

Aus dem Institut für Physiologie der Universität Tübingen  
Abteilung Physiologie II  
Kommissarischer Leiter: Professor Dr. R. W. Gülch

**Freisetzung von Dopamin aus Dendriten  
dopaminерger Neurone der Substantia nigra  
durch den Dopamin-Transporter**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Björn Henrik Falkenburger  
aus  
Neu-Ulm

2002

Dekan: Prof. Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Prof. Dr. J. P. Ruppertsberg

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Eichelbaum

# INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung .....	7
1.1	Dopamin .....	8
1.1.1	Struktur und Synthese von Dopamin .....	8
1.1.2	Dopaminrezeptoren .....	8
1.1.3	Dopaminerge Neurone im Mesenzephalon .....	9
1.1.4	Weitere Gebiete, in denen Dopamin eine Rolle spielt .....	9
1.2	Anatomie der Substantia nigra .....	10
1.3	Freisetzung von Dopamin in der Substantia nigra .....	10
1.4	Wirkungen von Dopamin in der Substantia nigra .....	13
1.4.1	Wirkung auf zellulärer Ebene .....	13
1.4.2	Wirkungen auf das motorische System .....	13
1.4.3	Wirkungen auf das sogenannte Verstärkersystem .....	14
1.5	Der Dopamin-Transporter .....	14
1.5.1	Bedeutung des Dopamin-Transporters .....	15
1.5.2	Lokalisation des Dopamin-Transporters .....	15
1.5.3	Funktionsweise des Dopamin-Transporters .....	16
1.6	Freisetzung von Neurotransmittern durch „reversen“ Transport .....	16
1.6.1	Dopamin .....	16
1.6.2	GABA .....	17
1.6.3	Glutamat .....	18
1.7	Messung von Dopamin im Gehirnschnitt .....	18
1.7.1	Messprinzip elektrochemischer Verfahren .....	19
1.7.2	Amperometrie .....	19
1.7.3	FCV .....	20
1.8	Gegenstand der vorliegenden Arbeit .....	21
2	Methoden .....	22
2.1	Vorversuche zur Elektrochemie .....	22
2.1.1	Berechnung der Voltammogramme .....	22
2.2	Experimente an Gehirnschnitten .....	23
2.2.1	Gewinnung der Gehirnschnitte .....	23
2.2.2	Perfusion .....	25

2.2.3	Elektrochemische Messungen.....	26
2.2.4	Stimulation.....	27
2.2.5	Datenerfassung und –verarbeitung .....	29
2.3	Experimente an einzelnen Neuronen.....	29
2.3.1	Präparation der Neurone.....	29
2.3.2	Lösungen.....	30
2.3.3	Elektrophysiologie.....	31
2.3.4	Elektrochemie .....	31
2.3.5	Datenerfassung und –verarbeitung .....	32
3	Ergebnisse .....	33
3.1	Suche nach dem geeignetsten elektrochemischen Verfahren.....	33
3.1.1	Vergleich verschiedener Elektroden.....	33
3.1.2	Sensitivität von Amperometrie und FCV .....	34
3.1.3	Selektivität von FCV und Amperometrie .....	35
3.1.4	Zusammenfassung.....	36
3.2	Applikation von Glutamat im Gehirnschnitt.....	36
3.2.1	Vorstellung der Antwort.....	36
3.2.2	Applikationsartefakte .....	38
3.2.3	Antwort in 2 mM und 0 mM extrazellulärem Calcium.....	40
3.2.4	Effekte von GBR12935 auf die Antwort in 0 mM Ca .....	41
3.2.5	Kontrolle der Wirkung von GBR12935 auf oxidative Ströme .....	44
3.2.6	Effekt weiterer Pharmaka auf die Antwort in 0 mM Kalzium .....	46
3.2.7	Zusammenfassung.....	48
3.3	Stimulation des STN im Gehirnschnitt.....	49
3.3.1	Vorstellung der Antwort.....	49
3.3.2	Effekt von GBR12395.....	51
3.3.3	Zusammenfassung.....	52
3.4	Kinetische Modellrechnungen.....	52
3.5	Freisetzung von Dopamin durch Depolarisation einzelner Neurone .....	54
3.5.1	Experimente .....	54
3.5.2	Interpretation.....	57

3.6	Thermodynamische Modellrechnungen.....	60
3.6.1	Modell.....	60
3.6.2	Intrazelluläre Dopaminkonzentration unter Normalbedingungen.....	61
3.6.3	Freisetzung durch Änderung des Membranpotentials .....	61
3.6.4	Freisetzung durch Änderung des Natriumgradienten.....	62
3.6.5	Effekt von Glutamat.....	63
4	Diskussion.....	65
4.1	Bewertung der Amperometrie als Verfahren zur Messung von Dopamin im Gehirnschnitt.....	65
4.1.1	Verhältnis von Signal zu Rauschen.....	65
4.1.2	Zeitliche Auflösung und Speicherbedarf .....	65
4.1.3	Sensitivität und Linearität.....	66
4.1.4	Selektivität .....	66
4.2	Identifikation der in den Messungen oxidierten Substanz.....	66
4.3	Hemmung des Dopamintransporters .....	68
4.3.1	Unterschiedliche Pharmakologie von Aufnahme und Freisetzung ..	68
4.3.2	Anteil des Auswärtstransports an der Freisetzung von Dopamin.....	69
4.4	Freisetzung von Dopamin durch Glutamat.....	69
4.4.1	Freisetzung in 2 mM Kalzium .....	69
4.4.2	Freisetzung in 0 mM Kalzium .....	70
4.4.3	Freisetzung durch synaptische Aktivierung .....	71
4.5	Faktoren, die den Transport von Dopamin beeinflussen.....	71
4.5.1	Die Rolle des vesikulären Kompartiments für die Freisetzung von Dopamin .....	71
4.5.2	Freisetzung durch Änderung des Natriumgradienten.....	72
4.5.3	Freisetzung durch Änderung des Chloridgradienten.....	73
4.5.4	Freisetzung durch Depolarisation.....	74
4.6	Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick .....	75
4.6.1	Relevanz für Hypoxie und Parkinson.....	75
4.6.2	Synaptische Integration in der Substantia nigra.....	77
4.6.3	Eine transport-vermittelte Synapse? .....	78
4.6.4	Ein neuer Wirkungsmechanismus von Transporterantagonisten.....	78

5	Zusammenfassung.....	79
6	Abkürzungen und Pharmaka.....	80
7	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....	82
7.1	Abbildungen.....	82
7.2	Tabellen.....	83
7.3	Gleichungen.....	83
8	Literaturverzeichnis.....	84
9	Veröffentlichungen.....	89
10	Danksagung.....	90
11	Lebenslauf.....	91

# 1 EINLEITUNG

“Men ought to know that from the brain, and from the brain only, arise our pleasures, joys, laughter and jests, as well as our sorrows, pains, griefs and tears. Through it, in particular, we think, see, hear, and distinguish the ugly from the beautiful, the bad from the good, the pleasant from the unpleasant. ... It is the same thing which makes us mad or delirious, inspires us with dread and fear, whether by night or by day, brings sleeplessness, inopportune mistakes, aimless anxieties, absent-mindedness, and acts that are contrary to habit. These things that we suffer all come from the brain, when it is not healthy, but becomes abnormally hot, cold, moist, or dry, or suffers any other unnatural affection to which it was not accustomed. Madness comes from its moistness. When the brain is abnormally moist, of necessity it moves, and when it moves neither sight nor hearing are still, but we see or hear now one thing and now another, and the tongue speaks in accordance with the things seen and hear on any occasion. But all the time the brain is still, a man can think properly”.

Hippokrates zugeschrieben (5. Jahrhundert v.Chr.)<sup>1</sup>

Auch heutzutage gehen wir davon aus, dass unser Gehirn das physische Substrat unseres „Geistes“ darstellt. Doch wie bringt das menschliche Gehirn ein Bewusstsein seiner selbst und seiner Umwelt hervor? Was geschieht im Gehirn, wenn wir Dinge wahrnehmen oder erinnern, Handlungen ausführen und neue Verhaltensweisen erlernen? Was ist die Triebfeder dafür, dass wir etwas tun, und wie entscheidet das Gehirn, was zu tun ist?

Diesen Fragen versuchen sich Natur-, Geistes- und Verhaltenswissenschaften aus ihren jeweiligen Richtungen zu nähern. Für die Medizin sind sie die Grundlage für ein Verständnis von Ätiologie und Pathogenese neurologischer und psychiatrischer Störungen, aber auch Grundlage für eine Vorstellung davon, wie sich bestimmte therapeutische Interventionen auswirken.

Die Leistungen des Gehirns werden vor allem seinen mehr als 100.000.000.000 Nervenzellen zugeschrieben, wobei auch die Rolle der Gliazellen in letzter Zeit an Bedeutung gewinnt. Die Funktionsweise des Gehirns kann im Prinzip dadurch erklärt werden, wie sich einzelne Nervenzellen verhalten, wie mehrere Nervenzellen miteinander kommunizieren, und wie sie aufgrund ihrer Verbindungen zu jeweils spezialisierten Systemen angeordnet sind.

---

<sup>1</sup> zitiert nach Kandel et al., 2000

Der größte Teil der Kommunikation zwischen Nervenzellen erfolgt mittels chemischer Botenstoffe. Die Erforschung der Mechanismen, durch die diese Botenstoffe freigesetzt werden, ist daher eine zentrale Fragestellung der heutigen Neurobiologie. Der klassische Mechanismus dafür ist die durch den Einstrom von Kalzium ausgelöste Exozytose (Katz, 1969).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Freisetzung von Dopamin aus den Dendriten dopaminerger Neurone in der Substantia nigra der Ratte untersucht. Da in den Dendriten elektronenmikroskopisch keine Ansammlungen präsynaptischer Vesikel gefunden wurden, musste die Möglichkeit eines Mechanismus ohne die Beteiligung von Vesikeln in Betracht gezogen werden.

## **1.1 Dopamin**

### **1.1.1 Struktur und Synthese von Dopamin**

Dopamin (3,4-Dihydroxyphenylethylamin) wird aus der aromatischen Aminosäure Tyrosin synthetisiert. Durch Hydroxylierung am Phenolring entsteht aus Tyrosin L-Dopa. Im ZNS wird die hierfür notwendige Tyrosinhydroxylase nur von dopaminergen Neuronen exprimiert. Ihr immunhistochemischer Nachweis wird daher häufig zur Identifikation dieser Neurone verwendet. Aus Dopa entsteht durch Decarboxylierung Dopamin.

Dopamin besitzt also einen Phenolring mit zwei Hydroxylgruppen in „ortho“-Stellung. Die Wasserstoffatome dieser beiden Hydroxylgruppen können sehr leicht abgespalten werden. Auf dieser Oxidation beruht der Nachweis von Dopamin durch elektrochemische Messungen.

### **1.1.2 Dopaminrezeptoren**

Es gibt mindestens fünf verschiedene Klassen von Dopaminrezeptoren, die als D1 bis D5 bezeichnet werden. Sie können jedoch grob in zwei Familien eingeteilt werden. D1 und D5 wirken durch Aktivierung der Adenylatzyklase exzitatorisch. D2, D3 und D4 dagegen wirken inhibitorisch, unter anderem



durch Öffnen eines Kaliumkanals (Lacey et al., 1987, Sibley und Monsma-FJ, 1992).

### **1.1.3 Dopaminerge Neurone im Mesenzephalon**

Im Gehirn finden sich dopaminerge Neurone insbesondere in der Substantia nigra pars compacta (SNc) und im ventralen tegmental Areal (VTA).

Die dopaminergen Neurone der SNc projizieren als nigrostriatale Bahn in den Ncl. caudatus und ins Putamen. Ihre Bedeutung für das motorische System wird dadurch illustriert, dass ein Defekt in dieser Projektion das Krankheitsbild des M. Parkinson hervorruft.

Den vom VTA ausgehenden mesolimbischen und mesocorticalen Bahnen wird eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Schizophrenie zugeschrieben. Neuroleptika entfalten ihre antipsychotische Wirkung vermutlich über Hemmung dieser Bahnen. Weiterhin ist dieses aufsteigende Dopaminsystem an einer von spezifischen Trieben unabhängigen positiven Verstärkung beteiligt. Dadurch stellt es vermutlich den Sucht erzeugenden Angriffspunkt für Drogen wie Amphetamin und Kokain dar (Schmidt und Thews, 1997).

### **1.1.4 Weitere Gebiete, in denen Dopamin eine Rolle spielt**

Obwohl sich die vorliegende Arbeit ausschließlich mit dem mesenzephalen Dopaminsystem befasst, ist es durchaus vorstellbar, dass die vorgestellten Ergebnisse über die Freisetzung von Dopamin auch an anderen Stellen im Gehirn eine Rolle spielen.

Vom Ncl. infundibularis des Hypothalamus entspringt eine kurze dopaminerge Bahn, die an den Kapillaren des hypophysären Pfortadersystems endet. Das hier sezernierte Dopamin reguliert die Sekretion verschiedener Hormone aus dem Hypophysenvorderlappen. Zum Beispiel hemmt es die Sekretion von Prolaktin und Wachstumshormon. Dopaminagonisten können daher bei Galaktorrhö oder Akromegalie eingesetzt werden.

Dopamin ist auch an der deszendierenden Hemmung nozizeptiver Afferenzen auf Rückenmarksebene beteiligt. Diese Bahnen entspringen der Region A11 im Dienzephalon.

Außerdem existieren Dopaminrezeptoren im Bereich der Nieren- und Splanchnikusgefäße. Ihre Aktivierung bewirkt eine Vasodilation, weshalb Dopamin bisweilen zur Prophylaxe eines prärenalen Nierenversagens bei Kreislaufschock eingesetzt wurde (Schmidt und Thews, 1997).

## **1.2 Anatomie der Substantia nigra**

Die Substantia nigra (SN) ist ein paariger Teil des Mesenzephalons. Sie liegt auf jeder Seite eingebettet zwischen den Crura cerebri (ventral) und dem Lemniscus medialis (dorsal). Anhand dieser Leitungsbahnen kann sie im Gehirnschnitt sicher identifiziert werden.

Sie besteht aus zwei verschiedenen Abschnitten. Während die ventral gelegene Pars reticulata (SNr) funktionell und entwicklungsgeschichtlich mit dem Pallidum internum (Pi) verwandt ist, entspricht die dorsale Pars compacta (SNc) dem weiter medial gelegenen VTA (Künzle H., 1993).

Die Somata der großen dopaminergen Neurone liegen in der SNc. Sie besitzen basale Dendriten innerhalb der SNc sowie sehr lange apikale Dendriten, die weit in die SNr reichen. Ihre Axone bilden die bereits erwähnten mesostriären Bahnen.

In der SNr finden sich GABAerge Projektionsneurone und Interneurone. Die Axone der Projektionsneurone ziehen unter anderem zum Thalamus.

## **1.3 Freisetzung von Dopamin in der Substantia nigra**

Die dopaminergen Neurone der SNc speichern Dopamin nicht nur in ihren Axonterminalen im Striatum, sondern auch in Soma und Dendriten (Björklund und Lindvall, 1975). Durch verschiedenste Stimuli konnte dieses Dopamin freigesetzt werden (Geffen et al., 1976, für eine Übersicht siehe Cheramy et al., 1981 und Tabelle 1). Da sich in der SN keine dopaminergen Axonterminalen finden, muss alles in der SN freigesetzte Dopamin aus dopaminergen Somata oder Dendriten stammen.

Die Idee, dass Dopamin nicht nur an Axonterminalen, sondern auch an Dendriten freigesetzt werden kann, war zunächst sehr gewagt. Denn sie stellte das verbreitete Paradigma auf den Kopf, nach dem Information in Neuronen nur in eine Richtung fließen kann, nämlich von der dendritischen Postsynapse zur axonalen Präsynapse. Da sie mehrfach reproduziert werden konnte, wurde die Existenz einer somatodendritischen Freisetzung von Dopamin jedoch schließlich akzeptiert. Neben Wirkung und Bedeutung des freigesetzten Dopamins wurde nun kontrovers diskutiert, durch welchen Mechanismus diese Freisetzung erfolgt.

Als Kriterien zur Unterscheidung zwischen Exozytose und einer Freisetzung durch den Dopamintransporter (DAT) wurden die Abhängigkeit der Exozytose von extrazellulärem Kalzium, bzw. die Sensitivität gegenüber Kalziumkanal-Blockern, sowie die Sensitivität des DAT gegenüber selektiven Inhibitoren verwendet. Dopamin wurde unter anderem freigesetzt durch hohe Konzentrationen extrazellulären Kalziums, niedrige Konzentrationen extrazellulären Natriums, Veratridin, Amphetamin und starke elektrische Felder (siehe Tabelle 1).

Leider lassen viele der dargestellten Arbeiten nur bedingt Rückschlüsse auf die physiologische Relevanz der beobachteten Phänomene zu, da die verwendeten Stimuli keine physiologischen Reize darstellen.

Autor	System	Messung	Stimulus	DA-Freisetzung in der
Mintz 1986	in vivo (STN, SN)	Mikrodialyse (SI=15 min)	elektrische Stimulation des STN	SN
			cholinerge Stimulation des STN	SN
Robertson 1991	in vivo (SNr)	Mikrodialyse (SI=20 min)	50 mM K in der SNr	SNr
			Nomifensin 10 µM in der SNr	SNr, TTX-sensitiv
			AMPH 2mg/kg in der SNr	SNr
Rosales 1994	in vivo (STN, SNr)	Mikrodialyse (SI=12 min)	Carbachol im STN	SNr, AP5-sensitiv
			NMDA in der SNr	SNr, AP5-sensitiv
Heeringa 1995	in vivo (SNr, SNc)	Mikrodialyse (SI=15 min)	AMPH 10 mg/kg in der SN	Reserpin-sensitiv
			AMPH 2 mg/kg in der SN	nicht Reserpin sensitiv
Hoffman 1997	in vivo (SNr)	Mikrodialyse (SI=20 min)	100 mM K in der SNr	SNr
			250 µM AMPH in der SNr	SNr
Rice 1997	Slice (SNc)	FCV (4 Hz)	elektrische Stimulation der SNc (10 V)	SNc, abhängig von Ca nicht TTX-sensitiv
			Veratridin in der SNc	SNc

Elverfors 1997	Slice (SN)	Chromato- graphie (SI=10 min)	Veratridin 10 µM, 10 min lang	SN, unabhängig von Ca TTX-sensitiv GBR12909-sensitiv
			[Na]=25 mM, 10 min lang	SN
			[K]=30 mM, 10 min lang	SN, abhängig von Ca nicht GBR12909-sensitiv
Rosales 1997	in vivo (STN, SNr)	Mikrodialyse (SI=15 min)	Carbachol im STN	SN
			NMDA in der SNr	SN, nicht SCH-sensitiv
			SKF38393 in der SNr	SN
Jaffe 1998	Einzelnes Neuron (SNc)	ampero- metrische Messung	0.3 mM Glutamat oder 100 mM KCl	exozytische Ereignisse sind häufiger während der Stimulation
Hoffman 1999	Slice (SN)	Chronoam- perometrie	30 mM KCl (2 min im Bad)	SN, TTX-sensitiv, Ca- & Kokain-unabhängig
Barstow 2000	Slice (STN, SNr)	Current- clamp	elektrische Stimulation des STN	D2-Rezeptor-Aktivierung

**Tabelle 1: Untersuchungen über die Freisetzung von Dopamin in der SN**

*DA Dopamin, SI Zeitliche Auflösung, FCV Fast Cyclic Voltammetry, Carbachol: mACh Agonist, AP5: NMDA-Rezeptor Antagonist, Nomifensin, GBR12935 und GBR12909: DAT Antagonisten, Reserpin: degranuliert Vesikel, Veratridin: öffnet Na-Kanäle, SCH=SCH23390: D1-Rezeptor-Antagonist, SKF38393: D1-Rezeptor-Agonist, AMPH: d-Amphetamin. Slice steht für Gehirnschnitt. Aus Platzgründen wurde jeweils nur der Erstautor aufgeführt.*

Durch die Beobachtung spontaner exozytischer Ereignisse (Jaffe et al., 1998) wurde überzeugend gezeigt, dass zumindest am Soma eine Freisetzung von Dopamin durch Exozytose prinzipiell möglich ist. Dies bestätigt die Existenz einer kalzium-abhängigen Freisetzung in der SNc (Rice et al., 1997). Das fehlen präsynaptischer Differenzierungen in dopaminergen Dendriten (Wassef et al., 1981, Groves und Linder, 1983, Nirenberg et al., 1996) sowie die Existenz einer kalzium-unabhängigen Freisetzung von Dopamin (Hoffman und Gerhardt, 1999, Elverfors et al., 1997) implizieren jedoch, dass dort möglicherweise andere Mechanismen zugrunde liegen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher vornehmlich die Freisetzung von Dopamin aus apikalen Dendriten in der SNr untersucht.

Einige der dargestellten Arbeiten verwenden eine Stimulation des STN, um die Freisetzung von Dopamin zu bewirken. Der STN besitzt eine monosynaptische, glutamaterge Projektion des STN auf Dendriten der dopaminergen Neurone (Barstow K.L. und Mintz I.M., 1998, Iribe et al., 1999). Der Vorteil dieses

Ansatzes besteht darin, dass die Freisetzung von Dopamin durch eine physiologische Afferenz ausgelöst wird.

## **1.4 Wirkungen von Dopamin in der Substantia nigra**

### **1.4.1 Wirkung auf zellulärer Ebene**

Exogen in der SN appliziertes oder durch Amphetamin freigesetztes endogenes Dopamin wirkt über D1- und D2-Rezeptoren auf die verschiedenen Neurone der SN. Die Aktivierung von D2-Autorezeptoren auf dopaminergen Neuronen der SNc (nigrostriatale Neurone) wirkt hemmend durch Öffnen eines Kaliumkanals (Aghajanian und Bunney, 1977, Lacey et al., 1987). Auf die GABAergen Neurone der SNr (nigrothalamische Neurone) wirkt es vor allem über präsynaptische D1-Rezeptoren auf striatonigralen und anderen Terminalen. Dieser Einfluss kann sowohl exzitatorisch (durch Terminalen mit Substanz P) als auch inhibitorisch (durch GABA-Terminalen) sein (Conde, 1992, Martin und Waszczak, 1994).

Ein direkter Effekt von dendritisch freigesetztem Dopamin auf dopaminerge Neurone der SN konnte in elektrophysiologischen Experimenten beobachtet werden. Die repetitive Stimulation des STN bewirkte in den dopaminergen Neuronen nicht nur sich summierende EPSPs, sondern auch eine darauf folgende Hyperpolarisation. Diese wurde auf die Aktivierung von D2-Rezeptoren nach Freisetzung von dendritischem Dopamin zurückgeführt, da sie durch den D2- Antagonisten Sulpirid gehemmt wurde (Barstow K.L. und Mintz I.M., 1998).

### **1.4.2 Wirkungen auf das motorische System**

Durch Modulation der nigrothalamischen Ausgangsneurone der Basalganglien greift das freigesetzte Dopamin in das motorische System ein. Dies soll in zwei Beispielen, am intakten Gehirn der Ratte, und in einem Tiermodell des M. Parkinson illustriert werden.

Die direkte Applikation von Dopamin in die intakte SN der Ratte führt zu vermehrten Spontanbewegungen des Tieres (Jackson und Kelly, 1983). Dies

kann durch eine vermehrte Ausschüttung von GABA in der SN aufgrund der Aktivierung präsynaptischer D1-Rezeptoren erklärt werden. Dies führt zu einer Inhibition der GABAergen nigrothalamischen Neurone, und damit zur Disinhibition des Thalamus.

Das wichtigste Tiermodell des M. Parkinson ist die einseitige Läsion der SNc durch 6-Hydroxydopamin. Zunächst wurden die Auswirkungen der Läsion vor allem durch das Fehlen von Dopamin im Striatum erklärt. In neueren Studien korreliert jedoch die Aktivierung nigraler Dopaminrezeptoren oft besser mit den motorischen Effekten einer Intervention als die Aktivierung striataler Rezeptoren. Insbesondere die therapeutische Wirkung von L-Dopa scheint auf der Aktivierung nigraler D1-Dopaminrezeptoren zu beruhen (Robertson, 1992).

### **1.4.3 Wirkungen auf das sogenannte Verstärkersystem**

Bei wiederholter Gabe von z.B. Amphetamin, Kokain oder Morphin wächst ihre bewegungsfördernde Wirkung. Dieser Effekt wird als „behavioural Sensitisation“ bezeichnet, und stellt ein wichtiges Tiermodell für die Mechanismen drogeninduzierter Psychosen und Verhaltensänderungen dar. An diesem Vorgang sind mehrere Transmittersysteme beteiligt. Grundlegender Bestandteil ist jedoch die Freisetzung von Dopamin in SNc und VTA sowie seine Wirkung auf D1-Rezeptoren (für eine Übersicht siehe Kalivas und Stewart, 1991).

## **1.5 Der Dopamin-Transporter**

Die Freisetzung von Dopamin durch den Dopamin Transporter (DAT) hat nicht nur Konsequenzen für die funktionelle Verschaltung der Substantia nigra. Sie erweitert auch das Bild über die Funktion des DAT selbst. Umgekehrt ist ein Verständnis der Funktionsweise des DAT wichtig für die Frage, wie eine Umkehrung der Transportrichtung aufgrund des glutamatergen Reizes zustande kommen kann.

### **1.5.1 Bedeutung des Dopamin-Transporters**

Der DAT wurde vor allem aufgrund seiner Eigenschaft als Rezeptor für bestimmte Drogen intensiv untersucht (für eine Übersicht siehe Giros und Caron, 1993).

Die eigentliche Aufgabe des DAT besteht in der Beendigung der synaptischen Übertragung durch Aufnahme von Dopamin in die präsynaptischen Axonterminalen. Kokain und andere Substanzen hemmen den DAT. Ihre Bindung an den DAT korreliert gut mit den psychischen Wirkungen der einzelnen Substanzen. Der DAT wird daher als der wichtigste Rezeptor für Kokain und seine Analoga angesehen (Shimada et al., 1991, Giros et al., 1996). Amphetamin ist ein Substrat des DAT und induziert eine kalzium-unabhängige Freisetzung von Dopamin durch den DAT. Ein Amphetamin-Analogon ist auch das als Ecstasy bekannte MDMA.

Ein weiteres Substrat des DAT ist das Neurotoxin MPTP bzw. sein Metabolit MPP<sup>+</sup>. Durch den DAT wird es selektiv in dopaminerge Neurone aufgenommen, und kann dadurch ein Parkinson-Syndrom auslösen.

### **1.5.2 Lokalisation des Dopamin-Transporters**

Der DAT befindet sich nicht überall auf der Zellmembran eines dopaminergen Neurons der SN. In hoher Dichte kommt er auf den Axonterminalen im Striatum vor, sowie auf den kleinen apikalen Dendriten in der SNr. Die meisten dieser Dendriten sind <5 µm im Durchmesser. DAT-tragende Dendriten enthalten keine aggregierte Vesikel. Im Soma wurde der DAT vor allem am Golgi-Apparat, jedoch kaum an der Plasmamembran nachgewiesen (Nirenberg et al., 1996, Freed et al., 1995).

Diese Verteilung legt eine spezifische Funktion des DAT an Axonterminalen und Dendriten nahe. Im Striatum dient er vermutlich der Wiederaufnahme des bei der synaptischen Übertragung freigesetzten Dopamins. In der SNr könnte auch die Freisetzung von Dopamin eine Aufgabe darstellen.

### 1.5.3 Funktionsweise des Dopamin-Transporters

Der DAT ist Mitglied einer Genfamilie, zu der auch die Transporter für GABA, Noradrenalin und Serotonin gehören.

