

3 Ergebnisse

3.1 Generierung und Charakterisierung der Antikörper

3.1.1 Auswahl der Sequenzen für die Immunisierung

Für die Erzeugung von Antikörpern, die spezifisch jeweils nur eines der vier Kanalproteine erkennen sollten, wurden in einem ersten Schritt die vollständigen Aminosäuresequenzen der vier verschiedenen Kir3-Kanäle bei der Ratte verglichen (Abbildung 4). Benötigt wurden Bereiche, in denen sich die Sequenzen so eindeutig wie möglich voneinander unterscheiden. Die vier verschiedenen Sequenzen weichen an ihren amino- und carboxyterminalen Enden am meisten voneinander ab (Abbildung 4). Hoch konserviert sind dagegen die Porenregion und die sie umgebenden, proximalen cytoplasmatischen Abschnitte (mit schwarz und blauen Farbtönen markierte Abschnitte in der Abbildung 4), so dass zur Generierung der Antikörper nur die Enden der Sequenzen in Betracht kamen. Einheitlich wurde deshalb für alle vier Kanalproteine der variable Carboxyterminus für die Umklonierung und spätere Immunisierung der Kaninchen ausgewählt (rot markierte Sequenzen in der Abbildung 4).

Abbildung 4: (auf Seite 60) Vergleich der vier Sequenzen

Dargestellt sind die vollständigen Aminosäuresequenzen von Kir3.1 bis Kir3.4 bei der Ratte. Der Sequenzvergleich erfolgte nach dem Higgins-Sharp Algorithmus. Übereinstimmende Aminosäuren sind farbig hinterlegt. Mit blauen Farbtönen ist die aus den beiden Transmembrandomänen M1, M2 und der in die Pore hineinragenden Domäne H5 bestehende Porenregion gekennzeichnet. Die rot markierten Aminosäuren am Carboxyterminus sind für die Immunisierung verwendet worden.

Kir3.1	1	MSALR-----	-----RKFG	DDYQVVTISS	SGSGLQFQG-	---PGQGPOQ	35
Kir3.2	1	MTMAKLTE SM	TNVLEGDSMD	QDV ^E SPVAIH	QPK-LPKQAR	DDLPRHLS RD	49
Kir3.3	1	MA-----	-----Q	ENAAFSPGSE	EPPR-----		17
Kir3.4	1	MA----GDSR	-----NAMN	QDMEIGVTSQ	DHKKI PKQAR	DYI PIATDRI	40
Kir3.1	36	QLVP--KKKR	QRFV ^D KN ^G RC	NVQHGNL ^G SE	TSRYLS ^D DLFT	TLVDL ^K WR ^W N	83
Kir3.2	50	R----TKRKI	QRYV ^R KD ^G K ^C	NVHHGNV-RE	TYRYL ^T DLFT	TLVDL ^K WR ^E N	94
Kir3.3	18	-----RRGR	QRYVEK ^D G ^R C	NVQ ^O GNV-RE	TYRYL ^T DLFT	TLVDL ^O WR ^L S	60
Kir3.4	41	RLLE ^G E ^G KK ^P R	QRYMEK ^T G ^K C	NVHHGNV-QE	TYRYLS ^D DLFT	TLVDL ^K WR ^E N	89
M1							
Kir3.1	84	LF ^L FL ^L LY ^T V	AWL ^F MAS ^M W ^W	VIAY ^T RG ^D LN	KAHVGN ^T PC	VAN ^V YN ^F PSA	133
Kir3.2	95	LL ^L F ^V M ^V Y ^T V	TW ^L FF ^G M ^I W ^W	LIAY ^T RG ^D MD	HI ^E DP ^S W ^T PC	VT ^N L ^N GF ^V SA	144
Kir3.3	61	LL ^L F ^V L ^A Y ^A L	TW ^L FF ^G A ^I W ^W	LIAY ^T RG ^D LE	HL ^E DT ^A W ^T PC	V ^N N ^L NG ^F V ^A A	110
Kir3.4	90	LL ^V FM ^V Y ^T I	TW ^L FF ^G I ^I W ^W	LIAY ^V RG ^D LD	HV ^G D ^O EW ^T PC	VEN ^L S ^G F ^V SA	139
H5							
Kir3.1	134	FL ^F ET ^E EA ^T	IGY ^G Y ^R Y ^T TD	KC ^P E ^G I ^L EL	F ^O S ^I L ^G S ^I VD	AFL ^I G ^C M ^F LK	183
Kir3.2	145	FL ^F S ^I ET ^E T ^T	IGY ^G Y ^R V ^T TD	KC ^P E ^G I ^L LL	I ^O S ^V L ^G S ^I VN	AF ^M V ^G C ^M F ^V K	194
Kir3.3	111	FL ^F S ^I ET ^E T ^T	IGY ^G Y ^R V ^T TD	QC ^P E ^G I ^V LL	L ^O AIL ^G S ^M VN	AF ^M V ^G C ^M F ^V K	160
Kir3.4	140	FL ^F S ^I ET ^E T ^T	IGY ^G Y ^R V ^T TE	KC ^P E ^G I ^L LL	V ^O AIL ^G S ^I VN	AF ^M V ^G C ^M F ^V K	189
M2							
Kir3.1	184	MS ^O PK ^K RA ^E T	LM ^F S ^H AV ^I S	MR ^D G ^K L ^L CL ^M F	RV ^G N ^L R ^N SH ^M	V ^S A ^Q IR ^C KL ^L	233
Kir3.2	195	IS ^O PK ^K RA ^E T	LM ^F S ^H AV ^I S	MR ^D G ^K L ^L CL ^M F	RV ^G DL ^R NS ^H I	VE ^A S ^I RA ^K L ^I	244
Kir3.3	161	IS ^O PN ^K RA ^A T	LM ^F S ^S HAV ^S	LR ^D GR ^L CL ^M F	RV ^G DL ^R S ^S HI	VE ^A S ^I RA ^K L ^I	210
Kir3.4	190	IS ^O PK ^K RA ^E T	LM ^F S ^N AV ^I S	MR ^D E ^K L ^L CL ^M F	RV ^G DL ^R NS ^H I	VE ^A S ^I RA ^K L ^I	239
Kir3.1	234	KS ^R QT ^E EG ^E F	L ^P L ^D Q ^L E ^L D ^V	GF ^S TC ^A D ^L LF	L ^V S ^P L ^I T ^C H ^V	ID ^A K ^S PF ^Y DL	283
Kir3.2	245	KS ^R QT ^S EG ^E F	I ^P L ^N Q ^T D ^I N ^V	GY ^Y T ^G D ^D R ^L F	L ^V S ^P L ^I I ^S HE	IN ^Q Q ^S PF ^W EL	294
Kir3.3	211	RS ^R QT ^L EG ^E F	I ^P L ^H Q ^T D ^L SV	GF ^D T ^G D ^D R ^L F	L ^V S ^P L ^V I ^S HE	ID ^A A ^S PF ^W EA	260
Kir3.4	240	KS ^R QT ^K EG ^E F	I ^P L ^N Q ^T D ^I N ^V	GF ^D T ^G D ^D R ^L F	L ^V S ^P L ^I I ^S HE	IN ^E K ^S PF ^W EM	289
Kir3.1	284	S ^O RS ^M Q ^T E ^Q F	E ^V V ^I L ^E G ^I V	E ^I T ^G M ^T C ^O AR	T ^S Y ^T E ^D E ^V L ^W	G ^H R ^F F ^P V ^L S ^L	333
Kir3.2	295	S ^K A ^Q L ^P K ^E E ^L	E ^I V ^I L ^E G ^M V	E ^A T ^G M ^T C ^O AR	S ^S Y ^I T ^S E ^I L ^W	G ^Y R ^F T ^P V ^L T ^L	344
Kir3.3	261	S ^R R ^A L ^E R ^D D ^F	E ^I V ^I L ^E G ^M V	E ^A T ^G M ^T C ^O AR	S ^S Y ^L V ^D E ^V L ^W	G ^H R ^F T ^S V ^L T ^L	310
Kir3.4	290	S ^R A ^Q L ^E Q ^E E ^F	E ^V V ^I L ^E G ^M V	E ^A T ^G M ^T C ^O AR	S ^S Y ^M D ^T E ^V L ^W	G ^H R ^F T ^P V ^L T ^L	339
Kir3.1	334	E ^E G ^F E ^K V ^D Y ^S	Q ^F H ^A T ^F E ^V P ^T	P ^P Y ^S V ^K E ^Q E ^E	M ^L L ^M S ^S P ^L I ^A	P ^A I ^T N ^S K ^E R ^H	383
Kir3.2	345	E ^D G ^F Y ^E V ^D Y ^N	S ^F H ^E T ^F E ^T S ^T	P ^S L ^S A ^K E---	-----	-----	371
Kir3.3	311	E ^D G ^F Y ^E V ^D Y ^A	S ^F H ^E T ^F E ^V P ^T	P ^S C ^S A ^R E---	-----	-----	337
Kir3.4	340	E ^K G ^F Y ^E V ^D Y ^N	T ^F H ^D T ^F E ^T N ^T	P ^S C ^C A ^K E---	-----	-----	366
Kir3.1	384	NS ^V E ^C L ^D G ^L D	D ^I S ^T K ^L P ^S K ^L	Q ^K I ^T G ^R E ^D F ^P	K ^K L ^L R ^M S ^S T ^T	S ^E K ^A Y ^S L ^G D ^L	433
Kir3.2	372	-----LA	E ^L A ^N R---	-----	-----	-----A ^E L	381
Kir3.3	338	-----LA	E ^A A ^A R---	-----	-----	-----L ^D A	347
Kir3.4	340	-----LA	E ^M K ^R N---	-----	-----	-----G ^O L	376
Kir3.1	434	P ^M K ^L O ^R I ^S S ^V	P ^G N ^S E ^E K ^L V ^S	K ^T T ^R K ^M L ^S D ^P M	S ^Q S ^V A ^D L ^P P ^K	L ^O K ^M A ^G G ^E P ^T R	483
Kir3.2	382	P ^L S ^W S ^V S ^S K ^L	N ^Q H ^A E ^L E---	-----T ^E E ^E	E ^K N ^P E ^E L ^T --	E ^R N ^G D ^V A ^N L ^E	418
Kir3.3	348	H ^L W ^S T ^I P ^S R ^L	D ^E K ^V E ^E E---	-----G ^A G ^E	G ^A G ^A G ^D G ^A D ^K	E ^R Q ^N C ^L P ^P E ^E	388
Kir3.4	377	L ^O S ^L P ^S P ^P L ^L	G ^C C ^A B ^A E---	-----K ^E A ^E	A ^E H ^D E ^E -E--	E ^P N ^G L ^S V ^S R ^A	412
Kir3.1	484	M ^E C ^N L ^P A ^K L ^R	K ^M N ^S D ^R F ^T				501
Kir3.2	419	N ^E S ^K V---	-----				425
Kir3.3	389	S ^E S ^K V---	-----				393
Kir3.4	413	T ^R C ^S M---	-----				419

Von den mir zur Verfügung gestellten Plasmiden (A. Karschin, Göttingen) mit den vollständigen Sequenzen der vier Kir3-Kanalproteine stammen nur zwei aus der Ratte. Die Sequenzen Kir3.2 und Kir3.4 stammen vom Menschen.

Das bedeutete, dass bei Kir3.2 und Kir3.4 die späteren Antikörper gegen das menschliche Protein gerichtet sein würden. Die Immuncytochemie sollte aber mit allen vier Antikörpern ausschließlich an Rattengewebe durchgeführt werden. Es musste deshalb sicher gestellt sein, dass die gegen die menschlichen Sequenzen gerichteten Antikörper auch die entsprechenden tierischen Aminosäuresequenzen erkannten.

In einem ersten Schritt wurden deshalb die Aminosäuresequenzen Kir3.2 und Kir3.4 bei Ratte und Mensch an ihren für die Antikörpererzeugung verwendeten carboxyterminalen Enden (Abbildung 5) miteinander verglichen.

A Kir3.2

<i>Homo sapiens</i>	365	LSAK	ELAEIASRAE	IPLSWSVSSK	LNQHAIEETE	398
<i>Rattus norvegicus</i>	367	LSAK	ELAEIANRAE	LPLSWSVSSK	LNQHAIEETE	400
<i>Homo sapiens</i>	399	EEEKNLEEQT	ERNGDVANLE	NESKV		423
<i>Rattus norvegicus</i>	401	EEEKNPEELT	ERNGDVANLE	NESKV		425

B Kir3.4

<i>Homo sapiens</i>	357	TNTP	SCCAKELAEI	KREGRILOYL	PSPPLIGGCA	EAGLDAFAEQ	400
<i>Rattus norvegicus</i>	357	TNTP	SCCAKELAEI	KRNGQLLOSL	PSPPLIGGCA	EAEKEAEAEH	400
<i>Homo sapiens</i>	401	NEEDEPKGLG	GSREARGSV				419
<i>Rattus norvegicus</i>	401	DEEEEPNGLS	VSRATRGS				419

Abbildung 5: Sequenzvergleich Ratte, Mensch

Vergleich der Carboxytermini von Kir3.2 (A) und Kir3.4 (B) bei Ratte und Mensch.

Schwarze Balken kennzeichnen übereinstimmende Aminosäuren. **A:** Bei Kir3.2 unterscheiden sich in diesem Abschnitt die Sequenzen an 3 von 59 Positionen. **B:** Die Sequenzen unterscheiden sich bei Kir3.4 an 15 von 63 Positionen.

Wie aus der Abbildung 5 zu sehen ist, unterscheiden sich die Aminosäuresequenzen von Ratte und Mensch bei Kir3.2 und auch bei Kir3.4 am Carboxyterminus nur an wenigen Stellen. Es konnte deshalb davon ausgegangen werden, dass Antikörper gegen die menschliche Sequenz

auch im tierischen Gewebe funktionieren würden. Bei Kir3.4 weichen die Sequenzen stärker voneinander ab. Tierische und menschliche Sequenzen unterscheiden sich an 15 von 63 Positionen. Da aber immer noch weite Bereiche identisch sind, konnte auch hier davon ausgegangen werden, dass die meisten der erzeugten Antikörper auch das tierische Protein erkennen würden.

3.1.2 Besonderheit bei der Kir3.3 Sequenz

Bei der Sequenz für das Kanalprotein Kir3.3 folgen nach der für die Immunisierung verwendeten Aminosäuren noch 16 weitere Aminosäuren. Ursache für diese Besonderheit ist die Tatsache, dass die zum Zeitpunkt der Umklonierung (1996) verwendete und unter dem Accession Code L77929 von A. Karschin im Internet veröffentlichte DNA-Sequenz fehlerhaft war.

Neben einigen falsch sequenzierten Basen gab es am 3' Ende durch ein zu viel gelesenes Guanin an der Position 1360 eine Leserasterverschiebung. Durch diese Verschiebung im Leseraster ergab sich ein vorzeitiges Stopcodon. Diese kürzere Sequenz lag der Umklonierung zugrunde, so dass die DNA auch nur bis zu diesem vermeintlichen Ende ausgeschnitten wurde.

Erst nachträglich (1998) wurde die korrigierte DNA-Sequenz unter dem selben Accession Code veröffentlicht. Die von uns durchgeführte Sequenzierung nach dem Umklonieren (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.2.12 auf Seite 33) ergab die Übereinstimmung mit dieser korrigierten Sequenz, so dass die Klonierung und der spätere Antikörper nicht beeinträchtigt waren.

