

Dopaminerge Neurone
im motorischen und limbischen Mesencephalon
der Ratte unterscheiden sich in ihrer
Ausstattung mit Kir3-Kanälen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium

im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dirk Eulitz

aus

Paderborn

Berlin 2000

Gutachter: Prof. Dr. med. R. W. Veh
Prof. Dr. rer. nat. R. Menzel

Datum der Disputation: 29.01.2001

1	Einleitung	8
1.1	Ionenkanäle	8
1.2	Kaliumkanäle	8
1.3	Einwärtsgerichtende Kaliumkanäle (Kir-Kanäle).....	11
1.4	Kir3-Kanäle.....	14
1.4.1	G _{βγ} vermittelte Aktivierung der Kir3-Kanäle	15
1.4.2	Assoziation mit anderen Proteinen.....	15
1.4.3	Kir3 Untereinheiten.....	16
1.4.4	Biologische Bedeutung von Kir3	17
1.4.4.1	Kir3 Protein außerhalb des ZNS	17
1.4.4.2	Kir3-Proteine im ZNS	17
1.4.4.3	Kir3 Verbreitung im ventralen Mesencephalon.....	18
1.5	Basalganglien und ventrales Mesencephalon.....	18
1.6	Ziel der Arbeit	23
2	Material und Methoden	24
2.1	Allgemein verwendete Materialien	24
2.1.1	Chemikalien und Puffer	24
2.1.2	Wasserqualität	24
2.1.3	Geräte	24
2.1.3.1	Zentrifugen.....	24
2.2	Klonierung	25
2.2.1	Ausgangssequenzen	25
2.2.2	Primer.....	26
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	28
2.2.4	Schneiden von Vektor und Insert für die Ligation.....	29
2.2.5	Agarosegelelektrophorese.....	30

2.2.6	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	30
2.2.7	Ligation	31
2.2.8	Herstellung kompetenter Bakterien.....	31
2.2.9	Transformation	32
2.2.10	Suche nach positiven Klonen	32
2.2.11	Analytische Proteinexpression	32
2.2.12	DNA Sequenzierung	33
2.2.13	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	33
2.2.14	Western Blot und Immundetektion	35
2.2.15	Proteinbestimmung	36
2.2.16	Präparative Proteinexpression.....	37
2.2.16.1	Reinigung der GST-Fusionsproteine	37
2.2.16.2	Reinigung der DHFR-Fusionsproteine	38
2.2.16.3	Präparative Gelelektrophorese	38
2.3	Gewinnung der Antikörper	39
2.3.1	Immunisierung der Kaninchen.....	39
2.3.2	Aufarbeitung des Blutes	39
2.3.3	Detektion der spezifischen Antikörper (ELISA Test).....	40
2.3.3.1	Allgemein.....	40
2.3.3.2	Speziell: Der kompetitive ELISA Test	40
2.4	Aufreinigung der Antikörper.....	42
2.4.1	Entfernung der IgM.....	42
2.4.2	Entfernung der Kreuzreaktivität gegen das Trägerprotein.....	42
2.4.2.1	Herstellung eines pGEX-Bakteriensediments.....	43
2.4.2.2	Entfernung der Kreuzreaktivität gegen das Trägerprotein.....	43
2.4.3	Entfernung der Kreuzreaktivität gegen andere Kir	43
2.4.4	Affinitätsreinigung der Antikörper	44
2.4.5	Chromatofokussierung	44
2.4.6	Einengung der Antikörper.....	45
2.5	Gewinnung der Rattenhirngewebe für die Immuncytochemie	46
2.5.1	Perfusionsfixierung der Rattengehirne.....	46

