie von Mäusen des weaver-Stamms	79
Abb. 3.18: Elektrophysiologische Charakterisierung der dopaminergen weaver Neuronen	80
Abb. 3.19: GTPγS-Effekt auf dopaminerge SNpc Neuronen	82
Abb. 3.20: QX314-Effekt auf dopaminerge SNpc Neuronen	84
Abb. 3.21: Tolbutamid-Effekt auf dopaminerge SNpc Neuronen in weaver-Mäusen.....	85
Abb. 3.22: scPCR-Analyse der Girk1-4-Expression in dopaminergen SN Neuronen.....	87
Abb. 3.23: Korrelation von Leitfähigkeit und Girk-Expressionsprofil dopaminerges weaver Neuronen.....	87
Abb. 3.24: Dopaminerge weaver Neuronen exprimieren ausschließlich SUR1-mRNA	88
Abb. 3.25: scPCR Korrelation von Calbindin und K _{ATP} -Kanal Expression in DA <i>weaver</i> Neuronen	89

Abkürzungsverzeichnis:

A	Adenin
Å	Ångström (10^{-10} m)
ACSF	artificial cerebrospinal fluid
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
AHP	(afterhyperpolarisation) Nachhyperpolarisation
AK	Antikörper
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxalpropionsäure
aqua dest.	einfach destilliertes Wasser
aRNA	antisense RNA
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
Bio	Biotin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cdNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CFTR	cystic fibrosis transmembrane regulator
cRNA	complementary RNA (komplementäre RNA)
CXI	Komplex I der Atmungskettenenzyme
D1 bzw. D2	Dopaminrezeptor TypI bzw. TypII
DA	dopaminerg
dA/dC/dG/dT	Desoxy-Adenosin-/Cytidin-/Guanosin-/Thymidin-Ribonukleotid
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	halbmaximale effektive Konzentration
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	[Ethylenbis(oxyethylennitrilo)]tetraacetat
FADH/H ⁺	Flavinadenindinukleotid, reduzierte Form
G	Guanin
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAD ₆₇	L-Glutamat-Dekarboxylase, 67 kD Form
GDP	Guanosin-5'-Diphosphat
GFAP	glial fibrillar acidic protein
GFG	Glycin-Phenylalanin-Glycin
Girk	G-Protein aktivierter einwärtsrektifizierender Kaliumkanal
GPe	Globus Pallidus, externes Segment

GPI	Globus Pallidus, internes Segment
G-Protein	Guanosin-Nukleotid bindendes Protein
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
GYG	Glycin-Tyrosin-Glycin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazino)-Ethansulfonsäure
I _A	schnell inaktivierender Kaliumstrom
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
I _h	hyperpolarisationsaktivierter Kationenstrom
K _{ATP}	ATP-sensitiver Kaliumkanal
kD	Kilodalton
Kir	einwärtsrektifizierender Kaliumkanal
Kv	Spannungsaktivierter Kaliumkanal
LB	Luria Bertani
mGlu-R	metabotroper Glutamatrezeptor
min	Minuten
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mPCR	multiplex-PCR
MPP ⁺	1-Methyl-4-Phenyl-Pyridin
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
NaAC	Natriumacetat
NADH/H ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form.
NBD	Nukleotidbindungsdomänen
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OPA	operational amplifier (Operationsverstärker)
P	Porendomäne
PBS	phosphatebuffer solution
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PIP	Phosphoinositolphosphat
poly(A) ⁺ -RNA	RNA mit polyadenyliertem 3'-Ende
QX314	N-(2,6-Dimethylphenylcarbonylmethyl)-Triethylammoniumbromid
R	Rezeptor
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	reverse Transkription
RTase	Reverse Transkriptase
scPCR	Einzelzell-RT-PCR
SEM	standard error of the mean (Standardabweichung der Mittelwerte)
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
SN	Substantia nigra (schwarze Substanz)
SNpc	Substantia nigra, pars compacta

SNpr	Substantia nigra, pars reticulata
STN	subthalamischer Nucleus
SU	Sulfonylurea/Sulfonylharnstoff
SUR	Sulfonylurearezeptor/Sulfonylharnstoffrezeptor
T	Thymin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TH	Tyrosinhydroxylase
TM	transmembrane Domäne
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-Propanediol
VTA	ventrales tegmentales Areal
U	Unit; Enzymaktivitätseinheit
<i>wv</i>	<i>weaver</i>

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Maßeinheiten, die auf Empfehlungen der IFCC (International Federation for Clinical Chemistry) und IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) beruhen, oder die zu den SI-Einheiten (Système Internationale d'Unités) zählen, werden nicht gesondert aufgeführt.

1 Einleitung

Die Arbeitsweise des Gehirns und die Leistungen des menschlichen Geistes zählen wohl zu den faszinierendsten Rätseln der Wissenschaft. Obwohl immer mehr zelluläre und molekulare Mechanismen der Neurobiologie aufgeklärt werden, ist erst im Ansatz klar, wie das Gehirn als Ganzes seine einzigartige Leistung vollbringt. Die Untersuchungen von spezifischen Funktionsstörungen neurologischer Erkrankungen lieferten oft erste, aber entscheidende Hinweise für ein tieferes Verständnis der funktionellen Organisation der Hirnleistungen. Trotz deutlicher Fortschritte bei der Erkennung und Behandlung von neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen ist die eigentliche Ursache vieler Krankheitsbilder noch weitgehend ungeklärt. Doch nur das Verständnis der molekularen Grundlagen pathophysiologischer Prozesse kann zur Entwicklung neuartiger Therapiekonzepte führen, die nicht nur die Symptomatik sondern die Ursache von Erkrankungen bekämpfen. Die Pathologie der Parkinson-Krankheit zum Beispiel ist seit langem bekannt: Die Symptomatik dieser häufigen neurologischen Erkrankung wird durch das selektive Absterben von dopaminergen Mittelhirnneuronen und einem daraus resultierenden Dopaminmangel verursacht. Der eigentliche zur Neurodegeneration führende Pathomechanismus dieser Krankheit ist jedoch noch unbekannt, und damit ist der Weg zu einer echten Heilung der Parkinson-Krankheit bis heute verschlossen.

1.1 Die Parkinson-Krankheit

1.1.1 Symptomatik und Biochemie der Parkinson-Krankheit

Aus dem Jahre 1817 stammt die erste auch heute noch gültige, präzise neurologische Beschreibung der Parkinson-Krankheit, die nach ihrem Erstbeschreiber, dem englischen Arzt James Parkinson, benannt ist.

Drei Hauptsymptome zeichnen von der Parkinson-Krankheit betroffene Menschen aus: Ruhetremor, Muskelsteifheit (Rigor), sowie generelle Bewegungsverarmung, verbunden mit Schwierigkeiten, Willkürbewegungen einzuleiten (Brady- bzw. Akinesie). Schon in den dreißiger Jahren dieses Jahrhunderts konnte das neuropathologische Korrelat der Parkinson-Krankheit identifiziert werden, der selektive Verlust von pigmentierten Mittelhirnneuronen in der schwarzen Substanz, der Substantia nigra (SN) (Hassler, 1938). Als weiteres typisches pathologisches Merkmal dieser Krankheit sind eosinophile Einschlusskörperchen, sogenannte Lewy bodies, in SN Neuronen nachgewiesen worden.

Der biochemische Hauptbefund der Parkinson-Krankheit ist ein zunehmend starker Verlust des Neurotransmitters Dopamin im Striatum, dem Hauptprojektionsgebiet der Substantia nigra Pars compacta (SNpc) Neuronen (vgl. 1.1.2). Die Ursache des Dopaminmangels liegt in der fortschreitenden Degeneration der dopaminausschüttenden Mittelhirnneuronen. Nimmt der striatale Dopamingehalt um über 80% ab, kommt es zu den genannten neurologischen Symptomen. Die Aufklärung der zentralen Rolle des Botenstoffes Dopamin wurde Grundlage für die symptomatische Neurotransmitter-Ersatz Therapie, für die entweder L-DOPA (vgl. Abb. 1.1) oder Dopaminrezeptor-Agonisten verwendet werden. Gleichzeitig wird verständlich, warum andere, das dopaminerge System inhibierende Pharmaka, wie vor allem die klassischen Neuroleptika, parkinsonartige Syndrome auslösen können (Birkmayer und Danielczyk, 1991). Parkinsonähnliche Erkrankungen sind auch als Spätfolge von Virus-Encephalitiden beschrieben worden (Wenning et al., 1997). Während für die klassische Parkinson-Krankheit kein einfacher mendelscher Erbgang nachzuweisen ist, konnten kürzlich die verantwortlichen Genmutationen für einige seltene familiäre Parkinsonformen identifiziert werden (Polymeropoulos et al., 1997).

Neuere neuropathologische Arbeiten zeigen, daß die dopaminergen Mittelhirnneuronen in der Substantia nigra- und der medial angrenzenden VTA-Region (ventrales tegmentales Areal) nicht gleichmäßig von dem degenerativen Prozeß erfaßt werden. Vielmehr weisen bestimmte Subregionen der SN deutliche Vulnerabilitätsunterschiede auf. So degenerieren lateroventral gelegene SN Neuronen fast komplett (91%), während mediodorsale Zellgruppen in SN und VTA kaum betroffen sind (Hirsch et al., 1997). Die Identifizierung von differentiell exprimierten Genen in den unterschiedlich vulnerablen dopaminergen Neuronen der Substantia nigra ist deshalb ein vorrangiges Ziel der Parkinsonforschung, um die molekularen Grundlagen der Degeneration sowie der Neuroprotektion zu verstehen. Sie sind der Schlüssel zu einer kausalen Therapie der Parkinson-Krankheit.

1.1.2 Funktionelle Anatomie der Basalganglien

Warum hat die Degeneration der dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra einen so entscheidenden Einfluß auf die Bewegungskontrolle eines Menschen? Um die Auswirkung des Dopaminmangels auf die Willkürmotorik zu verstehen, muß das generelle Funktionsprinzip der Basalganglien verstanden werden, die an der Initiation und Ausführung von Willkürbewegungen maßgeblich beteiligt sind. Die Basalganglien umfassen fünf Kerngebiete: den Nucleus caudatus, das Putamen, den Globus Pallidus

(GP), den subthalamischen Nucleus (STN) und die Substantia nigra (SN). Nucleus caudatus und Putamen werden auch unter dem Begriff Striatum zusammengefaßt. Der Globus Pallidus ist in ein internes (GPi) und ein externes Segment (GPe) gegliedert. Das interne Segment wird bei Nagern als Nucleus entopeduncularis bezeichnet. Die Substantia nigra wird ebenfalls in zwei Regionen unterteilt, in die Substantia nigra Pars compacta (SNpc) sowie die Substantia nigra Pars reticulata (SNpr) (vgl. auch Abb. 3.17). Die SNpr ähnelt zytologisch und funktionell dem internen Segment des Globus Pallidus. Anhand ihrer Transmitterausschüttung unterscheidet man zwei Klassen von Neuronen in der Substantia nigra, dopaminerge und GABAerge Neuronen. Die Schlüsselenzyme für die jeweiligen Transmittersynthesen sind die Tyrosinhydroxylase (TH) und die L-Glutamat-Deкарбоxylase (GAD) (vgl. Abb. 1.1).

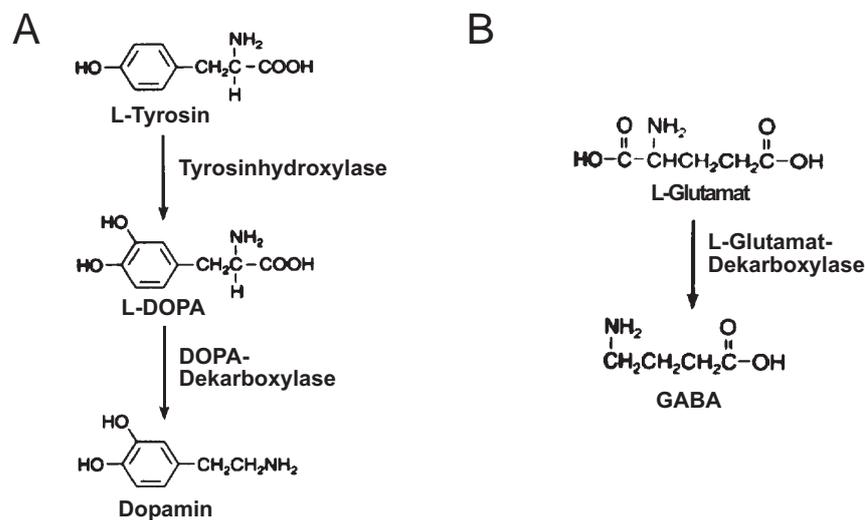


Abb. 1.1: Synthese der Neurotransmitter Dopamin und GABA

(A) Schlüsselenzym für die Synthese des Neurotransmitters Dopamin aus L-Tyrosin ist die Tyrosinhydroxylase. (B) Die L-Glutamat-Deкарбоxylase katalysiert die Synthese des inhibitorischen Transmitters γ -Aminobuttersäure (GABA) aus L-Glutamat.

Das Striatum bildet mit seinen glutamatergen neokortikalen Afferenzen die Eingangsregion der Basalganglien. Die GABAergen Neuronen des Striatums projizieren auf die ebenfalls GABAergen Kerne des GPi und der SNpr. Diese werden als Ausgangskerne der Basalganglien bezeichnet, da ihre Axone ventrale Thalamuskern innervieren. Im Gegensatz dazu verlassen die GABAergen Projektionen des GPe die Basalganglien nicht, sondern innervieren den glutamatergen STN, der wiederum mit GPi und SNpr in Verbindung steht. Das Netzwerk der Basalganglien besteht damit aus zwei

parallelen Schleifen, die zwischen Kortex und Thalamus geschaltet sind. Einem direkten Weg über Striatum und GPi/SNpr sowie einem indirekten über Striatum, GPe, STN und GPi/SNpr (siehe Abb. 1.2).

Die inhibitorischen GABAergen GPi/SNpr Neuronen sind spontanaktiv. Zur Initiation eines Bewegungsablaufes muß diese kontinuierliche Inhibition der Thalamusneurone unterbrochen werden. Die funktionelle Anatomie der Basalganglien ergibt sich aus den in Reihe geschalteten Kernen, die nach kortikaler Aktivierung eine Disinhibition thalamischer Neuronen vermitteln. Die Aktivierung thalamischer Kerne führt dann zu einer Stimulation von prä- und supplementärmotorischen Kortexarealen, die in direkter Verbindung über den primären Motorkortex an der Ausführung von Bewegungsprogrammen beteiligt sind.

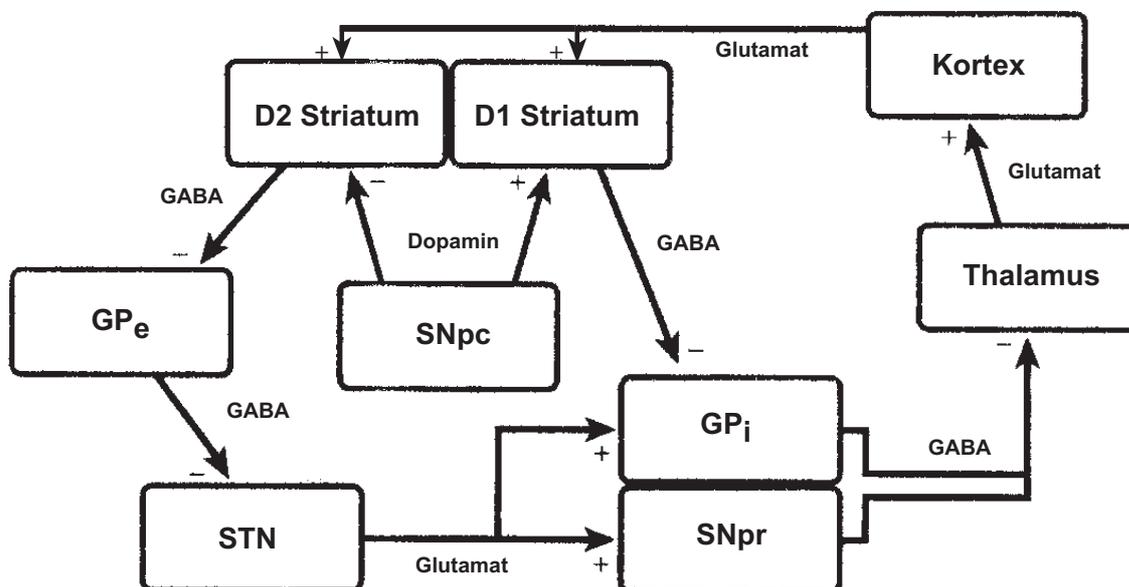


Abb. 1.2: Funktionelle Neuroanatomie der Basalganglien

Schematische Verschaltung des Kortex mit den Basalganglien. Das Striatum ist je nach Dopaminrezeptor Expression (D1 bzw. D2) in zwei Kompartimente unterteilt, die die Eingangsstationen für die glutamatergen kortikalen Afferenzen bilden. Die Basalganglien bestehen aus zwei parallelen Signalwegen, einem direkten über D1-Striatum und GPi/SNpr sowie einem indirekten über D2-Striatum, GPe, STN und GPi/SNpr. Die Ausgangskerne der Basalganglien projizieren auf den Thalamus, welcher wiederum in Verbindung mit dem Kortex steht. Die dopaminergen SNpc Neuronen innervieren beide Segmente des Striatums. Die exzitatorische bzw. inhibitorische Wirkung der Transmitter ist jeweils durch (+) bzw. (-) Symbole angezeigt (Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis und Text; verändert nach Lang und Lozano, 1998).

Ein erregendes kortikales Signal kann die Basalganglien auf zwei unterschiedlichen Wegen durchlaufen. Die direkte striatonigrale Projektion bewirkt eine GABA vermittelte Hemmung der spontanaktiven GPi/SNpr Neuronen. Dadurch wird ihre GABA Ausschüttung und damit die Inhibition des Thalamus direkt verringert, so daß ein erregendes Signal an den primären Motorkortex übermittelt werden kann. Im Gegensatz

dazu bewirkt die indirekte striatopallidale Projektion eine Inhibition der ebenfalls spontanaktiven inhibitorischen GPe Neuronen und führt damit zu einer höheren Aktivität der glutamatergen STN Neuronen. Glutamat erhöht wiederum die Aktivität der GPi/SNpr Neuronen und verstärkt damit die Thalamusinhibition. Nach dieser schematischen Darstellung fördert also die Stimulation des direkten Weges die Willkürmotorik, während diese durch Stimulation des indirekten Weges verringert wird (Chesselet und Delfs, 1996).

Der Neurotransmitter Dopamin, der von den spontanaktiven SNpc Neuronen ausgeschüttet wird, besitzt eine entscheidende modulatorische Funktion für die glutamaterge Stimulation der striatalen Neuronen. Dopamin vermittelt seine Wirkung über spezifische Dopaminrezeptoren, die zur Familie der G-Protein gekoppelten Sieben-Transmembran Rezeptoren gehören (vgl. Abb. 1.6). Gemäß ihrer stimulierenden oder inhibierenden Effektorvermittlung unterscheidet man D_1 -artige und D_2 -artige Dopaminrezeptoren. Die D_1 -artigen Rezeptoren (D_{1a} und D_{1b}/D_5) wirken stimulierend über die Adenylatzyklase während die Mitglieder der D_2 -Familie (D_{2kurz} , D_{2lang} , D_3 und D_4) über eine Hemmung der Adenylatzyklase oder andere Signalkaskaden eine inhibitorische Wirkung vermitteln (Sibley, 1996). Da D_1 -Rezeptoren hauptsächlich auf striatonigralen und D_2 -Rezeptoren hauptsächlich auf striatopallidalen Neuronen exprimiert werden, verstärkt die kontinuierliche Dopaminausschüttung die Signalleitung durch die Basalganglien über den direkten Weg (D_1), während der indirekte Weg gehemmt wird (D_2). Dopamin fördert also synergistisch sowohl über den direkten als auch über den indirekten Weg eine Erhöhung der Willkürmotorik. Ein Mangel an Dopamin durch fortschreitende Degeneration der dopaminergen Neuronen verringert sowohl die Stimulation der direkten striatonigralen Projektion als auch die Inhibition der indirekten striatopallidalen Projektion (Starr, 1995). Daraus resultiert eine erhöhte neuronale Aktivität von GPi und STN Neuronen. Dies hat eine verstärkte Inhibition des thalamokortikalen Netzwerkes zur Folge. Auch wird vermutet, daß die Generation des für Parkinson-Kranke typischen Ruhetremors durch die erhöhte Aktivität pallidaler Neuronen initiiert wird (Bergman et al. 1998). Tatsächlich führen Läsionen in STN und GPi zur einer Verbesserung der Parkinson-Sympomatik.

Das Verschaltungsprinzip der Basalganglien macht den entscheidenden Einfluß der dopaminergen Neuronen in der Bewegungskontrolle verständlich, stellt aber nur eine Erklärungshilfe dar, die den momentanen Wissensstand gut widerspiegelt. Die tatsächlich vorliegenden wechselseitigen Beeinflussungen der einzelnen Kerngebiete scheinen noch weitaus komplexer zu sein. Dies zeigt z.B. der Befund, daß alle Neuronen des Striatums

auf Einzelzell-PCR Ebene (vgl. 1.3.1.2) sowohl D₁- also auch D₂-artige Dopaminrezeptoren exprimieren (Surmeier et al., 1996b).

Zu betonen ist auch, daß der Eingang von vielen kortikalen Gebieten auf die striatalen Neuronen konvergiert. Man vermutet, daß diese enorme aber organisierte Konvergenz und die nachgeschaltete Verrechnung in den Basalganglien sich nicht in einer einfachen thalamischen Aktivierung erschöpft. Vielmehr werden innerhalb der Basalganglien einzelne Bewegungskomponenten zu sich ergänzenden und miteinander harmonisierenden motorischen Programmen kombiniert. Funktionsstörungen der Basalganglien sind daher immer von einem Zerfallen von motorischen Gesamtkonzepten begleitet. So fehlt z.B. beim Gangbild des Parkinson-Kranken die harmonische Mitbewegung der Arme, beim Huntington-Patienten dagegen stören unwillkürliche Bewegungen das motorische Konzept. Nicht vergessen werden darf, daß die motorische Funktion der Basalganglien nur eine von mehreren Leistungen dieses Netzwerkes ist, das ebenfalls im Dienste von kognitiven und emotiven Funktionen steht (Wichmann und DeLongh, 1996).

1.1.3 Metabolischer Streß und Neurodegeneration

Auch wenn die Ursache für das fortschreitende Absterben der dopaminergen Mittelhirnneuronen im Verlauf der Parkinson-Krankheit noch unbekannt ist, wird zunehmend evident, daß chronischer metabolischer Streß ein entscheidender Faktor für die Initiation neurodegenerativer Prozesse sein könnte (Beal, 1996; Hanna und Bhatia, 1997). Metabolischer Streß kann u.a. durch Inhibition der Atmungskette ausgelöst werden. Die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte Atmungskette bezeichnet eine enzymatische Kaskade von Redoxsystemen, durch die die oxidative ATP-Erzeugung ermöglicht wird. In SNpc Neuronen aus Gehirnen von Parkinson-Patienten konnte postmortem ein spezifischer etwa 40%iger Funktionsverlust des Komplex I (CXI; NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase) der Atmungskette nachgewiesen werden. Einige Studien zeigten diesen CXI-Defekt auch für Thrombozyten von Parkinson-Patienten. Die molekulare Grundlage dieser Störung ist unklar, jedoch weisen neuere Zellfusionsstudien darauf hin, daß Mutationen mitochondrialer DNA am CXI-Defekt beteiligt sein könnten (Swerdlow et al., 1996). Die Akkumulation exogener oder endogener CXI inhibierender Substanzen ist eine weitere Erklärungsmöglichkeit.

Zudem ist bei Parkinson-Patienten oft ein abnorm hoher Spiegel an freien Radikalen bei gleichzeitig erniedrigter Konzentration von neutralisierenden Antioxidantien, wie z.B. Vitamin A, C und E oder Glutathion, festzustellen (Schapira, 1996). Bereits im normalen

Zellstoffwechsel werden, z.B. während des Elektronentransferprozesses in der Atmungskette, ständig freie Radikale gebildet. Diese aufgrund eines ungepaarten Elektrons sehr reaktiven, oxidativen Verbindungen können aber im Normalfall durch effektive antioxidative Mechanismen inaktiviert werden. Wenn die Produktion freier Radikale jedoch so hoch ist, daß die unterschiedlichen Inaktivierungsmechanismen überlastet werden, spricht man von oxidativem Streß. Postmortem-Untersuchungen ergaben zahlreiche Hinweise für erhöhten oxidativen Streß in den SN Neuronen von Parkinson-Patienten: So fand sich eine Erniedrigung von zellulären Antioxidantien wie Glutathion (GSH) und antioxidativen Enzymen wie GSH-Peroxidase, sowie eine erhöhte Lipidperoxidation und erhöhte oxidative DNA Schädigung (Münch et al., 1998).

Komplex I-Defekt und oxidativer Streß können sich gegenseitig potenzieren. Störungen der Atmungskette führen zum einen zu einer erhöhten Produktion von freien Radikalen, erhöhter oxidativer Streß kann zum anderen z.B. mitochondriale DNA, die keine Reparaturmechanismen besitzt, schädigen und so einen Komplex I-Defekt induzieren oder weiter verstärken. Eine aus diesem Szenario resultierende zunehmende mitochondriale Funktionsstörung könnte schließlich die Selbstzerstörungskaskade des programmierten Zelltodes auslösen. Wie genau dieser Initiationsmechanismus aussehen könnte ist unbekannt. Dennoch liefern weitere Studien immer mehr Hinweise für eine grundsätzliche Beteiligung des metabolischen Stresses an der Initiation von Degenerationsprozessen (Przedborski und Jackson-Lewis, 1998). Die Hemmung der oxidativen Phosphorylierung und damit ein Absinken des ATP-Spiegels hat z.B. eine Verringerung der Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase zur Folge, die für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials notwendig ist. Eine dadurch induzierte Depolarisation kann den spannungsabhängigen Magnesiumblock der NMDA-Rezeptoren aufheben und so einen massiven Kalziumeinstrom und weitere Depolarisation bewirken. Durch die anhaltende Erregung und die hohe Kalziumkonzentration können wiederum intrazelluläre Prozesse aktiviert werden, die zum Zelltod führen. Man spricht auch von Exzitotoxizität (Choi, 1992; Choi, 1995).

In diesem Kontext stellt sich wiederum die Frage der differentiellen Vulnerabilität dopaminerger Subpopulationen, die nun präzisiert werden kann: Welche differentiell exprimierten Gene beeinflussen die unterschiedliche metabolische Toleranz dopaminerger SN Neuronen. Da die funktionelle Antwort dopaminerger Neuronen auf metabolischen Streß nicht an postmortem Humanpräparaten untersucht werden kann, sind Tiermodelle unerlässlich (Gerlach und Riederer, 1996).

1.2 Mausmodellssysteme der Parkinson-Krankheit

Ein geeignetes Tiermodell für die Parkinson-Krankheit sollte möglichst zwei Kriterien erfüllen. Zum einen muß es eine selektive Degeneration der dopaminergen Mittelhirnneuronen aufweisen, zum anderen sollte die neuroanatomische Organisation der Substantia nigra möglichst homolog zum Menschen sein. Dies gilt für Primaten, aber auch für die Maus, bei der die morphologische Struktur der SNpc der des Menschen sehr ähnlich ist. Bei Mensch und Maus sind innerhalb der SN zwei Zellschichten in dorsoventraler Orientierung zu differenzieren. Ebenfalls ist die morphologische Verteilung von Markerproteinen, wie z.B. kalziumbindenden Proteinen, für dopaminerge Subpopulationen in beiden Organismen homolog. Die Anzahl der dopaminergen Mittelhirnneuronen ist aber bei der Maus im Vergleich zum Menschen deutlich geringer (ca. 25.000 im Vergleich zu ca. 500.000) und die einzelnen Neuronen sind kleiner (ca. 22x11 µm im Vergleich zu ca. 60x30 µm). Auch fehlt der Maus die für Primaten typische schwarze Neuromelanin-Pigmentierung der SN Neuronen (Nelson et al., 1996). Entscheidend für den Stellenwert des Mausmodells ist jedoch, daß bei Neurodegenerationsprozessen in der SN Region von Maus und Mensch eine in Lage und Markerexpression sehr vergleichbare Population von dopaminergen Neuronen überlebt. Zwei wichtige Mausmodelle der Parkinson-Krankheit werden im folgenden vorgestellt.

1.2.1 Die *weaver*-Maus

Ein anerkanntes Tiermodell zur Untersuchung der selektiven Degeneration der dopaminergen Neuronen der Substantia nigra ist die sogenannte *weaver*-Maus. Dem *weaver*-Phänotyp liegt eine spontan auftretende, autosomal rezessiv vererbte Punktmutation auf Chromosom 16 im *Girk2*-Gen zugrunde. (Die Familie der G-Protein gekoppelten, einwärtsrektifizierenden Kaliumkanäle (Girks) wird in Kapitel 1.4.1.1 ausführlich besprochen.) Ein einziger Basenaustausch von G zu A in Position 953 der cDNA-Nukleotidsequenz des *Girk2*-Gens führt zum Austausch des ersten Glycins im Glycin-Tyrosin-Glycin Motiv (GYG) der Kanalpore zu Serin (Patil et al, 1995; vgl. Abb. 3.16). Der spontan auftretende Phänotyp der *weaver*-Maus ist charakterisiert durch Ataxie, Epilepsie und Tremor (Lane, 1964). Neben der postnatalen selektiven Degeneration dopaminergener SN Neuronen ist die Neuropathologie der homozygoten *weaver*-Maus vor allem durch eine massive pränatale Degeneration cerebellärer Körnerzellen und einer daraus resultierenden Fehlanlage des Kleinhirns gekennzeichnet. In den ersten drei

Lebenswochen sterben ca. 50% der dopaminergen Neuronen ab (Verney et al., 1995). Das Absterben der Neuronen beginnt erst postnatal und setzt sich progressiv fort. Sieben Tage nach Geburt (P7) ist noch kein Verlust an dopaminergen Neuronen zu beobachten, an P14 sind ca. 35% der dopaminergen Neuronen degeneriert, an P21 ca. 50%, und an P90 sind schließlich ca. 70% aller dopaminergen Neuronen abgestorben (Verney et al., 1995; Adelbrecht et al., 1996; vgl. auch Abb. 3.17). Sehr ähnlich dem Vulnerabilitätsmuster bei Parkinson-Kranken sind in der *weaver*-Maus vor allem die ventralen SN Neuronen von der fortschreitenden Degeneration betroffen, während calbindinpositive, mediodorsale SN und VTA Neuronen überleben (Graybiel et al., 1990; Hirsch et al., 1997).

Die Identifikation der für den *weaver*-Phänotyp ursächlichen Mutation im *Girk2*-Gen ermöglicht die Untersuchung des diesem Degenerationsmodell zugrundeliegenden Pathomechanismus. Die Analyse des *Girk2*-Gens bei Parkinson-Patienten ergab allerdings keinen Hinweis auf eine vergleichbare Mutation, so daß die *weaver*-Maus zwar ein der Parkinson-Krankheit homologes Vulnerabilitätsmuster aufweist, der initiale, die Degeneration auslösende molekulare Mechanismus jedoch unterschiedlich ist. Die funktionelle Analyse der *Girk2*-Mutation in heterologen Expressionssystemen ergab erste Hinweise auf einen möglichen Pathomechanismus. Homomere *wvGirk2*-Kanäle zeigen einen Verlust ihrer Kaliumselektivität und bilden im Sinne einer Funktionsänderung (gain-of-function) konstitutiv aktive Kationenkanäle aus (Slesinger et al., 1996). Dieser Mechanismus allein ist jedoch nicht in der Lage, das Degenerationsmuster in *weaver* zu erklären, da keineswegs alle *Girk2* exprimierenden Neuronen degenerieren (Adelbrecht et al., 1997). Diskutiert wird, ob die Heteromerisierung von *wvGirk2* mit anderen *Girk*-Untereinheiten den Kanalphänotyp modifizieren kann (Kofuji et al., 1996; Navarro et al., 1996). Elektrophysiologische Untersuchungen an betroffenen Körnerzellen ergaben in Hinblick auf eine Funktionsänderung oder aber einen Funktionsverlust der mutierten *wvGirk2*-Kanäle bisher kein eindeutiges Bild (Kofuji et al., 1996, Navarro et al., 1996; aber: Surmeier et al., 1996a; Rossi et al., 1998). Untersuchungen an dopaminergen *weaver* Neuronen werden in dieser Arbeit erstmals vorgestellt. Die Tatsache, daß eine *Girk2*-Knock-Out Maus keine Neurodegeneration aufweist, legt nahe, daß die *weaver*-Mutation nicht mit einem einfachen Funktionsverlust (loss-of-function) sondern eher mit einem komplexen, vom jeweiligen zellulären Expressionskontext abhängigen gain-of-function Pathomechanismus assoziiert ist (Signiori et al., 1997).

1.2.2 Die MPTP-Maus

Eine weitere Möglichkeit, diejenige Population dopaminerger Neuronen zu untersuchen, die auch bei Parkinson-Patienten überlebt, bietet eine systematische Verabreichung des Zellgiftes MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin) an geeignete Versuchstiere (Burns et al., 1983).

MPTP hat die Etablierung von sehr spezifischen neurotoxikologischen Parkinson-Tiermodellen erst ermöglicht und nimmt seit den frühen achtziger Jahren eine zentrale Rolle in der Parkinsonforschung ein. Die Einnahme von MPTP-kontaminiertem synthetischem Heroin führte bei einer Reihe von Konsumenten zu einem akut auftretenden, massiven Parkinson-Syndrom. Postmortem-Analysen erbrachten die neuropathologische Bestätigung dieser neuen Parkinsonform: Auch hier lag eine selektive Degeneration der vulnerablen dopaminergen Mittelhirnneuronen vor. MPTP wurde als die eigentlich aktive Substanz dieses toxischen Parkinson-Syndroms identifiziert und der biochemische Pathomechanismus aufgeklärt. MPTP kann die Blut-Hirn-Schranke, die das Gehirn umgibt, passieren und wird dort durch die Monoaminoxidase B in MPP^+ umgesetzt. MPP^+ wird über einen in der Plasmamembran lokalisierten Dopamintransporter selektiv in den dopaminergen Neuronen akkumuliert. Dort blockiert es den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette und induziert damit massiven metabolischen Streß (Heikkila und Sonsalla, 1987). Durch diese Befunde wurde die Suche nach möglichen CXI-Defekten auch beim idiopathischen Parkinson-Syndrom erst stimuliert. Auf welche Weise der durch MPP^+ ausgelöste metabolische Streß den Zelltod induziert und warum ebenfalls wie bei Parkinson-Patienten und in der *weaver*-Maus nur eine Subpopulation der dopaminergen Neuronen von der Degeneration betroffen ist, bleibt weiterhin ungeklärt.

1.3 Einzelzelltechniken

Aus dem bisher gesagten wird deutlich, daß es unerlässlich ist, dopaminerge Mittelhirnneuronen auf Einzelzellebene zu untersuchen. Warum geht ein Neuron in *weaver*-Mäusen, bei MPTP-induziertem, metabolischem Streß oder schließlich bei einem von der Parkinson-Krankheit betroffenen Menschen zugrunde, ein anderes bleibt aber völlig unbeeinflusst? Nur durch den Vergleich der einzelnen Neuronen kann die Ursache der unterschiedlichen Empfindlichkeit für neurodegenerative Prozesse aufgedeckt werden. Zeigen sich auf Einzelzellebene Unterschiede in dem elektrophysiologischen Verhalten dieser Neuronen oder in ihrer Empfindlichkeit gegenüber metabolischem Streß? Oder

finden sich Unterschiede in der Genexpression? Um die funktionelle Reaktion der Einzelzelle auf metabolischen Streß zu untersuchen und das Genexpressionsmuster derselben Zelle zu analysieren, wurden in dieser Arbeit zwei Einzelzelltechniken miteinander kombiniert: Die Patch-Clamp Technik für die elektrophysiologische Analyse und die Einzelzell-RT-PCR Technik zur Expressionsanalyse.

1.3.1 Die Patch-Clamp Technik

Mit der Patch-Clamp Technik* kann das elektrophysiologische Verhalten einzelner Neuronen im Hirnschnitt untersucht werden (Neher und Sackmann, 1976; Stuart et al., 1993). Mit Hilfe dieses Verfahrens kann die elektrische Aktivität einzelner Neuronen, selbst einzelner Ionenkanäle, untersucht werden. Dazu wird eine mit einer Elektrolytlösung gefüllte Glasmikropipette auf die Membran eines Neurons aufgesetzt. Durch Anlegen eines Unterdrucks entsteht eine dichte Verbindung zwischen Pipettenglas und Zellmembran mit einem sehr hohen Abdichtungswiderstand im Gigaohm-Bereich zwischen dem Pipetteninneren und dem Außenmedium. Mit diesem sogenannten Gigaseal* wird das Membranstück (der Patch) unter der Pipettenspitze elektrisch isoliert. Ein Silber/Silberchloriddraht in der Pipette stellt die Verbindung zu einem hochempfindlichen Vorverstärker her, mit dem der Strom gemessen werden kann, der durch geöffnete Ionenkanäle in dem Membranfleck fließt (Cell-Attached Konfiguration). Der Gigaseal ermöglicht verschiedene Manipulationen des Membranflecks unter der Pipette, so daß ausgehend von der Cell-Attached Konfiguration noch weitere Meßkonfigurationen möglich sind. So läßt sich durch leichten Unterdruck das Membranstück unter der Pipette durchbrechen, ohne daß der Gigaseal zerstört wird. Dadurch erhält man einen niederohmigen Zugang zur gesamten Zelle und kann damit die Gesamtheit der Ionenströme der untersuchten Zelle messen (Whole-Cell Konfiguration)*. Zieht man dagegen die Pipette nach Ausbildung des Gigaseals vorsichtig von der Zelle zurück, kann man das Membranstück unter der Pipette aus der Zellmembran herausreißen und erhält so einen zellfreien Zugang zu der zytoplasmatischen Seite des Membranflecks. Diese Inside-

* Die englischen Bezeichnungen Seal, für Abdichtung, Patch-Clamp für Membranfleck-Klemme, Cell-Attached, Whole-Cell, Inside-Out sowie Outside-Out, für die unterschiedlichen Meßkonfigurationen, haben sich auch in der deutschen Sprache und Literatur gegenüber den deutschen Übersetzungen durchgesetzt und werden daher auch in dieser Arbeit verwendet.

Out Konfiguration* ist z.B. geeignet, um Modulationen von Ionenkanälen durch intrazelluläre zytoplasmatische Faktoren zu untersuchen. Zieht man die Pipette in der Whole-Cell-Konfiguration von der Zelle zurück, so schließt sich die geöffnete Membran unter der Pipette wieder spontan und zeigt mit ihrer Außenseite zum Bad. Diese Outside-Out Konfiguration* ist eine wichtige Methode zur Untersuchung von Ionenkanälen mit schnellen Aktivierungs- und Deaktivierungskinetiken und deren Modulation (vgl. Hamill et al., 1981). Abbildung 1.3 faßt die unterschiedlichen Patch-Clamp Konfigurationen zusammen.

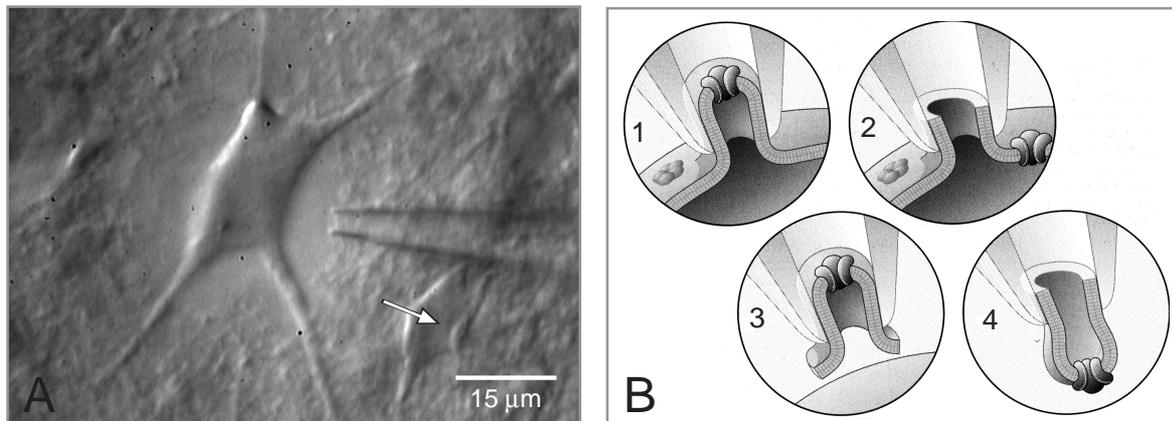


Abb. 1.3: Konfigurationen der Patch-Clamp Technik

Das videomikroskopische Bild (A) zeigt ein dopaminerges SNpc Neuron im Mittelhirnschnitt der Maus sowie eine Patch-Clamp Pipette. Der Pfeil verweist auf ein GABAerges Interneuron. Die Zeichnungen (B) stellen die vier Standard-Konfigurationen der Patch-Clamp Technik dar: (1) Cell-Attached, (2) Whole-Cell, (3) Inside-Out, (4) Outside-Out (verändert nach Numberger und Draguhn, 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Whole-Cell Messungen an SN Neuronen in Gehirnschnitten (Slices) von ca. 14 Tage alten Mäusen durchgeführt (Edwards et al., 1989; vgl. Abb. 1.3 A). Entscheidend für erfolgreiche Patch-Clamp Experimente ist die Präparation von vitalen, möglichst dünnen Gehirnschnitten. Während die Herstellung der Hirnschnitte von jungen Tieren relativ unkompliziert ist (siehe 2.3.1), ist eine entsprechende Präparation von adulten Tieren wesentlich empfindlicher, aber prinzipiell auch möglich (Lipron et al., 1995).

1.3.2 Die Detektion von Einzelzell-mRNA

Um die Genexpression von einzelnen Neuronen miteinander vergleichen zu können, müssen molekularbiologische Techniken angewandt werden. Im Prinzip könnten alle Techniken eingesetzt werden, die auch für makroskopische Analysen differentieller Genexpression geeignet sind.

Die Gesamtheit aller in einer Zelle exprimierten Gene spiegelt sich in der mRNA-Zusammensetzung des Zytoplasmas wider. Aus diesem Grund liegt allen Strategien zur Untersuchung von differentieller Genexpression die vergleichende Analyse zweier oder mehrerer mRNA-Pools zugrunde. Die RNA wird dazu meistens mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase unter Verwendung von Random-Hexamer- oder Oligo-dT-Primern in einen stabileren cDNA-Pool umgeschrieben. Primer sind kurze DNA-Moleküle von 6 bis 40 Basen, die gemäß ihrer Nukleotidsequenz mit entsprechenden einzelsträngigen DNA-Bereichen hybridisieren und so kurze doppelsträngige DNA-Bereiche bilden, die von einigen Enzymen als Synthesestartpunkte benötigt werden (z.B. Reverse Transkriptase, *Taq*-Polymerase). Die Expression spezifischer mRNA-Transkripte kann nach Reverser Transkription direkt durch Amplifikation der entsprechenden cDNA-Moleküle in einer Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) nachgewiesen werden. Soll nicht nur die Expression einer bestimmten Anzahl von Genen untersucht werden, sondern möglichst die gesamte Genexpression zweier Gewebe oder Zelltypen miteinander verglichen werden, bieten sich Methoden wie Subtraktive Hybridisierung oder Differential-Display-PCR an (Wan et al., 1996; Bähr, 1997).

Die methodische Herausforderung für die Analyse der Genexpression von einzelnen Zellen liegt in der sehr geringen Menge des Einzelzell-mRNA-Ausgangsmaterials. Dieses Problem ist besonders relevant für die mRNAs der Klasse III, die nur in geringer Kopienzahl pro Zelle vorliegen. Somit ist es essentiell, die Effizienz und Sensitivität der einzelnen Schritte der Einzelzell-Technik so zu optimieren, daß selbst Transkripte in geringster Kopienzahl noch reproduzierbar detektiert werden können. Der notwendige enorm hohe Amplifikationsfaktor der Einzelzell-Methode potenziert gleichzeitig das Risiko von Kontaminationen. Daher sollte die Durchführung möglichst einfach und in wenigen Schritten erfolgen. Bis jetzt wird deshalb in den meisten Studien zur vergleichenden Untersuchung der Genexpression einzelner Zellen die Patch-Clamp Technik mit der RT-PCR in der sogenannten Einzelzell-PCR (scPCR) kombiniert (Sucher et al., 1991; Lambolez et al., 1992; Monyer und Lambolez, 1995).

Nach elektrophysiologischer Charakterisierung einer Zelle in der Whole-Cell Konfiguration wird das Zytoplasma des Neurons durch Anlegen eines Unterdrucks unter optischer Kontrolle in die Meßpipette gesaugt und anschließend zur reversen Transkription und PCR-Amplifikation in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Einzelzell RT-PCR erfordert nur relativ wenige molekularbiologische Arbeitsschritte und birgt deshalb vergleichsweise ein nur geringes Risiko für falsch-negative oder -positive PCR-Signale.

Zum erfolgreichen Nachweis von mRNAs sollte möglichst der gesamte cDNA-Pool einer Zelle in der PCR eingesetzt werden, so daß pro Zelle lediglich eine Reaktion durchgeführt werden kann. Lediglich hochabundante Marker- oder Housekeeping-transkripte können noch verlässlich aus geringen Fraktionen (1-10%) des gesamten Einzelzell cDNA-Pools nachgewiesen werden. Damit ist die Zahl der abfragbaren Transkripte auf diejenige begrenzt, die mit einer sogenannten multiplex-PCR (mPCR) parallel amplifiziert werden kann. Sie liegt im Moment auf Einzelzellebene bei ca. 10 Transkripten (Ruano et al., 1995, Cauli et al., 1997; Song et al., 1997). In einer multiplex-PCR wird nicht nur ein DNA-Fragment vermehrt, sondern man amplifiziert simultan unterschiedliche DNA-Fragmente durch Zugabe aller entsprechenden Primerpaare (Edwards und Gibbs, 1994). Diese Variante der Einzelzell-PCR wurde auch in dieser Arbeit etabliert und durchgeführt.

Vorgeschaltete Amplifikationsschritte auf RNA- oder cDNA-Ebene, wie z.B. die von James Eberwine entwickelte Transkriptions- oder auch antisense-RNA (aRNA) Amplifikationsmethode, sollen unter optimalen Bedingungen einen linear amplifizierten, also repräsentativen und quasi unerschöpflichen Einzelzell cDNA-Pool erzeugen (Van Gelder et al., 1990; Eberwine et al., 1992). Die mRNA der einzelnen Zelle wird in dieser Methode mit Hilfe eines Oligo-dT-Primers, der an seinem 5'-Ende zusätzlich die Sequenz eines RNA-Polymerase-Promotors trägt, in cDNA umgeschrieben. An diese Promotorsequenz, die nun jedes cDNA-Molekül trägt, kann eine RNA-Polymerase binden und aus der cDNA eine amplifizierte sogenannte cRNA synthetisieren. Dieser Vorgang kann mehrfach wiederholt werden und sollte im Gegensatz zur PCR im Idealfall zu einer linearen Amplifikation des ursprünglichen mRNA-Pools der Einzelzelle führen. Zur Detektion der gewünschten Transkripte können nun im Prinzip beliebig viele RT-PCR-Reaktionen angesetzt werden, oder aber die amplifizierte cRNA wird direkt mittels Hybridisierungstechniken analysiert. Abbildung 1.4 zeigt schematisch vereinfacht das Prinzip beider Einzelzell-mRNA-Amplifikationsmethoden.