Aufgrund kinetischer Studien wird davon ausgegangen, dass pro Zyklus ein Dopamin-, zwei Natrium- und ein Chlorid-Ion transportiert werden (Gu et al., 1994, McElvain und Schenk, 1992). Da Dopamin bei physiologischem pH-Wert überwiegend ionisiert vorliegt, und auch einige der anderen Substrate des DAT (wie z.B. MPP<sup>+</sup>) Kationen sind, wird Dopamin vermutlich als Kation transportiert (Gräfe K.-H. und Bönisch H., 1988).

Da die transportierten Ionen an den DAT binden müssen, hängt der Transport von ihren Gradienten über die Zellmembran ab. Da pro Zyklus netto zwei positive Ladungen transportiert werden, wird der Transport auch vom Membranpotential bestimmt. Das Gleichgewichtspotential für den Transport kann mit der folgenden Gleichung berechnet werden (aus Lester et al., 1994).

$$E_0 = \frac{RT}{2F} \ln \left[ \left( \frac{[Na_e]}{[Na_i]} \right)^2 \cdot \frac{[Cl_e]}{[Cl_i]} \cdot \frac{[DA_e]}{[DA_i]} \right]$$

#### **Gleichung 1: Gleichgewichtspotential des DAT**

*[X<sub>e</sub>] bzw. [X<sub>i</sub>] stehen für die extrazelluläre bzw. intrazelluläre Konzentration des Ions X, E<sub>0</sub> für das Membranpotential im Gleichgewicht, R, T und F für Gaskonstante, absolute Temperatur und Faraday-Konstante.*

## **1.6 Freisetzung von Neurotransmittern durch „reversen“ Transport**

Im Mittelpunkt der Funktion von Neurotransmitter-Transportern steht die Aufnahme von Transmittern. Daher wird die Freisetzung von Transmittern auch als „reverser“ Transport bezeichnet.

### 1.6.1 Dopamin

Ein wichtiges Experiment für die Freisetzung von Dopamin durch den DAT war die Arbeit von Eshleman et al., 1994. Den DAT exprimierende COS-Zellen wurden mit radioaktiv markiertem Dopamin gefüllt, und gaben es danach wieder ab. Die Freisetzung wurde nach 3 min als Verschiebung von Radioaktivität aus



den Zellen in die Extrazellulärflüssigkeit gemessen. Sie konnte durch verschiedene Substanzen gefördert oder gehemmt werden (Tab. 2).

fördert die Freisetzung	hemmt die Freisetzung	kein Effekt
Methamphetamin (1mM) KCl (100 mM) [Na] <sub>e</sub> =0 Amphetamin Dopamin, Tyramin Serotonin Ethanol	GBR12935 Mazindol Nomifensin Benztropin Bupropion	Kokain (0,03-300 µM) Win-35 (0,003-1 µM) Desipramin Phencyclidin

**Tabelle 2: Einfluss verschiedener Substanzen auf die Freisetzung von Dopamin durch den DAT**

Dass Dopamin aus „gefüllten“ Zellen in ein dopaminfreies Extrazellulärmedium freigesetzt wird, entspricht den Erwartungen aus Gleichung 1. Dasselbe gilt für die Förderung der Freisetzung durch Depolarisation (100 mM extrazelluläres Kalium) und Verminderung von extrazellulärem Natrium.

Die Freisetzung durch Substrate wie Dopamin, Tyramin und Amphetamin kann durch einen Drehtürmechanismus erklärt werden, bei dem der DAT dieselbe Menge an Substrat einwärts wie auswärts transportiert. Dieses Phänomen wurde auch für den GABA-Transporter beschrieben (Schwartz, 1982).

Ein weiterer Wirkmechanismus von Amphetamin beruht darauf, dass es eine leichte Base ist. Dadurch verringert es den pH-Gradienten, der Dopamin in einem vesikulären Speicherpool konzentriert. Die erhöhte Konzentration von Dopamin im Zytosol bewirkt einen Auswärtstransport nach Gleichung 1 (Sulzer et al., 1995, Sulzer et al., 1993, Pifl et al., 1995, Sitte et al., 1998). Die physiologische Bedeutung der Freisetzung von Dopamin durch Amphetamin wird jedoch bezweifelt (Levi und Raiteri, 1993).

## 1.6.2 GABA

Die Freisetzung von GABA durch seinen Transporter wurde in der Retina unter relativ physiologischen Bedingungen beschrieben (Schwartz, 1987, Schwartz, 1982, do-Nascimento et al., 1998).

KCl und Glutamat konnten eine Freisetzung von radioaktiv markiertem GABA aus isolierten Horizontalzellen hervorrufen, die unabhängig von extrazellulärem Kalzium war. Von isolierten Horizontalzellen im Voltage-Clamp konnte GABA durch Depolarisation freigesetzt werden, und eine Aktivierung von GABA-Rezeptoren einer benachbarten Bipolarzelle hervorrufen. Auch dieser Effekt war unabhängig von extrazellulärem Kalzium und wurde durch einen selektiven Inhibitor des GABA-Transporters gehemmt.

Weiterhin konnte GABA durch Veratridin, KCl, Glutamat und seine Agonisten aus Kulturen von Hippocampus-Neuronen freigesetzt werden. Vor allem die Freisetzung durch Glutamat und Veratridin war unabhängig von extrazellulärem Kalzium und wurde durch einen selektiven Inhibitor des GABA-Transporters gehemmt (Harris und Miller, 1989a, Harris und Miller, 1989b).

### **1.6.3 Glutamat**

Auch eine Freisetzung von Glutamat durch den Glutamat-Transporter konnte gezeigt werden. In Gehirnschnitten des Hippocampus scheint dieser Mechanismus insbesondere während Hypoxie eine wichtige Rolle für die Freisetzung von Glutamat zu spielen (Rossi et al., 2000). Von dem unter Hypoxie freigesetzten Glutamat wird angenommen, dass es durch Depolarisation und Kalzium-Einstrom zum Zelltod benachbarter Neurone beiträgt.

## **1.7 Messung von Dopamin im Gehirnschnitt**

Um Dopamin im Gehirnschnitt direkt und lokal nachzuweisen, wurden bisher vor allem Mikrodialyse und elektrochemische Verfahren verwendet. Von diesen beiden Verfahren verfügt die Elektrochemie über eine deutlich bessere zeitliche Auflösung, die auch Aussagen zur Kinetik der Freisetzung erlaubt. Allerdings war bisher unklar, ob die Sensitivität eines elektrochemischen Verfahrens ausreicht, um auch die geringen Mengen an Dopamin nachzuweisen, die durch physiologische Stimuli freigesetzt werden.

Unter den elektrochemischen Verfahren wurde in Gehirnschnitten bisher meist ein Spannungsprotokoll mit schnellen Zyklen (FCV, s.u.) verwendet. Um das für

die geplanten Experimente geeignetste Verfahren zu wählen, wurden dieses Protokoll gegen ein alternatives Verfahren getestet. Dieses Verfahren (Amperometrie) verwendet eine konstante Spannung an der Messelektrode, und wurde bisher ausschließlich an einzelnen, gereinigten Zellen verwendet.

### **1.7.1 Messprinzip elektrochemischer Verfahren**

Für elektrochemische Messungen wird ein elektrophysiologischer Versuchsaufbau verwendet. An der Karbonfaser-Elektrode treten vor allem zwei Arten von Strömen auf: kapazitive und oxidative.

Ein kapazitiver Strom entsteht an der Oberfläche der Elektrode aufgrund einer Änderung des Potentials der Elektrode im Vergleich zur Referenzelektrode. Die Größe des Stroms hängt ab von der Größe der Oberfläche und der Größe der Potentialänderung pro Zeiteinheit.

Ein oxidativer Strom entsteht dadurch, dass eine Substanz, zum Beispiel Dopamin, oxidiert wird, und die beiden Elektronen aufgrund der anliegenden positiven Spannung an die Karbonfaser abgibt. Besonders leicht oxidierbar sind die Monamine Dopamin, Serotonin und Noradrenalin. Da das Potential der Elektrode mit steigendem Abstand von der Karbonfaser sehr rasch abfällt, können praktisch nur Moleküle oxidiert werden, die der Oberfläche direkt anliegen. Nachdem die beim Anlegen der Spannung an der Oberfläche befindlichen Moleküle oxidiert wurden, wird für die Größe des Stroms entscheidend, wie schnell nicht oxidierte Moleküle an die Oberfläche nachrücken können. Dies hängt nach der Fick'schen Diffusionsgleichung von der Dopaminkonzentration im Bad ab, und wird durch Konvektion („Rühren“) erleichtert. Letzteres ist der Grund dafür, dass bei der Applikation von Lösungen in den Gehirnschnitt, sowie durch Änderung der Perfusionsgeschwindigkeit artifizielle Änderungen im Strom an der Karbonfaser auftreten.

### **1.7.2 Amperometrie**

Im einfachsten Protokoll, der Amperometrie liegt eine feste Spannung von 650-800 mV an der Karbonfaser-Elektrode an. Eine höhere Spannung bewirkt eine

etwas schnellere Oxidation und durch das größere elektrische Feld eine höhere räumliche Auflösung.

Beim Anlegen der Spannung entsteht ein großer kapazitiver Strom, dessen Abklingen abgewartet werden muss. Die Nulllinie liegt danach meist nicht bei 0 pA, da verschiedene im Gehirnschnitt vorhandene Substanzen oxidiert werden. Durch die Freisetzung einer oxidierbaren Substanz wird die Menge an oxidierbarem Material erhöht, und ein Anstieg des oxidativen Stroms induziert. Durch die physiologische Elimination der freigesetzten Substanz nimmt der Nachschub an oxidierbarem Material an die Elektrode ab, und der oxidative Strom kehrt auf sein anfängliches Niveau zurück.

### **1.7.3 FCV**

Im Gegensatz zur Amperometrie wird bei der FCV das Potential sägezahnartig verändert. Die Amplitude beträgt meist etwa 2 V (–1V bis +1V), die Frequenz 4 Hz. Durch diese Potentialänderungen entstehen an der Elektrode kapazitive Ströme, die von der Größe ihrer Oberfläche abhängen.

Zusätzlich wird oberhalb eines ausreichend positiven Potentials vorhandenes Material oxidiert. Der daraus resultierende oxidative Strom dauert jedoch nur kurz, da die auf der Oberfläche befindlichen Moleküle schnell oxidiert werden, und in der kurzen Zeit oberhalb des Schwellenpotentials keine neuen Moleküle nachrücken könnten. Beim Absinken des Potentials auf negative Werte werden viele der oxidierten Substanzen wieder reduziert, wodurch vorübergehend ein Reduktionsstrom entsteht (siehe Abschnitt 2.1.1).

Die geringen Unterschiede in der Spannung, oberhalb bzw. unterhalb derer verschiedene Substanzen oxidiert bzw. reduziert werden, können in günstigen Fällen zur Identifikation der oxidierten Substanz herangezogen werden (siehe Abschnitt 3.1.3).

Die Größe der transienten Ströme ist von der Konzentration oxidierbarer Substanzen abhängig, da diese bestimmt, wieviel oxidierbares Material sich während dem entscheidenden Zeitintervall im Bereich der Elektrode befindet.

## **1.8 Gegenstand der vorliegenden Arbeit**

Zur Messung von Dopamin im Gehirnschnitt sollte ein elektrochemisches Verfahren etabliert werden, das es erlaubt, durch physiologische Stimuli freigesetztes Dopamin zu erfassen, und den zeitlichen Verlauf der Freisetzung adäquat darzustellen.

Mit dieser Methode sollte die Frage beantwortet werden, welcher Mechanismus die Freisetzung von Dopamin nach einer physiologischen Aktivierung dopaminerger Dendriten vermittelt. Die Freisetzung von Dopamin konnte durch direkte Applikation von Glutamat und durch synaptische Stimulation durch den STN hervorgerufen werden. Es wurde Wert darauf gelegt, in einem physiologischen Rahmen zu arbeiten. Dazu zählten insbesondere eine relativ kurze Stimulation und die Verwendung der Substanzen Glutamat und Carbachol in angemessenen Konzentrationen.

Die Beteiligung von Exozytose an der Freisetzung von Dopamin wurde durch die Entfernung von Kalzium aus dem Gehirnschnitt ausgeschlossen. Die Rolle des Dopamin-Transporters wurde durch entsprechende Antagonisten untersucht.

Um weitere Erkenntnisse über die Funktionsweise des Dopamin-Transporters zu gewinnen, wurden auch Experimente an isolierten dopaminerger Neuronen durchgeführt. Hier sollte insbesondere demonstriert werden, dass eine Freisetzung von Dopamin durch den Dopamin-Transporter allein durch Veränderung des Membranpotentials hervorgerufen werden kann.

## 2 METHODEN

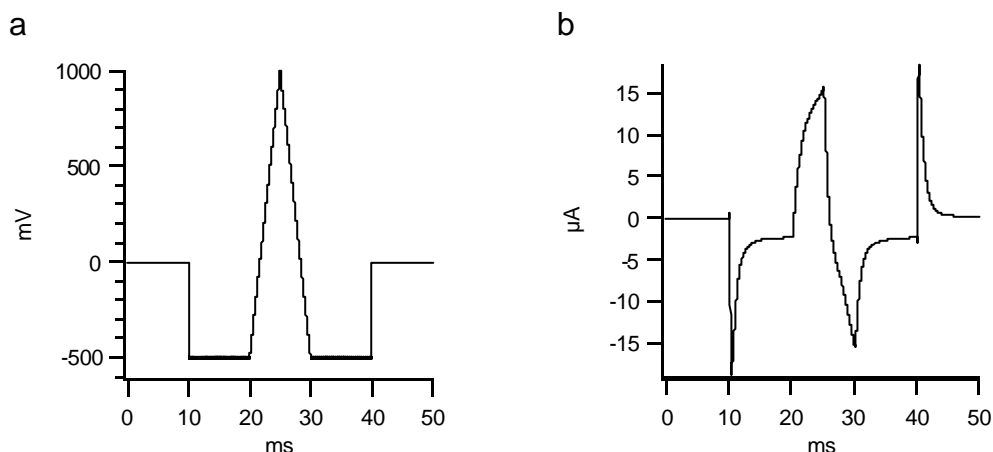
### 2.1 Vorversuche zur Elektrochemie

Alle Vorversuche wurden in physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt. Das zur Kalibrierung verwendete Dopamin wurde unmittelbar vor Gebrauch frisch zubereitet, da es in Lösung nicht stabil ist.

Die Daten wurden vom Verstärker (Axopatch 200B) bei 1 kHz gefiltert und offline weiterverarbeitet. Bei Amperometrie lag das Potential der Kohlenstoff-Elektrode in allen Experimenten bei 800 mV. Datenerfassung und Steuerung des Potentialverlaufs wurden von einem Macintosh Computer geleistet. Dazu wurde die Software IGOR (Wavemetrics) mit dem XOP „pulse control“ (Herrington und Bookman 1994) verwendet. Die initiale zeitliche Auflösung betrug 9 ms bei Amperometrie und 20  $\mu$ s bei FCV.

#### 2.1.1 Berechnung der Voltammogramme

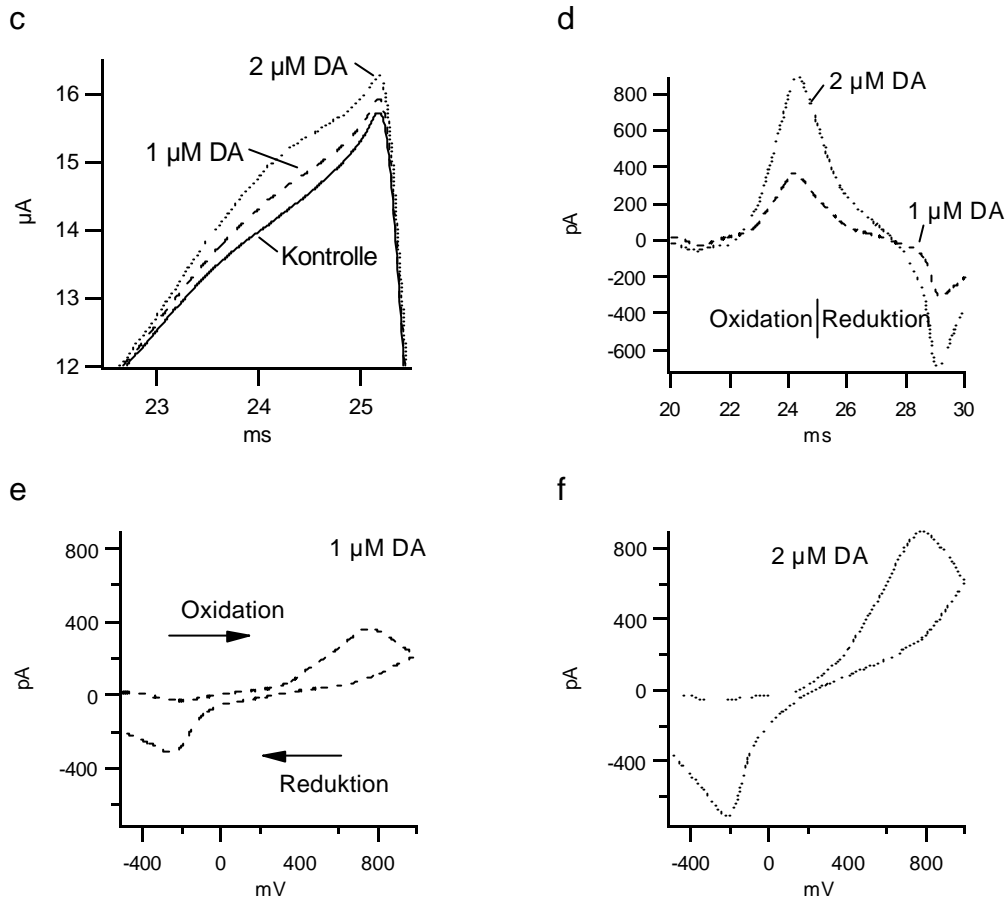
Bei FCV wurde ein sägezahnartiges Potentialmuster zwischen  $-0.5$  und  $+1$  V mit einer Frequenz von 4 Hz ununterbrochen durchlaufen (Abb. 1a). Nach einer „Einlaufzeit“ von 15 min wurden 50 Zyklen unter Kontrollbedingungen aufgezeichnet und als Ausgangswert gemittelt (Abb. 1b).



**Abbildung 1: Berechnung eines Voltammogramms**

**a** Potentialverlauf

**b** Gemittelter Strom unter Kontrollbedingungen (Dagan Elektrode)



**c** Ausschnitt. Ströme in Kontrollbedingungen, in 1 und 2 µM Dopamin (DA).   
**d** Oxidative Ströme = Ströme in Dopamin nach Subtraktion des Kontrollwerts   
**e** und **f** Oxidative Ströme bei 1 µM bzw. 2 µM Dopamin als **Voltammogramm** gegen die zur selben Zeit anliegende Spannung aufgetragen.

In jeder der verschiedenen Dopaminkonzentrationen wurden ebenfalls 50 Zyklen durchlaufen, und die letzten 10 aufgezeichnet. Diese 10 Spuren wurden ebenfalls gemittelt, und der Ausgangswert subtrahiert. Der auf diese Weise erhaltene oxidative Strom wurde als Voltammogramm dargestellt (Abb. 1c-f).

## 2.2 Experimente an Gehirnschnitten

### 2.2.1 Gewinnung der Gehirnschnitte

Für die Gehirnschnitte wurden 9-15 Tage alte Sprague Dawley Ratten dekapitiert, das Gehirn entnommen und in eine eiskalte ACSF-Lösung gebracht. Die ACSF enthielt (in mM) NaCl 125, KCl 2.5, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl 1, NaHCO<sub>3</sub> 26, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.25, Glucose 25 (pH=7.4 durch Ausgleich mit 95%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>). Das erkaltete Gehirn wurde sagittal halbiert und mit einem Vibratom in





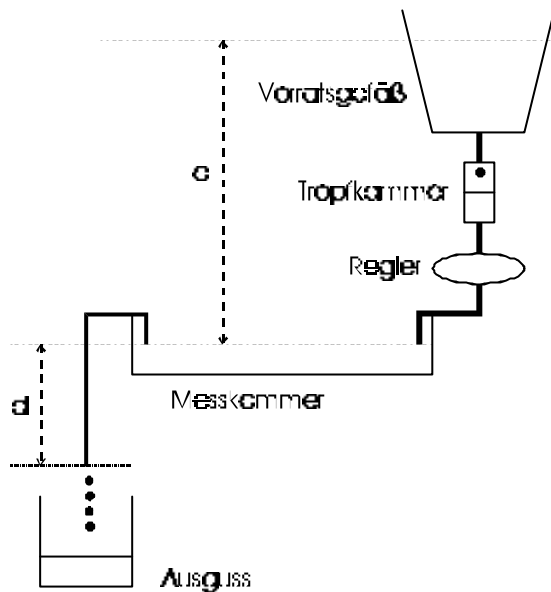
Neurone, die histologisch als dopaminerg identifiziert wurden, und für die elektrophysiologisch ein monosynaptischer Input des STN nachgewiesen ist (Barstow K.L. und Mintz I.M., 1998).

### **2.2.2 Perfusion**

Zur Perfusion wurden in den Experimenten mit Gehirnschnitten drei verschiedene Arten von Lösungen verwendet. „2 mM Ca“ entsprach im Wesentlichen der ACSF, die zur Präparation der Gehirnschnitte verwendet wurde und enthielt in mM NaCl 125, KCl 2.5, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 1, NaHCO<sub>3</sub> 26, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.25, Glucose 25 (pH=7.4 durch Perfusion mit O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>). Der Zusatz des GABA-A Inhibitors Bicuculin-Methiodid (20 µM) hatte sich in elektrophysiologischen Experimenten bewährt (Barstow K.L. und Mintz I.M., 1998).

Eine modifizierte „0 mM Ca“ Lösung wurde verwendet, um die Effekte in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium zu untersuchen. Dazu wurde das Calcium durch Magnesium ersetzt, und zusätzlich 1 mM EGTA hinzugegeben. Eine derartige Lösung entfernt zuverlässig alles extrazelluläres Kalzium und macht auch die Beteiligung intrazellulärer Kalziumspeicher unwahrscheinlich (Venance et al., 1997).

Die Diffusion von oxidierbaren Substanzen an die Oberfläche der Elektrode stellt einen wesentlichen, den oxidativen Strom limitierenden Faktor dar. Weiterhin können unterschiedliche Perfusionsraten die Diffusion von oxidierbaren Substanzen im Gehirnschnitt in unterschiedlichem Maße erleichtern (siehe 1.7.2). Daher war es für eine stabile Nulllinie notwendig, die Perfusionsrate extrem konstant zu halten. Dies galt insbesondere für die Experimente mit Stimulation des STN, in denen während der 25-minütigen Aufzeichnung keine Veränderungen an der Perfusion vorgenommen werden konnten. Die besten Ergebnisse lieferte der folgende Aufbau.



**Abbildung 3: Aufbau der Perfusion**

Die Ausflussgeschwindigkeit wurde durch eine gleichbleibende orthostatische Kraft konstantgehalten, die nur von der Höhendifferenz  $d'$  abhing. Zur Regulation der Einflussgeschwindigkeit wurden Drehregluatoren verwendet. Die Einführung von Tropfkammern erlaubte zusätzlich, die Perfusionsrate zu quantifizieren, um Abweichungen schnell feststellen zu können. Die Perfusionsrate wurde auf 0.5 ml/s eingestellt.

Alle Antagonisten wurden durch die Perfusion appliziert.

Alle Experimente wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt.

### 2.2.3 Elektrochemische Messungen

Dopamin wurde durch oxidative Ströme an Kohlenfaser-Elektroden gemessen, die einen Durchmesser von 30  $\mu\text{m}$  und eine Länge von etwa 100  $\mu\text{m}$  hatten (Quanteon SF1A). Das Potential an der Kohlenfaser wurde bei 800 mV gehalten. Im Vergleich mit anderen, häufiger verwendeten Protokollen wie „Fast Cyclic Voltammetry“ oder „Chronamperometry“ bietet dieses einfache Protokoll („Amperometrie“) den Vorteil einer nahezu beliebig hohen zeitlichen Auflösung. Durch das Mitteln von jeweils 111 Werten über die Zeit konnte das Signal im Vergleich zum Hintergrundrauschen um den Faktor 10 verstärkt werden. Dies

ermöglichte die Darstellung der kleinen, durch physiologische Stimuli freigesetzten Dopaminmengen bei einer zufriedenstellenden zeitlichen Auflösung.

Vor jeder Serie von Experimenten wurde die verwendete Elektrode kalibriert. Dies geschah durch Ersetzen der Badlösung durch 1  $\mu\text{M}$  Dopamin in physiologischer Kochsalzlösung, nachdem eine stabile Ausgangslage erreicht war. Der dadurch hervorgerufene oxidative Strom diente als Maß für die Sensitivität einer Elektrode. Die Dopaminlösung wurde jeweils frisch zubereitet, da Dopamin bei physiologischem pH-Wert in Lösung nicht stabil ist.

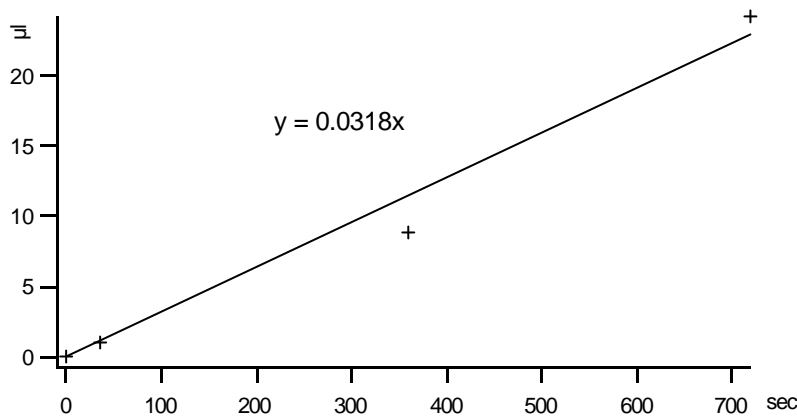
Nachdem die Elektrode in den Gehirnschnitt eingebracht wurde, musste nochmals eine stabile Nulllinie abgewartet werden.

Selbstverständlich konnte eine Beeinflussung der Neurone im Gehirnschnitt durch das an der Elektrode anliegende Potential von immerhin 800 mV nicht ausgeschlossen werden. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass das elektrische Feld um die Elektrode sehr rasch abfällt, und vor allem während des gesamten Experiments konstant gehalten wurde. Dies war ein weiterer Vorteil der amperometrischen Messung, im Vergleich zu Methoden, bei denen erhebliche Potentialänderungen verwendet werden.

Keine der für Perfusion und Stimulation verwendeten Lösungen enthielt eine leicht oxidierbare Substanz, die einen oxidativen Strom induzieren könnte. Insbesondere wurde sichergestellt, dass GBR12935 keinen Einfluss auf die evozierten oxidativen Ströme ausübt (siehe 3.2.5). Es befanden sich jedoch einige oxidierbare Substanzen im Gehirnschnitt selbst, welche einen gleichbleibenden Hintergrundstrom verursachten.

#### **2.2.4 Stimulation**

Zur lokalen und zeitlich präzisen Applikation bestimmter Lösungen wurde ein Picospritzer verwendet. Dabei ist die freigesetzte Menge zur Dauer der Applikation weitgehend proportional.



**Abbildung 4: Kalibrierung des Picospritzers**

*In dieser Grafik wurde das aus der Applikationspipette freigesetzte Volumen bei 20 psi gegen die Dauer der Applikation aufgetragen (+). Es ergab sich ein linearer Zusammenhang, demzufolge pro Sekunde etwa 0.0318 μl freigesetzt wurden.*

Abbildung 4 zeigt eine Kalibrierung des Picospritzers mit den verwendeten Kapillaren bei einem Druck von 20 psi. Pro Sekunde wurden in etwa 30 nl freigesetzt. Eine analoge Kalibrierung mit einem Druck von 30 psi ergab 40 nl pro Sekunde.