3.1.3 Umklonierung

Von den ausgewählten Bereichen wurden die entsprechenden DNA Sequenzen mittels PCR amplifiziert und mit Restriktionsenzymen an ihren Rändern beschnitten. Die so vorbereiteten DNA-Fragmente konnten anschließend in den mit den gleichen Endonucleasen passend geöffneten prokaryontischen Expressionsvektor (pGEX-4T-1) einkloniert werden. Anschließend wurden Bakterien mit diesen Fusionsvektoren transformiert und positive Klone auf die Korrektheit der integrierten Sequenzen überprüft. Die richtigen Klone konnten dann für die Expression der Fusionsproteine verwendet werden.

3.1.4 pGEX-Fusionsproteine

Die Fusionsproteine bestanden jeweils aus dem Trägerprotein GST (Gluthation-S-Transferase) und dem ausgewählten Kir3 Sequenzabschnitt. Mit den gereinigten Fusionsproteinen (Abbildung 6) wurden jeweils zwei Kaninchen immunisiert.

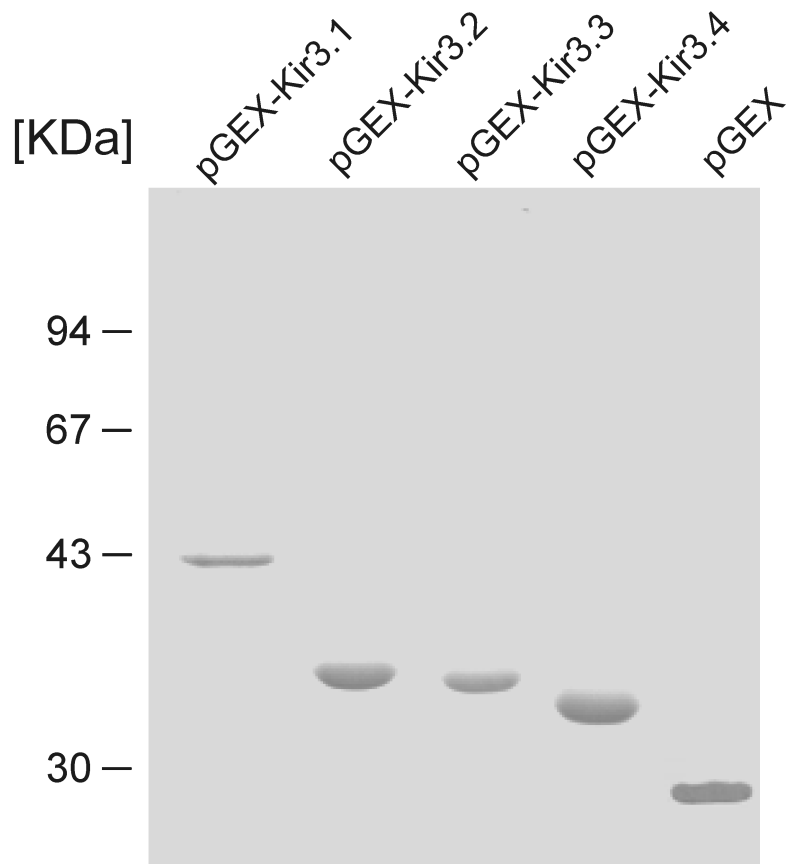


Abbildung 6: Die gereinigten Fusionsproteine

In dieser Abbildung sind die durch SDS-PAGE aufgetrennten und mit Comassi-Blau angefärbten Fusionsproteine dargestellt. In der rechten Spur ist das reine Trägerprotein ohne Fusionsanteil aufgetragen.

3.2 Reinigung der Antikörper am Beispiel Kir3.1

Die Aufreinigung der Antikörper wird im Folgenden am Beispiel des Kir3.1 Antikörpers dargestellt. Die Ergebnisse der drei anderen aufgereinigten Antikörper (Kir3.2, Kir3.3 und Kir3.4) unterschieden sich nicht wesentlich von denen des Kir3.1 Antikörpers.

3.2.1 Entfernung der IgM

Die Trennung der ca. 150 KDa schweren IgG Immunglobuline von den 6 mal schwereren IgM (ca. 900 KDa) erfolgte bei der Passage durch eine Superdex-Säule. Als Beispiel ist in der Abbildung 7 die Säulepassage des Kir3.1 Antikörpers dargestellt.

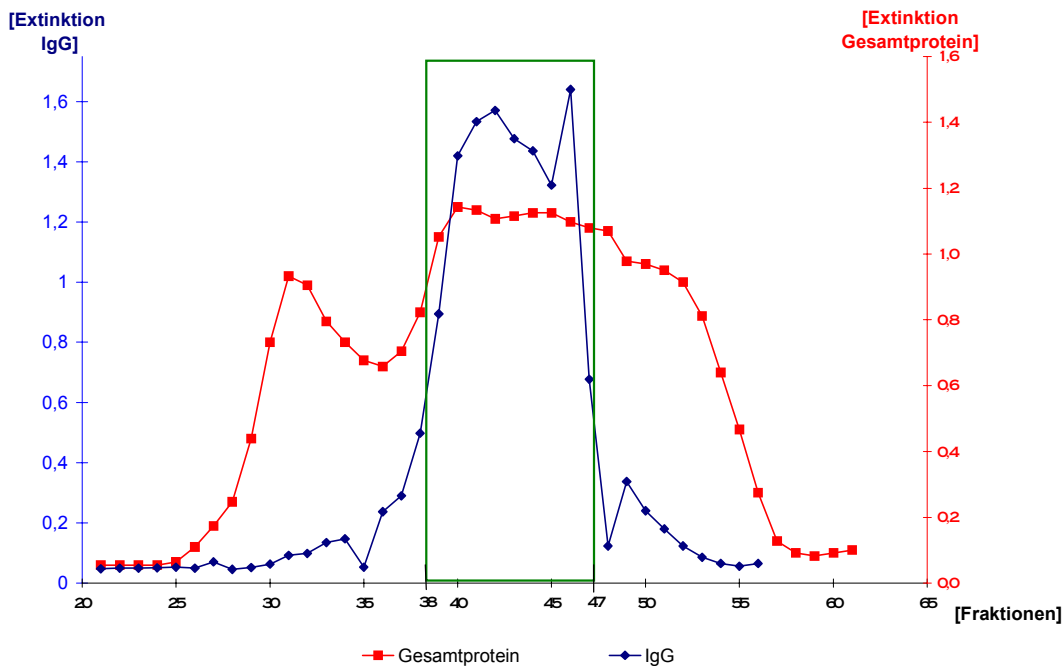


Abbildung 7: Auswahl der Fraktionen nach der Säulepassage des Kir3.1 Antikörpers

Der Verlauf der roten Kurve stellt die Gesamtproteinkonzentration in den Fraktionen 21 bis 61 dar. Die IgG Konzentration der Fraktionen 21 bis 56 wurde mit dem ELISA Test bestimmt und ist mit der blauen Kurve wiedergegeben. Die Fraktionen mit der höchsten IgG Konzentration (38 bis 47) sind grün eingerahmt.

Die Fraktionen mit hoher IgG Konzentration (38 bis 47) wurden vereinigt (gepoolt) und weiter für die Aufreinigung verwendet.

3.2.2 Kreuzreaktivität

Die Entfernung der Kreuzreaktivität erfolgte über mehrere Schritte. Am Beispiel des Kir3.1 Antikörpers wird sie im Folgenden dargestellt.

Während das Rohserum noch hohe Kreuzreaktivitäten vor allem gegen das pGEX Trägerprotein aufwies (Abbildung 8, A), war nach der Entfernung dieser kreuzreagierenden Antikörper eine nur noch geringe Aktivität gegen pGEX und die anderen Kir3 Fusionsproteine festzustellen (B). Von diesen restlichen Kreuzreaktivitäten war die Aktivität gegen das Fusionsprotein Kir3.3 am höchsten, so dass als nächster Schritt die gegen dieses Fusionsprotein kreuzreagierenden Antikörper herausgefangen wurden.

Der Antikörper wurde anschließend affinitätsgereinigt, sowie eingeeengt und wies danach nur noch sehr geringe Kreuzreaktivitäten auf (C).

Bei den anderen drei Antikörpern (Kir3.2 bis Kir3.4) wurde die Aufreinigung auf die gleiche Art und Weise durchgeführt. Nach der Entfernung der Kreuzreaktivitäten gegen das pGEX Trägerprotein wurde ebenfalls in einem zweiten Schritt die Kreuzreaktivität gegen dasjenige Mitglied der Kir Familie entfernt, gegen das der Antikörper am stärksten kreuzreagierte.

Dies war beim Kir3.2 sowie beim Kir3.3 Antikörper die Kreuzreaktivität gegen Kir6.2 und beim Kir3.4 Antikörper die Kreuzreaktivität gegen das Kir3.1 Fusionsprotein.

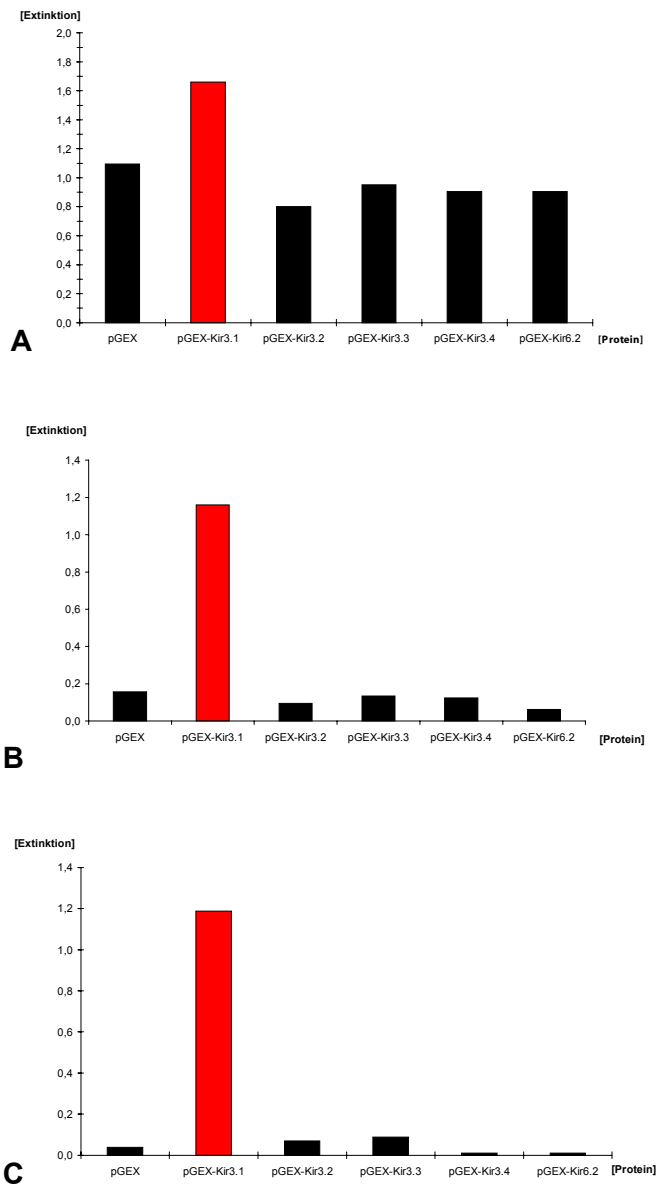


Abbildung 8: Vergleich der Kreuzreaktivität (Kir3.1) vor, während und nach der Reinigung
A: Rohserum vor der IgM Entfernung; **B:** nach Entfernung der Kreuzreaktivität gegen das pGEX-Trägerprotein; **C:** der fertige Antikörper nach Kreuz- und Affinitätsreinigung und anschließender Einengung. Die Verdünnung der Antikörper betrug bei A und C 1:100 000 und bei B 1:30 000.

3.2.3 Chromatofokussierung des Kir3.1 Antikörpers

Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes des Antikörpers erfolgte mittels Chromatofokussierung und war Voraussetzung für die spätere Einengung der Antikörper. Für alle vier Antikörper konnte ein isoelektrischer Punkt bei einem pH von ca. 7,4 ermittelt werden (Abbildung 9).

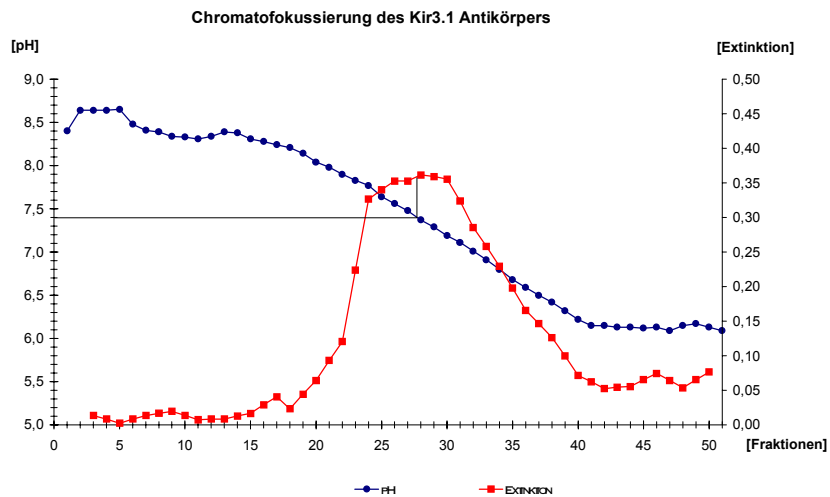


Abbildung 9: Chromatofokussierung des Kir3.1 Antikörpers

Antikörper wurden mit einem kontinuierlich abfallenden pH Gradienten (blaue Kurve) aus einer Anionenaustauschersäule herausgewaschen. Die IgG Konzentrationen der eluierten Fraktionen (rote Kurve) wurde mit dem ELISA Test bestimmt. Aus dem Kurvenverlauf lässt sich der isoelektrische Punkt der Antikörper bei einem pH Wert von ca. 7,4 erkennen.

Die anschließende Affinitätsreinigung wurde bei allen vier Antikörpern mit dem jeweilig spezifischen Fusionsprotein durchgeführt, das an dem alternativen Trägerprotein DHFR gekoppelt war.

3.3 Charakterisierung der gereinigten und eingegangenen Antikörper

3.3.1 Bilanz der Aktivität nach der Aufreinigung

Die gereinigten Antikörper lagen nach der Einengung in einem Volumen von 2,4 ml vor. Für die Aufreinigung war das gleiche Volumen an Rohserum eingesetzt worden. Von der Antikörperaktivität des Rohserums (= 100 %) blieb nach der Reinigung noch 35-40 % übrig.

3.3.2 Kreuzreaktivitäten nach der Aufreinigung

Die Kreuzreaktivität der aufgereinigten Antikörper wird im Folgenden wiederum am Beispiel des Kir3.1 Antikörpers vorgestellt. Auch hier unterschieden sich die Ergebnisse der drei anderen aufgereinigten Antikörper (Kir3.2, Kir3.3 und Kir3.4) nicht wesentlich von denen des Kir3.1 Antikörpers.

Mit einem kompetitiven ELISA Test wurden die Antikörper nach der Reinigung auf ihre restliche Kreuzreaktivität gegen die anderen pGEX-Kir3 Fusionsproteine, gegen das reine pGEX Trägerprotein und als zusätzliche Kontrolle gegen ein pGEX-Fusionsprotein mit dem Carboxyterminus eines Kir Kanals aus einer anderen Familie (Kir6.2) getestet. In der Abbildung 10 ist die Spezifität am Beispiel des gereinigten Kir3.1 Antikörpers zu erkennen. Es ließ sich keine erkennbare Kreuzreaktivität gegen die Carboxytermini der anderen Kir Kanäle nachweisen. Nur durch sein spezifisches Fusionsprotein konnte der Antikörper blockiert werden.