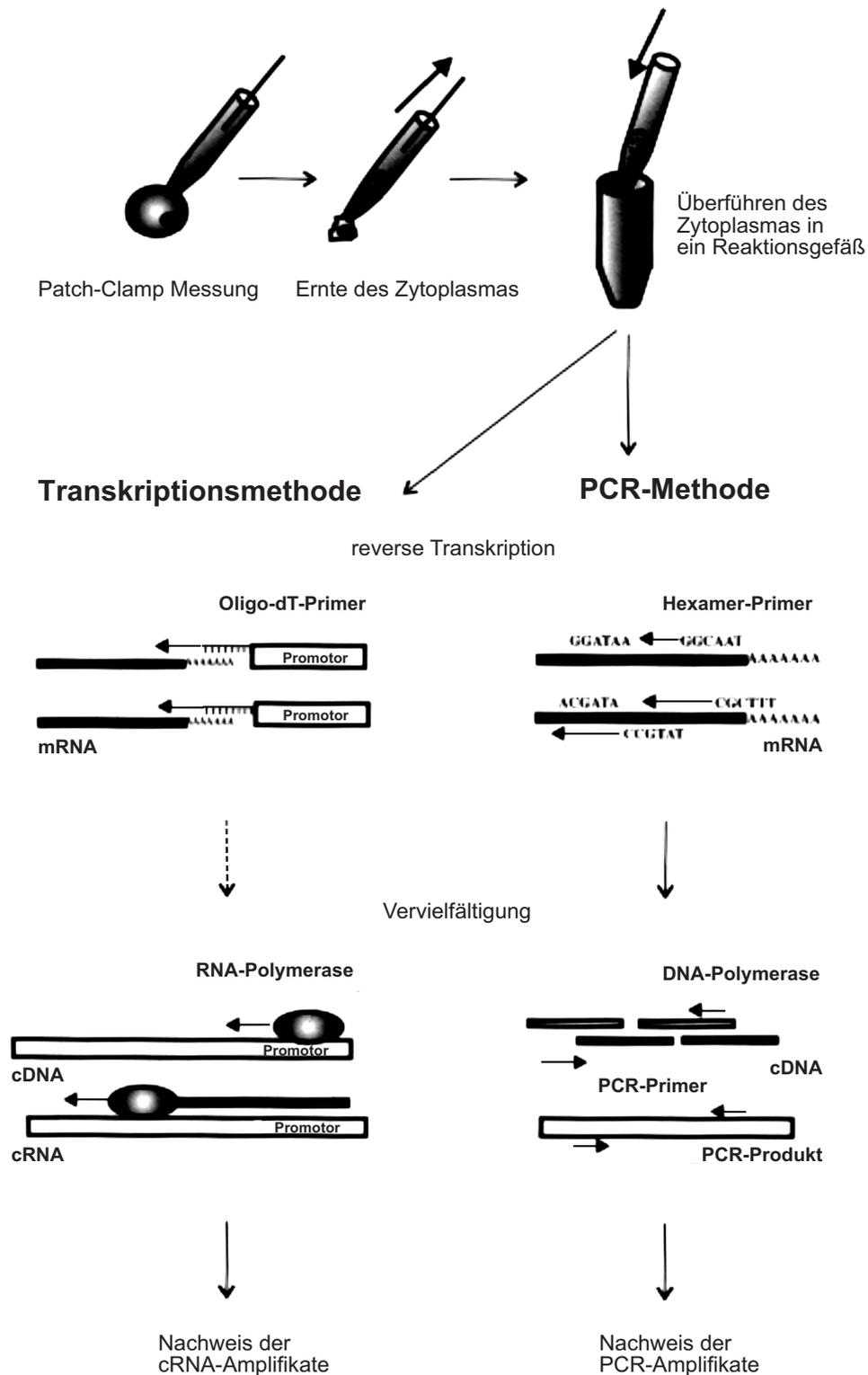


Abb. 1.4: Zwei Detektionsmethoden zum Nachweis von Einzelzell-mRNA

Nach elektrophysiologischer Charakterisierung in der Whole-Cell Konfiguration wird der Zellinhalt in die Patchpipette gesaugt und in ein Reaktionsgefäß überführt. In der PCR-Methode werden die RNA Transkripte nach reverser Transkription mit Random-Hexamer-Primern in einer geeigneten PCR amplifiziert und z.B. durch Gelelektrophorese oder Sequenzierung identifiziert. In der Transkriptionsmethode wird mit Hilfe von Oligo-dT-Primern, die eine zusätzliche 5'-RNA-Polymerase-Promotorsequenz tragen, eine cDNA synthetisiert und zum Doppelstrang ergänzt. An den Promotor der cDNA-Moleküle kann eine RNA-Polymerase binden und eine linear amplifizierte, sogenannte cRNA synthetisieren, die dann z.B. in Hybridisierungen oder mittels RT-PCR analysiert wird (verändert nach Numberger und Draguhn, 1996).

Die praktische Durchführung der aRNA-Amplifikation erfordert allerdings eine cDNA-Zweitstrang-Synthese und damit viele zusätzliche Arbeitsschritte (Eberwine et al., 1995). So konnte die Transkriptionsmethode bis jetzt nur in wenigen Arbeitsgruppen routinemäßig etabliert werden. Im Gegensatz dazu wird die Einzelzell-PCR-Methode inzwischen von mehreren Arbeitsgruppen erfolgreich eingesetzt (vgl. z.B. Smith und O'Dowd, 1994; Gurantz et al., 1996; Plant et al., 1997; Lee et al., 1998).

Da in einer multiplex-RT-PCR die Anzahl der aus einer Zelle nachzuweisenden unterschiedlichen mRNA-Transkripte limitiert ist, ist es von besonderer Bedeutung, ein sinnvolles Set an Genen zu bestimmen, deren Expression untersucht werden soll. Ionenkanäle sind für die Einzelzellanalyse von Neuronen von besonderem Interesse, da sie für eine große Anzahl von physiologischen Prozessen in diesen Zellen von entscheidender Bedeutung sind. Die Hauptfunktion der Ionenkanäle in Nervenzellen ist die Übertragung von elektrischen Signalen in und zwischen Zellen. Die Ströme werden hauptsächlich durch den Fluß von vier Ionenarten (Natrium, Kalium, Kalzium und Chlorid) getragen. Das spezifische Muster an Ionenkanälen, das eine Zelle exprimiert, ist letztendlich entscheidend für ihr elektrophysiologisches Verhalten und somit für ihre Rolle innerhalb der neuronalen Kommunikation.

1.4 Kaliumselektive Ionenkanäle

Ionenkanäle werden gemäß der Selektivität ihrer Kanalpore in unterschiedliche Familien eingeteilt. Kanäle, die eine hohe Selektivität für Kaliumionen aufweisen, gibt es in Bakterien, Pflanzen und Tieren. Diese Kaliumkanäle sind in vielen erregbaren und nichterregbaren Zelltypen entscheidend an der Kontrolle des Ruhemembranpotentials beteiligt. Ihre klassische Funktion besteht in der Steuerung neuronaler und muskulärer Erregungsprozesse, z.B. der Repolarisation von Aktionspotentialen. Auch sind Kaliumkanäle an endokrinen Vorgängen und an der komplexen Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes eines Organismus sowie an Zellproliferationsprozessen beteiligt. Sie greifen in die Steuerung der synaptischen Plastizität von Neuronen ein und sind damit an so komplexen Vorgängen wie Lernen und Erinnerungsvermögen beteiligt (Pongs, 1997).

Die enorme funktionelle Vielfalt der Kaliumkanäle spiegelt sich auch in ihrer molekularen Diversität wider. Das *C. elegans*-Genomprojekt, die erste komplette Analyse eines tierischen Genoms, führte zur Identifizierung von über 80 verschiedenen Kaliumkanalgenen für diesen Organismus, während andere Ionenkanäle eine geringere Zahl an Mitgliedern aufwiesen (Bargmann, 1998). Die Anzahl an unterschiedlichen

Kaliumkanälen in Säugetieren dürfte noch höher liegen. Man unterscheidet zwei Hauptfamilien von Kaliumkanälen anhand der Struktur ihrer Untereinheiten: Die Superfamilie der Kaliumkanäle mit sechs hydrophoben membrandurchspannenden Segmenten (S1 bis S6), der u.a. die Unterfamilien der spannungsgeschalteten (K_v) Kanäle angehören, und die Familie der einwärtsrektifizierenden Kaliumkanäle (K_{ir}) mit nur zwei Transmembrandomänen (M1 und M2) (Abbildung 1.5).

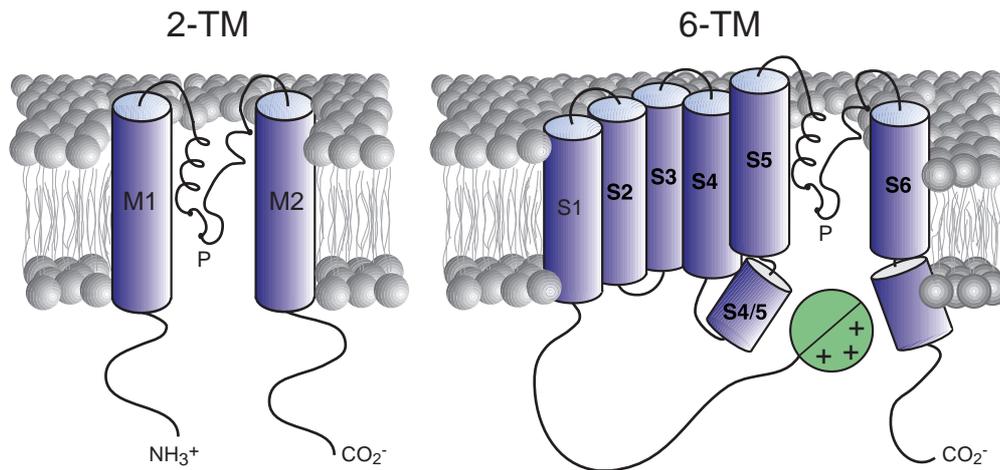


Abb. 1.5: Untereinheitenstruktur der zwei Hauptfamilien von Kaliumkanälen

Man unterteilt die Familie der Kaliumkanäle anhand der Anzahl der Transmembrandomänen (TMs) ihrer Untereinheiten in 2-TM (M1+M2) bzw. 6-TM (S1-S6) Kanäle. Gemeinsam ist beiden Hauptfamilien eine TM-flankierte Porendomäne (P). Einige 6-TM Kanäle tragen an ihrem Aminoterminus eine positiv geladene Inaktivierungsdomäne (verändert nach Sewing et al., 1996b).

Zur Bildung funktioneller Kaliumkanäle müssen sich jeweils vier dieser sogenannten α -Untereinheiten zusammenlagern (MacKinnon, 1991). Innerhalb der Unterfamilien können auch heterooligomere Kanäle gebildet werden (Sewing et al., 1996a). Zusätzlich können sich an einige Kaliumkanalkomplexe auch noch vier sogenannte β -Untereinheiten anlagern, wodurch die Kanaleigenschaften drastisch verändert werden können (Isom et al., 1994). Durch diese vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten von unabhängigen Kanaluntereinheiten ist die funktionelle Diversität der Kaliumkanäle nochmals erhöht.

Allen α -Untereinheiten ist eine hochkonservierte Signatursequenz gemeinsam, die Bestandteil der Porendomäne (P) ist. Die Signatursequenz der Pore von drei Aminosäuren (GYG oder GFG) ist entscheidend für die Selektivität der Kanalpore (vgl. 1.2.1). Es gibt aber auch Kaliumkanal Untereinheiten mit zwei Porendomänen, die zur Bildung funktioneller Kanäle lediglich Dimere ausbilden: In TwiK (Twin K⁺) Kanaluntereinheiten findet sich ein verdoppeltes Kir-Motiv; TwoK (Two K⁺) Kanaluntereinheiten scheinen sich

aus einer 6-TM und einer 2-TM Untereinheit gebildet zu haben. In diesem Jahr ist es erstmals gelungen, den M1-P-M2-Bereich eines bakteriellen einwärtsrektifizierenden Kaliumkanals (KscA aus *Streptomyces lividans*) zu kristallisieren und so die räumliche Struktur mit einer Auflösung von 3,2 Ångström aufzuklären (Doyle et al., 1998). Damit konnte die bis dahin nur hypothetische Struktur und Funktionsweise der Porenregion und des Selektivitätsfilters weitgehend bestätigt werden. Der Selektivitätsfilter der 45 Å langen Pore hat demnach eine Länge von 12 Å und interagiert über COO^- -Seitenketten mit den Kaliumionen. Zwei dehydratisierte K^+ -Ionen können an den Enden des Filters in einem Abstand von 7,5 Å koordiniert werden. Ihre gegenseitige Abstoßung ermöglicht eine schnelle Permeation der Ionen durch die Kanalpore. Eine Komplexierung von kleineren, dehydratisierten Na^+ - oder Li^+ -Ionen ist aufgrund der spezifischen Geometrie des Selektivitätsfilters energetisch zu ungünstig und findet deshalb nicht statt.

1.4.1 Einwärtsrektifizierende Kaliumkanäle

Einwärtsrektifizierende Kaliumleitfähigkeiten wurden schon 1949 von Bernhard Katz für den Skelettmuskel beschrieben. Die Namensgebung der Kir-Kanäle beruht auf der biophysikalischen Beschreibung ihres Schaltverhaltens. Sie leiten Einwärtsströme negativ vom Kaliumgleichgewichtspotential (E_k) besser als Auswärtsströme positiv von E_k . Ihre nichtlineare Strom-Spannungs-Beziehung gleicht damit der einer Diode (vgl. 2.3.5.1). Mechanistisch resultieren die geringeren Auswärtsströme aus einer spannungsabhängigen Blockierung der Kanalpore durch zytosolische, di- und polyvalente Kationen wie Mg^{2+} oder Spermidin³⁺. Je größer die treibende elektromotorische Kraft ($E-E_k$) in depolarisierender Richtung, desto stärker ist der Porenblock der Kir-Kanäle (Karschin, 1997). Im Gegensatz zu spannungsabhängigen K_v -Kanälen weist die Öffnungswahrscheinlichkeit von Kir-Kanälen also eine zum Membranpotential lediglich relative Spannungsabhängigkeit auf. Das Ausmaß dieser Rektifizierung ist von einigen negativ geladenen Aminosäuren am inneren Poreneingang abhängig, welche die Affinität für die blockierenden polyvalenten Kationen bestimmen (Nichols und Lopatin, 1997).

Bezüglich der physiologischen Funktion ist der Name der Kir-Kanäle zumindest für Warmblüter irreführend, da das Ruhemembranpotential unter physiologischen Ionenbedingungen positiv von E_k ist, und so lediglich Auswärtsströme durch Kir-Kanäle geleitet werden. Auf diese Weise stabilisieren die Kir-Kanäle das Ruhemembranpotential. Bei positiveren Membranpotentialen, z.B. im Rahmen von Aktionspotentialen, nimmt ihr

Einfluß dagegen durch die zunehmende spannungsabhängige Blockierung der Kanalpore deutlich ab (Hille, 1992b).

Aufgrund funktioneller Merkmale sowie der Homologie der Proteinsequenzen wurden die Kir-Kanäle in bis jetzt sieben Familien untergliedert (Doupnik et al., 1995; Karschin et al., 1997). Die Mitglieder der Kir1-Familie sind schwache Einwärtsrektifizierer und können durch zytoplasmatisches ATP moduliert werden. Zu dieser Familie gehören u.a. die Kir1.1-Kanäle der Niere (ROMK-Kanäle). Zur Kir2-Familie (früher IRK) zählen die stark einwärtsrektifizierenden Kir-Kanäle, deren Vertreter im Myokard und im Gehirn stark exprimiert werden. Die Kir3-Familie bilden G-Protein regulierte, mittelstark einwärtsrektifizierende Kir-Kanäle (Girk-Familie, siehe 1.4.1.1) Die Rolle von Kir4 (inzwischen Kir1.2) und Kir5, die im Gehirn heteromeren Kanäle bilden, ist noch weitgehend unklar. Mitglieder der Kir6-Familie bilden eine Untereinheit der schwach einwärtsrektifizierenden, ATP-sensitiven Kaliumkanäle (siehe 1.4.1.2). Und schließlich wurde erst kürzlich das erste Mitglied einer neuen siebten Kir-Familie identifiziert (Kir7.1), welches sich durch ungewöhnliche Permeationseigenschaften und magnesiumunabhängige Einwärtsrektifizierung auszeichnet (Krapivinski et al., 1998; Partiseti et al., 1998; Doering et al., 1998).

1.4.1.1 G-Protein regulierte Kaliumkanäle

Die Kir3-Familie der einwärtsrektifizierenden Kaliumkanäle wird auch als Girk-Familie bezeichnet, da diese Kanäle durch G-Protein Untereinheiten aktiviert werden. Trimere G-Proteine sind über langkettige Fettsäurereste mit der cytosolischen Zellmembran assoziiert und bestehen aus drei Untereinheiten, einer α -, β - und γ -Untereinheit. Die α -Untereinheit bindet GDP bzw. GTP und besitzt intrinsische GTPase-Aktivität. Abbildung 1.6 zeigt den Mechanismus der G-Protein vermittelten Öffnung der Girk-Kanäle.

Bindung des spezifischen Liganden an einen Sieben-Transmembran Rezeptor führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, die eine Interaktion mit dem trimeren G-Protein Komplex ermöglicht. Dadurch bindet die $G\alpha$ -Untereinheit anstelle von GDP jetzt GTP mit hoher Affinität, und der Komplex aus α und $\beta\gamma$ -Untereinheit zerfällt (Gilman, 1987). Sowohl der $G\alpha$ als auch der $G\beta\gamma$ -Komplex können, unabhängig von einer weiteren Ligandenbindung an den Rezeptor, entsprechende Effektormoleküle solange in ihrer Aktivität beeinflussen, bis das von $G\alpha$ gebundene GTP hydrolysiert ist und sich alle drei Komponenten wieder zum trimeren G-Protein Komplex zusammenfinden. Fälschlicherweise wurde der $\beta\gamma$ -Komplex früher für eine rein regulatorische Untereinheit

gehalten. Gerade dieser Untereinheitenkomplex bindet aber an Girk-Kanäle und vermittelt zusammen mit PIP_2 ihre Aktivierung (Logothetis et al, 1987; Clapham, 1994; Huang et al., 1998).

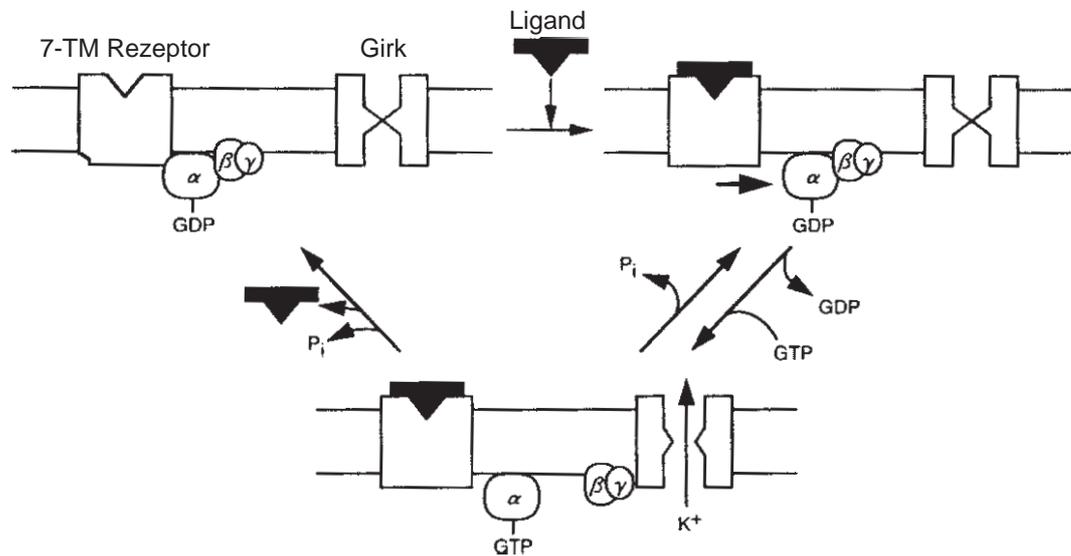


Abb. 1.6: G-Protein abhängige Aktivierung von Girk-Kanälen

Die Bindung des spezifischen Liganden an einen 7-TM Rezeptor führt zu dessen Konformationsänderung, die eine Interaktion mit dem trimeren G-Protein Komplex ermöglicht. Dadurch bindet die $G\alpha$ -Untereinheit anstelle von GDP jetzt GTP und der Komplex aus α und $\beta\gamma$ -Untereinheit zerfällt. Der $\beta\gamma$ -Komplex bindet direkt an den Girk-Kanal und vermittelt seine Aktivierung, unabhängig von einer weiteren Ligandenbindung an den Rezeptor, bis das von $G\alpha$ gebundene GTP hydrolysiert ist ($\text{GDP} + \text{P}_i$) und sich alle drei Komponenten wieder zum trimeren G-Protein Komplex zusammenfinden (verändert nach Isomoto et al., 1997a).

1993 wurde der erste Girk-Kanal (Girk1) durch Expressionsklonierung molekular identifiziert (Kubo et al., 1993). Für viele Warmblüter wurden inzwischen drei weitere Girk-Kanäle (Girk2-4) kloniert (Leasage et al., 1994; Krapivinski et al., 1995). Ein fünfter Girk-Kanal wurde nur aus dem Frosch *Xenopus laevis* isoliert (Hedin et al., 1996). Durch alternatives Splicen können mindestens drei verschiedene Girk2-Isoformen generiert werden, die sich auf Proteinebene nur in ihrem C-Terminus unterscheiden und differentiell exprimiert werden (Isomoto et al., 1996a; Wei et al., 1998). Auch von Girk1-mRNA existieren mindestens drei Splicevarianten (Nelson et al., 1997).

Während Girk1- bis 3-mRNA in vielen Hirnregionen exprimiert wird, ist Girk4-mRNA weniger im Gehirn sondern hauptsächlich im Atrium des Herzens exprimiert. Interessanterweise findet man gerade in der SNpc-Region fast ausschließlich Girk2-mRNA (Chen et al., 1997). Im Gegensatz dazu wird Girk3-mRNA in der SNpr hauptsächlich allein exprimiert (Karschin et al., 1996). Die Girk-Kanäle können sowohl homo- als auch

heteromere Kanalkomplexe bilden. Homomere Girk1-Kanäle sind nicht funktionell (Chan et al., 1996). Native Girk-Kanäle werden in der Regel aus verschiedenen Girk-Untereinheiten aufgebaut. Während ein Girk1/4-Heteromer im Herzen den für die Rhythmuskontrolle wichtigen acetylcholingesteuerten Kir-Kanal (K_{ACH}) konstituiert, bilden Girk1/2-Heteromere die dominante neuronale Spezies der Girk-Kanäle. Eine Ausnahme scheint der Girk2 Kanal zu sein, der auch als Homomer nativ, vor allem in dopaminergen Neuronen, exprimiert wird.

Die Aktivierung von somatodendritischen Girk-Kanälen erfolgt über eine große Vielfalt von neuronalen 7-TM Rezeptoren; zum einen für klassische Neurotransmitter wie GABA ($GABA_B$ -R) oder Glutamat (mGlu-R), zum anderen für Neuropeptid- oder Neuromodulator-Rezeptoren (z.B. Dopamin-R, Serotonin-R) (Dascal, 1997; Werner et al., 1996). Die Aktivierung dieser Kanäle führt zu einer Dämpfung neuronaler Erregbarkeit im Bereich vom mehreren 100 ms bis zu einigen Sekunden. Sie bildet die molekulare Grundlage für die sogenannten langsamen synaptischen Potentiale, die den schnellen, von ionotropen Neurotransmitterrezeptoren getragenen Potentialen nachfolgen. Girk-Kanäle haben somit eine zentrale Rolle bei der Modulation neuronaler Erregbarkeit (Hille, 1992a; Dascal, 1997). Knock-Out Mausmodelle von Girk-Untereinheiten zeigten bei Verlust der erregungsbegrenzenden Girk-Aktivität u.a. eine erhöhte Epilepsieneigung (Signorini et al., 1997; Wickmann et al., 1998). Girk-Kanäle wurden ebenfalls präsynaptisch lokalisiert. Es ist vorstellbar, daß die Aktivierung von präsynaptischen 7-TM Rezeptoren zu einer Begrenzung der Neurotransmitter-Freisetzung beiträgt. Eine Mutation im Girk2-Kanal ist Ursache für den unter 1.2.1 beschriebenen Phänotyp der *weaver*-Maus.

1.4.1.2 ATP-sensitive Kaliumkanäle

Eine weitere wichtige Klasse der einwärtsrektifizierenden Kaliumkanäle stellen die ATP-sensitiven Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle) dar. Die Öffnungswahrscheinlichkeit dieses Kanaltyps wird in Abhängigkeit von der intrazellulären ATP- bzw. ADP-Konzentration reguliert. Auf diese Weise kann der K_{ATP} -Kanal die zellulären elektrophysiologischen Eigenschaften direkt an den Energiestoffwechsel koppeln. Die Existenz von ATP-sensitiven Kaliumkanälen wurde erstmals 1983 von Akinori Noma für Herzmuskelzellen beschrieben. ATP-sensitive Kaliumleitfähigkeiten wurden in Folge in unterschiedlichsten Zelltypen identifiziert, wie z.B. in endokrinen Zellen (insbesondere den β -Zellen des Pankreas), in Herz- und Skelettmuskelzellen sowie in Zellen der glatten Muskulatur, in Endothel- und Nierenepithelzellen und schließlich in neuronalen Zellen verschiedenster

Hirnregionen (Yokoshiki et al., 1998; Ashcroft und Ashcroft, 1990). Auch in pflanzlichen Zellen wurden K_{ATP} -Kanäle beschrieben (Leonhard et al., 1997).

1.4.1.2.1 Struktur und Funktion von K_{ATP} -Kanälen

ATP-sensitive Kaliumkanäle sind heteromultimere Kanäle, die sich aus zwei grundsätzlich verschiedenen Untereinheiten zusammensetzen. Zum einen aus einer einwärtsrektifizierenden Kaliumkanal Untereinheit der Kir6-Familie, zum anderen aus einem Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR), einem Protein, das der Superfamilie der ATP-bindenden Proteine (ABC-Proteine) angehört. Der Sulfonylharnstoffrezeptor besitzt zwei intrazelluläre Nukleotidbindungsdomänen (NBD1+2) und mindestens 13 transmembrane Segmente (vgl. Abb. 1.7); neueste Modelle gehen von 11+6 TMs aus (Tusnady et al., 1997). Da die Kir6.2-Untereinheiten alleine keine funktionellen Kanäle bilden, kann die SUR-Kanalkomponente nicht als β -Untereinheit im klassischen Sinne angesehen werden. Zur Bildung funktioneller ATP-sensitiver Kaliumkanäle müssen vier Kir6-Untereinheiten und vier SUR-Untereinheiten zusammenfinden, wobei ein SUR C-Terminus jeweils mit einem Kir6 N-Terminus interagiert (Clement et al., 1997; Shyng und Nichols, 1997).

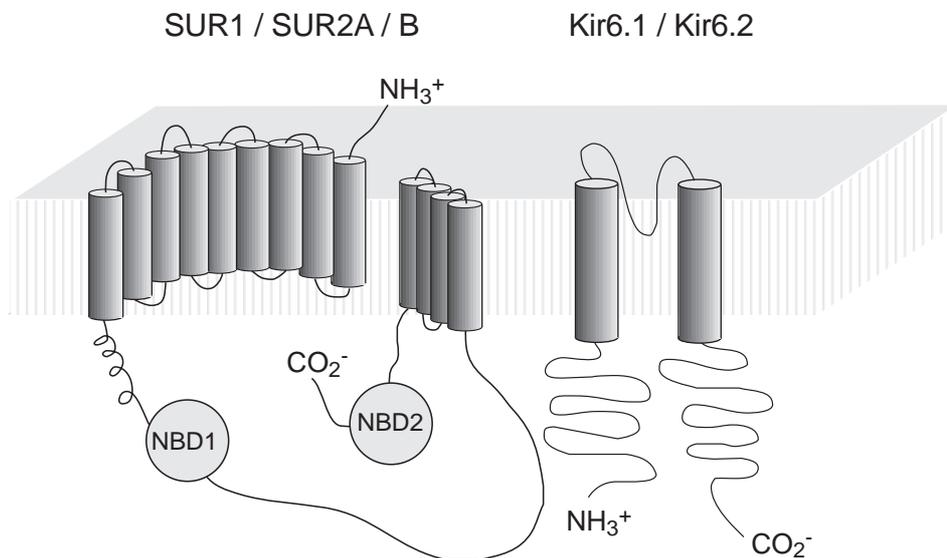


Abb. 1.7: Untereinheitenstruktur der K_{ATP} -Kanäle

K_{ATP} -Kanäle sind heterotetradimere Komplexe, die aus Kir6- und SUR-Untereinheiten bestehen. Die Kir6-Untereinheit (Kir6.1 oder Kir6.2) zeigen die typische 2-TM Struktur einwärtsrektifizierender K^+ -Kanäle. Die SUR-Untereinheiten (SUR1 oder SUR2A/B) besitzen mindestens 13 transmembrane Segmente und zwei intrazelluläre Nukleotidbindungsstellen (NBD1+2) (verändert nach Demolombe und Escande, 1996).

Bis jetzt wurden zwei verschiedene Kir6-Untereinheiten (Kir6.1 und Kir6.2) sowie zwei unterschiedliche SUR-Untereinheiten (SUR1, SUR2) als mögliche Komponenten der K_{ATP} -Kanäle identifiziert und in rekombinanten Systemen auf ihre Eigenschaften untersucht (Inagaki et al., 1995a; Inagaki et al., 1995b; Aguilar-Bryan et al., 1995; Isomoto et al., 1996b). Es existieren mindestens zwei Splicevarianten des SUR2 Gens; SUR2A unterscheidet sich lediglich in einen 3'-terminalen Einschub von 176 bp von SUR2B. Auf Proteinebene differieren die SUR2-Splicevarianten in den letzten 45 Aminosäuren. Diese zwei Splicevarianten und zusätzliche SUR2-Deletionsvarianten (SUR2A Δ 14 bzw. Δ 17/18) erhöhen die Vielfalt der möglichen SUR-Untereinheiten der K_{ATP} -Kanäle (Chutkow et al., 1996; Isomoto et al., 1996b; Aguilar-Bryan et al., 1998). Je nach Untereinheitenkombination haben die K_{ATP} -Kanäle unterschiedliche biophysikalische und pharmakologische Eigenschaften. (Tabelle 3.1 im Ergebnisteil stellt die wichtigsten pharmakologischen Unterschiede der für diese Arbeit relevanten Kanaltypen zusammen.)

Nachdem es gelungen ist, durch Deletion eines C-terminalen Kir6.2 Retentionssignals, das den Transport der Kanaluntereinheit in die Plasmamembran verhindert, funktionelle ATP-sensitive Kanäle ohne SUR-Untereinheiten zu exprimieren, konnten die Aufgaben der Kir6- und der SUR-Komponente genau untersucht werden (Tucker et al., 1997). Demnach bilden vier Kir6-Untereinheiten die Kanalpore mit Einzelkanalleitfähigkeiten von 70-80 pS für Kir6.2 bzw. 33 pS für Kir6.1 K_{ATP} -Kanäle. Die ATP- bzw. GTP-Inhibition des Kanals wird ebenfalls von der Kir6-Untereinheit vermittelt und nicht von der SUR-Komponente, wie aufgrund der NBDs ursprünglich angenommen wurde. Die SUR-Untereinheit ist dagegen für die korrekte Plasmamembranlokalisation der Kir6-Komponente mitverantwortlich. Die kanalstabilisierende SUR-Untereinheit erhöht die Öffnungswahrscheinlichkeit des K_{ATP} -Kanals um etwa das zweifache. Sie vermittelt die Sensitivität für die K_{ATP} -Kanalöffner (z.B. Diazoxid, Pinazidil, Chromokalim, Nikorandil) und für die öffnungsstimulierende Wirkung von MgADP und MgGDP. Auch die K_{ATP} -Kanalblocker (z.B. Tolbutamid, Glibenklamid) interagieren mit der SUR-Komponente des Kanals. Diese Sulfonylharnstoffe vermitteln ihre inhibierende Wirkung unter anderem durch die Blockierung der ADP/GDP-Kanalstimulierung in NBD1. Die SUR1-Untereinheit erhöht im Gegensatz zur SUR2-Untereinheit zusätzlich die ATP-Sensitivität des funktionellen K_{ATP} -Kanals (Isomoto et al., 1997b; Tucker und Ashcroft, 1998; Ashcroft und Gribble, 1998; Babenkow et al., 1998).

Die Eigenschaften des rekombinanten SUR1/Kir6.2 vermittelten K_{ATP} -Kanals entsprechen am besten denen des nativen Kanals der pankreatischen β -Zellen. Die

Kombination aus SUR2A/Kir6.2 scheint die molekulare Grundlage für den K_{ATP} -Kanal im Herzen zu bilden. SUR2B/Kir6.1 konstituiert wahrscheinlich den K_{ATP} -artigen Kanal der glatten Muskulatur, der von MgADP stimuliert, aber kaum von ATP inhibiert wird (Babekow et al., 1998; Yokoshiki et al., 1998). Die K_{ATP} -Kanäle der Niere bilden eine Ausnahme; sie werden anscheinend von Kir1.1-Untereinheiten in Kombination mit dem Chloridkanal CFTR, der ebenfalls ein Protein der ABC-Superfamilie ist, gebildet (Ho, 1998). Die Eigenschaften nativer K_{ATP} -Kanäle unterscheiden sich aber dennoch von denen der rekombinanten Kanäle. So liegt z.B. die ATP-Sensitivität der rekombinanten SUR1/Kir6.2-Kanäle im zellfreien System mit ca. 10 μ M in einer Größenordnung, die eine Öffnung der K_{ATP} -Kanäle unter physiologischen Bedingungen ($[ATP]_i$: 3-5 mM) nie ermöglichen würde. Tatsächlich findet sich in der intakten β -Zelle ein IC_{50} -Wert für ATP von ca. 1 mM (Ashcroft, 1998). Intrazelluläre Faktoren, wie z.B. pH-Wert, Proteinkinasen oder auch Phosphoinositolphosphate können die K_{ATP} -Kanal Eigenschaften wahrscheinlich entscheidend modulieren (Quayle et al., 1997; Baukowitz et al., 1998, Ashcroft und Gribble, 1998).

Die Funktion der ATP-sensitiven Kaliumkanäle ist am besten für die β -Zellen des Pankreas verstanden: Das Ansteigen des Blutglukose- und damit des cytosolischen ATP-Spiegels bewirkt das Schließen der pankreatischen K_{ATP} -Kanäle. Dies führt zur Depolarisation und damit zu erhöhter elektrischer Aktivität der β -Zellen, wodurch unter anderem die Öffnung von spannungsregulierten Kalziumkanälen vermittelt wird. Die in Folge erhöhte intrazelluläre Konzentration an freiem Kalzium fördert direkt die exozytotische Freisetzung von Insulin in den Blutkreislauf. Aus diesem Grunde werden K_{ATP} -Kanalblocker zur Diabetes-Therapie und K_{ATP} -Kanalöffner entsprechend zur Therapie von hyperinsulämischen Krankheitsbildern eingesetzt (Ashcroft, 1996). Mutationen in den SUR1-NBDs konnten sowohl in Patienten mit TypII-Diabetes als auch mit PHHI (persistent hyperinsulemic hypoglycemia of infancy) identifiziert werden (Inoue et al., 1996; Thomas et al., 1995).

Die Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen im Herzen scheint Herzrhythmusstörungen entgegenzuwirken sowie eine protektive Rolle bei ischämischen Prozessen zu besitzen. Öffnung von K_{ATP} -Kanälen des glatten Gefäßmuskels bewirkt Relaxation und wirkt so einem Bluthochdruck entgegen. Auch hier werden K_{ATP} -Kanalöffner therapeutisch eingesetzt (Lawson, 1996; Lopez et al., 1996; Quayle et al. 1997). Die Funktion der K_{ATP} -Kanäle des Gehirns ist, genau wie ihre Struktur, noch weitestgehend ungeklärt. Es wird angenommen, daß eine Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen in metabolischen Streßsituationen

(z.B. Ischämie, O₂-Mangel) ebenfalls für Neuronen einen protektiven Effekt besitzt (Ashcroft und Ashcroft, 1990).

1.4.1.2.2 Physiologie nativer neuronaler K_{ATP}-Kanäle

ATP-sensitive Leitfähigkeiten wurden für unterschiedlichste Neuronentypen beschrieben, wie z.B. ventromediale Hypothalamusneuronen, noradrenerge Neuronen des Locus Coeruleus, CA1-Neuronen des Hippocampus, dorsale Vagusneuronen, striatale Interneuronen, sowie GABAerge und dopaminerge Neuronen der Substantia nigra (Ashford et al., 1990; Finta et al., 1993; Fujimura et al., 1997; Karschin et al., 1998; Lee et al., 1998; Schwanstecher und Panten, 1993; Röper und Ashcroft, 1995). In den meisten Studien wurden lediglich qualitative metabolische und pharmakologische Charakterisierungen der jeweiligen ATP-sensitiven Kaliumleitfähigkeiten durchgeführt. Dennoch wird deutlich, daß die K_{ATP}-Kanäle in unterschiedlichen Neuronentypen heterogene pharmakologische und metabolische Eigenschaften aufweisen. [³H]-Sulfonylurea-(SU)-Bindungsstudien liefern zudem Hinweise auf das Vorhandensein von sowohl hoch- als auch niederaffinen Sulfonylharnstoff-Bindungsstellen in vielen Hirnregionen (Zini et al., 1991). Ob die unterschiedlichen SU-Affinitäten direkt durch die Expression der unterschiedlichen SUR-Isoformen vermittelt werden, ist nicht geklärt. Die höchste Dichte an SU-Bindungsstellen wurde in der Substantia nigra identifiziert (Hicks et al., 1994; Dunn-Meynell et al., 1997; Levin und Dunn-Meynell, 1997). Hochaffine SU-Bindungsstellen werden demnach hauptsächlich auf striatonigralen Terminalen und SNpr Neuronen exprimiert, niederaffine Bindungsstellen dagegen vornehmlich auf Zellkörpern von dopaminergen SN Neuronen. Die Anzahl der SU-Bindungsstellen in der SN nimmt in den ersten Tagen nach der Geburt stetig zu und erreicht bei Ratten nach ca. zwei bis drei Wochen die Werte adulter Tiere (Miller et al., 1991; Xia et al., 1993).

Elektrophysiologisch sind K_{ATP}-Kanäle in der SN sowohl prä- als auch postsynaptisch beschrieben. Es wird angenommen, daß präsynaptische K_{ATP}-Kanäle auf striatonigralen Terminalen die Ausschüttung des inhibitorisch wirkenden Transmitters GABA modulieren (Watts et al., 1995; Stanford und Lacey, 1996; Ye et al., 1997).

Schon 1990 konnten erstmals in elektrophysiologischen Untersuchungen postsynaptische ATP-sensitive Kaliumleitfähigkeiten in dopaminergen SN Neuronen von Meerschweinchen nachgewiesen werden. Als Antwort auf metabolischen Streß (Glukosemangel oder Mangel an intrazellulärem ATP) wurde Hyperpolarisation und Verlust der neuronalen Spontanaktivität beobachtet (Röper et al., 1990a,b). Ähnliche

Effekte konnten auch nach Induktion von Anoxie oder Hypoxie beobachtet werden (Murphy und Greenfield, 1991; Mercuri et al., 1994; Guatteo et al., 1998). Ebenso konnte durch ATP-Auswaschen, Rotenoninkubation sowie hohe intrazelluläre Natriumkonzentration ein sulfonylharnstoffsensitiver Kaliumstrom in dopaminergen SN Neuronen der Ratte induziert werden (Häusser et al., 1991; Röper und Ashcroft, 1995; Stanford und Lacey, 1995, Seutin et al., 1996). Im Vergleich zu den zahlreichen Hinweisen für eine K_{ATP} -Kanal Aktivierung in dopaminergen SN Neuronen durch metabolischen Streß sind die beschriebenen Effekte der K_{ATP} -Kanalöffner auf diese Neuronen nicht eindeutig (Häusser et al., 1991; Watts et al., 1995; Stanford und Lacey, 1995). Dagegen entspricht die Pharmakologie der K_{ATP} -Kanäle in der SNpr anscheinend der des β -Zell K_{ATP} -Kanals (Schwanstecher und Panten, 1993; Stanford und Lacey, 1996).

Die molekularen Grundlagen neuronaler K_{ATP} -Kanäle waren dagegen zu Beginn dieser Arbeit noch völlig ungeklärt.

1.5 Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die molekulare Komposition neuronaler K_{ATP} -Kanäle aufzuklären. Ein Schwerpunkt lag in der kombinierten elektrophysiologischen und molekularbiologischen Untersuchung einzelner Substantia nigra Neuronen in Mittelhirnschnitten der Maus. Zu diesem Zweck war es notwendig, die Einzelzell-RT-PCR Technik im Labor zu etablieren. Ein weiterer Schwerpunkt lag in der Charakterisierung der dopaminergen SN Neuronen in der *weaver*-Maus, die ein Tiermodell für die der Parkinson-Krankheit zugrundeliegende selektive Neurodegeneration darstellt. So sollten im Rahmen dieser Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

- Kann der molekularbiologisch definierte Phänotyp einzelner SN Neuronen mit einem spezifischen elektrophysiologischen Verhalten korreliert werden?
- Welche K_{ATP} -Kanal Untereinheiten werden in den verschiedenen molekularen Phänotypen von SN Neuronen exprimiert?
- Ist das Expressionsmuster von K_{ATP} -Kanal Untereinheiten einzelner SN Neuronen mit ihren metabolischen und pharmakologischen Eigenschaften korreliert?
- Wodurch zeichnet sich der elektrophysiologische Phänotyp der dopaminergen Neuronen in der *weaver*-Maus aus?
- Findet sich in den überlebenden dopaminergen *weaver* Neuronen ein spezifisches Einzelzell-Expressionsmuster von Girk- oder K_{ATP} -Kanälen?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Für die elektrophysiologischen und molekularbiologischen Untersuchungen wurden Mäuse im Alter von 12 bis 16 Tagen ausgewählt. Innerhalb der Ordnung *Rodentia* gehört die Maus (*Mus musculus*) der Familie der *Muridae* an. Die Charakterisierung der Substantia nigra Neuronen wurde an Mäusen des Stamms C57Bl/6J durchgeführt. Die Charakterisierung der SN Neuronen in *weaver*-Mäusen wurde an Tieren des Hybridstamms B6CBACa-A^{w-J}/A (Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) durchgeführt. Die Mäuse wurden in der UKE-eigenen Tierhaltung gezüchtet. Zur Zucht der homozygoten *weaver*-Mäuse wurden heterozygot betroffene Tiere miteinander verpaart, da die homozygoten *weaver*-Männchen aufgrund einer massiv gestörten Spermatogenese steril sind und auch die homozygoten Weibchen eine deutlich reduzierte Fertilität aufweisen.

2.1.2 Chemikalien und Geräte

Die verwendeten Chemikalien und Geräte sowie ihre Bezugsquellen sind jeweils unter den einzelnen Methoden aufgeführt. Chemikalien ohne einen entsprechenden Vermerk wurden von Sigma (Deisenhofen, D) bezogen. Standardgerätschaften sowie Einweg-Verbrauchsmaterialien werden nicht gesondert aufgeführt.

2.1.3 Lösungen

2.1.3.1 Lösungen Molekularbiologie

Ampicillin-Lösung:	0,1 g/ml Ampicillin in H ₂ O
DEPC:	0,1% Diethylpyrokarbonat in <i>aqua dest.</i>
MOPS (10x):	0,2 M MOPS, 50 mM NaAc, 10 mM EDTA, pH 7,0
TAE-Puffer:	40 mM Tris, 10 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 7,5
TE:	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
LB-Agar:	15 g Bacto-Agar auf 1 l LB-Medium, autoklaviert
LB-Medium:	10 g/l NaCl, 10 g/l Caseinhydrolysat, 5 g/l Hefeextrakt, pH 7,4 (NaOH), autoklaviert

2.1.3.2 Lösungen Elektrophysiologie

ACFS:	125 mM NaCl, 25 mM NaHCO ₃ , 2,5 mM KCl, 1,25 mM NaH ₂ PO ₄ , 2 mM CaCl ₂ , 2 mM MgCl ₂ , 25 mM Glucose, pH 7,4 mit 95% O ₂ /5% CO ₂
Applikations-Lsg.:	145 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM CaCl ₂ , 2 mM MgCl ₂ , 25 mM Glucose, pH 7,4 mit 1 N NaOH
Diazoxid-Stock:	100 mM Diazoxid in 1 N NaOH
GTPγS-Stock:	100 mM GTPγS in <i>aqua dest.</i>
Pipetten-Lsg., intern:	120 mM K-Gluconat, 20 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl ₂ ; + 5 mM Na ₂ ATP, pH 7,3
Rotenon-Stock:	100 mM Rotenon in DMSO
Pinacidil-Stock:	100 mM Pinacidil in DMSO
QX314-Stock:	100 mM QX314 in <i>aqua dest.</i>
scPCR-Lsg.:	140 mM KCl, 5 mM HEPES, 5 mM EGTA, 3 mM MgCl ₂ , pH 7,3
Tolbutamid-Stock:	100 mM Tolbutamid in DMSO

2.1.3.3 Lösungen Immuncytochemie

Blocklösung:	10% Serum (je nach Zweitantikörper), 0,2% BSA in PBS
Carrierlösung:	1% Serum (je nach Zweitantikörper), 0,2% BSA in PBS
DAB-Lösung (10x):	5% DAB in <i>aqua dest.</i>
PBS:	154 mM NaCl, 2,7 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄
Perfusionsslösung:	4% Paraformaldehyd in PBS
Vorspüllösung:	0,9% NaCl, 2% Dextran, 0,01% Heparin

2.1.4 Enzyme / Antikörper / dNTPs

Anti-TH-AK:	Boehringer Mannheim, D
Bio-Anti-Maus-AK:	Camon, Wiesbaden, D
dNTP-Mix:	DNA-Polymerization-Mix, Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Restriktionsenzyme:	MBI-Fermentas, St. Leon-Roth, D
Superscript TM II:	Gibco BRL, Eggenstein, D
T4-DNA-Ligase:	Boehringer Mannheim, D
Taq-Polymerase:	Gibco BRL, Eggenstein, D

2.1.5 Oligonukleotide

Alle PCR-Oligonukleotid-Primer wurden von Amersham Pharmacia Biotech, (UK) entsalzt und lyophilisiert bezogen und in sterilem TE-Puffer in einer Konzentration von 100 pmol/ μ l aufgenommen. Forward- und Reverse-Primer für eine spezifische PCR-Reaktion wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. Diese Primerlösungen (50 pmol/ μ l je Primer) wurden in 50 μ l Aliquots bei -20°C aufbewahrt (Oligonukleotid-Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Der Random-Hexamer-Primer wurde von Boehringer Mannheim, D bezogen; der DNA-Längenmarker (100 bp-Leiter) von MBI-Fermentas, St. Leon-Roth, D.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Durch Messung des Extinktionskoeffizienten bei 260 nm mit Hilfe eines Spektralphotometers (GeneQuant, Pharmacia Biotech, Freiburg, D) kann die Konzentration von Nukleinsäuren bestimmt werden. Ein gemessener Absorptionswert von 1 bei 1 cm Schichtdicke entspricht einer Konzentration von 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA, 33 μ g/ml einzelsträngiger DNA oder 40 μ g/ml RNA. Messungen bei 280 nm geben die Konzentration von Proteinen und Phenolresten an. Der Quotient der Absorptionskoeffizienten bei 260 nm und 280 nm gibt die Reinheit einer Nukleinsäurelösung an. Sehr reine DNA-Lösungen haben einen Quotienten von 1,8-1,95; bei sehr reinen RNA-Lösungen liegt der Wert zwischen 1,9 und 2,0.

2.2.2 Gelelektrophoresen von Nukleinsäuren

2.2.2.1 Auftrennung von DNA

Zur Analyse von PCR-Reaktionen und Restriktionsspaltungen wurden die DNA-Proben in horizontalen 0,8% bis 2%igen TAE-Agarosegelen in 1x TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Der DNA wurde vor dem Auftragen 1/5 Volumen eines 5x DNA-Probenpuffers (5x TAE, 0,2% Bromphenolblau, 0,2% Xylenxyanol) zugesetzt. Als DNA-Längenmarker wurde eine 100 bp-Leiter verwendet. Zur visuellen Detektion unter UV-Licht (Transilluminator) enthielt sowohl der TAE-Laufpuffer als auch das Agarosegel jeweils 0,6 μ g/ μ l Ethidiumbromid. Die angelegte Spannung variierte zwischen 80 und 130 Volt. Die Trenndauer betrug 30 bis 90 min (Sambrook et al., 1989).

2.2.2.2 Auftrennung von RNA

Zur Analyse der Güte von RNA-Präparationen wurde die RNA in horizontalen 1%igen Formaldehyd-Agarosegelen in 1x MOPS-Puffer aufgetrennt (Bonini und Hoffmann, 1991). Nach Abkühlung der Agarose auf 50°C wurde das Formaldehyd in einer Endkonzentration von 2% zugegeben. Zur Inaktivierung von RNAsen wurden vor dem Gießen die Gelträger und die Elektrophoresekammern mit 0,1% SDS gespült. Die RNA wurde bei einer Spannung von 80 Volt für 2 h aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in einem Ethidiumbromidbad gefärbt und unter UV-Licht ausgewertet. Nur wenn auch im hochmolekularen Bereich (über 1000 bp) undegradierte RNA zu detektieren war, wurde die RNA-Präparation zur cDNA-Synthese eingesetzt.

2.2.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren

2.2.3.1 Phenol/Chloroform-Aufreinigung von DNA

Zur Entfernung von Proteinen aus einer wäßrigen Nukleinsäurelösung wurde diese mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (1:1), gesättigt mit TE, versetzt, 1 min auf dem Vortex gemischt und 3 min in der Eppendorf-Tischzentrifuge (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg, D) bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wurde vorsichtig in ein frisches Reaktionsgefäß überführt (Sambrook et al., 1989).

2.2.3.2 Natriumacetatfällung

Nukleinsäure-Lösung wurde zur Abtrennung von Salzen und Proteinen mit 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 2,5 Volumen 96%igen Ethanol oder 0,7 Volumen Isopropanol versetzt. Nach 20 min Zentrifugation bei 4°C und 14.000 rpm wurden die Pellets mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen, dann getrocknet und in dem gewünschten Volumen frisch autoklavierten DEPC-behandeltem Wassers oder TE-Puffers aufgenommen (Sambrook et al., 1989).

2.2.3.3 PCR-Produktaufreinigung

Zur Abtrennung von Salzen, Proteinen und kurzkettigen Nukleinsäuren (Primer) wurden die PCR-Amplifikate mittels Säulen über das *Quiaquick PCR-Purification-Kit* (Quiagen, Hilden, D) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Zur Elution der DNA von

der Säule wurden 30-50 µl *aqua dest.* verwendet. Die aufgereinigten DNA-Fragmente wurden in Lösung bei 4°C aufbewahrt oder direkt zur Sequenzierung eingesetzt.

