

4 Diskussion

Die Neuronen-Schleifen der Basalganglien sind an verschiedenen motorischen und psychomotorischen Erkrankungen wie Morbus Parkinson und auch bei Schizophrenie beteiligt. Bei einigen dieser Krankheiten scheinen die Ursachen in Störungen des dopaminergen Systems zu liegen. Die bisherigen Therapie-Ansätze ermöglichen es noch nicht, selektiv nur die dopaminergen Neurone der SNc oder der VTA zu beeinflussen. Diese sind an der Regulation psychischer Schleifen, jene an der Regulation motorischer Schleifen beteiligt. Als Nebenwirkung werden stets auch die dopaminergen Neurone der jeweils anderen Region mit betroffen.

Wünschenswert wäre eine pharmakologische Therapie, die selektiver die verschiedenen dopaminergen Neurone ansprechen würde. Über die Beeinflussung von Kaliumkanälen, deren Mitglieder die größte Familie der Ionenkanäle bilden, erscheint ein solcher Ansatz denkbar.

In der vorliegenden Arbeit wurden neue Antikörper gegen alle vier Mitglieder der G-Protein regulierten Gruppe einwärtsgerichteter Kaliumkanäle generiert. Mit den gereinigten und charakterisierten Antikörpern wurden sowohl mit licht- als auch mit elektronenmikroskopischen Techniken die dopaminergen Neuronengruppen im Ventralen Mesencephalon untersucht.

Diese Region ist deshalb von besonderem Interesse, weil in diesem Bereich zwei dopaminerge Neuronengruppen unmittelbar aneinandergrenzen, die an der Regulation unterschiedlicher Schleifen, siehe oben, beteiligt sind. Die medial gelegenen Neurone der VTA werden lateral unmittelbar von den Neuronen der SNc flankiert.

Die laterale Gruppe ist an der Regulation der motorischen Schleifen (SNc) und die mediale Gruppe an der Regulation der psychischen Schleifen (VTA) beteiligt.

4.1 Alle vier Kir3-Kanalproteine sind im ventralen Mesencephalon der Ratte vorhanden

Über die Verteilung der Kanalproteine Kir3.1 bis Kir3.4 im ventralen Mesencephalon der Ratte waren bisher aus der Literatur nur ungenaue und nicht einheitliche Angaben bekannt (siehe Tabelle 7 auf der Seite 84). Die sichersten Angaben existieren über das Vorkommen von Kir3.2 sowohl im ventralen Mesencephalon der Ratte (Inanobe et al, 99a) als auch im ventralen

Mesencephalon der Maus (Schein et al, 98). Bei der Maus ist Kir3.2 in den dopaminergen Neuronen lokalisiert und fehlt im Nucleus interfascicularis der VTA, obwohl auch in dieser Region dopaminerge Neurone in der Maus nachweisbar sind (Schein et al, 98).

Von Kir3.3 und Kir3.4 war in dieser Region durch *in situ* Hybridisierungen nur die mRNA nachgewiesen worden (Tabelle 7). Kir3.1 konnte auf der Proteinebene nachgewiesen werden, jedoch mit nur sehr schwachem Signal (Liao et al, 96; Miyashita und Kubo, 97). Diese ungenauen und unvollständigen Angaben über das Vorkommen der Kir3-Kanäle konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit korrigiert werden.

4.1.1 Lichtmikroskopie der vier Kir3-Kanalproteine im ventralen Mesencephalon der Ratte

In lichtmikroskopischen Untersuchungen konnten alle vier Kanalproteine in der SNc und in der VTA nachgewiesen werden (Abbildung 19-21).