Zur direkten Stimulation der Dendriten wurde Glutamat in einer Konzentration von 1 mM in physiologischer Kochsalzlösung appliziert, was weitgehend der Konzentration im synaptischen Spalt entspricht (Clements et al., 1992, Clements, 1996). Die Dauer der Applikation betrug 9 Sekunden, der Druck 30 psi. Das entspricht einem applizierten Volumen von 360 nl.

Für die Stimulation des Ncl. subthalamicus wurde 10 mM Carbachol in physiologischer Kochsalzlösung appliziert (36 s, 20 psi). Dies entsprach einem applizierten Volumen von insgesamt 1 μl bzw. von 10 nmol Carbachol. Diese Menge liegt im Bereich dessen, was von anderen Autoren zur Stimulation des STN verwendet wurde (Rosales et al., 1994, Rosales et al., 1997).

Rosales applizierte in vivo 1 μg gelöst in 0.25 μl. Das entspricht 5.3 nmol bei einer Konzentration von 21 mM. Flores benutzte Bad-Applikation von 10 μM Carbachol für 5 min. Das entspricht einer Gesamtmenge von 50 nmol.

Die Stimulationen erfolgten genau im Abstand von 30 Minuten, um Effekte durch ein unterschiedliches Ausmaß an Erholung bzw. Erschöpfung des Dopaminpools auszuschließen.

### **2.2.5 Datenerfassung und –verarbeitung**

Bei Applikation von Glutamat bestand eine Messung aus 18 s Nulllinie, der Applikation von 9 s und weiteren 252 s Aufzeichnungsdauer. Das entspricht einer Gesamtdauer von 4.65 min.

Bei Stimulation des STN bestand die Aufzeichnung aus einer Nulllinie von 290 s, der Applikation von 36 s und weiteren 1100 s danach. Das bedeutet eine Gesamtdauer von knapp 24 min.

Die Daten wurden vom Verstärker (Axopatch 200B) bei 1 kHz gefiltert und offline zu 1 Punkt pro Sekunde gemittelt. Datenerfassung und Steuerung der Stimulation wurden von einem Macintosh Computer geleistet. Dazu wurde die Software IGOR (Wavemetrics) mit dem XOP „pulse control“ (Herrington und Bookman 1994) verwendet. Das initiale Samplingintervall betrug 9 ms.

Die dargestellten Werte entsprechen Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

## **2.3 Experimente an einzelnen Neuronen**

### **2.3.1 Präparation der Neurone**

Zur Präparation dissoziierter Neurone wurden zunächst Gehirnschnitte hergestellt. Sie verblieben jedoch nach dem Schneiden in eiskalter ACSF. Unter dem Binokular wurde die SNc herauspräpariert und 8 min in einer Enzymlösung bei 37°C inkubiert. Sie enthielt (in mM) NaSO<sub>4</sub> 82, KSO<sub>4</sub> 30, MgCl<sub>2</sub> 5, HEPES 10, Glucose 10 und 10mg/10ml Protease XIII (Sigma) (pH=7.4). Danach wurden sie in MEM (Gibco) gewaschen und in eine weitere Lösung gebracht, die aus MEM plus 25mM Glucose, 10mM HEPES, 10mg/10ml Trypsin-Inhibitor und 10mg/10ml Rinder-Serumalbumin bestand (pH=7.4). Durch mehrmaliges Pipettieren mit einer Pasteur-Pipette wurden von den Gewebestückchen einzelne Zellen abgetrennt. Der zellhaltige Überstand wurde abpipettiert und bei

5°C aufbewahrt. In dieser Zellsuspension konnten die dopaminergen Neurone leicht aufgrund ihrer Größe und Morphologie identifiziert werden.

### 2.3.2 Lösungen

Auch für diese Experimente wurden extrazelluläre Lösungen mit Kalzium, ohne Kalzium und mit GBR12935 verwendet. Sie basierten im Wesentlichen auf der Tyrode's Lösung.

Für das erste Experiment wurde eine extrazelluläre Lösung mit 2 mM Kalzium verwendet. Sie enthielt in mM NaCl 120, KCl 3, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 2, Glucose 20, HEPES 10 (pH=7,4) . Das entspricht einer extrazellulären Na-Konzentration von 120 mM und einer Cl-Konzentration von 127 mM.

Die Intrazelluarflüssigkeit in der Patch-Pipette enthielt (in mM) CsMethansulfonat 88.6, MgCl<sub>2</sub> 3.7, NaCl 4.6, EGTA 7.4, Ascorbinsäure 0.37, Dopamin 37, MgATP 4, MgGTP 0.3, PKreatin 14 (pH=7.4 mit CsOH). Insgesamt bedeutet das folgende intrazelluläre Konzentrationen (in mM): Na = 4.6, Cl = 12, Dopamin = 37.

Für das Experiment in 0 mM extrazellulärem Kalzium wurde wie in den Gehirnschnitten Kalzium durch Magnesium ersetzt. Insgesamt enthielt die Extrazellularflüssigkeit in mM NaCl 150, KCl 4, MgCl<sub>2</sub> 4, Glucose 10, HEPES 10 (pH=7,4). Das entspricht einer extrazellulären Na-Konzentration von 150 mM und einer Cl-Konzentration von 158 mM.

Intrazellulär wurde in diesem Experiment eine Lösung verwendet aus CsMethansulfonat 81.6, MgCl<sub>2</sub> 3.4, EGTA 6.8, HEPES 6.8, Dopamin 40, NaCl 10, Ascorbinsäure 0.5, MgATP 4, MgGTP 0.3 und PKreatin 14. Das entspricht Konzentrationen von Na = 10, Cl = 10, Dopamin = 40 mM.

Der Effekt von GBR12935 wurde in einem Experiment mit Kalzium untersucht. Da in diesen Experimenten nicht kontinuierlich perfundiert wurde, wurde die gesamte Lösung im Bad durch eine entsprechende Lösung mit 20 nM GBR12935 ersetzt. Nach den Messungen in GBR12935 wurde die Messkammer mehrere Male mit frischer Extrazellularlösung gewaschen.

Die verwendete Extrazellulärflüssigkeit bestand aus (in mM) NaCl 150, KCl 4, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 2, Glucose 10, HEPES 10 (pH=7.4). Die Intrazellulärflüssigkeit entsprach der im Experiment mit 0 mM Ca.

### **2.3.3 Elektrophysiologie**

In diesen Experimenten wurde mit der Patch-Clamp-Technik gearbeitet. Es wurden einzelne Zellen in „whole-cell“-Konfiguration gehalten. Voraussetzung für alle Experimente war ein stabiler Gigaseal. Leider war ein mit dem Transport von Dopamin verbundener Strom nicht erkennbar. Daher wurde der „Voltage-Clamp“ nur zur Kontrolle des Membranpotentials verwendet. Gemessen wurde der oxidative Strom an einer Karbonfaser-Elektrode.

Der Widerstand der feuerpolierten Glaspipetten (Borosilikat) lag um 5 MΩ. Die Zellen wurden auf einem Ruhepotential von -60 mV gehalten, um die Differenz zu positiven Potentialsprüngen etwas zu vermindern. Davon ausgehend wurden 3 s dauernde Rechteckpulse auf Potentiale zwischen -100 und +100 mV durchgeführt.

### **2.3.4 Elektrochemie**

Nachdem die Zelle vom Boden der Messkammer abgehoben und die Membran zur „whole cell“ Konfiguration durchbrochen war, wurde eine Karbonfaser-Elektrode an die Zelle herangeführt. Aufgrund der Größenverhältnisse und der feinen Manipulationen wurden für diese Experimente kleinere Elektroden verwendet als im Gehirnschnitt (Dagan Elektroden mit einem Durchmesser von 5 μm).

Die Spannung von 800 mV wurde ebenfalls vor Beginn des Experiments angelegt, und eine stabile Nulllinie abgewartet. Es wurden die Ströme vor, während und nach dem Rechteckpuls gemessen. Insgesamt bestand die Messung aus 1+3+1=4 Sekunden.

### **2.3.5 Datenerfassung und –verarbeitung**

Die amperometrischen Daten wurden vom Verstärker bei 1 kHz gefiltert und mit einer initialen zeitlichen Auflösung (SI) von 20-100  $\mu\text{s}$  von IGOR erfasst. Die kurzen SI wurden bei kleinen Potentialdifferenzen verwendet, um möglicherweise sehr kleine Ströme aufzulösen. Offline wurde das SI durch Mitteln auf 20 ms erweitert, um das Verhältnis von Signal zu Rauschen zu verbessern.

Die Amplitude einer Antwort wurde berechnet aus der Differenz von mittlerem Strom während des Rechteckpulses (von  $t=3$  bis  $t=4$  s) und der Nulllinie ( $t=1$  bis  $t=2$ ).

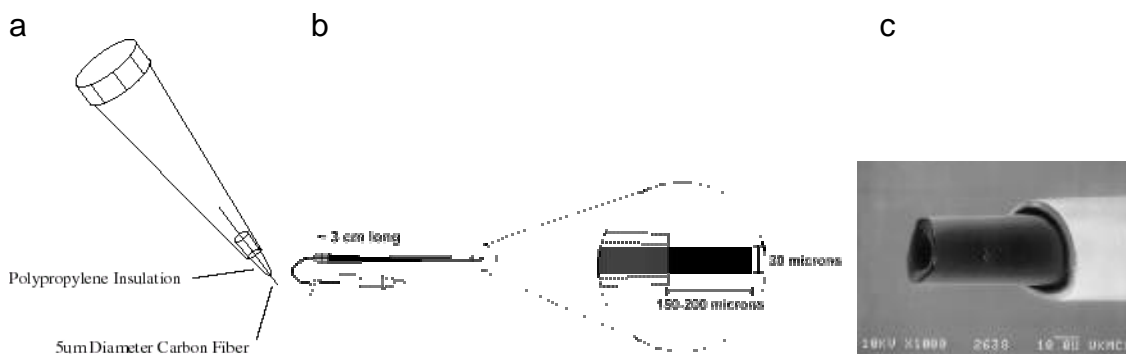


## **3 ERGEBNISSE**

### **3.1 Suche nach dem geeignetsten elektrochemischen Verfahren**

#### **3.1.1 Vergleich verschiedener Elektroden**

Zunächst wurden zwei verschiedene Elektroden mit Amperometrie und FCV kalibriert, um Vor- und Nachteile zu ermitteln. Neben technischer Feinheiten wie ihrem Aufbau und der Verbindung zum Vorverstärker lag der Unterschied zwischen den beiden Elektroden hauptsächlich in der Größe ihrer Oberfläche.



#### **Abbildung 5: Karbonfasern**

**a** Dagan ProcFE Elektrode mit einem Durchmesser von 5 µm

**b** Quanteon SF1A Elektrode mit einem Durchmesser von 30 µm

**c** Bild von der Spitze einer Quanteon SF1A Elektrode

Die Amplitude des Rauschens unter Normalbedingungen war mit 70 pA<sub>p-p</sub> im Vergleich zu 5 pA<sub>p-p</sub> bei den Quanteon Elektroden deutlich höher als bei den Dagan Elektroden. Dies kann durch ihre größere Oberfläche erklärt werden. Ebenfalls durch die Oberfläche bedingt sind die immensen kapazitiven Ströme, aufgrund derer die Quanteon Elektroden nicht für FCV verwendet werden konnten.

Die Sensitivität der Quanteon Elektroden, gemessen pA/µM Substanz, lag bei Amperometrie etwa um den Faktor 10 über der der Dagan Elektroden (siehe Tabelle 3).

### 3.1.2 Sensitivität von Amperometrie und FCV

Die Sensitivität eines Verfahrens wird durch zwei Eigenschaften bestimmt. Die erste ist die absolute Sensitivität in pA/ $\mu$ M Substanz, die zweite das Verhältnis des Signals im Vergleich zum Rauschen.

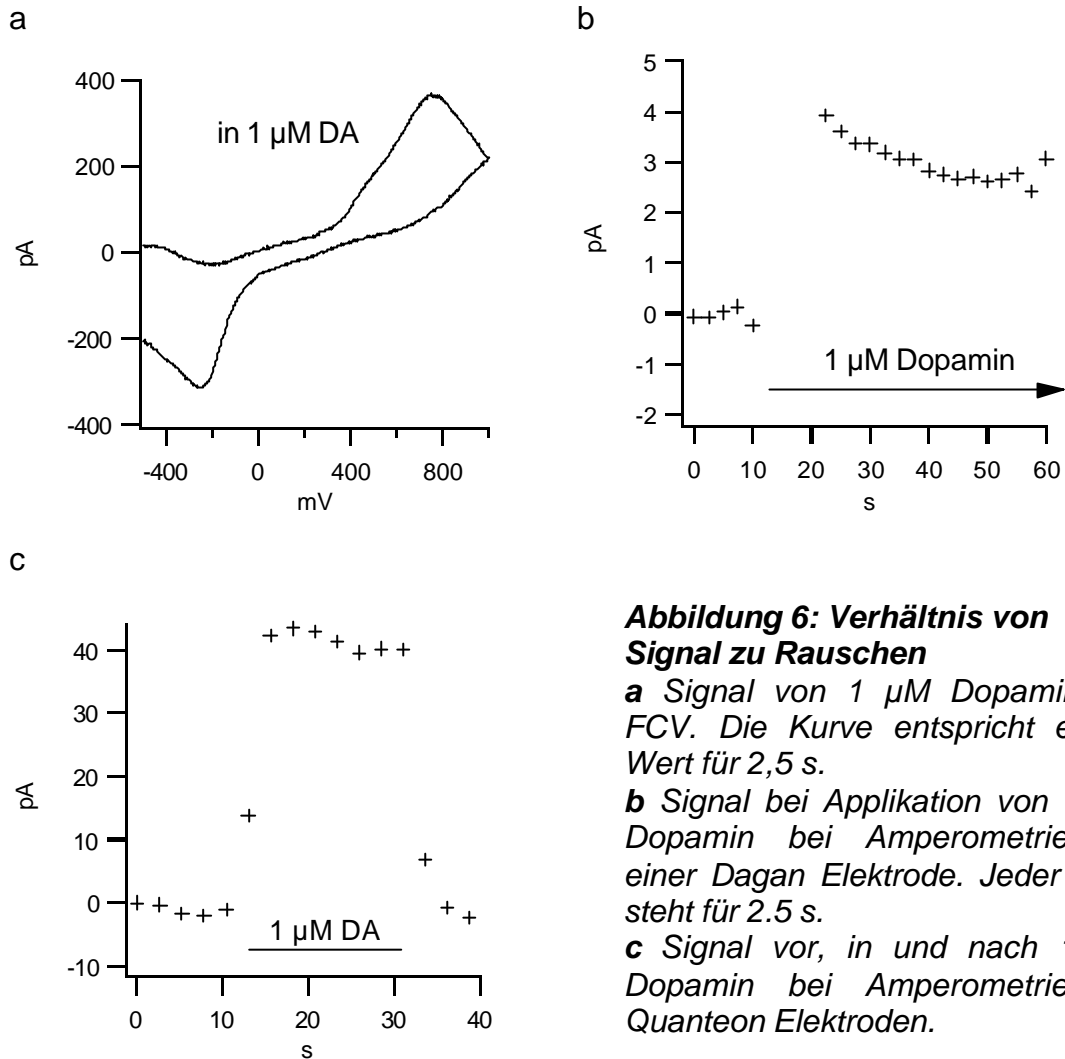
Dopamin	pA bei FCV Dagan Elektroden	pA bei Amperometrie Dagan Elektroden	pA bei Amperometrie Quanteon Elektroden
0.1 $\mu$ M			3.4
0.5 $\mu$ M	150		25
1 $\mu$ M	300	3	40
2 $\mu$ M	883		
10 $\mu$ M		54	
100 $\mu$ M		680	

***Tabelle 3: Absolute Sensitivität***

*Die Werte stellen die Amplitude des oxidativen Stromes dar, der durch die angegebene Konzentration an Dopamin hervorgerufen wurde.*

Obwohl die absolute Sensitivität der FCV deutlich über der von Amperometrie lag (Tabelle 3), verlieh das deutlich bessere Verhältnis von Signal zu Rauschen der Amperometrie eine mindestens ebenso gute Auflösung (Abb. 6).

Für diesen Vergleich wurde die effektive zeitliche Auflösung der beiden Verfahren angeglichen. Aufgrund der Zyklusfrequenz von 4 Hz und dem Mitteln von 10 Spuren liefert FCV nur einen Wert pro 2.5 s. Daher wurden ebenfalls jeweils 2.5 s der amperometrischen Daten zu einem Wert gemittelt. Dabei muss berücksichtigt werden, dass FCV aufgrund der feineren initialen zeitlichen Auflösung von 20  $\mu$ s (im Vergleich zu 9 ms) deutlich mehr Speicherplatz im Computer benötigte, was die Dauer der Aufzeichnung limitieren konnte.



**Abbildung 6: Verhältnis von Signal zu Rauschen**

**a** Signal von 1  $\mu\text{M}$  Dopamin bei FCV. Die Kurve entspricht einem Wert für 2,5 s.

**b** Signal bei Applikation von 1  $\mu\text{M}$  Dopamin bei Amperometrie mit einer Dagan Elektrode. Jeder Wert steht für 2,5 s.

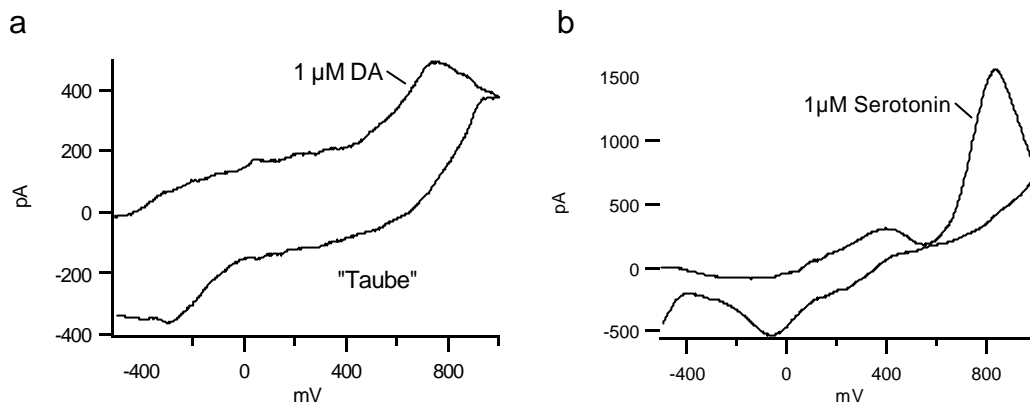
**c** Signal vor, in und nach 1  $\mu\text{M}$  Dopamin bei Amperometrie mit Quanteon Elektroden.

**3.1.3 Selektivität von FCV und Amperometrie**

Als Vorteil der FCV gilt vor allem die Möglichkeit, über die Form des Voltammogramms eine Aussage über die oxidierte Substanz zu machen. Die Voltammogramme für 1  $\mu\text{M}$  Dopamin und 1  $\mu\text{M}$  Serotonin unterschieden sich vor allem in Anzahl und Position der Reduktionsmaxima (Abb. 7).

Allerdings zeigte insbesondere das weniger scharfe Voltammogramm für Dopamin auch die Schwächen dieses Verfahrens auf. Eine instabile Elektrode oder das Auftreten von Stoffgemischen können die Maxima undeutlich werden lassen, und dadurch sowohl die Quantifizierung der Konzentration als auch den Rückschluss auf die oxidierte Substanz erschweren. Für die Stabilität eines

Voltammogramms ist es wichtig zu berücksichtigen, dass es aus der Differenz von Strömen bis zu 15  $\mu\text{A}$  berechnet wird (siehe Abb. 1). Daher können schon geringe Veränderungen der Elektrode das Voltammogramm undeutlich machen.



**Abbildung 7: Vergleich der Voltammogramme für Dopamin und Serotonin**

**a** Voltammogramm von  $1 \mu\text{M}$  Dopamin

**b** Voltammogramm von  $1 \mu\text{M}$  Serotonin

Beide Voltammogramme wurden mit derselben Dagan Elektrode gemessen.

### 3.1.4 Zusammenfassung

Quanteon Elektroden sind aufgrund ihrer Oberfläche sensitiver, aber auch rauschempfindlicher als Dagan Elektroden.

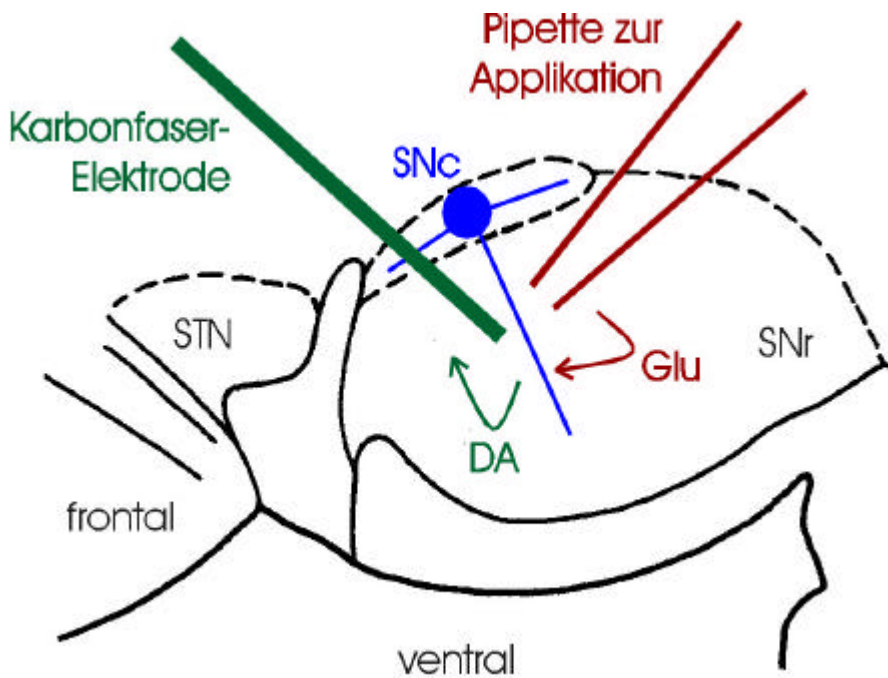
FCV ist das sensitivere Verfahren, Amperometrie liefert das bessere Verhältnis von Signal zu Rauschen und besitzt die feinere zeitliche Auflösung. Eine Identifikation der oxidierten Substanz mit FCV ist möglich, aber unzuverlässig.

## 3.2 Applikation von Glutamat im Gehirnschnitt

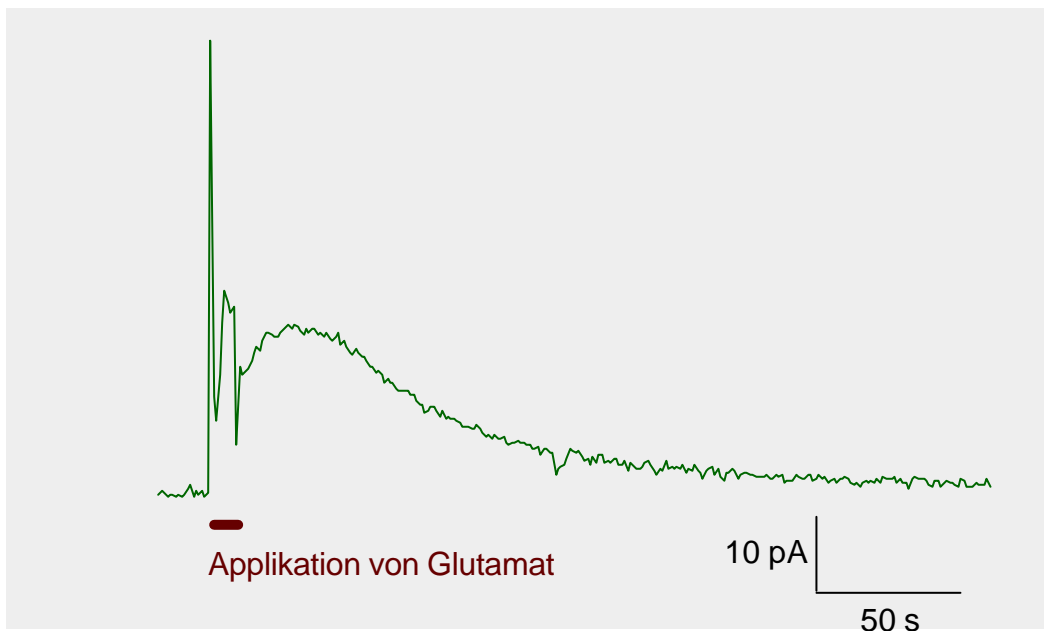
### 3.2.1 Vorstellung der Antwort

In einer ersten Serie von Experimenten am Gehirnschnitt wurde die Freisetzung von Dopamin aus Dendriten dopaminerger Neurone in der Substantia nigra (SN) durch die lokale Applikation von Glutamat hervorgerufen (Abb. 8).

a



b



**Abbildung 8: Freisetzung von Dopamin nach Stimulation durch Glutamat**

**a** Versuchsaufbau. Dopaminerge Dendriten der SNr wurden durch lokale Applikation von 1 mM Glutamat (Glu) stimuliert. Das freigesetzte Dopamin (DA) wurde durch eine Karbonfaser-Elektrode gemessen.

**b** Eine typische Antwort unter Normalbedingungen (2 mM Ca). Der oxidative Strom an der Karbonfaser-Elektrode erreicht sein Maximum nach ca. 30 Sekunden und dauerte insgesamt 2-3 Minuten. Die Amplitude von 45 pA entsprach einer Zunahme der Dopaminkonzentration von etwa 1.8  $\mu$ M.

Die Amplitude der beobachteten Antworten lag zwischen 2 und 45 pA. Diese hohe Variabilität ergab sich vermutlich aufgrund der unterschiedlichen Sensitivität der verwendeten Elektroden und der unterschiedlichen Eigenschaften der einzelnen Gehirnschnitte. Bei einer durchschnittlichen Sensitivität der Elektroden von 12 pA/ $\mu$ M Dopamin entsprechen diese Amplituden einer Konzentration von 0.17 bzw. 3.8  $\mu$ M Dopamin. Antworten in 2 mM Ca wurde in 10 Gehirnschnitten beobachtet.

