

Zur funktionellen Rolle von A-Typ  
Kaliumkanälen und deren  $\beta$ -Untereinheit  
KChIP4 in dopaminergen Mittelhirnneuronen  
der Maus

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

Vorgelegt dem Fachbereich Biowissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Anna-Maria Kashiotis  
aus Nikosia/Zypern

Frankfurt am Main (2013)  
(D30)

Vom Fachbereich Biowissenschaften der Goethe-Universität Frankfurt  
als Dissertation angenommen

Dekanin: Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz

Gutachter im Fachbereich 15: Prof. Dr. Manfred Kössl

Externer Gutachter: Prof. Dr. Jochen Roeper

Datum der Disputation: 28. Juli 2014

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	v
Abstract .....	vii
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das dopaminerge Mittelhirnsystem .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Der Neurotransmitter Dopamin – Synthese und Freisetzung.....	1
1.1.2 Dopamin-Rezeptoren .....	3
1.1.3 Funktionelle Anatomie des dopaminergen Mittelhirnsystems.....	4
1.1.4 Die Basalganglien und die dopaminerge Modulation der Willkürmotorik...	9
1.1.5 Die Rolle des präfrontalen DA für das Arbeitsgedächtnis .....	12
1.1.6 Das mesolimbische System in Belohnung und Aversion.....	14
<b>1.2 Elektrophysiologische Eigenschaften von DA Mittelhirnneuronen .....</b>	<b>19</b>
1.2.1 Mechanismen zur Generierung und Kontrolle der Spontanaktivität .....	19
1.2.2 Aktionspotentialparameter und die beteiligten Ionenkanäle .....	21
1.2.3 Differentielle elektrophysiologische Eigenschaften DA Subpopulationen <i>in vitro</i> .....	23
1.2.4 <i>In vivo</i> Aktivität und Modulation durch synaptische Eingänge.....	25
<b>1.3 Der A-Typ Kaliumstrom .....</b>	<b>28</b>
1.3.1 Aufbau und Funktion spannungsgesteuerter Kaliumkanäle.....	28
1.3.2 Modulation des A-Stroms .....	35
1.3.3 Der A-Strom dopaminergere Mittelhirnneurone .....	42
<b>1.4 Zielsetzung .....</b>	<b>44</b>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>45</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>45</b>
2.1.1 Versuchstiere .....	45
2.1.2 Chemikalien und Geräte .....	45
2.1.3 Lösungen .....	46
<b>2.2 <i>In vitro</i> Elektrophysiologie .....</b>	<b>50</b>
2.2.1 Gewinnung akuter Hirnschnitte .....	50
2.2.2 Die <i>Patch-Clamp</i> Technik.....	51
2.2.3 Der <i>Patch-Clamp</i> Messplatz .....	52
2.2.4 <i>Voltage-Clamp</i> Messungen in der <i>nucleated outside-out</i> Konfiguration .....	57

2.2.5	<i>Current-Clamp</i> Messungen zur Grundcharakterisierung DA SN und VTA Zellen .....	63
2.2.6	Messung synaptischer Ströme .....	66
2.2.7	Injektion synaptischer Ströme .....	67
2.2.8	Iontophoretische GABA-Applikation .....	69
2.2.9	Bestätigung der Lage und des dopaminergen Phänotyps der gemessenen Zellen .....	70
2.2.10	Datenanalyse, statistische Auswertung und Darstellung .....	71
<b>2.3</b>	<b>Immunhistochemie .....</b>	<b>72</b>
2.3.1	Fluoreszenzfärbung von <i>Patch</i> -Schnitten .....	72
2.3.2	Konfokalmikroskopische Analyse von <i>Patch</i> -Schnitten .....	73
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>74</b>
<b>3.1</b>	<b>Biophysikalische Eigenschaften des A-Stroms in Subpopulationen DA Mittelhirnneurone .....</b>	<b>74</b>
3.1.1	Die Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik des A-Stroms ist abhängig von der KChIP4-Expression .....	74
3.1.2	Rolle von KChIP4 für die Erholung aus der Inaktivierung .....	77
3.1.3	Funktion von KChIP4 für <i>Steady-State</i> Parameter der Aktivierung und Inaktivierung des A-Stroms .....	79
<b>3.2</b>	<b>Funktionelle Bedeutung der KChIP4-Untereinheit für dopaminerge Mittelhirnneurone .....</b>	<b>85</b>
3.2.1	Passive Membraneigenschaften .....	85
3.2.2	KChIP4 hat keine Bedeutung für die Spontanfrequenz dopaminergere Neurone .....	86
3.2.3	Die Bedeutung der KChIP4-Untereinheit für die Aktionspotentialparameter dopaminergere Mittelhirnneurone .....	88
3.2.4	KChIP4 bremst die Maximalfrequenz dopaminergere VTA Neurone .....	90
3.2.5	KChIP4-Expression verlangsamt die Erholung nach einer Inhibition .....	94
<b>3.3</b>	<b>KChIP4 moduliert die Verarbeitung von inhibitorischen synaptischen Eingängen in dopaminergere VTA Neuronen .....</b>	<b>99</b>
3.3.1	Inhibitorische synaptische Eingänge sind unverändert .....	99
3.3.2	KChIP4 beeinflusst die Verarbeitung inhibitorischer synaptischer Eingänge in dopaminergere VTA Neuronen .....	101
3.3.3	KChIP4 verlängert die Pause in der elektrischen Aktivität nach physiologischer GABA-Rezeptoraktivierung .....	106

<b>4 Diskussion .....</b>	<b>109</b>
<b>4.1 Methodische Aspekte .....</b>	<b>109</b>
4.1.1 <i>Voltage-Clamp</i> Experimente in kernhaltigen <i>Patches</i> .....	109
4.1.2 Bestätigung des DA Phänotyps der gemessenen Zellen .....	111
<b>4.2 KChIP4-Expression verleiht dem A-Strom von DA VTA Neuronen seine charakteristischen Eigenschaften .....</b>	<b>113</b>
4.2.1 KChIP4 bestimmt die Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik .....	114
4.2.2 Einfluss von KChIP4 auf die Leitfähigkeit von A-Typ Kaliumkanälen .....	117
4.2.3 Rolle von KChIP4 für die Erholung aus der Inaktivierung .....	119
4.2.4 Bedeutung von KChIP4 für die <i>Steady-State</i> Parameter des $I_A$ .....	120
4.2.5 Vergleich mit Ergebnissen aus heterologen Expressionssystemen und anderen neuronalen Populationen .....	121
4.2.6 Frühere Studien der A-Strom-Parameter in DA VTA Neuronen .....	123
4.2.7 Interaktion zwischen $K_V \beta$ -Untereinheiten .....	125
<b>4.3 Funktionelle Rolle des A-Stroms für DA Mittelhirnneurone .....</b>	<b>127</b>
4.3.1 KChIP4 hat keinen Einfluss auf die Spontanfrequenz von DA Neuronen .....	127
4.3.2 Differentielle Rolle von KChIP4 für die Aktionspotentialparameter von DA Subpopulationen .....	128
4.3.3 Bedeutung von KChIP4 für die Verarbeitung depolarisierender Ströme .....	130
4.3.4 KChIP4 kontrolliert die Dauer von GABA-induzierten Pausen .....	132
<b>4.4 Potentielle Relevanz von KChIP4 für die Verarbeitung von Belohnung und Aversion .....</b>	<b>135</b>
4.4.1 Bedeutung der Dauer von inhibitorischen Pausen .....	136
4.4.2 Mögliche Verhaltensphänotypen der KChIP4-KO-Tiere .....	137
4.4.3 Quellen der GABAergen Inhibition von DA VTA Neuronen .....	139
<b>4.5 Weiterführende Experimente und Ausblick .....</b>	<b>141</b>
4.5.1 Untersuchung des <i>in vivo</i> Entladungsmusters in Abhängigkeit von der KChIP4-Expression .....	141
4.5.2 Hat KChIP4 einen subpopulationsspezifischen Einfluss auf die Dauer von inhibitorischen Pausen? .....	143
4.5.3 Konditioneller Knock-Out und Re-Expression von KChIP4a .....	144
<b>4.6 Schlussfolgerung .....</b>	<b>146</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>147</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>179</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>181</b>

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>182</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>187</b>
<b>Kongressbeiträge.....</b>	<b>188</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>189</b>

# Zusammenfassung

Die im Mittelhirn lokalisierten dopaminergen (DA) Neurone sind in einer Vielzahl von Hirnfunktionen involviert und werden aufgrund von anatomischen, molekularen sowie funktionellen Unterschieden in mehrere Subpopulationen aufgeteilt. DA Neurone, die in der Substantia nigra (SN) pars compacta lokalisiert sind, spielen durch ihre Projektion in das dorsale Striatum eine Rolle in der Steuerung der Willkürmotorik. Die Area tegmentalis ventralis (VTA) enthält DA Neurone, die in den präfrontalen Cortex, die basolateralen Amygdala sowie den Nucleus accumbens projizieren und in höheren kognitiven Funktionen, wie dem Arbeitsgedächtnis, der Motivation sowie belohnungsassoziierten Lernvorgängen involviert sind.

In dieser Arbeit wurden die differentiellen Eigenschaften des transienten A-Typ Kaliumstroms sowie dessen Funktion für die intrinsische elektrische Aktivität und die Integration von synaptischen Eingängen in Subpopulationen von DA Neuronen untersucht. Dieser spannungsgesteuerte Strom ist an der Kontrolle der Schrittmacheraktivität beteiligt, beeinflusst die Form und Dauer von Aktionspotentialen und moduliert die Erregbarkeit des somatodendritischen Kompartiments. Der A-Typ Kaliumkanal besteht in DA Neuronen aus einem Tetramer von porenbildenden  $K_{v4.3}$   $\alpha$ -Untereinheiten. Die Koexpression von akzessorischen  $\beta$ -Untereinheiten moduliert maßgeblich die biophysikalischen Parameter des A-Stroms, wie z. B. die Kinetik der Inaktivierung sowie die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und Inaktivierung. Zu diesen  $\beta$ -Untereinheiten gehören die cytoplasmatischen Kaliumkanal-interagierenden Proteine (KChIPs) sowie die transmembranären Dipeptidylpeptidase-ähnlichen Proteine (DPPLs). Während in DA SN Neuronen vor allem KChIP3 exprimiert wird und einen schnell inaktivierenden A-Strom gewährleistet, sind DA VTA Neurone durch die zusätzliche Expression der KChIP4a Splice-Variante charakterisiert, welche durch Inhibition der schnellen Inaktivierung in einem langsam inaktivierenden A-Strom resultiert. Die Bedeutung der differentiellen KChIP4a-Expression für DA Mittelhirnneurone wurde mit Hilfe von KChIP4-Knock-Out (KO)-Mäusen untersucht. Alle Versuche wurden *in vitro* an akuten

Hirnschnitten adulter Wildtyp (WT)- und KChIP4-KO-Tiere durchgeführt und die DA neurochemische Identität sowie die Lage der gemessenen Zellen im Anschluss immunhistochemisch bestätigt. Die biophysikalischen Eigenschaften des A-Stroms wurden mit der *Patch-Clamp* Technik in der *nucleated outside-out* Konfiguration untersucht, welche optimale Bedingungen für *Voltage-Clamp* Experimente gewährleistet. Der A-Strom in DA VTA Neuronen aus KChIP4-KO-Tieren wies dabei eine siebenfach schnellere Inaktivierungskinetik als in vergleichbaren Neuronen aus WT-Tieren auf, während die Inaktivierungskinetik in DA SN Neuronen aus KChIP4-KO-Tieren lediglich um den Faktor zwei schneller war. Außerdem wurde festgestellt, dass selektiv in DA VTA Neuronen das halbmaximale Aktivierungspotential ebenfalls von der KChIP4-Expression abhängig war. Somit konnte gezeigt werden, dass die Expression von KChIP4 für die charakteristischen A-Strom-Eigenschaften von DA VTA Neuronen verantwortlich ist.

Die funktionelle Rolle des KChIP4-vermittelten langsamen A-Stroms wurde mit Hilfe von *Current-Clamp* Messungen in Ganzzelleableitungen untersucht. Dabei wurde deutlich, dass die Expression von KChIP4 die Spontanaktivität von DA SN und VTA Neuronen nicht beeinflusst. Das für DA VTA Neuronen charakteristische verzögerte Wiedereintreten der Spontanaktivität nach einer Inhibition zeigte allerdings eine Abhängigkeit von der KChIP4-Expression, da der sog. *rebound delay* in DA VTA Neuronen aus KChIP4-KO-Tieren signifikant kürzer war, als in Zellen aus WT-Tieren. Dies konnte sowohl durch Strominjektionen, die in ihrer Kinetik GABAergen synaptischen Eingängen ähnelten, als auch nach direkter Aktivierung von GABA-Rezeptoren durch iontophoretische GABA-Applikation bestätigt werden. KChIP4 könnte somit einen internen Verzögerungsmechanismus nach einer transienten Inhibition von DA Neuronen gewährleisten, die z.B. bei Präsentation von aversiven Stimuli sowie beim Ausbleiben von erwarteten Belohnungen auftritt. Somit könnte die physiologische Relevanz des KChIP4-gesteuerten A-Stroms in der Integration von inhibitorischen synaptischen Eingängen im Kontext von belohnungs-gesteuerten Lernprozessen liegen.



# Abstract

Midbrain dopamine (DA) neurons are involved in a variety of brain functions and are divided into different subpopulations according to anatomical, molecular and functional differences. DA neurons located in the substantia nigra (SN) pars compacta play an important role in the control of voluntary movement through their projections to the dorsal striatum. The ventral tegmental (VTA) comprises subpopulations of DA neurons, which project to the prefrontal cortex, the basolateral amygdala and the nucleus accumbens and are involved in higher cognitive functions, including working memory, motivation and reward-driven learning.

The present thesis focuses on the differential properties of the transient A-type potassium current, as well as its function in the intrinsic activity and integration of synaptic inputs in subpopulations of DA neurons. This voltage-gated channel is involved in the control of spontaneous activity, affects form and duration of action potentials and modulates the excitability of the somatodendritic compartment. The A-type  $K^+$ -channel in DA neurons is composed of a tetramer of pore-forming  $K_v4.3$   $\alpha$ -subunits. The coexpression of auxiliary  $\beta$ -subunits modulates various biophysical properties of the A-current, such as the kinetics of inactivation and the voltage-dependency of activation and inactivation.  $\beta$ -subunits include the cytoplasmatic potassium channel interacting proteins (KChIPs) and the membrane-spanning dipeptidyl-peptidase-like proteins (DPPLs). DA SN Neurons predominantly express KChIP3, which guarantees a fast inactivating A-current, whereas DA VTA neurons additionally express the KChIP4a splice-variant, which results in a slow A-current inactivation, through an inhibition of the fast inactivation.

The relevance of the differential KChIP4a-expression for DA midbrain neurons was studied with the use of KChIP4-knock-out (KO) mice. All experiments were performed *in vitro* in acute brain slices from adult wildtype (WT) and KChIP4-KO animals. The DA phenotype and the location of the measured cells were subsequently confirmed with the use of immunohistochemistry. The biophysical properties of the A-current were tested with the use of the patch-

clamp technique in the nucleated outside-out configuration, which ensures optimal conditions for voltage-clamp experiments.

The A-current of DA VTA Neurons from KChIP4-KO animals displayed a sevenfold faster inactivation than of comparable neurons from WT-animals, whereas the kinetics of inactivation in DA SN Neurons from KChIP4-KO animals was accelerated only two-fold. Moreover, the potential of half-maximal activation depended on the expression of KChIP4 selectively in DA VTA neurons. This demonstrated that the expression of KChIP4 is necessary for the characteristic properties of the A-current in DA VTA neurons.

The functional role of the KChIP4-mediated A-current was assessed with current-clamp recordings in the whole-cell configuration. The spontaneous electrical activity of DA SN as well as VTA neurons was independent of the expression of KChIP4. In DA VTA neurons the characteristic delay of the next action potential after an inhibition – called rebound delay – was found to depend on the expression of KChIP4, so that it was significantly shorter in DA VTA neurons from KO mice than in WT mice. This result could be replicated with current injections simulating those mediated by GABA-receptors, as well as with direct activation of GABA-receptors via iontophoretic application of the transmitter.

KChIP4 could thus pose an internal delay mechanism for the inhibition of DA neurons, which occurs upon presentation of aversive stimuli or the absence of an expected reward, so that the physiological role of the KChIP4-modulated A-current could be found in the integration of inhibitory synaptic inputs in the context of reward-associated learning.

# 1 Einleitung

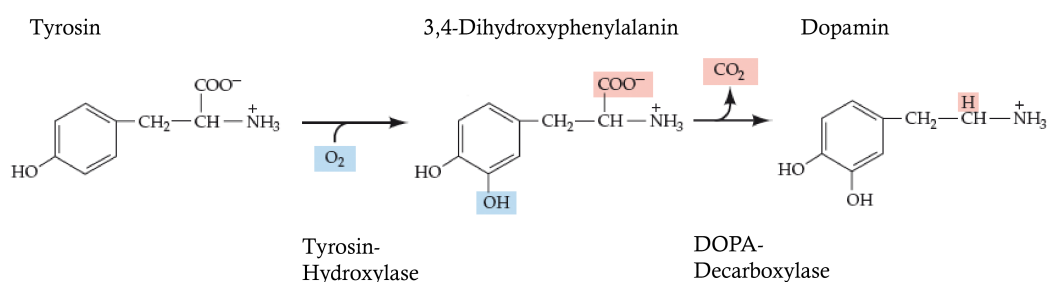
## 1.1 Das dopaminerge Mittelhirnsystem

Dopamin (DA) ist in einer Vielzahl von Hirnprozessen involviert wie z. B. in der Kontrolle der Willkürmotorik, in höheren kognitiven Funktionen wie dem Arbeitsgedächtnis sowie in der Verarbeitung von Informationen zu erhaltenen und zukünftigen Belohnungen. Der dafür nötigen, präzisen Kontrolle der elektrischen Aktivität von DA Neuronen liegt neben den synaptischen Eingängen vor allem die Zusammensetzung der von ihnen exprimierten Ionenkanälen zugrunde, sodass die biophysikalischen Eigenschaften einzelner Ionenkanäle die Diversität und die damit verbundenen unterschiedlichen Funktionen des DA Systems gewährleisten können.