2.2.4 genomische DNA-Isolierung aus Mausschwanz-Biopsien

Zur Analyse des Genotyps der *weaver*-Mäuse wurde ein ca. 0,5 cm langes Stück der Schwanzspitze des zu untersuchenden Tieres unter Äthernarkose amputiert und bei -70°C schockgefroren. Die nach der Amputation auftretende Blutung wurde mit Gewebekleber gestillt. Zur Bestimmung des Genotyps für die immunocytochemische Analyse wurde eine entsprechende Gewebeprobe nach Betäubung, aber vor Perfusion des Versuchstiers gewonnen. Für elektrophysiologische Untersuchung wurde die Gewebeprobe zur Genotypisierung nach Dekapitierung genommen. Das Gewebe wurde bis zur Extraktion der DNA bei -70°C aufbewahrt. Die DNA wurde mit Hilfe des *Easy-DNATM Kits* (Invitrogen, San Diego, USA) nach Vorschrift des Herstellers aus den Schwanzproben isoliert, gefällt und in 50 µl *aqua dest.* aufgenommen. Nach Zusatz von 2 µg RNase wurden die Proben für 30 min bei 37°C zum Abbau der RNA inkubiert. Zur besseren Lösung der gefällten genomischen DNA wurde noch weitere 90 min bei 37°C und dann über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.2.5 poly(A)⁺-RNA-Isolierung aus Gewebe

Um RNase-Kontaminationen zu vermeiden, sind Arbeiten mit RNA immer mit frisch autoklaviertem, oder über Nacht bei 220°C erhitzten Arbeitsmaterial und DEPC-behandeltem Wasser durchzuführen. poly(A)⁺-RNA wurde aus kleinen Gewebemengen direkt über Oligo-dT-Zellulose und Mikrofiltern mit dem *Mikro-FastTrackTM Kit* nach Angaben des Herstellers (Invitrogen, San Diego, USA) präpariert. Zum Aufschluß des Gewebes wurde dieses in flüssigem Stickstoff mit Hilfe eines Mörsers zerkleinert, sofort in 1 ml Lysis-Puffer überführt und für mindestens 45 min bei 45°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die mRNA wurde mit Natriumacetat (gemäß 2.2.3.2) gefällt und in 10-50 µl DEPC-behandeltem H₂O gelöst. Die RNA-Konzentration und die Reinheit der Präparation wurde photometrisch (gemäß 2.2.1) bestimmt; die Güte der RNA wurde durch Analyse eines Aliquots im RNA-Gel (gemäß 2.2.2.2) kontrolliert. Die mRNA wurde dann in 0,5-1 µg Aliquots in Lösung bei -70°C aufbewahrt.

2.2.6 Synthese des cDNA-Erststrangs

Die Synthese von cDNA wurde mit ca. 500 ng poly(A)⁺-RNA in einem Gesamtvolumen von 10 µl 1x RT-Puffer (75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 8,3) mit Random-Hexamer-Primern für 1-2 h bei 37°C durchgeführt. Im Reaktionsansatz befanden sich 5 µM Random-Hexamer-Primer, 10 mM DTT, 0,5 mM jedes dNTPs, 20 U Ribonuklease-Inhibitor (RNasin; Promega, Madison, USA) und 100 U SuperscriptTMII Reverse Transkriptase. Die Erststrang-cDNA-Lösung wurde bei -70°C gelagert und direkt ohne RNA-Hydrolyse oder cDNA-Zweitstrangsynthese zur PCR-Amplifikation eingesetzt.

2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein Verfahren zur selektiven *in vitro* Anreicherung von DNA-Fragmenten mit Hilfe von thermostabilen DNA-Polymerasen. Diese ergänzen einen DNA-Einzelstrang zum Doppelstrang, wenn ihnen ein kurzer doppelsträngiger Bereich als Startpunkt zur Verfügung steht. Durch Wiederholen einer temperaturabhängigen Reaktionsfolge von DNA-Denaturierung, Primeranlagerung und DNA-Doppelstrang-Synthese kommt es zur exponentiellen Vermehrung der Zielsequenz.

2.2.7.1 Standard PCR-Protokoll

Eine Standard PCR-Reaktion wurde in einem Volumen von 100 µl mit jeweils 100 pmol des jeweiligen Forward- und Reverse-Primers und 2.5 U *Taq*-Polymerase in einer wäßrigen Lösung aus 0,2 mM jedes dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4) in einem TC480C PCR-Gerät (Perkin Elmer, Überlingen, D) durchgeführt (Saiki et al., 1988). Die gewählten Temperaturen und Zeiten für die jeweiligen Amplifikationsschritte, sowie die Anzahl der PCR-Zyklen hängen dabei von der spezifischen Anlagerungstemperatur der Primer sowie von der Menge des DNA-Templates und der PCR-Produktlänge ab und müssen in der Regel für jedes PCR-Reaktionsgemisch empirisch optimiert werden.

Die PCR-Reaktion wurde als Hot-Start durchgeführt. Das bedeutet, daß die *Taq*-Polymerase und auch die Primer dem Reaktionsansatz erst bei Temperaturen um 94°C hinzugegeben wurden. Durch dieses Verfahren werden unerwünschte Nebenprodukte durch unspezifische PCR-Amplifikationen minimiert (Chou et al., 1992).

2.2.7.2 Multiplex-PCR-Protokoll

Zur simultanen Amplifikation von mehreren DNA-Fragmenten wurden alle entsprechenden Primer in einen 100 µl PCR-Reaktionsansatz gegeben. In Abweichung von dem Standard-PCR-Protokoll wurde die MgCl₂-Konzentration auf 1,8 mM erhöht. Nach 3 min Inkubation bei 94°C wurden 35 PCR-Zyklen mit folgenden Parametern durchgeführt: 94°C für 30 s, 58°C für 1 min, 72°C für 3 min. Der finale DNA-Syntheseschritt bei 72°C betrug 8 min.

2.2.7.3 Nested-PCR-Protokoll

Im Anschluß an eine Multiplex-PCR wurden die simultan amplifizierten Fragmente noch einmal in getrennten PCR-Reaktionen unter Standardbedingungen (2.2.7.1) amplifiziert. Dazu wurden für jedes PCR-Fragment neue sogenannte nested-Primer gewählt, deren Sequenz innerhalb des in der multiplex-PCR amplifizierten Bereichs lag. Die Parameter der PCR entsprachen denen unter 2.2.7.2. Die nested-PCR wurde aber nicht als Hot-Start durchgeführt, und es wurde nur eine Minute pro PCR-Zyklus bei 72°C inkubiert.

2.2.7.4 PCR-Protokoll zur Amplifikation von genomischer DNA

PCR-Amplifikationen aus genomischen DNA-Proben zur Genotypisierung der Mäuse des *weaver*-Hybridstamms wurden unter Standardbedingungen durchgeführt. Als Template wurden 3 µl einer Mausschwanz-DNA Präparation (siehe 2.2.4) eingesetzt. Die PCR-Parameter entsprachen denen der Multiplex-PCR (2.2.7.2). Es wurden 30 PCR-Zyklen mit Girk2-Exon5-spezifischen Primern bei einer Anlagerungstemperatur von 64°C durchgeführt. Nach Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation im 1%igem Agarosegel (siehe 2.2.2.1) und Aufreinigung der PCR-Proben gemäß 1.2.3.3 wurden diese direkt mit dem Forward-PCR-Primer sequenziert (siehe 2.2.10).

2.2.7.5 Auswahl der Primersequenzen für die PCR-Reaktionen

Um eine möglichst spezifische Amplifikation der Zielsequenz in der PCR zu gewährleisten, müssen die Primer lang genug sein, um bei einer hinreichend hohen Anlagerungstemperatur selektiv mit der Zielsequenz zu hybridisieren. Besonders für die multiplex-PCR ist es von entscheidender Wichtigkeit, daß die Primerpaare eine Amplifikation ihrer jeweiligen Zielsequenz mit annähernd gleicher Effizienz ermöglichen. Dies kann dadurch gewährleistet werden, daß die Primer möglichst alle die gleiche Länge und den gleichen GC-Gehalt und somit eine ähnliche Anlagerungstemperatur besitzen (Chamberlain and Chamberlain, 1994). Um gleichzeitig interne Schleifenbildung oder Dimerisierung der Primer zu vermeiden, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Primer alle mit Hilfe eines Computerprogramms aus dem Internet ausgewählt (Primerselection-xprimer; <http://alces.med.umn.edu/rawprimer>). Die zur Primerwahl benötigten cDNA-Sequenzen der jeweiligen Gene wurden entsprechenden Datenbanken entnommen (genebank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>; Accession-Nummer siehe Tab. 2.1). Als Parameter für die Primerauswahl wurde in der Regel eine Länge von 20 bp, ein GC-Gehalt von 50% und eine Anlagerungstemperatur von 59-60°C vorgegeben. Simultane Kontrolle der Primersequenzen durch die Humane Repeat-Datenbank BX3R vermied eine Primerwahl aus repetitiven DNA-Regionen. Durch computergestützten Homologievergleich der gewählten Primersequenzen mit entsprechenden cDNA-Datenbanken (Blast; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) wurden unspezifische Hybridisierungen weitgehend ausgeschlossen.

Für die multiplex-PCR wurden Forward- und Reverse-Primer jeweils so gewählt, daß alle PCR-Amplifikate annähernd eine Länge von ca. 1000 bp hatten. Für die nested-PCR-Reaktionen wurden jeweils um ca. 100 bp unterschiedliche Amplifikatlängen gewählt, so daß eine Identifikation der jeweiligen Fragmente anhand ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit im Agarosegel erleichtert wurde. Da die Mausequenz der SUR1-cDNA noch nicht veröffentlicht ist, wurde mit geeigneten Rattenprimern unter niedrigstringenten Bedingungen ein SUR1-Fragment aus Maus Mittelhirn-cDNA amplifiziert, gemäß 2.2.9 subkloniert und sequenziert (siehe 2.2.10). Aus der Nukleotidsequenz des Maus-SUR1-Teilkmons wurden dann geeignete SUR1-Primer gewählt. Auf gleichem Wege wurden die Sequenzen der SUR2-Primer erhalten, da die entsprechenden Maus-cDNA-Sequenzen der zwei Splicevarianten SUR2A und SUR2B erst nach Etablierung des vorliegenden multiplex-PCR-Protokolls veröffentlicht wurden

(Isomoto et al., 1996b). Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über alle im Rahmen dieser Arbeit als PCR-Primer verwendeten Oligonukleotide.

cDNA	Accession Nummer	Name	Nukleotid-Sequenz	Lage [bp]	Fragment Größe [bp]
Calbindin D _{28k}	M21531	F-6 R-7	CGCACTCTCAAAGTAGCCG CAGCCTACTTCTTTATAGCGCA	87 977	891
Calbindin D _{28k}	-"	F-15 R-3	GAGATCTGGCTTCATTTTCGAC AGTTCAGCTTTCCGTCATTA	167 606	440
GAD ₆₇	Z49976	F-21 R-12	TGACATCGACTGCCAATACC GGTTAGAGATGACCATCCG	731 1835	1105
GAD ₆₇	-"	F-22 R-17	CATATGAAATTGCACCCGTG CGGTGTCATAGGAGACGTCA	761 1462	702
Girk1	D45022	F-5 R-10	AGACCAGTCGCTACCTTTCG TCCTGCTCTTTCACGCTGTA	233 1130	897
Girk1	-"	F-6 R-2	GACCCTGATGTTTAGCGAGC TGACGACAACCTCGAACTGT	621 937	316
Girk2	U11859	F-3 R-25	CCTACCGATACCTGACGGAC GGGTGCTGGTCTCATAGGTC	711 1580	870
Girk2	-"	F-26 R-7	TACATCCGGGGAGATATGGA GAACCCGTCTTCCATCGTTA	839 1531	693
Girk2	-"	F-4 R-7	AGACAGAAACCACCATCGGT GAACCCGTCTTCCATCGTTA	936 1531	595
Girk2-Exon5	-"	F-1 R-40	AGGAAAATCCAGAGGTACGTGTGGT TCCCAGAAGGACTCTGTTGGTTA	644 1365	721
Girk3	U11860	F-4 R-25	TCACTTGGCTCTTCTTCGGT GTAGAGATGGGCATCAAGGC	516 1357	774
Girk3	-"	F-5 R-6	ATGTTTCGTC AAGATCTCGCA CATCCACCAGGTACGAGCTT	776 1196	412
Girk4	U33631	F-1 R-13	GTGTTGAAAACCTTAGCGGC CACCTCTTCATCCTTCTCG	386 1213	827
Girk4	-"	F-2 R-9	CCTTGAACCAGACCGACATT GAACTGGTGTGAATCGGTGA	752 1009	257
GFAP	K01347	F-2 R-11	AGAACAACCTGGCTGCGTAT CTCACATCACCACGTCCTTG	407 1213	807
GFAP	-"	F-12 R-7	AGAAAGGTTGAATCGCTGGA CCAGGGCTAGCTTAACGTTG	472 988	517
Kir6.1	D88159	F-1 R-1	GTCTTCTAGGAGGACGCGTG TATCATACAGGGGGCTACGC	126 1041	916
Kir6.1	-"	F-3 R-14	GCACACAAGAACATCCGAGA GGCTGAAAATCAGCGTCTCT	339 786	448
Kir6.2	D50581	F-3 R-5	AAGAAAGGCAACTGCAACGT CCCATAGAATCTCGTCAGC	243 1066	824
Kir6.2	-"	F-9 R-7	GCTGCATCTTCATGAAAACG TTGGAGTCGATGACGTGGTA	625 922	298
SUR1	L40624 (Ratte!)	F-8 R-4	GTGAGTTCTGTCCAGTGCA GTGATGTTCTCTCCACCGT	2091 2622	532
SUR1	-"	F-6 R-6	TCAAGGTTGTGAACCGCA GGTTTCTGAGATGCGTAGGC	2186 2586	401

SUR2	D86038	F-3 R-5	GAGACGGAAGACATTGCCAT CTATGATCCAGTCAGCGTGC	2148 2802	655
SUR2	-"	F-17 R-18	GGAGACCAAAGTCAAATCGG TGCGTCACAAGAACAACCG	2550 2764	215
SUR2A/B	D86038/ D86039	F-7N R-12	TGGTCGACATATTTGACGGA CTCCACACAGAAATCCGTCA	4237 5076 /4900	839/663
SUR2A/B	-"	F4-N R-86	CTTAGATGCCACTGTCACC ACATGTCTGCACGGACAAAC	4463 4976 /4800	513/337
TH	M69200	F-1 R15	CACCTGGAGTACTTTGTGCG CCTGTGGGTGGTACCCTATG	387 1525	1139
TH	-"	F-3 R-2	TGCACACAGTACATCCGTCA TCTGACACGAAGTACACCGG	936 1312	377

Tab. 2.1: PCR-Primer: Sequenzen, Lokalisationen und Amplifikatgröße

Aufgelistet sind für jeweils ein PCR-Primerpaar aus Forward- und Reverse-Primer (F- bzw. R-) die Datenbank-Accession Nummer der zugrundeliegenden cDNA-Sequenz, die Oligonukleotid-Sequenzen (angegeben in 5'-3'-Richtung), die Lokalisation der Hybridisierung mit der cDNA-Sequenz sowie die Größe des aus der PCR-Amplifikation resultierenden Fragments.

2.2.8 Durchführung eines Einzelzell-RT-PCR-Experiments

Nach Beendigung der elektrophysiologischen Messung (siehe 2.3.4) wurde das Zytoplasma der Zelle vorsichtig unter visueller Kontrolle durch Anlegen eines Unterdrucks in die Meßpipette eingesaugt. Um Kontaminationen durch Aufsaugen von Extrazellulärmaterial zu vermeiden, mußte der Seal während dieses Vorgangs stabil bleiben. Sofort im Anschluß wurde der gesamte Pipetteninhalt (ca. 6 µl) kontrolliert in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt, in dem sich bereits alle Komponenten für die reverse Transkription befanden. Nach Zugabe von je 0,5 µl RNasin und SuperscriptTMII wurde die cDNA-Synthese, wie unter 2.2.6 beschrieben, durchgeführt. Als Reaktionspuffer diente nicht der 1x RT-Puffer, sondern die scPCR-Pipettenlösung (Monyer und Jonas, 1995). Anschließend wurde der gesamte cDNA-Ansatz als Template für die erste multiplex-PCR gemäß 2.2.7.2 eingesetzt. Im Anschluß daran wurden die entsprechenden nested-PCR-Reaktionen gemäß 2.2.7.3 mit jeweils 2,5 µl multiplex-PCR-Produkt als Template durchgeführt. 15 µl der Produkte der nested-PCR-Reaktionen wurden auf ein 2% Agarosegel aufgetragen, unter UV-Licht ausgewertet und dokumentiert (siehe 2.2.2.1).

2.2.9 Klonierung von PCR-Produkten

Zur Bestimmung der Nukleotidsequenz von PCR-Fragmenten wurden diese nach Aufreinigung in einen geeigneten Vektor kloniert und sequenziert.

2.2.9.1 Ligation von Plasmidvektor und DNA

Da die Taq-Polymerase an die 3'-Enden der PCR-Fragmente jeweils noch ein überhängendes dA-Nukleotid anhängt, können diese DNA-Fragmente direkt in einen geöffneten Vektor ligiert werden, der komplementäre dT-Überhänge aufweist.

Zur Ligation von Vektor und PCR-Fragment wurden 1 µl aufgereinigtes PCR-Produkt (ca. 0.2 pmol) und 50 ng (0.03 pmol) des Vektors pT7Blue (Novagen, Madison, USA) in einem 10 µl Ansatz mit 5 mM DTT, 0,5 mM ATP, 20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 50 mM MgCl₂ und 2 Weiss Units T4-DNA-Ligase bei 16°C über Nacht inkubiert.

2.2.9.2 Transformation

Zur Plasmidtransformation in Bakterien wurde der Ligationsansatz mit 90 µl Hitzeschock-kompetenten *E.coli*-Bakterien des Stamms XL 1 blue (Inoue et al, 1990) gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Erhitzen des Reaktionsansatzes für 2 min auf 42°C wurde dieser weitere 10 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Vermehrung der Transformanden wurden jeweils 3 ml LB-Ampicillin-Medium mit je einer Einzelkolonie plasmidtragender *E.coli* XL 1 blue Bakterien von einer LB-Ampicillin-Platte angeimpft und über Nacht bei 37°C im Warmluftschüttler bei 180 rpm inkubiert.

2.2.9.3 Isolation von Plasmid-DNA aus 3 ml Bakterienkulturen

Eine Minipräparation von Plasmid-DNA aus 3 ml Übernachtskulturen wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lysismethode durchgeführt (Birnboim und Doley, 1979; Sambrock et al., 1989).

Lösung 1: 25 mM Tris/HCl pH 7,9; 10 mM EDTA, 50 mM Glucose

Lösung 2: 0,2 M NaOH, 1% SDS

Lösung 3: 3 M KAc, pH 4,8

1,5 ml einer 3 ml Bakterien-Übernachtskultur wurden in ein entsprechendes Eppendorf-Gefäß überführt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation von 30 s in der Eppendorf-Zentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert und der Überstand vollständig entfernt. Anschließend wurde das Pellet in 50 µl Lösung 1 gründlich resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 60 µl Lösung 2 zu der Bakteriensuspension gegeben und durch fünfmaliges Invertieren vorsichtig gemischt, um zu verhindern, daß die chromosomale

Bakterien-DNA degradiert wurde. Nach Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurden zur Neutralisation und Proteinfällung 75 µl Lösung 3 zum Präparationsansatz gegeben und dieser nach fünfmaligem Invertieren für weitere 5 min inkubiert. Die komplexierten Proteine wurden anschließend für 3 min bei 4°C und 2000 g pelletiert. Der die Plasmid-DNA enthaltende Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 180 µl Phenol/Chloroform gemäß 2.2.3.1 extrahiert, wiederum in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Ethanol (absolut) gefällt. Nach 5 min Zentrifugation bei 4°C und 8000 g wurde das DNA-Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.2.9.4 Restriktion von DNA

Zur Kontrolle der Plasmide auf Einbau des PCR-Fragments wurde 0,5 µl einer Plasmid-Minipräparation mit einem entsprechend geeigneten Restriktionsenzym gespalten. Nach Zugabe von 5 U/µl RNase und der entsprechend berechneten Menge des gewünschten Restriktionsenzym wurde der Reaktionsansatz von 10-20 µl für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz in einem Agarosegel gemäß 2.2.2.1 aufgetrennt und analysiert. Plasmide, aus denen Fragmente mit zu erwartender Größe herausgespalten werden konnten, wurden für eine Sequenzierung eingesetzt.

2.2.10 Sequenzierung von PCR-Produkten

Die Sequenzanalyse von DNA erfolgte mit Hilfe der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger et al. (1977). Es wurde das nicht-radioaktive *ABI-PRISM-Dye-TerminatorTM-Cycle-Sequencing-Kit* (Perkin-Elmer, Überlingen, D) verwendet, bei dem in Abwandlung zur ursprünglichen Methode (Smith et al., 1986) jedes der vier Didesoxynukleotid-Analoga mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Aus diesem Grund wurde nur ein Reaktionsansatz benötigt, der alle vier Nukleotidgemische enthielt.

PCR-Produkte wurden entweder nach Aufreinigung über das *Quiagen-PCR-Purifikation-Kit* (gemäß 2.2.3.3) direkt sequenziert, oder aber nach Klonierung gemäß 2.2.9 aus dem TA-Vektor sequenziert. In einen 8 µl Reaktionsansatz wurden jeweils 15 pmol eines geeigneten Sequenzierprimers sowie ca. 0,5 µg einer in Wasser gelösten DNA gegeben. Die Sequenzierreaktion und die anschließende Analyse der Sequenzen mit Hilfe eines automatischen DNA-Sequenzers wurde von der Service-Abteilung des Zentrums für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH) durchgeführt.

2.3 Elektrophysiologische Methoden

2.3.1 Hirnschnitt-Präparation

12-16 Tage alte Mäuse wurden in tiefer Halothannarkose (Hoechst, Frankfurt, D) dekapitiert. Sofort wurde der Schädel geöffnet, das Gehirn herauspräpariert und in eiskalte künstliche Liquorflüssigkeit (ACSF) überführt. Ein koronarer Mittelhirnblock von ca. 5 mm Dicke wurde mit Sekundenkleber auf einem Kunststoffblock fixiert. Anschließend wurden in eiskalter ACSF-Lösung mit einem Vibratom (Camden Instruments, London, UK) koronare Hirnschnitte in einer Dicke von 250 μm geschnitten. Danach wurden die Hirnschnitte zur metabolischen Regeneration für mindestens 30 min bei Raumtemperatur (20-25°C) in begaster ACSF-Lösung inkubiert und zur Messung in die Badkammer des Meßstandes überführt. Während der Messungen wurden die Schnitte kontinuierlich mit begaster ACSF-Lösung (ca. 3 ml/min) superfundiert (Edwards et al., 1989). Für die Messungen wurden diejenigen Hirnschnitte verwendet, auf denen sich die Substantia nigra auf Höhe des rostralen interpedunkulären und des kaudalen mamillären Kerns befand (Nelson et al., 1996).

2.3.2 Aufbau und Ausstattung des Meßplatzes

Die elektrophysiologischen Messungen an den Hirnschnitten wurden mittels Patch-Clamp Technik durchgeführt (Neher und Sackmann, 1976). Im Unterschied zu klassischen intrazellulären Ableitungen mit Hilfe von zwei Meßelektroden sind mit der Patch-Clamp Technik auch Ableitungen von wesentlich kleineren Zellen möglich. Außerdem sind aufgrund des hohen Abdichtwiderstandes sehr viel kleinere Ströme auflösbar. Aufgrund des geringeren Zugangswiderstandes im Voltage-Clamp im Vergleich zu Ableitungen mit scharfen Mikroelektroden sind auch Prozesse mit schnelleren Kinetiken einer Messung zugänglich. Da schon geringste Erschütterungen die Patch-Clamp Messungen stören können, befand sich die gesamte Meßapparatur auf einem schwingungsgedämpften Tisch (Micro-g[®], TMC, Spindler&Hoyer, Göttingen, D). Zur elektrischen Abschirmung wurde der Meßstand mit einem Faraday'schen Käfig umgeben und geerdet.

2.3.2.1 Bildgebendes Verfahren

Zur visuellen Identifizierung der Neuronen im Hirnschnitt diente eine Newicon-Röhrenkamera (C2400; Hamamatsu, Hamamatsu City, Japan), die sich auf einem

aufrechtem Mikroskop (Axioskop FS, Zeiss, Oberkochen, D) befand. Zur Visualisierung der Zellen wurde die Infrarot-Videotechnik in Kombination mit differentiellm Interferenzkontrast nach Normarski eingesetzt (IR-DIC, Dodt und Ziegelgänsberger, 1990; Sakmann und Stuart, 1995). Die Durchführung der Patch-Clamp Experimente wurde am Monitor beobachtet.

2.3.2.2 Applikationsverfahren

Eine kontrollierte lokale Applikation von Pharmaka erfolgte unter visueller Kontrolle mit Hilfe einer zweiten Patchpipette (\varnothing ca. 100 μm), die an einem zusätzlichen Mikromanipulator (Luigs & Neumann, Ratingen, D) befestigt war. Die jeweiligen Stocklösungen wurden in entsprechenden Konzentrationen zu jeweils 50 ml Applikationslösung gegeben. Der Wechsel zwischen den Applikationslösungen erfolgte mit Hilfe eines automatischen Applikationssystems (Automate, USA). Alternativ wurde eine Präinkubation des gesamten Gewebeschnitts durch Zugabe der gewünschten Pharmaka zu der externen ACSF-Lösung durchgeführt (mindestens 30 min Superfusion vor der eigentlichen Messung).

2.3.2.3 Pipetten/Pipettenhalterung

Pipetten wurden aus dünnwandigem Borosilikatglas mit Filament (GC150TF; Clark Electromedical Instruments, Pangbourne, UK) gezogen. Das Filament erleichtert das blasenfreie Befüllen der Pipette mit Lösung. Die Pipetten wurden in zwei Schritten mit Hilfe eines horizontalen Pipettenziehgeräts (Zeitz, München, D) gezogen. Um möglichst geringe Zugangswiderstände zu erhalten, und um in den Einzelzell-Experimenten das Zytoplasma möglichst einfach zu ernten, hatten die Pipetten große Öffnungsdurchmesser (\varnothing ca. 3 μm) mit Pipettenwiderständen zwischen 1,5 und 3 M Ω . Die Parameter für den Ziehvorgang wurden an jedem Experimentiertag empirisch neu ermittelt. Generell gilt: Je größer die Hitze und die Zuggeschwindigkeit, desto kleiner der Durchmesser und desto flacher die Flanken der Pipette. Für Einzelzell-PCR-Experimente wurde das Pipettenglas zur Inaktivierung von RNasen über Nacht bei 250°C im Ofen erhitzt. Direkt vor jedem Einzelzell Experiment wurde eine neue Pipette gezogen und das hintere Ende vor und nach Befüllen mit RNase freier scPCR-Lösung über einem Bunsenbrenner abgeflammt. Pipetten für die Applikation von Pharmaka (siehe 2.3.2.2) wurden aus dem gleichen Glas hergestellt.

Pipettenhalter und Vorverstärker waren direkt mit einem motorisierten Mikromanipulator verbunden. Ein chlorierter Silberdraht diente als Elektrode, um Pipettenlösung und Vorverstärker zu verbinden. Dieser wurde zu Beginn eines jeden Versuchstags in konzentrierter Chlorbleichlauge (Natriumhypochlorid) rechloriert. Für Einzelzell-PCR-Experimente wurde der Draht nach jedem Pipettenwechsel kurz in Chlorbleichlauge und anschließend in RNase freien Alkohol getaucht.

2.3.3 Datenaufnahme

Zur Datenaufnahme wurde der EPC9-Patch-Clamp Verstärker (HEKA Elektronik, Lambrecht, D) verwendet. Der Verstärker besteht aus einem Vorverstärker und einem Hauptverstärker. Die wichtigsten Funktionseinheiten des Vorverstärkers sind ein Operationverstärker (OPA, operational amplifier) und der Rückkopplungswiderstand R_f . Die zwei Eingänge des OPAs (+/-) besitzen quasi unendlich hohe Eingangswiderstände ($>10^{12} \Omega$). Dies hat zur Folge, daß kein Strom über die Eingänge in den OPA fließen kann. Der OPA ist so konstruiert, daß er immer diejenige Ausgangsspannung (U_f) liefert, die zum Ausgleich einer Spannungsdifferenz an den beiden Eingängen führt.

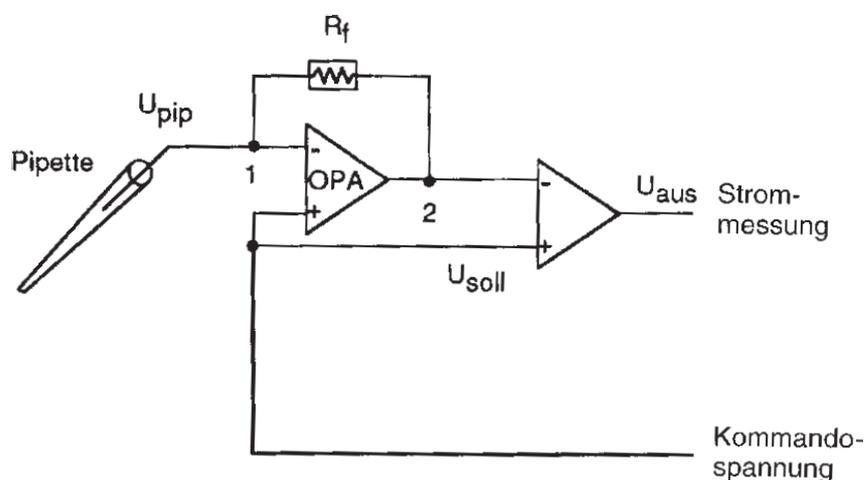


Abb. 2.1: Schematisches Schaltbild eines Patch-Clamp Verstärkers

Die wichtigsten Funktionseinheiten des Vorverstärkers sind ein Operationverstärker (OPA) und der Rückkopplungswiderstand (R_f). Die zwei Eingänge des OPAs (+/-) besitzen quasi unendlich hohe ($>10^{12} \Omega$) Eingangswiderstände. Dadurch kann kein Strom über die Eingänge in den OPA fließen. Der OPA liefert immer diejenige Ausgangsspannung (2), die proportional aber hochverstärkt zu der Spannungsdifferenz an den beiden OPA-Eingängen ist ($U_{soll} - U_{pip}$). Da der Ausgang über den R_f mit dem (-)-Eingang verbunden ist, liegt an R_f eine Spannung an, die proportional zum Strom zwischen (1) und (2) ist. Ein entsprechender Strom fließt in die Pipette, bis $U_{pip} = U_{soll}$. Die Spannung an (2) wird an einem nachgeschalteten Differenzverstärker mit der Kommandospannung (U_{soll}) verglichen und die Differenz (U_{aus}) über den Strommonitor ausgegeben (nach Numberger und Draguhn, 1996).

Der Ausgang ist über den Rückkopplungswiderstand (R_f) mit einem der beiden Eingänge verbunden und liefert in Abhängigkeit von R_f ein hoch verstärktes Spannungssignal U_f , daß proportional zu der Spannungsdifferenz der Eingänge ist. Die am OPA-Ausgang erzeugte Spannung wird an einem nachgeschalteten Differenzverstärker mit der Soll-Spannung verglichen und die Differenz über den Strommonitor ausgegeben. Bei dem verwendeten HEKA-Vorverstärker kommen je nach Verstärkungsbereich drei unterschiedliche R_f zum Einsatz (5 M Ω , 500 M Ω , 50 G Ω). Für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Whole-Cell Messungen wurde der mittlere Verstärkungsbereich (0,5-20 nA) mit $R_f = 500$ M Ω verwendet. Abbildung 2.1 gibt das Schaltungsprinzip des Vorverstärkers wider; dieser kann sowohl für Voltage-Clamp als auch für Current-Clamp Messungen eingesetzt werden (Numberger und Draghun, 1996).

2.3.3.1 Voltage-Clamp Messung

Bei der Whole-Cell Ableitung im Voltage-Clamp Verfahren wird das Membranpotential der Zelle durch ein gewähltes Kommandopotential (U_{soll}) vorgegeben. An dem (+)-Eingang des Operationsverstärkers liegt die Kommandospannung (U_{soll}) an, an dem (-)-Eingang (1) die Spannung an der Pipette (U_{pip}). Der OPA mißt die Differenz zwischen diesen beiden Spannungen, ohne daß Strom über die Eingänge des OPA fließt. Er liefert an seinem Ausgang (2) eine Spannung (U_f), die zu dieser Differenz proportional und in Abhängigkeit von R_f extrem verstärkt ist. Unterscheidet sich U_{pip} (1) von U_f (2), fließt solange ein Strom über R_f in die Pipette, bis die Spannungsdifferenz ausgeglichen ist. Die Spannung, die sich dabei um R_f aufbaut, ist proportional zu dem in die Pipette fließenden Kompensationsstrom ($U_f = R_f I$), so daß der jeweilige Strom, der zur Aufrechterhaltung des Kommandopotentials fließt, als entsprechendes Spannungssignal gemessen werden kann (Strom-Spannungswandler). Dieser Spannungswert wird über einen Differenzverstärker mit der Sollspannung verglichen und die Differenz (U_{aus}) über den Strommonitor ausgegeben (vgl. Abb. 2.1). Das Spannungssignal kann nach einer Kalibrierung mit dem entsprechenden Verstärkungsfaktor (mV/pA) direkt als Strom abgelesen werden. Fließen durch das Öffnen von Ionenkanälen z.B. nach einem Spannungssprung größere Ionenströme über die Membran (z.B. 1 nA) werden diese über die Patchpipette auch am OPA-Eingang (1) registriert. Der Ausgang generiert nun eine zu diesem Strom proportionale und in Abhängigkeit von R_f verstärkte Ausgangsspannung ($U_f : 500 \text{ M}\Omega \times 1 \text{ nA} = 500 \text{ mV}$). Unter Berücksichtigung des am EPC-9-Verstärker eingestellten

Kalibrierungsfaktors ($0,5 \text{ mV/pA}$) und U_f (500 mV) ist am Patchverstärker der relevante Membranstrom ablesbar (für 500 mV bei $0,5 \text{ mV/pA}$ entsprechend 1 nA).

2.3.3.2 Current-Clamp Messung

In der Current-Clamp Messung kann der Strom, der durch die Pipettenelektrode fließt, genau vorgegeben werden. Gemessen wird das entsprechende Potential zwischen Pipette und Badelektrode. Die Current-Clamp Konfiguration wird zum einen dazu verwendet, den spontanen zeitlichen Verlauf des Membranpotentials eines Neurons zu registrieren, zum anderen, um die Potentialänderungen eines Neurons nach Strominjektion zu verfolgen. Im ersten Sinne arbeitet der Vorverstärker als einfacher sogenannter Spannungsfolger. Dies wird durch eine sehr schnelle zusätzliche Rückkopplungsschleife ($30 \mu\text{s}$) bewirkt, die zwischen Spannung an der Pipette (U_{pip} , (-)-OPA-Eingang), über differentieller OPA-Ausgangsspannung (2) zurück zum (+)-OPA-Eingang verläuft. Ändert die Zelle ihr Membranpotential und kommt es damit zu einer Änderung der Spannung am (-)-OPA-Eingang, resultiert dies in einer zu R_f proportionalen U_f -Änderung, welche dann auf den (+)-OPA zurückgeleitet wird, so daß genau diese Spannungsdifferenz am OPA ausgeglichen wird. Diese Ausgleichsspannung ist der Spannungsänderung an der Zelle proportional und wird über einen Spannungsmonitor registriert, so daß die Potentialveränderungen der Zelle mit hoher zeitlicher Auflösung verfolgt werden können.

Mit Hilfe eines Differentialverstärkers kann über diese Rückkopplungsschleife ein zusätzlicher hyperpolarisierender oder depolarisierender Strom injiziert und die Potentialantwort der Zelle auf diesen registriert werden. Werden Ströme injiziert, kommt es zu einem Spannungsabfall an der Pipette. Diese injektionsbedingte Spannungsänderung kann nicht von der eigentlichen Membranpotentialänderung getrennt werden. Die Abschätzung dieser passiven, resistiven und kapazitiven Komponenten geschieht über die Einstellung der schnellen Kapazitätskorrektur (vgl. 2.3.3.3) und der Serienwiderstandskompensation (vgl. 2.3.3.4) im sogenannten Bridge-Balance Verfahren.

2.3.3.3 Kapazitätskorrektur

Die Kapazität ist definiert als diejenige Ladungsmenge, die benötigt wird, um einen Gegenstand mit einem elektrischen Potential zu versehen. Da es keinen idealen Ohm'schen Widerstand ohne kapazitive Komponente gibt, geht bei jeder Spannungsänderung etwas Zeit für die kapazitive Umladung von R_f verloren. Ein Strom-Spannungs-Wandler kann

daher auf ein schnelles, fast senkrecht ansteigende Spannungssignal (von z.B. Einzelkanalströmen) an einem Eingang nur mit einer exponentiell ansteigenden Kurve antworten. Um auch solche schnellen Signale aufzulösen, sind in den Vorverstärker noch zusätzliche Korrekturschaltkreise eingebaut, die diese Verluste ausgleichen und so die Antwortzeit auf wenige Mikrosekunden herabsetzen (Sigworth, 1995).

Neben der Kapazität des Vorverstärkers spielen die kapazitiven Eigenschaften der Patchpipette sowie der Zellmembran selbst eine wichtige Rolle. Eine Änderung der Kommandospannung führt nicht sofort zu einer entsprechenden Änderung des Membranpotentials, sondern zunächst werden die Kapazitäten von Pipette und Zellmembran umgeladen. Als Antwort auf den Testpuls zeigen sich schnell ansteigende und exponentiell abfallende, sogenannte transiente Ströme. Da diese kurzzeitigen Umladeströme sehr hohe Werte annehmen können und so die eigentlichen Meßsignale stören, wurden sie korrigiert, indem der zur Umladung benötigte Strom nicht mehr durch den Vorverstärker, sondern über einen parallelen Schaltkreis injiziert wurde. Der EPC9-Verstärker besitzt zwei automatische Korrekturmechanismen. Einen mit schneller Zeitkonstante ($0,5\text{-}8\ \mu\text{s}$) zur Korrektur der kapazitiven Ströme von Pipette und Pipettenhalter. Der zweite mit einer langsameren Zeitkonstante ($>5\ \mu\text{s}$) zur Korrektur der Umladeströme der Zellmembran. Die spezifische Kapazität biologischer Zellmembranen ist mit $1\ \mu\text{F}/\text{cm}^2$ für alle Zellen ungefähr gleich. Deshalb ist der Wert der langsamen Kapazität ein direktes Maß für die Membranfläche und damit für die Größe der untersuchten Zelle. Diese Abschätzung ist allerdings nur für annähernd kugelförmige Zellen korrekt. Ebenfalls wird nur für kugelsymmetrische Zellen das Kriterium der Isopotentialität erreicht. Bei verzweigten Zellen wie Neuronen werden elektrotonisch entfernte Kompartimente wie distale Dendriten nur verzögert und unvollständig durch einen Spannungssprung umgeladen.

2.3.3.4 R_s -Kompensation

Unter dem Serienwiderstand (R_s) versteht man denjenigen Widerstand, der in Serie zwischen Membranwiderstand der Zelle und Verstärkereingang liegt. Der unkompensierte R_s ist bestenfalls etwa doppelt so groß wie der Widerstand der freien Patchpipette in der Badlösung. Da die Zelle nur über R_s umgeladen werden kann, ist der Serienwiderstand für den unterschiedlichen Wert des Kommandopotentials am Verstärkerausgang und dem des Membranpotentials verantwortlich. Ein Teil des Kommandopotentials fällt in Abhängigkeit von der Größe der Membranströme über R_s ab, so daß Kommandopotential

und Membranpotential nicht identisch sind. Der zeitliche Verlauf der Umladung des Membranpotentials wird ebenfalls maßgeblich durch R_s beeinflusst. Zur Beschleunigung des Umladens der Zellmembran und damit zur Verbesserung der Whole-Cell Ableitung wurde der Spannungsverlust des Serienwiderstandes R_s kompensiert. Dazu wurde zur vorgegebenen Spannung vom OPA des EPC9-Verstärkers noch ein zusätzlicher Anteil hinzugefügt, der proportional zum injizierten Strom ist und damit den Spannungsabfall am Serienwiderstand der Pipette teilweise ausgleicht. Der Spannungsabfall an R_s kann aber niemals zu 100% ausgeglichen werden, da der positive Rückkopplungsmechanismus dieser Kompensation zu schwingen beginnt und damit zum Verlust des Seals führen kann.

Der Spannungsfehler U des Serienwiderstandes ist direkt proportional zum Betrag der Stromantwort und kann über das Ohm'sche Gesetz berechnet werden:

$$U = R_s \times I$$

Der kinetische Fehler aufgrund der zeitlichen Verzögerung des Umladeprozesses hängt direkt von der Zellkapazität (C_m) und R_s ab:

$$\tau = R_s \times C_m \frac{R_m}{R_m + R_s}$$

Da $R_m \gg R_s$, kann der Bruch in der Regel vernachlässigt werden und es ergibt sich:

$$\tau = R_s \times C_m$$

Je größer der Serienwiderstand, desto eher können Stromantworten mit kleinen Zeitkonstanten (τ) nicht mehr aufgelöst werden (Sigworth, 1995). In der vorliegenden Arbeit wurden Zugangswiderstände zwischen 3 und 8 M Ω erreicht, die im allgemeinen noch um 60% kompensiert wurden. Für $R_s \geq 5$ M Ω ergibt sich ein Spannungsfehler (U) bei einer Stromantwort von 1 nA von weniger als 5 mV; für $C_m \sim 50$ pF konnten Ereignisse mit Zeitkonstanten (τ) ab ca. 250 μ s in den Messungen unverfälscht aufgenommen werden.

2.3.3.5 P/4-Leckkorrektur

Jede Potentialänderung führt zu einem Strom, der nicht durch spannungsaktivierte Ionenkanäle hervorgerufen wird, sondern nur durch den Ohm'schen Widerstand der Zellmembran. Vermittelt werden diese linearen Ströme größtenteils durch geöffnete Ionenkanäle und außerdem zu einem sehr geringen Teil auch durch die Lipidmembran selbst. Dieser spannungsunabhängige sogenannte Leckstrom kann direkt während der Messung von spannungsaktivierten Strömen abgezogen werden (Bezanilla und Armstrong, 1977). Es wurde dazu ein Protokoll mit jeweils vier depolarisierenden Spannungspulsen

durchgeführt, die nur $\frac{1}{4}$ der Amplitude des entsprechenden Testpulses hatten. Durch Mittelwertbildung der Stromantworten und Multiplikation mit vier erhält man für den jeweiligen Testpuls den Stromanteil, der durch spannungsunabhängige Ströme vermittelt wurde. Dieser konnte in einer Leckkorrektur von der gemessenen Gesamtstromantwort abgezogen werden.

2.3.4 Durchführung der Patch-Clamp Messung

2.3.4.1 Die Cell-Attached Konfiguration

Eine mit 6 μ l Intrazellulärlösung gefüllte Pipette wurde in den Pipettenhalter gespannt und mit Hilfe des Mikromanipulators in das Bad gefahren. Um Kontaminationen der Pipette zu vermeiden, wurde sofort ein leichter Überdruck angelegt (30-80 cm H₂O). Durch Anlegen einer entsprechenden Korrekturspannung wurden vorhandene Offset-Potentiale korrigiert und so der Stromfluß minimiert. Unter Offset-Potentialen versteht man Spannungen, die an Übergängen zwischen Silberdraht, Pipettenlösung, Badlösung und Erdung entstehen. Die Pipette wurde dann an das zu untersuchende Neuron herangeführt, bis das Ausströmen der Pipettenlösung an der Zelloberfläche sichtbar wurde. Durch Aufheben des Überdrucks und behutsames Saugen erhöhte sich der Widerstand drastisch und es kam zur Ausbildung des Gigaseals. Was genau den sehr hohen Abdichtwiderstand von einigen Gigaohm zwischen Pipette und Zellmembran bewirkt, ist nicht bekannt. Die Ausbildung des Seals und der Cell-Attached Konfiguration wurde anhand der Änderung der Stromantwort auf einen Testpuls verfolgt und durch das Anlegen einer Spannung von -60 mV unterstützt. Im Anschluß daran wurde die schnelle Kapazitätskomponente korrigiert (vgl. 2.3.3.3).

2.3.4.2 Die Whole-Cell Ableitung

Alle Messungen dieser Arbeit wurden in der Whole-Cell Konfiguration durchgeführt. Diese Konfiguration wurde erreicht, indem der Membranfleck unter der Pipette durch leichtes Saugen durchbrochen wurde. Da nach Membrandurchbruch nicht nur der Bereich unter der Pipette sondern die gesamte Zellmembran umgeladen wurde, änderte sich die Stromantwort auf den Testpuls und die transienten kapazitiven Ströme nahmen zu. Diese langsamen kapazitiven Ströme wurden ebenfalls korrigiert (vgl. 2.3.3.3). Im Anschluß wurde der Serienwiderstand in der Regel um ca. 60% kompensiert (2.3.3.4).

2.3.4.3 Meßprotokolle

2.3.4.3.1 Current-Clamp

Zur Bestimmung des Ruhemembranpotentials sowie der Spontanaktivität wurde das Potential der Zelle sofort nach Etablierung der Whole-Cell Konfiguration über einen Zeitraum von mindestens 30 s aufgezeichnet und die Meßwerte gemittelt. Hyperpolarisierende Ströme wurden von einem auf -35 mV gehaltenen Membranpotential in Schritten von jeweils 10 pA für einen Zeitraum von 2 s injiziert und die Potentialantworten registriert.

2.3.4.3.2 Voltage-Clamp

Zur Untersuchung von spannungsaktivierten Leitfähigkeiten wurde, ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV, die Stromantwort des Neurons auf zunehmend depolarisierende Spannungspulse von jeweils 10 mV für 200 ms aufgezeichnet. Zur Beobachtung von Änderungen der Stromantwort bei einer konstanten Spannung über einen längeren Zeitraum, z.B. während der Applikation eines Pharmakons, wurde -ausgehend von einem Haltepotential von -60 mV- alle 10 s die Stromantwort auf einen Spannungspuls von 200 ms Länge auf -50 mV aufgezeichnet. Zur einfachen Analyse der Strom-Spannungs-Beziehung von nicht-inaktivierenden Leitfähigkeiten wurden die Stromantworten auf Spannungsrampen von -120 mV bis -40 mV bzw. 0 mV mit einer Steigung von 8 mV/100 ms bei einem Haltepotential von -60 mV aufgezeichnet. Zur Bestimmung des Umkehrpotentials einer Leitfähigkeit wurden Spannungsrampen vor und nach Aktivierung bzw. Inhibierung dieser Kanalleitfähigkeit aufgezeichnet.

2.3.5 Datenanalyse

Die Datenaufnahme erfolgte mit Hilfe des Software-Pakets Pulse+Pulsefit (HEKA Elektronik, Lambrecht, D). Die Digitalisierungsfrequenz betrug 2-5 kHz. Da nach Nyquist die Digitalisierungsfrequenz mindestens doppelt so hoch sein sollte, wie die höchste im Signal vorkommende Frequenz, wurden hochfrequente Signalanteile, die in der Regel nur dem Hintergrundrauschen entsprechen, mit Hilfe eines Tiefpaß-Besselfilters bis zu einer Grenzfrequenz von 1 Hz eliminiert. Besselfilter schwächen das Signal zwar schon unterhalb der gewählten Grenzfrequenz etwas ab, zeigen aber keine Signalverzerrung (Numberger und Draguhn, 1996). Zur weitergehenden Datenauswertung und Darstellung

wurden die Softwareprogramme Igor (Wavemetrics, Michigan, USA) und SigmaPlot (Jandel, Eukrath, D) verwendet.

2.3.5.1 Bestimmung eines Umkehrpotentials

Das Umkehrpotential eines Membranstroms wird von den relativen Leitfähigkeiten der passierenden Ionen und von ihrem jeweiligen Gleichgewichtspotential bestimmt. Am Umkehrpotential ist kein Nettostromfluß meßbar. Ist ein Strom nur von einer Ionenart getragen, so entspricht das Umkehrpotential dem Gleichgewichtspotential des entsprechenden Ions und kann gemäß der Nernst Gleichung berechnet werden (Nernst, 1888):

$$E_{\text{ion}} = \frac{RT}{zF} \times \ln \frac{[\text{ion}]_a}{[\text{ion}]_i}$$

mit E_{ion} :	Gleichgewichts- (Nernst-) Potential des jeweiligen Ions
R:	allgemeine Gaskonstante
T:	absolute Temperatur in Kelvin
z:	Wertigkeit des Ions
F:	Fahraday-Konstante
$[\text{ion}]_a / [\text{ion}]_i$:	Ionenkonzentration außerhalb bzw. innerhalb der Zelle

Die im Rahmen dieser Arbeit angegebenen Umkehrpotentiale wurden empirisch aus Stromantworten von Spannungsrampen ermittelt, indem derjenige Wert bestimmt wurde, bei dem der untersuchte Strom seine Orientierung änderte, also den Betrag Null hatte.