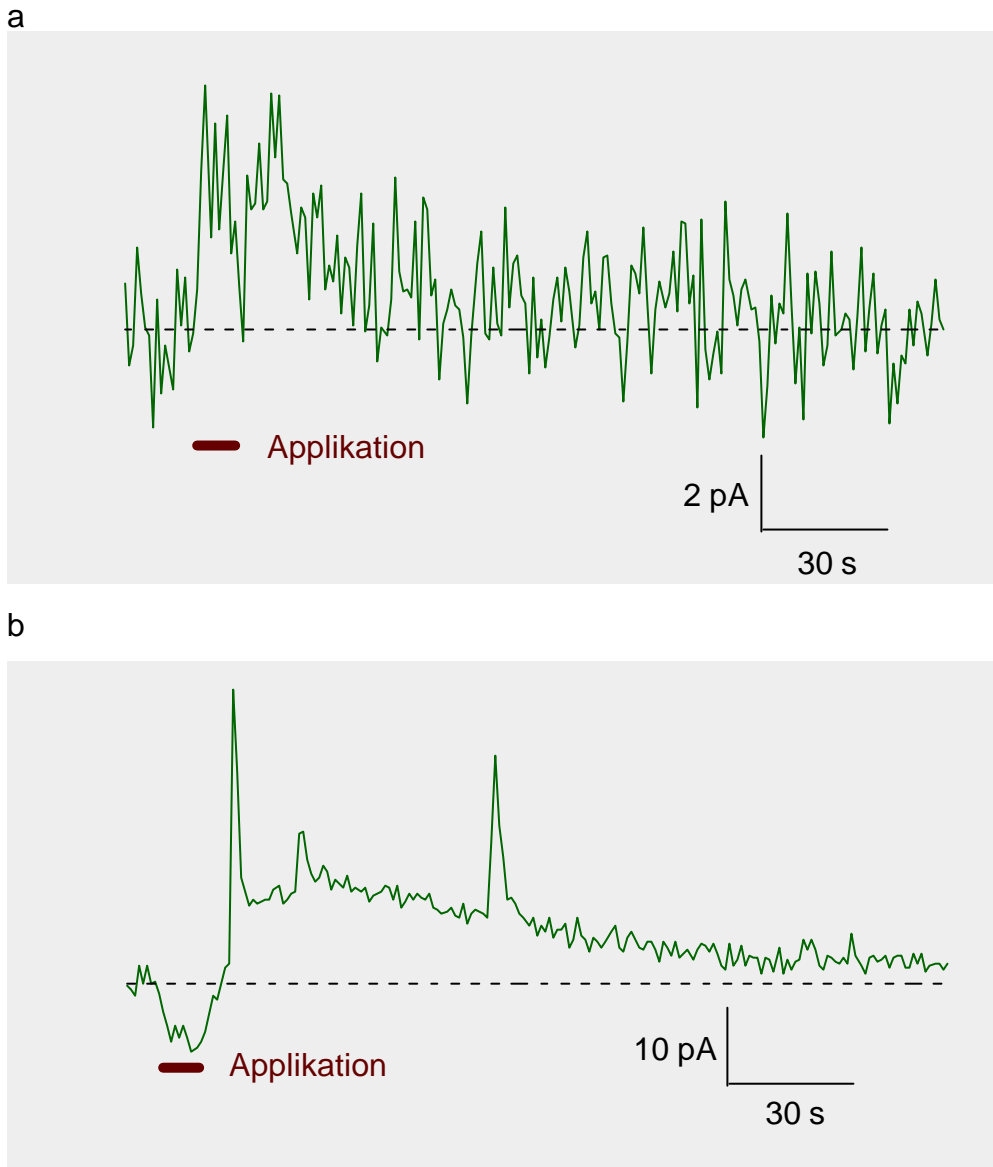
Die Antwort in Abb. 8 besteht aus einer schnellen und einer langsamen Komponente. Der langsame Anteil entstand durch die Freisetzung oxidierbarer Substanzen in der SN. Neben dopaminergen Dendriten wurden auch serotoninerge und noradrenerge Axonterminalen als potentielle Quellen für leicht oxidierbare Monoamine beschrieben (Dray et al., 1976 bzw. Collingridge et al., 1979). Allerdings war die Freisetzung von Transmittern aus Axonterminalen nach Applikation von Glutamat weniger wahrscheinlich als bei den in vorhergehenden Studien verwendeten unspezifischen Stimuli wie KCl.

Eine erwähnenswerte Beteiligung des Dopamin-Metaboliten DOPAC an den beobachteten oxidativen Strömen war ebenfalls unwahrscheinlich, da der Abbau von Dopamin zu DOPAC mit einer Halbwertszeit von ca. 10 min zu langsam war.

Daher lag der Antwort auf Applikation von Glutamat in der SN sehr wahrscheinlich eine Freisetzung von Dopamin zugrunde (siehe auch Abschnitt 4.2).

### **3.2.2 Applikationsartefakte**

Der schnelle, und auf den Zeitraum der Applikation beschränkte Anteil der Antwort wurde als durch die Applikation von Glutamat verursachter Artefakt verstanden. Abhängig von der Anordnung von Applikationspipette und Messelektrode waren diese Signale positiv oder negativ (Abb. 9a bzw. b).



**Abbildung 9: Applikationsartefakte**

**a** positiver Artefakt während der Applikation von Glutamat

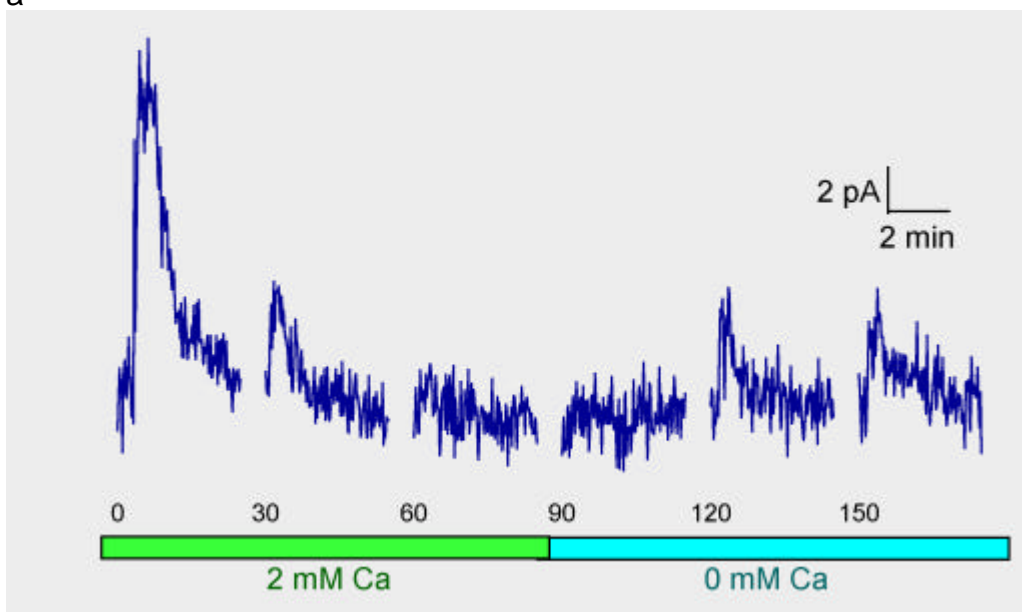
**b** negativer Artefakt während der Applikation von Glutamat

Da Diffusion einen wesentlichen, den oxidativen Strom limitierenden Faktor darstellt (siehe 1.7.2), könnte die durch die Applikation hervorgerufene, lokale Durchmischung der die Elektrode umgebenden Lösung einen positiven Artefakt erklären. Einen negativen Artefakt würde man erwarten, wenn die Elektrode während der Applikation dem Flüssigkeitsstrom aus der Applikationspipette ausgesetzt war, der wie bereits erwähnt im Gegensatz zum Gehirnschnitt keine oxidierbaren Substanzen enthielt.

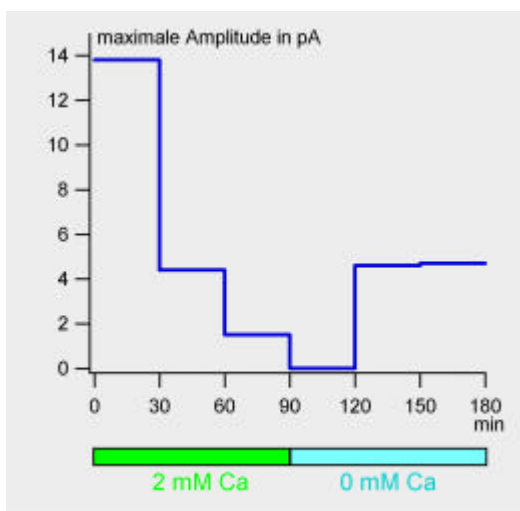
### 3.2.3 Antwort in 2 mM und 0 mM extrazellulärem Calcium

Leider war die Antwort auf Applikation von Glutamat in 2 mM Kalzium nicht stabil. Bei wiederholter Stimulation nahm die Amplitude der Antwort kontinuierlich ab, und verschwand schließlich im Hintergrundrauschen (Abb. 10). Daher konnte sie nicht pharmakologisch charakterisiert werden. Im selben Experiment erholte sich die Antwort jedoch, nachdem extrazelluläres Kalzium durch Perfusion mit 0 mM Kalzium Lösung entfernt wurde.

a



b



#### **Abbildung 10: Antwort in ACSF mit und ohne Calcium**

*a* Antworten bei aufeinanderfolgenden Stimulationen (im Abstand von jeweils 30 min)

Die initiale Amplitude betrug in diesem Fall 14 pA (933 nM Dopamin). Bei weiteren Stimulationen nahm die Amplitude zunächst auf 4.4 pA ab, nach der dritten war keine Antwort mehr zu erkennen. Bei Perfusion mit 0 mM Ca erholte sich die Antwort, und blieb stabil bei ca. 4.5 pA.

*b* Zusammenfassung des zeitlichen Verlaufs der maximalen Amplitude



Diese kalzium-unabhängige Antwort war sehr stabil, und konnte in 11 Gehirnschnitten untersucht werden. Die durchschnittliche Amplitude betrug etwa  $10 \pm 7.7$  pA. Innerhalb desselben Gehirnschnittes unterschieden sich die Amplituden jedoch nur um etwa 1 pA. Für die folgenden Experimente wurden nur völlig stabile Antworten verwendet.

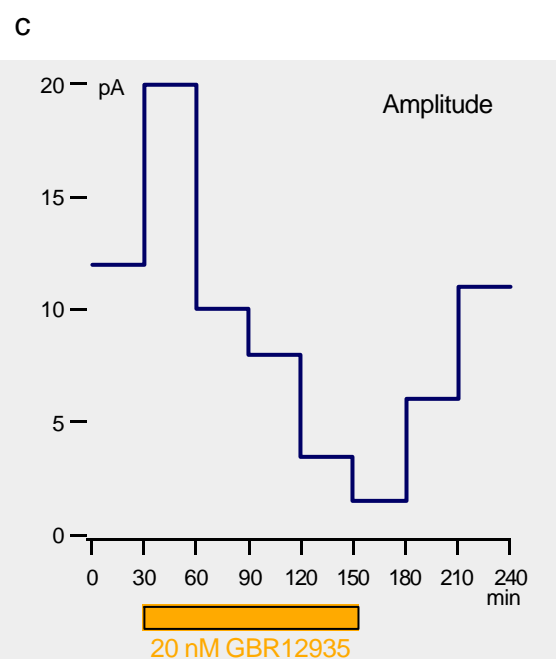
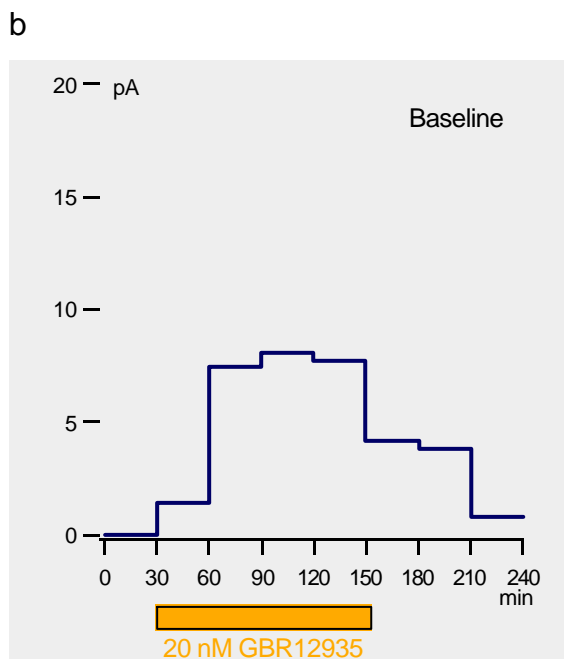
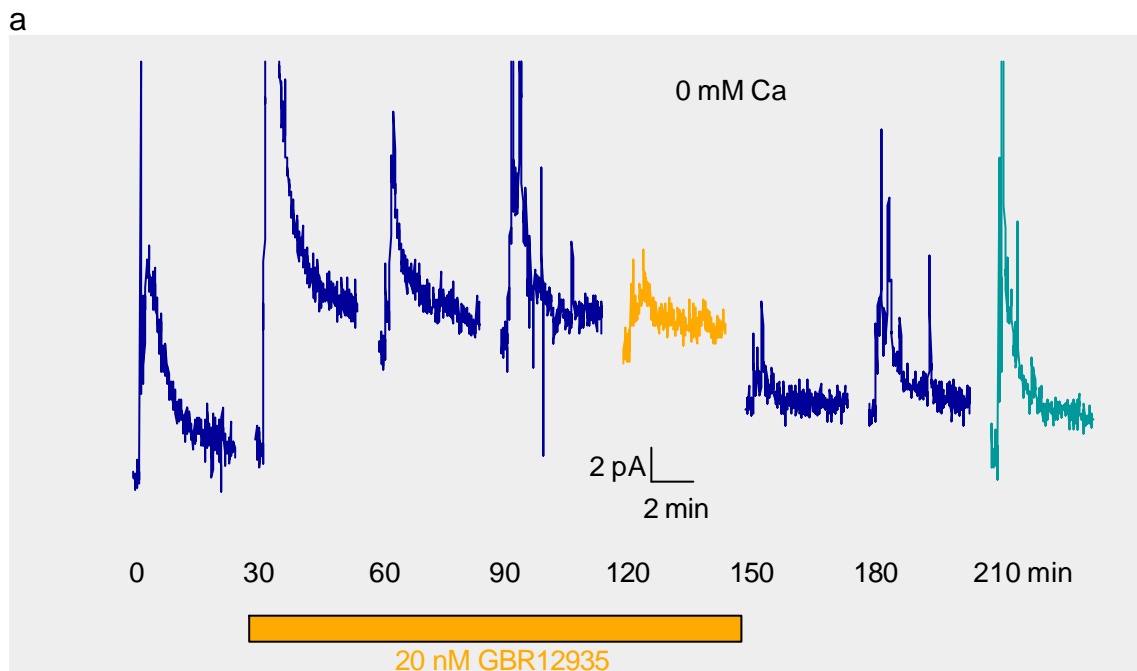
Da die Freisetzung durch Exozytose einen kalzium-abhängigen Prozess darstellt, war die Beteiligung von Exozytose an der Freisetzung von Dopamin unter kalzium-freien Bedingungen unwahrscheinlich. Weiterhin war eine Kontamination der Antwort durch Freisetzung anderer Monoamine aus Axonterminalen unter kalzium-freien Bedingungen unwahrscheinlich. Einen weiteren Beleg dafür, dass eine Freisetzung von Dopamin dieser Antwort zugrunde lag, liefert ihre im Folgenden dargelegte Abhängigkeit von der Funktion des DAT (siehe auch Abschnitt 4.2).

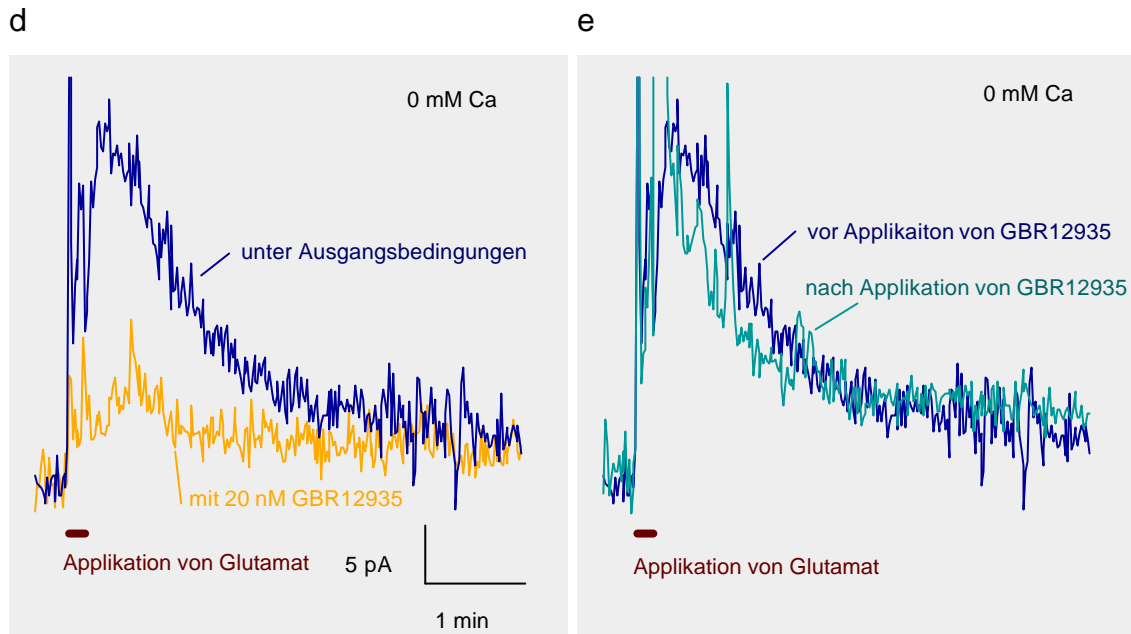
#### **3.2.4 Effekte von GBR12935 auf die Antwort in 0 mM Ca**

Unter kalzium-freien Bedingungen war eine Freisetzung von Dopamin durch Exozytose unwahrscheinlich. Um die Rolle des DAT für diese Art der Freisetzung zu untersuchen, wurde der Effekt des spezifischen DAT-Antagonisten GBR12935 auf die kalzium-unabhängige Freisetzung von Dopamin betrachtet. Eine Hemmung der Wiederaufnahme von Dopamin sollte sich in einer Erhöhung der extrazellulären Dopaminkonzentration widerspiegeln, eine Hemmung der Freisetzung von Dopamin müsste zu einer Verminderung der Antwort auf die Stimulation durch Glutamat führen.

Diese Experimente wurden mit besonders stabilen Antworten durchgeführt, bei denen sich die initialen Amplituden nicht unterschieden. Das gesamte Experiment wurde unter kalzium-freien Bedingungen durchgeführt (Abb. 11 und 12). GBR12935 führte in einigen Experimenten zu einer Erhöhung der Nulllinie (Abb. 11a,b), und vergrößerte initial die Amplitude der Antwort auf Glutamat (Abb. 11a,c). Beide Effekte können durch die Hemmung der Aufnahme von Dopamin durch GBR12935 erklärt werden. Im weiteren Verlauf dieses Experiments verminderte GBR12935 die Amplitude der Antwort bis auf ca. 30%

ihres initialen Werts (Abb. 11a,c,d). Beide Effekte waren voll reversibel (Abb. 11a,e). Dies zeigte, dass die beobachteten Effekte nicht durch eine Änderung in der Sensitivität der Elektrode oder durch eine Verminderung der Fähigkeit des Gehirnschnitts, Dopamin freizusetzen, hervorgerufen wurden. Es illustriert auch die Stabilität des Versuchsaufbaus während des mehrere Stunden dauernden Experiments.





**Abbildung 11: Effekt von GBR12935 auf die Antwort in 0 mM Ca**

**a** Freisetzung von Dopamin bei wiederholter Applikation von Glutamat

**b** Zeitlicher Verlauf der Nulllinie. Die reversible Erhöhung um etwa 7.5 pA durch GBR12935 entsprach ca. 1  $\mu$ M Dopamin und lässt sich durch eine verminderte Wiederaufnahme erklären.

**c** Zeitlicher Verlauf der Amplitude der Antwort auf Stimulation durch Glutamat. Die initiale Amplitude von 12 pA entsprach einer Erhöhung der extrazellulären Konzentration von Dopamin um 1.7  $\mu$ M. Nach Applikation von GBR12935 kam es nach einer initialen Zunahme zu einer deutlichen Abnahme der Amplitude.

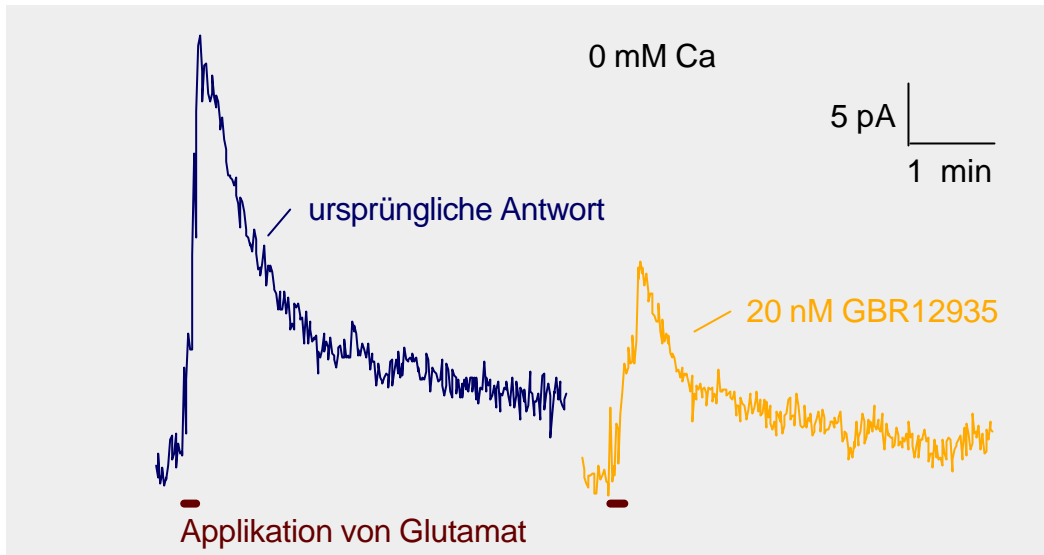
**d** Vergleich der letzten Antwort in GBR12935 mit der ursprünglichen Antwort. Die Amplitude war auf etwa 3,5 pA reduziert, was 29% der initialen Antwort entsprach.

**e** Vergleich der Antwort nach dem Auswaschen von GBR12935 mit der ursprünglichen. Sowohl die Nulllinie als auch die Amplitude wurden wiederhergestellt.

Wie bereits angedeutet, wurde eine Änderung der Nulllinie und die initiale Zunahme der Amplitude nicht in allen Experimenten mit GBR12935 beobachtet. Abb. 12 zeigt ein Beispiel für ein solches Experiment. Doch auch in diesen Experimenten führte GBR12935 zu einer Verminderung der Freisetzung von Dopamin nach Stimulation durch Glutamat.

Eine Hemmung der Antwort auf Glutamat durch GBR12935 unter kalzium-freien Bedingungen wurde in insgesamt 4 Gehirnschnitten beobachtet. In 3 Fällen war sie voll reversibel. Die Amplitude wurde im Schnitt auf  $30 \pm 2.6\%$  des

ursprünglichen Wertes reduziert. Bei Verwendung des „Student“ t-Tests entspricht dies einem Signifikanzniveau von  $p < 1\%$ .

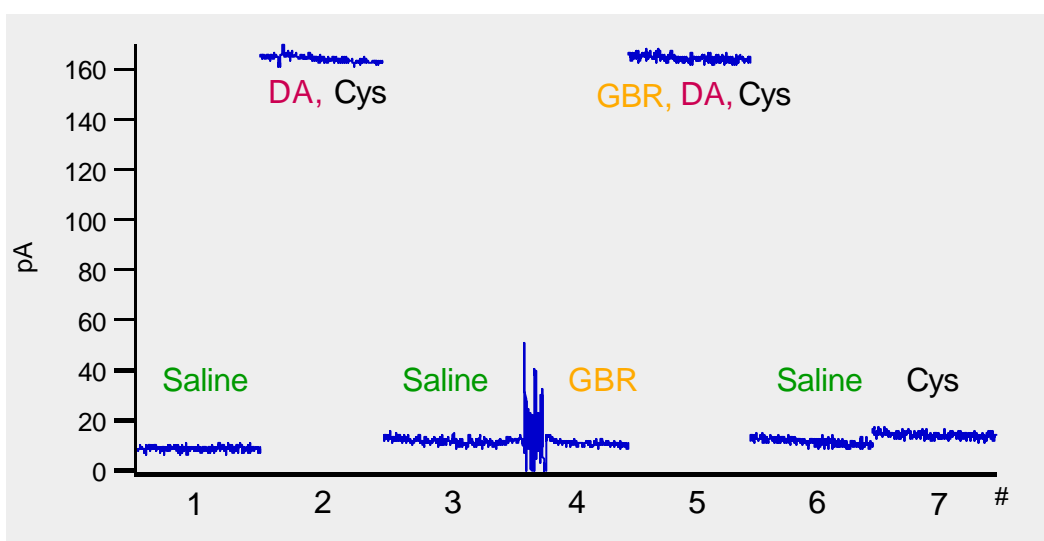


**Abbildung 12: Effekt von GBR12935, ohne Veränderung der Nulllinie**

Auch dieses Experiment wurde komplett unter kalzium-freien Bedingungen durchgeführt. Die dargestellten Antworten entsprechen der ursprünglichen Antwort, sowie der Antwort nach 30 min in 20 mM GBR12935.

**3.2.5 Kontrolle der Wirkung von GBR12935 auf oxidative Ströme**

Um auszuschließen, dass GBR12935 auf andere Art als durch Blockierung des DAT die amperometrischen Signale veränderte, wurde der Effekt von GBR12935 auf amperometrische Ströme genauer untersucht.



#	Bedingung	Strom in pA
1	Physiologische Kochsalzlösung (Saline)	9
2	1µM Dopamin (DA), 1 µM Zystein (Cys)	164
3	Physiologische Kochsalzlösung	12
4	20 nM GBR12935	11
5	20 nM GBR12935, 1µM Dopamin, 1 µM Zystein	164
6	Physiologische Kochsalzlösung	11
7	1 µM Zystein	14

**Table 4: Effekt von GBR12935 auf oxidative Ströme**

*Mittlere Ströme und Testlösungen bei den in Abb. 13 dargestellten Messungen.*

In diesen Experimenten wurde Zystein (Cys) zur Dopaminlösung hinzugegeben, um den Verfall des in Lösung instabilen Dopamins zu verhindern. Wie #7 zeigt, verursacht Zystein selbst keinen nennenswerten oxidativen Strom. Der Vergleich von Saline mit (#4) und ohne GBR12935 (#1, #3 und #6) zeigt, dass GBR12935 die Nulllinie nicht verändert. Der Vergleich des durch Dopamin hervorgerufenen oxidativen Stroms mit (#5) und ohne (#2) GBR12935 illustriert, dass GBR12935 auch diesen Strom nicht verändert. Die Wirkung von GBR12935 auf die oxidativen Ströme in Abbildung 11 und 12 beruht daher ausschließlich auf seiner Hemmung des DAT.

Bei der geringen Konzentration von 20 nM, die in diesen Experimenten verwendet wurde, ist die Wirkung von GBR12935 selektiv auf den DAT beschränkt. Eine Wirkung auf die Transporter für Serotonin oder Noradrenalin ist aufgrund der wesentlich geringeren Affinität für diese Transporter nicht anzunehmen. Die IC50-Werte für die Hemmung der Funktion von im selben Zelltyp exprimierten Transportern für Dopamin, Serotonin und Noradrenalin betragen 22, 6800 bzw. 235 nM (Eshleman et al., 1999).

Da die Funktion des DAT für die Freisetzung von Dopamin erforderlich war, gehen wir davon aus, dass die Freisetzung von Dopamin durch den DAT vermittelt wird (siehe auch Abschnitt 4.3).