### 1.1.1 Der Neurotransmitter Dopamin – Synthese und Freisetzung

DA gehört zusammen mit Adrenalin und Noradrenalin zur Transmittergruppe der Katecholamine, die durch mehrere aufeinanderfolgende chemische Reaktionen aus der essentiellen Aminosäure Tyrosin hergestellt werden (Abbildung 1.1). Im ersten Schritt wird Tyrosin durch das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH) hydroxyliert, eine Reaktion, die zusätzlich als Kofaktoren Tetrahydrobiopterin und Eisen benötigt (Fuller und Steinberg, 1976). Als Produkt entsteht 3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA), welches im Anschluss von der Aromatische-L-Aminosäuren-Decarboxylase (AADC) decarboxyliert wird, so dass DA entsteht. Die Aktivität der TH stellt den geschwindigkeitslimitierenden Schritt der Katecholaminbiosynthese dar und kann durch Phosphorylierung an vier distinkten Serinresten gesteigert werden (Daubner et al., 2011). Nach seiner Synthese wird DA durch den vesikulären Monoamintransporter (VMAT2) im Antiport gegen Protonen in synaptische Vesikel verpackt (Weihe und Eiden, 2000) und kann bei Bedarf durch calciumvermittelte Exocytose ausgeschüttet werden (Purves et al., 2004). DA

kann zusätzlich zur axonalen, synaptischen Exocytose auch somatodendritisch freigesetzt werden (Geffen et al., 1976; Nirenberg et al., 1996; Beckstead et al., 2004). Während für die axonale Exocytose der Einstrom von Calciumionen aus dem Extrazellulärraum unabdingbar ist, wird die nötige Steigerung der Calciumkonzentration bei der somatodendritischen DA-Freisetzung vermutlich durch einen Verstärkungsmechanismus in Form von calciumvermittelter Calciumfreisetzung aus den intrazellulären Calciumspeichern gewährleistet (Chen et al., 2011; Rice et al., 2011). Die höhere Calciumsensitivität der somatodendritischen Freisetzung lässt sich durch die differentielle Exocytosemaschinerie erklären (Mendez et al., 2011). Zusätzlich wird auch eine Umkehrung des DA-Transporters (DAT) als potentieller Mechanismus der somatodendritischen DA-Freisetzung diskutiert (Cragg et al., 1997; Falkenburger et al., 2001; Opazo et al., 2010; Rice et al., 2011).



### Abbildung 1.1: Die Biosynthese von Dopamin

Aus der Aminosäure Tyrosin wird in zwei aufeinander folgenden enzymatischen Reaktionen Dopamin synthetisiert (modifiziert nach Purves et al., 2004).

DA vermittelt seine Wirkung durch die Bindung an prä- und postsynaptisch lokalisierte Rezeptoren (siehe Abschnitt 1.1.2).

Der wichtigste Mechanismus zur Beendigung der Wirkung von DA ist die Diffusion aus dem Extrazellulärraum, allerdings kann auch eine Wiederaufnahme in die präsynaptische Terminale erfolgen (Rice et al., 2011). Durch den DAT, welcher ausschließlich in der präsynaptischen Membran von DA Neuronen lokalisiert ist (Nirenberg et al., 1997), werden je ein Molekül DA und Chlorid im Kotransport mit zwei Natriumionen über die Membran transportiert. In der Präsynapse kann DA zum einen erneut in Vesikel verpackt

und zur Wiederausschüttung bereitgestellt, zum anderen durch die mitochondrienassoziierte Monoamin-Oxidase (MAO) sowie die cytoplasmatische Catechol-O-Methyltransferase (COMT) degradiert werden (Purves et al., 2004). DA hat außerdem eine hohe Affinität zum Noradrenalintransporter (NET, engl. *norepinephrine Transporter*) (Giros et al., 1994; Gu et al., 1994; Eshleman et al., 1999), sodass in Hirnarealen mit einer geringen DAT-Dichte, wie z. B. dem präfrontalen Cortex (PFC) (Sesack et al., 1998) der NET für die Beendigung der Wirkung von DA hauptverantwortlich ist (Carboni et al., 1990; Shen et al., 2004; Kaenmaki et al., 2010). Gliazellen spielen ebenfalls eine Rolle für die Aufnahme von DA aus dem Extrazellulärraum. Neben dem NET-vermittelten DA Transport steht den Astrocyten zusätzlich der Transporter für organische Kationen OCT3 (engl. *organic cation transporter 3*, auch extraneuronaler Monoamintransporter genannt) (Wu et al., 1998; Takeda et al., 2002; Cui et al., 2009), sowie der Plasmamembran-Monoamintransporter (PMAT) für die DA Aufnahme zur Verfügung (Engel et al., 2004; Duan und Wang, 2010).

### 1.1.2 Dopamin-Rezeptoren

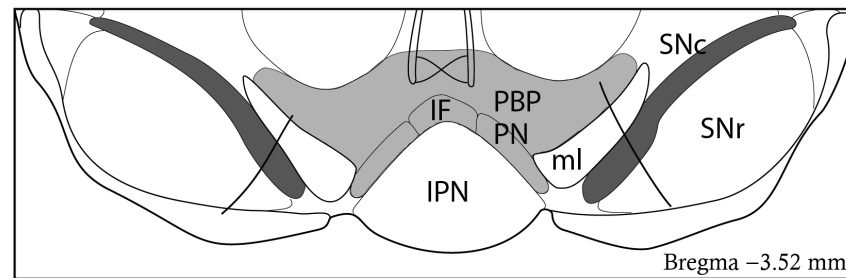
DA übt seine Wirkung durch die Bindung an Membranrezeptoren aus, die zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen gehören. Die fünf DA-Rezeptoren (D1R–D5R) werden aufgrund ihrer biochemischen und pharmakologischen Eigenschaften in zwei Untergruppen aufgeteilt: die D1-Gruppe besteht aus dem D1R und dem D5R, während sich die D2-Gruppe aus dem D2-, D3- und D4R zusammensetzt (Vallone et al., 2000; Neve et al., 2004). Bindung von DA an Rezeptoren der D1-Gruppe löst durch die Aktivierung der  $G\alpha$ -Untereinheit eines heterotrimeren  $G_s/G\alpha_{olf}$ -Proteins eine Steigerung der Aktivität der Adenylatcyclase und somit eine cAMP-abhängige Signalkaskade aus (Zhuang et al., 2000; Neve et al., 2004). Die dadurch aktivierte Proteinkinase A (PKA) reguliert durch Phosphorylierung von zellulären und nukleären Proteinen – unter anderem auch Ionenkanälen – die zelluläre Aktivität. So wird z. B. durch D1R-vermittelte Aktivierung der PKA in striatalen Neuronen die Oberflächenexpression der Glutamatrezeptoren vom AMPA- und NMDA-

Typ erhöht (Snyder et al., 2000; Hallett et al., 2006). Außerdem wird die Leitfähigkeit von L-Typ Calciumkanälen durch Phosphorylierung erhöht, während N- und P-Typ Calciumströme indirekt durch die Aktivierung einer Phosphatase reduziert werden (Missale et al., 1998; Vallone et al., 2000; Neve et al., 2004).

Die hyperpolarisierende Wirkung von D2R wird zum einen durch die Inhibition der Adenylatcyclase durch das Rezeptor-gekoppelte  $G\alpha_i$ -Protein vermittelt. Zum anderen werden durch die direkte Bindung der  $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins einwärtsrektifizierende Kaliumkanäle aktiviert (GIRK: *G-Protein coupled inward rectifying  $K^+$  channels*), was in einer Steigerung des Kaliumausstroms und einer Hyperpolarisation des Membranpotentials resultiert (Lacey, 1993; González-Hernández et al., 2009). Die Bindung von DA an D2R reguliert außerdem einen alternativen Signalweg, der über die Hemmung der auch als Akt bezeichneten Proteinkinase B zu einer gesteigerten Aktivität der Glycogensynthase-Kinasen 3  $\alpha$  und  $\beta$  (GSK3  $\alpha/\beta$ ) führt (Beaulieu et al., 2009). Neben seiner Wirkung auf postsynaptische D2R kann DA über somatodendritisch lokalisierte D2-Autorezeptoren DA Nachbarzellen parakrin inhibieren (Groves et al., 1975; Beckstead et al., 2004; Gantz et al., 2013).

### **1.1.3 Funktionelle Anatomie des dopaminergen Mittelhirnsystems**

Anfang der Sechzigerjahre konnten zum ersten Mal katecholaminerge Neurone mit der Methode der Formaldehyd-Histofluoreszenz im Nagerhirn visualisiert werden (Dahlstroem und Fuxe, 1964). Die Regionen katecholaminerger und serotonerger Neurone wurden A1–A17 genannt, eine Nomenklatur, die besonders bei speziesübergreifenden Vergleichen sehr hilfreich ist (Börklund und Hökfelt, 1984). Die Anzahl von DA Neuronen, die anatomische Organisation des Mittelhirns sowie die Dichte der Projektionen und damit auch die Komplexität des DA Systems nehmen vom Nager, über den Primaten bis hin zum Menschen kontinuierlich zu: während in Nagern die Anzahl TH-positiver Zellen etwa 20.000–30.000 beträgt, steigt sie bei Affen auf 160.000–320.000 an, um im Menschen etwa 400.000–600.000 zu erreichen (Björklund und Dunnett, 2007).



**Abbildung 1.2: Das ventrale Mittelhirn im Coronarschnitt eines Maushirns**

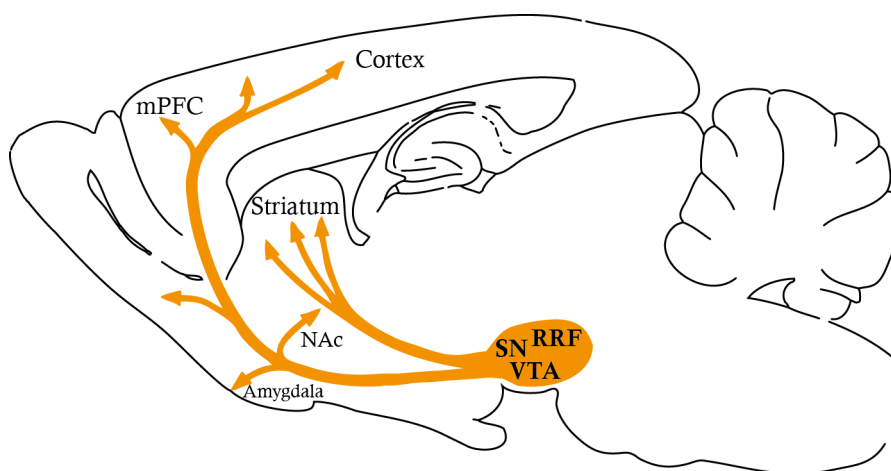
Darstellung des DA Mittelhirnsystems. Nigrostriatale Neurone sind ausschließlich in der Substantia nigra pars compacta (SNc, dunkelgrauer Bereich) lokalisiert. Die VTA (hellgrauer Bereich) besteht aus den Subnuclei interfascicularis (IF), paranigralis (PN) und parabrachialis pigmentosus (PBP). SNr: Substantia nigra pars reticulata, IPN: Ncl. interpeduncularis, ml: medialer Lemniscus (modifiziert nach Paxinos und Franklin, 2007).

Der Großteil der DA Neurone befindet sich im Mittelhirn in der Substantia nigra pars compacta (SNc, A9) und der Area tegmentalis ventralis (VTA, A10), wobei die Regionen anatomisch keine eindeutigen Grenzen aufweisen (siehe Abbildung 1.2). Eine weitere Zellgruppe stellt das retrorubrale Feld (RRF, A8) dar, welches sich dorsal und caudal der SN befindet. DA Neurone finden sich außerdem im olfaktorischen Bulbus sowie im Diencephalon (Björklund und Dunnett, 2007). Die im Mittelhirn lokalisierten Neurone schicken über das mediale Vorderhirnbündel (MFB: *medial forebrain bundle*) Projektionen zu diversen Hirnregionen, welche durch Einsatz von retrograd transportierten Tracersubstanzen in Nagern untersucht wurden (Ikemoto, 2007; Lammel et al., 2008; Wise, 2009).

### 1.1.3.1 Projektionen des dopaminergen Mittelhirnsystems

Die im Mittelhirn lokalisierten DA Neurone werden anhand ihrer drei wichtigsten Projektionsgebiete in das nigrostriatale, das mesolimbische und das mesocorticale System eingeteilt. Nigrostriatale Neurone projizieren in das dorsale Striatum und sind ausschließlich in der SNc lokalisiert. Dabei bilden die axonalen Projektionen der nigrostriatalen Neurone ein stark verzweigtes und dichtes Netzwerk, so dass ein einzelnes SN Neuron eine große Anzahl von striatalen Neuronen beeinflussen kann (Matsuda et al., 2009). Das mesolimbische System

umfasst Neurone mit Projektionen zu den basolateralen Amygdala (BLA) und dem ventralen Striatum, welches aus dem olfaktorischen Tuberkel und dem Nucleus accumbens (NAc) besteht. Der NAc wird weiterhin in eine zentrale Kern- (*core*) und eine lateral und medial davon liegende Mantelregion (*shell*) unterteilt. Der laterale *shell* des NAc (NAc lSh) wird vor allem von Neuronen innerviert, die in der SNc und in rostralen Anteilen des Ncl. parabrachialis pigmentosus (PBP) der VTA lokalisiert sind, während der *core* (NAc C) und der mediale *shell* (NAc mSh) sowie die BLA von Neuronen innerviert werden, die sich im medialen und intermediären PBP sowie in den medialen VTA Nuclei paranigralis (PN) und interfascicularis (IF) befinden (siehe Abbildung 1.2 und Abbildung 1.3). In diesen beiden Nuclei sind außerdem die mesocorticalen Neurone lokalisiert, die in den präfrontalen Cortex (PFC) projizieren (Lammel et al., 2008). Kürzlich wurde eine weitere Subpopulation von DA VTA Neuronen charakterisiert, die selektiv in die lateralen Habenulae projizieren und ähnliche elektrophysiologische Parameter aufweisen, wie die DA mesocorticalen Neurone (Gruber et al., 2007; Stamatakis et al., 2013).



### **Abbildung 1.3: Das DA Mittelhirnsystem mit ausgewählten Projektionsgebieten**

Schematische Darstellung der Projektionen von DA Mittelhirnneuronen am Sagittalschnitt eines Maushirns. DA Neurone, die in der Substantia nigra (SN) pars compacta und im retrorubralen Feld (RRF) lokalisiert sind, projizieren hauptsächlich in das dorsale Striatum und den lateralen *shell* des Nucleus accumbens (NAc). Neurone der ventralen tegmental Area (VTA) innervieren den medialen *shell* des NAc, den medialen präfrontalen Cortex (mPFC) und weitere corticale Areale, sowie die basolateralen Amygdala (BLA) (modifiziert nach Björklund und Dunnett, 2007).

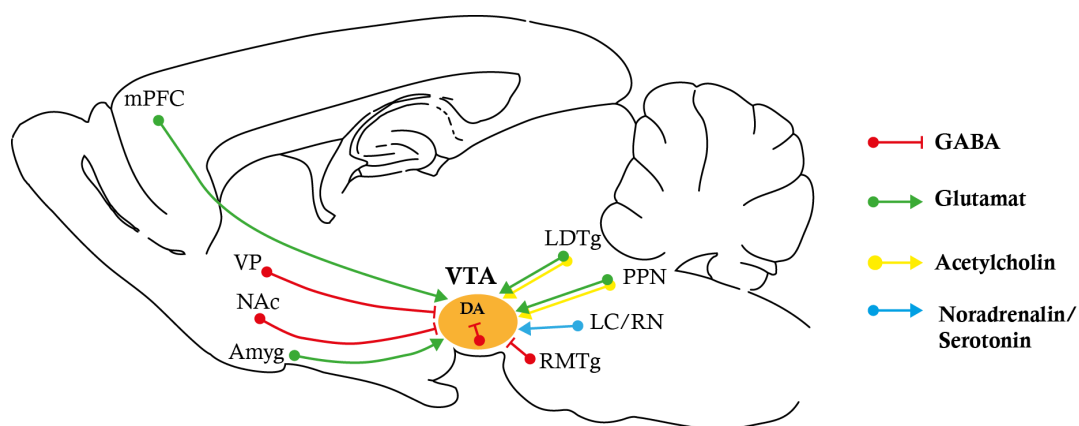


Somit ergeben sich in der VTA keine klaren Grenzen der mesolimbischen und mesocorticalen Subpopulationen, sondern ein Gradient von lateral nach medial, in welchem Neurone mit unterschiedlichen Projektionszielen vermischt vorliegen. Durch Kombination der retrograden Markierung mit elektrophysiologischen und molekularbiologischen Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Neurone des DA Mittelhirnsystems, welches lange als ein homogenes System betrachtet wurde, entsprechend ihrer Projektionsgebiete unterschiedliche elektrophysiologische Eigenschaften aufweisen (Ford et al., 2006; Lammel et al., 2008; Margolis et al., 2008), auf die in Abschnitt 1.2.3 näher eingegangen wird.

### **1.1.3.2 Afferenzen**

DA Neurone erhalten synaptischen Input aus mehreren Regionen (siehe Abbildung 1.4), die zusätzlich zu dem intrinsichen Pacemakermechanismus maßgeblich das Aktivitätsmuster kontrollieren (Morikawa und Paladini, 2011; Watabe-Uchida et al., 2012). VTA Neurone bekommen exzitatorisches glutamaterges Feedback aus dem PFC (Sesack und Pickel, 1992; Geisler et al., 2007), wobei die corticalen Neurone hauptsächlich präfrontal projizierende DA VTA Neurone sowie GABAerge Neurone innervieren, welche in den NAc projizieren (Carr und Sesack, 2000a, b). Zu den subcorticalen Arealen, die glutamaterge Eingänge in die SN und VTA liefern, zählen der subthalamische Nucleus (STN), die pedunculopontinen und laterodorsalen tegmentalen Nuclei (PPN bzw. LDTg), die BLA, der Ncl. striae terminalis (BNST, engl. *Bed nucleus of the stria terminalis*) sowie die Colliculi superiores (CS) (Overton und Clark, 1997). Sowohl im PPN als auch im LDTg sind Neurone lokalisiert, die Acetylcholin als Neurotransmitter benutzen, so dass beide Strukturen zusätzlich zu den glutamatergen auch cholinerge Projektionen in die SN und VTA schicken (Cornwall et al., 1990). DA Neurone der SN werden hauptsächlich vom PPN innerviert, während die VTA Eingänge von beiden Kerngebieten erhält (Omelchenko und Sesack, 2005; Mena-Segovia et al., 2008; Watabe-Uchida et al., 2012), wobei präferentiell mesolimbische VTA Neurone innerviert werden (Omelchenko und Sesack, 2006).

Die GABAerge Inhibition von DA VTA Neuronen wird in Form von negativem Feedback vom NAc und dem ventralen Pallidum (VP) vermittelt (Gerfen, 1985; Bolam und Smith, 1990; Saitoh et al., 2004; Matsuda et al., 2009; Fujiyama et al., 2011; Watabe-Uchida et al., 2012). Außerdem werden DA Neurone durch lokale GABAerge Neurone inhibiert, die in der VTA selbst sowie in der SN pars reticulata (SNr) lokalisiert sind (Tepper et al., 1995; Omelchenko et al., 2009). Der GABAerge rostromediale tegmentale Nucleus (RMTg), eine Region am caudalen Ende der VTA, hat in den letzten Jahren besondere Beachtung erhalten, da dessen GABAerger Einfluss auf die VTA in der Verarbeitung von aversiven Stimuli involviert ist (siehe Abschnitt 1.1.6) (Jhou et al., 2009a; Kaufling et al., 2009; Hong et al., 2011).