2.3.5.2 Bestimmung von Leitfähigkeiten

Die Membranleitfähigkeit g ist definiert als der reziproke Wert des Membranwiderstandes R :

$$g = \frac{1}{R}$$

Durch Anwendung des Ohm'schen Gesetzes ($U = RI$) kann die Leitfähigkeit nach folgender Formel berechnet werden:

$$g = \frac{\Delta I}{\Delta U}$$

Zur Berechnung der Leitfähigkeit aus Stromantworten auf eine Spannungsrampe wurden die Differenzen von Strom- und Spannungswerten bei -112 mV und -80 mV verwendet. Zur Bestimmung der Leitfähigkeit aus Stromantworten auf einen wiederholten

Testpuls von -50 mV wurde als zweiter Referenzwert das empirisch ermittelte Umkehrpotential des jeweiligen Stroms gewählt, so daß sich die obige Gleichung vereinfachen läßt:

$$g = \frac{I_{-50\text{mV}}}{E_{-50\text{mV}} - E_{\text{rev}}}$$

2.3.5.3 Bestimmung eines EC/IC_{50} -Wertes und des entsprechenden Hill-Koeffizienten

Zur Untersuchung der Beziehung zwischen unterschiedlichen Konzentrationen eines Pharmakons und seiner Wirkung wurden entsprechende Meßreihen in einer sogenannten Hill-Funktion ausgewertet. Ausgangspunkt ist die Annahme, daß die Wirkung des Liganden L (z.B. Pharmakon) erst nach Interaktion mit dem jeweiligen Rezeptor R (z.B. Ionenkanal) vermittelt wird. Die Bildung des entsprechenden Ligand-Rezeptor Komplexes (LR) unterliegt einem dynamischen Gleichgewicht mit der Dissoziationskonstante K_d .

$$K_d = \frac{[L] \times [R]}{[LR]}$$

Der Anteil an Rezeptoren p_o , die mit einem Liganden in Interaktion getreten sind, ergibt sich aus:

$$p_o = \frac{[LR]}{[R] + [LR]}$$

Aus der Kombination dieser beiden Gleichungen ergibt sich die sogenannte Hill-Langmuir-Gleichung (Hill, 1909; Langmuir, 1918).

$$p_o = \frac{1}{1 + (K_d/[L])}$$

Setzt man $K_d = [L]$, so ergibt sich für p_o ein Wert von 0,5. K_d gibt also denjenigen Wert an, bei dem die Hälfte aller Rezeptoren besetzt ist. Der Wert von K_d ist also ein Maß für die Affinität des Liganden zum Rezeptor. Je kleiner K_d , desto höher ist die Affinität. Da p_o nicht empirisch bestimmt werden kann, muß ein anderer experimentell bestimmter Faktor gewählt werden, um die Ligand-Rezeptor Interaktion zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurde z.B. die Stromantwort auf einen Testpuls von -50 mV ermittelt und entsprechend eine sogenannte Dosis-Wirkungskurve erstellt ($p_o = I/I_{\text{max}}$). Diejenige Ligandenkonzentration, bei der die Stromantwort 50% des gemessenen Maximalwertes beträgt, wird EC_{50} für die Kanalöffnung oder IC_{50} für den Kanalblock genannt (effective bzw. inhibitory concentration). Alternativ wurden direkt die Werte des Membranpotentials

bzw. der mittleren induzierten Leitfähigkeit entsprechend für p_0 eingesetzt. Kann die Dosis-Wirkungskurve mit der Hill-Langmuir-Gleichung beschrieben werden, so entspricht der Wert für K_d dem EC/IC₅₀-Wert. Zur Beschreibung von empirisch ermittelten Dosis-Wirkungskurven mit variabler Steigung wurde ein zusätzlicher Parameter eingeführt, der sogenannte Hill-Koeffizient n . Formt man diese Gleichung entsprechend um und trägt $p_0/(1-p_0)$ gegen $[L]$ auf eine logarithmische Skala auf, so erhält man einen Hill-Graphen mit der Steigung n .

$$p_0 = \frac{1}{1 + (K_d/[L])^n}$$

2.3.5.4 Bestimmung von Signifikanzen

Zur Bestimmung von signifikanten Unterschieden zweier Datenreihen wurde der Student's t-Test durchgeführt. Voraussetzung für den t-Test sind Normalverteilung und vergleichbare Standardabweichungen der Meßwerte (Ramm und Hoffmann, 1987). Die Berechnung der Zufallsvariablen p wurde automatisch als Funktion des Sigma-Programms durchgeführt. Ein p -Wert kleiner als 0,05 zeigt signifikante Unterschiede zwischen zwei Datenreihen an.

2.4 Immuncytochemische Methoden

2.4.1 Perfusion und Präparation der Hirnschnitte

Zur schnellen Fixierung des Gehirngewebes wurden die Mäuse mit 4% Paraformaldehyd in PBS perfundiert. Dazu wurden die Tiere mit 3% Chloralhydrat (Rompun: Bayer, Leverkusen, D) und Ketanest (Parke-Davis, Berlin, D) narkotisiert. Nach Lidreflexkontrolle wurde der Thorax geöffnet und die Perfusionskanüle in den aufgeschnittenen linken Ventrikel des Herzens eingeführt. Mittels einer Perfusionspritze wurden die Tiere unter gleichmäßigem Druck mit ca. 12 ml Vorspüllösung und anschließend mit 150 ml Perfusionslösung perfundiert. Anschließend wurde das Gehirn herauspräpariert und über Nacht bei 4°C in Perfusionslösung nachfixiert.

Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurde das perfundierte Gehirn bei 4°C über Nacht in 30%ige Sucroslösung in PBS gelegt. Dann wurde das Gehirn mit Trockeneis durchgefroren und bei -26°C mit Tissue-Tek (Wesarg, Hamburg, D) auf den Präparathalter aufgefroren. Anschließend wurden am Kryostaten (Leica, Heidelberg, D) koronare

Hirnschnitte von 25 µm Dicke angefertigt und bis zur Antikörperreaktion und Färbung in PBS gelagert.

2.4.2 Antikörperreaktionen und DAB-Färbung

Die Schnitte wurden 3x für je 5 min in PBS gewaschen und anschließend für 10 min in 15 ml NaBH₄-Lösung (0,5% in PBS) inkubiert, um Aldehydbindungen zu lösen und die Antikörper-Antigen-Bindung zu erleichtern. Anschließend wurden die Schnitte nochmals 3x für je 5 min in PBS gewaschen. Zur weiteren Verbesserung der Antikörperreaktion wurden die Schnitte für je 10 min in einer Ethanolreihe inkubiert (10, 20, 40, 20, 10%). Danach wurde wieder 3x für je 5 min mit PBS gewaschen. Zur Inaktivierung endogener Peroxidasen wurden die Schnitte für 30 min in 0,3% H₂O₂-Lösung inkubiert. Anschließend wurde 2x für je 5 min in PBS gewaschen. Zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen wurden die Schnitte für 30-60 min in Blocklösung bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schnitte wurden dann in die vorbereitete Antikörperlösung (Anti-TH-Ak 1:2000 verdünnt in Carrierlösung) überführt und für 2 h bei Raumtemperatur oder für 24 h im Kühlraum auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde wiederum 2x für 5 min in PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte in die vorbereitete Zweitantikörperlösung (Bio-Anti-Mouse-AK, 1:1000 verdünnt in PBS) überführt und auf dem Schüttler für 1,5-2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Wieder wurde 3x für 5 min mit PBS gewaschen.

Anschließend wurde die ABC-Reaktion (Avidin-Biotin-Complex) durchgeführt. 30 min vor Anwendung wurde der ABC-Komplex (Vektor, Burlingame, USA) 1:1000 in PBS verdünnt. Dann wurden die Schnitte in dieser Lösung für 1,5-2 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach 3x waschen mit Tris-HCl (pH 7,9) wurden die Schnitte mit 5 ml DAB-Vorinkubationslösung (50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM Imidazol, 0,3% Ammoniumnickelsulfat in 1x DAB-Lösung) überschichtet. Die Diaminobenzidin-Reaktion wurde dann mit 5 ml DAB-Reaktionslösung (0,006% H₂O₂ in DAB-Vorinkubationslösung) für 10 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte 3x je 5 min in Tris-HCl Puffer gewaschen und dann auf gelantinebeschichtete Objektträger aufgezogen, für mindestens 30 min getrocknet und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (50, 70, 80, 90, 2x 100% Ethanol, jeweils 10 min und im Anschluß 2x Xylol für 20 min). Die fertigen Schnitte wurden mit Entellan (Merck, Darmstadt, D) eingedeckelt, am Lichtmikroskop (Zeiss, Oberkochen, D) ausgewertet und dokumentiert.

3 Ergebnisse

Ein vorrangiges Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Protokolls zur reproduzierbaren Anwendung der Einzelzell-RT-PCR Technik. Diese sollte genutzt werden, um in Kombination mit elektrophysiologischen Techniken Funktion und Genexpression einzelner Substantia nigra Neuronen zu charakterisieren.

3.1 Etablierung eines multiplex-RT-PCR-Protokolls

Ziel der Einzelzell-PCR Untersuchung war in erster Linie die Definition der molekularen Identität neuronaler K_{ATP} -Kanäle. Zusätzlich sollte das Expressionsprofil der G-Protein gekoppelten Kaliumkanäle Girk 1-4 aufgeklärt werden. Da in der Substantia nigra neben dopaminergen Neuronen auch GABAerge Neuronen sowie Gliazellen zu finden sind, war es außerdem wichtig, molekulare Marker zu definieren, mit deren Hilfe der Zelltyp in der PCR eindeutig bestimmt werden konnte. Als Marker für dopaminerge Neuronen wurde die Tyrosinhydroxylase (TH) gewählt, das Schlüsselenzym für die Dopaminsynthese (Iwata et al., 1992). Die 67 kD Form der L-Glutamat-Decarboxylase, das Schlüsselenzym für die Synthese von γ -Aminobuttersäure (GABA) wurde als neuronaler Marker für GABAerge Neuronen gewählt (Greif et al., 1992; Szabó et al., 1996). Zum Ausschluß von Astrogliazellen wurde das Glial fibrillaric acidic Protein (GFAP) ausgewählt, ein in diesem Zelltyp spezifisch exprimiertes Protein (Brenner, 1994).

Im Methodenteil unter 2.2.8 wurde das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Einzelzell-RT-PCR-Protokoll beschrieben. Als ein entscheidender Schritt für die PCR Amplifikation von mRNA aus Einzelzellen erwies sich das kontrollierte und vollständige Überführen des Pipetteninhalts in das Reaktionsgefäß für die cDNA-Synthese. Dies wurde nach Positionierung von Pipette und Reaktionsgefäß mittels eines Mikromanipulators durch Anlegen eines positiven Drucks an die Pipette gewährleistet (vgl. Monyer und Lambolez, 1995). Von besonderer Wichtigkeit für die reproduzierbare RT-PCR Amplifikation erwies sich auch eine gleichbleibend hohe Qualität der Reversen Transkriptase und der *Taq*-Polymerase, sowie ein PCR-Gerät mit hoher Reproduzierbarkeit der Temperaturzyklen.

3.1.1 Sensitivität des RT-PCR-Protokolls; Positivkontrollen

Zum simultanen Nachweis von Markertranskripten und K_{ATP} -Kanal Untereinheiten bzw. Girk-Kanälen wurden multiplex-PCR-Protokolle entwickelt, die geeignet sind, die jeweiligen cDNA-Moleküle in sehr geringer Konzentration parallel nachzuweisen. Zur PCR-Etablierung wurde die aus Mausgewebe von Mittelhirn und Herz isolierte mRNA in cDNA umgeschrieben und hochverdünnt. In der cDNA aus Mittelhirn waren alle Markergene, die K_{ATP} -Kanal Untereinheiten und die Girk-Kanäle exprimiert. In Verdünnungen von 1:1000 bzw. 1:10.000 sind mRNAs der Klasse III nur noch in einer Konzentration von wenigen Molekülen vorhanden (Lambolez et al., 1994). Diese hochverdünnte Mittelhirn-cDNA wurde als Positivkontrolle für die Kombination aus multiplex- und nested-PCR eingesetzt (mPCR). Alle zu untersuchenden Transkripte wurden mit dem unter 2.2.7.2 und 2.2.7.3 beschriebenen multiplex-nested-PCR-Protokoll aus dieser Kontroll-cDNA reproduzierbar nachgewiesen.

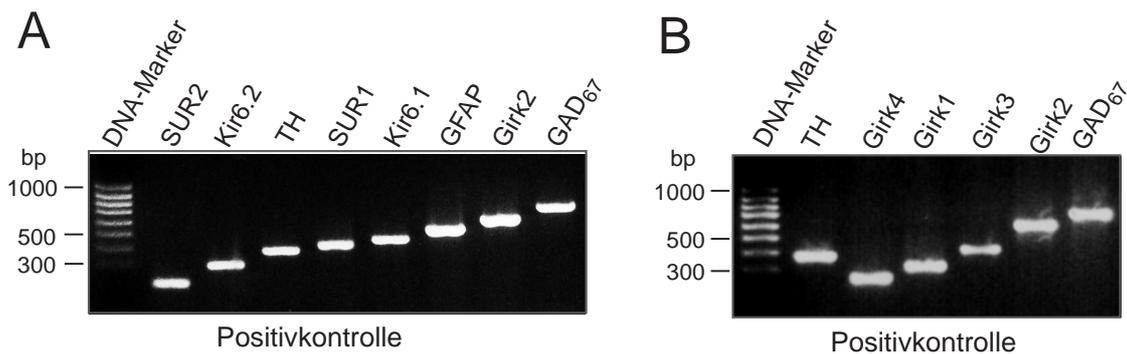


Abb. 3.1: Positivkontrolle für K_{ATP} -Kanal- bzw. Girk1-4-multiplex-PCR

Hochverdünnte Mittelhirn-cDNA (1:10.000), in der alle in dieser Arbeit untersuchten Gene exprimiert sind, wurde als DNA-Template in multiplex-nested-PCR Positivkontrollen eingesetzt. Abbildung (A) zeigt eine Positivkontrolle für die K_{ATP} -Kanal-mPCR nach elektrophoretischer Auftrennung im 2%igen Agarosegel. In allen Bahnen ist jeweils ein PCR-Fragment in der erwarteten Größe zu erkennen (SUR2: 215 bp, Kir6.2: 298 bp; TH: 377 bp, SUR1: 401 bp, Kir6.1: 448 bp, GFAP: 517 bp; Girk2: 595 bp; GAD₆₇: 702 bp). Die PCR-Fragmentgrößen können anhand des DNA-Markers (100 bp-Leiter) abgeschätzt werden. In (B) ist eine entsprechende Positivkontrolle für die Girk1-4-mPCR abgebildet (TH: 377 bp, Girk4: 257 bp, Girk1: 316 bp; Girk3: 412 bp, Girk2: 595 bp; GAD₆₇: 702 bp).

Abbildung 3.1 A zeigt eine Positivkontrolle für die K_{ATP} -mPCR. Neben den drei Markertranskripten (TH, GAD₆₇, GFAP) und den vier K_{ATP} -Kanal Untereinheiten (SUR2, Kir6.2, SUR1, Kir6.1) wurde zusätzlich Girk2 cDNA in der PCR amplifiziert. Da Girk2-mRNA in nahezu allen dopaminergen Neuronen der Substantia nigra exprimiert wird (Karschin et al., 1996), diente der Nachweis dieser mRNA als zusätzliche Kontrolle der Sensitivität des Einzelzell-RT-PCR-Protokolls: Wenn die RT-PCR ausreichend sensitiv ist,

um mRNAs in geringer Expression zu detektieren, wie z.B. die von Kaliumkanal Untereinheiten, sollte die Einzelzell-PCR eines dopaminergen Neurons neben dem TH-Signal ebenfalls ein PCR-Amplifikat für Girk2 liefern. Alle 122 im Rahmen dieser Arbeit analysierten TH positiven Neuronen gaben in der Einzelzell-PCR immer auch ein positives Signal für die Girk2-Expression. Abbildung 3.1 B zeigt eine entsprechende Positivkontrolle für die Girk1-4-mPCR. Als Marker wurden TH und GAD₆₇ simultan nachgewiesen. Auf den Astrogliazellmarker wurde verzichtet, da in über hundert vorherigen Einzelzell-Experimenten in keinem Fall versehentlich ein Gliazelle analysiert wurde. Beide Kontroll-PCRs zeigen im 2%igen Agarosegel für alle analysierten Gene deutliche Banden mit den jeweils erwarteten Amplifikatgrößen ohne Nebenprodukte. Die jeweilige Identität der PCR-Amplifikate wurde mehrfach durch Sequenzierung gemäß 2.2.10 verifiziert. Diese Ergebnisse wurden reproduzierbar mit dem Perkin-Elmer-TC-480C Thermocycler erhalten. Eine entsprechende Positivkontrolle wurde in jeder PCR von Einzelzell-cDNA parallel amplifiziert, um diejenigen negativen PCR-Signale zu identifizieren, die lediglich auf einem systematischen Fehler in der PCR beruhten.

3.1.2 Spezifität des RT-PCR-Protokolls; Negativkontrollen

Zur Optimierung der Zytoplasmaausbeute aus Einzelzellen war es in der Regel notwendig, auch den Nukleus des Neurons mit in die Patchpipette aufzunehmen. Daher mußte die Möglichkeit von falsch-positiven PCR-Signalen durch Amplifikation von genomischen Sequenzen des Zellkerns ausgeschlossen werden, auch wenn die Amplifikation von DNA eines Einzelkerns als sehr unwahrscheinlich gilt (Johansen et al., 1995). War die entsprechende Genstruktur bekannt, wurden die PCR-Primer so gewählt, daß Intronsequenzen innerhalb des von ihnen amplifizierten Bereichs lagen. Damit sind die genomischen DNA-Fragmente entweder zu groß für eine PCR-Amplifikation oder aber die PCR-Amplifikate genomischer Herkunft können anhand ihrer um die Intronsequenz erhöhten Größe leicht identifiziert werden. Da das Kir6.2-Gen kein Intron besitzt, wurden zum Ausschluß genomischer Kir6.2 DNA-Amplifikation zusätzliche Kontrollexperimente durchgeführt: Das Zytoplasma einer Zelle wurde zusammen mit dem Nukleus in die Pipette eingesaugt und dem Einzelzell-RT-PCR-Protokoll unterzogen. Die cDNA-Synthesereaktion wurde jedoch ohne Zugabe des Enzyms Reverse Transkriptase durchgeführt, so daß die mRNA der Einzelzelle nicht in cDNA überführt werden konnte. Damit lag in der anschließenden PCR-Reaktion einzig die genomische Sequenz des Nukleus als DNA-Template vor. In zehn dieser Kontrollexperimente konnte kein PCR-

Amplifikat detektiert werden. Zusätzlich wurde das Zytoplasma von fünf Zellen ohne Zellkern geerntet. Die RT-PCR-Analysen dieser Neuronen zeigten ebenfalls die erwarteten mRNA-Expressionsmuster (vgl. 3.3.2 und 3.4.4.1). Diese Kontrollexperimente zeigten, daß die DNA der Zellkerne keinen Einfluß auf die Ergebnisse der Einzelzell-PCR-Experimente dieser Arbeit hatte.

Um die Möglichkeit von falsch-positiven PCR-Signalen durch Kontaminationen von Extrazellulärmaterial zu evaluieren, wurden Kontrollexperimente durchgeführt, indem mit der Pipette lediglich Extrazellulärmaterial aufgesaugt wurde. Diese Proben wurden exakt nach Einzelzell-PCR-Vorschrift weiter behandelt. In allen acht Experimenten wurden weder PCR-Signale für K_{ATP} -Kanal Untereinheiten noch für Girk-Kanäle detektiert.

Um ebenfalls auszuschließen, daß die Manipulation der Pipette im Hirnschnitt oder die verwendeten Lösungen zu falsch-positiven PCR-Signalen führen konnten, wurde eine Pipette mit positivem Druck in den Hirnschnitt hinein- und gleich wieder hinausgefahren, ohne einen Seal zu erhalten oder Zellmaterial aufzusaugen. Diese Probe wurde exakt wie die Zytoplasmprobe einer Einzelzelle behandelt. Eine solche Negativkontrolle wurde parallel für jede PCR-Amplifikation von Einzelzell-cDNA durchgeführt und war in der Regel negativ. Konnte in seltenen Fällen doch eine PCR-Bande in der Negativkontrolle detektiert werden, wurden die Ergebnisse der parallel aufgearbeiteten Einzelzellen verworfen.

3.2 Einzelzell-PCR-Analyse der Substantia nigra Neuronen

3.2.1 Korrelation von Markergenexpression und elektrophysiologischen Eigenschaften

Der scPCR-Nachweis von Tyrosinhydroxylase- oder GAD_{67} -Expression diene als Kriterium zur eindeutigen Bestimmung des dopaminergen bzw. GABAergen Phänotyps eines zuvor elektrophysiologisch charakterisierten SN-Neurons. Im Anschluß an die Voltage- und Current-Clamp Messungen wurde das Zytoplasma des jeweiligen Neurons geerntet und mittels scPCR analysiert (vgl. 2.2.8). Nach Analyse von 77 Neuronen der Substantia nigra konnten anhand ihres elektrophysiologischen Verhaltens drei Zelltypen unterschieden werden, die jeweils mit der Expression von entweder TH oder GAD_{67} korreliert waren. Abbildung 3.2 zeigt diese Korrelation der elektrophysiologischen Eigenschaften mit dem Expressionsprofil für die drei Markertranskripte TH, GAD_{67} und GFAP.

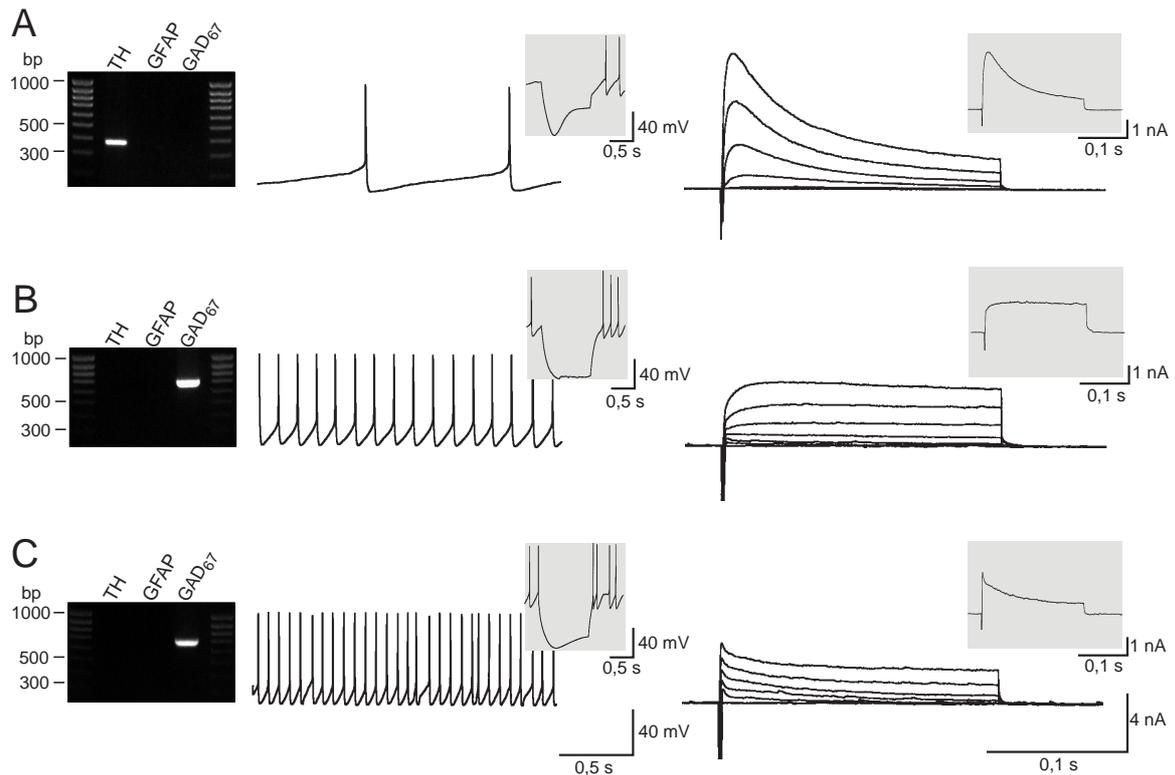


Abb. 3.2: Korrelation von Markergenexpression und elektrophysiologischen Eigenschaften

Abgebildet sind für drei einzelne SN Neuronen jeweils 2%ige Agarosegele mit elektrophoretisch aufgetrennten scPCR-Reaktionen der Markertranskripte, sowie des DNA-Längenmarkers. Außerdem Current-Clamp Aufzeichnungen der Spontanaktivität und der Antwort auf eine 2 s hyperpolarisierende Strominjektion von 100 pA (erste Einblendung) sowie die Voltage-Clamp Messung von spannungsaktivierten Leitfähigkeiten (Die zweite Einblendung zeigt die Stromantwort auf einen Spannungspuls von -80 mV auf -30 mV); genaue Meßprotokolle siehe 2.3.4.3. Abbildung (A) zeigt die typischen elektrophysiologischen Eigenschaften eines einzelnen TH positiven SNpc Neurons: Spontanaktivität mit einer Frequenz von ca. 1 Hz, zeitabhängige Verringerung des Membranpotentials nach Injektion eines hyperpolarisierenden Stroms (I_h) und einen spannungsabhängigen, ab -50 mV aktivierenden, schnell inaktivierender Kaliumauswärtsstrom (I_A). In (B) sind entsprechend die typischen elektrophysiologischen Eigenschaften eines GAD_{67} positiven SNpc Neurons gezeigt: Spontanaktivität in einer deutlich höheren Frequenz von 8 Hz, sowie keine Hinweise auf I_h - oder I_A -Ströme. Das in (C) gezeigte GAD_{67} positive Neuron aus der SNpr zeigt Spontanaktivität von 15 Hz, sowie eine leichte I_h -Komponente und einen I_A -Strom mit im Vergleich zu (A) geringerer Amplitude und schnellerer Inaktivierungskinetik.

3.2.1.1 TH positive SN Neuronen

Alle 54 analysierten Neuronen in der SNpc mit großen Zellkörpern (C_m ca. 30-80 pF) ergaben in der scPCR nur für den Marker TH ein positives Signal. PCR-Amplifikate für GAD_{67} sowie GFAP wurden nicht nachgewiesen (vgl. Abb. 3.2. A). Die Current-Clamp Analyse zeigte, daß diese molekular eindeutig als dopaminerg identifizierten Neuronen in den meisten Fällen mit einer relativ niedrigen Frequenz von $1,8 \pm 0,1$ Hz ($n=70$) spontanaktiv waren. Die Aktionspotentiale besaßen eine mittlere Dauer von $8,0 \pm 0,5$ ms

(n=40) und wurden bei einer Schwelle von $-36,3 \pm 0,8$ mV (n=40) generiert (vgl. auch Tab. 3.4). Als Antwort auf eine hyperpolarisierende Strominjektion von 100 pA wurde eine zeitabhängige Verringerung des korrespondierenden Membranpotentials (sag) beobachtet. Dieses Verhalten ist für dopaminerge Neuronen charakteristisch. Die Ursache liegt in der Aktivierung eines unselektiven Kationenkanals, der bei negativen Membranpotentialen einen der Hyperpolarisation entgegenwirkenden Einwärtsstrom (den sogenannten I_h -Strom) vermittelt und der bei positiveren Membranpotentialen deaktiviert (Pape, 1996).

Als weiteres Charakteristikum dieser Neuronen zeigte sich in der Analyse der Strom-Spannungs-Beziehung ein spannungsabhängiger, schnell inaktivierender Kalium-Auswärtsstrom, der schon bei Potentialen ab -50 mV aktiviert (also negativ von dem Schwellenpotential für die Generierung eines Aktionspotentials). Ein solcher A-Strom (I_A) ist in vielen Neuronentypen beschrieben worden und kann durch die Expression verschiedener $K_v\alpha$ - und β -Kaliumkanal Untereinheiten vermittelt werden, wie inzwischen auch auf Einzelzell-PCR Ebene gezeigt wurde (Martina et al., 1998; Song et al., 1998).

3.2.1.2 **GAD₆₇ positive SN Neuronen**

Neuronen der SNpc mit wesentlich kleineren Zellkörpern (C_m ca. 10-25 pF) zeigten ebenfalls meistens Spontanaktivität, allerdings mit einer deutlich höheren Frequenz von $8,8 \pm 0,6$ Hz (n=10). Current-Clamp sowie Voltage-Clamp Messungen gaben in diesen Neuronen keine Hinweise auf das Vorhandensein von I_h - bzw. I_A -Strömen. Ein ähnliches elektrophysiologische Verhalten wurde in der Ratte für die sogenannten Typ II SN Neuronen beschrieben (Lacey et al., 1989). In der Einzelzell-PCR erwiesen sich alle SN Neuronen dieses elektrophysiologischen Phänotyps als GAD₆₇ positiv sowie TH und GFAP negativ. Dies belegt erstmalig, daß es sich bei diesen kleineren Neuronen der SNpc nicht um dopaminerge sondern um GABAerge Neuronen (wahrscheinlich Interneuronen) handelt (vgl. Abbildung 3.2 B).

Eine weitere Population von GAD₆₇ positiven Neuronen mit mittlerer Größe (C_m ca. 20-40 pF) wurde in der SNpr identifiziert und elektrophysiologisch sowie molekularbiologisch charakterisiert. Diese GABAergen Neuronen waren mit einer Frequenz von $11,4 \pm 0,7$ Hz (n=10) spontanaktiv und wiesen eine geringe I_h -Komponente auf. Die Analyse der Strom-Spannungs-Beziehung zeigte keinen dominanten I_A -Strom wie in TH positiven Neuronen, aber bei positiveren Potentialen aktivierte ein A-Strom mit geringerer Amplitude und schnellerer Inaktivierungskinetik (vgl. Abb. 3.2 C). Auch diese Daten stehen im Einklang

mit früheren elektrophysiologischen Beschreibungen GABAerger SNpr Neuronen (Richards et al., 1997).

3.2.2 mRNA-Expression von K_{ATP} -Kanal Untereinheiten in SN Neuronen

Mit Hilfe des multiplex-RT-PCR-Protokolls wurde für eine große Anzahl von elektrophysiologisch charakterisierten Substantia nigra Neuronen das Expressionsmuster der K_{ATP} -Kanal Untereinheiten SUR1, Kir6.2, SUR2 und Kir6.1 in Kombination mit den vier beschriebenen Markertranskripten (TH, GAD₆₇, GFAP und Girk2) bestimmt. Es zeigte sich, daß alle drei Typen von Substantia nigra Neuronen ein eigenes, spezifisches Muster an K_{ATP} -Kanal Untereinheiten exprimierten.

3.2.2.1 GABAerge SNpc Neuronen

Die scPCR-Analyse von elf GABAergen SNpc Neuronen (GAD₆₇ positiv) ergab in keinem Fall positive PCR-Signale für eine der vier möglichen K_{ATP} -Kanal Untereinheiten. Die Expression von Girk2 konnte jedoch in allen elf Neuronen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.3). Dies zeigt an, daß die Einzelzell-PCR ausreichend sensitiv war, um die Expression von Ionenkanal-mRNA nachzuweisen. Entsprechende im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte elektrophysiologische Experimente lieferten ebenfalls keinen Hinweis auf das Vorhandensein von funktionellen K_{ATP} -Kanälen in diesem Neuronentyp.

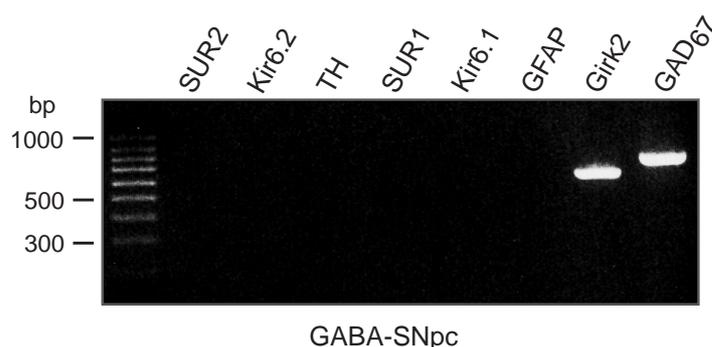


Abb. 3.3: K_{ATP} -Kanal Untereinheiten Expression in GABAergen SNpc Neuronen

Abgebildet ist ein 2%iges Agarosegel nach elektrophoretischer Auftrennung der scPCR-Produkte eines elektrophysiologisch gemäß Abb. 3.2 (B) als GABAerg identifizierten SNpc Neurons. Parallel untersucht wurde die mRNA-Expression der K_{ATP} -Kanal Untereinheiten SUR2, Kir6.2, SUR1, Kir6.1 sowie der Marker TH, GFAP GAD₆₇ und Girk2. In der ersten Bahn (links) wurde der DNA-Längenmarker aufgetragen. Es wurde ein PCR-Amplifikat für den Girk2, aber nicht für eine Untereinheit des K_{ATP} -Kanals detektiert. Das GAD₆₇ PCR-Amplifikat bestätigt den GABAergen Phänotyp des analysierten Neurons.

3.2.2.2 GABAerge SNpr Neuronen

Im Gegensatz zu den GABAergen Neuronen der SNpc wurden in GAD₆₇ positiven Neuronen der SNpr mRNA-Transkripte für K_{ATP}-Kanal Untereinheiten nachgewiesen. In allen elf analysierten Neuronen wurden positive PCR Signale für die Expression von sowohl Kir6.2 als auch von SUR1 detektiert. Im Gegensatz dazu waren die PCR-Nachweise für Kir6.1- oder SUR2-Expression für alle elf Neuronen negativ. Girk2-Amplifikate konnten in sieben der elf Neuronen detektiert werden (vgl. Abb. 3.4).

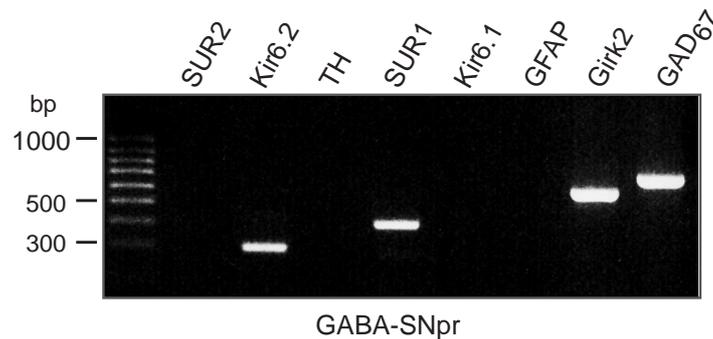


Abb. 3.4: K_{ATP}-Kanal Untereinheiten Expression in GABAergen SNpr Neuronen

Abgebildet ist ein 2%iges Agarosegel nach elektrophoretischer Auftrennung der scPCR-Produkte eines elektrophysiologisch gemäß Abb. 3.2 (C) als GABAergen identifizierten SNpr Neurons. Parallel untersucht wurde die mRNA-Expression der K_{ATP}-Kanal Untereinheiten SUR2, Kir6.2, SUR1, Kir6.1 sowie der Marker TH, GFAP GAD₆₇ und Girk2. In der ersten Bahn (links) wurde der DNA-Längenmarker aufgetragen. Neben dem PCR-Amplifikat für Girk2 wurden die K_{ATP}-Kanal Untereinheiten Kir6.2 und SUR1 detektiert. Das GAD₆₇ PCR-Amplifikat bestätigt den GABAergen Phänotyp des analysierten Neurons.

3.2.2.3 Dopaminerge SNpc Neuronen

Die Analyse der zwei Typen von GABAergen Substantia nigra Neuronen zeigte, daß beide Populationen ein unterschiedliches Muster an K_{ATP}-Kanal Untereinheiten exprimierten, aber innerhalb ihrer Populationen homogene Expressionsmuster aufwiesen. Ein dazu gegensätzliches Bild ergab die Einzelzell-Analyse der dopaminergen SNpc Neuronen (vgl. Abb. Abbildung 3.5 und 3.24 C). Die 54 analysierten TH und Girk2 positiven SN Neuronen zeigten drei unterschiedliche Expressionsmuster von K_{ATP}-Kanal Untereinheiten: In 21 TH positiven Neuronen (39%) wurde die mRNA-Expression von Kir6.2 und SUR1 nachgewiesen (Abb. 3.5 A). Eine zweite Population von 20 Neuronen (37%) exprimierte ebenfalls Kir6.2-mRNA, aber statt SUR1 wurde Koexpression der anderen Sulfonylurearezeptor-Isoform, SUR2 detektiert (Abb. 3.5 B). Und in einer dritten, kleineren Gruppe von 13 TH positiven Neuronen (24%) konnten Einzelzell-PCR-Signale

für die Expression von Kir6.2 in Kombination mit sowohl SUR1 als auch SUR2 nachgewiesen werden (3.5 C). Die mRNA-Expression der K_{ATP} -Kanal Untereinheit Kir6.1 wurde in keinem der analysierten Neuronen detektiert.

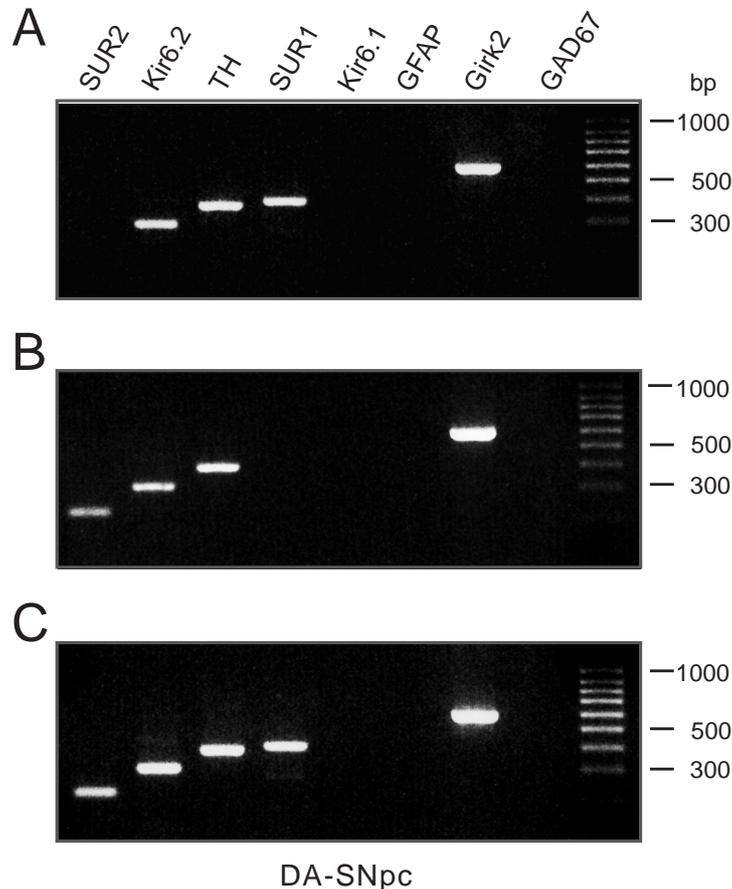


Abb. 3.5: Heterogene K_{ATP} -Kanal Untereinheiten Expression in dopaminergen SNpc Neuronen

Abgebildet sind die gelelektrophoretisch analysierten scPCR-Produkte (vgl. Abb. 3.3. und 3.4) von drei elektrophysiologisch gemäß Abb. 3.2 (A) als dopaminerg identifizierten SNpc Neuronen. Parallel untersucht wurde die mRNA-Expression der K_{ATP} -Kanal Untereinheiten SUR2, Kir6.2, SUR1, Kir6.1 sowie der Marker TH, GFAP GAD₆₇ und Girk2. In der letzten Bahn (rechts) wurde jeweils der DNA-Längenmarker aufgetragen. Das PCR-Amplifikat für TH bestätigt den dopaminergen Phänotyp der analysierten Neuronen. Das Neuron in (A) zeigt neben Girk2 PCR-Banden für die K_{ATP} -Kanal Untereinheiten Kir6.2 und SUR1. Das Neuron in (B) zeigt PCR-Banden für die K_{ATP} -Kanal Untereinheiten SUR2 und Kir6.2. Aus dem Neuron in (C) wurden PCR-Amplifikate für sowohl SUR2 als auch SUR1 und Kir6.2 erhalten.

3.2.2.4 Differenzierung zwischen SUR2A- und SUR2B-Expression

Die gewählten Primerpaare zum Einzelzell-PCR Nachweis für SUR2-Transkripte waren nicht dazu geeignet, zwischen den Splicevarianten SUR2A und SUR2B zu unterscheiden, da sie vor Beschreibung dieser Splicevarianten ausgewählt wurden. Aus diesem Grunde wurden zwei alternative SUR2-Primerpaare so gewählt, daß der Einschub von 176 bp, um

den sich SUR2A von SUR2B unterscheidet, jeweils innerhalb des von Forward- und Reverse-Primer amplifizierten Bereichs lag. Nach multiplex- und nested-PCR zeigte eine Bande von 513 bp den Nachweis von SUR2A an, während ein PCR-Fragment von nur 337 bp Länge das Vorhandensein von SUR2B nachwies.

Abbildung 3.6 A zeigt ein RT-PCR-Ergebnis für diese splicevariantenspezifischen SUR2A/B-Primerpaare. In einer PCR mit Maus Mittelhirn-cDNA als Template konnte im 2%igen Agarosegel nur ein einzelnes PCR-Fragment in Höhe von 337 bp detektiert werden. Im Gegensatz dazu resultierten aus der PCR-Reaktion für cDNA aus Herzgewebe zwei Amplifikate. Eines ebenfalls in Höhe von 337 bp, das zweite Fragment hatte eine Länge von 513 bp. Sequenzierungen der jeweiligen PCR-Banden verifizierten, daß im Mittelhirn nur SUR2B amplifiziert wurde, während im Herzen sowohl SUR2B als auch SUR2A nachgewiesen werden konnte.

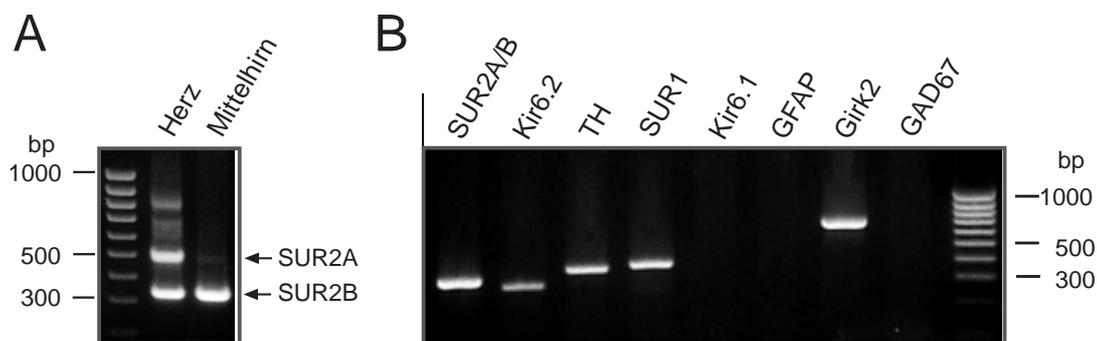


Abb. 3.6: Identifikation der Splicevarianten SUR2A und SUR2B

Zur Unterscheidung der SUR2-Splicevarianten wurden zwei alternative SUR2-Primerpaare so gewählt, daß der Einschub von 176 bp, um den sich SUR2A von SUR2B unterscheidet, jeweils innerhalb des von Forward- und Reverse-Primer amplifizierten Bereich lag. Nach multiplex- und nested-PCR zeigte eine Bande von 513 bp den Nachweis von SUR2A an, während ein PCR-Fragment von 337 bp Länge das Vorhandensein von SUR2B nachwies. (A) zeigt ein RT-PCR-Ergebnis für diese Splicevarianten-spezifischen SUR2A/B-Primerpaare. In einer PCR mit Maus Mittelhirn-cDNA als Template konnte nach Elektrophorese im 2%igen Agarosegel nur ein einzelnes PCR-Fragment in Höhe von 337 bp detektiert werden (Bahn 2). Im Gegensatz dazu resultierten aus der PCR-Reaktion für cDNA aus Herzgewebe eindeutig zwei Amplifikate (Bahn 1). Eines ebenfalls in Höhe von 337 bp, das zweite Fragment hatte eine Länge von 513 bp (siehe Pfeile). Die PCR-Fragmentgrößen wurden anhand des DNA-Längenmarkers (links) abgeschätzt. In (B) ist eine scPCR-Analyse für ein einzelnes dopaminerges SNpc Neuron gezeigt (entsprechend Abb. 3.5). Mit den splicevariantenspezifischen SUR2A/B-Primern konnte in diesem und vier weiteren SUR2 positiven Neuronen nur eine PCR-Bande für SUR2B in Höhe von ca. 337 bp amplifiziert werden.

Zusätzlich wurden Einzelzell-PCR-Experimente mit diesen splicevariantenspezifischen SUR2A/B-Primern anstelle der Standard-SUR2-Primer durchgeführt. In fünf TH positiven Neuronen, in denen ein Signal für SUR2 detektiert werden konnte, wurde immer nur eine einzige Bande in Höhe von 337 bp nachgewiesen (vergl. Abb. 3.6 B). Dies legt den Schluß nahe, daß nur SUR2B- und nicht SUR2A-mRNA in den dopaminergen Neuronen der

Substantia nigra exprimiert wird. SUR2A-mRNA ist im Herzgewebe sehr hoch exprimiert und ist dort wahrscheinlich an der Formation des kardialen ATP-sensitiven Kaliumkanals beteiligt (Okujama et al., 1998).

3.3 Funktionelle Charakterisierung von K_{ATP} -Kanälen in SN Neuronen

Die Einzelzell-PCR Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich der mRNA-Expression von K_{ATP} -Kanal Untereinheiten legen nahe, daß sowohl die GABAergen Projektionsneuronen der SNpr als auch die dopaminergen Neuronen der SNpc funktionelle K_{ATP} -Kanäle exprimieren. In unterschiedlichen elektrophysiologischen Studien wurden funktionelle K_{ATP} -Kanäle sowohl in dopaminergen Neuronen der Substantia nigra als auch in GABAergen SNpr Neuronen nachgewiesen (vgl. 1.4.1.2.2). Die molekulare Identität dieser Kanäle war jedoch bislang unbekannt. Die vorgestellten scPCR-Analysen weisen darauf hin, daß die dopaminergen SN Neuronen im Gegensatz zu den GABAergen SNpr Neuronen verschiedene K_{ATP} -Kanaltypen mit unterschiedlicher Untereinheiten-Zusammensetzung exprimieren. In heterologen Expressionssystemen weisen Kir6.2 vermittelte K_{ATP} -Kanäle unterschiedliche pharmakologische und metabolische Eigenschaften auf, je nach dem mit welcher SUR-Isoform sie koexprimiert werden (Ashcroft und Gribble, 1998; Babenkow et al., 1998). Die Wirkung der Kanalöffner und -blocker ist sowohl an nativen Kanälen als auch in rekombinanten Systemen von unterschiedlichen Arbeitsgruppen untersucht worden. Tabelle 3.1 faßt die Eigenschaften der für diese Arbeit relevanten, rekombinanten K_{ATP} -Kanäle zusammen.

	Diazoxid [EC ₅₀]	Pinacidil [EC ₅₀]	MgATP [IC ₅₀]	Tolbutamid [IC ₅₀]	Glibenklamid [IC ₅₀]
SUR1/Kir6.2	60 µM	kein Effekt	10 µM	2.4-32 µM	1.8 nM
SUR2A/Kir6.2	300 µM o.E.	10 µM	100 µM	?	350 nM
SUR2B/Kir6.2	<200 µM	2 µM	300 µM	<500 µM	<100 µM

Tab. 3.1: Pharmakologische und metabolische Eigenschaften ausgewählter rekombinanter K_{ATP} -Kanäle

Die Tabelle faßt für drei unterschiedliche K_{ATP} -Kanal Untereinheitenkombinationen die im rekombinanten System ermittelten EC₅₀- bzw. IC₅₀-Werte für zwei Kanalöffner, MgATP und zwei Sulfonylharnstoff-Kanalblocker zusammen. Wenn keine quantitativen Daten vorlagen, wurden soweit vorhanden qualitative Befunde angegeben (o.E.: ohne Effekt).

Sollten die dopaminergen Neuronen der Substantia nigra also tatsächlich zwei funktionelle K_{ATP} -Kanaltypen mit unterschiedlichen Sulfonylurearezeptor Untereinheiten exprimieren, so sollte sich diese Heterogenität auch in einer unterschiedlichen pharmakologischen und metabolischen Sensitivität dieser Neuronen widerspiegeln.

3.3.1 Effekte der K_{ATP} -Kanalöffner

Zur qualitativen Analyse der Wirkung von Diazoxid und Pinazidil (Biotrend, Köln, D) wurden diese K_{ATP} -Kanalöffner jeweils in einer Konzentration von 100 μM über eine Makropatchpipette direkt auf das zu untersuchende SN Neuron im Hirnschnitt appliziert.

3.3.1.1 Diazoxidsensitivität und K_{ATP} -Kanal Expression dopaminerg SN Neuronen

In heterologen Systemen aktiviert Diazoxid in einer Konzentration von 100 μM SUR1/Kir6.2 vermittelte K_{ATP} -Kanäle (EC_{50} : 60 μM). SUR2A/Kir6.2 Kanäle werden von Diazoxid in einer Konzentration von 300 μM nicht aktiviert, während für SUR2B/Kir6.2 Kanäle nur bekannt ist, daß eine Konzentration von 200 μM Diazoxid eine Kanalöffnung bewirkt (Isomoto et al., 1997b).

