

Aus dem Institut für Physiologie und Pathophysiologie
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Dominik Oliver

in Zusammenarbeit mit der Klinik für Neurologie
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Elektrophysiologische Charakterisierung neuronaler spannungsabhängiger Calciumströme des Locus coeruleus in zwei experimentellen Parkinson- Modellen der Maus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin (Dr. med.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität vorgelegt von

Markus Griesbach

geboren am 15. Oktober 1991 in Sömmerda

Marburg

2023

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 23.01.2023

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

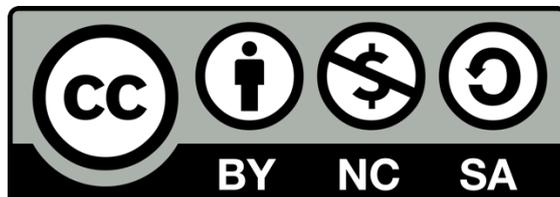
Dekanin: Prof. Dr. rer. nat. Denise Hilfiker-Kleiner

Referent: Prof. Dr. phil. nat. Niels Decher

1. Korreferent: Prof. Dr. med. Geert Mayer

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg

<https://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk steht unter einer Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Morbus Parkinson	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Ätiologie	2
1.1.3 Symptomatik.....	4
1.1.4 Therapie	6
1.1.5 Experimentalmodelle der Parkinson-Erkrankung	8
1.2 Locus coeruleus.....	9
1.2.1 Anatomie und Lageverhältnisse.....	9
1.2.2 Physiologische Funktion	11
1.2.3 Bedeutung im Rahmen der Parkinson-Erkrankung	12
1.3 Spannungsabhängige Calciumkanäle	14
1.4 Fragestellung und Zielsetzung	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Material.....	17
2.1.1 Chemikalien.....	17
2.1.2 Geräte	18
2.1.3 Lösungen	19
2.1.4 Software	20

2.1.5	Versuchstiere	20
2.2	Methoden.....	21
2.2.1	Präparation und Schnitthanfertigung	21
2.2.2	Der Messaufbau	22
2.2.3	Elektrophysiologische Messungen.....	23
2.2.4	Mathematische und statistische Analyse	26
3	Ergebnisse	27
3.1	Rotenon-Toxizitätsmodell (<i>in vitro</i>).....	27
3.1.1	Veränderungen der spannungsabhängigen Calciumströme nach direkter Rotenonexposition	27
3.1.2	Veränderung der spannungsabhängigen Calciumströme nach Rotenon-Inkubation.....	29
3.1.3	Effekte nach CoCl ₂ -vermittelter Blockade der spannungsabhängigen Calciumkanäle	32
3.2	α-Synuclein-Überexpressionsmodell (<i>in vivo</i>).....	37
3.2.1	Veränderungen der spannungsabhängigen Calciumströme bei Überexpression von Wildtyp-α-Synuclein.....	37
3.2.2	Veränderungen der spannungsabhängigen Calciumströme bei Überexpression von A53T-α-Synuclein.....	39
3.2.3	Vergleich der Effekte bei Überexpression der verschiedenen α-Synuclein-Varianten	41
4	Diskussion.....	43
4.1	Selektive neuronale Vulnerabilität und regionsspezifische Krankheitsprogression der Parkinson-Erkrankung	44
4.2	Calcium, mitochondriale Dysfunktion und α-Synuclein als Mediatoren der Parkinson-Erkrankung	45
4.2.1	Dysfunktionaler Calciumhaushalt und eingeschränkte Mitochondrienfunktion	45

4.2.2	Beziehung zwischen Calciumdysbalance und α -Synuclein-Aggregation	47
4.2.3	Beziehung zwischen α -Synuclein-Aggregation und mitochondrieller Dysfunktion.....	48
4.3	Pharmakologische Modulation neuronaler Ionenkanäle als möglicher Therapieansatz der PD	50
4.4	Methodische Gesichtspunkte der Arbeit.....	50
4.4.1	Das Patch-Clamp-Verfahren und seine Limitationen	51
4.4.2	Das α -Syn-Überexpressionsmodell	52
4.5	Ausblick	53
5	Zusammenfassung und Summary.....	55
5.1	Zusammenfassung	55
5.2	Summary	57
6	Literaturverzeichnis.....	59
7	Anhang	72
7.1	Verzeichnis der akademischen Lehrerinnen und Lehrer.....	72
7.2	Danksagung.....	73

Abkürzungsverzeichnis

4-AP	4-Aminopyridin
α-Syn	α -Synuclein
ATP	Adenosintriphosphat
ACSF	Engl.: » <i>Artificial Cerebrospinal Fluid</i> «
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Ca_v Kanal	spannungsabhängiger Calciumkanal
CoCl₂	Cobalt(II)-Chlorid
D₁R	Dopamin D ₁ -Rezeptor
D₂R	Dopamin D ₂ -Rezeptor
DAT	Dopamin-Transporter
DDC	DOPA-Decarboxylase
DHP	Dihydropyridin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMV	dorsaler motorischer Nucleus des Nervus vagus
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylacetylsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(Aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
K_v Kanal	spannungsabhängiger Kaliumkanal
LB	Engl.: » <i>Lewy Body</i> «
LC	<i>Locus coeruleus</i>
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
NA	Noradrenalin
Na_v Kanal	spannungsabhängiger Kaliumkanal

NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PD	Engl.: » <i>Parkinson's Disease</i> «
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-Ethansulfonsäure)
rAAV	rekombinanter adeno-assoziiertes Virus
REM	Engl.: » <i>Rapid Eye Movement</i> «
RNS	Engl.: » <i>Reactive Nitrogen species</i> «
ROS	Engl.: » <i>Reactive Oxygen species</i> «
SEM	Engl.: » <i>Standard Error of the Mean</i> «
SERCA	Engl.: » <i>Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase</i> «
SNpc	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
STN	<i>Nucleus subthalamicus</i>
TEA	Tetraethylammonium
TH	Tyrosinhydroxylase
TTX	Tetrodotoxin
VTA	Engl.: » <i>Ventral Tegmental Area</i> «
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Abbildung 1: Pathologische Veränderungen des Basalgangliensystems im Rahmen der Parkinson-Erkrankung	2
Abbildung 2: Zelluläre Pathomechanismen der Parkinson-Erkrankung nach bisherigem Kenntnisstand (Abbildung modifiziert nach Poewe <i>et al.</i> , 2017).....	4
Abbildung 3: Progressionsstadien der Parkinson-Erkrankung	6
Abbildung 4: Synaptische Wirkung verschiedener dopaminerger Pharmaka in der Therapie der Parkinson-Erkrankung	7
Abbildung 5: Afferente und efferente Projektionen des <i>Locus coeruleus</i> -Noradrenalin Systems.....	10
Abbildung 6: Syntheseschritte des Neurotransmitters Noradrenalin	11
Abbildung 7: Einteilungssystem der spannungsabhängigen Ca _v -Kanäle	14
Abbildung 8: Strukturmodell eines spannungsabhängigen Calciumkanals.....	15
Abbildung 9: Etablierung des On-Cell-Zustands während einer Patch-Clamp-Messung	24
Abbildung 10: Schematische Darstellung der verwendeten Spannungsprotokolle für die angelegte Klemmspannung im Voltage-Clamp-Modus.....	25
Abbildung 11: Unter Einfluss von Rotenon zeigt sich nach fünfminütiger Latenz ein verringerter maximaler Calcium-Influx	28
Abbildung 12: Nach zweistündiger Inkubation mit Rotenon zeigt sich ein signifikant verringerter maximaler Calcium-Influx	30
Abbildung 13: CoCl ₂ -vermittelte Antagonisierung der spannungsabhängigen Calciumkanäle unter Kontrollbedingungen	32
Abbildung 14: CoCl ₂ -vermittelte Antagonisierung der spannungsabhängigen Calciumkanäle nach zweistündiger Inkubation mit Rotenon.....	34

Abbildung 15: Darstellung des CoCl_2 -sensitiven Differenzstroms unter Kontrollbedingungen und nach zweistündiger Inkubation mit Rotenon	36
Abbildung 16: Bei Transduktion des WT- α -Syn-Gens zeigt sich nach achtwöchiger Latenz ein signifikant verminderter maximaler Calcium-Influx im Vergleich zur Luc-Kontrollgruppe	38
Abbildung 17: Bei Transduktion des A53T- α -Syn-Gens zeigt sich nach achtwöchiger Latenz ein signifikant verminderter maximaler Calcium-Influx im Vergleich zur Luc-Kontrollgruppe	40
Abbildung 18: Vergleich der einwärtsgerichteten Ionenströme und Ionen-Differenzströme bei Überexpression der verschiedenen α -Syn-Varianten	42

Tabellenverzeichnis

	<u>Seite</u>
Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Chemikalien und ihrer Hersteller	17
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Geräte und ihrer Hersteller	18
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Lösungen und ihrer Zusammensetzung	19
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Softwareprodukte und ihrer Entwickler	20
Tabelle 5: Signifikant reduzierte Ionenströme nach fünfminütiger Exposition mit 1 μ M-Rotenonlösung, Voltage-Clamp-Messung im schrittförmigen Spannungsprotokoll	29
Tabelle 6: Signifikant reduzierte Ionenströme nach zweistündiger Inkubation mit 1 μ M-Rotenonlösung, Voltage-Clamp-Messung im schrittförmigen Spannungsprotokoll	31
Tabelle 7: Signifikant reduzierte Ionenströme nach fünfminütiger Perfusion mit 1 mM- CoCl_2 -Lösung, Voltage-Clamp-Messung im schrittförmigen Spannungsprotokoll	33
Tabelle 8: Signifikant reduzierte Ionenströme nach zweistündiger Exposition mit 1 μ M-Rotenonlösung und anschließender fünfminütiger Perfusion mit einer 1 mM- CoCl_2 -Lösung, Voltage-Clamp-Messungen im schrittförmigen Spannungsprotokoll	35
Tabelle 9: Signifikant reduzierte Ionenströme bei achtwöchiger Latenz nach Transduktion des WT- α -Synuclein-Gens im Vergleich zur Luc-Kontrollgruppe, Voltage-Clamp-Messungen im schrittförmigen Spannungsprotokoll	39
Tabelle 10: Signifikant reduzierte Ionenströme bei achtwöchiger Latenz nach Transduktion des A53T- α -Syn-Gens im Vergleich Luc-Kontrollgruppe, Voltage-Clamp-Messungen im schrittförmigen Spannungsprotokoll	41

1 Einleitung

1.1 Morbus Parkinson

1.1.1 Epidemiologie

Morbus Parkinson (idiopathisches Parkinson-Syndrom, engl.: *Parkinson's disease*, PD) gilt mit einer globalen Prävalenz von 0,1 % als zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach der Alzheimer-Demenz. Während die Erkrankung vor dem fünfzigsten Lebensjahr kaum diagnostiziert wird, steigt die Prävalenz ab einem Alter von 65 Jahren auf etwa 1 % an. Im ältesten untersuchten Patientenkollektiv beträgt dieser Wert bis zu 4 % (de Lau & Breteler, 2006).

Die Inzidenz des Morbus Parkinson wird je nach Studiendesign zwischen 10 und mehr als 20 neudiagnostizierten Fällen pro 100.000 Personen in den Industrieländern beziffert. Innerhalb der Bevölkerungsgruppe mit einem Alter über 65 Jahren steigen diese Werte auf bis zu 160 Neuerkrankungen pro 100.000 Personen an. Der in diesem Kontext untersuchte Altersgipfel liegt bei einem Alter von 80 Jahren, wobei eine weitere Altersprogression wahrscheinlich durch eine erhöhte Dunkelziffer in älteren Patientenkollektiven bedingt ist (de Lau & Breteler, 2006; *Epidemiology of Parkinson's Disease*, 2017).

Das Lebenszeitrisiko ist dabei insgesamt für Männer mit 2 % etwas höher als für Frauen. Bezüglich ethnischer Schwankungen ist die Datenlage bisher insgesamt inkonsistent und lässt keine zuverlässigen Schlüsse zu (Ascherio & Schwarzschild, 2016; Pringsheim *et al.*, 2014).

Diese Daten verdeutlichen, dass die Parkinson-Krankheit eine Erkrankung des höheren Alters darstellt. Die Entwicklung der demographischen Struktur in den Industrienationen prognostiziert einen tendenziell wachsenden Anteil älterer Bevölkerungsschichten in den kommenden Jahrzehnten (Statistisches Bundesamt (Destatis), 2019). Es lässt sich also annehmen, dass die Prävalenz neurodegenerativer Erkrankungen in den kommenden Jahren zunehmen wird. Folgerichtig wird die Etablierung geeigneter Strategien zu Prävention und verbesserter Therapie der Parkinson-Erkrankung weiterhin an Bedeutung gewinnen.

1.1.2 Ätiologie

Die motorischen Symptome der PD werden vor allem durch die Degeneration dopaminerger Neurone der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc) bestimmt. Die SNpc ist auf komplexe Weise in die Modulation und Regulation promotorischer Signale eingebunden, die von primär motorischem Kortex und kortikalen Assoziationsfeldern stammen können.

Diese Signale werden physiologisch auf komplexe Weise durch die Bestandteile des extrapyramidalmotorischen Systems moduliert und integriert. Wesentlicher Moderator des extrapyramidalmotorischen Systems ist die Basalganglienschleife (siehe Abbildung 1).

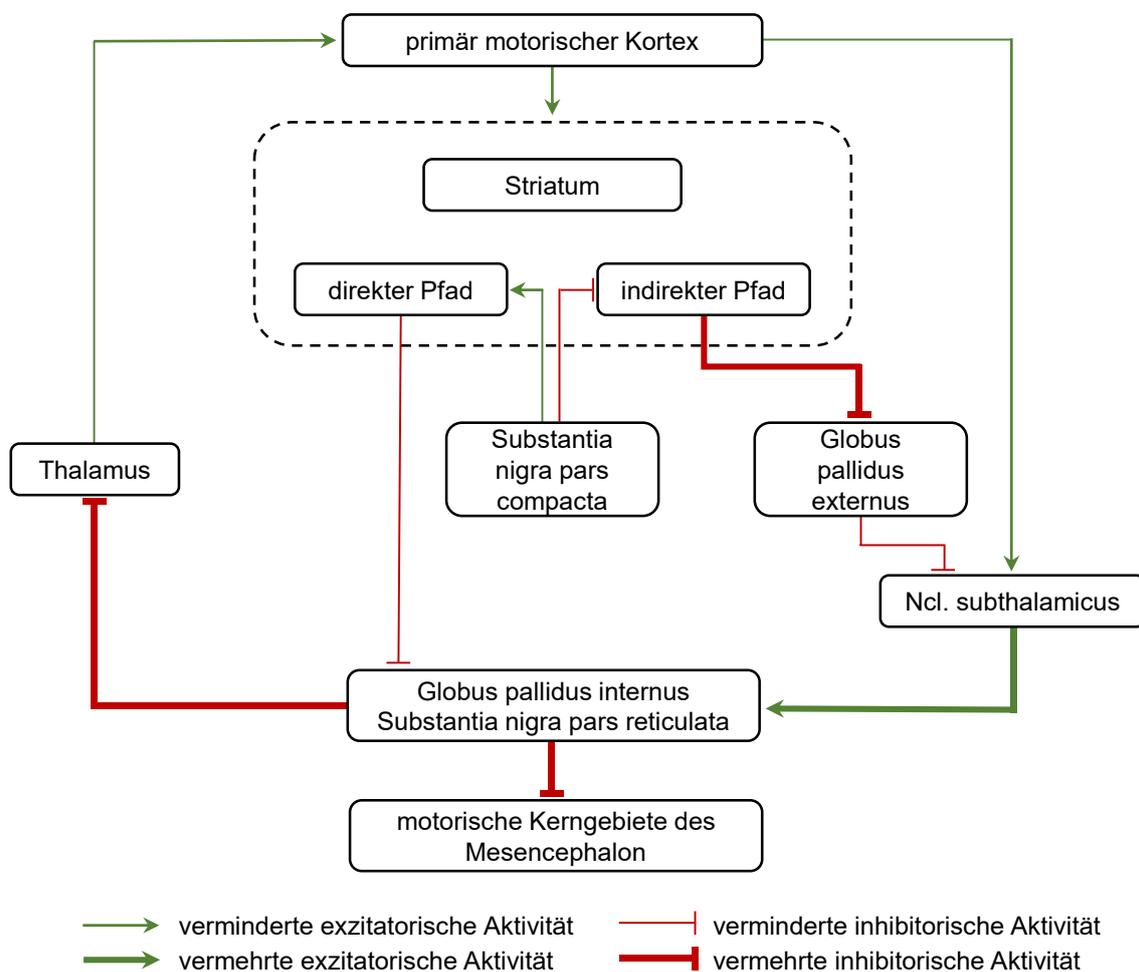


Abbildung 1: Pathologische Veränderungen des Basalgangliensystems im Rahmen der Parkinson-Erkrankung

Die oberhalb abgebildete Darstellung verdeutlicht, wie sich die exzitatorische und inhibitorische Aktivität der Komponenten des motorischen Systems im Rahmen der PD verändern. In der Summe kommt es so zu einer verstärkten Inhibition thalamokortikaler Bahnen und den typischen Kardinalsymptomen der PD (modifiziert nach Poewe *et al.*, 2017).

Die Verschaltung der Basalganglien ist zentraler Bestandteil des extrapyramidalmotorischen Systems und dient der Modulation von Bewegungsimpulsen. Die Projektionen der SNpc zum *Striatum* modulieren dort über einen direkten und einen indirekten Verschaltungspfad die Feinabstimmung der promotorischen Signale. Der direkte Pfad wird durch eine monosynaptische Projektion striataler GABAerger Neurone zu *Globus pallidus internus* und *Substantia nigra pars reticulata* ermöglicht. Die bewegungshemmende Wirkung dieser Zielstrukturen wird dadurch inhibiert. Der indirekte Pfad zeichnet sich hingegen durch ein polysynaptisches Verschaltungsmuster aus. Projektionen striataler GABAerger Neurone erreichen zunächst das *Globus pallidus externus*, das seinerseits mittels GABAerger Projektionen den *Ncl. subthalamicus* erreicht. Die Wirkung der SNpc führt zur Disinhibition des *Ncl. subthalamicus*, der seinerseits durch glutamaterge Projektionen die motorikhemmende Wirkung des *Globus pallidus internus* fördert. Mithilfe dieser zwei Verschaltungswege wird unter physiologischen Bedingungen die GABA-vermittelte Wirkung des *Pallidums* reguliert. Durch den Verlust der dopaminergen Neurone der SNpc, entsteht eine Dysbalance in dem komplexen System der Basalganglienschleife (Poewe *et al.*, 2017).

Die Pathogenese der Parkinson-Erkrankung stellt sich nach aktuellem Kenntnisstand als multifaktorieller Prozess dar. Betroffene Neurone zeigen im Rahmen der Parkinson-Erkrankung eine auf vielfältige Weise gestörte zelluläre Homöostase. Beeinträchtigungen der zellulären Proteostase bedingen die Akkumulation fehlgefalteten alpha-Synucleins, das zunächst zu Oligomerverbänden und schließlich zusammen mit Ubiquitin zu den charakteristisch auftretenden Lewy-Bodies aggregiert. Zwischenprodukte dieses Fehlfaltungsprozesses bedingen eine Funktionseinschränkung der Mitochondrien, die zu sukzessivem Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies im Cytosol führt und zelleigene Abbauprozesse durch den gestörten Energiehaushalt zunehmend einschränkt. Der dabei auftretende oxidative Stress wird durch eine dysregulierte zelluläre Calciumhomöostase aggraviert. Erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentrationen regen eine Aktivierung des proapoptotischen Enzymsystems der Caspasen an. Proinflammatorisch wirksame Gliazellen tragen durch Cytokine vermutlich zusätzlich zum Zusammenspiel der zellulären Dysregulation im Rahmen der Parkinson-Erkrankung bei (vgl. Abbildung 2) (Poewe *et al.*, 2017).

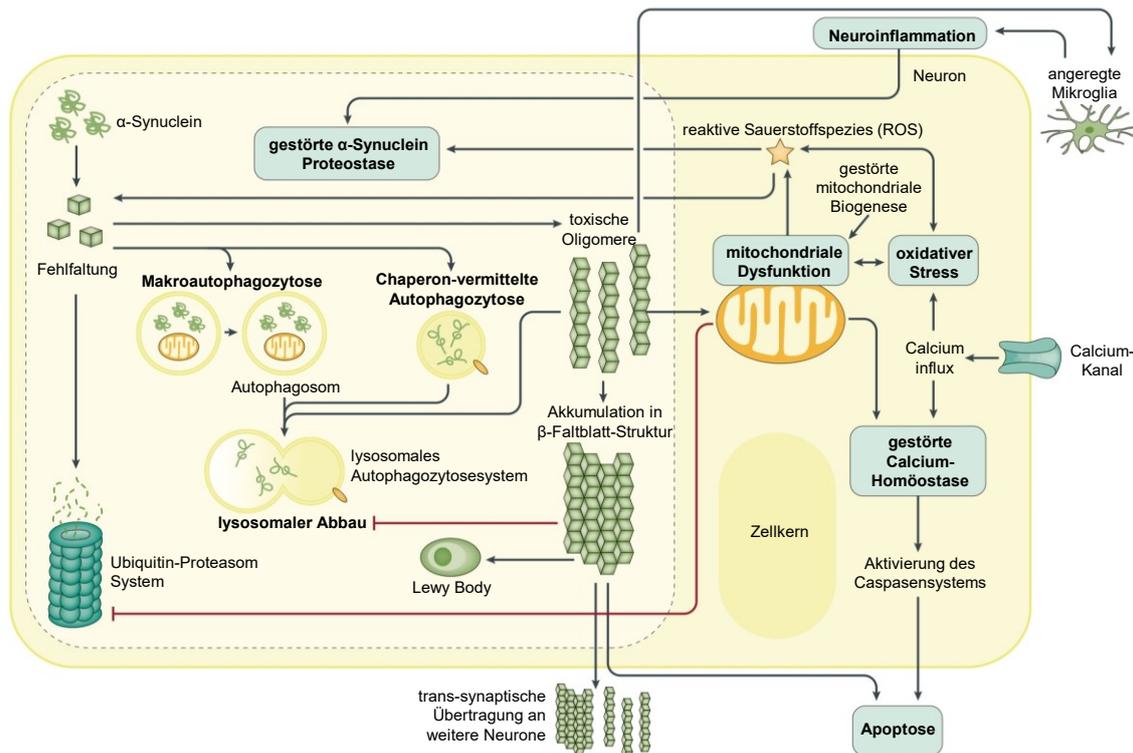


Abbildung 2: Zelluläre Pathomechanismen der Parkinson-Erkrankung nach bisherigem Kenntnisstand (Abbildung modifiziert nach Poewe *et al.*, 2017).

Das Dopaminsystem ist das pathognomonisch dysregulierte Neurotransmittersystem im Rahmen der PD. Allerdings sind im Krankheitsverlauf auch weitere zentralnervöse Transmittersysteme beeinträchtigt, wodurch sich insbesondere die nichtmotorischen Symptome der PD erklären lassen. Zu diesen dysregulierten Transmittersystemen zählen beispielsweise Serotonin, Acetylcholin und das für den LC charakteristische Noradrenalin (Factor *et al.*, 2017; Maillet *et al.*, 2016; Morris *et al.*, 2019; Schapira *et al.*, 2017).

1.1.3 Symptomatik

Die motorischen Kardinalsymptome des Morbus Parkinson sind ein gesteigerter Muskeltonus der Willkürmuskulatur (Rigor), eine allgemeine Bewegungsarmut (Bradykinese), ein meist asymmetrisch beginnender Ruhetremor sowie posturale Instabilität aufgrund zentral verminderter Stellreflexe. Der Ausprägungsgrad dieser klassischen motorischen Kardinalsymptome gilt als unabhängiger Prädiktor für die patientenspezifische Mortalität (Forsaa *et al.*, 2010). Diverse Studien haben ergeben, dass bei beginnender Ausprägung dieser klassischen motorischen Symptome bereits circa 80 % der dopaminergen Neurone des nigrostriatalen Systems untergegangen sind (Chung *et al.*, 2001). Das Auftreten der Krankheitssymptome ist individuell variabel und lässt die Klassifikation in diverse

Subgruppen zu. Diese werden nach der jeweils klinisch vordergründigen Komponente als Tremor-dominant, bradykinetisch-dominant sowie Stellreflex-und-Gang-dominant bezeichnet (Armstrong & Okun, 2020; Kalia & Lang, 2015). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass diese Ausprägungstypen mit unterschiedlicher Progression einhergehen können. Eine klare Prognose ist klinisch dennoch oft nicht möglich, da die beschriebenen Symptomkonstellationen fließend ineinander übergehen können (Kalia & Lang, 2015; Thenganatt & Jankovic, 2014). Daher ist die Einteilung der PD nach Subtypen bisher von eher theoretischer als klinisch praktischer Bedeutung.

Neben den genannten motorischen Leitsymptomen werden weitere motorische und nicht-motorische Symptome beobachtet. Zu den motorischen Symptomen gehören unter anderem Hypomimie, Mikrographie, Dysphagie und Dysarthrie sowie Störungen des Gangbildes mit Kleinschrittigkeit und Koordinationsstörungen. Das Spektrum nicht-motorischer Dysfunktionen ist divers und umfasst beispielsweise Hyposmie und Anosmie, kognitive Störungen wie demenzielle Syndrome und Psychosen, Störungen der autonomen Regulation, Verdauungsstörungen und Obstipation sowie REM-Schlafverhaltensstörungen und das Restless-Legs-Syndrom (Sveinbjornsdottir, 2016). Die Ausprägung und Konstellation dieser beschriebenen motorischen und nicht-motorischen Symptome ist individuell sehr variabel, sodass eine eindeutige Diagnosestellung vor Auftreten der Leitsymptome oft nur schwer möglich ist. Der Zeitraum bis zur korrekten Diagnose verlängert sich dadurch mitunter erheblich (Armstrong & Okun, 2020; J. W. Langston, 2006; Poewe *et al.*, 2017). Die Etablierung diagnostischer Methoden zur Früherkennung ist daher eine weitere Säule neben der Erforschung neuer therapeutischer Ansätze.