### Abbildung 1.4: Afferenzen dopaminergischer VTA Neurone

DA Neurone der VTA erhalten exzitatorische glutamaterge Eingänge (grün) aus dem medialen präfrontalen Cortex (mPFC), der basolateralen Amygdala (BLA), dem laterodorsalen Tegmentum (LDTg) und dem pedunculopontinen Nucleus (PPN). Das LDTg und der PPN schicken außerdem cholinerge Projektionen (gelb) in die VTA. Die GABAerge Inhibition (rot) von DA VTA Neuronen wird von Neuronen des ventralen Pallidums (VP), des Ncl. accumbens (NAc), des rostromedialen tegmentalen Nucleus (RMTg) sowie von GABAergen Neuronen, die in der VTA lokalisiert sind vermittelt. Die noradrenergen und serotonergen Projektionen (blau) aus dem Locus coeruleus (LC) bzw. den Raphe Nuclei (RN) spielen eine modulatorische Rolle (modifiziert nach Morikawa und Paladini, 2011).

DA Mittelhirnneurone erhalten noradrenerge (NA) Innervation aus dem Locus coeruleus und weiteren NA Kernen aus der Medulla oblongata (Paladini und Williams, 2004) sowie serotonerge Eingänge aus den Raphekernen (Vertes, 1991;

White, 1996). Zusätzlich zu den bereits genannten Transmittersystemen, werden DA Neurone von ihren DA Nachbarzellen durch die Ausbildung dendrodendritischer Synapsen beeinflusst (Bayer und Pickel, 1990; Nirenberg et al., 1996; Rice et al., 1997). Außerdem kann DA über die Aktivierung präsynaptischer Rezeptoren die Freisetzung von anderen Neurotransmittern modulieren: die Aktivierung von präsynaptischen D2R inhibiert die Freisetzung von Glutamat und durch Bindung von DA an D1R wird die Exocytose von GABA gefördert (Cameron und Williams, 1993; Koga und Momiyama, 2000). Die funktionelle Rolle der synaptischen Eingänge für die elektrische Aktivität von DA Neuronen wird in Abschnitt 1.2.4 erläutert.

#### **1.1.4 Die Basalganglien und die dopaminerge Modulation der Willkürmotorik**

Das DA Mittelhirnsystem spielt durch seine Stellung im Basalgangliennetzwerk eine wichtige modulatorische Rolle in verschiedenen Vorgängen, von der Steuerung der Willkürmotorik, über die Kontrolle von Motivation und die Beurteilung von Belohnungen bis hin zu höheren kognitiven Funktionen, wie verschiedenen Lernprozessen und der Funktion des Arbeitsgedächtnisses. Die bedeutende Rolle von DA wird unter anderem durch Erkrankungen oder Manipulationen dieses Systems veranschaulicht, z. B. in Form der motorischen Symptome der Parkinson Erkrankung.

Für willkürliche Bewegungsabläufe ist die DA Modulation durch mesostriatale Projektionsneurone im Basalgangliennetzwerk essentiell. Dieses besteht aus mehreren Kerngebieten, durch welche eingehende Informationen aus sensomotorischen und assoziativen Cortexarealen verarbeitet und über den ventralen Thalamus zurück zum Cortex geleitet werden (Abbildung 1.5). Die glutamatergen corticalen Eingänge finden ihren Weg in die Basalganglien über das Striatum, dessen dorsaler Anteil in der Kontrolle von Bewegungsabläufen involviert ist. Zu den Ausgangskernen der Basalganglien gehören das interne Pallidumsegment (GPi) und die SNr (Bolam et al., 2000). Die Transmission der Information wird über zwei getrennte Wege – dem direkten und indirekten Weg – weitergeleitet, die einen gegensätzlichen Einfluss auf das Ausgangssignal der

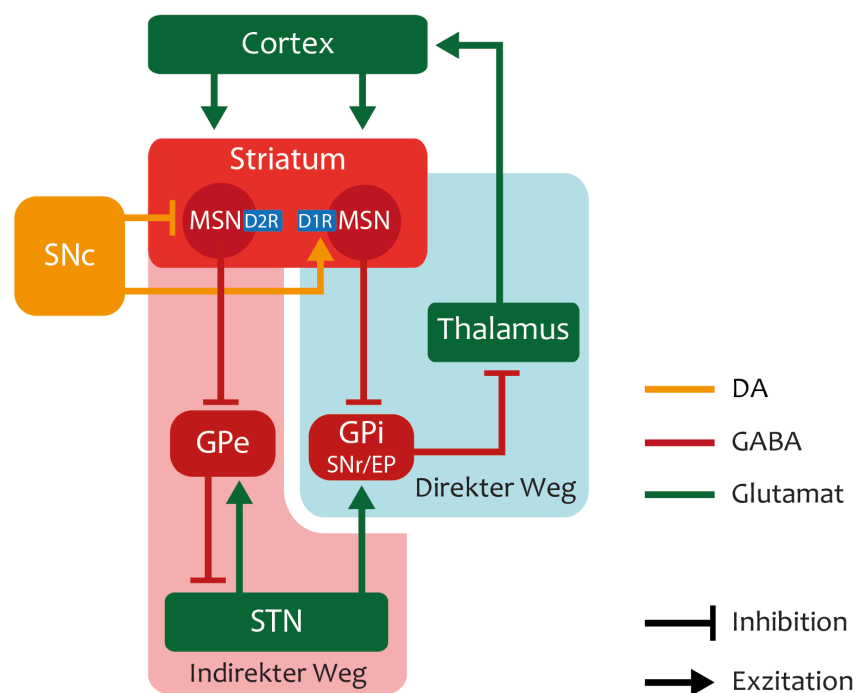
Basalganglien haben. Der direkte Weg führt von den GABAergen striatalen Projektionsneuronen (MSN: *medium spiny neurons*) direkt zu den ebenfalls GABAergen GPi und SNr, die unter Ruhebedingungen eine hohe spontane Aktivität aufweisen. Somit resultiert die Aktivierung der MSN über die Reduktion der Aktivität der Output-Kerne in einer Disinhibition des Thalamus, der dadurch motorische Areale des Cortex aktivieren kann. Dem direkten Weg kann dadurch eine die Motorik fördernde Eigenschaft zugeschrieben werden, während die Motorik durch den indirekten Weg gehemmt wird. Dabei aktivieren corticostriatale Eingänge das GPi durch eine indirekte Verschaltung über das ebenfalls GABAerge externe Pallidumsegment (GPe) und den STN. Die Disinhibition des GABAergen GPe führt dabei zu einer Erhöhung der Aktivität des STN, welcher durch seine glutamatergen Eingänge das GPi aktiviert, was wiederum zu einer Inhibition der thalamocorticalen Projektion führt. Da die striatalen Neurone unter Ruhebedingungen inaktiv sind, die GABAergen Output-Kerne sowie der STN allerdings eine hohe Spontanaktivität aufweisen, ist das Ausgangssignal der Basalganglien in Ruhe generell motorikhemmend. Nach dem klassischen Basalganglienmodell kann erst durch Überwiegen des direkten Wegs durch die Aktivierung der MSN über corticale Eingänge eine Bewegungsinitiation ermöglicht werden (Bolam et al., 2000; Gerfen und Surmeier, 2011). Eine neuere Studie zeigt allerdings, dass während der Initiation einer Bewegung sowohl MSN des direkten als auch des indirekten Wegs aktiviert werden (Cui et al., 2013), so dass in einem neuen Basalganglienmodell die Aktivierung des direkten Wegs das gewählte Motorprogramm fördert, während die gleichzeitige Aktivierung des indirekten Weges die Unterdrückung von konkurrierenden Motorprogrammen gewährleistet (Cui et al., 2013).

Die nigrostriatale Projektion spielt in diesem Netzwerk eine modulatorische Rolle, die sich durch die unterschiedliche Dopaminrezeptorbesetzung der MSN erklären lässt: MSN des direkten Wegs exprimieren D1R, während MSN des indirekten Wegs D2R besitzen (Gerfen et al., 1990). So kann DA durch Bindung an D1R die MSN des direkten Weges aktivieren, während über D2R die MSN des indirekten Weges gehemmt werden. Dabei wird eine Aktivierung von DA SN Neuronen sowohl für ein Start- als auch für ein Stop-Signal von motorischen Abläufen benötigt (Jin und Costa, 2010). Für die Inhibition der MSN des

indirekten Weges durch die Aktivierung der hochaffinen D2R reicht die basale DA-Konzentration aus, welche durch die niedrigfrequente (etwa 4 Hz), tonische Aktivität von DA Neuronen gewährleistet wird. Für die Aktivierung der MSN des direkten Weges über D1-Rezeptoren ist allerdings eine transiente Erhöhung der Entladungsfrequenz (ca. 20 Hz) von DA Neuronen erforderlich, die in kleinen Paketen, den sog. *bursts* auftritt und in einer supralinearen Erhöhung der DA-Konzentration resultiert (Gonon, 1988; Frank, 2005; Bromberg-Martin et al., 2010a; Dreyer et al., 2010). Aktuellen Studien zufolge wird die DA-Freisetzung im Striatum außerdem maßgeblich durch die synchronisierte Aktivität von striatalen cholinergen Interneuronen beeinflusst, indem die Bindung von Acetylcholin an präsynaptisch lokalisierten nikotinergen Acetylcholinrezeptoren eine von der intrinsischen Aktivität der DA Neurone unabhängige Depolarisation hervorruft, die zur Transmitterausschüttung führt (Threlfell et al., 2012). Die Aktivität der cholinergen Interneurone wird dabei durch thalamische Afferenzen kontrolliert (Ding et al., 2010).

Desweiteren existieren zusätzliche, z. T. reziproke Verbindungen zwischen den einzelnen Basalganglienkernen, auf die hier nicht weiter eingegangen wird. Das hier dargestellte, stark vereinfachte Schema des Basalgangliennetzwerkes reicht allerdings aus, um die Rolle von DA für die motorische Kontrolle zu erklären (Gerfen und Surmeier, 2011).

Die bedeutende Rolle von DA im Basalgangliennetzwerk kann besonders anhand der Symptomatik der Parkinson Erkrankung veranschaulicht werden, welche durch eine selektive Degeneration der nigrostriatalen Projektion gekennzeichnet ist. Durch die stark reduzierte DA-Freisetzung im Striatum bleibt sowohl die Aktivierung der D1-haltigen MSN als auch die D2-vermittelte Inhibition der MSN des indirekten Weges aus und der dadurch resultierende vorwiegend inhibitorische Basalganglienoutput führt bei Parkinsonpatienten zur Verlangsamung oder auch zum Ausbleiben von Willkürbewegungen (Dauer und Przedborski, 2003; Frank, 2005; Galvan und Wichmann, 2008).



**Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des Basalgangliennetzwerks**

Die Aktivierung des direkten Weges, d.h. der monosynaptischen Verbindung der striatalen Projektionsneurone (MSN) mit dem tonisch aktiven internen Pallidumsegment (GPi) und der Substantia nigra pars reticulata (SNr)/entopedunkulären Nucleus (EP) führt durch die Disinhibition des Thalamus zur Aktivierung von motorischen Cortexarealen. Der indirekte Weg hat eine motorikhemmende Wirkung, die durch die Disinhibition des Ncl. subthalamicus (STN) zustande kommt. Der STN aktiviert die inhibitorischen Ausgangskerne (GPi, SNr/EP) so dass die exzitatorische thalamocorticale Verbindung inhibiert wird. Die DA Neurone der Substantia nigra pars compacta (SNc) fördern über die Aktivierung der D1R-haltigen MSN den direkten Weg und hemmen über inhibitorische D2R die MSN des indirekten Weges. Somit kann der SNc eine motorikfördernde Wirkung zugeschrieben werden (modifiziert nach Bolam et al., 2000).

### 1.1.5 Die Rolle des präfrontalen DA für das Arbeitsgedächtnis

Über die mesocorticale Projektion sind DA VTA Neurone maßgeblich in höheren kognitiven Prozessen, wie z. B. dem Arbeitsgedächtnis involviert. Diese Fähigkeit erlaubt dem Gehirn Inhalte kurzfristig bereitzuhalten, zu verarbeiten und sie zur Erstellung von geeigneten Handlungsplänen einzusetzen (Floresco und Magyar, 2006; Surmeier, 2007). Die wichtige modulatorische Rolle von DA in diesem Kontext wurde schon Ende der Siebzigerjahre erkannt, indem in einem Primatenversuch gezeigt werden konnte, dass eine Depletion von DA im PFC

eine ähnlich schwerwiegende Beeinträchtigung der Funktion des Arbeitsgedächtnisses zur Folge hat, wie eine komplette Entfernung des Frontallappens (Brozoski et al., 1979). Durch eine Reihe von Studien mit DA Rezeptor-Antagonisten wurde festgestellt, dass DA im PFC durch Aktivierung v.a. von D1R die aufgabenbezogene Aktivität von corticalen Pyramidenzellen steigert und stabilisiert (Sawaguchi und Goldman-Rakic, 1991; Williams und Goldman-Rakic, 1995). Der mediale PFC (mPFC) von Nagern stellt das funktionelle Homolog des dorsolateralen PFC von Primaten dar und es konnte in Ratten durch Läsionsstudien gezeigt werden, dass DA Transmission in dieser Region für das initiale Lernen von Gedächtnisaufgaben notwendig ist (Bubser und Schmidt, 1990). Die Bedeutung von D1R für das Arbeitsgedächtnis konnte auch in Mäusen demonstriert werden, in welchen sich aufgrund einer striatalen Überexpression von D2R eine Beeinträchtigung der präfrontalen D1R-Aktivität manifestierte (Kellendonk et al., 2006). Während mehrere Studien die essentielle Rolle der D1R-Aktivierung im PFC bestätigten, wurde parallel festgestellt, dass eine Überstimulation dieser Rezeptoren ebenfalls zu einer Funktionsverminderung des Arbeitsgedächtnis führt (Kesner et al., 1981; Murphy et al., 1996; Zahrt et al., 1997). Daher entstand die Hypothese, dass eine optimale präfrontale DA-Konzentration für die jeweils benötigte Arbeitsgedächtnisleistung erforderlich ist und eine Abweichung in beide Richtungen zu einer Beeinträchtigung führt. Somit nimmt die Beziehung der Leistung des Arbeitsgedächtnisses und der DA-Konzentration mit der resultierenden D1R-Aktivierung im PFC die Form eine invertierten U-Kurve an (Williams und Goldman-Rakic, 1995). Zu beachten ist hier jedoch, dass diese Kurve nicht auf alle DA-abhängige kognitive Leistungen angewandt werden kann, sondern dass zu Beschreibung der Rolle des präfrontalen DA für Prozesse wie dem sog. *set shifting* (dem Ersetzen einer angewandten Strategie durch eine neue) oder für auf Kosten/Nutzen-basierende Entscheidungen weitere, kompliziertere Funktionen eingesetzt werden müssen (Floresco, 2013).

### 1.1.6 Das mesolimbische System in Belohnung und Aversion

Zusätzlich zur Kontrolle der Willkürmotorik und der kognitiven Rolle im Kontext des Arbeitsgedächtnisses, die durch die DA Projektion zum dorsalen Striatum bzw. durch mesocorticale DA Projektionsneurone vermittelt wird, hat das mesolimbische DA System eine wichtige Funktion in der Verarbeitung von Belohnungen und den damit einhergehenden zielgerichteten Lernvorgängen. DA Neurone werden in diesem Zusammenhang nicht nur direkt durch die hedonischen, sondern eher durch die prädiktiven, motivierenden und aufmerksamkeitserregenden Eigenschaften einer Belohnung aktiviert (Salamone, 2007; Berridge und Kringelbach, 2008). Somit kann DA die Verarbeitung von bereits erhaltenen und die Vorhersage von zukünftigen Belohnungen modulieren, sodass zielgerichtete Verhaltensreaktionen auf externe Reize gewährleistet werden können (Sesack und Grace, 2010).

Wolfram Schultz beobachtete zum ersten Mal in einem Primatenversuch eine kurze Salve hochfrequenter Aktionspotentiale als Reaktion auf einen Stimulus, der mit dem Erhalten einer Belohnung assoziiert war (Schultz, 1986). In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die gesteigerte Aktivität von DA Neuronen zu Beginn des Trainings zeitlich mit der Belohnungsgabe koinzidierte, die Frequenzerhöhung allerdings nach längerer Konditionierung direkt nach der Belohnungsankündigung auftrat und nicht mehr bei Gabe der Belohnung (Schultz et al., 1993; Hollerman und Schultz, 1998; Cohen et al., 2012). Es wurde postuliert, dass im DA-Signal der sog. *reward prediction error* (RPE) dargestellt wird, der den Unterschied einer erwarteten zu der tatsächlich erhaltenen Belohnung signalisiert. Wird eine unerwartete Belohnung erhalten oder ist eine vorhergesehene Belohnung größer als erwartet, wird ein positiver RPE signalisiert, was mit einer erhöhten Frequenz der DA Neurone einhergeht, so dass die Paarung zwischen dem voraussagenden Stimulus und der Belohnung verstärkt wird. Dabei spiegelt die Frequenz der DA Neurone die Größe der Belohnung (in Relation zu früheren Belohnungen) wider (Bayer und Glimcher, 2005; Tobler et al., 2005). Entspricht die Belohnung genau den Erwartungen, bleibt die Frequenz unverändert und man spricht von einem „*zero prediction error*“. Die Aktivität von DA Neuronen wird außerdem entsprechend beeinflusst, wenn ein Stimulus das Ausbleiben einer Belohnung signalisiert, d.h. als sog. Inhibitor



fungiert, so dass bei Präsentation eines solchen Inhibitors eine Pause in der DA Aktivität auftritt (Tobler et al., 2003). Fällt eine angekündigte Belohnung aus oder ist kleiner als erwartet, werden DA Neurone phasisch inhibiert, was einen negativen RPE signalisiert (Schultz, 1998; Cohen et al., 2012). Dies resultiert in der sog. Extinktion, d.h. einem graduell etablierten Ausbleiben der Reaktion auf einen belohnungsassoziierten Stimulus, wenn die Stimulus-Belohnungs-Assoziation nicht mehr gegeben ist (Schultz et al., 1997; Schultz, 1998).