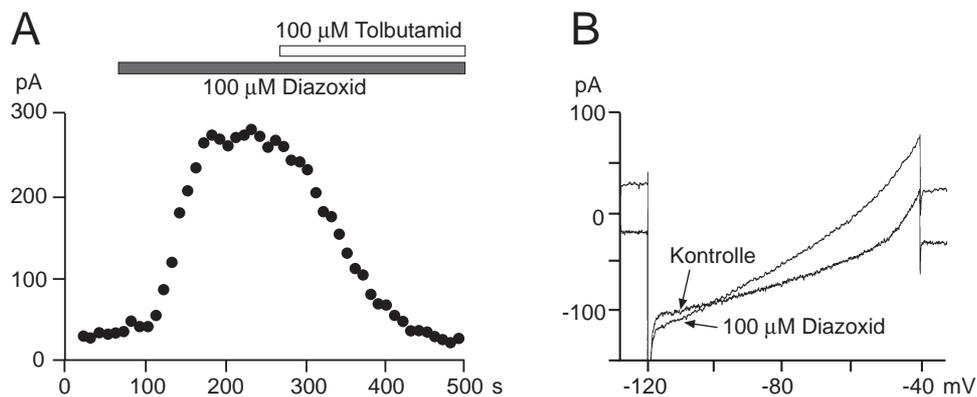


Abb. 3.7: Diazoxid aktiviert K_{ATP} -Kanäle mit hoher Tolbutamidsensitivität in dopaminergen SNpc Neuronen

Die Abbildung zeigt die Leitfähigkeitsänderung von zwei elektrophysiologisch als dopaminerg identifizierten SNpc Neuronen nach Applikation des K_{ATP} -Kanalöffners Diazoxid (Voltage-Clamp Meßprotokolle siehe 2.3.4.3.2). Applikation von 100 μM Diazoxid führte in Neuron in (A) zu einer Stromzunahme bei -50 mV von ca. 250 pA, die durch die Koapplikation des K_{ATP} -Kanalblockers Tolbutamid (100 μM) komplett blockiert wurde. Die jeweilige Applikationsdauer wird durch die horizontalen Balken angezeigt. Stromantworten auf Spannungsrampen vor und nach Applikation von 100 μM Diazoxid (B), zeigten, daß der diazoxidinduzierte Strom ein Umkehrpotential von ca. -100 mV hatte (berechnetes Gleichgewichtspotential für K^+ : -102 mV).

Abbildung 3.7 A zeigt die Stromantwort eines dopaminergen Neurons auf Testpulse von -60 mV auf -50 mV im Abstand von 10 s. Applikation von 100 μM Diazoxid führte in diesem und sieben anderen Neuronen zu einer deutlichen Strom- und damit Leitfähigkeitszunahme (mittlere Leitfähigkeitszunahme $1,1 \pm 0,3$ nS). Diese konnte durch die Koapplikation des K_{ATP} -Kanalblockers Tolbutamid in einer Konzentration von 100 μM komplett inhibiert werden. Stromantworten auf Spannungsrampen vor und nach

Diazoxidapplikation zeigten, daß der induzierte Membranstrom ein mittleres Umkehrpotential (E_{rev}) von $-103,1 \pm 3,7$ mV besaß (vgl. 3.7 B). Dieser Wert liegt nahe dem berechneten Gleichgewichtspotential für K^+ von -102 mV für die verwendeten intra- und extrazellulären Lösungen (vgl. 2.3.5.1). Daher ist es sehr wahrscheinlich, daß die diazoxidinduzierte und tolbutamidsensitive Leitfähigkeit von K_{ATP} -Kanälen vermittelt wird.

Um diesen K_{ATP} -Strom mit der Expression von K_{ATP} -Kanal Untereinheiten zu korrelieren, wurden kombinierte scPCR-Experimente durchgeführt. Nach Diazoxidapplikation wurde das Zytoplasma des entsprechenden Neurons zur Einzelzell-PCR-Analyse geerntet. Problematisch erwies sich dabei die Dauer des pharmakologischen Experiments; je länger die elektrophysiologische Messung dauerte, desto geringer wurde die Erfolgsrate der scPCR. Außerdem zeigte eine Subpopulation von dopaminergen Neuronen (ca. 30%) bei Diazoxidapplikation keinerlei Änderung von Aktivität oder Leitfähigkeit. Dabei war unklar, ob dies ein methodisches Problem war, oder ob $100 \mu\text{M}$ Diazoxid tatsächlich auf einige dopaminerge Neuronen keinen Effekt hatte. Aus diesen Gründen wurden nur solche Experimente ausgewertet, bei denen zum einen ein klarer Diazoxideffekt zu beobachten war und die zum anderen eindeutig positive scPCR-Resultate erbrachten. Diese kombinierten Experimente zeigten für sechs von sieben diazoxidsensitiven Neuronen jeweils SUR1-Expression in Kombination mit Kir6.2; ein Neuron zeigte Koexpression von SUR1 und SUR2 mit Kir6.2. Dieses Ergebnis legt nahe, daß diese Diazoxidsensitivität der dopaminergen Neuronen durch K_{ATP} -Kanäle vermittelt wird, die sich aus SUR1- und Kir6.2-Untereinheiten zusammensetzen (vgl. Abb. 3.9 A).

3.3.1.2 Pinazidilsensitivität und K_{ATP} -Kanal Expression dopaminergere SN Neuronen

Durch Pinazidil werden in heterologen Systemen präferentiell SUR2- K_{ATP} -Kanäle aktiviert. SUR2B/Kir6.2 Kanäle mit einem EC_{50} von $2 \mu\text{M}$, SUR2A/Kir6.2 Kanäle mit einem EC_{50} von $10 \mu\text{M}$. K_{ATP} -Kanäle, die sich aus den Untereinheiten SUR1/Kir6.2 zusammensetzen, sind in heterologen Systemen nicht von Pinacidil aktivierbar (Isomoto et al., 1997b).

Abbildung 3.8 zeigt, daß die Applikation von $100 \mu\text{M}$ Pinazidil ebenfalls einen Kaliumauswärtsstrom in dopaminergen Neuronen aktiviert (mittlere induzierte Leitfähigkeit: $2,9 \pm 0,3$ nS, mittleres E_{rev} : $-101,8 \pm 1,1$ mV, $n=17$; vgl. 3.3.1.1). Im Gegensatz zu dem diazoxidaktivierten Strom zeigte der pinazidilaktivierte Strom ein heterogenes Verhalten bei Koapplikation von $100 \mu\text{M}$ Tolbutamid. In drei von 17 Zellen konnte dieser

Strom durch 100 μM Tolbutamid vollständig blockiert werden (vgl. 3.8 A). In vier Neuronen wurde der pinazidilinduzierte Strom nur teilweise blockiert (vgl. 3.8 B), und in den verbleibenden 10 Neuronen zeigte die Koapplikation von 100 μM Tolbutamid keinen Effekt auf die pinazidilinduzierte Kaliumleitfähigkeit (vgl. 3.8 C).

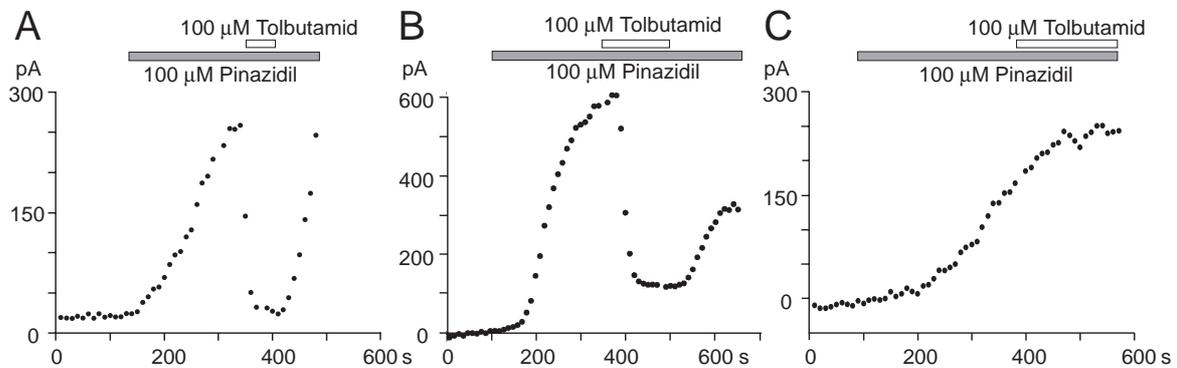


Abb. 3.8: Pinazidil aktiviert K_{ATP} -Kanäle mit variablen Tolbutamidsensitivitäten in dopaminergen SNpc Neuronen

Die Abbildung zeigt die Wirkung des K_{ATP} -Kanalöffners Pinazidil auf die Stromantwort bei -50 mV von drei elektrophysiologisch als dopaminerg identifizierten SNpc Neuronen (Voltage-Clamp Meßprotokoll siehe 2.3.4.3.2). Applikation von 100 μM Pinazidil führte in dem Neuron in (A) zur Aktivierung eines Auswärtsstroms, der durch die Koapplikation von 100 μM Tolbutamid komplett blockiert wurde. Der pinazidilinduzierte Strom des in (B) gezeigten Neurons wurde durch die Koapplikation von 100 μM Tolbutamid nur zu ca. 80% blockiert. Abbildung (C) zeigt ein drittes Neuron, bei dem der pinazidilaktivierte Strom durch die Koapplikation von 100 μM Tolbutamid nicht beeinflusst wurde. Die jeweilige Applikationsdauer wird durch die horizontalen Balken angezeigt.

In Übereinstimmung mit dem heterogenen Effekt von 100 μM Tolbutamid auf den pinazidilinduzierten Strom in dopaminergen Neuronen lieferten die kombinierten Einzelzell-PCR Versuche ebenfalls ein heterogenes Ergebnis bezüglich der SUR-Expression. Vier pinazidilsensitive Neuronen zeigten SUR1-Expression, drei Neuronen exprimierten SUR2-mRNA und drei weitere Neuronen ergaben in der PCR sowohl für SUR1- als auch für SUR2-Expression ein positives Signal, jeweils in Kombination mit Kir6.2 (vgl. 3.9 B).

Auch wenn diese Ergebnisse nur qualitative Aussagen über die Wirkung der K_{ATP} -Kanalöffner ermöglichen, ist dennoch für die Pinazidilsensitivität sowohl auf funktioneller als auch auf Transkript-Ebene ein heterogenes Bild zu differenzieren, im Gegensatz zu den homogenen Ergebnissen der entsprechenden Diazoxidexperimente (vgl. 3.9).

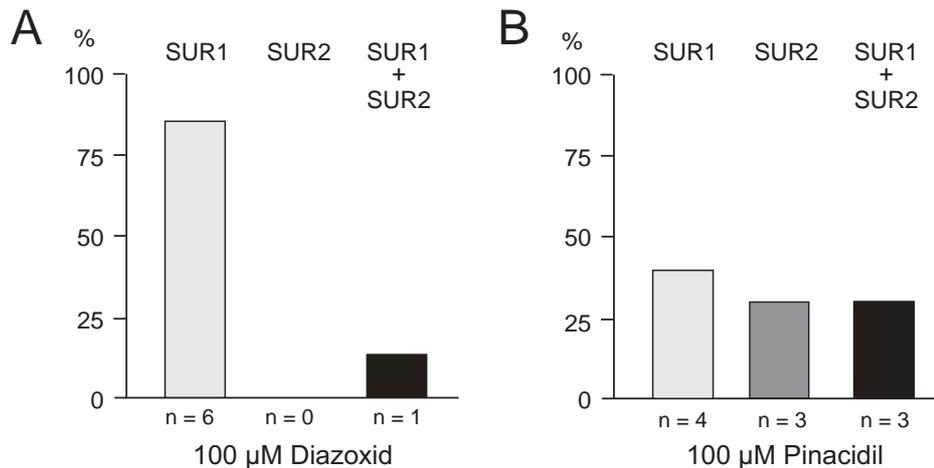


Abb. 3.9: Kombination von pharmakologischen Experimenten und Einzelzell-PCR

Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung der mittels scPCR bestimmten unterschiedlichen Expressionsmuster der SUR-Isoformen für sieben diazoxidsensitive und zehn pinazidilsensitive SNpc Neuronen. Alle Neuronen wurden elektrophysiologisch und molekularbiologisch als dopaminerg identifiziert und exprimierten Kir6.2-mRNA (vgl. Abb. 3.5). Applikation von 100 μM Diazoxid bzw. Pinazidil aktivierte jeweils kaliumselektive Auswärtsströme. Die Blockdiagramme geben die prozentualen Häufigkeiten der drei unterschiedlichen SUR-Expressionsmuster der diazoxidsensitiven (A) bzw. pinazidilsensitiven (B) Neuronen wieder: SUR1-Expression, SUR2-Expression oder Koexpression von SUR1 und SUR2.

3.3.2 Metabolische Sensitivität von SN Neuronen

Um die Sensitivität der dopaminergen Neuronen auf metabolischen Streß zu untersuchen, wurde die Wirkung von Rotenon getestet. Rotenon ist ein Blocker des Komplex I der Atmungskette. Wird dieser Komplex blockiert, so kann NADH/H⁺, das im Zitratzyklus gewonnen wird, nicht mehr unter ATP-Erzeugung in der Atmungskette oxidiert werden. Es bleibt nur noch die Oxidation von FADH/H⁺ über Komplex II, III und IV der Atmungskette zum Aufbau eines Protonengradienten über die Mitochondrienmembran und damit zur oxidativen Synthese von ATP. Es ist daher zu erwarten, daß Komplex I-Inhibition in der betreffenden Zelle eine ATP-Reduktion induziert.

3.3.2.1 Rotenonsensitivität dopaminergener Neuronen bei akuter Applikation

Zur qualitativen Analyse wurde Rotenon in einer Konzentration von 10 μM über eine Makropatchpipette direkt auf das untersuchte Neuron appliziert. Abbildung 3.10 A zeigt eine Current-Clamp Messung eines als dopaminerg identifizierten Neurons. Dieses Neuron war über einen Zeitraum von über einer Minute mit einer gleichbleibenden Frequenz von etwa 1,5 Hz spontanaktiv. Nach Applikation von 10 μM Rotenon war eine

Hyperpolarisation auf -56 mV bei einem völligen Verlust der Spontanaktivität zu beobachten. Koapplikation des K_{ATP} -Kanalblockers Tolbutamid in einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ konnte die rotenoninduzierte Hyperpolarisation komplett aufheben, so daß das Neuron wieder spontan Aktionspotentiale generierte. Die Wirkung des Tolbutamids war komplett reversibel; im Gegensatz dazu war die Rotenonwirkung im zeitlichen Rahmen des Experiments irreversibel (>50 min Auswaschzeit).

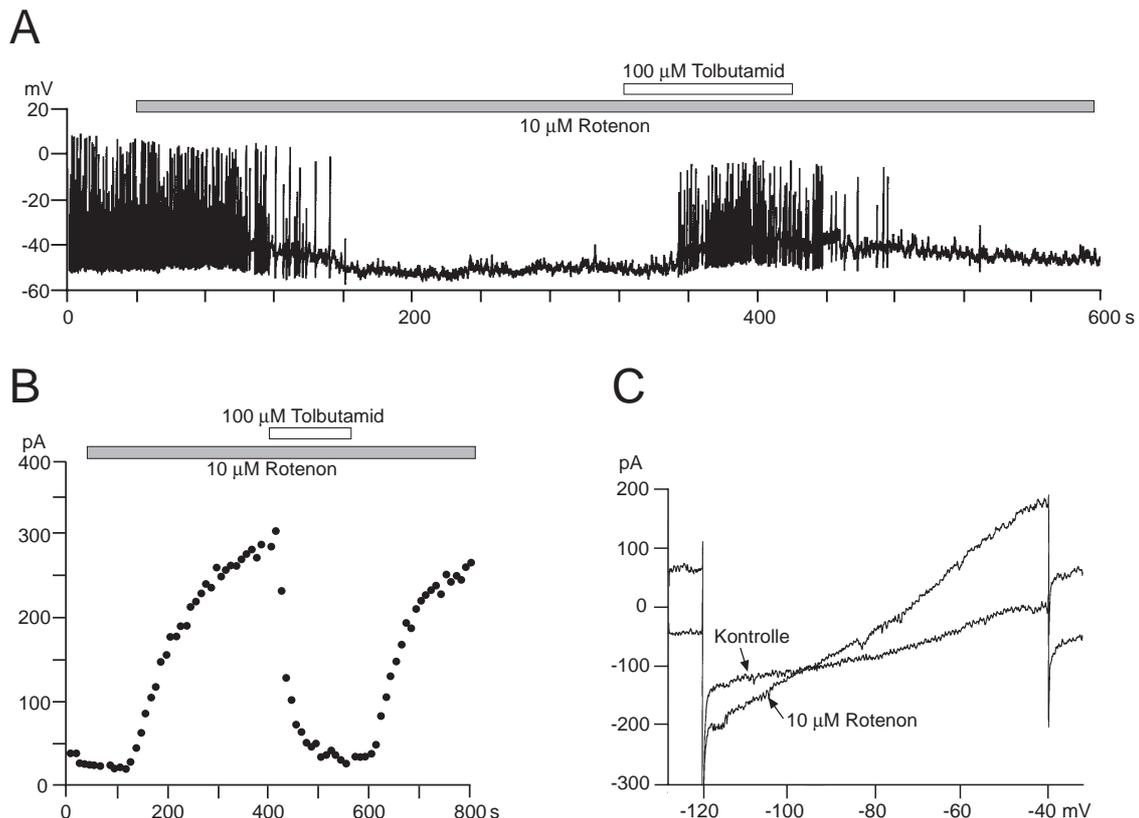


Abb. 3.10: Rotenon aktiviert K_{ATP} -Kanäle in dopaminergen SNpc Neuronen

Die Abbildung zeigt die Aktivitäts- und Membranstromänderung von zwei dopaminergen SNpc Neuronen nach akuter Applikation des Atmungskettenblockers Rotenon in Current-Clamp (A) bzw. Voltage-Clamp (B/C) Messungen (Meßprotokolle siehe 2.3.4.3). Applikation von $10 \mu\text{M}$ Rotenon führte zur Hyperpolarisation und zu einem vollständigen Verlust der Spontanaktivität des Neurons in (A). Koapplikation des K_{ATP} -Kanalblockers Tolbutamid ($100 \mu\text{M}$) konnte den Rotenoneffekt komplett aufheben. Eine entsprechende Voltage-Clamp Messung ist in (B) gezeigt. Applikation von Rotenon führte zu einer Stromzunahme von ca. 250 pA, die ebenfalls durch Koapplikation von Tolbutamid komplett blockiert werden konnte. Stromantworten auf Spannungsrampen vor und nach Rotenonapplikation (C) zeigten, daß dieser rotenoninduzierte Strom ein Umkehrpotential von ca. -100 mV besaß (berechnetes Gleichgewichtspotential für K^+ : -102 mV). Die jeweilige Applikationsdauer wird durch die horizontalen Balken angezeigt.

Abbildung 3.10 B und C zeigen vergleichbare Experimente für Voltage-Clamp Messungen. Grafik B gibt die mittlere Stromantwort auf einen Testpuls von -60 mV auf -50 mV im Abstand von 10 s wieder. $10 \mu\text{M}$ Rotenon führte in diesem und fünf weiteren Neuronen zu einer deutlichen Strom- und damit Leitfähigkeitszunahme ($2,0 \pm 0,2$ nS), die

ebenfalls durch Koapplikation von 100 μM Tolbutamid vollständig blockiert wurde. Die Stromantworten auf Spannungsrampen von -120 bis -40mV vor und nach Applikation von Rotenon zeigten, daß der induzierte Membranstrom ein mittleres Umkehrpotential von $-101 \pm 0,8 \text{ mV}$ besaß (vgl. Abb. 3.7 C). Dieser Wert dicht am berechneten Gleichgewichtspotential für K^+ von -102 mV legt nahe, daß auch diese rotenoninduzierte und tolbutamidsensitive Leitfähigkeit von K_{ATP} -Kanälen vermittelt wurde. Um auch diese Membranströme mit der Expression von K_{ATP} -Kanal Untereinheiten zu korrelieren, wurden ebenfalls kombinierte scPCR-Experimente durchgeführt. Es muß aber angemerkt werden, daß wiederum nur diejenigen Neuronen ausgewertet wurden, die einen eindeutigen Effekt auf akute Rotenonapplikation zeigten, und die zudem eindeutig positive Signale in der Einzelzell-PCR lieferten, da wie schon bei der akuten Applikation von Diazoxid, eine Subpopulation von dopaminergen Neuronen nicht auf die Applikation von Rotenon reagierte. In allen sieben auf diese Weise analysierten dopaminergen Neuronen wurde SUR1-Expression in Kombination mit Kir6.2 nachgewiesen.

Diese qualitativen Befunde bestätigen zum einen das Vorhandensein von K_{ATP} -Kanälen in dopaminergen SN Neuronen und legen zum anderen den Schluß nahe, daß SUR1+ Kir6.2 vermittelte K_{ATP} -Kanäle in dopaminergen Neuronen durch 10 μM Rotenon aktiviert und durch 100 μM Tolbutamid komplett blockiert werden können. Diese Experimente ergaben jedoch keinen Hinweis darauf, ob ein zweiter, SUR2-vermittelter Typ von K_{ATP} -Kanal mit einer geringeren Rotenonsensitivität in einer Teilpopulation der dopaminergen Neuronen funktionell exprimiert wird.

3.3.2.2 Effekte nach Präinkubation mit Rotenon

Zur Klärung der Frage, ob dopaminerge Neuronen der Substantia nigra auf Proteinebene wirklich nur einen Typ von K_{ATP} -Kanälen mit Rotenonsensitivität exprimieren, oder ob auch ein zweiter SUR2-vermittelter funktioneller K_{ATP} -Kanal exprimiert wird, der eine geringere metabolische Sensitivität aufweist, mußte die Rotenonwirkung quantitativ untersucht werden. Die akute Applikation von Rotenon war dafür aus den oben genannten Gründen nicht geeignet.

Zur quantitativen Bestimmung der Rotenonsensitivität von SN Neuronen wurden von Dr. Jochen Röper Rotenon-Präinkubationsexperimente mit ATP-freier intrazellulärer Pipettenlösung durchgeführt. Für diese Experimente wurden die Hirnschnitte vor der elektrophysiologischen Messung für mindestens 30 min mit Rotenon in Konzentrationen von 1 nM bis 10 μM inkubiert (vgl. 2.3.2.2). Da Rotenon ein Zellgift ist (Hartley et al.,

1994), führten höhere Rotenonkonzentrationen zu einer schnellen Zerstörung des gesamten Hirnschnitts. Der Vorteil der Präinkubation ist, daß alle Neuronen eines Gewebeschnitts zu jedem Zeitpunkt des Versuchs derselben Rotenonkonzentration ausgesetzt waren. In Whole-Cell Messungen wurde das Membranpotential sowie die Leitfähigkeit bestimmt. Anschließend wurde das Neuron über einen Zeitraum von 5 min mit der ATP-freien Pipettenlösung dialysiert, um durch ATP-Auswascheffekte induzierte zusätzliche K_{ATP} -Leitfähigkeiten zu beobachten. Mit Hilfe dieser Experimente konnten zwei Populationen von dopaminergen Neuronen mit deutlich unterschiedlicher Rotenonsensitivität bestimmt werden. Die Abbildung 3.8 zeigt die mit Hilfe der Hillgleichung (vgl. 2.3.5.3) beschriebenen unterschiedlichen Rotenon Dosis-Wirkungskurven.

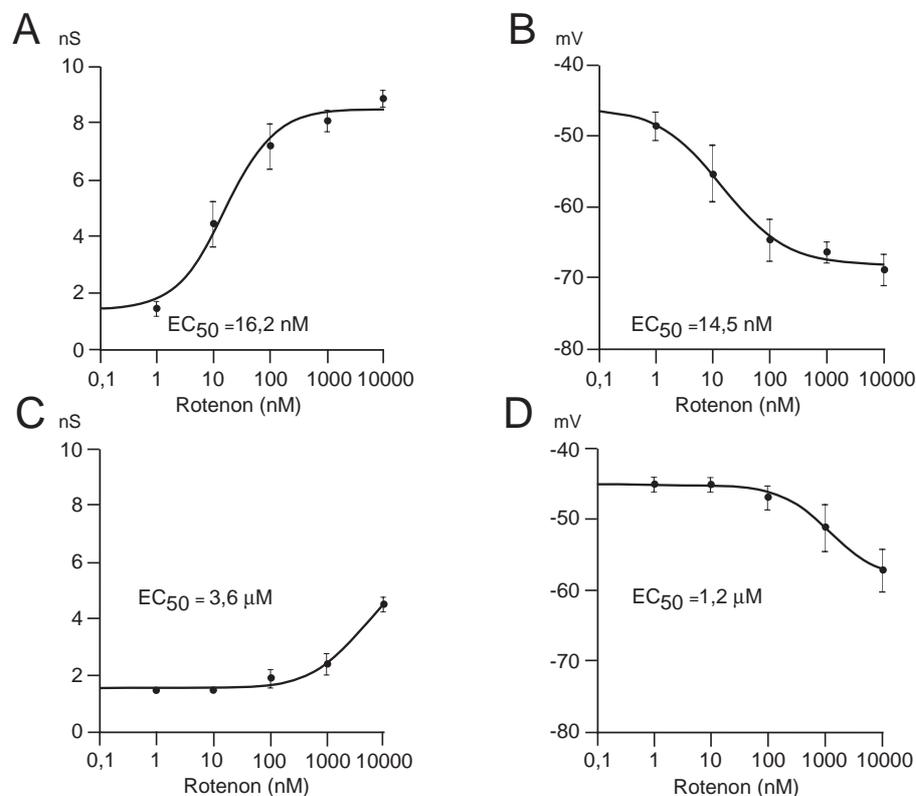


Abb. 3.11: Quantitative Analyse unterschiedlicher Rotenonsensitivitäten dopaminergere SNpc Neuronen

Die Abbildungen zeigen die mit Hilfe der Hillgleichung (siehe 2.3.5.3) beschriebenen Dosis-Wirkungskurven für Rotenon nach Präinkubation des Hirnschnitts in Konzentrationen von 1 nM bis 10 μM. Eine Population von dopaminergere SNpc Neuronen wies eine hohe Rotenonsensitivität mit einem EC₅₀-Wert von 16,2 bzw. 14,4 nM bezüglich der mittleren induzierten Leitfähigkeit (zwischen -112 und -80mV) bzw. der Hyperpolarisation auf (A/B). Eine zweite Population von dopaminergere Neuronen zeigte eine deutlich geringere Rotenonsensitivität mit einem EC₅₀ von 3,6 bzw. 1,2 μM bezüglich der induzierten Leitfähigkeit bzw. Hyperpolarisation (C/D). Alle Datenpunkte sind Mittelwerte von 6-10 Experimenten. Die vertikalen Linien geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an (SEM). Die Linien entsprechen jeweils den aus den Datenpunkten ermittelten Hill-Funktionen.

Eine Population von Neuronen wies eine hohe Rotenonsensitivität mit einem EC_{50} von 16,2 nM und einem Hill-Koeffizienten von 0,94 in Bezug auf die induzierten Leitfähigkeiten (max. 7,1 nS) auf (Abb. 3.11 A). Bei Auswertung der Hyperpolarisationen (max. -68.1 mV) ergab sich für diese Gruppe von Neuronen ein vergleichbarer EC_{50} -Wert von 14,5 nM sowie ein Hill-Koeffizient von 0,78 (Abb. 3.11 B). Eine zweite Population von dopaminergen Neuronen zeigte auch bei einer Rotenonkonzentration von 10 μ M noch keine vollständige Aktivierung dieser Kaliumleitfähigkeit (max. 3,9 nS). Aus den rotenoninduzierten Leitfähigkeiten ließ sich für diese Neuronen eine deutlich geringere Rotenonsensitivität mit einem EC_{50} von 3,6 μ M bei einem Hill-Koeffizienten von 1,0 bestimmen (Abb. 3.11 C). Die Auswertung der Membranpotentiale (max. -58.3 mV) ergab einen EC_{50} von 1,2 μ M und einen Hill-Koeffizienten von ebenfalls 1,0 (Abb. 3.11 D).

Zur weiteren Untersuchung dieser beiden, über 200fach unterschiedlichen Rotenonsensitivitäten in dopaminergen SN Neuronen erwies sich die Konzentration von 100 nM als besonders geeignet, da bei dieser Konzentration die hochaffine Subpopulation eine schon zu Beginn der Whole-Cell Messung vollständig aktivierte Kaliumleitfähigkeit sowie starke Membranhyperpolarisation zeigte, während eine zweite Population noch eine völlig normale Leitfähigkeit und Spontanaktivität aufwies. Durch Dialyse mit ATP-freier Pipettenlösung konnte aber auch in dieser Population in 100 nM Rotenon eine entsprechende Kaliumleitfähigkeit vollständig aktiviert werden.

3.3.2.3 Kombination von Rotenon-Präinkubation und scPCR

Zur Klärung der Frage, ob die unterschiedlichen Rotenonsensitivitäten der dopaminergen Neuronen mit der Expression der zwei unterschiedlichen Sulfonylurearezeptor-Isoformen (SUR1 bzw. SUR2) direkt korreliert sind, wurden Einzelzell-PCR-Experimente nach Rotenon-Präinkubation durchgeführt. Es wurde eine Konzentration von 100 nM Rotenon gewählt, da wie beschrieben, das Antwortverhalten der dopaminergen Neuronen auf diese Rotenonkonzentration deutliche Unterschiede aufwies. Sofort nach Etablierung der Whole-Cell Konfiguration wurde zur Bestimmung der Leitfähigkeit die Stromantwort auf eine Spannungsrampe von -120 bis -40 mV gemessen, und anschließend das Membranpotential bestimmt. Direkt nach diesen kurzen Messungen wurde das Zytoplasma zur Einzelzell-PCR-Analyse der K_{ATP} -Kanal Expression geerntet. Neunzehn TH und Girk2 positive Substantia nigra Neuronen wurden in diesen kombinierten Experimenten analysiert.

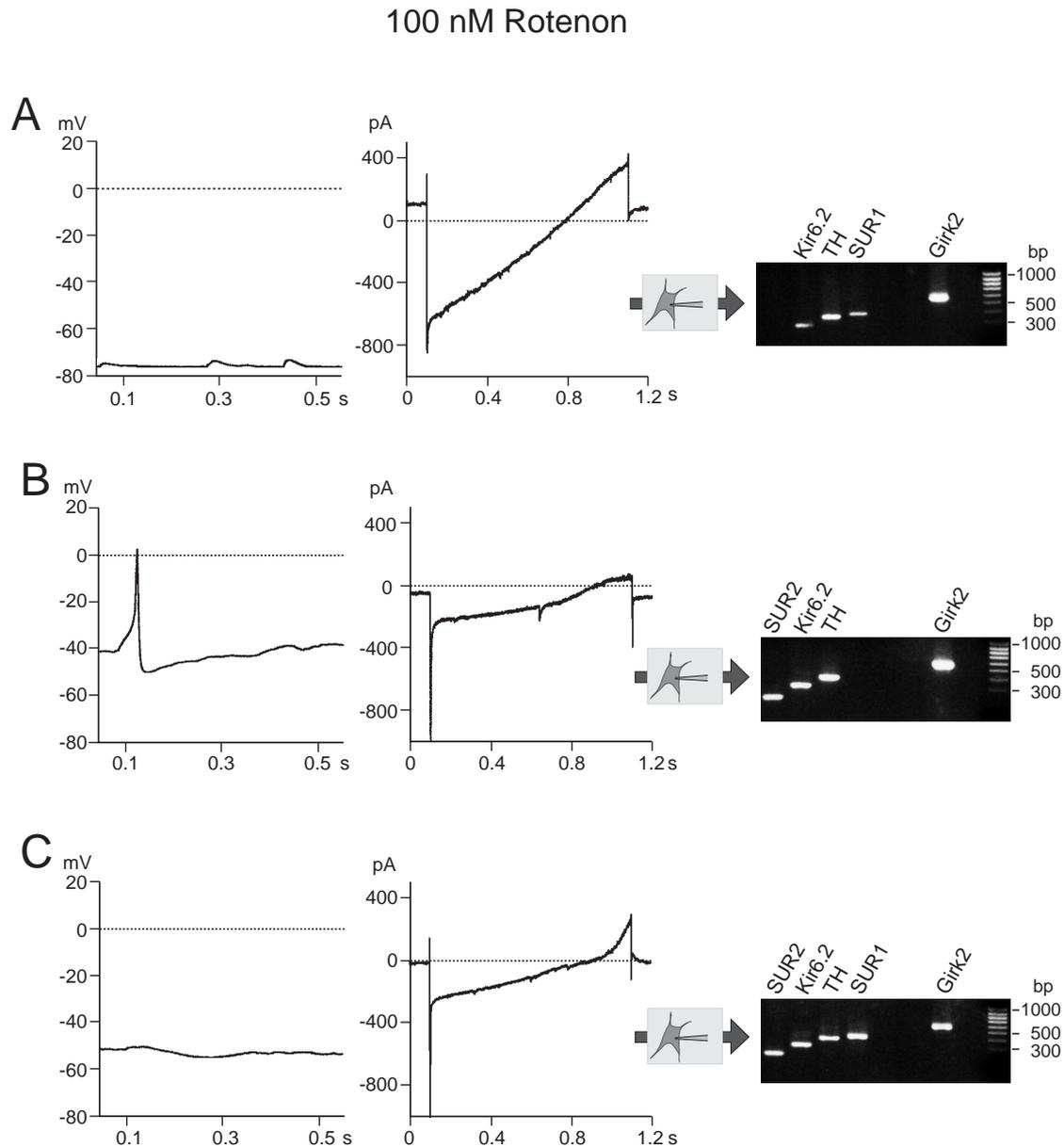


Abb. 3.12: Kombination von Rotenon-Präinkubation und Einzelzell-PCR

Die Abbildung zeigt die scPCR-Analyse für drei dopaminerge SNpc Neuronen, die nach Präinkubation des Hirnschnitts in 100 nM Rotenon deutlich unterschiedliche elektrophysiologische Eigenschaften aufwiesen. Nach Aufnahme des Membranpotentials im Current-Clamp und einer Spannungsrampe (von -120 bis -40 mV und 8 mV/100 ms) im Voltage-Clamp wurde der Zellinhalt des untersuchten Neurons in die Pipette gesaugt und in der scPCR auf Expression von K_{ATP} -Kanal Untereinheiten untersucht (gelelektrophoretische Analyse entsprechend Abb. 3.5). Das Neuron in (A) war sehr stark hyperpolarisiert, zeigte große Leitfähigkeiten und gab in der scPCR positive Signale für die K_{ATP} -Kanal Untereinheiten SUR1 und Kir6.2. Das Neuron in (B) zeigte ein elektrophysiologisches Verhalten wie unter Kontrollbedingungen und lieferte PCR-Signale für SUR2 und Kir6.2. Das Neuron in (C) zeigte bei leichter Hyperpolarisation einen Verlust der Spontanaktivität und lieferte PCR-Amplifikate von sowohl SUR1 als auch SUR2 in Kombination mit Kir6.2.

Sechs exprimierten SUR1 in Kombination mit Kir6.2, sieben Neuronen zeigten Expression von SUR2 mit Kir6.2 und weitere sechs Neuronen zeigten Koexpression von

SUR1 und SUR2 in Kombination mit Kir6.2. Die Häufigkeiten der drei unterschiedlichen SUR-Expressionsmuster stimmen gut mit der ermittelten Verteilung unter metabolischen Kontrollbedingungen überein (vgl. 3.2.2.3). Die Neuronen der Kontrollgruppe zeigten in ihrem elektrophysiologischen Verhalten keinerlei Unterschiede (mittlere Leitfähigkeiten im Bereich zwischen -112 und -80 mV: SUR1: $1,5 \pm 0,1$ nS ($n=12$); SUR2: $1,4 \pm 0,2$ nS ($n=7$); SUR1+2: $1,5 \pm 0,3$ nS ($n=4$); vgl. auch 3.2.1.1). Im Gegensatz dazu unterschieden sich die in 100 nM Rotenon präinkubierten dopaminergen SN Neuronen stark in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften. Die Abbildung 3.12 gibt für alle drei Typen von Expressionsmustern jeweils ein typisches Beispiel. Das Neuron in A zeigte eine deutliche Membranhyperpolarisation von -76 mV und eine sehr hohe Membranleitfähigkeit von 13 nS. Dieses Neuron exprimiert SUR1 und Kir6.2. Im Gegensatz dazu zeigt das Neuron in B die für dopaminergen Neuronen typische Spontanaktivität und auch die Membranleitfähigkeit war mit $1,5$ nS im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht erhöht. Die Einzelzell-PCR dieses Neurons lieferte positive Signale für SUR2- und Kir6.2-Expression. Das Neuron in C wies eine geringe Hyperpolarisation von -51 mV und eine leicht erhöhte Membranleitfähigkeit von 4 nS auf und zeigte mRNA-Koexpression von Kir6.2 und beiden SUR-Isoformen, SUR1 und SUR2.

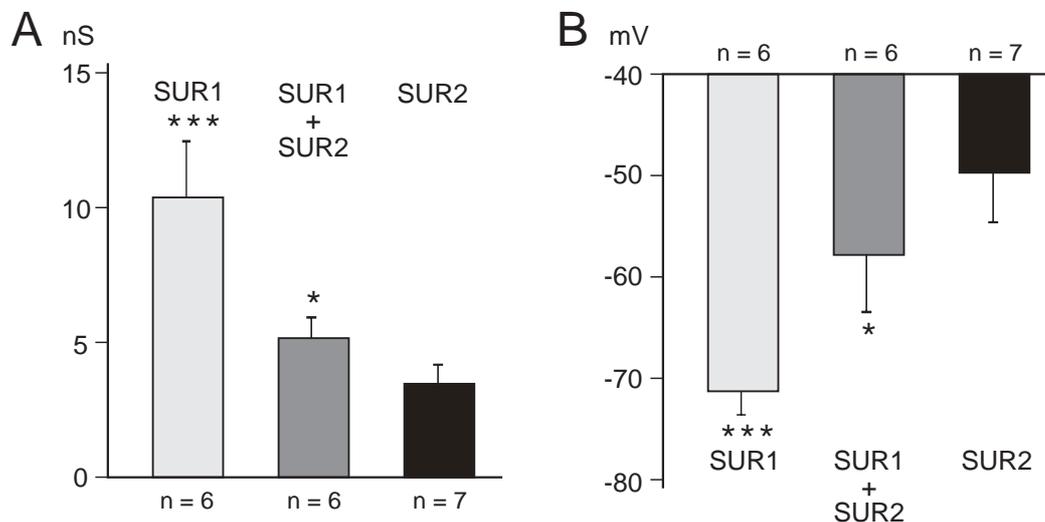


Abb. 3.13: Korrelation von metabolischer Sensitivität und alternativer SUR-Expression

Gezeigt ist die statistische Auswertung der kombinierten scPCR-Experimente nach Präinkubation des Hirnschnitts in 100 nM Rotenon (vgl. Abb. 3.12). Analysiert wurden 19 elektrophysiologisch und molekularbiologisch als dopaminerg identifizierte SN Neuronen. Das Blockdiagramm in (A) vergleicht die durchschnittlichen Leitfähigkeiten zwischen -112 und -80 mV der drei bezüglich der SUR-Isoform-Expression unterschiedlichen Populationen von dopaminergen SNpc Neuronen. In (B) sind entsprechend die durchschnittlichen Membranpotentiale aufgetragen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an (SEM). Die Sternchen (*) weisen auf die mittels t-Test ermittelten signifikanten Unterschiede der Werte der drei Populationen hin (SUR1/SUR2: $p < 0,0005$; SUR1/SUR1+2: $p < 0,05$; SUR1+2/SUR2: $p < 0,05$).

Abbildung 3.13 faßt die Korrelation von SUR-Isoform-Expression und rotenoninduzierter Membranleitfähigkeit sowie Membranhyperpolarisation zusammen. Die statistische Auswertung aller 19 in der Einzelzell-PCR analysierten Neuronen zeigt, daß die Korrelation von SUR1-Expression mit hoher Membranleitfähigkeit (A) und deutlicher Membranhyperpolarisation (B), sowie die Korrelation von SUR2-Expression mit im Vergleich zu Kontrollen unverändertem elektrophysiologischem Verhalten, eindeutig signifikant ist ($p < 0,0005$). Diejenige Neuronenpopulation, die Koexpression von SUR1 und SUR2 zeigte, lag sowohl mit dem mittleren Membranpotential als auch der mittleren Membranleitfähigkeit jeweils zwischen den entsprechenden Werten für die exklusiv SUR1- oder SUR2-exprimierenden Populationen ($p < 0,05$).

3.3.3 Tolbutamidsensitivität der rotenoninduzierten Kaliumleitfähigkeit

3.3.3.1 Tolbutamidsensitivität dopaminerg SN Neuronen

Die bisher dargestellten Ergebnisse legen nahe, daß die unterschiedliche Rotenonsensitivität von Neuronen direkt durch die Expression von unterschiedlichen K_{ATP} -Kanaltypen vermittelt wird. Die Kombinationsexperimente unter 3.3.2 zeigten eindeutig, daß eine hohe Sensitivität der dopaminergen Neuronen gegenüber einer Komplex I-Inhibition direkt mit der Expression von SUR1 und Kir6.2 korreliert ist. Der aus diesen Untereinheiten gebildete K_{ATP} -Kanal zeigt in heterologen Untersuchungen eine hohe Affinität für Sulfonylharnstoffe (Inagaki et al., 1995a). Die Expression von Kir6.2 mit der Isoform SUR2B ist mit einer ca. 200fach geringeren Rotenonsensitivität korreliert. Der aus diesen Untereinheiten gebildete K_{ATP} -Kanal zeigt in heterologen Untersuchungen eine deutlich niedrigere Sulfonylharnstoffsensitivität (Isomoto et al., 1996b). Gelten diese Unterschiede nicht nur für die rekombinanten Kanäle, sondern auch für native neuronale K_{ATP} -Kanäle, müßten diese ebenfalls unterschiedliche Tolbutamidsensitivitäten aufweisen (vgl. Tab 3.1).

Einen Hinweis auf die Existenz von mindestens zwei Subpopulationen von rotenonsensitiven dopaminergen Neuronen mit unterschiedlichen Affinitäten für den K_{ATP} -Kanalblocker Tolbutamid lieferten die Ergebnisse von Präinkubationsexperimenten, in denen sowohl Rotenon als auch Tolbutamid in unterschiedlichen Konzentrationen in die Perfusionslösung gegeben wurde. Nach Präinkubation mit 100 nM Rotenon und gleichzeitig 100 μ M Tolbutamid zeigten alle untersuchten Neuronen eine normale Aktivität und eine den Kontrollzellen entsprechende mittlere Leitfähigkeit. Dies legt den

Schluß nahe, daß Rotenon in dieser Konzentration keine Kaliumleitfähigkeit mit einer geringen Tolbutamidsensitivität aktivieren konnte. Nach Präinkubation des Hirnschnitts mit 10 μM Rotenon und 100 μM Tolbutamid wiesen die Neuronen dagegen eine durchschnittlich erhöhte Leitfähigkeit auf. In dieser hohen Konzentration kann Rotenon also eine Kaliumleitfähigkeit mit deutlich niedrigerer Tolbutamidaffinität aktivieren, die entsprechend in Anwesenheit von 100 μM Tolbutamid nur teilweise blockiert war. Tabelle 3.2 faßt die Ergebnisse dieser Experimente zusammen.

Präinkubationslösung:	Kontrolle; ACSF	100 nM Rotenon	100 nM Rotenon + 100 μM Tolbutamid	10 μM Rotenon	10 μM Rotenon + 100 μM Tolbutamid
Leitfähigkeit [nS]	1,5 \pm 0,1 (n=12)	4,5 \pm 0,2 (n=8)	1,6 \pm 0,1 (n=10)	7,7 \pm 0,9 (n=8)	2,8 \pm 0,2 (n=8)

Tab. 3.2: Leitfähigkeiten dopaminerg SN Neuronen nach Präinkubation mit Rotenon und Tolbutamid

Die Tabelle faßt die Präinkubationsexperimente mit unterschiedlichen Konzentrationen an Rotenon und Tolbutamid zusammen. Für insgesamt 46 elektrophysiologisch als dopaminerg identifizierte SNpc Neuronen wurde die mittlere Leitfähigkeit zwischen -112 und -80 mV bestimmt (Erläuterungen siehe Text).

Die unterschiedlichen Tolbutamidsensitivitäten der SN Neuronen wurden von Dr. Jochen Röper quantitativ analysiert. Zur vollständigen Aktivierung der K_{ATP} -Kanäle in allen Populationen von dopaminergen Neuronen wurde eine Präinkubation mit 100 nM Rotenon und eine anschließende Dialyse von mind. 5 min Dauer mit ATP-freier Pipettenlösung gewählt. Nach vollständiger Kanalaktivierung wurde mittels einer Applikationspipette Tolbutamid in aufsteigenden Konzentrationen von 100 nM bis zu 1 mM auf das zu untersuchende Neuron appliziert. Aus den Stromamplituden bei -50 mV wurde gemäß 2.3.5.3 jeweils der EC_{50} -Wert und der Hill-Koeffizient ermittelt.

Auch in diesen Experimenten zeigten die dopaminergen SN Neuronen wieder ein heterogenes Verhalten. Gemäß ihrer unterschiedlichen Affinität für Tolbutamid ließen sich drei Populationen von dopaminergen Neuronen unterscheiden (Abb. 3.14; vgl. auch Abb. 3.15). Neun von 23 analysierten Neuronen wiesen hohe Tolbutamidsensitivitäten mit einem mittleren IC_{50} -Wert von 8,8 \pm 1,0 μM und einem mittleren Hill-Koeffizienten von 1,2 \pm 0,1 auf. Sechs dopaminerge Neuronen zeigten deutlich niedrigere Tolbutamidsensitivitäten mit einem mittleren IC_{50} -Wert von 60,6 \pm 5,1 μM bei einem mittleren Hill-Koeffizienten von 1,0 \pm 0,1. Eine dritte Population von acht dopaminergen Neuronen zeigte mittlere Tolbutamidsensitivitäten. Diese wurde durch eine einzige Hillgleichung mit einem mittleren IC_{50} von 27,8 \pm 1,9 μM und einem mittleren Hill-Koeffizienten von 1,1 \pm 0,1 besser beschrieben, als durch die Summe zweier

Hillgleichungen mit jeweils einem hohen und einem niedrigen IC_{50} -Wert. Diese Ergebnisse liefern einen weiteren Beleg dafür, daß die dopaminergen Neuronen tatsächlich mindestens zwei Typen von K_{ATP} -Kanälen mit unterschiedlichen Rotenon- und Sulfonylharnstoffsensitivitäten funktionell exprimieren.

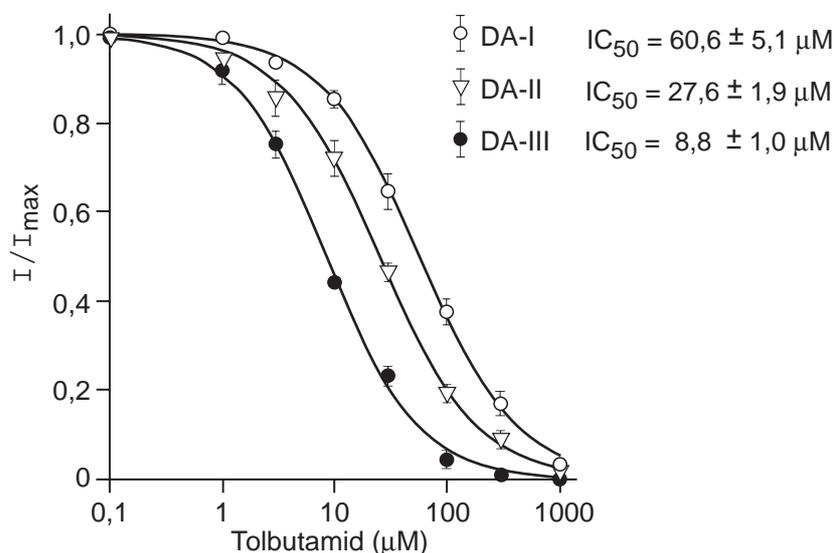


Abb. 3.14: Quantitative Analyse der Tolbutamidsensitivitäten der K_{ATP} -Kanäle in dopaminergen SNpc Neuronen

Nach vollständiger Aktivierung aller ATP-sensitiven Ströme durch Rotenon-Präinkubation und Auswaschen von ATP wurden diese durch Tolbutamidapplikation in steigenden Konzentrationen (100 nM bis 1 mM) blockiert. Von 23 elektrophysiologisch als dopaminerg identifizierten SNpc Neuronen wurden auf diese Weise die Dosis-Wirkungskurven bestimmt (vgl. 2.3.5.3; $p_0=I/I_{max}$, bei -50 mV). Neun Neuronen wiesen eine hohe Affinität für Tolbutamid auf (DA-III), sechs zeigten eine deutliche geringere Sensitivität (DA-I) und in acht Neuronen wurde eine Tolbutamidsensitivität ermittelt, die zwischen diesen beiden Affinitäten lag (DA-II). Alle Datenpunkte sind Mittelwerte von 6-9 unabhängigen Experimenten. Die vertikalen Linien geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an (SEM). Die Linien entsprechen jeweils den aus den Datenpunkten ermittelten Hill-Funktionen.

3.3.3.2 Tolbutamidsensitivität GABAerger SNpr Neuronen

Nach den Ergebnissen der Einzelzell-PCR, und im Einklang mit Befunden anderer Arbeitsgruppen, exprimieren GABAerge Neuronen der SNpr ebenfalls funktionelle K_{ATP} -Kanäle (Schwanstecher und Panten, 1993; Stanford und Lacey, 1996). Von Dr. Jochen Röper durchgeführte Präinkubationsexperimente mit 100 nM Rotenon zeigten in allen analysierten SNpr Neuronen schon zu Beginn der Whole-Cell Messung die vollständige Aktivierung einer tolbutamidsensitiven Kaliumleitfähigkeit. Im Gegensatz zu den dopaminergen Neuronen und im Einklang mit den scPCR-Ergebnissen wurde für alle acht analysierten GABAergen SNpr Neuronen eine gleich hohe Tolbutamidsensitivität mit einem mittleren IC_{50} -Wert von $8,7 \pm 1,7 \mu M$ und einem mittleren Hill-Koeffizienten von

1,1±0,1 ermittelt. Dieser Wert entspricht dem IC₅₀-Wert derjenigen Subpopulation von dopaminergen Neuronen mit der höchsten Affinität für Tolbutamid (Abb. 3.15).