---

vorhergehende Seite:

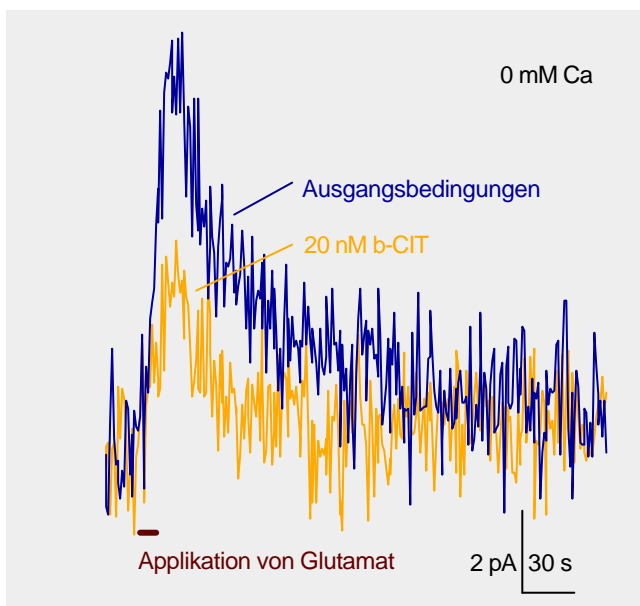
**Abbildung 13: Effekt von GBR12935 auf oxidative Ströme**

*Die Abbildung zeigt die gemessenen Ströme unter den in Tabelle 4 aufgeführten Bedingungen.*

### 3.2.6 Effekt weiterer Pharmaka auf die Antwort in 0 mM Kalzium

Um die Dopaminfreisetzung durch Glutamat genauer zu charakterisieren, wurde die Wirkung weiterer Pharmaka getestet.

Zur Bestätigung, dass die Wirkung von GBR12935 nicht auf diese eine Substanz beschränkt ist, wurde der Effekt von  $\beta$ -CIT, eines weiteren, spezifischen DAT-Antagonisten (Okada et al., 1998) untersucht. Ebenso wie GBR12935 blockierte auch 20 nM  $\beta$ -CIT die durch Glutamat hervorgerufene Antwort (Abb. 14). Auch dieser Effekt war voll reversibel.

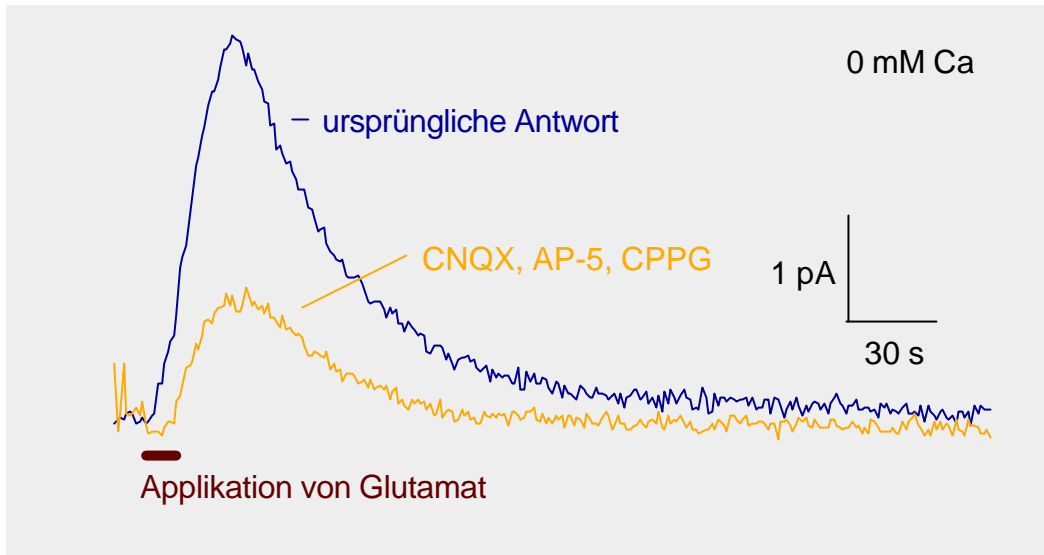


#### **Abbildung 14: Effekt von $\beta$ -CIT**

Die Versuchsanordnung entsprach der in Abb. 11. Das gesamte Experiment wurde 0 mM Kalzium durchgeführt. Dargestellt sind die initiale Antwort (8.5 pA, entsprach 340 nM Dopamin), sowie die Antwort in 20 nM  $\beta$ -CIT (4.5 pA entsprach 53% der ursprünglichen Amplitude). Der zeitliche Verlauf glich dem bei GBR12935.

Im Gegensatz zur Verwendung unspezifischer Reize wie KCl oder elektrischer Stimulation, wirkt Glutamat über die Aktivierung spezifischer membranständiger Rezeptoren. Um die Rolle dieser Rezeptoren zu beleuchten, wurde der Effekt von Glutamat-Rezeptor-Antagonisten beobachtet. Mit entsprechenden Antagonisten wurden NMDA-, non-NMDA- und metaprotrope Glutamatrezeptoren blockiert. Die dadurch hervorgerufene Inhibition der

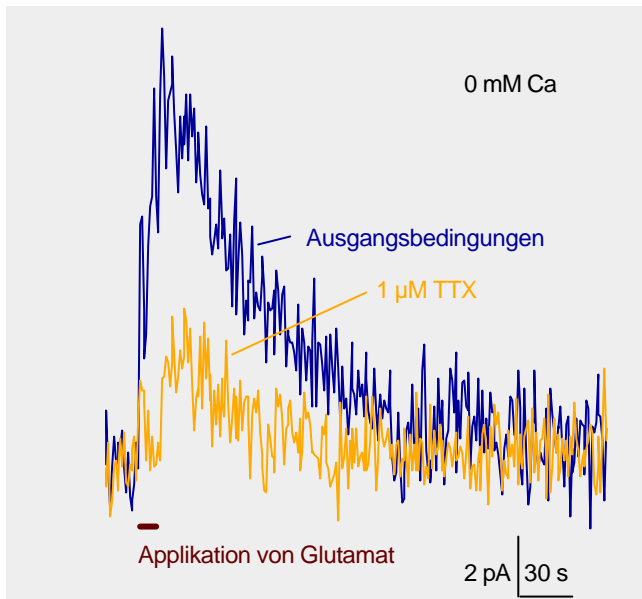
Freisetzung von Dopamin (Abb. 15) belegte, dass die beobachteten Antworten tatsächlich auf die Aktivierung von Glutamatrezeptoren, und nicht auf andere, unspezifische Effekte zurückzuführen sind.



**Abbildung 15: Effekt von Glutamat-Rezeptor-Antagonisten**

Die Versuchsanordnung entsprach der in Abb. 3-7. Die Abbildung zeigt die initiale Antwort in 0 mM Kalzium, sowie die Antwort direkt nach Applikation der Antagonisten CNQX (non-NMDA), D-AP5 (NMDA) und CPPG (mGlu). Die Amplitude wurde von 3.8 pA auf 1.17 pA (31%) reduziert. Dieser Effekt war nicht reversibel.

Wie bereits erwähnt, erfolgt der Transport von Dopamin an Natrium gekoppelt. Da eine Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration den Auswärtstransport von Dopamin erleichtert, wurde die Rolle spannungsabhängiger Natrium-Kanäle für die Freisetzung von Dopamin untersucht. Applikation des Natrium-Kanal-Blockers TTX hemmte die Freisetzung von Dopamin irreversibel (Abb. 16). Dies deutet darauf hin, dass spannungsabhängige Natriumkanäle für die Freisetzung von Dopamin notwendig sind.



**Abbildung 16: Effekt von TTX auf die Antwort in 0 mM Kalzium**  
 Gezeigt sind die ursprüngliche Antwort (11 pA) sowie die Antwort in 1 µM TTX (3 pA). Auch dieses Experiment wurde in 0 mM Kalzium durchgeführt.

### 3.2.7 Zusammenfassung

Durch die Applikation physiologischer Konzentrationen von Glutamat in der SN wurde ein oxidativer Strom induziert, der auf der Freisetzung von Dopamin beruht (siehe 4.2).

In kalzium-freien Bedingungen bewirkte die Applikation von Glutamat eine stabile und wiederholbare Freisetzung von Dopamin, die nicht durch Exozytose erfolgen konnte. Sie war gebunden an die Funktion von Glutamatrezeptoren, des DAT und von spannungsabhängigen Natriumkanälen, da sie durch entsprechende Antagonisten gehemmt wurde. Die freigesetzte Menge an Dopamin entsprach in etwa einer Erhöhung der extrazellulären Dopaminkonzentration um 1 µM.

Wir schließen daraus, dass die Aktivierung dendritischer Glutamatrezeptoren eine Freisetzung von Dopamin durch den DAT bewirkte.



### **3.3 Stimulation des STN im Gehirnschnitt**

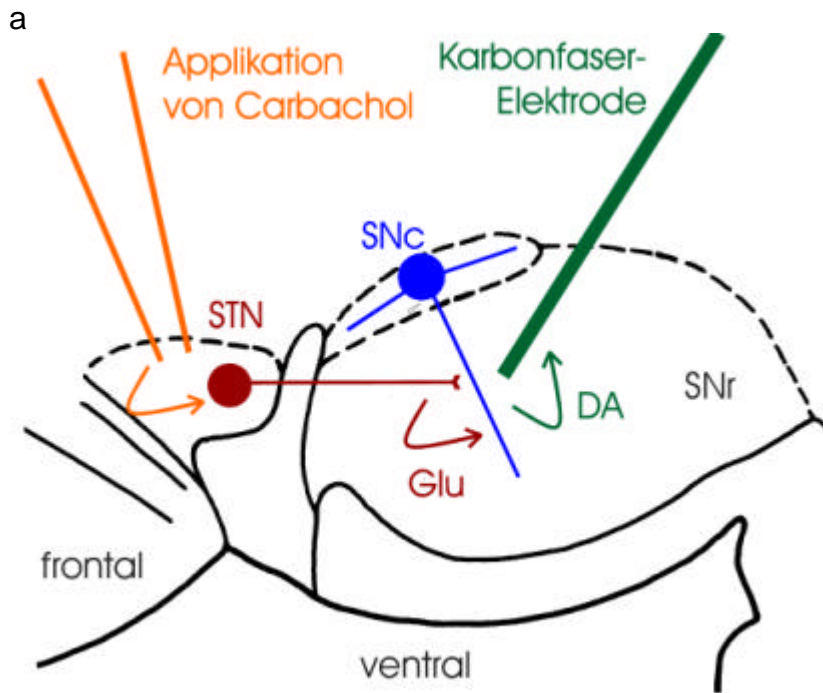
#### **3.3.1 Vorstellung der Antwort**

In den vorangegangenen Experimenten wurde die Möglichkeit dopaminergere Dendriten gezeigt, auf die Aktivierung von Glutamatrezeptoren mit der Freisetzung von Dopamin zu reagieren. In kalzium-freien Bedingungen wurde die Freisetzung durch den DAT vermittelt. Entscheidend für die Physiologie der SN ist jedoch, wie dopaminerge Dendriten auf die physiologische Stimulation durch synaptische Eingänge reagieren. Daher wurde in dieser zweiten Serie von Experimenten die Freisetzung von Dopamin nach Stimulation subthalamischer Afferenzen untersucht.

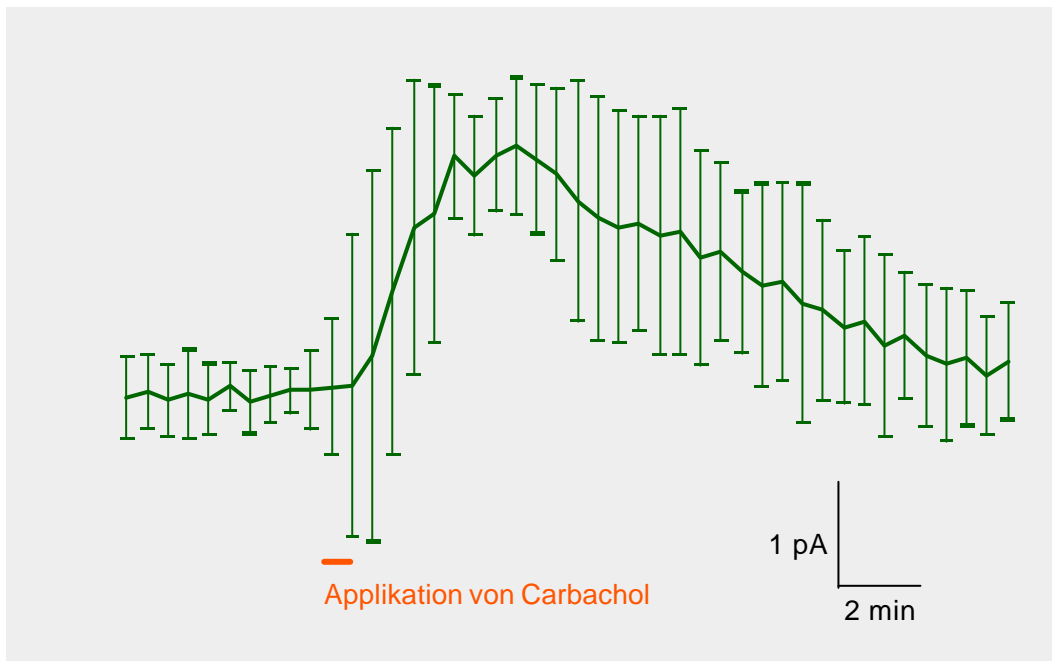
In Abb. 17a ist der Versuchsaufbau für diese Serie illustriert. Da der STN cholinerg innerviert ist, bewirkte die Applikation des mACh-Agonisten Carbachol eine verlässliche, lang dauernde Stimulation des STN (Flores et al., 1996). Die Stimulation des STN rief in der SN einen oxidativen Strom hervor wie er in Abb. 17b dargestellt ist. Diese Ströme waren sehr klein, und nur bei besonders stabiler Nulllinie verlässlich nachzuweisen. Daher zeigt Abb. 10b eine Zusammenfassung von 14 Antworten auf eine Stimulation des STN von 36 s Dauer.

Für diese Abbildung wurde die Nulllinie inklusive einer etwaigen Drift subtrahiert, und das Maximum auf 1 normalisiert. Für jeweils einen Zeitraum von 30 s wurden Mittelwert und Standardabweichungen der verwendeten Aufzeichnungen berechnet und dargestellt. Alle anderen Abbildungen sind nicht derart verändert.

Im Mittel erreichte die Antwort ihr Maximum nach etwa  $4,3 \pm 2,2$  min, und hatte eine Gesamtdauer von ca. 15 min. Die durchschnittliche Amplitude des Maximums betrug  $2,3 \pm 1,27$  pA. Bei einer Sensitivität von 120-150 pA/ $\mu$ M Dopamin entsprach dies einer Zunahme der Konzentration an Dopamin um 15-20 nM.



b



**Abbildung 17: Antwort auf Stimulation des STN**

**a** Versuchsaufbau. Carbachol wurde lokal im STN appliziert und aktivierte dadurch dessen glutamaterge Projektion in die SN. Das freigesetzte Dopamin wurde mit einer Karbonfaser-Elektrode in der SN gemessen. Diese Experimente wurden in 2 mM Kalzium durchgeführt.

**b** Oxidativer Strom in der SN als Antwort auf Stimulation des STN.

Da in diesen Experimenten Applikationspipette und Messelektrode weit voneinander entfernt lagen, trat kein Applikationsartefakt auf. Auch war die Antwort auf Stimulation des STN im Vergleich zur Applikation von Glutamat wesentlich langsamer, was vermutlich auf die langdauernde Aktivierung des STN zurückzuführen war.

Alle Experimente mit Stimulation des STN wurden in 2 mM Kalzium durchgeführt, da die Verwendung einer synaptischen Afferenz zur Stimulation der Freisetzung unter kalzium-freien Bedingungen nicht möglich ist. Dennoch waren die Antworten auf wiederholte Stimulation eines Gehirnschnittes sehr stabil. Sie wurden in insgesamt 11 Gehirnschnitten beobachtet.

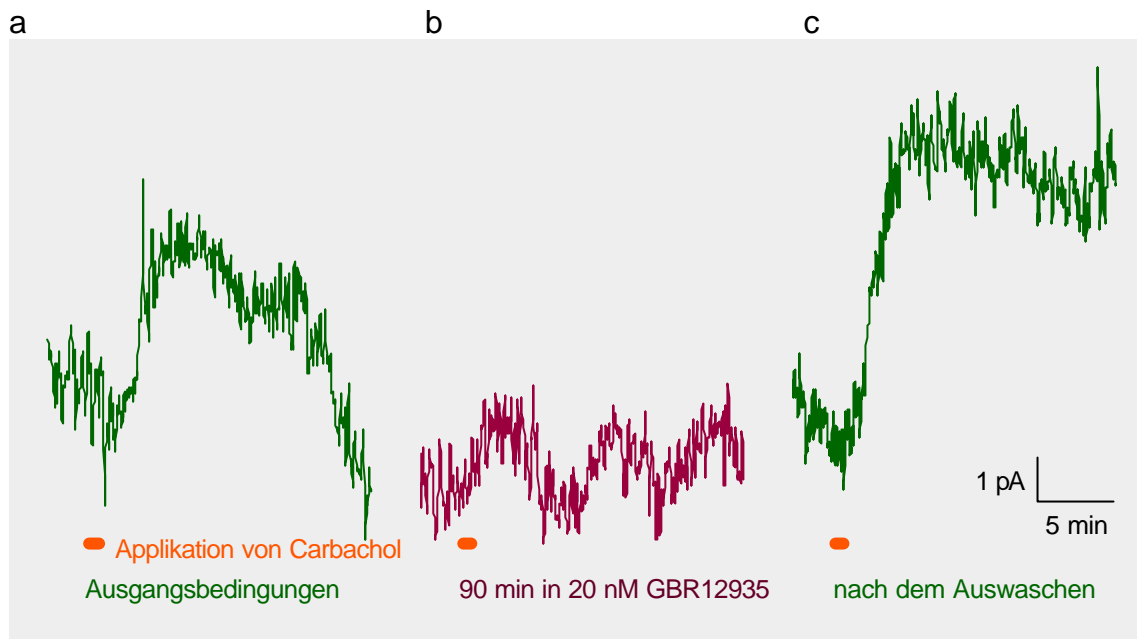
Die spezifische Stimulation subthalamischer Afferenzen machte eine Beeinflussung serotoninerger oder noradrenerger Axonterminalen sehr unwahrscheinlich. Wir führten die beobachteten oxidativen Ströme daher ausschließlich auf die Freisetzung von Dopamin aus Dendriten dopaminergener Neurone zurück.

In 3 Gehirnschnitten wurde auch durch eine Applikation von nur 9 Sekunden Dauer eine Antwort hervorgerufen. Diese war jedoch nicht stabil genug, um den Effekt von GBR12935 daran zu untersuchen. Die Amplitude betrug ca.  $1.25 \pm 0.7$  pA, was einer Dopaminkonzentration von etwa 10 nM entsprach.

### **3.3.2 Effekt von GBR12395**

Um nachzuprüfen, ob diese physiologische Freisetzung von Dopamin durch den DAT vermittelt wurde, untersuchten wir den Effekt von GBR12935 auf die Antwort nach Stimulation des STN (Abb. 18).

Der Block durch 20 nM GBR12935 wurde in drei Gehirnschnitten durchgeführt, und war in allen drei Fällen voll reversibel. 20 nM GBR12935 verminderte die Amplitude der Antwort auf weniger als 30% ihres ursprünglichen Wertes. Im Student t-Test entsprach dies einem Signifikanzniveau von  $p < 2\%$ .



**Abbildung 18: Effekt von GBR12935 auf die Antwort bei Stimulation des STN**

**a** Ursprüngliche Antwort auf Stimulation des STN.

**b** Antwort nach 90 min in 20 nM GBR12935.

**c** Antwort nach 120 min Auswaschen von GBR12935

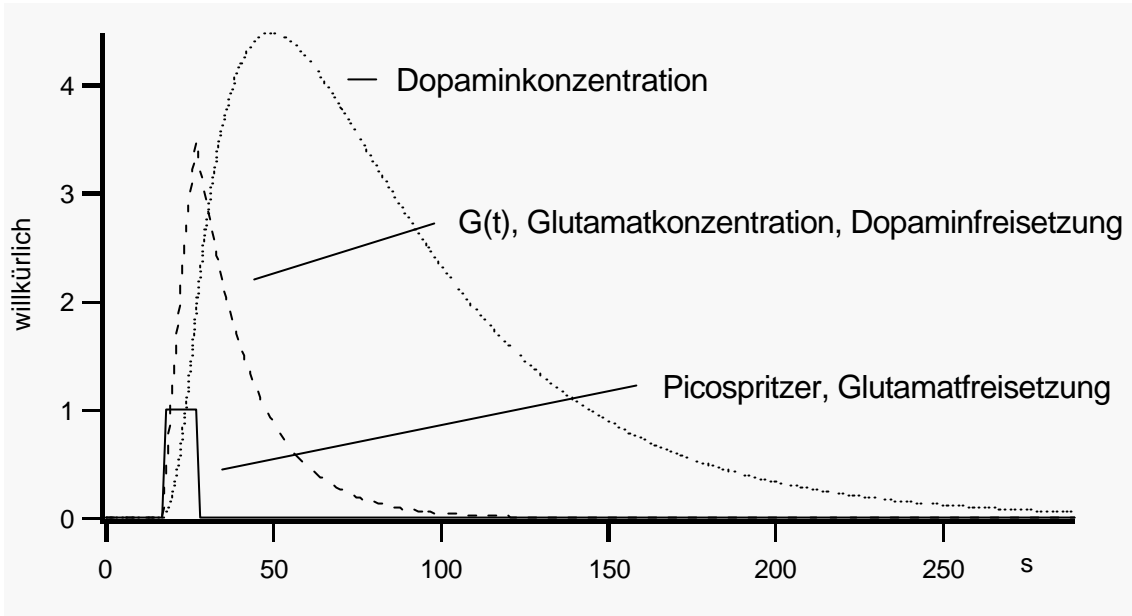
### 3.3.3 Zusammenfassung

Die physiologische Aktivierung dopaminerger Dendriten durch eine synaptische Afferenz führte zur Freisetzung von etwa 20 nM Dopamin durch den DAT.

### 3.4 Kinetische Modellrechnungen

Für ein besseres Verständnis der bisher vorgestellten Messungen ist es hilfreich, sich vor Augen zu halten, dass sie die extrazelluläre Konzentration von Dopamin widerspiegeln, und nicht die eigentliche Freisetzung von Dopamin. Das Verhältnis von glutamaterger Stimulation, Freisetzung und Konzentration von Dopamin soll anhand eines kurzen Modells illustriert werden.

Gegenstand des Modells ist die unmittelbare Umgebung der Karbonfaser-Elektrode bei Applikation von Glutamat (Abb. 19).



### Abbildung 19: Kinetisches Modell der Freisetzung von Dopamin

Die durchgezogene Linie entspricht dem Signal, das an den Picospritzer gesendet wird. Appliziert wird für 9 s von  $t=18$ .  $t=27$ . Da der Picospritzer ohne Verzögerung reagiert entspricht auch die pro Zeit zugeführte Menge an Glutamat  $g_r(t)$  dieser Kurve.

Die Umgebung der Elektrode habe das Volumen  $V$ . Die zum Zeitpunkt  $t$  im Volumen vorhandene Menge an Glutamat sei  $G(t)$ . Sie wird bestimmt von  $g_r(t)$  und der Clearance  $g_c(t)$ . Der Einfachheit halber wird für die Clearance eine Kinetik erster Ordnung angenommen. Es ist daher  $g_c(t) = kG(t)$ .

Unter der Bedingung, dass  $G(0)=g_r(0)=g_c(0)=0$ , gilt für einen beliebigen Zeitpunkt  $t$ :

$$G(t) = \int_0^t g_r(t) dt - \int_0^t g_c(t) dt = \int_0^t g_r(t) dt - k \int_0^t G(t) dt$$

$$G(t) + k \int_0^t G(t) dt = \int_0^t g_r(t) dt$$

$$G'(t) + kG(t) = g_r(t)$$

$$G(t) = \exp(-kt) \cdot \left( \int_0^t g_r(t) \cdot \exp(kt) dt \right)$$

$G(t)$  entspricht der gestrichelten Linie. Die Glutamatkonzentration im Volumen ist  $G/V$ , und damit proportional zu  $G(t)$ . Wenn die Freisetzung von Dopamin direkt der extrazellulären Glutamatkonzentration folgt, entspricht diese Kurve auch der Freisetzung von Dopamin  $a_r(t)$ .

Die Dopaminmenge  $A(t)$  wird ebenfalls von der Sekretion  $a_r$  und einer Clearance erster Ordnung ( $a_c=kA$ ) bestimmt. Analog zu obiger Rechnung erhält man für  $A(t)$ :

$$A(t) = \int_0^t a_r(t) dt - \int_0^t a_c(t) dt = \int_0^t a_r(t) dt - k \int_0^t A(t) dt$$

$$A(t) = \exp(-kt) \cdot \left( \int_0^t a_r(t) \cdot \exp(kt) dt \right)$$

*Die Dopaminkonzentration  $A(t)/V$  ist direkt proportional zu  $A(t)$  und wird durch die gepunktete Linie dargestellt.*

Der auf diese Weise berechnete Verlauf der Dopaminkonzentration ähnelt sehr dem im Gehirnschnitt gemessenen Verlauf. Eine Freisetzung proportional zur Konzentration von Glutamat ist daher durchaus mit den Daten vereinbar. Da die im Modell verwendete Eliminationskonstante  $k$  aus experimentellen Daten abgeschätzt wurde, ist es sogar wahrscheinlich, dass der Verlauf der Freisetzung von Dopamin tatsächlich der Kurve für  $a_r(t)$  folgt.

Die Bedeutung dieser Modellrechnung liegt jedoch vor allem in der Illustration der Tatsache, dass die Freisetzung von Dopamin wahrscheinlich nicht so langsam und lange dauernd erfolgt wie es der elektrochemisch gemessene Verlauf der Dopaminkonzentration vermuten lässt.

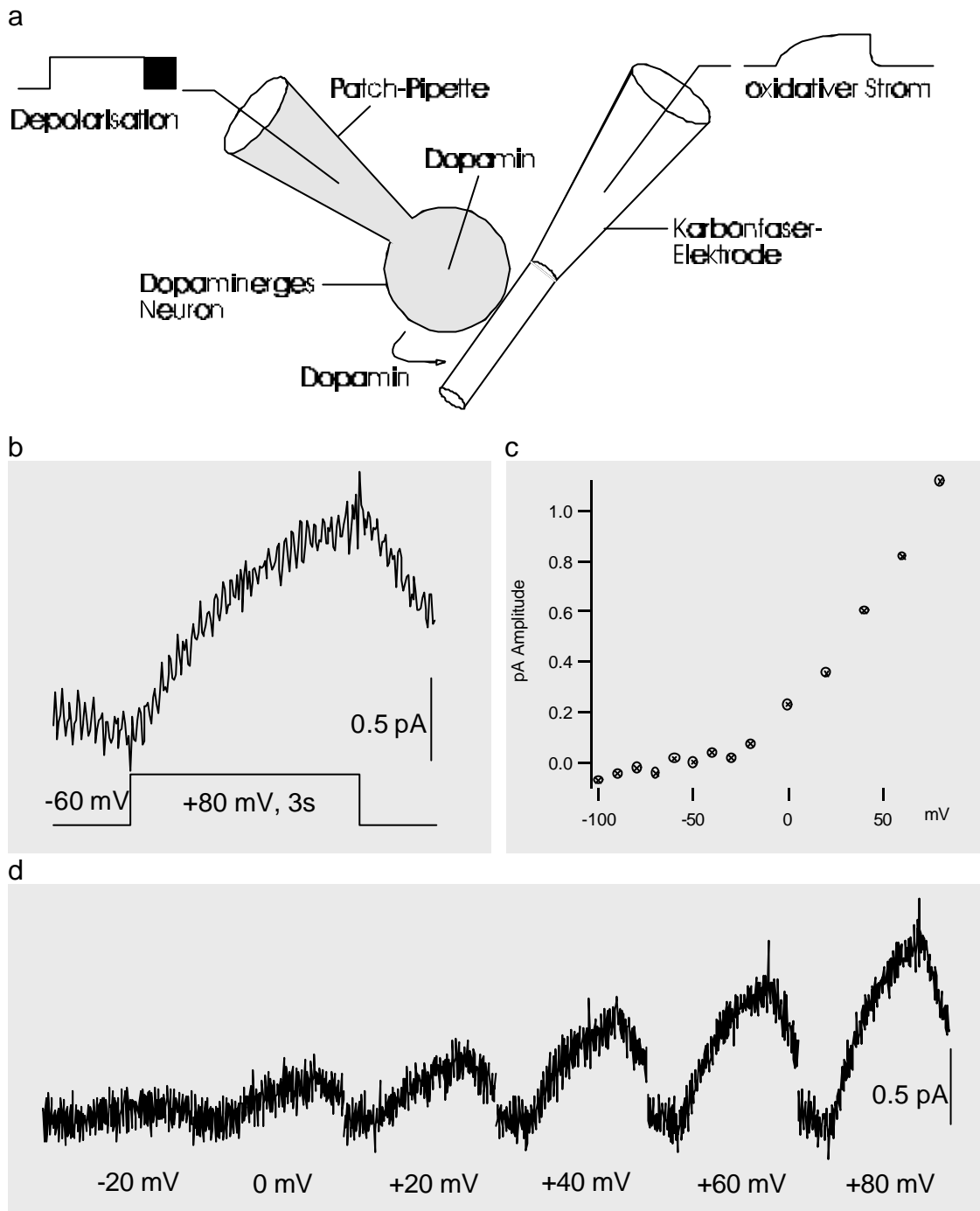
### **3.5 Freisetzung von Dopamin durch Depolarisation einzelner Neurone**

#### **3.5.1 Experimente**

Die Wirkung unterschiedlicher Ionengradienten auf den Transport von Dopamin durch den DAT wurde bereits in mehreren Studien untersucht. In dieser Serie von Experimenten sollte dagegen illustriert werden, dass auch eine Depolarisation der Zellmembran ausreichend ist, um einen Auswärtstransport von Dopamin zu bewirken.