Als histopathologisches Korrelat der PD gelten die sogenannten Lewy-Bodies (LB), cytosolische Proteinaggregate, die im Wesentlichen aus fehlgefaltetem alpha-Synuclein und Ubiquitin bestehen (Airavaara *et al.*, 2020). Das Auftreten von LB in den verschiedenen Regionen des zentralen Nervensystems folgt dabei einer bestimmten Abfolge, welche durch das Stufenmodell nach Braak *et al.* beschrieben werden kann (Braak *et al.*, 2003) (siehe auch Abbildung 3).

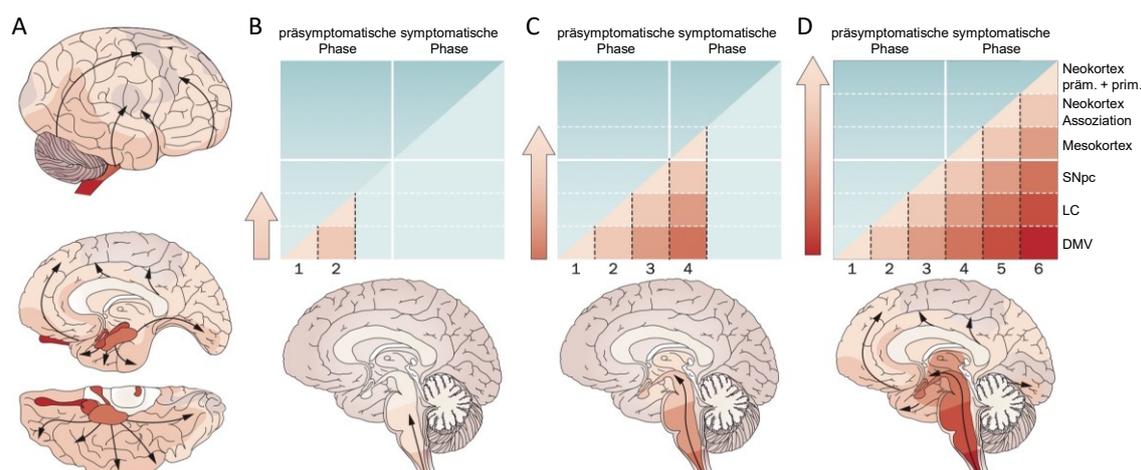


Abbildung 3: Progressionsstadien der Parkinson-Erkrankung

Im Rahmen der Parkinson-Erkrankung (PD) treten charakteristische eosinophile Proteinaggregate, die sogenannten Lewy-Bodies (LB), im Cytosol der Neurone verschiedener Regionen des zentralen Nervensystems auf. Die Ausbreitung dieser LB erfolgt dabei nach einem Schema, das von Braak *et al.* erstmals beschrieben wurde (Braak *et al.*, 2003, 2004). Dieses Schema postuliert eine Sequenz von sechs Stadien, anhand derer sich die histopathologische Progression der PD festhalten lässt. In Stadium 1 treten zunächst LB im Bereich des dorsalen motorischen Nucleus des Nervus vagus (DMV) auf. Mit Beginn des zweiten Stadiums ist auch der *Locus coeruleus* (LC) von LB betroffen. Ab Stadium 3 beginnt die Ausbreitung der Aggregate in der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc). Mit zunehmender Ausprägung des dritten Stadiums nach Braak *et al.* treten die ersten klinischen Symptome auf. Stadium 4, charakterisiert durch die Ausbreitung der LB auf Strukturen des Mesencephalons, markiert den definitiven Übergang in die symptomatische Phase der PD. In den Stadien 5 und 6 sind schließlich auch neokorticale Bereiche betroffen, wie zunächst die Assoziationsfelder und später auch der prämotorische Kortex sowie die neokortikalen Primärgebiete (Abbildung modifiziert nach Goedert, Spillantini, Del Tredici, & Braak, 2013).

1.1.4 Therapie

Die therapeutischen Möglichkeiten im Rahmen der PD sind so divers wie die ihr zugrundeliegenden Mechanismen und sollten möglichst an Progression, Symptomschwere und individuelle Bedürfnisse des Patienten angepasst werden. Zur Behandlung der primär motorischen Symptome der PD werden in den Off-Phasen insbesondere direkt oder indirekt dopaminerge Pharmaka verwendet, um die Dysbalance dieses Systems auszugleichen. Im Initialstadium sind direkte Dopaminagonisten, Monoaminoxidase-Inhibitoren oder auch die Anwendung der Dopaminvorstufe L-DOPA sinnvoll (Connolly & Lang, 2014; Fox *et al.*, 2018). Entgegen der früheren Annahme, dass auf die Applikation von L-DOPA möglichst erst in späteren Erkrankungsstadien zurückgegriffen werden sollte, hat die frühe Gabe dieser Dopaminvorstufe in kürzlich veröffentlichten Studien einen deutlichen Benefit für das untersuchte Patientenkollektiv gezeigt (Espay & Lang, 2017; PD MED Collaborative Group, 2014). Die Nutzung von L-DOPA wird jeweils mit Inhibitoren peripher weiterverarbeitender Enzyme dieser Dopaminvorstufe kombiniert. Dazu

zählen Hemmstoffe der DOPA-Decarboxylase (DDC) und der Catechol-O-Methyltransferase (COMT). Während L-DOPA in der Regel eine insgesamt bessere motorische Symptomkontrolle bietet, werden als unerwünschte Wirkung häufiger Dyskinesien beschrieben als bei den direkten Dopaminagonisten oder den Monoaminoxidase-Inhibitoren. Letztere bieten allerdings eine insgesamt schlechtere Symptomkontrolle. Als wichtigste unerwünschte Wirkung der direkten Dopaminagonisten beschreiben je nach Studie bis zu 40 % der Patienten Impulskontrollstörungen (Garcia-Ruiz *et al.*, 2014). Ein multimodales Behandlungskonzept unter Applikation mehrerer, niedriger dosierter Medikamentenklassen kann dementsprechend vorteilhaft sein. Eine Steigerung insbesondere der L-DOPA-Dosis lässt sich bei zunehmender Degeneration dopaminerger Zentren und unzureichender Speicherkapazität für Dopamin im Krankheitsverlauf meist nicht verhindern (Chou *et al.*, 2018). Abbildung 4 zeigt eine zusammenfassende Übersicht dopaminerger Pharmaka, die im Rahmen der PD Anwendung finden.

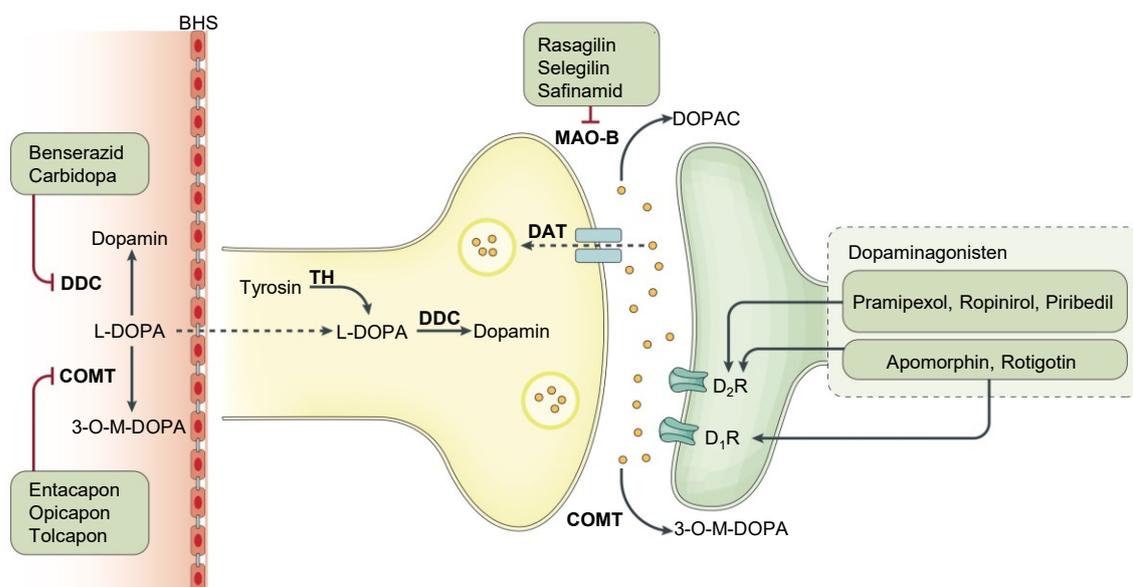


Abbildung 4: Synaptische Wirkung verschiedener dopaminerger Pharmaka in der Therapie der Parkinson-Erkrankung

Die medikamentöse Therapie der Parkinson-Erkrankung nutzt die Mechanismen verschiedener zentralnervöser Transmittersysteme aus. Dopamin, als Transmittersystem der SNpc, stellt dabei eines der wichtigsten Zielsysteme dar. Die periphere Applikation der Dopaminvorstufe L-DOPA muss mit Inhibitoren peripherer Spaltenzyme, wie der DOPA-Decarboxylase (DDC) oder Catechol-O-Methyltransferase (COMT) kombiniert werden, um wirksame Plasmaspiegel zu erreichen. L-DOPA wird bei ausreichender Plasmakonzentration mittels molekularer Transportsysteme über die Blut-Hirn-Schranke (BHS) in das Cytosol der Neurone verbracht, sodass die zellulär synthetisierte Dopaminmenge ansteigt. Der Abbau des freigesetzten Dopamins im synaptischen Spalt, kann durch zentral wirksame Hemmer der Monoaminoxidase-B (MAO-B) oder COMT gehemmt werden. Zur direkten Stimulation der postsynaptischen Dopaminrezeptoren stehen diverse zentral wirksame direkte Dopaminagonisten zur Verfügung (modifiziert nach Poewe *et al.*, 2017).

In späteren Erkrankungsstadien hat sich bei geeigneten Patientenkollektiven auch die tiefe Hirnstimulation, also die direkte Stimulation dysregulierter Bereiche des zentralen Nervensystems durch implantierte Schrittmachersonden, etabliert. Am häufigsten werden als Zielstrukturen der tiefen Hirnstimulation der *Nucleus subthalamicus* (STN) und der *Globus pallidus internus* verwendet. Die Stimulationsfrequenz des Schrittmachers wird postoperativ so angepasst, dass es zu einer Inhibition der bewegungshemmenden Einflüsse dieser Strukturen kommt. In Kombination mit einer multimodalen Pharmakotherapie, lässt sich so bei geeigneten Patienten auch in späteren Stadien der PD noch eine gute motorische Symptomkontrolle erzielen (Bratsos *et al.*, 2018; Fox *et al.*, 2018). In jedem Fall profitieren Patienten von einer frühzeitigen physiotherapeutischen Anbindung und regelmäßiger Bewegungstherapie (Armstrong & Okun, 2020).

Um die nichtmotorischen Symptome der PD zu behandeln werden größtenteils andere Transmittersysteme als Dopamin verwendet. Beispielsweise wird Rivastigmin als indirektes Cholinergikum zur Minderung der Effekte einer Parkinson-Demenz verwendet. Eine im Rahmen der PD assoziiert aufgetretene Depression kann durch selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitoren oder selektive Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahme-Inhibitoren behandelt werden. Störungen des Schlafverhaltens in den sogenannten »Rapid-Eye-Movement«-Phasen (REM-Phasen) des Schlafes kann durch die Gabe von Melatonin beigegeben werden (Armstrong & Okun, 2020).

1.1.5 Experimentalmodelle der Parkinson-Erkrankung

In den vergangenen Jahren konnten verschiedene Modelle etabliert werden, die maßgeblich zum theoretischen Verständnis der Pathogenese der PD beigetragen haben.

Das älteste in-vitro-Modell der Parkinson Erkrankung basiert auf der Exposition des Modellsystems mit der Substanz 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP). Metabolite des MPTP hemmen die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien dopaminergischer Neurone und erzeugen somit eine metabolische und oxidative Stresssituation, die physiologisch den Effekten der PD ähnelt. Die dabei resultierenden klinischen Symptome zeigen in den getesteten Modellorganismen ausgeprägte Ähnlichkeit zu den klinischen Stadien der PD und sind ebenfalls L-DOPA-reagibel (J. Langston *et al.*, 1983; Oertel & Kupsch, 1993). Ähnliche Effekte wie MPTP zeigt auch die Substanz Rotenon, die schon seit dem neunzehnten Jahrhundert als Pestizid Verwendung findet. Analog zum Wirkmechanismus von MPTP interferiert auch Rotenon mit Komplex I der Atmungskette und unterbindet damit die oxidative Phosphorylierung, was zu einer zunehmend

dysregulierten zellulären Homöostase und konsequenter Apoptose führt (Mounsey & Teismann, 2010; Sherer *et al.*, 2003).

Um die Effekte der charakteristisch auftretenden Synucleinopathien im Rahmen der PD zu testen, sind verschiedene in-vivo-Modelle zur Überexpression bestimmter Varianten dieses Proteins etabliert worden. Eine gängige Anwendung dieses Prinzips wird mithilfe eines rekombinanten adeno-assoziierten viralen Vektors (rAAV) umgesetzt, mit dessen Hilfe das kodierende Gen einer α -Synuclein-Variante in das Erbgut des Modellorganismus per Transfektion eingebracht wird (Henrich *et al.*, 2018; Volpicelli-Daley *et al.*, 2016). Nach einer Latenzzeit von acht Wochen zur Überexpression des transfizierten Genabschnittes, werden anschließend die gewünschten Messungen am Modellorganismus durchgeführt.

1.2 Locus coeruleus

1.2.1 Anatomie und Lageverhältnisse

Der *Locus coeruleus* (LC) ist der größte Bestandteil des Systems noradrenerger Neurone im zentralen Nervensystem. Er ist bilateral im kranio-lateralen Anteil des pontinen Tegmentums angelegt und weist eine durchschnittliche kranio-kaudale Längenausdehnung von 14,5 mm auf (Dahlström & Fuxe, 1964; Fernandes *et al.*, 2012). Die geschätzte Gesamtanzahl der LC-Neurone differiert je nach Quelle stark. Während Sharma *et al.* circa 45.000 bis 50.000 Neuronen des LC im gesamten zentralen Nervensystem beschreiben, wird diese Menge von anderen Studien auf lediglich bis zu 15.000 Neurone geschätzt (Espay *et al.*, 2014). Je nach Lage innerhalb des Kerns, weisen die Neurone des LC sowohl verschiedene Innervationsgebiete als auch eine teilweise andere Morphologie und Rezeptorenbeschaffenheit auf (Schwarz & Luo, 2015).

Der LC weist eine ausgeprägte Verzweigung afferenter und efferenter Bahnen entlang der gesamten Neuraxis auf, die von der Medulla spinalis bis in Anteile des Neokortex reichen. Die Efferenzen des LC erreichen Amygdala, Hippocampus, Thalamus, Hypothalamus, Cerebellum, Medulla spinalis aber auch höhere kortikale Zentren gleichermaßen (Eduardo E. Benarroch, 2018). Ebenso bestehen Verbindungen zu SNpc und STN, die auf elementare Weise in die Pathogenese der PD eingeschlossen sind (Carpenter *et al.*, 1981; Collingridge *et al.*, 1979).

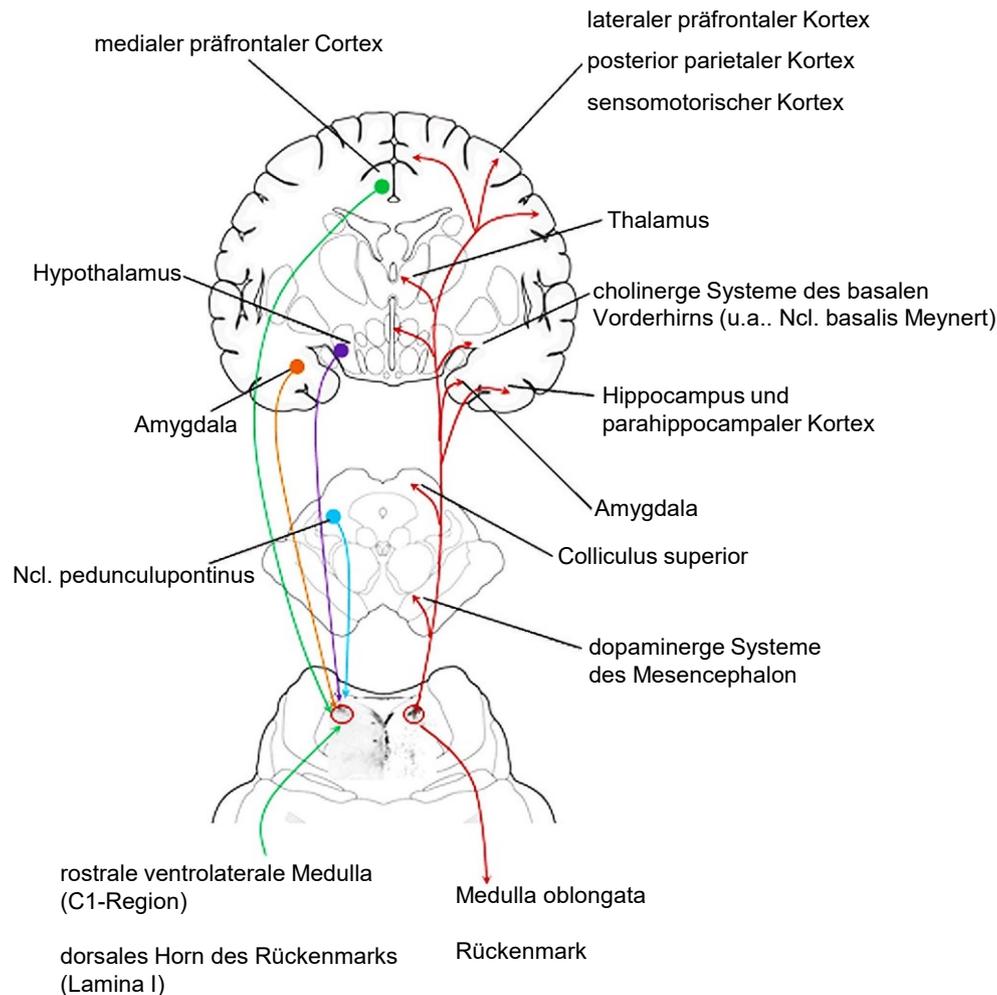


Abbildung 5: Afferente und efferente Projektionen des *Locus coeruleus*-Noradrenalin Systems

Der LC befindet sich anatomisch im Bereich des kranial-lateralen pontinen Tegmentums. Als größtes Kompartiment des noradrenergen Systems im zentralen Nervensystem weist der LC ein ausgeprägtes Netz an Projektionsbahnen auf. Die Abbildung stellt einen topographischen Bezug seiner wichtigsten Projektionsbahnen dar (modifiziert nach Benarroch, 2018).

Die efferenten Projektionen des LC lassen sich darüber hinaus in drei Trakte differenzieren: einen aufsteigenden Trakt (VTA, SNpc, Amygdala, Hippocampus, Hypothalamus, Thalamus, basales Vorderhirn, präfrontaler und sensorischer Kortex), einen cerebellären Trakt und einen spinalen Trakt (Bari *et al.*, 2020). Afferenzen erreichen den LC beispielsweise aus Amygdala, Hypothalamus, periaquäduktalem Grau, Formatio reticularis, pedunculopontinen Kernregionen aber auch aus Bereichen der Medulla spinalis (Eduardo E. Benarroch, 2018). Diese afferenten Projektionen wirken durch verschiedene Transmittersysteme exzitatorisch oder inhibitorisch auf die Neurone des LC ein und regulieren so seine Aktivität. Exzitatorische Einflüsse erreichen den LC glutamaterg aus Bereichen des Vorderhirns und des präfrontalen Kortex, durch Orexin aus dem posterolateralen Hypothalamus, dopaminerg aus periaquäduktalem Grau und ventral tegmentaler Zone

sowie cholinerg aus Kernbereichen des Tegmentums. Inhibitorische Einflüsse stammen vor allem GABAerg aus Kerngebieten der Medulla oblongata und des Hypothalamus (Aston-Jones *et al.*, 1991; Schwarz & Luo, 2015). Abbildung 5 zeigt eine schematische Darstellung der afferenten und efferenten Bahnen des LC-Systems.

1.2.2 Physiologische Funktion

Analog zu seinen ausgeprägten Projektionen im zentralen Nervensystem ist der LC auf vielfältige Weise in neurophysiologische Prozesse eingebunden.

Zentrales Element dieser Wirkungen ist das Katecholamin Noradrenalin, das als Neurotransmitter der coeruleären Neurone dient. Die Synthese des Noradrenalins basiert auf der nicht-essentiellen Aminosäure Tyrosin und erfolgt in einem dreistufigen Prozess. Dabei wird Tyrosin zunächst durch die Tyrosinhydroxylase (TH), das Schlüsselenzym der Dopaminsynthese, in die Dopaminvorstufe L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) überführt. L-DOPA wird im zweiten Reaktionsschritt durch die DOPA-Decarboxylase (DDC) zum biogenen Amin Dopamin überführt. Durch das Schlüsselenzym der Noradrenalin-synthese, die Dopamin- β -Hydroxylase, wird dann der letzte Reaktionsschritt zum Noradrenalin innerhalb synaptischer Vesikel katalysiert (E. E. Benarroch, 2009). Abbildung 6 fasst den Reaktionsablauf der Noradrenalin-synthese graphisch zusammen.

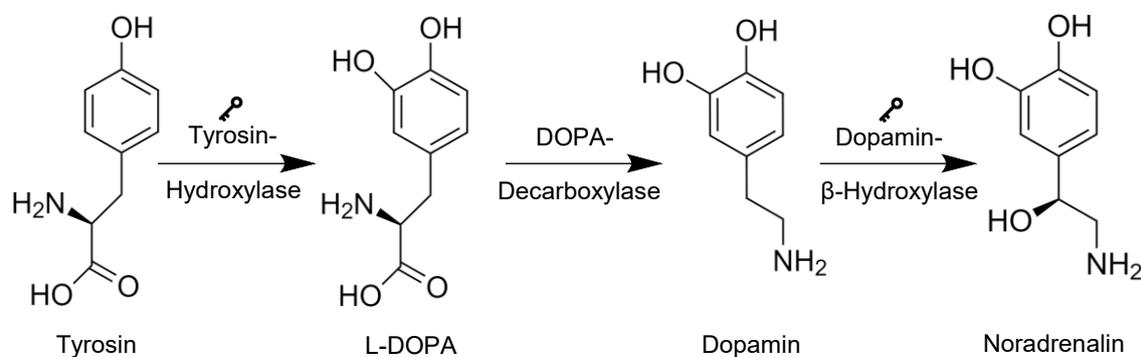


Abbildung 6: Syntheseschritte des Neurotransmitters Noradrenalin

Die Biosynthese des Noradrenalins erfolgt in drei Reaktionsschritten auf Grundlage der Aminosäure Tyrosin. Der erste Syntheseschritt wird durch die Tyrosinhydroxylase (TH), dem Schlüsselenzym der Dopaminsynthese, katalysiert und umfasst die Hydroxylierung des Tyrosins zum (L-DOPA). Dieser erste Reaktionsschritt stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Noradrenalin-synthese dar. Levodopa wird im nächsten Reaktionsschritt durch das Enzym DOPA-Decarboxyliert. Mithilfe des Schlüsselenzyms der Noradrenalin-synthese, der Dopamin- β -Hydroxylase, wird das so entstandene Dopamin durch eine Hydroxylierung der Seitenkette schließlich zum Noradrenalin überführt.

Besonders hervorzuheben ist die Rolle des LC als Bestandteil des aufsteigenden retikulären Aktivierungssystems (ARAS), in der er eine integrative Rolle bei der Vermittlung von Aufmerksamkeit und Erregung spielt. Der LC dient hier vor allem als eine vigilanzfördernde Instanz. Coeruleäre Neurone zeigen je nach Aufmerksamkeitsniveau ein unterschiedliches elektrophysiologisches Entladungsmuster. Die Entladungsmuster des LC lassen sich dabei allgemein als tonisch und phasisch beschreiben. Phasische Entladungsperioden sind durch hohe Frequenzen spontaner Depolarisationen charakterisiert, so vor allem im Wachzustand bei hoher Vigilanz vorkommend. Tonische Entladungsphasen sind demgegenüber durch geringere Entladungsfrequenzen gekennzeichnet (Takahashi *et al.*, 2010).

1.2.3 Bedeutung im Rahmen der Parkinson-Erkrankung

Das breite Spektrum physiologischer Mechanismen des LC lässt auf ein ebenso vielfältiges Spektrum möglicher Symptome bei Funktionsverlust dieser Region schließen. So hat sich in Studien der letzten Zeit bei diversen neurologischen Erkrankungen eine deutliche Beteiligung des LC-Systems dargestellt.

Im Rahmen der PD werden insbesondere die frühen nicht-motorischen Erkrankungssymptome unter anderem auf die Depletion und Degeneration noradrenerger Neurone des LC zurückgeführt. So hat sich beispielsweise eine Korrelation aus fortgeschrittener Degeneration noradrenerger Neurone in limbischem System und LC und der Progression der Parkinson-assoziierten Depression gezeigt (Remy *et al.*, 2005). Für die bereits in frühen Stadien der PD auftretenden Angststörungen gibt es Hinweise auf eine Beteiligung des dysregulierten Noradrenalinsystems (Kalk *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2017). REM-Schlafverhaltensstörungen im Rahmen der PD lassen sich auf Dysbalancen des Zusammenspiels noradrenerger, serotoninerger und dopaminerger Effekte zurückführen (Abbott *et al.*, 2005).

Auch bei genetisch bedingten Fällen der PD zeigen sich deutliche Assoziationen zu frühzeitiger Beteiligung des coeruleären Noradrenalinsystems. Von Coelln *et al.* zeigten mithilfe eines Knockout-Modells eine Korrelation zwischen dem PARK2-assoziierten juvenilen Parkinsonismus und einem hochgradigen Verlust der Neurone des LC (Von Coelln *et al.*, 2004).