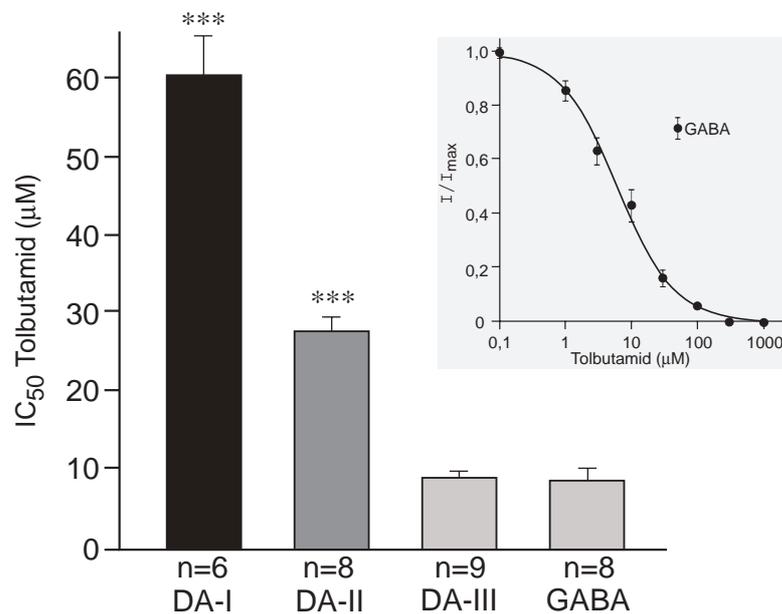


Abb. 3.15: SN Neuronen exprimieren K_{ATP}-Kanäle mit unterschiedlichen Tolbutamid-sensitivitäten

Das Blockdiagramm zeigt die mittleren IC₅₀-Werte für Tolbutamid der drei unterschiedlichen Populationen von dopaminergen SNpc Neuronen (DA-I, DA-II, DA-III, vgl. Abb.3.14) und für die homogene Population der GABAergen SNpr Neuronen (GABA). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Mittelwerte wider. Die Sternchen (*) zeigen die Signifikanz der unterschiedlichen Tolbutamidsensitivitäten von DA-I und DA-II im Vergleich zu DA-III oder GABA an p<0,0005). Die Einblendung gibt die mittlere Dosis-Wirkungskurve von acht GABAergen SNpr Neuronen wieder (Darstellung entsprechend Abb. 3.14).

Aufgrund der homogenen Expression von K_{ATP}-Kanal Untereinheiten in GABAergen SNpr Neuronen ist es sehr wahrscheinlich, daß die rotenoninduzierte Kaliumleitfähigkeit mit hoher Tolbutamidsensitivität in diesen Neuronen, sowie in der entsprechenden Subpopulation von dopaminergen Neuronen (DA-III) direkt durch K_{ATP}-Kanäle vermittelt wird, die aus den Untereinheiten SUR1 und Kir6.2 gebildet werden. Im Gegensatz dazu führt die Expression von SUR2 und Kir6.2 in einer zweiten Population von dopaminergen Neuronen (DA-I) sehr wahrscheinlich zur Bildung von funktionellen K_{ATP}-Kanälen, die eine deutlich geringere Sensitivität für Tolbutamid sowie metabolische Inhibition aufweisen. Die Implikationen der Koexpression beider SUR-Isoformen wird unter 4.3.2 diskutiert.

3.4 Charakterisierung von dopaminergen SN Neuronen in *weaver*-Mäusen

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag in der elektrophysiologischen und molekularbiologischen Charakterisierung der dopaminergen Neuronen von 14 Tage alten *weaver*-Mäusen. Wie unter 1.2.1 näher erläutert, liegt dem *weaver*-Phänotyp eine Punktmutation (G→A) in der Porenregion des *Girk2*-Gens zugrunde, welche die Eigenschaften funktioneller *Girk2*-Kanäle entscheidend zu ändern vermag. Da der elektrophysiologische Phänotyp der dopaminergen *weaver* Neuronen noch nicht beschrieben war, wurden diese elektrophysiologisch charakterisiert. Da die *weaver*-Maus, wie beschrieben, ein Tiermodell für die differentielle Vulnerabilität dopaminerges SN Neuronen darstellt, wurde außerdem auf Einzelzellebene untersucht, ob ein molekulares Korrelat für das selektive Überleben einer Teilpopulation der dopaminergen Neuronen definiert werden kann. Sollte es gelingen, Kandidatengene zu identifizieren, könnte dies möglicherweise den Zugang zu einem besseren Verständnis der generellen Mechanismen selektiver Neurodegeneration liefern.

3.4.1 Genotypisierung der *weaver*-Mäuse

Da heterozygote *weaver*-Mäuse keinen erkennbaren Phänotyp aufweisen, wurde der Genotyp zur Differenzierung zwischen homozygot gesunden und heterozygoten Tieren des *weaver*-Stamms molekularbiologisch bestimmt. Nach genomischer DNA-Isolierung und PCR-Amplifikation eines geeigneten Teilbereichs des *Girk2*-Gens wurde die PCR-Amplifikate direkt sequenziert (vgl. 2.2.4 und 2.2.7.4). Abbildung 3.16 zeigt die Fluoreszenzauswertung dreier Sequenzierreaktionen. Tier A liefert an Position 953 ein eindeutiges Signal für G, ist also gesund, Tier B zeigt ein eindeutiges Signal für A, ist also homozygot krank. Tier C hingegen gibt sowohl Signal für A als auch für G, trägt also beide Allele und ist demnach heterozygot für die *weaver*-Mutation. Alle entsprechenden Sequenzierungen lieferten mit wenigen Ausnahmen vergleichbare, eindeutig unterscheidbare Fluoreszenzsignale, so daß die molekularbiologische Bestimmung des *weaver*-Genotyps für die im Rahmen dieser Arbeit analysierten Tiere des *weaver*-Hybridstammes eindeutig war.

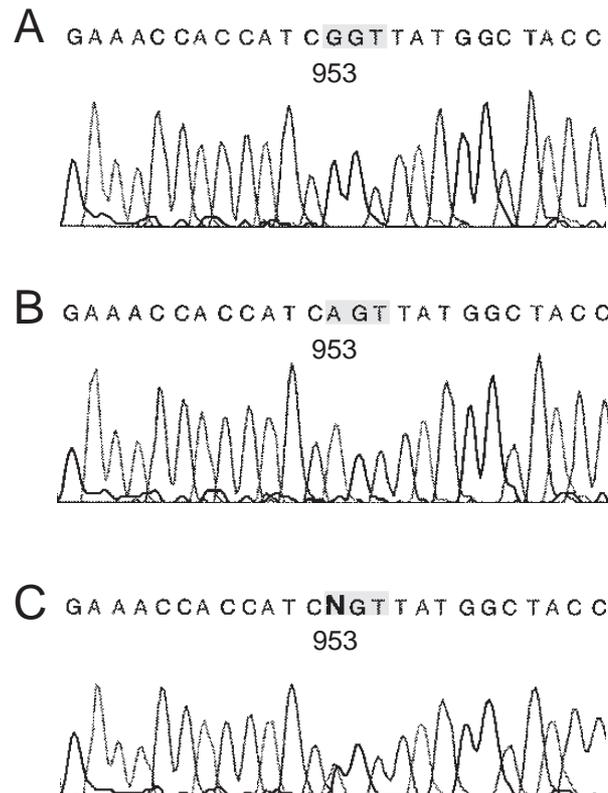


Abb. 3.16: Genotypisierung der *weaver*-Mäuse

Gezeigt sind Ausschnitte von drei Sequenzanalysen genomischer *Girk2*-Teilbereiche. Die genomische DNA stammte jeweils aus Mausschwanz-Biopsien und wurde nach PCR-Amplifikation einer Teilsequenz des 5. Exons des *Girk2*-Gens (Nukleotid 644 bis 1365 der codierenden Sequenz) sequenziert. Der *weaver*-Phänotyp wird durch eine Punktmutation an Position 953 (G→A) des *Girk2*-Gens bewirkt. Das Tier in (A) zeigt an Position 953 ein eindeutiges Fluoreszenzsignal für G, ist also nicht von der Mutation betroffen. Das Tier in (B) dagegen weist an der gleichen Position ein eindeutiges Signal für A auf, ist also homozygot für die *weaver*-Mutation. In der dritten Sequenz in (C) kann dagegen an Position 953 (N) sowohl ein Fluoreszenzsignal für G als auch für A identifiziert werden. Dieses Tier trägt also ein gesundes und ein mutiertes *Girk2*-Allel. Grau unterlegt ist jeweils das Basentriplett, das für Glycin bzw. Serin (in *weaver*) kodiert.

3.4.2 Tyrosinhydroxylase Immunocytochemie

Für die elektrophysiologischen und die molekularbiologischen Untersuchungen wurden Tiere im Alter von 13-15 Tagen ausgewählt. In homozygoten *weaver*-Mäusen setzt die Degeneration der dopaminergen Neuronen der Substantia nigra zu diesem Zeitpunkt massiv ein; es sind bereits ca. 30% der dopaminergen Neuronen degeneriert. Um diesen Verlust zu belegen, wurden Tyrosinhydroxylase Antikörperfärbungen koronarer Mittelhirnschnitte von gesunden und homozygot kranken 15 Tage alten *weaver*-Mäusen durchgeführt und diese mit entsprechenden Färbungen von adulten Geschwistertieren (90 Tage) verglichen. Abbildung 3.17 zeigt die TH-Antikörperfärbungen.

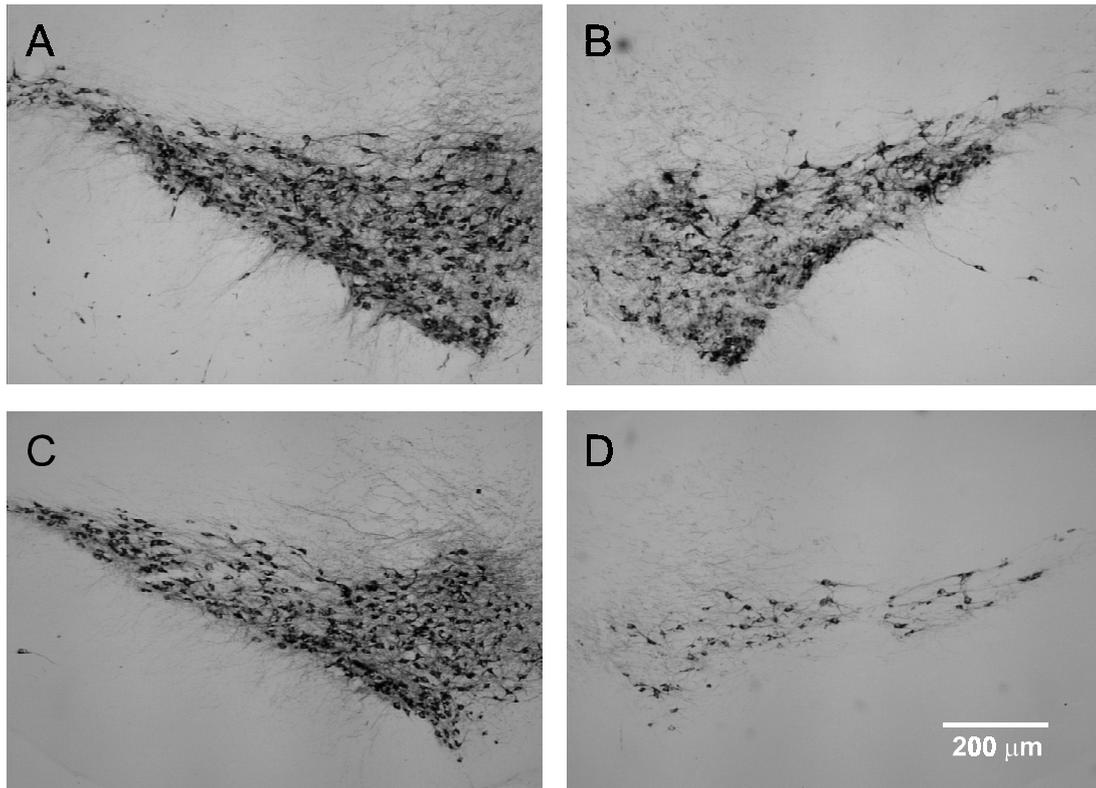


Abb. 3.17: Tyrosinhydroxylase Immunocytochemie von Mäusen des *weaver*-Stamms

Gezeigt sind DAB-Färbungen koronarer Mittelhirnschnitte vergleichbarer Ebenen aus vier Mäusen des *weaver*-Stamms nach Tyrosinhydroxylase Antikörperreaktion (vgl. 2.4). Die auf der linken Bildseite abgebildeten Tiere waren jeweils genotypisch als gesund identifiziert (A/C), die auf der rechten Bildseite abgebildeten Tiere waren homozygot von der *weaver*-Mutation betroffen (B/D). Die obere Reihe zeigt die DAB-Färbungen für zwei 14 Tage alte Geschwistertiere (A/B), die untere Reihe entsprechend die Färbungen von zwei adulten (90 Tage alten) Geschwistertieren (C/D). Die Reduktion der Anzahl der gefärbten Neuronen in der SNpc Region ist bereits im 14 Tage alten *weaver* Tier (B) zu erkennen und ist im adulten *weaver*-Tier (D) im Vergleich zu den gesunden Geschwistertieren (A/C) sehr stark ausgeprägt.

Im adulten gesunden Tier des *weaver*-Stammes (C) erkennt man deutlich das typische Band der großen TH positiven dopaminergen Neuronen der SNpc, während im entsprechend homozygot erkrankten *weaver*-Geschwistertier (D) kaum noch TH positive Neuronen gefärbt wurden. Im Vergleich dazu sind in der 14 Tage alten erkrankten *weaver*-Maus (B) noch deutlich mehr TH positive Neuronen zu erkennen. Dennoch ist auch hier im Vergleich zum entsprechend gesunden Geschwistertier (A) eine eindeutige Reduktion dieser Neuronen festzustellen.

3.4.3 Elektrophysiologische Charakterisierung der dopaminergen *wv* Neuronen

3.4.3.1 Elektrophysiologische Grundcharakterisierung

Im Vergleich zu gesunden Geschwistertieren (+/+) zeigten die dopaminergen Neuronen von homozygoten *weaver*-Mäusen (*wv/wv*) deutliche Unterschiede in ihrem elektrophysiologischen Verhalten. Abbildung 3.18 A/B zeigt diese Unterschiede in der Current-Clamp Messung.

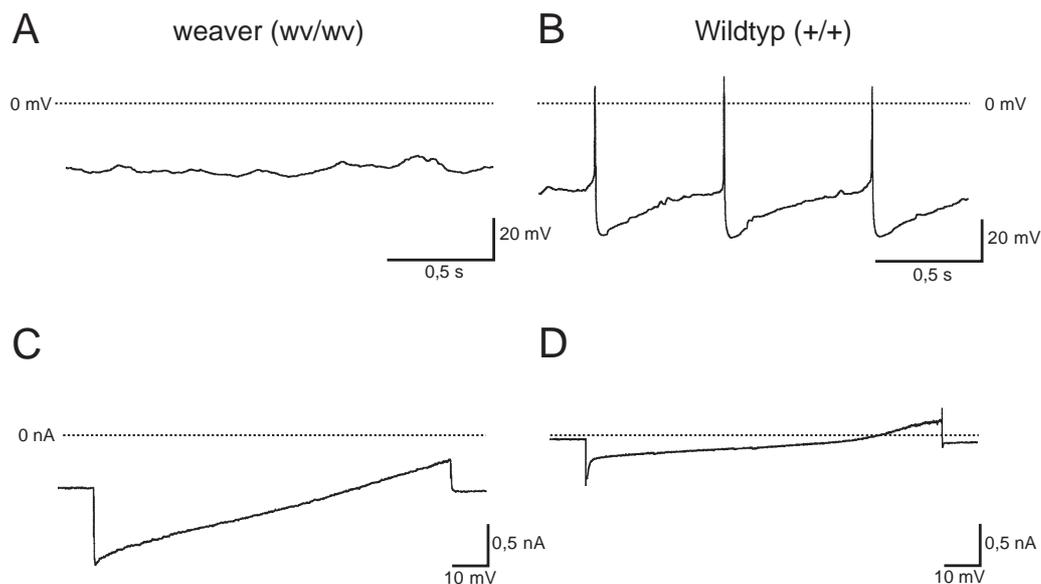


Abb. 3.18: Elektrophysiologische Charakterisierung der dopaminergen *weaver* Neuronen

Gezeigt sind das Spontanverhalten (Current-Clamp, A/B) und die Stromantworten auf Spannungsrampen von -120 bis -40 mV (Voltage-Clamp, C/D) für jeweils ein dopaminerges SN Neuron einer erkrankten *weaver*-Maus (*wv/wv*) und eines gesunden Geschwistertiers (+/+). Man erkennt im *weaver* Neuron den Verlust der normalen Spontanaktivität bei einer deutlich erhöhten Leitfähigkeit (A/C).

Während die SN Neuronen in gesunden Tieren, ebenso wie in C57Bl/6J Mäusen, spontanaktiv waren (vgl. auch Abb. 3.2 A), zeigten die entsprechenden Neuronen in *weaver*-Mäusen keinerlei Spontanaktivität und wiesen eine tonische Membrandepolarisation auf. Spannungsrampen von -120 bis -40 mV zeigten in *weaver* Neuronen im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich höhere Leitfähigkeit (Abb. 3.18 C/D). Heterozygot betroffene *weaver*-Mäuse zeigten ebenfalls eine signifikant erhöhte mittlere Leitfähigkeit, aber nur eine leichte Depolarisation im Vergleich zum Wildtyp, die dennoch in ca. 70% der dopaminergen Neuronen zu einem Verlust der Spontanaktivität führte.

Tabelle 3.3 faßt die elektrophysiologischen Ergebnisse für alle 40 analysierten *weaver* Neuronen (*wv/wv*) sowie für 29 Neuronen von heterozygoten (*wv/+*) bzw. 15 Neuronen gesunder Geschwistertiere (*+/+*) zusammen.

	<i>weaver</i> (<i>wv/wv</i>) n=40	Hetero (<i>wv/+</i>) n=29	Wildtyp (<i>+/+</i>) n=15
Spontanaktivität	0%	30%	100%
Membranpot. [mV]	-34±1,2	-38,0±2,8	-43,5±0,9
Leitfähigkeit [nS]	6,7±0,9	5,2±0,6	1,6±0,2

Tab. 3.3: Elektrophysiologische Eigenschaften von dopaminergen SNpc Neuronen des *weaver*-Stamms

Zusammengestellt ist der Prozentsatz an spontanaktiven SN Neuronen, das mittlere Membranpotential und die mittlere Leitfähigkeit im Potentialbereich von -112 bis -80 mV für 40 analysierte *weaver* Neuronen, 29 Neuronen aus heterozygoten Tieren sowie 15 Neuronen gesunder Tiere des *weaver*-Stamms.

Tabelle 3.4 zeigt, daß die dopaminergen Neuronen von gesunden Tieren des *weaver*-Stamms in ihrer Spontanaktivität keine signifikanten Unterschiede zu denen von C57Bl/6J-Tieren aufwiesen. In dopaminergen Neuronen von heterozygoten Tieren war dagegen die Schwelle und die maximale Nachhyperpolarisation (AHP) der Aktionspotentiale signifikant ($p < 0,05$) erniedrigt. Da der elektrophysiologische Phänotyp der heterozygoten *weaver*-Mäuse nur leicht geändert erschien, wurden für die eingehendere Untersuchung des Phänotyps der dopaminergen *weaver* Neuronen nur noch homozygot erkrankte (*wv/wv*) mit gesunden Wildtyp-Tieren (*+/+*) des *weaver*-Stamms verglichen.

	Hetero (<i>wv/+</i>) n=10	Wildtyp (<i>+/+</i>) n=15	C57Bl/6J n=40
Schwelle [mV]	-31,4±0,9	-36,6±0,8	-36,3±0,8
Dauer [ms]	7,0±0,3	7,5±0,4	8,0±0,5
max. AHP [mV]	-53,8±2,5	-58,5±1,3	-57,2±1,1
Frequenz [Hz]	1,5±0,4	1,4±0,7	1,8±0,1

Tab. 3.4: Aktionspotentiale und Spontanaktivität von dopaminergen SNpc Neuronen

Zusammengestellt sind die durchschnittliche Schwelle, die Dauer und die maximale Nachhyperpolarisation der Aktionspotentiale sowie die mittlere Spikefrequenz von 10 bzw. 15 spontanaktiven dopaminergen SNpc Neuronen aus heterozygoten bzw. gesunden Tieren des *weaver* Stamms im Vergleich mit 40 entsprechend analysierten Neuronen aus C57Bl/6J-Tieren.

3.4.3.2 GTP γ S-Effekt

Zur Untersuchung der Frage, ob in den *weaver* Neuronen noch ein Girk-Kanal vermittelter Strom durch G-Proteine aktiviert werden kann, wurde der intrazellulären Pipettenlösung 100 μ M GTP γ S zugesetzt und das jeweilige Neuron nach Etablierung der Whole-Cell Konfiguration für 5 min dialysiert. GTP γ S aktiviert wie GTP direkt G-Proteine, kann aber nicht von der G α -Untereinheit hydrolysiert werden, so daß keine Inaktivierung einmal aktivierter G-Proteine stattfindet. Ein Effekt von GTP γ S wurde durch fortlaufende Messung von Spannungsrampen von -120 bis -40 mV beobachtet. Abbildung 3.19 zeigt jeweils für ein *weaver* und ein Wildtyp dopaminerges Neuron die Stromantworten auf die Spannungsrampe zu Beginn der Messung und nach 5 min Whole-Cell Dialyse.

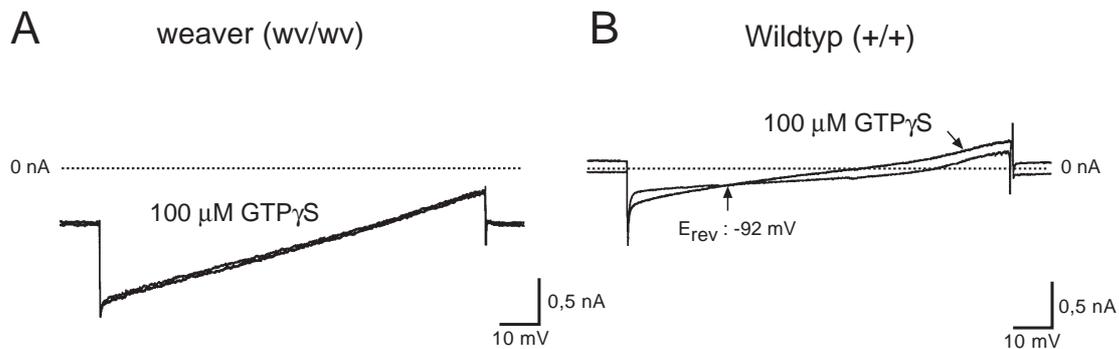


Abb. 3.19: GTP γ S-Effekt auf dopaminerge SNpc Neuronen

Gezeigt sind die Stromantworten auf Spannungsrampen für jeweils ein dopaminerges *weaver* und Wildtyp Neuron vor und nach intrazellulärer Dialyse mit 100 μ M GTP γ S. Das Wildtyp Neuron zeigte nach GTP γ S-Dialyse eine typische zusätzliche Leitfähigkeit mit einem Umkehrpotential von -92 mV (B), während im *weaver* Neuron keine zusätzliche Leitfähigkeit aktiviert wurde (A).

In allen getesteten Wildtyp Neuronen (n=6) aktivierte 100 μ M GTP γ S, wie erwartet, eine zusätzliche mittlere Leitfähigkeit von $1,2 \pm 0,2$ nS, die ein für einen Kaliumstrom charakteristisches mittleres Umkehrpotential von $92,7 \pm 2,2$ mV hatte (Abb. 3.19 B). In den entsprechenden *weaver* Neuronen dagegen (n=7) konnte durch GTP γ S-Dialyse keine zusätzliche Leitfähigkeit aktiviert werden (vgl. Abb. 3.19 A). Dies könnte zum einen bedeuten, daß in den dopaminergen *weaver* Neuronen keine funktionellen Girk-Kanäle mehr exprimiert werden. Andererseits könnten funktionelle wvGirk2-Kanäle ihre G-Protein vermittelte Aktivierbarkeit verloren haben, oder aber alle wvGirk2 vermittelten

Kanäle sind schon vollständig aktiviert, so daß GTP γ S keine zusätzliche Aktivierung vermitteln kann.

3.4.3.3 QX314-Effekt

Aus den bisher gezeigten Befunden kann noch keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob die deutlich geänderten elektrophysiologischen Eigenschaften der dopaminergen *weaver* Neuronen durch einen totalen Verlust funktioneller Girik2 Kanäle bewirkt werden (loss-of-function), oder aber ob ein funktioneller mutierter *wv*Girik2-Kanal mit deutlich veränderten Eigenschaften den beschriebenen elektrophysiologischen *weaver*-Phänotyp verursacht (gain-of-function). Zur Untersuchung dieser Frage wurde die Substanz QX314 auf dopaminerge *weaver*-SN Neuronen appliziert. QX314 (Calbiochem, Bad Soden, D) ist ein unspezifischer Kationenkanalblocker. Bei interner Applikation werden spannungsgesteuerte Natriumkanäle und der nikotinische Acetylcholinrezeptor am effektivsten blockiert (Kofuji et al., 1996). Girik Ströme können von hohen intrazellulären Konzentrationen an QX314 ebenfalls blockiert werden (Andrade, 1991). Ebenso kann der in dopaminergen Neuronen vorkommende I_h Strom von sehr hohen internen QX314 Konzentrationen (10 mM) blockiert werden (Perkins und Wong, 1995). Eine Sensitivität gegenüber extern appliziertem QX314 in mikromolaren Konzentrationen ist dagegen typisch für rekombinante homo- und heteromere *wv*Girik2-Kanäle (Kofuji et al., 1996, Slesinger et al 1996). Dies wurde ebenfalls für cerebelläre *weaver* Neuronen am Slice beschrieben (Rossi et al., 1998).

Wie in Abbildung 3.20 A gezeigt, konnte in den dopaminergen *wv*Neuronen tatsächlich nach externer Applikation von 100 μ M QX314 ein Strom mit einer mittleren Leitfähigkeit von $3,6 \pm 3,5$ nS blockiert werden (n=8). Spannungsrampen von -120 bis 0 mV vor und nach Applikation von QX314 zeigten, daß der Strom ein mittleres Umkehrpotential von $-24,2 \pm 3,5$ mV besaß (n=8). Dies weist darauf hin, daß ein Mischstrom blockiert wurde, der von mehr als einer Ionenart getragen ist. Die Leitfähigkeit zwischen -112 und -80 mV verringerte sich nach QX314 Applikation auf durchschnittlich $3,1 \pm 0,5$ nS und das Membranpotential wies einen Wert von $-51,3 \pm 2,7$ mV auf (n=14). Im Gegensatz dazu zeigten Kontrollmessungen an dopaminerge SN Neuronen aus Wildtyp-Tieren (n=6), daß extern appliziertes QX314 (100 μ M) hier ohne Effekt blieb (Abb. 3.20 B).

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die dopaminergen Neuronen in *weaver*-Mäusen einen funktionellen, aktivierten ω Girk2-Kanal exprimieren, der seine Kaliumselektivität verloren hat und durch G-Proteine zumindest nicht zusätzlich aktiviert werden kann. Durch die Applikation von QX314 wurden ω Girk2 vermittelte Kanäle blockiert, so daß die Leitfähigkeit verringert und die Depolarisation dieser Neuronen aufgehoben ist.

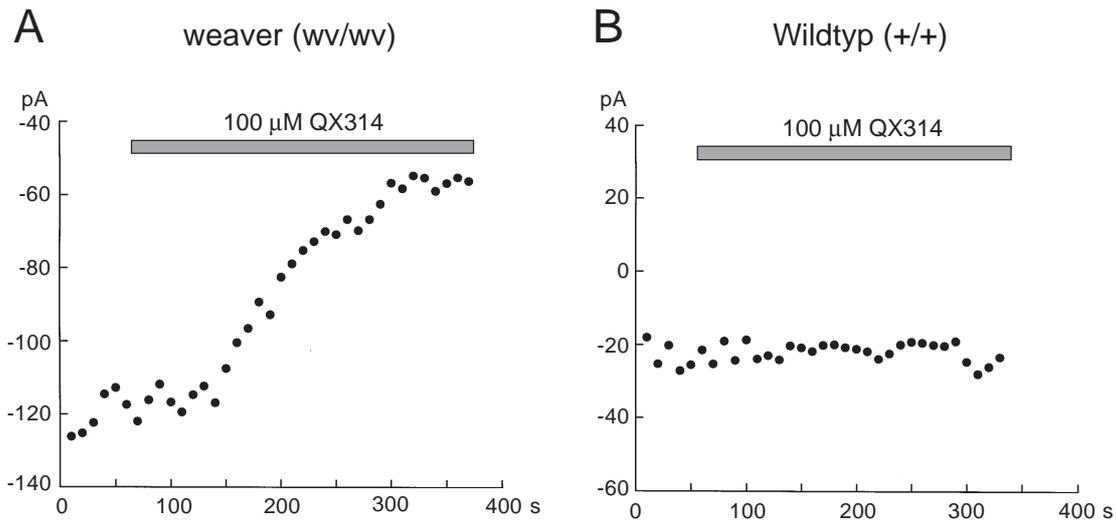


Abb. 3.20: QX314-Effekt auf dopaminerge SNpc Neuronen

Gezeigt sind die Stromantworten auf Spannungspulse bei -50 mV im Abstand von 10 s für jeweils ein dopaminerges *weaver* und Wildtyp Neuron bei externer Applikation von $100 \mu\text{M}$ QX314. Während dieser Kationenkanalblocker in *weaver* Neuronen einen Einwärtsstrom von ca. 70 pA blockiert (A), zeigt die entsprechende Applikation auf das Wildtyp Neuron keinen vergleichbaren Effekt (B). Die jeweilige Applikationsdauer wird durch die horizontalen Balken angezeigt.

3.4.3.4 Tolbutamid-Effekt

Nach Applikation von QX314 zeigten die dopaminergen Neuronen in *weaver*-Mäusen immer noch eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte mittlere Leitfähigkeit. Außerdem wiesen sie bei ω Girk2-Kanal Inhibition hyperpolarisierte Membranpotentiale auf. Dieser Befund weist darauf hin, daß noch eine weitere hyperpolarisierende Leitfähigkeit zu dem veränderten elektrophysiologischen Phänotyp der dopaminergen ω Neuronen beiträgt.

Diese zusätzliche Leitfähigkeit könnte z.B. von K_{ATP} -Kanälen vermittelt werden. Zum einen wurde im ersten Teil dieser Arbeit gezeigt, daß mindestens zwei Typen dieser Kanäle in dopaminergen Neuronen funktionell exprimiert werden, zum anderen können K_{ATP} -Kanäle in dopaminergen SN Neuronen durch hohe Konzentrationen an intrazellulären Natriumionen aktiviert werden (Seutin et al., 1996). Um zu testen, ob in den

dopaminergen *weaver* Neuronen sulfonylharnstoffsensitive Kaliumleitfähigkeiten tonisch aktiviert sind, wurde Tolbutamid in einer Konzentration von 100 μM appliziert. Tolbutamid blockierte eine weitere kaliumselektive Leitfähigkeit von $1,8 \pm 0,3 \text{ nS}$ mit einem mittleren Umkehrpotential von $-95,9 \pm 2,9 \text{ mV}$ ($n=9$) in den dopaminergen *weaver* Neuronen. Tatsächlich sind in diesen Neuronen also im Gegensatz zum Wildtyp unter metabolischen Kontrollbedingungen K_{ATP} -Kanäle bereits aktiviert.

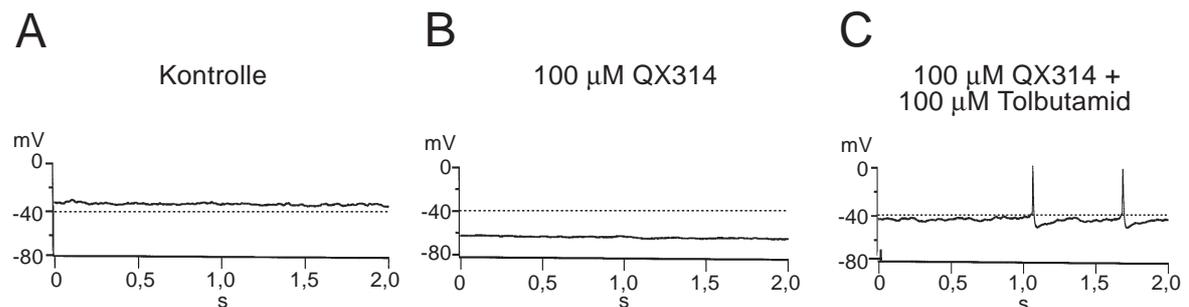


Abb. 3.21: Tolbutamid-Effekt auf dopaminerge SNpc Neuronen in *weaver*-Mäusen

Die Abbildung zeigt die Änderung des Membranpotentials eines dopaminergen *weaver* SNpc Neurons nach Applikation von QX314 und nach Koapplikation von QX314 und Tolbutamid. Die gestrichelte horizontale Linie gibt jeweils das durchschnittliche Membranpotential in dopaminergen Neuronen gesunder Tiere an. Das analysierte Neuron zeigt unter Kontrollbedingungen (A) ein im Vergleich zu Neuronen aus Wildtyp-Tieren leicht depolarisiertes Membranpotential und keine Spontanaktivität. Applikation von 100 μM QX314 induziert eine Hyperpolarisation in diesem Neuron (B). Bei zusätzlicher Koapplikation von 100 μM Tolbutamid zeigt das Neuron wieder die typische Spontanaktivität und ein dem Wildtyp vergleichbares Membranpotential (C).

Koapplikation von QX314 und Tolbutamid führte zu einer mittleren Leitfähigkeit der dopaminergen *weaver* Neuronen von $1,9 \pm 0,3 \text{ nS}$, die sich nur noch geringfügig von dem Wildtyp unterschied. Das Membranpotential nahm ebenfalls wieder Werte an, die dem Wildtyp nahe kommen. Tatsächlich konnte in einigen Messungen nach Koapplikation von QX314 und Tolbutamid die normale spontane Aktivität wiederhergestellt werden (vgl. Abb. 3.21). Generell zeigten die dopaminergen *weaver* Neuronen nach Koapplikation von QX314 und Tolbutamid eher wieder leicht depolarisierte Membranpotentiale ($-35,2 \pm 2,2 \text{ mV}$, $n=9$). Dies könnte damit erklärt werden, daß 100 μM QX314 den *wvGirk2* vermittelten Kationenstrom nicht zu 100% blockiert. Der IC_{50} für rekombinante *Girk1/wvGirk2* vermittelte Kanäle liegt zwar bei 10,5 μM (Kofuji et al., 1996), aber in cerebellären *weaver* Körnerzellen wurde die zusätzliche tonische Leitfähigkeit mit 100 μM QX314 nur zu 60 bis 80 % blockiert (Rossi et al., 1998).

3.4.4 Molekularbiologische Charakterisierung der dopaminergen *wv*Neuronen

Die elektrophysiologische Charakterisierung der dopaminergen Neuronen in *weaver*-Mäusen zeigte einen deutlich geänderten Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp. Dieser Phänotyp wurde durch die Aktivität von zwei unterschiedlichen Kir-Kanaltypen bewirkt: Zum einen durch funktionell tonisch aktive *wv*Girk2-Kanäle, die ihre Ionenselektivität verloren haben, und zum anderen durch die Koaktivierung von K_{ATP} -Kanälen. Zur Untersuchung der Frage, ob der veränderte elektrophysiologische Phänotyp, der letztendlich die Degeneration von nur einer Subpopulation der dopaminergen *weaver* Neuronen bewirkt, mit einem bestimmten Expressionsmuster von Girk-Kanälen oder aber K_{ATP} -Kanal Untereinheiten korreliert ist, wurden entsprechende Einzelzell-PCR Analysen durchgeführt.

3.4.4.1 scPCR-Detektion von Girk1-4-Kanälen

Die Frage, wie sich die *weaver* Mutation auf die Funktion heteromerer Girk-Kanäle auswirkt, ist nicht eindeutig beantwortet. Kofuji et al. zeigten 1996, daß die *wv*Girk2-Kanaluntereinheit einen dominant negativen gain-of-function Effekt in funktionellen Girk1/*wv*Girk2-Kanälen besitzt. Andere Studien zeigten dagegen, daß heteromultimere Girk1/*wv*Girk2-Kanäle entweder funktionslos bzw. nicht aktivierbar sind (Rossi et al., 1998; Surmeier et al., 1996a), oder aber weiterhin kaliumselektive Ströme mit stark reduzierten Amplituden vermitteln (Slesinger et al., 1996). Es wäre deshalb möglich, daß die Koexpression von *wv*Girk2 mit anderen Girk-Kanälen in dopaminergen Neuronen einen milderen elektrophysiologischen Phänotyp nach sich zieht, und so vielleicht das Überleben einer Subpopulation von dopaminergen Neuronen gewährleistet.

Einzelzell-PCR-Analysen der Girk1-4-Expression in Substantia nigra Neuronen aus Wildtyp-Mäusen ergaben, daß die dopaminergen Neuronen in der Regel allein Girk2-mRNA exprimieren. Von 13 untersuchten TH positiven Neuronen zeigten 10 ausschließlich die Expression von Girk2, ein Neuron zeigte Koexpression von Girk2 und Girk1-mRNA, zwei weitere exprimierten Girk2 in Kombination mit Girk3 (Abb. 3.22 A). Im Gegensatz dazu exprimierten alle untersuchten GABAergen SN Neuronen immer Kombinationen von mehreren Girk-mRNAs und nie Girk2 allein (n=9).

Die entsprechende Einzelzell-Analyse von dopaminergen *weaver* Neuronen ergab einen deutlich höheren Anteil an Koexpression von Girk2- mit anderen Girk-mRNAs. Von 11 TH positiven Neuronen zeigten jetzt nur vier alleinige Girk2-Expression, 4x wurde

Koexpression von Girk2 und Girk1 nachgewiesen, 2x konnte Girk2 zusammen mit Girk3-mRNA detektiert werden (Abb. 3.22 B).

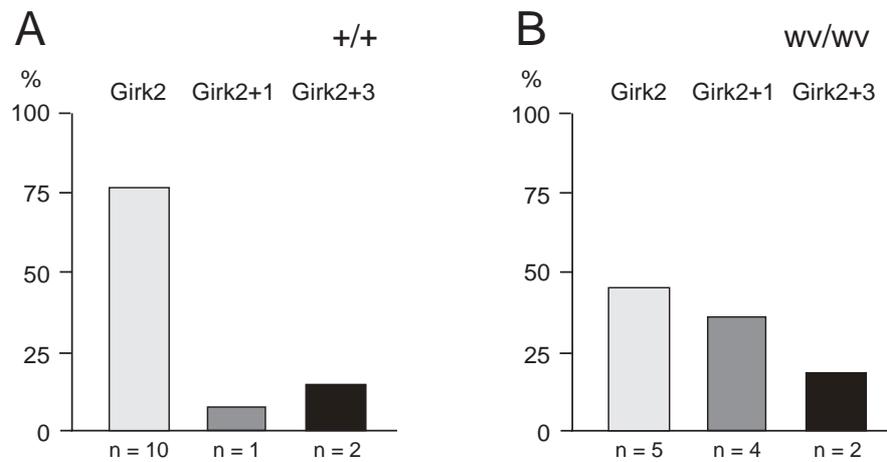


Abb. 3.22: scPCR-Analyse der Girk1-4-Expression in dopaminergen SN Neuronen

Die Expression von Girk1-4-mRNA wurde für 13 elektrophysiologisch und molekularbiologisch als dopaminerg identifizierte Neuronen aus Wildtyp-Tieren (+/+), sowie für 11 entsprechende Neuronen aus *weaver*-Mäusen (*wv/wv*) analysiert. Die Blockdiagramme geben jeweils die prozentuale Häufigkeit der drei unterschiedlichen gefundenen Girk-Expressionsmuster für Wildtyp (A) bzw. *weaver* Neuronen (B) wieder.

Aus Abbildung 3.23 wird aber ersichtlich, daß die Koexpression von unterschiedlichen Girk-Kanälen in den einzelnen analysierten *weaver* Neuronen nicht mit einer geringeren mittleren Leitfähigkeit korreliert, sondern der spezifische elektrophysiologische *weaver*-Phänotyp in allen untersuchten Neuronen vergleichbar stark ausgeprägt war.

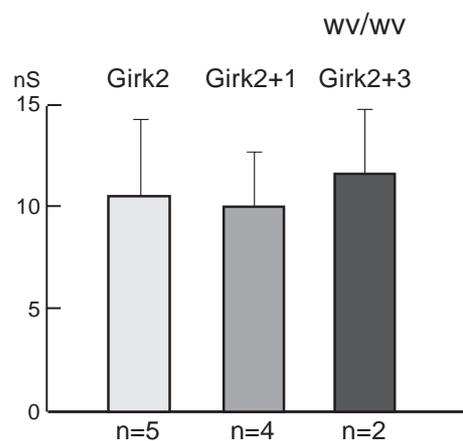


Abb. 3.23: Korrelation von Leitfähigkeit und Girk-Expressionsprofil dopaminerg *weaver* Neuronen

Die Graphik zeigt einen Vergleich der mittleren Leitfähigkeiten zwischen -112 und -80 mV und der drei unterschiedlichen Girk-Expressionsprofile der dopaminergen *weaver* Neuronen aus Abb. 3.22 (B). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied in den mittleren Leitfähigkeiten für eine der drei Neuronengruppen.

Die Koexpressionsrate von unterschiedlichen Girk-Kanälen und damit die Möglichkeit, heteromere Girk-Kanäle zu bilden, ist also in dopaminergen *weaver* Neuronen im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Die scPCR-Ergebnisse ergaben jedoch keinen Hinweis dafür, daß unterschiedliche Girk1-4-Expressionsmuster für das Überleben einer Subpopulation dieser Neuronen verantwortlich sind (vgl. 4.4.3).

3.4.4.2 scPCR-Detektion von K_{ATP} -Kanal Untereinheiten

Da im ersten Teil dieser Arbeit gezeigt wurde, daß dopaminerge Neuronen zwei Typen von K_{ATP} -Kanälen mit unterschiedlicher Sensitivität gegenüber metabolischem Streß exprimieren, könnte die differentielle Expression dieser Kaliumkanaltypen in den Mechanismus des selektiven Überlebens einer Subpopulation von dopaminergen Neuronen in *weaver*-Mäusen involviert sein. Deshalb wurde die Expression der K_{ATP} -Kanal Untereinheiten in *weaver* Neuronen ebenfalls mittels Einzelzell-PCR untersucht. In Übereinstimmung mit den entsprechenden scPCR Ergebnissen für C57Bl/6J Mäuse exprimierten alle 22 analysierten TH positiven dopaminergen *weaver* Neuronen Girk2 und Kir6.2 (vgl. 3.2.2.3, Abb. 3.5).

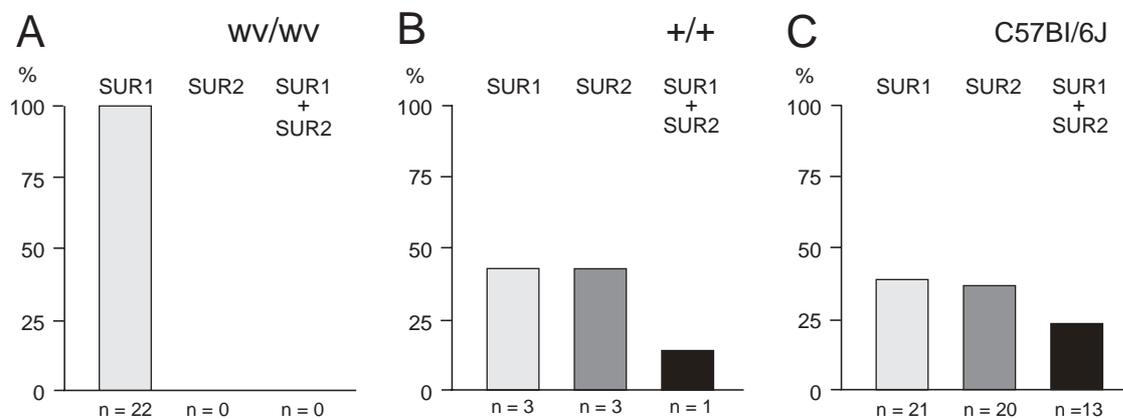


Abb. 3.24: Dopaminerge *weaver* Neuronen exprimieren ausschließlich SUR1-mRNA

Die Abbildung zeigt die Einzelzell-PCR-Analyse der K_{ATP} -Kanal Untereinheiten Expression von elektrophysiologisch und molekularbiologisch als dopaminerg identifizierten SNpc Neuronen in *weaver*-Mäusen (*wv/wv*) im Vergleich zu gesunden Tieren des *weaver* Hybridstammes (*+/+*) und Tieren des Stammes C57Bl/6J (vgl. Abb. 3.5). Die Blockdiagramme geben jeweils die prozentualen Häufigkeiten der drei unterschiedlichen SUR-Expressionsmuster wieder: SUR1, SUR2 oder Koexpression von SUR1 und SUR2, jeweils in Kombination mit Kir6.2 (entsprechend Abb. 3.9). Während die sieben untersuchten Wildtyp Neuronen des Hybridstammes eine den Neuronen aus C57Bl/6J Tieren entsprechende Verteilung der drei Typen von SUR-Isoformen-Expression zeigten (B/C), wurde in allen 22 analysierten dopaminergen (*wv/wv*) Neuronen ausschließlich SUR1-Expression detektiert.

Das unterschiedliche scPCR Ergebnis für die Expression der zwei SUR-Isoformen zeigt Abbildung 3.24 A. In allen 22 analysierten dopaminergen *weaver* Neuronen wurde ausschließlich die Expression von SUR1 nachgewiesen. SUR2-mRNA konnte in keinem der getesteten *weaver* Neuronen detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigten gesunde Geschwistertiere eine mit C57Bl/6J-Tieren vergleichbare Verteilung der drei verschiedenen SUR-Expressionsmuster in den dopaminergen SN Neuronen (Abb. 3.24 B/C). Die exklusive SUR1-Expression ist also kein generelles Phänomen des *weaver*-Maus Hybridstamms, sondern nur für die homozygot erkrankten Tiere spezifisch.

3.4.4.3 scPCR-Detektion von Calbindin in Kombination mit K_{ATP} -Kanal Untereinheiten

Die funktionelle Expression und Aktivierung eines SUR1-vermittelten K_{ATP} -Kanals in den dopaminergen *weaver* Neuronen könnte also tatsächlich einen Schutz vor Degeneration einer sehr empfindlichen Teilpopulation dieser Neuronen bieten. Zur Identifizierung der selektiv überlebenden Population von dopaminergen SN Neuronen in *weaver*-Mäusen wie auch bei Parkinson-Patienten, ist die Expression des kalziumbindenden Proteins Calbindin- D_{28k} der einzige anerkannte Marker (Gaspar et al., 1994; Hirsch et al., 1992; Airaksinen et al., 1997). Um zu testen, ob die SUR1-Expression in überlebenden *weaver* Neuronen mit einer Koexpression von Calbindin korreliert ist, wurde der Nachweis von Calbindin in das K_{ATP} -mPCR-Protokoll aufgenommen.

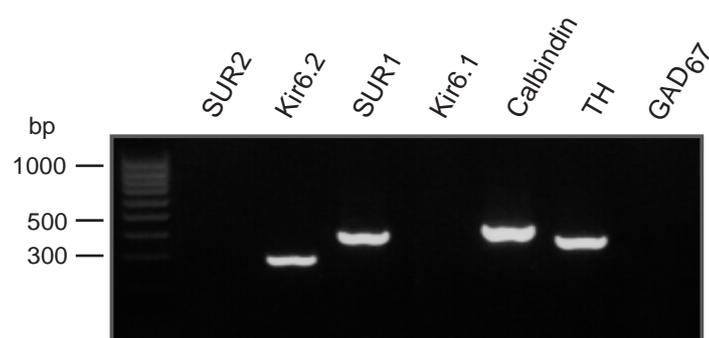


Abb. 3.25: Einzelzell-PCR Korrelation von Calbindin und K_{ATP} -Kanal Untereinheiten Expression in dopaminergen *weaver* Neuronen

Abgebildet ist ein 2%iges Agarosegel nach elektrophoretischer Auftrennung der scPCR-Produkte eines dopaminergen *weaver* SNpc Neurons. Parallel untersucht wurde die mRNA-Expression von Calbindin- D_{28k} und der K_{ATP} -Kanal Untereinheiten SUR2, Kir6.2, SUR1, Kir6.1 sowie der Marker TH und GAD_{67} . In der ersten Bahn (links) wurde der DNA-Längenmarker (100 bp-Leiter) aufgetragen. Zusätzlich zu den Banden von TH sowie SUR1 und Kir6.2 zeigte sich in diesem und fünf weiteren Neuronen ein PCR-Amplifikat für Calbindin (440 bp).

Die Primersequenzen zur Calbindin-Amplifikation wurden von Axel Neu aus der Arbeitsgruppe übernommen. Um das PCR-Protokoll so wenig komplex wie möglich zu halten, wurde auf den Nachweis von GFAP sowie Girk2-mRNA verzichtet, da zuvor für weit über 100 dopaminerge Neuronen auf Einzelzellebene gezeigt wurde, daß jedes TH positive Neuron immer Girk2 positiv und GFAP negativ war. Tatsächlich exprimierten alle sechs in diesen Einzelzell-PCR-Experimenten analysierten dopaminergen *wv*-Neuronen wieder ausschließlich SUR1 und waren ebenfalls Calbindin-D_{28k} positiv (vgl. Abb. 3.25).