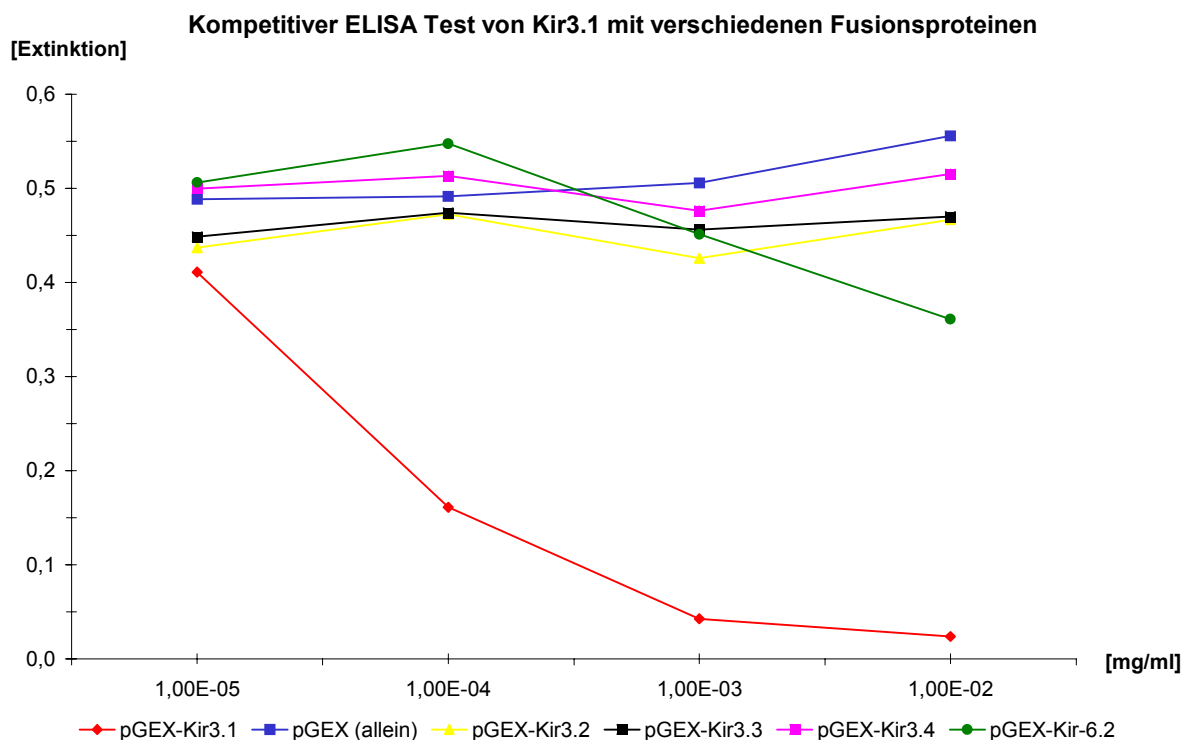


Abbildung 10 : Nur das spezifische Fusionsprotein wird erkannt

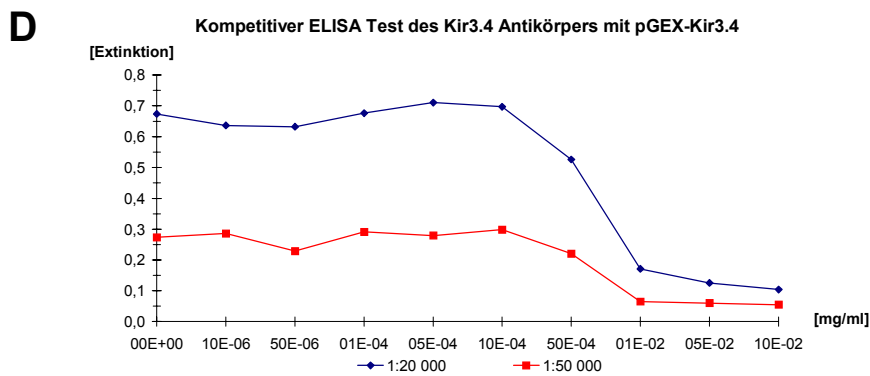
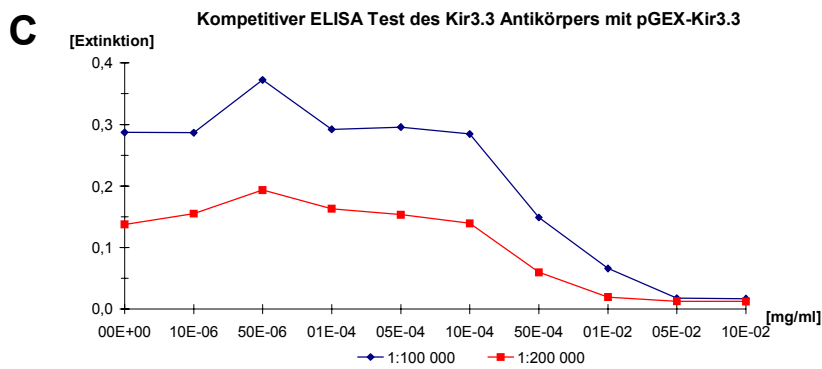
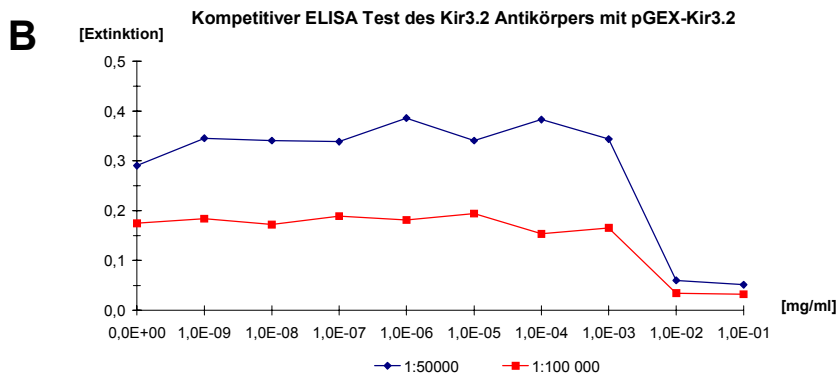
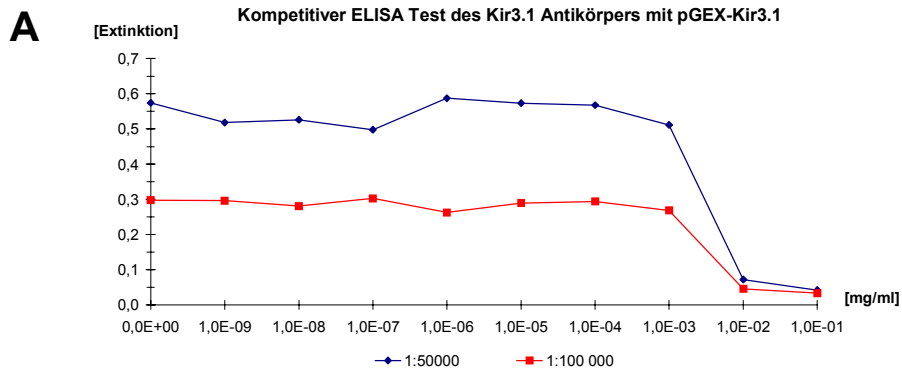
Der gereinigte und 1:30 000 verdünnte Antikörper Kir3.1 wurde in Verdünnungsreihen des reinen Trägerproteins (pGEX) und der vier verschiedenen pGEX-Kir3 Fusionsproteine inkubiert.

3.3.3 Blockade der Antikörper Kir3.1 bis Kir3.4

Die vollständige Blockierbarkeit aller vier Antikörper wurde mit kompetitiven ELISA Tests (Abbildung 11 auf Seite 70) bestätigt. Mit steigender Konzentration des jeweilig spezifischen Fusionsproteins konnte der entsprechende Antikörper blockiert werden.

Abbildung 11: (auf Seite 70) Kompetitive ELISA Tests

Dargestellt sind die kompetitiven ELISA Tests der gereinigten Antikörper von Kir3.1(A) bis Kir3.4 (D). Jeder der vier Antikörper war zuvor mit einer Verdünnungsreihe seines spezifischen Fusionsproteins inkubiert worden. Es wurden stets zwei Verdünnungen eingesetzt.



3.3.4 Spezifität der Antikörper im Rattenhirnhomogenat

In dem nächsten Schritt wurde getestet, ob die Antikörper neben dem Fusionsprotein auch das vollständige Kir-Kanalprotein erkennen konnten. Dafür wurden Wester-Blots mit Rattenhirnhomogenaten (Ganzhirn) verwendet.

Auf der folgenden Seite ist auf der Abbildung 12 zu erkennen, dass alle vier Antikörper (A-D) spezifische Banden im Rattenhirnhomogenat detektieren konnten (jeweils Spur1), die sich bei einer Präinkubation des Antikörpers mit seinem spezifischen Fusionsprotein auch blockieren ließen (Spur 2).

Tabelle 5: Die erwarteten Längen der vier Kir Kanalproteine im Rattenhirn betragen:

Protein	[KDa]	Bemerkung
Kir3.1	57	längste Splice-Variante
Kir3.2	49	längste Splice-Variante
Kir3.3	44	
Kir3.4	48	

Von den Proteinen Kir3.1 und Kir3.2 sind mehrere Splicevarianten bekannt, die auch von den gereinigten Antikörpern detektiert werden konnten. So wies der Kir3.1 Antikörper (A) drei distinkte Banden nach (Spur 1) (Nelson et al, 97), die sich blockieren ließen (Spur 2).

Kir3.2 kommt in drei Splicevarianten (a,b,c) im Gehirn vor. Sie unterscheiden sich nur in der Länge ihrer Carboxytermini. Der hier generierte Antikörper konnte davon zwei Varianten erkennen, die mit fast gleicher Größe (B, Spur 1) eine einzelne, aber etwas breitere Spur ergaben. Es sind die Splicevariante Kir3.2c mit der längsten Sequenz (425 Aminosäuren) und die 11 Aminosäuren kürzere Splicevariante Kir3.2a. Es war mit diesem Antikörper nicht möglich, die 98 Aminosäuren kürzere Splicevariante Kir3.2b zu erkennen (Inanobe et al, 99a), da zur Antikörpergenerierung nur die letzten 59 Aminosäuren des Carboxyterminus verwendet worden waren. Eine vierte im letzten Jahr bekannt gewordene Splicevariante (Kir3.2d), die sich nur durch einen 18 Aminosäuren kürzeren Aminoterminus vom Kir3.2c unterscheidet, ist bis jetzt nur im Hoden von Mäusen nachgewiesen worden (Inanobe et al, 99b).

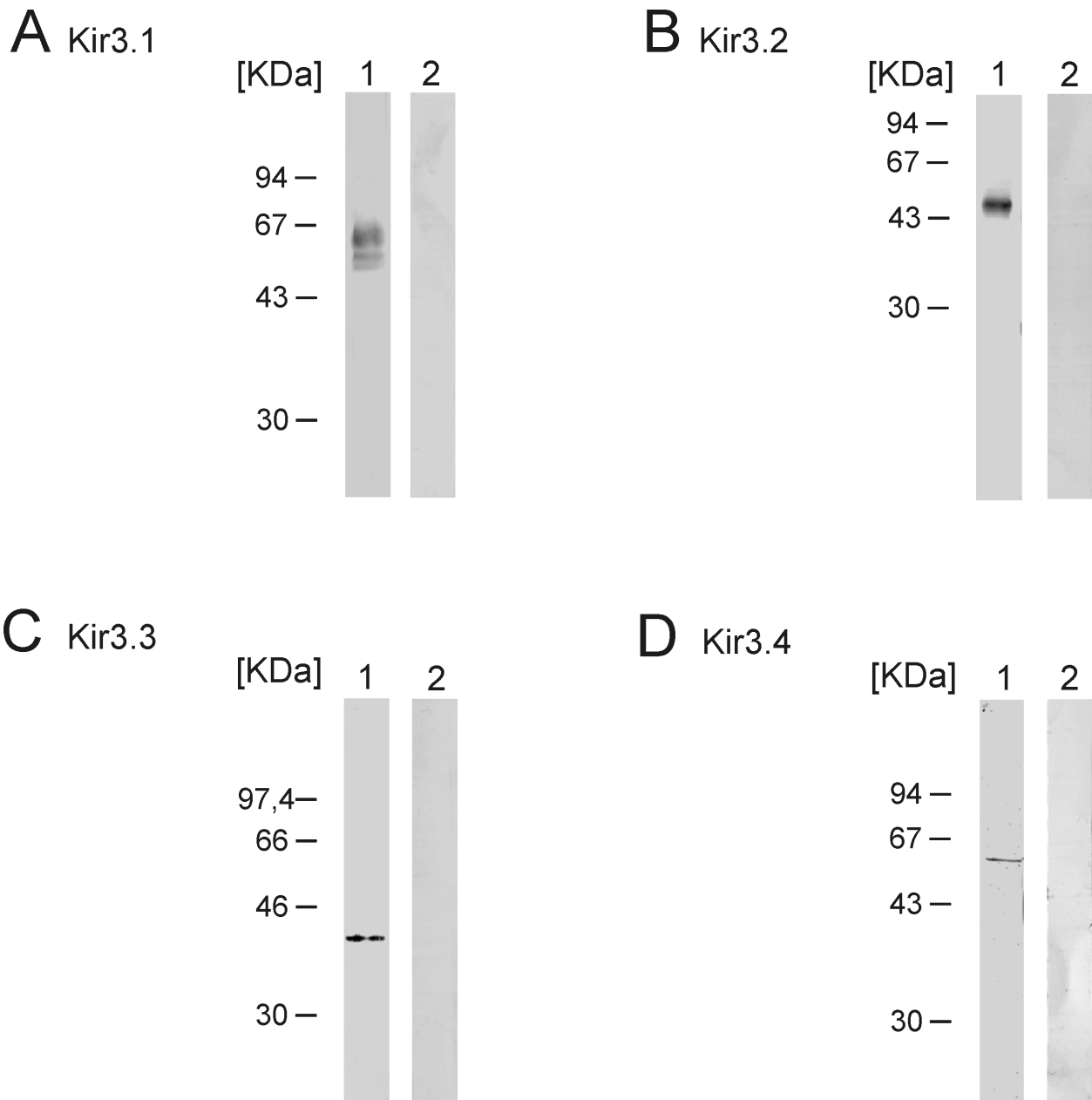


Abbildung 12: Spezifische Banden im Ganzhirnhomogenat

Die Antikörper Kir3.1(A) bis Kir3.4 (D) erkennen spezifische Banden der Kir3 Proteine im Rattengehirnhomogenat (Spur 1), die durch eine Vorinkubation des Antikörpers mit dem jeweiligen Fusionsprotein vollständig blockiert werden können (Spur 2).