Es hat sich außerdem gezeigt, dass demenzielle Syndrome im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen allgemein mit einem ausgiebigen Verlust noradrenerger Neurone einhergehen. Dazu zählt neben der Parkinson-Demenz als Progressionsform der PD

auch die Alzheimer-Demenz (Marien *et al.*, 2004). Im Mausmodell hat sich die noradrenerge Aktivität des LC darüber hinaus neuroprotektiv auf Neurone der SNpc ausgewirkt (Marien *et al.*, 2004; Srinivasan & Schmidt, 2003). Ähnliche Ergebnisse zeigen sich in jüngeren Studienergebnissen, welche die protektiven Eigenschaften des LC insbesondere auf eine modulierende Position neuroinflammatorischer Prozesse bei PD und Alzheimer-Demenz zurückführen (Giorgi *et al.*, 2020). Die frühe Beteiligung coeruleärer Neurone in den Stadien nach Braak *et al.* lässt also die Vermutung zu, dass unter anderem dieser fehlende neuroprotektive Einfluss zur zunehmenden Degeneration der SNpc beiträgt und die Krankheitsprogression maßgeblich beeinflusst (Braak *et al.*, 2004; Rommelfanger & Weinshenker, 2007). Dementsprechend erstrebenswert sind therapeutische Methoden zur frühzeitigen Stabilisierung des zentralnervösen Noradrenalinsystems.

1.3 Spannungsabhängige Calciumkanäle

Spannungsabhängige Calciumkanäle (Ca_v-Kanäle) sind an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt und kommen in verschiedenen Subformen fast ubiquitär im menschlichen Körper vor. Es sind zehn verschiedene humane Varianten der Ca_v-Kanäle kloniert worden, die sich anhand verschiedener Kriterien einteilen lassen. Das heute etablierte Einteilungssystem ordnet die Subtypen nach genetischen Kriterien (Übereinstimmungsgrad der für die α_1 -Untereinheit kodierenden Genabschnitte) sowie anhand ihrer Aktivierungs- und Öffnungskinetik (siehe Abbildung 7). Der Fokus dieser Arbeit liegt dabei auf der Subgruppe der Ca_v1-Kanalfamilie bzw. der L-Typ-Ca_v-Kanäle (»L« von Engl. »*long-lasting*« für die Dauer der einwärtsgerichteten Ströme nach Depolarisation). Die vier Isoformen dieser Subgruppe werden beispielsweise in der Skelettmuskulatur (Ca_v1.1), retinalen Photorezeptorzellen (Ca_v1.4) und im zentralen Nervensystem (Ca_v1.2 und Ca_v1.3) exprimiert (Hofmann *et al.*, 2014; Regus-Leidig *et al.*, 2009; Striessnig & Koschak, 2008; Tanabe *et al.*, 1988). Letztere sind dabei die Kanaltypen, die in dieser Arbeit explizit untersucht wurden.

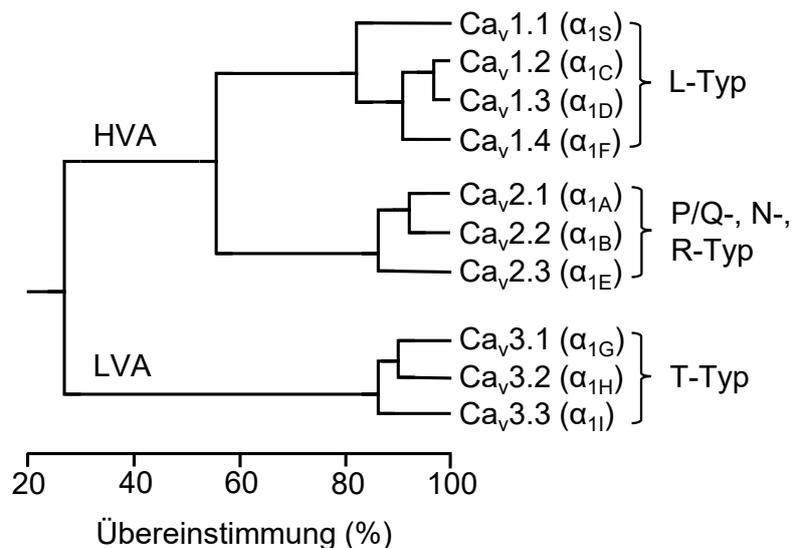


Abbildung 7: Einteilungssystem der spannungsabhängigen Ca_v-Kanäle

Die hier abgebildete Darstellung zeigt den Übereinstimmungsgrad der Gensequenzen, die für die transmembranäre und porenbildende α_1 -Untereinheit der Ca_v-Kanäle kodieren. Die dabei aufgeschlüsselten Subgruppen werden anhand ihrer Öffnungsdauer in weitere Subgruppen eingeteilt. Für diese Arbeit steht die Subgruppe der L-Typ-Ca_v-Kanäle (L von Engl.: »*long-lasting*«) im Fokus. Weiterhin lassen sich spannungsabhängige Calciumkanäle anhand ihres Aktivierungsverhaltens bei höheren Spannungswerten (»high-voltage activated«, HVA) oder niedrigeren Spannungswerten (»low-voltage activated«, LVA) unterscheiden (modifiziert nach Catterall, Striessnig, Snutch, & Perez-Reyes, 2003).

Strukturell sind Ca_v -Kanäle komplexe transmembranäre Proteingebilde, die aus mehreren Untereinheiten verschiedener Bezeichnung zusammengesetzt sind. Die porenbildende α_1 -Untereinheit setzt sich aus einem Tetramer von Domänen zusammen (numerisch als I-IV bezeichnet), die ihrerseits aus je sechs α -Helices bestehen. Die Konfiguration dieser α -helikalen Bestandteile ist maßgeblich an der Kinetik und den Eigenschaften des Kanals als Spannungssensor beteiligt. Die $\alpha_2\delta$ -Untereinheit interagiert vor allem mit den Domänen I-III der α_1 -Untereinheit und ist als pharmakologische Zielstruktur der als Antikonvulsiva und Koanalgetika verwendeten Substanzen Gabapentin und Pregabalin von Bedeutung (Catterall *et al.*, 2019; Davies *et al.*, 2007; Simms & Zamponi, 2014).

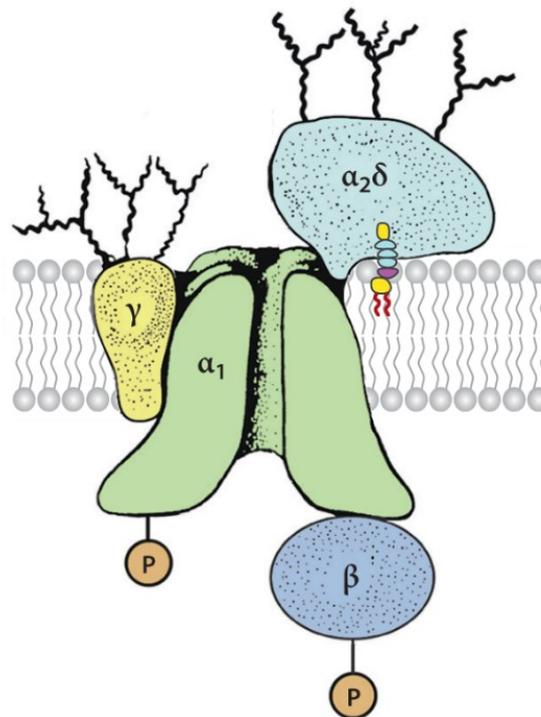


Abbildung 8: Strukturmodell eines spannungsabhängigen Calciumkanals

Exemplarisch ist hier das Modell eines spannungsabhängigen Calciumkanals der L-Typ-Familie abgebildet (genauer $\text{Ca}_v1.1$), wie er üblicherweise als Bestandteil der humanen Skelettmuskelzelle vorkommt (Tanabe *et al.*, 1988). (Abbildung modifiziert nach Nanou & Catterall, 2018)

Im Rahmen der PD sind insbesondere neuronale Kerngebiete wie SNpc und LC betroffen, die in regelmäßigen Intervallen autonom depolarisieren. Diese Schrittmacherfunktion der betroffenen Neurone wird maßgeblich durch Ca_v -1.3-Kanäle ermöglicht. Vergangene Studien haben neuroprotektive Effekte des Ca_v -1.3-Kanal-Antagonisten Isradipin für den Progress der PD gezeigt. Entsprechend gelten Ca_v -Kanäle als wichtige Zielstrukturen für künftige Pharmaka zur Modulation des Krankheitsverlaufs der PD (Guzman *et al.*, 2018; Ilijic *et al.*, 2011; Matschke *et al.*, 2015).

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, zur Aufklärung der zugrundeliegenden Pathomechanismen der PD beizutragen. Insbesondere in den Prodromalstadien, noch vor klinischem Auftreten der PD, ist ein genaues Verständnis der zellulären Abläufe unerlässlich um eine effektive Prävention zu ermöglichen. Der LC ist für eine Vielzahl zentralnervöser Funktionen von Wichtigkeit, seine Rolle im Rahmen der PD ist jedoch noch nicht vollständig erschlossen. Diese Arbeit soll zu einem besseren Verständnis der Veränderungen des LC-Systems bei PD beitragen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Nervenzellen des LC hinsichtlich ihres elektrophysiologischen Verhaltens untersucht. Im Fokus lag dabei vor allem die Untersuchung spannungsabhängiger Calciumkanäle, die eine zentrale Rolle bei der periodischen autonomen Entladung der Nervenzellen des LC spielen (Matschke *et al.*, 2015). Zwei verschiedene Modellsysteme zur Erzeugung einer im Sinne der PD veränderten zellulären Situation wurden dabei angewendet.

Um die Effekte einer oxidativ-metabolischen Stresssituation zu simulieren, wurden von Mäusen angefertigte Hirnschnitte dem Komplex-I-Inhibitor Rotenon zugeführt. Unter dem Einfluss von Rotenon zeigen die exponierten Nervenzellen Veränderungen, ähnlich wie sie im Rahmen der PD beobachtet werden (Greenamyre *et al.*, 2003; Mounsey & Teismann, 2010). Zur Kontrolle wurden die angefertigten Hirnschnitte jeweils auch im nativen Zustand den elektrophysiologischen Messungen unterzogen.

Die Rolle der cytosolischen α -Synuclein-Oligomere, wie sie in den LB der Nervenzellen bei PD aufzufinden sind, ist noch weitestgehend unverstanden. Um zu prüfen, inwieweit diese Oligomere das elektrophysiologische Verhalten der betroffenen Neurone beeinflussen, fand im Rahmen dieser Arbeit das von Henrich *et al.* etablierte prämotorische Mausmodell Anwendung. Dabei wurden Mäusen mithilfe stereotaktisch eingebrachter Adenovirus-assoziiierter Vektoren die kodierenden Genabschnitte für Wildtyp- α -Synuclein und A53T- α -Synuclein eingebracht (Henrich *et al.*, 2018). A53T- α -Synuclein ist eine Variante des α -Synucleins, die besonders zur Aggregation in Oligomeren neigt. Um einen Effekt durch die dabei notwendigen stereotaktischen Punktionen zu prüfen, wurde einem als Kontrolle verwendeten Kollektiv von Mäusen der kodierende Genabschnitt des Proteins Luciferase eingebracht. Nach einer vorab festgelegten Latenz, wurden von den Versuchstieren der Kollektive Hirnschnitte angefertigt und den elektrophysiologischen Messungen zugeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Zur Durchführung der Versuche wurden verschiedene Chemikalien verwendet, die im Folgenden nach ihren Herstellern sortiert aufgelistet sind.

Chemikalie	Hersteller
CaCl ₂ , CoCl ₂ , CsCH ₃ SO ₃ , CsCl, CsOH, KCl, MgATP, MgCl ₂ , NaCl, Na ₂ GTP, NaHCO ₃ , NaH ₂ PO ₄ D-(+)-Glucose, Saccharose HEPES TEA, TTX, 4-AP, Rotenon	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Carbogengas (95 % O ₂ / 5 % CO ₂)	Air Liquide S.A., Paris, Frankreich
EGTA Ketamin	Tocris, Bristol, UK
Isofluran	Baxter International Inc., Deerfield, IL, USA

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Chemikalien und ihrer Hersteller

2.1.2 Geräte

Im Rahmen dieser Arbeit kamen diverse Geräte zum Einsatz, die im Folgenden nach ihren Herstellern gelistet aufgeführt sind. Standardgerätschaften und laborübliche Einmalprodukte sind nicht separat aufgeführt.

Gerät	Hersteller
7000smz-2 Vibratom	Campden Instruments Ltd., Loughborough, UK
Axopatch 200B Verstärker	Molecular Devices LLC, San Jose, CA, USA
CV203BU Headstage Pipettenarretierung und Vorverstärker	
Digidata 1440A Analog/Digital-Wandler	
DMZ-Universal-Puller Pipettenziehgerät	Zeitz-Instruments GmbH, Martinsried, Deutschland
PatchMan NP2 Mikromanipulator	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zeiss Axio Examiner.D1 Mikroskop	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Zeiss AxioCam MRm Kamera	

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Geräte und ihrer Hersteller

2.1.3 Lösungen

Für die Experimente dieser Arbeit wurden verschiedene Lösungen hergestellt, deren Zusammensetzung im Folgenden dargestellt ist.

Lösungsbezeichnung	Zusammensetzung
Artifizielle Cerebrospinale Flüssigkeit (ACSF)	125 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 25 mM NaHCO ₃ ; 1,25 mM NaH ₂ PO ₄ ; 2 mM CaCl ₂ ; 1 mM MgCl ₂ ; 25 mM D-(+)-Glucose; pH 7,4 mittels 95%O ₂ /5%CO ₂
Artifizielle Cerebrospinale Flüssigkeit modifiziert für Calciumstrommessungen (ACSF _{mod})	125 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 25 mM NaHCO ₃ ; 1,25 mM NaH ₂ PO ₄ ; 1 mM CaCl ₂ ; 1 mM MgCl ₂ ; 25 mM D-(+)-Glucose; 10 mM TEA-Cl; 5 mM 4-AP; 0,7 µM TTX; pH 7,4 mittels 95%O ₂ /5%CO ₂
Perfusionslösung für CoCl ₂ Akutmessungen	125 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 25 mM NaHCO ₃ ; 1,25 mM NaH ₂ PO ₄ ; 2 mM CaCl ₂ ; 1 mM MgCl ₂ ; 25 mM D-(+)-Glucose; 1 mM CoCl ₂ ; pH 7,4 (Stabilisierung durch kontinuierliche Begasung mit 95%O ₂ /5%CO ₂)
Perfusionslösung für Rotenon Akutmessungen	125 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 25 mM NaHCO ₃ ; 1,25 mM NaH ₂ PO ₄ ; 2 mM CaCl ₂ ; 1 mM MgCl ₂ ; 25 mM D-(+)-Glucose; 1 µM Rotenon; pH 7,4 (Stabilisierung durch kontinuierliche Begasung mit 95%O ₂ /5%CO ₂)
Pipettenlösung	111 mM CsCH ₃ SO ₃ ; 12,5 mM CsCl; 1 mM MgCl ₂ ; 1 mM CaCl ₂ ; 10 mM HEPES; 1 mM EGTA; 2 mM MgATP; 0,21 mM Na ₂ GTP; pH 7,3 mittels CsOH
Präparationslösung	2,5 mM KCl; 1,25 mM NaH ₂ PO ₄ ; 10 mM MgSO ₄ ; 20 mM PIPES; 10 mM D-(+)-Glucose; 200 mM Saccharose; 0,5 mM CaCl ₂ ; pH 7,35 mittels NaOH
Rotenon-Stock	1 mM Rotenon in DMSO
TTX-Stock	0,7 µM TTX in Aqua dest.

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Lösungen und ihrer Zusammensetzung

2.1.4 Software

Zur digitalen Erfassung der Messdaten wurde die Software »Clampex 10.3« verwendet. Anschließend wurden die Datensätze mit der Software »Clampfit 10.0« analysiert und mittels der Softwarepakete »Office Excel 2016« sowie »Origin Pro 2016« statistisch ausgewertet. Das Schreiben dieser Arbeit erfolgte schließlich mithilfe des Literaturverwaltungspakets »Mendeley Reference Management 1.19«, dem Textverarbeitungsprogramm »Office Word 2016« sowie dem webbasierten LaTeX-Editor »Overleaf«. Die folgende Tabelle fasst sämtliche verwendeten Softwarepakete sowie deren Hersteller zusammen:

Softwareprodukt	Hersteller
Clampex 10.3	Molecular Devices LLC, San Jose, CA, USA
Clampfit 10.0	
Mendeley Reference Management 1.19	Mendeley Ltd., Elsevier Inc., New York, NY, USA
Office 2016	Microsoft Corp., Redmond, WA, USA
Origin Pro 2016	OriginLab Corp., Northampton, MA, USA
Overleaf Online LaTeX-Editor	Overleaf c/o Digital Science, London, UK

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Softwareprodukte und ihrer Entwickler

2.1.5 Versuchstiere

Für die elektrophysiologischen Versuche wurden Mäuse des Typs *Mus musculus* aus der Züchtungsreihe C57/Bl6 verwendet. Die Tiere wurden ausschließlich über die Firma »Charles River Laboratories« bezogen. Das Alter der Tiere unterschied sich zwischen den zwei experimentell untersuchten Modellen der PD.

Zur Messung der Daten im Rahmen des Rotenon-Toxizitätsmodells betrug das Alter der Mäuse zwischen 15 und 28 Tage postnatal. Die Durchführung der Experimente unter dem α -Synuclein-Überexpressionsmodell setzte aus zwei Gründen ein höheres Alter der Versuchstiere voraus: einerseits war zur Durchführung der stereotaktischen Injektion des Vektors in den Hirnstamm der Mäuse ein bestimmtes Grundalter nötig. Weiterhin wurde danach eine Inkubationszeit von acht Wochen abgewartet um eine ausreichende Expression des eingebrachten Gens zu gewährleisten. Aus diesen Gründen betrug das

Alter der Versuchstiere im Rahmen des zweiten Teilprojektes zwischen 118 und 121 Tagen postnatal. Die Injektionen des rAAV-Systems mit der gewünschten Variante des α -Synucleins wurden hierfür durch eine Kooperation mit der AG Oertel der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Marburg realisiert, da diese Methode dort bereits etabliert ist (Henrich *et al.*, 2018).

Die Versuchstiere wurden unter Einhaltung der Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes bei einem Tag-Nachtrhythmus von 12 Stunden zu 12 Stunden in Gruppen von bis zu fünf Mäusen gehalten. Futter und Wasser standen dabei zu jeder Zeit zur Verfügung. Die Pflege der Tiere sowie sämtliche durchgeführten Experimente unterlagen dabei der Genehmigung des Regierungspräsidiums Gießen.

2.2 Methoden

Alle Geräte, Substanzen und Softwareprodukte, die in den kommenden Abschnitten genannt werden, sind im Detail in den Tabellen 1 bis 4 unter Kapitel 2.1 aufgelistet.

2.2.1 Präparation und Schnittanfertigung

Zu Beginn der Präparation wurden die verwendeten Versuchstiere zunächst durch die Applikation des volatilen Anästhetikums Isofluran in einer geschlossenen Kammer narkotisiert. Anschließend wurde mittels intraperitonealer Injektion von Ketamin eine tiefere Sedierung erreicht. Nachdem die ausreichende Narkosetiefe durch Reflextestung überprüft wurde, erfolgte eine Perfusion des gesamten Kreislaufes mit eisgekühlter Präparationslösung. Dafür wurde das Herz des narkotisierten Versuchstieres freipräpariert, der linke Ventrikel kanüliert und anschließend mittels einer Intervallpumpe perfundiert. Um überschüssiges Blut aus dem Kreislauf zu entlassen wurde im Bereich des rechten Atriums eine Inzision gesetzt und eine ausreichende farbliche Klärung des dort austretenden Blutes abgewartet. Nach vollständiger Perfusion wurde das Versuchstier mit einer Schere dekapitiert. Entlang der Sutura sagittalis wurde der Schädel des Tieres eröffnet und das Gehirn behutsam freigelegt. Das nun präparierte Gehirn wurde auf einen Schnittblock in eiskalter Präparationslösung überführt und mithilfe eines Vibratoms (7000smz-2) in 200 μ m bis 180 μ m starke Schnitte in axialer Ausrichtung zerteilt. Die Identifikation der für den Locus coeruleus relevanten Region erfolgte anhand anatomischer Landmarken während des Schnittprozesses. Anschließend wurden die relevanten Schnitte in ein gesondertes, beheizbares Bad aus mit Carbogen begaster ACSF überführt. In diesem Bad wurden die Schnitte anschließend bei 34 °C für mindestens 30

Minuten inkubiert bevor mit den elektrophysiologischen Messungen begonnen wurde. Dieser Inkubationsschritt soll dem Gewebe eine Regenerationsphase von der Ischämiezeit sowie dem physikalischen Trauma ermöglichen und ein ausreichendes Auswaschen der applizierten Narkotika gewährleisten.

2.2.2 Der Messaufbau

Nach Abschluss der Präparationsschritte wurden die angefertigten Hirnschnitte zügig den elektrophysiologischen Messungen unterzogen. Als Methode zur Ableitung der zellulären Ströme kam im Rahmen dieser Arbeit die Patch-Clamp-Technik zum Einsatz (Sakmann & Neher, 2009).

Der dafür verwendete Messaufbau war auf einem schwingungsgedämpften Tisch gelagert, der als Teil eines Faradaykäfigs konstruiert wurde. Alle elektrischen Geräte des Messaufbaus wurden separat geerdet. Auf diese Weise konnte Messfehlern durch Erschütterungen oder mangelnde elektrische Abschirmung entgegengewirkt werden. Zur Bildgebung wurde ein Aufbau aus einem aufrechten Mikroskop (Zeiss Axio Examiner.D1) mit zusätzlich montierter digitaler Kameraoptik (Zeiss AxioCam MRm) verwendet, sodass die visuelle Einstellung der Zielzelle sowohl über das integrierte Doppelokular als auch einen angeschlossenen Monitor vorgenommen werden konnte. In den Objektisch des Mikroskops wurde ein Perfusionssystem mit Zu- und Ablauf integriert, welches von der hauseigenen Werkstatt für Feinmechanik angefertigt wurde. Der Zulauf dieses Systems erlaubte über einen Drehschalter ein schnelles Wechseln der Perfusionsflüssigkeit aus begasbaren Behältern und war als Schwerkraftsystem angelegt, während der Ablauf über eine elektrische Umwälzpumpe aktiv in einen Abfallbehälter geleitet wurde. Durch dieses System wurde ein einfaches Einwaschen diverser Perfusionslösungen und Pharmaka ermöglicht.

Die verwendeten Messpipetten wurden aus Borosilikatkapillaren eigens mithilfe eines Pipettenziehgerätes (DMZ-Universal-Puller) so gefertigt, dass ihr Öffnungswiderstand im Bereich zwischen 2 bis 5 M Ω lag. Zur Ableitung der Ströme wurde innerhalb der Pipette eine chlorierte Silberelektrode verwendet, die zum Erhalt der Chlorierung regelmäßig in einer 3 M KCl-Lösung gelagert wurde. Die Messpipette wurde auf eine Pipettenarettierung mit integriertem Vorverstärker montiert (CV203BU Headstage). Um eine genaue Positionierung der Messpipette zu gewährleisten und eine Adjustierung möglich zu machen, wurde die Pipettenarettierung mit einem Mikromanipulator (PatchMan NP2) verbunden. Die Referenzelektrode wurde in einen schmalen 150 mM

K⁺-Agarosegelzylinder eingebettet und direkt in die Badlösung des Mikroskoptisches eingelegt. Die im Rahmen der Messungen aufgezeichneten Signale wurden über einen Verstärker (Axopatch 200B) an einen Analog/Digital-Wandler (Digidata 1440A) übergeben, der diese bei einer Digitalisierungsfrequenz von 10kHz an einen PC-Arbeitsplatz übermittelte. Mithilfe eines Softwarepaketes (Clampex 10.3) konnten an diesem Arbeitsplatz sowohl die Messparameter eingestellt, als auch die gemessenen Daten aufgezeichnet werden.

2.2.3 Elektrophysiologische Messungen

Zur Messung der Ionenströme einzelner Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit die sogenannte Whole-Cell-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik verwendet. Um diese Konfiguration zu erreichen wird zunächst die Messpipette über ein steriles Filtersystem mit der internen Pipettenlösung befüllt, anschließend an der Pipettenarettierung befestigt und mithilfe des Mikromanipulators (PatchMan NP2) in die Badlösung des Mikroskoptisches eingebracht. Innerhalb der Messpipette wurde zuvor ein geringer Überdruck hergestellt, um Kontaminationen durch die Badlösung oder Bestandteile des Präparates zu verhindern. Die Badlösung des Mikroskoptisches bestand aus der bereits beschriebenen ACSF, welcher zur Isolation der zellulären Calciumströme ein Gemisch verschiedener Kanalantagonisten zugesetzt wurde (siehe Tab 3. »ACSF_{mod}«). Dieser modifizierten ACSF (ACSF_{mod}) wurde zur Blockade der spannungsabhängigen Kaliumströme Tetraethylammonium (TEA) und 4-Aminopyridin (4-AP), sowie Tetrodotoxin (TTX) zur Blockade der spannungsabhängigen Natriumkanäle zugesetzt. Für eines der Teilerperimente wurde darüber hinaus Cobalt-(II)-Chlorid zur Blockade spannungsabhängiger Calciumkanäle verwendet.

Anhand anatomischer Landmarken des Präparates wurde zunächst der *Locus coeruleus* aufgesucht und dessen Zellpopulation anhand morphologischer Parameter überprüft. In vergangenen Experimenten mit selbem Messprinzip wurde die korrekte Zellpopulation zusätzlich durch immunhistochemische Methoden verifiziert, sodass die Identifikation der LC-Region in Landmarkentechnik innerhalb der Arbeitsgruppe auf hinreichender Erfahrung basierte. Nach Identifikation eines möglichst oberflächlich liegenden Neurons, wurde die Messpipette unter Sicht an dessen Zellmembran herangeführt bis sich eine leichte Eindellung erkennen ließ (siehe Abbildung 9). Durch die vorsichtige Anlage eines Unterdrucks innerhalb der Messpipette wurde anschließend ein nahezu dichter Verbund zwischen Glaspipette und Zellmembran erreicht. Dieser Zustand wird als On-Cell-Konfiguration bezeichnet. Da der Abdichtwiderstand zwischen Messpipette und Zellmembran

hierbei mehrere $G\Omega$ betragen muss, spricht man auch von der Etablierung des sogenannten »Gigaseals« beziehungsweise des Tight-Seal-Zustands.