Morphologisch am auffälligsten ist das Vorkommen von Kir3.2. Durch lichtmikroskopische Fluoreszenzdoppelmarkierung konnte gezeigt werden, dass das Kir3.2-Kanalprotein und die Tyrosinhydroxylase in der Ratte überwiegend kolokalisiert vorkommen (Abbildungen 20-21). Diese Beobachtung bestätigt vorliegende Daten, die bereits im letzten Jahr veröffentlicht wurden (Inanobe et al, 99a). Zusätzlich konnte in den vorliegenden Untersuchungen bei der Ratte erstmalig gezeigt werden, dass innerhalb der Subnuclei von VTA und SNc Abweichungen von dieser Kolokalisation nicht gleichmäßig vorhanden sind. Die Kir3.2-Kanalproteinverteilung weist einen medio-lateralen Gradienten auf (Abbildungen 20, 21). Während in den lateralen Subnuclei der SNc und im PBPL der VTA alle beobachteten dopaminergen Neurone zugleich auch Kir3.2 immunpositiv waren (Abbildung 20), konnten in den medialeren Bereichen der VTA zunehmend auch dopaminerge Neurone beobachtet werden, in denen kein Kir3.2 Kanalprotein nachweisbar war (Abbildung 21). Dabei ist besonders der zentral gelegene Subnucleus IF in der VTA zu erwähnen. In diesem Subnucleus befindet sich eine Gruppe von dicht gepackten, relativ kleinen und runden dopaminergen Neuronen (Fallon und Loughlin, 95), die keine Kir3.2 Immunreaktivität aufweisen. Auch bei der Maus ist das Fehlen der Kir3.2 Immunreaktivität im IF beobachtet worden ist es (Schein et al, 98). Somit ist wahrscheinlich anzunehmen, dass diese

ungleichmäßige Verteilung von Kir3.2 auch bei anderen Säugetierarten und möglicherweise auch beim Menschen vorkommt.

Im Gegensatz zur auffällig heterogenen Verteilung von Kir3.2 ergab die immunocytochemische Färbung der Kanalproteine Kir3.1, Kir3.3 sowie Kir3.4 Hinweise für ein homogenes und unauffälliges Vorkommen dieser Proteine im ventralen Mesencephalon (siehe auch Tabelle 8). Es war lichtmikroskopisch nicht möglich, Unterschiede in der medio-lateraler Verteilung dieser drei Kanalproteine in den Subnuclei von VTA und SNc festzustellen.

Die beobachtete homogene und unauffällige Verteilung von Kir3.1, Kir3.3 und Kir3.4 im ventralen Mesencephalon gilt jedoch nicht für das gesamte Gehirn. In anderen Gebieten, wie zum Beispiel im Hippocampus (Abbildungen 13-16), sind auch diese Kanalproteine sehr heterogen verteilt und konnten mit den neu hergestellten Antikörpern immunocytochemisch mit hoher Signifikanz dargestellt werden. Die beobachtete homogene Verteilung der drei Kanalproteine im Mesencephalon dürfte daher nicht durch eine unspezifische Markierung der Antikörper erklärt werden können. Für die Bestätigung der Spezifität dienen auch die durchgeführten Western-blots mit Ganzhirnhomogenat der Ratte, in denen Banden von den gereinigten Antikörpern markiert wurden (Abbildung 12), die den Molekulargewichten der Kir3-Proteine entsprechen.

4.1.2 Elektronenmikroskopie der vier Kir3-Kanalproteine

Um genauere Angaben über die subzelluläre Verteilung, ob die Kir3-Kanalproteine zum Beispiel im Cytoplasma oder an der Plasmamembran lokalisiert sind, zu erhalten, wurde im letzten Teil der Arbeit die ultrastrukturelle Lokalisation auf elektronenmikroskopischer Ebene untersucht.

4.1.2.1 Elektronenmikroskopie von Kir3.2

Das Kanalprotein Kir3.2 ist im Soma und in Dendriten von dopaminergen und auch von nicht dopaminergen Neuronen lokalisiert. Es ist sowohl im Cytoplasma als auch an der Plasmamembran der Neurone vorhanden. Üblicherweise wird davon ausgegangen (Pei et al, 99), dass die Mehrzahl aller Kir3-Kanäle im Gehirn aus dem Heterooligomer von Kir3.1 und Kir3.2 (siehe Einleitung, Seiten 17-18) bestehen. Da sich das Kir3.1 Protein aber elektronenmikroskopisch nur im Cytoplasma und nie an der Plasmamembran nachweisen ließ (zur Diskussion des Vorkommens von Kir3.1 siehe Kapitel 4.1.2.2 auf Seite 101), ist es sehr unwahrscheinlich, dass die funktionsfähigen Kir-Kanäle in den dopaminergen Neuronen des ventralen Mesencephalons der Ratte von einem Kir3.1/3.2 Heterooligomer gebildet werden. Es ist eher wahrscheinlich, dass Kir3.2 in dieser Region einen homooligomeren Kanal bildet, der sich möglicherweise aus verschiedenen Splice-Varianten (zum Beispiel Kir3.2a und Kir3.2c) zusammensetzt, wie es auch für die Maus angenommen wird (Inanobe et al, 99a).