3.3.5 Spezifität der Antikörper im Rattengehirn

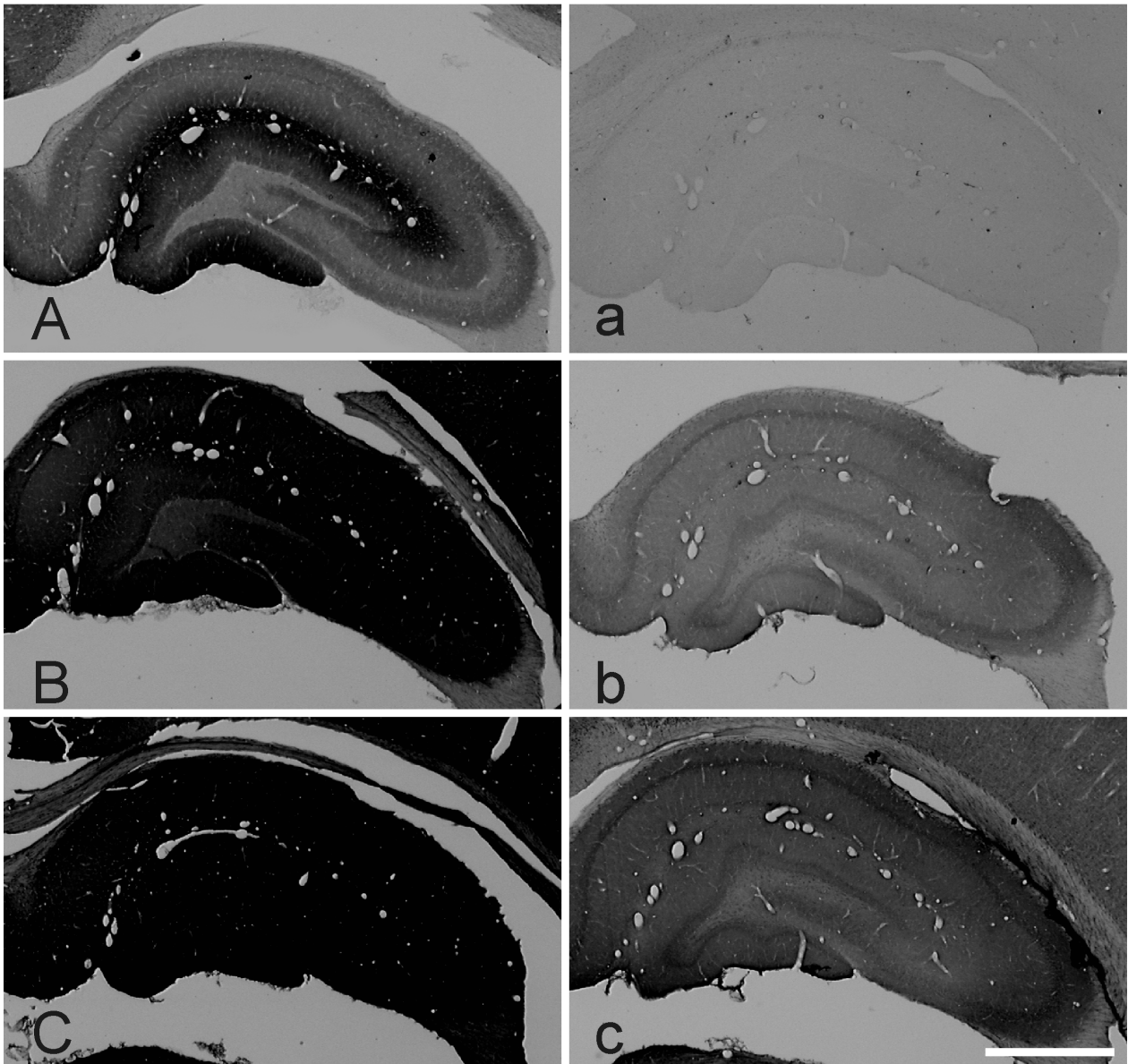
Die Kanalproteine der Kir3 Familie sind im Gehirn sehr unterschiedlich verteilt. Um die Spezifität der vier Antikörper auch *in situ* testen zu können, wurde der Hippocampus ausgewählt. In dieser Region war ein gemeinsames Vorkommen aller vier Kir3-Kanäle bereits beschrieben worden (Karschin et al, 96; Liao et al, 96; Ponce et al, 96; Drake et al, 97; Iizuka et al, 97; Miyashita und Kubo, 97; Murer et al, 97; Wickman et al, 00).

Auf den folgenden Seiten sind in den Abbildungen 13 bis 16 die Ergebnisse der Inkubationen mit den neuen Antikörpern dargestellt. Für die Abbildungen der linken Spalte (Großbuchstaben A, B, C) waren die Antikörper unblockiert zum Schnitt gegeben worden. In der rechten Spalte (Kleinbuchstaben a,b,c) war der Antikörper zuvor durch eine Inkubation mit dem jeweiligen spezifischen Fusionsprotein blockiert worden. Jeder Antikörper wurde in drei Verdünnungen eingesetzt. Die höchste Verdünnung (A,a) entspricht der Verwendung des Antikörpers in der Lichtmikroskopie, die niedrigste Verdünnung (C,c) der für die in der Elektronenmikroskopie verwendeten Verdünnung.

Kir3.1

nicht blockiert

blockiert

**Abbildung 13: Blockade des Kir3.1 Antikörpers**

Der Antikörper wurde in den drei Verdünnungen A,a (1:1000), B,b (1:200) und C,c (1:50) im Hippocampus der Ratte getestet.

Der Maßstab für die Abbildungen entspricht 1 mm.

Kir3.2

nicht blockiert

blockiert

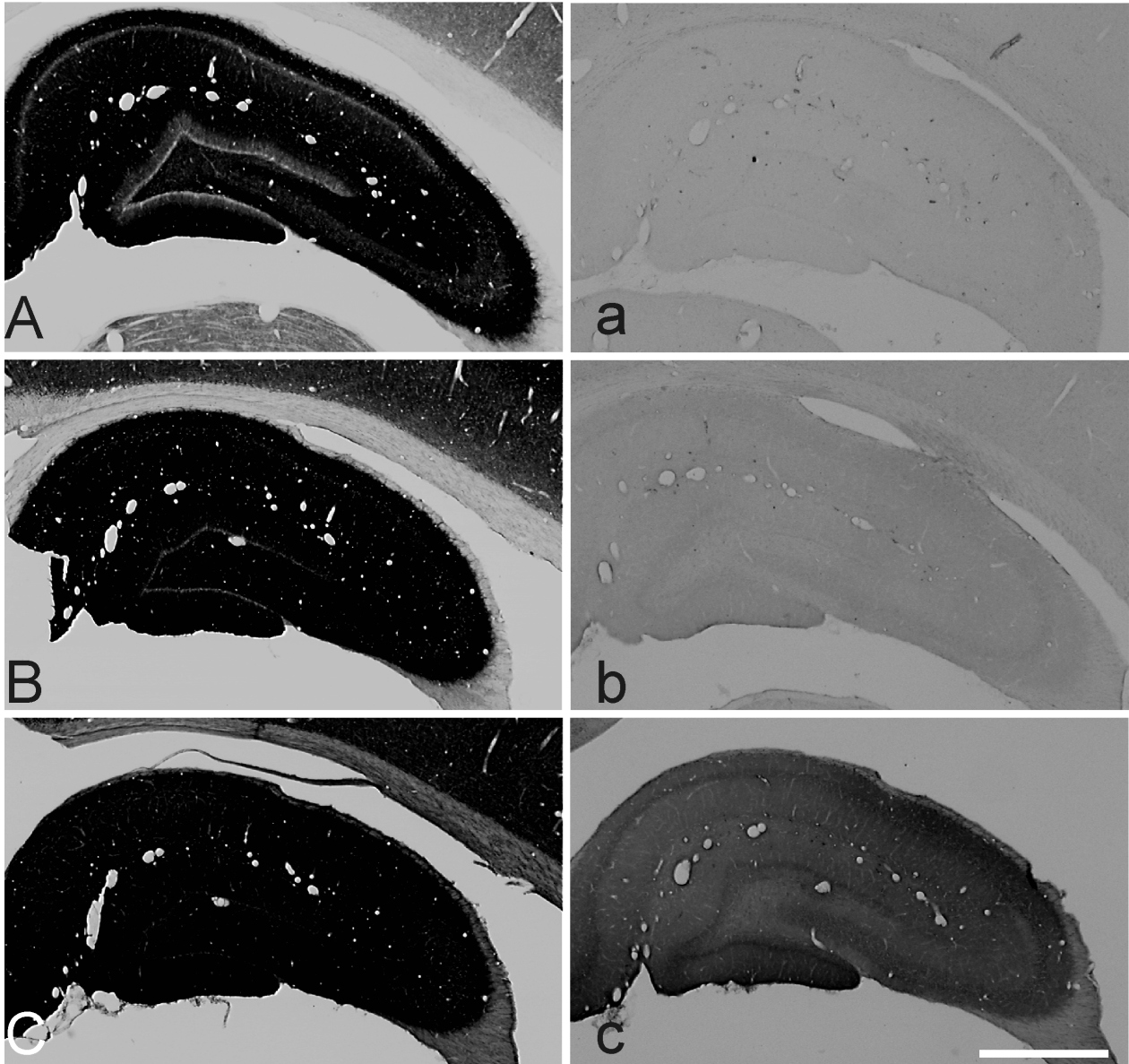


Abbildung 14: Blockade des Kir3.2 Antikörpers

Der Antikörper wurde in den drei Verdünnungen A,a (1:1000), B,b (1:200) und C,c (1:50) im Hippocampus der Ratte getestet.

Der Maßstab für die Abbildungen entspricht 1 mm.

Kir3.3

nicht blockiert

blockiert

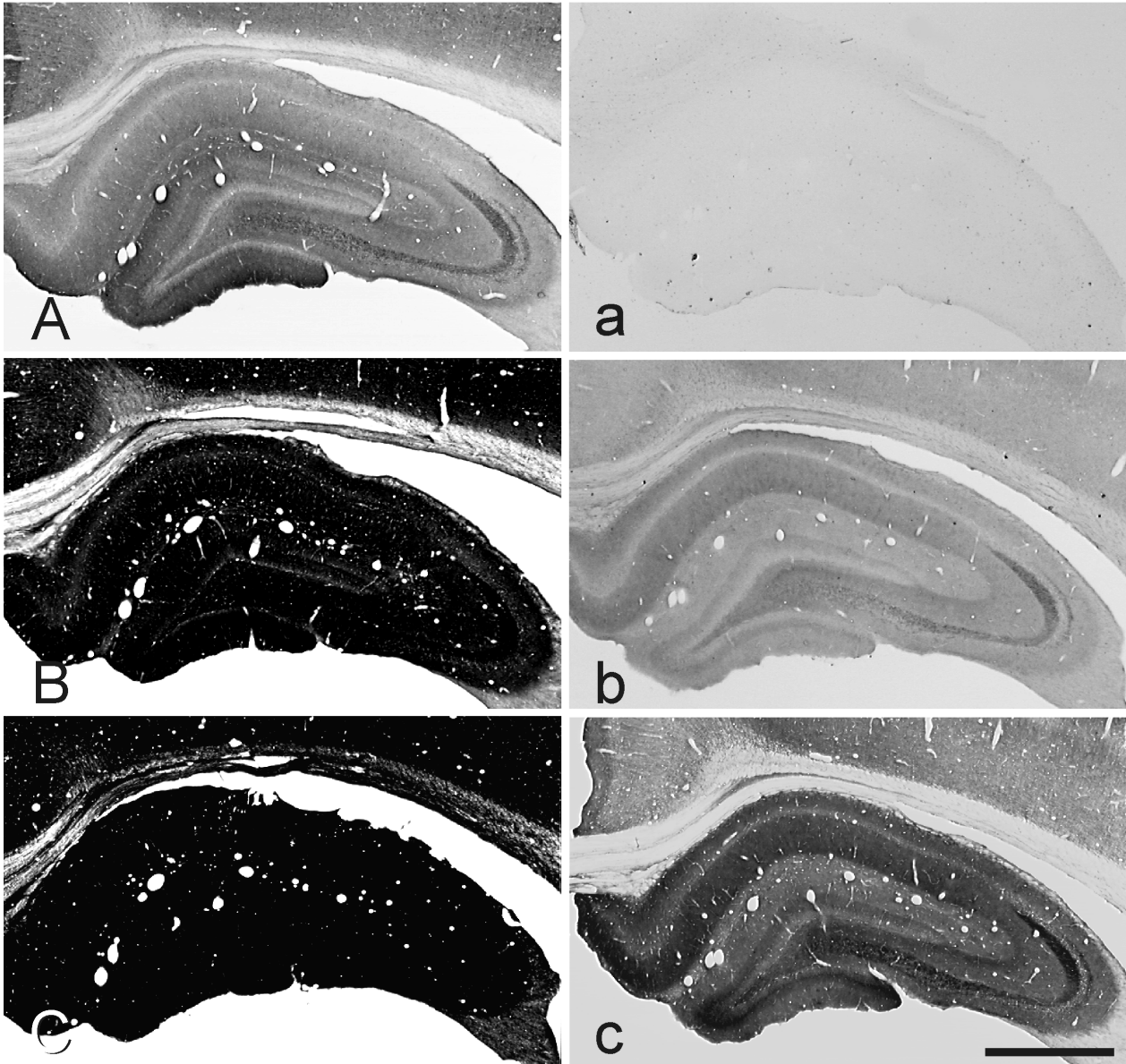


Abbildung 15: Blockade des Kir3.3 Antikörpers

Der Antikörper wurde in den drei Verdünnungen A,a (1:5000), B,b (1:1000) und C,c (1:200) im Hippocampus der Ratte getestet.

Der Maßstab für die Abbildungen entspricht 1 mm.

Kir3.4

nicht blockiert

blockiert

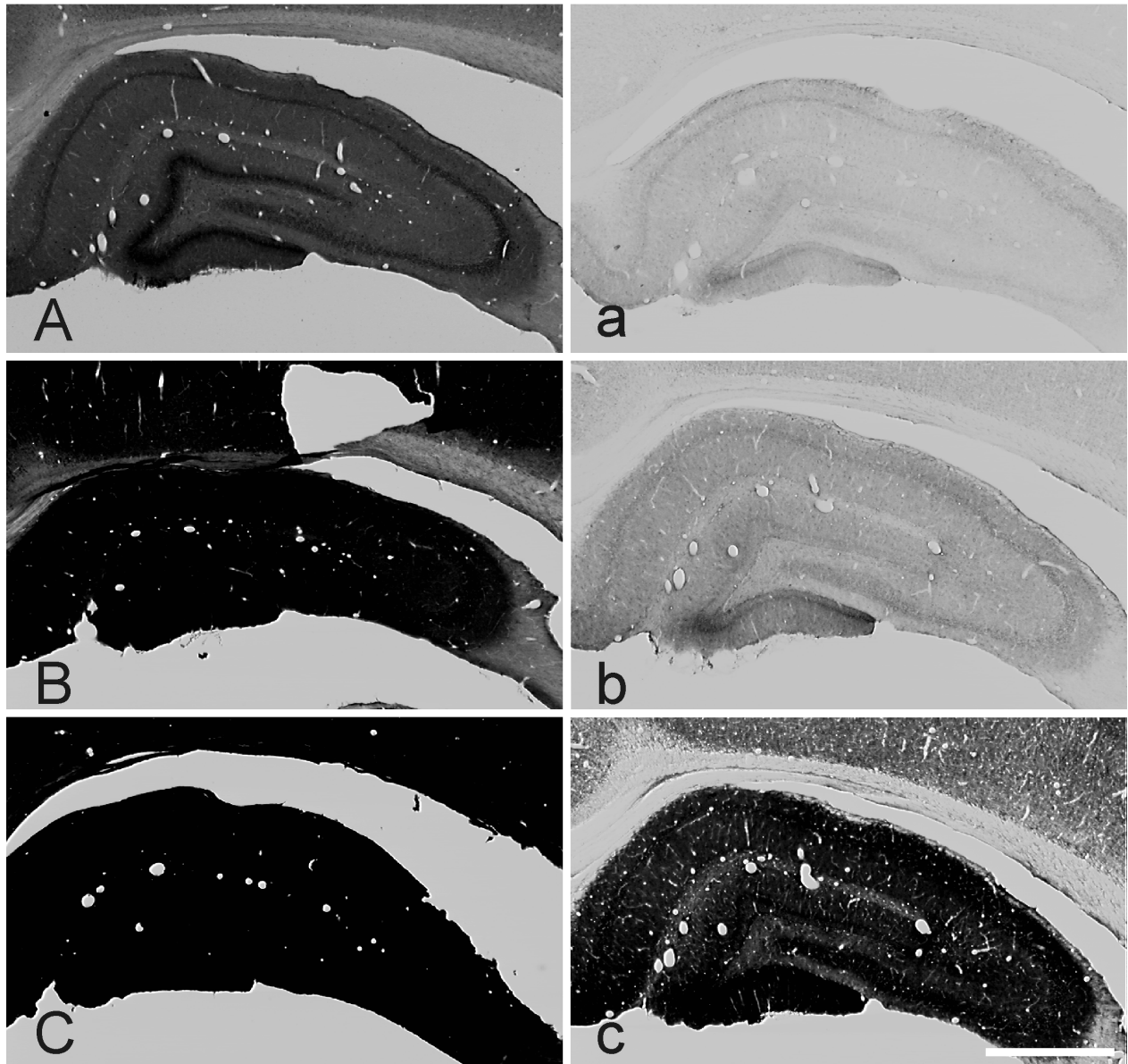


Abbildung 16: Blockade des Kir3.4 Antikörpers

Der Antikörper wurde in den drei Verdünnungen A,a (1:200), B,b (1:100) und C,c (1:20) im Hippocampus der Ratte getestet.