2.5.2	Präparation und Zerteilung der Rattengehirne	47
2.6	Gewinnung von Rattenhirnhomogenaten für Western-Blots.....	47
2.7	Immuncytochemie.....	48
2.7.1	Immuncytochemie für die Lichtmikroskopie.....	48
2.7.1.1	Schneiden	48
2.7.1.2	Färben mit der Avidin-Biotin-Methode	48
2.7.1.3	Blockadeversuch	50
2.7.1.4	Folgende Erstantikörper wurden zusätzlich eingesetzt	51
2.7.1.5	Doppelmarkierung für die Fluoreszenzmikroskopie.....	52
2.7.1.6	Beschichtung der Objektträger.....	53
2.7.1.7	Kontrollfärbung mit Kresylviolett.....	53
2.7.1.8	Lichtmikroskopische Auswertung	54
2.7.2	Immuncytochemie für die Elektronenmikroskopie.....	54
2.7.2.1	Schneiden	54
2.7.2.2	Preembedding Doppelmarkierung für die Elektronenmikroskopie	54
2.7.2.3	Preembedding Einfachmarkierung für die Elektronenmikroskopie.....	58
2.7.2.4	Semi- und Ultradünnschnitte	58
2.7.2.5	Kontrastierung der Ultradünnschnitte	58
2.7.2.6	Elektronenmikroskopische Auswertung	58
3	Ergebnisse	59
3.1	Generierung und Charakterisierung der Antikörper	59
3.1.1	Auswahl der Sequenzen für die Immunisierung	59
3.1.2	Besonderheit bei der Kir3.3 Sequenz.....	62
3.1.3	Umklonierung	62
3.1.4	pGEX-Fusionsproteine.....	63
3.2	Reinigung der Antikörper am Beispiel Kir3.1	64
3.2.1	Entfernung der IgM.....	64
3.2.2	Kreuzreaktivität.....	65
3.2.3	Chromatofokussierung des Kir3.1 Antikörpers	67

3.3	Charakterisierung der gereinigten und eingeeengten Antikörper	68
3.3.1	Bilanz der Aktivität nach der Aufreinigung.....	68
3.3.2	Kreuzreaktivitäten nach der Aufreinigung.....	68
3.3.3	Blockade der Antikörper Kir3.1 bis Kir3.4.....	69
3.3.4	Spezifität der Antikörper im Rattenhirnhomogenat.....	71
3.3.5	Spezifität der Antikörper im Rattengehirn.....	73
3.4	Ergebnisse der Lichtmikroskopie.....	78
3.4.1	Tyrosinhydroxylase als Nachweis für dopaminerge Neurone	78
3.4.2	Charakterisierung der dopaminergen Zellgruppen im ventralen Mesencephalon	79
3.4.3	Chemoarchitektur des ventralen Mesencephalons.....	82
3.4.4	Lichtmikroskopische Verteilung der Kir3-Kanäle in VTA und SN	84
3.4.5	Nachweis der Kolokalisation von TH und Kir3.2.....	86
3.4.6	Keine Kolokalisation von TH und Kir3.2 im IF	88
3.4.7	Zusammenfassung der lichtmikroskopischen Ergebnisse.....	89
3.5	Ergebnisse der Elektronenmikroskopie.....	89
3.5.1	Verteilung von Kir3.2	89
3.5.2	Elektronenmikroskopischer Nachweis von Kir3.1, Kir3.3 und Kir3.4.....	93
4	Diskussion	97
4.1	Alle vier Kir3-Kanalproteine sind im ventralen Mesencephalon vorhanden.....	97
4.1.1	Lichtmikroskopie der vier Kir3-Kanalproteine im ventralen Mesencephalon	98
4.1.2	Elektronenmikroskopie der vier Kir3-Kanalproteine.....	100
4.1.2.1	Elektronenmikroskopie von Kir3.2.....	100
4.1.2.2	Elektronenmikroskopie von Kir3.1, Kir3.3 und Kir3.4	101
4.2	Bewertung des Kir3.2 Gradienten.....	102
4.3	Ausblick	104

5	Anhang	105
5.1	Zusammenfassung.....	105
5.2	Abkürzungen.....	106
5.3	Literaturverzeichnis.....	109
5.4	Publikationen.....	117
5.4.1	Veröffentlichung.....	117
5.4.2	Posterbeiträge.....	117
5.5	Lebenslauf.....	119
5.6	Danksagung.....	120

5 Anhang

5.1 Zusammenfassung

Die dopaminergen Neurone im motorischen und limbischen Mesencephalon sind wichtige regulatorische Stationen in den parallel verlaufenden Basalganglienschleifen. Störungen dieser Neuronen führen zu wichtigen psychischen und motorischen Erkrankungen. Mit bisherigen Therapieansätzen ist es nicht möglich, selektiv nur die psychischen oder motorischen Schleifen zu beeinflussen. Eine Möglichkeit zur Unterscheidung dieser beider Neuronengruppen für zukünftige pharmakologische Therapieansätze könnte über die Beeinflussung von Ionenkanälen erfolgen.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Verteilung der Kir3-Kanalproteine im motorischen und limbischen Mesencephalon der Ratte untersucht.