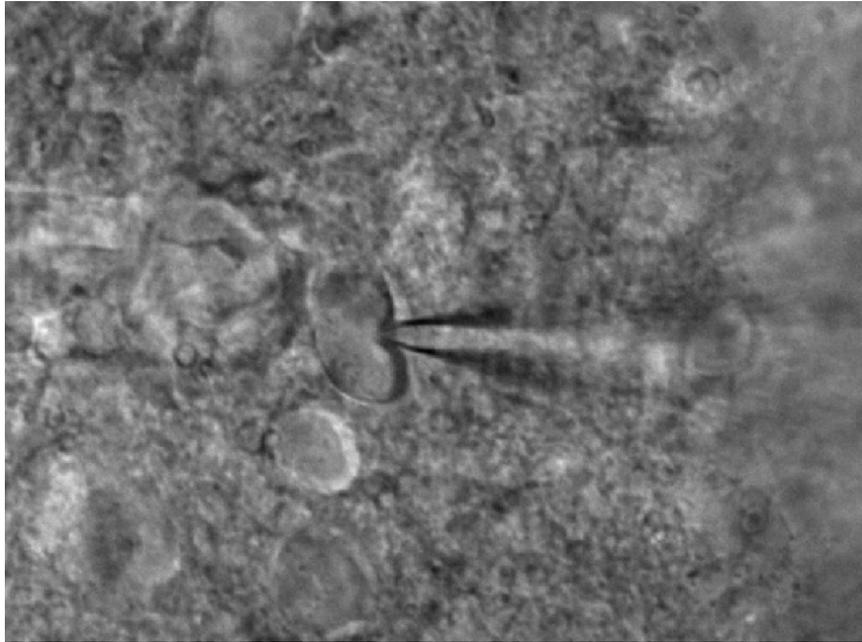


Abbildung 9: Etablierung des On-Cell-Zustands während einer Patch-Clamp-Messung

Als notwendiger Schritt zur Etablierung eines ausreichend dichten Kontaktes zwischen Messpipette und Zellmembran des untersuchten Neurons, muss zunächst die On-Cell-Konfiguration erreicht werden. Ist die Zielzelle identifiziert, wird diese mithilfe des Mikromanipulators mit der Glaspipette angefahren bis eine leichte Eindellung der Zellmembran erkennbar ist. Diese charakteristische Eindellung ist auf der gezeigten Abbildung am rechten Rand der Zellmembran eines Neurons erkennbar. Anschließend wird durch behutsame Anlage eines Unterdrucks in der Messpipette die suffiziente Abdichtung zwischen Zellmembran und Pipettenöffnung erreicht. Da der entstehende elektrische Widerstand dieses abgedichteten Systems im Bereich mehrerer $G\Omega$ liegt, wird diese Abdichtung auch als Gigaseal bezeichnet. Die hier dargestellte Abbildung entstand als Bildschirmfoto während einer der Messungen, die im Rahmen dieser Arbeit aufgezeichnet wurden.

Die korrekte Anlage dieser Konfiguration konnte durch Anlage eines Testpulses überprüft werden. Anschließend wurde durch behutsames Ansaugen der Abschnitt der Zellmembran unter der Öffnung der Messpipette eröffnet, sodass das Innere der Messpipette nun direkten Kontakt zum Cytosol der untersuchten Zelle hatte. In diesem Zustand spricht man nun von der Whole-Cell-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik, dessen korrekte Anlage sich ebenfalls durch einen Testpuls prüfen lässt. Kapazitative Effekte der Zellmembran wurden durch Kompensationsmechanismen des Verstärkers (Axopatch 200B) ausgeglichen. Die Qualität der Konfiguration wurde über den gesamten Messzeitraum anhand des Serienwiderstandes sowie des Membranwiderstandes überprüft. Ein hoher Serienwiderstand deutet darauf hin, dass Bestandteile der eröffneten Zellmembran in das Innere der Messpipette gelangt sind. Da diese Membranfragmente ebenfalls kapazitative Eigenschaften besitzen, erzeugen sie bereits

einen Spannungsabfall noch bevor das Kommandopotenzial das Cytosol des untersuchten Neurons erreicht hat. Aus diesem Grund wurden Messungen mit einem Serienwiderstand von mehr als 15 M Ω nicht in die Auswertung der Ergebnisse einbezogen. Der Membranwiderstand der Messung zeigt eine ausreichende Versiegelung zwischen Messpipette und Zellmembran an und betrug bei allen ausgewerteten Messungen mindestens 1 G Ω (»Gigaseal«).

Die Messungen erfolgten im Rahmen dieser Arbeit im Voltage-Clamp Modus. Dabei wird dem untersuchten System über die beiden Elektroden jeweils eine bestimmte Spannung angelegt und die Stromantwort der Zelle gemessen. Der Verlauf der angelegten Spannung lässt sich in Form frei konfigurierbarer Protokolle beliebig einstellen. Zwei verschiedene Protokolle für den Spannungsverlauf wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet: ein Protokoll mit rampenförmigem Anstieg der Spannungskurve sowie ein Protokoll mit inkrementellem Anstieg konstanter Spannungsverläufe (siehe Abbildung 10).

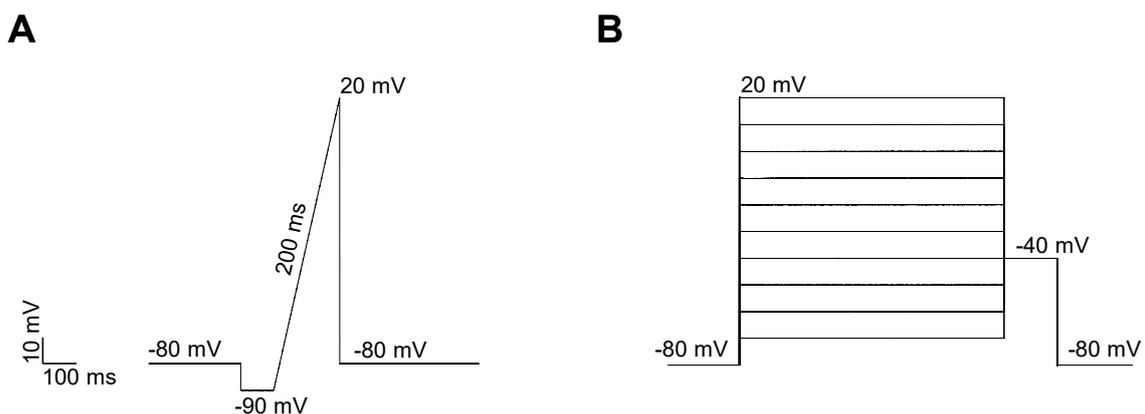


Abbildung 10: Schematische Darstellung der verwendeten Spannungsprotokolle für die angelegte Klemmspannung im Voltage-Clamp-Modus

(A) Darstellung der Klemmspannung im zeitlichen Verlauf für das rampenförmige Spannungsprotokoll, Teilschritte: -80 mV konstant für 200 ms, -90 mV konstant für 100 ms, linearer Anstieg bis 20 mV über 200 ms, -80 mV konstant für 1 s (hier verkürzt dargestellt) **(B)** Darstellung der Klemmspannung im zeitlichen Verlauf für das schrittweise steigende Spannungsprotokoll, Teilschritte: -80 mV konstant für 100 ms, pro Messschritt jeweils +10 mV konstant für 500 ms, -40 mV konstant für 100 ms

Die so durchgeführten Messungen lassen sich in Bezug auf die gemessenen Zellen gekoppelt oder ungekoppelt durchführen. Eine gekoppelte Messung bezeichnet in diesem Zusammenhang, dass dieselbe Zelle nach Ablauf des ersten Messzyklus unter Erhalt des Gigaseals einem zweiten Messzyklus unterzogen wird. Ein Messzyklus besteht dabei aus einer definierten Anzahl von Voltage-Clamp-Messungen mittels der beschriebenen Spannungsprotokolle. Zwischen erstem und zweitem Messzyklus können die Messbedingungen angepasst und deren elektrophysiologischer Einfluss

untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde den untersuchten Gewebeschnitten bei gekoppelten Messungen mittels der Badlösung für einen definierten Zeitraum ein weiteres Pharmakon, wie beispielsweise Rotenon oder CoCl_2 , zugesetzt. Der Begriff „ungekoppelte Messung“ bezieht sich auf Messreihen verschiedener coeruleer Neurone desselben oder eines anderen Gewebeschnittes.

2.2.4 Mathematische und statistische Analyse

Die aufgezeichneten Daten wurden zunächst mithilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes »Office Excel 2016« kategorisiert. Die Auswertung der einzelnen Messungen erfolgte mithilfe des Softwarepaketes »Clampfit 10.0«. Um die Daten schließlich statistisch auszuwerten und graphisch darzustellen kamen die Analysesoftware »Origin Pro 2016« sowie erneut »Office Excel 2016« zum Einsatz. Zur Signifikanzanalyse wurden je nach Datensatz verschiedene statistische Methoden angewendet. Für normalverteilte Datensätze wurden den Einstichproben-t-Test für nicht-gekoppelte Messungen, sowie der Paardifferenz-t-Test für gekoppelte Messungen verwendet. Wurde ein normalverteilter mit einem nicht-normalverteilten Datensatz verglichen, fand der Mann-Whitney-U-Test Anwendung. Für den Vergleich zweier nicht-normalverteilter Datensätze wurde der Median-Test nach Moods verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Rotenon-Toxizitätsmodell (*in vitro*)

Ob und inwieweit oxidativ-metabolischer Stress zelluläre Calciumströme beeinflusst, wurde im Rahmen dieser Arbeit mithilfe des neurotoxischen Agens Rotenon überprüft. Dazu wurden die angefertigten Hirnschnitte gekoppelten und nicht-gekoppelten Voltage-Clamp-Messungen unterzogen, für die zwei verschiedene Spannungsprotokolle verwendet wurden. Zwei verschiedene Expositionszeiträume zu Rotenon, wurden in den beiden Teilerperimenten untersucht. Der Inkubations- und Badlösung, in der sich die Hirnschnitte während der Messungen und Inkubationszeit befanden, wurden zur Antagonisierung der Na_v- und K_v-Kanäle TEA, 4-AP und TTX zugesetzt, sodass die calciumabhängigen Zellströme weitestgehend isoliert aufgezeichnet werden konnten. Der Pipettenlösung zur Füllung der Borosilikatpipette wurden zur weiteren Antagonisierung der K_v-Kanäle Caesiumionen beigemischt. Im Folgenden werden die Ergebnisse unter Kontrollbedingungen und nach Rotenonexposition miteinander verglichen.

3.1.1 Veränderungen der spannungsabhängigen Calciumströme nach direkter Rotenonexposition

Im Rahmen des ersten Teilerperimentes wurde ein geeignetes coeruleäres Neuron zunächst unter Kontrollbedingungen und anschließend nach einer fünfminütigen Perfusion mit 1 µM Rotenonlösung in ACSF untersucht. Mithilfe eines rampenförmigen Spannungsprotokolls wurde der maximale zelluläre Einwärtsstrom erfasst und zur besseren Vergleichbarkeit auf die gemessene Gesamtkapazität der Zelle gemittelt (entspricht dem Begriff »normalisierter Strom«, siehe Abbildung 10B). Es zeigte sich, dass bereits diese kurzfristige Rotenonexposition zu einer messbaren, jedoch nicht signifikanten Abnahme des zellulären Maximalstroms geführt hat (*arithmetisches Mittel des Maximalstroms ± SEM zu Messbeginn: -16,18 ± 3,88 pA/pF; arithmetisches Mittel des Maximalstroms ± SEM nach fünfminütiger Rotenonperfusion: -12,12 ± 1,04 pA/pF, n = 4*).

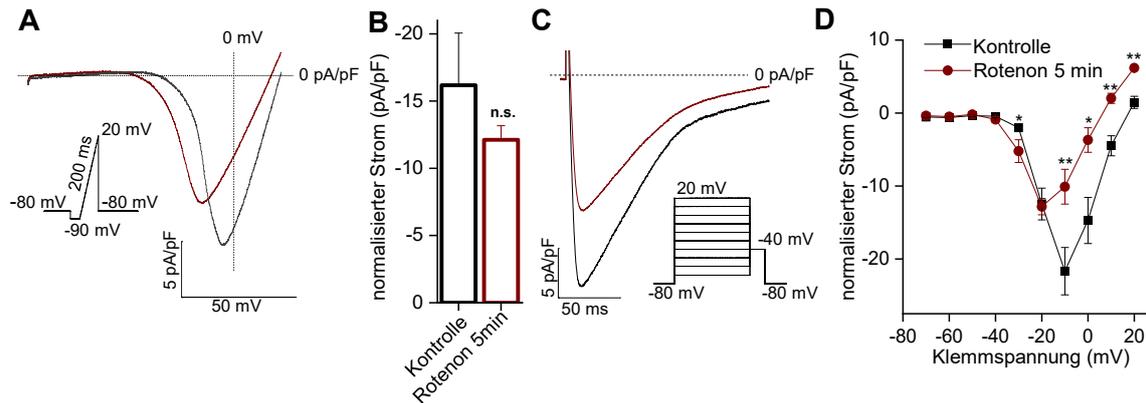


Abbildung 11: Unter Einfluss von Rotenon zeigt sich nach fünfminütiger Latenz ein verringerter maximaler Calcium-Influx

(A) Darstellung der arithmetisch gemittelten Einwärtsströme in Abhängigkeit der angelegten Klemmspannung unter Kontrollbedingungen (schwarze Kurve) und nach fünfminütiger Perfusion mit 1 μM Rotenon (dunkelrote Kurve) bei Anwendung eines Spannungsprotokolls in Rampenform (siehe Darstellung links der gemittelten Stromabbildungen, gekoppelte Messungen). (B) Die Analyse des Maximalstroms bei Anwendung des rampenförmigen Spannungsprotokolls zeigt eine statistisch nicht signifikante Abnahme des Calcium-Einwärtsstroms nach fünfminütiger Perfusion mit 1 μM Rotenon (dunkelroter Balken) im Vergleich zur Kontrollmessung (schwarzer Balken) ($n = 4$). (C) Darstellung der arithmetisch gemittelten Einwärtsströme im Zeitverlauf unter Kontrollbedingungen (schwarze Kurve) und nach fünfminütiger Perfusion mit 1 μM Rotenon (dunkelrote Kurve) bei Anwendung eines Spannungsprotokolls in Form eines Potentialschrittes von -80 mV zu -10 mV als repräsentativer Teilschritt eines mehrschrittigen Spannungsprotokolls (siehe Darstellung rechts der gemittelten Stromabbildungen). (D) Die Analyse der Strom/Spannungsbeziehung zeigt eine signifikante Abnahme der Calcium-Einwärtsströme nach fünfminütiger Perfusion mit 1 μM Rotenon für die Potentialsprünge von -80 mV zu jeweils -30 mV, -10 mV, 0 mV, 10 mV und 20 mV ($n = 4$). Die dargestellten Daten repräsentieren arithmetische Mittelwerte \pm SEM. n.s.: nicht signifikant; *: $P \leq 0,05$; **: $P \leq 0,01$

Das zweite verwendete Spannungsprotokoll nutzte inkrementelle Anstiege um jeweils 10 mV um die zellulären Calciumströme bei einem bestimmten vergleichbaren Membranpotential darzustellen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden auch hier die aufgezeichneten Ströme jeweils auf die Kapazität der gemessenen Zelle normiert und die Ergebnisse anschließend arithmetisch gemittelt (siehe Abbildung 10D). Signifikante Reduktionen der Ioneneinströme zeigten sich bei dem Potentialschritt von -80 mV zu -30 mV, sowie in Folge ab einer Klemmspannung von -10 mV über jeden weiteren Potentialschritt bis 20mV. Besonders deutliche Differenzen stellten sich ab dem Potentialschritt zu -10 mV dar, was in etwa der Aktivierungsschwelle der L-Typ-Calciumkanäle entspricht (Koschak *et al.*, 2001). Der Teilschritt von Ruhemembranpotential zu der erwähnten Aktivierungsschwelle von -10 mV wurde zur besseren Anschaulichkeit separat aufgeführt (siehe Abbildung 10C). Messreihen mit signifikant divergierenden Ergebnissen sind separat in Tabelle 5 aufgeführt.

Schritt	-30 mV	-10 mV	0 mV	10 mV	20 mV
[-80 mV zu]					
Signifikanzniveau	0,013	0,004	0,013	0,008	0,007
[p-Wert]					
$I_{norm.} \pm SEM$	$-2,01 \pm 0,24$	$-21,67 \pm 3,24$	$-14,72 \pm 3,16$	$-4,49 \pm 1,37$	$1,46 \pm 0,83$
Kontrolle					
[pA/pF]					
$I_{norm.} \pm SEM$	$-5,22 \pm 1,56$	$-10,09 \pm 2,39$	$-3,69 \pm 1,68$	$-2,02 \pm 0,70$	$6,19 \pm 0,25$
Rotenon					
5min					
[pA/pF]					

Tabelle 5: Signifikant reduzierte Ionenströme nach fünfminütiger Exposition mit 1 μ M-Rotenonlösung, Voltage-Clamp-Messung im schrittformigen Spannungsprotokoll

3.1.2 Veränderung der spannungsabhängigen Calciumströme nach Rotenon-Inkubation

Da das zweite Teilexperiment mit einer Rotenonexpositionsdauer von zwei Stunden durchgeführt wurde, erfolgten die anschließenden Voltage-Clamp-Messungen ungekoppelt. Der angefertigte Hirnschnitt wurde hierfür in der Sagittalebene zerteilt und seitenzugehörig markiert. Anschließend wurde die LC-Region einer Schnitthälfte in 1 μ M Rotenon-ACSF-Lösung für zwei Stunden inkubiert. Die jeweils kontralaterale Schnitthälfte wurde während der Inkubationszeit den elektrophysiologischen Messungen zugeführt und diente als Kontrolluntersuchung. Bei Anlage des rampenförmigen Spannungsprotokolls zeigte sich eine deutliche, statistisch signifikante Abnahme des kapazitativ gemittelten Maximalstroms (*arithmetisches Mittel des Maximalstroms \pm SEM zu Messbeginn: $-11,16 \pm 0,97$ pA/pF, $n = 17$; arithmetisches Mittel des Maximalstroms \pm SEM nach zweistündiger Rotenonperfusion: $-7,31 \pm 1,03$ pA/pF, $n = 14$).*

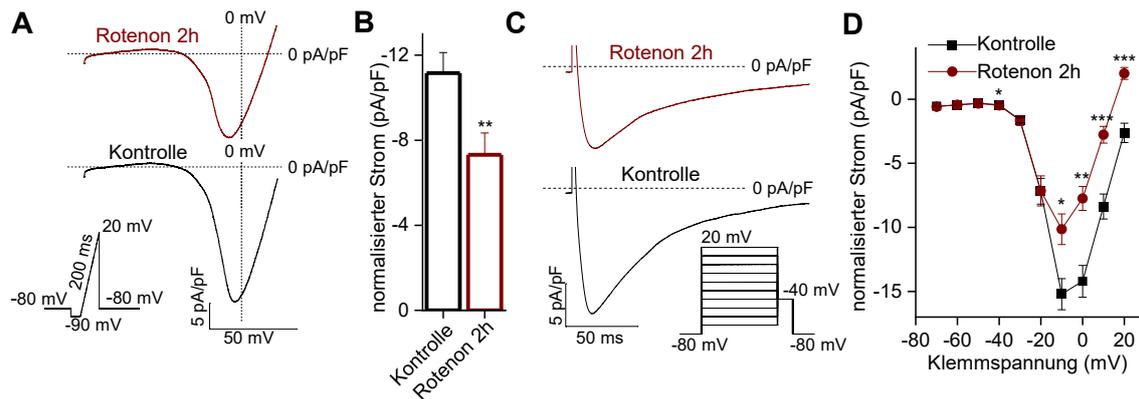


Abbildung 12: Nach zweistündiger Inkubation mit Rotenon zeigt sich ein signifikant verringerter maximaler Calcium-Influx

(A) Darstellung der arithmetisch gemittelten Einwärtsströme in Abhängigkeit der angelegten Klemmspannung unter Kontrollbedingungen (schwarze Kurve) und nach zweistündiger Inkubation mit $1 \mu\text{M}$ -Rotenon (dunkelrote Kurve) bei Anwendung eines Spannungsprotokolls in Rampenform (siehe Darstellung links der gemittelten Stromabbildungen). (B) Die Analyse des Maximalstroms bei Anwendung des rampenförmigen Spannungsprotokolls zeigt eine statistisch signifikante Abnahme des Calcium-Einwärtsstromes nach zweistündiger Inkubation mit $1 \mu\text{M}$ -Rotenon (dunkelroter Balken) im Vergleich zur Kontrollmessung (schwarzer Balken) ($n(\text{Kontrolle}) = 17$; $n(\text{Rotenon } 2\text{h}) = 14$). (C) Darstellung der arithmetisch gemittelten Einwärtsströme im Zeitverlauf unter Kontrollbedingungen (schwarze Kurve) und nach zweistündiger Inkubation mit $1 \mu\text{M}$ -Rotenon (dunkelrote Kurve) bei Anwendung eines Spannungsprotokolls in Form eines Potenzialschrittes von -80 mV zu -10 mV als repräsentativer Teilschritt eines mehrschrittigen Spannungsprotokolls (siehe Darstellung rechts der gemittelten Stromabbildungen). (D) Die Analyse der Strom/Spannungsbeziehung zeigt eine signifikante Abnahme der Calcium-Einwärtsströme nach zweistündiger Inkubation mit $1 \mu\text{M}$ -Rotenon für die Potenzialsprünge von -80 mV zu jeweils -40 mV , -10 mV , 0 mV , 10 mV und 20 mV ($n(\text{Kontrolle}) = 17$; $n(\text{Rotenon } 2\text{h}) = 14$).

Die dargestellten Daten repräsentieren arithmetische Mittelwerte \pm SEM.

n.s.: nicht signifikant; *: $P \leq 0,05$; **: $P \leq 0,01$; ***: $P \leq 0,001$

Das zweite Telexperiment zeigte auch bei Anwendung des inkrementellen Spannungsprotokolls eine deutliche Reduktion der einwärtsgerichteten Ionenströme. Mit Ausnahme der Klemmspannung bei -40 mV , zeigen sich die Messergebnisse analog zu den Ergebnissen nach direkter Rotenonperfusion mit einer signifikanten Reduktion ab einer Klemmspannung von -10 mV . Signifikant divergierende Ionenströme vor und nach Rotenoninkubation sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Schritt	-40 mV	-10 mV	0 mV	10 mV	20 mV
[-80 mV zu]					
Signifikanz-niveau	0,045	0,020	0,002	0,00008	0,00003
[p-Wert]					
$I_{norm.} \pm SEM$	$-0,44 \pm 0,12$	$-15,22 \pm 1,21$	$-14,21 \pm 1,24$	$-8,37 \pm 0,97$	$-2,62 \pm 0,75$
Kontrolle					
[pA/pF]					
$I_{norm.} \pm SEM$	$-0,48 \pm 0,06$	$-10,15 \pm 1,20$	$-7,74 \pm 0,94$	$-2,80 \pm 0,65$	$2,02 \pm 0,47$
Rotenon 2h					
[pA/pF]					

Tabelle 6: Signifikant reduzierte Ionenströme nach zweistündiger Inkubation mit 1 μ M-Rotenonlösung, Voltage-Clamp-Messung im schrittförmigen Spannungsprotokoll

3.1.3 Effekte nach CoCl_2 -vermittelter Blockade der spannungsabhängigen Calciumkanäle

Um die Restströme nach Blockade der spannungsabhängigen Natrium- und Kaliumkanäle mittels TTX, 4-AP und TEA weiter zu differenzieren, wurden zusätzlich gekoppelte Messungen unter akuter fünfminütiger Perfusion mit CoCl_2 durchgeführt. Spannungsabhängige Calciumkanäle lassen sich mittels CoCl_2 kompetitiv antagonisieren (Stewart *et al.*, 2017). Unter Kontrollbedingungen zeigte sich bei Anwendung des rampenförmigen Spannungsprotokolls eine Reduktion des einwärtsgerichteten Maximalstroms um im Mittel $44,8 \pm 9,1 \%$.

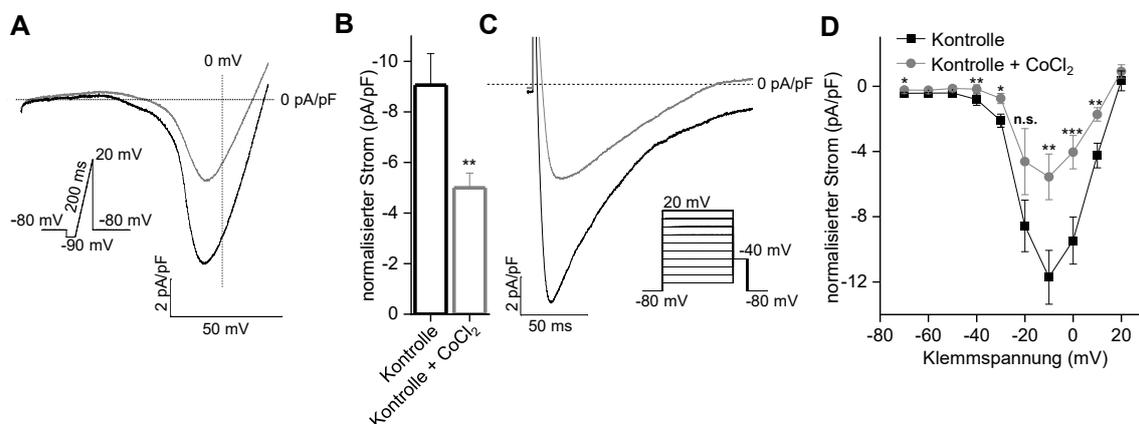


Abbildung 13: CoCl_2 -vermittelte Antagonisierung der spannungsabhängigen Calciumkanäle unter Kontrollbedingungen

(A) Darstellung der arithmetisch gemittelten Einwärtsströme in Abhängigkeit der angelegten Klemmspannung unter Kontrollbedingungen (schwarze Kurve) und nach fünfminütiger Perfusion mit einer 1 mM CoCl_2 -Lösung (graue Kurve) bei Anwendung eines Spannungsprotokolls in Rampenform (siehe Darstellung links der gemittelten Stromabbildungen). **(B)** Die statistische Analyse zeigt eine signifikante Abnahme des Maximalstroms bei Anwendung des rampenförmigen Spannungsprotokolls um im Mittel $4,06 \pm 0,83$ pA/pF nach fünfminütiger Perfusion mit 1 mM CoCl_2 -Lösung (grauer Balken) im Vergleich zur Messung unter Kontrollbedingungen (schwarzer Balken) ($n = 5$). Dies entspricht einer relativen Reduktion der Stromdichte um $44,8 \pm 9,1 \%$. **(C)** Darstellung der arithmetisch gemittelten Einwärtsströme im Zeitverlauf unter Kontrollbedingungen (schwarze Kurve) und nach fünfminütiger Perfusion mit einer 1 mM CoCl_2 -Lösung (graue Kurve) bei Anwendung eines Spannungsprotokolls in Form eines Potenzialschrittes von -80 mV zu -10 mV als repräsentativer Teilschritt eines mehrschrittigen Spannungsprotokolls (siehe Darstellung rechts der gemittelten Stromabbildungen). **(D)** Die Analyse der Strom/Spannungsbeziehung zeigt eine signifikante Abnahme der Calcium-Einwärtsströme nach fünfminütiger Perfusion mit einer 1 mM CoCl_2 -Lösung für die Potenzialsprünge von -80 mV zu jeweils -70 mV, -40 mV, -30 mV, -10 mV, 0 mV und 10 mV ($n = 5$).