Zusammenfassend lassen die vorgestellten Ergebnisse den Schluß zu, daß diejenigen dopaminergen *weaver* Neuronen, welche die massiv einsetzende Degeneration zwischen P7 und P14 überleben, calbindinpositiv sind und bereits aktivierte SUR1/Kir6.2 vermittelte K_{ATP}-Kanäle exprimieren, die sich durch eine hohe Sensitivität gegenüber Tolbutamid und metabolischen Streß von SUR2 vermittelten Kanälen unterscheiden.

4 Diskussion

4.1 Methodische Aspekte

Eine ausreichend hohe Effizienz der reversen Transkription sowie die prinzipielle Möglichkeit der PCR-Amplifikation einzelner DNA-Moleküle sind die Voraussetzungen für die Anwendung der RT-PCR Technik auf mRNA-Material aus Einzelzellen (Li et al., 1988; Rappolee et al., 1989, Monyer und Lambolez, 1995). Die Aussagekraft der mittels scPCR erhaltenen Ergebnisse hängt zum einen von ihrer Reproduzierbarkeit und zum anderen von der Sensitivität dieser Methode ab. Die Möglichkeit, falsch-positiver bzw. falsch-negativer RT-PCR-Signale muß kontrolliert und weitestgehend ausgeschlossen werden.

4.1.1 Etablierung eines RT-mPCR-Protokolls zum mRNA-Nachweis aus Einzelzellen

Um eine hohe Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Einzelzell-PCR-Protokolls zu gewährleisten, wurden im Rahmen dieser Arbeit umfangreiche Kontrollversuche durchgeführt. Zur Sensitivitätskontrolle wurden PCR-Reaktionen mit hochverdünnter Mittelhirn-cDNA als Template, wie unter 3.1.1 beschrieben, durchgeführt. In dieser cDNA waren alle in dieser Studie untersuchten Gene in unterschiedlichen Häufigkeiten exprimiert. Es zeigte sich, daß Markertranskripte (TH, GAD₆₇, GFAP) selbst aus Verdünnungen von bis zu 1:10.000 mit dem beschriebenen PCR-Protokoll problemlos amplifiziert werden konnten. Der Nachweis der Ionenkanal-Transkripte, insbesondere die der K_{ATP}-Kanal Untereinheiten, erwies sich als kritischer. Eine reproduzierbare RT-PCR Amplifikation von Einzelzell-mRNA war nur unter optimalen cDNA-Synthese- und PCR-Bedingungen gewährleistet; eine nur geringe Qualitätsminderung der verwendeten Enzyme (SuperscriptTMII, Taq-Polymerase) konnte ebenso die Sensitivität und damit die Nachweisgrenze der scPCR verringern, wie leichte Temperaturschwankungen des PCR-Geräts. Weiter erwies sich ein kontrolliertes Überführen des Patchpipetteninhalts in das Reaktionsgefäß zur cDNA-Synthese als entscheidend für die erfolgreiche Reproduzierbarkeit der scPCR-Experimente (vgl. 3.1) (Monyer und Jonas, 1995). Einzelzell-Experimente, die unter nicht optimalen Bedingungen durchgeführt wurden, gaben in der PCR-Analyse zwar noch Signale für die Markertranskripte, aber insbesondere Signale von K_{ATP}-Kanal Untereinheiten, konnten nicht mehr detektiert werden.

4.1.2 Aussagekraft von positiven und negativen scPCR-Ergebnissen

Da die Identität der jeweiligen PCR-Produkte und damit die Spezifität der Primer mehrfach durch Sequenzierung verifiziert wurde, war die Aussagekraft von positiven scPCR-Signalen eindeutig, wenn in der entsprechenden Negativkontrolle keine Amplifikate detektiert wurden. Falsch-positive PCR-Signale durch Amplifikation von genomischen DNA-Sequenzen des Nukleus wurden durch entsprechende Kontrollversuche ausgeschlossen (vgl. 3.1.2). Aus diesem Grund konnte auf eine DNase Behandlung des Einzelzellmaterials verzichtet werden, durch die die Möglichkeit von RNase- oder DNA-Kontaminationen erhöht worden wäre (Sawtell, 1997).

Die Beurteilung von negativen scPCR-Signalen ist auch bei eindeutiger Positivkontrolle schwieriger, da die hochverdünnte Mittelhirn Kontroll-cDNA den Bedingungen der Einzelzelle nur annähernd entsprechen kann. Ein PCR-Signal kann auch bei Expression des entsprechenden Gens in der untersuchten Zelle negativ ausfallen, wenn die Sensitivität der Methode in dem Experiment nicht optimal war (vgl. Mermelstein et al., 1997).

Die Berücksichtigung dieser theoretischen Möglichkeit ist besonders im Falle von heterogenen Detektionsmustern wichtig, wie sie in dieser Arbeit für die mRNA-Expression der SUR-Isoformen in dopaminergen SN Neuronen bestimmt wurden. So muß kritisch hinterfragt werden, ob wirklich drei Populationen mit unterschiedlichen SUR-Expressionsmustern existieren. Vorstellbar wäre, daß alle Neuronen sowohl SUR1 als auch SUR2 exprimieren, aber nicht in allen analysierten Zellen entsprechende PCR-Signale detektiert werden konnten. Gegen diese Möglichkeit sprechen drei Befunde dieser Arbeit: Zum einen konnte in den GABAergen SNpr Neuronen immer nur SUR1 und niemals SUR2 detektiert werden. Ebenfalls zeigten die überlebenden dopaminergen Neuronen in *weaver*-Mäusen, im Gegensatz zu gesunden Geschwistertieren, nur noch alleinige SUR1-Expression. Zum anderen wurden in unabhängigen quantitativen pharmakologischen Experimenten unterschiedliche Typen von funktionellen K_{ATP} -Kanälen für die dopaminergen, nicht aber für die GABAergen SN Neuronen, nachgewiesen. Und schließlich konnten die drei unterschiedlichen SUR-Expressionsmuster auf Einzelzellebene eindeutig mit jeweils unterschiedlichen metabolischen Sensitivitäten korreliert werden.

Aufgrund dieser Überlegungen und der umfangreichen Kontrollen ist es sehr wahrscheinlich, daß die in dieser Arbeit dargestellten scPCR Befunde die realen differentiellen mRNA-Expressionsmuster unterschiedlicher Zelltypen wiedergeben.

4.1.3 Limitationen der scPCR-Methode

Ein schon angesprochenes Problem der scPCR ist die begrenzte Anzahl der mit der multiplex-PCR aus einer Einzelzelle parallel nachweisbaren mRNAs (vgl. 1.3.2). Eine Möglichkeit, die Anzahl der nachzuweisenden Gene zu erhöhen, liegt in der Aufteilung des cDNA-Pools der Einzelzelle auf mehrere PCR-Ansätze. Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen zeigten aber, daß bereits bei einem Einsatz von 1/10 der Einzelzell-cDNA-Pools ein verlässlicher Nachweis der SUR-mRNAs nicht mehr gewährleistet war (vgl. auch Surmeier et al., 1996b; Mermelstein et al., 1998). Deshalb kann eine Verdünnung des Einzelzellmaterials nicht generell empfohlen werden. Der Nachweis von Transkripten mit hoher Abundanz ist dagegen auch aus 1/10 des Einzelzell-cDNA-Pools verlässlich möglich, so daß eine Verringerung der Komplexität der multiplex-PCR durch getrennte mPCR-Amplifikationen von Markertranskripten und Kanaltranskripten erreicht werden kann.

Weiter muß betont werden, daß nach mPCR-Amplifikation in dieser Arbeit nur qualitative Aussagen bezüglich der Expression der analysierten Gene möglich waren. Generell ist die Etablierung von quantitativen scPCR-Protokollen, die eine Abschätzung der Mengenverhältnisse der nachgewiesenen Transkripte ermöglicht, weitaus komplizierter, da die PCR-Amplifikation exponentiell abläuft (vgl. Jonas et al., 1994; Geiger et al., 1995; Sucher und Deitcher, 1995, Flint et al., 1997). In einer multiplex-PCR ist die Komplexität der Reaktionsabläufe nochmals erhöht.

Schließlich darf nicht außer acht gelassen werden, daß alle in dieser Arbeit vorgestellten scPCR Ergebnisse immer nur die Expression eines Gens auf Transkript-Ebene anzeigen. Ob in der Zelle auch das korrespondierende Protein funktionell exprimiert wird, kann mit der scPCR-Methode nicht nachgewiesen werden, obwohl dies in den meisten Fällen sehr wahrscheinlich ist. Allerdings kann die Translation von mRNA von vielen unterschiedlichen Faktoren beeinflusst werden. Es ist deshalb von großem Vorteil, wenn die mittels scPCR erhaltenen Ergebnisse mit anderen unabhängigen Techniken, wie z.B. immunocytochemischen oder elektrophysiologischen Analysen korreliert werden können, in denen direkt die Expression bzw. Funktionalität des korrespondierenden Proteins untersucht wird.

4.1.4 Alternative Amplifikationsmethoden zur Einzelzell-Analyse differentieller Genexpression

Um eine möglichst umfassende Untersuchung der differentiellen Genexpression einzelner Zellen zu ermöglichen, kann die Limitierung des Einzelzellmaterials durch einen möglichst linearen Amplifikationsschritt des gesamten mRNA- bzw. cDNA-Pools umgangen werden. Eine Methode zur kompletten Analyse der gesamten Genexpression einzelner Zellen ist bis jetzt noch nicht reproduzierbar etabliert. Problematisch bleibt, daß jeder Amplifikationsschritt zu einer Verschiebung der Transkriptzusammensetzung des Einzelzellmaterials führen kann.

Eine prinzipiell geeignete Methode zur linearen Amplifikation des cDNA-Pools ist die schon beschriebene aRNA-Amplifikation (vgl. 1.3.2). Allerdings wird diese Methode nur in sehr wenigen Arbeitsgruppen erfolgreich eingesetzt, und die Frage der Reproduzierbarkeit ist noch nicht eindeutig geklärt. In einer Weiterentwicklung dieser Methode wird die cDNA-Erststrangsynthese mittels an Magnetpartikelchen immobilisierten Oligo-dT-Primern durchgeführt (Eberwine, 1996). Auch ohne anschließende RNA-Amplifikation erhält man so einen an Magnetteilchen immobilisierten cDNA-Pool der Einzelzelle, der theoretisch nach Amplifikation mit Hilfe eines Magneten einfach wieder aus dem PCR-Ansatz isoliert und in einer nächsten PCR eingesetzt werden kann. Ein praktisches Problem liegt aber in dem relativ hohen Materialverlust durch das Aufreinigen der Magnetpartikel.

Eine weitere Möglichkeit zur linearen Vervielfältigung des Einzelzellmaterials ist eine kontrollierte PCR-Amplifikation des gesamten cDNA-Pools nach Anhängen einer Poly-A- oder Poly-G-Sequenz an die Erststrang-cDNA-Moleküle (Toellner et al., 1996). Mit Hilfe einer solchen PCR-Amplifikation des gesamten cDNA-Pools ist es sogar möglich, cDNA-Banken aus einzelnen Zellen herzustellen (Dulac, 1998).

Sollte es schließlich möglich sein, die Differential-Display-PCR Methode reproduzierbar auf Einzelzell-Ebene anzuwenden, könnten auf diese Weise sogar bislang noch unbekannte, in einzelnen Neuronen differentiell exprimierte Gene identifiziert werden (Liang und Pardee, 1992; Renner et al., 1998).

4.2 Markergenexpression und elektrophysiologischer Phänotyp von SN Neuronen

Mit Hilfe der Kombination von Patch-Clamp und RT-PCR Technik konnten in dieser Studie erstmals drei morphologisch und elektrophysiologisch unterscheidbare Neuronentypen in der Substantia nigra auf Einzelzellebene eindeutig anhand ihrer Markerexpression molekular klassifiziert werden: Dopaminerge Neuronen, GABAerge Interneuronen, sowie GABAerge Projektionsneuronen (Lacey et al., 1989, Stanford und Lacey, 1996, Richards et al., 1997). Die scPCR Korrelationen zwischen molekularen und elektrophysiologischen Phänotypen wurde eindeutig gezeigt, so daß in zukünftigen Untersuchungen der SN Neuronen direkt von dem elektrophysiologischen Eigenschaften (Spontanaktivität, A-Strom, I_h -Strom) auf den Neurotransmitter-Phänotyp (dopaminerg oder GABAerg) geschlossen werden kann.

Interessanterweise fanden sich in der VTA ebenfalls TH positive Neuronen, die nicht den typischen A-Strom der dopaminergen SN Neuronen aufwiesen, sondern einen dominanten, deutlich langsamer inaktivierenden K^+ -Auswärtsstrom, der bei Potentialen um -50 mV aktiviert wurde (vgl. Johnson und North, 1992). Eingehendere, von Jochen Röper durchgeführte Untersuchungen zeigten, daß die Frequenz der Spontanaktivität dieser dopaminergen VTA Neuronen im Vergleich zu den SN Neuronen etwa um das Dreifache erhöht war. Zur weiteren Charakterisierung können auch diese mittels scPCR eindeutig als dopaminerg identifizierte VTA Neuronen anhand ihres elektrophysiologischen Phänotyps von den dopaminergen SN Neuronen unterschieden werden.

4.3 K_{ATP} -Kanäle in SN Neuronen

4.3.1 Unterschiedliche Typen von K_{ATP} -Kanälen in dopaminergen SN Neuronen

Im Gegensatz zu den GABAergen SNpc Neuronen, die keinen Hinweis auf das Vorhandensein von K_{ATP} -Kanälen lieferten, exprimieren die GABAergen SNpr Neuronen einen K_{ATP} -Kanal mit hoher Tolbutamidsensitivität, der sehr wahrscheinlich aus den Untereinheiten SUR1 und Kir6.2 gebildet wird. Die dopaminergen Neuronen besitzen dagegen anscheinend mindestens zwei unterschiedliche Typen von K_{ATP} -Kanälen, die sich aus SUR1- und Kir6.2- bzw. SUR2B- und Kir6.2-Untereinheiten zusammensetzen.

4.3.1.1 Heterogene Pharmakologie der K_{ATP} -Kanäle

Die pharmakologischen und kombinierten scPCR-Experimente dieser Arbeit legen den Schluß nahe, daß 100 μ M Diazoxid spezifisch den SUR1-vermittelten K_{ATP} -Kanal in den dopaminergen Neuronen der Substantia nigra aktiviert, während 100 μ M Pinacidil unselektiv alle K_{ATP} -Kanaltypen in diesen Neuronen zu aktivieren scheint (vgl. 3.3.1). Allerdings kann Pinacidil auch unspezifisch andere K^+ -Kanäle (z.B. kalziumaktivierte K^+ -Kanäle) aktivieren (Gelband und McCullough, 1993). Dies muß besonders für diejenige Population von dopaminergen Neuronen in Betracht gezogen werden, in denen Pinacidil eine tolbutamidinsensitive Leitfähigkeit aktivierte. Obwohl diese pharmakologischen Experimente keine quantitativen Aussagen über die Wirkung der K_{ATP} -Kanalöffner zulassen, stehen schon die qualitativen Befunde im Kontrast zu denen der rekombinanten Kanäle. Demnach hat Pinacidil, im Gegensatz zu 100 μ M Diazoxid, auf SUR1/Kir6.2-vermittelte K_{ATP} -Kanäle keinen Effekt, während Diazoxid in einer Konzentration von 200 μ M ebenfalls einen SUR2B/Kir6.2-Kanal aktiviert (vgl. Tab. 3.1). Möglich wäre zum einen, daß zytosolische Faktoren die pharmakologische Sensitivität der nativen K_{ATP} -Kanäle im Vergleich zu den rekombinanten Kanälen modifizieren können. Da die Sensitivität für die Kanalöffner von den SUR-Untereinheiten des K_{ATP} -Kanals vermittelt wird (Schwanstecher et al., 1998), ist ebenfalls vorstellbar, daß möglicherweise bis jetzt unentdeckte SUR-Splicevarianten in den SN Neuronen exprimiert werden, die sich in den in dieser Studie PCR-amplifizierten Bereichen nicht von den bekannten SUR1- bzw. SUR2-Sequenzen unterscheiden. Da das SUR1- bzw. SUR2-Gen aus 39 bzw. 38 Exonen besteht, ist die Existenz von weiteren Splicevarianten neben SUR2A/B (sowie SUR2A Δ 14 und Δ 17 bzw. Δ 17/ Δ 18) wahrscheinlich (Aguilar-Bryan et al., 1998).

Eine Subpopulation der in dieser Arbeit untersuchten dopaminergen Neuronen zeigte keine diazoxidaktivierten Ströme (ca. 30%). In diesem Zusammenhang ist eine vergleichbare Arbeit von Watts et al., (1995) von Interesse, in der ebenfalls nur 64% aller untersuchten dopaminergen Neuronen der Ratte eine Sensitivität gegenüber 500 μ M Diazoxid aufwiesen. Der diazoxidaktivierte Strom war in seiner Amplitude variabel und konnte von 100 μ M Tolbutamid nur zu ca. 67% blockiert werden, während 30 μ M Glibenklamid eine vollständige Blockierung bewirkte. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Befunden dieser Arbeit, allerdings zeigte 50 μ M Pinacidil dort keine Wirkung. In einer anderen Studie dagegen aktivierte 500 μ M Pinacidil ebenfalls eine K_{ATP} -Leitfähigkeit in DA SN Neuronen (Häusser et al., 1991). Ein heterogenes pharmakologisches Verhalten der DA Neuronen ergaben auch Experimente mit scharfen

Mikroelektroden von Guatteo et al., (1998) in denen ein hypoxieinduzierter K_{ATP} -Strom nur in ca. 50% der untersuchten Neuronen mit 100 μ M Tolbutamid blockiert werden konnte.

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurde gezeigt, daß Nicorandil im rekombinanten System SUR2-spezifisch wirkt und bevorzugt SUR2B/Kir6.2 vermittelte K_{ATP} -Kanäle aktiviert (EC_{50} SUR2B/SUR2A: 10 μ M bzw. >500 μ M; Shindo et al., 1998). Die Untersuchung der Wirkung von Nicorandil auf die dopaminergen SN Neuronen wäre daher sicher ebenso von Interesse, wie eine umfassende quantitative Pharmakologie der K_{ATP} -Kanalöffner.

4.3.1.2 Unterschiedliche K_{ATP} -Kanäle mit differentieller metabolische Sensitivität

Schon in früheren Arbeiten wurde gezeigt, daß dopaminerge SN Neuronen auf unterschiedlichste Formen von metabolischem Streß (ATP-Auswaschen, Rotenoninkubation, Natriumüberladung, Anoxie, Hypoxie) mit der Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen reagieren können (Stanford und Lacey, 1995; Röper und Ashcroft, 1995; Seutin et al., 1996; Mercuri et al., 1994; Guatteo et al., 1998).

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen dagegen erstmals, daß einzelne dopaminerge SN Neuronen ein unterschiedliches Antwortverhalten auf metabolischen Streß (mit 100 nM Rotenon induziert) zeigen, welches eindeutig mit der mRNA-Expression unterschiedlicher SUR-Isoformen korreliert ist (vgl.3.3.2). Rotenon vermindert durch Blockierung des Komplex I der Atmungskette die ATP-Konzentration in den Neuronen. Mit den Experimenten dieser Arbeit kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß sich das heterogene Verhalten der dopaminergen Neuronen auf eine teilweise Blockierung der Atmungskette damit erklärt, daß diese Neuronen ihr ATP alternativ zu unterschiedlichen Anteilen aus glykolytischer Substratkettenphosphorylierung und oxidativer Phosphorylierung gewinnen. Dann wäre die Expression von SUR1 und SUR2B mit anaerober glykolytischer bzw. oxidativer Präferenz eines Neurons korreliert.

Um diese Erklärungsmöglichkeit auszuschließen, wurden von Dr. Jochen Röper denen für Rotenon entsprechende quantitative Versuche mit Jodoacetat durchgeführt. Die Präinkubation des Slices mit diesem Blocker der Glykolyse zeigte ebenfalls zwei Populationen von dopaminergen Neuronen mit deutlich unterschiedlichen Jodoacetatsensitivitäten (EC_{50} : 17 μ M bzw. 1,2 mM). Auch hier konnte die induzierte Leitfähigkeit nur in der hochaffinen Subpopulation durch Koinkubation mit 100 μ M

Tolbutamid blockiert werden (Kontrolle (n=6): $1,4 \pm 0,1$ nS; 100 μ M Jodoacetat (n=6): $7,2 \pm 0,6$ nS; 100 μ M Jodoacetat+100 μ M Tolbutamid (n=7): $1,5 \pm 0,2$ nS).

Mit diesen zusätzlichen Versuchen ist eindeutig gezeigt, daß die dopaminergen Neuronen tatsächlich unterschiedlich auf ATP-Mangel reagieren und damit eine unterschiedliche metabolische Sensitivität aufweisen, unabhängig davon, ob die Atmungskette oder die Glykolyse blockiert wurde.

Die kombinierten metabolischen scPCR-Experimente legen den Schluß nahe, daß die unterschiedlichen K_{ATP} -Kanäle als metabolische Sensoren in diesen Neuronen fungieren, wobei die Sensitivität von SUR1 vermittelten Kanälen deutlich höher ist, als die von SUR2B-Kanälen. Auch im rekombinanten System zeigen SUR1/Kir6.2-Kanäle eine deutlich höhere metabolische Sensitivität als SUR2A/Kir6.2-Kanäle (Ashcroft und Gribble, 1998). Durch welche molekularen Mechanismen die verschiedenen SUR-Untereinheiten unterschiedliche metabolische Sensitivitäten vermitteln, ist noch nicht geklärt. So wird die ATP-Sensitivität der rekombinanten K_{ATP} -Kanäle zum größten Teil von der Kir6.2 Untereinheit und nicht von der SUR-Komponente vermittelt (Tucker et al., 1997). Andererseits können Mutationen in den NBDs von SUR1 zu einem Verlust der metabolischen Aktivierbarkeit des K_{ATP} -Kanals führen (Gribble et al., 1997; Ashcroft und Gribble, 1998). Vorstellbar ist, daß die metabolische Sensitivität nativer K_{ATP} -Kanäle von intrazellulären Faktoren entscheidend beeinflußt werden kann. So wurde z.B. kürzlich gezeigt, daß Phosphoinositolphosphate die ATP-Sensitivität der SUR1/Kir6.2 Kanäle drastisch erniedrigen können (Shyng und Nichols, 1998; Baukowitz et al., 1998). Ob alternative SUR-Expression in diesem Kontext eine Rolle spielt, ist jedoch ebenfalls unklar.

4.3.2 Heteromere SUR1/SUR2B vermittelte K_{ATP} -Kanäle in dopaminergen SN Neuronen?

In einer Subpopulation von dopaminergen SN Neuronen (ca. 25%) wurde eine Koexpression von SUR1-, SUR2- und Kir6.2-mRNA nachgewiesen. Es stellt sich die Frage, ob in diesen Neuronen zwei unterschiedliche Typen von funktionellen K_{ATP} -Kanälen exprimiert werden, oder ob diese Neuronen nur einen einzigen Typ von K_{ATP} -Kanal besitzen, der aus beiden SUR-Isoformen zusammen mit vier Kir6.2-Untereinheiten aufgebaut ist. Die prinzipielle Möglichkeit der Bildung von funktionellen SUR-heteromeren K_{ATP} -Kanäle ist bis jetzt im rekombinanten System noch nicht untersucht worden.

Die Befunde dieser Arbeit sprechen eher für diese Möglichkeit, als dagegen: Zum einen konnten anhand unterschiedlicher Tolbutamidsensitivitäten eindeutig drei Populationen von dopaminergen Neuronen unterschieden werden. Dabei wurden die mittleren Tolbutamidsensitivitäten mit einer einzigen Hillfunktion eindeutig besser beschrieben, als mit einer Summenfunktion aus hoch- und niederaffinen Sensitivitäten (vgl. 3.3.3.1). Zum anderen konnten in den kombinierten metabolischen scPCR-Experimenten ebenfalls drei Populationen mit jeweils signifikant unterschiedlicher metabolischer Sensitivität bestimmt werden, wobei die Population mit mittlerer Sensitivität SUR1 und SUR2 in Kombination mit Kir6.2 koexprimierte (vgl. 3.3.2.3).

4.4 Charakterisierung der dopaminergen SN Neuronen in *weaver*-Mäusen

4.4.1 Gain-of-function Phänotyp dopaminerger SN Neuronen in homozygoten *weaver*-Mäusen

Obwohl die dem *weaver*-Phänotyp zugrunde liegende Punktmutation im Girk2-Gen schon 1995 identifiziert wurde, wird die Auswirkung dieser Mutation auf homomere und heteromere wv Girk2-Kanäle noch immer kontrovers diskutiert (vgl. 1.2.1 und 3.4.4.1).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten weisen eindeutig auf die Expression von funktionellen wv Girk2-Kanälen in dopaminergen SN Neuronen hin, die eine geänderte Selektivität und Regulation aufweisen. Dieser gain-of-function Phänotyp wurde auch im rekombinanten System für homomere und größtenteils auch für heteromere wv Girk2-Kanäle ermittelt (Kofuji et al., 1996; Navarro et al., 1996; aber: Slesinger et al., 1996). Eine vergleichbare Mutation in dem GYG-Motiv eines spannungsgesteuerten Shaker-Kaliumkanals (K_v1) führt ebenfalls zu einem Verlust der Kaliumselektivität der funktionellen Kanäle (Heginbotham et al., 1994).

Die pharmakologische Charakterisierung der dopaminergen *weaver* Neuronen lieferte eindeutige Hinweise dafür, daß der geänderte elektrophysiologische Phänotyp in diesen Neuronen durch die Koaktivierung von wv Girk2 und K_{ATP} -Kanälen vermittelt wird. Die Blockierung beider Leitfähigkeiten durch QX314 und Tolbutamid führte zu einem mit dem Wildtyp vergleichbaren elektrophysiologischen Phänotyp (vgl. 3.4.3.3 und 3.4.3.4).

Da die Wirkung von QX314 nicht absolut spezifisch für wv Girk2-Kanäle ist, sondern insbesondere bei interner Applikation in hohen Konzentrationen noch weitere Kanaltypen in ihrer Funktion beeinflußt, ist besonders zu betonen, daß die Applikation von QX314 auf Wildtyp Neuronen keinen Effekt hatte. So kann ausgeschlossen werden, daß der

beobachtete QX314-Effekt auf dopaminerge *weaver* Neuronen durch Modulation von z.B. Girk- oder I_h -Strömen vermittelt wurde (vgl. 3.4.3.3).

Um auszuschließen, daß die Membranhyperpolarisation nach QX314-Applikation lediglich eine parallel stattfindende ATP-Auswasch-Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen widerspiegelte, wurden die QX314-Messungen zusätzlich in der Anwesenheit von 100 μ M Tolbutamid durchgeführt. Die beobachteten QX314-Effekte unterschieden sich in diesen Experimenten nicht signifikant von den unter 3.5.2 beschriebenen.

4.4.2 Phänotyp dopaminerges SN Neuronen in heterozygoten *weaver*-Mäusen

Heterozygot betroffene *weaver*-Mäuse zeigen keinerlei Verhaltensauffälligkeiten, dennoch wurden leichte morphologische sowie physiologische Unterschiede für cerebelläre und dopaminerge Neuronen beschrieben (Wüllner et al., 1995; Fox et al., 1998; Verina et al., 1997; Won et al., 1997). Die im Rahmen dieser Arbeit elektrophysiologisch charakterisierten dopaminergen Neuronen von heterozygot betroffenen *weaver*-Mäusen wiesen einen leicht geänderten elektrophysiologischen Phänotyp auf. Im Vergleich zu gesunden Geschwistertieren zeigten sich leicht depolarisierte Ruhemembranpotentiale und in ca. 70% der Neuronen ein Verlust der Spontanaktivität (vgl. 3.4.3.1). Das Fehlen der normalen Spontanaktivität in ca. 2/3 aller untersuchten Neuronen könnte über einen längeren Zeitraum die neuronalen dopaminergen Interaktionen entscheidend verändern. Eine leichte chronische Depolarisation sollte eine generell erhöhte Empfindlichkeit dieser Neuronen für exzitotoxische Degenerationsprozesse zur Folge haben. In Einklang mit diesen Überlegungen stehen die Befunde, daß die Anzahl der Dendriten dopaminerges Neuronen in heterozygoten Tieren um ca. 60% reduziert ist (Triarhou und Ghetti, 1989). Ebenfalls ist die Anzahl dopaminerges Neuronen in diesen Tieren um ca. 12% verringert und dementsprechend der striatale Dopaminspiegel um ca. 14% erniedrigt (Verina et al., 1997; Roffler-Tarlov und Graybiel, 1987).

Auch findet sich in heterozygoten *weaver*-Mäusen eine leichte Reduktion der cerebellären Neuronen, und die männlichen Tiere verlieren nach ca. vier Lebensmonaten ihre Fortpflanzungsfähigkeit (Vogelweid et al., 1993; Fox et al., 1998). Obwohl die Girk2-Mutation nicht dominant ist, können die negativen Auswirkungen der Expression von wv Girk2-Kanälen nicht durch eine Koexpression von normalen Girk2-Kanälen vollständig kompensiert werden. Betont werden sollte in diesem Zusammenhang, daß der eigentliche Mechanismus, der den unterschiedlichen Neurodegenerationsprozessen in *weaver*-Mäusen zugrunde liegt, bis jetzt nicht geklärt ist.

4.4.3 Girk1-4-Koexpression in dopaminergen SN Neuronen

Die Koexpression unterschiedlicher Girk-Kanäle und damit die Möglichkeit zur Bildung heteromultimerer Girk-Kanäle wird als ein Mechanismus diskutiert, der Neuronen möglicherweise vor der Degeneration in *weaver*-Mäusen schützen könnte. Diese Möglichkeit war besonders für die unterschiedlich vulnerablen dopaminergen SN Neuronen interessant, die in Wildtyp-Tieren meist ausschließlich Girk2 exprimieren. In den scPCR-Untersuchungen dieser Arbeit konnte kein Hinweis für diese Koexpressions-Hypothese gefunden werden. Zwar zeigte sich in *weaver*-Mäusen ein erhöhter Anteil an Neuronen, die Girk2 nicht allein, sondern in Kombination mit Girk1 oder Girk3 exprimierten, aber weder wiesen diese Neuronen einen milderen elektrophysiologischen *weaver*-Phänotyp auf, noch ergab sich für die überlebenden *weaver* Neuronen ein spezifisches Girk-Koexpressionsprofil (vgl. 3.4.4.1).

In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, daß durch alternatives Splicen mindestens drei unterschiedliche Girk2-mRNAs gebildet werden können (Girk2a/b/c), die alle in der Substantia nigra nachzuweisen sind (Wei et al., 1998). Mit den in der scPCR verwendeten PCR-Primern konnten diese Girk2-Splicevarianten nicht unterschieden werden. Wie kürzlich gezeigt wurde, können diese Splicevarianten anscheinend tatsächlich in der SN heteromere Girk2-Kanäle mit unterschiedlichen Eigenschaften bilden (Inanobe et al., 1999). Auch wäre vorstellbar, daß die *weaver*-Mutation unterschiedliche Effekte auf die verschiedenen Girk2-Splicevarianten haben könnte.

4.4.4 Überlebende dopaminerge *weaver* Neuronen exprimieren ausschließlich SUR1

Die elektrophysiologischen Untersuchungen der *weaver* Neuronen lieferten eindeutige Hinweise auf bereits unter Kontrollbedingungen tonisch aktivierte K_{ATP} -Kanäle in den dopaminergen Neuronen. Daraufhin durchgeführte scPCR-Experimente zeigten, daß alle überlebenden dopaminergen Neuronen 14 Tage alter *weaver*-Mäuse ausschließlich SUR1 und Kir6.2 exprimieren. Gesunde Geschwistertiere sowie C57Bl/6J-Mäuse zeigten dieses Expressionsmuster dagegen in nur ca. 40% aller dopaminergen Neuronen (vgl. 3.4.4.2).

Weitere scPCR-Analysen ergaben, daß die überlebenden SUR1-exprimierenden Neuronen ebenfalls calbindinpositiv waren (n=6). Dieses kalziumbindende Protein gilt als Marker für die resistente Population dopaminerges SN Neuronen bei der Parkinson-Krankheit und ihren Tiermodellen. Die intrazelluläre Kalziumkonzentration ist generell als ein entscheidender Triggerfaktor für neurodegenerative Prozesse akzeptiert (Thymianski et

al., 1993; Choi, 1995). Außerdem wurde für cerebelläre *weaver* Körnerzellen gezeigt, daß der Kalziumchelator BAPTA eine Degeneration verhindern kann (Liesi et al., 1997). Für die dopaminergen *weaver* SN Neuronen wurde allerdings gezeigt, daß die Calbindinexpression keinen direkten neuroprotektiven Effekt besitzt (Airaksinen et al., 1997). In diesem Zusammenhang ist von Interesse, daß die SUR1-Expression in gesunden Mäusen auf Einzelzell-Ebene nicht mit der Koexpression von Calbindin korreliert werden konnte. Dieser scPCR-Befund läßt sich mit der Annahme erklären, daß die Calbindinexpression generell durch metabolische Streßsituationen stimuliert wird, um einer Kalziumüberladung von Neuronen und damit der Initiation von neurodegenerativen Prozessen entgegenzuwirken. Eine relative Änderung der Expressionsraten von AMPA-Glutamatrezeptor Untereinheiten als Antwort auf ischämische Prozesse wurde auf Einzelzell-PCR Ebene gezeigt (Ying et al., 1997). So ist vorstellbar, daß ebenfalls die SUR1-Expressionsrate in Antwort auf chronische Depolarisation und damit metabolische Belastung in den *weaver* SN Neuronen erhöht wird. Auch ist ein direkter neuroprotektiver Effekt durch die Aktivierung von SUR1 vermittelten K_{ATP} -Kanälen in dopaminergen SN Neuronen nach chronischem Natriumeinstrom vorstellbar (vgl. auch 4.5.2).

In diesem Kontext sollte auch bedacht werden, daß die SUR-Expression ebenso wie die Degeneration der dopaminergen SN Neuronen in *weaver* erst postnatal einsetzt. Da die Degeneration der *weaver* Neuronen sich nach P14 noch weiter progressiv fortsetzt, wäre es von großem Interesse, die Kaliumkanal Expressionsstudien dieser Arbeit mit entsprechenden Untersuchungen an adulten *weaver*-Mäusen zu vergleichen.

4.5 Funktionelle Bedeutung der K_{ATP} -Kanäle in SN Neuronen

Über die funktionelle Bedeutung der K_{ATP} -Kanäle im Gehirn ist noch wenig bekannt. Die Aktivierung dieser Kanäle als Antwort auf verschiedene Formen von metabolischem Streß, wie Anoxie, Glukosemangel oder Inhibition der ATP-Erzeugung, legt nahe, daß geöffnete K_{ATP} -Kanäle chronischer Depolarisation und daraus resultierenden neurodegenerativen Prozessen entgegenwirken könnten.

Die Expression von funktionell und strukturell unterschiedlichen K_{ATP} -Kanaltypen in der Substantia nigra wurde mit dieser Arbeit eingehend demonstriert. Wie zwei kürzlich erschienene Arbeiten zeigen, deutet sich die Komplexität neuronaler K_{ATP} -Kanäle auch für andere Gehirnregionen an: Einzelzell-Analyse von drei dorsalen Vagusneuronen ergab eine Koexpression von SUR1 und Kir6.2 (Karschin et al., 1998). Entsprechende Untersuchungen von fünf striatalen Interneuronen zeigten die Koexpression von SUR1 und

Kir6.1 an (Lee et al., 1998). K_{ATP} -Kanäle in Neuronen des ventromedialen Hypothalamus (VMH) haben wiederum völlig andere Eigenschaften: sie können von Leptin aktiviert werden und sind wahrscheinlich an der Vermittlung von Hunger- bzw. Sättigungsgefühlen beteiligt (Ashford et al., 1990; Spanswick et al., 1997). Die Expression von K_{ATP} -Kanälen unterschiedlicher molekularer Zusammensetzung und Funktion impliziert, daß die Aufgaben der neuronalen K_{ATP} -Kanäle noch weitaus vielseitiger sein könnten.

4.5.1 K_{ATP} -Kanäle als metabolische Sensoren in dopaminergen SN Neuronen?

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die SUR1/Kir6.2 vermittelten K_{ATP} -Kanäle in der Substantia nigra schon durch eine partielle Blockierung der Atmungskette, wie sie auch bei Parkinson-Patienten gefunden wurde, aktiviert werden. Als Folge kommt es zu einer starken Hyperpolarisation des betreffenden Neurons. Dieser K_{ATP} -Kanal scheint also in dopaminergen SN Neuronen tatsächlich die Aufgabe eines metabolischen Sensors zu besitzen, der nach Aktivierung in metabolischen Streßsituationen exzitotoxischen Reaktionen entgegenwirkt.

Welche Funktion ein SUR2/Kir6.2 vermittelter K_{ATP} -Kanal in den dopaminergen SN Neuronen besitzt, ist noch vollkommen unklar. Da die metabolische Sensitivität dieses Kanals weitaus geringer ist, scheint er nicht als Schutzantwort auf metabolische Streßsituationen aktiviert zu werden. Möglicherweise kann dieser SUR2- K_{ATP} -Kanal durch andere Signalkaskaden aktiviert werden. So ist eine Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen durch Hormone und G-Proteine gezeigt worden (Spanswick et al., 1997; Sanchez et al., 1998). Dies könnte eine Beteiligung dieses K_{ATP} -Kanals an der neuronalen Informationsverarbeitung und -weiterleitung implizieren.

4.5.2 Schützen aktivierte K_{ATP} -Kanäle in *weaver* selektiv vor dopaminergem Degeneration?

Eine durch wv Girk2-Kanäle vermittelte chronische Natriumüberladung der dopaminergen Neuronen stellt eine mögliche Form von metabolischem Streß dar. Es wurde gezeigt, daß eine hohe intrazelluläre Konzentration von Natrium direkt zur Aktivierung einer ATP-sensitiven Leitfähigkeit in dopaminergen Neuronen führen kann (Seutin et al., 1996). Möglicherweise könnte eine deutlich erhöhte Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase, die überschüssige Natriumionen aus Zellen herauspumpt, in *weaver* DA-Neuronen zu einem kritischen Absinken des ATP-Spiegels führen. Tatsächlich waren K_{ATP} -Kanäle in *weaver*

DA-Neuronen bei ausschließlicher SUR1-Expression tonisch aktiviert. Dies läßt den Schluß zu, daß die Aktivierung von SUR1-vermittelten K_{ATP} -Kanälen tatsächlich einen neuroprotektiven Effekt für die dopaminergen *weaver* SN Neuronen hat. Dieser Effekt könnte zumindest in der ersten Phase der selektiven Neurodegeneration entscheidend für ein Überleben sein. Die SUR2 exprimierende Population dopaminergere SN Neuronen, die eine weniger hohe metabolische Sensitivität besitzt, ist schon 14 Tage nach der Geburt in *weaver*-Mäusen nicht mehr nachzuweisen. Die besonders hohe Vulnerabilität dieser Neuronen könnte durch das Fehlen eines metabolisch aktivierbaren K_{ATP} -Kanals erklärt werden.

Diese Hypothese bietet eine Erklärungsmöglichkeit für das selektive Absterben von nur einer Teilpopulation dopaminergere Neuronen in *weaver*-Mäusen, obwohl alle SN Neuronen den mutierten *wvGirk2*-Kanal exprimieren und zwar in den meisten Fällen nicht in Kombination mit anderen Girk-Kanälen. Der Mechanismus, welcher der Degeneration von cerebellären Neuronen in *weaver*-Mäusen zugrunde liegt, wird wahrscheinlich ein völlig anderer sein. Dies wird auch durch die Tatsache illustriert, daß das cerebelläre Zellsterben apoptotisch ist, während die dopaminerge Degeneration eindeutig nicht durch eine klassische Form des programmierten Zelltods vermittelt wird (Wüllner et al., 1995; Oo et al., 1996). Das Schicksal der *wvGirk2* exprimierenden Zellen scheint also generell von ihrem spezifischen molekularbiologischen Kontext bestimmt zu sein.

4.5.3 K_{ATP} -Kanäle als molekulares Korrelat für differentielle Vulnerabilität?

Die extremen physiologischen Bedingungen in den dopaminergen *weaver* Neuronen stellen einen genetisch bedingten Sonderfall dar. Dennoch kann dieser Phänotyp als nur ein möglicher Mechanismus zur Induktion von metabolischem Streß in den SN Neuronen angesehen werden, so daß die eigentliche Frage nach der zugrundeliegenden Ursache der differentiellen Vulnerabilität dieser Neuronen offen bleibt.

Sollte die Expression von SUR1- K_{ATP} -Kanälen als metabolische Sensoren wirklich einen generellen neuroprotektiven Effekt besitzen und einer weniger vulnerablen Population von dopaminergere Neuronen gemeinsam sein? Die vorliegende Arbeit läßt diese Hypothese als Erklärungsansatz für differentielle Degeneration zumindest für die dopaminergere SN Neuronen zu. Für dieses Annahme würde auch der Befund sprechen, daß die Anzahl von [3 H]-Glibenklamid Bindungsstellen in der SN nach Behandlung mit 6-Hydroxydopamin nahezu unverändert bleibt, obwohl nach diesem Eingriff die Anzahl der

dopaminergen SN Neuronen dem Parkinson-Muster entsprechend drastisch reduziert ist (Dunn-Meynell et al., 1997).

Vorstellbar wäre, daß unterschiedlichste Formen von metabolischem Streß, wie z.B. freie Radikale, Vitaminmangel und Umweltgifte über viel Jahre kumulativ wirken und so unter anderem zu einer eingeschränkten Funktion des Komplex I der Atmungskette führen, wie er für Parkinson-Patienten bewiesen wurde. Die dopaminergen Neuronen, die durch den oxidativen Abbau ihres Neurotransmitters besonders anfällig für metabolische Beeinträchtigungen sind, könnten in Folge in einer Subpopulation von dopaminergen Neuronen den SUR1-vermittelten K_{ATP} -Kanal aktivieren, und deshalb im Vergleich zu den SUR2 exprimierenden Neuronen, denen dies nicht möglich ist, eine höhere Toleranz gegenüber exzitotoxischen Degenerationsprozessen aufweisen (vgl. 1.1.3).

In diesem Kontext ist von Bedeutung, daß das Arbeiten mit Herbiziden und Insektiziden eindeutig als ein Risikofaktor für die Entwicklung eines Parkinson-Syndroms identifiziert wurde, wobei die genauen Wirkstoffklassen nicht näher aufgeschlüsselt wurden (Seidler et al., 1996; Gorell et al., 1998). Für Rotenon bzw. MPTP-ähnliche Pestizide (z.B. Paraquat, Diquat) ist der Zusammenhang zur Parkinson-Krankheit offensichtlich (Hart, 1987; Jewess, 1994). Interessant ist, daß viele Herbizide Sulfonylharnstoff-Derivate sind, welche ein nur in Pflanzen vorkommendes Enzym blockieren (Brown und Cottemann, 1994). Können die Sulfonylharnstoff-Herbizide die Blut-Hirn-Schranke passieren, wäre vorstellbar, daß sie dort als K_{ATP} -Kanalblocker wirken und so eine durch metabolischen Streß induzierte Aktivierung dieser Kanäle verhindern. Dies würde wiederum chronische Depolarisation und daraus resultierende neurodegenerative Prozesse begünstigen.

Im Gegensatz dazu könnte die pharmakologische Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen in diesem Kontext möglicherweise einen ersten molekularen Ansatzpunkt für eine medikamentöse Protektion der dopaminergen Neuronen vor Degeneration darstellen.

4.6 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Protokolle zur Durchführung von Einzelzell-PCR-Experimenten und zur Etablierung von entsprechend geeigneten multiplex-PCRs haben sich auch für andere scPCR-Projekte als geeignet erwiesen. Inzwischen wurden in der Arbeitsgruppe multiplex-PCRs für die Einzelzell-Identifizierung von kalziumbindenden Proteinen, von A-Typ-Kaliumkanälen (vermitteln I_A), sowie von hyperpolarisationsaktivierten Kationenkanälen (vermitteln I_h) etabliert. Auch in Zukunft sollen weitere Projekte zur Untersuchung differentieller Genexpressionen auf Einzelzellebene durchgeführt werden. Da die Anzahl simultan nachweisbarer Transkripte weiterhin limitiert ist, liegt ein methodischer Schwerpunkt in der Arbeitsgruppe jetzt in der Untersuchung und Etablierung von Techniken, die zur Umgehung dieser Einschränkung geeignet sind. Damit soll eine umfassendere molekularbiologische und elektrophysiologische Analyse, perspektivisch bis zum kompletten "Expressionsprofiling" einzelner Neuronen, ermöglicht werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten pharmakologischen Untersuchungen zur Diazoxid- bzw. Pinacidilsensitivität von K_{ATP} -Kanälen in dopaminergen SN Neuronen lassen den Schluß zu, daß das pharmakologische Verhalten der nativen neuronalen K_{ATP} -Kanäle sich von dem entsprechender rekombinanter Kanäle unterscheidet. Eine quantitative Analyse der Pharmakologie könnte zur weiteren Klärung dieses Sachverhalts beitragen. Zur Zeit soll die Wirkung des im rekombinanten System für SUR2B-spezifischen K_{ATP} -Kanalöffners Nicorandil untersucht werden.

Die elektrophysiologische Charakterisierung der dopaminergen *weaver* Neuronen zeigte einen gain-of-function Phänotyp, mit Koaktivierung von $wvGirk2$ - und K_{ATP} -Kanälen. Auch hier sollen die pharmakologischen Effekte quantifiziert werden. Kopräinkubationsexperimente könnten zeigen, ob die vollständige Blockierung beider Kanal-Leitfähigkeiten den *weaver*-Phänotyp in situ "heilen" kann. Ebenfalls interessant wäre eine eingehendere Untersuchung der heterozygoten Tiere.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde die molekulare Struktur der K_{ATP} -Kanäle sowohl in den GABAergen als auch in den dopaminergen Neuronen der Substantia nigra aufgeklärt. Ausgehend von den vorliegenden Befunden werden zur Zeit immuncytochemische Arbeiten durchgeführt, um die K_{ATP} -Kanäle auf Proteinebene zu lokalisieren.

Zusätzlich liefert diese Arbeit mit differentieller SUR1 bzw. SUR2B-Expression das erste molekularbiologisch definierte Korrelat für die unterschiedlichen metabolischen Sensitivitäten der dopaminergen SN Neuronen. In weiteren Experimenten, z.B. in Slice-

Kulturen, könnte nun untersucht werden, ob die Expression von unterschiedlichen K_{ATP} -Kanälen direkt mit einer unterschiedlichen Vulnerabilität gegenüber toxischen Substanzen verschiedener Wirkstoffklassen korreliert ist. Der Befund, daß überlebende dopaminerge Neuronen in *weaver*-Mäusen ausschließlich SUR1-vermittelte K_{ATP} -Kanäle exprimieren, läßt den Schluß zu, daß dieser K_{ATP} -Kanal zumindest im selektiven Degenerationsprozeß der *weaver*-Maus eine neuroprotektive Rolle besitzt. Ob dies auch für das MPTP-Mausmodell der Parkinson-Krankheit gilt, soll demnächst in der Arbeitsgruppe in entsprechenden Tierversuchen untersucht werden. Deshalb ist es notwendig, die Patch-Clamp Technik für adulte Tiere zu etablieren. Die quantitative Wirkung von MPP^+ auf dopaminerge SN Neuronen wird bereits im Slice ermittelt. In weiterer Zukunft könnte an postmortem-Präparaten untersucht werden, ob die überlebenden dopaminergen Neuronen von Parkinson-Patienten ebenfalls nur noch SUR1 exprimieren. In diesem Zusammenhang wäre es ebenfalls interessant, die Wirkung von Sulfonylharnstoff-Herbiziden auf die SN Neuronen bzw. die unterschiedlichen K_{ATP} -Kanaltypen zu untersuchen.

Kann die Aktivierung eines SUR1-vermittelten K_{ATP} -Kanals nicht nur die unterschiedliche metabolische Sensitivität dieser Neuronen erklären, sondern auch ihre generelle unterschiedliche Vulnerabilität in Neurodegenerationsprozessen, würde dieser Kanal ein erstes pharmakologisches Target zur Beeinflussung der Degenerationsempfindlichkeit der Neuronen bieten. Dies könnte der erste Schritt zur Entwicklung eines Medikaments sein, mit dessen Hilfe es in weiter Zukunft möglich sein könnte, den der Parkinson-Krankheit zugrundeliegenden Neurodegenerationsprozeß aufzuhalten und diese Krankheit damit zu stoppen. Auch wenn dies jetzt noch sehr utopisch erscheint, sollte dieses ferne Ziel, daß nicht nur dieser Arbeit, sondern den meisten Forschungsprojekten an SN Neuronen zugrunde liegt, nicht aus den Augen verloren werden.

5 Zusammenfassung

ZUR MOLEKULARBIOLOGISCHEN ANALYSE DER GENEXPRESSION von einzelnen Neuronen wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Einzelzell-PCR-Protokoll entwickelt, mit dem es reproduzierbar möglich ist, nach elektrophysiologischer Charakterisierung eines Neurons dessen mRNA zu gewinnen und in einer anschließenden multiplex-RT-PCR simultan die Expression von bis zu acht Genen zu analysieren. Mit dieser Einzelzell-PCR Technik wurden insgesamt über 180 GABAerge und dopaminerge Substantia nigra Neuronen von C57Bl/6J- und *weaver*-Mäusen elektrophysiologisch und molekularbiologisch charakterisiert. Die dopaminergen Neuronen der Substantia nigra (SN) sind von besonderem Interesse, da eine Teilpopulation dieser Neuronen selektiv im fortschreitenden Verlauf der Parkinson-Krankheit sowie in Tiermodellen dieser Krankheit (z.B. den *weaver*-Mäusen) abstirbt.