Die lichtmikroskopische Beobachtung des Fehlens von Kir3.2 im Nucleus interfascicularis der VTA konnte elektronenmikroskopisch bestätigt werden. In diesem Gebiet konnten zwar Somata von zahlreichen dopaminergen Neuronen nachgewiesen werden. Keines dieser Neurone wies jedoch eine Kolo-kalisation mit Kir3.2 auf. Es gelang aber der elektronenmikroskopische Nachweis dieses Kanalproteins bei Einzelmarkierungen in einigen dendritischen Ausläufern. Lichtmikroskopisch waren diese Dendriten nicht gesehen worden. Diese Kir3.2 positiven Dendriten müssen zu Neuronen gehören, deren Somata außerhalb des Nucleus interfascicularis liegen. Ob die betreffenden Neurone dopaminerg sind, konnte aufgrund der Einzelfärbungen nicht geklärt werden.

Was könnte eine Erklärung dafür sein, dass sich das Kir3.2 Kanalprotein nur bei der Einzelmarkierung in Dendriten im Nucleus interfascicularis nachweisen ließ, nicht aber bei der Doppelmarkierung in dieser Region?

Bei der Einzelmarkierung des Kir3-Kanalproteins wird dieser durch DAB visualisiert und es existiert eine zusätzliche Signalverstärkung durch die Verwendung des Avidin-Biotin Komplexes nach der Bindung des Zweitantikörpers. Diese zusätzliche Signalverstärkung fehlt bei der Visualisierung des Kanalproteins in der Doppelmarkierung und ist möglicherweise der Grund für das Fehlen eines Kir3.2 Nachweises in der Doppelmarkierung. In allen anderen Subnuclei von VTA und SNc waren bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen keine beobachtbaren Unterschiede bezüglich der Kir3.2 Verteilung nachweisbar.

Es ist an dieser Stelle erwähnenswert, dass der in dieser Arbeit hergestellte Kir3.2 Antikörper nur die Splice-Varianten Kir3.2c (425 Aminosäuren) und Kir3.2a (414 Aminosäuren), nicht aber Kir3.2b (327 Aminosäuren) markiert. Zur Antikörperherstellung waren die letzten 59 Aminosäuren des Carboxyterminus von Kir3.2c verwendet worden. Die drei Splice-Varianten unterscheiden sich nur hinsichtlich der Länge ihrer Carboxytermini, und die Aminosäuresequenz von Kir3.2b ist zu kurz, um noch vom Antikörper erkannt zu werden.

Diese Splice-Variante kann in den dopaminergen Neuronen des ventralen Mesencephalons mit dem hergestellten Antikörper nicht nachgewiesen werden.

Theoretisch könnte somit die Kir3.2b-Splice-Variante im Nucleus interfascicularis vorkommen, sie würde aber aus den oben genannten Gründen nicht detektiert werden können.

4.1.2.2 Elektronenmikroskopie von Kir3.1, Kir3.3 und Kir3.4

Kir3.1, Kir3.3 und Kir3.4 konnten in allen Subnuclei sowohl der SNc als auch der VTA nachgewiesen werden. Dabei ist ihre rein cytoplasmatische Lokalisation, oft in der Nähe des ERs, bemerkenswert. Diese drei Kir3-Kanalproteine wurden nicht an der Plasmamembran gefunden. Welche Gründe sind für das Vorkommen dieser drei Kir3-Kanalproteine im Cytoplasma denkbar?

Eine Möglichkeit ist, dass die Gruppe der Neuronen, in denen diese Kir3 Proteine gefunden wurden, funktionsfähige Kanäle erst in ihren Projektionsgebieten ausbilden.