Dazu wurde das Membranpotential einzelner Neurone durch Voltage-Clamp kontrolliert. Die intrazelluläre Elektrode enthielt Dopamin, dessen Freisetzung durch eine der Zelle anliegende Karbonfaser-Elektrode gemessen wurde (Abb. 20a). Depolarisation der Zellmembran bewirkte einen Strom an der Karbonfaser-Elektrode (Abb. 20b).

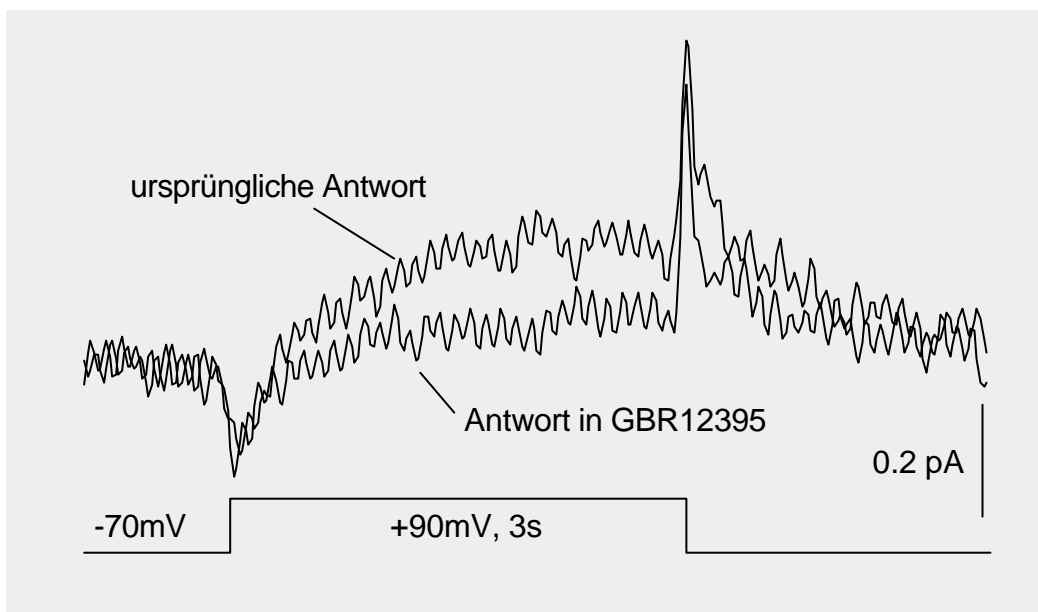
Diese Ströme konnten in 4 Zellen unter stabilen Gigaseal-Bedingungen beobachtet werden. Sie verschwanden, wenn die Versuchsanordnung aus Zelle und Karbonfaser in einen Flüssigkeitsstrom gebracht wurde. Dies spricht dafür, dass die beobachteten Ströme tatsächlich durch die Freisetzung einer oxidierbaren Substanz entstanden.



**Abbildung 20: Freisetzung von Dopamin durch Depolarisation**  
**a** Versuchsaufbau. Depolarisation der Zellmembran bewirkte einen oxidativen Strom in der Kohlenfaser-Elektrode, die bei  $800$  mV gehalten wurde.  
**b** Repräsentative Antwort bei einer Depolarisation von  $-60$  auf  $+80$  mV für 3 s.  
**c** Amplituden der Antworten auf mehrere Depolarisationen derselben Zelle.  
**d** Rohdaten der IV-Kurve in c.

Ein weiteres Argument für die Freisetzung von Dopamin lieferte die an einer Zelle beobachtete Empfindlichkeit gegenüber GBR12935 (Abb. 21), da Ascorbinsäure, die einzige verwendete oxidierbare Substanz außer Dopamin, kein Substrat des DAT ist. Ein „Auslaufen“ von oxidierbarer Substanz durch ein Leck war aufgrund des stabilen Gigaseals unwahrscheinlich.

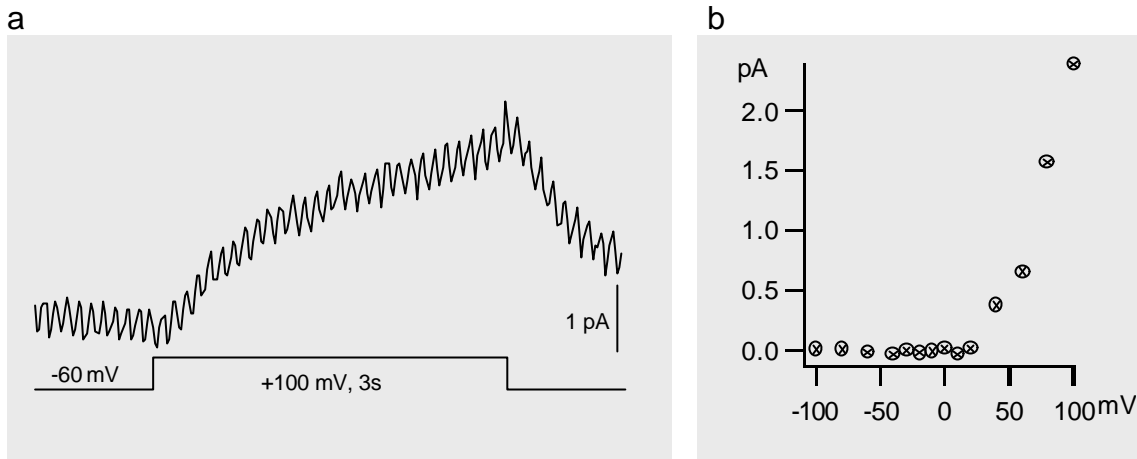
Die Empfindlichkeit gegenüber GBR12935 deutete darauf hin, dass die Freisetzung durch den DAT erfolgte. Dies wurde durch die Beobachtung derselben Ströme unter kalzium-freien Bedingungen unterstützt (Abb. 22).



**Abbildung 21: Effekt von GBR12935**

*Ströme initial und nach Applikation von 20 nM GBR12935. Der Block war reversibel, allerdings nahm dabei der Widerstand des Seals ab. Daher konnte die Reversibilität nicht zweifelsfrei festgestellt werden.*





**Abbildung 22: Antwort in kalzium-freien Bedingungen**  
**a** Antwort auf eine Depolarisation von  $-60\text{ mV}$  auf  $+100\text{ mV}$ . **b** IV-Kurve

### 3.5.2 Interpretation

Aufgrund der geringen Zahl untersuchter Zellen haben diese Ergebnisse nur vorläufige Bedeutung. Sie illustrieren jedoch, wie durch zukünftige Experimente mehr über die Funktionsweise des DAT gelernt werden kann.

Erstellt man ein mathematisches Modell der Verhältnisse am DAT in diesen Experimenten, so kann man die extrazelluläre Konzentration von Dopamin ( $[DA]_e$ ) im Gleichgewicht aus Gleichung 1 berechnen (Gleichung 2). Dabei steht  $z$  für die Anzahl positiver Ladungen, die pro Zyklus transportiert werden. Der Wert für  $c_2$  gilt bei  $20^\circ\text{C}$ .

$$DA_e(E) = \frac{\exp\left(E \cdot \frac{zF}{RT}\right)}{\left(\frac{Na_e}{Na_i}\right)^2 \cdot \left(\frac{Cl_e}{Cl_i}\right) \cdot \left(\frac{1}{DA_i}\right)} = c_1 \cdot \exp(z \cdot c_2 \cdot E)$$

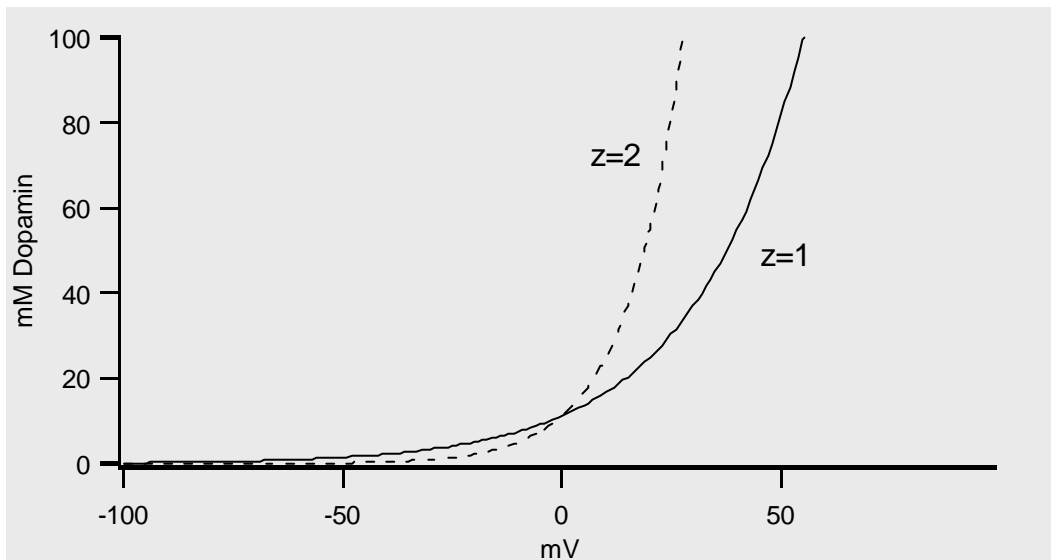
$$\text{mit } c_1 = \left(\frac{Na_i}{Na_e}\right)^2 \cdot \left(\frac{Cl_i}{Cl_e}\right) \cdot DA_i \text{ und } c_2 = \frac{F}{RT} = \frac{96484,56}{8,3144 \cdot 293} \cdot \frac{C}{J} = 39,6 \frac{1}{V} = 0,0396 \frac{1}{mV}$$

#### **Gleichung 2: Abhängigkeit der extrazellulären Dopaminkonzentration vom Membranpotential.**

Die Konzentrationen von Natrium, Chlorid und intrazellulärem Dopamin können aufgrund der im Vergleich zur Zelle großen Volumina von intrazellulärer Elektrode und Badlösung als konstant angesehen werden. Da in den Experimenten an einzelnen Neuronen kein Gehirnschnitt die Diffusion hemmt,

diffundiert der Großteil des freigesetzten Dopamins sofort in das im Vergleich zur Zelle riesige Volumen der Badlösung. Die an der Elektrode gemessene Konzentration stellt daher ein Fließgleichgewicht zwischen Freisetzung und Diffusion ins Bad dar. Nimmt man eine konstante Konzentration von Dopamin im Bad an, ist die Konzentration im Fließgleichgewicht jedoch der im Gleichgewicht proportional, da beide nur von der Freisetzung von Dopamin abhängen. Aufgrund der willkürlichen Skalierung der Dopaminkonzentration kann auf den genauen Wert für  $c_1$  verzichtet werden.

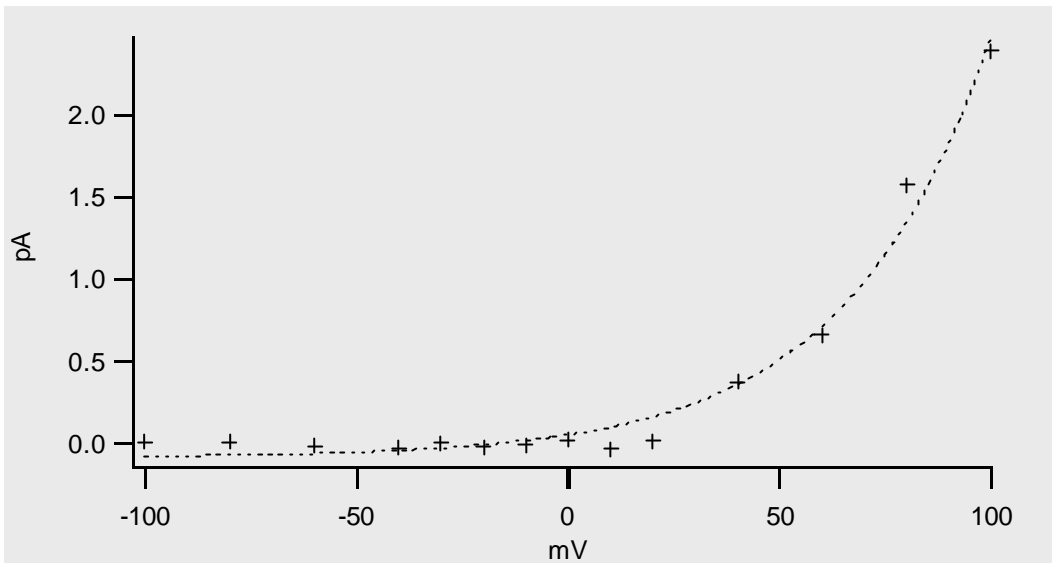
Eine grafische Darstellung der Abhängigkeit von  $DA_e$  vom Membranpotential für verschiedene Werte  $z$  zeigt, dass die durch  $z$  bestimmte Krümmung der Kurve nicht durch eine Skalierung von  $DA_e$  kompensiert werden kann (Abb. 23).



**Abbildung 23: Zusammenhang von  $DA_e$  und Membranpotential für verschiedene Werte  $z$**

Dies bedeutet, dass aus der Krümmung von IV-Kurven wie in Abb. 20 oder 22 auf  $z$  zurückgeschlossen werden kann, auch wenn die Skalierung von  $DA_e$  willkürlich oder unbekannt ist.

Um dies zu demonstrieren wurden IV-Kurven aus 5 Experimenten mit einer Exponentialfunktion angenähert wie in Abb. 24 gezeigt. Die dadurch gewonnenen Parameter (Tab. 5) deuteten bereits darauf hin, dass  $z=1$  eher mit den in den experimentellen Daten in Einklang zu bringen ist als  $z=2$ .



**Abbildung 24: Fit einer IV durch eine Exponentialfunktion**

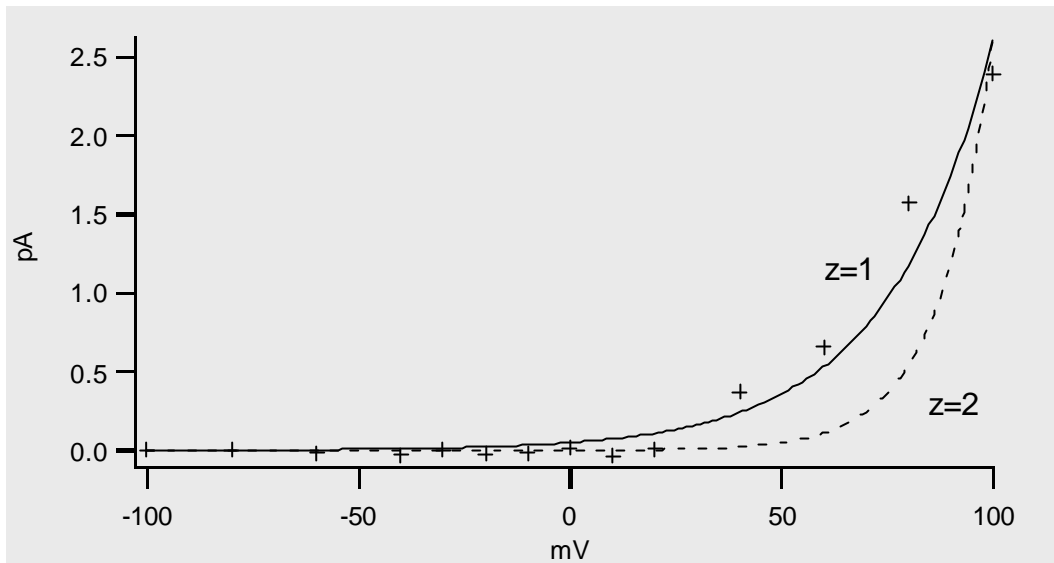
Abb. 22 wurde durch eine Exponentialfunktion der Form  $y = k_0 + k_1 \cdot \exp(k_2 \cdot x)$  angenähert.

Experiment	k0	k1	k2
4: 03_15_1	0,0890	0,1390	0,0292
5: 03_19	0,1000	0,0034	0,0477
6: 03_22	0,1400	0,0633	0,02456
7: 02_28, 0.7s	0,2100	0,0793	0,0213
8: 02_28, 3s	0,1650	0,3868	0,0152
Mittelwert	<b>!Ungültige Zeichenneinstellung</b>		<b>!Ungültige ZeichenEinstellung</b>

**Tabelle 5: Koeffizienten für den Fit verschiedener IVs**

Die theoretischen Werte betragen  $k_0=0$  und  $k_2=c_2$ , das heißt  $k_2=0.0396$  bei  $z=1$  und  $k_2=0.0792$  bei  $z=2$ .

Noch deutlicher wird dies bei dem Versuch, die Daten aus Abb. 22 durch Kurven mit festem  $z=1$  bzw.  $z=2$  anzunähern (Abb. 25).



**Abbildung 25: Fit von Abb. 22 mit  $z=1$  und  $z=2$**

Abb. 22 wurde durch eine Exponentialfunktion der Form  $y = k_0 + k_1 \cdot \exp(k_2 \cdot x)$  angenähert.  $k_0=0$ ,  $k_2=0.0396$  für  $z=1$  bzw.  $0.0792$  für  $z=2$ ,  $k_1$  ist frei wählbar

Die Daten werden durch die Kurve für  $z=1$  deutlich besser wiedergegeben, was bedeutet, dass beim Transport von Dopamin durch den DAT nur eine positive Ladung durch die Membran verschoben wird. Dies widerspricht den Erwartungen, dass pro Zyklus 1 Dopamin<sup>+</sup>, 2 Na<sup>+</sup>, 1 Cl<sup>-</sup> und damit zwei positive Ladungen transportiert werden. Auf mögliche Erklärungen wird in Abschnitt 4.5.4 eingegangen.

## **3.6 Thermodynamische Modellrechnungen**

### **3.6.1 Modell**

Bisher wurde gezeigt, dass die Aktivierung glutamaterger Afferenzen oder die direkte Applikation von Glutamat eine Freisetzung von Dopamin aus Dendriten dopaminerger Neurone in der SN bewirken kann. In diesem Abschnitt soll anhand einer thermodynamischen Abschätzung illustriert werden, wie die durch Aktivierung von Glutamatrezeptoren hervorgerufenen Veränderungen im Dendriten eine Freisetzung von Dopamin durch den DAT bewirken können.

Grundlage für diese Abschätzung ist das Gleichgewichtspotential am DAT (Gleichung 1), sowie Konzentrationen für Natrium, Chlorid und Dopamin unter Normalbedingungen.

### 3.6.2 Intrazelluläre Dopaminkonzentration unter Normalbedingungen

Die extrazelluläre Konzentration von Dopamin liegt unter Normalbedingungen bei 1.2 nM (Rosales et al., 1997, Hoffman et al., 1997, Gerhardt, persönliche Mitteilung). Aus Gleichung 1 lässt sich bei Verwendung üblicher Konzentrationen für Natrium und Chlorid die intrazelluläre Konzentration berechnen (Gleichung 3).

$$[DA_i] = \frac{\left(\frac{[Na_e]}{[Na_i]}\right)^2 \cdot \frac{[Cl_e]}{[Cl_i]} \cdot [DA_e]}{\exp\left(\frac{2F}{RT} E\right)}$$

Na <sub>e</sub>	Cl <sub>e</sub>	DA <sub>e</sub>	Na <sub>i</sub>	Cl <sub>i</sub>	E	DA <sub>i</sub>
150 mM	150 mM	1,2 nM	10 mM	10 mM	-70 mV	<b>1,0 mM</b>

#### **Gleichung 3: Berechnung der intrazellulären Dopaminkonzentration**

Die extrazelluläre NaCl-Konzentration und das Membranpotential von -70 mV entsprechen in der Elektrophysiologie üblichen Werten. Für die intrazelluläre NaCl Konzentration wurden 12-15 mM angegeben (Guatteo 1998). Da dies unter Umständen zu hoch liegt, wurde vorsichtshalber mit 10 mM gearbeitet.

Das Ergebnis von 1 mM erscheint plausibel, da es im Bereich von Angaben über die intrazellulären Noradrenalkonzentration liegt (1-2 mM, Gräfe K.-H. und Bönisch H., 1988).

### 3.6.3 Freisetzung durch Änderung des Membranpotentials

In den Experimenten mit Applikation von Glutamat in der SN wurde ein Strom gemessen, der der Zunahme der extrazellulären Dopaminkonzentration um 1 µM entspricht. In Gleichung 4 wurde berechnet, um wieviel die Zellmembran depolarisiert werden müsste, um im Gleichgewicht eine extrazelluläre Konzentration von 1µM Dopamin zu erreichen.

$$E = \frac{RT}{2F} \ln \left[ \left( \frac{[Na_e]}{[Na_i]} \right)^2 \cdot \frac{[Cl_e]}{[Cl_i]} \cdot \frac{[DA_e]}{[DA_i]} \right]$$

Na <sub>e</sub>	Cl <sub>e</sub>	DA <sub>e</sub>	Na <sub>i</sub>	Cl <sub>i</sub>	DA <sub>i</sub>	E
150 mM	150 mM	1 μM	10 mM	10 mM	1,0 mM	<b>+15 mV</b>
150 mM	150 mM	20 nM	10 mM	10 mM	1,0 mM	<b>-34 mV</b>

#### **Gleichung 4: Freisetzung durch Änderung des Membranpotentials**

Um eine extrazelluläre Dopaminkonzentration von 1 μM alleine durch Depolarisation zu erklären, müsste die Zellmembran um 85 mV bis auf +15 mV depolarisiert werden. Dies erscheint insbesondere in Kombination mit der langsamen Kinetik unplausibel. Für die durch synaptische Stimulation erreichten 20 nM wäre jedoch eine Depolarisation um nur 36 mV bis auf -34 mV ausreichend.

#### **3.6.4 Freisetzung durch Änderung des Natriumgradienten**

Um durch alleinige Veränderung des Natriumgradienten eine Freisetzung von Dopamin bis auf eine extrazelluläre Konzentration von 1 μM Dopamin zu erklären, wäre eine intrazelluläre Natriumkonzentration von 289 mM erforderlich (Gleichung 5). Dies ist unmöglich. Für 20 μM wären es immer noch 40 mM, was im Dendriten aufgrund seines im Vergleich zum Soma günstigeren Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen eventuell möglich ist (siehe Abschnitt 4.5.2).

$$[Na_i] = \sqrt{\frac{([Na_e])^2 \cdot \frac{[Cl_e]}{[Cl_i]} \cdot \frac{[DA_e]}{[DA_i]}}{\exp\left(\frac{2F}{RT} E\right)}}$$

Na <sub>e</sub>	Cl <sub>e</sub>	DA <sub>e</sub>	Cl <sub>i</sub>	DA <sub>i</sub>	E	Na <sub>i</sub>
150 mM	150 mM	1 μM	10 mM	1,0 mM	-70 mV	<b>289 mM</b>
150 mM	150 mM	20 nM	10 mM	1,0 mM	-70 mV	<b>40 mM</b>

#### **Gleichung 5: Freisetzung durch Änderung der intrazellulären Natriumkonzentration**

### 3.6.5 Effekt von Glutamat

In einem Neuron kommen isolierte Änderungen von Natriumgradient und Membranpotential jedoch nicht vor. So bewirkt ein Einstrom von Natrium in die Zelle eine Depolarisation des Membranpotentials, und eine Depolarisation führt durch Öffnen spannungsabhängiger (TTX-sensitiver) Natrium-Kanäle zu einem Einstrom von Natrium. Insbesondere eine Aktivierung der unterschiedlichen Glutamatrezeptoren bewirkt sowohl eine Depolarisation als auch einen Einstrom von Natrium.

Aufgrund technischer Schwierigkeiten liegen jedoch kaum Daten darüber vor, um wieviel genau Membranpotential und Natriumkonzentration durch eine Aktivierung dendritischer Glutamatrezeptoren verändert werden. Die folgende Abschätzung ist daher sehr grob. In elektrophysiologischen Messungen am Soma dopaminerger Neurone der SN bewirkte der glutamaterge Input des STN eine Depolarisation von ca. 20 mV, für eine halbmaximale Dauer von 500 ms (Barstow K.L. und Mintz I.M., 1998). Weiterhin wurden in dendritischen Patches bei Applikation von Glutamat 20 pA Peakstrom gemessen (Hausser und Roth, 1997). Die Dauer eines Ereignisses war ca. 5 ms, die Zeitkonstante 2 ms. Der Einstrom während hintereinander geschalteter EPSCs entsprach also in etwa einem kontinuierlichen Strom von 2.5 pA. Bei einer Fläche von ca.  $1.5 \mu\text{m}^2$  pro Patch entsprach dies einer Stromdichte von  $1.6 \text{ pA}/\mu\text{m}^2$ . Mit diesen Patches wurden allerdings vor allem extrasynaptische Rezeptoren erfasst. Die subsynaptische Stromdichte dürfte mindestens um den Faktor 100 höher liegen. Es wird daher von einer Stromdichte von  $160 \text{ pA}/\mu\text{m}^2$  ausgegangen. In einem Dendriten von  $1 \mu\text{m}$  Durchmesser bedeutet dies eine Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration um 34,5 mM Na innerhalb von 500 ms.