DA METABOLISCHER STREß, insbesondere Komplex I-Inhibition der Atmungskette, als entscheidender Initiationsfaktor von Neurodegenerationsprozessen identifiziert wurde und ATP-sensitive Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle) das elektrische Verhalten von Neuronen direkt an ihren Energiestoffwechsel koppeln, stand die Analyse von K_{ATP} -Kanälen in der Substantia nigra im Mittelpunkt dieser Arbeit. Funktionelle tetradimere K_{ATP} -Kanäle bestehen aus zwei verschiedenen Untereinheiten: Einem Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR1/SUR2A/SUR2B) und einem einwärtsrektifizierenden Kaliumkanal (Kir6.1/Kir6.2).

IN DER VORLIEGENDEN ARBEIT WURDE ERSTMALS die molekulare Komposition der K_{ATP} -Kanäle in SN Neuronen identifiziert: Elektrophysiologisch und molekularbiologisch als GABAerg identifizierte Neuronen der SN Pars compacta lieferten keine Hinweise auf die Expression von K_{ATP} -Kanälen. GABAerge Neuronen der SN Pars reticulata exprimierten dagegen funktionelle K_{ATP} -Kanäle mit einer hohen metabolischen Sensitivität und einer ebenfalls hohen Affinität für den K_{ATP} -Kanalblocker Tolbutamid. Die Einzelzell-PCR-Analysen lassen den Schluß zu, daß diese K_{ATP} -Kanäle aus den Untereinheiten SUR1 und Kir6.2 gebildet werden. In dopaminergen SN Neuronen wurden dagegen mittels Einzelzell-PCR drei unterschiedliche mRNA-Expressionsmuster von K_{ATP} -Kanal Untereinheiten identifiziert. 39% aller analysierten Neuronen exprimierten SUR1 und Kir6.2, 37% exprimierten SUR2B und Kir6.2 und 24% zeigten Koexpression von SUR1, SUR2B und Kir6.2. Pharmakologische Untersuchungen der dopaminergen Neuronen wiesen ebenfalls auf mindestens zwei Typen von funktionellen K_{ATP} -Kanälen mit unterschiedlichen Affinitäten für die K_{ATP} -Kanalöffner Diazoxid und Pinazidil und den

Kanalblocker Tolbutamid hin. Die mRNA-Expression der verschiedenen SUR-Isoformen konnte eindeutig mit unterschiedlichen Sensitivitäten gegenüber Rotenon, einem Blocker des Komplex I der Atmungskette, korreliert werden. Die SUR1 exprimierenden dopaminergen Neuronen zeigten auf Einzelzellebene eine 200fach höhere Rotenonempfindlichkeit im Vergleich zu SUR2B exprimierenden Neuronen. Dopaminerge SN Neuronen, die beide SUR-Isoformen exprimierten, zeigten eine metabolische Sensitivität, die zwischen diesen beiden Extremen lag. Nur der SUR1 vermittelte K_{ATP} -Kanal wurde bereits durch eine partielle Inhibition der Atmungskette, wie sie bei Parkinson-Patienten nachgewiesen wurde, aktiviert.

DA BEI *WEAVER*-MÄUSEN wie bei der Parkinson-Krankheit eine mediale, calbindinpositive Subpopulation von dopaminergen Neuronen die fortschreitende Degeneration überlebt, wurden die SN Neuronen in 14 Tage alten *weaver*-Mäusen in der vorliegenden Arbeit erstmalig umfassend charakterisiert. Die molekulare Ursache für den *weaver*-Phänotyp ist eine Punktmutation im Gen für den durch G-Proteine aktivierbaren Kaliumkanal *Girk2*. Die elektrophysiologische Untersuchung ergab, daß diese Punktmutation eine Funktionsänderung des *Girk2*-Kanals zur Folge hat (gain-of-function): Der mutierte *Girk2*-Kanal ist in den dopaminergen SN Neuronen ständig aktiv, hat seine Kaliumselektivität verloren und kann durch G-Proteine nicht weiter aktiviert werden. Durch einen ständigen Natriumeinstrom waren die dopaminergen Neuronen chronisch depolarisiert und nicht mehr spontanaktiv. Außerdem wurde gezeigt, daß die dopaminergen Neuronen von *weaver*-Mäusen im Gegensatz zum Wildtyp bereits aktivierte K_{ATP} -Kanäle besitzen, die ebenfalls zu dem elektrophysiologischen *weaver*-Phänotyp dieser Neuronen beitragen.

MITTELS EINZELZELL-PCR wurde zudem die Expression der gesamten Familie von G-Protein gekoppelten Kaliumkanälen (*Girk1* bis 4) untersucht. Es wurde gezeigt, daß die meisten dopaminergen SN Neuronen ausschließlich *Girk2*-mRNA exprimieren, und daß der geänderte Phänotyp dieser Neuronen in *weaver* nicht mit einem speziellen Expressionsmuster an *Girk1*- bis *Girk4*-mRNA korreliert ist. Im Gegensatz dazu exprimierten alle überlebenden dopaminergen Neuronen in 14 Tage alten *weaver*-Mäusen ausschließlich SUR1- und *Kir6.2*-mRNA, während dopaminerge SN Neuronen aus gesunden Geschwistertieren in den C57Bl/6J-Mäusen entsprechendes heterogenes Expressionsmuster der verschiedenen SUR-Untereinheiten zeigten. Weitere Einzelzell-PCR-Experimente ergaben, daß diese überlebenden Neuronen ebenfalls calbindinpositiv waren. Dieser Befund legt nahe, daß die Aktivierung von SUR1/*Kir6.2* K_{ATP} -Kanälen, die

wahrscheinlich durch chronischen Natriumeinstrom vermittelt wird, in den Mechanismus des selektiven Überlebens einer Subpopulation von dopaminergen SN Neuronen in *weaver*-Mäusen involviert ist.

DIE VORLIEGENDEN ARBEIT IDENTIFIZIERT somit die differentielle K_{ATP} -Kanal Expression als ein molekulares Korrelat für die unterschiedlichen Sensitivitäten dopaminerges SN Neuronen gegenüber metabolischem Streß. Weitere Untersuchungen sollen zeigen, ob die funktionelle Expression von unterschiedlichen K_{ATP} -Kanaltypen auch eine Rolle im selektiven Degenerationsprozeß der Parkinson-Krankheit spielt.

6 Literaturverzeichnis

Adelbrecht C, Agid Y, Raisman-Vozari R (1996): Effect of the *weaver* mutation on the expression of dopamine membrane transporter, tyrosine hydroxylase and vesicular monoamine transporter in dopaminergic neurons of the substantia nigra and the ventral tegmental area. *Molecular Brain Res.* 43; 291-300.

Adelbrecht C, Murer MG, Lauritzen I, Lesage F, Ladzunski M, Agid Y, Raisman-Vozari R (1997): An immunocytochemical study of a G-protein-gated inward rectifier K⁺ channel (Grik2) in the weaver mouse mesencephalon. *NeuroReport* 8; 969-974.

Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP, Boyd AE et al., (1995): Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 268; 423-426.

Aguilar-Bryan L, Clement JP, Gonzales G, Kunjilwar K, Babenkow A, Bryan J (1998): Towards understanding the assembly and structure of K_{ATP} channels. *Physiol Rev* 78; 227-245.

Airaksinen MS, Thoenen H, Meyer M (1997): Vulnerability of midbrain dopaminergic Neurons in calbindin-D28k-deficient mice: Lack of evidence for a neuroprotective role of endogenous calbindin in MPTP-treated and *weaver* mice. *Europ J Neurosci* 9; 120-127.

Andrade R (1991): Blockade of neurotransmitter-activated K⁺ conductance by QX-314 in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol* 199; 259-262.

Ashcroft FM (1996): Sweet news for hypoglycaemic babies. *Nature Medicine*, 2, 1301-1302.

Ashcroft FM (1998): Exciting times for PIP₂. *Science* 282; 1059-1060.

Ashcroft FM, Gribble FM (1998): Correlating structure and function in ATP-sensitive K⁺ channels. *Trends Neurosci* 21; 288-294.

Ashcroft SJH, Ashcroft FM (1990): Properties and function of the ATP-sensitive K-channels. *Cell Signal* 2; 197-214.

Ashford MLJ, Boden PR, Treherne JM (1990): Tolbutamide excites rat glucoreceptive ventromedial hypothalamic neurones by indirect inhibition of ATP-K⁺-channels. *Br J Pharmacol* 101; 531-540.

Babenkow AP, Aguilar-Bryan L, Bryan J (1998): A view of SUR/Kir6.X, K_{ATP} Channels. *Annu Rev Physiol* 60; 667-687.

- Bähr M (1997): Exkurs 3.1: Methodenvergleich Differential-display versus Subtraktive Hybridisierung. In: Klinische Neurobiologie, Herdegen, Tölle, Bähr (eds.), Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; 94-97
- Bargmann CI (1998): Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science* 282; 2082-203.
- Baukowitz T, Schulte U, Oliver D, Herlitze S, Krauter T, Tucker SJ, Ruppertsberg JP, Fakler B (1998): PIP₂ and PIP as determinants for ATP inhibition of K_{ATP} channels. *Science* 282; 1141-1144.
- Beal M (1996): Mitochondria, free radicals and neurodegeneration. *Curr Opin Neurobiol* 6; 661-666.
- Bergman H, Feingold A, Nini A, Raz A, Slovin H, Abeles M, Vaadia E (1998): Physiological aspects of information processing in the basal ganglia of normal and parkinsonian primates. *Trends Neurosci* 21, 32-38
- Bezannila F, Armstrong CM (1977) Inactivation of the sodium channel: I. Sodium current experiments. *J Gen Physiol* 70; 549-566.
- Birkmayer W, Danielczyk W (1991): Die Parkinsonkrankheit: Ursachen-Symptome-Behandlung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Birnboim HC, Doly J (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7; 1513-1523.
- Bonini JA, Hofmann C (1991): A rapid, accurate, nonradioactive method for quantitating RNA on agarosegels. *BioTechniques* 11; 708-709
- Brenner M (1994): Structure and transcriptional regulation of the GFAP gene. *Brain Pathol* 4; 245-257.
- Brown HM, Cotterman JC (1994): Recent advances in sulfonylurea herbicides. In: *Chemistry of Plant Protection* 10; Springer Verlag Berlin Heidelberg; 47-82.
- Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DJ, Kopin IJ (1983): A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci USA* 80; 4546-4550.
- Cauli B, Audinat E, Lambollez B, Angulo NC, Ropert N, Tsuzuki K, Hestrin S, Rossier J (1997): Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J Neuroscience* 17; 3894-3906.
- Chamberlain JS and Chamberlain JR (1994): Optimization of multiplex PCRs. In: *The polymerase chain reaction*, Mullis KB, Ferre' F, Bibbs RA (eds.), Birkhäuser Boston; 38-46.

- Chan KW, Sui JL, Vivaudou M, Logothetis DE (1996): Control of channel activity through a unique amino acid residue of a G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 93; 14193-14198.
- Chen SC, Erhard P, Goldowitz D, Smeyne RJ (1997) Developmental expression of the GIRK family of inward rectifying potassium channels: implications for abnormalities in the weaver mutant mouse 778; 251-264.
- Chesselst MF, Delfs JM (1996): Basal ganglia and movement disorders: an update. *Trends Neurosci* 10; 417-422
- Choi DW (1992): Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 23; 1261-1276
- Choi DW (1995): Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trend Neurosci* 18; 58-60.
- Chou Q, Russel M, Birch DE, Raymond J, Bloch W (1992): Prevention of pre-PCR mispriming and primer-dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res.* 20; 1717-1723.
- Chutkow W, Simon M, Le Beau M, Burant C (1996): Cloning, tissue expression and chromosomal localisation of SUR2, the putative drug-binding subunit of cardiac, skeletal muscle and vascular K_{ATP} channels. *Diabetes* 45; 1439-1445.
- Clapham DE (1994): Direct G-protein activation of ion channels? *Ann. Rev. Neurosci*, 17; 441-464.
- Clement JP, Kunjilwar K, Gonzales G, Schwanstecher M, Panten U (1997): Association and stoichiometry of KATP channel subunits. *Neuron* 18; 827-838.
- Dascal N (1997): Signalling via the G-protein-activated K⁺ channels. *Cell. Signal.* 9; 551-573.
- Demolombe S, Escande D (1996): ATP-binding cassette proteins as targets for drug discovery. *Trends in Pharmacological Science.* 17; 273-275.
- Doering F, Derst C, Wischmeyer E, Karschin C, Schneggenburger R, Daut J, Karschin A (1998): The epithelial inward rectifier channel Kir7.1 displays unusual K⁺ permeation properties. *J Neurosci* 18; 8625-8636.
- Dotd HU, Zieglgänsberger W (1990) Visualizing unstained neurons in living brain slices by infrared DIC-videomicroscopy. *Brain Res* 537; 333-336.
- Doyle DA, Morais J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998): The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280; 69-77.

Doupnik CA, Davidson N, Lester HA (1995): The inward rectifier potassium channel family. *Curr Opin Neurobiol* 5; 268-277.

Dulac C (1998): Cloning of genes from single neurons. *Curr Top Develop Biol* 36; 245-259.

Dunn-Meyell AA, Routh VH, McArdla JJ, Levin BE (1997): Low-affinity sulfonylurea binding site reside on neuronal cell bodies in the brain. *Brain Res* 745; 1-9.

Eberwine JH (1996): Amplification of mRNA population using aRNA generated from immobilized oligo(dT)-T7 primed cDNA. *BioTechniques* 20; 584-591.

Eberwine JH, Crino P, Dichter M (1995): Single-cell mRNA amplification: Implications for basic and clinic neuroscience. *The Neuroscientist* 1; 200-211..

Eberwine JH, Yeh H, Miyashio K, Cao Y, Suresh N, Finnel R, Zettel M, Coleman P (1992): Analysis of gene expression in single live neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 89; 010-3014.

Edward MC and Gibbs R (1994): Multiplex PCR: Advantage, development, and applications. *PCR Methods and Applications* 3; 65-75.

Edwards FA, Konnerth A, Sakmann B, Takahashi T (1989): A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. *Pflügers Arch* 414; 600-612.

Finta EP, Harms L, Sevcik J, Fischer H-D, Illes P (1993): Effects of potassium channel openers and their antagonists on rat locus coeruleus neurones. *Br J Pharmacol* 109; 308-315.

Flint AC, Maish US, Weishaupt JH, Kriegstein AR, Monyer H (1997): NR2A subunit expression shortens NMDA receptor synaptic currents in developing neocortex. *J Neurosci* 17; 2469-2476

Fox AP, Dlouhy S, Ghetti B, Hurley JH, Nucifora PGP, Nelson DJ, Won L, Heller A (1998): Altered responses to potassium in cerebellar neurons from *weaver* heterozygous mice. *Exp brain Res* 123; 298-306.

Fujimura N, Tanaka E, Yamamoto S, Shigemori M, Higashi H (1997): Contribution of ATP-sensitive potassium channels to hypoxic hyperpolarisation in rat hippocampal CA1 neurons in vitro. *J Neurophysiol* 77; 378-385.

Gaspar P, Ben-Jelloun N, Febvret A (1994): Sparing of the dopaminergic neurons containing calbindin-D_{28k} and of the dopaminergic mesocortical projections in *weaver* mutant mice. *Neuroscience* 61; 293-305.

Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P, Monyer H (1995): Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* 15, 193-204.

- Gelband CH, McCullough (1993): Modulation of rabbit aortic Ca^{2+} -activated K^+ channels by pinacidil, chromakalim, and glibenclamide. *Am J Physiol* 264; C1119-C1127.
- Gerlach M, Riederer P (1996): Animal models of Parkinson's disease: An empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J Neural Transm* 103; 987-1041.
- Graybiel AM, Ohta K, Roffler-Tarlov S (1990): Patterns of cell and fiber vulnerability in the mesostriatal system of the mutant mouse *weaver*. I. Gradients and compartments. *J Neurosci* 10; 720-733.
- Gribble FM, Tucker SJ, Ashcroft FM (1997): The essential role of the Walker A motifs of SUR1 in K_{ATP} channel activation by Mg-ADP and diazoxide. *EMBO J* 16; 1145-1152.
- Gilman AG (1987): G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56; 615-649.
- Gorell JM, Johnson CC, Rybicki BA, Peterson EL, Richardson RJ (1998): The risk of parkinson's disease with exposure to pesticide, farming, well water, and rural living. *Neurology* 50; 1346-1350.
- Greif KF, Tillkaratne NJ, Erlander MG, Feldblum S, Tobin AJ (1992): Transient increase in expression of a glutamate decarboxylase (GAD) mRNA during the postnatal development of the rat striatum. *Dev Biol* 153; 158-164
- Guatteo E, Federici M, Siniscalchi A, Hnöpfel T, Mercuri NB, Bernardi G (1998): Whole cell patch-clamp recordings of rat midbrain dopaminergic neurons isolate a sulfonylurea- and ATP-sensitive component of potassium currents activated by hypoxia. *J Neurophysiol* 79; 1239-1245.
- Gurantz D, Ribera AB, Spitzer NC (1996): Temporal regulation of *Shaker*- and *Shab*-like potassium channel gene expression in single embryonic spinal neurons during K^+ current development. *J Neurosci* 16; 3278-3295.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981): Improved Patch-Clamp technique for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391; 85-100.
- Hannah M, Bathia K (1997): Movement disorders and mitochondrial dysfunction. *Curr Opin Neurol* 10; 351-356.
- Hardmann CD, McRitchie DA, Halliday GM, Cartwright HR, Morris JGL (1996): Substantia nigra pars reticulata neurons in Parkinson's disease. *Neurodegeneration* 5;49-55.
- Hart TB (1987): Parkinson's disease and pesticides. *Lancet* 1; 38.

Hassler R (1938): Zur Pathologie der Paralysis agitans und des postencephalitischen Parkinsonismus. *J Psychol Neurol* 48; 387-455

Hartley A, Stone JM, Heron C, Cooper JM, Schapira AH (1994): Complex I inhibitors induce dose-dependent apoptosis in PC12 cells: Relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 63; 1987-1990.

Häusser MA, Weille JR, Lazdunski M (1991): Activation by chromakalim of pre- and post-synaptic ATP-sensitive K⁺ channels in substantia nigra. *Biochem Biophys Res Comm* 174; 909-914.

Hedin KE, Lim NF, Clapham DE (1996): Cloning of a *Xenopus laevis* inwardly rectifying K⁺ channel subunit that permits Girk1 expression of IK_{ACh} currents in oocytes. *Neuron* 16; 423-429.

Heginbotham L, Lu Z, Abrahmson T, MacKinnon R (1994): Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys J* 66; 1061-1067.

Heikkila RE, Sonsalla PK (1987): The use of the MPTP-treated mouse as an animal model of parkinsonism. *Can J Neurol Sci* 14; 436-440.

Hicks GA, Hudson AL, Henderson G (1994): Localisation of high affinity [³H]glibenclamide binding sites within the substantia nigra zona reticulata of the rat brain. *Neurosci* 61; 285-292.

Hill CF (1909) The mode of action of nicotine and curare determined by the form of the concentration curve of temperature coefficients. *J Physiol* 39; 361-73.

Hille B (1992a): G protein-coupled mechanisms and nervous signalling. *Neuron* 9; 187-195

Hille B (1992b): Potassium channels and chloride channels: Inward rectifiers permit long depolarising responses. In: *Ionic channels of excitable membrane*, 2.Aufl., 127-130.

Hirsch E, Mouatt C, Thomasset M, Javoy-Agid F, Agid Y, Graybiel AM (1992): Expression of calbindin-D28k-like immunoreactivity in catecholaminergic cell groups of the human midbrain: normal distribution and distribution in Parkinson's disease. *Neurodegeneration* 1, 83-93.

Hirsch E, Faucheux B, Damier P, Mouatt-Prigent A, Agid Y (1997): Neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 50; 79-88.

Ho K (1998): The ROMK-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator connection: new insights into the relationship between ROMK and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Curr Opin Nephrol and Hypertens* 7; 49-58.

- Huang CL, Feng S, Hilgemann DW (1998): Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP₂ and its stabilisation by Gβγ. *Nature* 391; 803-806.
- Inagaki N, Gomoi T, Clement JP, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Seino S (1995a): Reconstitution of I_{KATP}: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 270; 1166-1170.
- Inagaki N, Tsuura Y, Namba N, Masuda K, Gono T, Horie M, Seino Y, Mizuta M, Seino S (1995b): Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle and heart. *J Biol Chem* 270; 5691-5694.
- Inanobe A, Yoshimoto Y, Horio Y, Morishiga KI, Hibino H, Matsumoto S, Tokunaga Y, Maeda T, Hata Y, Takai Y, Kurachi Y (1999): Characterisation of G-protein gated K⁺ channels composed of Kir3.2 subunits in dopaminergic neurons of the substantia nigra. *J Neurosci* 19; 1006-1017.
- Inoue H, Ferrer J, Welling CM, Elbein SC, Hoffmann M, Mayorga R, Warrenperry M, Zhang Inoue H, Ferrer J, Welling CM, Elbein SC, Hoffmann M, Mayorga R, Warrenperry M, Zhang Y, Millns H, Turner R, Province M, Bryan J, Permutt MA, Aguilar-Bryan L (1996): Sequence variants in the sulfonylurea receptor (SUR) gene are associated with NIDDM in caucasians. *Diabetes* 45; 825-831.
- Inoue H, Nojima H, Okajama H (1990): High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* 96; 23-28.
- Isom LL, deJongh KS, Catterall WA (1994): Auxiliary subunits of voltage-gated ion channels. *neuron* 12; 1183-1194.
- Isomoto S, Kondo C, Kurachi Y (1997a): Inwardly rectifying potassium channels: Their molecular heterogeneity and function. *Jpn J Physiol* 47; 11-39.
- Isomoto S, Kondo C, Takahashi N, Matsumoto S, Yamada M, Tukumi T, Horio Y, Kurachi Y (1996a) A novel ubiquitously distributed isoform of Girk2 (GIRK2b) enhances Girk1 expression of the G-protein-gated K-current in Xenopus oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 218; 286-291.
- Isomoto S, Kondo C, Yamada M, Matsumoto S, Higashiguci O, Horio Y, Matsuzuwa Y, Kurachi Y (1996b): A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K⁺ channel *J Biol Chem* 271; 24321-24324.
- Isomoto S, Kurachi Y (1997b): Function, regulation, pharmacology, and molecular structure of ATP-sensitive K⁺ channels in the cardiovascular system. *J Cardiovasc Electrophysiol* 8; 1431-1446.
- Iwata N, Kobayashi K, Sasaoka T, Hikada H, Nagatsu T (1992): Structure of the mouse tyrosine hydroxylase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 182; 348-354.

Jewess PJ (1994): Insectizides and aricides witch act at the rotenon-binding site of mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase; complete displacement studie using a [³H]-labelled rotenone analogue. *Biochem Soc Trans* 22; 247-251.

Johansen FF, Lambolez B, Audinat E, Bochet P, Rossier J (1995): Single cell RT-PCR proceeds without risk of genomic DNA amplification. *Neurochem Int* 26; 239-243.

Johnson S, North R (1992): Two types of neurons ins the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs. *J Physiol* 450; 455-468.

Jonas P, Racca C, Sakmann B, Seeburg PH, Monyer H (1994): Differences in Ca²⁺ permeability of AMPA receptor channels in neocortical neurons caused by differential GluR-B subunit expression. *Neuron* 12; 1281-1289.

Karschin A, Brockhaus J, Ballanyi K (1998): K_{ATP}-Kanal channel formation by SUR1 receptors with Kir6.2 subunits in rat dorsal vagal neurons in situ. *J Physiol* 509; 339-346.

Karschin C, Dissmann E, Stühmer W, Karschin A (1996): IRK(1-3) and GIRK(1-4) inwardly rectifying K channel mRNAs are differentially expressed in the adult rat brain. *J Neurosci* 16; 3559-3570.

Karschin A, Wischmeyer E, Döring F, Karschin C (1997): Kalium-Einwärtsgleichrichter – ursprüngliche Kanalstrukturen als Basis funktioneller Vielfalt. *Neuroforum* 4; 127-132.

Katz B (1949): Les constantes e´lectriques de la membrane du muscle. *Arch Sci Physiol* 3; 285-299.

Kofuji P, Hofer M, Millen KJ, Millonig JH, Davidson N, Lester HA, Hatten ME (1996). Functional analysis of the *weaver* mutant GirK2 K⁺ channel and rescue of *weaver* granule cells. *Neuron* 16; 941-952.

Krapivinski G, Gordon EA, Wickmann K, Velimirovic B, Krapivinsky L, Clapham DE (1995): The G-protein gated K⁺ channel IKACH is a heteromultimer of two inwardly rectifying K-channel proteins. *Nature* 374; 135-141.

Krapivinsky G, Medina I, Eng L, Krapivinsky L, Yang Y, Clapham DE (1998): A novel inward rectifier K⁺ channel with unique pore properties. *Neuron* 20; 995-1005.

Kubo Y, Reuveny E, Slesinger PA, Jan YN, Jan LY (1993): Primary structure and functional expression of rat G-protein-coupled muscarinic potassium channel. *Nature* 364; 802-806.

Lacey M, Mercuri N, North R (1989): Two cell types in rat substantia nigra zona compacta distinguished by membrane properties and the actions of dopamine and opioids. *J Neurosci* 9, 1233-1241.

Lambolez B, Audinat E, Bochet P, Crépel F, Rossier J (1992): AMPA receptor subunits expressed by single purkinje cells. *Neuron* 9; 247-258.

Lambolez B, Audinat E, Bochet P, Rossier J (1994): Patch clamp recording and RT-PCR on single cells. *Praktische Anleitung, Praktikumsvorschrift*; 10-11.

Lane PW (1964): New mutation: *Weaver*, wv. *Mouse News Letter* 30, 32-33.

Lang AE, Lozano AM (1998): Parkinsons Disease, second of two parts. *N J Engl Med* 339; 1130-1143.

Langmuir I (1918): The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *Journal of the American Chemical Society* 40; 1361-1403.

Lawson K (1996): Potassium channel activation: a potential therapeutic approach? *Pharmacol Ther* 70; 39-63.

Lee K, Dixon A, Freeman T, Richardson P (1998): Identification of an ATP-sensitive potassium channel current in rat striatal cholinergic interneurons. *J Physiol* 510; 441-453.

Leonhardt N, Marin E, Vavasseur A, Forestier C (1997): Evidence for the existence of a sulfonylurea-receptor-like protein in plants: Modulation of stomatal movements and guard cell potassium channels by sulfonylureas and potassium channel openers. *Proc Natl Acad Sci USA* 94; 14156-14161.

Lesage F, Duprat F, Fink M, Guillemare E, Coppola T, Lazdunski M, Huguenot JP (1994): Cloning provides evidence for a family of inward rectifier and G-coupled K⁺ channels in brain. *FEBS Lett* 353; 37-42.

Levin BE, Dunn-Meynell AA (1997): In vivo and in vitro regulation of [³H]glyburide binding to brain sulfonylurea receptors in obesity-prone and resistant rats by glucose. *Brain Res* 776; 146-153.

Li H, Gyllenstein UB, Cui X, Saiki RK, Erlich HA, Arnheim N (1988): Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature* 335; 414-417.

Liang P, Pardee AB (1992): Differential Display of eukaryotic messenger mRNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257, 967-971.

Liesi P, Jan YN, Jan LY (1997): BAPTA-AM and ethanol protect cerebellar granule neurons from the destructive effect of the *weaver* gene. *J Neurosci Res* 48; 571-579.

Lipron P et al (1995): Making the best of brain slices: comparing preparative methods. *J Neurosci Methods* 59; 151-156.

Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ, Clapham DE (1987): The $\beta\gamma$ subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K channel in heart. *Nature* 325; 321-326.

Lopez JR, Ghanbari RA, Terzic A (1996): A K_{ATP} channel opener protects cardiomyocytes from Ca^{2+} waves: a laser confocal microscopy study. *Am J Physiol* 270; H1384-1389.

MacKinnon R (1991): Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 350; 232-235.

Martina M, Schultz JH, Ehmke H, Monyer H, Jonas P (1998): Functional and molecular differences between voltage-gated K^+ channels of fast spiking interneurons and pyramidal neurons of rat hippocampus.

Mercuri N, Bonci A, Johnson S, Stratta F, Calibresi P, Bernadi G (1994): Effects of anoxia on rat midbrain dopamine neuron. *J Neurophysiol* 71; 1165-1173.

Mermelstein PG, Song W-J, Tkach T, Yan Z, Surmeier J (1998): Inwardly rectifying potassium (IRK) current are correlated with IRK subunit expression in rat nucleus accumbens medium spiny neurons. *J Neurosci* 18; 6650-6661.

Miller JA, Velayo NL, Dage RC, Rampe D (1991): High affinity [3H]glibenclamide binding sites in rat neuronal and cardiac tissue: localization and developmental characteristics. *J Pharmacol Exp Ther* 256; 358-364.

Monyer H, Jonas P (1995): Polymerase chain reaction analysis of ion channel expression in single neurons of brain slices. In: *Single-Channel Recording*, Sakmann and Neher (eds.), 2. Aufl., Plenum Press, New York; 357-371.

Monyer H, Lambolez B (1995): Molecular biology and physiology at the single-cell level. *Curr Opin Neurobiol* 5; 382-387.

Münch G, Gerlach M, Sian J, Wong A, Riederer P (1998): Advanced glycytion and products in neurodegeneration: more than early markers of oxidative stress? *Ann Neurol* 44; S85-88

Murphy KPSJ, Greenfield SA (1991): ATP-sensitive potassium channels counteract anoxia in neurone of the substantia nigra. *Exp Brain Res* 84; 355-358.

Navarro B, Kennedy ME, Velimirovic B, Bhat D, Peterson AS, Clapham DE (1996): Nonselective and G betagamma-insensitive *weaver* K^+ channels. *Science* 272; 1950-1953.

Neher E, Sakmann B. (1976): Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260; 799-801.

Nelson CS, Marino JL, Allen CN (1997): Cloning and characterisation of Kir3.1 (Girk1) C-terminal alternative splice variants. *Brain res Mol Brain res* 46; 185-196.

Nelson EL, Liang CL, Sinton CM, German DC (1996): Midbrain dopaminergic neurons in the mouse: computer assisted mapping. *J Comp Neurol* 369; 361-371.

Nernst W (1888): Zur Kinetik der in Lösung befindlichen Körper. *Theorie der Diffusion. Zeitschrift für Physikalische Chemie* 2; 613-637.

Nichols CG, Lopatin AN (1997): Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol* 59; 171-191.

Noma A (1983): ATP-regulated K⁺-channels in cardiac muscle. *Nature* 305; 147-148.

Numberger M, Draguhn A (1996): *Patch-Clamp Technik*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.

Okujama Y, Yamada M, Kondo C, Satoh E, Isomoto S, Shindo T, Horio Y, Kitakaze M, Hori M, Kurachi Y (1998): The effect of nucleotides and potassium channel openers on the SUR2a/Kir6.2 complex K⁺ channel expressed in a mammalian cell line, HEK293T cells. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 435; 595-603.

Oo TF, Blazeski R, Harrison SM, Henchcliffe C, Mason CA, Roffler-Tarlov SK, Burke RE (1996): Neuronal death in the substantia nigra of *weaver* mouse occurs late in development and is not apoptotic. *J Neurosci* 16; 6134-6145.

Pape HC (1996): Queer current and pacemaker: The hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol* 58; 299-327.

Partiseti M, Collura V, Agnel M, Culouscou JM, Graham D (1998): Cloning and characterisation of a novel human inwardly rectifying potassium channel predominantly expressed in small intestine. *FEBS Lett* 434; 171-176.

Patil N, Cox DR, Bhat D, Faham M, Myers RM, Peterson AS (1995) A potassium channel mutation in *weaver* mice implicates membrane excitability in granule cell differentiation. *Nature Genetics* 11; 126-129.

Perkins KL, Wong RK (1995): Intracellular QX-314 blocks the hyperpolarization-activated inward current I_q in hippocampal CA1 pyramidal cells. *J Neurophysiol* 73; 911-915.

Plant T, Schirra C, Garaschuk O, Rossier J, Konnerth A (1997): Molecular determinants of NMDA receptor function in GABAergic neurones of rat forebrain. *J Physiol* 499; 47-63.

Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Die SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R (1997): Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276; 2045-2047.

Pongs O (1997): Strukturmerkmale Kalium-selektiver Ionenkanäle. *Biospektrum* 3; 21-26.

Przedborski S, Jackson-Lewis V (1998): Experimental developments in movement disorders: update on proposed free radical mechanisms. *Curr Opin Neurol* 11; 335-339.

Quayle JM, Nelson MT, Standen NB (1997): ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev* 77; 1165-1232.

Ramm B, Hoffmann G (1987): t-Verteilung, t-Test. In: *Biomathematik*, 3. Aufl., Ferdinand Enke Verlag Stuttgart; 170-176

Rappolee DA, Wang A, Mark D, Werb Z (1989) Novel method for studying mRNA phenotypes in single or small number of neurons. *J Cell Biochem* 39; 1-11.

Renner C, Trumpner L, Pfitzmeier JP, Loftin U, Gerlach K, Tehle I, Wasle A, Pfreundschuh M (1998): Differential mRNA display at the single-cell level. *Biotechniques* 24; 720-724.

Richards CTS, Kitai S (1997): Electrophysiological and immunocytochemical characterisation of GABA and dopamine neurons in the substantia nigra of the rat. *Neuroscience* 80; 545-557.

Roffler-Tarlov S, Graybiel AM (1987): The postnatal development of the dopamine-containing innervation of dorsal and ventral striatum: effects of the *weaver* gene. *J Neurosci* 7; 2364-2372.

Röper J, Ashcroft FM (1995): Metabolic inhibition and low internal ATP activate K-ATP channels in rat dopaminergic substantia nigra neurons. *Pflügers Arch* 430; 44-54.

Röper J, Hainsworth AH, Ashcroft FM (1990a): Tolbutamide reverses hypoglycaemia-induced hyperpolarization in guinea-pig isolated substantia nigra neurons. *J Physiol (Lond)* 426; 68P.

Röper J, Hainsworth AH, Ashcroft FM (1990b): ATP-sensitive K channels in guinea-pig isolated substantia nigra neurons are modulated by cellular metabolism. *J Physiol (Lond)* 430; 130P.

Rossi P, De Fillipi G, Armano S, Taglietti V, D'Ángelo E (1998): The *weaver* mutation causes a loss of inward rectifier current regulation in premigratory granule cells of the mouse cerebellum *J Neurosci* 18; 3537-3547.

Ruano D, Lambolez B, Rossier J, Paternain AV, Lerma J (1995): Kainate receptor subunits expressed in single cultured hippocampal neurons. *Neuron* 14; 971-978.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239; 487-491.

Sakmann B, Stuart G (1995) Patch-pipette recordings from the soma, dendrites and axon of neurons in brain slices. In: *Single channel Recording*, Sakmann B, Neher E (eds.), 2. Aufl., Plenum Press, New York; 199-211.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989): *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2. Aufl., Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, New York.

Sanchez JA, Gono T, Inagaki N, Katada T, Seino S (1998): Modulation of reconstituted ATP-sensitive K^+ channels by GTP-binding proteins in a mammalian cell line. *J Physiol* 507; 315-324.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 74; 5463-5467.

Sawtell NM (1997): Comprehensive quantification of herpes simplex virus latency at the single-cell level. *J Virol* 71; 5423-5431.

Schapira AHV (1996): Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration. *Curr Opin Neurol* 9; 260-263.

Schwanstecher C, Panten U (1993): Tolbutamide- and diazoxide-sensitive K^+ channels in neurons of the substantia nigra pars reticulata. *Naumyn Schmied Arch Pharmacol* 349; 113-117.

Schwanstecher M, Sieverding C, Dorschner H, Gross I, Aguilar-Bryan L, Schwanstecher C, Bryan J (1998): Potassium channel openers require ATP to bind to and act through sulfonylurea receptors. *EMBO J* 17; 5529-5536.

Seidler A, Hellenbrand W, Robra B-P; Vieregge P, Nischan P, Joerg J, Oertel WH, Ulm G, Schneider E (1996): Possible environmental, occupational, and other etiological factors for Parkinson's disease: A case-control study in Germany. *Neurology* 46; 1275-1284.

Seutin V, Shen KZ, North R, Johnson S (1996): Sulfonylurea-sensitive potassium current evoked by sodium loading in rat midbrain dopamine neurons. *Neuroscience* 71; 709-719.

Sewing S, Roeper J, Pongs O (1996a): Kv beta 1 subunit binding specific for shaker-related potassium channel alpha subunits. *Neuron* 16; 455-463.

Sewing S, Roeper J, Pongs O (1996b): Struktur und Funktion spannungsabhängiger K⁺-Kanäle. *Neuroforum* 2; 21-28.

Shindo T, Yamada M, Isomoto S, Horio Y, Kurachi Y (1998): SUR2 subtype (A and B)-dependent differential activation of the cloned ATP-sensitive K⁺ channels by pinacidil and nicorandil. *Br J Pharmacol* 124; 985-991.

Shyng SL, Nichols CG (1997): Octameric stoichiometry of the K_{ATP} channel complex. *J Gen Phys* 110; 655-664.

Shyng SL, Nichols CG (1998): Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of K_{ATP} channels. *Science* 282; 1138-1141.

Sibley DR (1996): Molecular biology of dopamine receptors. In: *Molecular and Cellular Mechanisms of Neostriatal Function*, Ariano and Surmeier (eds.), Landes Company; 256-271.

Signorini S, Liao YJ, Duncan SA, Jan LY, Stoffel M (1997): Normal cerebellar development but susceptibility to seizures in mice lacking G protein-coupled, inwardly rectifying K channel GirK2. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 923-927.

Sigworth FJ (1995): Electronic design of the Patch-Clamp. In: *Single-channel Recording*. Sakmann, Neher (eds.) 2. Aufl., Plenum Press, New York; 95-127.

Slesinger PA, Patil N, Liao YL, Jan YN, Jan LY, Cox DR (1996): Functional effects of the mouse mutant *weaver* on G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channels. *Neuron*, 16; 321-331.

Slesinger PA, Stoffel M, Jan YN, Jan LY (1997): Defective gamma-aminobutyric acid type B receptor-activated inwardly rectifying K⁺ currents in cerebellar granule cells isolated from *weaver* and GirK2 null mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94; 12210-12217.

Smith MA, O'Dowd DK (1994): Cell-specific regulation of agrin RNA splicing in the chick ciliary ganglion. *Neuron* 12; 795-804.

Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connel CR, Heiner C, Kent SBH, Hood LE (1986): Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321; 674-679.

Song WJ, Tkach T, Baranauskas G, Ichiohe N, Kitai T, Surmeier DJ (1997): Somatodendritic depolarization-activated potassium currents in rat neostriatal cholinergic interneurons are predominantly of the A type and attributable to coexpression of Kv4.2 and Kv4.1 subunits. *J Neurosci* 18; 3124-3137.

- Spanswick D, Smith MA, Groppi VE, Logan SD, Ashford MLJ (1997): Leptin activates hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels. *Nature* 390; 521-525.
- Stanford IM, Lacey GL (1995): Regulation of a potassium conductance in rat midbrain dopamine neurons by intracellular adenosine triphosphate (ATP) and the sulfonylureas tolbutamide and glibenclamide. *J Neurosci* 15; 4651-4657.
- Stanford IM, Lacey MG (1996): Electrophysiological investigation of adenosine trisphosphate-sensitive potassium channels in the rat substantia nigra pars reticulata. *Neurosci* 390, 521-525.
- Starr MS (1995): Glutamate/Dopamine D1/D2 balance in the basal ganglia and its relevance to parkinson's Disease. *Synapse* 19; 264-293.
- Stuart GJ, Dodt H-U, Sakmann B (1993): Patch-clamp recordings from soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy. *Pflügers Arch* 423; 511-518.
- Sucher NJ, Deitcher DL, Cepko CL, Lipton SA (1991): Patch clamp and PCR on a single rat retinal ganglion cell: neuronal nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32; 992.
- Sucher NJ, Deitcher DL (1995): PCR and Patch-Clamp analysis of single neurons. *Neuron* 14, 1095-1100.
- Surmeier DJ, Mermelstein PG, Goldowitz D (1996a): The *weaver* mutation of Girk2 results in a loss of inwardly rectifying K⁺ current in cerebellar granule cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93; 11191-11195.
- Surmeier DJ, Song W-J, Yan Z (1996b): Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *J Neurosci* 16; 6579-6591.
- Swerdlow RH, Parks JK, Miller SW, Tuttle JB, Trimmer PA, Sheehan JP, Bennett JP, Davis RE, Davis Parker W (1996): Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's Disease. *Annals of Neurology* 40; 663-671.
- Szabó G, Katarova Z, Körtvély E, Greenspan R, Urbán Z (1996): Structure and the promoter region of the mouse gene encoding the 67-kD form of glutamic acid decarboxylase. *DNA & Cell Biol* 15; 1081-1091.
- Thomas PM, Cote GJ, Wohlk N, Haddad B, Mathew PM, Rabl W, Aguilar-Bryan L, Gagel RF, Bryan J (1995): Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familiar persistent hyperinsulemic hypoglycaemia of infancy. *Science* 268; 426-429.
- Toellner K-M, Scheel-Toellner D, Seitzer U, Sprengler R, Trümper U, Schlüter C, Flad H-D, Gerdes J (1996): The use of reverse transcription polymerase chain reaction to analyse large numbers of mRNA species from a single cell. *J Immunol Meth* 191; 71-75.

Triarhou LC, Ghetti B (1989): The dendritic dopamine projection of the substantia nigra: phenotypic dominator of *weaver* gene action in hetero- and homozygosity. *Brain Res* 501; 373-381.

Tucker SJ, Gribble FM, Zhao C, Trapp S (1997): Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K⁺ channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature* 387; 179-183.

Tucker SJ, Ashcroft FM (1998): A touching case of channel regulation: the ATP-sensitive K⁺ channel. *Curr Opin Neurobiol* 8; 316-320.

Tusnady GE, Gakos E, Varadi A, Sarkadi B (1997): Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. *FEBS Lett* 402; 1-3.

Tymianski M, Wallace MC, Spigelman I, Uno M, Carlen PL, Tator CH, Charlton MP (1993): Cell-permanent Ca²⁺ chelators reduce early excitotoxic and ischemic neuronal injury in vitro and in vivo. *Neuron* 11; 221-235.

Van Gelder RN, von Zastrow ME, Yool A, Dement WC, Barchas JD, Eberwine JH (1990): Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 87; 1663-1667.

Verina T, Norton JA, Sorbel JJ, Triarhou LC, Laferty D, Richter JA, Simon JR, Ghetti B (1997): Atrophy and loss of dopaminergic mesencephalic neurons in heterozygous *weaver* mice. *Exp brain Res* 113; 5-12.

Verney C, Febvret-Muzerelle A, Gaspar P (1995): Early postnatal changes of the dopaminergic mesencephalic neurons in the *weaver* mutant mouse. *Brain Res De. Brain Res* 89; 115-119.

Vogelweid CM, Verina T, Norton J, Harruf R, Ghetti B (1993): Hypostermatogenesis is the cause of infertility in the male *weaver* mutant mouse. *J Neurogenet* 9, 89-104.

Watts AE, Hicks GA, Henderson G (1995): Putative pre and postsynaptic ATP-sensitive potassium channels in the rat substantia nigra in vitro. *J neurosci* 15; 3065-3074.

Wan JS, Sharp SJ, Poirier GMC, Wagaman PC, Chambers JC, Pyati J, Hom YL, Galindo JE, Huvar A, Peterson PA, Jackson MR, Erlander MG (1996): Cloning differentially expressed mRNAs. *Nature Biotech* 14; 1685-1691.

Wei J, Hodes ME, Piva R, Feng Y, Wang Y, Ghetti B, Dlouhy SR (1998): Characterisation of murine *Girk2* transcript isoforms: structure and differential expression. *Genomics* 51; 379-390.

Wenning GK, Pramstaller PP, Ransmayr G, Poewe W (1997): Atypische Parkinson-Syndrome. *Nervenarzt* 68; 102-115.

Werner P, Hussy N, Buell G, Jones KA, North RA (1996): Mol Pharmacol 49; 656-661.

Wichmann T, DeLongh M (1996): Functional and pathophysiological models of the basal ganglia. Curr Opin Neurobiol 6; 751-758.

Wickmann K, Nemej J, Gendler SJ, Clapham DE (1998): Abnormal heart rate regulation in *Girk4* knockout mice. Neuron 20; 103-114.

Won L, Ghetti B, Heller B, Heller A (1997): In vitro evidence that the reduction in mesencephalic dopaminergic neurons in the *weaver* heterozygote is not due to a failure in target cell interaction. Exp Brain Res 115; 174-179.

Wüllner U, Loschmann PA, Weller M, Klockgether T (1995): Apoptotic cell death in the cerebellum of mutant *weaver* and *lurcher* mice. Neurosci Lett 200; 1-4.

Xia Y, Eisenmann D, Haddad GG (1993): Sulfonylurea receptor expression in rat brain: effect of chronic hypoxia during development. Pediatr Res 34; 634-641.

Ye GL, Leung CHS, Yung WH (1997): Pre-synaptic effect of the ATP-sensitive potassium channel opener diazoxide on rat substantia nigra pars reticulata neurons. Brain Res 753; 1-7.

Ying HS, Weishaupt JH, Grabb M, Canzoniero LMT, Sensi SL, Sheline CT, Monyer H, Choi D (1997): Sublethal oxygen-glucose deprivation alters hippocampal neuronal AMPA receptor expression and vulnerability to kainate-induced death. J Neurosci 17; 9536-9544

Yokoshiki H, Sunagawa M, Seki T, Sperelakis N (1998): ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. Am J Physiol 274; C25-C37.

Zini S, Tremblay E, Roisin MP, Ben-Ari Y (1991): Two binding sites for 3[H]glibenclamide in the rat brain. Brain Res 542; 151-154.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei PD Dr. Jochen Röper bedanken. Für die interessante und anspruchsvolle Themenstellung der vorliegenden Arbeit, für die hervorragende fachliche Betreuung meiner Doktorarbeitszeit und nicht zuletzt für die ungezählten Diskussionen und Gespräche über Arbeit, Forschung und den ganzen Rest.

Ein besonderer Dank gilt Professor Dr. Michael Gewecke für sein stetes Interesse an dem Voranschreiten der vorliegenden Dissertation und für seine Bereitschaft, diese Arbeit als erster Gutachter zu betreuen.

Frau Professor Dr. Hannah Monyer danke ich für die spontane Bereitschaft, diese Arbeit als zweiter Gutachter zu beurteilen, sowie für die Einführung in die Einzelzell-PCR Technik. Im letzteren Sinne möchte ich mich auch bei Professor Dr. Peter Jonas bedanken.

Herrn Professor Dr. Olaf Pongs danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe am Zentrum für Molekulare Neurobiologie. In diesem Sinne bedanke ich mich auch bei allen anderen Mitgliedern des Instituts für Neuronale Signalverarbeitung am ZMNH. Besonders erwähnen möchte ich die AG Elektronenmikroskopie: Dr. Michaela Schweizer, Henrike Neuhoff und Saskia Siegel, die die immunocytochemischen Färbungen dieser Arbeit durchgeführt hat.

Ein besonderes Dankeschön möchte ich an Dörthe Clausen richten für die professionelle und unermüdliche Hilfe nicht nur bei der Erstellung der Abbildungen dieser Arbeit, sondern auch für all die perfekten Dias, die sie im Laufe der letzten drei Jahre für mich angefertigt hat.

Von ganzem Herzen danke ich Bianca Bethan, Christian Jurinke, Patricia Bockholt, Ramona Eidner und Thomas Hein (in alphabetical order) dafür, daß ich das große Glück habe, mich immer auf ihre Freundschaft und Unterstützung verlassen zu können.

Lebenslauf

Name: Birgit Liß
Geburtsdatum: 29.04.1971
Geburtsort: Flensburg
Familienstand: ledig

Schulbildung

1977-1981: Grundschule in Schafflund
1981-1990: Auguste-Viktoria-Gymnasium in Flensburg
Mai 1990: Abitur

Studium

Oktober 1990: Beginn des Studiums der Chemie an der Universität Hamburg.
April 1991: Wechsel in das 2. Semester des Studiengangs Biochemie/
Molekularbiologie an der Universität Hamburg.
Oktober 1992: Diplomvorprüfung in Biologie, Biochemie, Organischer und
Anorganischer Chemie und Physikalischer Chemie.
Dezember 1994: Diplomhauptprüfung in Biochemie und Molekularbiologie,
Gentechnologie und Neurobiologie.
September 1995: Beendigung des Studiums mit Abgabe der Diplomarbeit,
angefertigt bei Prof. Dr. M. Gewecke in der Abteilung
Neurophysiologie am Zoologischen Institut der Universität
Hamburg. Thema: "Herstellung von cDNA-Bibliotheken aus
Gewebe der Wüstenheuschrecke *Schistocerca gregaria*".

Dissertation

Januar 1996 – Februar 1999: Dissertation am Institut für Neurale Signalverarbeitung bei PD
Dr. J. Röper am Zentrum für Molekulare Neurobiologie
Hamburg, ZMNH.
Januar 1996 – April 1999: Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Rahmen des DFG-
Schwerpunktes "Einwärtsrektifizierende Kaliumkanäle".
April 1999: Abschlußprüfung zur Promotion im Fachbereich Biologie an der
Universität Hamburg.