Stichprobenartige Untersuchungen im medialen Vorderhirnbündel, in dem die Axone der Projektionsneurone des ventralen Mesencephalons verlaufen und in zwei wichtigen Projektionsgebieten (ventrales Striatum und Cingulärer Kortex) ergaben dafür jedoch keinen Hinweis. Es wurde sowohl in den dopaminergen Axonen, als auch in den Axonterminalien kein Anhaltspunkt für die Existenz von Kir3-Kanalproteinen gefunden. Das bedeutet, dass es sehr unwahrscheinlich, aber auch nicht völlig auszuschließen ist, dass in anderen Projektionsgebieten von VTA und SNc funktionsfähige hetero- oder homooligomere Kir3-Kanäle in den dopaminergen Axonterminalien existieren können.

Eine andere mögliche Erklärung des cytoplasmatischen Vorkommens von Kir3.1, Kir3.3 und Kir3.4 ist in einer zeitlichen Aktivierung von hetero- oder homooligomeren Kir3-Kanälen in diesen Neuronen zu sehen. So ist zum einen denkbar, dass eine aktivitätsabhängige Expression vorliegt, oder dass sich zum anderen in der Entwicklung der Tiere das Repertoire der aktiven, in der Plasmamembran eingebauten Kir3-Kanälen zwischen adulten und juvenilen oder gar embryonalen Ratten unterscheidet. Möglicherweise kommen ausschließlich homooligomere Kir3.2-Kanäle nur in den untersuchten adulten Rattengehirnen vor. Um diese Frage zu klären, wäre es wünschenswert, wenn in zukünftigen Experimenten auch Rattengehirne aus verschiedenen Embryonalstadien und von juvenilen Tieren untersucht werden.

Das cytoplasmatische Vorkommen ließe sich auch dadurch erklären, dass diese drei Kir3-Kanalproteine für Funktionen innerhalb der Zelle dienen, möglicherweise als Ionenkanäle in der Plasmamembran des Endoplasmatischen Retikulums.

4.2 Bewertung des Kir3.2 Gradienten

Ein neues Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, dass Kir3-Kanalproteine nicht gleichmäßig in den dopaminergen Neuronen des ventralen Mesencephalons im Gehirn der Ratte verteilt sind. In einem Gradienten nimmt das Kir3.2-Kanalprotein von lateral nach medial ab. Im zentralen Bereich der VTA, insbesondere des Nucleus interfascicularis erreicht die Kir3.2 Verteilung ihr absolutes Minimum. Es konnte im IF kein Kir3.2 Protein in den Somata dopaminergener Neurone nachgewiesen werden. Dadurch nimmt der IF im Vergleich zu allen anderen Unterkernen von VTA und SNc eine Sonderstellung ein.

Es stellt sich die Frage, welche Bedeutung diese ungleichmäßige Verteilung von Kir3.2 hat. Möglicherweise korrespondiert die Sonderstellung des Nucleus interfascicularis mit der Beteiligung an Afferenzen und Efferenzen, die spezifisch für diesen Subnucleus sind.

Die dopaminergen Neurone der SNc erhalten überwiegend Afferenzen aus dem Patch Kompartiment des Striatums (Bunney und Aghajanian, 78; Grace und Bunney, 85), dem Nucleus subthalamicus (Smith und Grace, 92), dem zentralen Nucleus der Amygdala (Rouillard und Freeman, 95), dem präfrontalen Kortex (Tong et al, 96; Overton et al, 96), aus der dorsalen Raphe (Dray et al, 76; Kelland et al, 90; Trent und Tepper, 91) und aus dem Nucleus pedunculopontinus (Scarnati et al, 84; Scarnati et al, 87; Kelland et al, 93). Efferenzen aus der SNc projizieren überwiegend in die Matrix des Striatums (Seifert et al, 98).