Der Maßstab für die Abbildungen entspricht 1 mm.

3.4 Ergebnisse der Lichtmikroskopie

3.4.1 Tyrosinhydroxylase als Nachweis für dopaminerge Neurone

Die meisten der Projektionsneurone im ventralen Mesencephalon sind dopaminerg. Dopamin gehört neben Noradrenalin und Adrenalin zu den Catecholaminen, deren Synthese aus der Aminosäure Tyrosin in der folgenden Abbildung dargestellt ist. Für den Nachweis von Dopamin ist das den Syntheseweg limitierende Enzym Tyrosinhydroxylase ausreichend, weil im ventralen Mesencephalon weder Noradrenalin noch Adrenalin vorkommen (Hökfelt et al, 84)

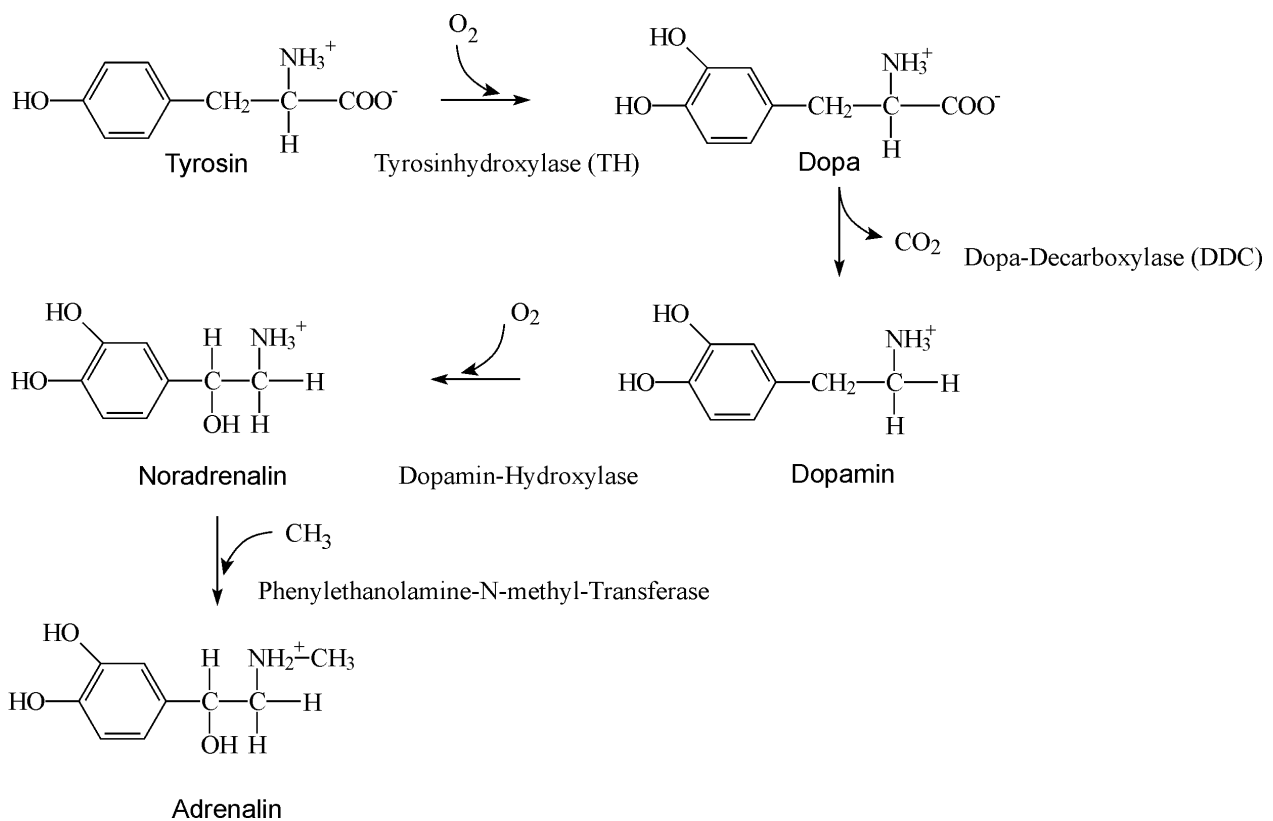


Abbildung 17: Syntheseweg der Catecholamine

Ausgehend von der Aminosäure Tyrosin ist der Syntheseweg der Catecholamine dargestellt. Das die Catecholaminsynthese limitierende Enzym ist Tyrosinhydroxylase.

3.4.2 Charakterisierung der dopaminergen Zellgruppen im ventralen Mesencephalon des Rattengehirns

Im Mesencephalon sind 3 dopaminerge Neuronenfelder (A8, A9 und A10) bekannt (Dahlström und Fuxe, 64). Die ventrolateral gelegenen dopaminergen Neurone des A9 Feldes gehören zur Substantia nigra (SN) und die ventromedial gelegenen dopaminergen Neurone des Feldes A10 zur Area tegmentalis ventralis (VTA). Posterior von diesen beiden Gebieten liegt das Feld A8 Retrorubrales Feld. Substantia nigra und Area tegmentalis ventralis sind zwei unmittelbar benachbart liegende Gebiete, deren Abgrenzung voneinander nicht eindeutig beschrieben ist. Zur lateral gelegenen Substantia Nigra werden zwei Abschnitte gezählt, die sowohl neurochemisch als auch funktional sehr heterogen sind. Die Substantia Nigra pars reticulata (SNr) ist eine zum Pallidum gehörende Struktur, die reich an GABAergen Neuronen ist. Die SNr ist eine wichtige Ausgangsstelle aus den Basalganglienschleifen (Abbildung 3) und hat wenig Ähnlichkeiten mit der sie dorsal überlagernden Substantia Nigra pars compacta (SNc). Nur in der SNc sind dopaminerge Neurone. Die SNc kann in zwei Schichten unterteilt werden, zum einen in eine die SNr dorsal umarmende Schicht, die Substantia Nigra pars compacta, dorsalis (SNcd) und zum anderen aus fingerförmigen in die SNr hineinragenden Ausläufern, der Substantia Nigra pars compacta, ventralis (SNcv). Der laterale Ausläufer der SNcd wird als Substantia Nigra pars lateralis (SNl) bezeichnet.

Die im ventralen Mesencephalon medial gelegene Area tegmentalis ventralis (VTA) schließt unmittelbar an die SN an und überlagert sie dorsal sogar mit einem seitlichen Streifen. Eine genaue Definition und Abgrenzung der Unterkerne der VTA existiert nicht. Es gibt unterschiedliche und auch widersprüchliche Aussagen über die Zahl und Lage der Unterkerne in der VTA. Sie werden in bis zu 7 verschiedene Unterkerne unterteilt (McRitchie et al, 96). In allen Unterkernen dominieren die dopaminergen Projektionsneurone. In der folgenden kurzen Beschreibung aller Unterkerne wird die Unterteilung von McRitchie angewandt.

In rostro-caudaler Orientierung verläuft im medialen Bereich der VTA ein Band von zwei zellarmen Unterkernen. Der rostral gelegene Nucleus rostralis linearis (RLi) wird caudal vom Nucleus caudalis linearis (CLi) abgelöst. Ventral vom Band aus RLi und CLi befindet sich der einzige unpaare Unterkern der VTA, der Nucleus interfascicularis (IF). Die Bezeichnung interfascicularis stammt von der lateralen Begrenzung durch den Fasciculus retroflexus. Die Neurone sind relativ klein und dicht angeordnet. Zwischen IF und SN befindet sich in mediolateraler

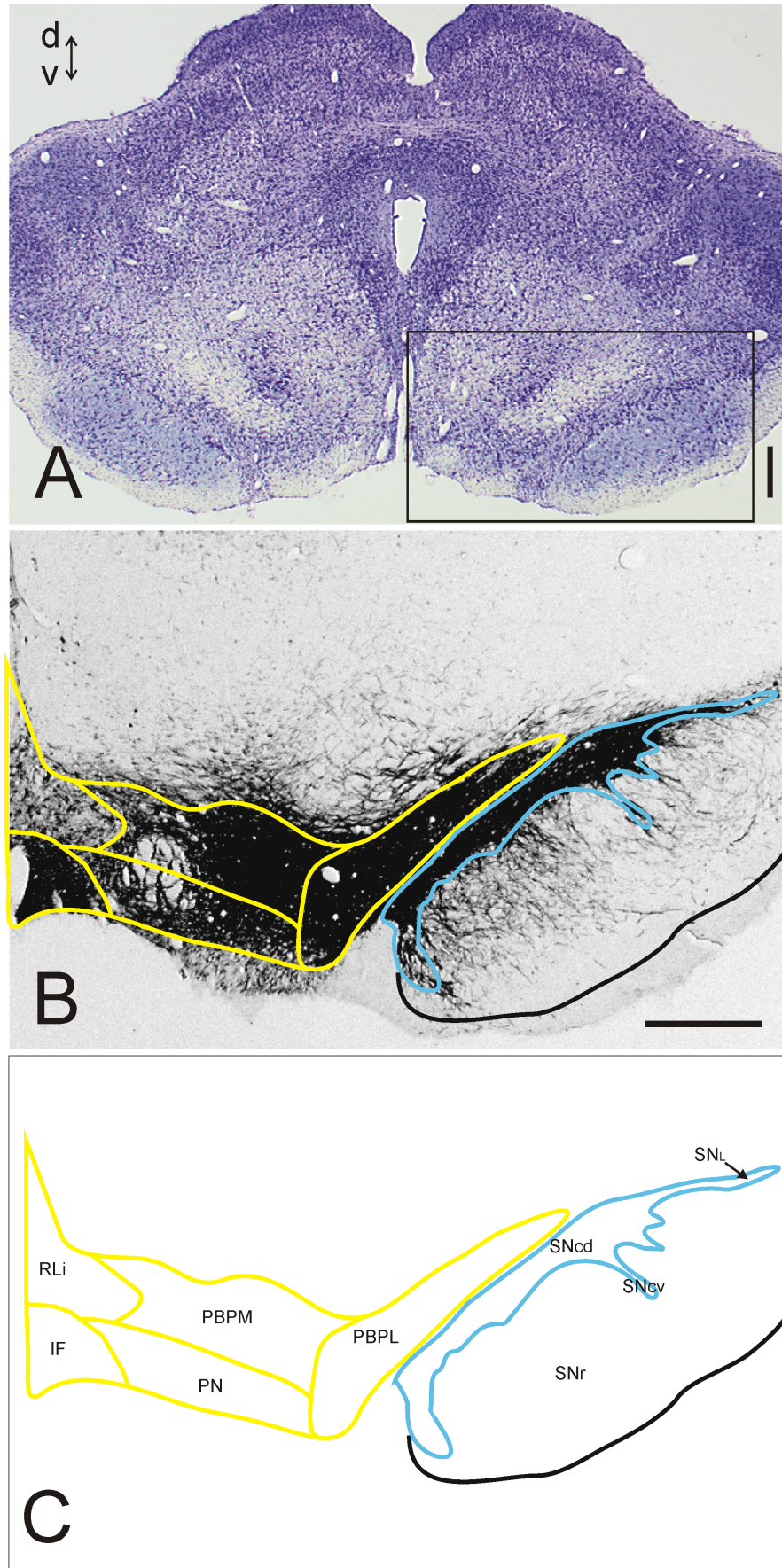
Ausdehnung der Nucleus paranigralis (PN). In selber Orientierung, aber rostral der Austrittsstelle des Nervus oculomotorius befindet sich der Unterkern Nucleus parapeduncularis (PaP).

Dorsal von PN als auch PaP gelegen, befindet sich der Nucleus pigmentosus parabrachialis, der aus einem medialen und einem lateralen Abschnitt besteht. Diese beiden Bereiche werden in der neueren Literatur in zwei Subnuclei getrennt (McRitchie et al, 96), für die jedoch keine eindeutigen Bezeichnungen existieren. Im Folgenden wird der mediale Bereich als Nucleus pigmentosus parabrachialis pars medialis (PBPM) und der laterale Bereich als Nucleus pigmentosus parabrachialis pars lateralis (PBPL) bezeichnet.

Abbildung 18:(auf der folgenden Seite) Subnuclei von VTA und SNc

A: Kresylviolettgefärbter Transversalschnitt durch das Mesencephalon der Ratte, auf der Höhe der vorderen Vierhügel. Eingerahmt ist der in der folgenden Abbildung (B) dargestellte Ausschnitt. Zur Orientierung sind dorsale (d) und ventrale (v) Orientierung eingezeichnet. **B:** Projektion der Subnuclei von VTA und SN auf einen mit Tyrosinhydroxylase Antikörper markierten Schnitt. Die Subnuclei sind farbig markiert: VTA = gelb; SNc = blau und SNr = schwarz umrandet. **C:** Schematische Lage der Subnuclei zueinander (aus B).

Der Maßstab für die Abbildungen A und B entspricht 0,5 mm.



3.4.3 Chemoarchitektur des ventralen Mesencephalons

Um die dopaminergen Neuronengruppen von VTA und SNc unterscheiden zu können, wurden zahlreiche Antikörper gegen verschiedene neuroaktive Substanzen eingesetzt. Intensität und die relative Anzahl markierter Zellkörper wurden lichtmikroskopisch ausgewertet. Zusätzlich wurde in die Auswertung, als Außengruppenvergleich, die SNr mit einbezogen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 6 auf der folgenden Seite aufgelistet.

Neben Tyrosinhydroxylase wurde die Verteilung 16 weiterer neuroaktiver Substanzen überprüft. Das Ergebnis ist, dass sich Tyrosinhydroxylase als Marker für die dopaminergen Neurone im ventralen Mesencephalon (s. o.) in allen Unterkernen von VTA und SNc eindeutig und dominant nachweisen ließ. Es konnten keine auffälligen Unterschiede in der Tyrosinhydroxylaseverteilung in den Unterkernen und zwischen den beiden Arealen SNc und VTA wahrgenommen werden.

Alle anderen getesteten 16 neuroaktiven Substanzen ergaben ebenfalls keine auffälligen Unterschiede in ihrer Verteilung sowohl in den Unterkernen als auch zwischen VTA und SNc. Unterschiede konnten jedoch im Vergleich zur SNr bestätigt werden. So war beispielsweise von den Calcium bindenden Proteinen Parvalbumin ausschließlich auf die SNr beschränkt, während sowohl Calbindin als auch Calretinin auch in VTA und SNc nachweisbar waren.

Tabelle 6: Lichtmikroskopie: Verteilung von Tyrosinhydroxylase und verschiedenen neuroaktiven Substanzen in VTA und SN des Rattengehirnes bei einer mittleren Schnittebene

Die Intensität und relative Anzahl markierter Zellkörper (ZK) und Fasern (Axone oder Dendriten) (F) wurde mit sehr stark (+++), stark (++), mittel (+) schwach (+/-) oder fehlend (-) wiedergegeben.

	Ventral Tegmental Area										Substantia Nigra					
	Rli		IF		PN		PBPM		PBPL		SNcd		SNcv		SNr	
	ZK	F	ZK	F	ZK	F	ZK	F	ZK	F	ZK	F	ZK	F	ZK	F
TH	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	++
Parvalbumin	+/-	+/-	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	++	++
Calbindin	+	+	+	++	+	++	+	+	+	+	-	+	-	+	+/-	+++
Calretinin	+	+	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	+
CCK ₈	+	+	+	++	++	+	++	+	++	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+
GABA	-	+/-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	++
GAD ₆₇	-	+/-	+	++	+	++	+	++	+	++	-	++	+/-	++	+	+++
Neurotensin	-	+/-	-	+	-	+/-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-
Serotonin	-	+/-	-	+	-	+	-	+	-	+/-	-	+	-	+	-	+
Leu-Enkephalin	-	+/-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
μ-Opioid Rez. 1A	-	+/-	-	+	-	+	+/-	+	-	+	-	+/-	-	+/-	-	-
δ-Opioid Rez. 1A	-	+/-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	++	-	++	+	+++
SP	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	++	-	++	-	+++
NK-B	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+/-	++	+/-	++	+	+++
Glycin-Transp. 2	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+	+/-	+
CHAT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VACH Transp.	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	-	-	-	-	-

3.4.4 Lichtmikroskopische Verteilung der Kir3-Kanäle in VTA und SN

Mit Antikörpern gegen Tyrosinhydroxylase und 16 weitere neuroaktive Substanzen konnten somit keine Unterschiede zwischen VTA und SNc gefunden werden. Als nächstes sollte die Frage beantwortet werden, wie die Kanalproteine Kir3.1 bis Kir3.4 in dieser Region verteilt sind. Aus der Literatur waren bisher nur ungenaue und nicht einheitliche Angaben bekannt. In der folgenden Tabelle sind diejenigen Autoren zusammengefasst, die in dieser Region entweder Protein oder mRNA nachweisen konnten.

Tabelle 7: Folgende Autoren fanden Hinweise für ein Vorkommen der Kir3-Kanalproteine im ventralen Mesencephalon der Ratte.

	VTA		SNc	
	Protein	mRNA	Protein	mRNA
Kir3.1	(Liao et al, 96)	(DePaoli et al, 94) (Karschin et al, 94)	(Liao et al, 96) (Miyashita und Kubo, 97)	
Kir3.2	(Liao et al, 96) (Murer et al, 97)	(Karschin et al, 96)	(Liao et al, 96) (Murer et al, 97)	(Karschin et al, 96)
Kir3.3		(Karschin et al, 96)		(Karschin et al, 96)
Kir3.4				(Iizuka et al, 97)

Die Angaben der Autoren sind bezüglich der Proteinverteilung im ventralen Mesencephalon der Ratte sehr ungenau, Angaben über eine Verteilung in den Subnuclei dieser Region fehlen vollständig. In den folgenden Versuchen wurde daher die Verteilung der vier Kir3-Kanalproteine mit den neuen, gereinigten Antikörpern lichtmikroskopisch überprüft. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 19 auf der folgenden Seite zusammengestellt.

Sehr auffällig ist die Verteilung von Kir3.2. Sowohl in der SNc als auch in der VTA läßt sich das Kanalprotein eindeutig nachweisen. Die Verteilung stimmt mit der Tyrosinhydroxylaseverteilung weitgehend überein, ist aber nicht in allen Unterkernen homogen. Der Nachweis von Kir3.2 ist medial am schwächsten und nimmt Richtung lateral zu (siehe Kapitel 3.4.6 der Ergebnisse).

Die Verteilung der anderen Kir3-Kanalproteine Kir3.1, Kir3.3 sowie Kir3.4 ist weniger auffällig. Eine sehr homogene und schwache Färbung ist sowohl in der VTA als auch in der SNc vorhanden.

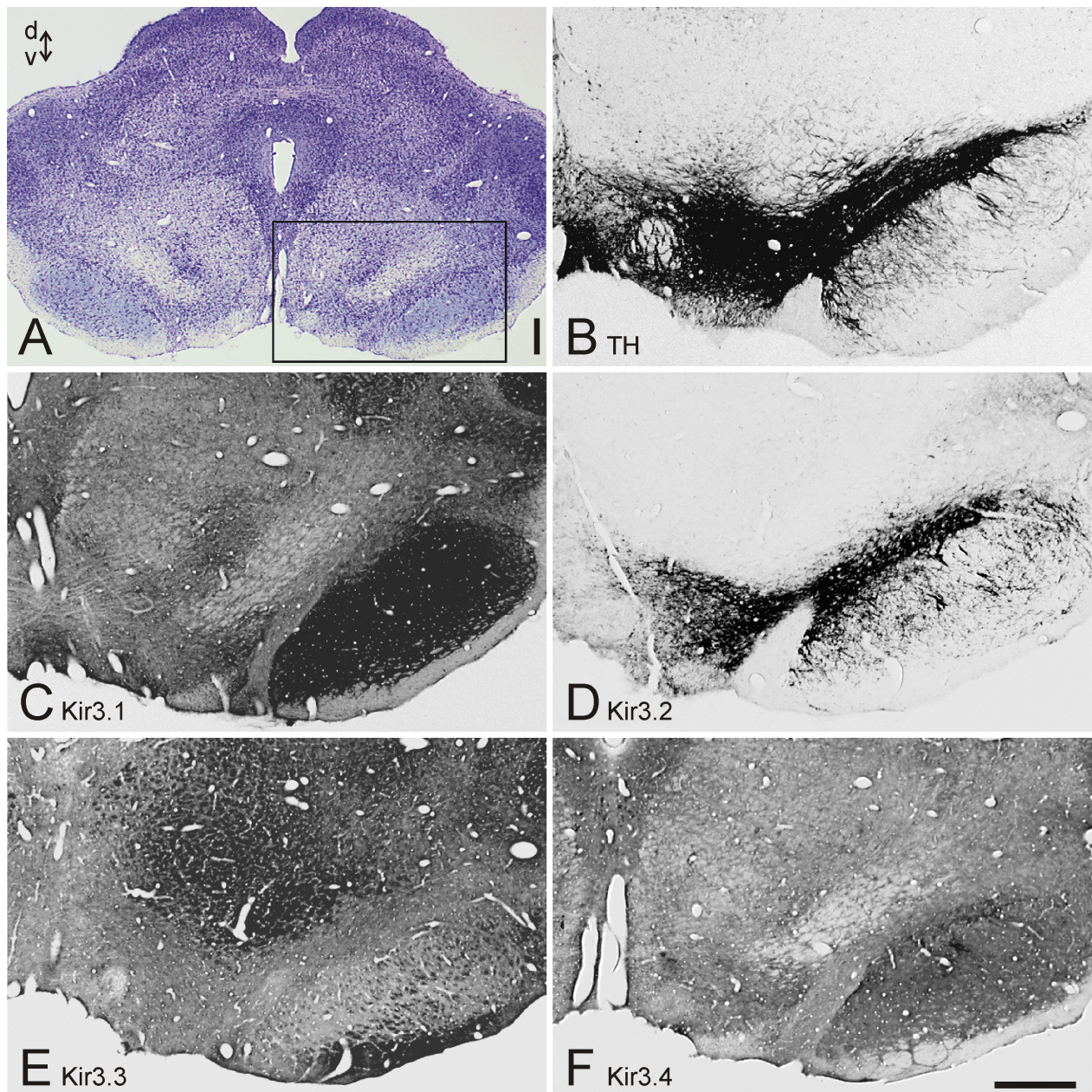


Abbildung 19: Lichtmikroskopie der Kir3.X Kanäle und Tyrosinhydroxylase

A: Kresylviolettgefärbter Transversalschnitt durch das Mesencephalon der Ratte. Eingerahmt ist der in den folgenden Abbildungen (B-F) dargestellte Ausschnitt. Zur Orientierung sind dorsale (d) und ventrale (v) Orientierung eingezeichnet. B: Tyrosinhydroxylase-Vorkommen im ventralen Mesencephalon. C-F: Kir3.1, Kir3.2, Kir3.3 und Kir3.4 Verteilung.

Der Maßstab für die Abbildungen A und B-F entspricht 0,5 mm.

3.4.5 Nachweis der Kolokalisation von TH und Kir3.2

Die bisherigen Ergebnisse ließen eine zumindest teilweise Kolokalisation von Kir3.2 und Tyrosinhydroxylase in einigen der Unterkerne von VTA wahrscheinlich erscheinen lassen. Zur Überprüfung dieser Beobachtungen wurden fluoreszenzmikroskopische Doppelmarkierungsversuche durchgeführt (Abbildungen 20 und 21).

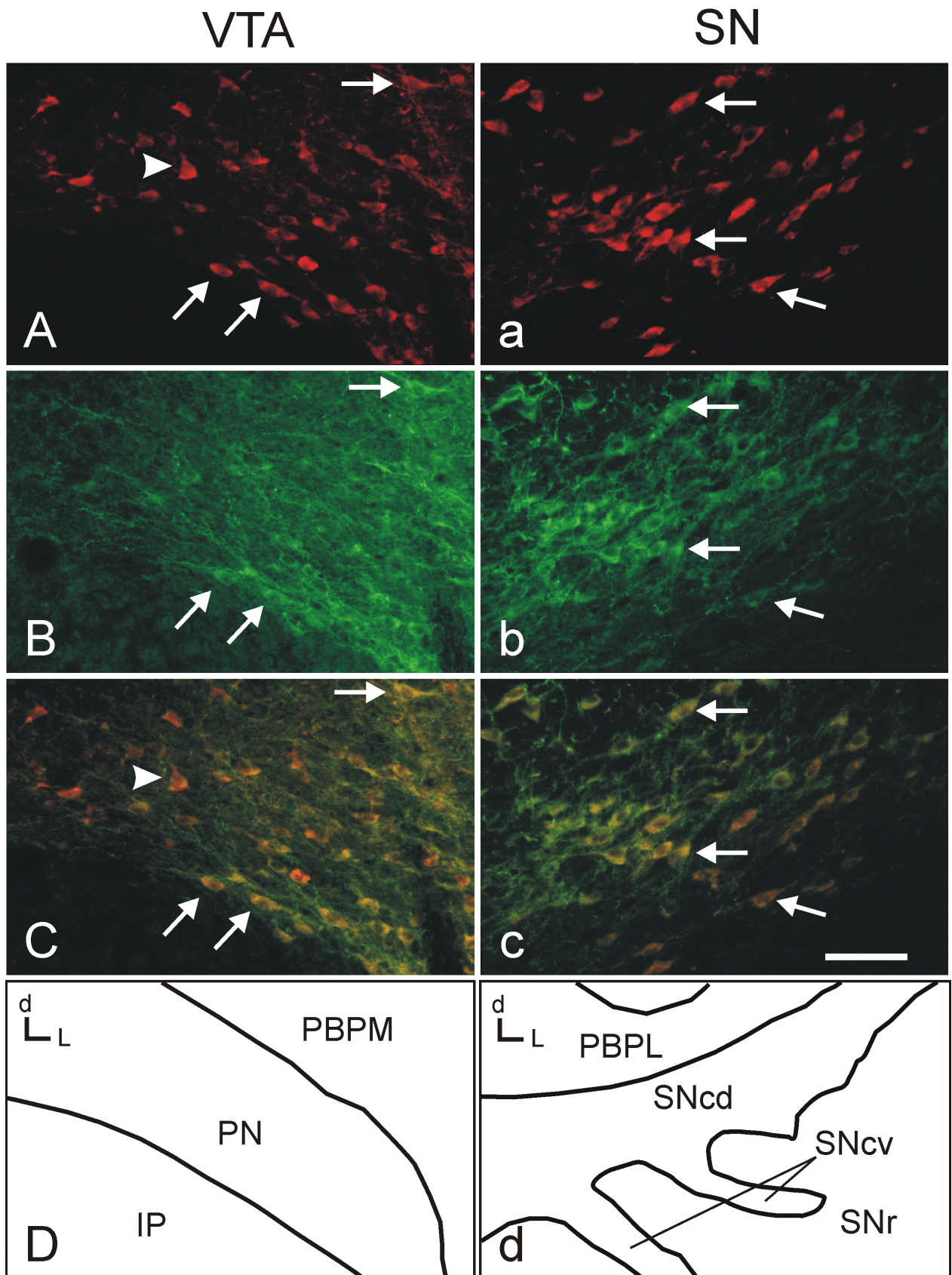
In beiden Schichten der SNc konnte nachgewiesen werden, dass nahezu alle Tyrosinhydroxylase positiven Neurone dort zugleich auch Kir3.2 positiv waren (Abbildung 20).

Die Verteilung von Tyrosinhydroxylase und Kir3.2 in den Unterkernen der VTA war heterogener. Als Kontrolle diente der außerhalb der VTA gelegene Nucleus interpeduncularis, der sich von den Unterkernen der VTA klar abgrenzte. In ihm waren weder dopaminerge noch Kir3.2 positive Neurone nachzuweisen (Abbildung 21).

In den meisten der Unterkerne (RLi, CLi, PaP und PBPL) war wie in der SNc jedes Tyrosinhydroxylase positive Neuron zugleich auch Kir3.2 positiv. In den Unterkernen PN, PBPM und IF aber kam es zu Unterschieden in der Verteilung. So konnten im PBPM zusätzlich einige Tyrosinhydroxylase positiven Neurone gefunden werden, die nicht zugleich Kir3.2 positiv waren. Noch deutlicher unterschied sich die Verteilung im IF der VTA. In diesem Unterkern konnte lichtmikroskopisch kein Kir3.2 Kanalprotein nachgewiesen werden, obwohl zahlreiche Tyrosinhydroxylase positive Neurone gefunden wurden (Abbildung 21).

Abbildung 20: Fluoreszenzmikroskopie von Tyrosinhydroxylase und Kir3.2 in VTA und SN
Linke Spalte VTA, rechte Spalte SN mit lateralem Arm der VTA. **A, a:** Tyrosinhydroxylase **B, b:** Kir3.2 und **C, c:** Doppelbelichtung **D, d:** Schema zur Orientierung mit der Lage der Unterkerne. Zur Orientierung sind dorsale und laterale (l) Orientierung eingezeichnet. Die Pfeile weisen auf Zellen hin, die sowohl Tyrosinhydroxylase als auch Kir3.2 positiv sind. Die Pfeilspitze weist auf eine Zelle hin, die nur Tyrosinhydroxylase positiv ist. IP = Nucleus interpeduncularis.

Der Maßstab für die Abbildungen entspricht 100 μm .



3.4.6 Keine Kollokalisierung von TH und Kir3.2 im IF

Es war bereits bekannt, dass im IF der VTA bei der Maus Kir3.2 lichtmikroskopisch nicht nachweisbar ist. Dieselbe Beobachtung konnte mit dem folgenden fluoreszenzmikroskopischen Versuch auch bei der Ratte bestätigt werden. Obwohl im IF zahlreiche Tyrosinhydroxylase positive Neurone nachgewiesen werden konnten, gab es keinen Hinweis auf das Kir3.2 Kanalprotein.