Eine Depolarisation um 20 mV auf  $-50 \text{ mV}$ , sowie ein Natriumeinstrom von 15-35 mM (auf eine intrazelluläre Konzentration von 25-44 mM Natrium) erscheinen insgesamt realistisch. Mit diesen Werten kann man durchaus relevante Änderungen der extrazellulären Dopaminkonzentration erklären, insbesondere die bei physiologischer Stimulation durch den STN gemessenen  $20 \mu\text{M}$  (Gleichung 6).

$$[DA_e] = \frac{\exp\left(\frac{2F}{RT}E\right)}{\left(\frac{[Na_e]}{[Na_i]}\right)^2 \cdot \frac{[Cl_e]}{[Cl_i]} \cdot \frac{1}{[DA_i]}}$$

Na <sub>e</sub>	Cl <sub>e</sub>	Cl <sub>i</sub>	DA <sub>i</sub>	Na <sub>i</sub>	E	DA <sub>e</sub>
150 mM	150 mM	10 mM	1,0 mM	25 mM	-50 mV	<b>35 nM</b>
150 mM	150 mM	10 mM	1,0 mM	44 mM	-22 mV	<b>1 μM</b>

***Gleichung 6: Freisetzung durch Änderung von Membranpotential und Natriumkonzentration***



## **4 DISKUSSION**

### **4.1 Bewertung der Amperometrie als Verfahren zur Messung von Dopamin im Gehirnschnitt**

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass Amperometrie eine wertvolle Methode auch in Experimenten an Gehirnschnitten sein kann. Dies wurde insbesondere durch den Nachweis der geringen, durch synaptische Aktivierung dopaminerger Dendriten freigesetzten, Mengen an Dopamin demonstriert. Die Vorteile gegenüber anderen Verfahren liegen vor allem in der sehr einfachen Handhabung, sowie in der beliebig feinen zeitlichen Auflösung. Die geringere absolute Sensitivität fällt aufgrund des besseren Verhältnisses von Signal zu Rauschen nicht ins Gewicht. Voraussetzung für die Verwendung von Amperometrie ist jedoch, dass die oxidierte Substanz wie im vorliegenden Fall pharmakologisch bzw. durch andere Hinweise identifiziert werden kann.

#### **4.1.1 Verhältnis von Signal zu Rauschen**

Es wurde bereits in den Kalibrierungsversuchen deutlich, dass die Aufbereitung der gemessenen Daten bei Amperometrie deutlich weniger Aufwand erforderte, und dadurch weniger anfällig gegenüber Störungen und Verunreinigungen war. Aufgrund der Möglichkeit, das Verhältnis von Signal zu Rauschen durch Mitteln über die Zeit drastisch zu verbessern, erschien uns die Amperometrie als die überlegene Methode.

Sie bot auch den Vorteil, durch das konstante Potential an der Elektrode, den Gehirnschnitt weniger stark zu beeinflussen als dies bei einem Zyklus von 1.5 V Amplitude und einer Frequenz von 4 Hz der Fall wäre.

#### **4.1.2 Zeitliche Auflösung und Speicherbedarf**

Die mit einem Wert pro 2,5 s relativ schlechte zeitliche Auflösung war ein weiteres Argument gegen die FCV. Zumindest ein Wert pro Sekunde wäre wünschenswert. Um ein angemessenes Verhältnis von Signal zu Rauschen zu erreichen, war bei Amperometrie ein Mitteln von etwa 100 Werten ausreichend, was durch ein initiales SI von 9 ms erreicht wurde. Aufgrund eines initialen SI

von 20  $\mu\text{s}$  lag der Speicherbedarf bei FCV um den Faktor 450 höher, was das Arbeiten ebenfalls erschwerte.

#### **4.1.3 Sensitivität und Linearität**

In den beobachteten Konzentrationsbereichen waren die gemessenen oxidativen Ströme für beide Methoden weitgehend linear (siehe Abb. 3). Auch wenn die absolut (in  $\text{pA}/\mu\text{M}$  Substanz) gemessenen Ströme bei FCV deutlich größer waren als bei Amperometrie, wog dies die einfachere Handhabung sowie das bessere Verhältnis von Signal zu Rauschen nicht auf.

In den Experimenten an Gehirnschnitten wurden die größeren Quanteon Elektroden verwendet, da sie sensitiver als die Dagan Elektroden waren. Das höhere Rauschen dieser Elektroden konnte durch die Verarbeitung der Daten ausgeglichen werden.

#### **4.1.4 Selektivität**

Es wurde gezeigt, dass die FCV unter günstigen Bedingungen Hinweise auf die oxidierte Substanz geben konnte (Abb. 7). Da dies jedoch nicht verlässlich möglich war, wurde darauf verzichtet, insbesondere da in den vorliegenden Experimenten die oxidierte Substanz aufgrund anatomischer und pharmakologischer Argumente gut identifiziert werden konnte.

### **4.2 Identifikation der in den Messungen oxidierten Substanz**

Wir beobachteten einen oxidativen Strom sowohl nach Applikation von Glutamat in 2 mM Kalzium (Abb. 8) als auch unter kalzium-freien Bedingungen (Abb. 10-16) und nach Stimulation des STN (Abb. 17).

Der Strom nach Applikation von Glutamat in 2 mM Kalzium war bei wiederholter Stimulation nicht stabil, so dass er pharmakologisch nicht weiter differenziert werden konnte. Wir gehen jedoch davon aus, dass es sich bei der freigesetzten oxidierbaren Substanz um Dopamin handelte, da Glutamat im Gegensatz zu unspezifischen Stimuli wie KCl keine Freisetzung von Monoaminen aus ihren

Axonterminalen bewirkt. Da in der SN insbesondere keine dopaminergen Axonterminalen vorkommen, muss alles in der SN freigesetzte Dopamin aus Dendriten dopaminergener Neurone stammen. Die Möglichkeit einer Freisetzung von Dopamin aus Dendriten wurde durch sehr spezifische Verfahren wie Mikrodialyse bereits gezeigt (siehe Abschnitt 1.3). Wie ebenfalls bereits erwähnt trägt der Dopamin-Metabolit DOPAC nicht wesentlich zu den beobachteten oxidativen Strömen bei, da seine Bildung aus Dopamin zu langsam ist.

Der unter kalzium-freien Bedingungen beobachtete oxidative Strom konnte mit großer Sicherheit auf die Freisetzung von Dopamin aus Dendriten dopaminergener Neurone zurückgeführt werden, da eine Freisetzung von Noradrenalin oder Serotonin aus ihren Axonterminalen unter kalzium-freien Bedingungen sehr unwahrscheinlich war. Der Nachweis, dass die Freisetzung der oxidierten Substanz durch den DAT erfolgt (siehe 4.3.2), ist ein weiteres Argument dafür, dass der oxidative Strom durch dessen Substrat Dopamin hervorgerufen wurde.

Analog zu obigen Überlegungen konnte auch der durch Stimulation des STN hervorgerufene oxidative Strom auf die Freisetzung von Dopamin zurückgeführt werden. Auch die Möglichkeit der Freisetzung von Dopamin durch Stimulation des STN wurde mit spezifischen Methoden gezeigt (Mintz et al., 1986, Rosales et al., 1994; Rosales et al., 1997). Die Beteiligung von DOPAC an den beobachteten Strömen kann aufgrund ihres langsamen Verlaufes nicht ausgeschlossen werden. Da DOPAC allerdings nicht selbst durch den DAT freigesetzt wird, spiegelt auch die Messung von DOPAC eine Freisetzung von Dopamin wider, der die extrazelluläre Metabolisierung zu DOPAC folgt. Die Beteiligung anderer, aus ihren Axonterminalen freigesetzten Monoaminen ist aufgrund der spezifischen pharmakologischen Stimulation des STN durch die lokale Applikation von Carbachol unwahrscheinlich. Wie oben stellt auch in diesem Fall die Abhängigkeit des oxidativen Stroms von der Funktion des DAT (siehe 4.3.2) ein weiteres Argument dafür dar, dass ihm die Freisetzung von Dopamin zugrunde liegt.

### **4.3 Hemmung des Dopamintransporters**

#### **4.3.1 Unterschiedliche Pharmakologie von Aufnahme und Freisetzung**

Aufgrund seiner Rolle als „Rezeptor“ für Kokain und Amphetamin wurden in der Literatur viele Substanzen beschrieben, die den DAT hemmen. Viele davon werden therapeutisch genutzt oder sind aufgrund ihres Missbrauchs klinisch relevant. Für ihre Wirkung wird die Hemmung der Wiederaufnahme von aus Axonterminalen freigesetztem Dopamin verantwortlich gemacht.

In einer Studie an den DAT exprimierenden COS-Zellen wurde jedoch kein einheitlicher Effekt dieser Substanzen auf die Freisetzung radioaktiv markierten Dopamins festgestellt (Eshleman et al., 1994, siehe Abschnitt 1.6.1). Das in der vorliegenden Arbeit vor allem verwendete Piperazinderivat GBR12935 hemmte die Freisetzung von Dopamin in diesen Experimenten, während z.B. Kokain keine Wirkung auf die Freisetzung von Dopamin zu haben schien (Eshleman et al., 1994).

Dieser Befund deutet darauf hin, dass sich die pharmakologischen Eigenschaften von Aufnahme und Freisetzung von Dopamin durch den DAT zumindest leicht unterscheiden. Unterstützt wurde dies von der Beobachtung in der vorliegenden Arbeit, dass in einigen Experimenten die Aufnahme von Dopamin bereits durch geringere Konzentrationen an GBR12935 gehemmt wurde als seine Freisetzung (Abb. 11).

Auf molekularer Ebene bieten sich zwei Erklärungsmöglichkeiten an für die unterschiedliche Pharmakologie von Aufnahme und Freisetzung von Dopamin durch den DAT. Eine Bindungsstelle an der extrazellulären Seite des DAT mit hoher Affinität für GBR12935 und Kokain könnte die Aufnahme von Dopamin sterisch hemmen, die Freisetzung jedoch unbeeinflusst lassen. Eine zweite Bindungsstelle mit geringerer Affinität für GBR12935 und ohne Affinität für Kokain könnte den DAT völlig blockieren, und damit jeglichen Transport unmöglich machen.

Eine andere Erklärung wäre, dass die Bindungsstelle für GBR12935 und Kokain in die Konformationsänderung von „aufnahmebereit“ (Dopamin kann von außen binden) zu „freisetzungsbereit“ (Dopamin kann von innen binden) einbezogen

wird, wodurch unterschiedliche Affinitäten entstehen. In diesem Fall müsste es möglich sein, Substanzen zu identifizieren, die selektiv Freisetzung bzw. Aufnahme von Dopamin hemmen. Diese Substanzen wären hilfreich, um die Bedeutung von Freisetzung und Aufnahme von Dopamin durch den DAT isoliert zu untersuchen, und könnten möglicherweise auch klinisch relevant sein.

### **4.3.2 Anteil des Auswärtstransports an der Freisetzung von Dopamin**

Die maximale Wirkung von GBR12935 auf die Freisetzung von Dopamin aus exprimierenden COS-Zellen lag bei 65% (Eshleman et al., 1994). Da in diesen Experimenten eine Freisetzung ausschließlich durch den DAT erfolgen konnte, muss davon ausgegangen werden, dass die Freisetzung von Dopamin durch den DAT von GBR12935 zu maximal 70% gehemmt werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Freisetzung von Dopamin sowohl nach Applikation von Glutamat (in 0 mM Ca) als auch nach Stimulation des STN durch GBR12935 um ebenfalls etwa 70% gehemmt. Es ist daher unwahrscheinlich, dass ein weiterer Mechanismus an der Freisetzung von Dopamin beteiligt war, da dies den Anteil der Hemmung weiter reduziert hätte. Die Hypothese, dass die Freisetzung in beiden Fällen ausschließlich durch den DAT erfolgte, steht im Einklang mit dem Fehlen präsynaptischer Strukturen in dopaminergen Dendriten der SNr (Wassef et al., 1981, Groves und Linder, 1983, Nirenberg et al., 1996) und erklärt die Freisetzung von Dopamin unter kalzium-freien Bedingungen.

## **4.4 Freisetzung von Dopamin durch Glutamat**

### **4.4.1 Freisetzung in 2 mM Kalzium**

Wir beobachteten einen oxidativen Strom nach Applikation von Glutamat in 2 mM Kalzium (Abb. 10). Wir gehen davon aus, dass es sich bei der freigesetzten oxidierbaren Substanz um Dopamin handelte (siehe 4.2).

Über den Mechanismus der Freisetzung kann nur spekuliert werden. Initial wurde ein im Vergleich zur Freisetzung von Dopamin durch den DAT in 0 mM Kalzium sehr großer oxidativer Strom festgestellt. An diesem Ereignis ist

möglicherweise die Freisetzung von Dopamin und anderer Monoamine durch Exozytose beteiligt. Sporadische exozytische Ereignisse wurden am Soma dopaminerger Neurone direkt beobachtet (Jaffe et al., 1998), und sind vereinbar mit einer kalzium-abhängigen Freisetzung von Dopamin nach starken, unspezifischen Stimuli wie KCl (Elverfors et al., 1997) und großen elektrischen Feldern (10V, Rice et al., 1997). Genau genommen wurde in diesen Experimenten jedoch nur beobachtet, dass in 2 mM Kalzium deutlich mehr Dopamin freigesetzt wurde als in 0 mM Kalzium. Dies konnte in den vorliegenden Experimenten ebenfalls beobachtet werden (Abb. 10), schließt eine Freisetzung von Dopamin in 0 mM Kalzium jedoch keinesfalls aus.

Ein merkwürdiger Befund war, dass die Freisetzung von Dopamin bei wiederholter Applikation von Glutamat abnahm, und schließlich weniger freigesetzt wurde als in 0 mM Kalzium. Die Abnahme spiegelt entweder eine Erschöpfung der Speicher an freisetzbarer Substanz wieder, oder ist auf eine Desensibilisierung der Glutamatrezeptoren zurückzuführen. Das Unterschreiten der in 0 mM Kalzium freigesetzten Menge an Dopamin kann durch die erhöhte Erregbarkeit der dopaminerger Neurone in 0 mM Kalzium (Schmidt und Thews, 1997) erklärt werden, oder durch den verstärkten Natrium-Einstrom durch Kalzium-Kanäle in der Abwesenheit von Kalzium.

#### **4.4.2 Freisetzung in 0 mM Kalzium**

Der unter kalzium-freien Bedingungen beobachtete oxidative Strom konnte mit großer Sicherheit auf die Freisetzung von Dopamin aus Dendriten dopaminerger Neurone zurückgeführt werden (siehe 4.2). Dies ist vereinbar mit der kalzium-unabhängigen Freisetzung von Dopamin, die in vorhergehenden Studien berichtet wurde (siehe Abschnitt 1.3). In diesen Studien wurde Dopamin durch die im Vergleich zu Glutamat weniger spezifischen und weniger physiologischen Stimuli 100 mM KCl bzw. Veratridin freigesetzt. Die Empfindlichkeit der kalzium-unabhängigen Freisetzung von Dopamin nach Applikation von KCl gegenüber niedriger Dosen an Kokain (Hoffman und Gerhardt, 1999) schließt im Gegensatz zur Meinung der Autoren eine

Freisetzung durch den DAT nicht aus, sondern kann durch die Unempfindlichkeit der Freisetzung von Dopamin durch den DAT gegenüber Kokain erklärt werden (siehe 1.6 und Kitayama et al., 1996).

In wenigen Gehirnschnitten wurde auch in der vorliegenden Arbeit die Freisetzung von Dopamin nach Applikation von KCl untersucht. Die resultierende Freisetzung von Dopamin besaß eine kalzium-unabhängige Komponente und wurde durch GBR12935 gehemmt (Daten nicht gezeigt). Dies bestätigt, dass auch KCl eine Freisetzung von Dopamin durch den DAT bewirken kann.

#### **4.4.3 Freisetzung durch synaptische Aktivierung**

Durch die Experimente mit Applikation von Glutamat in 0 mM Kalzium wurde gezeigt, dass dopaminerge Dendriten prinzipiell zur Freisetzung von Dopamin durch den DAT in der Lage sind. Ebenso wurde durch direkte Demonstration exozytotischer Ereignisse am Soma gezeigt, dass dopaminerge Neurone Dopamin durch Exozytose freisetzen können (Jaffe et al., 1998). Die entscheidende Frage lautet nun, welcher Mechanismus durch eine physiologische Afferenz rekrutiert wird. Die Experimente mit Stimulation des STN zeigen, dass die Aktivierung dopaminerger Dendriten durch subthalamische Afferenzen eine Freisetzung von Dopamin durch den DAT bewirkt.

Eine Freisetzung von Dopamin durch den DAT nach subthalamischer Stimulation wird auch durch elektrophysiologische Daten unterstützt (Barstow K.L. und Mintz I.M., 1998). Auf die Bedeutung dieses Vorgangs für das lokale Netzwerk in der SN wird in Abschnitt 4.6.2 eingegangen.

### **4.5 Faktoren, die den Transport von Dopamin beeinflussen**

#### **4.5.1 Die Rolle des vesikulären Kompartiments für die Freisetzung von Dopamin**

Für die Wirkung von Amphetamin spielt ein vesikuläres Kompartiment von Dopamin eine wesentliche Rolle. Dieses Kompartiment steht mit dem

zytoplasmatischen über einen vesikulären Dopamintransporter (VAT) im Gleichgewicht. Durch Aufbau eines pH-Gradienten wird Dopamin in diesem Kompartiment konzentriert. Es ist daher vorstellbar, dass die zytoplasmatische Konzentration von Dopamin durch das vesikuläre Kompartiment weitgehend konstant gehalten wird. Dies würde den Auswärtstransport fördern, da der Dopamingradient über die Plasmamembran erhalten bleibt.

#### **4.5.2 Freisetzung durch Änderung des Natriumgradienten**

Dopamin kann durch eine Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration freigesetzt werden. Dies ergibt sich aus Gleichung 1 und wird durch viele experimentelle Daten unterstützt (siehe 1.3). In diesen Versuchen wurde Dopamin unter anderem in der SN des Meerschweinchens durch den Natriumkanal-Öffner Veratridin freigesetzt. Diese Freisetzung war kalzium-unabhängig und wurde durch den DAT-Antagonisten GBR12909 gehemmt, erfolgte also durch den DAT (Elverfors et al., 1997). Auch für andere Neurotransmitter wie GABA (do-Nascimento et al., 1998) und Noradrenalin (Yamazaki et al., 1996) wurde ein Auswärtstransport nach Applikation von Veratridin beschrieben.

Unter physiologischen Bedingungen ist eine signifikante Änderung der intrazellulären Natriumkonzentration im Soma unwahrscheinlich. In kleinen Dendriten dagegen können auch geringe Mengen einströmenden Natriums aufgrund des günstigeren Verhältnisses von Oberfläche und Volumen die Natriumkonzentration signifikant verändern.

Zur Illustration dessen sei eine Abschätzung von Hille zitiert (Hille, 1992). Im Riesenaxon des Tintenfischs mit 1000  $\mu\text{m}$  Durchmesser wird durch ein Aktionspotential von 110 mV der Ionengradient nur um  $1:10^5$  verschoben. Dagegen können durch ein einzelnes Aktionspotential in einer kleinen Zelle oder einem Dendriten mit einem Durchmesser von 0,1  $\mu\text{m}$  bis zu 10% der vorhandenen Ionen bewegt werden.

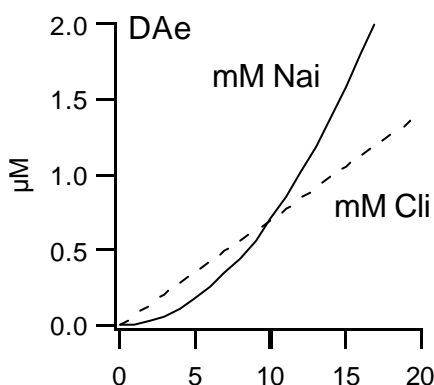
Die Aktivierung von Glutamatrezeptoren und die darauf folgende Aktivierung spannungsabhängiger Natriumkanäle bewirkt einen deutlichen Einstrom von Natrium in den Dendriten. In kalzium-freien Bedingungen wird er



möglicherweise durch den Einstrom von Natrium durch Kalziumkanäle erheblich verstärkt. Dieser Einstrom alleine reicht zwar nicht aus, um die Freisetzung von Dopamin zu erklären (siehe Abschnitt 3.6.4), doch die Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration bewirkt eine Annäherung des Gleichgewichtspotentials des DAT (Gleichung 1) an das Ruhemembranpotential des Dendriten, und erleichterte damit die Freisetzung von Dopamin durch Depolarisation.

#### 4.5.3 Freisetzung durch Änderung des Chloridgradienten

Die Freisetzung von Dopamin durch Änderung des Chloridgradienten ist eine Möglichkeit, die aus der thermodynamischen Beschreibung des DAT hervorgeht, jedoch bisher nicht untersucht wurde.



$$DA_e = \frac{\exp\left(E \cdot \frac{zF}{RT}\right)}{\left(\frac{Na_e}{Na_i}\right)^2 \cdot \left(\frac{Cl_e}{Cl_i}\right) \cdot \left(\frac{1}{DA_i}\right)}$$

**Abbildung 26: Zusammenhang zwischen DA<sub>e</sub> und Na<sub>i</sub> bzw. Cl<sub>i</sub>**

Die Abhängigkeit der extrazellulären Dopaminkonzentration DA<sub>e</sub> von den intrazellulären Konzentrationen von Natrium Na<sub>i</sub> und Chlorid Cl<sub>i</sub> wurde aus Gleichung 1 berechnet.

DA<sub>e</sub> hängt linear von Cl<sub>i</sub> und quadratisch von Na<sub>i</sub> ab. Das bedeutet, dass bei geringen intrazellulären Konzentrationen (hier <5mM) eine Änderung der intrazellulären Chloridkonzentration sogar eine größere Auswirkung auf die extrazelluläre Dopaminkonzentration hat als eine gleich große Änderung von Natrium (Abb. 26).

Da der Einstrom von Chlorid eine Hyperpolarisation bewirkt, ist die Freisetzung von Dopamin durch Chlorid alleine sehr unwahrscheinlich. Allerdings könnte die

Aktivierung von GABA-A-Rezeptoren durch den Einstrom von Chlorid paradoxerweise die Freisetzung von Dopamin aus dopaminergen Dendriten erleichtern. Dies ist physiologisch interessant, da die SN viele GABAerge Afferenzen erhält, und ein Großteil der Interneurone sowie die nigrothalamischen Projektionsneurone der SNr GABAerg sind.

#### **4.5.4 Freisetzung durch Depolarisation**

Obwohl die Freisetzung von Dopamin durch Depolarisation bisher nicht direkt nachgewiesen wurde, existieren in der Literatur Hinweise, die dies vermuten ließen. Schon recht früh wurde von einer nicht-kompetitiven Hemmung der Dopaminaufnahme durch Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration berichtet, was einer Depolarisation gleichkommt (Gräfe K.-H. und Bönisch H., 1988). Auch in neueren Studien ist es eine oft berichtete Tatsache, dass die Aufnahme von Dopamin (oder Noradrenalin) durch Hyperpolarisation gefördert, durch Depolarisation behindert wird (Sonders et al., 1997, Zahniser et al., 1998 bzw. Galli et al., 1998). In COS-Zellen gelang es auch, die Freisetzung von Dopamin durch Applikation von KCl zu steigern (Eshleman et al., 1994).

In den vorliegenden Experimenten mit einzelnen Neuronen wurde schließlich direkt illustriert, dass Dopamin alleine durch Depolarisation der Zellmembran aus dopaminergen Neuronen freigesetzt werden kann.

Da im Vergleich zum Gehirnschnitt kein umgebendes Gewebe die Diffusion von Dopamin behinderte, stellte die gemessene Dopaminkonzentration nur einen Bruchteil der Gleichgewichtskonzentration dar. Ein Großteil des aus der Zelle freigesetzten Dopamins diffundierte in das im Verhältnis zur Zelle riesige Volumen der Badlösung, ohne von der Elektrode erfasst zu werden. Dies war vermutlich ein Grund dafür, dass eine signifikante Freisetzung von Dopamin erst bei stark positiven Potentialen festgestellt wurde.

Ein weiterer Faktor dürfte die geringe Dichte des DAT in somatischen Membranen darstellen (Nirenberg et al., 1996). Die peripheren Dendriten mit einer hohen DAT-Dichte gingen leider bei der Präparation verloren, und sind auch im Gehirnschnitt aufgrund ihres geringen Durchmessers und der großen

Entfernung vom Soma durch einen elektrischen Zugang zum Soma nur unzureichend erreichbar.

Auf der anderen Seite stellte die Freisetzung bei stark positiven Membranpotentialen, jenseits des Umkehrpotentials von Natrium, sicher, dass für die Freisetzung von Dopamin ausschließlich das Membranpotential verantwortlich war, und nicht ein eventueller Einstrom von Natrium durch spannungsabhängige Natriumkanäle.

Ein Nebenbefund dieser Experimente war, dass während des Transportvorgangs am DAT offenbar nur eine positive Ladung durch die Membran verschoben wird. Die bisherigen kinetischen Daten zur Stöchiometrie des DAT deuten dagegen darauf hin, dass an dem Transport von Dopamin durch den DAT ein  $DA^+$ , zwei  $Na^+$  und 1  $Cl^-$  beteiligt sind (siehe Abschnitt 1.5.3). Dies impliziert die Translokation von zwei positiven Ladungen.

Eine mögliche Erklärung für diesen Widerspruch ist, dass Dopamin als neutrales Molekül transportiert wird. Obwohl Dopamin bei physiologischem pH-Wert als Kation vorliegt, könnte die Wechselwirkung mit dem DAT diese Veränderung bewirken.

Die zweite Erklärung ist, dass nur eines der beiden Natriumionen wirklich transportiert wird, das andere dagegen an einer allosterischen Bindungsstelle den Transport der Substrate erleichtert. Diese Überlegung erscheint plausibel, da die anderen Mitglieder der Gen-Familie des DAT, die Transporter für Noradrenalin und Serotonin, ebenfalls nur ein Natrium pro Zyklus transportieren. Möglicherweise wird die genaue Lokalisation der Natrium-Bindungsstellen auf dem DAT-Molekül diese Frage beantworten.

## **4.6 Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick**

### **4.6.1 Relevanz für Hypoxie und Parkinson**

Unter hypoxischen Bedingungen wurde eine Freisetzung von Glutamat durch Transport beobachtet (Rossi et al., 2000), was durch den Zusammenbruch der Ionengradienten und des Membranpotentials erklärt werden kann. Daher erscheint in Hypoxie auch eine Freisetzung von Dopamin wahrscheinlich (Levi

und Raiteri, 1993). Die Bedeutung dieses Vorgangs ist jedoch eher fraglich, da für Dopamin keine mit Glutamat vergleichbare Exzitotoxizität beschrieben wurde.

In der Substantia nigra bewirkt das durch synaptische Aktivierung dopaminerger Dendriten freigesetzte Dopamin zwar eine Hyperpolarisation dopaminerger Neurone durch Aktivierung von D2-Rezeptoren, eine Verminderung der Feuerrate wurde jedoch nicht nachgewiesen (Barstow K.L. und Mintz I.M., 1998 und Barstow K.L., persönliche Mitteilung). Möglicherweise besteht daher die Funktion dieses Dopamins weniger in der direkten Übermittlung von Informationen, als vielmehr in einer längerfristigen Regulation von Aktivität und Erregbarkeit der auch spontan aktiven dopaminergen Dendriten (siehe 4.6.2). Dies würde zu der langsamen Kinetik und der sehr geringen Menge des durch physiologische Stimuli freigesetzten Dopamins passen.

Die durch D2-Rezeptoren vermittelte Öffnung von Kaliumkanälen wirkt stabilisierend auf das Membranpotential der dopaminergen Dendriten und senkt ihre Erregbarkeit. Da Exzitotoxizität vermutlich eine Rolle in der Progredienz des M. Parkinson spielt, könnte dieser protektive Effekt des freigesetzten Dopamins möglicherweise zur Verlangsamung der Degeneration dopaminerger Neurone beitragen, und damit die Progredienz des M. Parkinson bremsen.

Die Freisetzung von Dopamin in der SN könnte sogar therapeutisch bei M. Parkinson wirksam sein. Dafür sprechen Experimente an Ratten mit Läsion der SNc. In diesem Modell des M. Parkinson bewirkte nämlich sowohl die Transplantation dopaminerger Neurone in das Striatum, als auch die Transplantation in die SN eine funktionelle Besserung der Symptome (Nikkhah et al., 1994). Durch selektives Ausschalten nigraler bzw. striataler Dopaminrezeptoren konnte weiterhin gezeigt werden, dass auch ein Großteil der Wirkung von L-Dopa auf der Aktivierung nigraler Dopaminrezeptoren beruht (Robertson, 1992).