Es wurden Antikörper gegen die vier Mitglieder der Kir3-Familie gewonnen und anschließend gereinigt. Die gereinigten Antikörper wurden in immunocytochemischen Färbungen eingesetzt, um sowohl lichtmikroskopisch als auch elektronenmikroskopisch die Verteilung der Kir3-Kanalproteine in den dopaminergen Neuronen des ventralen Mesencephalons zu untersuchen.

Es gelang alle vier Kanalproteine in diesem Gebiet nachzuweisen. Sie unterscheiden sich sowohl in ihrer Häufigkeit als auch in ihrer ultrastrukturellen Verteilung. Eine Sonderstellung nimmt das Kanalprotein Kir3.2 ein. Von den vier Kanalproteinen ist es das einzige, dass nicht nur innerhalb von dopaminergen Neuronen (oft in der Nähe des ERs), sondern auch an der Cytoplasmamembran nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich ist dieses Protein heterogen verteilt, es weist einen Gradienten zwischen dem lateralen motorischen und dem medial gelegenen limbischen Mesencephalon auf.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen es möglich erscheinen, dass die zukünftigen Behandlungen von Störungen der dopaminergen Neurone im motorischen und limbischen Mesencephalon durch eine zusätzliche Beeinflussung von Kir3.2-Kanälen selektiver und mit weniger Nebenwirkungen erfolgen kann.

Abstract

Dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNc) and the ventral tegmental area (VTA) of the ventral mesencephalon play an important role in the regulation of the parallel basal ganglia loops. Their dysfunction can result in significant locomotor (SNc) and neuropsychiatric (VTA) disorders. Due to the high similarity between the closely related loops, a selective treatment without any side-effect is not possible. Ion channels could be potential targets for a more selective therapy.

The aim of the current study was therefore to investigate the distribution of the Kir3-channel proteins in the dopaminergic neurons in the mesencephalon of the rat brain.

For this reason, specific antibodies against each of the four members of the Kir3-family were produced and affinity-purified. Immunocytochemical labelling with the purified antibodies at the light and electron microscopical level was subsequently used to investigate the distribution of these Kir3-channel proteins within the dopaminergic neurons of the ventral mesencephalon.

All four members of the Kir3-family were present in this region. Their distribution was heterogeneous, with differences in quantity as well in ultrastructural distribution being detected. The Kir3.2 channel protein distribution was especially striking. The four channel proteins could be found in the cytoplasm of dopaminergic neurons (frequently close to the ER) but only Kir3.2 was also located at the plasma membrane of these neurons. In addition, the distribution of Kir3.2 protein was shown to be heterogeneous. A significant increase of the protein concentration from the medially situated VTA to the laterally situated SNc could be observed.

Thus it seems possible that the newly characterised heterogeneous distribution of Kir3.2 channel protein in dopaminergic neurons could perhaps offer a new chance for a more selective therapy of locomotor and neuropsychiatric disorders.

5.5 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Dirk Eulitz
Anschrift: Fidicinstr. 27
10965 Berlin
Email: Dirk.Eulitz@gmx.de
Geburtsdatum: 22.04.1967
Geburtsort: Paderborn
Familienstand: verheiratet, ein Kind

Beruflicher Werdegang:

Schule:

1973-1977 Grundschule, Paderborn
1977-1987 Gymnasium, Paderborn
1987-1989 Zivildienst, Paderborn

Studium:

1989-1995 Biologie mit Abschluss Diplom an der Freien Universität Berlin
1993-1995 studentische Hilfskraft mit Unterrichtsaufgaben (Tutor)
1995 freie Mitarbeit am Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität Berlin
1996-2000 Promotion am Institut für Anatomie der Charité, Berlin
Thema: Unterschiede in der Verteilung der Kir3-Kanalproteine im ventralen Mesencephalon der Ratte

5.6 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe „Elektronenmikroskopie und molekulare Neuroanatomie“ am Institut für Anatomie der Charité durchgeführt. Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. R. W. Veh für die Bereitstellung des interessanten Themas.

Ich danke den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für das freundschaftliche Klima und die gute Zusammenarbeit. Ich danke allen für die anregenden Diskussionen und die stets gewährte Hilfsbereitschaft, sie haben zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Mein Dank geht auch an Dr. Thomas Jöns für das Lesen des Manuskripts.

Ich danke Rike für ihre Geduld und Hilfe.