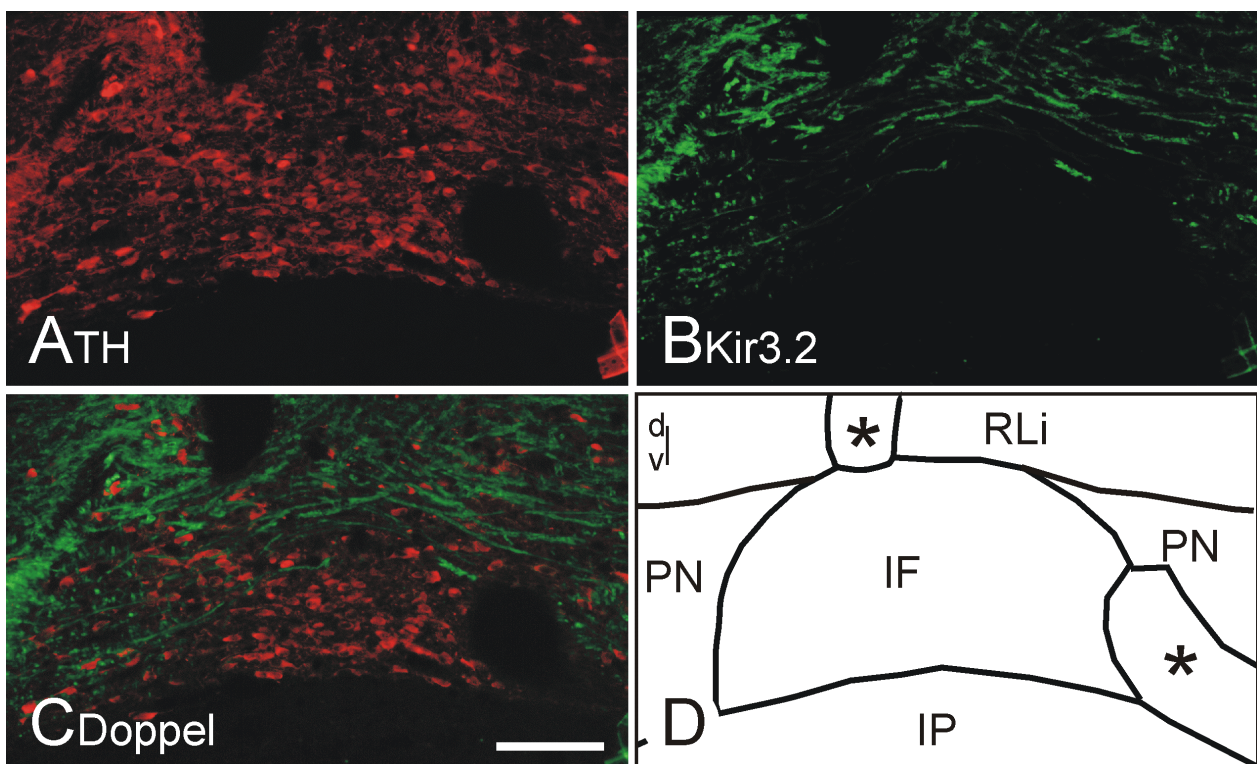


Abbildung 21: Fluoreszenzmikroskopie von Tyrosinhydroxylase und Kir3.2 im IF der VTA

A: Tyrosinhydroxylase, **B:** Kir3.2 und **C:** Doppelbelichtung **D:** Schema zur Orientierung mit der Lage der Unterkerne. Zur Orientierung sind dorsale (d) und ventrale (v) Orientierung eingezeichnet. Mit den Sternen sind zwei Blutgefäße gekennzeichnet.

Der Maßstab für die Abbildungen entspricht 100 μm .

3.4.7 Zusammenfassung der lichtmikroskopischen Ergebnisse

In der folgenden Tabelle ist die Verteilung von Tyrosinhydroxylase und aller vier Kir3-Kanalproteine nach der lichtmikroskopischen Auswertung zusammengefasst.

Tabelle 8: Lichtmikroskopie: Verteilung von TH und der vier Kir3 Proteine in VTA und SN des Rattengehirnes bei einer mittleren Schnittebene.

Die Intensität und relative Anzahl markierter Zellkörper (ZK) und Fasern (F) wurde mit sehr stark (+++), stark (++), mittel (+) schwach (+/-) oder fehlend (-) wiedergegeben. Mit grauer Farbe hinterlegt ist die identischen Verteilung (Ausnahme IF) von TH und Kir3.2 in VTA und SNc markiert.

	Ventral Tegmental Area										Substantia Nigra					
	Rli		IF		PN		PBPM		PBPL		SNcd		SNcv		SNr	
	ZK	F	ZK	F	ZK	F	ZK	F	ZK	F	ZK	F	ZK	F	ZK	F
TH	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	++
Kir3.1	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	+/-	+/-	++
Kir3.2	+/-	+	-	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	++
Kir3.3	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	++
Kir3.4	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	++

3.5 Ergebnisse der Elektronenmikroskopie

3.5.1 Verteilung von Kir3.2

In den nächsten Versuchen wurde die ultrastrukturelle Verteilung des Kir3.2 Kanalproteins sowohl allein als auch mit Doppelmarkierungen mit Tyrosinhydroxylase in VTA und SNc untersucht.

Im medialen Kern der VTA, dem Nucleus interfascicularis, wurden keine Neurone gefunden, in deren Cytoplasma oder an deren Plasmamembran Hinweise für das Kir3.2 Kanalprotein gefunden

wurden (Abbildung 22, A,B). Im selben Nucleus wurden jedoch Kir3.2 positive Dendriten nachgewiesen, deren zugehörige Somata sich nicht im Nucleus interfascicularis befinden können (Abbildung 22, C,D).

Mit Doppelmarkierungsversuchen konnte gezeigt werden, dass die Kir3.2 negativen Neurone im Nucleus interfascicularis dopaminerg sind (Abbildung 23, A,B). Außerhalb dieser medialen VTA Region wurde das Kanalprotein sowohl an der Plasmamembran von dopaminergen Dendriten (Abbildung 23, D), als auch im Cytoplasma und an der Plasmamembran von dopaminergen Somata gefunden (Abbildung 23, C).

Eine Koloalisation des Kir3.2 Kanalproteins mit dopaminergen Neuronen konnte in allen Unterkernen von VTA und SNc außerhalb des Nucleus interfascicularis nachgewiesen werden. Es wurden keine Unterschiede zwischen diesen Unterkernen bezüglich ihrer Kir3.2 Verteilung gefunden.

Legende für die folgenden elektronenmikroskopischen Bilder:

*At = Axonterminalie; Ax = Axon; Den = Dendrit; ER = Endoplasmatisches Retikulum;
g = Golgi-Apparat; Mit = Mitochondrium; Nuc = Nuclues; PM = Plasmamembran*

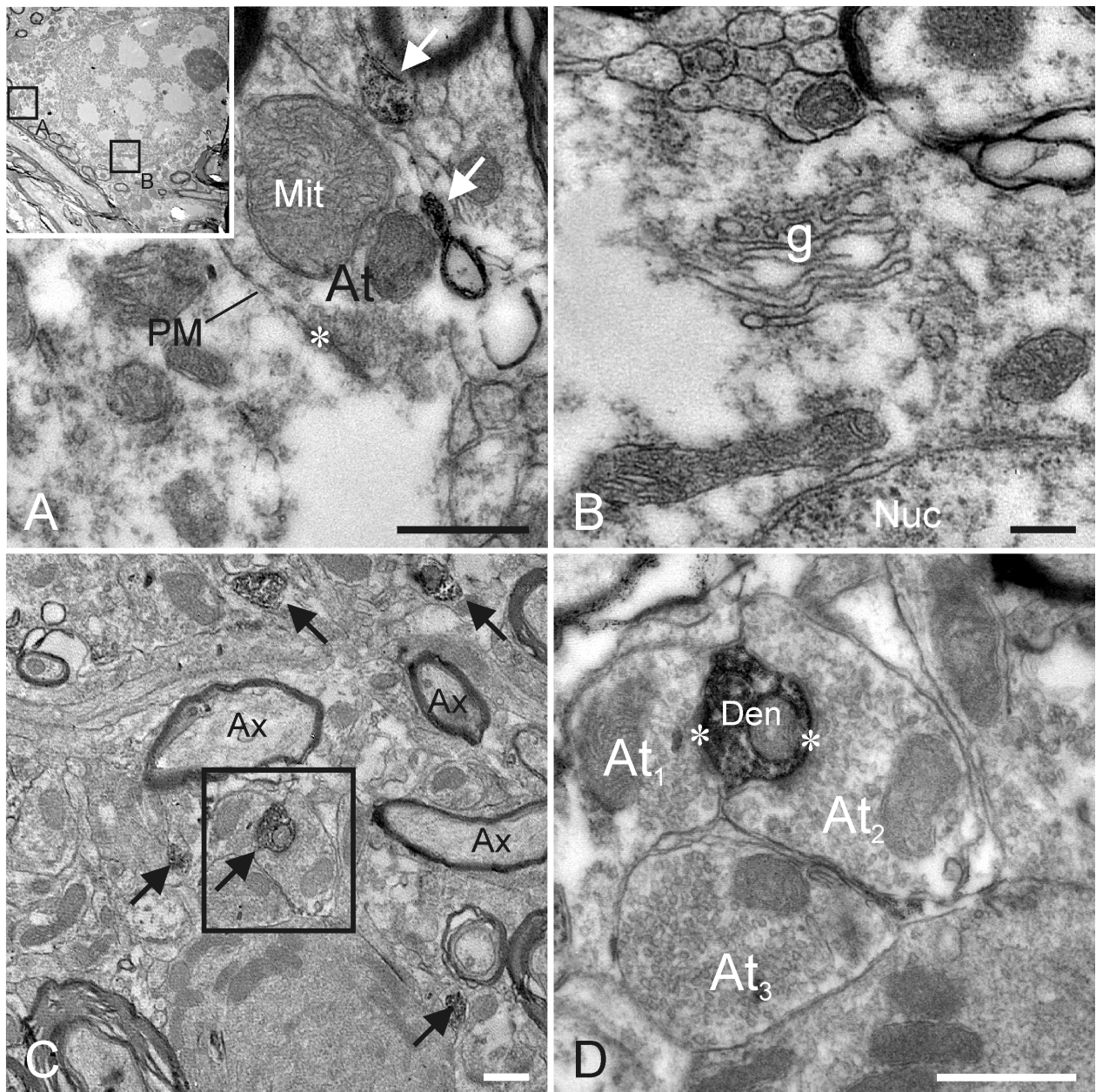


Abbildung 22: Einfachmarkierung von Kir3.2

Einfachmarkierung von Kir3.2 im IF der VTA. Bei diesem Versuch ist der Kir3.2 Kanal mit DAB visualisiert worden und wird in den Bildern als dunkle Flächen dargestellt. In **A** und **B** sind Ausschnitte aus einem Neuron dargestellt, der Stern in **A** kennzeichnet eine Synapse an diesem Neuron. Sowohl an der Plasmamembran als auch im Cytoplasma und im Golgi-Apparat (**B**) gibt es keinen Hinweis für Kir3.2. Die Pfeile in **A** und **C** weisen auf Kir3.2 Nachweis im Neuropil hin. In der Ausschnittsvergrößerung **D** bildet der Kir3.2 positive Dendrit zwei, vermutlich hemmende Synapsen mit den Axonterminalien At_1 und At_2 aus, die mit den Sternen markiert sind.

Die Maßstäbe für die Abbildungen **A** bis **D** entsprechen $0,5 \mu\text{m}$.

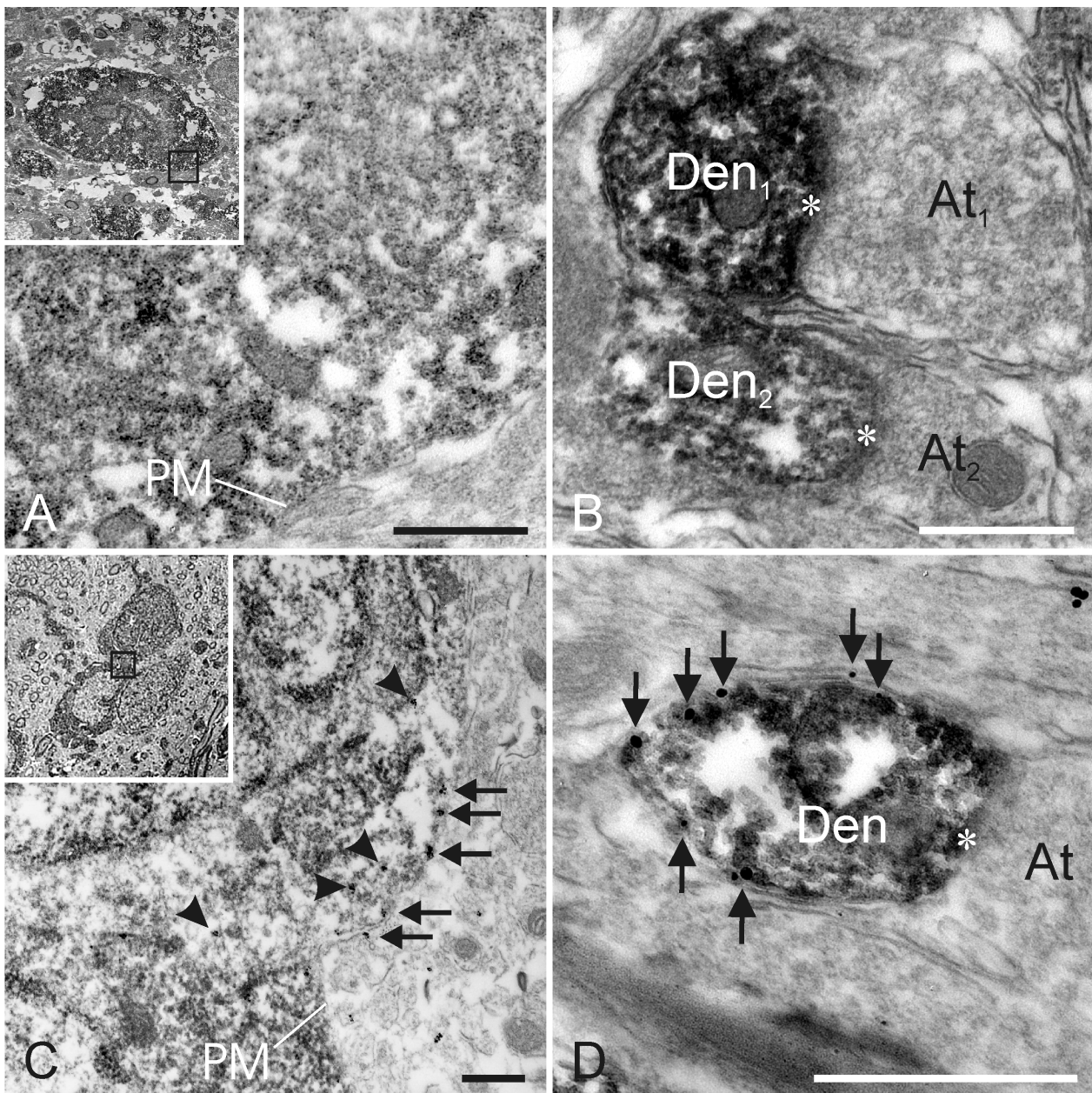


Abbildung 23: Doppelmarkierung von Tyrosinhydroxylase und Kir3.2

Doppelmarkierung im IF (A,B) und PN (C,D) der VTA. Der Nachweis von TH mit dem DAB Reaktionsprodukt ergibt elektronendichtere Bereiche, die in den Bildern als dunkle Flächen dargestellt werden. Kir3.2 wird bei diesem Versuch durch die Gold-Silber Verstärkung auf den Bildern mit schwarzen Punkten wiedergegeben. An der Plasmamembran ist Kir3.2 mit Pfeilen und im Cytoplasma mit Pfeilspitzen markiert worden. Ausschnitte aus TH positiven Neuronen sind in A und C zu sehen und Querschnitte von TH positiven Dendriten in B und D. Die Synapsen der Dendriten sind durch Sterne markiert.