Dies wirft ein neues Licht auf die Hyperaktivität des STN bei M. Parkinson. Bisher wird davon ausgegangen, dass sie durch Aktivierung der SNr für eine Hemmung des Thalamus, und damit für die Negativsymptome bei M. Parkinson

mit verantwortlich ist (Schmidt und Thews, 1997). Es ist jedoch ebenso möglich, dass sich die Hyperaktivität des STN durch Stimulation der dendritischen Freisetzung von Dopamin positiv auf den Krankheitsverlauf auswirkt. Dies könnte eine Erklärung dafür liefern, dass eine elektrische Stimulation des STN die Symptome bei M. Parkinson verbessern kann. Insbesondere Rigor und Akinese können unabhängig von der Therapie mit L-Dopa deutlich verringert, Dosis und Nebenwirkungen von L-Dopa reduziert werden (siehe u.a. Houeto et al., 2000, Bejjani et al., 2000).

#### **4.6.2 Synaptische Integration in der Substantia nigra**

Die Dendriten dopaminergener Neurone der SN besitzen einen großen und hoch differenzierten Dendritenbaum, zu dessen komplexen Eigenschaften auch die Generation von Kalzium- und Natriumaktionspotentialen gehört (Hausser et al., 1995). Glutamaterge Afferenzen bewirken hier nicht nur ein starkes EPSP, sondern auch die Freisetzung von Dopamin durch den DAT.

Da der DAT über die gesamte Oberfläche der Dendriten verteilt ist, wird die räumliche und zeitliche Verteilung der Freisetzung von Dopamin allein vom Membranpotential bestimmt, unterstützt durch den Einstrom von Natrium (siehe Abschnitt 4.5). Die Freisetzung geschieht demnach delokalisiert und abhängig von ankommenden Afferenzen, sowie von dendritischen und vom Soma einwandernden („backpropagating“) Aktionspotentialen.

Da das freigesetzte Dopamin wiederum eine hemmende Wirkung auf die umgebenden dopaminergen Dendriten ausübt, erscheint die lokale Regulation von Aktivität und Erregbarkeit dieser auch spontan aktiven Neurone als ein äußerst komplexer und vor allem aktiver Prozess. Ein genaueres Verständnis dieser Regulation könnte durch elektrophysiologische Experimente an einzelnen Dendriten gewonnen werden. Es wäre klinisch höchst relevant, da der durch dieses Netzwerk bestimmte dopaminerge Tonus im Striatum für parkinsonoide Symptome von entscheidender Bedeutung ist.

### **4.6.3 Eine transport-vermittelte Synapse?**

Da die Bezeichnung Synapse per se nicht an einen vesikulären Mechanismus gebunden ist (es gibt auch „elektrische“ Synapsen), könnte man auch die Interaktion zwischen dopaminergen Dendriten als Synapse bezeichnen. Die präsynaptische Freisetzung von Dopamin erfolgt bei dieser dendro-dendritischen Synapse nicht durch Exozytose, sondern durch reversen Transport durch den DAT. Postsynaptisch bewirkt das freigesetzte Dopamin eine Hyperpolarisation durch Aktivierung von D2-Rezeptoren. Im Gegensatz zu klassischen dendro-dendritischen Synapsen ist diese Interaktion nicht an morphologisch fassbare Strukturen gebunden. Vielmehr erfolgt die Freisetzung von Dopamin dynamisch über die gesamte Oberfläche der Dendriten verteilt (siehe 4.6.2). Dennoch kann diese Synapse synchronisierte postsynaptische Potentiale vermitteln, z.B. in Form der Hyperpolarisation dopaminergere Dendriten nach Stimulation des STN (Barstow K.L. und Mintz I.M., 1998). In diesen Experimenten ist der transport-vermittelten dendro-dendritischen Synapse noch eine klassische axo-dendritische Synapse vorgeschaltet.

### **4.6.4 Ein neuer Wirkungsmechanismus von Transporterantagonisten**

Wie bereits erwähnt, wurde die Freisetzung verschiedener Transmitter durch ihre Transporter beschrieben (siehe 1.6). Möglicherweise vermitteln all diese Transmitter ebenfalls dendro-dendritische Interaktionen durch analoge „transport-vermittelte“ Synapsen. Dies hätte wichtige Implikationen für den Wirkungsmechanismus von Antagonisten dieser Transporter. Dazu gehören trizyklische Antidepressiva, SSRI, Kokain, Ecstasy und andere Substanzen, die als Therapeutika eingesetzt werden oder aufgrund ihres Suchtpotentials klinische Bedeutung besitzen. Möglicherweise ist die Wirkung dieser Substanzen nicht nur auf die Erleichterung axo-dendritischer Übertragung durch Hemmung der Wiederaufnahme von axonal freigesetztem Transmitter zurückzuführen. Vielmehr könnte ein Teil der Wirkungen auch auf der Blockierung transport-vermittelter dendro-dendritischer Übertragung beruhen.

## **5 ZUSAMMENFASSUNG**

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Amperometrie eine geeignete Methode darstellt, um geringe, durch physiologische Stimuli freigesetzte Mengen an Dopamin zu erfassen. Die Aktivierung dopaminerger Dendriten der Substantia nigra durch lokale Applikation einer niedrigen Konzentration von Glutamat bewirkte die Freisetzung von Dopamin. Diese Freisetzung wurde nicht durch Exozytose vermittelt, da sie unter kalzium-freien Bedingungen stabil war. Sie erfolgte mittels reversen Transports durch den Dopamin-Transporter, da sie durch seine Antagonisten gehemmt wurde.

Auch die physiologische Aktivierung der dopaminerger Dendriten durch Stimulation eines synaptischen Eingangs führte zu einer Freisetzung von Dopamin. Diese Freisetzung erfolgte ebenfalls durch den Dopamin-Transporter, da sie durch entsprechende Antagonisten gehemmt wurde.

Es wurde illustriert, dass eine Depolarisation der Plasmamembran ausreichend ist, um die Freisetzung von Dopamin durch reversen Transport zu bewirken. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Umkehr der Transportrichtung aus thermodynamischer Sicht bereits unter physiologischen Konzentrationsverhältnissen stattfinden kann.

Diese Befunde beschreiben eine neue Art der dendro-dendritischen Interaktion, die nicht an morphologisch fassbare Strukturen gebunden ist. Die Freisetzung von Dopamin durch den DAT erfolgt delokalisiert und wird dynamisch von den komplexen elektrischen Eigenschaften der Dendriten bestimmt. Diese Interaktion ergänzt das funktionelle Bild der Substantia nigra, und könnte zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie des M. Parkinson beitragen. Da ein vergleichbarer Mechanismus auch für Freisetzung anderer Transmittersubstanzen wahrscheinlich ist, besitzen diese Ergebnisse weiterhin große Bedeutung für die Wirkung der klinisch relevanten Transporterantagonisten. Möglicherweise wird ein Teil ihrer Wirkung nicht durch eine Hemmung der axonalen Wiederaufnahme von Transmittern vermittelt, sondern durch eine Störung der dendro-dendritischen Interaktion.

## 6 ABKÜRZUNGEN UND PHARMAKA

Abkürzung/Substanz	Bedeutung/Wirkung
$\beta$ -CIT	Antagonist des DAT
$[X]_{e/i}$	extra-/intrazelluläre Konzentration von X
AMPH	Amphetamin
AP-5	Antagonist an NMDA Glutamat-Rezeptoren
BG	Basalganglien
BSA	Bovines Serumalbumin
Carbachol	Agonist am mACh Rezeptor
Cl	Chlorid
CNQX	Antagonist an non-NMDA Glutamat-Rezeptoren
Coc	Kokain
COS	Affennieren-Zelllinie
Cys	Zystein
DA	Dopamin
DAT	Dopamintransporter
Dopamin	
E	Membranpotential
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
FCV	Fast Cyclic Voltammetry (elektrochemische Methode)
GBR	GBR12935
GBR12935	Antagonist des DAT
Glutamat	
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potential
KCl	Kaliumchlorid, depolarisiert die Plasmamembran
MEM	Minimal Essential Medium (Nährmedium für Zellkulturen)
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NMDA	bestimmter Glutamat-Rezeptor Agonist
Reserpin	zerstört Vesikel
SI	Sampling Intervall (zeitliche Auflösung)
SN	Substantia nigra



SNc	SN pars compacta
SNr	SN pars reticulata
STN	Ncl. subthalamicus
TTX	Blockiert spannungsabhängige Na-Kanäle
VAT	vesikulärer Dopamintransporter
Veratridin	Öffner von Natriumkanälen

## **7 VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN**

### **7.1 Abbildungen**

Abbildung 1: Berechnung eines Voltammogramms .....	22
Abbildung 2: Topographie der SN im Gehirn der Ratte .....	24
Abbildung 3: Aufbau der Perfusion.....	26
Abbildung 4: Kalibrierung des Picospritzers .....	28
Abbildung 5: Karbonfasern.....	33
Abbildung 6: Verhältnis von Signal zu Rauschen.....	35
Abbildung 7: Vergleich der Voltammogramme für Dopamin und Serotonin.....	36
Abbildung 8: Freisetzung von Dopamin nach Stimulation durch Glutamat.....	37
Abbildung 9: Applikationsartefakte .....	39
Abbildung 10: Antwort in ACSF mit und ohne Calcium.....	40
Abbildung 11: Effekt von GBR12935 auf die Antwort in 0 mM Ca.....	43
Abbildung 12: Effekt von GBR12935, ohne Veränderung der Nulllinie.....	44
Abbildung 13: Effekt von GBR12935 auf oxidative Ströme.....	45
Abbildung 14: Effekt von $\beta$ -CIT .....	46
Abbildung 15: Effekt von Glutamat-Rezeptor-Antagonisten.....	47
Abbildung 16: Effekt von TTX auf die Antwort in 0 mM Kalzium .....	48
Abbildung 17: Antwort auf Stimulation des STN.....	50
Abbildung 18: Effekt von GBR12935 auf die Antwort bei Stimulation des STN	52
Abbildung 19: Kinetisches Modell der Freisetzung von Dopamin.....	53
Abbildung 20: Freisetzung von Dopamin durch Depolarisation.....	55
Abbildung 21: Effekt von GBR12935 .....	56
Abbildung 22: Antwort in kalzium-freien Bedingungen.....	57
Abbildung 23: Zusammenhang von $DA_e$ und Membranpotential für verschiedene Werte z.....	58
Abbildung 24: Fit einer IV durch eine Exponentialfunktion.....	59
Abbildung 25: Fit von Abb. 22 mit z=1 und z=2.....	60
Abbildung 26: Zusammenhang zwischen $DA_e$ und $Na_i$ bzw. $Cl_i$ .....	73

## **7.2 Tabellen**

Tabelle 1: Untersuchungen über die Freisetzung von Dopamin in der SN.....	12
Tabelle 2: Einfluss verschiedener Substanzen auf die Freisetzung von Dopamin durch den DAT.....	17
Tabelle 3: Absolute Sensitivität.....	34
Tabelle 4: Effekt von GBR12935 auf oxidative Ströme.....	45
Tabelle 5: Koeffizienten für den Fit verschiedener IVs.....	59

## **7.3 Gleichungen**

Gleichung 1: Gleichgewichtspotential des DAT .....	16
Gleichung 2: Abhängigkeit der extrazellulären Dopaminkonzentration vom Membranpotential. ....	57
Gleichung 3: Berechnung der intrazellulären Dopaminkonzentration .....	61
Gleichung 4: Freisetzung durch Änderung des Membranpotentials .....	62
Gleichung 5: Freisetzung durch Änderung der intrazellulären Natriumkonzentration.....	62
Gleichung 6: Freisetzung durch Änderung von Membranpotential und Natriumkonzentration.....	64

## **8 LITERATURVERZEICHNIS**

1. Aghajanian GK, Bunney BS (1977) Dopamine "autoreceptors": pharmacological characterization by microiontophoretic single cell recording studies. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 297: 1-7.
2. Barstow K.L. and Mintz I.M. Cocaine Analogs inhibit the dendritic release of dopamine in the rat substantia nigra. *Soc.Neurosci.Abstr.* 24. 1998.
3. Bejjani BP, Dormont D, Pidoux B, Yelnik J, Damier P, Arnulf I, Bonnet AM, Marsault C, Agid Y, Philippon J, Cornu P (2000) Bilateral subthalamic stimulation for Parkinson's disease by using three-dimensional stereotactic magnetic resonance imaging and electrophysiological guidance. *J Neurosurg* 92: 615-625.
4. Björklund A, Lindvall O (1975) Dopamine in dendrites of substantia nigra neurons: suggestions for a role in dendritic terminals. *Brain Res* 83: 531-537.
5. Cheramy A, Leviel V, Glowinski J (1981) Dendritic release of dopamine in the substantia nigra. *Nature* 289: 537-542.
6. Clements JD (1996) Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function. *Trends Neurosci* 19: 163-171.
7. Clements JD, Lester RA, Tong G, Jahr CE, Westbrook GL (1992) The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science* 258: 1498-1501.
8. Collingridge GL, James TA, MacLeod NK (1979) Neurochemical and electrophysiological evidence for a projection from the locus coeruleus to the substantia nigra [proceedings]. *J Physiol Lond* 290: 44P.
9. Conde H (1992) Organization and physiology of the substantia nigra. *Exp Brain Res* 88: 233-248.
10. do-Nascimento JL, Ventura AL, Paes dC (1998) Veratridine- and glutamate-induced release of [3H]-GABA from cultured chick retina cells: possible involvement of a GAT-1-like subtype of GABA transporter. *Brain Res* 798: 217-222.
11. Dray A, Gonye TJ, Oakley NR, Tanner T (1976) Evidence for the existence of a raphe projection to the substantia nigra in rat. *Brain Res* 113: 45-57.
12. Elverfors A, Jonason J, Jonason G, Nissbrandt H (1997) Effects of drugs interfering with sodium channels and calcium channels on the release of endogenous dopamine from superfused substantia nigra slices. *Synapse* 26: 359-369.
13. Eshleman AJ, Carmolli M, Cumbay M, Martens CR, Neve KA, Janowsky A (1999) Characteristics of drug interactions with recombinant biogenic amine transporters expressed in the same cell type. *J Pharmacol Exp Ther* 289: 877-885.
14. Eshleman AJ, Henningsen RA, Neve KA, Janowsky A (1994) Release of dopamine via the human transporter. *Mol Pharmacol* 45: 312-316.

15. Flores G, Hernandez S, Rosales MG, Sierra A, Martinez FD, Flores HJ, Aceves J (1996) M3 muscarinic receptors mediate cholinergic excitation of the spontaneous activity of subthalamic neurons in the rat. *Neurosci Lett* 203: 203-206.
16. Freed C, Revay R, Vaughan RA, Kriek E, Grant S, Uhl GR, Kuhar MJ (1995) Dopamine transporter immunoreactivity in rat brain. *J Comp Neurol* 359: 340-349.
17. Galli A, Blakely RD, DeFelice LJ (1998) Patch-clamp and amperometric recordings from norepinephrine transporters: channel activity and voltage-dependent uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13260-13265.
18. Geffen LB, Jessell TM, Cuello AC, Iversen LL (1976) Release of dopamine from dendrites in rat substantia nigra. *Nature* 260: 258-260.
19. Giros B, Caron MG (1993) Molecular characterization of the dopamine transporter. *Trends Pharmacol Sci* 14: 43-49.
20. Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG (1996) Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 379: 606-612.
21. Gräfe K.-H., Bönisch H. (1988) The Transport of Amines Across the Axonal Membranes of Noradrenergic and Dopaminergic Neurones. In: *Handbook of Experimental Pharmacology* pp 193-245.
22. Groves PM, Linder JC (1983) Dendro-dendritic synapses in substantia nigra: descriptions based on analysis of serial sections. *Exp Brain Res* 49: 209-217.
23. Gu H, Wall SC, Rudnick G (1994) Stable expression of biogenic amine transporters reveals differences in inhibitor sensitivity, kinetics, and ion dependence. *J Biol Chem* 269: 7124-7130.
24. Harris KM, Miller RJ (1989a) CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione) antagonizes NMDA-evoked [<sup>3</sup>H]GABA release from cultured cortical neurons via an inhibitory action at the strychnine-insensitive glycine site. *Brain Res* 489: 185-189.
25. Harris KM, Miller RJ (1989b) Excitatory amino acid-evoked release of [<sup>3</sup>H]GABA from hippocampal neurons in primary culture. *Brain Res* 482: 23-33.
26. Hausser M, Roth A (1997) Dendritic and somatic glutamate receptor channels in rat cerebellar Purkinje cells. *J Physiol Lond* 501: 77-95.
27. Hausser M, Stuart G, Racca C, Sakmann B (1995) Axonal initiation and active dendritic propagation of action potentials in substantia nigra neurons. *Neuron* 15: 637-647.
28. Hille B (1992) *Ionic channels of excitable membranes*. Sunderland, MA: Sinauer Associated Inc.

29. Hoffman AF, Gerhardt GA (1999) Differences in pharmacological properties of dopamine release between the substantia nigra and striatum: an in vivo electrochemical study. *J Pharmacol Exp Ther* 289: 455-463.
30. Hoffman AF, van Horne CG, Eken S, Hoffer BJ, Gerhardt GA (1997) In vivo microdialysis studies on somatodendritic dopamine release in the rat substantia nigra: effects of unilateral 6-OHDA lesions and GDNF. *Exp Neurol* 147: 130-141.
31. Houeto JL, Damier P, Bejjani PB, Staedler C, Bonnet AM, Arnulf I, Pidoux B, Dormont D, Cornu P, Agid Y (2000) Subthalamic stimulation in Parkinson disease: a multidisciplinary approach. *Arch Neurol* 57: 461-465.
32. Iribe Y, Moore K, Pang KC, Tepper JM (1999) Subthalamic stimulation-induced synaptic responses in substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in vitro. *J Neurophysiol* 82: 925-933.
33. Jackson EA, Kelly PH (1983) Role of nigral dopamine in amphetamine-induced locomotor activity. *Brain Res* 278: 366-369.
34. Jaffe EH, Marty A, Schulte A, Chow RH (1998) Extrasynaptic vesicular transmitter release from the somata of substantia nigra neurons in rat midbrain slices. *J Neurosci* 18: 3548-3553.
35. Kalivas PW, Stewart J (1991) Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res Brain Res Rev* 16: 223-244.
36. Kandel, Schwartz, and Jessell. *Principles of Neural Science*. 1994.
37. Katz B (1969) *The Release of Neural Transmitter Substances*. Springfield, Ill.: Thomas.
38. Kitayama S, Morita K, Dohi T (1996) Cocaine inhibits the release of MPP+ but not dopamine through the rat dopamine transporter. *Eur J Pharmacol* 309: 107-109.
39. Künzle H. (1993) Aufbau und Verbindungen der Basalganglien. In: Benninghoff: *Mikroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen* (Drenckhahn D, Zenker W, eds), pp 572-582. München, Wien, Baltimore: Urban und Schwarzenberg.
40. Lacey MG, Mercuri NB, North RA (1987) Dopamine acts on D2 receptors to increase potassium conductance in neurones of the rat substantia nigra zona compacta. *J Physiol Lond* 392: 397-416.
41. Lester HA, Mager S, Quick MW, Corey JL (1994) Permeation properties of neurotransmitter transporters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 34: 219-249.
42. Levi G, Raiteri M (1993) Carrier-mediated release of neurotransmitters. *Trends Neurosci* 16: 415-419.
43. Martin LP, Waszczak BL (1994) D1 agonist-induced excitation of substantia nigra pars reticulata neurons: mediation by D1 receptors on striatonigral terminals via a pertussis toxin-sensitive coupling pathway. *J Neurosci* 14: 4494-4506.

44. McElvain JS, Schenk JO (1992) A multisubstrate mechanism of striatal dopamine uptake and its inhibition by cocaine. *Biochem Pharmacol* 43: 2189-2199.
45. Mintz I, Hammond C, Guibert B, Leviel V (1986) Stimulation of the subthalamic nucleus enhances the release of dopamine in the rat substantia nigra. *Brain Res* 376: 406-408.
46. Nikkhah G, Bentlage C, Cunningham MG, Bjorklund A (1994) Intranigral fetal dopamine grafts induce behavioral compensation in the rat Parkinson model. *J Neurosci* 14: 3449-3461.
47. Nirenberg MJ, Vaughan RA, Uhl GR, Kuhar MJ, Pickel VM (1996) The dopamine transporter is localized to dendritic and axonal plasma membranes of nigrostriatal dopaminergic neurons. *J Neurosci* 16: 436-447.
48. Okada T, Fujita M, Shimada S, Sato K, Schloss P, Watanabe Y, Itoh Y, Tohyama M, Nishimura T (1998) Assessment of affinities of beta-CIT, beta-CIT-FE, and beta-CIT-FP for monoamine transporters permanently expressed in cell lines. *Nucl Med Biol* 25: 53-58.
49. Paxinos G, Watson C (1986) *The Rat Brain in Stereotactic Coordinates*. San Diego: Academic Press Inc.
50. Pifl C, Drobny H, Reither H, Hornykiewicz O, Singer EA (1995) Mechanism of the dopamine-releasing actions of amphetamine and cocaine: plasmalemmal dopamine transporter versus vesicular monoamine transporter. *Mol Pharmacol* 47: 368-373.
51. Rice ME, Cragg SJ, Greenfield SA (1997) Characteristics of electrically evoked somatodendritic dopamine release in substantia nigra and ventral tegmental area in vitro. *J Neurophysiol* 77: 853-862.
52. Robertson HA (1992) Dopamine receptor interactions: some implications for the treatment of Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 15: 201-206.
53. Rosales MG, Flores G, Hernandez S, Martinez FD, Aceves J (1994) Activation of subthalamic neurons produces NMDA receptor-mediated dendritic dopamine release in substantia nigra pars reticulata: a microdialysis study in the rat. *Brain Res* 645: 335-337.
54. Rosales MG, Martinez FD, Morales R, Nunez A, Flores G, Gongora-Alfaro JL, Floran B, Aceves J (1997) Reciprocal interaction between glutamate and dopamine in the pars reticulata of the rat substantia nigra: a microdialysis study. *Neuroscience* 80: 803-810.
55. Rossi DJ, Oshima T, Attwell D (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403: 316-321.
56. Schmidt RF, Thews G (1997) *Physiologie des Menschen*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
57. Schwartz EA (1982) Calcium-independent release of GABA from isolated horizontal cells of the toad retina. *J Physiol Lond* 323: 211-227.

58. Schwartz EA (1987) Depolarization without calcium can release gamma-aminobutyric acid from a retinal neuron. *Science* 238: 350-355.
59. Shimada S, Kitayama S, Lin CL, Patel A, Nanthakumar E, Gregor P, Kuhar M, Uhl G (1991) Cloning and expression of a cocaine-sensitive dopamine transporter complementary DNA [published erratum appears in *Science* 1992 Mar 6;255(5049):1195]. *Science* 254: 576-578.
60. Sibley DR, Monsma-FJ J (1992) Molecular biology of dopamine receptors. *Trends Pharmacol Sci* 13: 61-69.
61. Sitte HH, Huck S, Reither H, Boehm S, Singer EA, Pifl C (1998) Carrier-mediated release, transport rates, and charge transfer induced by amphetamine, tyramine, and dopamine in mammalian cells transfected with the human dopamine transporter. *J Neurochem* 71: 1289-1297.
62. Sonders MS, Zhu SJ, Zahniser NR, Kavanaugh MP, Amara SG (1997) Multiple ionic conductances of the human dopamine transporter: the actions of dopamine and psychostimulants. *J Neurosci* 17: 960-974.
63. Sulzer D, Chen TK, Lau YY, Kristensen H, Rayport S, Ewing A (1995) Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to the cytosol and promotes reverse transport. *J Neurosci* 15: 4102-4108.
64. Sulzer D, Maidment NT, Rayport S (1993) Amphetamine and other weak bases act to promote reverse transport of dopamine in ventral midbrain neurons. *J Neurochem* 60: 527-535.
65. Venance L, Stella N, Glowinski J, Giaume C (1997) Mechanism involved in initiation and propagation of receptor-induced intercellular calcium signaling in cultured rat astrocytes. *J Neurosci* 17: 1981-1992.
66. Wassef, M, Berod, A, and Sotelo, C. Dopaminergic dendrites in the pars reticulata of the rat substantia nigra and their striatal input. *Neuroscience* 11, 2125-2139. 1981.
67. Yamazaki T, Akiyama T, Kitagawa H, Takauchi Y, Kawada T (1996) Elevation of either axoplasmic norepinephrine or sodium level induced release of norepinephrine from cardiac sympathetic nerve terminals. *Brain Res* 737: 343-346.
68. Zahniser NR, Gerhardt GA, Hoffman AF, Lupica CR (1998) Voltage-dependency of the dopamine transporter in rat brain. *Adv Pharmacol* 42: 195-198.



## **9 VERÖFFENTLICHUNGEN**

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht.

als Abstract:

Synaptically-evoked release of dopamine mediated by the dendritic dopamine transporter.

Björn H. Falkenburger and Isabelle M. Mintz, Boston University Medical Center.

Biophysical Journal, January 2000, Vol 78, Nummer 1, Seite 216A

als Artikel:

Dendrodendritic inhibition through reversal of dopamine transport

Björn H. Falkenburger, Karen L-Barstow und Isabelle M. Mintz.

Science, 28. Sept. 2001, Vol 293, Seite 2465-70

## **10 DANKSAGUNG**

Als erstes möchte ich mich sehr herzlich bei Frau Dr. Isabelle Mintz für die Überlassung des Themas bedanken, für ihr Vertrauen in mich und ihre kontinuierliche Unterstützung im Verlauf der Arbeit. Sie vermittelte mir meine Grundkenntnisse in Elektrophysiologie und prägte meine Vorstellung von wissenschaftlichem Arbeiten. Ich möchte mich außerdem für das Stipendium bedanken, das meinen Aufenthalt in Boston sehr erleichterte, und mir die Teilnahme an zwei wichtigen Kongressen ermöglichte.

Ebenso gilt mein herzlicher Dank Herrn Prof. Dr. J. Peter Ruppertsberg für die spontane Bereitschaft, meine Dissertation zu betreuen, sowie für die wertvolle Diskussion und Unterstützung bei der Abfassung derselben.

Weiterhin möchte ich mich bei Karen Barstow, Vincent Coljeee, Valerie Itier und Serguei Sidach bedanken, für hilfreiche Tips im Labor und für die schöne Zeit in Boston, sowie bei meinen Eltern für die Unterstützung meiner Vorhaben und den Computer, auf dem diese Arbeit geschrieben wurde. Mein Dank gilt nicht zuletzt auch Frau Prof. Dr. Ursula Dräger für die Vermittlung des Kontakts zu Dr. Mintz und Dr. Martin Korte, der mich als erster für die Neurowissenschaften begeisterte.

## **11 LEBENS LAUF**

- Geboren 31 Dezember 1974 in Neu-Ulm
- 1994 Abitur am Albert-Einstein-Gymnasium in Reutlingen  
Leistungskurse Mathematik und Biologie
- 1994/1995 Zivildienst in der Abteilung für Kinder- und Jugendpsychiatrie  
am Universitätsklinikum Tübingen
- 1995/1996 Studium der Mathematik (Diplom) mit Nebenfach Psychologie  
an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- 1996/2002 Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes
- 1996/2002 Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- 1998/1999 Forschungsaufenthalt im Labor von Dr. I. Mintz,  
Boston University School of Medicine, Boston
- 12.11.2002 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung