

**Identifikation eines dualen
mesokortikolimbischen Dopaminsystems mit
selektiven axonalen Projektionen in der
adulten Maus (*Mus musculus L.*)**

Eine kombinierte *in vivo* Tracing und *in vitro* Patch-Clamp Studie

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

**Stephan Lammel
aus Thuine**

Marburg/Lahn, 2008

Vom Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am _____

_____ angenommen.

Erstgutachter: _____

Zweitgutachter: _____

Tag der mündlichen Prüfung am: _____

Inhaltsverzeichnis

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| INHALTSVERZEICHNIS | I |
| TABELLENVERZEICHNIS | IV |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | V |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | VII |
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 DER NEUROTRANSMITTER DOPAMIN..... | 1 |
| 1.1.1 Grundprinzipien DA Neurotransmission..... | 1 |
| 1.1.2 Das dopaminerge Mittelhirnsystem | 3 |
| 1.1.3 Dopamin Rezeptoren | 8 |
| 1.1.4 Pharmakologische Targets im dopaminergen System..... | 11 |
| 1.1.4.1 Pharmakologische Targets in der Therapie des Morbus Parkinson..... | 12 |
| 1.1.4.2 Pharmakologische Targets in der Therapie der Schizophrenie | 13 |
| 1.1.4.3 Pharmakologische Targets in der Therapie des Aufmerksamkeits-Defizit- Hyperaktivitäts-Syndroms | 15 |
| 1.2 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN DOPAMINERGER NEURONE..... | 16 |
| 1.3 VERSCHIEDENE FREISETZUNGSMODI VON DOPAMIN | 22 |
| 1.4 FUNKTIONELLE EIGENSCHAFTEN MESOKORTIKOLIMBISCHER DOPAMINERGER PROJEKTIONEN .. | 22 |
| 1.4.1 Funktionelle Anatomie und Zytoarchitektur des Striatums und des präfrontalen Kortex..... | 23 |
| 1.4.2 Einfluss der dopaminergen Neurotransmission bei motivationalen Prozessen | 27 |
| 1.4.3 Einfluss der dopaminergen Neurotransmission bei kognitiven Prozessen | 32 |
| 1.5 ZIELSETZUNG | 37 |
| 2 MATERIAL UND METHODEN..... | 39 |
| 2.1 MATERIAL | 39 |
| 2.1.1 Versuchstiere | 39 |
| 2.1.2 Chemikalien und Geräte..... | 39 |
| 2.1.3 Lösungen | 40 |
| 2.1.3.1 Lösungen Elektrophysiologie | 40 |
| 2.1.3.2 Lösungen Immunzytochemie | 40 |
| 2.1.4 Enzyme und Antikörper | 41 |
| 2.1.4.1 Enzyme | 41 |
| 2.1.4.2 Primäre Antikörper | 42 |
| 2.1.4.3 Sekundäre Antikörper | 42 |
| 2.2 METHODEN..... | 43 |
| 2.2.1 Tracing-Experimente | 43 |
| 2.2.1.1 Operative Methoden zur in vivo Applikation von Tracersubstanzen..... | 44 |
| 2.2.1.2 Retrogrades Tracing kortikaler Hirnareale | 47 |
| 2.2.1.3 Retrogrades Tracing striataler Hirnareale | 49 |
| 2.2.1.4 Retrogrades Tracing der Amygdala | 49 |
| 2.2.1.5 Anterogrades Tracing des ventralen tegmental Areal | 50 |
| 2.2.1.6 Postoperative Überlebenszeiten <i>in vivo</i> markierter Tiere | 50 |
| 2.2.2 Elektrophysiologische Methoden | 51 |
| 2.2.2.1 Hirnschnittpräparation adulter Mäuse | 51 |
| 2.2.2.2 Die Patch-Clamp Technik | 52 |
| 2.2.2.3 Aufbau und Ausstattung des Messplatzes | 54 |
| 2.2.2.3.1 Mechanisch optische Elemente..... | 55 |
| 2.2.2.3.2 Elektronische Komponenten | 56 |
| 2.2.2.3.3 Funktionsprinzip des Vorverstärker | 56 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 2.2.2.3.4 Patchpipetten und Messelektroden | 57 |
| 2.2.2.4 Kapazitätsabgleich und Serienwiderstand-Kompensation..... | 59 |
| 2.2.2.5 Durchführung der Patch-Clamp Messung | 61 |
| 2.2.2.6 Spannungs- und Stromklemmen Modus | 63 |
| 2.2.2.7 Die perforated patch Methode..... | 64 |
| 2.2.2.8 Messprotokolle | 65 |
| 2.2.2.8.1 Current-clamp..... | 65 |
| 2.2.2.8.2 Whole-cell voltage-clamp | 66 |
| 2.2.2.8.3 zellfreier outside-out voltage-clamp | 66 |
| 2.2.2.9 Datenanalyse | 66 |
| 2.2.3 Histologie und Immunzytochemie | 67 |
| 2.2.3.1 Gewebefixierung durch intrakardiale Perfusion mit Paraformaldehyd | 67 |
| 2.2.3.2 Antikörperreaktion und ABC / DAB-Färbung | 68 |
| 2.2.3.3 Immunfluoreszenz-Färbung | 70 |
| 2.2.3.4 Nissl-Färbung | 71 |
| 2.2.3.5 Histochemische Aufarbeitung neurobiotin-gefüllter Zellen..... | 71 |
| 2.2.4 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie | 72 |
| 2.2.5 Semi-quantitative Analyse der GIRK2 Immunreaktivität | 74 |
| 2.2.6 Neurolucida®-basierte Rekonstruktion von Hirnschnitten und Bestimmung des Zelldurchmessers retrograd markierter Neurone..... | 75 |
| 2.2.7 Statistische Auswertungen..... | 76 |
| 2.2.7.1 Bestimmung von Signifikanzen | 76 |
| 2.2.7.2 Hierarchische Clusteranalyse | 76 |
| 2.2.7.3 Diskriminanzanalyse | 78 |
| 3 ERGEBNISSE | 80 |
| 3.1 IMMUNZYTOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DOPAMINERGER PROJEKTIONSAREALE | 80 |
| 3.1.1 Expression der Markerproteine TH und DAT in DA Projektionsarealen..... | 80 |
| 3.1.2 Identifizierung mesencephaler Projektionen durch Tracing der VTA | 83 |
| 3.2 NEUROANATOMISCHE CHARAKTERISIERUNG DOPAMINERGER PROJEKTIONSSYSTEME | 89 |
| 3.2.1 Neuroanatomische Rekonstruktion der Injektionsareale | 89 |
| 3.2.2 Topographie der DA Subpopulationen im Mittelhirn | 95 |
| 3.2.4 Topographie nicht-dopaminerges mesokortikales DA Neurone im Mittelhirn... | 103 |
| 3.3 MESOKORTIKALE UND MESOLIMBISCHE PROJEKTIONEN SIND UNABHÄNGIG..... | 104 |
| 3.3.1 Räumliche Nähe mesokortikaler und mesolimbischer (core/shell) DA Neurone | 105 |
| 3.3.2 Analyse kollateraler Verzweigungen im mesokortikolimbischen DA System .. | 107 |
| 3.4 IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE SPEZIFISCHER MARKERPROTEINE IN DA SUBPOPULATIONEN | 109 |
| 3.4.1 Calbindin-D28k ist kein geeigneter Marker zur Differenzierung meso- kortikolimbischer dopaminerges Subpopulationen | 109 |
| 3.4.2 Differentielle Proteinexpression des Dopamintransporters im meso- kortikolimbischen DA System | 111 |
| 3.5 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DA SUBPOPULATIONEN | 115 |
| 3.5.1 Grundcharakterisierung | 115 |
| 3.5.1.1 Retrograd identifizierte DA Neurone unterscheiden sich nicht signifikant bezüglich der mittleren Spontanfrequenz..... | 116 |
| 3.5.1.2 Aktionspotentialparameter im mesokortikolimbischen DA System | 117 |
| 3.5.1.3 Antwortverhalten der DA Subpopulationen auf hyperpolarisierende Strom- injektionen..... | 121 |
| 3.5.1.4 Antwortverhalten der DA Subpopulationen auf depolarisierende Strom- injektionen..... | 123 |
| 3.5.1.5 Charakterisierung von I_h und I_A Membranströmen in DA Subpopulationen in der voltage-clamp Konfiguration | 125 |
| 3.5.1.6 Inaktivierungskinetiken von A-Typ Membranströmen DA Subpopulationen in der outside-out Konfiguration | 126 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.5.2 Korrelation elektrophysiologischer Eigenschaften mit immunhistochemischer Analyse dopaminergere Projektionen | 128 |
| 3.5.3 Das mesokortikolimbische DA System ist dual | 130 |
| 3.6 KEINE HINWEISE AUF FUNKTIONELLE SOMATODENDRITISCHE AUTOREZEPTOREN IN MESOKORTIKALEN DA NEURONEN..... | 132 |
| 3.6.1 Mesokortikale DA Neurone reagieren nicht auf Badapplikation von Dopamin. | 132 |
| 3.6.2 Testung verschiedener D2 Rezeptor Antikörper..... | 135 |
| 3.6.3 Semi-quantitative Analyse des G-Protein gekoppelten einwärts rektifizierenden Kaliumkanals 2 (GIRK2) in DA Subpopulationen | 139 |
| 4 DISKUSSION | 143 |
| 4.1 METHODISCHE ASPEKTE..... | 143 |
| 4.2 NEUROANATOMIE DES MESOKORTIKOLIMBISCHEN DA SYSTEMS..... | 146 |
| 4.3 KOLLATERALISATION DES MESOKORTIKOLIMBISCHEN DA SYSTEMS | 150 |
| 4.4 UNTERSCHIEDE IN DER GENEXPRESSION BZW. PROTEINEXPRESSION ZUR DIFFERENZIERUNG VON DOPAMINERGEN SUBPOPULATIONEN..... | 152 |
| 4.5 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE GRUNDCHARAKTERISIERUNG DA SUBPOPULATIONEN..... | 155 |
| 4.5.1 Notwendigkeit der Bestimmung neurochemischer Identitäten im Mittelhirn.... | 155 |
| 4.5.2 Vergleich der elektrophysiologischen Daten mit Studien an nicht-retrograd identifizierten DA VTA Neuronen | 158 |
| 4.5.3 Vergleich der elektrophysiologischen Daten mit Studien an retrograd identifizierten DA VTA Neuronen | 162 |
| 4.6 ABWESENHEIT SOMATODENDRITISCHER D2 AUTOREZEPTOREN IN MESOKORTIKALEN DA NEURONEN | 165 |
| 4.7 DUALITÄT DES MESOKORTIKOLIMBISCHEN DA SYSTEMS | 169 |
| 4.8 AUSBLICK | 173 |
| 5 ZUSAMMENFASSUNG | 176 |
| 6 LITERATURVERZEICHNIS | 180 |
| 7 DANKSAGUNG..... | 199 |
| 8 TABELLARISCHER LEBENS LAUF | 201 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tab. 1: Primär-Antikörper für DAB- und Immunfluoreszenzfärbungen | 42 |
| Tab. 2: Sekundär-Antikörper für DAB- und Immunfluoreszenzfärbungen | 42 |
| Tab. 3: Eigenschaften der Beads als retrograder Tracer | 44 |
| Tab. 4: Programm P01 DMZ-Universal Puller (Zeitzi)..... | 45 |
| Tab. 5: Stereotaktische Koordinaten und Injektionsvolumina für retrogrades Tracing striataler Hirnareale | 49 |
| Tab. 6: Postoperative Überlebenszeiten | 51 |
| Tab. 7: Programm P10 DMZ-Universal Puller (Zeitzi)..... | 58 |
| Tab. 8: Prozentuale Verteilung DA Projektionsneurone im Mittelhirn | 102 |
| Tab. 9: Aktionspotentialparameter DA Subpopulationen..... | 118 |
| Tab. 10: Maximale und minimale Depolarisations- und Repolarisationspotentiale im <i>phase plot</i> | 120 |
| Tab. 11: Feuerungsraten DA Subpopulationen | 123 |
| Tab. 12: Elektrophysiologische Parameter mesokortikaler TH-positiver und TH-negativer Neurone | 129 |
| Tab. 13: Ergebnisse der Diskriminanzanalyse | 132 |
| Tab. 14: Elektrophysiologische Eigenschaften von VTA Neuronen | 159 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abb. 1: Enzymatische Katecholaminsynthese | 2 |
| Abb. 2: Projektionsgebiete DA Neurone | 6 |
| Abb. 3: Pharmakologische Targets an einer DA Synapse | 12 |
| Abb. 4: Molekulare Mechanismen und Feuerungsverhalten DA Neurone <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> | 17 |
| Abb. 5: Synaptische Trias im Striatum..... | 24 |
| Abb. 6: Schematische Darstellung des PFC der Ratte | 26 |
| Abb. 7: Limbisch-kortikostriatale Funktionsschleife..... | 28 |
| Abb. 8: Dopaminerge Neurone kodieren Belohnungssignale | 32 |
| Abb. 9: Working memory Studien beim Primaten..... | 33 |
| Abb. 10: Working memory ist abhängig von kortikaler D1 Rezeptoraktivierung | 35 |
| Abb. 11: Retrogrades Tracing des medialen PFC | 48 |
| Abb. 12: Patch-Clamp Konfigurationen..... | 54 |
| Abb. 13: Patch-Clamp Messplatz | 54 |
| Abb. 14: Schematisches Schaltbild eines Vorverstärkers | 57 |
| Abb. 15: Kapazitäten und Serienwiderstände in Patch-Clamp Experimenten | 61 |
| Abb. 16: Durchführung eines Patch-Clamp Experiments | 63 |
| Abb. 17: Strahlengang eines konfokalen Mikroskops..... | 74 |
| Abb. 18: TH und DAT Immunreaktivität im PFC | 81 |
| Abb. 19: TH und DAT Immunreaktivität in striatalen, hippocampalen, cingulären und amygdalären Hirnstrukturen..... | 83 |
| Abb. 20: Anterogrades Tracing der VTA mit PHA-L..... | 85 |
| Abb. 21: Kortikale (PFC) und subkortikale (NAc) Hirnregionen nach anterogradem Tracing der VTA mit PHA-L..... | 87 |
| Abb. 22: Nachweis mesencephaler TH-positiver und TH-negativer Terminale im mPFC.... | 88 |
| Abb. 23: Serielle, neuroanatomische Rekonstruktion der Injektionsstellen..... | 95 |
| Abb. 24: Topographie DA Projektionsneurone im intermediären Mittelhirn..... | 100 |
| Abb. 25: Topographie DA Projektionsneurone im caudalen und rostralen Mittelhirn | 101 |
| Abb. 26: Verteilung der DA Subpopulationen im Mittelhirn..... | 102 |
| Abb. 27: Zelldurchmesser der verschiedenen DA Subpopulationen..... | 103 |
| Abb. 28: Topographie nicht-dopaminerger mesokortikaler Neurone im Mittelhirn..... | 104 |
| Abb. 29: Mesokortikale DA Neurone sind in direkter Nachbarschaft zu mesolimbischen core DA Neuronen lokalisiert | 106 |
| Abb. 30: Mesokortikale DA Neurone besitzen kaum Kollaterale | 108 |
| Abb. 31: Proteinexpression von Calbindin-D28k in den DA Subpopulationen..... | 111 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Abb. 32: DAT Proteinexpression im intermediären Mittelhirn | 113 |
| Abb. 33: DA Neurone im mesokortikolimbischen System unterscheiden sich in der DAT Proteinexpression..... | 114 |
| Abb. 34: Mesokortikolimbische dopaminerge Neurone unterscheiden sich nicht signifikant in ihrer mittleren Spontanaktivität | 116 |
| Abb. 35: DA Neurone im mesokortikolimbischen System sind anhand der Aktionspotentialform differenzierbar..... | 117 |
| Abb. 36: Ableitung intrazellulärer Aktionspotentiale DA Neurone..... | 120 |
| Abb. 37: Änderung des Membranpotentials identifizierter DA Neurone in Antwort auf hyperpolarisierende Strominjektionen | 122 |
| Abb. 38: <i>In vitro</i> Feuerungsraten identifizierter DA Neurone | 124 |
| Abb. 39: I_h und I_A Ströme unterscheiden sich in den DA Subpopulationen..... | 126 |
| Abb. 40: Retrograd identifizierte Neurone besitzen unterschiedliche A-Strom Inaktivierungskinetiken | 127 |
| Abb. 41: Korrelation elektrophysiologischer Parameter mit immunhistochemischer Charakterisierung | 129 |
| Abb. 42: Ergebnis der hierarchischen Clusteranalyse | 131 |
| Abb. 43: Antwort retrograd identifizierter DA Neurone auf akute Dopamin Applikation ... | 134 |
| Abb. 44: Testung von vier verschiedenen D2 Rezeptor Antikörpern..... | 136 |
| Abb. 45: Testung des D2 Antikörpers Chemicon AB5084P in der Wildtyp (C57Bl/6) und in der D2KO (-/-) Maus | 138 |
| Abb. 46: Differentielle GIRK2 Proteinexpression im Mittelhirn | 140 |
| Abb. 47: Semi-quantitative Analyse der GIRK2 Immunreaktivitäten für retrograd identifizierte DA Neurone | 142 |
| Abb. 48: UV-Lasermikrodissektion und quantitative mRNA Analyse DA Markergene | 154 |
| Abb. 49: Dualität des mesokortikolimbischen DA Systems | 171 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------------|------------------------------------------------------------|
| 5-HT | 5-Hydroxytyramin, Serotonin |
| AADC | Aromatische-Aminosäure-Decarboxylase |
| Abb. | Abbildung |
| ABC | Avidin-Biotin Komplex |
| ACC | anteriöer Cingulärer Kortex |
| ACh | Acetylcholin |
| ACSF | artifizielle cerebro-spinale Flüssigkeit |
| AD | Außendurchmesser |
| ADHS | Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Syndrom |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AK | Antikörper |
| Akt | Proteinkinase B |
| AMPA | α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure |
| ANOVA | einfaktorielle Varianzanalyse |
| AP | Aktionspotential |
| <i>aqua dest.</i> | einfach destilliertes Wasser |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BA | Brodmann Areal |
| BL | Distanz Bregma-Lambda |
| BLA | basolaterale Amygdala |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat |
| Ca_v | spannungsabhängiger Kalzium Kanal |
| CB | Calbindin-D28k |
| cDNA | komplementäre DNA |
| CeN | Nukleus centralis der Amygdala |
| cGMP | zyklisches Guanosinmonophosphat |
| CLi | Nukleus linearis centralis |
| CNB | cyclische Nukleotid Bindungsstelle |
| CNQX | 6-Cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion |
| COMT | Katechol-O-Methyltransferase |
| CS | konditionierter Stimulus |

| | |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------|
| D | Deutschland |
| D2I | Dopaminrezeptor 2, lange Splicevariante |
| D2s | Dopaminrezeptor 2, kurze Splicevariante |
| DA | dopaminerg |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidin |
| DAT | Dopamintransporter |
| DARP-32 | Dopamin und cAMP reguliertes Phosphoprotein von 32 kDa |
| Dil | 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyaninperchlorat |
| DGP | dorsaler Globus Pallidus |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DOPAC | Dihydroxyphenylacetaldehyd |
| DPPX | Dipeptidyl Peptidase 10 |
| DS | dorsolaterales Striatum |
| EGTA | Ethylene glycol-bis(beta-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid |
| EPMS | Extrapyramidal motorische Störungen |
| GABA | Gamma-Aminobuttersäure |
| GAD | L-Glutamat-Decarboxylase |
| G_{βγ} | βγ-Untereinheit des G-Proteins |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| GIRK | G-Protein gekoppelter einwärtsrektifizierender Kaliumkanal |
| Glu | Glutamat |
| G-Protein | Guanosin-Nukleotid bindendes Protein |
| GRK | G-Protein gekoppelte Rezeptor Kinase |
| GSK | Glycogen-Synthase-Kinase |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| HCN | Hyperpolarisationaktivierter-zyklisch nukleotid-modulierter Ionenkanal |
| HEPES | N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic-acid] |
| HVS | Homovanillinsäure |
| I_A | A-Typ Kaliumstrom |
| ID | Innendurchmesser |
| I.E. | Internationale Einheiten |
| IF | Nukleus Interfascicularis |

| | |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| I_h | Hyperpolarisationsaktivierter und zyklisch-Nukleotid gesteuerter Ionenkanalstrom |
| i.p. | intraperitoneal |
| IPN | Nukleus Interpeduncularis |
| K_{ATP} | ATP-sensitiver Kaliumkanal |
| KCHIP | Kaliumkanal-interagierendes Protein |
| kDa | kilo Dalton |
| KG | Körpergewicht |
| Kir | einwärtsrektifizierender Kaliumkanal |
| KO | Knock-out |
| Kv | spannungsabhängiger Kaliumkanal |
| | |
| L-DOPA | L-3,4-Dihydroxyphenylalanin |
| LDT | laterodorsaler Nukleus |
| LH | lateraler Hypothalamus |
| LM | Lemniscus medialis |
| Lsg. | Lösung |
| LSM | Laserscanning Mikroskopie |
| LTD | Langzeit-Depression |
| LTP | Langzeit-Potenzierung |
| | |
| MAO | Monoaminoxidase |
| max. | maximal |
| Met | Methionin |
| mod. | modifiziert |
| mPFC | medialer präfrontaler Kortex |
| mRNA | messenger Ribonukleinsäure |
| MSN | medium spiny neuron |
| MVB | mediales Vorderhirnbündel |
| | |
| NAc | Nukleus Accumbens |
| Na_v | spannungsabhängiger Natrium Kanal |
| NB | Neurobiotin |
| NCS | neuronaler Kalzium Sensor |
| NHP | Nachhyperpolarisation |
| NK | Negativkontrolle |
| NMDA | N-Methyl-D-Aspartat |
| n.s. | nicht signifikant |

| | |
|--------------|--------------------------------------------------------------|
| OPA | Operationsverstärker |
| PAR4 | Prostata-Apoptose-Antwort Protein 4 |
| PBP | Nukleus parabrachialis pigmentosus |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PFC | präfrontaler Kortex |
| PHA-L | Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin |
| PIP2 | Phosphoinositoldiphosphat |
| PIT | Pawlow'scher-instrumenteller Transfer |
| PKA | Proteinkinase A |
| PN | Nukleus paranigralis |
| pp | perforated patch |
| PP1 | Phosphoprotein 1 |
| PP2B | Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinphosphatase, Calcineurin |
| PPN | Pedunculopontiner Nukleus |
| RLi | Nukleus linearis rostralis |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RRA | Area retrorubralis |
| RT | Reverse Transkriptase |
| SEM | Standardfehler des Mittelwertes |
| SK | Kalzium-sensitiver Kaliumkanal mit geringer Leitfähigkeit |
| SN | Substantia nigra |
| SNc | Substantia nigra pars compacta |
| SNI | Substantia nigra pars lateralis |
| SNr | Substantia nigra pars reticularis |
| SUR | Sulfonylharnstoff Rezeptor |
| Tab. | Tabelle |
| TH | Tyrosinhydroxylase |
| TH+ | Tyrosinhydroxylase-immunpositiv |
| Tris | 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-Propanediol |
| VA | Valin |

| | |
|--------------|---------------------------------|
| VGLUT | vesikulärer Glutamattransporter |
| VGP | ventraler Globus Pallidus |
| VMAT | vesikulärer Monoamintransporter |
| VTA | ventrales tegmentales Areal |
| wc | whole-cell (ganzzell) |

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Maßeinheiten, die auf Empfehlungen der IFPC (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

1.1 Der Neurotransmitter Dopamin

Das dopaminerge (DA) Nervensystem stellt eines der am intensivsten erforschten Neurotransmissionssysteme dar. Vor genau 50 Jahren machten Arvid Carlsson und Kollegen die entscheidende Entdeckung, dass eine Dopamindepletion die Ursache der akinetischen Effekte bei -behandelten Tieren war (Carlson et al., 1957). Die zentrale Funktion des Neurotransmitters Dopamin in der Kontrolle motorischer Funktionen zeigte sich, als in *post-mortem* Gehirnen von Patienten mit Morbus Parkinson deutlich reduzierte Dopaminkonzentrationen im Striatum nachgewiesen wurden (Ehringer und Hornykiewicz, 1960). 1967 begründete George Cotzias die klinische Therapie von Morbus Parkinson mit der Dopaminvorstufe L-DOPA (L-3,4-Dihydroxyphenylalanin) (Cotzias et al., 1967). Bis heute sind mehr als 100.000 Publikationen (Pubmed Suche nach "*Dopamine*") erschienen, die sich der Erforschung des dopaminergen Nervensystems widmen ("*Dopamine is the center of the universe*" A. A. Grace, 50 Jahre Dopamin, Göteborg, Schweden, 01.06.2007). Störungen im zentralen DA Regelkreislauf sind jedoch nicht nur in die motorischen Defizite des Morbus Parkinson involviert, sondern haben auch zentrale Bedeutung bei multiplen neurologischen und psychiatrischen Krankheitsbildern wie Schizophrenie, Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Syndrom (ADHS) und Drogensucht (Björklund und Dunnett, 2007a).

1.1.1 Grundprinzipien dopaminerger Neurotransmission

Dopamin (4-Hydroxytyramin, 3,4-Dihydroxy- β -phenylethylamin) besitzt eine Katechol-(C₆H₆O₂) gruppe sowie eine Amino-(NH₂) gruppe und wird daher zu den Katecholaminen bzw. biogenen Aminen gezählt. Die Synthese von Dopamin erfolgt aus der aromatischen Aminosäure Tyrosin, welche mit der Nahrung aufgenommen oder in der Leber aus Phenylalanin gebildet wird. Die

¹ Wirkungsmechanismus von Reserpin siehe Abb. 3

Hydroxylierung von Tyrosin am Benzolring durch die Tyrosinhydroxylase (TH) als geschwindigkeitsbestimmender Schritt führt zu der Bildung von L-DOPA. Die TH ist das Schlüsselenzym für die Synthese der Katecholamine Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin und gilt daher als Markerenzym zum Nachweis von Neuronen mit diesen Transmittern. Das Zwischenprodukt L-DOPA wird durch die Aromatische-Aminosäure-Decarboxylase (AADC, DOPA-Decarboxylase) zu Dopamin decarboxyliert (Abb. 1).

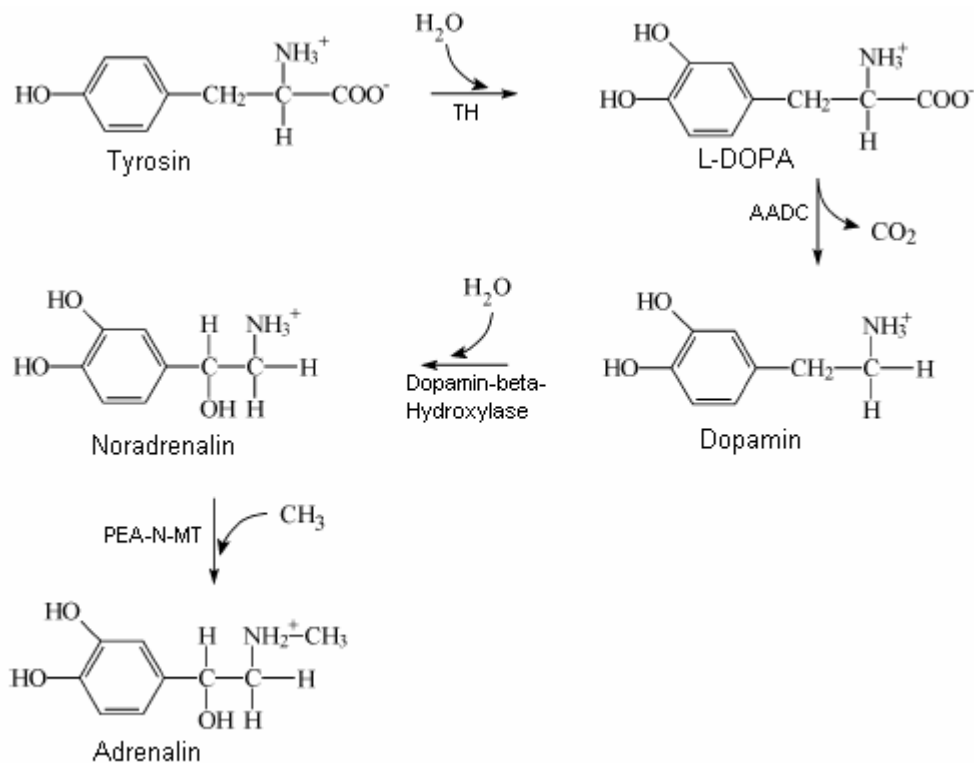


Abb. 1: Enzymatische Katecholaminsynthese

Abkürzungen: TH: Tyrosinhydroxylase, L-DOPA: L-3,4-Dihydroxyphenylalanin, AADC: DOPA-Decarboxylase, PEA-N-MT: Phenylethanolamin-N-Methyltransferase

In zwei weiteren Reaktionen wird Dopamin in noradrenergen und adrenergen Neuronen über die Dopamin- β -Hydroxylase zu Noradrenalin bzw. über die Phenylethanolamin-N-Methyltransferase zu Adrenalin umgesetzt (Abb. 1).

Im Anschluss an die zytoplasmatische Synthese wird Dopamin über einen vesikulären Monoamintransporter (VMAT2) in intrazelluläre Vesikel aufgenommen und gespeichert. Durch Depolarisation im Rahmen eines

Aktionspotentials wird Dopamin Kalzium-abhängig exozytotisch freigesetzt und diffundiert dann zu seinen Rezeptoren (siehe Kapitel 1.1.3). Die Wiederaufnahme des Dopamin in die Zelle erfolgt über einen hochaffinen elektrogeneren Natrium-abhängigen Dopamintransporter (DAT). Weiterhin kann Dopamin auch durch unspezifische Vorgänge in Gliazellen aufgenommen und aus dem synaptischen Spalt entfernt werden. Sie spielen jedoch nur eine untergeordnete Rolle und können eine genetische Inaktivierung des DAT nicht kompensieren, wie durch den Phänotyp der DAT *knock-out* (KO)-Mäuse. Nachgewiesen wurde eine starke Zunahme der Lokomotion, stereotypen Verhaltens, pituitärer Hypoplasie und (Gainetdinov et al., 1999). Der Abbau von Dopamin erfolgt in der Präsynapse durch das Enzym Monoaminoxidase (MAO), das in den zwei Isoformen MAO-A und MAO-B vorkommt, die sich hinsichtlich ihrer Substratspezifität unterscheiden. In der Präsynapse DA Neurone wird Dopamin mittels der MAO-B zu 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd (DOPAC) abgebaut und extrazellulär letztendlich durch die Katechol-O-Methyltransferase (COMT) zu Homovanillinsäure (HVS) metabolisiert. In einem weiteren Stoffwechselweg wird Dopamin in den umliegenden Astrozyten (Gliazellen) durch die COMT zu 3-Methoxytyramin und wird dann durch die MAO-B zu HVS umgesetzt (Purves et al., 2004; Vallone et al., 2000)

1.1.2 Das dopaminerge Mittelhirnsystem

Der Hauptanteil der dopaminergen Neurone ist mit etwa 75 % im ventralen Mittelhirn lokalisiert (Hardman et al, 2002). Während in der Maus etwa 20.000-30.000, in der Ratte etwa 40.000-45.000 mesencephale DA Neurone existieren, nimmt die Anzahl der DA Nervenzellen beim Affen (160.000-320.000 Zellen) und Menschen (bis zu 600.000 Zellen) enorm zu (Björklund und Dunnett, 2007b).

Zur Charakterisierung der DA Neuroanatomie werden noch heute die 1964 von Dahlstrom und Fuxe eingeführten Kurzbezeichnungen für Areale, in denen sich dopaminerge bzw. katecholaminerge Neurone befinden verwendet. Im Mittelhirn unterscheidet man zwischen drei unterschiedlichen Arealen (A8-10) in denen DA

¹ Zwergwuchs, Minderwuchs

Neurone lokalisiert sind: Die Area tegmentalis ventralis (VTA, A10) im ventromedialen Anteil des Mittelhirns. A9 Neurone befinden sich in der Substantia nigra pars compacta (SNc), sowie vereinzelt ventral innerhalb der Substantia nigra pars reticulata (SNr). A8 Neurone sind in der Area retrorubralis (RRA), caudodorsal der Substantia nigra (SN), lokalisiert. Außerhalb des Mittelhirns sind DA Neurone im Diencephalon (A11-A15), im Bulbus olfaktorius (A16) und in der Retina (A17) lokalisiert (Björklund und Dunnett, 2007b). Weiterhin konnten beim Primaten TH-positive Zellen in kortikalen und striatalen Hirnarealen nachgewiesen werden. In diesen Zellen konnte jedoch keine Expression von weiteren DA Markern (AADC, VMAT2) oder anderen Katecholaminen gefunden werden. Die funktionelle Rolle dieser Zellen ist noch unklar (Dubach, 1994).

Als weitere Neuronenpopulation existieren im Mittelhirn GABAerge (*gamma amino butyric acid*) Interneurone sowie GABAerge Projektionsneurone. Interessanterweise konnte in einigen mesencephalen DA Neuronen eine Koexpression von TH mit Markern anderer Neurotransmittersysteme detektiert werden. In der rostralen VTA konnte eine Koexpression von TH und GAD (Glutamatdecarboxylase), dem Schlüsselenzym für die GABA-Synthese, molekularbiologisch und mittels *in situ* Hybridisierung nachgewiesen werden (Olson und Nestler, 2007). Eine Koexpression von TH mRNA mit VGLUT2 mRNA (vesikulärer Glutamattransporter 2; als Marker für glutamaterge Neurone) konnte in kultivierten postnatalen DA Neuronen der Ratte nachgewiesen werden (Dal Bo et al., 2004). Vor kurzem wurden im rostralen Mittelhirn Neurone entdeckt, die selektiv VGLUT2 exprimieren. Eine Koexpression mit TH-positiven Neuronen konnte nicht bestätigt werden (Yamaguchi et al., 2007). Im Hypothalamus koexprimieren DA Neurone Neuropeptide wie z.B. Neurotensin, Galanin, Enkephalin und Dynorphin und lassen somit auf eine neuroendokrine Funktion dieser Zellen schließen (Lookingland et al., 2005).

Dopaminerge Mittelhirnneurone sind über afferente und efferente Verbindungen in ein komplexes Verschaltungssystem neuronaler Hirnstrukturen eingebunden. Die wichtigsten efferenten Verbindungen sind in Abb. 2 dargestellt. Die

Nomenklatur efferenter DA Projektionssysteme wird bislang nicht einheitlich gehandhabt. Dies resultiert aus den zum Teil unterschiedlichen Ergebnissen anatomischer Studien bezüglich der Ursprungs- und Terminationsgebiete mesencephaler DA Neurone. Die ersten Studien, die die topographische Organisation aufsteigender DA Projektionen in der Ratte beschrieben, waren dominiert von dem Konzept, dass DA Neurone der SN (A9) zum Striatum (Streifenkörper) projizieren (nigrostriatales DA System), während DA VTA Neurone (A10) das sogenannte mesokortikolimbische DA System bilden. Diese Studien favorisierten also eine Trennung dieser Projektionssysteme aufgrund einer lateralen (A9) bzw. medialen (A10) Lokalisation der DA Zellkörper im Mittelhirn (Ungerstedt, 1971; Berger et al., 1974; Lindvall et al., 1974). Spätere Studien legten nahe, dass SN und VTA als Kontinuum betrachtet werden können, die jeweils sowohl nigrostriatale als auch mesokortikolimbische DA Neurone enthalten. Eine Separation der Projektionen erfolgte anhand der dorsalen bzw. ventralen Lokalisation der Zellen (die sogenannte dorsoventrale Topographie). Demnach enthält die dorsale SNc ("*dorsal tier*") nicht nur nigrostriatale DA Neurone, sondern auch DA Neurone deren Terminalen in kortikalen und limbischen (ventro-striatalen) Hirnstrukturen enden. Dagegen projizieren DA Neurone der ventralen SNc ("*ventral tier*") ausschließlich in striatale Hirnareale (Fallon und Moore, 1978; Fallon et al., 1978; Gerfen et al., 1987a; Fallon, 1988; Björklund und Dunnett, 2007b). Um die Unabhängigkeit des Ursprungsgebietes zu betonen, wurde die Nomenklatur in mesostriatales und mesokortikolimbisches DA System geändert. Weiterhin wird in vielen Studien auch eine Dreiteilung in mesostriatal, mesolimbisch und mesokortikal vorgenommen, um die jeweilige funktionelle Bedeutung stärker zu betonen (Swanson, 1982).

Die Axone dieser mesenzephalen DA Neurone projizieren über das mediale Vorderhirnbündel (MVB) in unterschiedliche Regionen des Diencephalon und Telencephalons. Als Hauptprojektionsareal mesostriataler DA Neurone gilt das dorsolaterale Striatum. Diese Projektion ist Teil der komplexen

Basalganglienverschaltung und ist maßgeblich an der Bewegungssteuerung beteiligt (Zeiss, 2005). Mesolimbische DA Neurone projizieren präferentiell zum Nucleus Accumbens (NAc), der im ventralen Striatum lokalisiert ist. Dieser kann anatomisch und funktionell in eine zentrale core sowie mediale und laterale shell Region unterteilt werden. Der präfrontale Kortex (PFC) wird als primäres Terminationsgebiet mesokortikaler DA Neurone betrachtet. Im Vergleich zu den Zellen, die den NAc (65 bis 85 % sind DA) und das dorsale Striatum innervieren (über 90 % sind DA), erhält der PFC eine hohe Dichte GABAerger mesencephaler Afferenzen und nur etwa 30 bis 40 % der mesopräfrontalen Neurone sind dopaminerg (Carr und Sesack, 2000a; Swanson, 1982; Fallon, 1988).

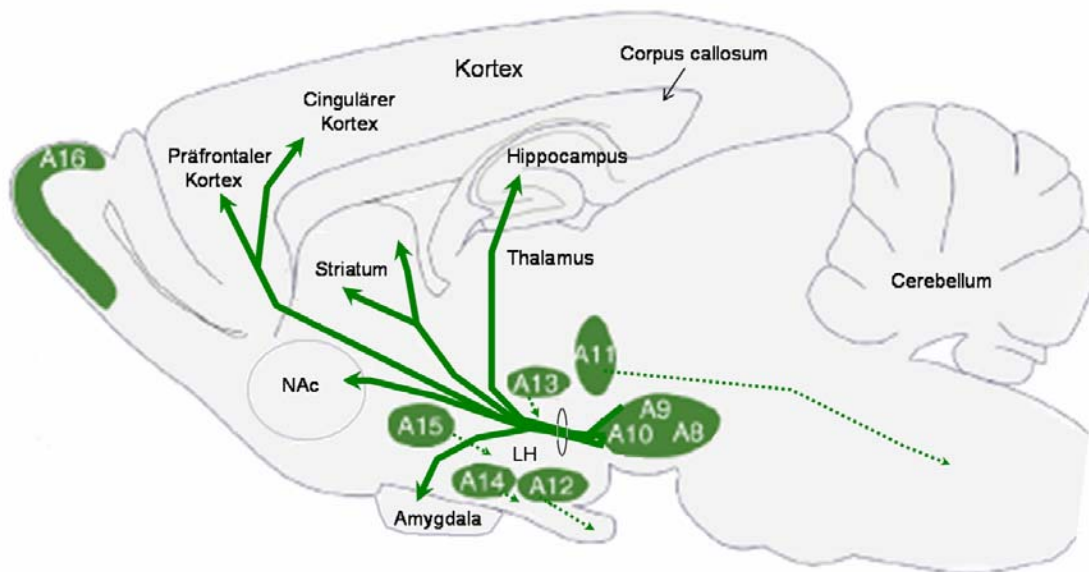


Abb. 2: Projektionsgebiete DA Neurone

Topographie DA Neurone im Nager (Sagittalschnitt) und deren primären Innervationsgebieten. Projektionen mesencephaler DA Neurone (A8-A10) werden im Kapitel 1.4 ausführlich funktionell besprochen. Projektionen diencephaler DA Neurone (A11-A15) sind durch Pfeile angedeutet. DA Neurone der Region A11 sind an deszendierender Hemmung nozizeptiver Afferenzen auf Rückenmarksebene beteiligt. A12 DA Neurone (Nucleus infundibularis; Hypothalamus) projizieren zum hypophysären Pfortadersystem (Tuberoinfundibuläres DA System). A13 DA Neurone (Zona incerta) projizieren u.a. in den Hypothalamus (präoptische Region) und limbische Areale. A14 und A15 DA Neurone innervieren ebenfalls den Hypothalamus und sind in das Tuberoinfundibuläres DA System involviert. Abbildung modifiziert nach Björklund und Dunnett, 2007b.

Weiterhin sind DA Projektionen zu einer Vielzahl anderer Hirnareale beschrieben. Hierzu gehören Amygdala, entorhinaler und cingulärer Kortex, laterales Septum, lateraler Hypothalamus (LH), Hippocampus, Tuberculum olfactorium und laterale Habenula. Eine Zuordnung zu den jeweiligen DA Projektionssystemen geschieht meist aufgrund funktioneller Eigenschaften der Projektionsgebiete (Swanson, 1982; Fallon, 1988). Im Gegensatz zum Nager, dessen mesokortikale Projektion hauptsächlich auf präfrontale, cinguläre und entorhinale Areale beschränkt ist (Björklund und Dunnett, 2007b), kommt es beim Primaten zu einer zunehmenden Expansion DA Projektionsgebiete über den gesamten Neokortex hinaus. Bemerkenswert ist weiterhin die Zunahme kortikaler Innervationen durch DA Neurone der Regionen A8 (Area retrorubralis) und A9 (SN) (Williams und Goldman-Rakic, 1998).

Da die Zellkörper der DA Neurone des mesokortikalen und mesolimbischen DA Systems vor allem in der VTA lokalisiert sind, sollen im folgenden Abschnitt noch die wichtigsten Afferenzen, also die Eingänge der VTA, genannt werden. Exzitatorischer glutamaterger und cholinergischer Input erhält die VTA aus dem PFC, lateralen Hypothalamus, Basal Nucleus der Stria terminalis, Superior Colliculus, Pedunculo-pontinen Nucleus (PPN) und dem tegmentalen laterodorsalen Nucleus (LDT). Inhibitorische GABAerge Afferenzen erreichen die VTA hauptsächlich aus dem ventralen Pallidum und dem NAc. Weiterhin erhält die VTA noradrenerge Projektionen aus dem Locus coeruleus und serotonerge Projektionen aus dem dorsalen Raphe Nucleus. Oftmals bestehen zwischen afferenten Eingängen und VTA Subpopulationen hochselektive Verbindungen, die je nach Verschaltungsprinzip zu negativen bzw. positiven Rückkopplungsschleifen (*feedback-loops*) oder zu *Feedforward*-Inhibitionen führen. So erreichen exzitatorische Afferenzen aus dem PFC selektiv mesokortikale DA sowie mesoaccumbale GABAerge Projektionsneurone (Carr und Sesack, 2000b). Exzitatorischer Input aus dem LDT zielt selektiv auf DA Neurone, die den NAc innervieren. Dagegen ist inhibitorischer Input aus dem LDT auf mesoaccumbale GABAerge Neurone beschränkt. Da Neurone des PFC den LDT innervieren,

wird vermutet, dass so der PFC über eine indirekte Verschaltung mesoaccumbale DA Neurone erregen kann (Fields et al., 2007). Weitere regulatorische Einflüsse ergeben sich aus lokal freigesetztem Dopamin, das zu einer über somatodendritische D2 Rezeptoren (siehe Kapitel 1.1.3) vermittelten Hyperpolarisation von sowohl DA als auch nicht-dopaminergen Zellen führt (Johnson und North, 1992; Margolis et al., 2006b). Inwieweit putative Interneurone mit GABAergem Phänotyp an lokalen Verbindungen innerhalb der VTA beteiligt sind, ist zur Zeit noch unklar (Margolis et al., 2006a).

1.1.3 Dopamin Rezeptoren

Dopamin Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Sieben-Transmembran Rezeptoren und werden aufgrund ihrer Primärsequenz, genomischen Organisation und pharmakologischen Eigenschaften in D1-artige (= 1-Rezeptorfamilie mit den Rezeptoren D1 und D5) und D2-artige Rezeptoren (= D2-Rezeptorfamilie mit den Rezeptoren D2, D3 und D4) unterteilt (Kebabian und Calne, 1979)¹.

Der D2 Rezeptor beinhaltet sechs Introns (zum Vergleich: D1/D5: keine Introns; D3: 5 Introns; D4: 3 Introns) und existiert in zwei unterschiedlichen Isoformen, die als D2s (*short*) und D2l (*long*) bezeichnet werden (Dal Toso et al., 1989). Sie sind auf alternatives Splicing eines 87 Basenpaar Exons zwischen Intron 4 und 5 zurückzuführen. D2s bzw. D2l Rezeptorproteine bestehen aus 415 bzw. 444 Aminosäuren und unterscheiden sich in der dritten Zytoplasmaschleife, die für die G-Proteinbindung verantwortlich ist (Missale et al., 1998). Das Fehlen des D2 Rezeptors führt bei Mäusen zu parkinsonähnlichen Symptomen wie Akinesie und Bradykinese (Zeiss, 2005).

Dopamin-Rezeptoren aktivieren zahlreiche Signaltransduktionswege. Am besten untersucht sind die Aktivierung oder Inhibierung der cAMP- (cyclisches Adenosinmonophosphat) Signaltransduktion.

¹ chromosomale Lokalisation der Dopamin Rezeptoren: D1: 5q 35.1; D2: 11q 22-23; D3: 3q 13.3; D4: 11p 15.5; D5: 4p 15.1-16.1 (Missale et al., 1998).

D1-artige Rezeptoren sind an stimulierende G-Proteine gekoppelt und wirken exzitatorisch über eine Aktivierung der membranständigen Adenylatzyklase. Dies führt zu einer Erhöhung des zytoplasmatischen cAMP Spiegels und einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), die dann wiederum verschiedene Effektoren (Ionenkanäle, Transkriptionsfaktoren, Rezeptoren) phosphoryliert, was letztlich zur Erregung des Neurons führt. Ein Effektorprotein ist beispielsweise DARP-32 (Acronym für Dopamin und cAMP-reguliertes Phosphoprotein; Molekulargewicht: 32 kDa), das durch die PKA-Phosphorylierung an Threonin-34 zu einem potenten Inhibitor der Proteinphosphatase 1 (PP1) konvertiert wird. Folglich wird die Dephosphorylierung von Glutamatrezeptoren (AMPA, NMDA) durch PP1/Spinophilin Komplexe inhibiert. Somit führt die D1-Rezeptoraktivierung zu einer Erhöhung des Phosphorylierungsstatus von Glutamatrezeptoren und infolge zu einer erhöhten Aktivität dieser Neurotransmitterrezeptoren (Yan et al., 1999; Greengard, 2001).

Dagegen sind D2-artige Rezeptoren an inhibitorische G-Proteine gekoppelt und wirken über eine Hemmung der Adenylatzyklase und cAMP Bildung inhibitorisch auf die Zelle. Effektorproteine, wie das bereits genannte DARP-32, werden dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung von DARP-32 wird ebenfalls durch die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinphosphatase (PP2B, Calcineurin) vermittelt, die durch erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentrationen aktiviert wird (Greengard, 2001). Darüberhinaus ist die direkte Aktivierung von Ionenkanälen (z.B. GIRK2 Kanal (G-Protein gekoppelter einwärts rektifizierender Kaliumkanal)) durch die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit möglich (Vallone et al., 2000; Bonci und Hopf, 2005). D2 Rezeptoren können auch G-Protein unabhängige Signalwege aktivieren. Generell haben sogenannte Arrestine (β -Arrestine und visuelle Arrestine) bei membranständigen Rezeptoren eine wichtige Funktion in deren Desensibilisierung bzw. Internalisierung (Gainetdinov et al., 2004). Zusätzlich konnte kürzlich die Bedeutung von β -Arrestin-2 bei der Signaltransduktion des D2 Rezeptors nachgewiesen werden (Beaulieu et al., 2005). β -Arrestin-2 verbindet den D2 Rezeptor mit der Proteinkinase B (Akt), die wiederum andere Proteine

phosphorylieren kann, wie z.B. die Glycogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3)¹ (Bonci und Hopf, 2005; Kottke und Stark, 2006). Ein weiterer Bindungspartner des D2 Rezeptors ist PAR4 (Prostata-Apoptose-Antwort Protein 4). PAR4 interagiert mit dem D2 Rezeptor über das Calmodulin Bindungsmotiv in der dritten zytosolischen Schleife. Durch erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentrationen verdrängt aktiviertes Calmodulin PAR4 von dieser Bindungsstelle und inhibiert die D2 Rezeptoraktivierung. Tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass eine Depletion von PAR4 bei Mäusen zu depressiven Verhaltensmustern führt (Park et al., 2005; Bonci und Hopf, 2005; Kottke und Stark, 2006).

Die einzelnen Rezeptorsubtypen werden in verschiedenen Arealen des ZNS in unterschiedlicher Dichte exprimiert. D1 Rezeptor mRNA konnte vor allem im Striatum, Tuberculum olfactorium und im PFC detektiert werden. Eine spezifische D2 Rezeptor mRNA Expression wurde im Striatum, mesencephalen SNc und VTA DA Neuronen und im Hippocampus nachgewiesen. Die Dopamin Rezeptorsubtypen D3, D4 und D5 konnten zumeist auch in den Hirnarealen nachgewiesen werden, in denen jeweils auch D1 bzw. D2 Rezeptoren gefunden wurden (Sealfon und Olanow, 2000).

Somatodendritische Autorezeptoren haben eine wichtige regulatorische Funktion in der Steuerung der elektrischen Aktivität DA Neurone. Mercuri und Kollegen zeigten in *in vitro* Patch-Clamp Experimenten der D2 KO Maus, dass DA Neurone durch die Applikation von Dopamin (30 μ M) oder Dopamin Agonisten (1 μ M Quinpirol) nicht hyperpolarisiert werden können und identifizierten den D2 Rezeptor somit als Autorezeptor (Mercuri et al., 1997). Weitere Studien konnten nachweisen, dass die D2s Isoform offenbar als Autorezeptor fungiert, während die D2l Isoform überwiegend postsynaptisch exprimiert ist (Usiello et al., 2000). Allerdings konnte sowohl D2s als auch D2l mRNA mittels qualitativer PCR in DA Mittelhirnneuronen der SNc detektiert werden (Hetzl und Liss, 2006). Generell werden zwei Subtypen von Autorezeptoren unterschieden: somatodendritische Impuls-modulierende und präsynaptische Synthese- und Freisetzungs-

¹ GSK3 ist wichtiges Target von Lithiumsalzen, die bei der Therapie manischer Depressionen verwendet werden.

modulierende Autorezeptoren¹ (Roth und Elsworth, 2000). Während Freisetzung-modulierende Autorezeptoren in allen Subpopulationen DA Neurone nachgewiesen wurden, wird die Existenz von Impuls-modulierender somatodendritischer D2 Autorezeptoren in mesokortikalen DA Neuronen kontrovers diskutiert (Chiodo et al., 1984; Gariano et al., 1989).

Zur Zeit ist noch unklar inwieweit Dopaminrezeptoren an der Vermittlung neurotoxischer oder neuroprotektiver Mechanismen beteiligt sind. So konnte gezeigt werden, dass Dopamin zytotoxisch in kultivierten Neuronen wirkt. Es ist jedoch noch eindeutig geklärt, ob es sich dabei um Dopamin Rezeptor vermittelte Mechanismen handelt oder oxidative Metabolite bzw. reaktive Sauerstoff-gebildet werden, die apoptotische Vorgänge induzieren (Bozzi und Borrelli, 2006). Andere Studien zeigten, dass die Aktivierung des D2 Rezeptors mittels D2 Agonisten (Lisurid, Bromocriptin) in klinischen Studien und in Tierexperimenten neuroprotektiv ist (O'Neill et al., 1998; Kitamura et al., 2003). Als Mechanismus wird vermutet, dass die Stimulation präsynaptischer D2 Autorezeptoren die extrazellulären Dopaminkonzentrationen und somit das zur Oxidation verfügbare Dopamin und schließlich die Produktion freier Radikale verringert wird (Bozzi und Borrelli, 2006).

1.1.4 Pharmakologische Targets im dopaminergen System

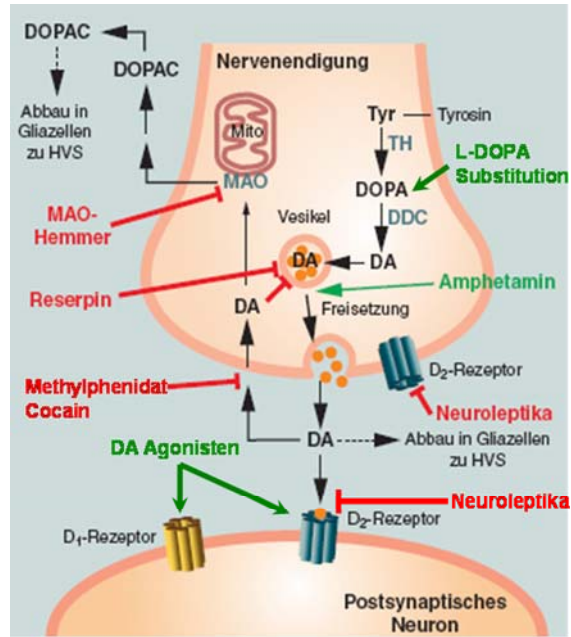
Es gibt eine Vielzahl von Substanzen, die mit dem dopaminergen System interagieren. Im Folgenden sollen daher kurz einige wichtige pharmakologische Targets und ihre Bedeutung in der Therapie neuronalen Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Schizophrenie und dem Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Syndrom (ADHS) erläutert werden. Abbildung 3 verdeutlicht wichtige pharmakologische Targets an einer dopaminergen Synapse.

¹ Inwiefern zwischen Synthese- und Freisetzungmodulierenden Autorezeptoren differenziert werden kann, ist bislang nicht eindeutig geklärt.

² Reaktive Sauerstoff-Spezies (H_2O_2 , Hydroxylradikal, Superoxid-Anion) werden beispielsweise als Nebenprodukte in der mitochondrialen Atmungskette, beim Purinabbau, bei der Katecholaminoxidation oder durch UV- bzw. radioaktive Strahlung gebildet und schädigen DNA, Lipide und Proteine.

Abb. 3: Pharmakologische Targets an einer DA Synapse

Schematische Darstellung einer DA Synapse. Gekennzeichnet sind Angriffspunkte stimulierender (grüne Pfeile) und inhibierender Substanzen (rote Pfeile). Reserpin ist ein Indolalkaloid (v.a. aus *Rauwolfia serpentina*), das den vesikulären Monoamintransporter (VMAT2) in der Membran der Speichervesikel hemmt. Dadurch kann Dopamin nicht mehr in die Vesikel aufgenommen werden und es wird weniger Dopamin freigesetzt. Die Erklärung der Wirkung der übrigen hier dargestellten Substanzen erfolgt im Text. Abbildung modifiziert nach Müller, 2002.



1.1.4.1 Pharmakologische Targets in der Therapie des Morbus Parkinson

Die Parkinson-Krankheit (Morbus Parkinson) ist eine chronisch-progressive, neurodegenerative Bewegungserkrankung. Aufgrund einer Degeneration dopaminergener Neurone - hauptsächlich in der Substantia nigra pars compacta - kommt es zu einem striatalen Dopaminmangel und zu den klassischen Kardinalsymptomen wie Bradykinesie, Rigor, Tremor sowie posturaler Instabilität (Dauer und Przedborski, 2003). In der Therapie dieser Erkrankungen werden u.a. Dopaminrezeptoragonisten eingesetzt. Hierzu zählen Lysergsäurederivate (Cabergolin, Lisurid, Pergolid, Bromocriptin) und nicht-Lysergsäurederivate (Pramipexol, Ropinirol). L-DOPA und Apomorphin sind hochpotente Anti-Parkinson-Mittel, die synergistisch D1 und D2 Rezeptoren stimulieren. Allerdings erfordert die stark emetische Wirkung von Apomorphin die zusätzliche Gabe von . Aufgrund einer phasischen Stimulation (L-DOPA hat eine Plasmahalbwertszeit von 2 Stunden) und Internalisierung von Dopaminrezeptoren (bei dauerhafter Anwendung), führt L-DOPA in einem erheblichen Ausmaß zu Dyskinesien. Inhibitoren der MAO-B (Selegilin, Xilopar, Rasagilin) beeinflussen ebenso wie COMT-Hemmer (Entacapon, Tolcapon) die Metabolisierung des freigesetzten Dopamins (Reichmann, 2005).

¹ Domperidon ist ein Dopamin Antagonist, der v.a. im peripheren Nervensystem wirksam ist.

1.1.4.2 Pharmakologische Targets in der Therapie der Schizophrenie

Rund 1 % der Bevölkerung erkrankt im Laufe des Lebens zumindest einmal an Schizophrenie. Diese Erkrankung manifestiert sich in den klassischen Positiv- (Halluzinationen und Wahnvorstellungen) und Negativsymptomen (kognitive Störungen, affektive Verflachung, Antriebslosigkeit, Apathie) und den daraus resultierenden Beeinträchtigungen von Arbeitsfähigkeit und sozialen Fertigkeiten. Eine zentrale Rolle haben die Neurotransmitter Dopamin, Glutamat und Serotonin, deren veränderte Transmission wahrscheinlich auf neurale Entwicklungsstörungen zurückzuführen ist (Widschwendter und Fleischhacker, 2005). Der Hauptfokus gilt dabei dem Neurotransmitter Dopamin. Die Dopaminhypothese der Schizophrenie geht von einer kortiko-subkortikalen Dopamin Imbalance aus. Funktionelle bildgebende Verfahren geben Hinweise, dass die Negativsymptome Folge einer verminderten D1 Rezeptorstimulation im PFC sind (Goldman-Rakic und Selemon, 1997). Demnach liegt einerseits Hypoaktivität von Dopaminprojektionen zum PFC, und andererseits Hyperaktivität subkortikaler mesolimbischer Dopaminprojektionen vor, letztere führt zu der Positivsymptomatik (Widschwendter und Fleischhacker, 2005). In der Therapie der Schizophrenie werden antipsychotische Medikamente (Neuroleptika) eingesetzt. Alle derzeit am Markt erhältlichen Neuroleptika wirken zumindest teilweise als Dopaminrezeptorantagonisten. Generell unterscheidet man zwischen typischen (z.B. Haloperidol) und atypischen Neuroleptika (z.B. Clozapin, Quetiapin, Sulpirid), die sich u.a. in Wirkprofil und Wirkmechanismus unterscheiden (De Oliveira und Juruena, 2006).

Typische zeigen eine gute Wirksamkeit in Bezug auf die Plus-Symptomatik und entfalten ihre Wirkung vor allem durch eine Blockade von D2 Rezeptoren. Die Blockade postsynaptischer D2 Rezeptoren stellt jedoch nicht den alleinigen Wirkungsmechanismus dar, da die antipsychotische Wirkung in Schizophrenie Patienten erst nach mehreren Wochen eintritt. Tierexperimentelle Studien haben gezeigt, dass die akute Applikation von Haloperidol in DA VTA und SN Neuronen zu einer dosisunabhängigen Erhöhung der Feuerungsrate und Anzahl der

¹ auch bezeichnet als klassische Neuroleptika.

spontanaktiven Zellen führt. Als Mechanismus wird eine Blockade inhibitorischer somatodendritischer D2 Autorezeptoren vermutet sowie eine Aktivierung exzitatorischer Feedbacksysteme als Antwort auf die Blockade postsynaptischer Rezeptoren im Striatum. Aktivierung striataler GABAerger Afferenzen erhöht die Feuerungsrate DA Neurone indirekt durch Inhibition mesencephaler GABAerger Interneurone (Müller 2002, Westerink, 2002). Weiterhin tragen glutamaterge Afferenzen aus dem Kortex und Nukleus Subthalamicus zu einem direkten exzitatorischen Effekt bei (Pucak und Grace, 1996). Dies resultiert in einer Überstimulation DA Neurone (vor allem mesostriataler DA Neurone) wodurch die akut nach einer Neuroleptikagabe auftretenden Dyskinesien erklärt werden könnten. Bei persistierender D2 Rezeptorblockade im Verlauf einer chronischen Therapie kommt es nach tierexperimentellen Befunden aufgrund einer tonischen Depolarisation des Membranpotentials zu einer persistierenden Inaktivierung von Natriumkanälen und es können keine neuen Aktionspotentiale generiert werden. Dieser als Depolarisationsblock bezeichnete Mechanismus erklärt zum einen die antipsychotische Wirkung, zum anderen aber auch die schweren und unerwünschten Störungen der extrapyramidalen Motorik (EPMS) im mesostriatalen DA System bei der typischen Neuroleptikatherapie (Grace et al., 1997; Müller, 2002; Westerink, 2002). Chiodo und Kollegen stellten die Hypothese auf, dass eine Abwesenheit von somatodendritischen D2 Autorezeptoren eine Ursache für das Ausbleiben des Depolarisationsblocks in mesokortikalen DA Neuronen sein könnte (Chiodo et al., 1984). Dies könnte ein Erklärungsansatz für das Ausbleiben der Wirkung typischer Neuroleptika in bezug auf die Minus-Symptomatik (kognitive Störungen) liefern. Allerdings konnten andere Arbeitsgruppen eine Abwesenheit von somatodendritischen D2 Rezeptoren in mesokortikalen DA Neuronen nicht bestätigen (Gariano et al., 1989; Talmaciu et al., 1986; Gessa et al., 2000).

Im Gegensatz zu typischen Neuroleptika weisen atypische Neuroleptika deutlich weniger EPMS auf und zeigen auch eine Wirkung in Bezug auf die Minus-Symptomatik (Fleischhacker und Widschwendter, 2006). Ein Erklärungsansatz für den Mechanismus atypischer Wirksamkeit ist die präferentielle funktionelle

Beeinflussung bestimmter DA Subpopulationen. Clozapin verursacht einen Depolarisationsblock selektiv nur in mesolimbischen VTA DA Neuronen ohne die elektrische Aktivität von DA SN Neuronen zu beeinflussen (Chiodo und Bunney, 1983). Weiterhin werden Interaktionen mit anderen monoaminergen Rezeptoren diskutiert, die die spezifische Wirksamkeit atypischer Neuroleptika erklären könnten. Das bereits erwähnte Clozapin besitzt neben der Selektivität für den D2 Rezeptor auch noch antagonistische Aktivität am Serotonin-Rezeptor 5-HT_{2A} und anderen Katecholamin-Rezeptoren (α 1- und α 2-Adrenozeptoren). Die Interaktion zwischen dem dopaminergen und serotonergen System scheint für eine atypische Wirksamkeit nötig zu sein. Diese Hypothese wird unterstützt durch Tierexperimente, die zeigten, dass typische Neuroleptika durch zusätzliche 5-HT_{2A} Rezeptorblockade in atypische Neuroleptika konvertiert werden können (Meltzer et al., 2003). Als weiteres Konzept wird die sogenannte "*loose binding*" (lockere Bindung) Theorie diskutiert. Dabei hat man spekuliert, dass atypische Neuroleptika aufgrund der relativ schwachen Bindungsstärke zum D2 Rezeptor besonders leicht von diesem Rezeptor durch das physiologische Dopamin verdrängt werden können, besonders wenn, wie z.B. im Striatum, sehr hohe Dopaminkonzentrationen vorliegen.

1.1.4.3 Pharmakologische Targets in der Therapie des Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Syndroms

Das Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Syndrom (ADHS) ist mit einer Prävalenz von 5-8 % eine häufige Störung im Kindes- und Jugendalter. Hauptsymptome sind Hyperaktivität, Aufmerksamkeitsstörungen und Impulsivität (Casey et al., 2007). Es wird heute angenommen, dass die Genese dieser Erkrankung letztendlich auf neurobiologische, genetische und psychosoziale Faktoren zurückzuführen ist. Dabei wird u.a. eine dopaminerge Hypofunktion fronto-striataler Hirnregionen als Ursache für die Erkrankung diskutiert (Huber et al., 2007). Neuroimaging Studien, dass die striatale Dopamintransporter (DAT) Dichte bei ADHS Patienten erhöht ist (Krause et al., 2003). Der durch die vermehrte präsynaptische Dopamin Wiederaufnahme langfristig resultierende chronische relative extrazelluläre Dopaminmangel scheint dabei ein wesentlicher

neurochemischer Ursachenfaktor zu sein. Ein Grundstein bei der Behandlung einer hyperkinetischen Störung stellt die Pharmakotherapie mit psychomotorisch stimulierenden Substanzen dar. Dabei ist Methylphenidat (Handelsname: Ritalin®), ein Amphetaminderivat, das mit Abstand am häufigsten verwendete Präparat. Methylphenidat bedingt eine reversible und dosisabhängige Blockade des DAT, wodurch infolge der Inhibition der Wiederaufnahme von Dopamin, dessen extrazelluläre Konzentration ansteigt (Leviel, 2001; Sulzer et al., 1995). In diesem Kontext ist das Wirkprinzip von Methylphenidat dem des Stimulanzium Kokain sehr ähnlich. Im Vergleich zu Amphetamin oder Kokain kommt es bei Methylphenidat jedoch zu keiner unkontrollierten Entleerung vesikulärer Speicher, sondern freigesetzter Transmitter hat eine verlängerte Wirkungsdauer. Das Risiko einer Toleranzentwicklung ist bei Methylphenidat dadurch deutlich vermindert (Iversen, 2006).

1.2 Elektrophysiologische Eigenschaften dopaminerger Neurone

Die elektrophysiologische Analyse DA Mittelhirnneurone begann mit den klassischen Arbeiten von Grace und Bunney in den frühen achtziger Jahren, die als erstes die elektrophysiologischen Eigenschaften dieser Zellen in Kombination mit histochemischen Techniken beschrieben (Grace und Bunney, 1980; Grace und Bunney, 1983). In den letzten Jahrzehnten wurden die Methoden zur Charakterisierung DA Neurone wesentlich erweitert und decken heute von der *in vitro* Messung von Zellkulturen und in Hirnschnitten bis zur *in vivo* Messung DA Neurone in wachen Primaten ein breites Spektrum biophysikalischer Analyseverfahren ab. Das folgende Kapitel gibt einen Überblick über die elektrophysiologischen Eigenschaften DA Mittelhirnneurone *in vitro* und betont dabei molekulare Mechanismen (Ionenkanäle), die eine besondere Bedeutung in der Steuerung der elektrischen Aktivität haben. Dabei werden stets Vergleiche zu *in vivo* Studien gezogen (Abb. 4).

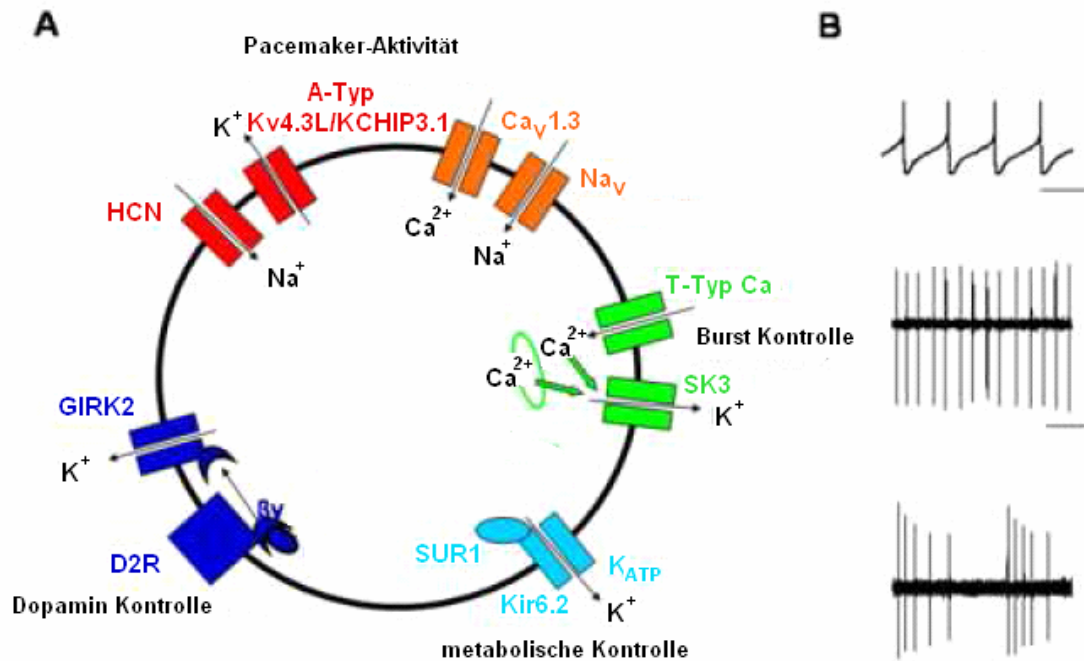


Abb. 4: Molekulare Mechanismen und Feuerungsverhalten DA Neurone *in vivo* und *in vitro*

[A] Schematische Darstellung verschiedener Ionenkanäle, die von DA Mittelhirnneuronen exprimiert werden und an der Modulation der Aktivität dieser Zellen beteiligt sind. Die D2 Autorezeptor vermittelte Regulation der Aktivität wird im Kapitel 1.1.3 besprochen. ATP-sensitive Kaliumkanäle (K_{ATP}-Kanäle) werden durch ATP inhibiert und durch ADP und Phospholipide (PIP₂) aktiviert (Nichols, 2006). Somit koppeln sie den Energiestatus und metabolische Veränderungen innerhalb der Zelle an die elektrische Aktivität. Sie werden in der vorliegenden Arbeit nicht näher erläutert. Ionenkanäle, die an der Burst-Kontrolle (SK3 und T-Typ Kalzium Kanäle) sowie an der Pacemaker Aktivität (HCN-Kanäle, A-Typ Kalium Kanäle) beteiligt sind, werden im Text besprochen. Weiterhin weisen mehrere Studien auf eine wichtige Rolle von spannungsabhängigen L-Typ Ca_v-Kanälen (Ca_v1.3 Kanäle) bei der Entstehung der regelmäßigen Schrittmacheraktivität DA Neurone hin (Johannsen, 2006; Puopolo et al., 2007). [B] Verschiedene Entladungsmuster DA Neurone in der adulten Maus. *In vitro* (oben, Patch-clamp), *in vivo* Aktivität (Mitte, extrazelluläre Messung), sowie Burst Aktivität *in vivo* (unten). Größenbalken: 0,5 s/25 mV (oben); 1 s/0,5 mV (Mitte, unten). Abbildung modifiziert nach Liss und Roeper, submitted.