Durch optogenetische Stimulation von DA Neuronen konnte bestätigt werden, dass deren Aktivierung als Verstärker bei der operanten Konditionierung fungiert (Kim et al., 2012) und für eine sog. konditionierte Ortpräferenz (engl. *conditioned place preference* (CPP)) ausreichend ist (Tsai et al., 2009). Während die Korrelation der Frequenz von DA Neuronen mit dem RPE schon seit längerem bekannt ist und intensiv untersucht wurde, konnte erst vor kurzem ein kausaler Link zwischen RPE, der Aktivierung von DA Neuronen und dem korrespondierenden Lernprozess demonstriert werden (Steinberg et al., 2013). In einem Verhaltensparadigma, in welchem belohnungsassoziiertes Lernen blockiert wurde, konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von DA Neuronen während der Belohnungsgabe ausreichend ist, um den Lernprozess wiederherzustellen. Weiterhin konnte durch optogenetische Aktivierung von DA Neuronen die Extinktion inhibiert werden, die unter Kontrollbedingungen als Folge des Ausbleibens einer angekündigten Belohnung manifestiert wird. Somit wurde bestätigt, dass eine Stimulation der DA Neurone beim Ausbleiben der Belohnung die Extinktion des belohnungsassoziierten Verhaltens verlangsamt (Steinberg et al., 2013).

#### **1.1.6.1 Dopaminerge Neurone kodieren nicht ausschließlich Belohnung**

In den letzten Jahren musste die Theorie, dass das DA Mittelhirnsystem ausschließlich in der Verarbeitung von Belohnungen involviert ist, überdacht werden, da DA Neurone identifiziert wurden, die auf aversive und noxische Reize mit einer Frequenzsteigerung reagierten (Brischoux et al., 2009; Matsumoto und Hikosaka, 2009; Wang und Tsien, 2011). Daraufhin wurde eine neue Hypothese für die Rolle dieser Neurone vorgeschlagen: eine Gruppe von DA Neuronen folgt der klassischen RPE Kodierung, indem sie durch positive

Ereignisse aktiviert und durch negative Ereignissen inhibiert werden und somit den relativen Wert eines Ereignisses signalisieren. Die zweite Gruppe wird aus Neuronen gebildet, die sowohl durch belohnende als auch durch aversive Stimuli erregt werden und somit die Salienz des Ereignisses signalisieren. Weiterhin vermitteln beide Neuronenpopulationen ein Warnsignal, welches durch unerwartete sensorische Stimuli von potentiell hoher Bedeutung ausgelöst wird (Bromberg-Martin et al., 2010b). Die Handlungsmotivation wird so durch die Verarbeitung der Signale für Wert und Relevanz des Stimulus sowie dem alarmierenden Signal kontrolliert. Ob es sich bei diesen in Primaten beobachteten funktionellen Gruppen um spezifische DA Projektionsneurone handelt ist noch unbekannt, im Nager fanden sich jedoch erste Hinweise dafür. Es konnte gezeigt werden, dass DA Neurone nach belohnenden und aversiven Reizen subpopulationsspezifische Plastizität der exzitatorischen Synapsen aufweisen (Lammel et al., 2011). Dabei zeigte sich die Plastizität von DA Neuronen, die in den NAc mSh projizieren nach einem belohnenden Stimulus erhöht, während dies in mesocorticalen Neuronen nach einem aversiven Ereignis detektiert wurde. Die mesolimbische Projektion in den NAc lSh zeigte hingegen eine schwache Reaktion sowohl auf den belohnenden, als auch auf den aversiven Stimulus (Lammel et al., 2011).

In aktuellen Arbeiten von Christopher Fiorillo und Kollegen wurden in Primaten diverse Reaktionen von DA Neuronen auf aversive, neutrale und belohnende Stimuli beobachtet, dabei wurden allerdings keine Hinweise auf distinkte Subpopulationen gefunden (Fiorillo et al., 2013a; Fiorillo et al., 2013b). Außerdem konnten, im Gegensatz zu der Arbeit von Matsumoto und Hikosaka, keine DA Neurone identifiziert werden, die durch aversive Reize aktiviert wurden (Matsumoto und Hikosaka, 2009; Fiorillo et al., 2013b). Eine Erklärung dafür fanden die Autoren im zeitlichen Verlauf der Reaktion von DA Neuronen auf die applizierten Stimuli. Die temporale Analyse der Frequenzänderung ergab, dass Stimuli mit einer hohen Intensität sowie aversive Stimuli eine triphasische Reaktion hervorrufen. Die initiale Aktivitätssteigerung reflektiert die Intensität des Stimulus. Laut Fiorillo und Kollegen handelt es sich bei den in früheren Studien beschriebenen DA Neuronen, die auf aversive Stimuli mit einer Erhöhung ihrer Aktivität reagieren, lediglich um eine Fehldeutung dieser initialen

Frequenzsteigerung, die auch bei neutralen Stimuli mit einer hohen Intensität auftritt (Fiorillo et al., 2013a; Fiorillo et al., 2013b). Die Aktivität in der zweiten Phase spiegelt die Wertigkeit des Stimulus wider, so dass belohnende Stimuli eine Steigerung und aversive oder neutrale Stimuli eine Verminderung der Aktivität hervorrufen. Die dritte, in dieser Arbeit zum ersten mal beschriebene Phase, manifestierte sich in Form einer Steigerung der Aktivität nach einer starken Inhibition bzw. einer Inhibition nach einer starken Aktivierung (Fiorillo et al., 2013a). In einer dritten Arbeit wurde die Hypothese, dass Aversion und Belohnung gegensätzliche Modalitäten in einer Dimension darstellen und durch ein einzelnes Neuron – in Form von Steigerung bzw. Inhibition dessen Aktivität – repräsentiert werden können, in Frage gestellt (Fiorillo, 2013). Es wird dagegen vorgeschlagen, dass Aversion und Belohnung durch zwei unterschiedliche Dimensionen repräsentiert werden, so dass DA Neurone nicht direkt durch die aversive Natur eines Reizes inhibiert werden, sondern durch Hinweise, die die Abwesenheit der Belohnung nahe legen, welche mit der Präsentation eines aversiven Stimulus einhergeht (Fiorillo, 2013).

Zur Kodierung von RPE müssen DA Neurone eine Vielzahl von Informationen aus verschiedenen Hirnstrukturen verarbeiten. Dazu gehören sensorische Signale in Form der prädiktiven Stimuli, Informationen zur Erwartungslage und letztlich Information zum subjektiven Wert der erhaltenen oder ausgebliebenen Belohnung. Der orbitofrontale und präfrontale Cortex liefern Informationen zur Belohnungserwartung (Takahashi et al., 2011; Jo et al., 2013), während stimulus-assoziierte sensorische Informationen aus dem PPTg übermittelt werden (Pan und Hyland, 2005). Außerdem beeinflussen in diesem Zusammenhang die lateralen Habenulae (LHb) die Aktivität von DA Neuronen. Es konnte gezeigt werden, dass die elektrische Stimulation der LHb von Ratten eine Inhibition von DA SN und VTA Neuronen verursacht (Christoph et al., 1986; Ji und Shepard, 2007), eine Beobachtung, die später auch in Primaten bestätigt wurde (Matsumoto und Hikosaka, 2007). Es konnte weiterhin demonstriert werden, dass nach einem Stimulus, der das Ausbleiben einer Belohnung signalisiert, die Aktivität der LHb gesteigert und die von DA Mittelhirnneuronen reduziert wird (Matsumoto und Hikosaka, 2007). Da die LHb-Projektion allerdings glutamaterg ist (Omelchenko et al., 2009; Brinschwitz et al., 2010), ist für deren inhibitorische

Wirkung auf die DA Neurone eine di- oder polysynaptische Verbindung erforderlich. Als Umschaltstation wurde sowohl in Nagern als auch in Primaten der RMTg identifiziert, eine GABAerge Struktur am caudalen Ende der VTA (Perrotti et al., 2005; Jhou et al., 2009a; Jhou et al., 2009b; Kaufling et al., 2009). Der RMTg erhält eine starke Innervation aus den LHb und schickt seinerseits dichte Projektionen in die SN und VTA, insbesondere zu DA Neuronen, die in den *core* und medialen *shell* des NAc projizieren (Jhou et al., 2009b; Kaufling et al., 2010; Balcita-Pedicino et al., 2011). Erhaltene Belohnungen und prädiktive Stimuli korrelieren mit einer verminderten Aktivität des RMTg, während das Ausbleiben einer Belohnung, ein aversiver Reiz oder die entsprechenden voraussagenden Signale zu einer Exzitation führen (Jhou et al., 2009a; Hong et al., 2011). Die LHb erhalten exzitatorischen Input aus dem GPi und werden von Neuronen des ventralen Pallidums inhibiert (Hong und Hikosaka, 2008; Hong und Hikosaka, 2013).

Im letzten Jahr wurden zum einen die beschriebenen korrelativen Befunde in Mäusen bestätigt und zum anderen durch Stimulation der LHb die kausale Verbindung zum Verhalten hergestellt: die optogenetische Aktivierung der LHb resultierte in den verschiedenen Verhaltensparadigmata sowohl in einer passiven, als auch in einer konditionierten Vermeidungsreaktion (Lammel et al., 2012; Stamatakis und Stuber, 2012). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der LHb aversiv ist, da sich die Tiere aktiv gegen die LHb-Stimulation wehrten, wenn sie durch einen *nose-poke* die Stimulation unterbrechen konnten (Stamatakis und Stuber, 2012). Durch Kombination der optogenetischen Aktivierung der synaptischen Eingänge mit retrogradem *Tracing* konnte außerdem gezeigt werden, dass die glutamaterge LHb-Projektion zum einen GABAerge RMTg-Neurone aktivieren und somit indirekt DA Neurone inhibieren kann und zum anderen direkt mesocortical projizierende DA Neurone stimuliert (Lammel et al., 2012). LHb Neurone, die den RMTg innervieren, sind dabei hauptsächlich in lateralen Bereichen der LHb zu finden, während die Projektionen zur VTA eher medialen Anteilen der LHb entstammen (Gonçalves et al., 2012).

## 1.2 Elektrophysiologische Eigenschaften von DA Mittelhirnneuronen

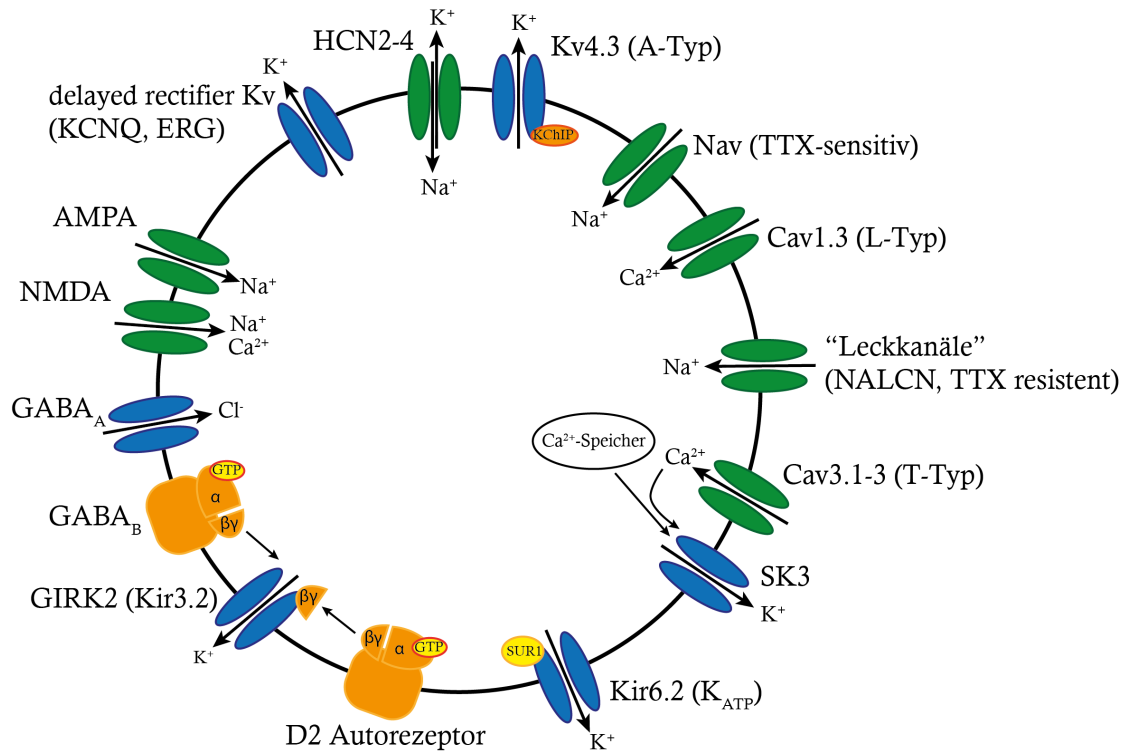
DA Neurone besitzen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* charakteristische elektrophysiologische Eigenschaften, die sie von anderen Neuronen unterscheiden (Shi, 2009). Bereits Anfang der Siebzigerjahre wurde festgestellt, dass sie im anästhesierten Tier eine basale spontane elektrische Aktivität mit einer Frequenz von 1–8 Hz aufweisen (Bunney et al., 1973). In diesen Messungen traten die Aktionspotentiale (AP) außerdem häufig in kleinen Paketen von 2–12 Entladungen mit Frequenzen von 8–20 Hz auf, die sog. *bursts* (Grace und Bunney, 1984b, a). *In vitro* werden spontane *bursts* zwar nicht beobachtet, die intrinsische Einzel-AP-Aktivität im Bereich von 0,5–10 Hz ist jedoch trotz Blockade der synaptischen Eingänge zu beobachten (Neuhoff et al., 2002; Margolis et al., 2006; Lammel et al., 2008). Dies deutet auf einen intrinsischen Schrittmachermechanismus hin (Grace und Onn, 1989), der durch das Zusammenspiel einer Vielzahl von Ionenkanälen gewährleistet wird und *in vivo* zusätzlich durch synaptische Ereignisse moduliert werden kann.

### 1.2.1 Mechanismen zur Generierung und Kontrolle der Spontanaktivität

Die Spontanfrequenz von DA Mittelhirnneuronen *in vitro* liegt im Bereich von 0,5–10 Hz (Liss et al., 2005; Margolis et al., 2006; Lammel et al., 2008). Diesem sog. *pacemaker* liegt ein unterschwelliges langsames oszillatorisches Potential (SOP: *slow oscillatory potential*) zugrunde (Nedergaard et al., 1993), so dass durch die regelmäßige Depolarisation des Membranpotentials die Schwelle für die Entstehung eines Aktionspotentials, die am Soma bei etwa –30 mV liegt, erreicht wird (Margolis et al., 2006; Lammel et al., 2008). In der Generierung der Oszillation des Membranpotentials in DA SN Neuronen sind sowohl spannungsgesteuerte Natrium- als auch Calciumkanäle ( $\text{Na}_v$  bzw.  $\text{Ca}_v$ ) involviert, wobei zur relativen Beteiligung der beiden Ströme in mehreren Studien unterschiedliche Ergebnisse vorliegen. Während L-Typ Calciumkanäle ( $\text{Ca}_v1.3$ ) in einigen Studien als unabdingbar für die Spontanaktivität von DA SN

identifiziert wurden (Nedergaard et al., 1993; Mercuri et al., 1994; Chan et al., 2007; Puopolo et al., 2007; Putzier et al., 2009), haben Guzman und Kollegen gezeigt, dass trotz Blockade dieser Kanäle ein robuster *pacemaker* bestehen bleibt, da die oszillatorische Depolarisation durch ein interaktives Netzwerk anderer Kanäle, u.a. TTX-sensitiver  $\text{Na}_v$ -Kanäle gewährleistet wird (Guzman et al., 2009). Drion und Kollegen konnten 2011 diese gegensätzlichen Ergebnisse durch den Einsatz eines theoretischen Modells erklären, in welchem eine kooperative Beteiligung von Natrium- und Calciumkanälen gezeigt werden konnte, ein Befund, der auch experimentell bestätigt wurde. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass die relative Beteiligung von Neuron zu Neuron variieren kann (Drion et al., 2011).

In DA VTA Neuronen hingegen ist die Ausbildung des oszillatorischen Potentials ausschließlich von der Aktivierung von Natriumkanälen abhängig. Dabei spielt neben den spannungsgesteuerten Kanälen eine TTX-resistente Hintergrundleitfähigkeit für Natriumionen (NALCN; *Na<sup>+</sup> leak channel*) eine entscheidende Rolle für die Pacemaker-Aktivität (Lu et al., 2009; Khaliq und Bean, 2010). Auch DA SN Neurone von Tieren im früh postnatalen Alter (<21 Tage) weisen einen VTA-ähnlichen Calcium-unabhängigen Pacemaker-Mechanismus auf (Chan et al., 2007). In diesen juvenilen DA SN Neuronen sind zusätzlich durch Hyperpolarisation aktivierte, nicht selektive Kationenkanäle (HCN: *hyperpolarisation-activated, cyclic nucleotide-gated, non-selective cation channels*) an der Ausbildung des SOP beteiligt (Chan et al., 2007). Da diese Kanäle allerdings in DA VTA Neuronen, wenn überhaupt, nur eine geringe Expression aufweisen (siehe Abschnitt 1.2.3), spielen sie für die Kontrolle der Pacemaker-Aktivität eine untergeordnete Rolle (Neuhoff et al., 2002; Ford et al., 2006; Margolis et al., 2006; Lammel et al., 2008). Die Frequenz der Spontanaktivität wird in DA SN Neuronen maßgeblich durch den A-Strom kontrolliert, auf dessen Eigenschaften und Funktion für DA Neurone im Detail in Abschnitt 1.3.3 eingegangen wird.



**Abbildung 1.6: Schematische Darstellung ausgewählter Ionenkanäle und Neurotransmitterrezeptoren von DA Neuronen**

Die elektrische Aktivität von DA Neuronen wird durch das Zusammenspiel der exprimierten Ionenkanäle und der synaptischen Eingänge kontrolliert (modifiziert nach Liss und Roper, 2008).

### 1.2.2 Aktionspotentialparameter und die beteiligten Ionenkanäle

Wird im Laufe der spontanen Depolarisation der Schwellenwert für die Entstehung eines Aktionspotentials erreicht, werden neben TTX-sensitiven  $Na_V$ -Kanälen auch  $Ca_V$ -Kanäle aktiviert, was im schnellen Aufstich des Aktionspotentials resultiert. Bei den  $Ca_V$ -Kanälen handelt es sich um Kanäle mit  $Ca_V1.2$ - (L-Typ),  $Ca_V2.1$ - (N-Typ) und  $Ca_V2.2$ - (P/Q-Typ) Untereinheiten (Nedergaard et al., 1993; Puopolo et al., 2007). Nach Erreichen des maximalen Depolarisationspotentials (+30–40 mV) wird die Repolarisation eingeleitet, was zum einen durch die Inaktivierung der  $Na_V$ - und  $Ca_V$ -Kanäle und zum anderen durch eine Erhöhung der Kaliumleitfähigkeit gewährleistet wird. Letzteres wird durch die Aktivierung von verzögert aktivierten, sog. *delayed rectifier*  $K_V$ -Kanälen realisiert (Silva et al., 1990; Ishiwa et al., 2008), wobei für DA Neurone noch unbekannt ist, um welche  $K_V$ -Untereinheiten es sich dabei handelt. Dem

Aktionspotential folgt je nach Subpopulation eine mehr oder weniger prominente Nachhyperpolarisation (AHP: *afterhyperpolarisation*), welche in DA SN Neuronen durch das Öffnen von Calcium-aktivierten Kaliumkanälen (SK: *small conductance, calcium-activated K<sup>+</sup>-channels*) getragen wird, die durch die erhöhte Calciumkonzentration während des Aktionspotentials aktiviert werden (Lammel, 2008). SK-Kanäle können neben dem Calciuminflux durch T-Typ Ca<sub>v</sub>-Kanäle und ligandengesteuerte ionotrope Rezeptoren wie z. B. nikotinerge Acetylcholin- und NMDA-Rezeptoren, auch durch Calciumionen aktiviert werden, die aus dem endoplasmatischen Reticulum freigesetzt werden (Adelman et al., 2012). An der Nachhyperpolarisation sind außerdem *delayed rectifier* K<sub>v</sub>- sowie auch KCNQ-Kanäle (K<sub>v</sub>7.x) beteiligt (Koyama und Appel, 2006a; Kuznetsova et al., 2010). SK-Kanäle sind in DA SN Neuronen außerdem für die Regularität des Pacemakers zuständig (Wolfart et al., 2001), während spannungsgesteuerte A-Typ Kaliumströme (siehe Abschnitt 1.3) die Entladungsfrequenz kontrollieren (Liss et al., 2001; Khaliq und Bean, 2008). Die Dauer des Aktionspotentials, die an der Schwelle Werte zwischen 2 und 4 ms annimmt, sowie die darauffolgende Nachhyperpolarisation variieren in den verschiedenen DA Subpopulationen (siehe Abschnitt 1.2.3) (Margolis et al., 2006; Lammel et al., 2008).

Die spontanen Aktionspotentiale entstehen nach Erreichen der Schwelle am Initiationssegment (IS) des Axons, welches seinen Ursprung oftmals nicht am Soma, sondern an einem der Hauptdendriten hat (Grace und Bunney, 1983b; Hausser et al., 1995). Die IS-Aktionspotentiale propagieren zusätzlich zur orthodromen Weiterleitung auch rückwärts zum somatodendritischen Kompartiment und lösen dort ein dendritisches Aktionspotential aus (Grace und Bunney, 1983b; Hausser et al., 1995). Dadurch kann zusätzlich zur synaptischen Endigung auch somatodendritisch eine calciumabhängige DA-Exocytose erfolgen (Rice et al., 1997; Gentet und Williams, 2007; Ford et al., 2010). IS-Aktionspotentiale haben eine niedrigere Schwelle sowie eine geringere Dauer und Amplitude als somatodendritische Aktionspotentiale (Grace und Bunney, 1983b, a; Hausser et al., 1995). Die Amplitude der Aktionspotentiale sowie die Erregbarkeit der DA Neurone wird dabei maßgeblich durch A-Typ Kaliumströme reguliert (Nedergaard, 1999).



### 1.2.3 Differentielle elektrophysiologische Eigenschaften DA Subpopulationen *in vitro*

Die verschiedenen DA Subpopulationen unterscheiden sich je nach Projektionsgebiet in mehreren Parametern erheblich voneinander (Ford et al., 2006; Margolis et al., 2006; Lammel et al., 2008; Margolis et al., 2008). DA Neurone wurden lange durch die Anwesenheit des  $I_h$ -Stroms identifiziert (Shi, 2009). Dieser wird durch HCN-Kanäle vermittelt (siehe Abschnitt 1.2.1) und wird bei Hyperpolarisation des Membranpotentials aktiviert, was in einer charakteristischen Senkung, dem sog. *sag* im Potentialverlauf resultiert. Während nigrostriatale Neurone, sowie Neurone, die in den NAc *ISh* projizieren, einen prominenten *sag* aufweisen, ist dessen Amplitude in den DA Neuronen, die in den *core* und medialen *shell* des NAc sowie die BLA projizieren, erheblich geringer und bei mesocorticalen Projektionsneuronen fast komplett abwesend (Margolis et al., 2006; Lammel et al., 2008; Zhang et al., 2010). Dies lässt sich durch deren geringere Expression von HCN-Kanälen erklären (Neuhoff et al., 2002). Die mesocorticalen DA Neurone zeichnen sich außerdem durch eine geringe DAT-Expression sowie die Abwesenheit von GIRK-gekoppelten D2-Autorezeptoren aus (Lammel et al., 2008).

Eine weitere charakteristische Eigenschaft von DA VTA Neuronen im Zusammenhang mit einer Hyperpolarisation ist ihre verzögerte Rückkehr zur Spontanaktivität nach einer Inhibition. Mesolimbische und mesocorticale Neurone zeigen in der Repolarisationsphase eine 2–3 s lange Verzögerung zum nächsten Aktionspotential, die als *rebound delay* bezeichnet wird (Neuhoff et al., 2002; Lammel et al., 2008). Diese Latenz wird durch die Aktivierung von A-Typ Kaliumkanälen hervorgerufen, die somit ebenfalls an der Diversität des DA Mittelhirnsystems beteiligt sind (Liss et al., 2002; Krabbe, 2008; Lammel, 2008). Die differentiellen Eigenschaften dieser Kanäle in den DA Subpopulationen stehen im Fokus dieser Arbeit und werden in Abschnitt 1.3.3 detailliert beschrieben.

Der höhere Membranwiderstand von DA VTA Neuronen im Vergleich zu DA SN Neuronen resultiert außerdem in größeren Potentialantworten bei vergleichbaren Strominjektionen (Lammel et al., 2008). Diese intrinsische passive

Membraneigenschaft kann zu einem größeren Einfluss von synaptischen Strömen auf die elektrische Aktivität von DA VTA Neuronen führen.

Während die Aktionspotentiale der mesostriatalen Neurone, sowie DA Neurone, die in den NAc lSh projizieren, eine deutliche Nachhyperpolarisation aufweisen, fällt diese in mesocorticalen und mesolimbischen (in den NAc C und NAc mSh projizierenden) DA Neuronen wesentlich geringer aus. Außerdem haben mesocorticale und mesolimbische Neurone signifikant breitere Aktionspotentiale (Lammel et al., 2008). Da SK-Kanäle an der Repolarisation der Aktionspotentiale sowie der Amplitude der Nachhyperpolarisation beteiligt sind, lassen sich diese Unterschiede durch die geringere Expression von SK3-Kanälen in DA VTA Neuronen erklären (Wolfart et al., 2001). Die unregelmäßige Spontanaktivität von DA VTA Neuronen kann ebenfalls durch die geringere SK3-Expression erklärt werden, da SK-Kanäle außerdem die Regularität der Spontanfrequenz kontrollieren (Wolfart et al., 2001).

Calbindin, ein calcium-bindendes Protein, ist ebenfalls differentiell in DA SN und VTA Neuronen exprimiert; dessen Anwesenheit ist allerdings kein verlässlicher Marker, um zwischen den zwei mesocorticolimbischen Subpopulationen zu unterscheiden (Lammel et al., 2008).

ATP-abhängige Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ ), welche in DA Neuronen aus der porenbildenden Kir6.2 (engl. *inward rectifying K<sup>+</sup> channel*)  $\alpha$ -Untereinheit und der modulatorischen SUR1-Untereinheit (engl. *sulfonylurea receptor*, Sulfonylharnstoffrezeptor) gebildet werden, zeigen ebenfalls ein subpopulationspezifisches Expressionsmuster.  $K_{ATP}$ -Kanäle stellen für die Zelle einen metabolischen Sensor dar, da ihre Offenwahrscheinlichkeit vom Verhältnis von ATP und ADP abhängig ist (Nichols, 2006). Der durch eine ATP-Depletion aktivierte Strom ist dabei in mesolimbischen VTA Neuronen etwa halb so groß, wie in mesostriatalen SN Neuronen, was sich ebenfalls in einer um die Hälfte reduzierten mRNA-Expression von Kir6.2 und SUR1 widerspiegelt (Liss et al., 2005). Mit Hilfe von Kir6.2-defizienten Mäusen, deren DA SN Neurone sowohl in einem genetischen, als auch in einem pharmakologisch induziertem Parkinson-Modell vor Degeneration geschützt waren, konnte ein kausaler Link zwischen der Anwesenheit von  $K_{ATP}$ -Kanälen und der differentiellen Vulnerabilität von DA SN Neuronen gezeigt werden, die im Gegensatz zu DA VTA Neuronen bei

Parkinson degenerieren (Liss et al., 2005). Zusätzlich übernimmt dieser Strom selektiv in der medialen SN eine wichtige Funktion bei der Induktion von *bursts* (Schiemann et al., 2012).

Zur Expression von D2-Autorezeptoren der verschiedenen DA VTA Subpopulationen finden sich in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse. Bei DA Neuronen mit corticalen Projektionen wurde *in vivo* eine fehlende Autoinhibition durch D2-Rezeptoren beobachtet (Chiodo et al., 1984). Damit übereinstimmend zeichnen sich nach Lammel und Kollegen ebenfalls ausschließlich die mesocorticalen DA VTA Neurone durch die Abwesenheit einer Inhibition über D2-Autorezeptoren aus und dieses Ergebnis wird durch die sehr geringe Expression von D2R und GIRK-Kanälen untermauert (Lammel et al., 2008). Im Gegensatz dazu wurde in Ratten das Fehlen einer D2-vermittelten Autoinhibition nur in mesoamygdalären Neuronen beobachtet (Margolis et al., 2008), was früheren Studien entspricht, die eine Inhibition durch D2-Autorezeptoren in Subpopulationen von mesocorticalen Neuronen *in vivo* zeigten (Shepard und German, 1984; Gariano et al., 1989a; Gariano et al., 1989b).

Die kürzlich genauer charakterisierten DA VTA Neurone, die selektiv in die LHb projizieren, sind ähnlich wie mesocorticale DA Neurone durch einen hohen Membranwiderstand sowie durch die Abwesenheit von  $I_h$  und einer D2-vermittelten Autoinhibition gekennzeichnet. Obwohl diese Neurone TH-positiv sind, setzen sie bei ihrer Aktivierung nicht DA, sondern GABA frei und inhibieren dadurch die Neurone der LHb (Stamatakis et al., 2013). Diese Daten unterstützen den schon großen Datensatz zur Heterogenität des DA Systems, in Bezug auf Projektionsgebiete, elektrophysiologischer Parameter, Genexpressionsprofile und ausgeschütteter Neurotransmitter (Ford et al., 2006; Lammel et al., 2008; Margolis et al., 2008; Lammel et al., 2011; Tritsch et al., 2012; Roeper, 2013).

#### **1.2.4 *In vivo* Aktivität und Modulation durch synaptische Eingänge**

Das Aktivitätsmuster von DA SN und VTA Neuronen wird zusätzlich zur ihren intrinsischen Pacemakermechanismen auch durch synaptische Eingänge aus verschiedenen Hirnregionen kontrolliert (siehe Abschnitt 1.1.3.2). Dabei hängt

das Ausmaß des synaptischen Einflusses auf die DA Neurone zum einen von der Anzahl der exprimierten postsynaptischen Rezeptoren ab, wird aber auch maßgeblich durch ihre passiven Membraneigenschaften, insbesondere durch ihren Membranwiderstand bestimmt. Während *in vitro* unter kompletter synaptischer Isolation ausschließlich reguläre Spontanaktivität beobachtet wird, können DA Neurone *in vivo* zusätzlich in einem irregulären Feuermuster entladen, sowie kurze, hochfrequente Aktionspotentialsalven, die sog. *bursts* generieren (Grace und Bunney, 1984a, b; Tepper et al., 1995; Paladini und Tepper, 1999). Diese sind mit einer supralinearen Steigerung der DA-Konzentration in den Zielarealen assoziiert (Gonon, 1988) und treten z. B. im Zusammenhang mit RPE-Signalling auf (siehe Abschnitt 1.1.6). *Bursts* finden sich allerdings auch im anästhesierten Tier, sowohl in einem regelmäßigen, als auch in einem irregulären Muster (Grace und Bunney, 1984a; Schiemann et al., 2012) und ähneln in ihrer Dauer und Frequenz den in wachen Tieren beobachteten belohnungsassoziierten *bursts* (Hyland et al., 2002). Die Pausen in der DA Aktivität, welche z. B. nach dem Ausbleiben einer Belohnung oder der Präsentation eines vorhersagenden Stimulus auftreten, werden vermutlich durch die Stimulation inhibitorischer GABA-Rezeptoren durch die entsprechenden synaptischen Eingänge generiert (Morikawa und Paladini, 2011).

### 1.2.4.1 *Burst-Kontrolle*

In der Kontrolle der *Burst*-Aktivität sind sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Transmittersysteme involviert. Stimulation von glutamatergen Afferenzen aus dem präfrontalen Cortex und dem STN, welche zu einer Aktivierung von NMDA-Rezeptoren auf DA Neuronen führen, können in DA Neuronen *bursts* auslösen (Gariano und Groves, 1988; Overton und Clark, 1992; Smith und Grace, 1992; Zhang et al., 1994; Overton und Clark, 1997). Dementsprechend wird die *Burst*-Aktivität durch lokale Applikation von NMDA-Rezeptorantagonisten reduziert, ein Effekt der ebenfalls durch Läsionen des PFC und STN ausgelöst werden kann (Smith und Grace, 1992; Chergui et al., 1993; Murase et al., 1993). Lokale Applikation von GABA<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten in die SN führt ebenfalls zu einer Erhöhung der *Burst*-Aktivität, was darauf hindeutet, dass in Ruhe die exzitatorischen und inhibitorischen Afferenzen im

Gleichgewicht stehen, so dass NMDA-vermittelte *Burst*-Aktivität indirekt durch Disinhibition initiiert werden kann (Paladini und Tepper, 1999; Lobb et al., 2010; Lobb et al., 2011a; Morikawa und Paladini, 2011).

#### **1.2.4.2 Pausen**

DA Neurone werden im Kontext der RPE-Berechnung in drei Situationen inhibiert: wenn eine erwartete Belohnung nicht auftritt, wenn das Ausbleiben einer Belohnung signalisiert wird sowie bei einem unerwarteten aversiven Ereignis (Schultz, 1998; Tobler et al., 2003; Matsumoto und Hikosaka, 2007; Cohen et al., 2012). Die tonische Entladungsfrequenz wird dabei reduziert und erlischt im Extremfall komplett für Hunderte von Millisekunden (Bayer et al., 2007; Mileykovskiy und Morales, 2011). Diese Inhibition erfolgt vermutlich durch Aktivierung von GABAergen Eingängen (Tobler et al., 2003; Lobb et al., 2010). Dabei spielen v.a. GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren eine prominente Rolle, welche durch Afferenzen aus dem RMTg, dem Striatum, Ncl. accumbens, Globus pallidum, dem ventralen Pallidum sowie der GABAergen Neuronen der SNr und VTA aktiviert werden (Paladini und Tepper, 1999). Zusätzlich können metabotrope GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren eine Inhibition von DA Neuronen vermitteln (Johnson und North, 1992; Brazhnik et al., 2008), über die direkte Aktivierung von GIRK-Kanälen durch die  $\beta\gamma$ -Untereinheit des heterotrimeren G<sub>i</sub>-Proteins (Lacey et al., 1988; Cruz et al., 2004). GIRK-Ströme sind außerdem für spontane D2R-abhängige Pausen in der Aktivität von DA SN Neuronen verantwortlich (Gantz et al., 2013). Die durch postsynaptische Ströme ausgelöste Änderung des Membranpotentials sowie deren zeitlicher Verlauf wird dabei maßgeblich durch intrinsische Membraneigenschaften der Neurone (insbesondere durch den Membranwiderstand) sowie durch die biophysikalischen Parameter der aktivierten Membranströme beeinflusst.

## 1.3 Der A-Typ Kaliumstrom

Der spannungsabhängige Kaliumstrom, der später von Connor und Stevens die Bezeichnung A-Strom erhielt, wurde zum ersten Mal 1961 im *Voltage-Clamp* in Mollusken gemessen und charakterisiert (Hagiwara et al., 1961; Connor und Stevens, 1971). Die schnelle Aktivierung der Kanäle bei Membranpotentialen über  $-65$  mV und die Inaktivierung bei anhaltender Depolarisation resultiert in einem transienten Kaliumauswärtsstrom, der auch als  $I_{to}$  (engl. *transient outward*), A-Typ Kaliumstrom oder A-Strom ( $I_A$ ) bezeichnet wird (McAllister und Noble, 1966; Connor und Stevens, 1971).

### 1.3.1 Aufbau und Funktion spannungsgesteuerter Kaliumkanäle

In Säugetieren wurden mehr als 80 Gene identifiziert, die für kaliumselektive Ionenkanäle kodieren und deren Nomenklatur durch das Komitee für Gennomenklatur der *Human Genome Organization* (HUGO *gene nomenclature committee*; HGNC) verwaltet wird. Das Schaltverhalten (engl. *gating*) der Ionenkanäle kann durch verschiedene Mechanismen gesteuert werden (Spannungsänderung, intrazelluläre Signalmoleküle), jedoch haben alle Kaliumkanäle ein gemeinsames Grundgerüst, welches die Selektivität des Kanals für Kaliumionen gewährleistet (siehe Abschnitt 1.3.1.2)(Hille, 2001).

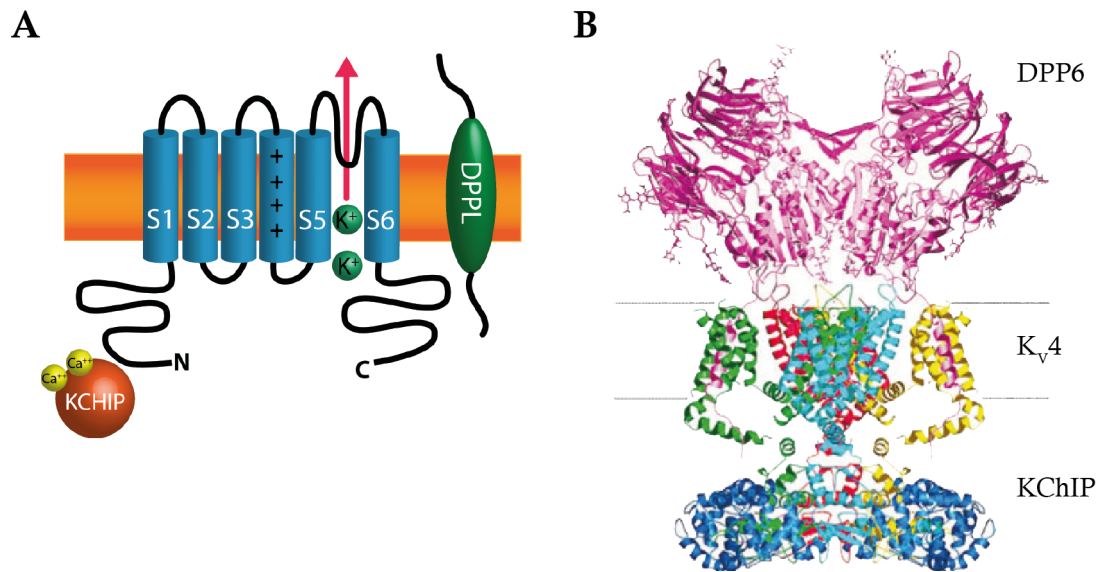
Das erste Gen, welches für einen spannungsgesteuerten Kaliumkanal ( $K_v$ ) kodiert, wurde in Fliegen der Gattung *Drosophila melanogaster* entdeckt. Tiere mit einer Mutation im sog. *shaker*-Gen sind durch das verstärkte Schütteln ihrer Beine während der Ätheranästhesie aufgefallen (Papazian et al., 1987; Kamb et al., 1988; Pongs et al., 1988). Die drei weiteren Genfamilien von spannungsgesteuerten Kaliumkanälen wurden *Shab*, *Shaw* und *Shal* genannt und weisen eine 50 bis 70 %ige Sequenzhomologie zu den entsprechenden Säuger-Subfamilien  $K_v1.x$ ,  $K_v2.x$ ,  $K_v3.x$  und  $K_v4.x$  auf (Butler et al., 1989; Birnbaum et al., 2004). Ein weiteres Nomenklatorsystem für Kaliumkanäle basiert auf der Genbezeichnung KCN ( $K^+$  *channel*), so dass die Genfamilien  $K_v1.x$ – $K_v4.x$  auch  $KCNAX$ – $KCNDx$  genannt werden.

Aus der Familie der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle können mehrere Mitglieder transiente A-Ströme generieren. Während in glatten Muskelzellen vor allem  $K_v1.5$  für den A-Strom zuständig ist (Fergus et al., 2003; McGahon et al., 2007), wird er in Neuronen von  $K_v1.4$ -,  $K_v3.x$ - und  $K_v4.x$ -haltigen Kaliumkanälen getragen (Martina et al., 1998; Shibata et al., 2000; Tkatch et al., 2000; Carrasquillo et al., 2012; Granados-Fuentes et al., 2012).

Native A-Typ Kaliumkanäle liegen meist in einem ternären Kanalkomplex vor, der aus vier  $\alpha$ -Untereinheiten und jeweils vier cytoplasmatischen und vier membranständigen akzessorischen Untereinheiten (KChIP bzw. DPPL; siehe Abbildung 1.7 und Abschnitt 1.3.2) besteht (Maffie und Rudy, 2008; Soh und Goldstein, 2008; Marionneau et al., 2010). Die biophysikalischen Eigenschaften der jeweiligen Ströme sind von den porenbildenden  $\alpha$ -Untereinheiten abhängig, können aber maßgeblich durch die jeweiligen akzessorischen Untereinheiten sowie durch posttranslationale Modifikationen beeinflusst werden (siehe Abschnitt 1.3.2).

### **1.3.1.1 Aufbau der $K_v$ $\alpha$ -Untereinheit**

Das Grundgerüst spannungsgesteuerter Kaliumkanäle besteht aus vier  $\alpha$ -Untereinheiten, die sich als Tetramer zu einem funktionsfähigen Kaliumkanal zusammenlagern. Jede Untereinheit beinhaltet Elemente, die bei allen spannungsgesteuerten Kanälen zu finden sind: eine N-terminale intrazelluläre Domäne, die bei  $K_v$ -Kanälen die Tetramerisierungsdomäne (T1) enthält, gefolgt von sechs Transmembransegmenten S1–S6 mit dem Spannungssensor (S4) und der Porendomäne (S5–S6), deren Verbindungsstück die Porenschleife bildet (siehe Abbildung 1.7). Der C-Terminus liegt ebenfalls intrazellulär (Hille, 2001; Covarrubias et al., 2008).



**Abbildung 1.7: Struktur spannungsgesteuerter Kaliumkanäle**

**A:** Schematische Darstellung eines K<sub>v</sub>-Kanalkomplexes. Jede der vier α-Untereinheiten (blau) von spannungsgesteuerten Kaliumkanälen besteht aus einer Proteinkette mit sechs Transmembransegmenten (S1–S6). Sowohl der N- als auch der C-Terminus befinden sich intrazellulär. Die Spannungssensitivität wird durch das positiv geladene S4-Segment gewährleistet, während die Kanalpore mit dem Selektivitätsfilter von den Segmenten S5 und S6 und der dazwischen liegenden Porenschleife gebildet wird. Die biophysikalischen Eigenschaften des Kanals werden durch die cytoplasmatischen KChIPs und die transmembranären DPPLs beeinflusst (weitere Erläuterungen: siehe Text). **B:** Modell eines ternären K<sub>v</sub>-Kanalkomplexes, zusammengesetzt aus den Kristallstrukturen der K<sub>v</sub>4 α-Untereinheit, KChIP1 und DPP6. Ein funktionsfähiger Kanal wird durch ein Dodekamer mit vier K<sub>v</sub> α-, vier KChIP- und vier DPPL-Untereinheiten gebildet. Um eine bessere Ansicht zu ermöglichen, sind nur zwei der vier DPP6-Untereinheiten dargestellt (modifiziert nach Maffie und Rudy, 2008).

**1.3.1.2 Der Selektivitätsfilter**

Um die Passage von Kaliumionen durch die hydrophobe Membran zu ermöglichen, ist die Zusammenlagerung von vier Porendomänen nötig. Die Form der TM-Segmente, die die Kanalpore bilden, wurde mit einem invertierten Teepee-Zelt verglichen, an dessen Basis sich der sog. Selektivitätsfilter befindet, der die hohe Selektivität für Kaliumionen gegenüber z. B. der kleineren Natriumionen gewährleistet. Er wird durch vier Proteinketten gebildet (eine von jeder Untereinheit) mit der Aminosäuresequenz TXXTXGYG, die zwischen den verschiedenen Kaliumkanalfamilien hochkonserviert ist (Heginbotham et al., 1994). Die Carbonylgruppen der Aminosäuren, die die Innenseite des Selektivitätsfilters auskleiden, entsprechen in ihrer Anordnung der Hydrathülle



von Kaliumionen, die vor ihrem Eintritt in die Pore von ihrer Hydrathülle befreit werden müssen. Frühe Hypothesen machten die geometrische Anordnung der Carbonylgruppen für die Selektivität verantwortlich, was allerdings eine starre Porenarchitektur voraussetzt (Bezanilla und Armstrong, 1972). Die Anordnung der Carbonylgruppen im Selektivitätsfilter ist zwar der Hydrathülle von Kaliumionen ähnlicher als der von Natriumionen (Doyle et al., 1998; Zhou et al., 2001), da die Proteinketten allerdings beweglich und die strukturellen Unterschiede klein sind, ist der determinierende Faktor für die Selektivität letztendlich in der energetischen Bilanz zu finden (Noskov et al., 2004). Die Energie, die für die Befreiung der Ionen von ihrer Hydrathülle aufgewandt wird, muss durch die Bindungsenergie im Selektivitätsfilter ausgeglichen werden (Morais-Cabral et al., 2001; Zhou et al., 2001). Die elektrostatischen Wechselwirkungen der Carbonylgruppen des Selektivitätsfilters begünstigen die Bindung von Kaliumionen, was dem Kanal eine intrinsische Selektivität verleiht (Noskov und Roux, 2006, 2007). Der Selektivitätsfilter beinhaltet vier potentielle Kaliumkoordinationsstellen, wobei sich zwischen zwei Kaliumionen immer ein Wassermolekül befindet, so dass die Konfigurationen  $K^+ \cdot H_2O \cdot K^+ \cdot H_2O$  (1,3-Konfiguration) und  $H_2O \cdot K^+ \cdot H_2O \cdot K^+$  (2,4-Konfiguration) entstehen (Morais-Cabral et al., 2001). Die Tatsache, dass diese beiden Konfigurationen energetisch sehr ähnlich sind, ermöglicht einen sehr schnellen Ionenfluss durch den Kanal, mit Geschwindigkeiten von bis zu  $10^8$  Ionen/s (Morais-Cabral et al., 2001).

### 1.3.1.3 Spannungssensor und Aktivierung

Ionenkanäle können in einem geschlossenen sowie in einem geöffneten, ionenleitenden Zustand vorliegen. Bei spannungsgesteuerten Kanälen ist der Übertritt von der geschlossenen in die geöffnete Konformation vom Membranpotential abhängig, welches durch den integrierten Spannungssensor detektiert werden kann (Hille, 2001). Dieser befindet sich im S4 Segment in Form von vier bis acht positiv geladenen Aminosäuren (meist Argininen) an jeder dritten Stelle, die bei einer Depolarisation des Membranpotentials durch die akkumulierten positiven Ladungen abgestoßen werden. Dadurch bewegt sich der Spannungssensor in Richtung des Extrazellulärraums, was die Öffnung des Kanals zur Folge hat. Die essentielle Bedeutung des sich wiederholenden Motivs

von einem Arginin gefolgt von zwei hydrophoben Aminosäuren, konnte durch ein *shaker*-Kanalkonstrukt gezeigt werden, dessen Spannungssensor durch das S4-Segment eines nicht-spannungsgesteuerten Kanals ersetzt wurde (CNGA1). Die Proteinstruktur von CNGA1 unterscheidet sich zwar erheblich von der des *shaker*-Kanals, beinhaltet allerdings dasselbe Argininmotiv. Trotz der großen Unterschiede wies der Chimärkanal eine deutliche Spannungsabhängigkeit auf (Xu et al., 2010).

Für die genaue Bewegung des S4-Segments werden drei potentielle Modelle diskutiert, die sich u. a. in der Amplitude der Bewegung des S4-Segments unterscheiden: das Transporter-, das *helical screw*- sowie das Paddel-Modell (Tombola et al., 2006). Laut dem ersten Modell bewegen sich die positiven Ladungen des S4-Segments zwischen zwei Höhlen, die durch andere Transmembrandomänen (TM) gebildet werden und während der Kipp- und Rotationsbewegung des Spannungssensors ebenfalls eine Konformationsänderung durchlaufen. Dem *helical screw-Modell* liegt ebenfalls eine schraubenförmige Bewegung um die eigene Achse zugrunde, in Kombination mit einer Translokation der positiven Ladungen in Richtung des Extrazellulärraums. Beim Paddel-Modell bewegen sich das S3- und S4-Segment gemeinsam als eine ruderähnliche Struktur von der intrazellulären zur extrazellulären Seite der Membran (Ahern und Horn, 2004; Tombola et al., 2006).

An der zum Intrazellulärraum gerichteten Spitze des invertierten Teepee befindet sich das Aktivierungstor, welches für das Öffnen und Schließen des Kanals zuständig ist und vom S6 Segment gebildet wird. Ein Glycin in der Sequenz dient als Scharnier für das Abknicken eines Teils von S6, welches den Ionenfluss durch die Pore behindert (Tombola et al., 2006). Die Bewegung des Spannungssensors ist dabei obligatorisch für die Konformationsänderung, die zur Öffnung des Kanals führt und für die Kopplung wurde die Notwendigkeit einer Interaktion vom S4–S5 Linker mit dem C-terminalen Ende des S6-Segments gezeigt (McCormack et al., 1991; Long et al., 2005; Jensen et al., 2012). Die Geschwindigkeit der Aktivierung stellt eine intrinsische Kanaleigenschaft dar, die durch Anwesenheit distinkter Aminosäuren im Spannungssensor bestimmt wird, aber auch durch die Interaktion von akzessorischen Untereinheiten moduliert werden kann (Lacroix et al., 2013).

Die Deaktivierung, d. h. das Schließen des Kanals bei hyperpolarisierten Membranpotentialen stellt prinzipiell den umgekehrten Prozess der Aktivierung dar, mit dem Unterschied, dass für das Öffnen der Pore die Bewegung aller vier Spannungssensordomänen nötig ist, während für die Deaktivierung die Bewegung nur einer Domäne ausreichend ist (Jensen et al., 2012).

#### 1.3.1.4 Inaktivierungsmechanismen

Zusätzlich zur geschlossenen und geöffneten Konformation, können Ionenkanäle durch verschiedene Mechanismen in eine nichtleitende, inaktive Konformation gebracht werden, die nur durch eine Re- oder Hyperpolarisation des Membranpotentials aufgehoben werden kann (Hille, 2001; Jerng et al., 2004a). Die Inaktivierung kann zum einen durch Domänen des Kanalproteins als eine Form von Autoregulation und zum anderen durch Konformationsänderungen im Selektivitätsfilter erfolgen. Desweiteren können akzessorische Untereinheiten die Inaktivierung hervorrufen oder auch modulieren (siehe Abschnitt 1.3.2).

Die Inaktivierung aus der geöffneten Konformation (OSI: *open-state inactivation*) findet v. a. bei  $K_v1.3$ ,  $K_v1.4$ ,  $K_v3.3$  und  $K_v3.4$  statt, setzt – wie der Name andeutet – eine vorherige Öffnung des Kanals voraus und wird auch als *ball-and-chain* oder N-Typ Inaktivierung bezeichnet. Dabei bindet der N-Terminus (*ball*) der  $\alpha$ -Untereinheit, der mit einer Proteinkette (*chain*) am Kanal gebunden ist nach Öffnung des Kanals an die Innenseite der Pore, sodass diese verstopft wird (Hoshi et al., 1991; Zhou et al., 2001). Während der Erholung aus der Inaktivierung können Restströme gemessen werden, was darauf hindeutet, dass der Übergang von der inaktivierten zur geschlossenen Konformation über die geöffnete Konformation erfolgt (Ruppersberg et al., 1991).

Wird der N-Terminus durch Deletion der relevanten Aminosäuren außer Kraft gesetzt, kommt eine zweite Form der Inaktivierung zum Vorschein, die als P/C-Typ Inaktivierung bezeichnet wird und eine langsamere Kinetik aufweist (mehrere Sekunden statt ms) (Hoshi et al., 1990). Die Inaktivierung wird durch eine Konformationsänderung der äußeren Kanalöffnung im Bereich des Selektivitätsfilters eingeleitet, sodass dieser keine Kaliumionen leiten kann (Starkus et al., 1997; Lacroix et al., 2013). Durch die allosterische Kopplung des Aktivierungstors mit dem Selektivitätsfilter führt die Konformationsänderung, die

das Öffnen des Kanals hervorruft, zur Ausbildung der C-Typ Inaktivierung (Cuello et al., 2010). Der Eintritt in die P/C-Typ Inaktivierung wird durch die N-Typ Inaktivierung begünstigt, die Erholung ist sehr langsam (mehrere Sekunden) und kann nicht durch eine Hyperpolarisation der Membran beschleunigt werden (Baukrowitz und Yellen, 1995).

Der N-Terminus von  $K_v4$ -Kanälen ist zwar in der Lage eine N-Typ Inaktivierung zu verursachen (Gebauer et al., 2004), allerdings spielen sowohl die N- als auch die P/C-Typ Inaktivierung bei diesen Kanälen eine eher untergeordnete Rolle (Jerng und Covarrubias, 1997; Bähring et al., 2001; Kaulin et al., 2008). Viele Ergebnisse deuten auf eine präferentielle Inaktivierung aus der geschlossenen Konformation, die als *closed-state* Inaktivierung (CSI) bezeichnet wird (Bähring und Covarrubias, 2011; Bähring et al., 2012; Fineberg et al., 2012). Diese Form der Inaktivierung ist bei relativ hyperpolarisierten Potentialen und der damit einhergehenden vernachlässigbaren Offenwahrscheinlichkeit schnell und komplett, außerdem wird sie bei depolarisierten Potentialen immer geringer und die Erholung aus der Inaktivierung verläuft, im Gegensatz zur N-Typ Inaktivierung, nicht über die geöffnete Konformation (Bähring et al., 2001; Beck et al., 2002; Fineberg et al., 2012). Der dafür postulierte Mechanismus wurde bereits für HCN-Kanäle vorgeschlagen (Shin et al., 2004) und entspricht einer Entkopplung des Spannungssensors vom Aktivierungstor, sodass sich der Kanal trotz der vorhandenen Depolarisation präferentiell in der geschlossenen Konformation befindet (Dougherty et al., 2008; Villalba-Galea et al., 2008; Barghaan und Bähring, 2009; Bähring et al., 2012). Der Potentialbereich, in dem der A-Strom aktiviert werden kann, bevor er vorher in die CSI-Konformation übergeht, ist sehr klein. Daher ergibt sich lediglich ein begrenztes Potentialfenster, in dem eine kontinuierliche Leitfähigkeit des A-Strom gewährleistet ist (Jerng et al., 1999; Bähring et al., 2001; Dougherty et al., 2008; Barghaan und Bähring, 2009). Die Inaktivierung von  $K_v4$ -Kanälen wird außerdem maßgeblich durch die Anwesenheit von akzessorischen Untereinheiten beeinflusst, auf die im folgenden Abschnitt eingegangen wird (Beck et al., 2002; Jerng et al., 2009; Fineberg et al., 2012).

### 1.3.2 Modulation des A-Stroms

Bei dem Vergleich von  $K_v4$ -Strömen aus heterologen Expressionssystemen mit nativen Strömen wurden erhebliche Unterschiede festgestellt, sowohl bezüglich der subzellulären Lokalisation, als auch in den biophysikalischen Eigenschaften der generierten Ströme. Rekonstituierte  $K_v4.2$ -Kanäle akkumulierten intrazellulär im endoplasmatischen Retikulum, statt wie in Neuronen an der Zelloberfläche exprimiert zu werden (Shibata et al., 2003). Neben sehr depolarisierten Werten für das halbmaximale Aktivierungspotential ( $V_{50}$ ) (das Potential, bei dem sich 50 % der Kanäle in der geöffneten Konformation befinden), war auch die Kinetik der Aktivierung und Inaktivierung sowie der Erholung aus der Inaktivierung von nativen A-Strömen schneller als in kultivierten Zellen oder Oocyten (Jerng et al., 2004a). Diese Unterschiede konnten durch die Koexpression von modulatorischen Untereinheiten erklärt werden, welche in der Form von cytoplasmatischen und transmembranären Proteinen auftreten (siehe Abschnitt 1.3.2.1 und 1.3.2.2) (Maffie und Rudy, 2008). Die vier porenbildenden  $K_v$   $\alpha$ -Untereinheiten bilden zusammen mit jeweils vier KChIPs einen oktameren Kanalkomplex (Pioletti et al., 2006; Wang et al., 2007). Dessen Erweiterung zu einem ternären Komplex, durch die Bindung von vier DPPL-Untereinheiten (siehe Abbildung 1.7), wird von funktionellen Ergebnissen mehrerer Studien unterstützt (Strop et al., 2004; Jerng et al., 2005; Maffie und Rudy, 2008; Soh und Goldstein, 2008; Jerng und Pfaffinger, 2012). Die Eigenschaften des A-Stroms können außerdem durch posttranslationale Modifikationen in Form von Glycosylierung und Phosphorylierung moduliert werden (siehe Abschnitt 1.3.2.3).