Die afferenten Eingänge in die Subnuclei der VTA sind weniger detailliert untersucht worden. Neben Eingängen aus der dorsalen Raphe (Oades und Halliday, 87) werden in der Literatur vor allem die Amygdala sowie das laterale Septum (Maeda und Mogenson, 81) und der Präfrontale Kortex (Overton et al, 96) (Tong et al, 96) als Eingänge in die VTA erwähnt. Efferenzen ziehen aus der VTA vorwiegend in dem Nucleus accumbens des Striatums (Francois et al, 99).

Auch über die Projektionen der Unterkerne der VTA existieren einige Daten. Die verschiedenen Unterkerne der VTA sind an zum Teil unterschiedlichen Projektionswegen beteiligt (Swanson, 82; Takada und Hattori, 87; Oades und Halliday, 87; McRitchie et al, 96). Keiner der Autoren weist jedoch auf eine Sonderstellung des Nucleus interfascicularis hin.

Die beschriebenen Afferenzen und Efferenzen sind somit keine Erklärung für die Sonderstellung der Nucleus interfascicularis. Was für eine Bedeutung das Fehlen des Kir3.2 Kanalproteins in den dopaminergen Neuronen gerade dieser Region hat, kann daher aus den vorhandenen Daten gegenwärtig nicht erklärt werden.

Welche Funktion das Kanalprotein aber in der Plasmamembran dopaminergere Neurone anderer Subnuclei hat, konnte an dissoziierten dopaminergen Neuronen aus der SNc gezeigt werden (Uchida et al, 00). Das freigesetzte Dopamin dieser Neurone führt zu einer Aktivierung von D2-Autorezeptoren. Durch eine Signaltransduktion über Pertussistoxin sensitive G-Proteine werden Kir Kanäle geöffnet, Kaliumionen können ausströmen und die Neurone werden hyperpolarisiert. Die Frequenz der Aktionspotentiale sinkt ab.

Ein Fehlen dieser Regulationsmöglichkeit im Nucleus interfascicularis könnte bedeuten, dass die Neurone dort weniger flexibel ihre Frequenz der Aktionspotentiale regulieren können und möglicherweise dadurch eher metabolischem Stress ausgesetzt sind.

4.3 Ausblick

Eine zukünftige, selektivere pharmakologische Therapie bei psychischen Erkrankungen durch die Beeinflussung von Kir3.2-Kanälen erscheint auf der Grundlage der vorliegenden Arbeit nicht unmöglich. Bisherige Therapieansätze mit Dopaminantagonisten bei Patienten mit Schizophrenie, beeinflussen als Nebenwirkung auch die Wirkung der dopaminergen Neurone in den motorischen Schleifen (siehe Einleitung Seite 22).

Die Lokalisation von Kir3.2-Kanälen in dopaminergen Neuronen im ventralen Mesencephalon der Ratte nimmt von medial (VTA) nach lateral (SNc) zu. Wenn diese Beobachtung auch für den Menschen gilt, wäre zukünftig eine Behandlung denkbar, die diesen Kir-Kanalgradienten ausnutzt.

Ein antipsychotisches Medikament wie zum Beispiel Haloperidol wirkt auf die Dopamin D1- und D2-Rezeptoren antagonistisch. Die dopaminergen Neurone in VTA und SNc besitzen D2-Autorezeptoren, eine Aktivierung dieser Rezeptoren öffnet über G-Proteine ihre Kir3.2-Kanäle, hyperpolarisiert die Neurone und reduziert die Aktivität der Dopaminfreisetzung. Bei Zugabe von Haloperidol wird diese Reduzierung der Dopaminfreisetzung durch die Blockade der D2-Autorezeptoren verringert. Sowohl in den psychischen als auch in den motorischen Schleifen wird deshalb ohne negative Rückkopplung weiter Dopamin freigesetzt. Nebenwirkung ist bei Haloperidol der Verlust einer geregelten Dopaminfreisetzung in den motorischen Schleifen. Als Folge kommt es zu hyperkinetischen Symptomen, wie zum Beispiel unwillkürlichen, zuckenden Bewegungen.

Eine begleitende Therapie, die speziell Kir3.2-Kanäle öffnet, würde vor allem die dopaminergen Neurone in den motorischen Schleifen in der SNc hyperpolarisieren und somit zu einer Reduzierung der Nebenwirkung von Haloperidol führen.