Die dargestellten Daten repräsentieren arithmetische Mittelwerte \pm SEM.

n.s.: nicht signifikant; *: $P \leq 0,05$; **: $P \leq 0,01$; ***: $P \leq 0,001$

Bei Anwendung des inkrementellen Spannungsprotokolles zeigten sich nach Applikation von 1 mM CoCl₂ ebenfalls deutliche Reduktionen der verbliebenen Einwärtsströme unter Kontrollbedingungen. Im Gegensatz zu den oben aufgeführten Telexperimenten wurden dabei über nahezu den gesamten Verlauf der Klemmspannungsinkremente signifikante Minderungen der Einwärtsströme beobachtet. Im Einzelnen sind die dabei aufgezeichneten Werte unterhalb in Tabelle 7 abgebildet.

Teilschritt [-80 mV zu]	-70 mV	-40 mV	-30 mV
Signifikanzniveau [p-Wert]	0,022	0,005	0,019
<i>I</i>_{norm.} ± SEM Kontrolle [pA/pF]	-0,54 ± 0,05	-0,44 ± 0,12	-1,62 ± 0,23
<i>I</i>_{norm.} ± SEM Kontrolle + CoCl₂ [pA/pF]	-0,23 ± 0,02	-0,18 ± 0,27	-0,75 ± 0,31

Teilschritt [-80 mV zu]	-10 mV	0 mV	10 mV
Signifikanzniveau [p-Wert]	0,002	0,001	0,002
<i>I</i>_{norm.} ± SEM Kontrolle [pA/pF]	-15,21 ± 1,21	-14,21 ± 1,24	-8,37 ± 0,97
<i>I</i>_{norm.} ± SEM Kontrolle + CoCl₂ [pA/pF]	-5,55 ± 1,40	-4,04 ± 1,02	-1,72 ± 0,41

Tabelle 7: Signifikant reduzierte Ionenströme nach fünfminütiger Perfusion mit 1 mM-CoCl₂-Lösung, Voltage-Clamp-Messung im schrittformigen Spannungsprotokoll

Um die calciumsensitiven Restströme unter oxidativ-metabolischem Stress darzustellen, wurde dasselbe Experiment an insgesamt fünf Hirnschnitten durchgeführt, die zuvor für zwei Stunden in 1 μM -Rotenonlösung inkubiert wurden. Auch hier konnte eine deutliche Reduktion der calciumsensitiven Restströme festgestellt werden. Im Mittel wurde bei Anwendung des rampenförmigen Spannungsprotokolls durch 1mM CoCl_2 eine statistisch signifikante Reduktion des restlichen einwärtsgerichteten Maximalstroms um $20,8 \pm 6,1 \%$ erreicht.

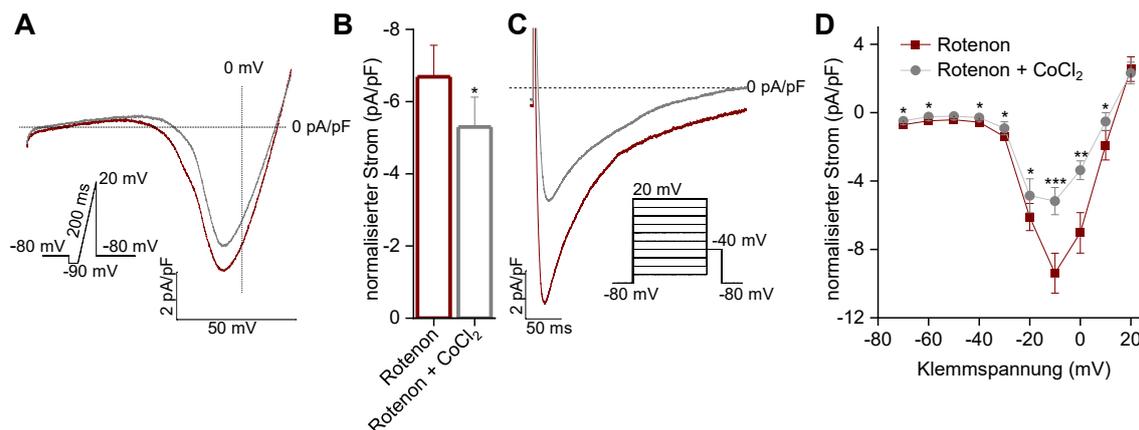


Abbildung 14: CoCl_2 -vermittelte Antagonisierung der spannungsabhängigen Calciumkanäle nach zweistündiger Inkubation mit Rotenon

(A) Darstellung der arithmetisch gemittelten Einwärtsströme in Abhängigkeit der angelegten Klemmspannung nach zweistündiger Inkubation mit 1 μM -Rotenonlösung (dunkelrote Kurve) und nach zusätzlich fünfminütiger Perfusion mit einer 1 mM CoCl_2 -Lösung (graue Kurve) bei Anwendung eines Spannungsprotokolls in Rampenform (siehe Darstellung links der gemittelten Stromabbildungen). **(B)** Die statistische Analyse zeigt eine signifikante Abnahme des Maximalstroms um im Mittel $1,39 \pm 0,41$ pA/pF nach fünfminütiger Perfusion mit einer 1 mM CoCl_2 -Lösung (dunkelroter Balken) im Vergleich zur Messung unter Kontrollbedingungen (grauer Balken) ($n = 5$). Dies entspricht einer relativen Reduktion des maximalen Stroms um $20,8 \pm 6,1 \%$. **(C)** Darstellung der arithmetisch gemittelten Einwärtsströme im Zeitverlauf unter Kontrollbedingungen (dunkelrote Kurve) und nach fünfminütiger Perfusion mit einer 1 mM CoCl_2 -Lösung (graue Kurve) bei Anwendung eines Spannungsprotokolls in Form eines Potentialschrittes von -80 mV zu -10 mV als repräsentativer Teilschritt eines mehrschrittigen Spannungsprotokolls (siehe Darstellung rechts der gemittelten Stromabbildungen). **(D)** Die Analyse der Strom/Spannungsbeziehung zeigt eine signifikante Abnahme der Calcium-Einwärtsströme nach fünfminütiger Perfusion mit einer 1 mM CoCl_2 -Lösung für die Potentialsprünge von -80 mV zu jeweils -40 mV, -30 mV, -20 mV, -10 mV, 0 mV und 10 mV ($n = 5$). Die dargestellten Daten repräsentieren arithmetische Mittelwerte \pm SEM.
n.s.: nicht signifikant; *: $P \leq 0,05$; **: $P \leq 0,01$; ***: $P \leq 0,001$

Ähnliche Ergebnisse konnten auch unter Anwendung des inkrementellen Spannungsprotokolls aufgezeichnet werden. Analog zu den Messungen nach CoCl_2 -vermittelter Antagonisierung unter Kontrollbedingungen, wurden auch hier signifikant niedrigere Einwärtsströme festgestellt.

Dabei wurden auch in diesem Telexperiment über den nahezu gesamten Verlauf der angewendeten Klemmspannungen signifikante Minderungen der einwärtsgerichteten Ionenströme abgeleitet. Die einzelnen Ergebnisse der für statistisch signifikant reduzierte Ionenströme sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Teilschritt	-70 mV	-60 mV	-40 mV	-30 mV
[-80 mV zu]				
Signifikanzniveau	0,029	0,014	0,047	0,021
[p-Wert]				
$I_{norm.} \pm SEM$	-0,59 \pm 0,05	-0,43 \pm 0,04	-0,48 \pm 0,06	-1,66 \pm 0,39
Rotenon 2h [pA/pF]				
$I_{norm.} \pm SEM$	-0,49 \pm 0,07	-0,24 \pm 0,03	-0,30 \pm 0,14	-0,92 \pm 0,34
Rotenon 2h + CoCl₂				
[pA/pF]				
Teilschritt	-20 mV	-10 mV	0 mV	10 mV
[-80 mV zu]				
Signifikanzniveau	0,017	0,001	0,004	0,043
[p-Wert]				
$I_{norm.} \pm SEM$	-7,15 \pm 1,17	-10,15 \pm 1,20	-7,74 \pm 0,94	-2,77 \pm 0,65
Rotenon 2h [pA/pF]				
$I_{norm.} \pm SEM$	-4,86 \pm 0,99	-5,17 \pm 0,80	-3,37 \pm 0,55	-0,52 \pm 0,52
Rotenon 2h + CoCl₂				
[pA/pF]				

Tabelle 8: Signifikant reduzierte Ionenströme nach zweistündiger Exposition mit 1 μ M-Rotenonlösung und anschließender fünfminütiger Perfusion mit einer 1 mM-CoCl₂-Lösung, Voltage-Clamp-Messungen im schrittförmigen Spannungsprotokoll

Die Reduktion des maximalen Einwärtsstroms zeigte zunächst eine deutliche Differenz zwischen Kontrollbedingungen und nach zweistündiger Rotenoninkubation. Die Auswertung der aufgezeichneten Datensätze ergab jedoch keine statistisch signifikante Differenz der aufgezeichneten Messungen. Eine graphische Abbildung der CoCl_2 -sensitiven Maximalströme bei Anwendung des rampenförmigen Spannungsprotokolls ist in Abbildung 15 dargestellt.

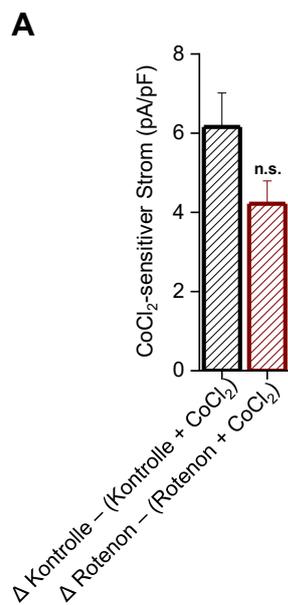


Abbildung 15: Darstellung des CoCl_2 -sensitiven Differenzstroms unter Kontrollbedingungen und nach zweistündiger Inkubation mit Rotenon

(A) Darstellung des cobaltsensitiven Maximalstroms unter Kontrollbedingungen und nach zweistündiger Inkubation mit $1 \mu\text{M}$ Rotenon sowie anschließend jeweils fünfminütiger Perfusion mit einer 1 mM CoCl_2 -Lösung. Abgebildet ist jeweils die Differenz des maximalen Einwärtsstroms vor und nach CoCl_2 -Perfusion für das jeweils getestete Kollektiv bei Anwendung des rampenförmigen Spannungsprotokolls. Die Differenz des Maximalstroms im Kontrollmodell (schwarz schraffierter Balken) und die Differenz des Maximalstroms im Rotenonmodell (dunkelrot schraffierter Balken) sind nebeneinander abgebildet. Der cobaltsensitive Maximalstrom variiert nicht signifikant zwischen den untersuchten Modellen.

Die dargestellten Daten repräsentieren arithmetische Mittelwerte \pm SEM.

n.s.: nicht signifikant; *: $P \leq 0,05$; **: $P \leq 0,01$; ***: $P \leq 0,001$

3.2 α -Synuclein-Überexpressionsmodell (*in vivo*)

Der Einfluss cytosolischer α -Syn-Oligomere auf das elektrophysiologische Verhalten der LC-Neurone wurde im Rahmen dieser Arbeit mithilfe des von Henrich *et al.* etablierten prämotorischen Parkinsonmodells untersucht. Mithilfe stereotaktisch gesteuerter Injektion wurde hierbei einem Kollektiv von Mäusen mittels rAAV ein gewünschtes Gen in den Bereich des dorsalen Hirnstammes nahe der LC-Region injiziert. Die elektrophysiologischen Effekte der α -Syn-Oligomere wurden durch die Injektion von zwei Varianten des α -Syn-Gens geprüft. Auf diese Weise wurden eine Wildtyp-Variante des α -Syn (WT- α -Syn) und die stärker zur Aggregation neigende A53T-Variante des α -Syn transduziert. Als Kontrollgruppe wurde ein Kollektiv von Mäusen verwendet, dem das Gen des Proteins Luciferase (Luc) eingebracht wurde. Nach einer Latenz von acht Wochen wurden die Versuchstiere präpariert und die dabei angefertigten Hirnschnitte den elektrophysiologischen Messungen unterzogen. Dabei wurden wie im Rotenon-Modell unter Kapitel 3.1 beschrieben auch hier die Na_v - und K_v -Kanäle der gemessenen Zellen mittels TEA, 4-AP, TTX und Caesiumionen antagonisiert um die calciumabhängigen Ströme weitestgehend isoliert zu untersuchen. In diesem Kapitel werden die dabei aufgezeichneten Ergebnisse dargestellt und miteinander verglichen.

3.2.1 Veränderungen der spannungsabhängigen Calciumströme bei Überexpression von Wildtyp- α -Synuclein

Für das erste Telexperiment des hier untersuchten Modells, wurden zunächst die elektrophysiologischen Effekte nach Expression von WT- α -Syn mit denen nach Expression von Luc miteinander verglichen. Es hat sich dabei gezeigt, dass unter Expression von WT- α -Syn eine deutliche Reduktion der einwärtsgerichteten Ionenströme ableitbar ist. Analog zu den Messungen im Rotenon-Modell, wurde auch in diesem Experiment zunächst der maximale Einwärtsstrom der Zelle mittels eines rampenförmigen Klemmspannungsprotokolls erfasst und auf die Kapazität der Zelle normiert. Hier zeigte sich, dass der Maximalstrom der Neurone, die WT- α -Syn exprimiert hatten im Vergleich zu solchen mit Luc um im Mittel $3,57 \pm 0,45$ pA/pF abnahm. Dies entspricht einer relativen Reduktion des einwärtsgerichteten Maximalstroms um $23,12 \pm 2,92$ %.

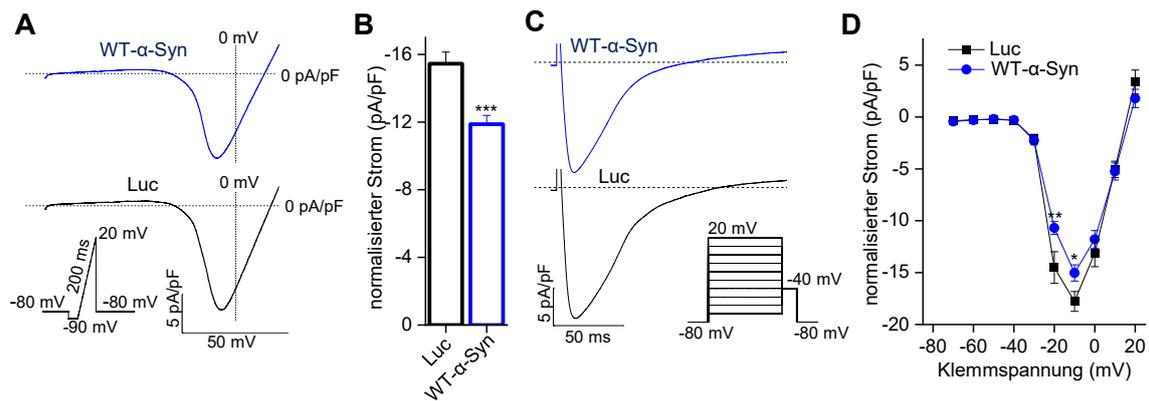


Abbildung 16: Bei Transduktion des WT- α -Syn-Gens zeigt sich nach achtwöchiger Latenz ein signifikant verminderter maximaler Calcium-Influx im Vergleich zur Luc-Kontrollgruppe

(A) Darstellung der arithmetisch gemittelten Einwärtsströme in Abhängigkeit der angelegten Klemmspannung nach Expression von Luc als Kontrolle (schwarze Kurve) und nach Expression von WT- α -Syn (blaue Kurve) bei Anwendung eines Spannungsprotokolls in Rampenform (siehe Darstellung links der gemittelten Stromabbildungen). **(B)** Die statistische Analyse zeigt eine signifikante Abnahme des einwärtsgerichteten Maximalstroms bei Anwendung des rampenförmigen Spannungsprotokolls um im Mittel $3,57 \pm 0,45$ pA/pF nach Expression von WT- α -Syn (blauer Balken) im Vergleich zur Messung nach Expression von Luciferase (schwarzer Balken) als Kontrolle ($n(\text{Luc}) = 14$, $n(\text{WT-}\alpha\text{-Syn}) = 28$). Die relative Reduktion des Maximalstroms beträgt $23,12 \pm 2,92$ %. **(C)** Darstellung der arithmetisch gemittelten Einwärtsströme im Zeitverlauf nach Expression von Luc als Kontrolle (schwarze Kurve) und nach Expression von WT- α -Syn (blaue Kurve) bei Anwendung eines Spannungsprotokolls in Form eines Potenzialschrittes von -80 mV zu -10 mV als repräsentativer Teilschritt eines mehrschrittigen Spannungsprotokolls (siehe Darstellung rechts der gemittelten Stromabbildungen). **(D)** Die Analyse der Strom/Spannungsbeziehung zeigt eine signifikante Abnahme der Calcium-Einwärtsströme nach Expression von WT- α -Syn für die Potenzialsprünge von -80 mV zu jeweils -20 mV und -10 mV ($n(\text{Luc}) = 14$, $n(\text{WT-}\alpha\text{-Syn}) = 28$) im Vergleich zu vergleichbaren Messungen nach Expression von Luc als Kontrolle.

Die dargestellten Daten repräsentieren arithmetische Mittelwerte \pm SEM.

n.s.: nicht signifikant; *: $P \leq 0,05$; **: $P \leq 0,01$; ***: $P \leq 0,001$

Anschließend wurde das ebenfalls bereits im Rotenonmodell angewendete inkrementelle Klemmspannungsprotokoll verwendet. Auch hier zeigte sich im direkten Vergleich erneut eine deutliche Reduktion der einwärts gerichteten Ionenströme nach Expression von WT- α -Syn. Diese Ionenstromreduktionen waren ausschließlich in den Spannungsschritten zu jeweils -20 mV und -10 mV statistisch signifikant. Die im Einzelnen gemessenen Teilschritte sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Teilschritt [-80 mV zu]	-20 mV	-10 mV
Signifikanzniveau [p-Wert]	0,009	0,041
$I_{\text{norm.}} \pm \text{SEM}$ Luc [pA/pF]	$-14,51 \pm 1,52$	$-17,77 \pm 0,96$
$I_{\text{norm.}} \pm \text{SEM}$ WT- α -Syn [pA/pF]	$-10,69 \pm 0,62$	$-15,03 \pm 0,78$

Tabelle 9: Signifikant reduzierte Ionenströme bei achtwöchiger Latenz nach Transduktion des WT- α -Synuclein-Gens im Vergleich zur Luc-Kontrollgruppe, Voltage-Clamp-Messungen im schrittförmigen Spannungsprotokoll

3.2.2 Veränderungen der spannungsabhängigen Calciumströme bei Überexpression von A53T- α -Synuclein

Im zweiten Telexperiment wurden nun die gemessenen neuronalen Ionenströme nach Expression von A53T- α -Syn mit denen der Luc-Kontrollgruppe verglichen. A53T- α -Syn ist eine besonders zur Aggregation und Oligomerisierung neigende Mutante des zuvor verwendeten WT- α -Syn, die unter anderem ihren eigenen proteasomalen Abbau verhindert (Cuervo *et al.*, 2004). Bei Anwendung des rampenförmigen Spannungsprotokolls zeigten LC-Neurone, denen A53T- α -Syn transduziert wurde, eine deutliche Reduktion ihrer einwärtsgerichteten Maximalströme im Vergleich zur Kontrollgruppe, der Luc transduziert wurde. Im Mittel wurde der abgeleitete Maximalstrom dabei um $3,77 \pm 0,52$ pA/pF reduziert, was einer relativen Reduktion um $24,39 \pm 3,38$ % entspricht.

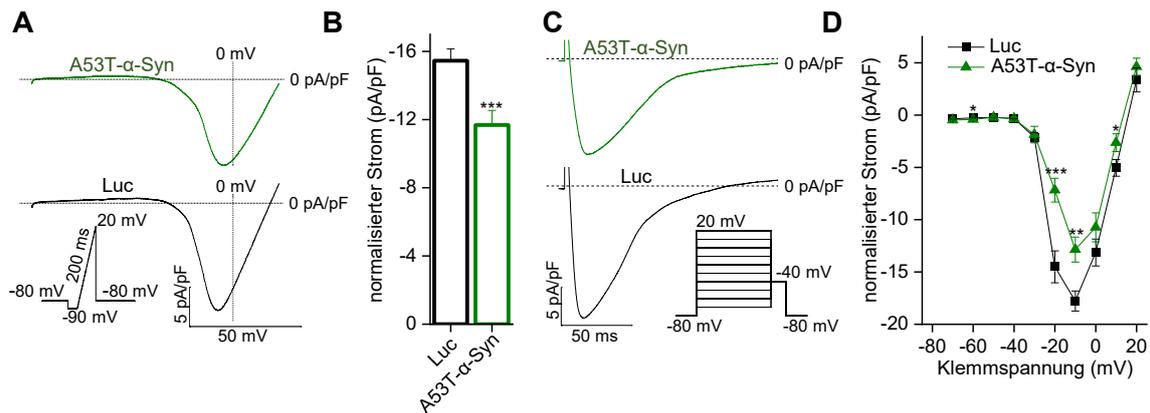


Abbildung 17: Bei Transduktion des A53T- α -Syn-Gens zeigt sich nach achtwöchiger Latenz ein signifikant verminderter maximaler Calcium-Influx im Vergleich zur Luc-Kontrollgruppe

(A) Darstellung der arithmetisch gemittelten Einwärtsströme in Abhängigkeit der angelegten Klemmspannung nach Expression von Luc als Kontrolle (schwarze Kurve) und nach Expression von A53T- α -Syn (grüne Kurve) bei Anwendung eines Spannungsprotokolls in Rampenform (siehe Darstellung links der gemittelten Stromabbildungen). **(B)** Die statistische Analyse zeigt eine signifikante Abnahme der maximalen Einwärtsströme bei Anwendung des rampenförmigen Spannungsprotokolls um im Mittel $3,77 \pm 0,52$ pA/pF nach Expression von A53T- α -Syn (grüner Balken) im Vergleich zur Messung nach Expression von Luc als Kontrolle (schwarzer Balken) ($n(\text{Luc}) = 14$, $n(\text{A53T-}\alpha\text{-Syn}) = 13$). Dies entspricht einer relativen Reduktion der maximalen Einwärtsströme um $24,39 \pm 3,38$ %. **(C)** Darstellung der arithmetisch gemittelten Einwärtsströme im Zeitverlauf nach Expression von Luc als Kontrolle (schwarze Kurve) und nach Expression von A53T- α -Syn (grüne Kurve) bei Anwendung eines Spannungsprotokolls in Form eines Potenzialschrittes von -80 mV zu -10 mV als repräsentativer Teilschritt eines mehrschrittigen Spannungsprotokolls (siehe Darstellung rechts der gemittelten Stromabbildungen). **(D)** Die Analyse der Strom/Spannungsbeziehung zeigt eine signifikante Abnahme der Calcium-Einwärtsströme nach Expression von A53T- α -Syn für die Potenzialsprünge von -80 mV zu jeweils -60 mV, -20 mV, -10 mV und 10 mV ($n(\text{Luc}) = 14$, $n(\text{A53T-}\alpha\text{-Syn}) = 13$) im Vergleich zu Messungen nach Expression von Luc als Kontrolle.

Die dargestellten Daten repräsentieren arithmetische Mittelwerte \pm SEM.

n.s.: nicht signifikant; *: $P \leq 0,05$; **: $P \leq 0,01$; ***: $P \leq 0,001$

Bei Anwendung des inkrementellen Klemmspannungsprotokolls zeigten sich nach Transduktion von A53T- α -Syn erneut Reduktionen der einwärtsgerichteten Ionenströme. Analog zu den vorbeschriebenen Telexperimenten, waren auch hier die deutlichsten und statistisch signifikanten Einbrüche in etwa ab der Aktivierungsschwelle der Ca_v -Kanäle erkennbar. Die im Einzelnen ermittelten Werte mit den zugehörigen Klemmspannungen sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Teilschritt	-60 mV	-20 mV	-10 mV	10 mV
[-80 mV zu]				
Signifikanzniveau [p-Wert]	0,023	0,001	0,004	0,048
$I_{\text{norm.}} \pm \text{SEM}$ Luc [pA/pF]	-0,42 \pm 0,06	-14,51 \pm 1,52	-17,77 \pm 0,96	-5,05 \pm 0,79
$I_{\text{norm.}} \pm \text{SEM}$ A53T- α -Syn [pA/pF]	-0,26 \pm 0,03	-7,18 \pm 1,13	-12,86 \pm 1,20	-2,63 \pm 0,85

Tabelle 10: Signifikant reduzierte Ionenströme bei achtwöchiger Latenz nach Transduktion des A53T- α -Syn-Gens im Vergleich Luc-Kontrollgruppe, Voltage-Clamp-Messungen im schrittförmigen Spannungsprotokoll

3.2.3 Vergleich der Effekte bei Überexpression der verschiedenen α -Synuclein-Varianten

Wie zuvor beschrieben konnte nach Transduktion beider α -Syn-Varianten eine deutliche Minderung der einwärtsgerichteten Ionenströme erfasst werden. Im direkten Vergleich konnte dabei ein zwar messbarer aber überwiegend statistisch insignifikanter Unterschied der Ionenstromreduktion durch die verschiedenen α -Syn-Varianten ermittelt werden. Dabei ist auffällig, dass sowohl bei Anwendung des rampenförmigen als auch des inkrementellen Klemmspannungsprotokolls eine etwas größere Stromreduktion nach Expression von A53T- α -Syn messbar war als bei WT- α -Syn. Bei Anwendung des inkrementellen Klemmspannungsprotokolls zeigten sich signifikant divergierende Differenzströme jeweils für die Spannungsschritte zu -60 mV und -20 mV. Abbildung 17 fasst die ermittelten Daten graphisch zusammen.

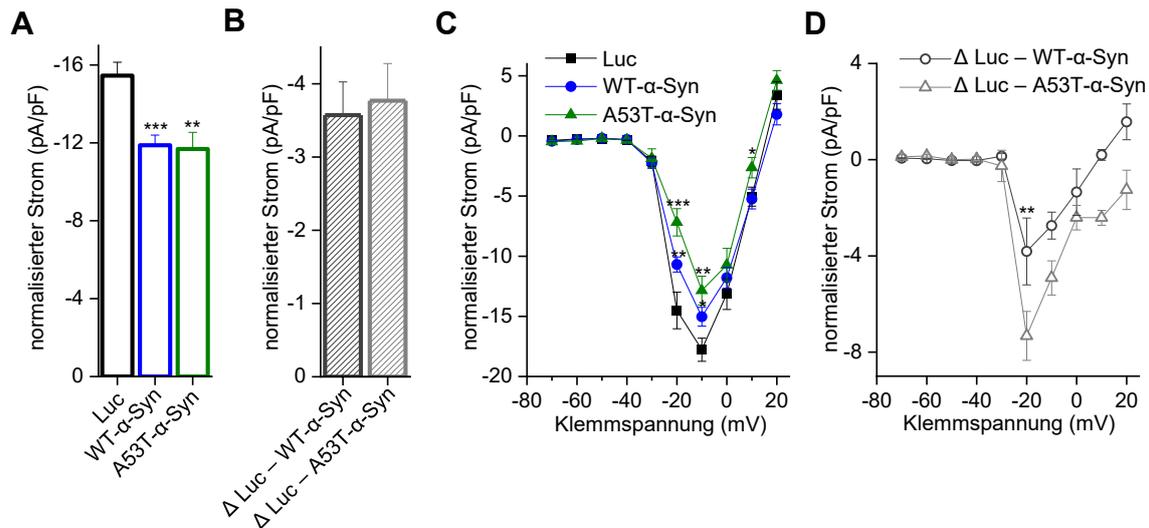


Abbildung 18: Vergleich der einwärtsgerichteten Ionenströme und Ionen-Differenzströme bei Überexpression der verschiedenen α -Syn-Varianten

(A) Die Ergebnisse aus den Abbildungen 15B und 16B sind hier zur Übersicht gemeinsam dargestellt. Abgebildet sind die arithmetisch gemittelten Einwärtsströme bei jeweils achtwöchiger Latenz nach Transduktion von Luc (schwarzer Balken, $n = 14$), WT- α -Syn (blauer Balken, $n = 28$) und A53T- α -Syn (grüner Balken, $n = 12$). Beide α -Syn-Varianten erzeugten eine signifikante Reduktion der maximalen einwärtsgerichteten Ströme bei Anwendung des rampenförmigen Spannungsprotokolls. **(B)** Zur besseren Vergleichbarkeit der jeweils gemessenen Ionenstromdifferenzen im rampenförmigen Spannungsprotokoll, sind hier die Differenzen der arithmetisch gemittelten maximalen Einwärtsströme zwischen der Luc-Kontrollgruppe und der jeweiligen α -Syn-Variante dargestellt. Im Mittel betrug der Differenzstrom zwischen Luc und WT- α -Syn $-3,57 \pm 0,45$ pA/pF (dunkelgrau schraffierter Balken, links abgebildet), während der mittlere Differenzstrom zwischen Luc und A53T- α -Syn bei $-3,77 \pm 0,52$ pA/pF lag (hellgrau schraffierter Balken, rechts abgebildet). Im direkten Vergleich zeigt sich, dass die errechneten Differenzströme statistisch nicht signifikant voneinander abweichen. **(C)** Analog zu Teilabbildung (A) sind hier die einzelnen arithmetisch gemittelten Messergebnisse für das inkrementelle Spannungsprotokoll noch einmal zusammen aufgeführt, so wie sie bereits in den Abbildung 15D und 16D dargestellt sind. Das jeweils abgebildete Signifikanzniveau bezieht sich dabei jeweils auf den statistischen Vergleich zwischen Luc-Kontrollgruppe (schwarze Kurve) mit WT- α -Syn (blaue Kurve) und A53T- α -Syn (grüne Kurve). **(D)** Um die ermittelten Ionenstromdifferenzen zwischen Luc-Kontrollgruppe und den α -Syn-Varianten vergleichbar zu machen, sind diese hier separat aufgeführt. Abgebildet ist die Strom-/Spannungsbeziehung für den jeweils gemessenen Klemmspannungsabschnitt für die Ionenstromdifferenz zwischen Luc-Kontrollgruppe und WT- α -Syn (dunkelgraue Kurve) sowie zwischen Luc-Kontrollgruppe und A53T- α -Syn (hellgraue Kurve). Statistisch signifikant divergieren dabei die Differenzströme für die Spannungsschritte zu -60 mV und -20 mV. Die dargestellten Daten repräsentieren arithmetische Mittelwerte \pm SEM. n.s.: nicht signifikant; *: $P \leq 0,05$; **: $P \leq 0,01$; ***: $P \leq 0,001$

4 Diskussion

Der LC ist auf komplexe Art und Weise in das Zusammenspiel des zentralen Nervensystems eingebunden. Als Teil des ARAS trägt er eine wesentliche Rolle bei der Vermittlung von Vigilanz, der Zirkadianik des Tag-Nacht-Rhythmus und der Modulation des REM-Schlafes. Auch bei höheren kortikalen Funktionen wie gezielter Aufmerksamkeit und der Aktivierung und Konsolidierung des Erinnerungsvermögens nimmt der LC eine zentrale Rolle ein (E. E. Benarroch, 2009; Espay *et al.*, 2014). Zahlreiche Studien der vergangenen Jahre beleuchten die Rolle des LC als eines der Kerngebiete, das im Rahmen der PD bereits in frühen Stadien ausgeprägten neurodegenerativen Prozessen unterworfen ist, häufig sogar noch vor Beteiligung der dopaminergen SNpc (Vermeiren & De Deyn, 2017). So zeigen sich die charakteristischen α -Synuclein-Oligomere, wie sie typischerweise in den cytosolisch auftretenden LB im Rahmen der PD auftreten, im LC ebenfalls bereits bevor dopaminerge Zentren beteiligt sind (Braak *et al.*, 2004).

Dementsprechend liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die frühe Beteiligung des LC für die vielfältigen und häufig unspezifischen Symptome der prodromalen PD eine wichtige Rolle spielt. Die vielfältigen Funktionen des LC werden vermutlich durch die von Matschke *et al.* beschriebene Schrittmacherfunktion der spannungsgesteuerten L- und T-Typ-Calciumkanäle in Zusammenspiel mit SK-Kanälen beeinflusst (Matschke *et al.*, 2015). Die neuronale Calciumhomöostase spielt jedoch nicht nur für die korrekte Funktionsweise dieser autonomen Schrittmacherzellen eine zentrale Rolle, sondern ist auch an vielen weiteren Prozessen wie der Signaltransduktion und Vermittlung der Apoptose beteiligt (Leandrou *et al.*, 2019).

Zwei zentrale Mechanismen, die für die Pathophysiologie der PD eine Rolle spielen können, wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht: die Dysregulation der neuronalen Calciumhomöostase durch oxidativ-metabolischen Stress einerseits sowie durch die charakteristisch auftretenden α -Syn-Oligomere andererseits. Die Effekte dieser Modelle auf das Verhalten der Ca_v -Kanäle wurden durch vorhergehende Arbeiten vor allem an dopaminergen Neuronen der SNpc untersucht. Diese Arbeit widmete sich den Auswirkungen an LC-Neuronen.

4.1 Selektive neuronale Vulnerabilität und regionspezifische Krankheitsprogression der Parkinson-Erkrankung

Seit das Stadienmodell der PD nach Braak *et al.* anhand der von LB betroffenen Hirnregionen postuliert wurde ist klar, dass das Verteilungsmuster von α -Syn nicht homogen ist. Man nahm zunächst an, dass die α -Syn-Aggregation nach Exposition zu einem bestimmten Antigen in den distalen Fasergebieten von N.olfactorius und N. vagus beginnt und sich von dort retrograd entlang axonaler Bahnen im zentralen Nervensystem ausbreitet (Braak *et al.*, 2003). Sobald die α -Syn-Oligomere die SNpc erreichen und dort infolge ca. 70 % der dopaminergen Neurone untergegangen sind, manifestiert sich die PD klinisch (Braak *et al.*, 2004; Del Tredici *et al.*, 2002).

Daten der nachfolgenden Jahre zeigten jedoch, dass es keine klare Korrelation zwischen α -Syn-Last und Ausprägungsgrad der klinischen PD gibt. Neuropathologische Auswertungen zeigten, dass es sowohl Patienten mit klinisch manifester PD ohne jedwede LB-Belastung des ZNS gibt, als auch Patienten die trotz hoher cytosolischer LB-Last bis zu ihrem Todeszeitpunkt keine Symptome entwickelt haben (Berg *et al.*, 2014). Das von Braak *et al.* vorhergesagte Verteilungsmuster konnte in diversen Studien histologisch bei nur etwa 50 % der Patienten mit klinischer PD nachgewiesen werden (Halliday *et al.*, 2012; Kalaitzakis *et al.*, 2008).

Neben der α -Synucleinopathie scheint es einen bestimmten zellulären Phänotyp zu geben, der besonders anfällig für degenerative Veränderungen ist. Zwei wesentliche Charakteristika treten dabei als besonders prädestinierend hervor:

- i) ein anspruchsvoller zellulärer Energiestoffwechsel und damit ein größeres Potential mitochondrieller Stresssituationen mit dem Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und
- ii) eine hohe cytosolische Calciumlast, wie sie besonders bei solchen Zellpopulationen vorkommt, die einer autonomen tonischen Entladung durch Ca_v -Kanäle unterliegen.

Die Schnittmenge der neuronalen Kerngebiete, die diese zwei Kriterien erfüllen und daher, die im Rahmen der PD von degenerativen Veränderungen betroffen sind, ist beachtlich. Dazu zählen beispielsweise der DMV, die pedunculopontinen Kerne und auch der in dieser Arbeit untersuchte LC (Goldberg *et al.*, 2012; Kang & Kitai, 1990; Sanchez-Padilla *et al.*, 2014).

4.2 Calcium, mitochondriale Dysfunktion und α -Synuclein als Mediatoren der Parkinson-Erkrankung

Der zelluläre Calciumhaushalt, die Funktionsweise der Mitochondrien und die im Rahmen der PD auftretenden α -Syn-Oligomere sind auf vielfältige Weise miteinander verzahnt. Dieses Kapitel gibt einen Überblick zum derzeitigen Kenntnisstand über die Interaktionen dieser drei für die Pathophysiologie der PD wichtigen Instanzen und ordnet die Ergebnisse dieser Arbeit in deren Kontext ein.

4.2.1 Dysfunktionaler Calciumhaushalt und eingeschränkte Mitochondrienfunktion

Eine physiologische Calciumhomöostase ist essenziell für das korrekte Zusammenspiel intra- und extrazellulärer Signaltransduktion, neuronaler Plastizität und mitochondrialer Funktionsfähigkeit. Das korrekte Verhältnis von cytosolischer und mitochondrialer Calciumkonzentration spielt darüber hinaus eine zentrale Rolle bei der Vermittlung der Apoptose durch das Caspasensystem (Smaili *et al.*, 2000).

Neurone, die eine intrinsische Schrittmacheraktivität zeigen, sind dafür oftmals auf die tonische Generation von Aktionspotenzialen durch Ca_v -Kanäle angewiesen. Die Regelmäßigkeit der dabei auftretenden transmembranären Calciumströme bedeutet für den Ionenhaushalt der Zelle ein erhöhtes Risiko der cytosolischen Calciumüberladung. Neueren Studien zufolge haben diese Calciumüberladung und der energetische Mehraufwand der davon betroffenen Neurone potenziell mehrere Prozesse zur Folge, die für die Entstehung der PD eine Rolle spielen können. Durch die erhöhten Calciumspiegel autonomer Schrittmacherneurone kommt es Ca_v1 -vermittelt zu einer ausgeprägten *feed-forward* Aktivierung der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien. Dieser Prozess ist grundsätzlich physiologisch und passt die mitochondriale ATP-Generation an den aktuellen Energiebedarf der Zelle an. Mit steigendem Energieumsatz der Mitochondrien steigt jedoch das Risiko retrograder Elektronenflüsse über die Elektronentransporter der Atmungskette, sodass vermehrt reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS und RNS) im Cytosol entstehen, die ihrerseits wichtige zelluläre Moleküle schädigen können. Insbesondere neuronale Zentren mit ausgeprägten und langen axonalen Verzweigungen, wie beispielsweise SNpc und LC, scheinen davon betroffen zu sein (Berridge *et al.*, 2000; Pacelli *et al.*, 2015; Surmeier *et al.*, 2017). Eine so entstehende mitochondriale Dysfunktion kann die bestehende Calciumdysbalance noch aggravieren, da neben dem

endoplasmatischen Retikulum (ER) auch Mitochondrien eine wesentliche Rolle als zelluläre Calciumspeicher und Puffer einnehmen (Xu *et al.*, 2016).

Eine solche oxidativ-metabolische Stresssituation erzeugt das im Rahmen dieser Arbeit angewendete Insektizid Rotenon, indem es Komplex I der mitochondrialen Atmungskette antagonisiert (Freestone *et al.*, 2009; Sherer *et al.*, 2003). Xiong *et al.* hatten im vergangenen Jahrzehnt deutliche parkinsonoide Zellpathologien und einen progredienten Zellverlust nach Rotenonexposition zunächst an dopaminergen SNpc-Neuronen nachweisen können. Ähnliche Veränderungen konnten in einer weiteren Studie auch an den noradrenergen Neuronen des LC aufgezeigt werden (Chaves *et al.*, 2010). Interessanterweise erzeugt Rotenon dabei offenbar nicht bloß Effekte auf Ebene der Atmungskette, sondern induziert über noch unbekannte Wege auch die Aggregation von α -Syn-Oligomeren in LB (Xiong *et al.*, 2012).

Unbeantwortet blieb bisher die Frage nach den Veränderungen der Ionenströme über Ca_v -Kanäle des LC nach Rotenonexposition. Diese Arbeit konnte bestätigen, dass auch Neurone des LC nach Rotenonexposition einer ausgeprägten Reduktion der einwärtsgerichteten Calciumströme unterliegen. Dieser Effekt war sowohl nach zweistündiger Inkubation als auch nach fünfminütiger Perfusion mit jeweils 1 μ M-Rotenonlösung deutlich messbar. Dass eine signifikante Reduktion spannungsabhängiger Calciumströme bereits nach so kurzfristiger Exposition ableitbar ist, legt die Vermutung einer schnellen Wirkungskinetik von Rotenon im *in-vitro*-Modell nahe. Dies lässt sich am ehesten durch ein Zusammenspiel aus Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Speichersystemen wie ER und Mitochondrien und einem verstärkten Influx extrazellulärer Calciumionen erklären. Mehrere Gesichtspunkte scheinen hierbei plausibel zu sein:

- i) Eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration könnte für eine signifikante Verringerung des transmembranären elektrochemischen Gradienten verantwortlich gemacht werden (Yuan *et al.*, 2015).
- ii) Das durch Rotenon erhöhte Membranpotential hat zur Folge, dass sich eine signifikante Menge von Ca_v -Kanälen für längere Zeit in spannungsabhängig inaktiviertem Zustand befindet und somit die Amplitude der einwärtsgerichteten Calciumströme verringert wird. Da α -Syn ebenfalls Substrat des für die Aktivität der Ca_v -Kanäle wichtigen regulatorischen Proteins Calmodulin ist, ist eine verlängerte Inaktivierungszeit zusätzlich durch den Einfluss von α -Syn denkbar (Lee *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2003; Simms & Zamponi, 2014).

iii) Letztlich sind auch die durch Rotenon eingeschränkte zelluläre Homöostase und der zelluläre Energiestoffwechsel als mögliche Einflussfaktoren der beobachteten veränderten Calciumstromkinetik relevant.

Nach Blockade der nach Rotenonexposition ableitbaren Restströme mit CoCl_2 verblieb eine restliche einwärtsgerichtete Stromkomponente. Dies legt die Vermutung nahe, dass neben den Kanälen der Ca_v -1-Familie noch weitere Ionenkanäle an der Restleitfähigkeit nach Rotenonexposition beteiligt sind.

4.2.2 Beziehung zwischen Calciumdysbalance und α -Synuclein-Aggregation

Dysbalancen der zellulären Calciumhomöostase und α -Syn-Aggregation beeinflussen sich ebenfalls wechselseitig (Budd & Nicholls, 1998; Gupta *et al.*, 2009). α -Syn, ein 140 Aminosäuren umfassendes, alpha-helikal strukturiertes Protein, ist soweit bisher verstanden an der synaptischen Freisetzung von Vesikeln mittels des SNARE-Komplex beteiligt (Bendor *et al.*, 2013). In Studien der vergangenen Jahre hat sich gezeigt, dass der erhöhte intrazelluläre Calciumspiegel auch eine messbar erhöhte Anzahl cytosolischer α -Syn-Aggregate zur Folge hat. Der genaue Mechanismus hinter diesem Zusammenhang ist bisher noch unbekannt (Follett *et al.*, 2013; Nath *et al.*, 2011).

Neben den oben beschriebenen Zellorganellen dienen auch diverse zelluläre Proteine als Puffersysteme der cytosolischen Calciumkonzentration. Eines dieser Proteine ist Calmodulin, das wesentlich an der calciumabhängigen Signaltransduktion beteiligt ist und unter anderem die Inaktivierung der Ca_v -Kanäle vermittelt. Schon seit längerem ist bekannt, dass Calmodulin bei Calciumbindung eine verstärkte α -Syn-Aggregation induziert (Lee *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2003). Calbindin, ein weiteres neuronal vorkommendes Protein mit cytosolischer Pufferfunktion für den Calciumhaushalt, hat ebenfalls einen nachweisbaren Einfluss auf die α -Syn-Aggregation. Rcom-H'cheo-Gauthier *et al.* stellten mithilfe des Rotenonmodells fest, dass es ausschließlich in solchen Zellpopulationen zu LB-Formation kam, die Calbindin-negativ waren (Rcom-H'cheo-Gauthier *et al.*, 2016). Auch eine direkte Interaktion zwischen cytosolischen Calciumionen und α -Syn ist beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass eine Bindung von Calciumionen an α -Syn den Sekundärstrukturwechsel des Proteins von alpha-Helix zu beta-Faltblatt wesentlich beschleunigt und damit eine Propagation der α -Syn-Aggregation ausgelöst werden kann (Han *et al.*, 2018). Die Datenlage legt nahe, dass auch hier die eingeschränkte Calciumhomöostase wesentlich zur Krankheitsprogression beiträgt.

Umgekehrt scheint auch das Vorkommen von α -Syn einen Einfluss auf den zellulären Calciumhaushalt zu haben. Es gibt beispielsweise Hinweise auf einen direkten Einfluss von α -Syn auf die Membranpermeabilität betroffener Neurone, die wiederum eine erhöhte intrazelluläre Calciumlast zur Folge hätte (Angelova *et al.*, 2016). Ebenso haben jüngere Studien eine direkte Interaktion zwischen α -Syn und der an der ER-Membran lokalisierten SERCA-Pumpe als zugrundeliegenden Mechanismus nahegelegt (Betzer *et al.*, 2018).

Der Einfluss von α -Syn auf spannungsabhängige Calciumströme wurde im Rahmen dieser Arbeit mithilfe des von Henrich *et al.* etablierten prämotorischen *in-vivo*-Modells der Maus erfasst. Die Ergebnisse der Voltage-Clamp-Messungen zeigen eine deutliche, statistisch signifikante Abnahme der einwärtsgerichteten Ionenströme unter Einfluss von α -Syn. Diese Messergebnisse korrelieren gut mit den eben dargestellten Forschungsdaten und deuten auf eine erhöhte cytosolische Calciumlast unter Einfluss von α -Syn hin, welche sich wie dargestellt am ehesten durch die eingeschränkte zelluläre Homöostase erklären lässt und somit zusätzlich den elektrochemischen Gradienten für Calciumströme nach intrazellulär wesentlich einschränkt. Weiterhin ist nicht außer Acht zu lassen, dass im Rahmen der Experimente dieser Arbeit nicht alle ionotropen Rezeptoren mit einwärtsgerichteter Stromkomponente antagonisiert werden konnten. Darüber hinaus sind Ionenkanäle der TRP-Familie von Interesse und möglicherweise wesentlich für die gemessenen Differenzströme verantwortlich.

Um nachzuweisen, ob die Kinetik der Aggregation einen Einfluss auf die Calciumhomöostase hat, wurden eine WT-Variante des α -Syn und eine stärker zur Oligomerisierung neigende Mutante des α -Syn (A53T) zur Expression gebracht. Es zeigte sich, dass A53T- α -Syn tatsächlich eine etwas ausgeprägtere Reduktion der einwärtsgerichteten Ionenströme auslösen konnte. Diese Differenz war zwar messbar statistisch jedoch nicht signifikant.

4.2.3 Beziehung zwischen α -Synuclein-Aggregation und mitochondrialer Dysfunktion

Der Einfluss von ROS und RNS – die wie oben beschrieben durch mitochondrielle Dysfunktion auftreten können – wird neben neuroinflammatorischen Prozessen als wesentlicher Faktor zur Entstehung cytosolischer α -Syn-Oligomere beschrieben. Jüngeren Studien zufolge gibt es außerdem Hinweise, dass α -Syn regulatorisch in die Aktivität der mitochondrialen ATP-Synthase eingebunden ist (Ludtmann *et al.*, 2016). Im Rahmen der PD fallen in betroffenen Regionen, wie der SNpc und dem LC, fehlgefaltete α -Syn-

Oligomere an, die im Verlauf zu beta-Faltblattstrukturen aggregieren und zellulär nicht eliminiert werden können. Der lysosomale Abbau dieser Oligomere ist durch bisher nicht gänzlich verstandene Prozesse eingeschränkt und auch die Proteolyse durch das Ubiquitin-Proteasom-System ist – am ehesten im Rahmen der eingeschränkten mitochondrialen Funktion – deutlich reduziert (Nagley *et al.*, 2010).

Die auch im Rahmen dieser Arbeit untersuchte α -Syn-Mutante A53T zeigte in einer Studie von Xie *et al.* in mehrerer Hinsicht Einfluss auf Funktion und Integrität der neuronalen Mitochondrien. Dabei ist besonders interessant, dass neben Einschränkungen des Elektronentransportes in der Atmungskette auch die mitochondrialen Fusions- und Teilungsprozesse der untersuchten Neurone erheblich eingeschränkt waren. Untersucht wurden dabei dopaminerge Neurone von SNpc und VTA, zwei neuronale Kerngebiete mit verschiedenen Mechanismen der autonomen Entladung. Das ist deshalb relevant, weil sich die nach A53T-Expression eingeschränkte Mitochondrienfunktion in SNpc-Neuronen durch Isradipin umkehren ließ, nicht aber in VTA-Neuronen (Xie & Chung, 2012). In Neuronen der SNpc werden autonome Schrittmacherpotenziale durch $Ca_v1.3$ -Kanäle generiert während VTA-Neurone dafür vor allem auf Na_v -Kanäle angewiesen sind (Guzman *et al.*, 2009; Khaliq & Bean, 2010).

In einer jüngeren Studie von Lieberman *et al.* konnten diese Effekte reproduziert und erneut mit Ca_v -Kanälen der L-Typ-Familie assoziiert werden. Eine Dysregulation der mitochondrialen Calciumhomöostase und damit nachgeschaltete Pathologien der Atmungskette werden von den Autoren als Erklärung genannt. Interessanterweise konnte mittels Isradipin ein Stabilisierungseffekt erreicht werden, der etwa dem protektiven Effekt in einem α -Syn-Knockout-Modell der Maus entsprach. Wurden Neurone der α -Syn-defizienten Mäuse noch zusätzlich Isradipin ausgesetzt, ließ sich allerdings keine weitere Verbesserung darstellen (Lieberman *et al.*, 2017).

Wie bereits dargestellt legen auch die im Rahmen dieser Arbeit aufgezeichneten Daten eine deutlich erhöhte intrazelluläre Calciumlast unter Einfluss von α -Syn nahe. Unklar bleibt jedoch noch immer ob bei der Pathogenese der PD dysfunktionale Calciumhomöostase, mitochondriale Dysfunktion oder α -Syn-Aggregate den jeweils ersten Schritt darstellen.

4.3 Pharmakologische Modulation neuronaler Ionenkanäle als möglicher Therapieansatz der PD

Matschke *et al.* haben gezeigt, dass sich in Folge der zunehmenden Calciumdysbalance die Frequenz der autonomen Schrittmacherpotenziale betroffener LC-Neurone maßgeblich senkt. Dieser Effekt ist interessanterweise umkehrbar durch die gezielte Aktivierung calciumaktivierter Kaliumkanäle der SK-Familie, die wesentlich zur Regulation der Schrittmacheraktivität des LC sowie zur Repolarisation der Zelle beitragen (Matschke *et al.*, 2018). Es ist also eine berechtigte Annahme, dass auch durch eine Modulation seitens der Ca_v -Kanäle eine Stabilisierung des Zellstoffwechsels erreicht werden könnte. Entsprechende Studien zum Effekt von Calciumkanalantagonisten vom Nifedipin-Typ sind bereits seit einiger Zeit publiziert und zeigen tatsächlich solche stabilisierenden Effekte an SNpc-Neuronen (Guzman *et al.*, 2018; Sanchez-Padilla *et al.*, 2014). Matschke *et al.* konnten ähnliche Effekte auch mittels Isradipin an LC-Neuronen nachweisen, wobei eine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung früherer Studien belegt werden konnte.

In den vergangenen Jahren wurden diverse Pharmaka mit antagonistischer Wirkung an Ca_v -Kanälen verschiedener Subfamilien hinsichtlich ihrer Wirkung in Modellen der PD getestet. Als Beispiel seien die Dihydropyridine Nifedipin, Nimodipin und Isradipin genannt (L-Typ Ca_v -Kanäle), aber auch Mifebradil (L- und T-Typ Ca_v -Kanäle) und die natürlich vorkommenden Gifte ω -Conotoxin (N-Typ Ca_v -Kanäle) und ω -Agatoxin (P/Q-Typ Ca_v -Kanäle) (Leandrou *et al.*, 2019). In unterschiedlichen Ausprägungen konnte für die meisten dieser Pharmaka eine neuroprotektive Funktion in den getesteten Modellen nachgewiesen werden.

4.4 Methodische Gesichtspunkte der Arbeit

Das Mesencephalon ist ein komplexes Konstrukt verschiedener auf- und absteigender Leitungsbahnen und distinkter Kerngebiete auf anatomisch kleinem Raum. Der LC ist als Teil des pontinen Tegmentums von entsprechend vielen dieser Strukturen umgeben, sodass eine wesentliche Herausforderung dieser Arbeit war, die korrekte Region in den angefertigten Hirnschitten ausfindig zu machen. Die Identifikation der Hirnregion erfolgte zunächst makroskopisch anhand der typischen Lokalisation in den lateralen Winkelbereichen des vierten Ventrikels. Matschke *et al.* konnten in aufgezeichneten Messungen hinreichend Erfahrung mit der mikroskopischen Identifikation der LC-Neurone sammeln. Die dabei mittels Patch-Clamp aufgezeichneten Daten zeigten ein charakteristisches elektrophysiologisches Verhalten, dass sich deutlich vom Entladungsmuster

umgebender Kerngebiete, wie etwa den cholinergen dorsolateralen Kernen oder dem glutamatergen *Ncl. mesencephalicus nervi trigemini*, unterscheidet (Sharma *et al.*, 2010). Zur Lageverifikation wurden im Rahmen vorhergehender Arbeiten immunhistochemische Färbungen der gemessenen Neurone mittels Neurobiotin und Antikörpern gegen α -Syn und TH, einem Schlüsselenzym der Dopamin- und Noradrenalin synthese, durchgeführt. Die korrekte Identifikation des LC kann zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit daher als innerhalb der Arbeitsgruppe etabliert gelten.

4.4.1 Das Patch-Clamp-Verfahren und seine Limitationen

Das von Neher und Sakmann entwickelte Patch-Clamp-Messverfahren wurde, als wichtigste Methode zur Aufzeichnung der zellulären Ionenströme, für diese Arbeit verwendet. Durch technische Innovationen wie automatische Kapazitätskorrekturen in nachgeschalteten Verstärkern wurde die Genauigkeit des Messverfahrens über die Jahre deutlich optimiert (Kornreich, 2007).

Ein wesentlicher Nachteil des Patch-Clamp-Verfahrens ist, dass damit lediglich einzelne Zellen hinsichtlich ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften untersucht werden können. Innerhalb der Kerngebiete des Zentralnervensystems gibt es oftmals diverse Subpopulationen von Neuronen, die untereinander mittels Tight-Junctions oder Synapsen kommunizieren. Auch für den LC sind Subpopulationen verschiedener Neurone beschrieben worden (Schwarz & Luo, 2015). Die elektrophysiologischen Interaktionen von ganzen Zellverbänden können mittels Patch-Clamp-Technik nicht abgeleitet werden.

Im Rahmen der Messvorbereitungen werden die zur Messung benötigten Glaspipetten mithilfe eines Pipettenziehgerätes selbst aus Borosilikatkapillaren gefertigt. Der Herstellungsprozess der dabei gefertigten Messpipetten wird vor Messbeginn anhand des Öffnungswiderstands der Kapillare und nach optischen Richtlinien unter dem Mikroskop begutachtet. Eine gleichbleibend hohe Qualität der dabei erstellten Messpipetten zu erzielen ist dabei nicht immer trivial und als potenzielle systematische Fehlerquelle anzusehen.

Die zweidimensionale Projektion des zur Darstellung der Zellen verwendeten Mikroskops lässt oftmals nur schwer einschätzen, wie tief im angefertigten Schnitt sich das gemessene Neuron befindet. Dadurch könnte es grundsätzlich zu Schwankungen der Exposition der Neurone zu den verwendeten Pharmaka kommen, da tiefer im Schnitt gelegene Zellen eine entsprechend längere Diffusionsstrecke zum Lösungsmedium umgibt.

4.4.2 Das α -Syn-Überexpressionsmodell

Um die Effekte von α -Syn auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der LC-Neurone zu untersuchen, war ein gezieltes Einbringen der dafür benötigten Gene in das Mesencephalon der Versuchstiere nötig. Zu diesem Zweck kam das von Henrich *et al.* etablierte prämotorische Mausmodell zum Einsatz. Durch einen stereotaktisch gesteuerten Injektor wurde den Versuchstieren dafür mittels rAAV das jeweils gewünschte Gensegment eingebracht. Neben dem bereits getesteten A53T- α -Syn wurde einer weiteren Kohorte WT- α -Syn verabreicht, um den Einfluss unterschiedlich stark zur Aggregation neigender Varianten des α -Syn auf das elektrophysiologische Verhalten der LC-Neurone zu untersuchen. Um auszuschließen, dass durch den Injektionsprozess oder die Expression eines kodierenden Genabschnittes an sich schon elektrophysiologische Veränderungen ausgelöst werden, wurde einer Kontrollkohorte das Gen für das Protein Luc verabreicht. In einer vergangenen Veröffentlichung konnte mithilfe dieses Modells eine ausgeprägte Expression von A53T- α -Syn erzeugt werden (Henrich *et al.*, 2018).

Die Kollegen der Klinik für Neurologie der Philipps-Universität Marburg um Henrich *et al.* führten die nötigen Injektionen auch für diese Arbeit durch.

4.5 Ausblick

Neurodegenerative Erkrankungen wie die PD verlaufen oftmals über lange Zeiträume ohne klinische Symptome, während molekularpathologisch unlängst der Krankheitsprozess im Gange ist. Zum Zeitpunkt der Erstmanifestation typischer klinischer Symptome der PD sind bereits mehr als 40-60 % dopaminerger SNpc-Neurone untergegangen, ein noch größerer Anteil weist zu diesem Zeitpunkt bereits dysfunktionale Axone auf (Burke & O'Malley, 2013; Cheng *et al.*, 2010).

Eine rechtzeitige krankheitsmodulierende Therapie ist also nur dann möglich, wenn Risikopatienten rechtzeitig als solche identifiziert werden können. Dazu bedarf es der Entwicklung geeigneter Screeningmethoden, sowohl klinischer als auch labordiagnostischer und potenziell radiologischer Natur. Klinische Diagnostik- und Handlungsempfehlungen werden dazu in regelmäßigen Abständen revidiert und an den derzeitigen Kenntnisstand angepasst (Postuma *et al.*, 2015). Unlängst wird beispielsweise auch an einer Vielzahl möglicher Biomarker geforscht, die zukünftig zur rechtzeitigen Erkennung einer prodromalen PD beitragen können (Lotankar *et al.*, 2017).

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass unabhängig vom verwendeten Modellsystem wesentliche Veränderungen des elektrophysiologischen Verhaltens betroffener Neurone bei der PD auftreten. Dabei wurde der Fokus dieser Arbeit auf die Ca_v -Kanäle gelegt, die für die gestörte zelluläre Calciumhomöostase der LC-Neurone eine wesentliche Rolle spielen. Ionenkanäle sind bereits seit langem gut etablierte Zielstrukturen für die Pharmakotherapie einer Erkrankung und zahlreiche Daten belegen krankheitsmodulierende Eigenschaften durch Ca_v -Kanalspezifische Pharmaka (Leandrou *et al.*, 2019). Es liegt nahe weiter nach Substanzen zu forschen, die über gezielte Modulation des Oszillationsverhaltens der LC-Neurone zu einer Stabilisierung des zellulären Calciumhaushalts und damit zu einer Verringerung calciuminduzierter Zytotoxizität beitragen. Im Rahmen der Experimente dieser Arbeit ist in beiden Modellsystemen eine nicht-calciumspezifische Reststromkomponente messbar gewesen. Von besonderem Interesse könnten zukünftig neben den hier fokussierten Ca_v -vermittelten Ionenströmen auch weitere Ionenkanaltypen, wie beispielsweise die TRP-Ionenkanäle, sein.

Die drei wesentlichen pathophysiologischen Prozesse auf neuronaler Ebene stellen sich nach aktuellem Kenntnisstand als dysregulierte Calciumhomöostase, oxidativ-metabolischer Stress durch mitochondrielle Dysfunktion und zunehmende Aggregation von α -Syn-Oligomeren dar. Bisher bleibt unklar welcher dieser drei Faktoren die fortschreitende Pathologie initial anstößt (Andersen, 2004). Zukünftige Arbeiten könnten beispielsweise mithilfe von Knockout-Modellen bekannter neuroprotektiver Genabschnitte prüfen, ob sich eine deutliche Tendenz zur Initiation eines dieser drei Risikofaktoren darstellen lässt.

5 Zusammenfassung und Summary

5.1 Zusammenfassung

Der *Locus coeruleus* (LC) ist ein noradrenerger Kern des dorsolateralen Hirnstammes, der auf vielfältige Weise in die physiologischen Prozesse des zentralen Nervensystems eingebunden ist. Eine funktionelle Beeinträchtigung dieses Kerngebietes lässt sich bei vielen neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen oftmals bereits in frühen Stadien beobachten, sodass der LC sowohl aus diagnostischer als auch therapeutischer Sicht von großem Interesse ist. Im Rahmen der Parkinson-Erkrankung (PD; auch Morbus Parkinson), kommt es durch degenerative Veränderungen der dopaminergen Neurone der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc) zu den charakteristischen Kardinalsymptomen der Erkrankung. Die Neurone des LC sind im Rahmen der PD jedoch bereits vor den Neuronen der SNpc vom Zelluntergang betroffen. Der progrediente Verlust der noradrenergen Neurone des LC wird für viele der nichtmotorischen Symptome der PD verantwortlich gemacht. Darüber hinaus wird in Bezug auf die SNpc eine neuroprotektive Funktion der Neurone des LC angenommen. Die Ursachen für die Beteiligung des LC und dessen selektive Vulnerabilität im Rahmen der PD sind bisher jedoch weitestgehend ungeklärt.

Die Neurone des LC zeichnen sich durch eine ausgeprägte Periodik ihrer Depolarisationen aus, um eine regelmäßige Freisetzung von Noradrenalin (NA) zu ermöglichen. Diese Schrittmacheraktivität wird maßgeblich durch spannungsabhängige Calciumkanäle gewährleistet. Es hat sich gezeigt, dass dieses charakteristische Entladungsverhalten der LC-Neurone im Rahmen der PD zugunsten einer erhöhten Depolarisationsfrequenz verschoben ist. Die dadurch erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration, oxidativer Stress sowie die charakteristischen alpha-Synuclein-Aggregate in den betroffenen Zellen wurden als mögliche Faktoren der Pathogenese der PD postuliert. Die Stabilisierung der zellulären Calciumhomöostase könnte daher einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf der PD bewirken.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss zweier Modelle der PD auf die elektrophysiologischen Eigenschaften spannungsabhängiger Calciumströme in Neuronen des LC untersucht.

Im ersten untersuchten Modellsystem wurden Hirnschnitte von Wildtyp-Mäusen (C57/Bl6) angefertigt und für eine definierte Inkubationszeit der Substanz Rotenon ausgesetzt. Rotenon, eine Substanz die vor allem als Insektizid Verwendung findet, blockiert

den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette und erzeugt somit eine oxidative und metabolische Stresssituation für die betroffenen Zellverbände, wie sie auch im Rahmen der PD zu beobachten ist. Mithilfe der Substanzen Tetrodotoxin (TTX), Tetraethylammonium (TEA) sowie 4-Aminopyridin (4-AP) wurde die pharmakologische Antagonisierung der spannungsabhängigen Natrium- und Kaliumkanäle der untersuchten Zellen ermöglicht, sodass die Calciumströme der untersuchten Neurone anschließend näherungsweise isoliert dargestellt werden konnten. Einzelzellaufnahmen dieser Neurone mithilfe der Patch-Clamp-Methode haben ergeben, dass die Amplitude der ins Cytosol gerichteten Calciumströme nach Einwirkung von Rotenon mitunter signifikant abnimmt. Eine anschließend erfolgte Antagonisierung der spannungsabhängigen Calciumkanäle mittels einer hochdosierten Cobalt(II)-Chlorid-Lösung (CoCl_2) konnte den erhaltenen Calciuminflux zwar signifikant senken, jedoch nicht vollständig blockieren. Die resultierende Reststromkomponente wird somit offenbar von Kanalsystemen getragen, die nicht cobaltspezifisch antagonisiert werden können.

Im Rahmen des zweiten untersuchten Modellsystems wurde der Einfluss der für PD typisch auftretenden alpha-Synuclein-Aggregate auf die elektrophysiologischen Eigenschaften spannungsabhängiger Calciumströme der LC-Neurone untersucht. Zu diesem Zweck wurde einem Kollektiv von Wildtyp-Mäusen (C57/Bl6) zu definierten Zeitpunkten stereotaktisch ein viraler Vektor unilateral in den Bereich der dorsolateralen Pons injiziert. Die Versuchstiere wurden in drei verschiedene Kohorten randomisiert, welchen dabei jeweils entweder das Gen eines Wildtyp-alpha-Synucleins, das Gen einer stark zur Aggregation neigenden Mutante des alpha-Synucleins (A53T-alpha-Synuclein) oder das Gen des Proteins Luciferase mittels eines viralen Vektorsystems transduziert wurde. Letztere Kohorte diente als Kontrollgruppe. Nach einer zweimonatigen Latenzzeit wurden Einzelzellaufnahmen des LC an Hirnschnitten der Versuchstiere durchgeführt, nachdem auch hier die spannungsabhängigen Natrium- und Kaliumkanäle der untersuchten Zellen mittels TTX, TEA und 4-AP antagonisiert wurden. Analog zu den Ergebnissen des ersten Untersuchungsmodells, zeigte sich nach Überexpression beider alpha-Synuclein-Varianten auch hier ein signifikant gesenkter Calciuminflux.

Als Ursache des verminderten Ioneneinstromes kommt im Rahmen beider Modellsysteme eine intrazelluläre Calciumüberladung infrage, welche beispielsweise durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern sowie die erhöhte Oszillationsfrequenz der Neuronen des LC entsteht. Die gezielte pharmakologische Modulation spannungsabhängiger Calciumkanäle der LC-Neurone, kommt demnach als möglicher therapeutischer Ansatz im Rahmen der PD infrage.

5.2 Summary

The *Locus coeruleus* (LC) is a noradrenergic nucleus of the dorsolateral brainstem, that is an integral part of the electrophysiological processes of the central nervous system. Functional impairment of this region can be detected in various neurological and psychiatric disorders, oftentimes even in early stages, so that the LC is of great diagnostic and therapeutic interest. In the pathogenesis of Parkinson's disease (PD), dopaminergic neurons of the *Substantia nigra pars compacta* (SNpc) gradually degenerate, leading to the characteristic motor symptoms of this chronic neurological disorder. Neurons of the LC are affected by neurodegeneration even before the SNpc. The progredient loss of the noradrenergic LC-neurons is discussed as one of the main reasons for the non-motor symptoms of PD. Furthermore, neurons of the LC seem to modify the electrophysiological properties of the SNpc in a way that is actually neuroprotective. Causes for the progredient degeneration and selective vulnerability of the LC are mostly unknown though.

In order to ensure a steady release of noradrenalin (NA), LC-neurons are characterized by a distinct periodicity of their depolarisations. The underlying pacemaking mechanisms of the LC are primarily relying on voltage-dependent calcium channels. Previous studies have shown that neurons of the LC show a higher frequency of depolarisations within the course of PD. The resulting rise in intracellular calcium concentration, as well as oxidative stress and the characteristic alpha-synuclein aggregates in the cytosol of the affected cells, have been suggested as possible factors of the pathogenesis of PD. Stabilizing the properties of cellular calcium-homeostasis might therefore have positive effects on the progression of PD.

This thesis investigated the influence of two different experimental models of PD on the electrophysiological properties of voltage-dependent calcium currents of the LC.

The first experimental model evaluated brain slices of wildtype-mice (C57/Bl6), that were previously incubated in a solution of rotenone for a predefined time period. Rotenone, a substance best known for its use as an insecticide, inhibits complex I of the mitochondrial chain of oxidative phosphorylation, hence causing a situation of oxidative and metabolic cellular stress as it is also observed in cells that are affected by PD. In order to isolate the calcium currents of the inspected cells, Tetrodotoxin (TTX), Tetraethylammonium (TEA) and 4-Aminopyridine (4-AP) were utilized as pharmacological antagonists of voltage-dependent sodium- and potassium channels. The calcium-currents of these neurons were then recorded, utilizing the patch-clamp method in whole-cell configuration. The results of these recordings have shown a significant reduction in amplitude of the inward

calcium-currents in the rotenone-group. The samples of the rotenone-group were then perfused with a highly concentrated cobalt(II)-chloride-solution in order to antagonize the remaining calcium-currents. Although the inward calcium-currents could be significantly reduced by this procedure, they could not be totally blocked, suggesting the existence of a subset of calcium-channels insensitive to cobalt-specific antagonization. The remaining component of the current therefore seems to be insensitive to cobalt-specific antagonization, suggesting that either another subset of voltage-dependent calcium-channels or for example TRP-channels might play an additional role in that regard.

The second experimental model evaluated the electrophysiological influence of cytosolic alpha-synuclein-aggregates as they typically appear in LC-neurons of patients with PD, with a focus on possible variations of voltage-dependent calcium-currents. To accomplish this, three randomized groups of wildtype-mice (C57/Bl6) were unilaterally injected with a viral vector system in the dorsolateral pons-region utilizing a stereotactic application system. Depending on the group, the viral vector system contained either the gene of a wildtype-alpha-synuclein, the gene of the mutant type alpha-synuclein A53T or the gene of the enzyme Luciferase. A53T is a variant of alpha-Synuclein that shows a significantly higher rate of aggregation than wildtype-alpha-synuclein. The Luciferase group was utilized as the control group for this experiment. After a predefined time period of four months, single-cell recordings of LC-neurons were conducted with the same method that was used in the aforementioned first model system. To again isolate the inward calcium-currents of the inspected neurons, Tetrodotoxin (TTX), Tetraethylammonium (TEA) and 4-Aminopyridine (4-AP) were utilized as pharmacological antagonists of voltage-dependent sodium- and potassium channels. Comparable to the results of the first, rotenone-based model system, a significant decrease of inward calcium-currents could be shown in the wildtype-alpha-synuclein group as well as the A53T-alpha-synuclein group.

The reduced calcium influx might in both model systems be caused by an elevated intracellular calcium-load, possibly caused by a combination of increased release of calcium from intracellular storages as well as an increased frequency of calcium-dependent depolarisations of these LC-neurons. To further investigate the origin of the increased intracellular calcium-load, calcium-imaging experiments might be conducted as a follow-up to this thesis. These results suggest, that a pharmacological modulation of voltage-dependent calcium channels of LC-neurons might be beneficial to patients with early stages of PD.

6 Literaturverzeichnis

- Abbott, R. D., Ross, G. W., White, L. R., Tanner, C. M., Masaki, K. H., Nelson, J. S., Curb, J. D., & Petrovitch, H. (2005). Excessive daytime sleepiness and subsequent development of Parkinson disease. *Neurology*, *65*(9), 1442–1446. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000183056.89590.0d>
- Airavaara, M., Parkkinen, I., Konovalova, J., Albert, K., Chmielarz, P., & Domanskyi, A. (2020). Back and to the Future: From Neurotoxin-Induced to Human Parkinson's Disease Models. *Current Protocols in Neuroscience*, *91*(1). <https://doi.org/10.1002/cpns.88>
- Andersen, J. K. (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: Cause or consequence? *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(7), S18. <https://doi.org/10.1038/nrn1434>
- Angelova, P. R., Ludtmann, M. H. R., Horrocks, M. H., Negoda, A., Cremades, N., Klenerman, D., Dobson, C. M., Wood, N. W., Pavlov, E. V., Gandhi, S., & Abramov, A. Y. (2016). Ca²⁺ is a key factor in α -synuclein-induced neurotoxicity. *Journal of Cell Science*, *129*(9), 1792–1801. <https://doi.org/10.1242/jcs.180737>
- Armstrong, M. J., & Okun, M. S. (2020). Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease. *JAMA*, *323*(6), 548. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.22360>
- Ascherio, A., & Schwarzschild, M. A. (2016). The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *The Lancet Neurology*, *15*(12), 1257–1272. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30230-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30230-7)
- Aston-Jones, G., Shipley, M. T., Chouvet, G., Ennis, M., van Bockstaele, E., Pieribone, V., Shiekhhattar, R., Akaoka, H., Drolet, G., Astier, B., Charléty, P., Valentino, R. J., & Williams, J. T. (1991). Afferent regulation of locus coeruleus neurons: Anatomy, physiology and pharmacology. In *Progress in Brain Research* (Vol. 88, Issue C, pp. 47–75). [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)63799-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)63799-1)
- Bari, B., Chokshi, V., & Schmidt, K. (2020). Locus coeruleus-norepinephrine: basic functions and insights into Parkinson's disease. *Neural Regeneration Research*, *15*(6), 1006. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.270297>
- Benarroch, E. E. (2009). The locus ceruleus norepinephrine system: Functional organization and potential clinical significance. *Neurology*, *73*(20), 1699–1704. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181c2937c>
- Benarroch, Eduardo E. (2018). Locus coeruleus. In *Cell and Tissue Research* (Vol. 373,

- Issue 1, pp. 221–232). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2649-1>
- Bendor, J. T., Logan, T. P., & Edwards, R. H. (2013). The function of α -synuclein. In *Neuron* (Vol. 79, Issue 6, pp. 1044–1066). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.004>
- Berg, D., Postuma, R. B., Bloem, B., Chan, P., Dubois, B., Gasser, T., Goetz, C. G., Halliday, G. M., Hardy, J., Lang, A. E., Litvan, I., Marek, K., Obeso, J., Oertel, W., Olanow, C. W., Poewe, W., Stern, M., & Deuschl, G. (2014). Time to redefine PD? Introductory statement of the MDS Task Force on the definition of Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 29(4), 454–462. <https://doi.org/10.1002/mds.25844>
- Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 1, Issue 1, pp. 11–21). European Association for Cardio-Thoracic Surgery. <https://doi.org/10.1038/35036035>
- Betzer, C., Lassen, L. B., Olsen, A., Kofoed, R. H., Reimer, L., Gregersen, E., Zheng, J., Cali, T., Gai, W., Chen, T., Moeller, A., Brini, M., Fu, Y., Halliday, G., Brudek, T., Aznar, S., Pakkenberg, B., Andersen, J. P., & Jensen, P. H. (2018). Alpha-synuclein aggregates activate calcium pump SERCA leading to calcium dysregulation. *EMBO Reports*, 19(5), e44617. <https://doi.org/10.15252/embr.201744617>
- Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., De Vos, R. A. I., Jansen Steur, E. N. H. H., & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, 24(2), 197–211. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00065-9](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00065-9)
- Braak, H., Ghebremedhin, E., Rüb, U., Bratzke, H., & Del Tredici, K. (2004). Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell and Tissue Research*, 318(1), 121–134. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0956-9>
- Bratsos, S. P., Karponis, D., & Saleh, S. N. (2018). Efficacy and Safety of Deep Brain Stimulation in the Treatment of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Cureus*, 10(10). <https://doi.org/10.7759/cureus.3474>
- Budd, S. L., & Nicholls, D. G. (1998). Mitochondria in the life and death of neurons. *Essays in Biochemistry*, 33, 43–52. <https://doi.org/10.1042/bse0330043>
- Burke, R. E., & O'Malley, K. (2013). Axon degeneration in Parkinson's disease. In

- Experimental Neurology* (Vol. 246, pp. 72–83). *Exp Neurol*.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.01.011>
- Carpenter, M. B., Carleton, S. C., Keller, J. T., & Conte, P. (1981). Connections of the subthalamic nucleus in the monkey. *Brain Research*, 224(1), 1–29.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(81\)91113-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)91113-6)
- Catterall, W. A., Lenaeus, M. J., & Gamal El-Din, T. M. (2019). Structure and Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818>
- Catterall, W. A., Striessnig, J., Snutch, T. P., & Perez-Reyes, E. (2003). International Union of Pharmacology. XL. Compendium of Voltage-Gated Ion Channels: Calcium Channels. In *Pharmacological Reviews* (Vol. 55, Issue 4, pp. 579–581).
<https://doi.org/10.1124/pr.55.4.8>
- Chaves, R. S., Melo, T. Q., Martins, S. A., & Ferrari, M. F. R. (2010). Protein aggregation containing beta-amyloid, alpha-synuclein and hyperphosphorylated tau in cultured cells of hippocampus, substantia nigra and locus coeruleus after rotenone exposure. *BMC Neuroscience*, 11(1), 144. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-11-144>
- Cheng, H. C., Ulane, C. M., & Burke, R. E. (2010). Clinical progression in Parkinson disease and the neurobiology of axons. In *Annals of Neurology* (Vol. 67, Issue 6, pp. 715–725). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1002/ana.21995>
- Chou, K. L., Stacy, M., Simuni, T., Miyasaki, J., Oertel, W. H., Sethi, K., Fernandez, H. H., & Stocchi, F. (2018). The spectrum of “off” in Parkinson’s disease: What have we learned over 40 years? In *Parkinsonism and Related Disorders* (Vol. 51, pp. 9–16). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2018.02.001>
- Chung, K. K. K., Zhang, Y., Lim, K. L., Tanaka, Y., Huang, H., Gao, J., Ross, C. A., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2001). Parkin ubiquitinates the α -synuclein-interacting protein, synphilin-1: Implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nature Medicine*, 7(10), 1144–1150. <https://doi.org/10.1038/nm1001-1144>
- Collingridge, G. L., James, T. A., & MacLeod, N. K. (1979). Neurochemical and electrophysiological evidence for a projection from the locus coeruleus to the substantia nigra [proceedings]. *The Journal of Physiology*, 290(2), 44P.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/469786>
- Connolly, B. S., & Lang, A. E. (2014). Pharmacological Treatment of Parkinson Disease.

- JAMA*, 311(16), 1670. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3654>
- Cuervo, A. M., Stafanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P. T., & Sulzer, D. (2004). Impaired degradation of mutant α -synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science*, 305(5688), 1292–1295. <https://doi.org/10.1126/science.1101738>
- Dahlström, A., & Fuxe, K. (1964). Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, 20(7), 398–399. <https://doi.org/10.1007/BF02147990>
- Davies, A., Hendrich, J., Van Minh, A. T., Wratten, J., Douglas, L., & Dolphin, A. C. (2007). Functional biology of the $\alpha 2\delta$ subunits of voltage-gated calcium channels. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(5), 220–228. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2007.03.005>
- de Lau, L. M., & Breteler, M. M. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 5(6), 525–535. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70471-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70471-9)
- Del Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R. A. I., Bohl, J. R. E., & Braak, H. (2002). Where Does Parkinson Disease Pathology Begin in the Brain? *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 61(5), 413–426. <https://doi.org/10.1093/jnen/61.5.413>
- Espay, A. J., & Lang, A. E. (2017). Common myths in the use of levodopa in Parkinson disease: When clinical trials misinform clinical practice. In *JAMA Neurology* (Vol. 74, Issue 6, pp. 633–634). American Medical Association. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.0348>
- Espay, A. J., LeWitt, P. A., & Kaufmann, H. (2014). Norepinephrine deficiency in Parkinson's disease: The case for noradrenergic enhancement. *Movement Disorders*, 29(14), 1710–1719. <https://doi.org/10.1002/mds.26048>
- Factor, S. A., McDonald, W. M., & Goldstein, F. C. (2017). The role of neurotransmitters in the development of Parkinson's disease-related psychosis. *European Journal of Neurology*, 24(10), 1244–1254. <https://doi.org/10.1111/ene.13376>
- Fernandes, P., Regala, J., Correia, F., & Gonçalves-Ferreira, A. J. (2012). The human locus coeruleus 3-D stereotactic anatomy. *Surgical and Radiologic Anatomy*, 34(10), 879–885. <https://doi.org/10.1007/s00276-012-0979-y>
- Follett, J., Darlow, B., Wong, M. B., Goodwin, J., & Pountney, D. L. (2013). Potassium depolarization and raised calcium induces α -synuclein aggregates. *Neurotoxicity Research*, 23(4), 378–392. <https://doi.org/10.1007/s12640-012-9366-z>
- Forsaa, E. B., Larsen, J. P., Wentzel-Larsen, T., & Alves, G. (2010). What predicts mortality in Parkinson disease? *Neurology*, 75(14), 1270–1276.

<https://doi.org/10.1212/WNL.0B013E3181F61311>

- Fox, S. H., Katzenschlager, R., Lim, S. Y., Barton, B., de Bie, R. M. A., Seppi, K., Coelho, M., & Sampaio, C. (2018). International Parkinson and movement disorder society evidence-based medicine review: Update on treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease. In *Movement Disorders* (Vol. 33, Issue 8, pp. 1248–1266). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/mds.27372>
- Freestone, P. S., Chung, K. K. H., Guatteo, E., Mercuri, N. B., Nicholson, L. F. B., & Lipski, J. (2009). Acute action of rotenone on nigral dopaminergic neurons - involvement of reactive oxygen species and disruption of Ca²⁺ homeostasis. *European Journal of Neuroscience*, 30(10), 1849–1859. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06990.x>
- Garcia-Ruiz, P. J., Martinez Castrillo, J. C., Alonso-Canovas, A., Herranz Barcenas, A., Vela, L., Sanchez Alonso, P., Mata, M., Olmedilla Gonzalez, N., & Mahillo Fernandez, I. (2014). Impulse control disorder in patients with Parkinson's disease under dopamine agonist therapy: A multicentre study. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 85(8), 841–845. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2013-306787>
- Giorgi, F. S., Biagioni, F., Galgani, A., Pavese, N., Lazzeri, G., & Fornai, F. (2020). Locus Coeruleus Modulates Neuroinflammation in Parkinsonism and Dementia. *International Journal of Molecular Sciences 2020, Vol. 21, Page 8630*, 21(22), 8630. <https://doi.org/10.3390/IJMS21228630>
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Del Tredici, K., & Braak, H. (2013). 100 years of Lewy pathology. *Nature Reviews Neurology*, 9(1), 13–24. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.242>
- Goldberg, J. A., Guzman, J. N., Estep, C. M., Ilijic, E., Kondapalli, J., Sanchez-Padilla, J., & Surmeier, D. J. (2012). Calcium entry induces mitochondrial oxidant stress in vagal neurons at risk in Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, 15(10), 1414–1421. <https://doi.org/10.1038/nn.3209>
- Greenamyre, J. T., Betarbet, R., & Sherer, T. B. (2003). The rotenone model of Parkinson's disease: Genes, environment and mitochondria. *Parkinsonism and Related Disorders*, 9(SUPPL. 2), 59–64. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(03\)00023-3](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(03)00023-3)
- Gupta, A., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2009). What causes cell death in Parkinson's

- disease? *Annals of Neurology*, 64(S2), S3–S15. <https://doi.org/10.1002/ana.21573>
- Guzman, J. N., Ilijic, E., Yang, B., Sanchez-Padilla, J., Wokosin, D., Galtieri, D., Kondapalli, J., Schumacker, P. T., & Surmeier, D. J. (2018). Systemic isradipine treatment diminishes calcium-dependent mitochondrial oxidant stress. *Journal of Clinical Investigation*, 128(6), 2266–2280. <https://doi.org/10.1172/JCI95898>
- Guzman, J. N., Sánchez-Padilla, J., Chan, C. S., & Surmeier, D. J. (2009). Robust pacemaking in substantia nigra dopaminergic neurons. *Journal of Neuroscience*, 29(35), 11011–11019. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2519-09.2009>
- Halliday, G., McCann, H., & Shepherd, C. (2012). Evaluation of the Braak hypothesis: How far can it explain the pathogenesis of Parkinson's disease? In *Expert Review of Neurotherapeutics* (Vol. 12, Issue 6, pp. 673–686). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1586/ern.12.47>
- Han, J. Y., Choi, T. S., & Kim, H. I. (2018). Molecular Role of Ca²⁺ and Hard Divalent Metal Cations on Accelerated Fibrillation and Interfibrillar Aggregation of α -Synuclein. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20320-5>
- Henrich, M. T., Geibl, F. F., Lee, B., Chiu, W. H., Koprach, J. B., Brotchie, J. M., Timmermann, L., Decher, N., Matschke, L. A., & Oertel, W. H. (2018). A53T- α -synuclein overexpression in murine locus coeruleus induces Parkinson's disease-like pathology in neurons and glia. *Acta Neuropathologica Communications*, 6(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0541-1>
- Hofmann, F., Flockerzi, V., Kahl, S., & Wegener, J. W. (2014). L-type CaV1.2 calcium channels: From in vitro findings to in vivo function. *Physiological Reviews*, 94(1), 303–326. <https://doi.org/10.1152/physrev.00016.2013>
- Ilijic, E., Guzman, J. N., & Surmeier, D. J. (2011). The L-type channel antagonist isradipine is neuroprotective in a mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 43(2), 364–371. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.04.007>
- Kalaitzakis, M. E., Graeber, M. B., Gentleman, S. M., & Pearce, R. K. B. (2008). The dorsal motor nucleus of the vagus is not an obligatory trigger site of Parkinson's disease: a critical analysis of α -synuclein staging. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 34(3), 284–295. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2007.00923.x>
- Kalia, L. V., & Lang, A. E. (2015). Parkinson's disease. In *The Lancet* (Vol. 386, Issue 9996, pp. 896–912). Lancet Publishing Group. <https://doi.org/10.1016/S0140->

6736(14)61393-3

- Kalk, N. J., Nutt, D. J., & Lingford-Hughes, A. R. (2011). The role of central noradrenergic dysregulation in anxiety disorders: Evidence from clinical studies. In *Journal of Psychopharmacology* (Vol. 25, Issue 1, pp. 3–16). <https://doi.org/10.1177/02698811110367448>
- Kang, Y., & Kitai, S. T. (1990). Electrophysiological properties of pedunclopontine neurons and their postsynaptic responses following stimulation of substantia nigra reticulata. *Brain Research*, 535(1), 79–95. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91826-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91826-3)
- Khaliq, Z. M., & Bean, B. P. (2010). Pacemaking in dopaminergic ventral tegmental area neurons: Depolarizing drive from background and voltage-dependent sodium conductances. *Journal of Neuroscience*, 30(21), 7401–7413. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0143-10.2010>
- Kornreich, B. G. (2007). The patch clamp technique: Principles and technical considerations. *Journal of Veterinary Cardiology*, 9(1), 25–37. <https://doi.org/10.1016/j.jvc.2007.02.001>
- Koschak, A., Reimer, D., Huber, I., Grabner, M., Glossmann, H., Engel, J., & Striessnig, J. (2001). $\alpha 1D$ (Cav1.3) Subunits Can Form L-type Ca^{2+} Channels Activating at Negative Voltages. *Journal of Biological Chemistry*, 276(25), 22100–22106. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101469200>
- Langston, J., Ballard, P., Tetrud, J., & Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 219(4587), 979–980. <https://doi.org/10.1126/science.6823561>
- Langston, J. W. (2006). The Parkinson's complex: Parkinsonism is just the tip of the iceberg. *Annals of Neurology*, 59(4), 591–596. <https://doi.org/10.1002/ana.20834>
- Leandrou, E., Emmanouilidou, E., & Vekrellis, K. (2019). Voltage-Gated Calcium Channels and α -Synuclein: Implications in Parkinson's Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12, 237. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00237>
- Lee, D., Lee, S.-Y., Lee, E.-N., Chang, C.-S., & Paik, S. R. (2004). α -Synuclein exhibits competitive interaction between calmodulin and synthetic membranes. *Journal of Neurochemistry*, 82(5), 1007–1017. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01024.x>
- Lieberman, O. J., Choi, S. J., Kanter, E., Saverchenko, A., Frier, M. D., Fiore, G. M., Wu,

- M., Kondapalli, J., Zampese, E., Surmeier, D. J., Sulzer, D., & Mosharov, E. V. (2017). α -synuclein-dependent calcium entry underlies differential sensitivity of cultured SN and VTA dopaminergic neurons to a parkinsonian neurotoxin. *ENeuro*, 4(6). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0167-17.2017>
- Lotankar, S., Prabhavalkar, K. S., & Bhatt, L. K. (2017). Biomarkers for Parkinson's Disease: Recent Advancement. In *Neuroscience Bulletin* (Vol. 33, Issue 5, pp. 585–597). Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0183-5>
- Ludtmann, M. H. R., Angelova, P. R., Ninkina, N. N., Gandhi, S., Buchman, V. L., & Abramov, A. Y. (2016). Monomeric alpha-synuclein exerts a physiological role on brain ATP synthase. *Journal of Neuroscience*, 36(41), 10510–10521. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1659-16.2016>
- Maillet, A., Krack, P., Lhommée, E., Météreau, E., Klinger, H., Favre, E., Le Bars, D., Schmitt, E., Bichon, A., Pelissier, P., Fraix, V., Castrioto, A., Sgambato-Faure, V., Broussolle, E., Tremblay, L., & Thobois, S. (2016). The prominent role of serotonergic degeneration in apathy, anxiety and depression in de novo Parkinson's disease. *Brain*, 139(9), 2486–2502. <https://doi.org/10.1093/brain/aww162>
- Marien, M. R., Colpaert, F. C., & Rosenquist, A. C. (2004). Noradrenergic mechanisms in neurodegenerative diseases: A theory. In *Brain Research Reviews* (Vol. 45, Issue 1, pp. 38–78). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.02.002>
- Martinez, J., Moeller, I., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Luring, B. (2003). Parkinson's disease-associated α -synuclein is a calmodulin substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 278(19), 17379–17387. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209020200>
- Matschke, L. A., Bertoune, M., Roeper, J., Snutch, T. P., Oertel, W. H., Rinné, S., & Decher, N. (2015). A concerted action of L- and T-type Ca²⁺ channels regulates locus coeruleus pacemaking. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 68, 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2015.08.012>
- Matschke, L. A., Rinné, S., Snutch, T. P., Oertel, W. H., Dolga, A. M., & Decher, N. (2018). Calcium-activated SK potassium channels are key modulators of the pacemaker frequency in locus coeruleus neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 88, 330–341. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2018.03.002>
- Morris, R., Martini, D. N., Madhyastha, T., Kelly, V. E., Grabowski, T. J., Nutt, J., & Horak, F. (2019). Overview of the cholinergic contribution to gait, balance and falls in

- Parkinson's disease. In *Parkinsonism and Related Disorders* (Vol. 63, pp. 20–30). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2019.02.017>
- Mounsey, R. B., & Teismann, P. (2010). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: pathogenesis and neuroprotection. *Parkinson's Disease*, 2011, 617472. <https://doi.org/10.4061/2011/617472>
- Nagley, P., Higgins, G. C., Atkin, J. D., & Beart, P. M. (2010). Multifaceted deaths orchestrated by mitochondria in neurones. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1802, Issue 1, pp. 167–185). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.09.004>
- Nanou, E., & Catterall, W. A. (2018). Calcium Channels, Synaptic Plasticity, and Neuropsychiatric Disease. In *Neuron* (Vol. 98, Issue 3, pp. 466–481). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.03.017>
- Nath, S., Goodwin, J., Engelborghs, Y., & Pountney, D. L. (2011). Raised calcium promotes α -synuclein aggregate formation. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 46(2), 516–526. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.12.004>
- Oertel, W. H., & Kupsch, A. (1993). Pathogenesis and animal studies of Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurology and Neurosurgery*, 6(3), 323–332. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8507901>
- Pacelli, C., Giguère, N., Bourque, M. J., Lévesque, M., Slack, R. S., & Trudeau, L. É. (2015). Elevated Mitochondrial Bioenergetics and Axonal Arborization Size Are Key Contributors to the Vulnerability of Dopamine Neurons. *Current Biology*, 25(18), 2349–2360. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.050>
- PD MED Collaborative Group. (2014). Long-term effectiveness of dopamine agonists and monoamine oxidase B inhibitors compared with levodopa as initial treatment for Parkinson's disease (PD MED): a large, open-label, pragmatic randomised trial. *The Lancet*, 384, 1196–1205. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60683-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60683-8)
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkman, J., Schrag, A.-E., & Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17013. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>
- Postuma, R. B., Berg, D., Stern, M., Poewe, W., Olanow, C. W., Oertel, W., Obeso, J., Marek, K., Litvan, I., Lang, A. E., Halliday, G., Goetz, C. G., Gasser, T., Dubois, B., Chan, P., Bloem, B. R., Adler, C. H., & Deuschl, G. (2015). MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. In *Movement Disorders* (Vol. 30, Issue 12, pp.

- 1591–1601). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/mds.26424>
- Pringsheim, T., Jette, N., Frolkis, A., & Steeves, T. D. L. (2014). The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Movement Disorders*, 29(13), 1583–1590. <https://doi.org/10.1002/mds.25945>
- Rcom-H'cheo-Gauthier, A. N., Davis, A., Meedeniya, A. C. B., & Pountney, D. L. (2016). Alpha-synuclein aggregates are excluded from calbindin-D28k-positive neurons in dementia with Lewy bodies and a unilateral rotenone mouse model. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 77, 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2016.10.003>
- Regus-Leidig, H., Dieck, S. T., Specht, D., Meyer, L., & Brandstätter, J. H. (2009). Early steps in the assembly of photoreceptor ribbon synapses in the mouse retina: The involvement of precursor spheres. *Journal of Comparative Neurology*, 512(6), 814–824. <https://doi.org/10.1002/cne.21915>
- Remy, P., Doder, M., Lees, A., Turjanski, N., & Brooks, D. (2005). Depression in Parkinson's disease: loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system. *Brain*, 128, 1314–1322. <https://doi.org/10.1093/brain/awh445>
- Rommelfanger, K. S., & Weinshenker, D. (2007). Norepinephrine: The redheaded stepchild of Parkinson's disease. In *Biochemical Pharmacology* (Vol. 74, Issue 2, pp. 177–190). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.01.036>
- Sakmann, B., & Neher, E. (2009). *Single-channel recording* (Bert Sakmann (ed.); 2. ed., Na). Springer.
- Sanchez-Padilla, J., Guzman, J. N., Ilijic, E., Kondapalli, J., Galtieri, D. J., Yang, B., Schieber, S., Oertel, W., Wokosin, D., Schumacker, P. T., & Surmeier, D. J. (2014). Mitochondrial oxidant stress in locus coeruleus is regulated by activity and nitric oxide synthase. *Nature Neuroscience*, 17(6), 832–840. <https://doi.org/10.1038/nn.3717>
- Schapira, A. H. V., Chaudhuri, K. R., & Jenner, P. (2017). Non-motor features of Parkinson disease. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 18, Issue 7, pp. 435–450). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.62>
- Schwarz, L. A., & Luo, L. (2015). Organization of the locus coeruleus-norepinephrine system. *Current Biology*, 25(21), R1051–R1056. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.09.039>
- Sharma, Y., Xu, T., Graf, W. M., Fobbs, A., Sherwood, C. C., Hof, P. R., Allman, J. M., & Manaye, K. F. (2010). Comparative anatomy of the locus coeruleus in humans

- and nonhuman primates. *Journal of Comparative Neurology*, 518(7), 963–971. <https://doi.org/10.1002/cne.22249>
- Sherer, T. B., Betarbet, R., Testa, C. M., Seo, B. B., Richardson, J. R., Kim, J. H., Miller, G. W., Yagi, T., Matsuno-Yagi, A., & Greenamyre, J. T. (2003). Mechanism of Toxicity in Rotenone Models of Parkinson's Disease. *Journal of Neuroscience*, 23(34), 10756–10764. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-34-10756.2003>
- Simms, B. A., & Zamponi, G. W. (2014). Neuronal voltage-gated calcium channels: Structure, function, and dysfunction. In *Neuron* (Vol. 82, Issue 1, pp. 24–45). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.016>
- Smaili, S. S., Hsu, Y. Te, Youle, R. J., & Russell, J. T. (2000). Mitochondria in Ca²⁺ signaling and apoptosis. In *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* (Vol. 32, Issue 1, pp. 35–46). Springer. <https://doi.org/10.1023/A:1005508311495>
- Srinivasan, J., & Schmidt, W. J. (2003). Potentiation of parkinsonian symptoms by depletion of locus coeruleus noradrenaline in 6-hydroxydopamine-induced partial degeneration of substantia nigra in rats. *European Journal of Neuroscience*, 17(12), 2586–2592. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02684.x>
- Statistisches Bundesamt (Destatis). (2019). *Bevölkerung im Wandel - Annahmen und Ergebnisse der 14. koordinierten Bevölkerungsvorausberechnung*. https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressekonferenzen/2019/Bevoelkerung/presse-broschuere-bevoelkerung.pdf?__blob=publicationFile
- Stewart, W. J., Johansen, J. L., & Liao, J. C. (2017). A non-toxic dose of cobalt chloride blocks hair cells of the zebrafish lateral line. *Hearing Research*, 350, 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2017.04.001>
- Striessnig, J., & Koschak, A. (2008). Exploring the function and pharmacotherapeutic potential of voltage-gated Ca²⁺ channels with gene Knockout models. In *Channels* (Vol. 2, Issue 4, pp. 233–251). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/chan.2.4.5847>
- Surmeier, D. J., Schumacker, P. T., Guzman, J. D., Ilijic, E., Yang, B., & Zampese, E. (2017). Calcium and Parkinson's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 483(4), 1013–1019. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.168>
- Sveinbjörnsdóttir, S. (2016). The clinical symptoms of Parkinson's disease. In *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/jnc.13691>
- Takahashi, K., Kayama, Y., Lin, J. S., & Sakai, K. (2010). Locus coeruleus neuronal

- activity during the sleep-waking cycle in mice. *Neuroscience*, 169(3), 1115–1126.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.06.009>
- Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T., & Numa, S. (1988). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature*, 328(6128), 313–318. <https://doi.org/10.1038/328313a0>
- Thenganatt, M. A., & Jankovic, J. (2014). Parkinson Disease Subtypes. *JAMA Neurology*, 71(4), 499. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.6233>
- Epidemiology of Parkinson's disease, 124 *Journal of Neural Transmission* 901 (2017).
<https://doi.org/10.1007/s00702-017-1686-y>
- Vermeiren, Y., & De Deyn, P. P. (2017). Targeting the norepinephrinergic system in Parkinson's disease and related disorders: The locus coeruleus story. In *Neurochemistry International* (Vol. 102, pp. 22–32). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.11.009>
- Volpicelli-Daley, L. A., Kirik, D., Stoyka, L. E., Standaert, D. G., & Harms, A. S. (2016). How can rAAV- α -synuclein and the fibril α -synuclein models advance our understanding of Parkinson's disease? In *Journal of Neurochemistry: Vol. 139 Suppl* (pp. 131–155). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jnc.13627>
- Von Coelln, R., Thomas, B., Savitt, J. M., Lim, K. L., Sasaki, M., Hess, E. J., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2004). Loss of locus coeruleus neurons and reduced startle in parkin null mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(29), 10744–10749. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401297101>
- Xie, W., & Chung, K. K. K. (2012). Alpha-synuclein impairs normal dynamics of mitochondria in cell and animal models of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 122(2), 404–414. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07769.x>
- Xiong, N., Long, X., Xiong, J., Jia, M., Chen, C., Huang, J., Ghoorah, D., Kong, X., Lin, Z., & Wang, T. (2012). Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-induced toxicity and its potential mechanisms in Parkinson's disease models. In *Critical Reviews in Toxicology* (Vol. 42, Issue 7, pp. 613–632). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.3109/10408444.2012.680431>
- Xu, Z., Zhang, D., He, X., Huang, Y., & Shao, H. (2016). Transport of Calcium Ions into

Mitochondria. *Current Genomics*, 17(3), 215–219.
<https://doi.org/10.2174/1389202917666160202215748>

Yuan, Y. he, Yan, W. fen, Sun, J. dong, Huang, J. yang, Mu, Z., & Chen, N. H. (2015). The molecular mechanism of rotenone-induced α -synuclein aggregation: Emphasizing the role of the calcium/GSK3 β pathway. *Toxicology Letters*, 233(2), 163–171. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2014.11.029>

Zhu, K., van Hilten, J. J., & Marinus, J. (2017). Onset and evolution of anxiety in Parkinson's disease. *European Journal of Neurology*, 24(2), 404–411. <https://doi.org/10.1111/ene.13217>

7 Anhang

7.1 Verzeichnis der akademischen Lehrerinnen und Lehrer

Meine akademischen Lehrenden in Marburg und Fulda waren die Damen und Herren ...

... Adamkiewicz, Barth, Bartsch, Bauer, Baum, Becker, Behr, Best, Bette, Brehm, Cetin, Czubayko, Daut, Decher, Fendrich, Figiel, Frink, Fülber, Geks, Görg, Greene, Greim, Hesse, Heverhagen, Hoch, Hundt, Jerrentrup, Kanngießer, Keller, Kellersmann, Kern, Kinscherf, Kirschbaum, König, Kühnert, Lill, Lohoff, Maisner, Mikulasch, Moll, Moosdorf, Mutters, Neubauer, Nimphius, Oertel, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Parahuleva, Peterlein, Plant, Plappert, Preisig-Müller, Renz, Rexin, Richter, Riera-Knorrenschild, Roelcke, Rost, Ruchholtz, Schäfer, Schales, Schieffer, Schmeck, Schmitt, Schütz, Schröder, Schwuchow, Seifart, Seipelt, Timmermann, Vogelmeier, Vogt, Vorwerk, Wagner, Waldmann, Wallot, Walthers, Weihe, Wilhelm, Wissniowski, Worzfeld, Wrocklage, Wulf, Zemlin

7.2 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Niels Decher bedanken, der mir die Möglichkeit eröffnet hat in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Für seine Unterstützung und sein immer offenes Ohr für Fragen aber auch eigene Ideen und Konzepte bin ich sehr dankbar. Die vom ersten Gespräch an sehr gute Arbeitsatmosphäre mit ihm und seinem Team sind nicht selbstverständlich und verdienen besondere Anerkennung.

Besonderer Dank gilt darüber hinaus Dr. Lina Matschke, die mir als Betreuerin dieser Arbeit immer tatkräftig als Ansprechpartnerin zur Seite stand. Ihre ansteckende Begeisterung für die Neurophysiologie hat einen entscheidenden Beitrag zu dieser Arbeit beigetragen.

Dr. Aytuğ Kiper, der bei technischen Fragestellungen jeder Art eine unschätzbare Hilfe war, danke ich ebenfalls für seine Unterstützung.

Das Elektrophysiologie-Team hat die Zeit im Labor zu einer sehr erfüllenden und prägenden Lebensphase gemacht. Dafür gilt der gesamten Arbeitsgruppe mein Dank, nicht nur für die stetige Hilfsbereitschaft, sondern auch für gemeinsame Gespräche und das Feiern neuer Veröffentlichungen.

Meiner Frau, Tuğyan Ebru Bariş-Griesbach, ist nicht nur für ihre immerwährende Unterstützung in allen Belangen zu danken, sondern auch für das akribische Korrekturlesen dieser Arbeit, für das geduldige Zuhören und ihre wertvollen Ratschläge. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie danken, die mir seit ich denken kann in jeder Situation Rückhalt gibt. Meine Eltern Uwe und Ines unterstützen mich bis heute bedingungslos mit Rat und Tat. Meine Schwester, meine Großeltern, meine Nichte, meine Schwiegereltern, meine Schwägerin und alle, die ich um mich schare, sind von unschätzbarem Wert. Euer aller Unterstützung hat maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Familie ist das Kostbarste im Leben und ich habe eine ganz Wunderbare um mich. Danke euch allen!