Die Maßstäbe für die Abbildungen A bis D entsprechen 0,5 μm .

3.5.2 Elektronenmikroskopischer Nachweis von Kir3.1, Kir3.3 und Kir3.4

In den nächsten Versuchen wurde die ultrastrukturelle Verteilung der Kanalproteine Kir3.1, Kir3.3 und Kir3.4 untersucht.

Es wurden Doppelmarkierungen durchgeführt, als Beweis dopaminerger Neurone diente wieder der Nachweis von Tyrosinhydroxylase. Der entsprechende Kir Kanal wurde auf den folgenden Abbildungen stets durch eine Gold-Silber Verstärkung mit schwarzen Punkten wiedergegeben. Der Nachweis von Tyrosinhydroxylase durch DAB Niederschlag ergab elektronendichtere Bereiche, die in den Bildern als dunkle Flächen wiedergegeben werden.

Die Kanalproteine Kir3.1, Kir3.3 und Kir3.4 konnten in allen Subnuclei von VTA und SNc eindeutig elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden. Sie wurden sowohl in einigen der dopaminerger als auch in einigen der nicht dopaminerger Neuronen (Abbildungen 24 bis 26, A, B) gefunden. Ihre ultrastrukturelle Lokalisation war immer im Cytoplasma des Somas, oft in unmittelbarer Nähe zum ER. Es gab keinen Nachweis für ein Vorkommen der Kanalproteine an der Plasmamembran von Soma und Dendriten (Abbildungen 24 bis 26, C).

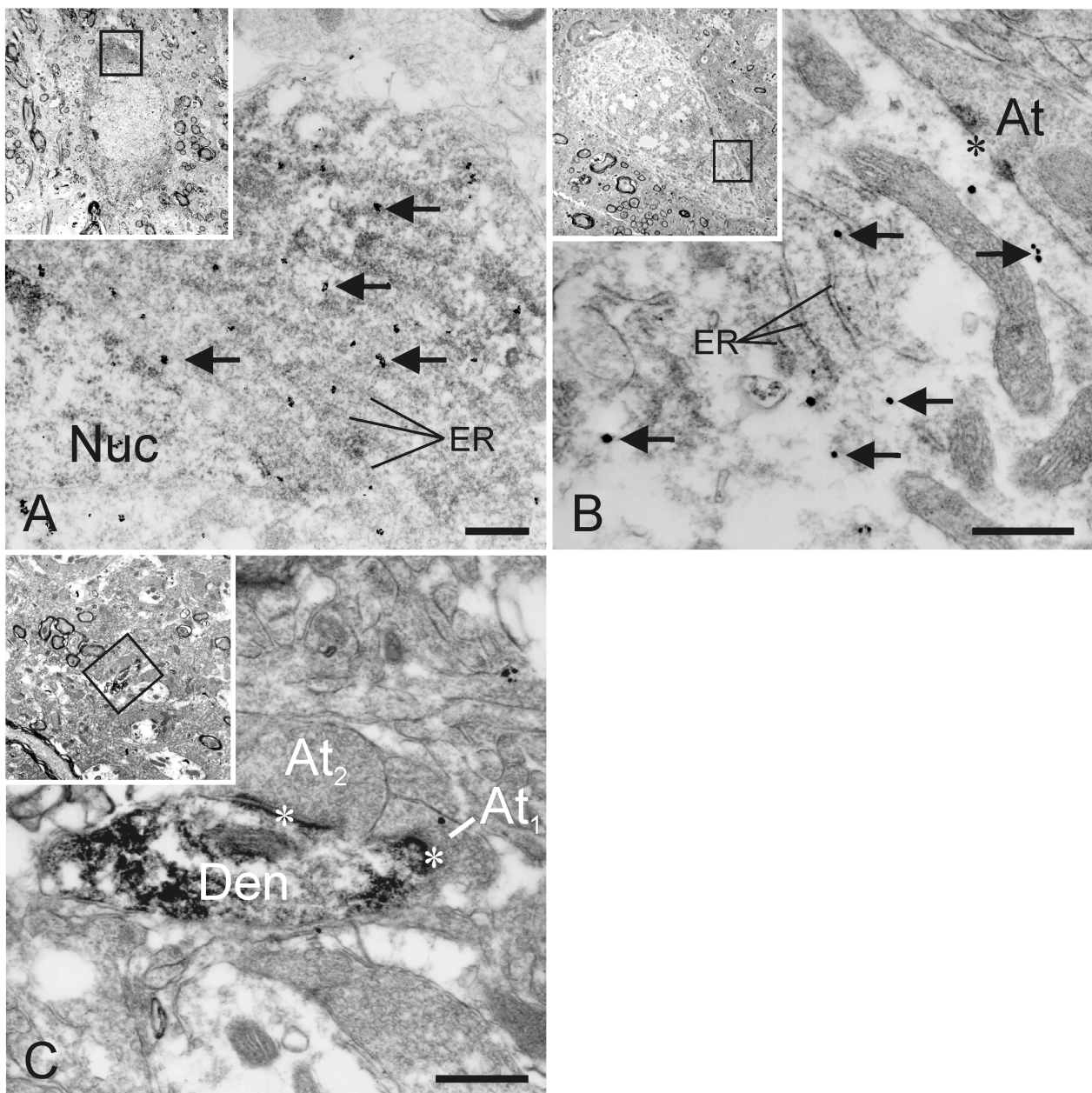


Abbildung 24: Doppelmarkierung von Tyrosinhydroxylase und Kir3.1

Doppelmarkierung im PN (A) und RLi (B,C) der VTA. In A ist ein Ausschnitt aus dem Soma eines TH positiven Neurons dargestellt, die Pfeile weisen auf den Nachweis von Kir3.1 im Bereich des ER hin. In B ist ein Ausschnitt eines TH negativen Neurons zu sehen, die Synapse am Soma ist mit dem Stern markiert. Auch im Cytoplasma dieses Neurons ist Kir3.1 in der Nähe von ER Membranen nachweisbar. Ein Dendrit mit zwei Synapsen ist in C zu sehen, Kir3.1 ist im Dendriten nicht nachweisbar.

Die Maßstäbe für die Abbildungen A bis C entsprechen 0,5 μm

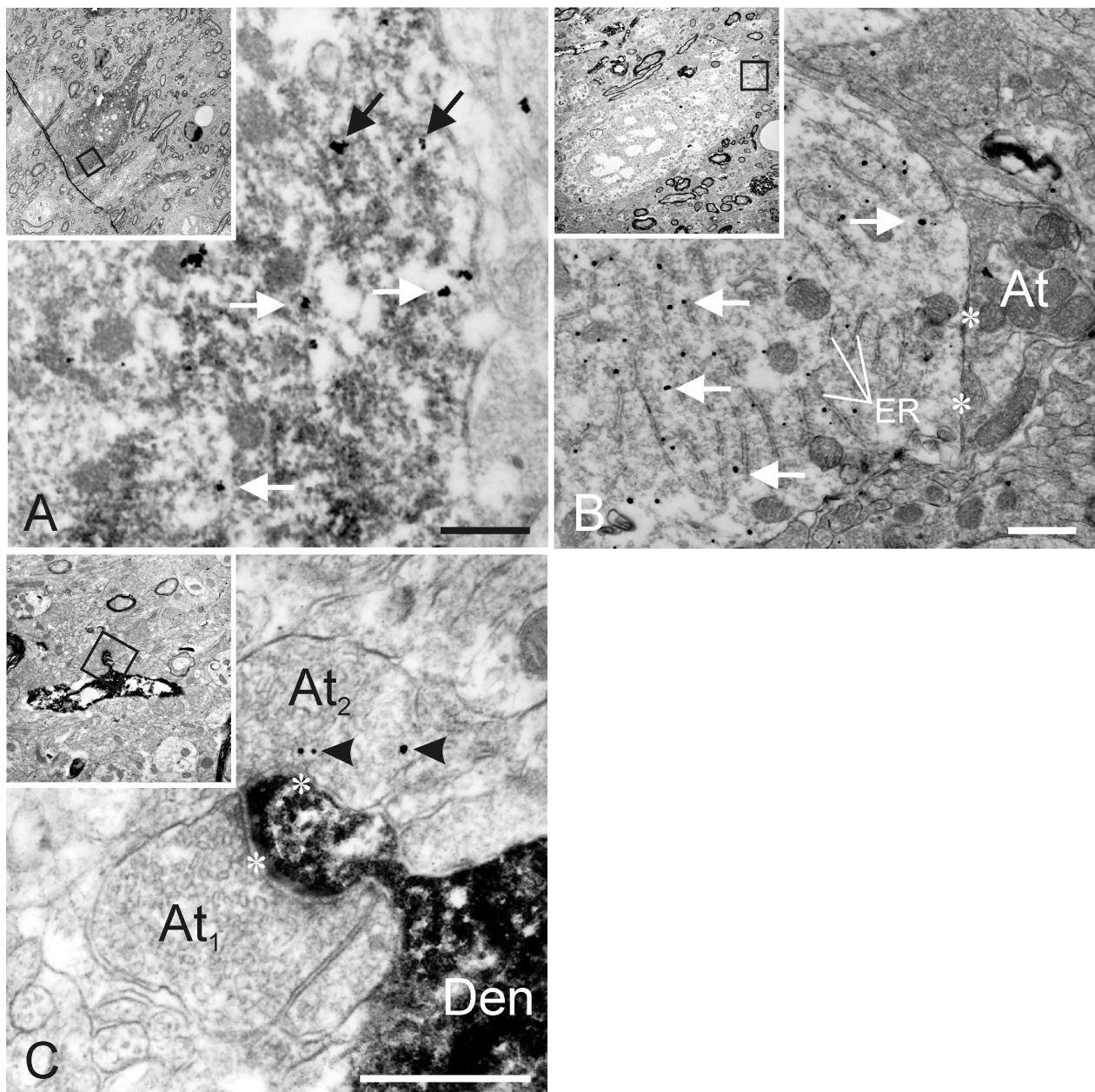


Abbildung 25: Doppelmarkierung von Tyrosinhydroxylase und Kir3.3

Doppelmarkierung im IF (A) und PBPL (B,C) der VTA. In A ist ein Ausschnitt aus dem Soma eines TH positiven Neurons dargestellt, die Pfeile weisen auf Kir3.3 Nachweis im Cytoplasma der Zelle hin. In B ist ein Ausschnitt eines TH negativen Neurons zu sehen, die Synapsen am Soma sind mit Sternen markiert. Kir3.3 ist in unmittelbarer Nähe von ER Membranen nachweisbar (Pfeile). Ein TH positiver Dendrit mit zwei Synapsen (Sterne) ist in C zu sehen, die Pfeilspitzen weisen auf Kir3.3 in den präsynaptischen Axonterminalien hin, im Dendriten ist kein Kir3.3 nachweisbar.

Die Maßstäbe für die Abbildungen A bis C entsprechen 0,5 μm .

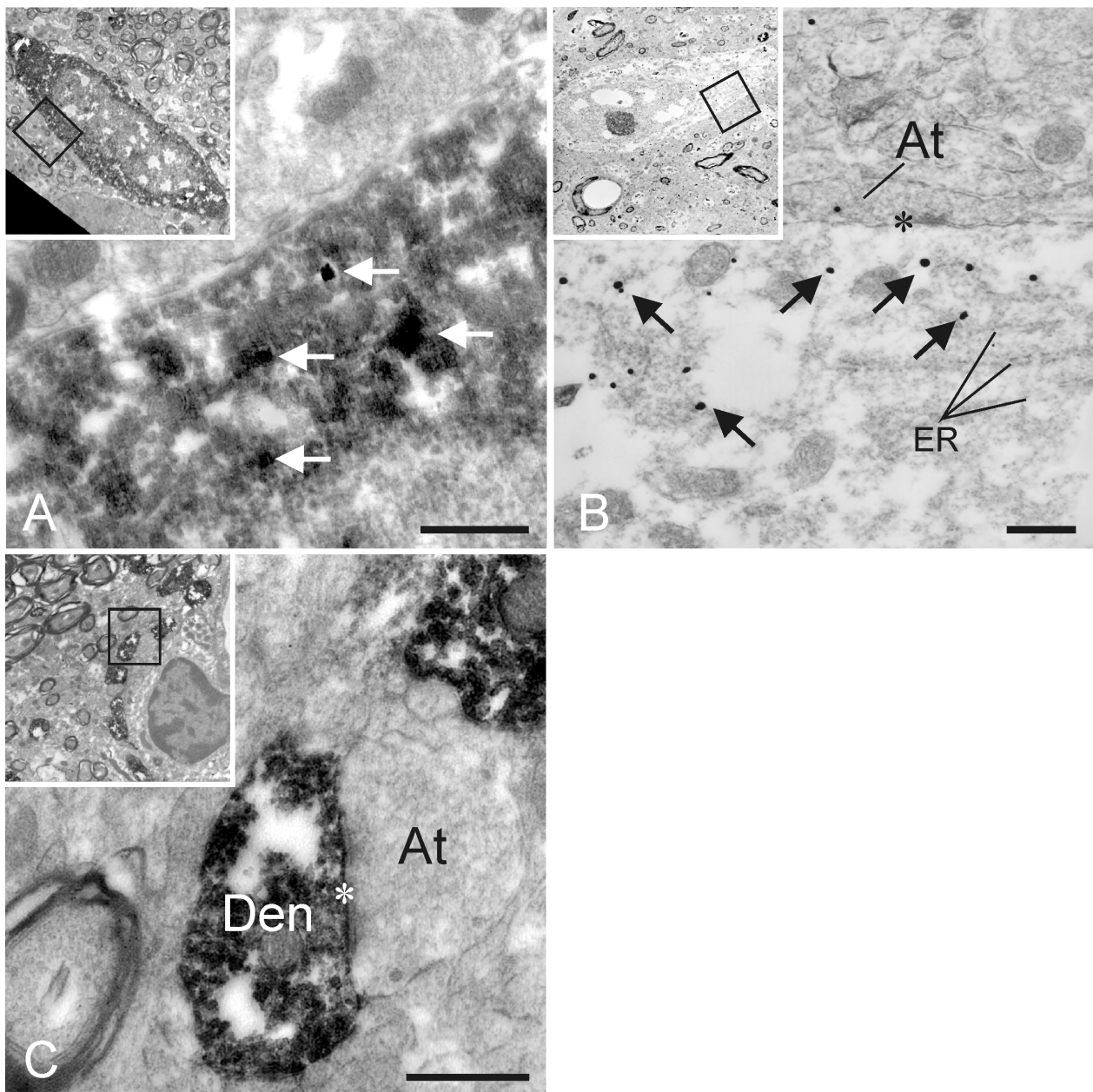


Abbildung 26: Doppelmarkierung von Tyrosinhydroxylase und Kir3.4

Doppelmarkierung im RLi (A) und PBPL (B,C) der VTA. In A ist ein Ausschnitt aus dem Soma eines TH positiven Neurons dargestellt, die Pfeile weisen auf den Nachweis von Kir3.4 im Cytoplasma der Zelle. In B ist ein Ausschnitt eines TH negativen Neurons zu sehen (eine Synapse am Soma ist mit einem Stern markiert). Kir3.4 ist in der Nähe von ER Membranen nachweisbar (Pfeile). Ein quer geschnittener TH positiver Dendrit mit Synapse (Stern) ist in C dargestellt, die Pfeilspitzen weisen auf Nachweis von Kir3.1 in den präsynaptischen Axonterminalien hin, im Dendriten ist keine Kir3.4 Markierung erkennbar.

Die Maßstäbe für die Abbildungen A bis C entsprechen 0,5 μm .