#### 1.3.2.1 KChIPs

Die cytoplasmatischen Modulatoren von  $K_v4$ -Kanälen sind kleine, etwa 200–250 Aminosäuren lange Proteine, die ihrer Funktion entsprechend als Kaliumkanal interagierende Proteine (KChIP: *K<sub>v</sub> channel-interacting proteins*) bezeichnet werden (An et al., 2000). Sie zählen aufgrund ihrer hohen Sequenzhomologie mit Proteinen wie NCS-1 (*neuronal calcium sensor 1*) und Frequenin zur Recoverin/NCS-Familie (Burgoyne und Weiss, 2001; Burgoyne, 2007). Durch

ihre vier EF-Hand Motive können sie Calciumionen binden, wobei nur zwei der Bindungsstellen (EF-3 und -4) tatsächlich mit Calcium besetzt sind (Scannevin et al., 2004; Zhou et al., 2004).

Die KChIPs wurden in einem Hefe-zwei-Hybrid-Screen als Interaktionspartner des N-Terminus von  $K_v4$   $\alpha$ -Untereinheiten entdeckt (An et al., 2000) und konnten anschließend in nativen Geweben immunhistochemisch, mittels RT-PCR, Westernblot sowie *in situ* Hybridisierung nachgewiesen werden (Liss et al., 2001; Liss et al., 2002; Hammond et al., 2003; Xiong et al., 2004; Duncan et al., 2009; Anderson et al., 2010; Bourdeau et al., 2010; Dabrowska und Rainnie, 2010). Bisher sind vier Gruppen von KChIPs bekannt (KChIP1–4), wobei jede dieser Gruppen mehrere Mitglieder enthält, die durch alternatives Splicing der entsprechenden Gene entstehen (An et al., 2000; Holmqvist et al., 2002; Decher et al., 2004; Jerng et al., 2004b; Jerng und Pfaffinger, 2008). Sie sind durch eine 70 %ige C-Terminale Sequenzhomologie zueinander sowie variablen N-Termini charakterisiert (An et al., 2000; Burgoyne, 2007). Alle KChIPs werden im Gehirn exprimiert, KChIP2 findet sich außerdem im Herzen und in der Lunge (Jerng et al., 2004a).

Interessanterweise wurde KChIP3 bereits als das Protein Calsenilin identifiziert, welches durch die Bindung an Presenilin-1 und -2 die Bildung von  $\beta$ -Amyloid beeinflusst und so eine Rolle bei der Alzheimererkrankung spielen könnte (Buxbaum et al., 1998). Außerdem gleichen beide Proteine bis auf eine N-terminale 30 Aminosäuren lange Sequenz auch dem Protein DREAM (engl. *downstream regulatory element antagonist modulator*), welches als calciumreguliertes DNA-bindendes Protein die Transkription von *c-fos* und der Prodynorphingene unterdrückt (Carrión et al., 1999). KChIP4 ist identisch mit dem Calsenilin-ähnlichen Protein CALP, welches ebenfalls Presenilin-2 bindet und die Spaltung des  $\beta$ -Amyloid-Vorgängers fördert (Morohashi et al., 2002).

An der stabilen Bindung der KChIPs an der  $K_v$   $\alpha$ -Untereinheit sind zwei N-terminale Abschnitte beteiligt. Der proximale Teil des N-Terminus wird in einer länglichen, tiefen hydrophoben Tasche an der Oberfläche der KChIPs gebunden. Dadurch wird das N-terminale Peptid immobilisiert und seine potentielle Funktion für die Inaktivierung gestört. Das gleiche KChIP-Molekül bindet eine benachbarte  $K_v$   $\alpha$ -Untereinheit an der zweiten  $K_v$ /KChIP-

Interaktionsstelle, sodass die zwei Untereinheiten zusammengehalten werden und ein stabiler oktamerer  $K_v$ :KChIP-Komplex mit einer Stöchiometrie von 4:4 entsteht (Scannevin et al., 2004; Pioletti et al., 2006; Wang et al., 2007).

Die Koexpression von KChIPs mit  $K_v$   $\alpha$ -Untereinheiten in heterologen Expressionssystemen konnte sowohl deren strukturelle als auch funktionelle Modulation aufschlüsseln. Eine wichtige Rolle der KChIPs für die subzelluläre Lokalisation von  $K_v4$  konnte zum einen durch die zwölffache Erhöhung der  $K_v4.2$ -Stromdichte bei Koexpression von KChIP1 und zum anderen durch den immunocytochemischen Nachweis der erhöhten Oberflächenexpression von  $K_v4$  nach Koexpression mit KChIP1, 2 oder 3 gezeigt werden (An et al., 2000; Shibata et al., 2003; Foeger et al., 2010). Die KChIPs binden dabei an einen N-terminalen Bereich von  $K_v4$ , der bei Abwesenheit von KChIPs als Signalsequenz für eine Retention im endoplasmatischen Retikulum fungiert (Bähring et al., 2001). Wird dieser Bereich, der kürzlich den Namen FERN-Domäne (*functional expression regulating N-terminal domain*) bekommen hat, von KChIP3 gebunden, kann der Kanal an die Membranoberfläche transloziert und dort eingebaut werden. Interessanterweise kann KChIP3 bei kompletter Abwesenheit der FERN-Domäne die funktionelle Expression um einen zusätzlichen Faktor fünf steigern (Kunjilwar et al., 2013).

Die KChIP-Expression verändert ebenfalls die biophysikalischen Eigenschaften des A-Stroms, sodass in heterologen Systemen generierte Ströme den nativen Strömen ähnlicher werden. Koexpression von KChIP1 führt zu einer Verschiebung des halbmaximalen Aktivierungspotentials zu hyperpolarisierteren Werten, einer Verzögerung der Inaktivierungskinetik und einer Beschleunigung der Erholung aus der Inaktivierung (Jerng et al., 2004a). Diese Effekte werden selektiv durch den hochkonservierten C-terminalen Bereich der KChIPs verursacht (An et al., 2000; Beck et al., 2002; Holmqvist et al., 2002).

Die Variationen in der N-terminalen Sequenz der KChIPs können deren Funktion stark beeinflussen, sodass verschiedene Splice-Varianten sehr unterschiedliche Funktionen aufweisen. So kann z. B. die KChIP1 Splice-Variante KChIP1b die Kinetik der Erholung aus der Inaktivierung stark verlangsamen und hat somit einen gegensätzlichen Effekt als KChIP1a (Van Hoorick et al., 2003). Weiterhin fanden Holmqvist und Kollegen 2002 eine

KChIP4 Splice-Variante (KChIP4.4 oder KChIP4a) mit einem distinkten N-Terminus, deren Expression zu einer Inhibition der Inaktivierung des A-Stroms führte, sodass  $K_v4$ -Kanäle bei Anwesenheit von KChIP4a mit einer etwa 10-fach langsameren Geschwindigkeit inaktivierten (Holmqvist et al., 2002). Aufgrund ihrer Funktion wurde diese 34 Aminosäuren lange Domäne KIS-Domäne (*K<sup>+</sup> channel inactivation suppressor domain*) genannt. Später wurden zwei weitere KChIP Splice-Varianten mit KIS-Domänen gefunden, welche als KChIP2x und KChIP3x bezeichnet wurden und ähnliche Effekte auf die Inaktivierungskinetik des A-Stroms haben, wie die KChIP4a-Variante (Jerng und Pfaffinger, 2008).

Konzeptionell kann die Wirkung der KIS-Domäne durch eine Stabilisierung der geöffneten Konformation erklärt werden. KChIP4a erschwert den Übertritt des Kanals aus der geschlossenen in die geöffnete Konformation, was in einer langsameren Aktivierungskinetik resultiert. Ist der Kanal allerdings erst einmal geöffnet, so wird die schnelle Inaktivierung aus der geöffneten Konformation erschwert, sodass effektiv die geöffnete Konformation begünstigt wird (Holmqvist et al., 2002). Einer neuen Studie zufolge unterstützt KChIP4a zusätzlich die Inaktivierung aus der geschlossenen Konformation und führt zu einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Steady-State Inaktivierung zu hyperpolarisierten Potentialen (Tang et al., 2013).

Während die C-Terminale *Core*-Domäne von KChIP4a bei Abwesenheit der KIS-Domäne identische modulatorische Eigenschaften zu KChIP1 aufweist, sind diese bei Expression der KIS-Domäne nicht mehr vorhanden. So wird z. B. die Beschleunigung der Erholung aus der Inaktivierung, die die *Core*-Domäne von KChIP4 vermittelt, durch die KIS-Domäne komplett okkludiert (Holmqvist et al., 2002). Außerdem wird die Fähigkeit der Steigerung der Oberflächenexpression vermutlich ebenfalls durch Autoinhibition okkludiert (Schwenk et al., 2008).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die KChIPs ihre modulatorische Rolle an der  $K_v \alpha$ -Untereinheit in direkter Konkurrenz zueinander ausüben, so dass z. B. bei Steigerung der KChIP1-Expression bei gleichbleibender Expression von KChIP4a der Effekt von KChIP1 auf die Inaktivierungskinetik überwiegt (Holmqvist et al., 2002). So könnte im nativen Gewebe, welches eine einzige  $K_v \alpha$ -Untereinheit besitzt, allein durch die Expression von verschiedenen KChIP-Varianten ein breites Spektrum an A-Strömen mit verschiedenen Eigenschaften



entstehen. Eine Assoziation der KChIP4a-Expression mit einer langsamen Inaktivierungskinetik des A-Stroms konnte bereits in Neuronen des Globus Pallidus und auch in DA Neuronen gezeigt werden (Liss et al., 2002; Baranauskas, 2004) (siehe Abschnitt 1.3.3).

Zum Effekt von KChIP4a auf die Oberflächenexpression existieren gegensätzliche Ergebnisse zu verschiedenen  $K_v \alpha$ -Untereinheiten in verschiedenen Expressionssystemen. Während KChIP4a die Oberflächenexpression von  $K_v4.3$  in verschiedenen Zelllinien (COS-1, HEK293) sowie kultivierten Hippocampusneuronen nicht steigerte (Shibata et al., 2003; Tang et al., 2013) und weiterhin die Wirkung der anderen KChIPs in dieser Hinsicht antagonisierte (Shibata et al., 2003), konnte in den Säugerzelllinien COS7 und HEK293 eine 1,5- bis 2-fache Steigerung der Oberflächenexpression von  $K_v4.2$  und  $K_v4.3$  durch KChIP4a gezeigt werden (Lin et al., 2010). Dieser Effekt benötigt eine Phosphorylierung der  $K_v \alpha$ -Untereinheit durch die Proteinkinase A (Lin et al., 2010).

Die Rolle der KChIP-vermittelten A-Strom-Modulation für die neuronale Erregbarkeit wurde durch den Einsatz von KChIP-defizienten Tieren, sowie durch einen KChIP-knock-down mittels siRNA (engl. *small interfering RNA*) untersucht. Damit konnte z. B. gezeigt werden, dass die Expression von KChIP1 ein schnellere Erholung der A-Ströme aus der Inaktivierung ermöglicht und so für eine stärkere inhibitorische Kontrolle von hippocampalen Interneuronen bei anhaltender Depolarisation sorgt (Bourdeau et al., 2010). In KChIP2-defizienten Tieren wurden in Pyramidenzellen des Hippocampus reduzierte A-Ströme sowie eine Verschiebung des halbmaximalen Inaktivierungspotentials zu negativeren Werten festgestellt, die in einer erhöhten zellulären Erregbarkeit, sowie einer niedrigeren Schwelle für einen elektrisch induzierten epileptischen Anfall resultierten (Wang et al., 2013). Beide Studien bestätigen somit eine physiologisch relevante Rolle der akzessorischen KChIP-Untereinheiten für die zelluläre Erregbarkeit.

### 1.3.2.2 Dipeptidyl Peptidase-ähnliche Proteine

Der A-Strom wird durch weitere Proteine moduliert, welche strukturelle Ähnlichkeiten zur Dipeptidyl-Peptidase 4 (DPP4) und dem Zelladhäsionsprotein

CD26 aufweisen. Sie besitzen eine kurze N-terminale intrazelluläre Domäne, ein einzelnes TM-Segment sowie einen langen extrazellulären C-Terminus, aber im Gegensatz zu DPP4/CD26 keine aktive katalytische Domäne (Kin et al., 2001). Bisher wurden zwei relevante Proteine identifiziert, die in verschiedenen Splice-Varianten vorliegen: DPP6 (auch als DPPX bekannt) und DPP10 (Nadal et al., 2003; Qi et al., 2003). Erst durch die zusätzliche Expression dieser Proteine konnten in heterologen Expressionssystemen Ströme generiert werden, deren Eigenschaften eine hinreichende Ähnlichkeit zu nativen Strömen aufwiesen (Maffie und Rudy, 2008; Soh und Goldstein, 2008; Jerng und Pfaffinger, 2012). Ähnlich wie bei den KChIPs können verschiedene DPP-Varianten, die durch alternatives Splicing entstehen, differentielle Funktionen aufweisen. So beschleunigen z. B. selektiv die Splice-Varianten DPP10a und DPP6a (DPP6E) die Inaktivierungskinetik von  $K_{v4.2}$ -Kanälen. Sie unterscheiden sich von anderen DPP6- und DPP10-Varianten durch eine N-terminale Aminosäuresequenz, die vermutlich die Kanalpore blockieren kann (Jerng et al., 2007; Jerng et al., 2009). DPP6 wird präferentiell von  $K_{v4.2}$ -haltigen Neuronen exprimiert (z. B. Pyramidenzellen des Hippocampus, striatale MSN und cerebelläre Körnerzellen), während DPP10 vor allem in Neuronen gefunden wurde, die einen  $K_{v4.3}$ -vermittelten A-Strom aufweisen (z. B. Purkinjezellen und hippocampale Interneurone) (Zagha et al., 2005). Sowohl DPP6 als auch DPP10 fördern den Transport der Kanäle an die Zelloberfläche (Foeger et al., 2012), beschleunigen die Erholung aus der Inaktivierung und führen zu einer Verschiebung des halbmaximalen Aktivierungs- und Inaktivierungspotentials zu negativeren Werten (Nadal et al., 2003; Jerng et al., 2004b; Ren et al., 2005; Zagha et al., 2005). Gleichzeitig erhöhen sie die Aktivierungs- und Inaktivierungsrate des A-Stroms (Nadal et al., 2003; Nadal et al., 2006; Amarillo et al., 2008). Eine wichtige Rolle für DPP6 wurde in Neuronen der CA1-Region des Hippocampus identifiziert. Die A-Stromdichte wird in den Dendriten mit steigender Entfernung vom Soma erhöht (Hoffman et al., 1997), was für die dendritische Erregbarkeit und die synaptische Plastizität entscheidend ist (Kim et al., 2008). Dieser A-Strom-Gradient wird durch Expression von DPP6 gewährleistet (Sun et al., 2011).

### 1.3.2.3 Regulation durch posttranslationale Modifikation

Die Eigenschaften von  $K_V$ -Kanälen können durch Palmitoylierung, Glycosylierung sowie Phosphorylierung reguliert werden. Die Bindung von Palmitinsäure (einer langen Fettsäure) erfolgt vermutlich nicht direkt an der  $K_V$   $\alpha$ -Untereinheit, sondern an den akzessorischen Untereinheiten und führt im Fall von KChIP2 zu einer weiteren Steigerung der Oberflächenexpression (Takimoto et al., 2002). Ähnliches gilt vermutlich auch für die Glycosylierung, welche ebenfalls die Expression von  $K_V$ -Kanälen an der Zelloberfläche steigern kann (Khanna et al., 2001). Da die Entfernung von Zuckerresten zu einer Abnahme des A-Stroms führt, in  $K_V4.x$ -Kanäle allerdings keine Konsensussequenz für eine Glycosylierung identifiziert wurde, geschieht dies vermutlich durch eine Modifikation der akzessorischen Untereinheiten (Birnbaum et al., 2004).

Die Funktion von  $K_V$ -Kanälen kann sowohl von den Proteinkinasen A und C (PKA bzw. PKC) als auch von der Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinase II (CaMKII) moduliert werden. Einige Studien zeigten, dass die Phosphorylierung durch PKA und PKC zu einer Verminderung der A-Stromdichte führte, zum Teil in Kombination mit einer Verschiebung der Aktivierungskurve zu positiveren Potentialen (Apkon und Nerbonne, 1988; Nakamura et al., 1997; Hoffman und Johnston, 1998). Außerdem wird die differentielle Mobilität von  $K_V4$ -Kanälen in proximalen und distalen Dendriten von Pyramidenzellen durch deren Phosphorylierung durch die PKA reguliert (Nestor und Hoffman, 2012).

Die Oberflächenexpression von  $K_V$ -Kanälen kann in verschiedenen Zelltypen durch Phosphorylierung sowohl gesteigert, als auch reduziert werden. Die Unterschiede lassen sich zum einen durch die Aktivität unterschiedlicher Kinasen und zum anderen durch die Expression von akzessorischen Untereinheiten erklären. In einer aktuellen Studie von Lin und Kollegen wurde in Pyramidenzellen des Hippocampus eine Verminderung der Oberflächenexpression von  $K_V4.2$ -Kanälen bei Aktivierung der PKA gezeigt (Lin et al., 2011). Einer früheren Studie der gleichen Arbeitsgruppe zufolge, resultiert die Aktivierung der PKA bei gleichzeitiger Koexpression von KChIP4a allerdings in einer erhöhten A-Stromdichte (Lin et al., 2010). Ein ähnlicher Einfluss einer akzessorischen Untereinheit auf die phosphorylierungsabhängige Modulation von  $K_V$ -Kanälen wurde schon für KChIP3 festgestellt, dessen Expression für eine

PKA-vermittelte Verlangsamung der Inaktivierungskinetik des A-Stroms unabdingbar ist (Schrader et al., 2002). Somit können die Effekte der Kinasen maßgeblich durch die Koexpression von akzessorischen  $\beta$ -Untereinheiten beeinflusst werden.

Phosphorylierung von  $K_v4.2$ -Untereinheiten durch die CaMKII führt hingegen zu einer Steigerung der Anzahl von stabilen Ionenkanälen auf der Zelloberfläche, bei unveränderten biophysikalischen Eigenschaften (Varga et al., 2004). In cerebellären Körnerzellen führt die Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) ebenfalls zu einer Erhöhung der A-Stromamplitude, allerdings nicht durch direkte Phosphorylierung der  $K_v$ -Untereinheiten, sondern durch eine phosphorylierungsabhängige Steigerung der mRNA-Expression (Yao et al., 2012; Yao et al., 2013).