In Hirnschnittpräparaten sind dopaminerge SN Neurone spontanaktiv, d.h. sie erzeugen auch in Abwesenheit von synaptischer Stimulation durch intrinsische Mechanismen Aktionspotentiale (spikes) in regelmäßigen Abständen mit einer durchschnittlichen Frequenz von ungefähr 0,4 bis 4 Hz; im Mittel bei 1,3±1,1 Hz (Liss et al., 2001). Man spricht daher von einer sogenannten Schrittmacher Aktivität (Pacemaker) (Abb. 4 B, oben). Die Feuerungsrate dieser Zellen *in vivo* liegt im Mittel bei 4,5 Hz (Minimum: 0,5 Hz; Maximum: 10 Hz) (Grace und

Bunney, 1984a). Generell werden *in vivo* verschiedene Entladungsmuster differenziert. Man unterscheidet reguläre (Abb. 4 B, Mitte) und irreguläre Entladungsmuster sowie Bursts (Abb. 4 B, unten), die durch Gruppenentladungen in sehr kurzen Zeitabständen charakterisiert sind. Bursts bestehen meistens aus 2 bis 3, seltener bis maximal 15 Spikes (Grace und Bunney, 1984b). Experimentell konnten Bursts *in vivo* durch iontophoretische Applikation von Glutamat (Grace und Bunney, 1984b) oder durch Aktivierung glutamaterger Afferenzen (Smith und Grace, 1992) induziert werden. Inaktivierung glutamaterger Afferenzen (Smith und Grace, 1992) oder die Applikation von Glutamatantagonisten wie Kynurensäure (Charley et al., 1991) bzw. NMDA-Antagonisten (Chergui et al., 1993) führte *in vivo* zu einer Aufhebung des Burstverhaltens. Es konnte gezeigt werden, dass DA Neurone im Burstmodus etwa 2-3 mal mehr Dopamin freisetzen (Gonon, 1988). Eine Änderungen des Feuerungsmodus führt daher vermutlich zu höheren extrazellulären Dopamin Konzentrationen, als durch alleinige Erhöhung der Feuerungsfrequenz erreicht werden kann. Die verschiedenen Neurotransmitter-Freisetzungsmodi DA Neurone stehen in den letzten Jahren im Fokus vieler Studien und werden im Kapitel 1.3 näher erläutert. Aufgrund des fehlenden exzitatorischen Inputs (Deafferentation) kommt es in Mittelhirnschnittpräparaten zu einem Verlust des Burstmodus (Grace und Bunney, 1984b). Alleinige glutamaterge Stimulation ist jedoch nicht ausreichend für die Induzierung von Bursts *in vitro* (Seutin et al., 1990). Burst-ähnliche Entladungsmuster konnten in *in vitro* Präparationen erstmals nach Applikation des Kaliumkanalblockers Tetraethylammonium (TEA) beobachtet werden (Shepard und Bunney, 1988). 2 bis 50 % der mesencephalen DA Neurone sind *in vivo*, unabhängig von einer Anästhesie (Freeman et al., 1985), nicht spontanaktiv (Dai und Tepper, 1998; Bunney und Grace, 1978). Die Ursache liegt in einer GABA vermittelten Inhibition DA Neurone aus dem ventralen Pallidum (Floresco et al., 2003). Die Inhibition pallidaler Strukturen u.a. durch eine hippocampale Aktivierung des NAc führt zu einer Disinhibition DA Neurone und ermöglicht es ihnen spontan zu feuern (Lisman und Grace, 2005). Kürzlich wurde gezeigt, dass neben dem Input vom

Präfrontalen Kortex und Pedunculo-pontinen Nukleus (DA VTA Neurone), sowie Nukleus Subthalamicus (DA SN Neurone (Smith und Grace, 1992)) vermutlich cholinerge Afferenzen vom laterodorsalen Tegmentum ein sogenanntes "*permissive gate*" für die Aktivierung des Burstmodus darstellen (Lodge und Grace, 2006; Mameli-Engvall et al., 2006). Weiterhin können nur spontanaktive DA Neurone in den Burstmodus wechseln (Floresco et al., 2003). Ursache hierfür scheint die pallidale GABA vermittelte Hyperpolarisation DA Neurone zu sein und die daraus resultierende Blockade des NMDA Rezeptors durch extrazelluläres Magnesium (Mayer et al., 1984).

Kalzium-sensitive Kaliumkanäle mit geringer Leitfähigkeit (SK-Kanal, *Ca²⁺-sensitive small conductance potassium channel*) sind wesentlich an der Modulation der intrinsischen Erregbarkeit DA Neurone beteiligt (Abb. 4 A). SK Kanäle, von denen bislang vier Mitglieder SK1-SK4 kloniert wurden, gehören der KCNN Genfamilie an (Bond et al., 1999). Sie sind selektiv permeabel für Kalium und werden bei Kalzium-Konzentrationen oberhalb von 200 nmol/l aktiviert. Kalzium kann beispielsweise als Antwort auf die Aktivierung metabotroper Glutamat Rezeptoren freigesetzt werden (Seutin et al., 2000). Wolfart und Roeper (2002) haben gezeigt, dass in DA SN Neuronen SK Kanäle durch die Aktivierung von T-Typ Kalziumkanälen (T-Typ Ca) und den daraus resultierenden Kalziuminflux aktiviert werden. Weiterhin ist der SK3 Subtyp im Vergleich zu den anderen SK Subtypen (SK1, SK2, SK4) in DA SN Neuronen deutlich höher exprimiert. SK3 vermittelt hier die langsame Nachhyperpolarisation (Wolfart et al., 2001). Direkte Inhibition des SK-Kanals mit dem Peptidtoxin Apamin (eine Komponente des Giftes der europäischen Honigbiene (*Apis mellifera*)) induziert Burstentladungen *in vitro* (Shepard und Bunney, 1991) und führt in DA SN Neuronen zu einer Veränderung des Entladungsmusters. Die Regelmäßigkeit mit der diese Zellen normalerweise Aktionspotentiale generieren geht durch Blockade der SK Kanalaktivität verloren; es kommt zu einem irregulärem Entladungsmuster. Dies geschieht jedoch nicht in DA VTA Neuronen, die durch eine sehr geringe SK3 Proteinexpression gekennzeichnet sind (Wolfart et al.,

2001). Ohne pharmakologische Manipulation gibt es im Hirnschnitt aufgrund der Deafferentation (z.B. trägt Input aus dem Pedunculopontinen Nukleus (PPN) zu einer reduzierten Aktivierung des SK Kanals bei) keine negativen Regulationsmechanismen zur Blockade des SK-Kanals. Die durch die SK Kanäle vermittelte langsame Nachhyperpolarisation verzögert das Intervall bis zum nächsten Aktionspotential und verhindert somit eine schnelle Folge von Aktionspotentialen wodurch Bursts *in vitro* verhindert werden (Kitai et al., 1999)

Der HCN Kanal (*Hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-modulated ion channel*) ist ein spannungsabhängiger Ionenkanal, der ebenfalls in die Kontrolle der Rhythmogenese in neuronalen (und auch kardialen; DiFrancesco, 1993) Zellen involviert ist (Neuhoff et al., 2002) (Abb. 4 A). Dabei handelt es sich um einen unselektiven Kationenkanal (permeabel für Natrium- und Kaliumionen), der bei negativem Membranpotential einem der Hyperpolarisation entgegenwirkenden Einwärtsstrom (I_h Strom) vermittelt und bei positivem Membranpotential deaktiviert ist. Funktionelle HCN Kanäle bestehen aus homo- bzw. heterotetrameren Proteinuntereinheiten und werden von vier verschiedenen HCN (HCN1-HCN4) Genen codiert (Ludwig et al., 1998). Auf immunhistochemischer Ebene wird vor allem die HCN3 Untereinheit (HCN1,2,4 zeigen eine schwache Immunreaktivität in der SNc) dominant in der SNc exprimiert. Dagegen konnte in der VTA nahezu keine HCN-Immunreaktivität gefunden werden (die HCN2 Untereinheit zeigt eine nur marginale Immunreaktivität in der VTA) (Notomi und Shigemoto, 2004). Die Bindung zyklischer Nukleotide (cAMP, cGMP) an eine C-terminale CNB- (*cyclic nucleotide binding*) Domäne fördert die Aktivierung von I_h Kanälen durch Verschieben der Spannungsabhängigkeit zu depolarisierten Potentialen und erhöht somit die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals (DiFrancesco und Tortora, 1991). Kürzlich wurde gezeigt, dass die Interaktion mit Membranphospholipiden (PIP₂, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) ebenfalls und unabhängig von der Anwesenheit zyklischer Nukleotide zu einer Herabsetzung der Aktivierungsschwelle und hieraus resultierenden Kanalaktivierung führt.

Enzymatische Degradierung der Phospholipide führte in DA SN Neuronen sowie Kardiomyozyten zu einer reduzierten Kanalaktivierung und Abnahme der Spontanaktivität (Zolles et al., 2006). DA Neurone der SN exprimieren drei der vier HCN Kanal Untereinheiten (HCN2, HCN3, HCN4) (Franz et al., 2000). Neuhoff und Kollegen zeigten, dass der I_h Kanal direkt an der Kontrolle des Schrittmacherpotentials in -negativen DA SN Neurone beteiligt ist. Eine vergleichbare funktionelle Rolle konnte in DA VTA Neuronen nicht gezeigt werden. Weiterhin konnte in DA Neuronen der medialen VTA nur eine marginale Aktivierung des I_h Kanals als Antwort auf eine hyperpolarisierende Strominjektion nachgewiesen werden (Neuhoff et al., 2002).

Spannungsabhängige A-Typ Kaliumkanäle haben ebenfalls eine Schlüsselfunktion bei der Modulation der Pacemakeraktivität DA SN Neurone (Liss et al., 2001) (Abb. 4 A). Sie entstehen durch Tetramerisierung von vier $Kv4\alpha$ -Untereinheiten ($Kv4.1$ bis $Kv4.3$), an deren zytoplasmatischen N-terminalen Ende β -Untereinheiten gebunden sind (KCHIP1 bis 4; *potassium channel interacting protein*). Als zusätzliche transmembrane β -Untereinheit gilt DPPX (Dipeptidyl Peptidase 10) (An et al., 2000; Nadal et al., 2003). In DA SN Neuronen werden A-Typ Kanäle aus den porenformenden α -Untereinheiten $Kv4.3L$ (lange Splicevariante), sowie den regulatorischen β -Untereinheiten KCHIP3.1 (lange Splicevariante) und DPPX gebildet. Die Schrittmacheraktivität ist dabei mit der A-Typ Kanaldichte und der Anzahl der Kanaluntereinheiten ($Kv4.3L$ und KCHIP3.1 mRNA Moleküle) negativ korreliert (Liss et al., 2001). A-Typ Kaliumkanäle vermitteln in DA SN Neuronen einen transienten, schnell inaktivierenden (Inaktivierungszeitkonstante τ^2 : etwa 30 ms) Kaliumauswärtsstrom (I_A) (Liss et al., 2001). Im Gegensatz beobachtet man in DA VTA Neuronen einen deutlich langsamer inaktivierenden A-Typ-Strom (Inaktivierungszeitkonstante τ : etwa 80-100 ms (Liss, 2002).

¹ Calbindin-D28k (CB) ist ein Kalzium-bindendes Protein, dass in den beim Morbus Parkinson weniger vulnerablen DA Neuronen exprimiert wird. Die physiologische Funktion von CB ist jedoch noch nicht vollständig geklärt ist. Es wird oftmals als ein Marker für DA Subpopulationen verwendet (Yamada et al., 1990; Liang et al., 1996; Neuhoff et al., 2002).

² Definition siehe Kapitel 2.2.2.9.

1.3 Verschiedene Freisetzungsmodi von Dopamin

Dopamin kann sowohl tonisch als auch phasisch freigesetzt werden. Dopamin wird tonisch infolge von Einzelspikes in den postsynaptischen Arealen freigesetzt und führt hier zu einer basalen extrazellulären Dopamin Konzentration (10-100 nM; in der Ratte). Der tonische Dopaminfreisetzungsmodus vermittelt ein diffuses Signal mit langandauernder Wirkung (Sekunden bis Minuten), also geringer zeitlicher und räumlicher Auflösung. Tonisch freigesetztes Dopamin ist neuromodulatorisch an der Bewegungsausführung, sowie Kognitions- und motivationalen Prozessen beteiligt (Schultz, 2007; Grace und Floresco, 2007).

Weiterhin kann Dopamin auch phasisch im Rahmen von Gruppenentladungen von Aktionspotentialen (Bursts, siehe Kapitel 1.2) freigesetzt werden. Dabei handelt es sich um ein transientes Signal (100 bis 300 ms), das zu hohen extrazellulären Dopamin Konzentrationen im Striatum führt (Garris und Wightman, 1994). Funktionell beschreiben Schultz und Kollegen die phasische Dopamin Freisetzung als eine Antwort auf primäre oder konditionierte Belohnungsstimuli (Schultz, 2001; Schultz, 2007; Grace und Floresco, 2007; siehe Kapitel 1.4.2).

Die Begrenzung des phasischen DA Signals erfolgt im Wesentlichen durch den Dopamin-transporter (DAT), der extrazelluläres Dopamin wieder in die Terminalen aufnimmt (siehe Kapitel 1.1.1). Durch eine hohe DAT Dichte wie z.B. im Striatum kann freigesetztes Dopamin nur kurze Strecken diffundieren und eine Wirkung nur im Bereich des synaptischen Spalts entfalten. In Hirnarealen mit geringer DAT Dichte (PFC) ist die Diffusionsstrecke und Wirkungsdauer von Dopamin wesentlich länger, und es werden auch extrasynaptische Dopamin Rezeptoren erreicht. Man bezeichnet diesen Vorgang als sogenannte Volumentransmission (*volume transmission*) (Cragg und Rice, 2004).

1.4 Funktionelle Eigenschaften mesokortikolimbischer dopaminerger Projektionen

¹ axonale Stimulation DA Neurone führt zu einer Erhöhung der Dopaminkonzentration im ventralen und dorsalen Striatum von 5-10 nM auf 250-500 nM (Ratte) bzw. 500-1600 nM (Primaten) (Schultz, 2007).

1.4.1 Funktionelle Anatomie und Zytoarchitektur des Striatums und des präfrontalen Kortex

Das Striatum ist im Diencephalon lokalisiert und lässt sich anatomisch und funktionell in einen dorsalen und ventralen Bereich gliedern. Die Zytoarchitektur der beiden Areale ist im Wesentlichen identisch (Gerfen und Wilson, 1996). Mehr als 90 % der Neurone des Striatums zählen zu einer Zellpopulation, die aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften als *medium spiny neurons* (MSN) bezeichnet werden. Etwa 10 % der Zellen des Striatums sind Interneurone. Dabei lassen sich zwei Zelltypen unterscheiden: die großen dornfreien cholinergen Neurone (*large aspiny neurons*) und die mittelgroßen GABAergen Interneurone (*medium sized interneurons*) (Kawaguchi, 1993). MSN sind GABAerge Projektionsneurone. Es werden zwei Subpopulationen unterschieden, die sich in ihren Projektionsgebieten (Globus Pallidus pars internus, SNr bzw. Globus Pallidus pars) der Dopamin Rezeptorexpression (D1 bzw. D2) und Neuropeptidbildung (Substanz P bzw. Enkephalin, Dynorphin) unterscheiden. Diese Zellen exprimieren Dopaminrezeptoren u.a. an den Dornfortsätzen (*spines*) distaler Dendriten. Hier konvergieren nigrostriatale DA mit glutamatergen kortikostriatalen Afferenzen. An dieser sogenannten "synaptischen Trias" moduliert Dopamin die Effizienz der glutamatergen Neurotransmission und führt entweder zu einer Erhöhung (über D1 Rezeptoren striatonigraler MSN) oder Abschwächung (über D2 Rezeptoren striatopallidaler MSN) der neuronalen Erregbarkeit (Abb. 5) (Smith und Bolam, 1990; Centonze et al., 2001). Der funktionelle Antagonismus der striatalen Dopamin Rezeptoren ist von besonderer Bedeutung bei der Regulation der striatalen synaptischen Plastizität, also der Verarbeitung und Speicherung motorischer Informationen (Pisani et al., 2005; Surmeier et al., 2007). Demnach ist die Induzierung einer Langzeit- (LTP = *long-term potentiation*) abhängig von der Koaktivierung von D1 und NMDA Rezeptoren (Surmeier et al., 2007). Kürzlich wurde gezeigt, dass cholinerge Interneurone als wichtiges Integrationselement bei der Vermittlung der

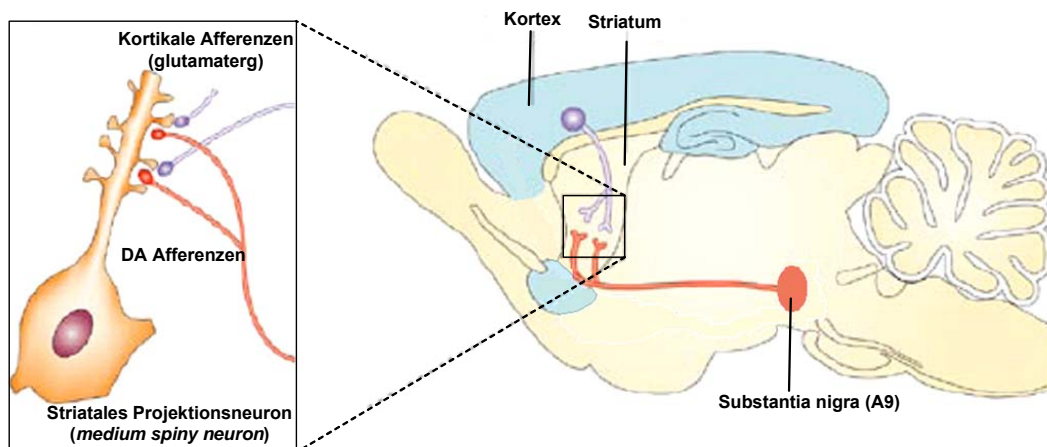
¹ im Nager als Nucleus entopeduncularis bezeichnet.

² langandauernde Verstärkung der synaptischen Übertragung.

striatalen synaptischen Plastizität fungieren. Demnach ist die Induktion einer D2 Rezeptor-vermittelten LTD (= *long-term depression*) nicht abhängig von der jeweiligen Dopamin Rezeptor Expression der MSN, sondern wird vielmehr durch Dopamin-induzierte Änderungen in der Acetylcholinfreisetzung (Wang et al., 2006; Wilson, 2006). Allerdings betonen andere Arbeitsgruppen in diesem Zusammenhang insbesondere die Bedeutung der Endocannabinoide, die von D2 Rezeptor-exprimierenden striatopallidalen MSN freigesetzt werden und folglich LTD in D1 Rezeptor-exprimierenden striatonigralen MSN induzieren (Kreitzer und Malenka, 2007).

Abb. 5: Synaptische Trias im Striatum

Glutamaterge Afferenzen aus dem Kortex und DA Afferenzen aus der SN des Mittelhirns konvergieren auf den Dornenfortsätzen (*spines*) distaler Dendriten der striatalen



Projektionsneurone (*medium spiny neurons*) (Abbildung modifiziert nach Smith und Bolam, 1990).

Der präfrontale Kortex (PFC) macht beim Primaten und Menschen etwa die Hälfte des Frontalhirns (Frontallappen; Lobus frontalis) aus und vermittelt

¹ langandauernde Abschwächung bzw. Hemmung der synaptischen Effektivität.

² Dies bedeutet, dass durch die D2 Rezeptoraktivierung cholinergischer Interneurone die Acetylcholinfreisetzung vermindert und somit die Aktivierung muskarinischer Acetylcholinrezeptoren (M1), die auf den spines der MSN in der Nähe der kortikostriatalen glutamatergen Synapse lokalisiert sind, reduziert wird. Dies führt in den MSN zu einer Erniedrigung der Erregbarkeit und Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit von Kalzium Kanälen (Cav1.3), wodurch es zu einer vermehrten Ausschüttung von Endocannabinoiden und folgenden Aktivierung von präsynaptischen Cannabinoid Rezeptoren kommt (CB1 Rezeptor) wodurch die Glutamat Ausschüttung verringert wird (LTD Induzierung).

wichtige Exekutivfunktionen. Hierzu gehören kognitive Prozesse sowie die Selektion, Planung und Exekution adäquater Verhaltensweisen insbesondere im sozialen Kontext. Menschen mit Läsionen in diesem Gebiet haben Probleme zielorientiert zu handeln, Relevantes von Irrelevantem zu unterscheiden und haben Einschränkungen bei der Impulskontrolle. Es kommt jedoch nicht zu Intelligenzdefiziten (Purves et al., 2004).

Beim Primaten und Menschen wird der PFC anatomisch und funktionell in drei Teile geteilt: Der dorsolaterale präfrontale Kortex (Brodmann Areale (BA) 9, 12, 45, 46, 47), der ventromediale (orbitofrontale) Kortex (BA 9-12, 47) sowie der anteriore cinguläre Kortex (BA 24, 25, 34) (Purves et al., 2004).

Während der orbitofrontale Kortex wesentlich in die Planung und Kontrolle von zielgerichtetem Verhalten involviert ist, vermittelt der dorsolaterale Kortex kognitive Funktionen (Purves et al., 2004). Hierzu gehört das Arbeitsgedächtnis (working memory). Dabei handelt es sich um eine Form des Kurzzeitgedächtnisses, welches u.a. der kurzzeitigen Repräsentation von Verhaltens-relevanten Informationen dient. Eine Pionierin auf diesem Gebiet war Patricia Goldman-Rakic; sie beschrieb das Arbeitsgedächtnis als "*blackboard of mind*" (Goldman-Rakic, 1999). Eine ausführliche Beschreibung der Relevanz der dopaminergen Neurotransmission im Rahmen mnemischer Prozesse erfolgt im Kapitel 1.4.3.

Der anteriore cinguläre Kortex (ACC) ist eine wichtige Schnittstelle emotional-kognitiver Vorgänge. Der dorsale ACC ist beim bewussten Auftreten von Fehlern aktiv (*error-related negativity*: großes elektrisches Potential unmittelbar nach einem Fehler)¹. Der ventrale Bereich vermittelt emotional getragene Ausdrucksbewegungen (Mimik, Gestik). Weiterhin ist dieses Areal an der kortikalen Verarbeitung von Schmerz und zwar im Sinne einer emotional (aversiven) Bewertung dieses sensorischen Reizes beteiligt (Kerns et al., 2005; Allman et al., 2001).

Die strukturelle Organisation des PFC beim Nager unterscheidet sich von der des Primaten aufgrund von Variationen in Bezug auf etablierte anatomische Kriterien

¹ er wird daher oft auch als Konfliktmonitor bezeichnet.

(Konnektivität). Generell erfolgt beim Nager ebenfalls eine Dreiteilung des PFC in mediale, laterale und ventrale Areale (Abb. 6). Der mediale PFC besteht aus einem dorsalen (präzentraler Kortex (PrC) und anteriorer cingulärer Kortex (ACg)) und einem ventralen Bereich (prälimbischer (PrL), infralimbischer (IL) und medioorbitaler (MO) Kortex). Der ventrale PFC wird aus dem ventralen orbitalen (VO) Kortex sowie ventrolateralen orbitalen (VLO) Kortex gebildet. Der laterale PFC setzt sich aus dem lateralen orbitalen (LO) Kortex sowie dem dorsalen und ventralen agranulären insularen (AID, AIV) Kortex zusammen. Ventraler und lateraler PFC zusammen werden als orbitofrontaler Kortex bezeichnet (Dalley et al., 2004; Otani, 2003).

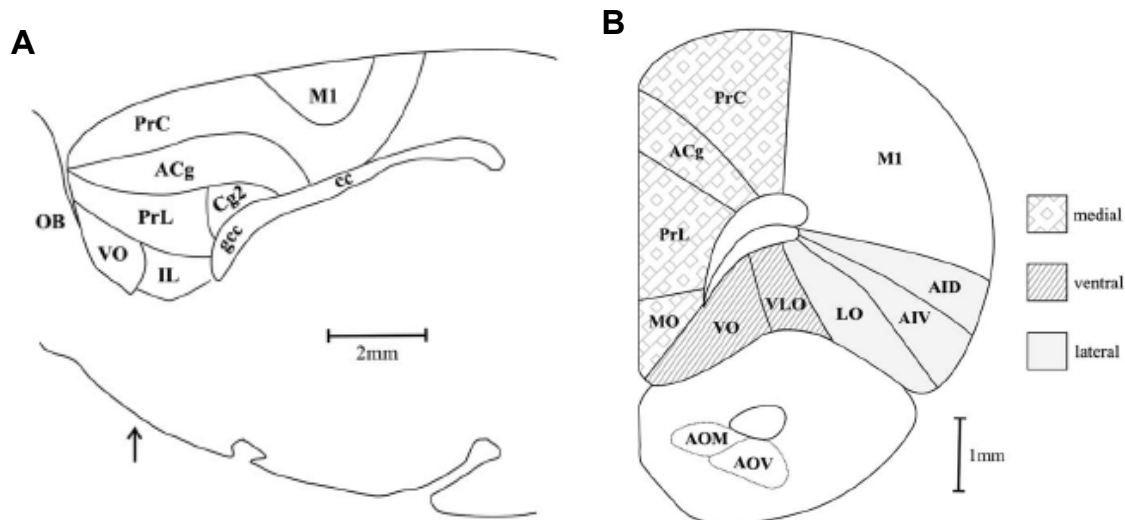


Abb. 6: Schematische Darstellung des PFC der Ratte

[A] Sagittalschnitt. [B] Koronaler Hirnschnitt bei Bregma +3,5 mm (angedeutet durch den Pfeil in A). Die verschiedenen Muster verdeutlichen die drei Hauptareale des PFC im Nager (medial, ventral, lateral). Neuroanatomische Nomenklatur identisch zur Maus (siehe Paxinos und Franklin, 2001). Abbildung nach Dalley et al., 2004.

Die Frage vieler Studien in den letzten Jahrzehnten war, inwieweit funktionelle Eigenschaften des humanen PFC (insbesondere die des dorsolateralen PFC) auch beim Nager vorhanden sind (Preuss, 1995). Vor 1948 galt der PFC des Primaten innerhalb der Säugetiere als einzigartig in der Vermittlung höherer kognitiver Fähigkeiten. 1948 postulierten Rose, Woolsey und Akert, dass ein homologer Hirnbereich auch bei Nicht-Primaten existiert. Auch beim Nager

wurde eine Innervation vom mediodorsalen thalamischen Nukleus nachgewiesen, die beim Primaten als Grundlage präfrontaler Eigenschaften gilt. Die Hypothese von Rose, Woolsey und Akert wurde durch Studien unterstützt, die eine DA Innervation des PFC und mnemische Prozesse (working memory) in der Ratte nachwies. Es wird vermutet, dass beim Nager der prälimbische und infralimbische Kortex des medialen PFC die neuronale Schaltstelle des working memory repräsentieren (Brown und Bowman, 2002; Uylings et al., 2003).

Im PFC konvergieren DA Terminale auf Pyramidenzellen sowie schnellfeuernden GABAergen Interneuronen (*fast spiking interneurons*). D1 Rezeptoren sind primär auf den dendritischen Dornfortsätzen der Pyramidenzellen lokalisiert, sowie auf Dendriten und axonalen Terminalen GABAerger Interneurone. Darüberhinaus exprimieren die Interneurone D2 Rezeptoren (Sesack et al., 1995). Somit hat Dopamin im PFC sowohl direkte als auch indirekte modulatorische Effekte auf die Erregbarkeit der Pyramidenzellen (Seamans und Yang, 2004).

1.4.2 Einfluss der dopaminergen Neurotransmission bei motivationalen Prozessen

Die neuronale Grundlage für motiviertes Verhalten lieferten Olds und Milner (1954) durch die sogenannten intrakraniellen Selbstreizungsexperimente bei Ratten. Hierbei wurde den Tieren die Möglichkeit gegeben bestimmte Gehirnareale (v.a. die des limbischen Systems) durch den Druck eines Hebels elektrisch zu stimulieren. Dies führte zu einer offenbar angenehmen Empfindung, was in Folge zu einer unkontrollierten Selbstreizung und Vernachlässigung aller anderen Bedürfnisse führte. Diese Versuche lieferten eine erste Beschreibung des sogenannten Verstärkersystems, in das u.a. Strukturen des limbischen Systems (Nukleus Accumbens (NAc), basolaterale Amygdala (BLA), mesolimbisches DA System) involviert sind. Später entdeckte man, dass die Wirkung von psychomotorisch aktivierenden Substanzen (Kokain, Amphetamin) im NAc vermittelt werden (Wise, 1989) und auch natürliche Verstärker (Nahrung, Wasser, Sex) diese Systeme aktivieren können (Cardinal und Everitt, 2004). Dies führte zur Erkenntnis, dass sowohl die Effekte der intrakraniellen Selbstreizung

als auch psychomotorisch aktivierende Substanzen die Wirkung von natürlichen Verstärkern nachahmen. Pathologische Prozesse innerhalb dieses Systems, die beispielsweise durch Drogenmissbrauch initiiert werden können, stellen somit die Grundlage für Suchterkrankungen dar (Kalivas und Volkow, 2005; Cardinal und Everitt, 2004). Hirnstrukturen, die in das neuronale Netzwerk motivationaler Prozesse eingebunden sind, werden in Abbildung 7 schematisch dargestellt. Motiviertes Verhalten entsteht dabei nicht aus den Teilleistungen der einzelnen Hirnstrukturen, sondern kann vielmehr als das Ergebnis der Aktivität des gesamten neuronalen Netzwerkes und der beteiligten Transmittersysteme angesehen werden (Everitt und Robbins, 2005).

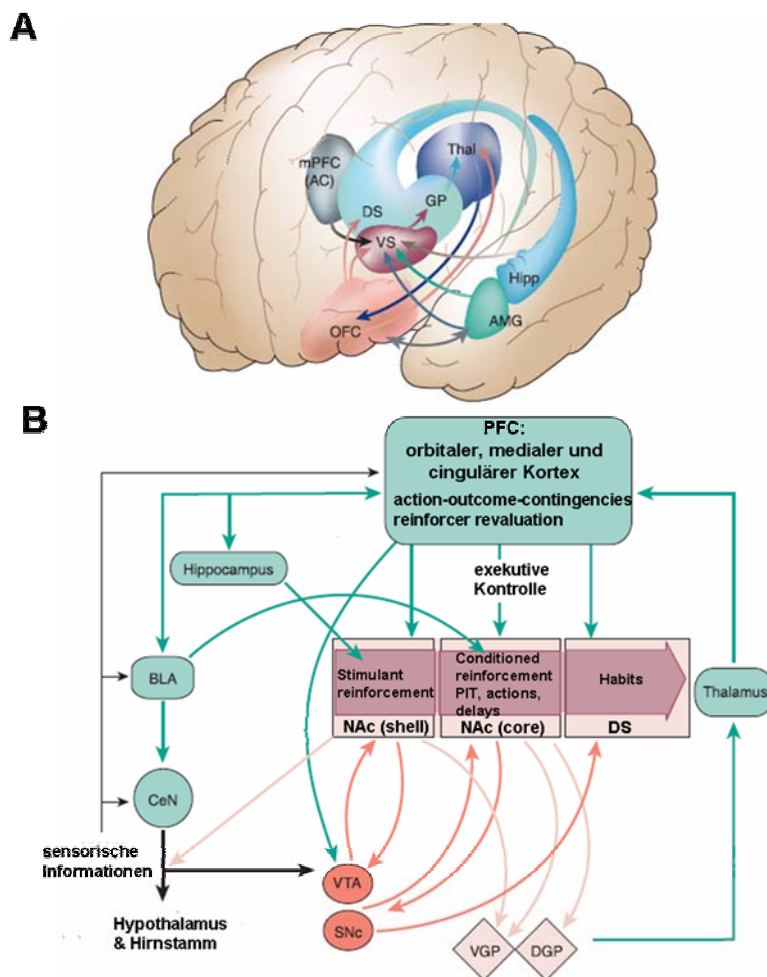


Abb. 7: Limbisch-kortikostriatale Funktionsschleife

[A] Limbisch-kortikostriatale Funktionsschleife im humanen Gehirn [B] Schematische Darstellung. Abbildung modifiziert nach Everitt und Robbins, 2005.

Einige wichtige Hirnstrukturen der limbisch-kortikostriatalen Funktionsschleife, deren funktionelle Eigenschaften im folgenden kurz erläutert werden sollen, sind die basolaterale Amygdala (BLA), der präfrontale Kortex (PFC), der Nucleus Accumbens (NAc), das dorsolaterale Striatum (DS), sowie die VTA und SN des Mittelhirns. Die wichtigsten Neurotransmitter dieses neuronalen Netzwerkes sind GABA, Dopamin und Glutamat.

Die BLA ist eine funktionelle Untereinheit der Amygdala (Mandelkern, Corpus amygdaloideum) und steht im engen Kontakt mit NAc (core Subregion) und dem PFC. Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Pawlow'schen Konditionierung von Angstzuständen (Furchtgedächtnis), d.h. ein zunächst neutraler Stimulus (z.B. ein Ton, Geruch) erlangt negativ verstärkende Eigenschaften durch die Kombination mit einem aversiven Stimuli (z.B. elektrischer Fuß-Schock). Dabei handelt es sich um einen Dopamin-abhängigen Prozess, da die Blockade postsynaptischer Dopaminrezeptoren durch Haloperidol eine Konditionierung vermindert (Rosenkranz und Grace, 2002). Darüberhinaus haben die BLA und der NAc (core) eine wichtige Funktion bei der Reaktion auf verzögerte Belohnungen (*delay of reinforcement*). Läsionen in der BLA oder NAc (core) führen bei Ratten zu einer Erhöhung des impulsiven Wahlverhaltens (*impulsive choice*), d.h. sie ziehen eine sofortige kleinere Belohnung einer größeren verzögerten vor (Cardinal et al., 2001; Everitt und Robbins, 2005).

Der PFC vermittelt u.a. instrumentelle Handlungs-Konsequenz-Kontingenzen (*action-outcome-contingencies*), d.h. er kodiert Informationen mit welchem Verhalten ein adäquates Ergebnis erhalten wird. Mentale Repräsentationen werden im PFC ausgebildet, aufrechterhalten sowie stetig aktualisiert, so dass flexible Verhaltensweisen (im Gegensatz zum dorsolateralen Striatum, das gewohnte Verhaltensweisen (*habits*) vermittelt, s.u.) ermöglicht werden. Ein Mechanismus dieser Kontingenzen ist beispielsweise die Devaluierung ingestiver primärer Verstärker (ein Tier, das gelernt hat einen Hebel zu drücken damit es eine Futterbelohnung erhält, würde wenn es zuvor bereits gefüttert wurde oder das Futter das Tier zuvor erkrankt lieg, weniger auf das Futter reagieren).

Dagegen ist Devaluierung von selbstverabreichten Kokain deutlich schwieriger) (Everitt und Robbins, 2005). Außerdem kodieren Nervenzellen im PFC die relative Attraktivität von belohnungsanzeigenden Hinweisreizen (*reinforcer revaluation*) (Schultz, 2000). Die funktionelle Bedeutung des PFC bei der Vermittlung kognitiver Prozesse erfolgt im Kapitel 1.4.3.

Der Nukleus Accumbens, der im ventralen Striatum lokalisiert ist, beinhaltet zwei anatomisch und funktionell distinkte Subkompartimente: eine core sowie eine shell (medial und lateral) Subregion (Zahm, 2000). Die core Subregion vermittelt, den motivationalen Einfluss von Pawlow'sch konditionierten Reizen auf gelerntes, instrumentelles Verhalten (Pawlow'sch-instrumenteller , PIT). Weiterhin hat der NAc core, wie auch die BLA, eine wichtige Rolle bei der Reaktion auf verzögerte Belohnungen (Cardinal et al., 2002; Everitt und Robbins, 2005). Dagegen wird durch die shell Subregion der motivationale Einfluss von unkonditionierten Reizen wie beispielsweise Futter (Bassareo und Di Chiara, 1999) und auch Kokain (Ito et al., 2000) vermittelt (*stimulant reinforcement*).

Das dorsolaterale Striatum spielt bei der Ausbildung von Gewohnheiten (*habits*) eine wichtige Rolle. Eine Gewohnheit kann beispielsweise nach wiederholter Gabe von Drogen auftreten, die auf einer Konditionierung suchtrelevanter Umgebungsreize beruht (Ort der Drogenaufnahme, Utensilien für Drogenkonsum), und entscheidend für die hohe Rückfälligkeit bei der Drogenabhängigkeit ist (Everitt und Robbins, 2005).

Nach Everitt und Robbins (2005) sind maladaptive Lernprozesse, die auf der klassischen Konditionierung von Hinweisreizen beruhen (Pawlow'sche Konditionierung) für die Etablierung der Drogensucht in der limbisch-kortikostriatalen Funktionsschleife von besonderer Bedeutung. Dieser konditionierte motivationale Zustand führt zu einem verstärkten Beachten von suchtrelevanten Hinweisreizen (*wanting*). Im Laufe der Zeit kommt es zu einer Zunahme des "*wanting*" und der Gewöhnung, während es gleichzeitig auch zu

¹ Ein Pawlow'sch konditionierter Reiz (*conditioned stimuli* (CS) assoziiert mit positiven Verstärkern wie z.B. Nahrung) kann die Intensität von instrumentell konditioniertem Verhalten für den gleichen Verstärker beeinflussen, wenn dieser unerwartet auftritt und wird somit als Pawlow'sch-instrumenteller Transfer definiert (Everitt und Robbins, 2005).

einer Abnahme des positiven Verstärkereffekts (*liking*), der die Euphorie vermittelt, kommt. Mit anderen Worten kommt es zu einem Übergang von der präfrontalen exekutiven Kontrolle zu striatal kontrollierten Verhaltensweisen und anschließend von einer ventralen zu einer dorso-striatalen Kontrolle zielgerichteten Verhaltens (Everitt und Robbins, 2005; Cadinal et al., 2002).

Dopamin hat im limbisch-kortikostriatalen Schaltkreis wichtige funktionelle Eigenschaften sowohl bei der Kodierung von belohnungshinweisenden Reizen als auch in der situationsgerechten Selektion und Initiation von belohnungsgerichteten Verhaltensweisen (Kalivas und Volkow, 2005; Schultz, 2007). Wichtige Erkenntnisse in der Verarbeitung belohnender Reize lieferten die Arbeiten von Schultz und Kollegen (Abb. 8). Demnach stellt das phasische Dopamin Signal ein prädiktives Belohnungssignal (*reward prediction error signal*) dar. Mittels Mikroelektroden wurde bei Primaten eine Aktivitätszunahme DA Neurone als Reaktion auf eine unerwartete Futterbelohnung gemessen (positiver Vorhersagefehler). Nach Konditionierung der Tiere auf eine Futterbelohnung kam es nur bei unerwartet auftretenden konditionierten Reizen zu einer Aktivitätszunahme DA Neurone, wobei die Belohnung selbst zu keiner Aktivitätsänderung mehr führte. Im Falle einer ausbleibenden Futterbelohnung (aversives Ereignis) kam es sogar zu einer Depression der DA Aktivität (negativer Vorhersagefehler). Das DA Neuron reagiert also immer dann mit einer Aktivitätsänderung, wenn Unterschiede zwischen Erwartung und dem darauf folgenden Ereignis bestehen. Es kann als eine Art Kritiker betrachtet werden, der gelernte Verhaltensweisen im Kontext mit äußeren Ereignissen evaluiert (*actor-critic-model*). Das DA Neuron ist assoziativ lernend und fördert belohnende Verhaltensweisen durch erhöhte Aktivität und damit Dopamin Freisetzung, wohingegen aversive Ereignisse das Gegenteil bewirken und so gemieden werden (Schultz 2001; Schultz, 2007).

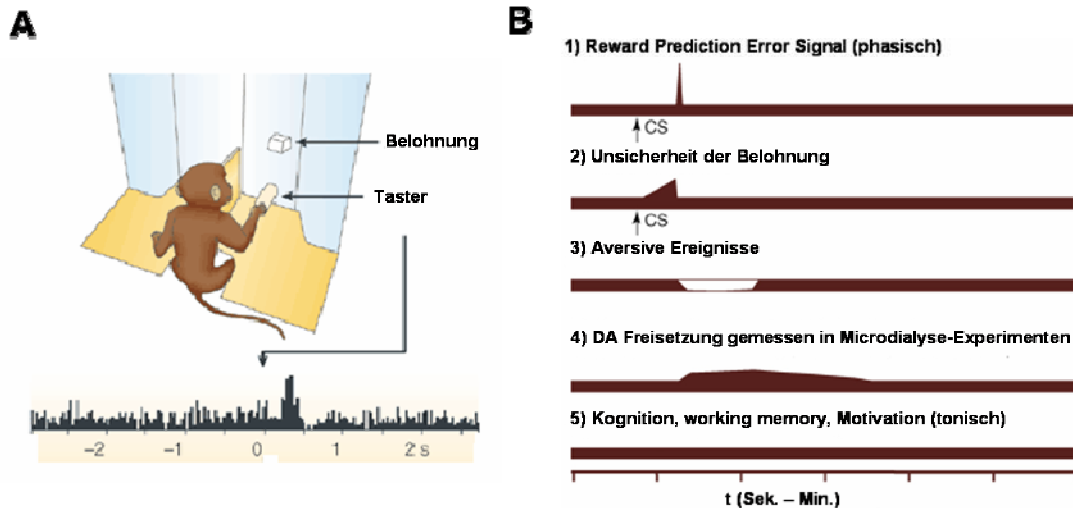


Abb. 8: Dopaminerge Neurone kodieren Belohnungssignale

[A] Primäre Verstärker führen zu einer phasischen Aktivierung DA Neurone. Wenn der Primat seine Hand von einem Taster in eine Box mit einer für ihn nicht sichtbaren Belohnung (z.B. ein Apfel) legt, kommt es bei Berührung zu einer phasischen Aktivierung DA Neurone. Berührt er dagegen einen neutralen Gegenstand (z.B. ein Kabel), kommt es zu keiner Aktivierung DA Neurone (nicht in der Abbildung dargestellt). [B] (1) Phasisches Dopamin Signal als Antwort auf einen unerwartet auftretenden konditionierten Stimulus (CS, Pfeil), der ein belohnendes Ereignis ankündigt. (2) DA Neurone kodieren die Unsicherheit der Vorhersage (*reward uncertainty*). Mehr als ein Drittel der DA Neurone sind durch eine relativ langsam ansteigende Aktivierung zwischen konditioniertem Stimulus und der Belohnung gekennzeichnet (Fiorillo et al., 2003). (3) Aversive Ereignisse (Kneifen des Tieres, Stress) führen zu einer Extinktion der DA Aktivität. SN Neurone, die aufgrund aversiver Stimuli aktiviert werden, sind nicht-dopaminerg (Ungless et al., 2004). (4) Dopamin Freisetzung, wie sie in Mikrodialyse Experimenten *in vivo* als Reaktion auf belohnende und aversive Ereignisse in striatalen und kortikalen Hirnarealen gemessen wurde (Watanabe et al., 1997; Bassareo und Di Chiara, 1999; Salamone, 1994) (5) Tonische Dopamin Freisetzung geschieht kontinuierlich und ist in kognitive (Arbeitsgedächtnis (*working memory*), siehe Kapitel 1.4.3) und motivationale Prozesse involviert. Abbildung modifiziert nach Schultz, 2001 und Schultz, 2007.

1.4.3 Einfluss der dopaminergen Neurotransmission bei kognitiven Prozessen

Das Arbeitsgedächtnis bzw. *working memory* ist eine besondere Form des Kurzzeitgedächtnisses. Läsionen im PFC führen nicht zu Verlusten im Kurzzeitgedächtnis (Manes et al., 2002). Daher kann die eigentliche funktionelle Rolle des Arbeitsgedächtnisses treffender mit "*working with memory*" umschrieben werden. Es dient dem Organismus neben dem kurzzeitigen aktiven Aufrechterhalten von Informationen zur Manipulation, Organisation und Planung von zukünftigen Verhaltensweisen (Seamans und Yang, 2004).

Am besten untersucht ist das Arbeitsgedächtnis im dorsolateralen PFC des Primaten. Hierzu wurde ein sogenannter *delayed response task* durchgeführt (Abb. 9 A). Dem Versuchstier werden zwei Boxen gezeigt, wobei eines einen Stimulus (Futter) enthält und das andere leer ist. Im Anschluss wird das Loch abgedeckt und das Tier muss nach einer kurzen Zeit (*Delay Phase*) das Loch mit dem Futter wiederfinden. Elektrophysiologische Messungen mit Mikroelektroden zeigten eine hohe neuronale Aktivität im dorsolateralen PFC während der *Delay Phase*. Dies reflektiert die aktiven Gedächtnisrepräsentationen. Bei Abwesenheit eines Stimulus konnte keine erhöhte elektrische Aktivität detektiert werden (Abb. 9 B) (Goldman-Rakic, 1995; Purves et al., 2004).

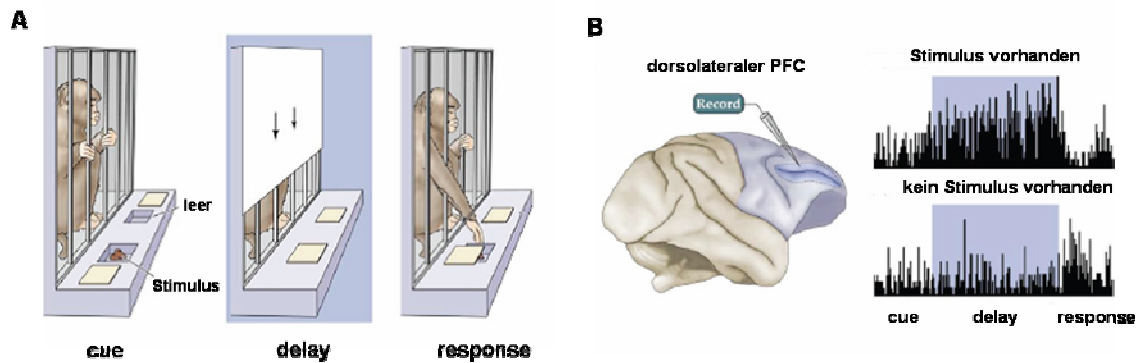


Abb. 9: Working memory Studien beim Primaten

[A] Der *delayed response task* ist ein Paradigma zur funktionellen Analyse des working memory. Er gliedert sich in eine *Cue Phase* (Hinweis Phase, in der dem Versuchstier ein Stimulus (Futterbelohnung) gezeigt wird), *Delay Phase* (kurze Pause, in der der Stimulus für das Tier nicht sichtbar verdeckt wird) und *Response Phase* (Testphase, in der die Futterbelohnung wiedergefunden werden muss). [B] Sofern ein Stimulus vorhanden ist, kann während der *Delay Phase* eine erhöhte elektrische Aktivität im dorsolateralen PFC registriert werden. Abbildung modifiziert nach Purves et al., 2004.

Ein Einfluss der dopaminergen Neurotransmission bei kognitiven Prozessen wurde erstmals 1979 postuliert. Nach Depletion des Dopamins im PFC von Primaten konnte im *delayed response task* eine signifikante Leistungsabnahme beobachtet werden (Brozoski et al., 1979). Durch die Kombination mit *in vivo* Mikrodialyse Experimenten konnte eine signifikante Erhöhung der extrazellulären Dopamin Konzentration im dorsolateralen PFC von Primaten während eines *delayed response tasks* nachgewiesen werden (Watanabe et al., 1997).

Phillips und Kollegen entwickelten eine Studie in der verschiedene Komponenten des working memory im Nager analysiert werden sollten. In einem modifizierten *delayed response task* erkundete eine Ratte im Verlauf einer Trainingsphase eine Plattform mit acht Armen (Abb. 10 A). Davon sind vier Arme geöffnet und beinhalten eine Futterbelohnung. Nach Abschluss der Trainingsphase wird das Tier für eine definierte Zeit (30 Min.) von der Plattform entfernt (*Delay Phase*). Im Anschluss wird die Ratte wieder auf die Plattform gesetzt. Nun sind alle acht Arme geöffnet. Die zuvor verschlossenen Arme beinhalten nun eine Futterbelohnung, während die anderen vier Arme leer sind. Diese Information muss die Ratte benutzen und zielgerichtet die Futterbelohnung anstreben (Testphase). Dabei ergaben Mikrodialyse Experimente, dass es zu einer Erhöhung der extrazellulären Dopamin Konzentration im PFC im Verlauf der Trainings- und Testphase kommt. Dagegen kommt es in der *Delay Phase* zu einem Absinken der Dopamin Konzentration auf ein Basislevel. Wurde der Zeitraum der *Delay Phase* auf 1-6 Stunden verlängert, kam es zu einer Zunahme von Fehlern, die mit einer Abnahme der Dopamin Konzentration im PFC während der Testphase korrelierte. Interessanterweise kam es auch zu einem Anstieg der Dopamin Konzentrationen, wenn in der Testphase keine Futterbelohnung vorhanden war (Phillips et al., 2004).

Auf molekularer Ebene wird die Wirkung von Dopamin im PFC primär über D1 Rezeptoren vermittelt. Bei Infusion eines D1 Agonisten kam es bei trainierten Ratten im oben beschriebenen Paradigma zu einer Zunahme der Fehler, wenn die *Delay Phase* 30 Minuten beträgt. Im Vergleich zur Infusion mit einer Kochsalzlösung führte die gleiche Dosis des D1 Agonisten zu einer Fehlerabnahme bei einer Wartezeit von 12 Stunden. Infusion des D2 Antagonisten Sulpirid blieb ohne Effekt (Floresco und Phillips, 2001). Frühere Studien zeigten bereits, dass die systemische Gabe des indirekten Dopamin Agonisten Amphetamin bei Ratten zu signifikant schlechteren Ergebnissen im *delayed response task* führte (Kesner et al., 1981). Die Koapplikation von D1 Rezeptorantagonisten wirkte dem entgegen (Murphy et al., 1996). Sawaguchi und Kollegen zeigten, dass bei mikroiontophoretischer Applikation von Dopamin

bzw. von Dopamin Agonisten eine D1 Rezeptor vermittelte Zunahme der neuronalen Aktivität pyramidalen Neurone im Primaten während der Delay Phase *in vivo* detektiert werden konnte (Sawaguchi et al., 2001). Williams und Goldman-Rakic beobachteten bei Iontophorese geringer Konzentrationen eines D1 Antagonisten ebenfalls eine Zunahme der elektrischen Aktivität dieser Zellen. Dagegen führten hohe Konzentrationen dieses Antagonisten zu einer Aktivitätsabnahme. Die Applikation eines D2 Antagonisten (Sulpirid) führte unabhängig von dessen Konzentration zu keiner Aktivitätsänderung (Williams und Goldman-Rakic, 1995). Anhand dieser Experimente entwickelten sie die Hypothese, dass ein optimaler Bereich der D1 Rezeptorstimulation entscheidend für eine effiziente Funktion des PFC sei. Abweichung vom Optimum im Sinne einer Hypo- bzw. Hyperstimulation des D1 Rezeptors führen zu Verschlechterungen des working memory. Diese Verhältnisse können durch eine invertierte U-Funktion dargestellt werden (Williams und Goldman-Rakic, 1995) (Abb. 10 B).

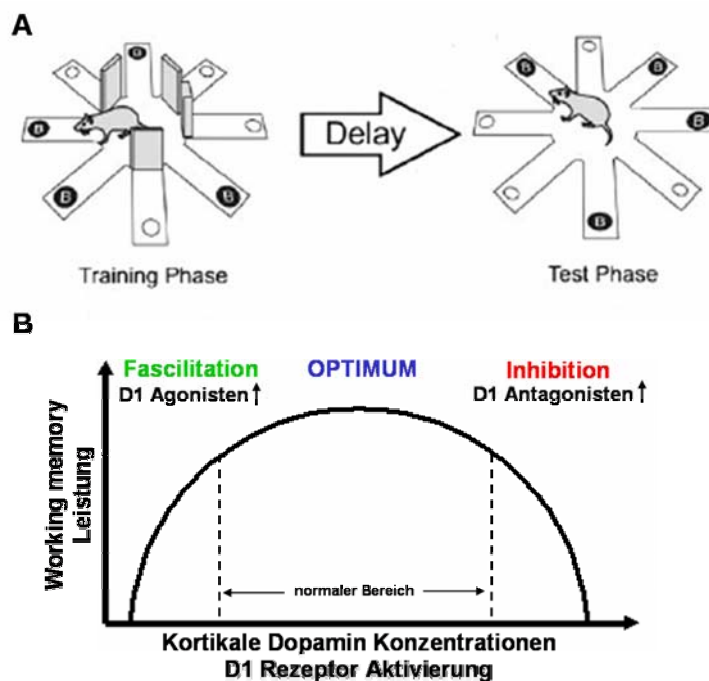


Abb. 10: Working memory ist abhängig von kortikaler D1 Rezeptoraktivierung

[A] Delayed response task bei der Ratte. Dargestellt ist eine Plattform mit acht Armen. Arme, die eine Futterbelohnung enthalten sind mit "B" gekennzeichnet. Das Paradigma

besteht aus drei Phasen: Trainingsphase, Delay Phase (Unterbrechung des Experiments für einen definierten Zeitraum) und Testphase. [B] Invertierte U-Funktion. Optimale D1 Rezeptorstimulation bedingt eine effiziente Funktion des Arbeitsgedächtnisses. D1 Agonisten stimulieren die neuronale Aktivität im PFC, während D1 Antagonisten sie inhibieren. Besteht bereits ein Optimum (z.B. bei zuvor trainierten Tieren im Paradigma der Abbildung A) haben D1 Agonisten bzw. Antagonisten inverse Effekte (Floresco und Phillips et al., 2001; Williams und Goldman-Rakic, 1995).

Aufgrund der geringen Dichte des Dopamintransporters (DAT) im PFC wird in diesem Hirnareal ein großer Anteil des freigesetzten Dopamin durch die Katechol-O-Methyltransferase (COMT) metabolisiert (Sesack, 1998). Die Ursache für Abweichungen vom Optimum kortikaler D1 Rezeptorstimulation kann durch einen Polymorphismus in der kurzen Isoform der COMT hervorgerufen werden. Dies führt zu einer Substitution der Aminosäure Methionin (Met) gegen Valin (Val) (Val¹⁵⁸Met Polymorphismus). Der Val/Val Genotyp besitzt eine 3-4 mal höhere COMT Aktivität im Vergleich zum Met/Met Genotyp (Lachman et al., 1996). Dies führt zu einer deutlichen Erniedrigung präfrontaler Hirnleistungen (Thapar et al., 2005). Der COMT Polymorphismus (Val/Val) wird daher als ein genetischer Risikofaktor für Schizophrenie diskutiert (Li et al., 1996). Eine zu hohe kortikale Dopamin Freisetzung kann beispielsweise durch akuten Stress oder aversive Stimuli hervorgerufen werden (Grace, 2002). Somit können im PFC auch aversive Ereignisse (Ausbleiben einer Futterbelohnung; siehe Phillips et al., 2004) zu einer positiven Dopaminantwort führen. Im Gegensatz zu der Theorie von Schultz, nach der DA Neurone der SN und VTA ein prädiktives Belohnungssignal vermitteln (siehe Kapitel 1.4.2), scheint dies bei mesokortikalen DA Neuronen nicht zu zutreffen. Vielmehr wird vermutet, dass Glutamat wesentlich besser geeignet sei, ein schnelles, transientes Belohnungssignal im PFC zu vermitteln. Es ist jedoch noch unklar, ob putativ glutamaterge Neurone und / oder mesokortikale Neurone, die Glutamat und Dopamin koexprimieren hierfür verantwortlich sind (Seamans und Yang, 2004).

1.5 Zielsetzung

Während die funktionellen Eigenschaften klassischer (d.h. vor allem mesostriataler) DA Neurone und deren phasischen Aktivitätsmuster bei der Vermittlung prädiktiver Belohnungssignale erfolgreich durch Schultz und Kollegen definiert wurden, sind die neurophysiologischen Eigenschaften der DA Neurone, die durch eine tonische Dopaminfreisetzung in kortikolimbischen Hirnarealen beispielsweise die Salienz (Bedeutsamkeit) appetitiver und aversiver Stimuli sowie kognitive Fähigkeiten (working memory) vermitteln, weitgehend ungeklärt. Erste Studien deuteten an, dass individuelle DA Mittelhirnneurone differentielle elektrophysiologische Eigenschaften aufweisen (Neuhoff et al., 2002; Liss et al., 2005). Bislang konnte jedoch kein generelles Schema, das die anatomische, funktionelle und molekulare Diversivität DA Mittelhirnneurone vereint gefunden werden. Die hohe Diversivität wird insbesondere an der seit über 20 Jahren andauernden Debatte über eine putative Abwesenheit somatodendritischer D2 Autorezeptoren in DA Neuronen, die den PFC innervieren deutlich (Chiodo et al., 1984; Gariano et al., 1989).

Als methodischer Schwerpunkt sollte eine Tracing-Methode etabliert und mit weiteren Techniken kombiniert werden, um Subpopulationen dopaminerger Neurone neuroanatomisch, immunzytochemisch, neurophysiologisch und molekularbiologisch (in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Liss) zu charakterisieren, identifizieren und spezifizieren. Das Tracing-Verfahren sollte dabei folgende Parameter vereinen: 1. hohe Selektivität 2. hohe Anzahl retrograd markierter Neurone 3. hohe Reproduzierbarkeit.

Im einzelnen sollten folgende Fragestellungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit erörtert werden:

- Können dopaminerge Mittelhirnneurone anhand ihrer distinkten Projektionen anatomisch und morphologisch eindeutig identifiziert werden?

- Gibt es axonale Verknüpfungen (Kollaterale) im mesokortikolimbischen DA System?
- Können Subpopulationen DA Mittelhirnneurone anhand spezifischer Markerproteine differenziert werden?
- Können Subpopulationen DA Mittelhirnneurone anhand elektrophysiologischer Eigenschaften eindeutig identifiziert werden?
- Können Subpopulationen DA Mittelhirnneurone anhand der Aktivierung von D2 Autorezeptoren unterschieden werden?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Alle Experimente wurden an männlichen, adulten (8-12 Wochen alt) Mäusen des Stamms C57Bl/6 durchgeführt. Das Gewicht der Tiere betrug zwischen 22 und 32 g. Die Mäuse wurden in der universitären Tierhaltung gezüchtet. Die Tiere wurden im 12 Stunden Lichtrhythmus gehalten. Das Futter war eine Standarddiät (Altromin, Lage, D). Das Trinkwasser der Mäuse wurde auf einen pH von ungefähr 2,8 angesäuert. Futter und Wasser bekamen die Tiere *ad libitum*. Die Tiere wurden in Standardkäfigen Makrolon Typ II oder III in Gruppen von bis zu 10 Tieren gehalten und mindestens einmal pro Woche in saubere Käfige umgesetzt. Zur postoperativen Versorgung und Kontrolle waren die Tiere in einem separaten Raum im 12 Stunden Lichtrhythmus in Einzelhaltung untergebracht. Die Raumtemperatur betrug 22,4 bis 24,8 °C (im Mittel 23,3 °C) und die Luftfeuchtigkeit 47,8 %. Die Durchführung aller Tierexperimente erfolgte entsprechend des genehmigten Tierversuchsantrags V54-19c20/15 (1) MR 20/28 - Nr 47/2004 (Regierungspräsidium Gießen).

2.1.2 Chemikalien und Geräte

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

2.1.3 Lösungen

2.1.3.1 Lösungen Elektrophysiologie

| | |
|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Wasser / <i>aqua dest.</i> : | Ultrafiltriertes Wasser (<50 μ S), Reinstwasser-System Ultra Clear, SG, Barsbüttel, D |
| ACSF-Perfusionslösung: | 125 mM NaCl, 25 mM NaHCO ₃ , 2,5 mM KCl, 1,25 mM NaH ₂ PO ₄ , 0,1 mM CaCl ₂ , 12 mM MgCl ₂ , 2,5 mM Glucose, 50 mM Saccharose, 3 mM Kynurensäure, pH 7,4 mit 95 % O ₂ / 5 % CO ₂ |
| ACSF-Patchlösung: | 125 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 25 mM NaHCO ₃ , 1,25 mM NaH ₂ PO ₄ , 2,5 mM Glucose, 22,5 mM Saccharose, 2 mM CaCl ₂ , 2 mM MgCl ₂ , pH 7,4 (95 % O ₂ / 5 % CO ₂) |
| Pipettenlösung (wc): | 135 mM Kaliumgluconat, 0,1 mM EGTA, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM MgCl ₂ , 2 mM MgATP, 0,2 mM NaGTP, 0,1 % Neurobiotin, pH 7,4 |
| Pipettenlösung (pp): | 140 mM KCl, 10 mM HEPES, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl ₂ , pH 7,4 |
| Gramicidin-Stocklsg.: | 94,1 mM Gramicidin in DMSO (entspricht 50 mg/ml) |
| Dopamin-Applikationslsg.: | 100 μ M Dopaminhydrochlorid in ACSF-Patchlösung |

2.1.3.2 Lösungen Immunzytochemie

| | |
|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Wasser / <i>aqua dest.</i> : | Ultrafiltriertes Wasser (<50 μ S, Reinstwasser-System Ultra Clear, SG, Barsbüttel, D |
| Blocklösung: | 10 % Pferde-Serum (Vector Laboratories, Burlingame, USA), 0,2 % BSA (Roth, Karlsruhe, D), 0,5 % Triton X-100 in PBS |
| Carrierlösung: | 1 % Pferde-Serum, 0,2 % BSA, 0,5 % Triton X-100 in PBS |

| | |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DAB-Lösung: | 0,4 % DAB (Vector Laboratories), 0,2 % NiCl ₂ -Lösung (Vector Laboratories), 0,2 % H ₂ O ₂ in 50 mM Tris-Puffer |
| DAB-Lösung (mod.): | 4 % DAB (Vector Laboratories), 2 % NiCl ₂ -Lösung (Vector Laboratories), 2 % H ₂ O ₂ in 50 mM Tris-Puffer |
| PBS: | 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 200 mM NaH ₂ PO ₄ , 200 mM Na ₂ HPO ₄ in <i>aqua dest.</i> , pH 7,4 (eingestellt mit 0,1 M HCl) |
| Tris-Puffer: | 50 mM Trizma ® Base in <i>aqua dest.</i> , pH 7,4 |
| Aufbewahrungslösung: | 10 % Saccharose, 0,05% NaN ₃ in 0,1 M PBS |
| Fixierungslösung: | 4 % Paraformaldehyd, 15 % Pikrinsäure in 0,1 M PBS, pH 7,4 |
| PHA-L Tracerlösung: | 2,5 % PHA-L in 10 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0 |

2.1.4 Enzyme und Antikörper

2.1.4.1 Enzyme

Meerrettichperoxidase: Vectastain® ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA

2.1.4.2 Primäre Antikörper

| Antikörper | Spezies | Bezugsquelle | Verdünnung |
|----------------------|-----------|--------------------------------------|-------------------------------|
| Anti-TH | Maus | Merck, Darmstadt, D | 1:1000 |
| Anti-TH | Kaninchen | Merck, Darmstadt, D | 1:1000 |
| Anti-GIRK2 | Kaninchen | alomone labs, Jerusalem, Israel | 1:500 |
| Anti-DAT | Ratte | Chemicon, Temecula, USA | 1:1000 1:2000 ¹ |
| Anti-Calbindin D-28K | Maus | Swant, Bellinzona, Schweiz | 1:1000 |
| Anti-PHA-L | Kaninchen | Vector Laboratories, Burlingame, USA | 1:1000 |

Tab. 1: Primär-Antikörper für DAB- und Immunfluoreszenzfärbungen

¹ die verwendete Konzentration ist jeweils angegeben.

2.1.4.3 Sekundäre Antikörper

| Antikörper | Spezies | Bezugsquelle | Verdünnung |
|-------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|------------|
| Anti-Maus (biotinyliert) | Ziege gegen Maus | Vector Laboratories, Burlingame, USA | 1:1000 |
| Anti-Kaninchen (biotinyliert) | Ziege gegen Kaninchen | Vector Laboratories Burlingame, USA | 1:1000 |
| Alexa Fluor® 488 | Ziege gegen Kaninchen | Molecular Probes, Eugene, USA | 1:750 |
| Alexa Fluor® 488 | Ziege gegen Maus | Molecular Probes, Eugene, USA | 1:750 |
| Alexa Fluor® 546 | Ziege gegen Maus | Molecular Probes, Eugene, USA | 1:750 |
| Alexa Fluor® 647 | Ziege gegen Kaninchen | Molecular Probes, Eugene, USA | 1:750 |
| Alexa Fluor® 647 | Ziege gegen Maus | Molecular Probes, Eugene, USA | 1:750 |
| Streptavidin Alexa Fluor® 488 | | Molecular Probes, Eugene, USA | 1:1000 |

Tab. 2: Sekundär-Antikörper für DAB- und Immunfluoreszenzfärbungen

2.2 Methoden

2.2.1 Tracing-Experimente

Durch Tracing-Experimente können anatomische Verbindungen innerhalb des Nervensystems präzise nachgewiesen werden. Die Entdeckung des axonalen Transports durch Weiss und Hiscoe (1948) stellt das Grundprinzip dieser Methode dar. Dabei wird zwischen retrogradem und anterogradem Transport unterschieden. Beim retrograden Transport, wird die Tracersubstanz in ein Hirnareal injiziert, das von einer Vielzahl axonaler Terminale innerviert wird. Anschließend erfolgt die Inkorporation des Tracers in das Axon (gewöhnlich Endozytose-vermittelt) und der retrograde vesikuläre Transport durch das Motorprotein Dynein entlang der Mikrotubuli zum Zellsoma. Beim anterograden Transport erfolgt die Aufnahme der Tracersubstanz über das Perikaryon und / oder dessen Dendriten und wird mit Hilfe des Moleküls Kinesin entlang der Mikrotubuli zu den synaptischen Terminalen der Zellen transportiert. Retrograder und anterograder Transport sind Kalzium- und ATP-abhängige Vorgänge, die unabhängig von der elektrischen Aktivität innerhalb der Axone sind (Köbber et al., 2000). Somit können sowohl Neurone, die definierte Hirnareale innervieren untersucht werden, als auch axonale Projektionen bestimmter Zellpopulationen.

Für die retrograde Markierung spezifischer Zellpopulationen *in vivo* stehen eine Vielzahl unterschiedlicher Tracersubstanzen zur Auswahl. Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich fluoreszierende Latexpartikel, sogenannte Beads (Lumafluor corp., Naples, USA), verwendet. Sie wurden 1984 als retrograder Tracer eingeführt und sind durch viele positive Eigenschaften gekennzeichnet (siehe Tab. 3) (Katz et al., 1984).

| Vorteile | Nachteile |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> • hohe Effizienz (Anzahl markierter Zellen) • kein Ausbleichen des Fluoreszenzsignals (<i>photobleaching</i>) • sehr gut abgegrenzte Injektionsareale • leichte Anwendbarkeit ("<i>ready-to-use</i>") • keine zusätzlichen histochemischen Methoden zur Detektion notwendig • leichte Verifizierung der Injektionsstelle (verbleiben im Injektionsareal) • Doppeltracing-Studien sind möglich | <ul style="list-style-type: none"> • keine Zellmorphologie sichtbar • inkompatibel mit vielen organischen Lösungsmittel (Xylen) |

Tab. 3: Eigenschaften der Beads als retrograder Tracer

Für das anterograde Tracing axonaler Terminalen wurde PHA-L (Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin, Vector Laboratories, Burlingame, USA) verwendet. PHA-L wurde 1984 als anterograde Tracer eingeführt und ist ein Lektin der roten Kidneybohne. Es wird über den aktiven Transport nach Bindung an membranständige Zuckermoleküle (α -D-Mannose, β -D-Galactose) in die Zelle aufgenommen. Im Gegensatz zu den Beads, muss PHA-L immunhistochemisch visualisiert werden (Gerfen und Sawchenko, 1984).

2.2.1.1 Operative Methoden zur *in vivo* Applikation von Tracersubstanzen

Die Injektion der Tracersubstanzen in das Zielareal erfolgte durch Druckapplikation mittels einer 1 μ l Hamiltonspritze (7001 N, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) unter stereotaktischer Kontrolle. Hierzu wurden zunächst Glasmikropipetten (*borosilicate glass capillaries*, GC120F-10, 1,20 mm AD x 0,69 mm ID, Harvard Apparatus, Edenbridge, England) mit einem langen, dünnen Schaft mittels eines horizontal ziehenden Elektrodenpullers (DMZ-Universal Puller, Zeitz, Martinsried, D) hergestellt. Die Parameter des verwendeten Programms (P01) sind in der Tabelle 4 aufgelistet.

| | | | |
|-------------|-----|-------|-----|
| P(A) | | | |
| H | 600 | t(F1) | 000 |
| F(TH) | 025 | F1 | 160 |
| s(TH) | 010 | s(F2) | 070 |
| t(H) | 000 | F2 | 700 |
| s(H) | 030 | AD | 000 |

Tab. 4: Programm P01 DMZ-Universal Puller (Zeitz)

Definitionen der einzelnen Parameter unter <http://zeitz-inst.homepage.t-online.de>

Im Anschluß wurde die Spitze der Mikropipette etwas zurückgebrochen und im unteren Drittel mit Mineralöl und dann mit Wasser vollständig gefüllt. Die Befestigung an der Hamiltonspritze erfolgte mit Sekundenkleber (UHU blitzschnell®, flüssig).

Bei *in vivo* Experimenten sind prä- und postoperative Versorgung, Anästhesie, Analgesie und für das Tier möglichst schonende operative Methoden von großer Bedeutung. Zu Beginn des Experiments wurde jedes Tier gewogen, um die Medikation individuell bestimmen zu können. Etwa 20 Minuten vor Beginn des Eingriffs erfolgte eine intraperitoneale (i.p.) Injektion von 0,1 mg/kg Körpergewicht (KG) Atropin (50 µl einer 50 µg/ml Atropinsulfat Stammlösung) zur Senkung Operationsstress-bedingter vegetativer Reaktionen und zur Hyposalivation. Durch die Pupillenerweiterung (Mydriasis) konnte die parasympholytische Wirkung überprüft werden. Zur Anästhesie des Tieres wurde eine Injektionsnarkose durchgeführt. Hierzu wurde eine Kombination aus 60 mg/kg KG Ketamin (Ketavet®, 100 mg/ml, Pharmacia GmbH, Erlangen, D) und 0,6 mg/kg KG des α_2 -Agonisten Medetomidin (Domitor®, 1 mg/ml, Pfizer, Karlsruhe, D) verwendet. Die Substanzen wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und 30 µl i.p. injiziert. Ketamin ist ein NMDA-Rezeptorantagonist, der hypnotisch, analgetisch und kreislaufaktivierend wirkt. Nachteilig ist eine verstärkte Speichel- und Schleimbildung, der jedoch durch die Prämedikation mit Atropin vorgebeugt wird. Nach Sedation des Tieres wurde die Kopfhaut rasiert und mit Betaisodonalösung® (Mundipharma GmbH, Limburg, D) desinfiziert. Anschließend wurde die Maus in eine zuvor desinfizierte (Softasept®)

stereotaktische Apparatur (Cartesian Research Inc., Heidenhain, USA) eingespannt und der Kopf fixiert. Das Tier wurde auf einer beheizbaren Unterlage (TSE Systems, Bad Homburg, D) platziert und die Körpertemperatur mittels einer Rektalsonde stetig kontrolliert (Sollwert: 30-35 °C). Zum Schutz vor dem Austrocknen der Kornea dienten Augentropfen (Lacrisic®, Alcon Pharma, Freiburg, D). Nach Erlöschen somatischer Reaktionen auf chirurgische Reize (Lidschlussreflex, *foot-pinch*-Reflex) wurde im Areflexiestadium der Schädel freigelegt und justiert. An den gewünschten rostrocaudalen und mediolateralen Koordinaten wurde ausgehend von dem Referenzpunkt Bregma (Schnittpunkt von Sagittal- und Kranznaht) ein Loch (Durchmesser: 0,6 mm) in den Schädelknochen gebohrt (Bohrer: Twister® Miniature Drill, EDP 32157, #75, M.A. Ford, Derby, England). Eine resultierende Blutung wurde mit Hilfe von chirurgischen Pfeiltupfern (#501789, WPI, Sarasota, USA) gestillt. Anschließend wurde die Tracersubstanz in die Glasmikropipette aufgezogen, die Hamiltonspritze in der stereotaktischen Apparatur befestigt und ihre Funktion (prä-Test) überprüft. Eventuelle Verstopfungen wurden durch vorsichtiges Kürzen der Pipettenspitze beseitigt. Dann wurde die Mikropipette auf die gewünschte Tiefe (z-Koordinate) abgesenkt, wobei die Dicke des Schädels von ungefähr 0,4 mm hinzu addiert wurde. An der gewünschten Position wurde die Pipette mehrmals 0,1 mm auf und ab bewegt um so ein kleines Reservoir für den Tracer zu erstellen (nicht bei anterogradem Tracing notwendig aufgrund des unterschiedlichen Diffusionsvermögens und der Viskositätsunterschiede der Tracersubstanzen). Die Injektion erfolgte sehr langsam und in kleinen Schüben (etwa 20 nl / 5 s). Nach einer Wartezeit von 5 min wurde die Mikropipette langsam aus dem Gehirn herausgeführt. Ein positiver Funktionstest der Hamiltonspritze bestätigte die erfolgreiche Applikation (post-Test). Im Anschluss wurde die Maus aus der stereotaktischen Apparatur herausgenommen und der Hautschnitt vernäht (Ethicon Nahtmaterial, Ethilon II, EH 7930H 5-0, 45 cm, Ethicon, Norderstedt, D). Die Injektionsnarkose wurde durch die Gabe von 0,6 mg/kg KG des Medetomidin-Antagonisten Atipamezol (50 µl i.p., 1 mg/ml, Antisedan®, Pfizer, Karlsruhe, D) beendet und zur Desinfektion Betaisodonna-

Lösung® auf die Nahtstelle aufgetragen. Nachdem die Maus auf ein Heizkissen (Heat solution®, Prism Enterprises, USA) gelegt wurde, erholte sie sich in der Regel innerhalb weniger Stunden. In einem Postoperationsraum wurde der gesundheitliche Zustand des Tieres mehrmals täglich kontrolliert. Sofern es zu größeren Blutverlusten kam, wurde zur postoperativen Versorgung 0,2 bis 0,3 ml Ringer/Glucose-Lösung (20 mM Glucose in Ringerlösung (Braun AG, Melsungen, D)) i.p. injiziert.

2.2.1.2 Retrogrades Tracing kortikaler Hirnareale

Für ein erfolgreiches Tracing des mPFC (prälimbischer und infralimbischer Kortex) ist eine Verteilung der Beads (bei gegebener Selektivität) im Injektionsareal notwendige Voraussetzung für eine Vielzahl retrograd markierter DA Neurone im Mittelhirn. Dies ist insofern problematisch, da Einmal-Injektionen größerer Volumina aufgrund der geringen Ausdehnung des mPFC entlang des Pipettentraktes vom Injektionsort verdrängt werden und aus dem Bohrloch heraustreten bzw. es zu starken Kontaminationen anderer Hirnareale kommt. Dies konnte dadurch umgangen werden, dass insgesamt sieben kleine Injektionen an vier definierten Positionen entlang der rostro-caudalen Achse durchgeführt wurden. Da es auch hierbei zu einem Heraustreten der Beads kommen konnte, waren die Volumina jeder Injektion variabel und betragen zwischen 20 und 80 nl, bei einem Gesamtvolumen von 400 nl. Abb. 11 verdeutlicht den Ablauf dieser Methode. Nachdem an den rostrocaudalen (y: +2,10 mm) und mediolateralen (x: +0,27 mm) Koordinaten ein Loch gebohrt wurde, erfolgte posterior (etwa 0,15 mm vom Rand des Bohrlochs entfernt) die erste Injektion bei z: -2,10 mm (generell z-Koordinaten jeweils zuzüglich der 0,4 mm Schädelstärke) Tiefe. Die nächste Injektion erfolgte bei z: -1,6 mm, wobei nach jeder Injektion 5 min gewartet wurde. Dieser Ablauf wurde an drei weiteren Positionen im Bohrloch wiederholt, die jeweils 0,1 mm voneinander entfernt waren (bei der letzten Position nur eine Injektion bei z: -2,10 mm). Alle stereotaktischen Koordinaten wurden anhand des Maushirnatlas von Paxinos und Franklin, 2001 ermittelt.

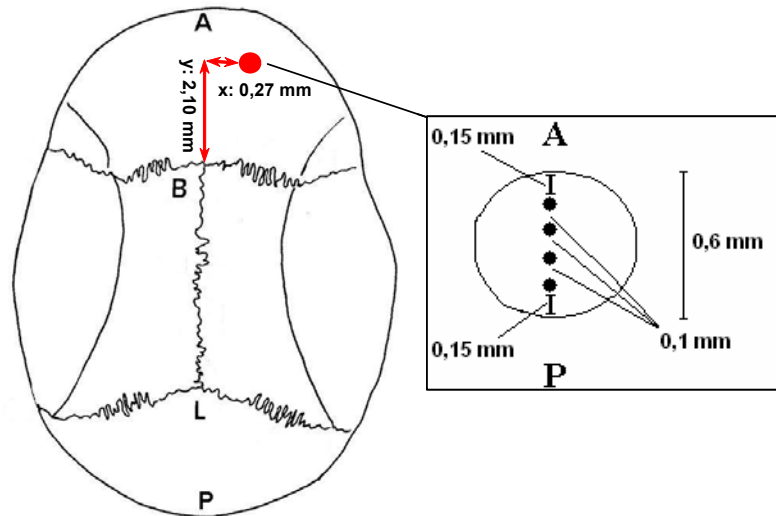


Abb. 11: Retrogrades Tracing des medialen PFC

Die Abbildung zeigt die Lokalisation des Bohrlochs (roter Punkt) auf der rostro-caudalen und mediolateralen Achse ausgehend vom Referenzpunkt Bregma. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt das Bohrloch mit den vier Injektionspositionen, wobei die erste Injektion posterior und die folgenden dann in 0,1 mm Schritten nach anterior ausgeführt wurden (A: Anterior, P: Posterior, B: Bregma, L: Lambda).

Für das selektive retrograde Tracing des cingulären Kortex konnte kein Protokoll etabliert werden, das zu einer Markierung einer größeren Anzahl von TH-positiven Zellen im Mittelhirn führte. Trotz der hohen Selektivität waren stets nur sehr wenige markierte TH-positive Zellen im Mittelhirn zu sehen. Auch Versuche mit multiplen Injektionen blieben erfolglos. Bei den wenigen erfolgreichen Experimenten erfolgte die Injektion der Beads in den posterioren cingulären Kortex (stereotaktischen Koordinaten: x: +0,25 mm; y: +0,98 mm; z: -1,4 mm und -0,75 mm). Die Gesamtinjektionsvolumina variierten zwischen 150 und 300 nl. Somit blieb die Analyse des mesocingulären DA Systems auf wenige immunhistochemische Experimente (Untersuchung der Calbindin und DAT Proteinexpression) beschränkt. Systematische elektrophysiologische und neuroanatomische Untersuchungen dieses Systems konnten nicht durchgeführt werden.

2.2.1.3 Retrogrades Tracing striataler Hirnareale

Das Striatum lässt sich anatomisch und funktionell in einen dorsalen und ventralen Anteil unterteilen. Beim Primaten wird das Striatum zusätzlich durch die Capsula interna in den Nucleus caudatus und Putamen geteilt. Eine entsprechende Differenzierung existiert beim Nager nicht. Im ventralen Striatum ist der Nucleus Accumbens (NAc) lokalisiert. Er besteht aus zwei Subregionen, die als core und shell bezeichnet werden. Selektives Tracing dieser Subareale erlaubt die Differenzierung mesolimbischer core und shell Projektionen. Beim Tracing des NAc shell, wurde stets dessen lateraler Bereich markiert. Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die verwendeten stereotaktischen Koordinaten und entsprechende Injektionsvolumina für die *in vivo* Markierung striataler Hirnareale.

| | NAc core | NAc shell | dorsales Striatum |
|--------------------------------|---------------------|----------------------|------------------------------|
| x-Koordinate [mm] | +1,00 | +1,75 | +1,90 |
| y-Koordinate [mm] | +1,54 | +1,45 | +0,98 |
| z-Koordinate [mm] | +4,00 | +4,00 | +2,20 |
| Injektionsvolumina [nl] | 80 | 80 | 80 |

Tab. 5: Stereotaktische Koordinaten und Injektionsvolumina für retrogrades Tracing striataler Hirnareale

Ausgehend von Bregma; Angaben nach Paxinos und Franklin, 2001.

2.2.1.4 Retrogrades Tracing der Amygdala

Die basolaterale Amygdala ist im Diencephalon, caudal von Bregma lokalisiert. Da der Abstand zwischen Bregma und Lambda zwischen individuellen C57Bl/6 Mäusen sehr variierte (BL: 3,9 bis 4,6 mm) wurde eine empirische Formel verwendet, die den Abstand auf die gewünschte Zielkoordinate (y: -1,94 mm) normiert (Schiemann, 2005). Das Injektionsvolumen betrug 100 nl.

Somit konnten folgende Koordinaten etabliert werden:

x: +2,80 mm

y: $-\left(\frac{BL}{4,20} * 1,94\right) + 0,40$ mm

z: -4,30 mm

2.2.1.5 Anterogrades Tracing des ventralen tegmental Areal

Für die Bestimmung der y-Koordinate für das Tracing der VTA mit PHA-L wurde ebenfalls die empirische Formel verwendet, die in Abschnitt 2.2.1.4 beschrieben wurde. Das Injektionsvolumen betrug 5-10 nl PHA-L bei z=-4,40 mm. Sofort nach der Injektion wurde die Position der Mikropipette auf z=-4,15 mm verändert und anschließend für 5 min gewartet, bevor sie langsam aus dem Gehirn entfernt wurde. Dadurch konnte die Selektivität des Tracings wesentlich verbessert werden. Folgende Koordinaten konnten für das Tracing der VTA etabliert werden:

X: +0,27 mm

y: $-\left(\frac{BL}{4,20} * 3,60\right) + 0,40$ mm

z: +4,40 mm

2.2.1.6 Postoperative Überlebenszeit *in vivo* markierter Tiere

Die Überlebenszeit ist definiert als die Zeit, die benötigt wird für den axonalen retrograden bzw. anterograden Transport der Tracersubstanz, um eine maximale Anzahl markierter Zellen im Mittelhirn bzw. axonaler Terminale zu erlangen. Sie wird beeinflusst von der verwendeten Tracersubstanz, der Transportrichtung und der Länge des Transportweges. Längere Überlebenszeiten als in Tabelle 6 gezeigt, führten zu keiner weiteren Zunahme markierter DA Neurone im Mittelhirn bzw. axonaler Terminale im PFC.

| Injektionsareal | mPFC | cingulärer Kortex | VTA | NAc core | BLA | NAc shell | dorsales Striatum |
|-----------------------|------|-------------------|-----|----------|-----|-----------|-------------------|
| Überlebenszeit [Tage] | 21 | 21 | 20 | 14 | 14 | 7 | 7 |

Tab. 6: postoperative Überlebenszeiten

Überlebenszeiten nach Injektion von retrograden (Beads) und anterograden (PHA-L) Tracersubstanzen in definierte Hirnareale

2.2.2 Elektrophysiologische Methoden

2.2.2.1 Hirnschnittpräparation adulter Mäuse

Für die Hirnschnittpräparation wurde eine adulte Maus zunächst terminal anästhesiert. Die Anästhesie wurde eingeleitet durch eine i.p. Injektion von 100 µl des Kombinationsnarkotikums Ketavet® / Domitor® (siehe 2.2.1.1). Im areflexiven Zustand wurde das Tier auf einer Styroporunterlage fixiert. Nach Öffnung des Thorax und Freilegung des Herzens, wurde zur Unterbindung des caudalen Blutkreislaufes die Aorta descendens abgeklemmt und linksventrikulär 50 µl Heparin (250 I.E., Liquemin®, Roche, D) injiziert. Im Anschluss erfolgte die über eine Schlauchpumpe (Ismatec, Zürich, Schweiz; initial Stufe 40) vermittelte linksventrikuläre Perfusion mit eiskalter (1 Stunde bei -80 °C) ACSF-Perfusionslösung. Inzision des rechten Atriums erlaubte den venösen Abfluss (nach Inzision Geschwindigkeit der Schlauchpumpe auf Stufe 70 erhöht). Während der Perfusion wurde mit einer oralen Sonde (PeakTech® 5110, PeakTech, Ahrensburg, D) die Körpertemperatur gemessen. Eine erfolgreiche Perfusion war durch ein Absinken der Temperatur auf Werte unterhalb von 10 °C gekennzeichnet. Das Gehirn wurde in eiskalter ACSF-Perfusionslösung herauspräpariert und mittels eines Mikrotoms (VT 1000 S, Leica, Wetzlar, D) wurden 200 µm dicke, koronale Mittelhirnschnitte angefertigt (Schnittgeschwindigkeit: Stufe 2; Frequenz: 9). Dabei hat sich gezeigt, dass das Schneiden von dorsal nach ventral zu einer deutlichen Optimierung der Qualität des Präparates führte. Dadurch konnte ein gelegentliches Aufrollen der Schnitte dauerhaft verhindert werden. Um eine ebene Anschnittsfläche zu erhalten, wurde der erste Schnitt von ventral nach dorsal angefertigt und nach dem Drehen des

Präparats alle weiteren von dorsal nach ventral geschnitten. Anschließend wurden die Schnitte in eine mit Carbogen (95 % O₂ / 5 % CO₂) begaste ACSF-Patchlösung überführt. In dieser Lösung wurden die Schnitte für 90 Min. auf dem Wasserbad (36 °C) inkubiert und dann bei Raumtemperatur bis zum Beginn der Messung unter Carbogen-Begasung aufbewahrt.

2.2.2.2 Die Patch-Clamp Technik

Zur Messung der Membranpotentiale und Ionenströme retrograd identifizierter Neurone in akuten Mittelhirnschnitten wurde die Patch- Methode angewandt. Sie wurde 1976 von Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelt, wofür sie 1991 mit dem Nobel-Preis für Medizin ausgezeichnet wurden. Bei der Patch-Clamp Ableitung wird mittels einer stumpfen Glaspipette eine Verbindung mit sehr hohem Widerstand (Giga-Ohmbereich; 1 GΩ entspricht 10⁹ Ω) zwischen Zellmembran und Pipette gebildet (Gigaseal). Die hohe Abdichtung und infolge der geringen Leckströme vermindern das elektrische Hintergrundrauschen und erlauben eine extrem hohe Signalauflösung, die im pA-Bereich (10⁻¹² A) liegt. Dadurch ist eine Messung von Strömen durch einzelne Ionenkanäle möglich. Abbildung 12 zeigt verschiedene Patch-Clamp-Konfigurationen. Die cell-attached oder on-cell Konfiguration liegt vor, wenn nach dem Aufsetzen der Pipette auf die Zellmembran ein Gigaseal gebildet wurde. Wird nun die Glaspipette vorsichtig von der Zelle zurückgezogen, bleibt ein Membranstück (patch) in der Öffnung hängen und bildet einen inside-out Patch. Dabei weisst die zytosolische Innenseite der Plasmamembran zur Badlösung und die Außenseite zur Pipettenlösung. Wenn man dagegen durch leichtes Ansaugen die Zellmembran unter der Pipette in der cell-attached Konfiguration vorsichtig aufreißt, erhält man einen direkten Zugang zu der Zelle (whole-cell bzw. Ganzzell Ableitung). In der whole-cell Konfiguration kommt es zu einer deutlichen Erhöhung des Rauschens, da die Summe aller Einzelkanalströme der gesamten Zelle dargestellt wird - das

¹ Die englischen Bezeichnungen Patch-Clamp für Membranfleck-Klemme, seal für Abdichtung, cell-attached, whole-cell, inside-out, 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.

sogenannte makroskopische Strommuster der Zelle. Einzelkanalmessungen sind hierbei nur bedingt möglich. Weiterhin werden durch den direkten Zugang Zytoplasma und die Pipettenlösung durchmischt. Dadurch kommt es zu einer Veränderung von Ionenkonzentrationen, second messenger Systemen und Auswaschen kleiner Proteine. Durch die Verwendung einer Pipettenlösung, die dem intrazellulären Medium sehr ähnlich ist, wird das physiologische Profil der Zelle weniger beeinflusst. Nahezu unveränderte physiologische Bedingungen erhält man durch die perforated patch Methode (siehe Kapitel 2.2.2.7). Ein Vorteil der whole-cell Konfiguration ist, dass sie das Einbringen von intrazellulären, histochemisch-detektierbaren Farbstoffen erlaubt. In der vorliegenden Arbeit wurde Neurobiotin (N-(2-Aminoethyl)-biotinamidhydrochlorid, $C_{12}H_{23}ClN_4O_2S$, Vector Laboratories, Burlingame, USA), eine chemisch veränderte Biotinverbindung mit hoher Affinität zu Avidin verwendet. Durch langsames Wegziehen der Pipette aus der whole-cell Konfiguration erhält man einen outside-out Patch. Hierbei zeigt die Zellmembranaußenseite nun zur Badlösung. Durch die Reduktion der Membranfläche kommt es zu einer drastischen Reduktion des Rauschens und somit werden Einzelkanalmessungen möglich. In der vorliegenden Arbeit wurden whole-cell und outside-out Messungen durchgeführt. Elektrophysiologische Grundcharakteristika einer Zelle, wie der zeitliche Verlauf des Membranpotentials und die Reaktion auf hyperpolarisierende bzw. depolarisierende Strominjektionen zur Nachahmung synaptischer Einflüsse wurden im whole-cell Modus gemessen. Inaktivierungskinetiken des A-Typ Kanals wurden vorzugsweise in der outside-out Konfiguration bestimmt.

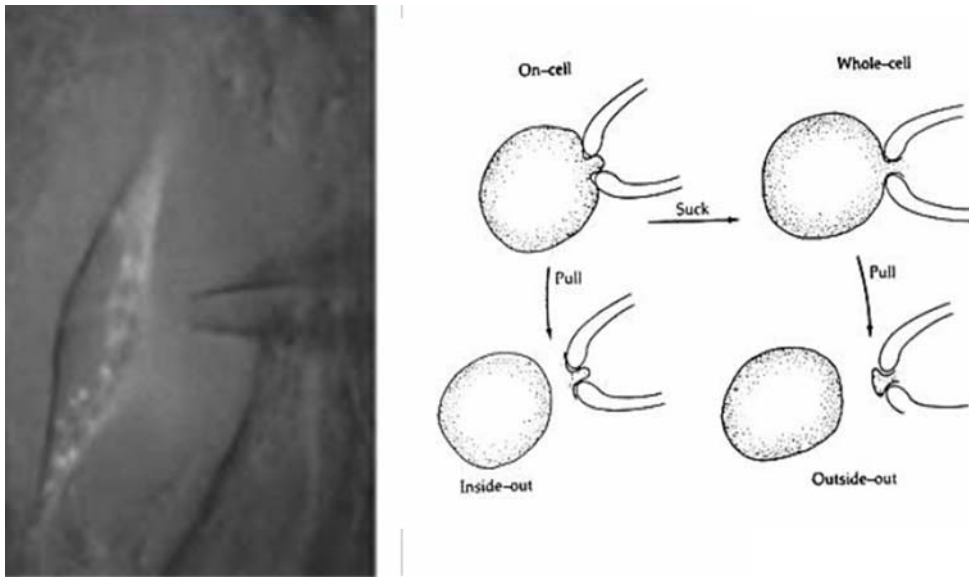


Abb. 12: Patch-Clamp Konfigurationen

Links: Dargestellt ist die Annäherung der Patchpipette an eine durch Beads retrograd markierte Nervenzelle (aus Liss et al., 2005). Rechts: Typische Patch-Clamp Konfigurationen (aus Hille, 2001).

2.2.2.3 Aufbau und Ausstattung des Messplatzes

Die elektrophysiologischen Messungen wurden an einem Patch-Clamp Messstand durchgeführt (Abb. 13). Der Aufbau und die Funktion elektronischer und mechanischer Komponenten soll in den folgenden Kapiteln erläutert werden.



Abb. 13: Patch-Clamp Messplatz

2.2.2.3.1 Mechanisch optische Elemente

Der Messplatz war zur Abschirmung gegen äußere elektrische Störungen von einem Faradaykäfig umgeben und auf einem schwingungsgedämpften Tisch (Newport GmbH, Darmstadt, D) positioniert. In dessen Zentrum stand ein inverses Mikroskop (Axioskop 2 FS plus, Zeiss, Oberkochen, D) mit einem konventionellen Objektiv (Achromplan 4x / 0,10; Zeiss, Oberkochen, D) zur Übersichtsdarstellung und einem Wasserimmersionsobjektiv (Achromplan 40x / 0,80 W Ph 2, Zeiss, Oberkochen, D) zur Detailansicht. Bei Verwendung des Wasserimmersionsobjektivs wurde routinemäßig differentieller Interferenzkontrast nach Normarski verwendet (Kontrastverstärker, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan). Weiterhin war ein zusätzliches Linsenelement (Luigs und Neumann GmbH; Ratingen, D) im Strahlengang zwischen Mikroskop und Kamera eingebaut, welches exakte Manipulationen der Pipette in unmittelbarer Zellnähe und in zusätzlicher zwei- bis vierfacher Vergrößerung ermöglichte. Die Darstellung des Präparats erfolgte auf einem Videomonitor, der mit einer Infrarotkamera (Newvicon C2400, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan) verbunden war. Zur Detektion der Beads war das Mikroskop mit einer Lichtquelle für die Fluoreszenzanregung (FluoArc, Leistungselektronik, Jena, D) verbunden. Die Badkammer, in der sich die Hirnschnitte im Verlauf der Messung befanden, war anstelle des Objektisches des Mikroskops montiert und konnte mechanisch in zweidimensionaler Richtung bewegt werden. Über ein Temperaturkontrollsystem (Badkontroller V, Luigs und Neumann GmbH; Ratingen, D) konnte eine konstante Temperatur von 36 °C in der Badlösung erreicht werden. Um eine gleichmäßige Perfusion der Schnitte mit der Badlösung zu gewährleisten, wurde der Zu- und Ablauf zur Badkammer über eine Schlauchpumpe (Durchflussrate: 2 bis 4 ml/min, Ismatec, Zürich, Schweiz) gesteuert. Die Patchpipette wurde in einen Pipettenhalter eingesetzt, der zur Gewährleistung eines möglichst kurzen Signalweges direkt am Vorverstärker angebracht war und über einen elektrischen Mikromanipulator (Mini 25, Luigs und Neumann GmbH; Ratingen, D) in drei Ebenen gesteuert werden konnte. Über einen Silikonschlauch, der mit dem Pipettenhalter und mit einer

Druckluftquelle verbunden war, konnte mittels eines Drei-Wege-Hahns entweder durch Ansaugen ein leichter Unterdruck in der Patchpipette ermöglicht werden oder ein Überdruck erzeugt werden.

2.2.2.3.2 Elektronische Komponenten

Die Aufzeichnung der Messdaten und die Steuerung des Analog-Digital Wandlers (AD Wandler) erfolgte über einen Macintosh Computer (MAC OS X, Apple® Computer). Zur Aufzeichnung der Daten wurde das Programm Patchmaster Version 1.2 (Heka Elektronik, Lambrecht, D) verwendet. Der Pipettenhalter war direkt auf dem Vorverstärker (*headstage*, EPC 10, Heka Elektronik, Lambrecht, D) montiert. Dieser war über ein Kabel mit dem Hauptverstärker (EPC 10 *double patch-clamp*, Heka Elektronik, Lambrecht, D) verbunden. Der Hauptverstärker war ebenso wie das Temperaturregelsystem neben dem Faradaykäfig positioniert. Dort wurden die Daten nochmals verstärkt und gefiltert. Dies geschah mit einem Bessel-Tiefpassfilter, der alle Signale mit einer Frequenz über 5 kHz heraus filtert. Die Digitalisierung der analogen Daten des Verstärkers übernahm ein in den Computer integrierter Analog-Digital-Wandler (Heka Elektronik, Lambrecht, D), der das analoge Signal mit einer Frequenz von 10 kHz abtastet und somit digitalisiert. Das Nyquist-Shannon-Abtasttheorem besagt, dass die Digitalisierung mindestens doppelt so hoch wie die Maximalfrequenz eines kontinuierlichen Signals sein muss, um eine gut aufgelöste Darstellung des Signals zu erreichen.

2.2.2.3.3 Funktionsprinzip des Vorverstärker

Für die Messung der elektrophysiologischen Daten wurde ein EPC 10 Patch-Clamp Vorverstärker benutzt. Abbildung 14 zeigt einen vereinfachten Schaltkreis eines Vorverstärkers. Die wichtigsten Elemente sind zwei Operationsverstärker (OPA; *operational amplifier*) und ein Rückkopplungswiderstand (R_f). Das Pipettenpotential (Membranpotential V_m der Zelle) und die vorgegebene Sollspannung (Kommandopotential V_c) liegen an den beiden Eingängen des ersten OPA an. Entsteht eine Differenz zwischen V_c und V_m , entsteht am

Ausgang des OPA eine Spannung, die proportional zu dieser Differenz ist. Zum Ausgleich des Spannungsunterschieds muss ein Strom über den Rückkopplungswiderstand R_f fließen. Aufgrund des hohen Eingangswiderstands ($10^{12} \Omega$) des OPA kann dieser Strom nur in die Elektrode fließen. Dieser Strom wird V_m solange ändern bis die Differenz zwischen V_m und V_c Null ist. Die am ersten OPA erzeugte Spannung wird am zweiten OPA mit dem Kommandopotential verglichen und die Differenz über den Strommonitor ausgegeben. Der Vorverstärker minimiert also Differenzen zwischen Membran- und Kommandopotential und induziert gleichzeitig eine Spannung über den Rückkopplungswiderstand, die proportional zum injizierten Strom ist. Der Vorverstärker bildet die Grundlage für die Durchführung der klassischen Spannungs- (voltage-clamp) bzw. Stromklemme (current-clamp) (siehe Abschnitt 2.2.2.5) (Numberger und Draguhn, 1996).

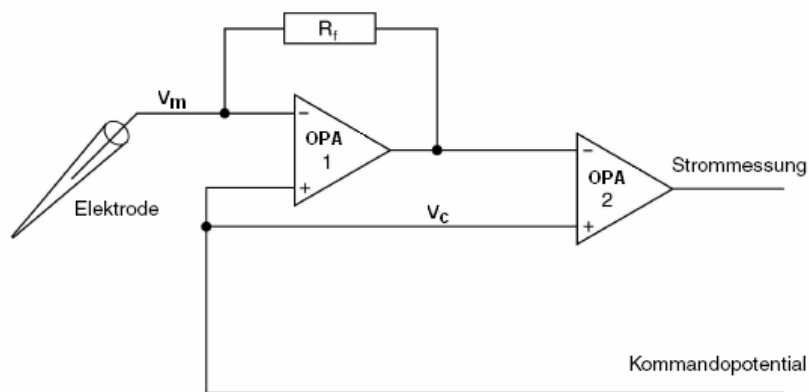


Abb. 14: Schematisches Schaltbild eines Vorverstärkers

V_m : Membranpotential, V_c : Kommandopotential, R_f : Rückkopplungswiderstand, OPA: Operationsverstärker (Abbildung modifiziert nach Numberger und Draguhn, 1996).

2.2.2.3.4 Patchpipetten und Messelektroden

Die Patchpipetten wurden mit einem temperaturkontrollierten, horizontal ziehenden Puller (DMZ-Universal Puller, Zeitz, Martinsried, D) in zwei automatisierten Schritten hergestellt. Die Parameter des verwendeten Programms (P10) sind in der Tabelle 7 aufgelistet.

| P(A) | | | | P(B) | | | |
|-------|-----|-------|-----|-------|----------|-------|-----|
| H | 400 | t(F1) | 000 | H | variabel | t(F1) | 090 |
| F(TH) | 016 | F1 | 000 | F(TH) | 018 | F1 | 140 |
| s(TH) | 019 | s(F2) | 000 | s(TH) | 010 | s(F2) | 002 |
| t(H) | 050 | F2 | 000 | t(H) | 030 | F2 | 145 |
| s(H) | 046 | AD | 121 | s(H) | 000 | AD | 045 |

Tab. 7: Programm P10 DMZ-Universal Puller (Zeitz)

Definitionen der einzelnen Parameter unter <http://zeitz-inst.homepage.t-online.de>

Als Patchpipetten wurden Borsilikatglaskapillaren mit Filament (GC150TF-15, 1,50 mm AD x 1,17 mm ID, Harvard Apparatus, Edenbridge, England) verwendet. Die Hitzeeinstellung (P(B)-H) des Pullers wurde vor jedem Experimentaltag empirisch ermittelt, so dass der Pipettenwiderstand nach dem Eintauchen der Pipette in die Badlösung im Bereich von 3,5 bis 4,2 M Ω (bei eingeschalteten Überdruck und für alle Pipettenlösungen) lag. Dabei gilt die Regel: Je größer die Hitze desto kleiner der Pipettendurchmesser, also desto höher der Pipettenwiderstand. Vor der Messung wurden die Patchpipette mit der Pipettenlösung durch einen Membranfilter mit 0,2 μ m Porendurchmesser (Whatman®, Schleicher und Schuell, Maidstone, England) im unteren Drittel gefüllt, so dass der Elektrodendraht im Pipettenhalter gerade in die Flüssigkeit eintauchte. Als Mess- und Badelektrode wurden Silberdrähte verwendet (Ag⁺/AgCl-Elektroden), die zur Vermeidung von Offsetpotentialen mit 10 bis 13 % Natriumhypochloridlösung (NaOCl, *Bleach*) regelmäßig neu chloriert wurden ($Cl^- + Ag \rightleftharpoons AgCl + e^-$). Offsetpotentiale sind Spannungen, die nicht vom biologischen Präparat oder Kommandopotential herrühren und an Übergängen zwischen Silberdraht, Pipettenlösung und Badlösung (*Liquid junction potential*) entstehen. Sie führen zur Abweichung zwischen dem angezeigten und dem tatsächlichen Zellmembranpotential und können daher elektronisch kompensiert werden. Die Badelektrode war mit dem Erdleiter verbunden und die Messelektrode stellte eine leitende Verbindung zwischen Pipettenlösung und Vorverstärker her.

2.2.2.4 Kapazitätsabgleich und Serienwiderstandkompensation

Die Lipiddoppelschicht biologischer Membranen verhält sich elektronisch betrachtet wie ein Kondensator parallel geschaltet zu einem Widerstand (RC-Glied). Die Kapazität C eines Kondensators ist definiert als die Ladungsmenge Q , die er pro angelegter Spannung V speichern kann ($C = \frac{Q}{V}$). Kapazitiver Strom fließt in einem Kondensator nur dann, wenn sich die Spannung über dem Kondensator ändert $I = \frac{\Delta Q}{\Delta t} = C * \frac{\Delta V}{\Delta t}$. Wenn $\frac{\Delta V}{\Delta t} = 0$, die Spannung am Kondensator also konstant ist, dann beträgt auch der kapazitive Strom $I = 0$. Nach dem Ohm'schen Gesetz ergibt sich $I = \frac{V}{R} = C * \frac{\Delta V}{\Delta t}$ bzw. $\frac{\Delta V}{\Delta t} = \frac{1}{RC} * V$. Dabei handelt es sich um eine Reaktion 1. Ordnung. Die Proportionalitätskonstante bzw. Geschwindigkeitskonstante dieser Gleichung ist $\frac{1}{RC}$ bzw. dessen Kehrwert $\tau = RC$. Bei Umladungsvorgängen, wie beispielsweise der Änderung des Kommandopotentials, treten also transiente kapazitive Ströme auf, die sich durch Exponentialfunktionen beschreiben lassen und elektronisch kompensiert werden können (*cancellation of capacitive currents*) (Abb. 15 A).

Wichtige passive Eigenschaften der Zelle können aus der Membrankapazität C_m ermittelt werden. Da die Membranfläche der Zelle die Kapazität bestimmt, ergibt C_m einen Wert für die Oberfläche der Zelle (spezifische Kapazität von Biomembranen C_m : $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$) (Abb. 15 B).

Der Membranwiderstand R_m sinkt mit zunehmender Oberfläche der Zelle, da mehr Leitfähigkeiten (Ionenkanäle) in der Zellmembran vorhanden sind (R_m bei dopaminergen SNc Neuronen: 150-400 M Ω) (Abb. 15 B).

Die elektrisch leitende Verbindung zwischen der Elektrode und dem Inneren der Zelle wird durch den Serienwiderstand R_s bestimmt (Abb. 15 B). Idealerweise sollte er in der Nähe des Pipettenwiderstandes (etwa 3-5 M Ω) liegen. Jedoch kommt es durch kleinste Membranfragmente zu einer Erhöhung von R_s von mehr als das Doppelte des eigentlichen Pipettenwiderstandes (in den vorliegenden Experimenten im Mittel etwa bei 10-40 M Ω). Da die Zelle nur über R_s umgeladen werden kann, ist der Serienwiderstand für den unterschiedlichen Wert des

Kommandopotentials V_c am Verstärkerausgang und dem des Membranpotentials V_m verantwortlich. Ein Teil des Kommandopotentials fällt in Abhängigkeit der Größe der Membranströme I_m über R_s ab, so dass V_c und V_m nicht identisch sind. Der Spannungsfehler des Serienwiderstandes berechnet sich aus dem Ohm'schen Gesetz und zwar wie folgt: $V_c = V_m - R_s I_m$ bzw. $\Delta V = R_s I_m$.

Zusätzlich muss bei Umladungsprozessen die Membrankapazität C_m umgeladen werden. Bei diesem Vorgang hängt die zeitliche Geschwindigkeit der Umladung von R_s ab. Der kinetischer Fehler des Umladungsprozesses berechnet sich wie folgt:

$\tau = R_s C_m \frac{R_m}{R_m + R_s}$. Da $R_m \gg R_s$ ergibt sich $\tau \approx R_s C_m$. Daher spiegelt der

gemessene Kompensationsstrom bei hohen R_s Werten nicht genau die Leitfähigkeitsänderung der Membran wieder, sondern reagiert verlangsamt, wodurch das Potential eine bestimmte Zeit vom Kommandopotential abweicht. Die hier beschriebenen Abweichungen werden nicht vom Verstärker angezeigt und führen zu Spannungsfehlern und kinetischen Fehlern. Zur Vermeidung derartiger Fehler wurde der Serienwiderstand bei voltage-clamp Messungen in der whole-cell Ableitung zu 75 % kompensiert. Hierzu wurde eine hinreichend große Spannung zum Kommandopotential addiert, um den zu erwartenden Spannungsabfall über R_s zu neutralisieren. Jedoch kann man R_s nicht vollständig kompensieren, da der Schaltkreis als positive Rückkopplungsschleife implementiert ist, die irgendwann zu oszillieren beginnt und somit zum Verlust des Seals führt. Im Gegensatz zum Kapazitätsabgleich bei dem die kapazitiven Ströme lediglich nicht mehr sichtbar gemacht werden (*cancellation of capacitive currents, s.o.*), kommt es bei der Kompensation des Serienwiderstandes zu einer tatsächlichen Verbesserung der Geschwindigkeit und Präzision des Verstärkers (Sherman-Gold, 2006; Nicholls et al., 2002).

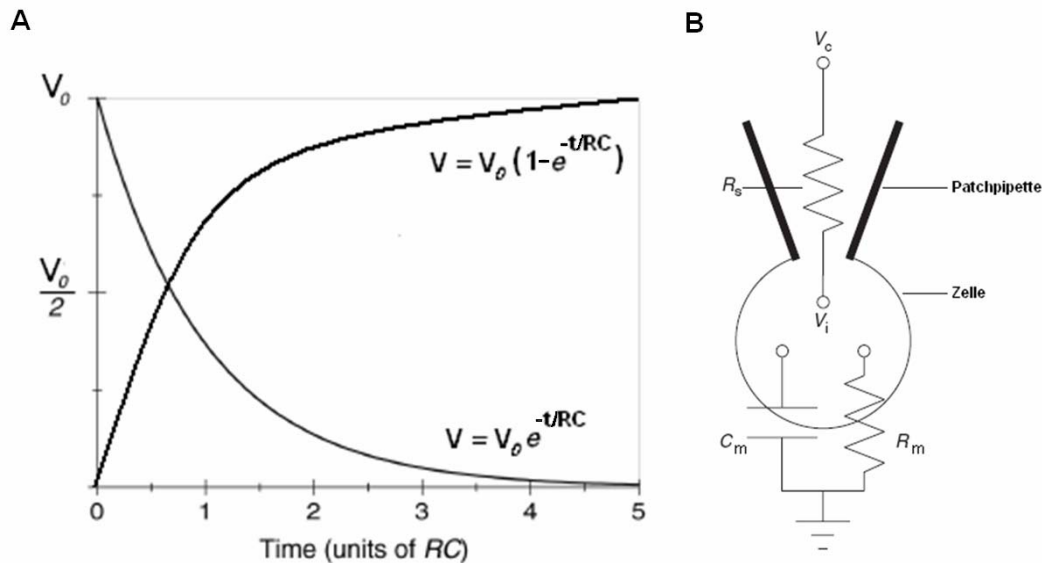


Abb. 15: Kapazitäten und Serienwiderstände in Patch-Clamp Experimenten

[A] Exponentialfunktionen, die den Ladungsvorgang bzw. Entladungsvorgang eines Kondensators veranschaulichen. Die Geschwindigkeitskonstante dieses Vorgangs ist $\tau = RC$ und definiert als die Zeit, in der das Potential auf $1-1/e$ oder etwa 63 % seines Endwertes gestiegen bzw. als die Zeit, in der das Potential auf $1/e$ oder etwa 37 % seines Maximalwertes abgefallen ist (für $\tau = t$). V_0 : Potential zum Zeitpunkt $t=0$; V : Potential [V]; R : Widerstand [Ω]; C : Kapazität [F]; t : Zeit; [s]; e : Eulersche Zahl [B] Schematisches Schaltbild der Ganzzelleableitung. C_m : Kapazität der Membran, R_s : Serienwiderstand, V_c : Kommandopotential, V_i : Potential im Zellinneren, R_m : Membranwiderstand (Abbildung modifiziert nach Jackson, 1997).

2.2.2.5 Durchführung der Patch-Clamp Messung

Zur Durchführung einer Patch-Clamp Messung wurden die Hirnschnitte in die Badkammer transferiert und mittels eines Gitters aus Paltindraht und Nylonfäden fixiert. Die Badlösung war eine Carbogen-begaste ACSF-Patchlösung (Osmolarität: 280-300 mosmol/l), der vor Beginn des Experiments $12,5 \mu\text{M}$ CNQX (Di-natriumsalz, 6-Cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion, $\text{C}_9\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_4$, Tocris Cookson, Ellisville, USA) und $5 \mu\text{M}$ Gabazine (SR-95531 Hydrobromid, 2-(3-Carboxypropyl)-3-amino-6-(4-methoxyphenyl)pyridazinium, $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3$, Tocris Cookson, Ellisville, USA) hinzugefügt wurden. CNQX ist ein spezifischer Antagonist von AMPA / Kainat Rezeptoren und Gabazine führt zu einer allosterischen Inhibition von GABA_A -Rezeptoren. Somit können durch die Zugabe dieser Substanzen synaptische Einflüsse spezifisch blockiert und nur die intrinsischen Eigenschaften der Zellen analysiert werden. Nach dem Eintauchen der Pipette in die Badlösung wurde zunächst das Offsetpotential korrigiert.

Anschließend wurde ein geringfügiger Überdruck (ca. 150 mbar) an der Pipette erzeugt, um ein Vermischen der Pipettenlösung mit der Badlösung zu verhindern. Zur Berechnung des Pipettenwiderstands wurde ein repetitiver rechteckförmiger Testpuls erzeugt (Abb. 16 A). Aus dem resultierenden Strom konnte nach dem Ohm'schen Gesetz ($R = \frac{U}{I}$) automatisch der Pipettenwiderstand berechnet werden. Dieser lag im Bereich von 3 bis 5 M Ω . Mit Hilfe des Mikromanipulators wurde die Patchpipette an eine durch Beads retrograd markierte Zelle herangefahren. Unter leichtem Saugen konnte ein Unterdruck in der Pipette erzeugt werden, so dass es zur Ausbildung eines Gigaseals kam. Aufgrund von Umladevorgängen an Pipette und des Membranflecks unter der Pipette kommt es in der cell-attached Konfiguration zur Ausbildung von zwei transienten kapazitiven Artefakten mit schneller Zeitkonstante ($\tau = R_m C_m$ mit R_m =Membranwiderstand und C_m =Kapazität der Zellmembran; siehe Kapitel 2.2.2.4), die elektronisch kompensiert wurden (C-fast Routine) (Abb. 16 B). Um eine starke Depolarisation der Zelle zu verhindern, wurde das Kommandopotential auf einen Wert in der Nähe des zellulären Ruhemembranpotentials eingestellt (-40 mV). Durch wiederholtes leichtes Saugen konnte die Membran nun durchbrochen und ein Zugang zur Zelle hergestellt werden (whole-cell Modus). Aufgrund von Umladungsvorgängen kommt es nun wiederum zu einer Erhöhung der transienten kapazitiven Ströme, die allerdings langsame Zeitkonstanten aufweisen (Abb. 16 C). Im Vergleich zur cell-attached Konfiguration ist sie um mindestens drei Größenordnungen größer, da nicht nur der Membranfleck unter der Pipette, sondern nun die gesamte Membranfläche der Zelle als Kondensator wirkt. Nach erneuter Kompensation (C-slow Routine) konnte anschließend mit der Messung anhand verschiedener Messprotokolle begonnen werden.

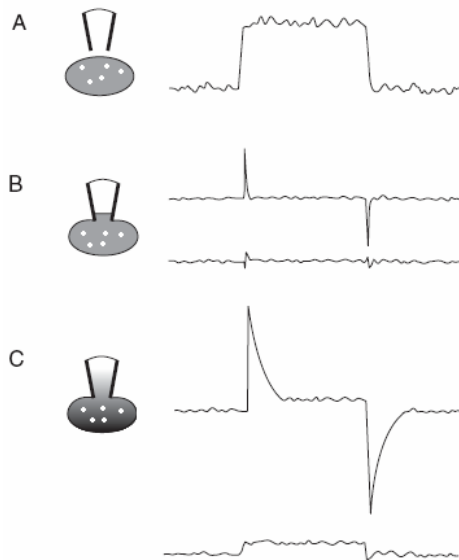


Abb. 16: Durchführung eines Patch-Clamp Experiments

[A] Testpuls bei Annäherung an eine durch Beads (weiße Punkte) markierte Zelle. Der Widerstand ist gering und die Stromantwort auf den Testpuls hoch. [B] Ausbildung eines Gigaseals in der cell-attached Konfiguration. Der Widerstand nimmt zu ($>1 \text{ G}\Omega$) und abgesehen von den zwei elektronisch kompensierbaren kapazitiven Strömen ist der Testpuls praktisch flach. [C] Nach dem Aufbrechen der Zellmembran (whole-cell Modus) nimmt der Widerstand ab und kompensierbare kapazitive Artefakte erscheinen (Umladung der Zellmembran) (Abbildung modifiziert nach Jackson, 1997).

2.2.2.6 Spannungs- und Stromklemmen Modus

Bei der Spannungsklemme (voltage-clamp) wird das Kommandopotential V_c (definierter Sollwert) kontinuierlich mit dem Membranpotential V_m der Zelle verglichen. Eine Differenz zwischen beiden Werten wird durch Strominjektion über einen Vorverstärker ausgeglichen. Dieser kompensatorische Strom kann über einen in Serie geschalteten Widerstand gemessen werden und gibt die Leitfähigkeit der Zellmembran, die unter anderem vom Öffnungszustand transmembraner Ionenkanäle bestimmt wird wieder. Somit ist es möglich das Membranpotential konstant zu halten und den korrespondierenden Strom zu messen. In diesem Zusammenhang ist ein niedriger Serienwiderstand R_s (siehe Kapitel 2.2.2.4) essentiell, da ansonsten Stromantworten mit kleinen Zeitkonstanten nicht mehr richtig aufgelöst werden können. Ein niedriger Wert für R_s kann erreicht werden wenn nieder-ohmige Pipetten (3-5 $\text{M}\Omega$) verwendet werden bzw. eine elektronische Kompensation des Serienwiderstandes vorgenommen wird. Die Membrankapazität C_m mesokortikaler DA Neurone betrug im Mittel etwa 16 pF und der Serienwiderstand $R_s=15 \text{ M}\Omega$ ($n=10$). Somit konnten Ereignisse mit Zeitkonstanten ab 240 μs unverfälscht aufgenommen werden (zum Vergleich: mesoamygdaläre DA Neurone: 456 μs $n=10$; mesolimbische core DA Neurone: 405 μs $n=15$; mesolimbische shell DA Neurone: 629 μs $n=17$; mesostriatale DA Neurone: 308 μs $n=9$). Bei einer

Stromantwort von 1 nA ergibt sich beispielsweise für die mesokortikalen DA Zellen (n=10) ein Spannungsfehler von 15 mV (zum Vergleich: mesoamygdaläre DA Neurone: 38 mV n=10; mesolimbische core DA Neurone: 27 mV n=15; mesolimbische shell DA Neurone: 17 mV n=17; mesostriatale DA Neurone: 11 mV n=9). Um signifikante Spannungsfehler zu vermeiden, wurden Inaktivierungskinetiken zusätzlich in der outside-out Konfiguration bestimmt. Hier beträgt der Serienwiderstand maximal den Pipettenwiderstand.

Bei der Stromklemme (current-clamp) wird der spontane zeitliche Verlauf des Membranpotentials gemessen. Insofern keine Leckströme erzeugt worden sind, die ständig kompensiert werden müssen, entspricht das Potential bei 0 pA Strominjektion dem Zellmembranpotential. Weiterhin kann durch positive oder negative Strominjektionen die Zelle depolarisiert oder entsprechend hyperpolarisiert werden. Durch diese Potentialänderungen können synaptische Einflüsse simuliert werden. Da der Membranwiderstand der Zelle und der Widerstand der Elektrode (R_s) in Reihe geschaltet sind, ist es schwierig bei variabler Strominjektion den Effekt der Elektrode auf die gemessene Spannung von der Zellantwort zu trennen. Im sogenannte Bridge Balance Verfahren (über eine Wheatstone'sche-Brückenschaltung) wird die Spannungsänderung von der Elektrode bei Änderung des injizierten Stroms ausgeglichen, so dass nur der Effekt der Zellantwort übrig bleibt.

2.2.2.7 Die perforated patch Methode

Bei der perforated patch (perforierter Patch) Methode wird der Membranfleck unter der Pipette mit künstlich eingebauten Poren durchlöchert. Hierfür enthielt die Pipettenlösung das porenbildende Peptid-Antibiotikum Gramacidin, das aus dem grampositiven Bodenbakterium *Bacillus brevis* gewonnen wird. Die Poren sind selektiv permeabel für monovalente Kationen (K^+ , Na^+) jedoch impermeabel für multivalente Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+}), Anionen (Cl^-) und größere intrazelluläre Moleküle, wie z.B. Glukose. Im Vergleich zur Ganzzelleableitung wird das intrazelluläre Milieu kaum beeinflusst und eine größtmögliche physiologische *in vitro* Messung ist möglich. Da die Methode deutlich weniger invasiv ist, können

Ableitungen über mehrere Stunden und pharmalogische Untersuchungen durchgeführt werden. Da Gramicidin nicht wasserlöslich ist, wurde es in DMSO (Dimethylsulfoxid, C_2H_6OS) gelöst, vor jedem Versuchstag frisch angesetzt und unter Lichtschutz aufbewahrt. Die Gramicidin Stammlösung wurde direkt zur Pipettenlösung (Endkonzentration: $188,2 \mu M$; entspricht $100 \mu g/ml$) pipettiert und für 5 min mit Ultraschall behandelt. Da das Antibiotikum erst nach Ausbildung des Gigaseals in Kontakt mit der Zellmembran kommen sollte, wurde zunächst die Spitze einer Glaspipette in Gramicidin-freier Pipettenlösung für 10 s eingetaucht (*tip filling*) und dann von hinten mit Gramicidin-haltiger Pipettenlösung gefüllt. Nach erfolgreicher Bildung des Gigaseals konnte die Aufzeichnung der Spontanaktivität in der current-clamp Konfiguration beginnen.

2.2.2.8 Messprotokolle

2.2.2.8.1 Current-clamp

Die Spontanaktivität der Zellen wurde untersucht, indem während der Ganzzelleableitung kein Strom in die Zelle injiziert wurde und währenddessen der Verlauf der Membranpotentialänderung registriert wurde (5 s pro Datenspur). Um spontane Aktionspotentiale mit hoher zeitlicher Auflösung aufzuzeichnen, wurde das Zeitfenster der Digitalisierung auf 0,5 s pro Datenspur eingeschränkt (ebenfalls keine Strominjektion). Hyperpolarisierende Ströme wurde schrittweise (zwischen 10 und 30 pA) über einen Zeitraum von 2 s injiziert und die Potentialantwort aufgezeichnet. Die maximale Feuerungsrate der Zellen wurde ausgehend von einem Haltepotential von -60 mV durch rampenförmige Injektion depolarisierender Ströme ausgelöst. Die Amplitude der depolarisierenden Stromrampe wurde in 50 pA Schritten auf +500 pA erhöht (Steigung von 0,025-0,25 pA/ms) und entsprechend wieder abgesenkt. Bei Eintritt eines Depolarisationsblocks der Aktivität wurde die Aufzeichnung gestoppt.

2.2.2.8.2 Whole-cell voltage-clamp

Für die Analyse des I_h -Stroms (Definition siehe Kapitel 1.2) wurde ausgehend von einem Kommandopotential von -40 mV das Membranpotential auf -100 mV für einen Zeitraum von 0,5 s abgesenkt. Anschließende Depolarisation auf das Kommandopotential von -40 mV führte zu Aktivierung von A-Typ Kaliumkanälen (I_A -Strom) (siehe Kapitel 1.2).

2.2.2.8.3 Zellfreier outside-out voltage-clamp

In der zellfreien Ableitung (outside-out) wurde das Inaktivierungsverhalten des A-Typ Kaliumstroms untersucht. Hierzu wurde ausgehend von einem Kommandopotential von -40 mV das Membranpotential für 500 ms auf -100 mV abgesenkt. Anschließend wurde das Membranpotential schrittweise (10 mV Schritte) von -60 mV auf +20mV für jeweils 0,75 s depolarisiert und dann wieder auf -40 mV repolarisiert.

2.2.2.9 Datenanalyse

Die Auswertung der elektrophysiologischen Daten erfolgte mit Hilfe der Programme Fitmaster (Version 2.03 für Macintosh; Heka Elektronik, Lambrecht, D) und IgorPro (Version 4.08 für Windows XP; WaveMetrics, Lake Oswego, USA).

Die Feuerungsraten der gemessenen Zellen wurde aus dem Interspike-Intervall berechnet. Hochaufgelöste spontane Aktionspotentiale wurden anhand der Parameter Amplitude, Schwelle, Dauer und Amplitude der Nachhyperpolarisation charakterisiert. Dabei erfolgte die Bestimmung der Schwelle und der Dauer anhand der zweiten Ableitung des Aktionspotentials. Die sag amplitude wurde als Differenz zwischen einem initialen Minimalwert des Membranpotentials von -80 mV und dem steady-state-Potential nach Repolarisation ausgewertet. Der rebound delay wurde bestimmt als die Zeit zwischen dem Ende der hyperpolarisierenden Strominjektion, die die Zelle initial auf -80 mV hyperpolarisierte und dem Peak des ersten Aktionspotentials.

Der Zeitverlauf der Inaktivierung der A-Typ Kalium Kanäle kann in seinen Hauptkomponenten mit Exponentialfunktionen beschrieben werden (siehe auch Abb. 15). Die Bestimmung der Inaktivierungszeitkonstante τ erfolgte mit dem Programm Fitmaster durch Anlegen einer fallenden Exponentialfunktion (2-Komponenten-Fit): $f(t) = V_1 * e^{-t/\tau_1} + V_2 * e^{-t/\tau_2}$ bei einem Membranpotential von -40 mV (whole-cell) bzw. +20 mV (outside-out) nach Vorhyperpolarisation auf -100 mV. Für die Analyse der Daten wurde grundsätzlich die zweite Komponente τ_2 (langsame Komponente) verwendet. Die Bestimmung der I_h Ströme erfolgte aus der Differenz von initialer und maximaler Stromamplitude bei einem Membranpotential von -100 mV in der whole-cell Ableitung.

2.2.3 Histologie und Immunzytochemie

Bei der Methode der Immunzytochemie werden Antigene bzw. bestimmte Aminosäuresequenzen (Epitope) durch spezifische Antikörper markiert und können durch die anschließende Färbung mit Peroxidase- oder Fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern detektiert werden. Die Prozedur im Einzelnen sowie die ablaufenden Reaktionen werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

2.2.3.1 Gewebefixierung durch intrakardiale Perfusion mit Paraformaldehyd

Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA, $(\text{CH}_2\text{O})_n$, Polyoxymethylen) bedeutet die Unterbrechung komplexer Stoffwechselprozesse und die Verhinderung postmortaler Zerfallserscheinungen. So soll mit der Fixierung der augenblickliche Zustand und die Struktur des Gewebes möglichst naturgetreu festgehalten werden. Dabei reagieren die Aminogruppen der Proteine mit den Aldehydgruppen und es kommt zur Quervernetzung der Proteine. Die biologische Aktivität der Proteine und somit deren antigene Eigenschaften bleiben erhalten (von Bohlen und Halbach, 1999).

Das Protokoll der intrakardialen PFA-Perfusion weicht in nur wenigen Arbeitsschritten und verwendeten Lösungen von der ACSF-Perfusion (2.2.2.1)

ab: Zur terminalen Narkotisierung der Tiere wurde 100 µl Natrium-Pentobarbital (5-Ethyl-5-(1-methylbutyl)-barbitursäure; $C_{11}H_{18}N_2O_3$; Eutha®77, Essex Tierarznei, München, D) intraperitoneal injiziert. Pentobarbital ist ein direkter Agonist am $GABA_A$ -Rezeptor, einem ligandengesteuerten Chloridkanal. Die linksventrikuläre Perfusion mit der Fixierungslösung (4 °C) erfolgte unter gleichmäßigen Druck (45 bis 60 ml/min) mit einer über eine Saugflasche verbundenen Schlauchpumpe (Ismatec, Zürich, Schweiz). Die Fixierungslösung war nicht älter als 14 Tage (PFA oxidiert bei längerer Aufbewahrung und durch Sonnenlicht zu Ameisensäure (H-COOH)). Die Zeitdauer der Perfusion betrug 4 min (8 min bei Färbungen des Frontalhirns zur Verminderung der störenden Erythrozyten und besserer Darstellung gefärbter Terminale). Bei einer guten Gewebsfixierung sollte es innerhalb der ersten Minute zu einer deutlichen Gelbfärbung (Pikrinsäurezusatz) und Versteifung der Kopfes und der oberen Extremitäten des Tieres kommen. Das präparierte Gehirn wurde über Nacht bei 4 °C (hemmt die Autolyse der unfixierten Anteile, setzt aber auch die Diffusionsgeschwindigkeit der Fixierlösung herab) in der Fixierungslösung postfixiert und dann in einer Natriumazid (NaN_3 , verhindert die Pilz- und Bakterienbildung im fixierten Gewebe) haltigen Aufbewahrungslösung bei 4 °C gelagert.

2.2.3.2 Antikörperreaktion und ABC / DAB-Färbung

Mittels eines Mikrotoms (Leica VT 1000 S, Leica, Nussloch, D) wurden im 4 °C kalten PBS-Bad koronale Hirnschnitte angefertigt. Die Schnittdicke betrug in Abhängigkeit des durchgeführten Experiments 50 µm oder 100 µm (Schnittgeschwindigkeit: Stufe 4; Frequenz: 8). Damit stets eine korrekte anatomische Rekonstruktion gewährleistet werden konnte, wurden die Schnitte in mehreren nummerierten Rollrand-Schnappdeckelgläschen in PBS gesammelt. Nach 3x 10 min Waschen in PBS wurden die Schnitte eine Stunde in Blocklösung zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen inkubiert. Nach dem Blockieren und einmaligen Waschen in PBS (5 min) begann die Inkubation mit dem primären Antikörper (AK) verdünnt in Carrierlösung über Nacht bei

Raumtemperatur auf einem Schüttler. Generell wurden alle Inkubations- und Waschvorgänge zur besseren Penetration auf einem Schüttler (Rocky 3D, Fröbel, Lindau, D) durchgeführt. Die jeweiligen Konzentrationen der eingesetzten Primär-AK sind Tab. 1 zu entnehmen. Das in der Carrierlösung verwendete Triton X-100 (Polyethylenglycol-tert-octylphenylether, 4-(C₈H₁₇)C₆H₄(OCH₂CH₂)_nOH, n ~ 10) dient als Detergenz und führt zu einer erhöhten Membranpermeabilität. Am folgenden Tag wurden die Hirnschnitte mehrfach gründlich in PBS gewaschen (3× 10 min), bevor die Inkubation mit dem sekundären AK (verdünnt in Carrierlösung; siehe Tab. 2) begann. Die Inkubationszeit betrug 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Der verwendete sekundäre AK war am C-terminalen Ende mit dem Vitamin Biotin konjugiert, welches als Anbindungsstelle für das tetramere Avidin der nun folgenden ABC-Reaktion fungierte. Vor der ABC-Reaktion wurden die Gehirnschnitte erneut intensiv mit PBS gewaschen (3× 10 min). Dann wurde zunächst eine Stammlösung mit den Reaktionskomponenten A (Avidin) und B (Meerrettichperoxidase konjugiert mit Biotin) in PBS (1:1000) dreißig Minuten vor Beginn der ABC-Reaktion hergestellt (Vectastain® ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA), wodurch es zur Bildung eines Avidin-Biotin Komplexes (ABC) kommt. In einer sechzig minütigen Inkubation der Hirnschnitte in der ABC-Stammlösung auf dem Schüttler, fand anschließend eine Kopplung der Peroxidase über das Avidin am biotinylierten Sekundär-AK statt. Dann wurden die Schnitte 2× 10 min in PBS und 1× 10 min in Tris-Puffer gewaschen. Für die Detektion des Antigens wurde die Nickel-intensivierte Diaminobenzidin- (DAB, C₁₂H₁₄N₄, 3,3',4,4'-Biphenyltetramine) Reaktion durchgeführt. Hierbei wird über ein durch die Meerrettichperoxidase katalysierten Oxidationsvorgang das primär farblose 3,3'-Diaminobenzidin in eine braune Form überführt, das lokal präzipitiert. Dazu wurden die Hirnschnitte in Abhängigkeit vom Antikörper für 1 bis 5 min in der DAB-Lösung inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Reaktion durch extensives Waschen mit Tris-Puffer beendet. Die Hirnschnitte wurden auf gelatinisierten Objektträgern (Super Frost®, 76x26 mm, Menzel-Gläser®, Braunschweig, D) aufgezogen und anschließend über Nacht unter dem Abzug

getrocknet. In einer aufsteigenden Alkoholreihe (50, 70, 90, 2× 100 % Ethanol, jeweils 10 min) wurden die Präparate dehydriert und anschließend 2× 10 min mit Xylol gespült. Da Xylol und lange Dehydrierungen in Alkohol die Beads zerstören, wurde bei injizierten Tieren ein alternatives Dehydrierungsprotokoll (50, 70, 90, 2× 100 % Ethanol, jeweils 5 min) durchgeführt. Die fertigen Schnitte wurden eingedeckelt (VectaMount®, Vector Laboratories, Burlingame, USA) und in Aufbewahrungskästen bei Raumtemperatur gelagert. Die Begutachtung und digitale Fotografie der Schnitte erfolgte an einem Olympus-Mikroskop (BX 61, Olympus, Hamburg, D) mit Hilfe der Neurolucida Software Version 6.0 (MFB-Bioscience, Magdeburg, D). Bei bestimmten immunhistochemischen Experimenten (werden im Ergebnisteil gesondert erwähnt) wurde ein modifiziertes DAB Protokoll verwendet, das zu sehr intensiven Färbungen führt. Dadurch können insbesondere Immunreaktivitäten terminaler Axone und dendritische Fortsätze Neurobiotin gefüllter Zellen besser dargestellt werden. In Abweichung von dem oben beschriebenen standardisierten DAB Protokoll wurde beim modifizierten Protokoll der ABC-Komplex in einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Weiterhin wurden die Komponenten der DAB-Lösung in einer 10-fach höheren Konzentration (siehe 2.1.3.2) angesetzt.

2.2.3.3 Immunfluoreszenz-Färbung

Im Gegensatz zur ABC / DAB-Färbung werden bei der Immunfluoreszenz-Färbung Sekundär-AK mit gekoppelten Fluoreszenz-Farbstoffen definierter Wellenlängen (Alexa Fluor®) verwendet, die mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie bzw. Konfokaler LSM-Mikroskopie sichtbar gemacht werden können. Das Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung weicht nur in wenigen Arbeitsschritten von einer ABC / DAB Färbung ab: Bei den Antikörperinkubationen wurden jeweils zwei Primär- bzw. Sekundärantikörper verwendet (Doppelimmunfluoreszenzfärbung, siehe Tab. 1 bzw. Tab. 2). Weiterhin müssen vier zehninütige Waschschrte nach beiden Antikörperinkubationen durchgeführt werden. Da keine Farbreaktion notwendig ist, können die Schnitte direkt aufgezogen, im wässrigen Medium (VectaShield R,

Vector Laboratories, Burlingame, USA) eingedeckelt, mit Nagellack versiegelt und bis zur mikroskopischen Auswertung bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt werden. Da Fluoreszenz-gefärbte Schnitte nur wenige Wochen gelagert werden können und es bei längerer Lagerung zu einer Zunahme der Autofluoreszenz kommt, erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Analyse stets wenige Tage nach der immunhistochemischen Aufarbeitung.

2.2.3.4 Nissl-Färbung

Zur Überprüfung der Selektivität der retrograden Tracingexperimente wurde eine Nissl-Fluoreszenz-Färbung (benannt nach Franz Nissl, 1860-1919) durchgeführt. Bei dieser histologischen Färbemethode kommt es, unabhängig vom Zelltyp, zu einer Färbung der Zellsomata. Ein basischer Farbstoff (z.B. Kresylviolett, Thionin oder Toluidinblau) bindet an basophile Verbindungen wie RNA oder DNA der Zellen. Dadurch werden sogenannte „Nissl-Schollen“ sichtbar, die dem rauen Endoplasmatischen Retikulum entsprechen.

Dazu wurden zunächst koronale Hirnschnitte des betreffenden Areals von 100 µm Dicke angefertigt und für 40 min in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Schnitte mit dem Nissl-Farbstoff (NeuroTrace® 500 / 525 *green fluorescent Nissl stain*, Molecular Probes, Eugene, USA) verdünnt mit PBS im Verhältnis 1:100. Nach einer Inkubationsdauer von 20 min wurden die Schnitte erneut für 2 Stunden mit PBS gewaschen. Abschließend wurden sie auf Objektträger aufgezogen, getrocknet, eingedeckelt (VectaShield®, Vector Laboratories, Burlingame, USA), mit Nagellack versiegelt und bis zur Auswertung bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die Analyse und digitale Fotografie der Schnitte erfolgte an einem Olympus-Mikroskop (BX 61, Olympus, Hamburg, D) mittels der Neurolucida® Software Version 6.0 (MFB-Bioscience, Magdeburg, D).

2.2.3.5 Histochemische Aufarbeitung neurobiotin-gefüllter Zellen

Hirnschnitte mit nach elektrophysiologischen Experimenten Neurobiotin gefüllten Zellen, wurden über Nacht in Fixierungslösung inkubiert (Immersionsfixierung) und anschließend bei 4 °C in der Aufbewahrungslösung gelagert. Entsprechend

Abschnitt 2.2.3.3 wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Da diese Hirnschnitte dicker waren (200 μm), wurde die Inkubationsdauer in der Blockierlösung verdoppelt (2 Stunden). Die gleichzeitige Durchführung einer TH-Immunfluoreszenzfärbung in Kombinationen mit einer Streptavidin-basierten Neurobiotin-Färbung ermöglicht die Verifizierung der dopaminergen Identität bei gleichzeitiger Darstellung der anatomischen Lokalisation im dopaminergen Mittelhirnsystem. Nach konfokaler Auswertung der Zellen wurde eine DAB Konvertierung der Hirnschnitte durchgeführt, wodurch die Schnitte nach Entwässerung dauerhaft gelagert werden können. Hierzu wurde der Nagellack des Deckgläschens vorsichtig mit etwas Aceton entfernt und die Schnitte mit einem Pinsel in PBS überführt und über Nacht auf dem Schüttler gewaschen. Nach weiteren 3×10 min Waschen in PBS wurde entsprechend Abschnitt 2.2.3.2 eine DAB Färbung nach dem modifizierten Protokoll durchgeführt. Eine Inkubation in der Blockierlösung und in Primär- und Sekundärantikörpern war nicht mehr notwendig. Zur besseren Penetration der Hirnschnitte in dem ABC-Komplex wurde die Inkubationsdauer verdoppelt (2 Stunden).

2.2.4 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Mittelhirnschnitte, bei denen eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt wurden, konnten mit Hilfe eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops (Zeiss LSM 510) analysiert werden. Abb. 17 zeigt den schematischen Aufbau eines konfokalen Mikroskops. Als Punktlichtquelle dient dabei ein starker Laser. Die korrekte Wellenlänge für die selektive Anregung eines Fluoreszenzfarbstoffs kann durch einen Eingangssperrfilter ausgewählt werden. Dieser dünne Strahl (grüner Pfeil) beleuchtet über einen dichromatischen Teilerspiegel durch das Objektiv das fluoreszenzmarkierte Präparat. Der dichromatische Teilerspiegel ist in diesem Fall ein optisches Element, das bis zu einer bestimmten Wellenlänge Licht reflektiert, jedoch Licht oberhalb dieser Grenze passieren lässt. Das fluoreszenzmarkierte Präparat emittiert nun längerwelliges Licht (roter Pfeil), das durch das Objektiv, den für diese Wellenlänge durchlässigen dichromatischen Teilerspiegel und den Ausgangssperrfilter (zur Selektion des emittierten

Wellenlängenbereichs) auf eine konfokale Lochblende (*pinhole*) fällt. Diese ist so angeordnet, dass sie nur Licht passieren lässt, welches Informationen aus der Brennebene des Objektivs trägt. Alles andere Licht mit unscharfer Information aus Ebenen unterhalb und oberhalb des Fokus wird durch die Lochblende abgeschnitten. Die Öffnung der Lochblende produziert dickere optische Schnitte und reduziert die Auflösung. Beim Verkleinern des Durchmessers der Lochblende nehmen optische Schnittdicke und Helligkeit ab. Das passierende Licht wird in einem Detektor (*photomultiplier*) nach seinem Intensitätswert digitalisiert und in einem Computer gespeichert. Um ein vollständiges Bild des Präparats zu erhalten, muss es Punkt für Punkt gescannt werden. Durch die Verwendung mehrerer monochromatischen Laser, die die Probe nacheinander scannen, können Kollokalisationsstudien durchgeführt werden. Die Bilder werden dann von einer Software einzeln und als Überlagerungsbild wiedergegeben. Überlagerungen der Fluoreszenzsignale verschiedener Wellenlänge (*cross-talk*) sind somit nahezu ausgeschlossen. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden angeregt mit einem Argon-Laser bei 488 nm in Kombination mit einem BP505-530 Emissionsfilter, mit einem Helium-Neon-Laser bei 546 nm (BP560-615 Emissionsfilter) und mit einem Helium-Neon-Laser bei 647 nm (BP659-713 Emissionsfilter). Die Bilder wurden in einer Auflösung von 1024 × 1024 Pixel mit einem Plan-Apochromat 63x/1,4 Öl-Immersionsobjektiv unter Verwendung der Zeiss LSM 510 Software (Version 3.2) aufgenommen.

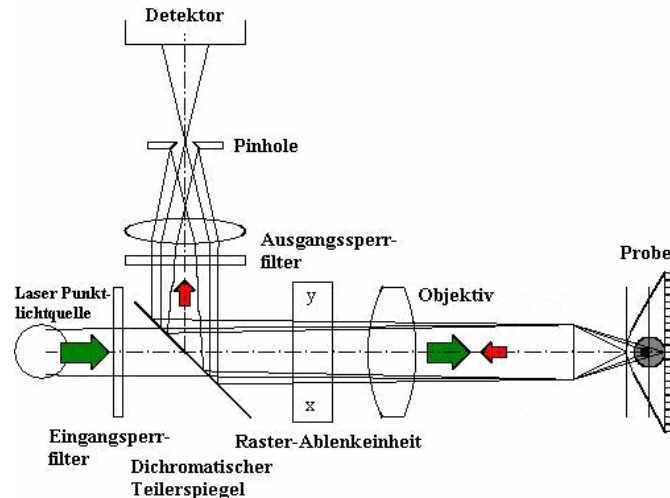


Abb. 17: Strahlengang eines konfokalen Mikroskops

Abgebildet ist der schematische Aufbau eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops. Grüner Pfeil: ein starker Laser wird zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs verwendet. Roter Pfeil: von der Probe emittiertes längerwelliges Licht, das über eine konfokale Lochblende (*pinhole*) auf einen Detektor trifft. Die Lochblende ist konfokal angeordnet, d.h. sie ist so angeordnet, dass sie nur Licht passieren lässt, welches Informationen aus der Brennebene des Objektivs trägt.

2.2.5 Semi-quantitative Analyse der GIRK2 Immunreaktivität

Bei der semi-quantitativen Analyse der GIRK2 Immunreaktivität wurden die Zellen mit identischen Einstellungen bestehend aus identischer Vergrößerung (63x/1,4 Öl-Immersionsobjektiv), elektronischer Nachverstärkung (*amplifier gain*: 1), Verstärker-offset (*amplifier offset*: 0), Laserleistung (45 %), Scanmodus (*frame*), Auflösung (1024 × 1024, 12 Bit), 2x Zoom und Scangeschwindigkeit (Stufe: 4, *pixel time*: 25,6 μs, *scan time*: 15,73s) gescannt. Die optische Schnittdicke für die Anregung des GIRK2 Immunsignals (bei 647 nm) betrug <2,8 μm (*pinhole*: 3,07 *airy units*, Stufe: 386). Die Photomultiplier-Hochspannung (*detector gain*) wurde vor jedem Experiment so gewählt, dass sowohl das GIRK2 Hintergrundsignal als auch das Zellsignal über den gesamten dynamischen Detektionsbereich (0-255) aufgelöst war und keine Über- bzw. Untersättigung eintrat. Diese Einstellung wurde im Verlauf des Experiments nicht geändert. Weiterhin wurden für die Immunfluoreszenzfärbungen nur Antikörper und Chemikalien derselben Charge verwendet.

Mit Hilfe von Adobe Photoshop® (Version 9.0, Adobe Systems, München, D) wurde der Zellkörper des markierten DA Neurons unter Ausschluss des Nukleus

in jedem Bild markiert. Die GIRK2 Signalintensitätsverteilung wurde nun gegen die absolute Frequenzhäufigkeit des Signals (Pixelhäufigkeit) der markierten Region dargestellt. Es resultierte ein Histogramm, das durch eine Gauss-Funktion ($y = a * e^{-b(x-m)^2}$ mit $a, b = \text{Konstanten}$; $m = \text{mean}$, Abszissenabschnitt im Maximum der Kurve) beschrieben wurde und dessen arithmetische Mittel (mean) die mittlere GIRK2 Signalintensität ergab. Weiterhin wurde zu jeder Zelle das jeweilige Hintergrundsignal der GIRK2 Immunreaktivität bestimmt. Diese wurde definiert als die mittlere GIRK2 Signalintensität im Nukleus der jeweiligen Zelle. Aus dem Verhältnis der mittleren Intensität des Neurons zu der des Hintergrunds konnte nun eine Aussage über die relative GIRK2 Immunreaktivität erfolgen. Durch die Normalisierung auf das Hintergrundsignal konnten somit auch verschiedene Experimente bzw. Tiere miteinander verglichen werden.

2.2.6 NeuroLucida®-basierte Rekonstruktion von Hirnschnitten und Bestimmung des Zelldurchmessers retrograd markierter Neurone

Die neuroanatomische Rekonstruktion der Injektionsstellen und Mittelhirnschnitte erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (BX 61, Olympus, Hamburg, D), das mit einem motorisierten LUDL® Mikroskoptisch (LUDL Electronic Products, New York, USA) und dem LUCIVID® Kamerasystem (MicroBrightfield, Magdeburg, D) ausgestattet war. Dabei wird über einen Spiegel die Oberfläche des Computerbildschirms in den Strahlengang des Mikroskops projiziert. Mit Hilfe der NeuroLucida® Software können so auf einem Computermonitor mikroskopische Objekte nachgezeichnet werden. Die Bewegung des Mikroskoptisches in der x- und y-Achse wird ebenfalls von der Software gesteuert. Die serielle Rekonstruktion der Mittelhirnschnitte erfolgte unter Verwendung eines 10x Objektivs. Nissl-gefärbte Injektionsstellen wurden unter 2-facher Vergrößerung rekonstruiert. Charakteristische neuroanatomische Landmarken wurden mit Hilfe des Maushirnatlas (Paxinos und Franklin, 2001) ermittelt. Die Verifizierung der DA Identität der retrograd markierten Zellen wurde unter 60-facher Vergrößerung durchgeführt. Für die Erstellung der Übersichtsbilder mehrerer Tierexperimente wurden die x-/y-Koordinaten der markierten Zellen bei der jeweiligen

Bregmaposition notiert und entsprechend in das Bild eingetragen. Die Ermittlung des Zelldurchmessers erfolgte ebenfalls mit Hilfe der Neurolucida® Software in 60-facher Vergrößerung. Die Bestimmung erfolgte an immunhistochemisch aufgearbeiteten koronalen Mittelhirnschnitten (50 µm, Standard DAB Färbung), wobei stets der längste Zelldurchmesser einer retrograd markierten TH-positiven Zelle bestimmt (Thompson et al., 2005).

2.2.7 Statistische Auswertungen

2.2.7.1 Bestimmung von Signifikanzen

Numerische Daten sind als arithmetisches Mittel \pm Standardfehler (*standard error of mean*; SEM) angegeben. Zur Bestimmung von signifikanten Unterschieden zwischen zwei oder mehreren Datenreihen wurde entweder der ungepaarte t-Test nach Student oder die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA, *one-way analysis of variance*) durchgeführt. Beim t-Test wird überprüft ob, sich zwei unabhängige Datenreihen signifikant unterscheiden. Voraussetzung für den Test sind annähernde Normalverteilung und hohe Varianzhomogenität. Beim ANOVA Test wird bei drei oder mehr unabhängigen Datengruppen überprüft, ob sich die einzelnen Gruppen signifikant unterscheiden. Bei einem Unterschied wurde in einem nachfolgenden *post-hoc* Test (Bonferroni) überprüft, welche Gruppen sich unterscheiden. Signifikanzangaben in den Abbildungen beziehen sich dabei immer, bzw. sofern nicht anderes gekennzeichnet, auf den Vergleich mit der mesokortikalen Gruppe. Das jeweilige Signifikanzniveau ist in den Abbildungen mit * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$ gekennzeichnet. Die Berechnung der Zufallsvariablen p wurde automatisch als Funktion des Programms GraphPad (Version 5.0, GraphPad Software, San Diego, USA) durchgeführt.

2.2.7.2 Hierarchische Clusteranalyse

Die Clusteranalyse wurde mit Hilfe des Programms SPSS (Version 11.0, SPSS, München, D) durchgeführt. Sie ist ein multivariates Analyseverfahren bei dem

versucht wird unter Einbeziehung bestimmter Parameter (Variablen, hier: elektrophysiologische Daten) homogene Teilmengen (Cluster bzw. Gruppen) in einer insgesamt heterogenen Gesamtheit zu erkennen. Die Elemente verschiedener Cluster sollen möglichst unähnlich sein, während gleiche Cluster eine hohe Homogenität aufweisen. Durch die Bildung von Gruppen können die Daten strukturiert und mittels zusätzlicher Verfahren (Diskriminanzanalyse) weitergehend analysiert werden.

Die Ähnlichkeit von Objekten wird bei metrisch skalierten Variablen als Distanzmaß berechnet und basiert auf der Minkowski-Metrik (Bortz, 1995):

$$d_{k,l} = \left[\sum_{j=1}^J |x_{kj} - x_{lj}|^r \right]^{\frac{1}{r}}$$

mit $d_{k,l}$: Distanz der Objekte k und l

x_{kj}, x_{lj} : Wert der Variablen bei Objekt k, l ($j=1, 2, \dots, J$)

$r \geq 1$: Minkowski-Konstante

Die hierarchische Clusteranalyse ist ein agglomeratives Verfahren (d.h. es werden bestehende Gruppen zusammengefasst; Gegenteil: divisiv, d.h. es wird eine große Gruppe in mehrere kleine aufgeteilt). Im ersten Schritt einer Clusteranalyse werden für alle möglichen Objektpaare die Distanzwerte berechnet und in einer Distanzmatrix dargestellt. Daher werden im zweiten Schritt die zwei Objekte mit der kleinsten Distanz zu einem Cluster verschmolzen. In weiteren Schritten werden dann je nach Distanz dem Cluster ein weiteres Objekt hinzugefügt oder zwei Objekte zu einem neuen Cluster vereinigt und solange fusioniert bis nur noch ein Cluster vorhanden ist. So entsteht eine Hierarchie der Clusterbildung abhängig vom Distanzmaß der Objekte.

Bei der hierarchischen Clusteranalyse nach Ward werden diejenigen Cluster fusioniert, mit deren Zusammenschluss die geringste Erhöhung eines bestimmten Heterogenitätsmaß einhergeht. Als Heterogenitätsmaß wird die Fehlerquadratsumme (Varianzkriterium) verwendet. Sie ist wie folgt definiert:

$$V_c = \sum_{i \in C} \sum_{k=1}^K (x_{ik} - \bar{x}_{kc})^2$$

mit c = Bezeichnung für ein Cluster bzw. Gruppe von Objekten ($c=1, \dots, C$)
 i = Bezeichnung für Objekte ($i=1, \dots, I$)
 k = Bezeichnung für Variablen ($k=1, \dots, K$)
 $x_{i,k}$ = Wert der Variable k bei Objekt i
 $\bar{x}_{k,c}$ = Mittelwert der Variable k bei allen Objekten von Cluster c .

Im Vergleich zu anderen agglomerativen Clusterverfahren (Single-Linkage, Complete-Linkage, Average-Linkage, Centroid und Median) hat sich gezeigt, dass die Ward Methode in den meisten Fällen richtige Partionen findet und die Elemente richtig den Gruppen zuordnet. "Das Ward Verfahren kann somit als ein sehr guter Fusionsalgorithmus angesehen werden" (Backhaus et al., 1996; Seite 298).

In sogenannten Dendrogrammen kann die schrittweise Vereinigung der Objekte bzw. Cluster nachvollzogen werden. Dabei werden homogene Objekte/Cluster auf einem niedrigen Niveau (kleiner Distanzkoeffizient bzw. Fehlerquadratsumme) und heterogene Cluster auf einem höheren Niveau (großer Distanzkoeffizient bzw. Fehlerquadratsumme) zusammengeschlossen. Die Clusterzahl, ein Maß für eine sinnvolle Gruppeneinteilung, lässt sich an der Stelle erkennen, an der die Distanzkoeffizienten bzw. Fehlerquadratsummen sprunghaft ansteigen (*Elbow*-Kriterium) (Bortz, 1995; Wiedenbeck und Züll, 2001; Koop und Lois, 2006/2007).

2.2.7.3 Diskriminanzanalyse

Im Gegensatz zur Clusteranalyse werden bei der Diskriminanzanalyse keine Gruppen gebildet, sondern man geht von einer vorhandenen Gruppierung aus und überprüft die Qualität dieser Gruppierung, z.B. im Anschluss an eine Clusteranalyse. Weiterhin ist es möglich zu prüfen, inwieweit die einzelnen Variablen am Zustandekommen eines Gesamtunterschieds beteiligt sind.

Bei der Diskriminanzanalyse wird eine neue Achse y (Diskriminanzfunktion) gebildet. Die Koeffizienten dieser Funktion werden dabei so gebildet, dass sich die Gruppen möglichst maximal unterscheiden. Die Streuung der Verteilung in den Gruppen soll möglichst klein sein.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_nx_n$$

mit x_1 bis x_n : Werte der Variablen

b_1 bis b_n , Konstante b_0 : von der Analyse abzuschätzende Koeffizienten

Gütemaße für die Diskriminanzfunktion sind:

- Eigenwert: $\gamma = \text{Maximalwert des Diskriminanzkriteriums} = \frac{SS_b}{SS_w}$

mit SS_b : Erklärte Streuung (Streuung zwischen den Gruppen)

SS_w : Nicht erklärte Streuung (Streuung in den Gruppen)

- Kanonische Korrelationskoeffizient: $c = \gamma/(1+\gamma)$
- Wilk's Lambda: $\lambda = 1/(1+\gamma)$

Hohe Eigenwerte zeigen gute Diskriminanzfunktionen an. Je kleiner Wilk's Lambda und je größer der kanonische Korrelationskoeffizient (maximal 1) desto besser ist die Trennung der Gruppen. Die Diskriminanzanalyse wurde ebenfalls mit SPSS Version 11.0 durchgeführt.

3 Ergebnisse

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung DA Subpopulationen, die definierte Hirnareale innervieren. Folgende mesokortikale und mesosubkortikale Projektionen wurden untersucht:

- präfrontaler Kortex (PFC)
 - prälimbischer Kortex (PRL) und infralimbischer Kortex (IL)
 - cingulärer Kortex (Cg1, Cg2)
- Nucleus Accumbens (NAc)
 - Nucleus Accumbens core (AcbC)
 - Nucleus Accumbens shell (lateral Anteil) (AcbSh)
- Amygdala (basolateraler Anteil, BLA)
- dorsolaterales Striatum (CPu)

3.1 Immunzytochemische Charakterisierung dopaminerge Projektionsareale

3.1.1 Expression der Markerproteine TH und DAT in DA Projektionsarealen

Klassische Markerproteine für den Nachweis DA Hirnstrukturen sind die Tyrosinhydroxylase (TH)¹, das Schlüsselenzym der Katecholaminsynthese und der Dopamintransporter (DAT), ein Protein für die synapto-somatische Wiederaufnahme von Dopamin. Abbildung 18 und 19 zeigen koronale Hirnschnitte (100 µm) im Bereich des PFC (Bregma: +1,94 mm), dorso-ventralen Striatums (Bregma: +1,10 mm) und der BLA (Bregma: -1,82 mm) nach TH (links) bzw. DAT (rechts) Immunhistochemie. Im PFC sind vor allem in dessen medialen Anteil (prälimbischer und infralimbischer Kortex) TH-positive Fasern zu sehen. Dieser Bereich zeigt jedoch nur eine sehr schwache DAT Immunreaktivität. Dagegen ist der core des NAc sowohl durch eine starke TH als auch DAT Proteinexpression gekennzeichnet.

¹ generell für katecholaminerge Strukturen; im Mittelhirn spezifisch für Dopamin; siehe Kapitel 3.1.2

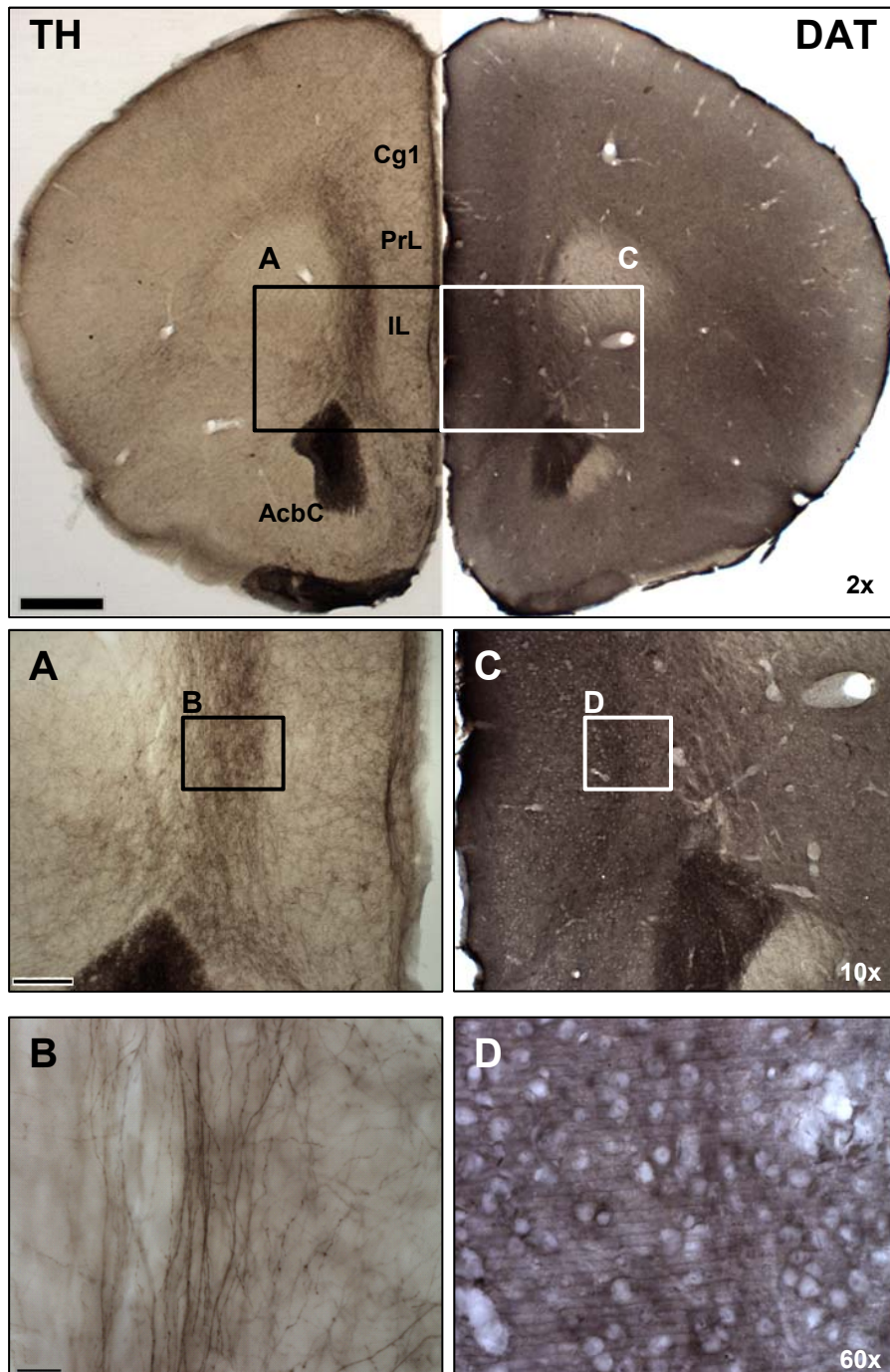


Abb. 18: TH und DAT Immunreaktivität im PFC

Dargestellt ist ein koronaler Hirnschnitt im Bereich des PFC (Bregma: +1,94 mm) nach TH (links) bzw. DAT (rechts, Verdünnung: 1:2000) Immunhistochemie (DAB-Methode, modifiziertes Protokoll) (Balken: 0,5 mm). A,C: Vergrößerter Ausschnitt (10x) des infralimbischen Kortex (Balken: 200 µm). B,D: 60-fache Vergrößerung des markierten Ausschnitts in (A) und (C) (Balken: 20 µm). Bregma-Angaben und neuroanatomische Nomenklatur nach Paxinos und Franklin, 2001.

Im Bereich des Striatums erkennt man eine deutliche TH und DAT Faserfärbung im dorsalen (CPu) und ventralen Striatum (core (AcbC) und shell (medial und lateral) des NAc. Die DAT Immunreaktivität erscheint im medialen shell und core des NAc etwas schwächer zu sein im Vergleich zum lateralen shell und dorsalen Striatum. Der cinguläre Kortex (Cg1, Cg2), sowie Bereiche des Septums (LSI) weisen nur eine sehr schwache TH und DAT Immunreaktivität auf (Abb. 19, oben). Eine TH Immunreaktivität zeigt auch die BLA. Dagegen konnte keine DAT Färbung in dieser Region gefunden werden. DAT und TH Immunfärbungen im caudalen Striatum (CPu), dorsal der BLA, sowie im lateralen Hypothalamus (LH) sind vergleichsweise deutlich zu erkennen. Dopaminerge Neurone in der Region des LH (A11 bis A14) gehören zum sogenannten Tubero-infundibulären Dopaminsystem und sind an der inhibitorischen Regulation der Prolactinsekretion beteiligt. Eigenschaften dieses Systems waren nicht Gegenstand dieser Arbeit und werden daher nicht näher erläutert. Weiterhin sind TH-Immunfärbungen im piriformen Kortex (Pir) und in hippocampalen Hirnstrukturen (CA1, CA2, CA3, Gyrus dentatus) erkennbar. Die letztgenannten Hirnareale weisen jedoch keine bzw. nur eine sehr schwache DAT Immunreaktivität auf (Abb. 19, unten).

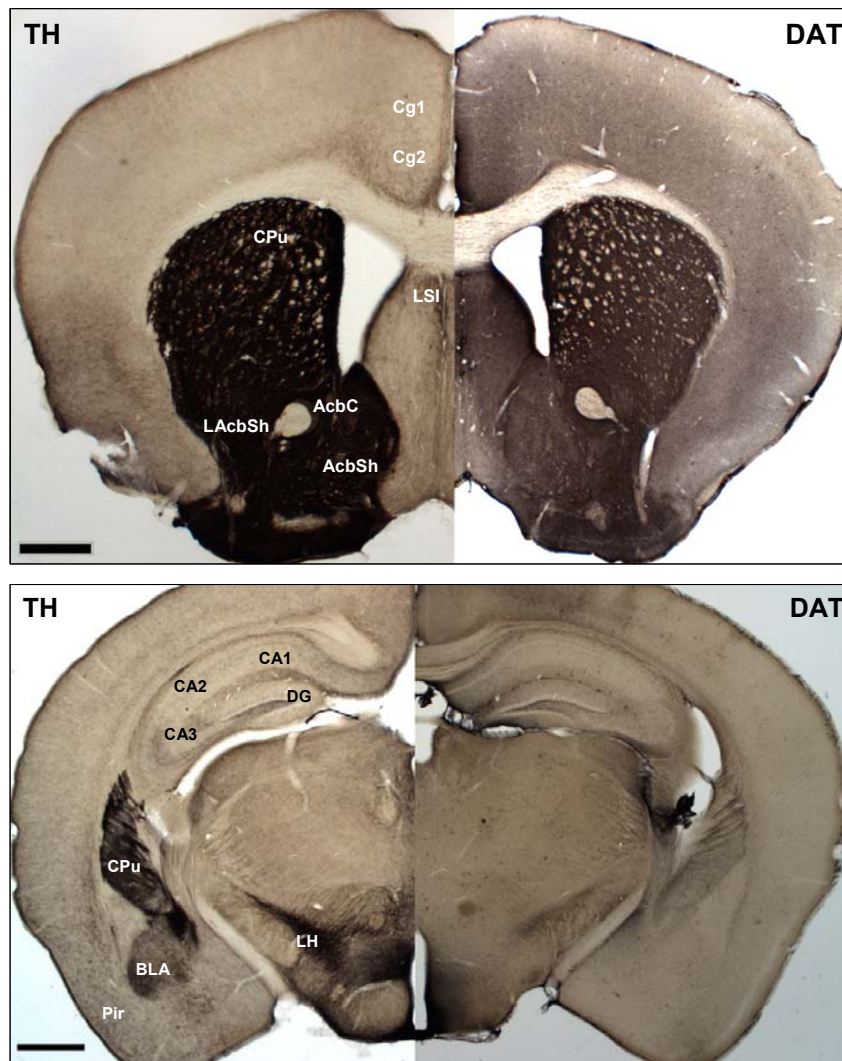


Abb. 19: TH und DAT Immunreaktivität in striatalen, hippocampalen, cingulären und amygdalären Hirnstrukturen

Abgebildet sind koronale Hirnschnitte nach TH (links) und DAT (rechts, Verdünnung: 1:2000) DAB Immunhistochemie (2x Vergrößerung, modifiziertes DAB Protokoll). Oben (Bregma: +1,10 mm): im Bereich des dorsalen Striatums (CPu), NAc core (AcbC) und shell (AcbSh), Septums (LSI) und cingulären Kortex (Cg1, Cg2). Unten (Bregma: -1,82 mm): Hippocampus (CA1, CA2, CA3, DG), basolaterale Amygdala (BLA), lateraler Hypothalamus (LH), caudales Striatum (CPu) und piriformer Kortex (Balken für alle Abbildungen: 0,5 mm). Bregma Angaben und neuroanatomische Nomenklatur nach Paxinos und Franklin, 2001.

3.1.2 Identifikation mesencephaler Projektionen durch Tracing der VTA

Im Gegensatz zu immunzytochemischen Färbungen mit einem gegen die Tyrosinhydroxylase (TH) gerichteten Antikörper im Mittelhirn, in dem nur dopaminerge Strukturen vorhanden sind (die Dopamin- β -Hydroxylase ist im Mittelhirn nicht nachweisbar), werden in anderen Hirnarealen auch zusätzlich adrenerge und noradrenerge Fasern gefärbt. Beispielsweise kann man nach

retrogradem Tracing des PFC markierte Zellen im Locus coeruleus, einem noradrenergen Kern im Hirnstamm, identifizieren (Daten nicht gezeigt). Dies spricht für eine noradrenerge Innervation des PFC. Zur weiteren Differenzierung mesencephaler Projektionen wurde ein sogenanntes anterogrades Tracing durchgeführt. Dabei wurde der anterograde Tracerfarbstoff PHA-L in die ventromediale VTA injiziert. Im allgemeinen wird bei Verwendung des Tracers PHA-L eine iontophoretische Applikation durchgeführt. Vorteil dieser Methode ist eine selektive, räumlich sehr eng begrenzte Applikation des Tracers. Da zunächst ein generelles Vorkommen mesencephaler VTA Projektionen in den Zielregionen untersucht werden sollte, wurde eine Druckapplikation durchgeführt. Der Nachteil hierbei ist die äußerst geringe Selektivität aufgrund der starken Verteilung des Tracers. Selbst Applikation von sehr geringen Volumina des Tracers (20 bzw. 40 nl) führten zu einer Anfärbung großer Bereiche des Mittelhirns. Auch Verdünnung von PHA-L mit *aqua ad injectabilia* (1:2, 20 nl) führten nur zu einer ungenügenden Selektivität (Daten nicht gezeigt). Dennoch konnte bei Injektion äußerst geringer Volumina (ungefähr 5 bis 10 nl PHA-L) eine hinreichende Selektivität und somit eine hohe Anzahl terminaler Fasern in den verschiedenen Projektionsarealen erreicht werden. Abbildung 20 zeigt das Injektionsgebiet im intermediären ventralen Mittelhirn im Bereich der VTA. Das PHA-L markierte Areal wurde auf dem koronalen Hirnschnitt (50 µm) nach einer immunhistochemischen Aufarbeitung mit einem primären Antikörper gegen PHA-L und anschließender Immunperoxidase-DAB Färbung nachgewiesen (modifiziertes DAB Protokoll).

Injektionsstelle: VTA

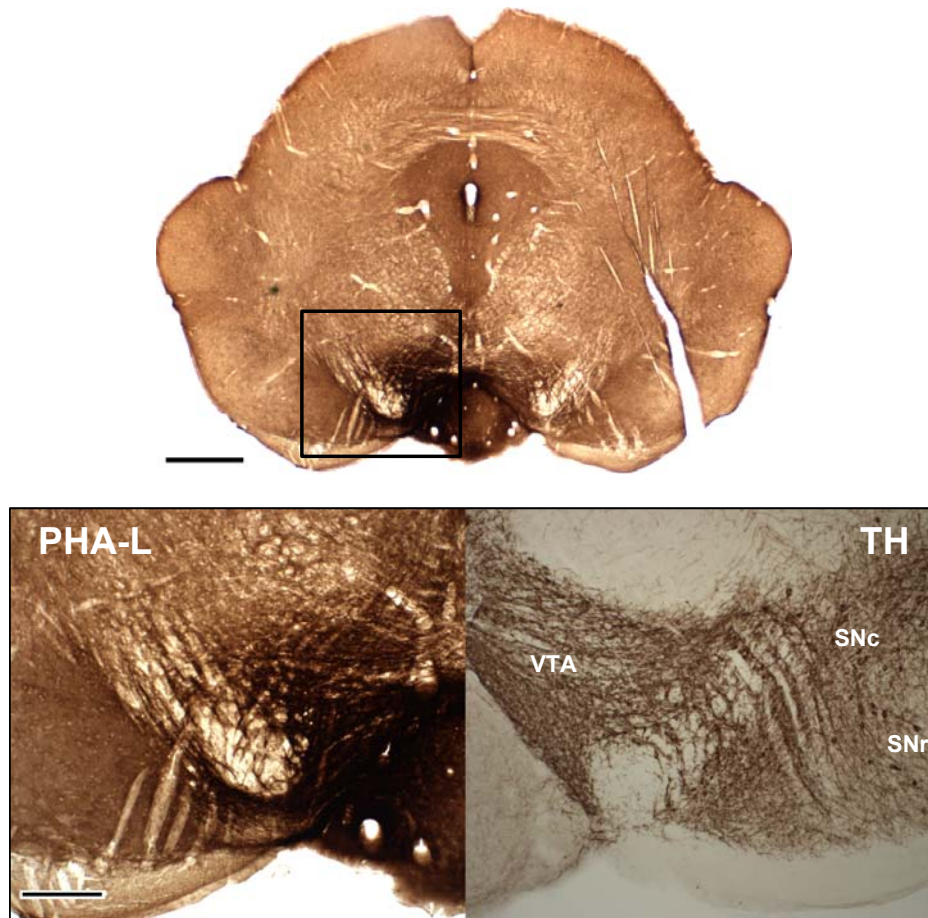


Abb. 20: Anterogrades Tracing der VTA mit PHA-L

Die Abbildung zeigt die Injektionsstelle des anterograden Tracer PHA-L im Bereich des intermediären ventralen Mittelhirns nach DAB Immunfärbung (modifiziertes Protokoll) mit einem gegen PHA-L gerichteten Antikörper in 2-facher Vergrößerung (oben; Balken: 0,5 mm). Der vergrößerte Ausschnitt (10-fache Vergrößerung) zeigt, dass das Injektionsareal den gesamten Bereich der VTA umfasst und in der SN nur marginale Färbungen zu erkennen sind (unten, links; Balken: 200 μ m). Zum Vergleich: Ausschnitt eines koronalen Mittelhirnschnitt nach TH Immunfärbung (unten, rechts, Standard DAB Protokoll).

Nach immunzytochemischer Aufarbeitung diencephaler und telencephaler Hirnschnitte (50 μ m) wurden PHA-L gefärbte Fasern in den Hauptprojektionsgebieten mesencephaler Neurone gefunden. Abbildung 21 zeigt PHA-L gefärbte Terminale im Bereich des NAc (core- und shell Region), sowie des medialen PFC. Im Vergleich zum NAc konnte im PFC nur eine geringere Anzahl PHA-L gefärbter Fasern beobachtet werden. Diese waren hauptsächlich im prälimbischen und infralimbischen Kortex lokalisiert und konnten erst nach

einer Überlebenszeit von 14 Tagen nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu kam es im NAc bereits nach einer Überlebenszeit von einem Tag zu einer hohen Dichte gefärbter Fasern. Unterschiede zwischen der core und shell Region des NAc wurden nicht beobachtet. Da die Injektion des anterograden Tracers primär in die VTA erfolgte, und Bereiche der SN pars compacta nur marginal getroffen wurden, konnte entsprechend im dorsalen Striatum nur eine sehr geringe Anzahl gefärbter Fasern nachgewiesen werden. Weiterhin konnten Terminale im cingulären Kortex (v.a. in dessen ventraler Region, Cg2) und im lateralen Septum (LSI) gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

Der Nachweis PHA-L gefärbter Terminale erlaubt zwar bei dem hier gewählten Injektionsort eine Aussage über deren Ursprung im Mesencephalon, definiert jedoch nicht den neurochemischen Phänotyp der jeweiligen Nervenfasern oder Axone. Es ist bekannt, dass beispielsweise mesencephale GABAerge Neurone in den PFC projizieren (Carr und Sesack, 2000). Weiterhin wird eine glutamaterge Innervation des PFC diskutiert (Lavin et al., 2005). Da in zukünftigen Studien insbesondere der Phänotyp der nicht-dopaminergen mesokortikalen Neurone charakterisiert werden soll, wurden Doppelfluoreszenzfärbungen koronaler Hirnschnitte (50 µm) des PFC angefertigt. Die Abbildung 22 wurde mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen und zeigt PHA-L (weiß, 488 nm) und TH (grün, 546 nm) gefärbte Terminale im infralimbischen Kortex bei 63-facher Vergrößerung. Beim Übereinanderlegen der Fluoreszenzsignale im rechten Bild, wird die Existenz von sowohl TH-positiven (PHA-L- und TH-immunpositiv, oben) als auch TH-negativen (PHA-L-immunpositiv, TH-immunnegativ; unten) Terminalen im PFC veranschaulicht. Auffällig war eine deutlich höhere Anzahl TH-negativer, PHA-L-immunpositiver Fasern im Vergleich zu TH-positiven, PHA-L-immunpositiven Fasern.

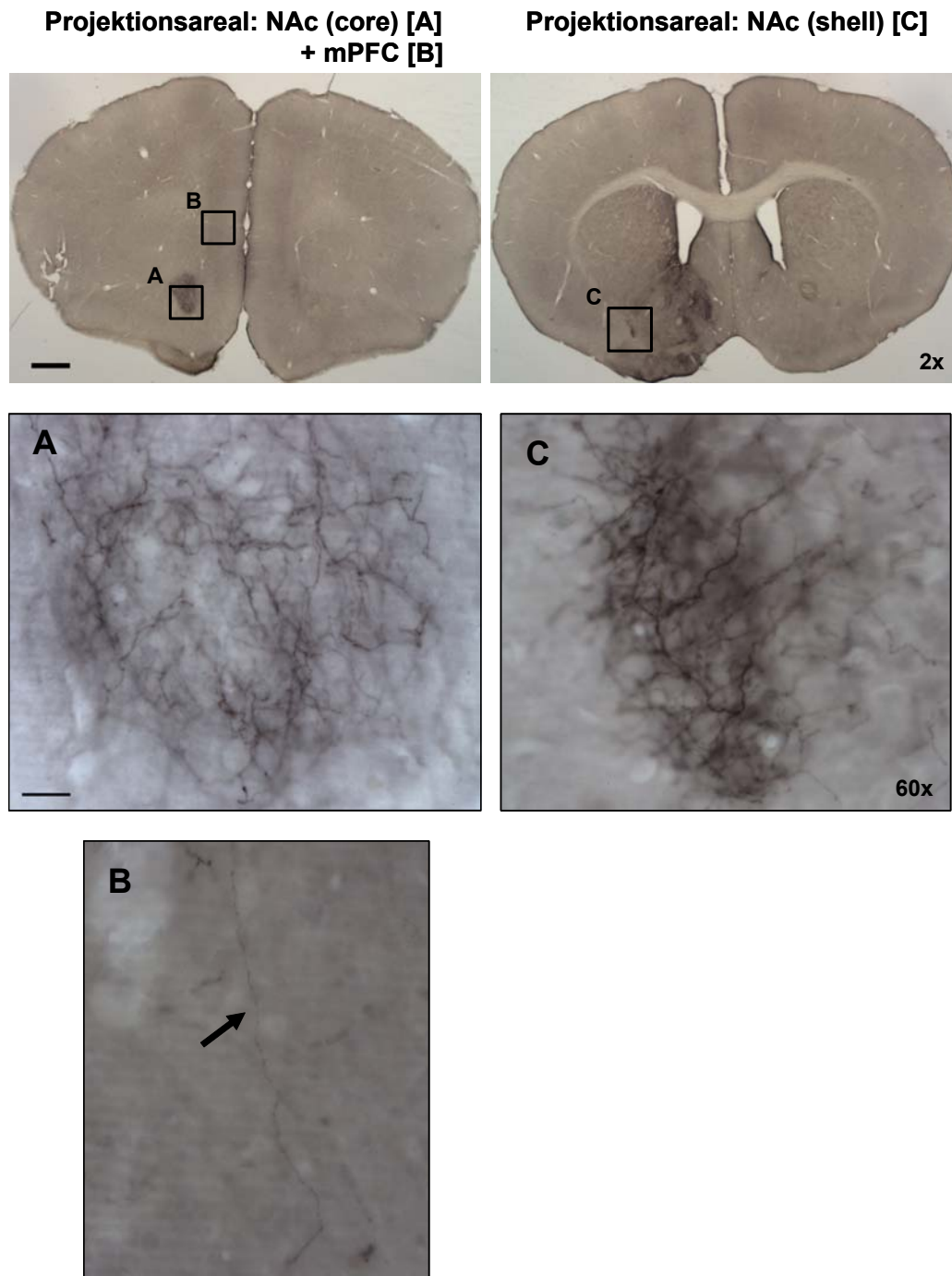


Abb. 21: Korticale (PFC) und subkortikale (NAc) Hirnregionen nach anterogradem Tracing der VTA mit PHA-L

Dargestellt sind PHA-L gefärbte koronale Hirnschnitte im Bereich des mPFC und Striatums nach DAB Immunhistochemie (modifiziertes Protokoll) in 2-facher Vergrößerung (oben; Balken: 0.5 mm) sowie in 60-facher Vergrößerung: PHA-L gefärbte Terminale im NAc core (A), im prälimbischen und infralimbischen Kortex (B, Pfeilspitze) und im NAc shell (C) (Balken: 20 μ m).

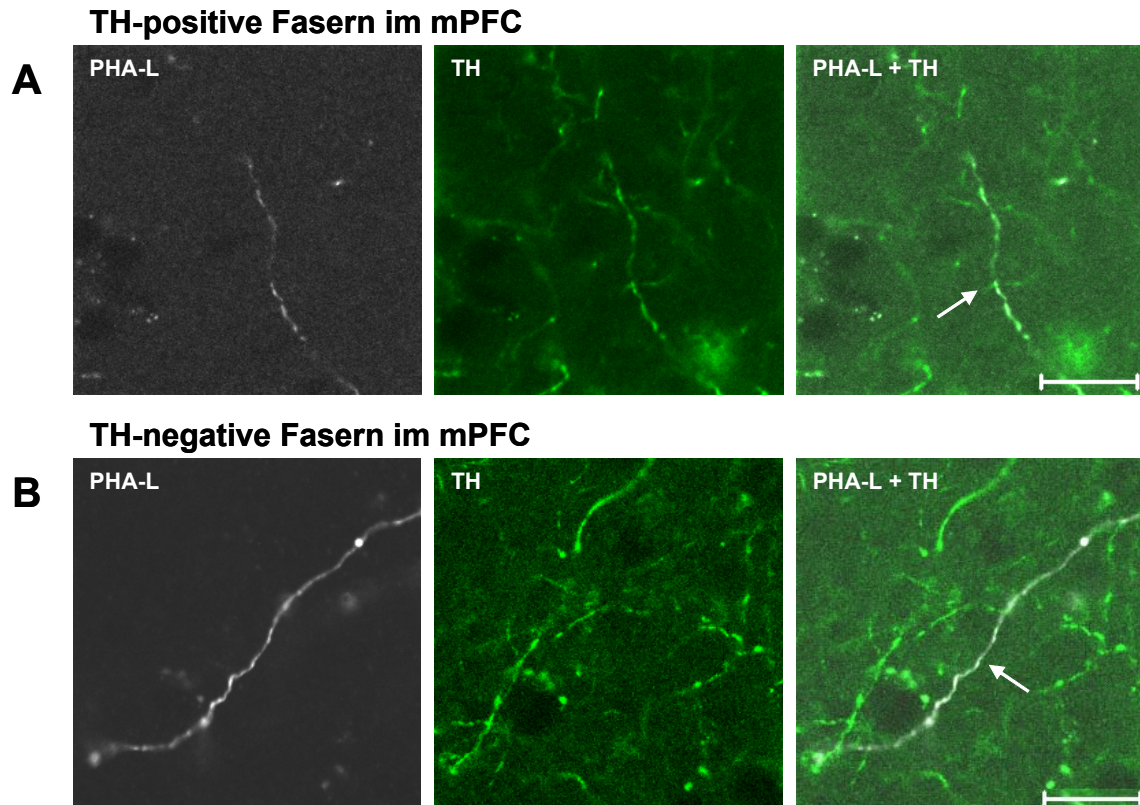


Abb. 22: Nachweis mesencephaler TH-positiver und TH-negativer Terminale im mPFC

Die Abbildung zeigt konfokal mikroskopische Aufnahmen nach Doppelfluoreszenzfärbungen mit PHA-L (weiß, 488 nm) und TH (grün, 546 nm) Antikörpern in 63-facher Vergrößerung. [A] PHA-L-positive und TH-positive Terminale im mPFC nach anterogradem Tracing der VTA (Pfeilspitze). [B] PHA-L-positive, jedoch TH-negative Terminale im mPFC (Pfeilspitze) (Balken: 20 μ m).

Zusammenfassend kann man somit festhalten, dass die Projektionsareale dopaminergere Mittelhirnneurone durch unterschiedliche TH und DAT Immunreaktivität gekennzeichnet sind. Klassische Projektionsareale DA Neurone, wie das dorsale und ventrale Striatum (NAc), besitzen ausgeprägte Faserfärbungen. Innervationsgebiete, wie der mPFC oder die BLA zeigen schwächere Immunreaktivitäten. Mittels anterogradem Tracing der VTA konnte eine Innervation des mPFC und NAc aus dem Mittelhirn nachgewiesen werden. Exemplarisch konnte gezeigt werden, dass sowohl dopaminerge (TH-positive), als auch nicht-dopaminerge (TH-negative) mesencephale Neurone, deren

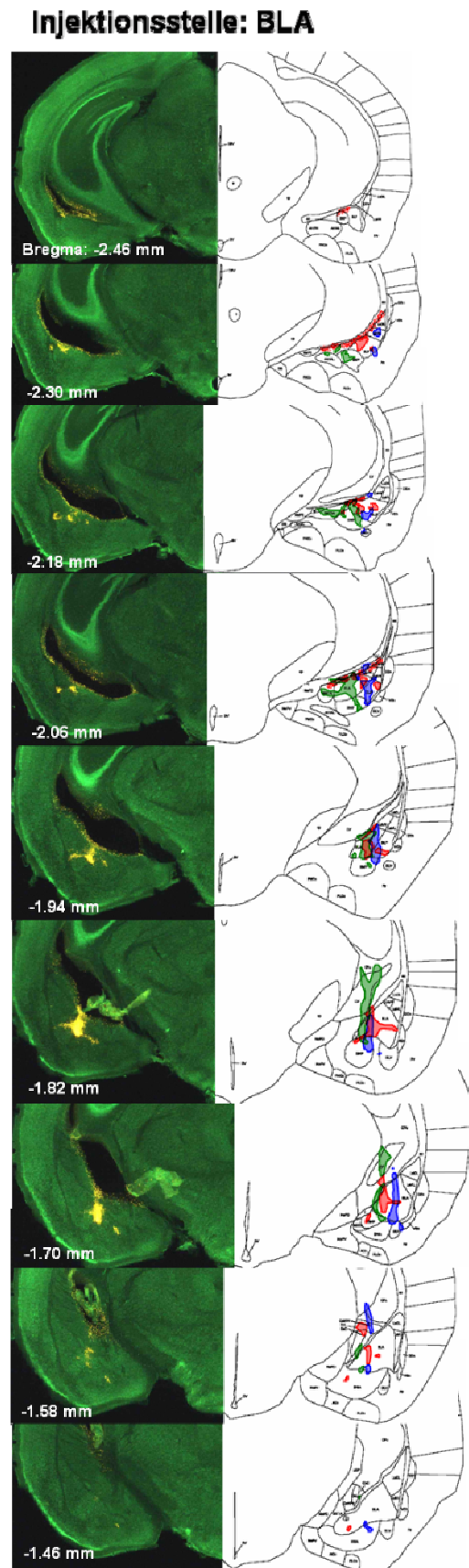
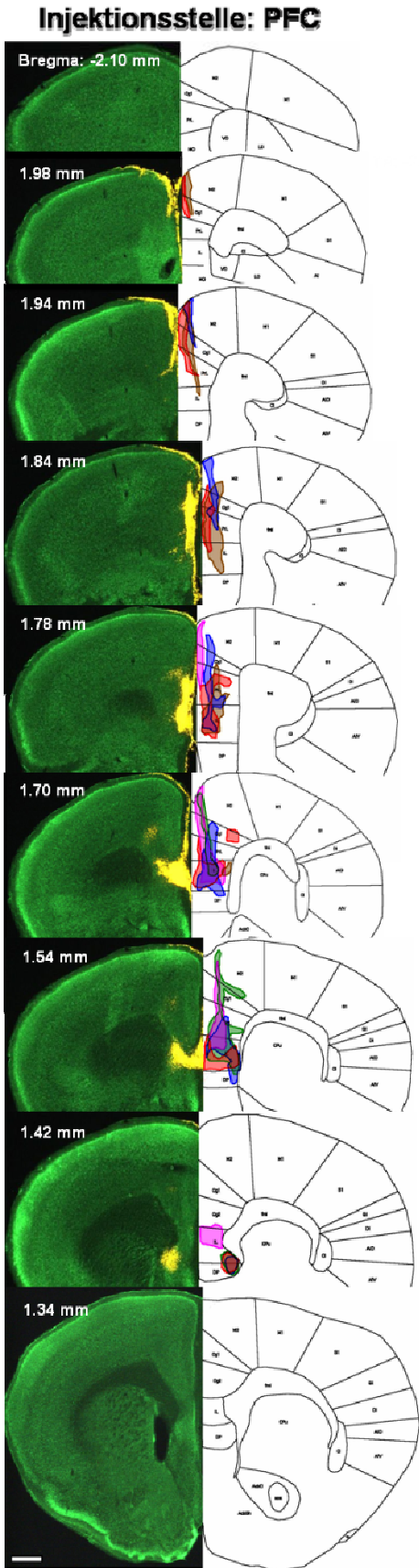
neurochemischer Phänotyp bislang unbekannt ist, den medialen PFC innervieren.

3.2 Neuroanatomische Charakterisierung dopaminerger Projektionssysteme

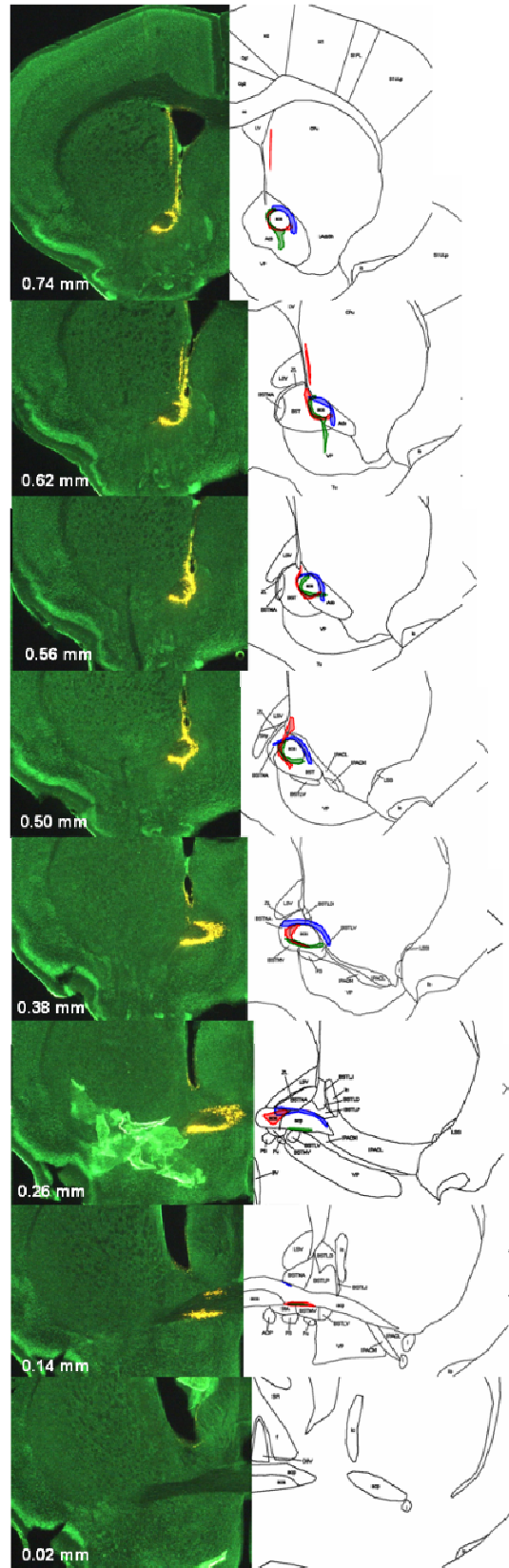
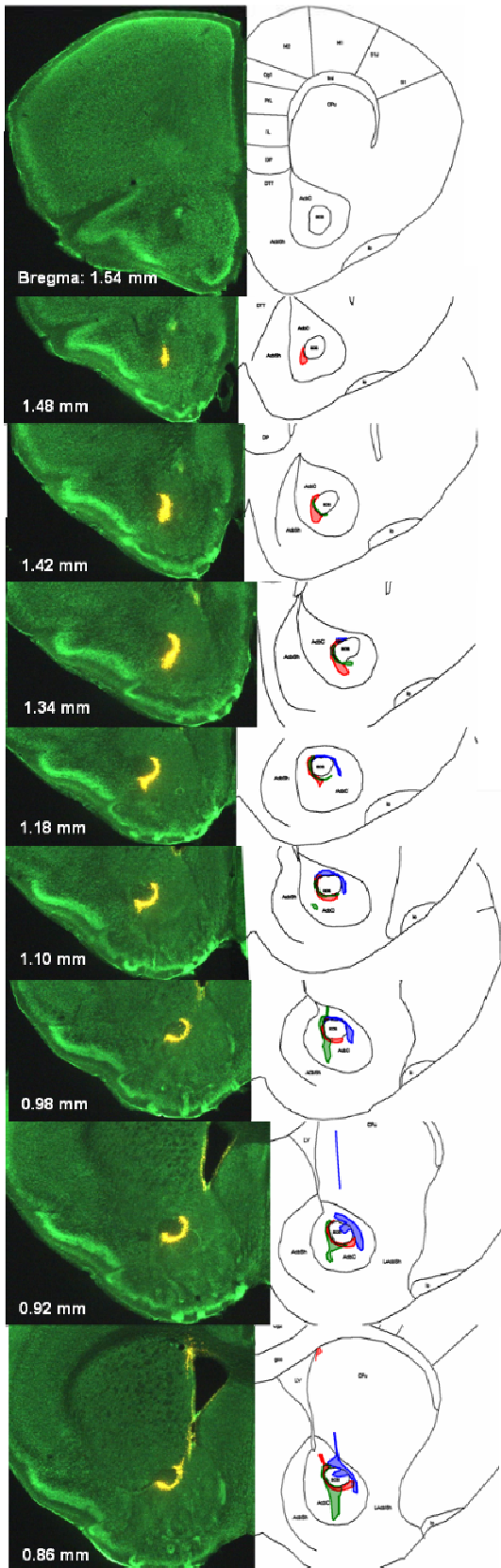
3.2.1 Neuroanatomische Rekonstruktion der Injektionsareale

Die hohe Selektivität bei den Tracingexperimente ist eine wichtige Voraussetzung für die spezifische Analyse der DA Subpopulationen. Kontaminationen der Tracersubstanz in dem geplanten Injektionsort benachbarter Hirnareale führen bezüglich des Injektionsortes zu zusätzlich falsch positiv markierten Neuronen. Um die Spezifität des retrograden Tracings direkt zu demonstrieren wurden die Injektionsareale der Tiere, die für die topographische Darstellung der dopaminergen Systeme im Mittelhirn (siehe Kapitel 3.2.2) verwendet wurden, anhand serieller Schnittserien neuroanatomisch rekonstruiert. Hierzu wurden die Injektionsstellen im Anschluss an eine grüne Nissl Färbung, unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops (488 nm) und 2-facher Vergrößerung, mit Hilfe der Neurolucida® Software rekonstruiert (siehe Kapitel 2.2.3.4 und 2.2.6). Für alle folgenden immunzytochemischen und elektrophysiologischen Experimente wurden nur Tiere verwendet, bei denen die Selektivität der Injektionen durch Analyse serieller Schnittserien nachgewiesen werden konnte. Abbildung 23 zeigt die Injektionsareale der DA Projektionssysteme, die in dieser Arbeit untersucht worden sind. In der linken Hälfte ist jeweils ein fluoreszenzmikroskopisches Foto der Injektionsstelle nach Nissl Färbung exemplarisch für ein Tier abgebildet. Durch Überlagerung mit der Grünfluoreszenz der Nisslfärbung zeigen sich die eigentlich roten Fluoreszenzbeads hier in gelb. Rechts sieht man die seriellen Rekonstruktionen nach Übereinanderlegung der Injektionsstellen für alle injizierten Tiere. Dies waren bei Injektionen in den PFC n=5 Tiere (verwendete Farben bei der Rekonstruktion: rot, braun, blau, violett, grün). Bei Injektionen in die BLA, NAc (core), NAc (shell) jeweils n=3 Tiere (Farbcode: rot, blau, grün) und für das dorsale Striatum n=1 Tier (Farbcode: rot). Hinsichtlich der Selektivität sieht man,

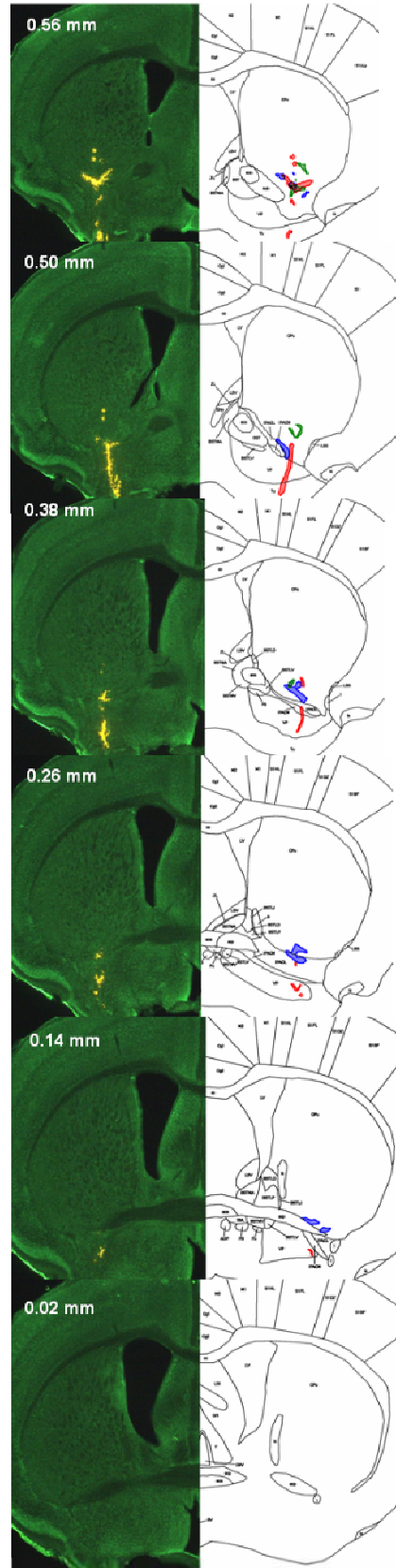
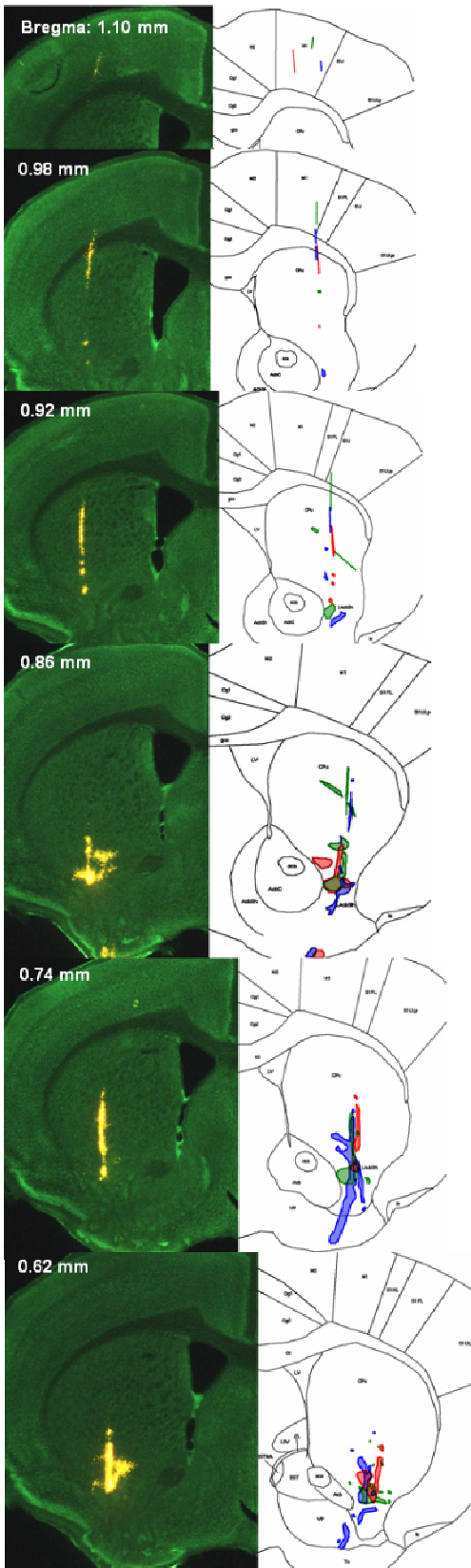
dass bei Injektionen in den mPFC primär prälimbische (PRL) und infralimbische (IL) Bereiche getroffen wurden. Weniger starke Markierungen sind im cingulären Kortex (Cg1) und im sekundären motorischen Kortex (M2) zu sehen. Ein weiteres Subareal des mPFC, der sogenannte mediale orbitale Kortex (MO), wurde nicht getroffen. Bei Injektionen in die Amygdala wurde primär die anteriore basolaterale Amygdala (BLA) getroffen. Sekundär waren die posteriore basolaterale Amygdala (BLP) und posteriore basomediale Amygdala (BMP) markiert. Weiterhin waren Markierungen im intraamygdalären Bed Nucleus der Stria terminalis (BSTIA), Striatum (CPu) und im lateralen Ventrikel (LV) zu berücksichtigen. Beim Tracing der core Region des NAc wurde auch primär diese Region getroffen (AcbC). Weiterhin gab es minimale Spuren der Beads im dorsalen Striatum (CPu) und im Bed Nucleus der Stria terminalis (BST). Bei Injektionen in die shell Region des NAc wurde dessen lateraler Bereich (LAcbSh) getroffen. Markierungen waren ebenfalls im dorsalen Striatum (CPu) und ventralen Pallidum (VP) zu sehen. Selektive Markierungen des medialen Anteils der shell Region blieben aufgrund starker Kontaminationen im core des NAc bislang erfolglos. Beim Tracing des dorsolateralen Striatums (CPu) wurden keine benachbarten Gebiete markiert. Leichte Kontaminationen waren nur im primären motorischen Kortex (M1) zu beobachten.



Injektionsstelle: NAc (core)



Injektionsstelle: NAc (shell)



Injektionsstelle: dorsales Striatum

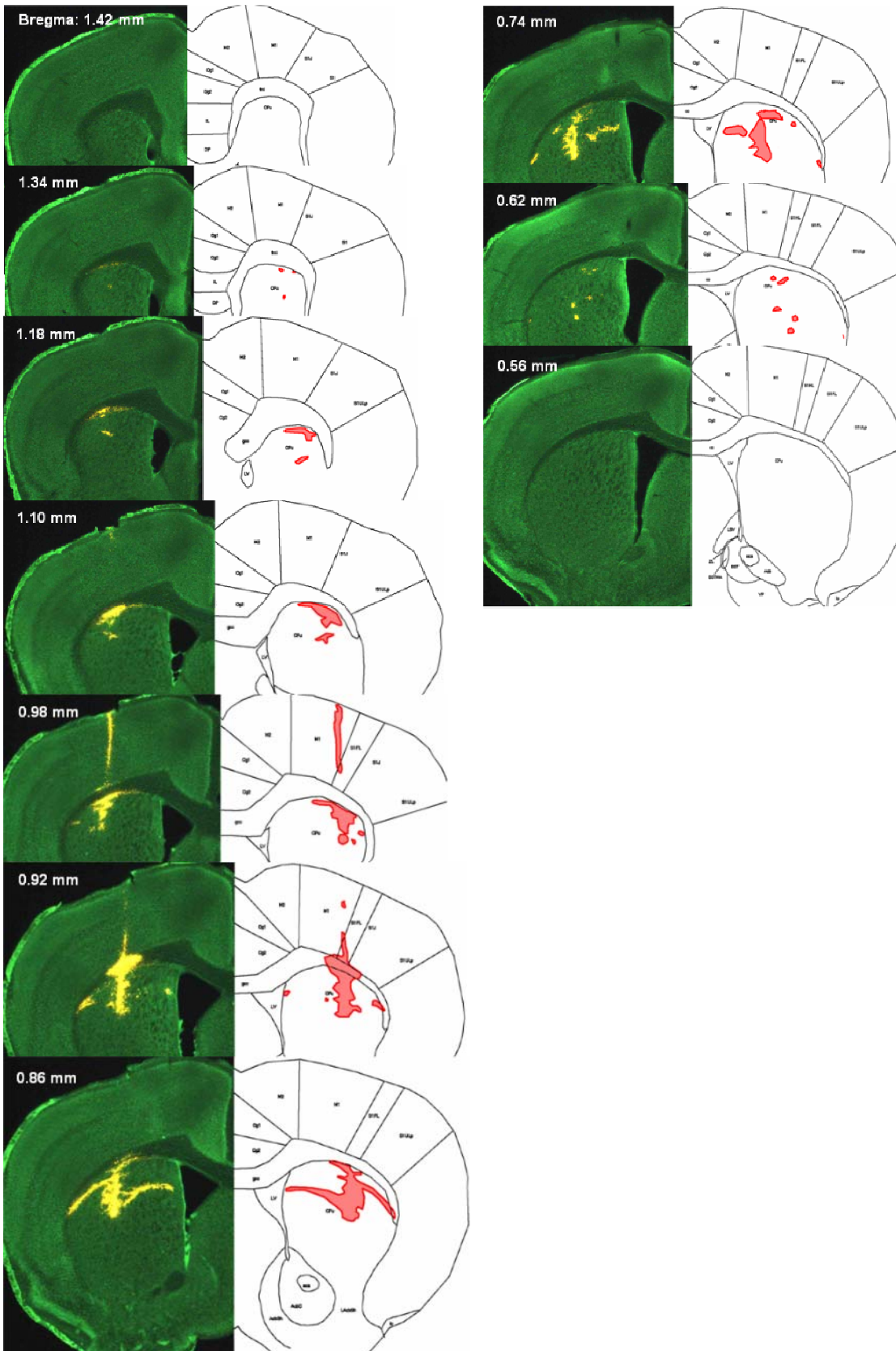


Abb. 23: Serielle, neuroanatomische Rekonstruktion der Injektionsstellen

Dargestellt sind die seriellen Rekonstruktionen für Injektions der Tracersubstanz (Beads) in den mPFC (n=5 Tiere), BLA (n=3), NAc core (n=3), NAc shell (n=3), und dorsales Striatum (n=1). Linke Hälfte: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (2x Objektiv, 488 nm) nach Nissl-Färbung der Injektionsstelle exemplarisch für ein Tier. Rechte Hälfte: Neurolucida®-basierte Rekonstruktion für die Gesamtheit der injizierten Tiere. Die rote Farbe entspricht hierbei der Injektionsstelle in der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme. Bregma-Angaben und neuroanatomische Nomenklatur nach Paxinos und Franklin, 2001 (Balken: 0,5 mm).

3.2.2 Topographie der DA Subpopulationen im Mittelhirn

Durch retrogrades neuronales Tracing wurden die Zellsomata im Mittelhirn durch die fluoreszierenden Beads markiert. Um einen Überblick über die Lokalisation der jeweilig markierten DA Subpopulationen zu erhalten, wurden entsprechende neuroanatomische Verteilungskarten des Mittelhirns, der in Kapitel 3.2.1 *in vivo* markierten Tiere, angefertigt. Hierzu wurden koronale Mittelhirnschnitte (50 µm) in einer DAB-Immunperoxidase Reaktion (Standard DAB Protokoll, siehe Kapitel 2.2.3.2) unter Verwendung eines Antikörpers, der gegen die Tyrosinhydroxylase (TH) gerichtet war, prozessiert. Die Mittelhirnschnitte wurden mit Hilfe der Neurolucida®-Software von caudal nach rostral (Bregma -4,04 mm bis -2,69 mm; nach Paxinos und Franklin, 2001) seriell rekonstruiert (10x Objektiv). Bei einer Schnittdicke von 50 µm entspricht dies 27 Schnitte pro Tier (PFC n=5 Tiere; BLA, NAc core, NAc shell jeweils n=3 Tiere; dorsales Striatum n=1 Tier; siehe Kapitel 3.2.1) und einer Gesamtdicke von 1,35 mm. Nach Überprüfung der DA Identität (60x Objektiv) wurden nur TH-positive und zugleich durch Beads markierten Zellen in den Karten erfasst. Abbildungen 24 (A) und 25 (A, B) zeigen die Positionen der dopaminergen Subpopulationen im intermediären (Bregma -3,49 mm), caudalen (Bregma -3,04 mm) und rostralen (Bregma -3,94 mm) Mittelhirn für die Gesamtmenge der rekonstruierten Tiere.

Mesokortikale DA Neurone konnte man am häufigsten im intermediären (73,5 % 215/293 TH+ Zellen; Bregma -3,69 bis -3,14 mm) und caudalen (24,8 % 73/293 TH+ Zellen; Bregma -4,04 bis -3,74 mm), jedoch nur sehr selten im rostralen Mittelhirn (1,7 % 5/293 TH+ Zellen; Bregma -3,09 bis -2,69 mm) auffinden. Sie waren hauptsächlich in der medialen VTA lokalisiert (99 %) und kaum in der SN (1 %).

Generell werden vier Subnuklei der VTA (A10) unterschieden: der Nucleus Paranigralis (PN) und Nucleus Interfascicularis (IF), die im intermediären Mittelhirn lokalisiert sind, sowie der Nucleus Parabrachialis Pigmentosus (PBP), der sich über das intermediäre und rostrale Mittelhirn erstreckt, und die Nuklei linearis rostralis und centralis (RLi, CLi), die hauptsächlich im caudalen (RLi auch im intermediären) Mittelhirn zu finden sind. Bezüglich des RLi und CLi existiert keine einheitliche anatomische Bezeichnung für DA Neurone im caudo-medialen Mittelhirn (zum Vergleich DA Neurone in der Area Retrorubralis (RRA) im caudo-lateralen Mittelhirn werden nach Dahlstrom und Fuxe (1964) als A8 bezeichnet). In der vorliegenden Arbeit werden der RLi und CLi als eine einheitliche Subregion der VTA betrachtet und aufgrund der geringen Größe des CLi im folgenden nur noch als RLi bezeichnet.

Hinsichtlich dieser Subnuklei waren mesokortikale DA Neurone präferentiell im PN (43,1 %), PBP (31,1 %), sowie RLi (24,8 %), jedoch selten im IF (1 %) lokalisiert. 8,3 % der durch retrogrades Tracing markierten Zellen hatten ihre Zellkörper auf der kontralateralen Seite des Mittelhirns. Der Zelldurchmesser der mesokortikalen DA Neuronen schwankte um einen Mittelwert von $17,5 \pm 0,4 \mu\text{m}$ ($n=118$) (Abb. 24c, 26, 27 und Tab. 8) (Bestimmung des Zelldurchmessers siehe 2.2.6).

Mesoamygdaläre DA Neurone waren hauptsächlich im intermediären (57,1 % 120/210 TH+ Zellen) aber auch im caudalen Mittelhirn (25,3 % 53/210 TH+ Zellen) aufzufinden. Relativ selten waren sie im rostralen Mittelhirn lokalisiert (17,3 % 37/210 TH+ Zellen). Ebenso wie mesokortikale DA Neurone, befanden sich mesoamygdaläre DA Neurone in der medialen VTA (81,4 %) und nur wenige Zellen konnten in der SN (18,6 %) nachgewiesen werden. Auch die Verteilung innerhalb der VTA (PN: 28,1 %; PBP: 38 %; RLi: 12,7%; IF: 2,9 %) und der Prozentsatz der kontralateral lokalisierten Zellen (8,2 %) war vergleichbar zu den mesokortikalen DA Neuronen. Der durchschnittliche Zelldurchmesser betrug $17,8 \pm 0,7 \mu\text{m}$ ($n= 48$) und unterscheidet sich nicht signifikant von den mesokortikalen Zellen ($p > 0,05$; ANOVA) (Abb. 24c, 26, 27 und Tab. 8).

Mesolimbische DA Neurone, die die core Region des NAc innervieren, waren primär im intermediären (67,5% 424/629 TH+ Zellen), aber auch häufig im rostralen Mittelhirn (23,7 % 149/629 TH+ Zellen) aufzufinden. Selten dagegen im caudalen Mittelhirn (8,8 % 56/629 TH+ Zellen). 69 % dieser Zellen waren in der VTA (hauptsächlich im medialen Bereich) lokalisiert und zu 31 % in der SN. Bei Analyse der VTA Subnuklei ergab sich eine den mesokortikalen und mesoamygdalären DA Neuronen vergleichbare Verteilung (PN: 33,4 %; PBP: 47,7 %), jedoch mit häufiger Wahrscheinlichkeit im IF (6,2 %) und eher geringer im RLi (12,7 %). 3,7 % dieser Zellen waren kontralateral lokalisiert und der mittlere Zelldurchmesser betrug $18,0 \pm 0,5 \mu\text{m}$ (n=59) (kein signifikanter Unterschied zu mesokortikalen DA Neurone $p > 0,05$; ANOVA).

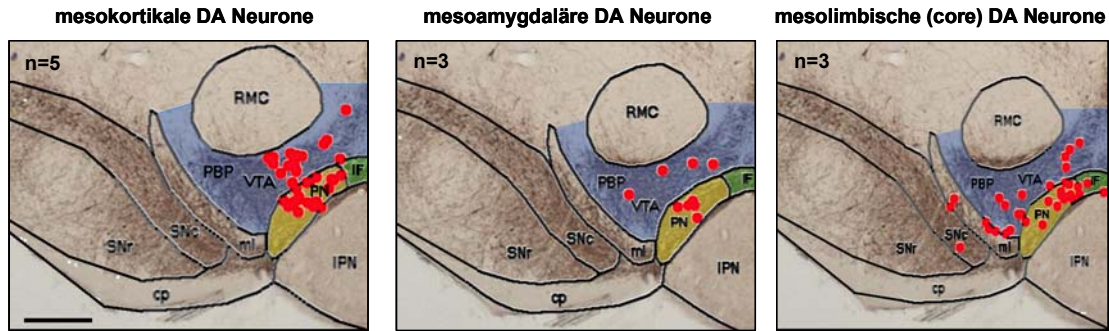
Mesolimbische DA Neurone, die den shell des NAc innervieren, waren bezüglich der Verteilung im Mittelhirn regional weniger beschränkt (intermediäres Mittelhirn: 53,4 % 661/1239 TH+ Zellen; rostrales Mittelhirn: 33 % 408/1239 TH+ Zellen; caudales Mittelhirn: 13,6 % 170/1239 TH+ Zellen). 37,6 % dieser Zellen konnten in der VTA nachgewiesen werden, wobei sie primär in dessen lateralen Anteil lokalisiert waren. 50,8 % der Zellen befanden sich in der SN und auch in der Area retrorubralis (A8) konnten 11,6 % TH-positive Zellen gefunden werden. Weiterhin unterschied sich die Verteilung innerhalb der Subnuklei stark von den bereits beschriebenen Subpopulationen. 96,5 % der Zellen waren im PBP lokalisiert, 2,4 % im PN, 1,1 % im RLi und gar nicht im IF (0 %). Nur 0,4 % dieser Zellen waren kontralateral aufzufinden und auch der mittlere Zelldurchmesser ($21,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$) unterschied sich signifikant von den mesokortikalen DA Neuronen ($p < 0,001$; ANOVA) (Abb. 24c, 26, 27 und Tab. 8).

Mesostriatale DA Neurone waren bezüglich ihrer regionalen Verteilung im Mittelhirn sehr ähnlich zu den mesolimbischen shell DA Neuronen (intermediäres Mittelhirn: 56 % 296/528 TH+ Zellen; rostrales Mittelhirn: 29,6 % 156/528 TH+ Zellen; caudales Mittelhirn: 14,4 % 76/528 Zellen). Jedoch waren sie nahezu vollständig in der SN (93,2 %) und in der Area Retrorubralis (4,2 %) und nur sehr selten in der VTA (2,6 %) lokalisiert. Diese Zellen befanden sich dann ausschließlich im PBP (100 %). Es konnten keine kontralateralen Zellen (0 %)

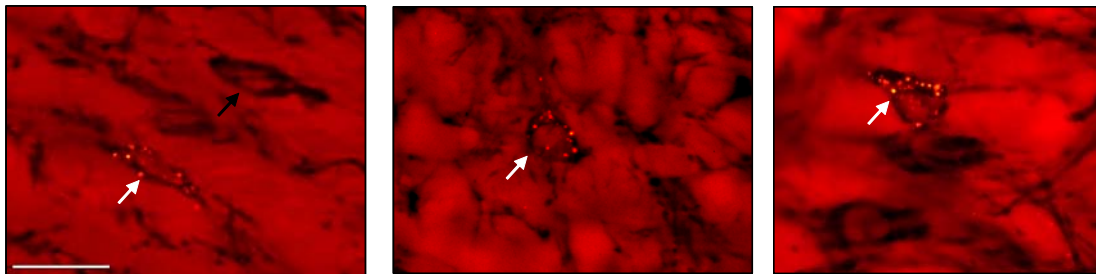
gefunden werden und der mittlere Zelldurchmesser lag um $24,0 \pm 0,7 \mu\text{m}$ und unterschied sich signifikant von den mesokortikalen DA Neuronen ($p < 0,001$; ANOVA) (Abb. 24c, 26, 27 und Tab. 8).

Zusammenfassend kann man somit festhalten, dass mesokortikale, mesoamygdaläre und mesolimbische core DA Neurone hauptsächlich in der medialen VTA im intermediären Mittelhirn lokalisiert waren. Sie zeigten eine vergleichbare Verteilung innerhalb der VTA Subnuklei und unterschieden sich bezüglich ihrer Zellgröße nicht signifikant. Dagegen waren mesolimbische shell und mesostriatale DA Neurone präferentiell in der lateralen VTA, SN und in A8 lokalisiert. Diese Zellen waren wesentlich größer und unterschieden sich signifikant von den mesokortikalen DA Neuronen.

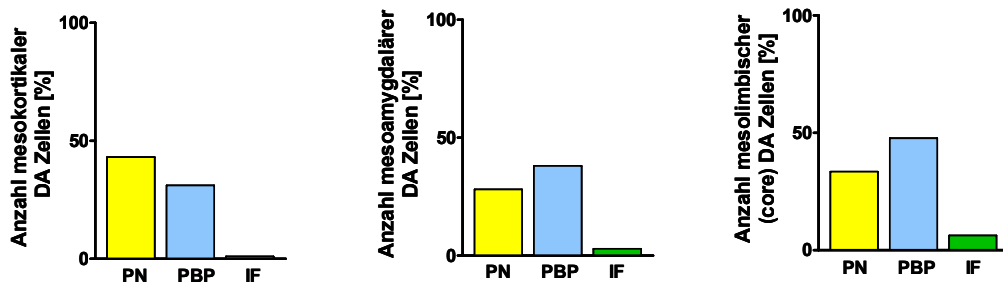
A



B



C



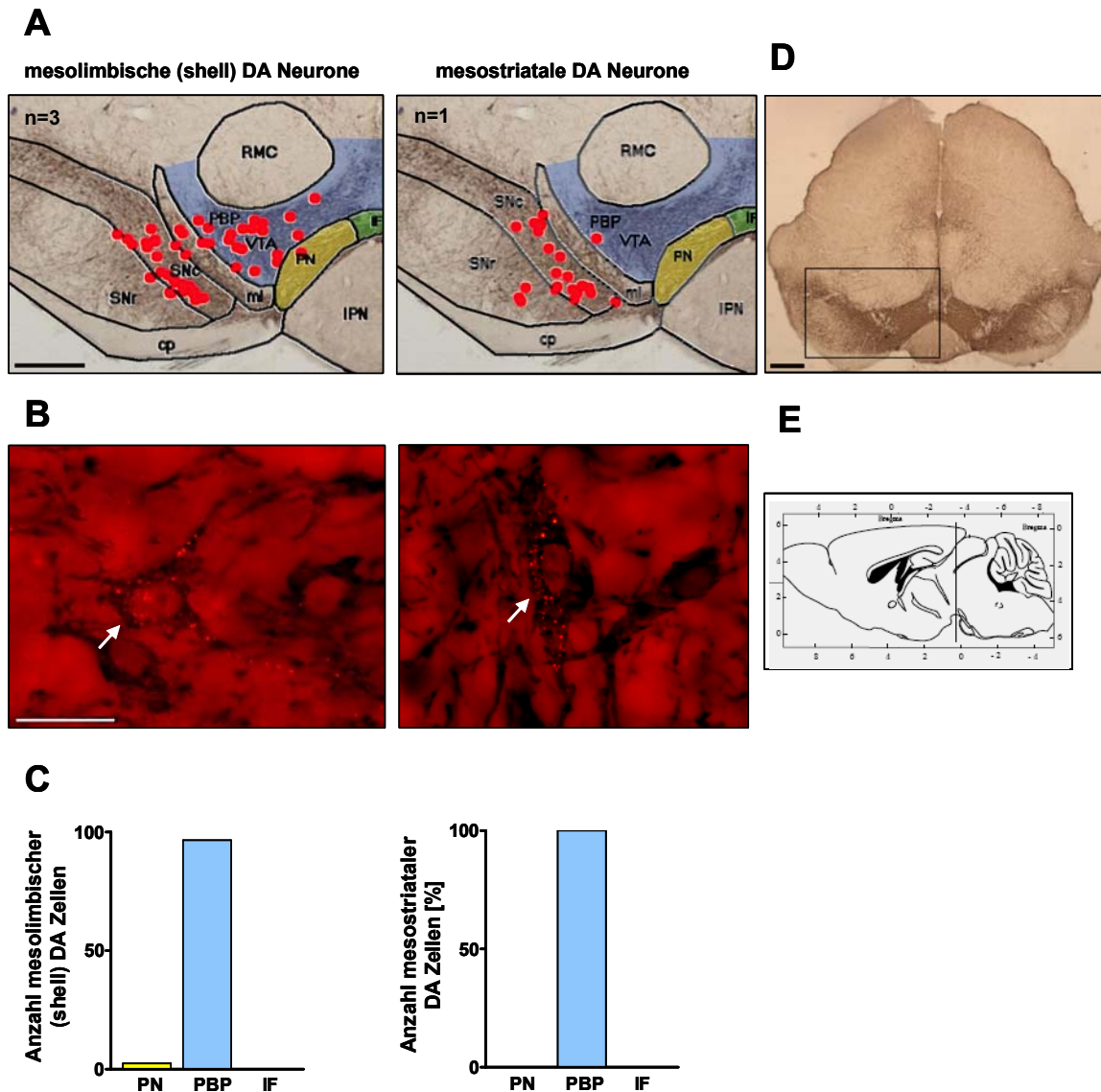


Abb. 24: Topographie DA Projektionsneurone im intermediären Mittelhirn

[A] Lokalisation mesokortikaler, mesoamygdalärer, mesolimbischer core, mesolimbischer shell und mesostriataler DA Neurone im intermediären Mittelhirn (Bregma: -3,49 mm) nach NeuroLucida®-basierter Rekonstruktion von TH-DAB gefärbten koronalen Schnitten. TH-positive Zellen sind als rote Punkte dargestellt. Die Subnuclei der VTA sind durch die Farben gelb (PN), blau (PBP) und grün (IF) hervorgehoben. Die Rekonstruktion wurde zur besseren Orientierung mit einer TH-DAB Färbung des Mittelhirns unterlegt. Neuroanatomische Nomenklatur nach Paxinos und Franklin, 2001 (Balken: 0,5 mm). [B] Entsprechend jeweils ein TH-positives, durch Beads markiertes Projektionsneuron (weißer Pfeil) in 60-facher Vergrößerung. Der schwarze Pfeil markiert exemplarisch eine TH-positive Zelle, die keine Beads enthält (Balken: 20 µm). [C] Die Balkendiagramme zeigen die Verteilung der DA Neurone in den primären Subnuclei der VTA (RLi nicht gezeigt). [D] Übersichtsdarstellung des Mittelhirns (2x Objektiv) nach TH-DAB Färbung in der vergrößerte Bereich aus (A) markiert ist (Balken: 0,5 mm). [E] Lokalisation der Schnitte in der Sagittalebene.

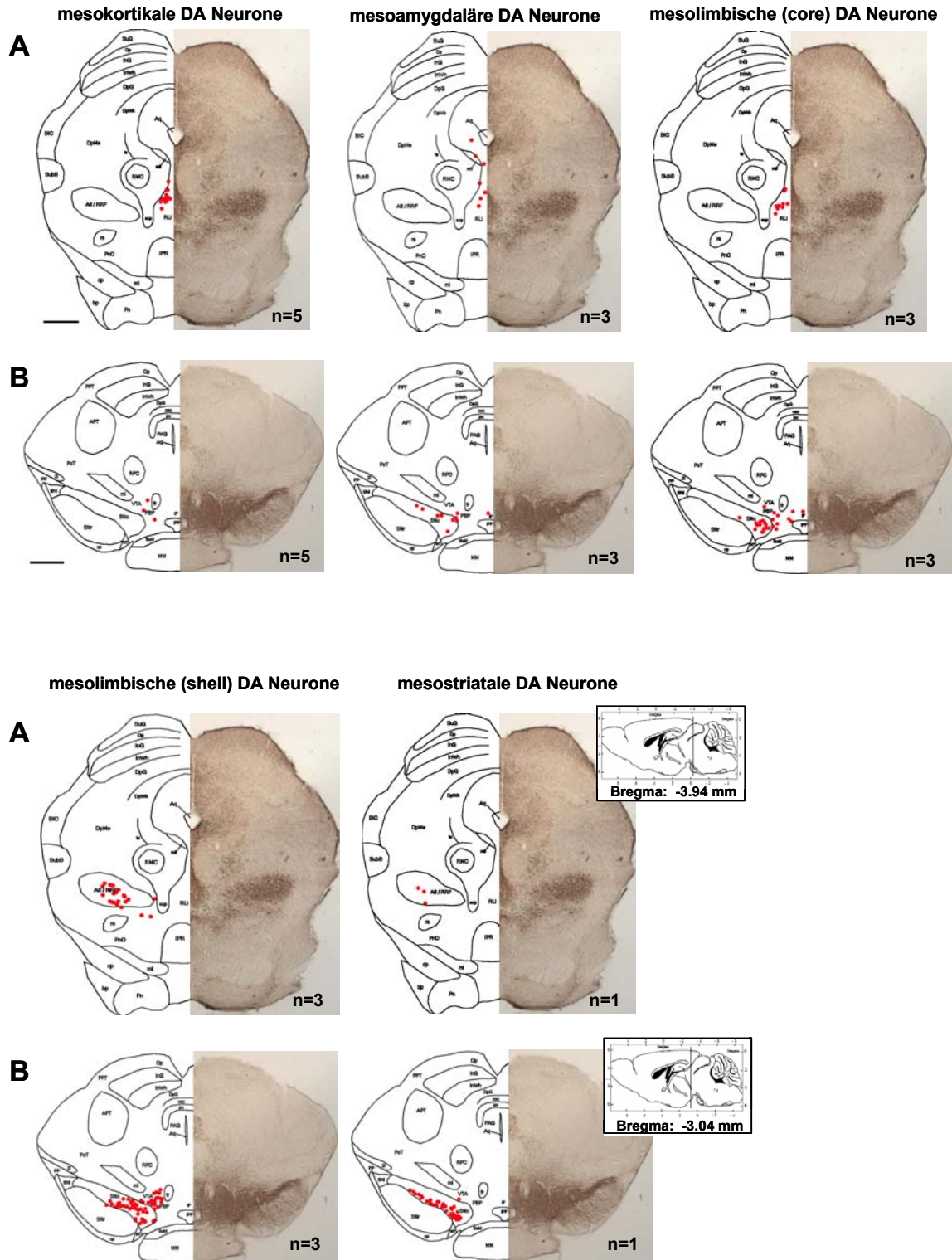


Abb. 25: Topographie DA Projektionsneurone im caudalen und rostralen Mittelhirn

[A] Lokalisation der DA Subpopulationen im caudalen Mittelhirn (Bregma: -3,94 mm) nach Neurolucida®-basierter Rekonstruktion (links). Die roten Punkte markieren TH-positive Zellen. Der rechte Teil zeigt einen entsprechenden TH-DAB gefärbten Schnitt. [B] Lokalisation der DA Subpopulationen im rostralen Mittelhirn (Bregma: -3,04 mm). Einfügungen in (A) und (B): Lokalisation der Schnitte in der Sagittalebene. Nomenklatur nach Paxinos und Franklin, 2001 (Größenbalken für alle Abbildungen: 0,5 mm).

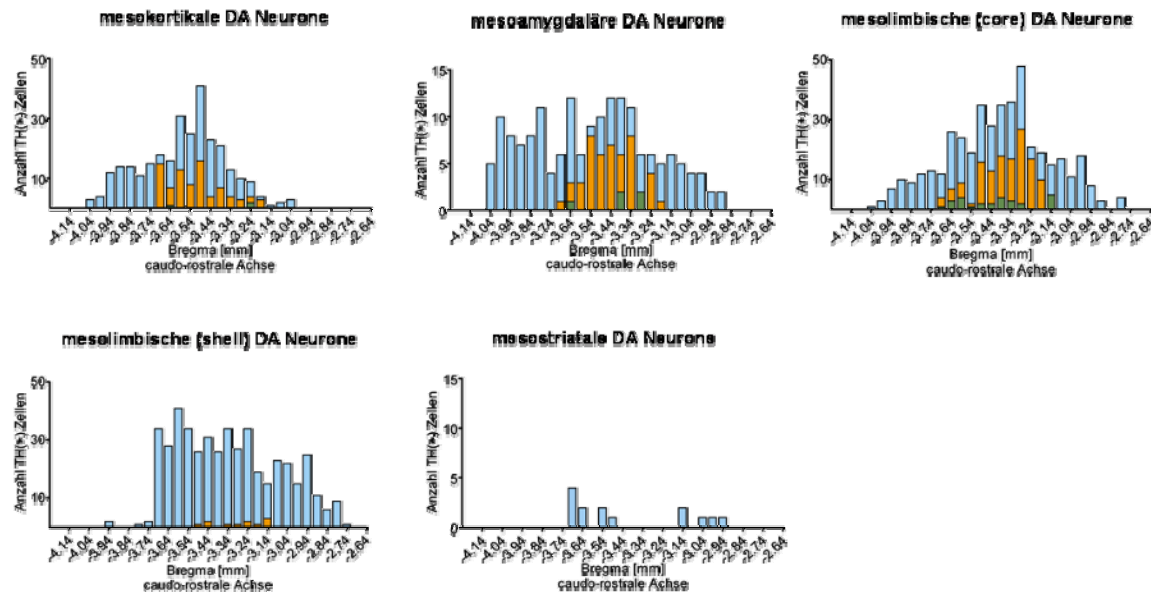


Abb. 26: Verteilung der DA Subpopulationen im Mittelhirn

Dargestellt sind Histogramme, die die Verteilung (dargestellt als Summe retrograd markierter TH-positiver Zellen) der jeweiligen Subpopulationen in der gesamten VTA (RLi+PN+PBP+IF) (blau), im PN (gelb) und im IF (grün) entlang der caudo-rostralen Achse des Mittelhirns zeigen (siehe auch Tabelle 8). Mesokortikal n=5 Tiere; mesoamygdalär n=3 Tiere, mesolimbisch core n=3 Tiere, mesolimbisch shell n=3 Tiere; mesostriale: n=1 Tier.

| | A8 (RRA) | A9 (SNc+SNr) | A10 (RLi+PN+PBP+IF) | A10-PN | A10-PBP | A10-IF | A10-RLi | kontralat. VTA Zellen |
|---------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|-------------------|--------------------|-----------------------|
| mesokortikale DA Zellen | 0 % (0/293) | 1.0 % (3/293) | 99.0 % (290/293) | 43.1 % (125/290) | 31.1 % (90/290) | 1.0 % (3/290) | 24.8 % (72/290) | 8.3 % (24/290) |
| mesoamygdaläre DA Zellen | 0 % (0/210) | 18.6 % (39/210) | 81.4 % (171/210) | 28.1 % (48/171) | 38.0 % (65/171) | 2.9 % (5/171) | 31.0 % (53/171) | 8.2 % (14/171) |
| mesolimbische (core) DA Zellen | 0 % (0/629) | 31.0 % (195/629) | 69.0 % (434/629) | 33.4 % (145/434) | 47.7 % (207/434) | 6.2 % (27/434) | 12.7 % (55/434) | 3.7 % (16/434) |
| mesolimbische (shell) DA Zellen | 11.6 % (144/1239) | 50.8 % (629/1239) | 37.6 % (466/1239) | 2.4 % (11/466) | 96.5 % (450/466) | 0 % (0/466) | 1.1 % (5/466) | 0.4 % (2/466) |
| mesostriale DA Zellen | 4.2 % (22/528) | 93.2 % (492/528) | 2.6 % (14/528) | 0 % (0/14) | 100 % (14/14) | 0 % (0/14) | 0 % (0/14) | 0 % (0/14) |

Tab. 8: Prozentuale Verteilung DA Projektionsneurone im Mittelhirn

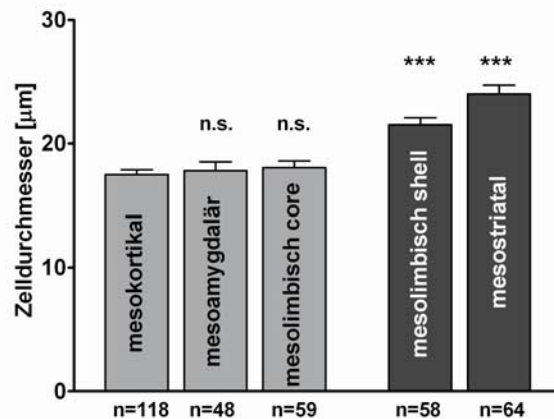


Abb. 27: Zelldurchmesser der verschiedenen DA Subpopulationen

Balkendiagramm, das den mittleren Zelldurchmesser der DA Subpopulationen wiedergibt.

3.2.4 Topographie nicht-dopaminerges mesokortikales DA Neuron im Mittelhirn

Da in zukünftigen Studien die neurochemische Identität der nicht-dopaminergen mesokortikalen Neuronen untersucht werden soll, erfolgte in der vorliegenden Arbeit bereits eine topographische Analyse dieser Zellen mit Hilfe der Neurolucida®-Software.

Mit Bezug auf die Gesamtzahl der markierten mesokortikalen Zellen im Mittelhirn waren 89 % TH-negativ (2382/2675 Zellen) und nur 11 % TH-positiv (293/2675 Zellen) (für n=5 Tiere, siehe Kapitel 3.2.1). Abbildung 28 zeigt die Lokalisation der TH-negativen mesokortikalen Zellen im Mittelhirn. Nicht-dopaminerges mesokortikales Neuron konnte man überwiegend im caudalen (36,4 % 867/2382 TH-negative Zellen) und rostralen Mittelhirn (44,9 % 1070/2382 TH-negative Zellen) auffinden. Caudal waren sie präferentiell im Bereich der Pontinen retikulären Formation (PnO) (am Übergang zwischen Mesencephalon und Pons) und des RLi und CLi lokalisiert. Rostral existierten vor allem zwei Gebiete in denen die Zellen präferentiell zu finden waren: das supramammilläre Areal (SuM), sowie die Region um den Fasciculus retroflexus (fr). Im Gegensatz zu TH-positiven mesokortikalen Neuronen waren nur wenige TH-negative Zellen im intermediären Mittelhirn nachweisbar (18,7 % 445/2382 Zellen). Hier befanden sie sich hauptsächlich medial, im RLi. Nur selten waren TH-negative Zellen in den klassischen VTA Subnuklei (PN, PBP, IF) lokalisiert.

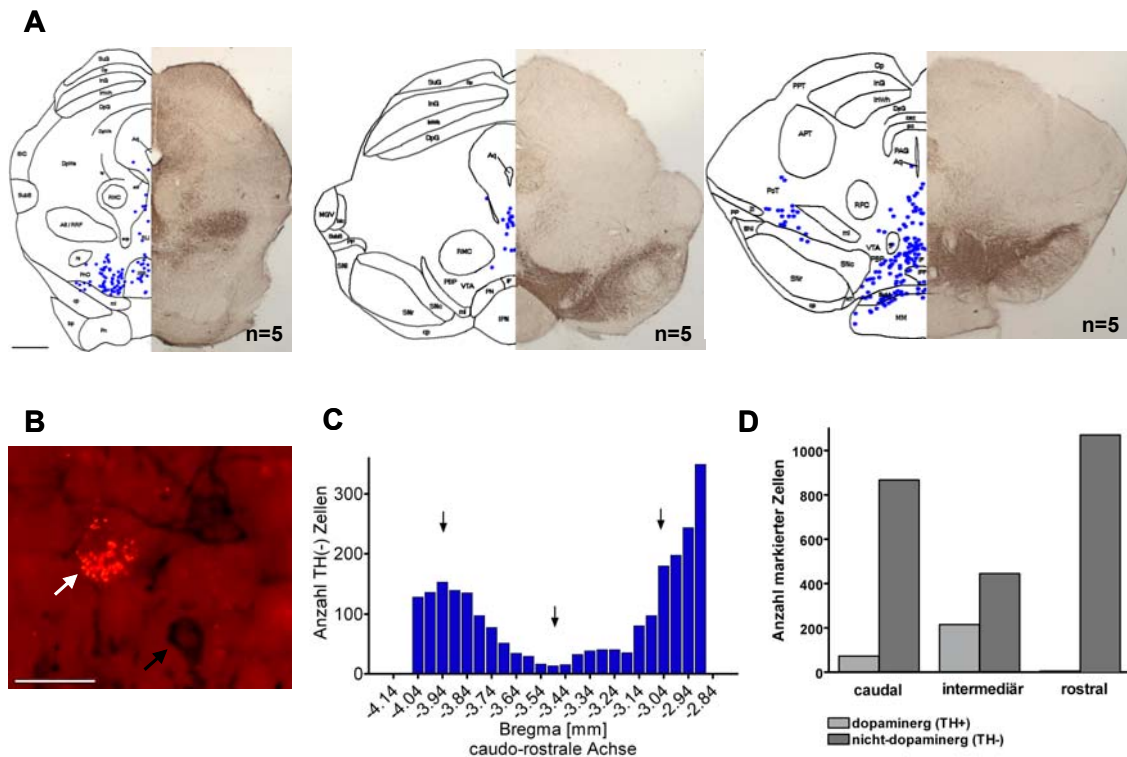


Abb. 28: Topographie nicht-dopaminerg mesokortikaler Neurone im Mittelhirn

[A] Lokalisation nicht-dopaminerg mesokortikaler Neurone (blau) im caudalen (links, Bregma: -3,94 mm), intermediären (Mitte, Bregma: -3,49 mm) und rostralen Mittelhirn (rechts, Bregma: -3,04 mm). Jeweils links die Neurolucida®-basierte Rekonstruktion und rechts die korrespondierende TH-DAB Färbung (Balken: 0,5 mm). [B] TH-negative mesokortikale Zelle (60x Objektiv, weißer Pfeil). Daneben eine nicht durch die Beads markierte TH-positive Zelle (schwarzer Pfeil) (Balken: 20 µm). [C] Verteilung der TH negative Zellen entlang der caudo-rostralen Achse. Die schwarzen Pfeile markieren die Bregma Position der unter (A) gezeigten Schnitte. [D] Balkendiagramm, das die Summe der mesokortikalen Zellen im caudalen, intermediären und rostralen Mittelhirn zwischen DA und nicht-dopaminergen Neuronen vergleicht.

3.3 Mesokortikale und mesolimbische Projektionen sind unabhängig

Die Ergebnisse unter 3.2 haben gezeigt, dass mesokortikale und mesolimbische core DA Neurone in der medialen VTA lokalisiert sind, während mesolimbische shell DA Neurone überwiegend in der lateralen VTA nachzuweisen sind. Mit Hinblick auf eine weitere Charakterisierung des mesokortikolimbischen DA Systems ergaben sich somit folgende Fragestellungen, die in diesem Kapitel geklärt werden sollen:

- Sind die Zellkörper mesokortikaler und mesolimbischer (core/shell) DA Neurone benachbart?
- Inwieweit ist das mesokortikolimbische DA System durch axonale Verzweigungen (Kollaterale) miteinander verknüpft?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden sogenannte Doppel-Tracing Experimente durchgeführt. Dazu wurden rote Beads (546 nm) in den mPFC und gleichzeitig grüne Beads (488 nm) in die core oder in die shell Region des NAc der selben Hemisphäre injiziert (jeweils n=3 Tiere).

Nach einer Überlebenszeit von 21 Tagen erfolgte die Perfusion und immunhistochemische Aufarbeitung der Tiere. Dies geschah im Rahmen einer Immunfluoreszenzfärbung mit einem gegen die Tyrosinhydroxylase (TH) gerichteten Primärantikörper, sowie einem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper, dessen Absorptionsmaximum bei 647 nm lag.

3.3.1 Räumliche Nähe mesokortikaler und mesolimbischer (core/shell) DA Neurone

Abbildung 29 A zeigt koronale Hirnschnitte nach einer Nisslfärbung (488 nm) zur Verifizierung der Injektionsareale der Doppel-Tracing Experimente. Die Ermittlung der Distanz zwischen den DA Subpopulationen erfolgte mit Hilfe der Neurolucida® Software. Hierzu wurde unter 600-facher Vergrößerung die Entfernung (in μm) zwischen einer mesokortikalen zur nächstgelegenen mesolimbischen core bzw. mesolimbischen shell TH-positiven Zelle bestimmt. Die Sicherstellung der DA Identität erfolgte zuvor anhand konfokalmikroskopischer Aufnahmen. Abbildung 29 B (links) zeigt, dass mesolimbische core DA Neurone in direkter Nachbarschaft zu mesokortikalen DA Neuronen lokalisiert sind. Die mittlere Entfernung betrug $89,9 \pm 10,7 \mu\text{m}$ (n=28). Dagegen waren mesokortikale DA Neurone signifikant weiter von mesolimbischen shell DA Neuronen entfernt. Die mittlere Distanz betrug $232,7 \pm 24,3 \mu\text{m}$ (n=26) ($p < 0.001$; ungepaarter T-Test; Abb. 29 C).

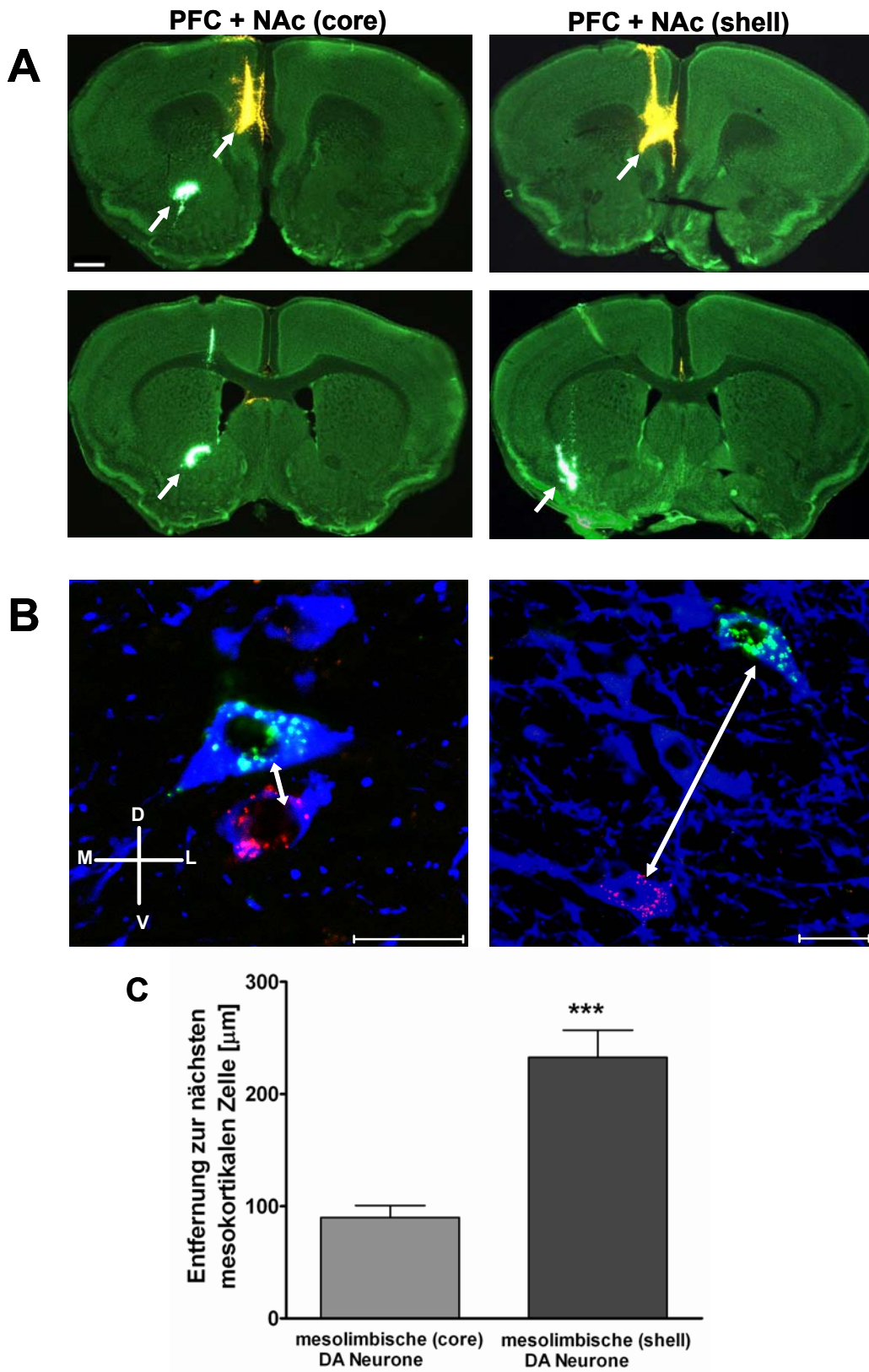


Abb. 29: Mesokortikale DA Neurone sind in direkter Nachbarschaft zu mesolimbischen core DA Neuronen lokalisiert

[A] Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (2x Objektiv) nach Nisslfärbung (488 nm) zur Verifizierung der Injektionsstellen. Die weißen Pfeile markieren die Lokalisation der roten Beads (hier gelb dargestellt) im PFC, sowie der grünen Beads im NAc core bzw. NAc shell (Balken: 0,5 mm) [B] Konfokalmikroskopische Aufnahmen (63x). Links: mesokortikales DA Neuron (rote Beads, 545 nm) in direkter Nachbarschaft zu einem mesolimbischen core DA Neuron (grüne Beads, 488 nm). Das TH-Signal (647 nm) ist blau dargestellt. Rechts: mesokortikales DA Neuron (rote Beads, 546 nm) und ein deutlich weiter entferntes mesolimbisches shell DA Neuron (grüne Beads, 488 nm) (Balken: 20 µm) (D-dorsal, V-ventral, M-medial, L-lateral). [C] Das Balkendiagramm veranschaulicht die mittleren Entfernungen zwischen mesokortikalen und mesolimbischen core bzw. shell DA Neuronen.

3.3.2 Analyse kollateraler Verzweigungen im mesokortikolimbischen DA System

Da in der Literatur oftmals von einem mesokortikolimbischen DA System gesprochen wird sollte untersucht werden, inwieweit mesokortikale DA Neurone mittels Axonkollateralen auch subkortikale Territorien (insbesondere NAc core und NAc shell) innervieren. Hierzu wurde die Anzahl der mesokortikalen DA Neurone bestimmt, die in den Doppel-Tracing Experimenten nur durch rote oder durch rote und grüne Beads markiert waren. Bei Injektionen in den PFC (rote Beads) und NAc core (grüne Beads) waren 87,5 % (28/32 Zellen) der mesokortikalen DA Neuronen nur durch rote Beads markiert (siehe Abb. 29 B, links). Nur in 12,5 % (4/32 Zellen) konnten Doppelmarkierungen nachgewiesen werden (Abb. 30 A). Beim Doppel-Tracing des PFC (rote Beads) und NAc shell (grüne Beads) waren 95,7 % (22/23 Zellen) nur durch rote Beads markiert (siehe Abb. 29 B, rechts) und 4,3 % (1/23 Zellen) doppel-markiert (Abb. 30 B). Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass Kollateralbildung, die zu einer Innervation von kortikalen und limbischen Territorien durch einzelne DA Neurone führen, eher selten, bzw. in etwa nur 10 % vorkommen.

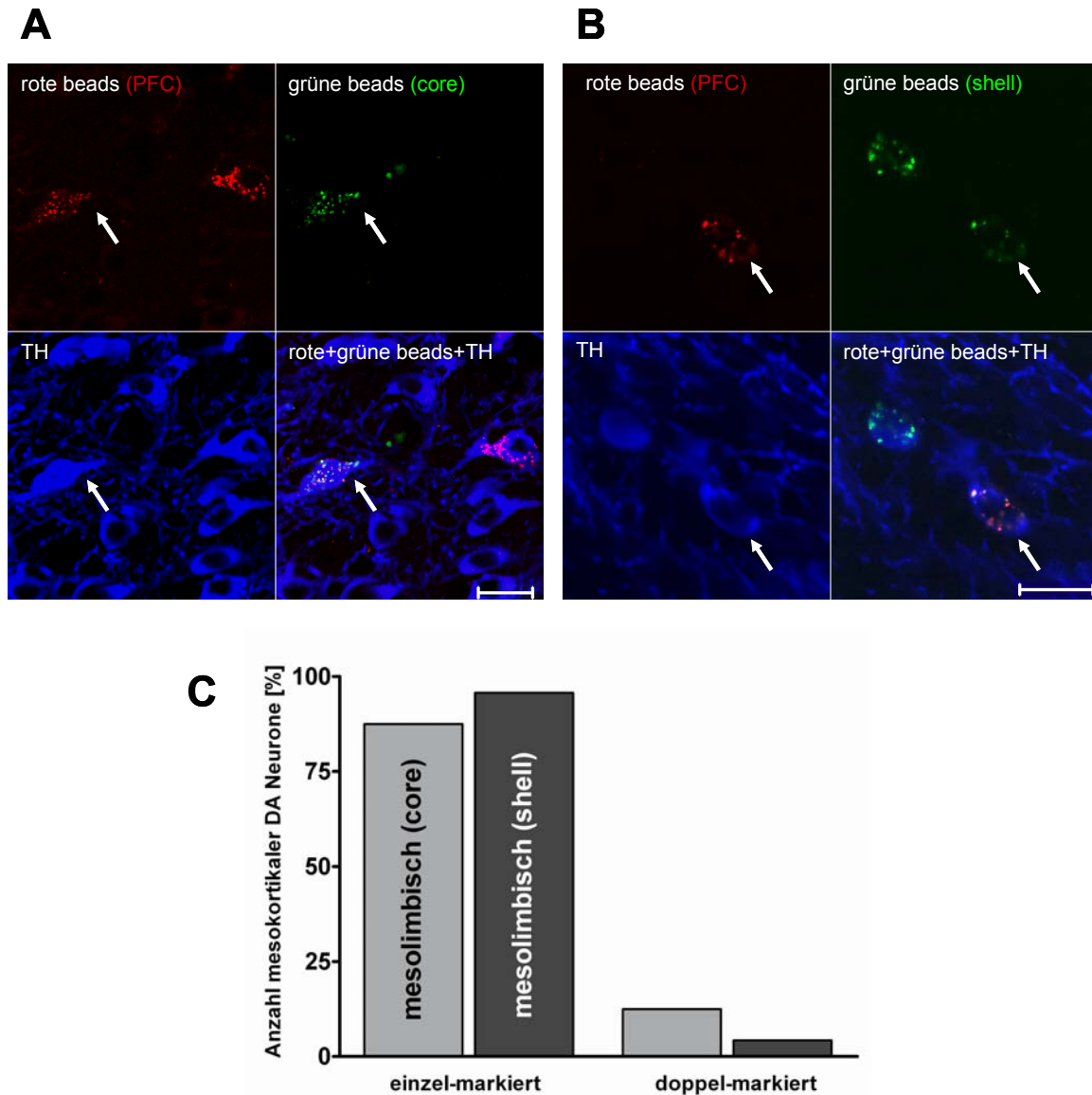


Abb. 30: Mesokortikale DA Neurone besitzen kaum Kollaterale

[A] Dargestellt ist eine TH-positive Zelle (blau, 647 nm) (63x, konfokalmikroskopische Aufnahme), die gleichzeitig durch rote Beads (546 nm) aus dem PFC und grüne Beads (488 nm) aus dem NAc core retrograd markiert wurde (weißer Pfeil). Rechts daneben sieht man eine TH-positive Zelle, die nur durch rote Beads markiert wurde (Balken: 20 µm). [B] TH-positive Zelle, die durch rote Beads (PFC) und grüne Beads (NAc shell) doppel-markiert wurde (weißer Pfeil). Oberhalb sieht man eine TH-positive Zelle, die nur durch grüne Beads markiert wurde (Balken: 20 µm). [C] Das Balkendiagramm, gibt den Prozentsatz der mesokortikalen DA Zellen wieder, die einzel bzw. doppel-markiert waren (jeweils für mesokortikale und mesolimbische core DA Neurone (grauer Balken), bzw. mesokortikale und mesolimbische shell DA Neurone (schwarzer Balken)).

3.4 Immunhistochemische Analyse spezifischer Markerproteine in DA Subpopulationen

Um die DA Projektionsneurone auf Proteinebene näher zu charakterisieren und um Subpopulationen möglicherweise immunhistochemisch voneinander abzugrenzen, wurde die Expression bestimmter Markerproteine in retrograd identifizierten DA Neuronen mit Hilfe von Fluoreszenz- und DAB Immunhistochemie qualitativ untersucht. Folgende Markerproteine wurden untersucht:

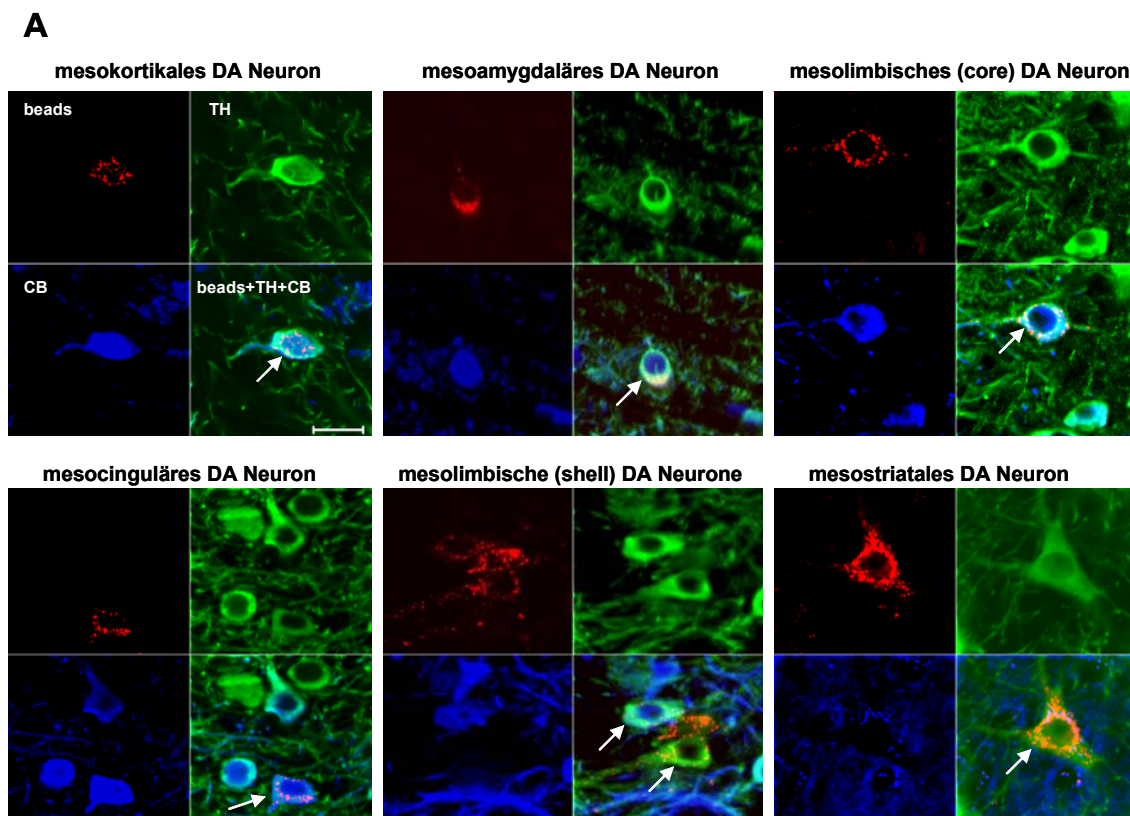
- Calbindin-D28k
- Dopamintransporter (DAT)
- G-Protein gekoppelter einwärts rektifizierender Kalium Kanal 2 (GIRK2) (siehe 3.6.3)
- Dopaminrezeptor 2 (siehe 3.6.2)

3.4.1 Calbindin-D28k ist kein geeigneter Marker zur Differenzierung meso-kortikolimbischer DA Subpopulationen

Calbindin-D28k (CB) ist ein Kalzium-bindendes Protein, das in Subpopulationen von DA Mittelhirnneuronen exprimiert wird. Die physiologische Funktion dieses Kalziumpuffers ist noch nicht geklärt, möglicherweise beeinflusst es die Vulnerabilität von DA Neuronen bei Morbus Parkinson (Yamada et al., 1990; Liang et al., 1996).

Um die Expression von CB in den DA Subpopulationen zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern, die gegen die Tyrosinhydroxylase (TH, 488 nm) und Calbindin-D28k (CB, 647 nm) gerichtet waren angefertigt. Bei Calbindin handelte es sich dabei um einen bereits in der Arbeitsgruppe etablierten Antikörper (Neuhoff et al., 2002). Generell war eine konfokal mikroskopische Analyse der Proteinexpression nicht auf eine bestimmte Region im Mittelhirn beschränkt, sondern erstreckte sich über dessen gesamten Bereich (caudal, intermediär, rostral). Abbildung 31 veranschaulicht, dass CB in 100 % der untersuchten mesokortikalen (n=38/38 Zellen; n=3 Tiere), mesoamygdalären

(n=9/9 Zellen; n=1 Tier) und mesolimbischen core (n=16/16 Zellen; n=1 Tier) DA Neuronen nachgewiesen werden konnte. Mesocinguläre DA Neurone waren ebenfalls zu 100 % CB-positiv (n=22/22 Zellen; n=4 Tiere). Dagegen exprimierten nur etwa 60 % der mesolimbischen shell DA Neurone (12/20 Zellen; n=1 Tier) Calbindin. In keiner mesostriatalen DA Zelle (0/7 Zellen; n=1 Tier) konnte ein Calbindin-Immunsignal gefunden werden. Bezüglich nicht-DA mesokortikaler Neurone beschränkte sich die Analyse auf die VTA des rostralen Mittelhirns. Diese Zellen waren hauptsächlich CB-negativ (92,3 %; 12/13 Zellen; n=1 Tier) (Daten nicht gezeigt).



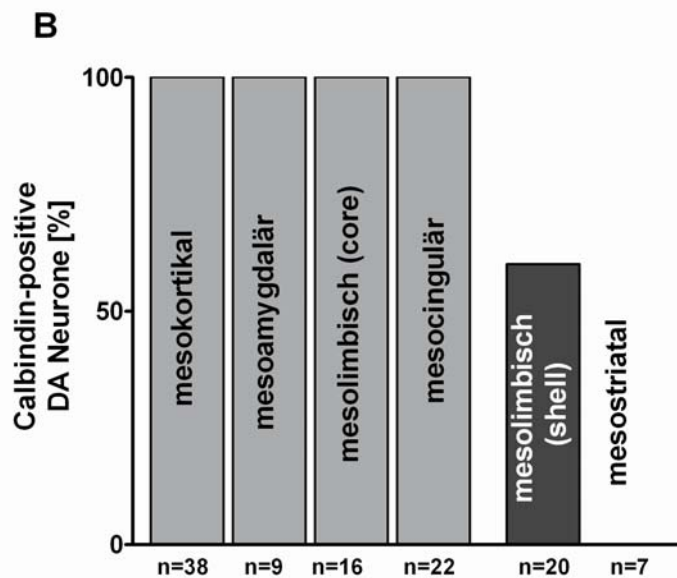


Abb. 31: Proteinexpression von Calbindin-D28k in den DA Subpopulationen

[A] Konfokal mikroskopische Aufnahmen (63x) der Analyse von Calbindin-D28k (blau, 647 nm) in TH-positiven (grün, 488 nm) und durch Beads (rot, 546 nm) markierten Projektionsneuronen zeigen. Man beachte bei den mesolimbischen shell DA Neuronen, die unmittelbare Nachbarschaft Calbindin-positiver und Calbindin-negativer Zellen (weiße Pfeile) (Balken für alle Abbildungen: 20 μ m). [B] Das Balkendiagramm zeigt die prozentuale Calbindin Expression in den DA Subpopulationen.

3.4.2 Differentielle Proteinexpression des Dopamintransporters im mesokortikolimbischen DA System

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse der somatischen Dopamintransporters (DAT) Expression wiedergegeben. Zunächst wurde eine generelle DAT Expression in den Zellen der VTA und SN des Mittelhirns untersucht. Abbildung 32 (rechts) zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen nach einer DAB-Immunperoxidase Reaktion (Standard DAB Protokoll) mit einem in der Arbeitsgruppe bereits etablierten DAT Antikörper im intermediären Mittelhirn. Es ist zu sehen, dass mediale Bereiche der VTA, in denen vor allem mesokortikale, mesoamygdaläre und mesolimbische core DA Neurone lokalisiert sind, nur eine geringe DAT-Immunreaktivität aufweisen (Abb. 32 C). Mesolimbische shell DA Neurone befinden sich präferentiell in der lateralen VTA. Diese Region hatte eine deutlich höhere DAT Immunreaktivität (Abb. 32 D). Auch in Zellen der SN konnte ein hohes DAT Immunsignal gefunden werden (nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse konnten nach einer konfokalen Analyse der DAT Expression in retrograd identifizierten DA Neuronen validiert werden. Nur bei einviertel der mesokortikalen TH positiven Zellen (25 %, 4/16 Zellen; n=2 Tiere) konnte eine über den Hintergrund hinausgehende somatische DAT Immunreaktivität

nachgewiesen werden. Ebenso zeigten mesoamygdaläre (14,3 %; 2/14 Zellen; n=1 Tier) und mesolimbische core DA Neurone (47,8 %; 12/23 Zellen; n=1 Tier) nur relativ geringe Zellzahlen, die eine im Vergleich zum Hintergrundsignal, deutliche DAT Immunreaktivität aufwiesen (Abb. 33) Nur etwa einviertel der mesocingulären DA Neurone hatten ein signifikantes DAT Immunsignal (23,5 %, 4/17 Zellen; n=3 Tiere).

Dagegen wurde in allen untersuchten mesolimbischen shell (100 %; 12/12 Zellen; n=1 Tier) und mesostriatalen (100 %; 16/16 Zellen; n=1 Tier) DA Neuronen eine sehr hohe somatische DAT Immunreaktivität gefunden, die sich deutlich von dem Hintergrundsignal abgrenzen ließ (Abb. 33). In keiner TH-negativen mesokortikalen Zelle der rostralen VTA konnte eine vergleichbare Immunreaktivität nachgewiesen werden (0 %; 0/10 Zellen; n=1 Tier) (Daten nicht gezeigt).

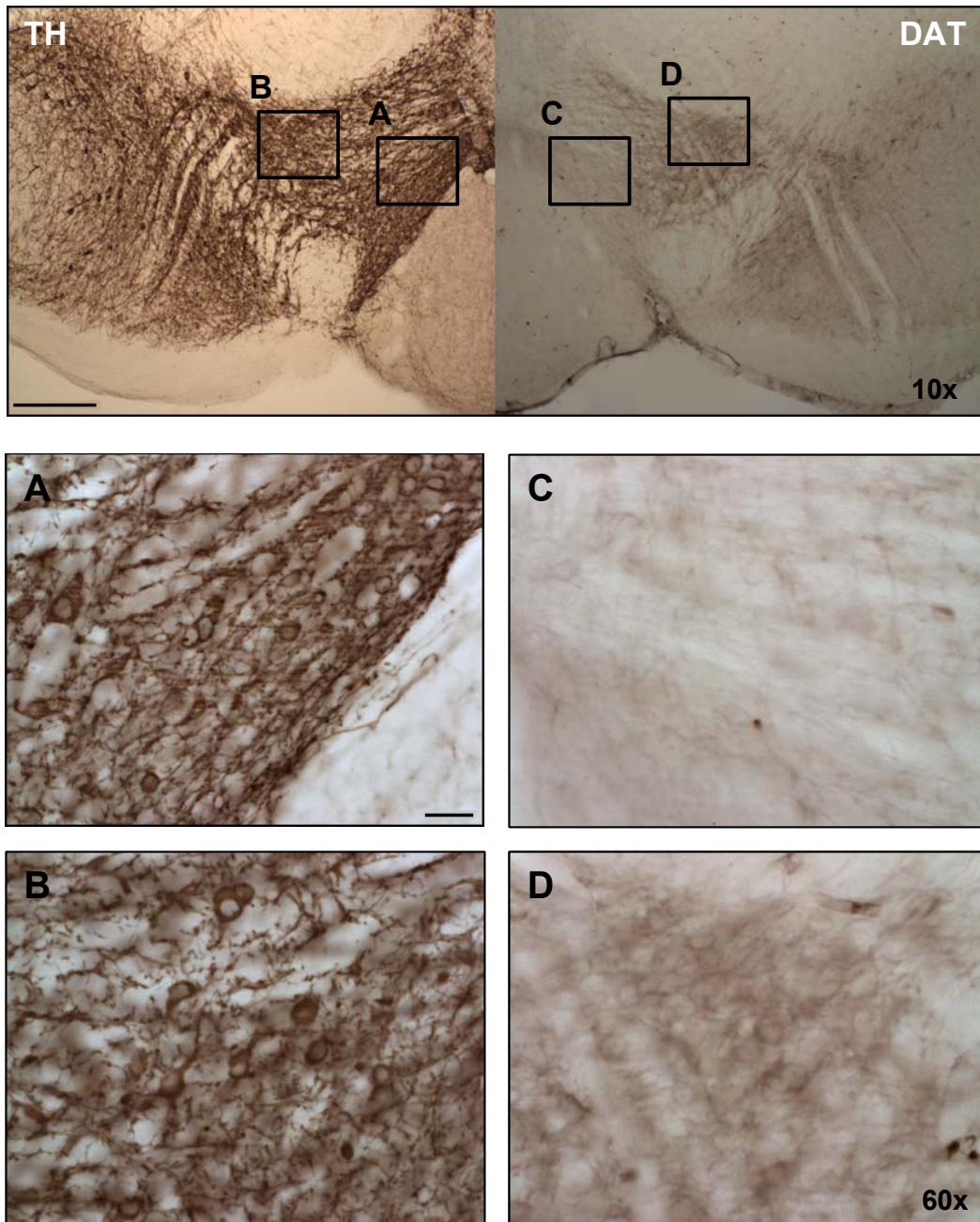


Abb. 32: DAT Proteinexpression im intermediären Mittelhirn

Dargestellt ist die DAT (rechts, Verdünnung: 1:1000, Standard DAB Protokoll) und zum Vergleich die TH (links, Standard DAB Protokoll) Immunreaktivität im intermediären Mittelhirn (10x Objektiv) (Balken: 200 μm). Die Ausschnitte (A) und (C) zeigen 60-fache Vergrößerungen in der medialen (B) und (D) in der lateralen VTA (Balken für A bis D: 20 μm).

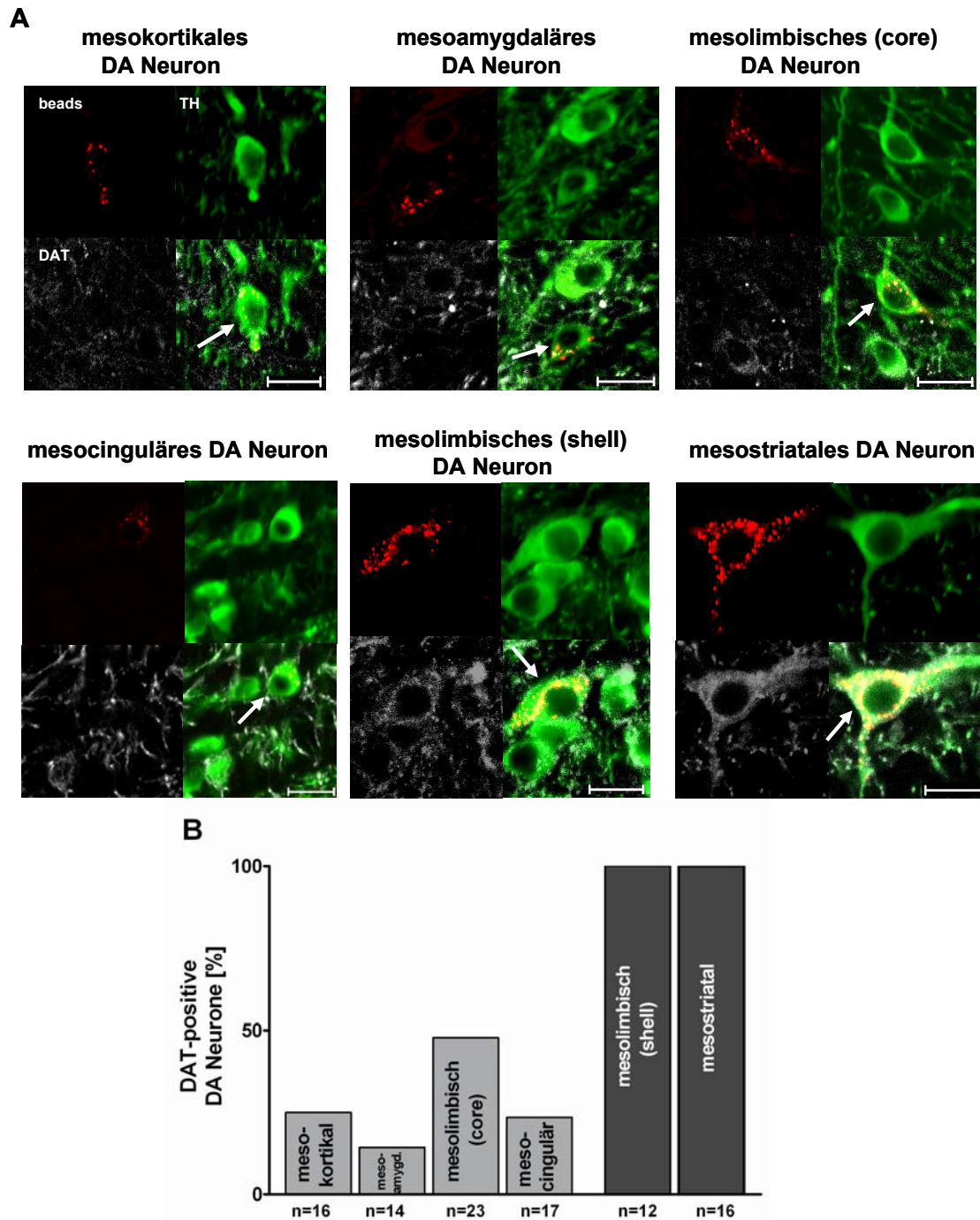


Abb. 33: DA Neurone im mesokortikolimbischen System unterscheiden sich in der DAT Proteinexpression

[A] Konfokal mikroskopische Aufnahme (63x) der DAT (weiß, 647 nm, 1:1000), TH (grün, 488 nm) und Beads (rot, 546 nm) Immunreaktivität in den DA Subpopulationen (Balken für alle Abbildungen: 20 μ m). [B] Balkendiagramm, das den Prozentsatz der Zellen mit hoher DAT Immunreaktivität im Vergleich zum Hintergrund (definiert als DAT positiv) in den DA Subpopulationen veranschaulicht.

Zusammenfassend kann man somit festhalten, dass Calbindin-D28k aufgrund seines Expressionsmusters in der VTA kein geeigneter Marker für die Differenzierung mesokortikolimbischer Projektionen darstellt. Aufgrund der Intensitätsunterschiede in der DAT Immunreaktivität lassen sich mesokortikale, mesoamygdaläre, mesocinguläre und mesolimbische core DA Neurone eindeutig von mesolimbischen shell und mesostriatalen DA Neuronen abgrenzen.

3.5 Elektrophysiologische Charakterisierung DA Subpopulationen

3.5.1 Grundcharakterisierung

Nachdem in den vorherigen Kapiteln neuroanatomische, morphologische und immunzytochemische Parameter DA Subpopulationen beschrieben wurden, soll im folgenden Kapitel auf biophysikalische Eigenschaften eingegangen werden. Hierzu wurden *in vitro* Patch-Clamp Messungen an retrograd identifizierten DA Neuronen in der whole-cell und outside-out Konfiguration an koronalen Hirnschnitten durchgeführt. Die Zellen wurden während der Messung mit 0,1 % Neurobiotin gefüllt und zur Bestimmung des DA Phänotyp histochemisch aufgearbeitet (siehe Kapitel 3.5.2). Es wurden sowohl klassische elektrophysiologische Parameter wie Spontanfrequenz, Aktionspotentialform und die Veränderung des Membranpotentials als Antwort auf hyperpolarisierende und depolarisierende Strominjektionen im current-clamp als auch Strom-Spannungsbeziehungen im voltage-clamp Modus analysiert. Es wurden markierte Zellen aus allen drei Hauptbereichen des Mittelhirns (caudal, intermediär, rostral) analysiert. Regional-bedingte Unterschiede in der Elektrophysiologie konnten nicht beobachtet werden.

Die biophysikalischen Eigenschaften dopaminerger Neurone wurden bislang mittels der Patch-Clamp Methode systematisch vor allem in früh postnatalen (10-21 Tage alt) Maus Präparationen erforscht. Studien zu selektiv identifizierten DA Neuronen in der adulten Maus wurden bislang nicht oder nur ansatzweise durchgeführt (Liss et al., 2005; Ford et al., 2006).

3.5.1.1 Retrograd identifizierte DA Neurone unterscheiden sich nicht signifikant bezüglich der mittleren Spontanfrequenz

In akuten Hirnschnittpräparaten feuern DA Neurone in der VTA und SN Aktionspotentiale in regelmäßigen Abständen in einem sogenannten Schrittmacher-Rhythmus (Pacemaker). Das Entladungsmuster DA VTA Neurone ist jedoch irregulärer im Vergleich zu DA SN Neuronen (Neuhoff et al., 2002).

Die Messung der Spontanfrequenz identifizierter DA Neurone erfolgte in der whole-cell Konfiguration. Die current-clamp Analyse zeigte, dass klassische mesostriatale DA Neurone der SNc eine mittlere Feuerungsrate von $2,6 \pm 0,4$ Hz ($n=5$) aufwiesen. Mesolimbische shell DA Neurone besaßen eine vergleichbare Spontanfrequenz von $2,7 \pm 0,5$ Hz ($n=6$). Eine deutlich höhere Spontanfrequenz konnte bei mesolimbischen core ($3,5 \pm 0,3$ Hz, $n=7$), mesoamygdalären ($3,4 \pm 0,3$ Hz, $n=5$) und mesokortikalen ($3,8 \pm 0,4$ Hz, $n=5$) DA Neuronen gefunden werden (Abb. 34). Eine statistische Analyse ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Subpopulationen ($p > 0,05$; ANOVA). Das Erregungsmuster war bei mesokortikalen, mesoamygdalären und mesolimbischen core DA Neuronen teilweise irregulärer im Vergleich zu den mesolimbischen shell und mesostriatalen DA Neuronen.

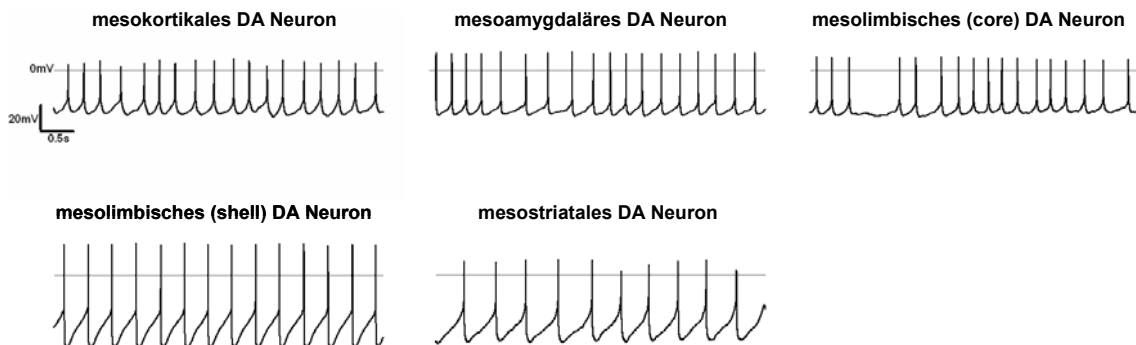


Abb. 34: Mesokortikolimbische dopaminerge Neurone unterscheiden sich nicht signifikant in ihrer mittleren Spontanaktivität

Abgebildet sind Spontanaktivitäten DA Subpopulationen in der current-clamp Konfiguration der Ganzzelleableitung (whole-cell).

3.5.1.2 Aktionspotentialparameter im mesokortikolimbischen DA System

Bei der Charakterisierung der Aktionspotentialform einzelner, zeitlich hoch aufgelöster Aktionspotentiale (AP) wurden folgende Parameter analysiert: Amplitude, Dauer, Nachhyperpolarisation (NHP) und Schwellenpotential. Diesbezüglich unterschieden sich die DA Subpopulationen insbesondere in ihrer Nachhyperpolarisation und in der Aktionspotentialdauer. Während mesokortikale, mesoamygdaläre und mesolimbische core DA Neurone Aktionspotentiale von langer Dauer und Nachhyperpolarisationen oberhalb von -50 mV aufwiesen, sind für mesolimbische shell und mesostriatale DA Neurone Aktionspotentiale von kurzer Dauer mit einer ausgeprägten Nachhyperpolarisation unterhalb von etwa -50 mV charakteristisch (Abb. 35). Die Ergebnisse der Auswertung der oben genannten Kenngrößen einzelner, spontaner Aktionspotentiale sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

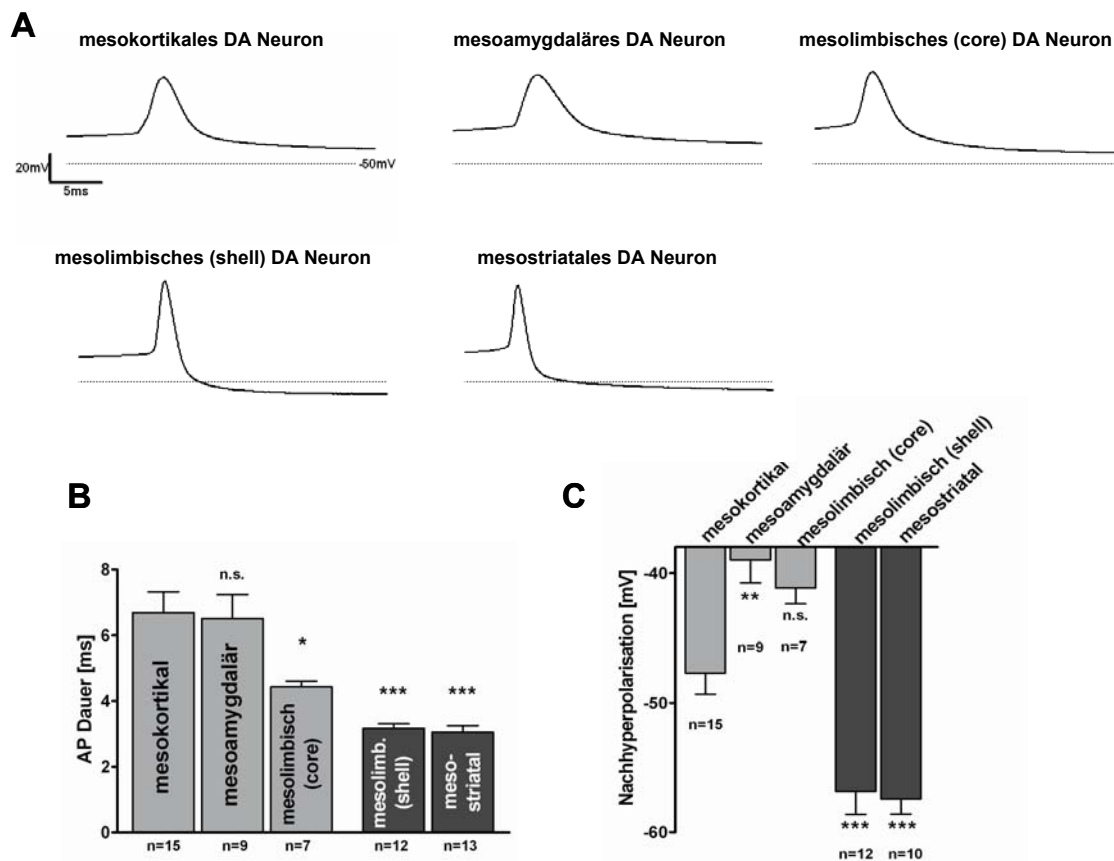


Abb. 35: DA Neurone im mesokortikolimbischen System sind anhand der Aktionspotentialform differenzierbar

[A] Einzelne, spontane Aktionspotentiale (AP) in hoher zeitlicher Auflösung der current-clamp Konfiguration. [B] und [C] Balkendiagramme, die die Dauer einzelner Aktionspotentiale (B) bzw. die maximale Nachhyperpolarisation (C) in den DA Subpopulationen vergleicht.

| | Amplitude [mV] | Schwelle [mV] | Dauer [ms] | NHP [mV] |
|--------------------|---------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------|
| mesokortikal | 19,1 ± 2,6 (n=6) | -27,0 ± 1,2 (n=6) | 6,7 ± 0,6 (n=15) | -47,7 ± 1,6 (n=15) |
| mesoamygdalär | 20,5 ± 2,1 (n=9) | -21,6 ± 0,4 (n=9) | 6,5 ± 0,7 (n=9) | -39,0 ± 1,8 ** (n=9) |
| mesolimbisch core | 20,6 ± 0,9 (n=7) | -22,6 ± 1,5 (n=7) | 4,4 ± 0,2 * (n=7) | -41,2 ± 1,2 (n=7) |
| mesolimbisch shell | 23,3 ± 1,9 (n=8) | -24,2 ± 1,4 (n=8) | 3,2 ± 0,1 *** (n=12) | -56,9 ± 1,8 *** (n=12) |
| mesostriatal | 22,7 ± 3,9 (n=6) | -17,4 ± 2,0 *** (n=6) | 3,1 ± 0,2 *** (n=13) | -57,4 ± 1,2 *** (n=10) |

Tab. 9: Aktionspotentialparameter DA Subpopulationen

Abbildung 36 A zeigt exemplarisch ein Aktionspotential eines mesokortikalen und mesolimbischen shell DA Neurons, welche jeweils in der whole-cell Konfiguration gemessen wurden. Mathematisch entspricht das erste Differential der Geschwindigkeit der Membranpotentialänderung (die erste zeitliche Ableitung des Potentials $v(t) = \frac{dV}{dt}$). Das zweite Differential beschreibt die Beschleunigung der Membranpotentialänderung (die zweite zeitliche Ableitung des Potentials $v(t) = \frac{d^2V}{dt^2}$). Da nach der die zweite Ableitung des Membranpotentials nach dem

¹ Die Kabelgleichung ist eine partielle Differentialgleichung zweiter Ordnung und beschreibt die räumliche (abhängig von der Raum- bzw. Längenkongstante) und zeitliche (abhängig von der Membranzeitkonstante) Ausbreitung eines Aktionspotentials in Nervenfasern. Sie leitet sich her aus dem Membranstrom i_m [$A\ cm^{-1}$], der durch folgende zwei Gleichungen gegeben ist:

$$i_m = \frac{1}{r_i} \frac{d^2V}{dx^2} \text{ und } i_m = \frac{V}{r_m} c_m \frac{dV}{dt}. \text{ Durch Kombination dieser beiden Gleichungen erhält man die}$$

$$\text{Kabelgleichung: } \left(\frac{r_m}{r_i}\right) \frac{d^2V}{dx^2} = V + r_m c_m \frac{dV}{dt} \text{ mit}$$

V : Membranpotential [mV]

r_m : transmembranale Widerstand [$\Omega\ cm$]

r_i : axiale Innenwiderstand [$\Omega\ cm^{-1}$]

c_m : transmembranale Kapazität [$\mu F\ cm^{-1}$]

$\lambda^2 = \frac{r_m}{r_i}$: Raum- bzw. Längenkongstante

$\tau = r_m c_m$: Membranzeitkonstante

Ort dem Membranstrom entspricht und dieser Membranstrom in seinem zeitlichen Verlauf die Ableitung von extrazellulären Aktionspotentialen (*single units*) erlaubt, entspricht die zweite Ableitung in etwa der Form der extrazellulär gemessenen Aktionspotentiale (Grace und Bunney, 1983). Charakteristisch für das extrazelluläre Aktionspotential ist der triphasische Verlauf, der typisches Merkmal klassischer DA SN Neurone ist und den auch die mesolimbischen shell DA Neuronen aufwiesen. Dagegen ergab die zweite Ableitung des mesokortikalen Aktionspotentials ein sehr kleines, nahezu biphasischer Signal. Unter der Annahme, dass die Aktionspotentiale in mesolimbischen und mesokortikalen DA Neuronen *in vivo* einen ähnlichen Zeitverlauf aufweisen würden, wären extrazelluläre Aktionspotentiale dieser Art deutlich schwerer *in vivo* zu detektieren.

In *phase plot* Diagrammen (Abb. 36 B) wird die zeitliche Änderung des Potentials $\frac{dV}{dt}$ als Funktion des Potentials V aufgetragen. Mesokortikale Zellen zeigten im Vergleich zu mesolimbischen shell Neuronen eine deutlich kleinere maximale Depolarisations- und Repolarisationsgeschwindigkeit (siehe auch Tabelle 10).

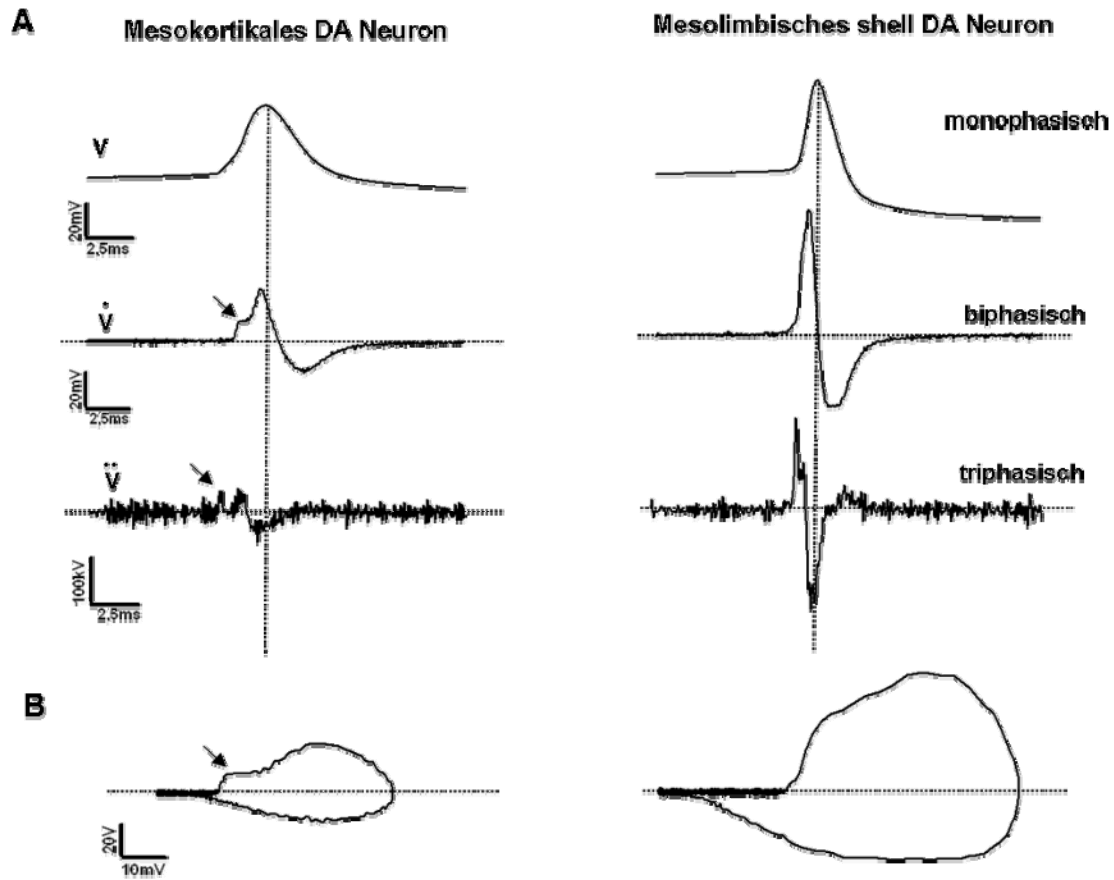


Abb. 36: Ableitung intrazellulärer Aktionspotentiale DA Neurone

[A] Aktionspotential mesokortikaler und mesolimbischer shell DA Neurone, sowie deren erste (V') und zweite Ableitung (V''). Der Pfeil markiert einen zusätzlichen Peak in der ersten Phase des Aktionspotential. Ursache hierfür ist die Trennung des Initialsegmentpotentials und der somatodendritischen Spikekomponente, die oftmals in DA Neuronen beobachtet werden kann (Grace und Bunney, 2000). [B] *Phase plot* Diagramme.

| | mesokortikal n=6 | mesoamygdalär n=9 | mesolimb. core n=7 | mesolimb. shell n=8 | meso- striatal n=12 |
|----------------|---------------------|----------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Maximum [V] | $38,7 \pm 3,7$ | $35,9 \pm 7,0$ | $43,4 \pm 2,6$ | $64,0 \pm 7,5$ | $62,3 \pm 5,6$ |
| Minimum [V] | $-20,6 \pm 1,4$ | $-17,4 \pm 2,3$ | $-25,3 \pm 1,2$ | $-36,2 \pm 2,8$ | $-47,9 \pm 4,9$ *** |

Tab. 10: Maximale und minimale Depolarisations- und Repolarisationspotentiale im *phase plot*

3.5.1.3 Antwortverhalten der DA Subpopulationen auf hyperpolarisierende Strominjektionen

DA Neurone in der SNc reagieren als Antwort auf eine hyperpolarisierende Strominjektion mit einer zeitabhängigen Verringerung des korrespondierenden Membranpotentials (die sogenannte sag Amplitude). 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. Ein Charakteristikum DA VTA Neurone ist die zeitabhängige Verzögerung der Repolarisation (rebound delay) am Ende einer hyperpolarisierenden Strominjektion (Neuhoff et al., 2002).

Die Analyse entsprechender current-clamp Messungen ergab, dass mesostriatale und mesolimbische shell DA Neurone bei einer Hyperpolarisation des Membranpotentials auf -80 mV mit einer ausgeprägten sag Amplitude reagieren. Sie betrug bei den mesostriatalen Zellen im Mittel $19,0 \pm 0,8$ mV ($n=15$) und mesolimbischen shell Zellen $14,4 \pm 1,0$ mV ($n=36$). Die mittlere sag Amplitude war signifikant kleiner bei mesokortikalen $3,8 \pm 0,5$ mV ($n=12$), mesoamygdalären $3,4 \pm 0,6$ mV ($n=9$) und mesolimbischen core DA Neuronen $6,2 \pm 1,5$ mV ($n=13$). Die Auswertung der zeitabhängigen Verzögerung der elektrischen Aktivität (rebound delay) ergab in mesostriatalen Zellen eine mittlere Verzögerung von $0,4 \pm 0,1$ s ($n=11$). Vergleichbar kurze Zeitintervalle konnten auch in mesolimbischen shell DA Neuronen gemessen werden ($0,9 \pm 0,2$ s; $n=16$). Mesokortikale ($2,2 \pm 0,5$ s; $n=12$), mesoamygdaläre ($3,0 \pm 0,5$; $n=7$) und mesolimbische core ($2,8 \pm 0,5$ s; $n=13$) DA Neurone zeigten signifikant länger andauernde Verzögerungen (Abb. 37).

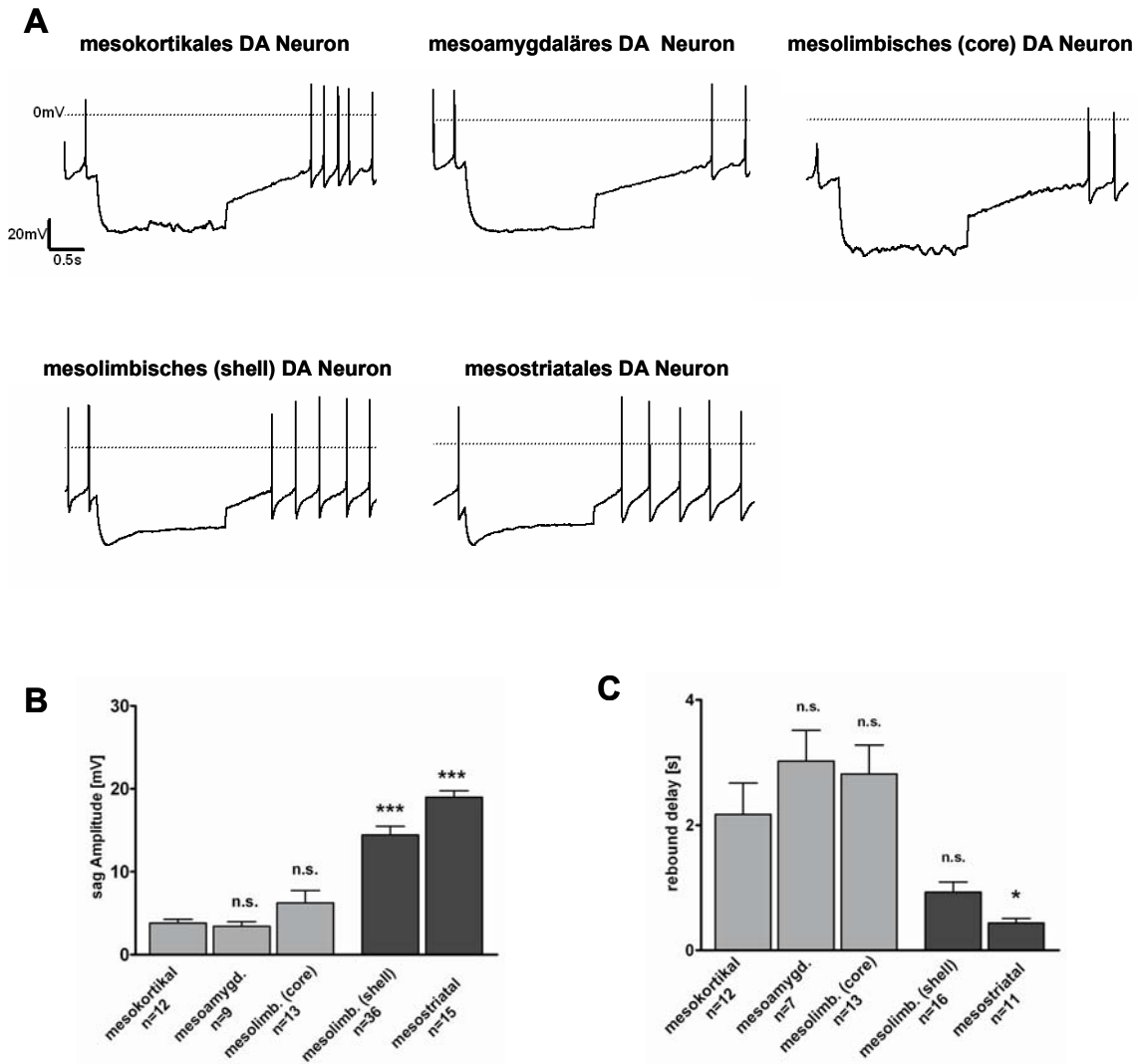


Abb. 37: Änderung des Membranpotentials identifizierter DA Neurone in Antwort auf hyperpolarisierende Strominjektionen

[A] Dargestellt sind die zeitlichen Verläufe des Membranpotentials bei -80 mV als Antwort auf die Injektion hyperpolarisierender Ströme in der current-clamp Konfiguration der whole-cell Ableitung bei identifizierten DA Neuronen. Die schwarzen Pfeile markieren die zeitabhängige Verringerung des korrespondierenden Membranpotentials (sag Amplitude) und die Verzögerung der elektrischen Aktivität nach Hyperpolarisation der Plasmamembran (rebound delay). [B] Balkendiagramm der Analyse der sag Amplituden in den DA Subpopulationen. [C] Balkendiagramm der Analyse der rebound delays in den DA Subpopulationen.

3.5.1.4 Antwortverhalten der DA Subpopulationen auf depolarisierende Strominjektionen

Von negativen Potentialen ausgehend, kommt es in Antwort auf eine rampenförmige Injektion depolarisierender Ströme bei DA Neuronen initial zu einer Auslösung von Aktionspotentialen und mit zunehmender Amplitude der depolarisierenden Ströme zur Inhibition dieser Aktivität. Man spricht von einem Depolarisationsblock (siehe Kapitel 1.1.4.2).

Abbildung 38 (A, B, C) zeigt die Feuerungsraten identifizierter DA Neurone bei einer Strominjektion von +50 pA (f_{\min}) sowie die maximalen Feuerungsraten bei Eintritt des Depolarisationsblockes (f_{\max}). Die Tabelle 11 gibt einen Überblick über die mittleren initialen und maximalen Feuerungsraten der verschiedenen DA Subpopulationen.

Interessanterweise konnten mesokortikale, mesoamygdaläre und mesolimbische core DA Neurone über eine längere Zeit hochfrequent feuern. Diese Zeit betrug stets mehr als 270 ms, was als die mittlere Dauer von Gruppenentladungen von Aktionspotentialen (Bursts) *in vivo* gilt (Grace und Bunney, 1984b). Selbst bei sehr geringen Strominjektionen (+50 pA) war ihre Frequenz stets über 10 Hz (ein Wert der *in vivo* und *in vitro* als maximale Feuerungsrate DA Neurone betrachtet wird; siehe auch Kapitel 4.7). Diese Grenze wurde von mesolimbischen shell und mesostriatalen DA Neurone nie überschritten (Abb. 38 D).

| | mesokortikal | mesoamygdalär | mesolimbisch core | mesolimbisch shell | meso-striatal |
|--------------------|----------------------|---------------------|---------------------|-------------------------|-------------------------|
| f_{\max} [Hz] | 24,8 ± 2,9 (n=13) | 19,5 ± 1,1 (n=9) | 21,1 ± 2,3 (n=8) | 9,0 ± 0,4 *** (n=28) | 9,5 ± 0,6 *** (n=13) |
| f_{\min} [Hz] | 9,0 ± 0,4 (n=6) | 8,8 ± 0,5 (n=9) | 9,0 ± 1,2 (n=8) | 3,1 ± 0,3 *** (n=10) | 2,9 ± 0,3 *** (n=5) |

Tab. 11: Feuerungsraten DA Subpopulationen

f_{\min} gibt die Feuerungsrate bei einer Strominjektion von +50 pA an; f_{\max} gibt die Feuerungsrate bei Eintritt des Depolarisationsblocks an.

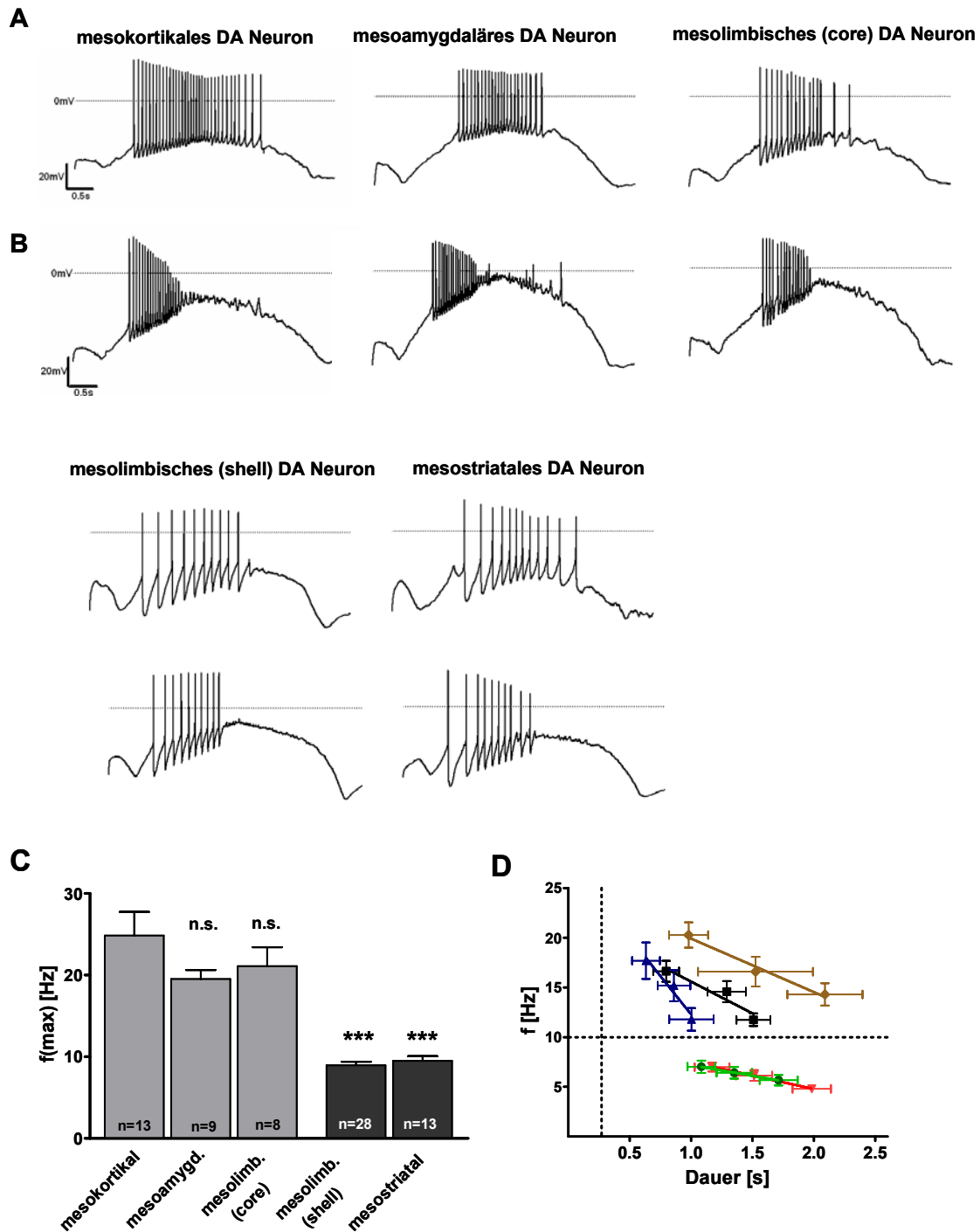


Abb. 38: *In vitro* Feuerungsraten identifizierter DA Neurone

[A] Feuerungsraten identifizierter DA Neurone bei einer depolarisierenden Strominjektion von +50 pA. [B] Maximale Feuerungsraten identifizierter DA Neurone im Depolarisationsblock. [C] Balkendiagramm, das die maximalen Feuerungsfrequenzen der DA Subpopulationen vergleicht. Die statistischen Angaben beziehen sich auf den Vergleich mit mesokortikalen Zellen. [D] Feuerungsraten identifizierter DA Neurone bei Strominjektion von +50 pA, +100 pA und +150 pA in Abhängigkeit der Feuerungsdauer. Die horizontale Linie bei 10 Hz beschreibt die bislang in Studien untersuchte maximale Grenze

für die Feuerungsrate DA Neurone *in vivo* und *in vitro* (siehe Kapitel 4.7). Die vertikale Linie bei 270 ms beschreibt die mittlere Dauer von Gruppenentladungen von Aktionspotentialen (Bursts) *in vivo* (Farbcode: braun: mesokortikal; schwarz: mesoamygdalär; blau mesolimbisch core; grün: mesolimbisch shell, rot: mesostriatal).

3.5.1.5 Charakterisierung von I_h und I_A Membranströmen in DA Subpopulationen in der voltage-clamp Konfiguration

Der I_h Strom wird oftmals als ein Marker für die Bestimmung der DA Identität verwendet (Johnson und North, 1992; Cameron et al., 1997; Margolis et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde der I_h Strom sowohl im current-clamp (siehe 3.5.1.3) als auch im voltage-clamp Modus analysiert. Weiterhin wurde der Kaliumsauswärtsstrom durch A-Typ Kanäle gemessen, dessen Inaktivierungskinetik durch die Zeitkonstante τ beschrieben wird (siehe Kapitel 2.2.2.9).

Abbildung 39 (A,B) zeigt die korrespondierenden Ionenströme I_h bei einem Kommandopotential von -100 mV und I_A bei -40 mV in der voltage-clamp Konfiguration. Während in mesokortikalen ($23,4 \pm 6,4$ pA, n=8), mesoamygdalären ($20,7 \pm 4,9$ pA, n=8) und mesolimbischen core ($20,5 \pm 5,0$ pA, n=13) nur ein geringer I_h Strom nachweisbar war, besaßen mesolimbische shell ($158 \pm 24,9$ pA, n=15) und mesostriatale DA Neurone ($179,4 \pm 31,7$ pA, n=6) signifikant größere Einwärtsströme.

Entsprechende Gruppen zeigten sich auch bei der Analyse des Inaktivierungsverhaltens des A-Typ Kaliumkanals in den verschiedenen DA Subpopulationen (Abb. 39 A,C). Während DA Neurone in der SN und lateralen VTA durch eine kleine Inaktivierungszeitkonstante, gekennzeichnet waren (mesostriatal: $33,9 \pm 4,9$ ms, n=6; mesolimbisch shell: $33,6 \pm 2,4$ ms, n=15), inaktivierten A-Typ Kaliumkanäle in DA Neurone der medialen VTA deutlich langsamer (mesokortikal: $103,4 \pm 19,5$ ms, n=8; mesoamygdalär: $70,3 \pm 14,5$, n=8; mesolimbisch core: $102,4 \pm 15,0$ ms, n=13).

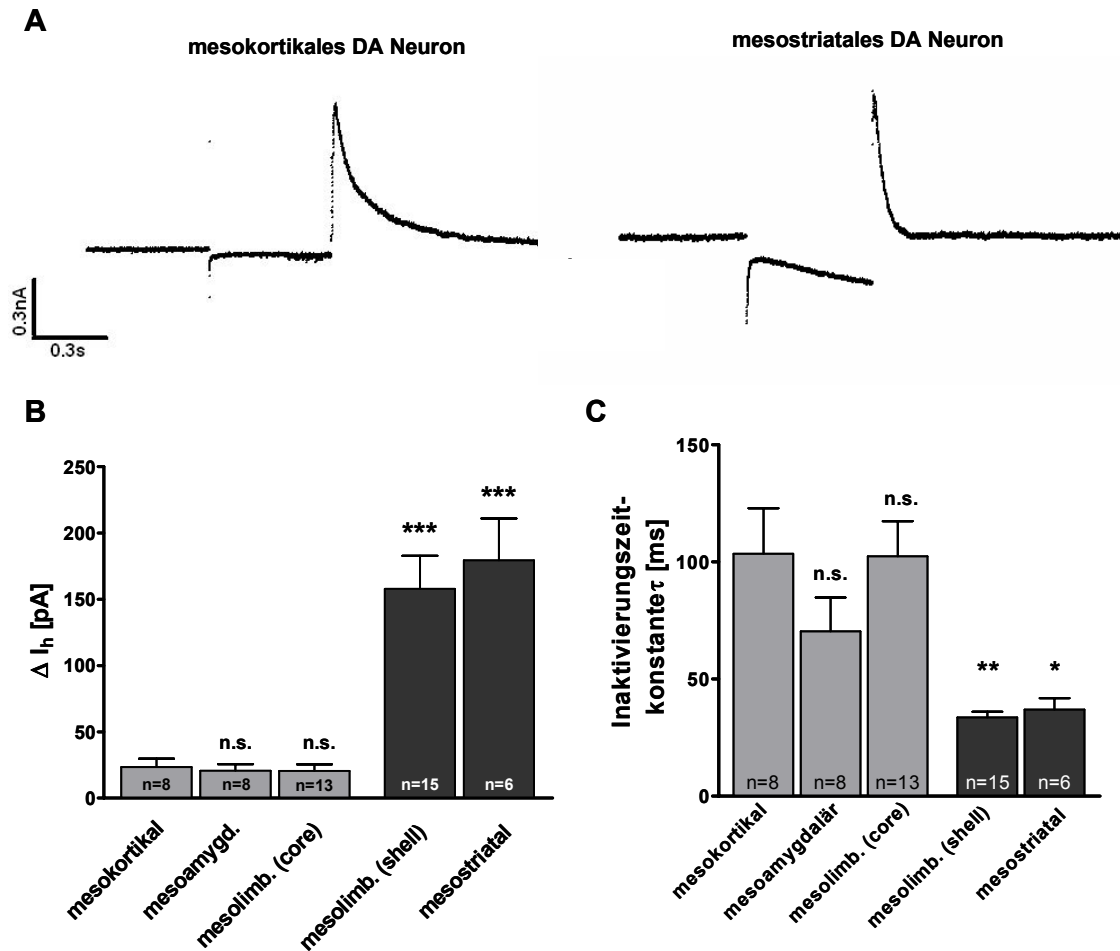


Abb. 39: I_h und I_A Ströme unterscheiden sich in den DA Subpopulationen

[A] Darstellung der Ionenströme I_h bei -100 mV und I_A bei anschließender Depolarisierung im unterschwelligen Bereich auf -40 mV im whole-cell Modus. Nicht gezeigt sind mesoamygdaläre und mesolimbische core / shell DA Neurone. [B] Balkendiagramm, das den mittleren I_h Einwärtsstroms bei -100 mV für die entsprechenden DA Subpopulationen wiedergibt. [C] Balkendiagramm, das die mittlere Inaktivierungskonstante τ des A-Stroms bei -40 mV für die verschiedenen Subpopulationen verdeutlicht.

3.5.1.6 Inaktivierungskinetiken von A-Typ Membranströme DA Subpopulationen in der outside-out Konfiguration

Weiterhin wurde das Inaktivierungsverhalten des A-Stroms in der zellfreien Ableitung (outside-out) untersucht. Die Bestimmung der Inaktivierungszeitkonstante τ in der outside-out Konfiguration erfolgte bei +20 mV. Mesostriatale ($5,9 \pm 0,6$ ms, n=6) und mesolimbische shell DA Neurone ($6 \pm 0,6$ ms, n=13) wiesen auch hier eine signifikant schnellere Inaktivierungskinetik auf während die Inaktivierungskinetiken der A-Typ Kaliumkanäle der

mesokortikalen ($18,2 \pm 5,3$ ms, $n=5$), mesoamygdalären ($17,7 \pm 2,5$ ms, $n=7$) und mesolimbischen core ($13,3 \pm 2,4$ ms, $n=11$) signifikant langsamer waren. Abbildung 40 zeigt exemplarisch für mesokortiale und mesostriatale DA Neurone die korespondierenden Kaliumauswärtsströme bei verschiedenen Haltepotentialen.

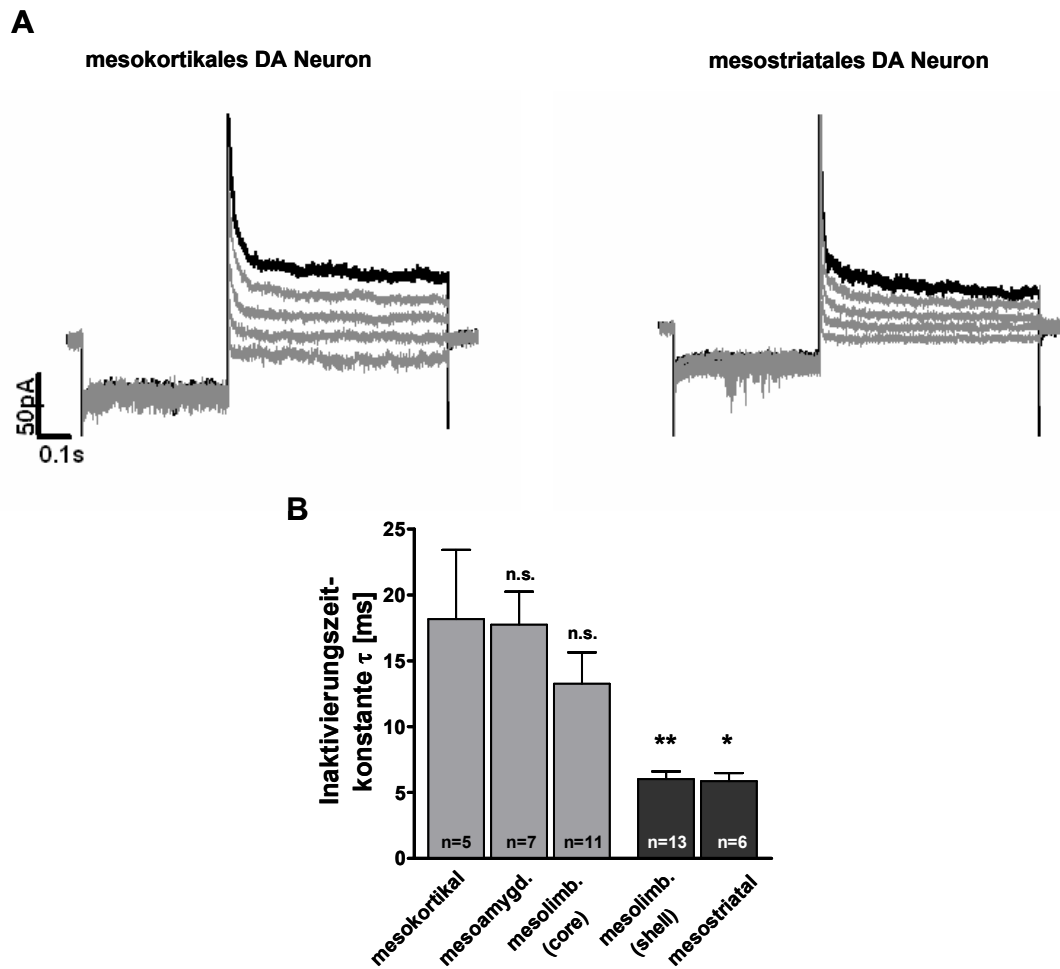


Abb. 40: Retrograd identifizierte Neurone besitzen unterschiedliche A-Strom Inaktivierungskinetiken

[A] Kaliumauswärtsströme (I_A) bei verschiedenen Haltepotentialen (-60 mV, -40 mV, -20 mV, 0 mV (grau) und +20 mV (schwarz)) in der outside-out Konfiguration. Mesoamygdaläre und mesolimbische core/shell DA Neurone sind nicht gezeigt. [B] Balkendiagramme der mittleren Inaktivierungskonstante tau (bei +20 mV) für die jeweiligen DA Subpopulationen im outside-out Modus.

3.5.2 Korrelation elektrophysiologischer Eigenschaften mit immunhistochemischer Analyse von dopaminergen Projektionen

Zur Bestimmung der neurochemischen Identität wurden die Zellen im Verlauf der elektrophysiologischen Messung mit 0,1 % Neurobiotin gefüllt und nach immunhistochemischer Aufarbeitung am konfokalen Mikroskop auf TH Immunreaktivität untersucht. Abbildung 41 zeigt exemplarisch mit Neurobiotin gefüllte Zellen aus den jeweiligen DA Subpopulationen. Für die Analyse der elektrophysiologischen Daten unter 3.5.1 wurden ausschließlich Zellen verwendet, die eine positive Immunreaktivität für TH aufwiesen. Weiterhin wurden auch Zellen gemessen, die keine TH Immunreaktivität zeigten. Auf eine Charakterisierung dieser nicht-dopaminergen Zellen innerhalb der jeweiligen Subpopulationen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen. Dennoch sollen aufgrund der besonderen Bedeutung der mesokortikalen Projektion elektrophysiologische Unterschiede innerhalb dieser Population näher erläutert werden. Die hier beschriebenen mesokortikalen nicht-dopaminergen Neurone waren vor allem in der medialen VTA (Nucleus linearis rostralis, RLi) des intermediären Mittelhirns lokalisiert. Ihr elektrophysiologisches Profil war dem der mesokortikalen dopaminergen Zellen ähnlich (leicht erhöhte Feuerungsrate bei etwas kürzeren Aktionspotentialen). Charakteristisch war die Abwesenheit des rebound delays bei den nicht-DA mesokortikalen Neuronen. Weiterhin konnte die Abwesenheit des A-Stroms im voltage-clamp Modus (keine messbare oder nur sehr schnelle Inaktivierungskinetik des Kaliumauswärtsstroms bei -40 mV) als eindeutiges Differenzierungsmerkmal für die DA Identität verwendet werden. Tabelle 12 gibt einen Überblick über das elektrophysiologische Profil nicht-dopaminerner (TH-immunnegativ) im Vergleich zu dopaminergen (TH-immunpositiv) mesokortikalen Neuronen.

| | Spontan- frequenz [Hz] | max. Feuer- frequenz [Hz] | sag Amplitude [mV] | AP- Dauer [ms] | AP- Amplitude [mV] | AP- Schwelle [mV] | NHP [mV] |
|------------------------|------------------------------|---------------------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| TH- negativ | 7,2 ±0,8* (n=10) | 22,3 ±1,6 (n=11) | 6,5 ±1,2* | 4,5 ±0,3* (n=9) | 23,7 ±2,5 (n=9) | -20,1 ±1,6** (n=9) | -45,9 ±1,2 (n=9) |
| TH- positiv | 3,8 ±0,4 (n=5) | 24,8 ±2,9 (n=13) | 3,8 ±0,5 (n=12) | 6,7 ±0,6 (n=15) | 19,1 ±2,6 (n=6) | -27,0 ±1,2 (n=6) | -47,7 ±1,6 (n=15) |

Tab. 12: Elektrophysiologische Parameter mesokortikaler TH-positiver und TH-negativer Neurone

Gezeigt werden elektrophysiologische Parameter TH-immunnegativer (d.h. nicht-DA) und TH-immunpositiver (d.h. DA) mesokortikaler Neurone. Sterne geben signifikante Unterschiede im ungepaarten T-Test an (Feuerungsrate: p=0,0135, sag Amplitude: p=0,0381, AP-Dauer: p=0,0162, AP-Schwelle: p=0,009).

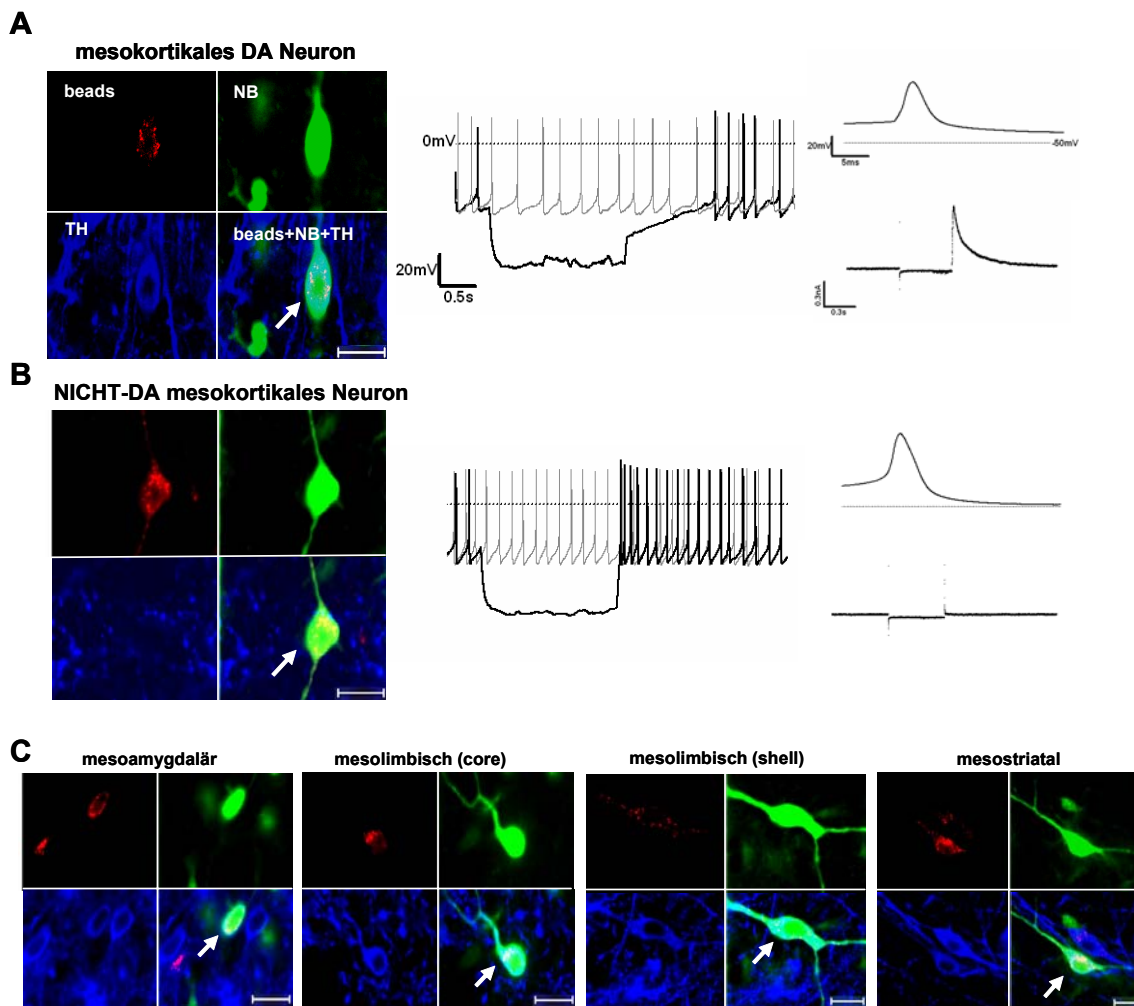


Abb. 41: Korrelation elektrophysiologischer Parameter mit immun-histochemischer Charakterisierung

[A] Dargestellt ist eine konfokal mikroskopische Aufnahme (links, 63x) einer mit Neurobiotin (NB) gefüllten mesokortikalen Zelle, die eine positive TH Immunreaktivität aufweist. Rechts: das charakteristische elektrophysiologische Profil dieser Zellen nach Injektion hyperpolarisierender Ströme bei -80 mV (grau unterlegt: Spontanaktivität ohne Strominjektion). Einblendungen: Aktionspotential in hoher zeitlicher Auflösung (oben), sowie Aktivierung makroskopischer Ionenströme I_h (-100 mV) und I_A (-40 mV) in der voltage-clamp Konfiguration (whole-cell) (unten). [B] Entsprechend ein mit Neurobiotin gefülltes mesokortikales Neuron, das keine TH Immunreaktivität aufweist (links) sowie dessen biophysikalische Profil (rechts). [C] Exemplarische Abbildungen von mit Neurobiotin gefüllten Zellen der übrigen DA Subpopulation (Farbcode für alle Aufnahmen: rot-Beads, grün- Neurobiotin, blau-TH; Balken für alle Abbildungen: 20 μ m).

3.5.3 Das mesokortikolimbische DA System ist dual

Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass im mesokortikolimbischen DA System offensichtlich zwei unterschiedliche dopaminerge Phänotypen existieren. Sie lassen sich durch anatomische, morphologische, immunhistochemische und elektrophysiologische Kriterien klar voneinander abgrenzen. Zur statistischen Analyse wurde eine hierarchische Clusteranalyse (Ward Methode) durchgeführt. Es ist ein systematisches Verfahren bei dem anhand ausgewählter Merkmale bzw. Variablen versucht wird, homogene Fallgruppen zu identifizieren. Als Variablen wurden elektrophysiologische Parameter (Zellgröße [pF], AP-Schwelle [mV], AP-Dauer [ms], Nachhyperpolarisation [mV], maximale Feuerungsrate [Hz], sowie Minimum und Maximum des phase plots [V]) identifizierter DA Neurone verwendet. Insgesamt wurden 38 Zellen analysiert (mesokortikal n=6, mesoamygdalär n=9, mesolimbisch core n=7, mesolimbisch shell n=7, mesostriatal n=9). Abbildung 42 zeigt das Ergebnis der Clusteranalyse in Form eines Dendrogramms. Verbundene vertikale Linien kennzeichnen verbundene Objekte bzw. Zellen. Die horizontale Achse beschreibt den Fehlerquadratkoeffizienten und wurde auf 0 bis 25 normiert. Die Zuordnungsübersicht verdeutlicht den Fusionierungsprozess von der ersten (alle Objekte isoliert) bis zur letzten Stufe (alle Objekte in einem Cluster vereint). Die Spalte des Koeffizienten gibt die gemessene Distanz (bzw. nach Ward den Fehlerquadratkoeffizienten) zwischen den Objekten bzw. Clustern wieder und wächst mit zunehmender Heterogenität. Ein sprunghafter/überproportionaler Anstieg der Fehlerquadratsumme lässt sich zwischen Schritt 36 und 37 beobachten. Wenn man nun die Anzahl der

fusionierten Objekte/Cluster (Clusterzahl) gegen die Fehlerquadratsumme aufträgt, ergibt sich nach dem *Elbow*-Kriterium eine Clusterzahl von 2. Demnach ist eine zweiteilige Gruppeneinteilung die optimale Lösung.

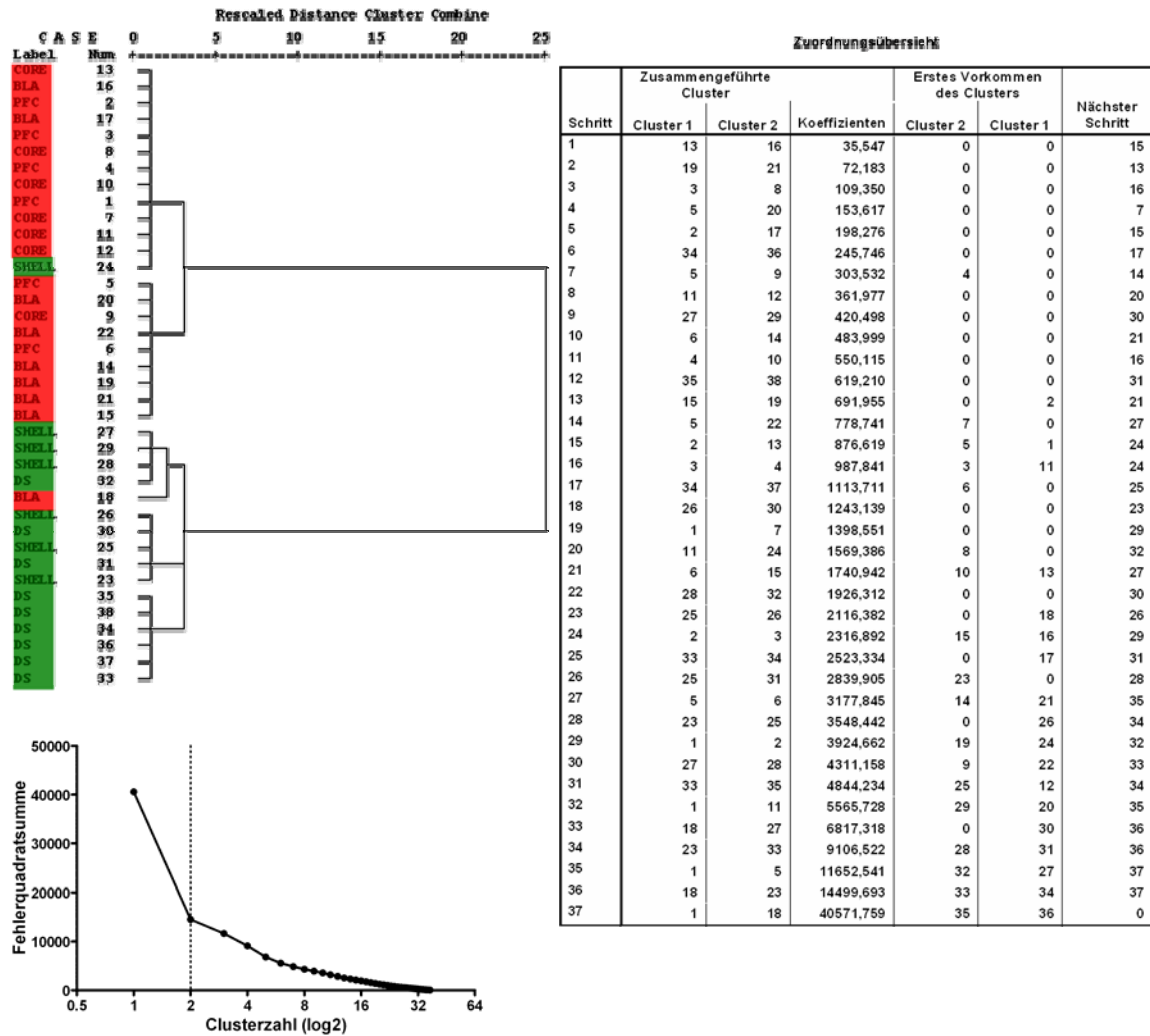


Abb. 42: Ergebnis der hierarchischen Clusteranalyse

Oben, links: Dendrogramm. Der rote und grüne Farbcode markiert die zwei Gruppen DA Neurone. Rechts: Zurordnungsübersicht. Unten, links: Struktogramm, dass die Bestimmung der optimalen Clusterzahl (gestrichelte Linie) nach dem *Elbow*-Kriterium (überproportionaler Anstieg der Fehlerquadratsumme bei Fusion äußerst heterogener Cluster) verdeutlicht.

Demnach können mesokortikale, mesoamygdaläre und mesolimbische core DA Neurone statistisch von mesolimbischen shell und mesostriatalen DA Neuronen

in zwei Gruppen abgegrenzt werden. Dabei konnte innerhalb jeder Gruppe nur ein Ausreißer detektiert werden (Zelle 24 "SHELL" und Zelle 18 "BLA").

Um die Qualität der Gruppierung der Clusteranalyse zu prüfen, wurden eine Diskriminanzanalyse durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.7.3). Tabelle 13 faßt die Ergebnisse zusammen.

| Eigenwert | Kanonische Korrelation | Wilk's-Lambda | Klassifikations- ergebniss |
|-----------|------------------------|---------------|-------------------------------|
| 7,457 | 0,939 | 0,118 | 100 % |

Tab. 13: Ergebnisse der Diskriminanzanalyse

Die Resultate zeigen, dass die von der Clusteranalyse erstellten Gruppierungen zu 100 % korrekt klassifiziert wurden. Der niedrige Wilk's-Lambda Wert verdeutlicht die hohe Trennkraft der Gruppierungen auf der Diskriminanzfunktion. Durch die Analyse des sogenannten Diskriminanzfunktionskoeffizienten konnte die diskriminatorische Bedeutung der Variablen ermittelt werden. Demnach hat die Nachhyperpolarisation die größte diskriminatorische Bedeutung.

3.6 Keine Hinweise auf funktionelle somatodendritische Autorezeptoren in mesokortikalen DA Neuronen

3.6.1 Mesokortikale DA Neurone reagieren nicht auf Badapplikation von Dopamin

Um pharmakologische Untersuchungen durchführen zu können, wurden perforated patch Experimente an retrograd identifizierten Zellen durchgeführt. Dabei wurde zunächst die Spontanaktivität der Zelle für mindestens 10 Minuten aufgezeichnet. Zur maximalen Aktivierung der somatodendritischen D2 Rezeptoren wurde 100 μ M Dopamin (Dopaminhydrochlorid; gelöst in ACSF-Patchlösung) appliziert. Die Badapplikation des frisch angesetzten Dopamins führte bei allen untersuchten mesostriatalen Neuronen (n=7; maximale Hyperpolarisation: $-61,7 \pm 4,7$ mV) zu einer Hyperpolarisation. Weiterhin reagierten auch mesolimbische core (n=5; $-62,8 \pm 7,3$ mV), mesolimbische shell (n=7; $-63,8 \pm 1,0$ mV) und mesoamygdaläre Neurone (n=3; $-59,1 \pm 3,5$ mV) auf

die Applikation von 100 μ M Dopamin (Applikationsdauer: 340 s) mit einer kompletten Inhibition der Spontanaktivität reagierten. Nach dem Auswaschen des Dopamins kam es bei allen untersuchten Zellpopulationen zu einer Wiederaufnahme der Spontanaktivität (Abb. 43 A untere Reihe und B). Mesolimbische core DA Neurone begannen nach einer kurzen, jedoch kompletten Hyperpolarisation bereits während der Applikation von Dopamin zu feuern (siehe Einschub in Abb. 43 B). Dieser Effekt war bei den mesoamygdalären DA Zellen (2 von 3 Zellen) weniger stark ausgeprägt und gar nicht bei den mesostriatalen und mesolimbischen shell DA Neuronen zu beobachten. Mesokortikalen DA Neurone (n=7) reagierten gar nicht auf die Applikation von Dopamin. Die Spontanaktivität blieb unbeeinflusst während der gesamten Applikationsdauer unverändert (Abb. 43 A obere Reihe). Die Verifizierung der dopaminergen Identität erfolgte bei den perforated patch Experimenten anhand etablierter elektrophysiologischer Kriterien (siehe Kapitel 3.5.2) nach dem Auswaschen des Dopamins in der whole-cell Konfiguration.

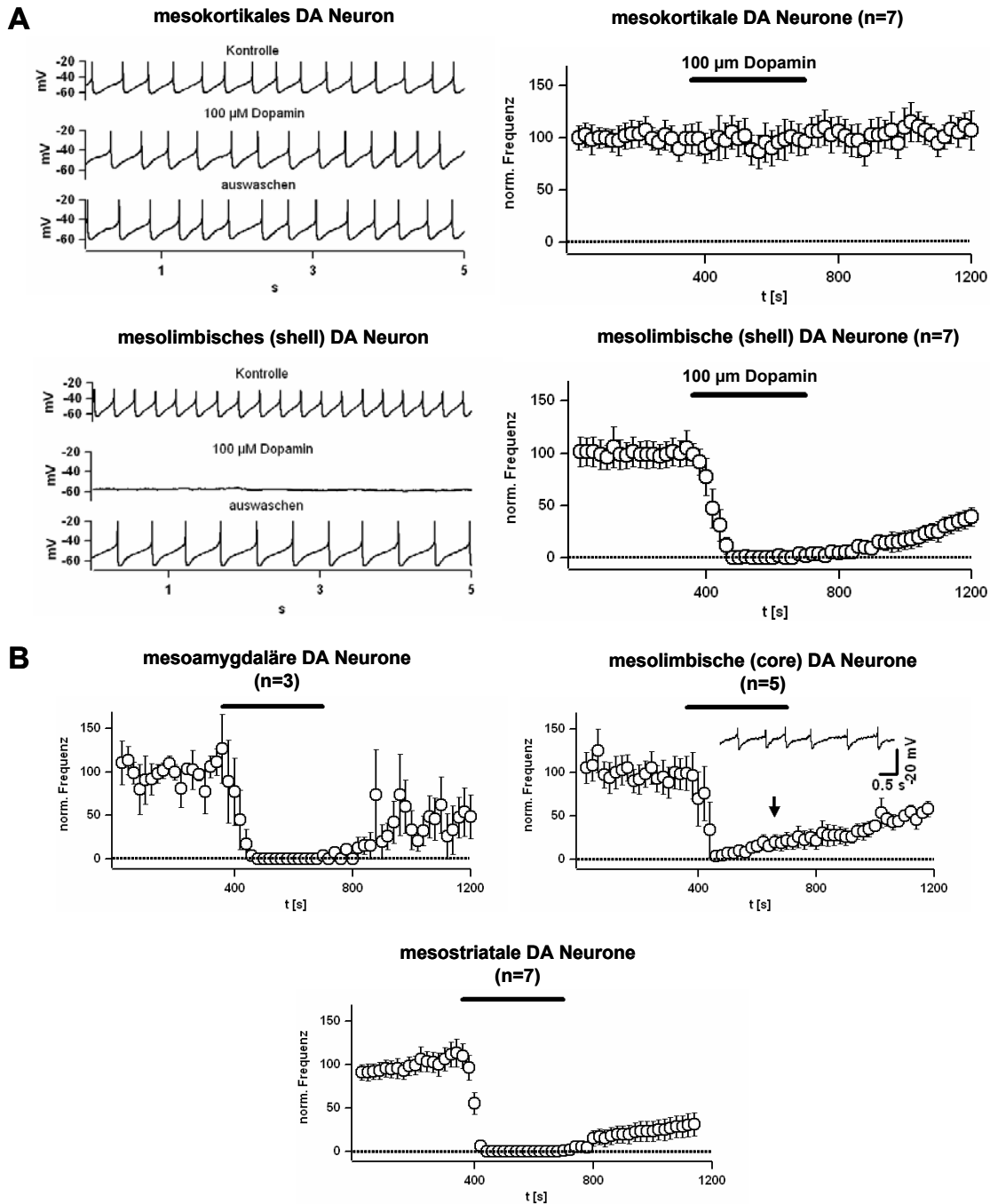


Abb. 43: Antwort retrograd identifizierter DA Neurone auf akute Dopamin Applikation

[A] Dargestellt ist die Spontanaktivität im perforated patch eines mesokortikalen (links, oben, gemessen von Prof. Roeper) und eines mesolimbischen shell (links, unten) DA Neurons unter Kontrollbedingungen, nach Applikation von 100 μ M Dopamin, sowie nach dem Auswaschen. Rechts, sowie in [B] Normierte Frequenz der Spontanaktivitäten im zeitlichen Verlauf für die Gesamtzahl der untersuchten Zellen. Der schwarze Balken gibt jeweils die Zeitdauer der Dopaminapplikation an. Man beachte, dass mesolimbische core DA Neurone bereits während der Dopamin Applikation beginnen zu feuern (Einschub bei 660 s; angezeigt durch den schwarzen Pfeil).

3.6.2 Testung verschiedener D2 Rezeptor Antikörper

Für die Analyse der D2 Rezeptor Expression auf Proteinebene musste zunächst ein geeigneter Antikörper ausgewählt werden. Hierzu wurden vier verschiedene Antikörper ausgetestet:

- Anti-Dopamin D2 Rezeptor (L/S); polyklonal; Kaninchen-Antiserum; Chemicon AB1558
- Anti-Dopamin Rezeptor D2 (L/S); polyklonal; Kaninchen Ig G Antikörper; Chemicon AB5084P
- Dopamin D2 Rezeptor Antikörper (L/S); polyklonal; Kaninchen Ig G Antikörper; Biotrend D2R11-A
- D2 Antikörper; polyklonal; Kaninchen Ig G Antikörper (nicht kommerziell, zur Verfügung gestellt von A.I. Levey)

Die Testung der Antikörper erfolgte mittels DAB Immunperoxidase Reaktionen (Standard DAB Protokoll). Die Antikörper wurden dabei in Verdünnungsreihen zu 1:250, 1:500 und 1:1000 angesetzt. Zusätzlich zu den mesencephalen Schnitten wurden striatale Hirnschnitte angefertigt (alle Schnitte 50 µm), von denen bekannt ist, dass sie eine hohe D2 Rezeptor Expression aufweisen (Mansour et al., 1990). Als Kontrollesexperiment wurden Negativkontrollen (Inkubation ohne Primärantikörper) durchgeführt.

Die Abbildung 44 (A-C) zeigt, dass das Antiserum Chemicon AB1558 bzw. der Antikörper Biotrend D2R11-A und der nicht-kommerzielle Antikörper keine hinreichende Spezifität und Sensitivität aufweisen. Im Mittelhirn und Striatum sind nur sehr schwache diffuse und unspezifische (z.B. keine signifikanten Unterschiede zwischen striatalen und nicht-striatalen Regionen) Färbungen zu erkennen. Der Chemicon Antikörper AB5084P (Abb. 44 D) ergab die besten Ergebnisse. Mittels des Standard DAB Protokolls konnte eine schwache striatale D2 Immunreaktivität nachgewiesen werden. Jedoch waren im Mittelhirnschnitten in der SN keine zellulären Färbungen sichtbar und es konnten keine signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle beobachtet werden.

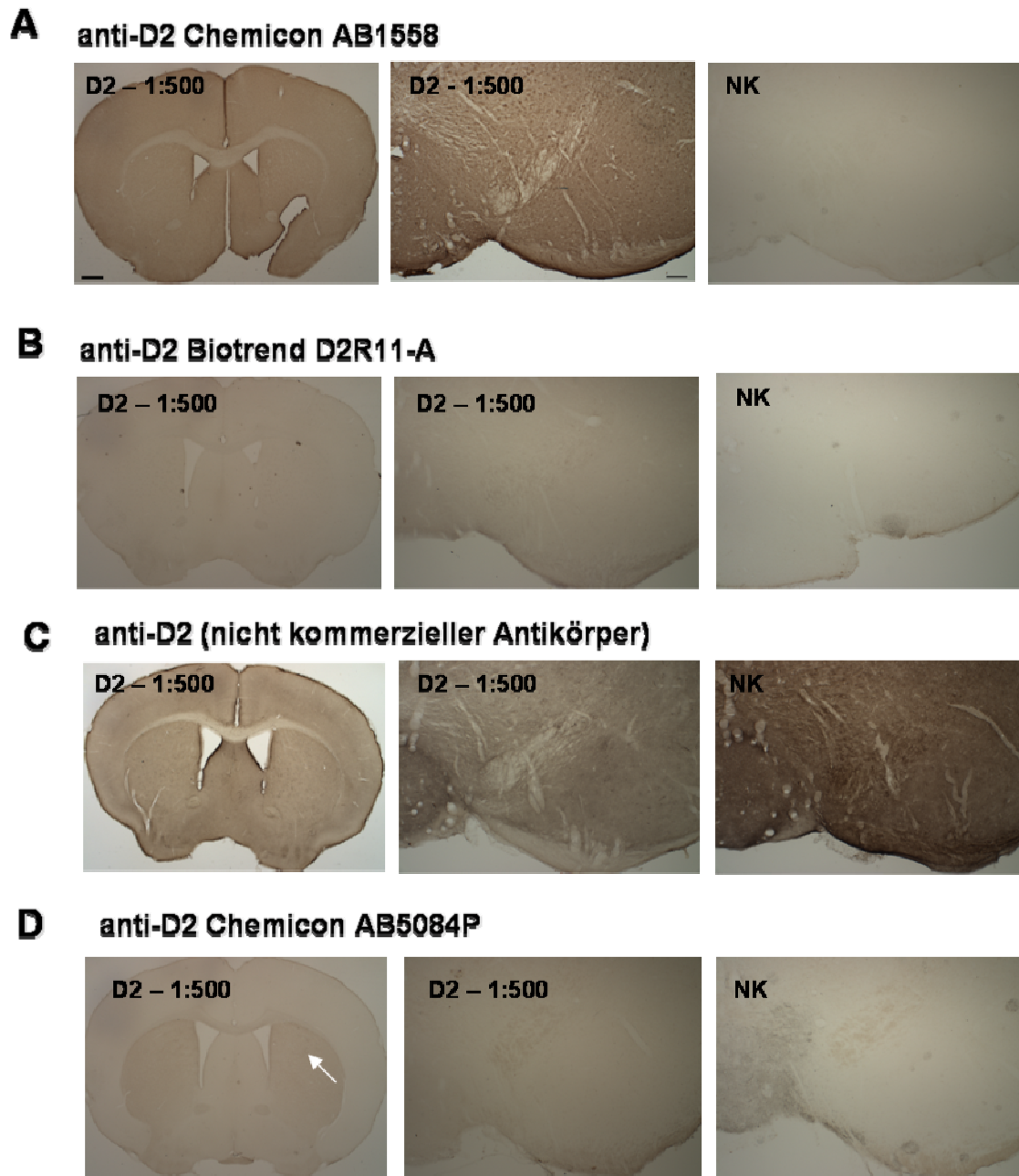


Abb. 44: Testung von vier verschiedenen D2 Rezeptor Antikörpern

[A] DAB Immunfärbung (Standard DAB Protokoll: A-D) mit einem D2 Rezeptor Antiserum Chemicon AB1558 (1:500) im Striatum (links, 2x) und Mittelhirn (Mitte, 10x). Rechts: Negativkontrolle (NK), d.h. Färbung ohne Primärantikörper (10x) (Balken für alle 2x Abbildungen: 0,5 mm; Balken für alle 10x Abbildungen: 200 μ m). [B] Testung des D2 Antikörpers Biotrend D2R11-A im Striatum (links, 2x) und Mittelhirn (Mitte, 10x, jeweils 1:500). Rechts: Negativkontrolle im Mittelhirn (10x). [C] Testung eines nicht kommerziellen D2 Antikörpers. Links: Striatum (2x). Mitte: Mittelhirn (10x, jeweils 1:500). Rechts: Negativkontrolle im Mittelhirn (10x) [D] Testung des D2 Antikörper Chemicon AB5084P im Striatum (links, 2x) und Mittelhirn (Mitte, jeweils 1:500, 10x). Man beachte die schwache D2 Immunreaktivität im Striatum (Pfeil). Rechts: Negativkontrolle im Mittelhirn (10x).

Um die Färbung des Chemicon Antikörpers AB5084P zu verstärken, wurden DAB Färbungen mit Hilfe des modifizierten Protokolls (siehe Kapitel 2.2.3.2) durchgeführt. Dies führte zu einer starken striatalen D2 Immunreaktivität. Auch im Mittelhirn waren nun nigrale Zellfärbungen erkennbar, die nicht in der Negativkontrolle beobachtet werden konnten (Abb. 45 A).

Kontrollexperimente in der D2KO Maus (PFA-fixierte Gehirne zur Verfügung gestellt von E. Borrelli) bestätigten, dass es sich bei dem Signal um eine spezifische D2 Immunreaktivität handelt (Abb. 45 B).

Da der Chemicon Antikörper AB5084P die besten Ergebnisse lieferte, wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen (TH und D2) koronaler Mittelhirnschnitte (50 μm) in C57Bl/6 Mäusen angefertigt. Die konfokal mikroskopischen Aufnahmen zeigen ein sehr starkes D2 Hintergrundsignal, das vom zellulären D2 Signal nur sehr schwer bzw. gar nicht differenziert werden konnte (Abb. 45 C). Qualitative Aussagen über die D2 Rezeptorexpression in DA SN und VTA Neuronen waren nicht möglich.

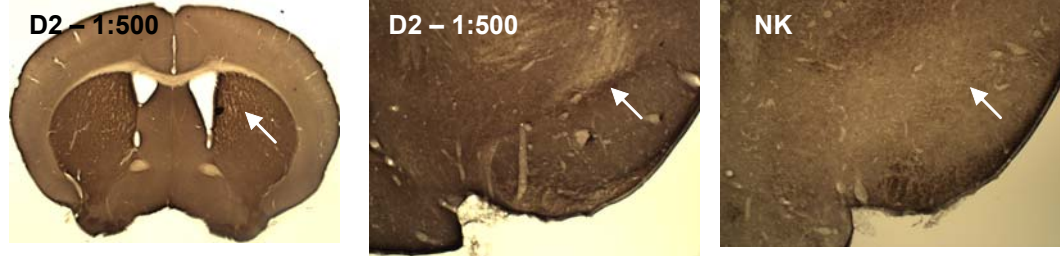
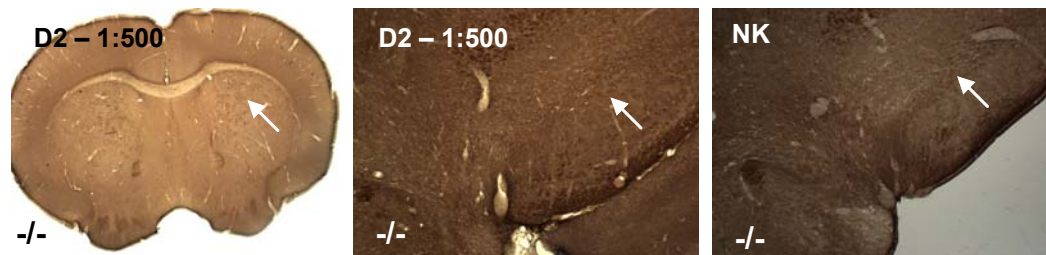
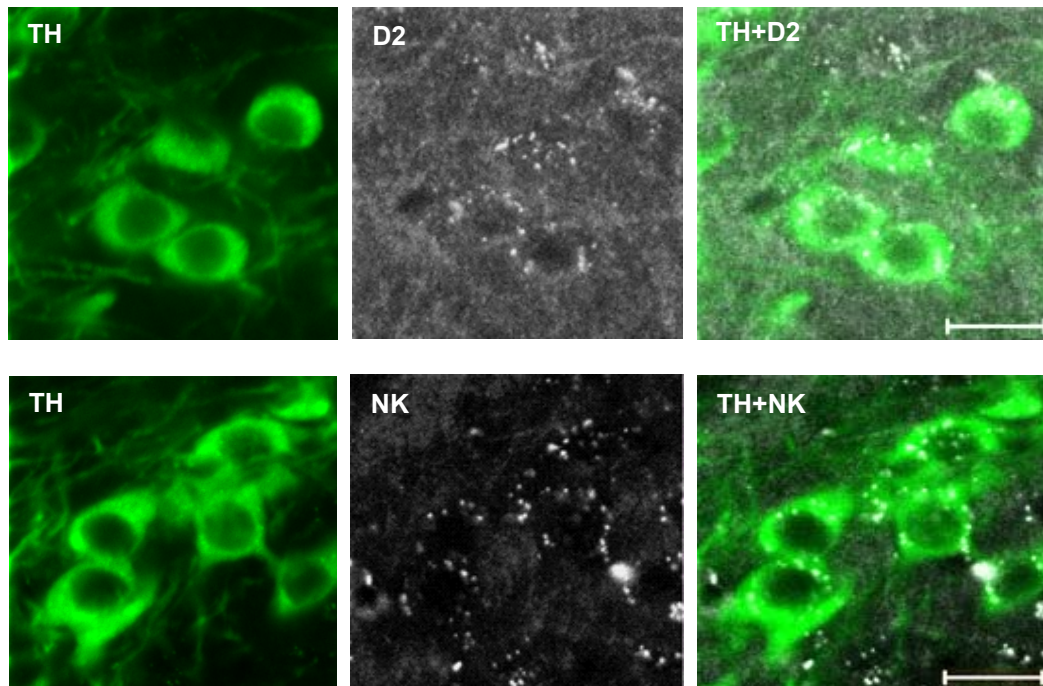
A anti-D2 Chemicon AB5084P (mod. Prot.)**B anti-D2 Chemicon AB5084P in der D2 KO Maus (mod. Prot.)****C anti-D2 Chemicon AB5084P Immunfluoreszenzfärbung**

Abb. 45: Testung des D2 Antikörpers Chemicon AB5084P in der Wildtyp (C57Bl/6) und in der D2KO (-/-) Maus

[A] DAB Immunfärbung (modifiziertes Protokoll) mit dem D2 Rezeptor Antikörper Chemicon AB5084P (1:500) im Striatum (links, 2x, Pfeilspitze zeigt auf das Striatum) und Mittelhirn (Mitte, 10x, Pfeilspitze zeigt auf die SNc) in der C57Bl/6 Maus. Im Gegensatz zu Negativkontrolle (NK, rechts, 10x, Färbung ohne Primärantikörper, der Pfeil weist auf die

SNc) ist eine deutliche D2 Immunreaktivität in der SNc und im Striatum erkennbar [B] Kontrollexperimente in der D2KO Maus (-/-) mit dem D2 Antikörper Chemicon AB5084P (1:500) Links: Striatum (2x, Pfeil). Mitte: Mittelhirnschnitt (der Pfeil zeigt auf die SNc, 10x). Rechts: Negativkontrolle im Mittelhirn (der Pfeil verweist auf die SNc, 10x). In der D2KO Maus ist weder im Striatum noch in der SNc eine D2 Immunreaktivität nachweisbar. [C] Konfokal mikroskopische Aufnahme (63x) unter Verwendung des Chemicon AB5084P D2 Antikörpers (Verdünnung: 1:500) in der SNc in der C57Bl/6 Maus (grün: TH, 488 nm; weiß: D2, 647 nm (obere Reihe). Negativkontrolle ebenfalls in der SNc (untere Reihe) (Balken: 20 µm).

3.6.3 Semi-quantitative Analyse des G-Protein gekoppelten einwärts rektifizierenden Kaliumkanals 2 (GIRK2) in DA Subpopulationen

Da im Rahmen der unter 3.6.2 beschriebenen Testserien kein geeigneter D2 Rezeptor Antikörper etabliert werden konnte, wurde die Expressionsanalyse auf Proteinebene auf GIRK2 beschränkt, da hier ein bereits etablierter Antikörper verwendet werden konnte. Abbildung 46 zeigt die GIRK2 Immunreaktivität in koronalen Mittelhirnschnitten (50 µm) nach DAB Immunhistochemie. Unterschiede in der GIRK2 Immunreaktivität sind vor allem zwischen der medialen VTA im Vergleich zu der lateralen VTA sowie SN zu erkennen. In Kapitel 3.2.2 wurde gezeigt, dass in der lateralen VTA präferentiell mesolimbische shell DA Neurone lokalisiert sind; dagegen mesokortikale, mesoamygdaläre und mesolimbische core DA Neurone hauptsächlich in der medialen VTA zu finden sind. Diese immunhistochemischen Ergebnisse deuten daher auf eine differentielle GIRK2 Proteinexpression. Für die Analyse retrograd identifizierter DA Neurone wurden Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen mit gegen TH und GIRK2 gerichteten Antikörpern angefertigt. Die konfokale Analyse der zellulären Immunreaktivitäten erfolgte im caudalen, intermediären und rostralen Mittelhirn.

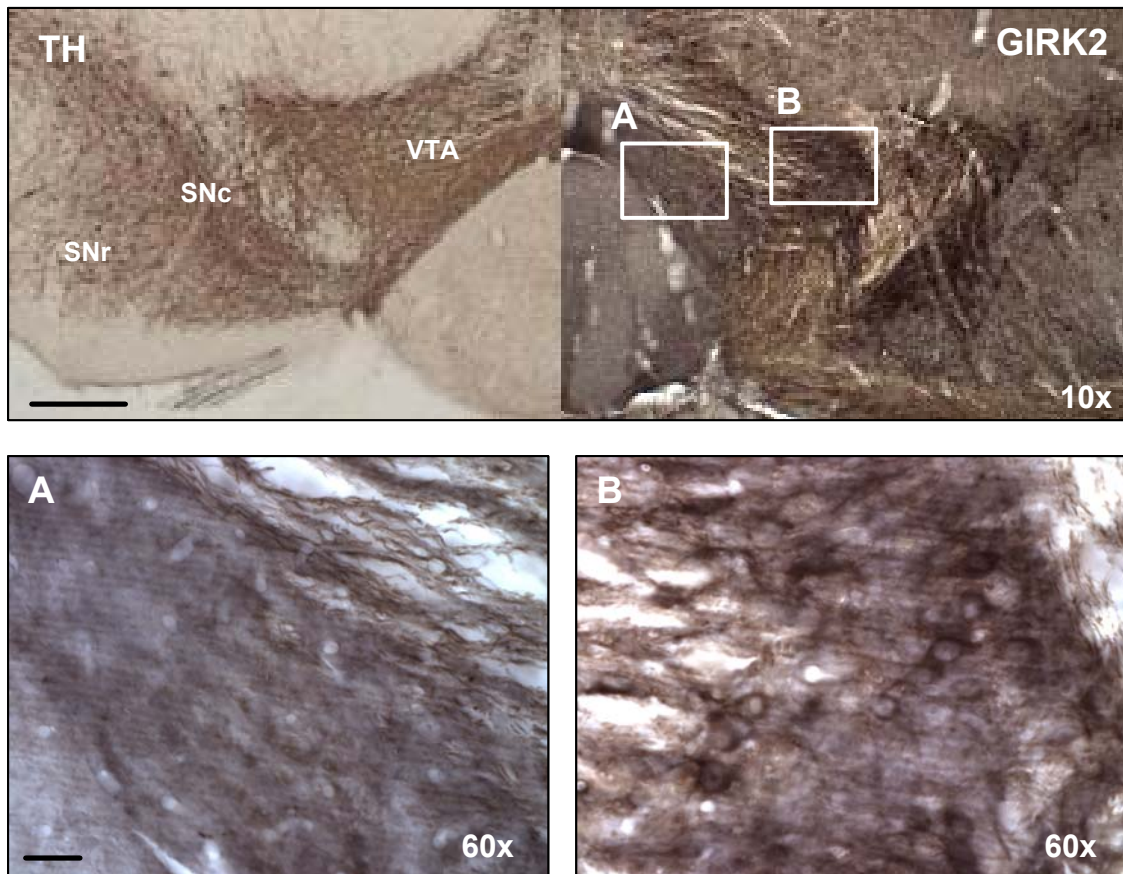


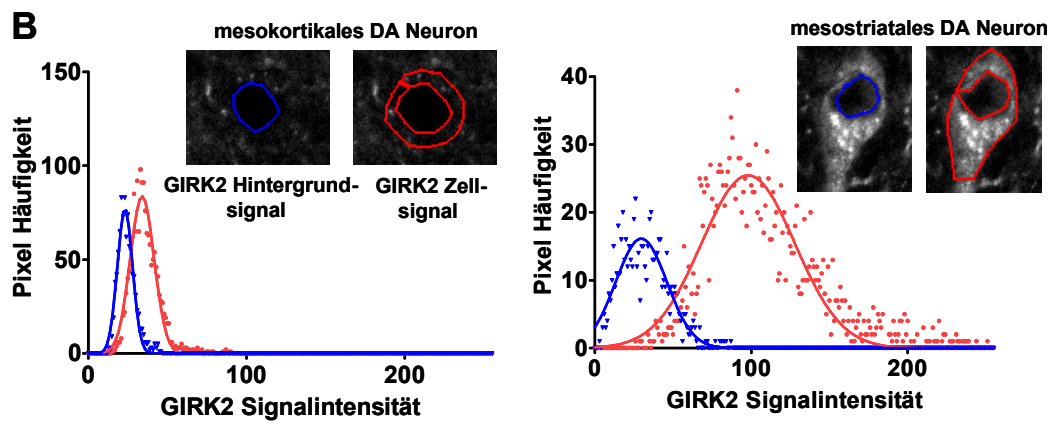
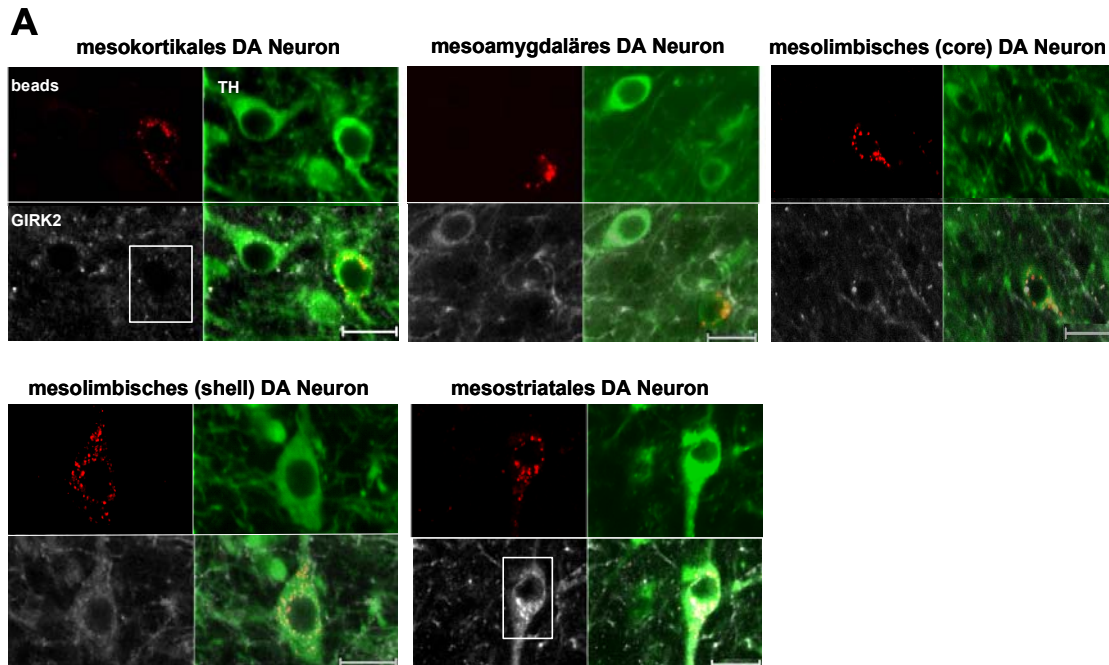
Abb. 46: Differentielle GIRK2 Proteinexpression im Mittelhirn

Koronaler Mittelhirnschnitt nach DAB Immunhistochemie mit einem GIRK2 Antikörper (rechts) bzw. zum Vergleich mit einem TH Antikörper (links) (Balken: 200 μm). Die unteren Aufnahmen zeigen 60-fach vergrößerte Ausschnitte der GIRK2 Immunreaktivitäten in der medialen (A), sowie in der lateralen VTA (B) (Balken: 20 μm).

Abbildung 47 A zeigt konfokal mikroskopische Aufnahmen der GIRK2 Immunreaktivität in retrograd identifizierten TH-positiven Zellen. Zum Vergleich der GIRK2 Signalintensitäten zwischen den DA Subpopulationen, wurde eine semi-quantitative Analyse durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.5).

Während das GIRK2 Hintergrundsignal zwischen den DA Subpopulationen nicht signifikant ($p > 0,05$) unterschiedlich war (mesokortikal: $33,6 \pm 3,0$ $n=10$; mesoamygdalär: $25,8 \pm 3,3$ $n=6$; mesolimbisch core: $24,6 \pm 2,2$ $n=10$; mesolimbisch shell: $25,3 \pm 1,8$ $n=13$; mesostriatal $25,3 \pm 3,9$ $n=10$) konnten beim zellulären GIRK2 Signal signifikante Unterschiede nachgewiesen werden (mesokortikal: $50,2 \pm 3,3$ $n=10$; mesoamygdalär: $36,0 \pm 3,2$ $n=6$; mesolimbisch core: $51,6 \pm 5,4$ $n=10$; mesolimbisch shell: $75,5 \pm 4,0$ $n=13$; mesostriatal: $99,2 \pm$

5,9 n=10) (Abb. 47 C). Das relative GIRK2 Immunsignal (Verhältnis zelluläres zu Hintergrundsignal) war bei mesokortikalen ($1,5 \pm 0,1$ n=10), mesoamygdalären ($1,4 \pm 0,1$ n=6) und mesolimbischen core ($2,1 \pm 0,2$ n=10) DA Neuronen signifikant niedriger im Vergleich zu mesolimbischen shell ($3,1 \pm 0,2$ n=13) und mesostriatalen DA Neuronen ($4,6 \pm 0,5$ n=10) (Abb. 47 D).



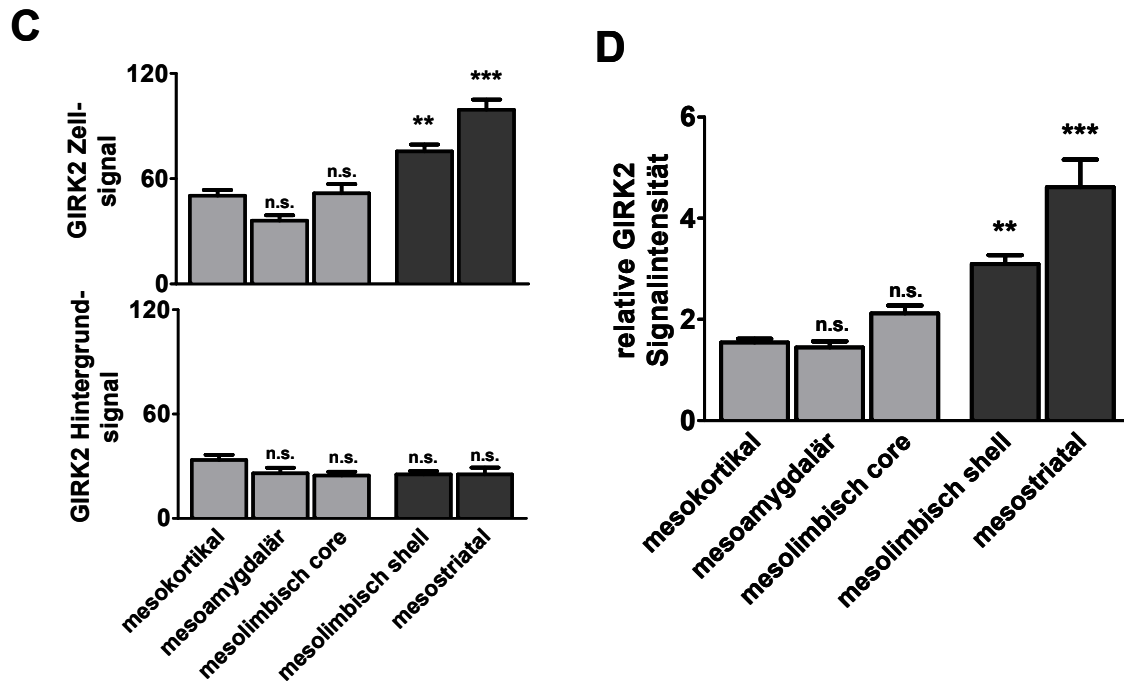


Abb. 47: Semi-quantitative Analyse der GIRK2 Immunreaktivitäten für retrograd identifizierte DA Neurone

[A] Konfokal mikroskopische Aufnahmen (63-fache Vergrößerung). Farbcode: rot-Beads, grün-TH, weiß-GIRK2 (Balken: 20 μm). [B] Häufigkeitsverteilungen der GIRK2 Signalintensitäten der Zelle (rote Gaussfunktion) und des jeweiligen Hintergrunds (blaue Gaussfunktion) exemplarisch für mesokortikale und mesostriatale DA Neurone (aus Abbildung (A)). Die Einfügungen verdeutlichen die Markierungen der Zelle (rot) und des Hintergrunds (definiert als Nukleus, blau) in Adobe Photoshop® [C] + [D] Balkendiagramm der GIRK2 Signalintensitäten des Hintergrunds und der Zelle sowie die relative GIRK2 Intensität von Zelle zu Hintergrund.

4 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden in den folgenden Abschnitten im Kontext der bisherigen Literatur diskutiert. In Anlehnung an die Zielsetzung der Arbeit wird dabei auf methodische Aspekte, die Anatomie des mesokortikolimbischen DA System, spezifische Marker für Subpopulationen DA Neurone sowie auf elektrophysiologischen Eigenschaften dieser Neurone eingegangen. Weiterhin soll der Erkenntnisfortschritt, der durch diese Arbeit ermöglicht wurde, klar gemacht werden und die Bedeutung der vorliegenden Arbeit für zukünftige Studien diskutiert werden.

4.1 Methodische Aspekte

Für die erfolgreiche Durchführung von Tracing-Experimenten sind Parameter wie Selektivität, Anzahl der markierten Zellen und Reproduzierbarkeit von großer Bedeutung.

Bei geringer Selektivität des Tracings kommt es zu Kontaminationen anderer, benachbarter Hirnareale mit der Tracersubstanz. Für alle immunzytochemischen, molekularbiologischen und elektrophysiologischen Experimente wurden daher nur Tiere verwendet, bei denen die Selektivität nicht von den im Kapitel 3.2.1 dargestellten seriell rekonstruierten Hirnschnitten abwich. Ein gemeinsames Merkmal vieler Fluoreszenztracer ist, dass das Injektionsareal in ein zentrales, intensiv markiertes Areal (*core*) und eine umgebende schwächer markierte Region (*halo*) unterteilt werden kann. Die Aufnahme des Tracers in die Terminalen erfolgt in der *core* Region (Apps et al., 1991). Im Gegensatz zu vielen anderen Fluoreszenztracern (z.B. "*fast blue*") existiert bei den relativ großen fluoreszierenden Mikrosphären (Beads, Durchmesser 50 nm) eine klar abgegrenzte *core* Region. Dies ermöglicht eine exakte Markierung von Hirnarealen (Apps et al., 1991; Köbbert et al., 2000). Dennoch waren minimale Kontaminationen nicht immer vollständig vermeidbar. Beispielsweise kam es beim Tracing des NAc shell zu Spuren der Beads im Pipettentrakt, der durch das

dorsale Striatum verlief. Dies könnte die hohe Anzahl mesolimbischer shell DA Neurone in der SN erklären (siehe auch Kapitel 4.2).

Quantitative Studien haben gezeigt, dass keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Anzahl der durch die Beads retrograd markierten Zellen und dem Injektionsvolumen existiert (King et al., 1998). Andererseits beeinflusst die Größe des Injektionsgebietes wesentlich die Anzahl der retrograd markierten Neurone (King et al., 1998). Für eine ausreichende Anzahl retrograd markierter Neurone ist bei Hirnarealen mit geringer DA Innervationsdichte (PFC, BLA) eine größere Ausbreitung der Tracersubstanz notwendig im Vergleich zu Hirnstrukturen mit einer sehr hohen DA Innervationsdichte (Striatum).

Wie bereits erwähnt ist das Diffusionsvermögen der Beads im Injektionsareal begrenzt. Beim Tracing kortikaler Hirnareale führte dies anfangs, trotz der gewünschten hohen Selektivität, zu einer sehr geringen Anzahl (maximal eine bis zwei Zellen) markierter DA Neurone. Versuche, die Anzahl der markierten Neurone durch die Verwendung eines anderen retrograden Tracers (Alexa Fluor® 555 konjugiertes Cholera Toxin B; Molecular Probes, Eugene, USA), die zu einer größeren Verteilung um die Injektionsstelle führen zu erhöhen, waren den Experimenten mit den Beads unterlegen. Hier war das Problem ein starkes Photobleaching wodurch eine Identifizierung der markierten Neurone wesentlich erschwert wurde. Um dennoch die Anzahl der markierten DA Neurone zu maximieren, konnte bei kortikalen Tracing-Experimenten eine Methode etabliert werden, bei der multiple Injektionen an definierten Stellen im prälimbischen und infralimbischen Kortex zu einer großen Ausbreitung der Beads bei erhaltener hoher Selektivität führten. Vergleichbare Versuche blieben beim Tracing des cingulären Kortex ohne Erfolg bzw. es konnten jeweils nur äußerst wenige TH-positive Zellen (ungefähr 5 bis 10 DA Zellen) markiert werden. Die Ursache könnte eine im Vergleich zum mPFC noch geringere DA Innervationsdichte des cingulären Kortex sein. TH-Färbungen zeigten eine sehr geringe Innervationsdichte TH-immunpositiver Fasern im cingulären Kortex (Vergleich Abb. 19, Cg1, Cg2). Somit konnten die Beads vermutlich von nur sehr wenigen Terminalen endozytotisch aufgenommen und retrograd transportiert werden.

Kontaminationen anderer Hirnareale waren beim Tracing des cingulären Kortex aufgrund dessen anatomischen Position ausgeschlossen.

Weiterhin war die Wartezeit nach Injektion der Beads entscheidend für die Anzahl der im Mittelhirn markierten DA Neurone. Während bei Injektionen in das dorsolaterale Striatum bereits nach zwei Tagen eine Vielzahl von markierten DA Neuronen beobachtet werden konnte, war für das Tracing anderer Hirnareale eine deutlich längere Wartezeit notwendig (z.B. mPFC: 21 Tage). Ursachen könnten beispielsweise längere axonale Transportwege oder eine geringe Innervationsdichte sein (z.B. mPFC, BLA; siehe Abb. 18 (PrL, IL) und 19 (BLA)). Generell akkumulierten deutlich weniger Beads in mesokortikalen und mesoamygdalären DA Neuronen im Vergleich zu mesostriatalen DA Neuronen.

Da die Orientierung nur anhand stereotaktischer Merkmale (Bregma, Lambda) und den Koordinaten der drei Raumrichtungen erfolgte, war die Reproduzierbarkeit der Tracing Experimente im Wesentlichen von der biologischen Variabilität (Verlauf der Schädelnähte, Gewicht- und Größenunterschiede) individueller Tiere abhängig. Tracing-Experimente, bei denen Injektionen in große Hirnstrukturen, wie z.B. das dorsale Striatum erfolgten, waren von der biologischen Variabilität weniger abhängig im Vergleich zu Injektionen in kleinere Hirnarealen, wie beispielsweise die BLA oder der prälimbische und infralimbische Kortex.

Für die Double-Tracing-Experimente war es von großer Bedeutung, dass die unterschiedlichen Tracer mit gleicher Effizienz aufgenommen und retrograd transportiert werden. Experimente, bei denen eine Mischung roter und grüner Beads im gleichen Verhältnis injiziert wurde, haben gezeigt, dass jede markierte Zelle sowohl rote als auch grüne Beads enthielt. In dieser Arbeit verwendete rote und grüne Beads werden mit äquivalenter Effizienz endozytotisch aufgenommen und retrograd transportiert (Apps and Garwicz, 2000; Katz and Iarovici, 1990; Köbbert et al., 2000).

4.2 Neuroanatomie des mesokortikolimbischen DA Systems

In der vorliegenden Arbeit wurde die Topographie mesokortikolimbischer DA Neurone im Mittelhirn der Maus analysiert. Als Vergleichspopulation wurden mesostriatale DA Neurone untersucht.

Studien, die die ascendierenden Projektionen der VTA beschreiben wurden erstmals 1957 publiziert. In den vergangenen Jahrzehnten sind eine Vielzahl von Studien erschienen in denen durch unterschiedliche Techniken (z.B. Immunhistochemie, Läsionsstudien, Histofluoreszenzanalysen, pharmakologische Studien) und in verschiedenen Spezies (Hühner, Katzen, Hamster, Affen, Tauben, vor allem aber in Ratten) die Afferenzen der VTA (dopaminerge und nicht-dopaminerge) analysiert wurden. Eine Übersicht über die Studien von 1957 bis 1984 ist in Oades und Halliday, 1987 zu finden. Die vorliegende Arbeit ist die erste, die eine detaillierte Darstellung der Topographie der DA VTA Projektionen für die Maus liefert. Darüberhinaus konnte eine räumliche Segregation verschiedener mesokortikolimbischer DA Subsysteme gezeigt werden. DA Neurone, die den mPFC (prälimbischer und infralimbischer) Kortex, die BLA und die core Subregion des NAc innervieren wurden präferentiell in der medialen VTA des intermediären Mittelhirns nachgewiesen. Die Position ihrer Zellkörper war auf den Nukleus paranigralis (PN) und den Nukleus parabrachialis pigmentosus (PBP) beschränkt. DA Neurone, die in den lateralen shell des NAc projizieren waren vor allem in der lateralen VTA (PBP) lokalisiert und konnten nicht im PN gefunden werden. Mesostriatale DA Neurone lagen hauptsächlich in der SN pars compacta.

Mesokortikale DA Neurone waren zu 99 % in der VTA (PN, PBP, IF, RLi, CLi) und nur 1 % der Zellen war in der SN lokalisiert. Diese Befunde sind im Einklang mit Swanson (1982), der zeigte, dass mesokortikale DA Neurone in der Ratte hauptsächlich in der dorsomedialen VTA lokalisiert sind. Weiterhin konnte er auch markierte TH-positive Neurone im RLi, CLi und markierte Zellen in der SNc nachweisen. Albanese und Minciacchi (1983) wiesen mesokortikale Neurone in

der medialen VTA an der Grenze zum Nukleus interpeduncularis (IPN) und in der SNc nach, untersuchten allerdings nicht deren neurochemische Identität.

Mesoamygdaläre DA Neurone wurden in der vorliegenden Arbeit vor allem in der VTA (etwa 81 %), z.T. aber auch in der SN (etwa 19 %) nachgewiesen. Mesoamygdaläre Neurone, die in der SN lokalisiert sind, wurden ebenfalls in der Studie von Swanson (1982) detektiert. Auf prozentuale Angaben wurde jedoch verzichtet, da man davon ausging, dass es sich aufgrund von Kontaminationen des Tracers im Striatum um nigrostriatale DA Neurone handeln müsste. In der vorliegenden Arbeit waren bei einem Tier leichte Spuren der Beads im Pipettentrakt im dorsalen Striatum zu sehen. Da selbst kleinste dorsostriatale Kontaminationen zu einer Vielzahl von markierten SN Neuronen führen, könnte dies die relativ hohe Anzahl der mesoamygdalären SN Neurone erklären.

Mesoaccumbale Neurone wurden in vielen Studien zumeist über die gesamte VTA verteilt nachgewiesen (Beckstead et al., 1979; Carter und Fibiger, 1977; Fallon und Moore, 1978). Explizit erwähnen Albanese und Minciacchi (1983) mesoaccumbale Neurone oberhalb des IPN in der medialen VTA, sowie in der lateralen VTA und medialen SNc. Diese Studien unterschieden nicht zwischen der core und shell Subregion des NAc. Phillipson und Griffith (1980) zeigten, dass Zellen im PBP in den lateralen NAc und Neurone im IF und PN in den medialen NAc projizieren. In der vorliegenden Arbeit erfolgte erstmals eine systematische Differenzierung zwischen DA Neuronen die den core bzw. den lateralen shell des NAc innervieren. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Segregation der anatomischen Positionen der mesoaccumbalen DA Projektionsneurone in Bezug auf die Subregionen core (hauptsächlich in der medialen VTA) und shell (hauptsächlich in der lateralen VTA). Weiterhin konnte jeweils eine hohe Anzahl markierter Zellen in der SN nachgewiesen werden (core: 31 %; shell: 50,8 %). Ursache für Zellmarkierungen in der SN könnten auch hier geringe Kontaminationen im dorsalen Striatum sein. Aufgrund des Pipettentraktes waren minimale Spuren des Tracers nicht vermeidbar (Vergleich oben mesoamygdaläre DA Neurone). Ebenso konnte Swanson (1982) nach retrograder Markierung des NAc (keine Unterscheidung zwischen core / shell)

DA Neurone in der medialen und lateralen VTA, sowie eine hohe Anzahl markierter Neurone in der medialen SNc nachweisen. Er verwies auch hier auf Kontaminationen im dorsalen Striatum.

Seit 1974 wird kontrovers diskutiert, ob der cinguläre Kortex von DA Neuronen der SN und / oder der VTA innerviert wird. Lindvall und Kollegen (1974) postulierten, dass der cinguläre Kortex DA Projektionen aus der lateralen SN erhält. Andere Studien berichten wiederum von Projektionen aus der VTA (Emson und Koob, 1978; Swanson, 1982). Aufgrund der sehr geringen Anzahl markierter mesocingulärer DA Neurone wurde im Kontext dieser Arbeit auf eine systematische Analyse verzichtet (mögliche Ursachen im Kapitel 4.1 diskutiert). Die anekdotisch markierten TH-positiven Neurone, mit nachgewiesenen Projektionen in den cingulären Kortex, waren allerdings grundsätzlich in der VTA lokalisiert. Eine Zuteilung entsprechender Subnuklei war aufgrund der geringen Zellzahlen und breiten Verteilung innerhalb der VTA jedoch nicht möglich.

Die Mehrheit der aufsteigenden Projektionen der VTA verläuft ipsilateral. Dies wurde durch Tracing-Studien striataler (Chronister et al., 1976), amygdalärer (Fallon, 1981) sowie weiterer mesokortikolimbischer Hirnareale (Porrino und Goldman-Rakic, 1982) nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit waren maximal 8 % der markierten Zellen auf der kontralateralen Seite des Mittelhirns lokalisiert. Kontralaterale Zellen waren hauptsächlich bei den mesokortikalen, mesoamygdalären und mesolimbischen core DA Neuronen zu beobachten. Dagegen waren kaum mesolimbische shell und mesostriatale DA Neurone auf der kontralateralen Seite lokalisiert. Swanson (1982) beschreibt, dass etwa 1 bis 10 % der mesencephalen DA Neurone die Projektionen kreuzen. Ähnliche Resultate stammen auch von Fallon (1988). In seiner Studie waren ungefähr 1 bis 5 % der markierten Zellen auf der kontralateralen Seite lokalisiert.

Die Modelldarstellung der dorso-ventralen Topographie (siehe Kapitel 1.1.2) beruht vor allem darauf, dass nach dem Tracing kortikolimbischer Hirnareale retrograd markierte Neurone in der SN nachgewiesen wurden (Fallon, 1988; Björklund und Dunnett 2007b). Es wurde bereits diskutiert, dass markierte nigrale

Neurone aus Kontaminationen der Beads im dorsalen Striatum resultieren könnten. Aufgrund der anatomischen Position der NAc und der BLA war dies beim Tracing dieser Areale leicht möglich. Dagegen waren mesokortikale DA Neurone kaum in der SN lokalisiert (3/293 Zellen; in n=5 Tiere). Bei einigen Tracing-Experimenten des mPFC konnte eine sehr hohe Anzahl markierter DA Neurone in der SN beobachtet werden. Diese Experimente waren jedoch stets durch deutliche dorsostriatale Kontaminationen gekennzeichnet und wurden aus diesem Grund nicht in die Analyse aufgenommen. Es ist somit sehr wahrscheinlich, dass die markierten Neurone in den hier diskutierten Studien aus dorsostriatalen Kontaminationen resultieren. Diese Möglichkeit wird insbesondere dann deutlich wenn man bedenkt, dass in den Studien von Swanson (1982), Albanese und Minciacchi (1983) sowie Fallon (1981) die fluoreszierenden Tracerfarbstoffe "*true blue*", "*fast blue*" und "*nuclear yellow*" verwendet wurden. Im Gegensatz zu den Beads zeigen diese Tracer eine große Verteilung im Injektionsareal (Köbber et al., 2000). Kontaminationen anderer Hirnareale könnten leicht möglich sein. Die Darstellung der Injektionsstellen erfolgte in den hier diskutierten Arbeiten jedoch stets nur in exemplarischer und schematischer Weise. Es wurde also keine komplette serielle Rekonstruktion durchgeführt.

Die Zunahme der nigralen kortikalen Projektionen könnte auch phylogenetische Ursachen haben. Eine bemerkenswerte phylogenetische Veränderung bei der Evolution der DA Projektionen ist, dass es im Gegensatz zu den subkortikalen Projektionen, bei den kortikalen zu einer starken Zunahme der Innervationsterritorien des Neokortex kommt (Oades und Halliday, 1987; Björklund und Dunnett, 2007b). Während die mesokortikale DA Innervation in der Ratte auf präfrontale, cinguläre und entorhinale Kortexareale beschränkt ist, wird beim Primaten und Menschen nahezu der gesamte Neokortex innerviert (Lewis et al., 1997; Williams und Goldman-Rakic, 1998; Oades und Halliday, 1987). Daher könnte man spekulieren, dass es von der Maus über die Ratte (alle bislang diskutierten Studien wurden in Ratten durchgeführt) bis hin zum Primaten zu einer Zunahme der nigrokortikalen DA Projektionen kommt.

Scheibner und Tork (1987) berichten, dass in der Katze mindestens 10 kortikale Hirnareale (darunter auch sensorische und motorische Areale) von Neuronen der VTA innerviert werden. Die dichteste Innervation erhalten präfrontale, insuläre, cinguläre und visuelle Kortices. Beim Primaten sind mesokortikale DA Projektion aus den Regionen A8 (RRA), A9 (SN) und A10 (VTA) beschrieben. Dabei wird insbesondere über eine deutliche Zunahme der A8 und A9 DA Neurone, die in den PFC projizieren berichtet (Williams und Goldman-Rakic, 1998). In der vorliegenden Arbeit konnten keine mesokortikalen DA Neurone in A8 gefunden werden. Deutch und Kollegen (1988) konnten ebenfalls keine mesokortikalen Projektionen in der Ratte in A8 finden. Dagegen konnten Fallon, 1981 und Swanson, 1982 mesokortikale DA Neurone in der Ratte in A8 nachweisen. Allerdings ist es möglich, dass es sich bei den beiden letztgenannten Studien aufgrund von dorsostriatalen Kontaminationen auch um nigrostriatale DA Neurone handelt (siehe oben).

Mit Hinblick auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit scheinen A8 und A9 im Nager im Wesentlichen grundlegende striatale (also v.a. die Motorik betreffend) Funktionen zu vermitteln, dagegen nimmt die Bedeutung dieser Regionen bei höher entwickelten Säugern bei der Vermittlung kortikaler Funktionen zu. Wie bereits im Kapitel 1.4.1 beschrieben wurde, wird vermutet, dass der mPFC des Nagers ähnliche funktionelle Aufgaben wie der dorsolaterale Kortex des Primaten übernimmt. Somit könnte es im Laufe der Evolution zu einer Lateralisierung nicht nur von funktionell ähnlichen kortikalen Hirnarealen, sondern auch von mesencephalen DA Neuronen, deren Terminale diese Regionen innervieren, gekommen sein (Gaspar et al., 1992).

4.3 Kollateralisation des mesokortikolimbischen DA Systems

Um zu untersuchen, ob individuelle DA Neurone des mesokortikolimbischen DA Systems zu multiplen Hirnarealen projizieren, wurden zwei verschiedene retrograde Tracer (rote und grüne Beads) in kortikale (mPFC) und subkortikale Hirnareale (NAc core oder NAc shell) derselben Hemisphäre injiziert. Es konnte

gezeigt werden, dass mesokortikale und mesolimbische core DA Neurone in unmittelbarer Nachbarschaft in der VTA lokalisiert sind. Weiterhin konnten nur wenige doppelt markierte DA Neurone gefunden werden (PFC+NAc core: 12,5 %; PFC+NAc shell: 4,3 %). Dies zeigt, dass mesokortikale DA Neurone kaum axonale Abzweigungen (Kollaterale) besitzen, die subkortikale Hirnareale, also insbesondere den in dieser Arbeit untersuchten NAc shell bzw. core, innervieren. Erste Doppel-Tracing Studien wurden von Fallon (1981) in der Ratte durchgeführt. Die Fluoreszenztracer Nuclear yellow, Granular blue und Propidiumiodid wurden in striatale (dorsomediales Striatum), septale und kortikale (PFC) Hirnareale injiziert. Im Anschluss konnten zumeist einfach markierte Zellen, wenige doppelt markierte und vereinzelt dreifach markierte Neurone in der VTA und SN beobachtet werden. Es wurden jedoch keine prozentualen Angaben gemacht. Problematisch war, dass Granular blue aufgrund eines starken bleaching Effektes nur etwa 30 bis 60 s im UV Licht sichtbar war, wodurch nicht ausgeschlossen werden konnte, dass mehr doppelt markierte Neurone vorhanden waren als detektiert wurden. In einer umfangreichen Studie untersuchte Swanson (1982) axonale Verknüpfungen mesencephaler VTA Neurone durch doppeltes retrogrades Tracing diverser Hirnareale (entorhinaler Kortex, laterales Septum, dorsaler Hippocampus, laterale Habenula, Locus coeruleus, NAc, Amygdala und PFC) in der Ratte. Der prozentual größte Anteil doppelt markierter Neurone konnte beim Tracing des PFC und NAc (9 %) ermittelt werden. Albanese und Minciacchi (1983) führten ebenfalls Doppel-Tracing Studien verschiedener Hirnareale (laterales Septum, dorsales Striatum, NAc, laterale Habenula) in der Ratte durch. Alle getesteten Kombinationen führten grundsätzlich zu nicht mehr als 10 % doppelt markierter Neurone. Nur wenige doppelt markierte Neurone konnten auch in der Doppel-Tracing Studie von Sobel und Corbett (1984) nachgewiesen werden (untersuchte Hirnareale: NAc, Septum, entorhinaler Kortex jeweils in Kombination mit mPFC). Margolis und Kollegen (2006a) injizierten die Fluoreszenzfarbstoffe Dil (1,1'-Diocetadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyaninperchlorat) in den NAc und FluoroGold in den mPFC von jungen Ratten (27 Tage alt). Hier waren 19 % der

mesokortikalen und 13 % der mesolimbischen Neurone doppelt markiert. In keiner der bislang diskutierten Studien erfolgte jedoch eine Bestimmung der neurochemischen Identität der markierten Neurone. In der vorliegenden Arbeit wurden zum Vergleich auch die markierten TH-negativen Neurone ausgewertet. Der prozentuale Anteil der doppelt markierten Zellen war mit 10,5 % (2/19 Zellen; PFC+NAc core) bzw. 7,1 % (1/14 Zellen; PFC+NAc shell) vergleichbar zu den TH-positiven (DA) Neuronen und konsistent zu den Ergebnissen der hier diskutierten Studien.

4.4 Unterschiede in der Genexpression bzw. Proteinexpression zur Differenzierung von dopaminergen Subpopulationen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von verschiedenen Markerproteinen in retrograd identifizierten DA Neuronen analysiert. Es sollte untersucht werden, ob der topographischen Dichotomie mesokortikolimbischer DA Neurone auch eine differentielle Proteinexpression unterliegt. Der Dopamintransporter (DAT) spielt eine wichtige Rolle bei der präsynaptischen und somatodendritischen Wiederaufnahme von Dopamin und damit der effektiven Wirkungsdauer des ausgeschütteten Dopamins. Entsprechend der anatomischen Segregation konnte in mesokortikalen, mesoamygdalären und mesolimbischen core DA Neuronen im Vergleich zum Hintergrundsignal nur eine schwache DAT Immunreaktivität nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war die DAT Immunreaktivität mesolimbischer shell und mesostriataler DA Neurone deutlich stärker. Ferner korrelierte die somatische DAT Immunreaktivität mit denjenigen in den entsprechenden Projektionsarealen. Die differentielle Immunreaktivität in den verschiedenen Projektionsarealen der Maus war konsistent mit der Studie von Sesack und Kollegen (1998), in der die DAT Immunreaktivität mittels lichtmikroskopischer und elektronenmikroskopischer Methoden in cingulären, prälimbischen und dorsostriatalen Hirnarealen der Ratte analysiert wurde. Die vorliegende Arbeit ist die erste, in der die DAT Immunreaktivität in DA Neuronen mit definierten Projektionsarealen untersucht wurde. Im Primaten konnte in der dorsalen VTA und dorsalen SNc eine geringe DAT Expression nachgewiesen

werden, wohingegen DA Neurone in der ventralen SNc und ventralen VTA eine hohe DAT Expression aufwiesen (Haber et al., 1995).

Im humanen Gehirn konnte eine höhere DAT mRNA Expression in SNc Neuronen im Vergleich zu Neuronen in der VTA (PN, PBP) nachgewiesen werden (Uhl et al., 1994; Harrington et al., 1996).

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Liss wurde eine quantitative mRNA Expressionsanalyse der DA Markergene TH, DAT und VMAT2 durchgeführt (Andrea Hetzel und Olga Häckel). Das Verhältnis der entsprechenden Genprodukte (DAT zum VMAT2) ist verantwortlich für die Menge an zytosolischem Dopamin. Hierzu wurden Zellen der retrograd identifizierten Subpopulationen mittels (LMD 6000, Leica, Wetzlar, D) in Zellpools mit jeweils fünf Zellen gesammelt und nach Zelllyse und reverser Transkription der mRNA mittels quantitativer TaqMan real-time PCR analysiert. Das Verhältnis der DAT/TH und DAT/VMAT2 mRNA war in mesokortikalen (DAT/TH: $1,00 \pm 0,11$ n=11; DAT/VMAT2: $1,00 \pm 0,21$ n=8), mesoamygdalären (DAT/TH: $1,31 \pm 0,43$ n=12; DAT/VMAT2: $1,25 \pm 0,24$ n=10) und mesolimbischen core (DAT/TH: $1,79 \pm 0,34$ n=15; DAT/VMAT2: $1,62 \pm 0,18$ n=13) Neuronen signifikant geringer im Vergleich zu mesostriatalen (DAT/TH: $4,61 \pm 0,18$ n=20; DAT/VMAT2: $3,25 \pm 0,27$ n=20) und mesolimbischen shell (DAT/TH: $3,80 \pm 0,55$ n=16; DAT/VMAT2: $2,90 \pm 0,41$ n=15) Neuronen, was insbesondere an einer erhöhten DAT Expression in den zwei letzten Zelltypen begründet war (siehe Abb. 48). Entsprechend der differentiellen neuronalen DAT Immunreaktivität konnten somit auch auf molekularer Ebene zwei distinkte Genotypen identifiziert werden.

¹ Die kontaktfreie UV-Lasermikrodissektion ermöglicht es spezifisch Zellen aus komplexen Gewebeverbänden zu isolieren.

² Verhältnisse normalisiert auf mesokortikale DA Neurone.

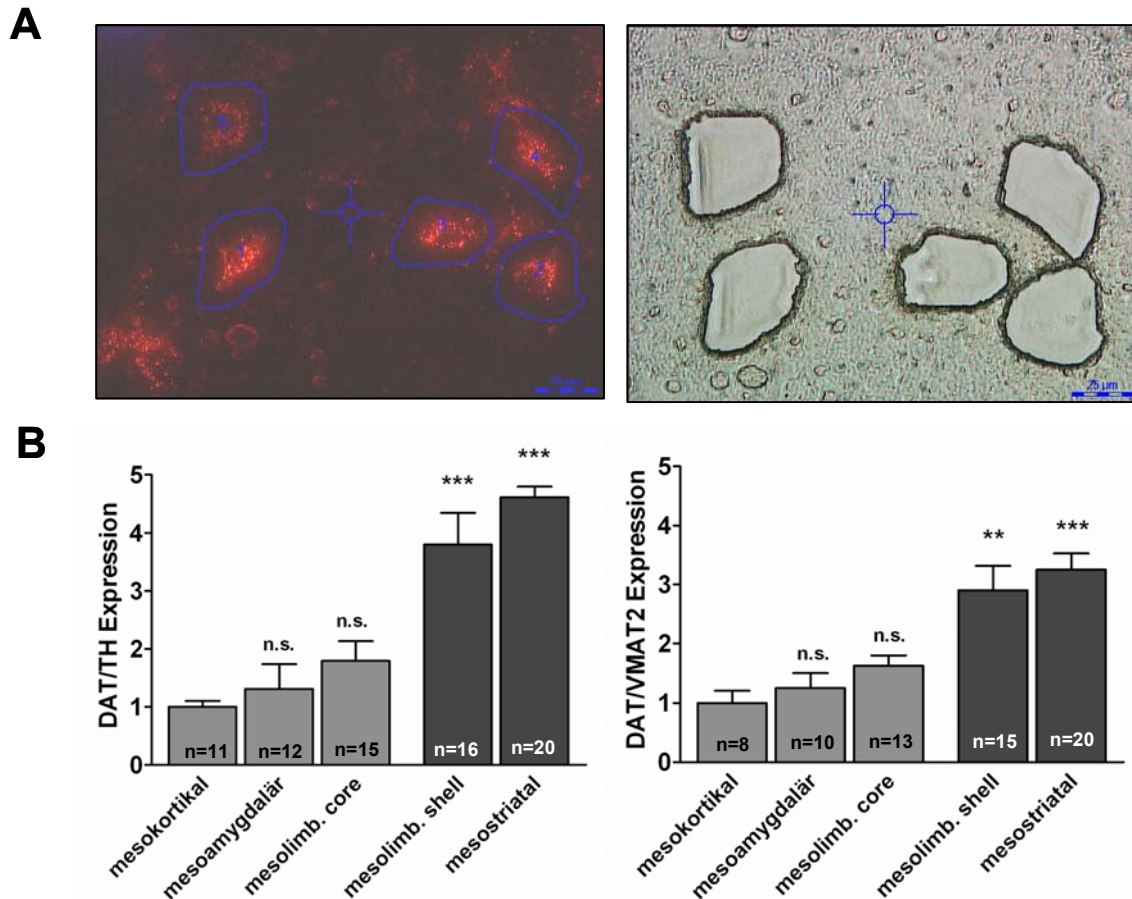


Abb. 48: UV-Lasermikrodissektion und quantitative mRNA Analyse DA Markergene

[A] Lasermikrodissektion retrograd identifizierter Neurone im Mittelhirn der adulten Maus. Links: Vor der Lasermikrodissektion: Fünf Beads-positive Zellen wurden unter Fluoreszenz umrandet. Rechts: Durchlichtaufnahme nach Lasermikrodissektion: Die Zellen wurden mittels einen gepulsten Dioden-Laser (LMD 6000) isoliert und in Reaktionsgefäße gesammelt. [B] Ergebnis der quantitativen Expressionsanalyse. Links: Verhältnis der DAT/TH mRNA Expression in den verschiedenen Subpopulationen. Rechts: Verhältnis der DAT/VMAT2 mRNA Expression in den verschiedenen Subpopulationen.

Viele Studien verwendeten Calbindin-D28k (CB) als Marker für DA Subpopulationen (Gerfen et al., 1987b; Neuhoff et al., 2002). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass CB nur eingeschränkt zur Differenzierung von DA Subtypen verwendet werden kann. Mesolimbische shell DA Neurone der lateralen VTA waren durch eine relativ hohe Anzahl CB-positiver Zellen (60 %) gekennzeichnet. Diese Zellen können nicht anhand der CB-Expression von den mesokortikalen, mesocingulären, mesoamygdalären und mesolimbischen core DA Neuronen unterschieden werden. Die hier untersuchten mesostriatalen DA

Neuronen waren alle CB-negativ (n=7 Zellen). Es ist jedoch bekannt, dass in der Maus CB-positive DA Neurone auch in der SN vorhanden sind (Neuhoff et al., 2002). Ferner berichten andere Studien von CB-positiven DA Neuronen in der dorsalen VTA und SNc und von CB-negativen DA Neuronen in der ventralen VTA und SNc in der Ratte und beim Primaten (Gerfen et al., 1987b; Gaspar et al., 1993). Da nur sieben Zellen ausgewertet wurden, ist es nicht weiter verwunderlich, dass keine Calbindin-positiven DA SN Neurone gefunden wurden, da diese weniger als 15 % in der SNc ausmachen (Neuhoff et al., 2002). Da die gut beschriebenen mesostriatalen DA Neurone in dieser Arbeit nur als Vergleichspopulation dienten, war eine weitergehende Analyse diesbezüglich nicht notwendig.

4.5 Elektrophysiologische Grundcharakterisierung DA Subpopulationen

4.5.1 Notwendigkeit der Bestimmung neurochemischer Identitäten im Mittelhirn

In dieser Arbeit wurden Subpopulationen von VTA (und SN) Neuronen durch retrogrades Tracing identifiziert, elektrophysiologisch charakterisiert und der DA Phänotyp histochemisch durch Koimmunlokalisation von Beads, Neurobiotin und der Tyrosinhydroxylase im konfokalen Mikroskop nachgewiesen.

Von besonderer Bedeutung war die Bestimmung des neurochemischen Phänotyps der analysierten Zellen. Im Gegensatz zur SN hat die VTA zytoarchitektonisch schlecht definierte Grenzen und besteht aus mehreren Subnuklei, die unterschiedliche Zellgruppen beinhalten. Während in der SNc etwa 90 % der Zellen DA sind, sind in der VTA viele GABAerge und andere nicht-dopaminerge Neurone lokalisiert, so dass nur etwa 55 % der VTA Neurone dopaminerg sind (Carr und Sesack, 2000; Margolis et al., 2006b). In der rostralen VTA konnten auch glutamaterge Neurone nachgewiesen werden (Yamaguchi et al., 2007). Somit ist es verständlich, dass die anatomische Organisation der VTA oftmals als kompliziert und diffus beschrieben wird und nur wenig über die funktionelle Eigenschaften von Zellpopulationen in der VTA bekannt ist.

Weiterhin wird deutlich, wie wichtig eine eindeutige Bestimmung der DA Identität ist.

Funktionelle elektrophysiologische und immunhistochemische Methoden mit denen DA Neurone *in vivo* identifiziert wurden, sind beispielsweise die Histofluoreszenz Technik (Dopamin wird in Verbindung mit Glyoxylsäure in Isoquinolin umgewandelt, das gelb-grün fluoresziert) (Bunney et al., 1973), die antidrome von Projektionsarealen (Grace und Bunney, 1983), pharmakologische Reaktionen (Bunney et al., 1973) oder Dopamin-spezifische Läsionen (Hollerman und Grace, 1990). In Hirnschnitten (oder allgemein *in vitro*) können Zellen, die im Verlauf einer elektrophysiologischen Messung mit einem Farbstoff (z.B. Neurobiotin) gefüllt wurden, durch immunhistochemischen Nachweis der Tyrosinhydroxylase durch Koimmunlokalisation im konfokalen Mikroskop identifiziert werden (Neuhoff et al., 2002; Liss et al., 2005). Eine weitere *in vitro* Methode ist das Ausaugen des Zytoplasmas der Zelle und anschließende Einzelzell-RT-PCR zum molekularen Nachweis der Tyrosinhydroxylase (TH) (Liss und Roper, 2004).

In Kombination dieser Methoden mit elektrophysiologischen Techniken wurden die klassischen elektrophysiologischen Eigenschaften DA Neuronen der SN analysiert, wie z.B. der triphasische Verlauf (+/-/+) extrazellulärer Aktionspotentiale mit einer Dauer von mehr als 2,5 ms *in vivo* (Anfang bis Ende des Aktionspotentials), geringe Feuerungsraten (0,5 bis 10 Hz; im Mittel etwa 4,5 Hz), charakteristischem Burstverhalten (*in vivo*) bzw. Pacemaker Aktivität (etwa 1 bis 4 Hz; *in vitro*) und eine durch Dopamin Agonisten oder aversive Stimuli induzierte Inhibition der neuronalen Aktivität (*in vivo* und *in vitro*) (Grace und Bunney, 1983; Grace und Onn, 1989; Schultz, 1999; Ungless et al., 2004). SN Zellen mit hohen Feuerungsfrequenzen (> 10 Hz) und einer kurzen Aktionspotentialdauer (< 2,5 ms) wurden als nicht DA eingestuft (Grace und Onn,

¹ Die Methode der antidromen Aktivierung beruht auf der Fähigkeit von Axonen, elektrische Impulse sowohl orthodrom (in Richtung der Terminalen) als auch antidrom (rückwärts, in Richtung zum Zellsoma) leiten. Dabei wird eine Stimulationselektrode in das neuronale Projektionsgebiet platziert (z.B. dorsales Striatum). Gleichzeitig misst eine Mikroelektrode in der somatischen Region eingehende Impulse aus dem Projektionsgebiet.

1989) und konnten später als GABAerg identifiziert werden (Richards et al., 1997). In der VTA wurden putative DA Neurone oftmals nur anhand elektrophysiologischer Kriterien identifiziert ohne einen immunhistochemischen Nachweis zu erbringen. Diese Kriterien wurden jedoch für DA SNc Neurone etabliert und es ist unklar, ob sie auch für DA VTA Neurone gültig sind. So konnten in der VTA auch putative DA Neurone gefunden werden, die durch aversive Stimuli sowohl erregt als auch inhibiert werden (Mantz et al., 1989; Romo und Schultz, 1989). Kürzlich konnten Ungless und Kollegen (2004) durch elektrophysiologische Messungen in Kombination mit juxtazellulärer Neurobiotin Markierung *in vivo* zeigen, dass eine Inhibition der elektrischen Aktivität durch aversive Stimuli nur in TH-immunpositiven Neuronen geschieht. Dagegen werden nicht-DA VTA Neurone durch aversi Stimuli erregt. Auch in *in vitro* Messungen konnten nicht-DA VTA Neurone gefunden werden, die ähnliche biophysikalische Eigenschaften wie DA Neurone der SNc aufwiesen (Cameron et al., 1997). Dies macht deutlich, dass eine Identifizierung der DA Identität anhand der für die DA SN Neurone etablierten Kriterien nicht zuverlässig ist. Eine alternative sichere Methode ist daher der Nachweis der Tyrosinhydroxylase in den elektrophysiologisch charakterisierten Zellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher für die Grundcharakterisierung der DA Subpopulationen (Kapitel 3.5) ausschließlich immunhistochemisch identifizierte TH-positive (also dopaminerge) Neurone ausgewertet. Nicht-DA Neurone wurden mit Ausnahme der mesokortikalen Neurone nicht systematisch untersucht. Diese Zellen ähnelten in vielen biophysikalischen Eigenschaften den mesokortikalen (und somit auch den mesoamygdalären, mesolimbischen core) DA Neuronen. Die maximale Feuerungsrate war bei TH-positiven (um 25 Hz) und TH-negativen (um 22 Hz) nicht signifikant unterschiedlich. Weiterhin konnte bei den TH-negativen (um 4 mV) und TH-positiven (um 6,5 mV) mesokortikalen Neuronen nur eine marginale sag-Amplitude und kein I_h Strom in den voltage-clamp Experimenten beobachtet werden. Darüberhinaus wiesen beide Zellpopulationen eine lange Aktionspotentialdauer (TH+: um 7 ms; TH-: um 5 ms) und eine nur geringe Nachhyperpolarisation (TH+: um -48 mV; TH-: um -46 mV) auf.

Eindeutige Unterscheidungsmerkmale waren jedoch die Abwesenheit des rebound delays und des A-Stroms in den nicht-DA mesokortikalen Neuronen. Erste Experimente deuten darauf hin, dass in der VTA ein zweiter Subtyp nicht-DA mesokortikaler Neurone existiert, die einen I_h Strom aufweisen. Ein rebound delay oder A-Strom konnte in diesen Zellen jedoch nicht nachgewiesen werden (Ergebnisse erster Experimente von Prof. Roeper). Obwohl nicht-DA Neurone der anderen Subpopulationen nicht systematisch untersucht wurden, scheint der A-Strom und rebound delay aufgrund der bisherigen Ergebnisse ein eindeutiges Identifikationsmerkmal für den DA Phänotyp in der VTA (und SN) zu sein.

4.5.2 Vergleich der elektrophysiologischen Daten mit Studien an nicht-retrograd identifizierten DA VTA Neuronen

In der vorliegenden Arbeit konnten zwei Subtypen von DA VTA Neuronen identifiziert werden. Die DA Neurone der medialen VTA (mesokortikal, mesoamygdalär und mesolimbisch core) zeigten unkonventionelle elektrophysiologische Eigenschaften: Sie zeigten keine Hinweise auf I_h Ströme (weder im voltage-clamp noch im current-clamp (sag Amplitude)), wiesen spontan eine z.T. irreguläre Spontanaktivität in höheren Frequenzbereichen (> 3 Hz) auf, sowie eine sehr lange Aktionspotentialdauer (um 6 ms) und eine geringe Nachhyperpolarisation. Dagegen entsprach der Phänotyp der DA Neurone der lateralen VTA (mesolimbisch shell) den der klassischen DA SN Nervenzellen (siehe auch Kapitel 4.4.1) bzw. den in dieser Arbeit ebenfalls analysierten mesostriatalen DA Neuronen (charakteristischer I_h Strom, reguläre Spontanaktivität (1-3 Hz), Aktionspotentialdauer um 3 ms, ausgeprägte Nachhyperpolarisation).

Ein sehr oft verwendeter elektrophysiologischer Marker für die DA Identität von SNc Neuronen ist das Vorhandensein eines I_h Stroms (Lacey et al., 1989). In vielen Studien gilt das Vorhandensein des I_h Stroms auch in VTA Zellen als ein Marker für den DA Phänotyp und stellte u.a. eine Grundlage für die Unterteilung der VTA Neurone in die drei Hauptklassen der Primärzellen, Sekundärzellen und Tertiärzellen dar (siehe Tabelle 14 auf der folgenden Seite) (Johnson und North, 1992; Cameron et al., 1997).

| | Primärzellen | Sekundärzellen | Tertiärzellen |
|-------------------------------------------------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|
| prozentualer Anteil * | 60 % | 11 % | 29 % |
| I_h Strom | in 93 % der Zellen | in 0 % der Zellen | in 13 % der Zellen |
| Feuerungsrate | 1-3 Hz | 5 Hz | 1-3 Hz |
| Reaktion auf Dopamin (100 µM) | Hyperpolarisation | keine Reaktion | Hyperpolarisation |
| Reaktion auf [Met]⁵ Enkephalin (10 µM) ** | keine Reaktion | Hyperpolarisation | Hyperpolarisation |
| Reaktion auf Serotonin (30 µM) | Depolarisation | Depolarisation | Hyperpolarisation |
| Phänotyp | 82 % TH-positiv *** | putativ GABAerg | < 1/3 TH-positiv |

Tab. 14: Elektrophysiologische Eigenschaften von VTA Neuronen

Einteilung von VTA Neuronen in drei Hauptklassen (Primärzellen, Sekundärzellen und Tertiärzellen) in Abhängigkeit charakteristischer biophysikalischer Eigenschaften.

* Prozentuale Anteil der analysierten Zellen in der VTA ($n_{\text{gesamt}}=66$ Zellen). ** [Met]⁵ Enkephalin ist ein $\mu\delta$ -Opioid Rezeptor Agonist. *** Andere Arbeitsgruppen zeigten, dass alle Primärzellen TH mRNA exprimieren, also DA sind (Koyama et al., 2005). Die Einteilung beruht auf Studien von Johnson und North, 1992, Cameron et al., 1997 und Margolis et al., 2003.

Allerdings postulierten Margolis und Kollegen (2006b), dass das Vorhandensein des I_h Stroms in VTA Neuronen nicht als Kriterium für den DA Phänotyp zulässig ist. TH-negative und TH-positive VTA Neurone, die einen I_h Strom besitzen, können nicht anhand elektrophysiologischer und morphologischer Parameter (kein signifikanter Unterschied in der Zellgröße, AP-Form, Reaktion auf den D2 Agonisten Quinpirol (1 µM) und der spontanen Feuerungsrate) unterschieden werden. Darüberhinaus wurden in der genannten Studie folgende zwei Aussagen angeführt: 1. Im Gegensatz zu DA VTA Neuronen kommt es als Antwort auf die Applikation von κ -Opioid Rezeptor Agonisten zu keiner Hyperpolarisation bei nicht-DA VTA Zellen. 2. Die Abwesenheit des I_h Stroms besagt zuverlässig, dass eine VTA Zelle nicht-DA ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind somit teilweise inkonsistent mit der Studie von Margolis und Kollegen (2006b). Während es sicherlich zutreffend ist, dass in der VTA auch nicht-dopaminerge Neurone vorhanden sind, die einen I_h Strom besitzen (siehe Kapitel 4.5.1), konnten in der vorliegenden Arbeit auch DA VTA Neurone identifiziert werden, die kein I_h Strom exprimieren. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz könnte sein, dass in der Arbeit von Margolis und Kollegen die I_h-negativen Zellen nur in bestimmten Arealen der VTA gemessen wurden. Denn die Hälfte dieser

Zellen ($n_{\text{gesamt}}=16$) wurde ausschließlich in der medio-rostralen VTA gemessen. In dieser Region wurden in der vorliegenden Arbeit vor allem nicht-DA mesokortikale Neurone gemessen. Charakteristisch für diese Zellen war die relativ hohe Feuerungsrate (um 7 Hz) und die Abwesenheit der I_h vermittelten sag-Amplitude (Vergleich Kapitel 4.5.1); sie könnten somit den in der Studie von Margolis beschriebenen Zellen und generell den in Tabelle 14 aufgeführten Sekundärzellen entsprechen. Leider wurden in keiner der oben genannten Studien A-Ströme und rebound delays angegeben. Man könnte vermuten, dass die TH-positiven, I_h -negativen VTA Zellen in vielen Studien (Margolis et al., 2003; Margolis et al., 2006b; Johnson und North, 1992; Cameron et al., 1997) bislang nicht gemessen wurden. Dies ist sicherlich verständlich, wenn man bedenkt, dass diese sehr kleinen Zellen ($< 20 \mu\text{m}$ durchschnittlicher Zelldurchmesser) in einer kleinen Nische im intermediären, medio-ventralen Mittelhirn lokalisiert sind. Im Vergleich zum rostralen, medio-ventralen Mittelhirn ist diese Region der VTA aufgrund einer starken Myelinisierung auch methodisch mittels der Patch-Clamp Technik schwer zugänglich. Ferner ist zu betonen, dass in den oben genannten Studien ein histochemischer Nachweis der DA Identität nur in einem Teil der Experimente erfolgte. Durch den hier erstmals beschriebenen unkonventionellen Phänotyp DA Neurone in der medialen VTA (mesokortikal, mesoamygdalär, mesolimbisch core) könnten diese oftmals als Sekundärzellen (putativ GABAerg) identifiziert worden sein. DA Neurone der lateralen VTA (mesolimbisch shell), die eine ähnliche Morphologie (durchschnittlicher Zelldurchmesser $> 20 \mu\text{m}$) und biophysikalische Eigenschaften wie die der klassischen SN Neurone aufweisen, würden mit einer größeren Wahrscheinlichkeit als DA eingestuft und entsprechen somit vermutlich den Primär- bzw. Tertiärzellen (siehe Tab. 14).

Im Gegensatz zu den bislang diskutierten Studien konnten andere Arbeitsgruppen in der VTA histochemisch-identifizierte DA Neurone nachweisen, die als Antwort auf hyperpolarisierende Strominjektionen keine sag Amplitude zeigten (Jones und Kauer, 1999). Diese Zellen feuerten in hohen Frequenzen (um 5 Hz) und könnten daher den in dieser Arbeit beschriebenen mesokortikalen, mesoamygdalären und mesolimbischen core DA Neuronen entsprechen.

Weiterhin wurden auch DA VTA Neurone analysiert, die eine charakteristische sag Amplitude besaßen und eine signifikant niedrigere Feuerungsrate (um 1,5 Hz) aufwiesen und somit wahrscheinlich den mesolimbischen shell DA Neuronen entsprechen (Jones und Kauer, 1999).

Neuhoff und Kollegen (2002) unterschieden Calbindin-positive und Calbindin-negative Subpopulationen DA VTA Neurone. Calbindin-negative DA Neurone waren in der lateralen VTA lokalisiert, besitzen einen I_h Strom, zeigten eine ausgeprägte Nachhyperpolarisation, kurze rebound delays, geringe Spontanfrequenzen (um 3 Hz) und große Zellkörper (knapp 27 μm). Dagegen waren Calbindin-positive DA VTA Neurone in der medialen VTA lokalisiert. Sie unterschieden sich deutlich von den Calbindin-negativen Zellen, da die sag Amplitude weniger als halb so groß war, einen mehr als doppelt so langen rebound delay, eine geringe Nachhyperpolarisation und kleine Zellkörper aufwiesen (um 21 μm). Ferner zeigten diese Zellen eine signifikant höhere Spontanaktivität (um 5 Hz). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind nicht nur konsistent mit der Studie von Neuhoff et al. 2002, sondern ergänzen sie bezüglich der neuronalen Projektionsgebiete. Demnach entspricht der oben beschriebene Phänotyp der Calbindin-positiven, I_h -negativen DA Neurone in der medialen VTA den mesokortikalen, mesoamygdalären oder mesolimbischen core DA Neuronen. Diese Hypothese wird ebenfalls unterstützt durch die Studie von Notomi und Shigemoto (2004), die zeigten, dass I_h -Strom vermittelnde HCN-Kanaluntereinheiten in der VTA nicht exprimiert werden. Dagegen entsprechen die Calbindin-negativen, I_h -positiven DA Neurone der lateralen VTA vermutlich den mesolimbischen shell DA Neuronen. Darüberhinaus würde man vermuten, dass mesolimbische shell DA Neurone, ebenso wie die klassischen DA SN Neurone, HCN2-4 mRNA (Franz et al., 2000) bzw. HCN2-4 Proteine (Notomi und Shigemoto, 2004) exprimieren.

Da die Studie von Neuhoff und Kollegen (2002) in postnatalen (12-14 Tage alt) Mäusen, die Studien von Margolis et al., 2003, 2006a,b, Cameron et al., 1997, Johnson und North, 1992 in postnatalen Ratten (16-23 Tage alt) durchgeführt wurden, könnte man auch vermuten, dass funktionelle Unterschiede aus den

verschiedenen Spezies resultieren (persönliche Kommunikation mit E. Margolis). Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da andere Arbeitsgruppen histochemisch identifizierte DA VTA Neurone, die keinen I_h Strom besitzen, auch in postnatalen Ratten (16-23 Tage alt) beschrieben haben (Jones und Kauer, 1999).

4.5.3 Vergleich der elektrophysiologischen Daten mit Studien an retrograd identifizierten DA VTA Neuronen

Ein wichtiges Merkmal dieser Arbeit ist, dass die elektrophysiologischen Messungen an retrograd identifizierten Neuronen erfolgten. Über die funktionellen Eigenschaften retrograd identifizierter DA Subtypen ist nur wenig bekannt. In einigen frühen Studien in den achtziger Jahren wurden DA Projektionsneurone durch antidrome Aktivierung (siehe Kapitel 4.4) identifiziert, und die DA Identität wurde anhand der für die nigrostriatalen DA Neurone etablierten elektrophysiologischen Eigenschaften (triphasisches Aktionspotential mit einer Dauer von $> 2,5$ ms; siehe Kapitel 4.4) verifiziert. Insbesondere die biophysikalischen Eigenschaften der mesokortikalen (und mesocingulären) DA Neurone waren Gegenstand vieler kontroverser Diskussionen. So wurden in einigen Arbeitsgruppen unkonventionelle elektrophysiologische Eigenschaften mesokortikaler DA Neurone beschrieben. Chiodo und Kollegen (1984) konnten in extrazellulären Messungen in der Ratte eine signifikant erhöhte Feuerungsrate (etwa 9 Hz) im Gegensatz zu den klassischen nigrostriatalen DA Neuronen (um 3 Hz) feststellen. Weiterhin zeigten mesokortikale DA Neurone eine signifikant erhöhte Burstaktivität (mesokortikale DA Neurone: 54 %; nigrostriatale DA Neurone: 2 %).

Mit Ausnahme dieser frühen Studien existieren nur sehr wenige Arbeiten, die die funktionellen Eigenschaften retrograd identifizierter DA Neurone untersucht haben. Margolis und Kollegen (2006a) zeigten, dass κ -Opioid Rezeptor Agonisten DA Neurone, die den mPFC innervieren, inhibieren. Dagegen kommt es zu keiner Inhibition bei DA Neuronen, die in den NAc projizieren. Hierzu wurde jungen Ratten (27 Tage alt) der Fluoreszenztracer Dil in den mPFC bzw. in den NAc injiziert. Die retrograd markierten Neurone wurden in whole-cell Patch-Clamp Experimenten gemessen, ein Teil der Zellen mit Neurobiotin gefüllt und

histochemisch analysiert. Mesopräfrontale (mesokortikale) und mesoaccumbale (mesolimbische) Neurone waren in dieser Studie durch einen ausgeprägten I_h Strom gekennzeichnet (95 % (20/21 Zellen) der mesolimbischen Zellen I_h -positiv, 62 % (18/29 Zellen) der mesokortikalen Zellen I_h -positiv). Der I_h Strom war bei retrograd und histochemisch identifizierten mesokortikalen DA Neuronen signifikant größer im Vergleich zu den mesoaccumbalen DA Neuronen. Mesokortikale Neurone, die keinen I_h Strom aufwiesen waren TH-immunnegativ (n=5 Zellen) und unterschieden sich in der Dauer der Aktionspotentiale nicht signifikant von TH-immunpositiven mesokortikalen Neuronen. Mesokortikale und mesolimbische DA Neurone wurden entsprechend als Primärzellen identifiziert. Ein wichtiger Aspekt, der die Diskrepanz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit erklären könnte, hat einen methodischen Hintergrund. Dil ist ein hochlipophiler Tracer, der anterograd, retrograd und auch in bereits fixiertem Gewebe transportiert wird. Er hat ein sehr hohes Diffusionsvermögen und wird auch axonal aufgenommen. Dagegen ist das Diffusionsvermögen der Beads sehr limitiert, und sie werden nur an den Terminalen der Nerven aufgenommen (Köbber et al., 2000). Bei bilateralen Injektionen von jeweils 1 μ l des Fluoreszenztracers Dil sind Kontaminationen anderer Hirnareale sehr wahrscheinlich. Injektionsstellen wurden im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit nicht systematisch analysiert und nur exemplarisch abgebildet, so dass Kontaminationen anderer Hirnareale vermutlich nicht beachtet wurden und somit falsch positiv identifizierte Projektionsneurone analysiert wurden.

Ford und Kollegen (2006) injizierten Beads in den medialen shell des NAc bzw. in die BLA von adulten Mäusen. Sie lokalisierten mesoamygdaläre DA Neurone in der lateralen VTA und SN und mesolimbische shell DA Neurone in der medialen VTA. In mesolimbischen shell DA Neuronen konnte kein bzw. nur ein sehr geringer I_h Strom nachgewiesen werden und dieser war signifikant geringer im Vergleich zu den mesoamygdalären DA Neuronen. Während in dieser Studie auch I_h negative DA VTA Neurone nachgewiesen wurden, sind einige Ergebnisse dennoch inkonsistent zu der hier vorliegenden Arbeit. Dass der Phänotyp der mesolimbischen shell DA Neurone in der Studie von Ford unterschiedlich zu den

hier beschriebenen mesolimbischen shell DA Neuronen ist und am besten mit den mesolimbischen core DA Neuronen verglichen werden kann, könnte zwei Ursachen haben. 1. DA Neurone, die den medialen und lateralen shell des NAc innervieren, haben unterschiedliche Phänotypen. 2. Durch Kontaminationen beim Tracing wurden mesolimbische core statt shell DA Neurone analysiert. Obwohl ein unterschiedlicher Phänotyp prinzipiell nicht ausgeschlossen werden kann, sind Kontaminationen sehr wahrscheinlich. In der Studie von Ford wurde im Vergleich zu dieser Arbeit zum Teil mehr als das doppelte Volumen in den shell bzw. in die BLA injiziert (Ford: 200 μ l; hier: shell: 80 μ l und BLA: 100 μ l). Mesoamygdaläre DA Neurone waren in der lateralen VTA und SN lokalisiert und das elektrophysiologische Profil entsprach im Wesentlichen dem der klassischen DA SN Neurone. Bei dem Injektionsvolumen ist es durchaus möglich, dass Kontaminationen im dorsalen Striatum bzw. im core des NAc zu falsch positiv identifizierten Neuronen führten. Injektionsstellen wurden auch in dieser Studie nur exemplarisch abgebildet und nicht seriell rekonstruiert. Von großer Bedeutung ist, dass die Wartezeit nach Injektion der Beads nur 2 bis 5 Tage betrug. In der vorliegenden Arbeit konnten mesoamygdaläre DA Neurone erst nach einer Wartezeit von 14 Tagen nachgewiesen werden, wohingegen bereits nach zwei Tagen eine Vielzahl von mesostriatalen DA Neurone durch die Beads markiert waren.

In einer Studie von Liss und Kollegen (2005) wurden mesostriatale und mesolimbische DA Neurone (keine Unterscheidung core / shell) in Hirnschnitten der adulten Maus analysiert. Mesostriatale DA Neurone waren durch den klassischen Phänotyp DA SN Neurone gekennzeichnet (siehe oben). Die elektrophysiologischen Eigenschaften der mesolimbischen DA Neurone sind konsistent mit den hier beschriebenen mesolimbischen core DA Neuronen (geringe sag- und I_h Strom Amplituden, maximale Feuerungsrate > 10 Hz).

4.6 Abwesenheit somatodendritischer D2 Autorezeptoren in mesokortikalen DA Neuronen

Somatodendritische Neurotransmitter Freisetzung und entsprechende Impuls regulierende Autorezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der neuronalen Aktivität (Ludwig, 2003). Dopaminerge Neuronen besitzen Autorezeptoren des D2 Subtyps, die in der somatodendritischen Membran von DA VTA und SN Nervenzellen lokalisiert sind. Sie werden durch somatodendritisch freigesetztes Dopamin aktiviert und reduzieren die elektrische Aktivität DA Neurone durch Erhöhung der Kaliumleitfähigkeit (Aktivierung von D2-G-Protein gekoppelten einwärtsrektifizierenden Kaliumkanälen (GIRK2); siehe Einleitung Kapitel 1.1.3). Während die Anwesenheit somatodendritischer D2 Autorezeptoren in mesostriatalen und mesolimbischen DA Neuronen bereits seit langem bekannt ist (Roth und Elsworth, 2000), wird sie bei mesokortikalen und mesocingulären DA Neuronen kontrovers diskutiert (Chiodo et al., 1984; Gariano et al., 1989). Die letztgenannten Subtypen reagierten weder auf lokale Applikation von Dopamin und die systemische Gabe des unselektiven Dopamin Rezeptor Agonisten Apomorphin, noch auf den D2 selektiven Dopamin Rezeptor Antagonisten Haloperidol (Vergleich: nigrostriatale und mesolimbische DA Neurone reagierten mit einer Zunahme der Spontanaktivität) (Chiodo et al., 1984). Bannon und Kollegen (1983) untersuchten Änderungen im Dopamin Metabolismus (DOPAC und HVA Konzentrationen) in den DA Projektionsarealen als Antwort auf die systemische Applikation von Apomorphin und Haloperidol. Dabei konnten im PFC und cingulären Kortex keine Veränderungen der Konzentrationen der Dopamin Metabolite festgestellt werden. Im Striatum, im piriformen Kortex und im Tuberculum olfactorium führte Haloperidol zu einer Zunahme, während Apomorphin zu einer Abnahme der Metabolite führte. Auch andere Arbeitsgruppen beschrieben unkonventionelle Eigenschaften mesokortikaler DA Neurone, wie beispielsweise eine selektive Aktivierung als Antwort auf akuten Stress ("*footshock stress*"; Bannon und Roth, 1983) und die Abwesenheit eines Depolarisationsblocks bei chronischer Therapie mit klassischen Neuroleptika (Bannon und Roth, 1983). Als eine Ursache für die

unkonventionellen Eigenschaften mesokortikaler (und zum Teil auch mesocingulärer) DA Neurone wurde die Abwesenheit von somatodendritischen D2 Autorezeptoren postuliert. Andere Arbeitsgruppen konnten keine Unterschiede der biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften im Vergleich zu den klassischen nigrostriatalen DA Neuronen feststellen. Demnach unterschieden sich mesokortikale und mesocinguläre in der Feuerungsrate nicht signifikant von nigrostriatalen und mesolimbischen DA Neuronen (um 2-3 Hz) (Deniau et al., 1980; Gariano et al., 1989) und wurden durch Apomorphin inhibiert (Shepard und German, 1984; Gariano et al., 1989). Diese Arbeiten würden im Gegensatz zu den obigen vermuten lassen, dass mesokortikale und mesocinguläre ebenso wie die klassischen DA SN Neurone somatodendritische D2 Autorezeptoren exprimieren.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Debatte der D2 Autorezeptorexpression in mesokortikalen DA Neuronen aufgeklärt werden. Hierzu wurden perforated patch Messungen an retrograd identifizierten DA Neuronen durchgeführt. Während mesostriatale, mesoamygdaläre, mesolimbische core / shell DA Neurone auf die Applikation von 100 μ M Dopamin mit einer Inhibition der Spontanaktivität reagierten, konnte in keiner mesokortikalen DA Zelle ($n=7$) eine derartige Reaktion beobachtet werden. Die Ergebnisse sind konsistent u.a. mit der Studie von Chiodo et al., 1984 und unterstützen die Theorie der selektiven Abwesenheit von somatodendritischen D2 Autorezeptoren in mesokortikalen DA Neuronen. Dagegen stimmen sie nicht mit der Studie von Gariano und u.a. (1989) überein. Ein wichtiger Unterschied ist, dass Gariano und Kollegen die mesokortikalen DA Neurone ausschließlich in der lateralen VTA und SNc lokalisierten. In der vorliegenden Arbeit waren in dieser Region nur klassische DA Neurone lokalisiert, die stets durch Dopamin inhibiert wurden. Dagegen waren in der Studie von Chiodo et al., 1984 die analysierten Zellen in der medialen VTA lokalisiert. Hier lagen auch die unkonventionellen DA Neurone der vorliegenden Arbeit, die nicht auf die Applikation von Dopamin reagierten. Somit ist es wahrscheinlich, dass in der Studie von Gariano, die in dieser Arbeit

beschriebenen mesokortikalen unkonventionellen DA Neurone nicht untersucht wurden.

Mesolimbische shell und mesostriatale DA Neurone reagierten auf die Applikation von Dopamin mit einer kompletten und persistierenden Inhibition der Spontanaktivität. Dagegen depolarisierten die mesolimbischen core und z.T. die mesoamygdalären DA Neurone noch in Anwesenheit von Dopamin und begannen wieder zu feuern. Dieser Effekt wird als Desensitisierung bezeichnet. Im Allgemeinen beschreibt der Begriff der Desensitisierung die Abschwächung der Rezeptor-Signaltransduktion infolge dessen lang andauernder Stimulation. Änderungen in der Sensitivität DA Rezeptoren durch endogene oder exogene Liganden spielen eine wichtige Rolle bei Erkrankungen wie Schizophrenie oder Drogensucht (Gainetdinov et al., 2006). Die Desensitisierung und Internalisierung der Dopamin Rezeptoren wird insbesondere durch G-Protein gekoppelte Rezeptor Kinasen (GRKs; diskutiert werden v.a. GRK-2, GRK-3, GRK-5 und GRK-6) und Arrestine (β -Arrestin-1 und β -Arrestin-2) vermittelt. Dabei kommt es infolge lang andauernder Stimulation der Dopamin Rezeptoren zu einer katalytischen Aktivierung der GRKs, die das G-Protein phosphorylieren. Vermutlich interagieren auch NCS-Proteine (*neuronal calcium sensor proteins*; z.B. Calmodulin) mit den GRKs. Somit könnte die kalziumabhängige Modulation der GRKs ein wichtiger Mechanismus bei der Desensitisierung der Dopamin Rezeptoren sein (Iacovelli et al., 1999; Kabbani et al., 2002). Anschließend binden Arrestine GRK-phosphorylierte Rezeptoren und blockieren die Umsetzung von GDP zu GTP, so dass die α - bzw. $\beta\gamma$ -Untereinheiten des G-Proteins nicht mehr mit den Effektorproteinen reagieren können. Weiterhin vermitteln Arrestine die Internalisierung der inaktivierten Rezeptoren (Gainetdinov et al., 2006). Da die Experimente in der perforated patch Konfiguration durchgeführt wurden, bei der es zu keiner Beeinflussung des zellulären Metabolismus und Signalkaskaden kommt, ist es unwahrscheinlich, dass Dopamin Signalkaskaden des D2 Rezeptors gestört wurden und somit von einer differentiellen Sensitivität des D2 Rezeptors in den verschiedenen

Subtypen ausgegangen werden kann. In diesem Zusammenhang könnten zukünftige Studien, die die D2 und GIRK2 Splicevarianten in den verschiedenen Subpopulationen analysieren von besonderer Bedeutung sein. Da das Kalziumpuffer-Protein Calbindin-D28k v.a. in den Subtypen exprimiert war, die infolge der Dopamin Applikation desensitisierten, könnte die oben beschriebene Kalziumabhängigkeit der Desensitisierung hier eine wichtige Funktion haben.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Liss wurde die mRNA Expression von D2 Rezeptor und GIRK2 in identifizierten (d.h. TH mRNA-positiven) DA Neuronen mit definierten axonalen Projektionen quantitativ analysiert (Andrea Hetzel und Olga Häckel). Hierzu wurden zunächst Doppel-Tracing Experimente durchgeführt (rote Beads: mPFC; grüne Beads: dorsolaterales Striatum). Einzelne markierte Neurone wurden mittels Lasermikrodissektion gesammelt. Nach Zelllyse und reverser Transkription wurde die Einzelzell-cDNA mesokortikaler bzw. mesostriataler DA Neurone aufgesplittet und parallel die D2 und GIRK2 Expression mittels TaqMan real-time PCR quantifiziert. GIRK2 und D2 mRNA wurde in 80 % (n=24 von 30 Zellen) der mesostriatalen DA Neurone kodetektiert, dagegen aber nur in 25 % (n=5 von 20 Zellen) der mesokortikalen DA Neuronen. Mesostriatale DA Neurone zeigten eine 10-fach höhere GIRK2 und 15-fach höhere D2 Expression im Vergleich zu mesokortikalen DA Neuronen. Im Gegensatz dazu war das Einzelzell-Verhältnis der GIRK2/D2 mRNA Expression beider Subtypen aber identisch (mesokortikal: $0,76 \pm 0,31$ n=5; mesostriatal: $0,84 \pm 0,11$ n=24; kein signifikanter Unterschied im ungepaarten T-Test; $p > 0,05$). Dennoch scheinen die mesokortikalen DA Zellen, in denen geringe Mengen an GIRK2 und D2 mRNA detektiert wurde, keine funktionellen somatodendritischen D2 Rezeptorproteine zu exprimieren, da keine der elektrophysiologisch gemessenen mesokortikalen DA Neurone auf die Applikation von Dopamin reagierte. Ferner besteht die Möglichkeit, dass mesokortikale DA Neurone durchaus GIRK2 und D2 Proteine bilden, diese jedoch nach axonal transportieren werden und als präsynaptische Autorezeptoren fungieren.

Auf Proteinebene konnte die Expression des D2 Rezeptors nicht untersucht werden. Von insgesamt vier getesteten D2 Antikörpern zeigte keiner eine spezifische Immunreaktivität. Aufgrund der molekularen Analyse kann jedoch von einer Koregulation von D2 und GIRK2 ausgegangen werden. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen signifikanten Unterschieden in der Abundanz der mRNA zwischen den beiden DA Subtypen, war das Verhältnis der GIRK2/D2 mRNA Expression in mesokortikalen bzw. mesostriatalen Einzelzellen nahezu identisch. In diesem Zusammenhang könnte man spekulieren, dass die GIRK2 Immunreaktivität auch eine Aussage über die D2 Proteinexpression in der jeweiligen DA Subpopulationen erlaubt. Die funktionellen Daten und die semi-quantitativen GIRK2 Immunreaktivitäten sind konsistent mit der geringen D2 und GIRK2 mRNA Expression in mesokortikalen, bzw. mit der hohen D2 und GIRK2 mRNA Expression in mesostriatalen DA Neuronen auf molekularer Ebene. Mesostriatale und mesolimbische shell DA Neurone, die eine robuste D2 Rezeptor vermittelte Inhibition der neuronalen Aktivität bei Applikation von Dopamin zeigen, wiesen auch eine hohe GIRK2 Immunreaktivität auf. Dagegen ist die schwache GIRK2 Immunreaktivität in den unkonventionellen DA Neuronen assoziiert mit der Abwesenheit der Inhibition der Spontanaktivität durch Dopamin Applikation, wie anhand der mesokortikalen DA Neurone gezeigt wurde, oder der transienten Inhibition durch Dopamin, wie in den mesolimbischen core und mesoamygdalären DA Neuronen beobachtet wurde.

4.7 Dualität des mesokortikolimbischen DA Systems

In der vorliegenden Arbeit wurden retrograd identifizierte Neurone des mesokortikolimbischen DA Systems im Vergleich zum mesostriatalen System charakterisiert.

Eine Segregation des mesokortikolimbischen DA Systems konnte neuroanatomisch, morphologisch, molekular und funktionell gezeigt werden. Ferner konnte die Dualität dieses Systems anhand eines nicht-supervigierten

statistischen Analyseverfahrens (Cluster-Analyse) bestätigt werden. Abbildung 49 fasst die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit schematisch zusammen.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass DA Mittelhirnneurone mit einem unkonventionellen Phänotyp in den mPFC, BLA und NAc core (vermutlich auch in den cingulären Kortex) projizieren. Diese Zellen hatten eine hohe, z.T. irreguläre Spontanaktivität (um 4 Hz) und feuerten bei geringen Injektionen depolarisierender Ströme in einem Frequenzbereich von 10-15 Hz, konnten bei maximaler Strominjektion in einem Bereich von 20-30 Hz feuern und wurden gar nicht (mesokortikal) oder nur transient (mesoamygdalär, mesolimbisch core) von Dopamin durch die Aktivierung somatodendritischer D2 Autorezeptoren inhibiert. Ferner konnte dieser schnell-feuernde "untypisch" DA Phänotyp über mehrere Sekunden über 10 Hz feuern, was als Grenze für tonische Aktivität klassischer DA Neurone *in vitro* und *in vivo* gilt (Ungless et al., 2004; Grace und Bunney, 1984; Robinson et al., 2004; Dai und Tepper, 1998; Fa et al., 2003; Liss et al., 2005). Gleichzeitig wiesen sie im Vergleich zu mesolimbischen shell und mesostriatalen DA Neuronen eine geringere DAT/TH und DAT/VMAT2 mRNA Expression auf, also eine geringere bzw. verzögerte Dopamin Wiederaufnahme. Somit wären diese untypischen DA Neuronen ideale Kandidaten für die beschriebene tonische Dopamin Freisetzung *in vivo* in kortikolimbischen Hirnarealen (Grace et al., 2007). Langsam-feuernde DA Neurone, die den shell des NAc sowie das dorsolaterale Striatum innervieren, erreichen Frequenzbereiche nur unterhalb von 10 Hz und können vermutlich nur im Rahmen phasischer Dopamin Freisetzung (beim Burst) für wenige hunderte von Millisekunden höherfrequent feuern (Wolfart et al., 2001; Grace und Bunney, 1984).

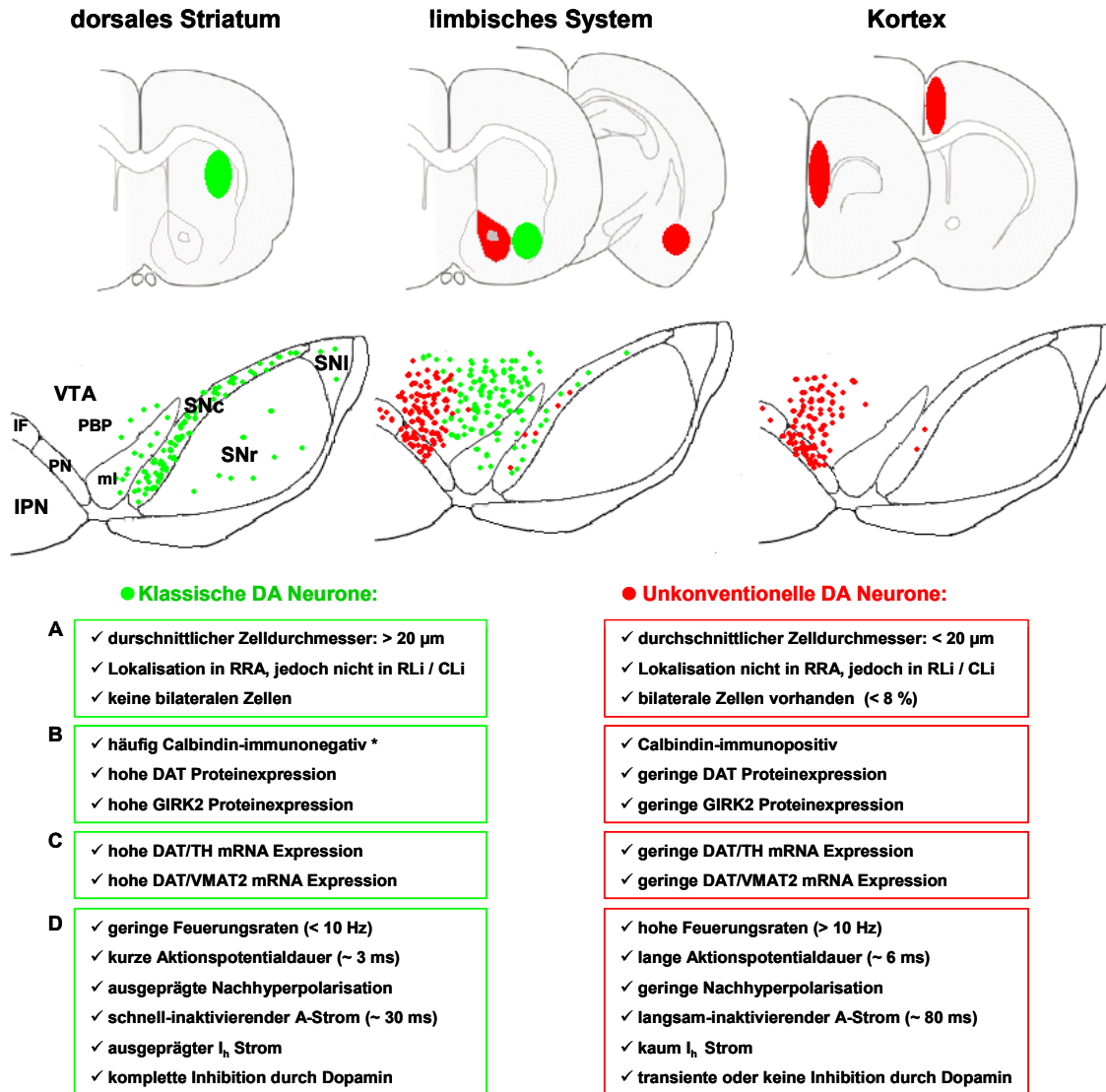


Abb. 49: Dualität des mesokortikolimbischen DA Systems

Klassische DA Neurone (grün) projizieren in das dorsolaterale Striatum und in den lateralen shell des NAc. Sie sind präferentiell in der lateralen VTA und SN lokalisiert. Unkonventionelle DA Neuronen (rot) sind in der medialen VTA lokalisiert und projizieren in den mPFC, die BLA, NAc core und vermutlich in den cingulären Kortex. Der Dualismus des mesokortikolimbischen DA Systems wurde anhand morphologischer und anatomischer Eigenschaften (A), der Expression von spezifischen Markerproteinen (B) und Markergenen (C) sowie funktionellen Eigenschaften (D) etabliert. * cave: 60 % der mesolimbischen shell DA Neurone sind Calbindin-immunopositiv. Abkürzungen: SNc-Substantia nigra pars compacta; SNr-Substantia nigra pars reticulata; VTA-Area tegmentalis ventralis; SNI-Substantia nigra pars lateralis; IPN-Nukleus interpeduncularis; ml-Lemniscus medialis; PBP-Nukleus parabrachialis pigmentosus; IF-Nukleus interfascicularis; PN-Nukleus paranigralis; RLi-rostraler Nukleus linearis; CLi-zentraler Nukleus linearis; DAT-Dopamintransporter; GIRK-G-Protein gekoppelter einwärts rektifizierender Kaliumkanals; I_h-hyperpolarisationsaktivierter und zyklisch-Nukleotid gesteuerter Ionenkanalstrom; VMAT-vesikulärer Monoamintransporter.

Die Dualität des mesokortikolimbischen DA Systems wird akzentuiert in den Modelvorstellungen vieler neurologischer Erkrankungen wie z.B. Schizophrenie (Yang et al., 1999), ADHS (Viggiano et al., 2003) und Drogenabhängigkeit (Cardinal et al., 2002), die u.a. durch eine Dysregulation des (tonischen) kortikolimbischen DA Systems gekennzeichnet sind. Eine zufriedenstellende Behandlung dieser komplexen Krankheitsbilder ist noch nicht erreicht.

Ferner scheinen Interaktionen zwischen den verschiedenen DA Projektionssystemen eine wichtige Komponente in der Pathophysiologie der Schizophrenie zu sein. So konnte kürzlich eine transgene Maus entwickelt werden, die striatale D2 Rezeptoren reversibel überexprimiert. Als Folge konnte eine erhöhte Dopamin Konzentration und D1 Rezeptoraktivierung im mPFC nachgewiesen werden. Der Phänotyp der Maus war durch kognitive Defizite bei working memory Tests gekennzeichnet (Kellendonk et al., 2006). Möglicherweise könnten mesokortikale DA Neurone, die direkt oder indirekt synaptischen Input aus dem Striatum erhalten, für die Alterationen der DA Neurotransmission im Frontalhirn verantwortlich sein und somit ein wichtiges Target in der Therapie der Schizophrenie darstellen.

Zur Zeit wird das DA System in seiner Gesamtheit therapeutisch beeinflusst. So führt die Therapie schizophrener Psychosen mit Neuroleptika durch unspezifische Interaktion mit den verschiedenen DA Subpopulationen zu einer Vielzahl unerwünschter Nebenwirkungen. Neben den in der Einleitung bereits erwähnten dyskinetischen Symptomen (extrapyramidal-motorische Störungen, EPMS) aufgrund einer Blockade von D2 Rezeptoren im mesostriatalen Dopamin System, kommt es bei Inhibition dieser Rezeptoren im tuberoinfundibulären Dopamin System zu einer vermehrten Prolaktinausschüttung und kann bei anhaltend hohen Hormonspiegeln konsekutiv zu Gynäkomastie, Galaktorrhö und Libidostörungen führen (Widschwendter und Fleischhacker, 2005; Fleischhacker und Widschwendter, 2006). Die Gabe atypischer Neuroleptika (z.B. Clozapin) verursacht weniger EPMS. Jedoch kann Hypersensitivität ein malignes neuroleptisches Syndrom induzieren und die Interaktion mit α 1-Adrenozeptoren kann eine orthostatische Hypotension verursachen. Clozapin zeichnet sich durch

hohe Affinität zum M1-Rezeptorsubtyp aus, was zu den typischen anticholinergen Nebenwirkungen wie Mundtrockenheit, Harnverhalten und Akkomodationsstörungen führt. Die pharmokotherapeutische Herausforderung bei der Beeinflussung der DA Neurotransmission besteht darin, dass im mesolimbischen System eine reduzierte, im mesokortikalen eine gesteigerte, und im mesostriatalen und tuberinfundibulären Dopamin System eine gleich bleibende Aktivität erwünscht wäre. Die vorliegende Arbeit liefert die zelluläre Basis für neue hochspezifische Targets, die gezieltere Eingriffe in relevante Modulationssysteme erlaubt und somit eine subsyndromspezifische, nebenwirkungsarme Therapie ermöglicht.

4.8 Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit erlangten Erkenntnisse über die Dualität des mesokortikolimbischen DA Systems bieten viele Ansatzpunkte für zukünftige Studien.

Eine zentrale weiterführende Frage ist, welche distinkte Rolle die unterschiedlichen DA Subpopulationen in den Krankheitsbildern des DA Systems (Morbus Parkinson, Schizophrenie, ADHS, Drogenabhängigkeit) haben. In diesem Zusammenhang soll die funktionelle Rolle des A-Stroms in den unkonventionellen DA Neuronen untersucht werden (zur funktionellen Rolle in DA SN Neuronen siehe Kapitel 1.2 bzw. Liss et al., 2001). Im Rahmen meiner Diplomarbeit in den Arbeitsgruppen von Prof. Liss und Prof. Roeper konnte gezeigt werden, dass DA VTA Neurone im Vergleich zu DA SN Neurone eine signifikant höhere Immunreaktivität einer β -Untereinheit des A-Typ Kaliumkanals (KCHIP4) aufweisen. Weiterhin konnte in DA VTA Neuronen eine Subpopulation definiert werden, die durch eine vermehrte KCHIP4 Protein Expression gekennzeichnet ist. Dabei konnte gezeigt werden, dass die mesokortikalen DA Neurone im Vergleich zu mesostriatalen und mesolimbischen (keine Unterscheidung zwischen core und shell) die höchste KCHIP4 Immunreaktivität

aufwiesen. In zukünftigen Studien soll die funktionelle Rolle von KCHIP4 in den unkonventionellen DA Neuronen untersucht werden. Eine im Rahmen der vorliegenden Arbeit in den C57Bl/6 Hintergrund zurückgekreuzte KCHIP4KO Maus wird derartige Studien erleichtern und auch eine *in vivo* Verhaltensanalyse der postulierten Befunde ermöglichen. Aufgrund seiner differentiellen Expression könnte KCHIP4 ein wichtiges selektives Target für die Entwicklung neuer Subtyp-spezifischer, nebenwirkungsarmer Arzneimittel darstellen.

Kürzlich wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Liss die Methode der Einzelzell-Lasermikrodissektion und quantitative mRNA Expressionsanalyse in humanen DA Mittelhirnneuronen etabliert (Ramirez et al., 2006). So könnte man nun untersuchen, ob auch im humanen Gehirn die Dualität des mesokortikolimbischen DA Systems vorhanden ist. Unkonventionelle DA Neurone könnten anhand der geringen DAT/TH und DAT/VMAT2 mRNA Expression sowie anhand der geringen Abundanz für D2, GIRK2, SK3 (Wolfart et al., 2001) und HCN2-4 (Franz et al., 2000) mRNA im Vergleich zu klassischen nigrostriatalen DA Neuronen identifiziert werden.

Die in der Arbeitsgruppe von Prof. Roeper etablierte Methode der elektrophysiologischen Messung und histochemischen Identifizierung DA Mittelhirnneurone im anästhesierten Tier, erlaubt es die unkonventionellen DA Neurone und deren funktionelle Rolle auch *in vivo* zu analysieren. Die in dieser Arbeit beschriebenen elektrophysiologischen Eigenschaften und die spezifische anatomische Lokalisation dieser Zellen in der medialen VTA im intermediären Mittelhirn werden derartige Studien erleichtern.

Basierend auf den Resultaten dieser Arbeit könnten die unkonventionellen DA Subpopulationen, wie bereits erwähnt, ein wichtiges zelluläres Target bei der selektiven Modulation DA Subpopulationen für die Entwicklung neuer spezifischer, nebenwirkungsarmer Arzneimittel in der Therapie neurologischer Erkrankungen wie z.B. Schizophrenie und ADHS sein. In zukünftigen *in vitro* und

in vivo Experimenten könnte durch Badapplikation bzw. systemische Applikation die funktionellen Eigenschaften verschiedener Wirkstoffe untersucht werden. Dabei wäre das Ziel Substanzen zu finden, die möglichst selektiv nur eine spezielle DA Subpopulation in ihrer Aktivität beeinflussen. Ein geeigneter Kandidat könnte beispielsweise Orexine (Hypocretine) sein. Orexin-exprimierende Neurone sind im lateralen Hypothalamus lokalisiert und projizieren u.a. zur VTA. Sie haben eine wichtige Funktion bei der Regulation der Aufmerksamkeit. Ferner sind sie involviert in die Regulation belohnender Verhaltensweisen natürlicher Verstärker (Nahrungsaufnahme) und der Drogenabhängigkeit (Harris und Aston-Jones, 2006). Die direkte Infusion von Orexinen in die VTA führte zu erhöhten Dopamin Konzentrationen im PFC, wobei die Konzentrationen im NAc unverändert blieben (Vittoz und Berridge, 2006). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Orexine die Mehrheit von DA VTA Neuronen erregt, jedoch nicht DA SN Neurone. Die orexinerge LH-VTA Projektion könnte somit eine wichtige Bedeutung bei der Erregung einer oder mehrerer Subpopulationen DA Neurone als Antwort auf primäre Belohnungsreize haben (Korotkova et al., 2004). Die Definition dieser Subpopulation bzw. Subpopulationen ist Gegenstand zukünftiger Studien.

5 Zusammenfassung

Dopaminerge (DA) Neurone sind im Mittelhirn hauptsächlich in zwei Nuklei lokalisiert: in der Substantia nigra (SN, A9) und Area tegmentalis ventralis (VTA, A10). Während DA SN Neurone das dorsale Striatum innervieren, projizieren die DA VTA Neurone in kortikolimbische Hirnareale (u.a. präfrontaler Kortex (PFC), basolaterale Amygdala (BLA), Nucleus Accumbens (NAc) core/shell). Die eingehend charakterisierten klassischen mesostriatalen DA Neurone sind essentiell für die Ausführung von Willkürbewegungen und für die Vermittlung prädiktiver Belohnungssignale. Dagegen sind die elektrophysiologischen Eigenschaften der DA Neurone, die durch eine vornehmlich tonische Dopaminfreisetzung in kortikolimbischen Hirnarealen beispielsweise die Salienz appetitiver und aversiver Stimuli, sowie kognitive (working memory) und emotionale Funktionen vermitteln, weitgehend unbekannt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher selektives retrogrades Tracing in Kombination mit elektrophysiologischen und immunhistochemischen Methoden durchgeführt, um die anatomischen, morphologischen und funktionellen Eigenschaften mesokortikolimbischer DA Neurone im Vergleich zu den klassischen mesostriatalen DA Neuronen in adulten C57Bl/6 Mäusen zu analysieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde herausgefunden, dass das mesokortikolimbische DA System anatomisch, molekular und funktionell von zwei unterschiedlichen Phänotypen DA Neurone gebildet wird. Dabei konnte neben dem klassischen Typ, erstmals die Existenz eines weiteren DA Phänotyps mit unkonventionellen elektrophysiologischen Eigenschaften beschrieben werden.

Es konnte gezeigt werden, dass DA Neurone, die den PFC, die BLA und die core Subregion des NAc innervieren vor allem in der medialen VTA des intermediären Mittelhirn lokalisiert waren. Es handelte sich um kleine Zellen (durchschnittlicher Zelldurchmesser $< 20 \mu\text{m}$), die spezifisch in bestimmten Subnuklei der VTA

nachgewiesen wurden (Nukleus paranigralis, Nukleus parabrachialis pigmentosus, rostraler und zentraler Nukleus linearis). Dagegen waren die DA Nervenzellen, die in den lateralen shell des NAc sowie in das dorsolaterale Striatum projizieren signifikant größer (durchschnittlicher Zelldurchmesser > 20 µm) und präferentiell in der lateralen VTA (Nukleus parabrachialis pigmentosus), in der SN und in der Area retrorubralis (A8) lokalisiert.

Die topographische Dualität des mesokortikolimbischen DA Systems konnte auch in einer differentiellen Proteinexpression wiedergefunden werden. Mesokortikale, mesoamygdaläre und mesolimbische core DA Neurone waren im Vergleich zu mesolimbischen shell und mesostriatalen DA Neuronen durch eine geringe Expression des Dopamintransporters (DAT) gekennzeichnet. Ferner konnte gezeigt werden, dass das Markerprotein Calbindin nur bedingt für die Differenzierung des DA Mittelhirnsystems geeignet ist.

Die maximale Feuerungsrate der mesostriatalen und mesolimbischen shell DA Neurone lag stets unterhalb von 10 Hz und war ebenso wie weitere elektrophysiologische Parameter (Aktionspotentialdauer, Nachhyperpolarisation) konsistent mit den in der Literatur beschriebenen klassischen DA SN Neuronen *in vivo* und *in vitro*. Im unterschwelligen Bereich eines Aktionspotentials war eine schnelle Inaktivierung eines spannungabhängigen Kaliumauswärtsstroms (A-Strom) charakteristisch. Bei Injektion hyperpolarisierender Ströme wiesen diese Zellen eine für DA Neurone typische zeitabhängige Verringerung des korrespondierenden Membranpotentials auf (sag Amplitude, vermittelt über HCN Kanälen). Die Applikation von 100 µM Dopamin führte zu einer über somatodendritische D2 Autorezeptoren vermittelten kompletten und persistierenden Inhibition der Spontanaktivität.

Im Gegensatz hierzu waren mesokortikale, mesoamygdaläre und mesolimbische core DA Neurone durch unkonventionelle elektrophysiologische Eigenschaften gekennzeichnet. Diese Zellen konnten ungewöhnlich hohe maximale Feuerungsraten von etwa 20-30 Hz erreichen. Die Aktionspotentialdauer war signifikant länger und die Amplitude der Nachhyperpolarisation signifikant niedriger. Weiterhin gab es keine Hinweise auf das Vorhandensein von HCN

Kanälen und die Inaktivierung des A-Typ Kanals war signifikant langsamer. Die Applikation von Dopamin führte entweder zu keiner (mesokortikale DA Neurone) oder nur zu einer transienten (mesoamygdaläre, mesolimbische core DA Neurone) Inhibition der Spontanaktivität. Ferner konnte gezeigt werden, dass GIRK2 Kanäle, die durch somatodendritische D2 Autorezeptoren aktiviert werden, signifikant niedriger in den unkonventionellen DA Neuronen exprimiert sind. Der funktionelle Dualismus des mesokortikolimbischen DA System konnte anhand einer hierarchischen Clusteranalyse statistisch bestätigt werden.

Die unkonventionellen elektrophysiologischen Eigenschaften machen die mesokortikalen, mesoamygdalären und mesolimbischen core DA Neuronen zu geeigneten Kandidaten für die Vermittlung tonischer Dopaminfreisetzung *in vivo* und haben somit eine wichtige Funktion bei der Vermittlung kognitiver, motivationaler und emotionaler Fähigkeiten.

Der in der vorliegenden Arbeit vorgestellte anatomische, morphologische, funktionelle und molekulare Dualismus des mesokortikolimbischen DA Systems liefert die zelluläre Basis für die selektive Modulation DA Subpopulationen und ist somit von besonderer Bedeutung für die Entwicklung neuer spezifischer, nebenwirkungsarmer Arzneimittel in der Therapie neurologischer Erkrankungen wie beispielsweise Schizophrenie, Morbus Parkinson und ADHS.

Veröffentlichungen, Kongressbeiträge:

Daten der vorliegenden Dissertation haben zu folgender Veröffentlichung beigetragen:

Lammel S, Hetzel A, Häckel O, Jones I, Liss B and Roeper J

"Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system" (NEURON, *cell press*, www.neuron.org, Manuskript angenommen am 04.01.2008)

Daten der vorliegenden Dissertation wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt:

(1) Doktorandentagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG) in Nürnberg-Heroldsberg, 06. - 08. September 2006 (Vortrag)

Lammel S, Haeckel O, Hetzel A, Liss B and Roeper J

"Functional and molecular topography of the dopaminergic mesocorticolimbic system in mice"

1. Preis für den Beitrag (200 €)

(2) Neuroscience 2006 in Atlanta, USA, 14. - 18. Oktober 2006 (Poster)

Lammel S, Haeckel O, Hetzel A, Liss B and Roeper J

"Functional and molecular topography of the dopaminergic mesocorticolimbic system in mice"

(3) 50 Jahre Dopamin, Göteborg, Schweden, 30. Mai - 2. Juni 2007 (Poster)

Lammel S, Hetzel A, Haeckel O, Liss B and Roeper J

"Functional and molecular characterization reveals a unique phenotype for mesoprefrontal dopaminergic neurons"

(4) Neuroscience 2007 in San Diego, USA, 03. - 07. November 2007 (Poster)

Lammel S, Hetzel A, Haeckel O, Liss B and Roeper J

"The cellular and molecular basis for a dual mesocorticolimbic dopamine system"

6 Literaturverzeichnis

- Albanese, A. and D. Minciacchi (1983). "Organization of the ascending projections from the ventral tegmental area: a multiple fluorescent retrograde tracer study in the rat." J Comp Neurol **216**(4): 406-20.
- Allman, J. M., A. Hakeem, et al. (2001). "The anterior cingulate cortex. The evolution of an interface between emotion and cognition." Ann N Y Acad Sci **935**: 107-17.
- An, W. F., M. R. Bowlby, et al. (2000). "Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors." Nature **403**(6769): 553-6.
- Apps, R. and M. Garwicz (2000). "Precise matching of C1±C3 zone olivo-cortical divergence and cortico-nuclear convergence in the paravermal cerebellum." Eur J Neurosci **12**: 205-214.
- Apps, R., J. R. Trott, et al. (1991). "A study of branching in the projection from the inferior olive to the x-zone and lateral c1 zone of the cat cerebellum using a combined electrophysiological and retrograde fluorescent double-labelling technique." Exp Brain Res **87**: 141-152.
- Backhaus, K., B. Erichson, et al. (1996). *Multivariate Analysemethoden. Eine anwendungsorientierte Einführung*. Berlin, Springer.
- Bannon, M. J. and R. H. Roth (1983). "Pharmacology of mesocortical dopamine neurons." Pharmacol Rev **35**(1): 53-68.
- Bannon, M. J., M. E. Wolf, et al. (1983). "Pharmacology of dopamine neurons innervating the prefrontal, cingulate and piriform cortices." Eur J Pharmacol **92**(1-2): 119-25.
- Bassareo, V. and G. Di Chiara (1999). "Differential responsiveness of dopamine transmission to food-stimuli in nucleus accumbens shell/core compartments." Neuroscience **89**(3): 637-41.
- Beaulieu, J. M., T. D. Sotnikova, et al. (2005). "An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior." Cell **122**(2): 261-73.
- Beckstead, R. M., V. B. Domesick, et al. (1979). "Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat." Brain Res **175**(2): 191-217.
- Berger, B., J. P. Tassin, et al. (1974). "Histochemical confirmation for dopaminergic innervation of the rat cerebral cortex after destruction of the noradrenergic ascending pathways." Brain Res **81**(2): 332-7.

- Bjorklund, A. and S. B. Dunnett (2007). "Dopamine neuron systems in the brain: an update." Trends Neurosci **30**(5): 194-202.
- Bjorklund, A. and S. B. Dunnett (2007). "Fifty years of dopamine research." Trends Neurosci **30**(5): 185-7.
- Bonci, A. and F. W. Hopf (2005). "The dopamine D2 receptor: new surprises from an old friend." Neuron **47**(3): 335-8.
- Bond, C. T., J. Maylie, et al. (1999). "Small-conductance calcium-activated potassium channels." Ann N Y Acad Sci **868**: 370-8.
- Bortz, J. (1989). Statistik für Sozialwissenschaftler.
- Brown, V. J. and E. M. Bowman (2002). "Rodent models of prefrontal cortical function." Trends Neurosci **25**(7): 340-3.
- Brozoski, T. J., R. M. Brown, et al. (1979). "Cognitive deficit caused by regional depletion of dopamine in prefrontal-cortex of rhesus monkey." Science **205**: 929-932.
- Bunney, B. S. and A. A. Grace (1978). "Acute and chronic haloperidol treatment: comparison of effects on nigral dopaminergic cell activity." Life Sci **23**(16): 1715-27.
- Cameron, D. L., M. W. Wessendorf, et al. (1997). "A subset of ventral tegmental area neurons is inhibited by dopamine, 5-hydroxytryptamine and opioids." Neuroscience **77**(1): 155-66.
- Cardinal, R. N. and B. J. Everitt (2004). "Neural and psychological mechanisms underlying appetitive learning: links to drug addiction." Curr Opin Neurobiol **14**(2): 156-62.
- Cardinal, R. N., J. A. Parkinson, et al. (2002). "Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex." Neurosci Biobehav Rev **26**(3): 321-52.
- Cardinal, R. N., D. R. Pennicott, et al. (2001). "Impulsive choice induced in rats by lesions of the nucleus accumbens core." Science **292**(5526): 2499-501.
- Carlson, A. (1957). 3,4-dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. Nature. **120**: 1200.
- Carr, D. B. and S. R. Sesack (2000). "GABA-containing neurons in the rat ventral tegmental area project to the prefrontal cortex." Synapse **38**(2): 114-23.

- Carr, D. B. and S. R. Sesack (2000). "Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons." J Neurosci **20**(10): 3864-73.
- Carter, D. A. and H. C. Fibiger (1977). "Ascending projections of presumed dopamine-containing neurons in the ventral tegmentum of the rat as demonstrated by horseradish peroxidase." Neuroscience **2**(4): 569-76.
- Casey, B. J., J. T. Nigg, et al. (2007). "New potential leads in the biology and treatment of attention deficit-hyperactivity disorder." Curr Opin Neurol **20**(2): 119-24.
- Centonze, D., B. Picconi, et al. (2001). "Dopaminergic control of synaptic plasticity in the dorsal striatum." Eur J Neurosci **13**(6): 1071-7.
- Charley, P. J., J. Grenhoff, et al. (1991). "Burst firing of mesencephalic dopamine neurons is inhibited by somatodendritic application of kynurenate." Acta Physiol Scand **142**(1): 105-12.
- Chergui, K. (1993). "Tonic activation of NMDA receptors causes spontaneous burst discharge of rat midbrain dopamine neurons in vivo." Eur J Neurosci **5**: 137-144.
- Chiodo, L. A., M. J. Bannon, et al. (1984). "Evidence for the absence of impulse-regulating somatodendritic and synthesis-modulating nerve terminal autoreceptors on subpopulations of mesocortical dopamine neurons." Neuroscience **12**(1): 1-16.
- Chiodo, L. A. and B. S. Bunney (1983). "Typical and atypical neuroleptics: differential effects of chronic administration on the activity of A9 and A10 midbrain dopaminergic neurons." J Neurosci **3**(8): 1607-19.
- Chronister, R. B., K. E. Farnell, et al. (1976). "The rodent neostriatum: a Golgi analysis." Brain Res **108**: 37-46.
- Cotzias, G. C. (1967). "Aromatic amino acids and modification of Parkinsonism." N. Engl. J. Med. **282**: 31-33.
- Cragg, S. J. and M. E. Rice (2004). "Dancing past the DAT at a DA synapse." Trends Neurosci **27**(5): 270-7.
- Dahlstrom, A. and K. Fuxe (1964). "Localization of monoamines in the lower brain stem." Experientia **20**(7): 398-9.
- Dai, M. and J. M. Tepper (1998). "Do silent dopaminergic neurons exist in rat substantia nigra in vivo?" Neuroscience **85**(4): 1089-99.

- Dal Bo, G., F. St-Gelais, et al. (2004). "Dopamine neurons in culture express VGLUT2 explaining their capacity to release glutamate at synapses in addition to dopamine." J Neurochem **88**(6): 1398-405.
- Dal Toso, R., B. Sommer, et al. (1989). "The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing." Embo J **8**(13): 4025-34.
- Daniels, J. C., H. Sakai, et al. (1971). "Evaluation of lymphocyte reactivity studies in patients with thermal burns." J Trauma **11**(7): 595-601.
- Dauer, W. and S. Przedborski (2003). "Parkinson's disease: mechanisms and models." Neuron **39**(6): 889-909.
- Deniau, J. M., A. M. Thierry, et al. (1980). "Electrophysiological identification of mesencephalic ventromedial tegmental (VMT) neurons projecting to the frontal cortex, septum and nucleus accumbens." Brain Res **189**(2): 315-26.
- De Oliveira, I. R. and M. F. Juruena (2006). "Treatment of psychosis: 30 years of progress." J Clin Pharm Ther **31**(6): 523-34.
- DiFrancesco, D. (1993). "Pacemaker mechanisms in cardiac tissue." Annu Rev Physiol **55**: 455-72.
- DiFrancesco, D. and P. Tortora (1991). "Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP." Nature **351**(6322): 145-7.
- Dubach, M. (1994). *Telencephalic dopamine cells in monkeys, humans, and rats. Phylogeny and Development of Catecholamine Systems in the CNS of Vertebrates*, Cambridge University Press: 273-287.
- Ehringer, H. and O. Hornykiewicz (1960). "[Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system.]." Klin Wochenschr **38**: 1236-9.
- Emson, P. C. and G. F. Koob (1978). "The origin and distribution of dopamine-containing afferents to the rat frontal cortex." Brain Res **142**(2): 249-67.
- Everitt, B. J. and T. W. Robbins (2005). "Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion." Nat Neurosci **8**(11): 1481-9.
- Fa, M., G. Mereu, et al. (2003). "Electrophysiological and pharmacological characteristics of nigral dopaminergic neurons in the conscious, head-restrained rat." Synapse **48**(1): 1-9.

- Fallon, J. H. (1981). "Collateralization of monoamine neurons: mesotelencephalic dopamine projections to caudate, septum, and frontal cortex." J Neurosci **1**(12): 1361-8.
- Fallon, J. H. (1988). "Topographic organization of ascending dopaminergic projections." Ann N Y Acad Sci **537**: 1-9.
- Fallon, J. H. and R. Y. Moore (1978). "Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum." J Comp Neurol **180**(3): 545-80.
- Fleischhacker, W. W. and C. G. Widschwendter (2006). "Treatment of schizophrenia patients: comparing new-generation antipsychotics to each other." Curr Opin Psychiatry **19**(2): 128-34.
- Fields, H. L., G. O. Hjelmstad, et al. (2007). "Ventral Tegmental Area Neurons in Learned Appetitive Behavior and Positive Reinforcement." Annu Rev Neurosci **30**: 289-316.
- Fiorillo, C. D., P. N. Tobler, et al. (2003). "Discrete coding of reward probability and uncertainty by dopamine neurons." Science **299**(5614): 1898-902.
- Floresco, S. B. and A. G. Phillips (2001). "Delay-dependent modulation of memory retrieval by infusion of a dopamine D1 agonist into the rat medial prefrontal cortex." Behav Neurosci **115**(4): 934-9.
- Floresco, S. B., A. R. West, et al. (2003). "Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission." Nat Neurosci **6**(9): 968-73.
- Ford, C. P., G. P. Mark, et al. (2006). "Properties and opioid inhibition of mesolimbic dopamine neurons vary according to target location." J Neurosci **26**(10): 2788-97.
- Franz, O., B. Liss, et al. (2000). "Single-cell mRNA expression of HCN1 correlates with a fast gating phenotype of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated ion channels (Ih) in central neurons." Eur J Neurosci **12**(8): 2685-93.
- Freeman, A. S., L. T. Meltzer, et al. (1985). "Firing properties of substantia nigra dopaminergic neurons in freely moving rats." Life Sci **36**(20): 1983-94.
- Gainetdinov, R. R., S. R. Jones, et al. (1999). "Functional hyperdopaminergia in dopamine transporter knock-out mice." Biol Psychiatry **46**(3): 303-11.
- Gainetdinov, R. R., R. T. Premont, et al. (2004). "Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions." Annu Rev Neurosci **27**: 107-44.

- Gariano, R. F., J. M. Tepper, et al. (1989). "Mesocortical dopaminergic neurons. 1. Electrophysiological properties and evidence for soma-dendritic autoreceptors." Brain Res Bull **22**(3): 511-6.
- Garris, P. A. and R. M. Wightman (1994). "Different kinetics govern dopaminergic transmission in the amygdala, prefrontal cortex, and striatum: an in vivo voltammetric study." J Neurosci **14**(1): 442-50.
- Gaspar, P., C. W. Heizmann, et al. (1993). "Calbindin D-28K in the dopaminergic mesocortical projection of a monkey (*Aotus trivirgatus*)." Brain Res **603**(1): 166-72.
- Gaspar, P., I. Stepniewska, et al. (1992). "Topography and collateralization of the dopaminergic projections to motor and lateral prefrontal cortex in owl monkeys." J Comp Neurol **325**(1): 1-21.
- Gerfen, C. R., K. G. Baimbridge, et al. (1987). "The neostriatal mosaic: III. Biochemical and developmental dissociation of patch-matrix mesostriatal systems." J Neurosci **7**(12): 3935-44.
- Gerfen, C. R., M. Herkenham, et al. (1987). "The neostriatal mosaic: II. Patch- and matrix-directed mesostriatal dopaminergic and non-dopaminergic systems." J Neurosci **7**(12): 3915-34.
- Gerfen, C. R. and P. E. Sawchenko (1984). "An anterograde neuroanatomical tracing method that shows the detailed morphology of neurons, their axons and terminals: immunohistochemical localization of an axonally transported plant lectin, Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L)." Brain Res **290**(2): 219-38.
- Gerfen, C. R. and C. J. Wilson (1996). The basal ganglia. Handbook of chemical neuroanatomy, integrated systems of the CNS, part III. L. W. Swanson, A. Bjorklund and T. Hökfelt, Elsevier Science. **12**: 360-466.
- Gessa, G. L., P. Devoto, et al. (2000). "Dissociation of haloperidol, clozapine, and olanzapine effects on electrical activity of mesocortical dopamine neurons and dopamine release in the prefrontal cortex." Neuropsychopharmacology **22**(6): 642-9.
- Goldman-Rakic, P. S. (1995). "Architecture of the prefrontal cortex and the central executive." Ann N Y Acad Sci **769**: 71-83.
- Goldman-Rakic, P. S. and L. D. Selemon (1997). "Functional and anatomical aspects of prefrontal pathology in schizophrenia." Schizophr Bull **23**(3): 437-58.

- Goldman-Rakic, P. S. (1999). "The physiological approach: functional architecture of working memory and disordered cognition in schizophrenia." Biol Psychiatry **46**(5): 650-61.
- Gonon, F. G. (1988). "Nonlinear relationship between impulse flow and dopamine released by rat midbrain dopaminergic neurons as studied by in vivo electrochemistry." Neuroscience **24**(1): 19-28.
- Grace, A. A. and B. S. Bunney (1980). "Nigral dopamine neurons: intracellular recording and identification with L-dopa injection and histofluorescence." Science **210**(4470): 654-6.
- Grace, A. A. (2002). Dopamine. Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress.
- Grace, A. A. and B. S. Bunney (1983). "Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--1. Identification and characterization." Neuroscience **10**(2): 301-15.
- Grace, A. A. and B. S. Bunney (1983). "Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--2. Action potential generating mechanisms and morphological correlates." Neuroscience **10**(2): 317-31.
- Grace, A. A. and B. S. Bunney (1984). "The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing." J Neurosci **4**(11): 2877-90.
- Grace, A. A. and B. S. Bunney (1984). "The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing." J Neurosci **4**(11): 2866-76.
- Grace, A. A. and B. S. Bunney (2000). Electrophysiological Properties of Midbrain Dopamine Neurons. Neuropsychopharmacology: The Fourth Generation of Progress.
- Grace, A. A., B. S. Bunney, et al. (1997). "Dopamine-cell depolarization block as a model for the therapeutic actions of antipsychotic drugs." Trends Neurosci **20**(1): 31-7.
- Grace, A. A. and S. P. Onn (1989). "Morphology and electrophysiological properties of immunocytochemically identified rat dopamine neurons recorded in vitro." J Neurosci **9**(10): 3463-81.
- Grace, A. A., S. B. Floresco, et al. (2007). "Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors." Trends Neurosci **30**(5): 220-7.
- Greengard, P. (2001). "The neurobiology of slow synaptic transmission." Science **294**(5544): 1024-30.

- Haber, S. N., H. Ryoo, et al. (1995). "Subsets of midbrain dopaminergic neurons in monkeys are distinguished by different levels of mRNA for the dopamine transporter: comparison with the mRNA for the D2 receptor, tyrosine hydroxylase and calbindin immunoreactivity." J Comp Neurol **362**(3): 400-10.
- Harrington, K. A., S. J. Augood, et al. (1996). "Dopamine transporter (Dat) and synaptic vesicle amine transporter (VMAT2) gene expression in the substantia nigra of control and Parkinson's disease." Brain Res Mol Brain Res **36**(1): 157-62.
- Hetzl, A. and B. Liss (2006). Autoreceptor-mediated dopamine-effects on DA midbrain neurons: Molecular basis and physiological responses. FENS, P236, Wien.
- Hille, B. (2001). Ion Channels of Excitable Membranes, Sinauer Associates.
- Hollerman, J. R. and A. A. Grace (1990). "The effects of dopamine-depleting brain lesions on the electrophysiological activity of rat substantia nigra dopamine neurons." Brain Res **533**(2): 203-12.
- Huber, M., E. Kirchler, et al. (2007). "[Neuropsychiatric bases of the methylphenidate-therapy of the attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD)]." Fortschr Neurol Psychiatr **75**(5): 275-84.
- Iacovelli, L., M. Sallese, et al. (1999). "Regulation of G-protein-coupled receptor kinase subtypes by calcium sensor proteins." Faseb J **13**(1): 1-8.
- Ito, R., J. W. Dalley, et al. (2000). "Dissociation in conditioned dopamine release in the nucleus accumbens core and shell in response to cocaine cues and during cocaine-seeking behavior in rats." J Neurosci **20**(19): 7489-95.
- Iversen, L. (2006). "Neurotransmitter transporters and their impact on the development of psychopharmacology." Br J Pharmacol **147 Suppl 1**: S82-8.
- Jackson, M. B. (1997). Whole-Cell Voltage clamp Recording. Current Protocols in Neuroscience, John Wiley & Son, Inc.: 6.6.1-6.6.30.
- Johannssen, H. (2006). Adaptive Plastizität DA Mittelhirnneurone. Institut für Physiologie, Marburg. Diplomarbeit.
- Johnson, S. W. and R. A. North (1992). "Two types of neurone in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs." J Physiol **450**: 455-68.
- Jones, S. and J. A. Kauer (1999). "Amphetamine depresses excitatory synaptic transmission via serotonin receptors in the ventral tegmental area." J Neurosci **19**(22): 9780-7.

- Kabbani, N., L. Negyessy, et al. (2002). "Interaction with neuronal calcium sensor NCS-1 mediates desensitization of the D2 dopamine receptor." J Neurosci **22**(19): 8476-86.
- Kalivas, P. W. and M. Nakamura (1999). "Neural systems for behavioral activation and reward." Curr Opin Neurobiol **9**(2): 223-7.
- Kalivas, P. W. and N. D. Volkow (2005). "The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice." Am J Psychiatry **162**(8): 1403-13.
- Katz, L. C., A. Burkhalter, et al. (1984). "Fluorescent latex microspheres as a retrograde neuronal marker for in vivo and in vitro studies of visual cortex." Nature **310**(5977): 498-500.
- Katz, L. C. and D. M. Iarovici (1990). "Green fluorescent latex microspheres: a new retrograde tracer." Neuroscience **34**(2): 511-20.
- Kawaguchi, Y. (1993). "Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum." J Neurosci **13**(11): 4908-23.
- Kebabian, J. W. and D. B. Calne (1979). "Multiple receptors for dopamine." Nature **277**(5692): 93-6.
- Kellendonk, C., E. H. Simpson, et al. (2006). "Transient and selective overexpression of dopamine D2 receptors in the striatum causes persistent abnormalities in prefrontal cortex functioning." Neuron **49**(4): 603-15.
- Kerns, J. G., J. D. Cohen, et al. (2005). "Decreased conflict- and error-related activity in the anterior cingulate cortex in subjects with schizophrenia." Am J Psychiatry **162**(10): 1833-9.
- Kesner, R. P., R. A. Bierley, et al. (1981). "Short-term memory: the role of d-amphetamine." Pharmacol Biochem Behav **15**(5): 673-6.
- King, V., D. M. Armstrong, et al. (1998). "Numerical aspects of pontine, lateral reticular, and inferior olivary projections to two paravermal cortical zones of the cat cerebellum." J Comp Neurol **390**: 1-15.
- Kitai, S. T., P. D. Shepard, et al. (1999). "Afferent modulation of dopamine neuron firing patterns." Curr Opin Neurobiol **9**(6): 690-7.
- Kitamura, Y., T. Taniguchi, et al. (2003). "Neuroprotective mechanisms of antiparkinsonian dopamine D2-receptor subfamily agonists." Neurochem Res **28**(7): 1035-40.

- Kobbert, C., R. Apps, et al. (2000). "Current concepts in neuroanatomical tracing." Prog Neurobiol **62**(4): 327-51.
- Koop, J. and D. Lois (2006). Multivariate statistische Analyse-Verfahren mit SPSS (Übung), TU Chemnitz.
- Korotkova, T. M., A. A. Ponomarenko, et al. (2004). "Functional diversity of ventral midbrain dopamine and GABAergic neurons." Mol Neurobiol **29**(3): 243-59.
- Kottke, T. and H. Stark (2006). "Komplexe Regulation bei Dopamin-D2-Rezeptoren." Pharm. Unserer Zeit **1**(35).
- Koyama, S., Y. Kanemitsu, et al. (2005). "Spontaneous activity and properties of two types of principal neurons from the ventral tegmental area of rat." J Neurophysiol **93**: 3282-3293.
- Krause, K. H., S. H. Dresel, et al. (2003). "The dopamine transporter and neuroimaging in attention deficit hyperactivity disorder." Neurosci Biobehav Rev **27**(7): 605-13.
- Lacey, M. G., N. B. Mercuri, et al. (1989). "Two cell types in rat substantia nigra zona compacta distinguished by membrane properties and the actions of dopamine and opioids." J Neurosci **9**(4): 1233-41.
- Lachman, H. M., D. F. Papolos, et al. (1996). "Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders." Pharmacogenetics **6**(3): 243-50.
- Leviel, V. (2001). "The reverse transport of DA, what physiological significance?" Neurochem Int **38**(2): 83-106.
- Lewis, D. A., S. R. Sesack, et al. (1998). "Dopamine axons in primate prefrontal cortex: specificity of distribution, synaptic targets, and development." Adv Pharmacol **42**: 703-6.
- Li, T., P. C. Sham, et al. (1996). "Preferential transmission of the high activity allele of COMT in schizophrenia." Psychiatr Genet **6**(3): 131-3.
- Liang, C. L., C. M. Sinton, et al. (1996). "Midbrain dopaminergic neurons in the mouse that contain calbindin-D28k exhibit reduced vulnerability to MPTP-induced neurodegeneration." Neurodegeneration **5**(4): 313-8.
- Lindvall, O., A. Bjorklund, et al. (1974). "Mesencephalic dopamine neurons projecting to neocortex." Brain Res **81**(2): 325-31.

- Lisman, J. E. and A. A. Grace (2005). "The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory." Neuron **46**(5): 703-13.
- Liss, B. (1999). Differentielle Expression von Kaliumkanälen in Substantia nigra Neuronen der Maus (*Mus musculus L.*), Hamburg. Dissertation.
- Liss, B. (2002). Differential co-expression of KCHIP-subunits defines inactivation kinetics of A-type potassium channels in DA VTA neurons. Poster 438.17
- Liss, B., O. Franz, et al. (2001). "Tuning pacemaker frequency of individual dopaminergic neurons by Kv4.3L and KChip3.1 transcription." Embo J **20**(20): 5715-24.
- Liss, B. and J. Roeper (2004). "Correlating function and gene expression of individual basal ganglia neurons." Trends Neurosci **27**(8): 475-81.
- Liss, B., O. Haeckel, et al. (2005). "K-ATP channels promote the differential degeneration of dopaminergic midbrain neurons." Nat Neurosci **8**(12): 1742-51.
- Liss, B. and J. Roeper (submitted) "Individual dopamine midbrain neurons: functional diversity and flexibility in health and disease." Brain Res Rev.
- Lodge, D. J. and A. A. Grace (2006). "The laterodorsal tegmentum is essential for burst firing of ventral tegmental area dopamine neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(13): 5167-72.
- Lookingland, K. J. and K. E. Moore (2005). Functional Neuroanatomy of hypothalamic dopaminergic neuroendocrine systems. Handbook of Chemical Neuroanatomy (Dopamine). S. B. Dunnett, M. Bentivoglio, A. Björklund and T. Hökfelt, Elsevier. **21**: 435-523.
- Ludwig, A., X. Zong, et al. (1998). "A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels." Nature **393**: 587-591.
- Ludwig, M. and Q. J. Pittman (2003). "Talking back: dendritic neurotransmitter release." Trends Neurosci **26**(5): 255-61.
- Mameli-Engvall, M., A. Evrard, et al. (2006). "Hierarchical control of dopamine neuron-firing patterns by nicotinic receptors." Neuron **50**(6): 911-21.
- Manes, F., B. Sahakian, et al. (2002). "Decision-making processes following damage to the prefrontal cortex." Brain **125**(Pt 3): 624-39.
- Mantz, J., A. M. Thierry, et al. (1989). "Effect of noxious tail pinch on the discharge rate of mesocortical and mesolimbic dopamine neurons: selective activation of the mesocortical system." Brain Res **476**(2): 377-81.

- Margolis, E. B., G. O. Hjelmstad, et al. (2003). "Kappa-opioid agonists directly inhibit midbrain dopaminergic neurons." J Neurosci **23**(31): 9981-6.
- Margolis, E. B., H. Lock, et al. (2006). "Kappa opioids selectively control dopaminergic neurons projecting to the prefrontal cortex." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(8): 2938-42.
- Margolis, E. B., H. Lock, et al. (2006). "The ventral tegmental area revisited: is there an electrophysiological marker for dopaminergic neurons?" J Physiol **577**(Pt 3): 907-24.
- Marinelli, M., C. N. Rudick, et al. (2006). "Excitability of dopamine neurons: modulation and physiological consequences." CNS Neurol Disord Drug Targets **5**(1): 79-97.
- Matthysse, S. (1973). "Antipsychotic drug actions: a clue to the neuropathology of schizophrenia?" Fed Proc **32**(2): 200-5.
- Mayer, M. L., G. L. Westbrook, et al. (1984). "Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones." Nature **309**(5965): 261-3.
- Meltzer, H. Y., Z. Li, et al. (2003). "Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **27**(7): 1159-72.
- Mercuri, N. B., A. Saiardi, et al. (1997). "Loss of autoreceptor function in dopaminergic neurons from dopamine D2 receptor deficient mice." Neuroscience **79**(2): 323-7.
- Missale, C., S. R. Nash, et al. (1998). "Dopamine receptors: from structure to function." Physiol Rev **78**(1): 189-225.
- Müller, W. E. (2002). "Wirkungsmechanismen der atypischen Neuroleptika." Pharmazie in unserer Zeit **6**(31): 537-544.
- Murphy, B. L., A. F. Arnsten, et al. (1996). "Increased dopamine turnover in the prefrontal cortex impairs spatial working memory performance in rats and monkeys." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(3): 1325-9.
- Nadal, M. S., A. Ozaita, et al. (2003). "The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type K⁺ channels." Neuron **37**(3): 449-61.
- Neuhoff, H., A. Neu, et al. (2002). "I(h) channels contribute to the different functional properties of identified dopaminergic subpopulations in the midbrain." J Neurosci **22**(4): 1290-302.

- Nichols, C. G. (2006). "KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism." Nature **440**(7083): 470-6.
- Nicholls, J. G., A. R. Martin, et al. (2002). Vom Neuron zum Gehirn, Spektrum Verlag.
- Numberger, M. and A. Draguhn (1996). Patch-clamp-Technik, Spektrum Verlag.
- Oades, R. D. and G. M. Halliday (1987). "Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity." Brain Res **434**(2): 117-65.
- Olds, J. and P. Milner (1954). "Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain." J Comp Physiol Psychol **47**(6): 419-27.
- Olson, V. G. and E. J. Nestler (2007). "Topographical organization of GABAergic neurons within the ventral tegmental area of the rat." Synapse **61**(2): 87-95.
- O'Neill, M. J., C. A. Hicks, et al. (1998). "Dopamine D2 receptor agonists protect against ischaemia-induced hippocampal neurodegeneration in global cerebral ischaemia." Eur J Pharmacol **352**(1): 37-46.
- Otani, S. (2003). "Prefrontal cortex function, quasi-physiological stimuli, and synaptic plasticity." J Physiol Paris **97**(4-6): 423-30.
- Park, S. K., M. D. Nguyen, et al. (2005). "Par-4 links dopamine signaling and depression." Cell **122**(2): 275-87.
- Paxinons, G. and K. Franklin (2001). The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Academic Press.
- Phillips, A. G., S. Ahn, et al. (2004). "Magnitude of dopamine release in medial prefrontal cortex predicts accuracy of memory on a delayed response task." J Neurosci **24**(2): 547-53.
- Phillipson, O. T. (1979). "Afferent projections to the ventral tegmental area of Tsai and interfascicular nucleus: a horseradish peroxidase study in the rat." J Comp Neurol **187**: 117-43.
- Phillipson, O. T. and A. C. Griffith (1980). "The neurons of origin for the mesohabenular dopamine pathway." Brain Res **197**: 213-218.
- Pisani, A., D. Centonze, et al. (2005). "Striatal synaptic plasticity: implications for motor learning and Parkinson's disease." Mov Disord **20**(4): 395-402.

- Porrino, L. J. and P. S. Goldman-Rakic (1982). "Brainstem innervation of prefrontal and anterior cingulate cortex in the rhesus monkey revealed by retrograde transport of HRP." J Comp Neurol **205**(1): 63-76.
- Preuss, T. M. (1995). "Do rats have a prefrontal cortex? The Rose–Woolsey–Akert program reconsidered." J Cogn Neurosci **7**: 1-24.
- Pucak, M. L. and A. A. Grace (1996). "Effects of haloperidol on the activity and membrane physiology of substantia nigra dopamine neurons recorded in vitro." Brain Res **713**(1-2): 44-52.
- Puopolo, M., E. Raviola, et al. (2007). "Roles of subthreshold calcium current and sodium current in spontaneous firing of mouse midbrain dopamine neurons." J Neurosci **27**(3): 645-56.
- Purves, D., G. J. Augustine, et al. (2004). *Neuroscience: Third Edition*, Sinauer Associates.
- Ramirez, A., A. Heimbach, et al. (2006). "Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase." Nat Genet **38**(10): 1184-91.
- Reichmann, H. (2005). "[Medication treatment for Parkinson's disease]." Nervenarzt **76**(12): 1547-57; quiz 1558.
- Richards, C. D., T. Shiroyama, et al. (1997). "Electrophysiological and immunocytochemical characterization of GABA and dopamine neurons in the substantia nigra of the rat." Neuroscience **80**(2): 545-57.
- Robinson, S., D. M. Smith, et al. (2004). "Firing properties of dopamine neurons in freely moving dopamine-deficient mice: effects of dopamine receptor activation and anesthesia." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(36): 13329-34.
- Romo, R. and W. Schultz (1989). "Somatosensory input to dopamine neurones of the monkey midbrain: responses to pain pinch under anaesthesia and to active touch in behavioural context." Prog Brain Res **80**: 473-8; discussion 465-6.
- Rose, J. E. and C. N. Woolsey (1948). "The orbitofrontal cortex and its connections with the mediodorsal nucleus in rabbit, sheep and cat." Res Publ Assoc Nerv Ment Dis **27**: 210-32.
- Rosenkranz, J. A. and A. A. Grace (2002). "Dopamine-mediated modulation of odour-evoked amygdala potentials during pavlovian conditioning." Nature **417**(6886): 282-7.

- Roth, R. H. and J. D. Elsworth (2000). Biochemical Pharmacology of Midbrain Dopamine Neurons. *Neuropsychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*.
- Salamone, J. D. (1994). "The involvement of nucleus accumbens dopamine in appetitive and aversive motivation." *Behav Brain Res* **61**(2): 117-33.
- Sawaguchi, T. (2001). "The effects of dopamine and its antagonists on directional delay-period activity of prefrontal neurons in monkeys during an oculomotor delayed-response task." *Neurosci Res* **41**(2): 115-28.
- Scheibner, T. and I. Tork (1987). "Ventromedial mesencephalic tegmental (VMT) projections to ten functionally different cortical areas in the cat: topography and quantitative analysis." *J Comp Neurol* **259**(2): 247-65.
- Schiemann, J. (2005). *In vivo* Aktivität von identifizierten DA Neuronen im Mittelhirn. Institut für Physiologie, Marburg. Diplomarbeit.
- Schultz, W. (2000). "Multiple reward signals in the brain." *Nat Rev Neurosci* **1**(3): 199-207.
- Schultz, W. (2001). "Reward signaling by dopamine neurons." *Neuroscientist* **7**(4): 293-302.
- Schultz, W. (2007). "Behavioral dopamine signals." *Trends Neurosci* **30**(5): 203-10.
- Schultz, W. (2007). "Multiple dopamine functions at different time courses." *Annu Rev Neurosci* **30**: 259-88.
- Sealfon, S. C. and C. W. Olanow (2000). "Dopamine receptors: from structure to behavior." *Trends Neurosci* **23**(10 Suppl): S34-40.
- Seamans, J. K. and C. R. Yang (2004). "The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex." *Prog Neurobiol* **74**(1): 1-58.
- Sesack, S. R., V. A. Hawrylak, et al. (1998). "Dopamine axon varicosities in the prelimbic division of the rat prefrontal cortex exhibit sparse immunoreactivity for the dopamine transporter." *J Neurosci* **18**(7): 2697-708.
- Sesack, S. R., C. L. Snyder, et al. (1995). "Axon terminals immunolabeled for dopamine or tyrosine hydroxylase synapse on GABA-immunoreactive dendrites in rat and monkey cortex." *J Comp Neurol* **363**(2): 264-80.

- Seutin, V., P. Verbanck, et al. (1990). "Evidence for the presence of N-methyl-D-aspartate receptors in the ventral tegmental area of the rat: an electrophysiological in vitro study." Brain Res **514**(1): 147-50.
- Shepard, P. D. and B. S. Bunney (1988). "Effects of apamin on the discharge properties of putative dopamine-containing neurons in vitro." Brain Res **463**(2): 380-4.
- Shepard, P. D. and B. S. Bunney (1991). "Repetitive firing properties of putative dopamine-containing neurons in vitro: regulation by an apamin-sensitive Ca(2+)-activated K⁺ conductance." Exp Brain Res **86**(1): 141-50.
- Shepard, P. D. and D. C. German (1984). "A subpopulation of mesocortical dopamine neurons possesses autoreceptors." Eur J Pharmacol **98**(3-4): 455-6.
- Sherman-Gold, R. (2006). *The Axon CNS Guide to Electrophysiology & Biophysics Laboratory Techniques, Molecular Devices.*
- Smith, A. D. and J. P. Bolam (1990). "The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones." Trends Neurosci **13**(7): 259-65.
- Smith, I. D. and A. A. Grace (1992). "Role of the subthalamic nuclei in the regulation of nigral dopamine neuron activity." Synapse **12**: 287-303.
- Sobel, E. and D. Corbett (1984). "Axonal branching of ventral tegmental and raphe projections to the frontal cortex in the rat." Neurosci Lett **48**(2): 121-5.
- Sulzer, D., T. K. Chen, et al. (1995). "Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to the cytosol and promotes reverse transport." J Neurosci **15**(5 Pt 2): 4102-8.
- Surmeier, D. J., J. Ding, et al. (2007). "D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons." Trends Neurosci **30**(5): 228-35.
- Swanson, L. W. (1982). "The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat." Brain Res Bull **9**(1-6): 321-53.
- Talmaciu, R. K., I. S. Hoffmann, et al. (1986). "Dopamine autoreceptors modulate dopamine release from the prefrontal cortex." J Neurochem **47**(3): 865-70.

- Thapar, A., K. Langley, et al. (2005). "Catechol O-methyltransferase gene variant and birth weight predict early-onset antisocial behavior in children with attention-deficit/hyperactivity disorder." Arch Gen Psychiatry **62**(11): 1275-8.
- Thompson, L., P. Barraud, et al. (2005). "Identification of dopaminergic neurons of nigral and ventral tegmental area subtypes in grafts of fetal ventral mesencephalon based on cell morphology, protein expression, and efferent projections." J Neurosci **25**(27): 6467-77.
- Uhl, G. R., D. Walther, et al. (1994). "Dopamine transporter messenger RNA in Parkinson's disease and control substantia nigra neurons." Ann Neurol **35**(4): 494-8.
- Ungerstedt, U. (1971). "Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain." Acta Physiol Scand Suppl **367**: 1-48.
- Ungless, M. A., P. J. Magill, et al. (2004). "Uniform inhibition of dopamine neurons in the ventral tegmental area by aversive stimuli." Science **303**(5666): 2040-2.
- Usiello, A., J. H. Baik, et al. (2000). "Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors." Nature **408**(6809): 199-203.
- Uylings, H. B., H. J. Groenewegen, et al. (2003). "Do rats have a prefrontal cortex?" Behav Brain Res **146**(1-2): 3-17.
- Vallone, D., R. Picetti, et al. (2000). "Structure and function of dopamine receptors." Neurosci Biobehav Rev **24**(1): 125-32.
- Viggiano, D., D. Vallone, et al. (2003). "Behavioural, pharmacological, morpho-functional molecular studies reveal a hyperfunctioning mesocortical dopamine system in an animal model of attention deficit and hyperactivity disorder." Neurosci Biobehav Rev **27**(7): 683-9.
- Vittoz, N. M. and C. W. Berridge (2006). "Hypocretin/orexin selectively increases dopamine efflux within the prefrontal cortex: involvement of the ventral tegmental area." Neuropsychopharmacology **31**(2): 384-95.
- von Bohlen, U., O. Halbach, et al. (1999). Methoden der Neurohistologie, Spektrum Akademischer Verlag.
- Wang, Z., L. Kai, et al. (2006). "Dopaminergic control of corticostriatal long-term synaptic depression in medium spiny neurons is mediated by cholinergic interneurons." Neuron **50**(3): 443-52.

- Watanabe, M., T. Kodama, et al. (1997). "Increase of extracellular dopamine in primate prefrontal cortex during a working memory task." J Neurophysiol **78**(5): 2795-8.
- Westerink, B. H. (2002). "Can antipsychotic drugs be classified by their effects on a particular group of dopamine neurons in the brain?" Eur J Pharmacol **455**(1): 1-18.
- Wiedenbeck, M. and C. Züll (2001). *Klassifikation mit Clusteranalyse: Grundlegende Techniken hierarchische und K-mean-Verfahren.* Mannheim.
- Williams, G. V. and P. S. Goldman-Rakic (1995). "Modulation of memory fields by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex." Nature **376**(6541): 572-5.
- Williams, S. M. and P. S. Goldman-Rakic (1998). "Widespread origin of the primate mesofrontal dopamine system." Cereb Cortex **8**(4): 321-45.
- Wilson, C. J. (2006). "Striatal D2 receptors and LTD: yes, but not where you thought they were." Neuron **50**(3): 347-8.
- Wise, R. A. (1989). "Opiate reward: sites and substrates." Neurosci Biobehav Rev **13**(2-3): 129-33.
- Wolfart, J., H. Neuhoff, et al. (2001). "Differential expression of the small-conductance, calcium-activated potassium channel SK3 is critical for pacemaker control in dopaminergic midbrain neurons." J Neurosci **21**(10): 3443-56.
- Wolfart, J. and J. Roeper (2002). "Selective coupling of T-type calcium channels to SK potassium channels prevents intrinsic bursting in dopaminergic midbrain neurons." J Neurosci **22**(9): 3404-13.
- Yamada, T., P. L. McGeer, et al. (1990). "Relative sparing in Parkinson's disease of substantia nigra dopamine neurons containing calbindin-D28K." Brain Res **526**(2): 303-7.
- Yamaguchi, T., W. Sheen, et al. (2007). "Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area." Eur J Neurosci **25**(1): 106-18.
- Yan, Z., L. Hsieh-Wilson, et al. (1999). "Protein phosphatase 1 modulation of neostriatal AMPA channels: regulation by DARPP-32 and spinophilin." Nat Neurosci **2**(1): 13-7.
- Yang, C. R., J. K. Seamans, et al. (1999). "Developing a neuronal model for the pathophysiology of schizophrenia based on the nature of electrophysiological actions of dopamine in the prefrontal cortex." Neuropsychopharmacology **21**(2): 161-94.

- Zahm, D. S. (2000). "An integrative neuroanatomical perspective on some subcortical substrates of adaptive responding with emphasis on the nucleus accumbens." Neurosci Biobehav Rev **24**(1): 85-105.
- Zeiss, C. J. (2005). "Neuroanatomical phenotyping in the mouse: the dopaminergic system." Vet Pathol **42**(6): 753-73.
- Zolles, G., N. Klocker, et al. (2006). "Pacemaking by HCN channels requires interaction with phosphoinositides." Neuron **52**(6): 1027-36.

7 Danksagung

Wie in den vorangegangenen Kapiteln dargelegt, spielt das mesokortikolimbische Dopamin System bei zielgerichtetem Handeln und Motivation eine wesentliche Rolle. Diese wird stark durch externe Stimuli beeinflusst. So möchte ich im abschließenden Kapitel der Dissertation diejenigen danken, die mich durch positiv verstärkende Stimuli, also mit Förderung, Anregungen und Zuspruch in den letzten Jahren bei meiner wissenschaftlichen Arbeit unterstützt haben.

Prof. Dr. Jochen Roeper hat mir die Möglichkeit gegeben, mit modernsten Methoden in einem anspruchsvollen und hochinteressanten Themengebiet zu forschen. Für die perfekte Betreuung, die aufgeschlossene und freundliche Begleitung meiner Arbeit, sowie die Bereitschaft anstehende Probleme jederzeit zu diskutieren möchte ich ihm als meinem Doktorvater sehr herzlich danken.

Herzlichster Dank gebührt ebenfalls **Prof. Dr. Birgit Liss** für die Kobetreuung dieser Dissertation und die kritische Durchsicht meiner Arbeit. In diesem Sinne möchte ich sowohl Herrn Roeper als auch Frau Liss für die stetige Förderung und Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeit seit Beginn meines Diplomprojektes herzlich danken.

Weiterhin gebührt mein Dank **Prof. Dr. Maike Petersen** vom Institut für pharmazeutische Biologie der Universität Marburg, die diese Arbeit als externe Promotion des Fachbereiches Pharmazie begutachtet hat.

Den Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppen Neurophysiologie (**Eva Naudascher, Sigrid Petzoldt, Julia Schiemann**) und Molekulare Neurobiologie (**Anca Alexandru, Anna-Lena Damm, Jan Gründemann, Olga Häckel, Andrea Hetzel, Frauke Kepura, Wiebke Milani, Falk Schlaudraff**) des physiologischen Institutes der Universität Marburg gilt mein Dank für das tolle Arbeitsklima und die stetige Hilfsbereitschaft. Hier möchte ich besonders die

Leistung von Eva, Olga und Andrea herausheben, die durch ihre technischen Fähigkeiten und Unterstützung einen wichtigen Beitrag zu dieser Studie geleistet haben. Julia danke ich für das Korrekturlesen meiner Dissertation.

Ferner möchte ich meinen **Lingener und Marburger Freunden** herzlich danken für die schöne und interessante Zeit, die wir gemeinsam verbrachten, sowie für den Ausgleich und für fröhliche Stunden auch in Zeiten gewisser Motivationstiefs.

Meine Eltern **Hildegard** und **Hans-Jürgen Lammel** haben großen Anteil daran, dass diese Arbeit entstehen konnte. Euer Vertrauen und eure nie fordernde Förderung wusste ich in meiner gesamten universitären Ausbildung stets hinter mir. Hierfür möchte ich Euch herzlich danken.

8 Tabellarischer Lebenslauf

Personalien:

Name: Lammel
 Vorname: Stephan
 Geburtsdatum: 30. Juli 1977
 Geburtsort: Thuine
 Wohnort: Frankfurt/Main; Kriftelerstrasse 42
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: ledig
 Eltern: Hans-Jürgen Lammel
 Hildegard Lammel geb. Tieke

Schulbildung:

| | |
|-------------|----------------------------------|
| 1984 - 1988 | Grundschule Lingen |
| 1988 - 1990 | Orientierungsstufe Lingen/Laxten |
| 1990 - 1994 | Kreisrealschule Lingen |
| 1994 - 1997 | Gymnasium Johanneum Lingen |

Wehrdienst:

| | |
|-------------|----------------------------|
| 1997 - 1998 | Bundeswehr in Lingen (Ems) |
|-------------|----------------------------|

Studium:

| | |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1999 - 2004 | Pharmazie Studium Philipps-Universität Marburg Abschluss: Approbation zum Apotheker (06/2004) |
| 11/2003 - 05/2004 | Diplomarbeit in Neurophysiologie und molekularer Neurobiologie Institut für normale und pathologische Physiologie Philipps-Universität Marburg AG Prof. Liss und AG Prof. Roeper Abschluss: Diplom Pharmazeut (11/2004) |

Dissertation:

| | |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 08/2004 - 08/2007 | Dissertation in Neurophysiologie Institut für normale und pathologische Physiologie Philipps-Universität Marburg AG Prof. Roeper |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

.....
.....
.....

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den.....

.....
Stephan Lammel