### **1.3.3 Der A-Strom dopaminerger Mittelhirnneurone**

Die Anwesenheit eines A-Stroms in DA Neuronen wurde in mehreren Studien beschrieben (Silva et al., 1990; Liss et al., 1999; Koyama und Appel, 2006b; Krabbe et al., 2008; Lammel, 2008). Eine molekulare Charakterisierung in DA SN Neuronen zeigte, dass dem A-Strom die Expression der langen Splice-Variante der  $K_v4.3$   $\alpha$ -Untereinheit ( $K_v4.3L$ ) sowie den akzessorischen Untereinheiten KChIP3.1 und DPPX zugrunde liegt (Liss et al., 2001; Liss und Roeper, 2004). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Frequenz der spontanen Entladung und die A-Stromdichte eine starke, umgekehrt proportionale lineare Korrelation im gesamten physiologischen Bereich aufweisen. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Spontanfrequenz der einzelnen DA SN Neurone durch die A-Stromdichte reguliert wird (Liss et al., 2001). Dabei ist die Spontanfrequenz umgekehrt proportional zur A-Stromdichte, die wiederum linear von der Anzahl von  $K_v4.3$ - und KChIP3.1-Molekülen abhängig ist (Liss et al., 2001). Die Rolle des A-Stroms für die Spontanfrequenz von DA SN Neuronen konnte durch Blockade des A-Stroms mittels 4-Aminopyridin, die eine Frequenzsteigerung um etwa 25 % auslöste, bestätigt werden (Krabbe, 2008).

Im Gegensatz zu DA SN Neuronen weisen DA VTA Neurone einen A-Strom mit erheblich langsamer Inaktivierungskinetik auf (Liss et al., 2002; Krabbe, 2008; Krabbe et al., 2008). In juvenilen Mäusen konnte gezeigt werden, dass DA

VTA Neurone ebenfalls die  $K_{v4.3L}$   $\alpha$ -Untereinheit exprimieren, zusammen mit folgenden KChIP-Kombinationen: nur KChIP3.1, KChIP1 + 3.1, KChIP3.1 + 4a sowie KChIP1 + 3.1 + 4a (Liss et al., 2002). Die Inaktivierungskinetik des A-Stroms war dabei mit dem Expressionsverhältnis von KChIP4a/KChIP1 assoziiert, so dass Zellen mit einem höheren KChIP4a/KChIP1 Verhältnis einen langsamer inaktivierenden A-Strom aufwiesen (Liss et al., 2002). Eine semiquantitative Analyse der KChIP4-Immunreaktivität deutet ebenfalls auf eine höhere Expression von KChIP4 in der VTA im Vergleich zur SN (Lammel, 2004). Durch Kombination der immunhistochemischen Analyse mit retrogradem Tracing der mesolimbischen und mesocorticalen Projektionsneurone wurde festgestellt, dass mesocorticale Neurone die höchste KChIP4-Immunreaktivität aufwiesen, während die KChIP4-Expression der mesolimbischen Neurone der von nigrostriatalen DA SN Neuronen ähnelte (Lammel, 2004).

Khaliq und Kollegen konnten zeigen, dass bei langsamer Depolarisation des Membranpotentials fast keine A-Ströme vorhanden sind, bei hohen Depolarisationsraten ( $>10$  mV/s), wie sie im Rahmen der Spontanaktivität von DA VTA Neuronen typisch sind, allerdings eine starke Aktivierung von A-Strömen stattfindet. Diese stellt einen sehr wirksamen Feedback-Mechanismus dar, der die Frequenz der Spontanaktivität gering hält (Khaliq und Bean, 2008). Diese postulierte Rolle des A-Stroms für die Spontanfrequenz konnte in retrograd identifizierten mesolimbischen DA VTA Neuronen nicht bestätigt werden, da in diesen Neuronen die Applikation von 4-Aminopyridin keine eindeutige Frequenzänderung auslöste (Krabbe, 2008). Allerdings handelt es sich bei den untersuchten DA VTA Neuronen in den beiden Studien vermutlich um unterschiedliche Subpopulationen.

## 1.4 Zielsetzung

Da die Rolle des langsam inaktivierenden A-Stroms in DA VTA Neuronen noch nicht eindeutig geklärt werden konnte (Khaliq und Bean, 2008; Krabbe, 2008), steht die Untersuchung dessen biophysikalischen Eigenschaften sowie der Einfluss der differentiellen KChIP4-Expression im Fokus der vorliegenden Arbeit. Dabei ergeben sich folgende Fragestellungen, welche durch den Einsatz von KChIP4-defizienten Mäusen untersucht werden sollen:

Welchen Einfluss hat die differentielle KChIP4a-Expression auf die biophysikalischen Eigenschaften des A-Stroms in Subpopulationen von DA Mittelhirnneuronen?

Welche Rolle spielt KChIP4a für die intrinsische Aktivität und die Aktionspotentialparameter von DA Neuronen?

Welche Bedeutung hat die KChIP4a-Expression für die Integration von exzitatorischen und inhibitorischen synaptischen Eingängen?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Versuchstiere

Alle Versuche wurden mit adulten ( $\geq 12$  Wochen alten) männlichen Mäusen durchgeführt. Als Kontrolltiere dienten Tiere des Stammes C57BL/6N, welche von der Firma Charles River (Sulzfeld) bezogen wurden. Die KChIP4-Knock-Out-Tiere (KChIP4-KO) wurden kommerziell bei Lexicon Pharmaceuticals (The Woodlands, USA) in Kooperation mit W. Frank An (Broad Institute of Harvard and MIT, Cambridge, USA) hergestellt. Sie wurden im Sv/129-Stamm generiert und in der universitätsklinikinernen Tierhaltung über sechs Generationen mit Mäusen vom C57BL/6-Stamm rückgekreuzt. Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden Tiere aus einer homozygoten KChIP4-KO Zucht verwendet, die von mfd-Diagnostics GmbH (Wendelsheim) aufrechterhalten wurde. Alle Tiere konnten sich nach ihrem Transport bis zum Beginn der Experimente für mindestens drei Tage erholen. Sie wurden in einem separaten Raum in ventilierten Tierhaltungskontainern (ScantainerClassic, Scanbur Technology A/S, Karlslunde, Dänemark) bei 25 °C, 20–50 % relativer Luftfeuchte sowie einem zwölf Stunden hell/dunkel Zyklus in Gruppen von zwei bis fünf Tieren gehalten. Futter (Standarddiät, Ssniff, Soest) und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung und sie wurden zwei mal pro Woche in saubere Käfige umgesetzt. Die Experimente erfolgten im Rahmen der Tierversuchsgenehmigung V54-19c 20/15-F40/29 (Regierungspräsidium Darmstadt).

#### 2.1.2 Chemikalien und Geräte

Sofern nicht anders angemerkt, stammen Chemikalien von Sigma (Sigma-Aldrich, München). Alle verwendeten Geräte werden im entsprechenden Methodenabschnitt aufgeführt.

## 2.1.3 Lösungen

### 2.1.3.1 Lösungen der *in vitro* Elektrophysiologie

Die artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF) wurde ohne Zugabe der Zucker sowie der divalenten Kationen, als zehnfach konzentrierte Stocklösung in Reinstwasser (Milli-Q Integral Wasseraufbereitungssystem, Merck Millipore, Darmstadt) angesetzt und bei 4 °C aufbewahrt. Am jeweiligen Messtag wurden 100 ml der Stocklösung 1:10 verdünnt, um jeweils 500 ml einfach konzentrierte *Patch*- und Perfusionslösung herzustellen. Neben Glucose sowie Calcium- und Magnesiumchlorid (Konzentrationen siehe Tabelle 2.1), wurde beiden Lösungen Saccharose zur Einstellung der Osmolalität auf 300–315 mOsmol/kg beigefügt. Die niedrigere Calciumkonzentration der Perfusionslösung sowie die Zugabe von Kynurensäure, einem unspezifischen Antagonisten aller ionotroper Glutamat-rezeptoren, diente dem Schutz der Zellen vor glutamaterger Exzitotoxizität. Beide Lösungen wurden zur Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 für mindestens 10 min mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub> / 5 % CO<sub>2</sub>) begast. Die Perfusionslösung wurde anschließend für eine Stunde bei –80°C gelagert, so dass etwa 80 % der Lösung noch flüssig war, während der Rest an der Gefäßwand zu Eis einfro. Mit der eiskalten Lösung erfolgte anschließend die Perfusion und Herstellung der Hirnschnitte (siehe Abschnitt 2.2.1).

Die Charakterisierung der A-Strom-Eigenschaften, die Grundcharakterisierung der DA Zellen sowie die Injektion künstlicher synaptischer Ströme wurden unter Blockade ionotroper glutamaterger sowie GABAerger synaptischer Eingänge durchgeführt, unter der Verwendung des AMPA-R-Antagonisten CNQX bzw. des GABA<sub>A</sub>-R-Antagonisten SR 95531 (Gabazine). Die Messung evozierter GABAerger Ströme wurde ohne Gabazine durchgeführt, aber unter zusätzlicher Gabe von DL-AP5 sowie Mecamylamin, zur Blockade von NMDA- bzw. ionotroper Acetylcholinrezeptoren (nAChR). Die Wirkung physiologischer GABAerger synaptischer Eingänge auf die zelluläre Aktivität wurde durch iontophoretische GABA-Applikation durchgeführt, unter Zugabe von CNQX.



<b>Chemikalie</b>	<b>ACSF Perfusion</b>	<b>ACSF Patch</b>
	mM	mM
NaCl	125	125
KCl	2,5	2,5
MgCl <sub>2</sub>	6,174	2,058
CaCl <sub>2</sub>	0,1	2
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25	1,25
NaHCO <sub>3</sub>	25	25
Glucose	2,5	2,5
Saccharose	50	22,5
Kynurensäure	3	/

**Tabelle 2.1: ACSF-Lösungen der *in vitro* Elektrophysiologie**

Alle Pharmaka wurden als Stocklösungen in Reinstwasser oder DMSO angesetzt (siehe Tabelle 2.2), anschließend aliquotiert und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Am jeweiligen Messtag wurden die Aliquots aufgetaut und zur *Patch*-Lösung hinzugefügt, um die gewünschte Endkonzentration zu erreichen.

<b>Pharmakon</b>	<b>Zielrezeptor</b>	<b>Lösungsmittel</b>	<b>Endkonzentration</b>
			$\mu\text{M}$
CNQX	AMPA/Kainat	Wasser	12,5
DL-AP5	NMDA-R	Wasser	50
SR 95531	GABA <sub>A</sub> R	Wasser	4
CGP55845	GABA <sub>B</sub> R	DMSO	1
Mecamylamin	nAChR	Wasser	10
Sulpirid	D2R	DMSO	1

**Tabelle 2.2: Eingesetzte Rezeptor-Pharmaka**  
(Tocris Bioscience, Bristol, Großbritannien)

Die Pipettenlösungen für die *Patch-Clamp* Messungen wurden mit Wasser zu Injektionszwecken (*Aqua ad injectabilia*, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) hergestellt, der pH-Wert mit KOH bzw. bei der Lösung für die Messung synaptischer Ströme mit CsOH auf 7,35 eingestellt und als Stock bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$

aufbewahrt. Nach Zugabe von Mg-ATP und Li-GTP sowie Neurobiotin lag die Osmolalität bei 270–300 mOsmol/kg und der pH-Wert wurde erneut auf 7,35 eingestellt. Die gebrauchsfertigen Lösungen wurden in kleinen Aliquots bei –20 °C eingefroren, wo sie bis zu ihrer Verwendung aufbewahrt wurden. An jedem Messtag wurde die entsprechende Menge aufgetaut und vor der Verwendung durch einen Filter geleitet (Filter mit Porengröße 0,2 µm, Nalgene®, Thermo Fischer Scientific, Langenselbold) um mögliche Partikel, welche die feinen *Patch*-Pipettenspitzen verstopfen könnten, zu entfernen.

Standard interne Lösung		Lösung für synaptische Ströme	
Chemikalie	Konzentration	Chemikalie	Konzentration
	mM		mM
KGlu	135	CsCl	140
KCl	5	EGTA	0,1
EGTA	0,1	HEPES	10
HEPES	10	MgCl <sub>2</sub>	1
MgCl <sub>2</sub>	2	QX-314	1
LiGTP	0,1	LiGTP	0,2
MgATP	5	MgATP	2
Neurobiotin	1mg/ml	Neurobiotin	1mg/ml

**Tabelle 2.3: Pipettenlösungen der *in vitro* Elektrophysiologie**

Für die iontophoretische GABA-Applikation wurde GABA in einer Konzentration von 10 mM in ACSF (Harvard Apparatus, Holliston, USA) gelöst und der pH-Wert mit HCl auf 4 eingestellt. Die Lösung wurde in Aliquots eingefroren, unmittelbar vor ihrer Verwendung aufgetaut und durch einen Nylonfilter mit Porengröße 0,2 µm (Nalgene®) in die Micropipetten gefüllt.

### 2.1.3.2 Lösungen der Immunhistochemie

Die Fixierungslösung sowie alle Pufferlösungen der Immunhistochemie wurden wöchentlich frisch hergestellt. Aliquots von in PBS gelöstem Triton X-100 für *Blocking*- und *Carrier*-Lösungen sowie BSA (bovines Serumalbumin) wurden bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert, bei Bedarf aufgetaut und in den entsprechenden Konzentrationen eingesetzt.

<b>Chemikalie</b>	<b>Konzentration</b>
<b>Fixierungslösung</b> (in Reinstwasser, pH 7,4)	
Paraformaldehyd	4 %
Pikrinsäure	15 %
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	0,1 M
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0,1 M
<b>Aufbewahrungslösung</b> (in PBS, pH 7,4)	
Sucrose	10 %
$\text{NaN}_3$	0,05 %
<b>PBS</b> (Tabletten von Sigma, in Reinstwasser, pH 7,4)	
$\text{NaCl}$	137 mM
$\text{KCl}$	2,7 mM
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	10 mM
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	10 mM
<b>Blocking-Lösung</b> (in PBS, pH 7,4)	
Pferdeserum (Vector Laboratories, Burlingame, Kanada)	10 %
BSA	0,2 %
Triton X-100	0,5 %
<b>Carrier-Lösung</b> (in PBS, pH 7,4)	
Pferdeserum	1 %
BSA	0,2 %
Triton X-100	0,5 %

**Tabelle 2.4: Lösungen der Immunhistochemie**

### 2.1.3.3 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe wurden aliquotiert, bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert und unmittelbar vor ihrer Verwendung in der entsprechenden Konzentration in *Carrier*-Lösung verdünnt.

---

Antikörper	Host-Spezies	Verdünnung	Firma
anti-Tyrosinhydroxylase	Kaninchen	1:1000	Merck, Darmstadt
Alexa Fluor anti-rabbit 568	Ziege	1:750	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Streptavidin 488		1:1000	Life Technologies GmbH, Darmstadt

---

**Tabelle 2.5: Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe der Immunhistochemie**

## 2.2 *In vitro* Elektrophysiologie

### 2.2.1 Gewinnung akuter Hirnschnitte

Für die *in vitro* Elektrophysiologie wurden akute Hirnschnitte angefertigt. Dafür wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Injektion von Ketamin (400 mg/kg Körpergewicht, Ketavet®, 100 mg/ml, Pfizer, Karlsruhe) und Medetomidin (4 mg/kg Körpergewicht, Domitor®, 1 mg/ml, Orion Corporation, Espoo, Finnland) anästhesiert und die Tiefe der Narkose durch Auslösen des Zwischenzehenreflexes durch Klemmen der Zehenzwischenhaut mit einer Pinzette überprüft. Nach Erlöschen der Reflexe wurde das Tier an den Vorder- und Hinterläufen auf einer Styroporunterlage fixiert. Der Thorax wurde geöffnet, das Herz vorsichtig freigelegt und nach Abklemmen der Aorta descendens oberhalb der Leber 50  $\mu\text{l}$  Heparin (Heparin-Natrium, 25.000-ratiopharm, Ratiopharm, Ulm) in die linke Herzkammer des noch schlagenden Herzens injiziert, um die Blutgerinnung zu unterbinden. Die eiskalte ACSF-Perfusionslösung (siehe Tabelle 2.1) wurde mit Hilfe einer Schlauchpumpe (Ismatec, Zürich, Schweiz) mit einer Flussrate von etwa 15 ml/min durch die

linke Herzkammer in den Blutkreislauf eingeleitet, während für den venösen Abfluss der rechte Vorhof geöffnet wurde. Nach der etwa dreiminütigen transcordialen Perfusion wurde die Maus dekapitiert, das Gehirn vorsichtig herauspräpariert und das Kleinhirn sowie der rostrale Teil des Gehirns (etwa auf Höhe des Striatums) mit einer Rasierklinge abgetrennt und verworfen. Der Gewebblock wurde mit der vorderen Anschnittsfläche mit Sekundenkleber auf die Objektträgerplatte eines Vibratoms (Leica VT1200, Wetzlar) geklebt und in die Eiswanne platziert. Die restliche Perfusionslösung und das entstandene Eis wurden in einem Mixer püriert, bis keine großen Eistücke mehr vorhanden waren. Die Eislösung wurde dann vorsichtig um den Gewebblock gegossen, sodass dieser komplett davon umgeben war. Anschließend wurden von dorsal nach ventral 250 µm dicke Coronarschnitte des Mittelhirns angefertigt (Klingen: Camden Instruments Ltd., Loughborough, Großbritannien), welche bei 37 °C in carbogener ACSF-Patch-Lösung für 90 Minuten sowie anschließend bei Raumtemperatur (21–23°C) bis zum Beginn der Messung inkubiert wurden.

### **2.2.2 Die *Patch-Clamp* Technik**

Bert Sakmann und Erwin Neher gelang es Mitte der Siebzigerjahre, durch die Verwendung stumpfer, relativ großer Glaspipetten einen hohen Abdichtwiderstand (sog. Gigaseal) zwischen der Pipette und des unter ihr liegenden Zellmembranstücks zu erreichen (Neher und Sakmann, 1976). Durch die resultierende Verminderung des Rauschens, konnten damit zum ersten Mal Einzelkanalströme im pA-Bereich gemessen werden. Die Weiterentwicklung dieser Methode und ihre Kombination mit der sog. Spannungsklemme erbrachte ihnen 1991 den Nobelpreis in Physiologie und Medizin und wurde als Grundmethode für die Messungen dieser Arbeit eingesetzt.

Mit der, im Englischen als *Voltage-Clamp* bezeichneten, Spannungsklemme können Ströme, die über eine Membran fließen gemessen werden, indem die Spannung über der Zellmembran registriert und mit dem gewünschten Wert – der Sollspannung – verglichen wird. Der Unterschied der beiden Spannungen aktiviert einen Rückkopplungsmechanismus, der einen dem Membranstrom entgegengerichteten Strom in die Zelle injiziert, so dass die Membranspannung

an die Sollspannung angepasst wird. Dieser Kompensationsstrom wird registriert und gibt Rückschluss über die Leitfähigkeit der Zellmembran.

Zusätzlich kann durch einen weiteren Stromkreis die Spannung über der Zellmembran gemessen werden, während Strom in die Zelle injiziert wird. Dieser als *Current-Clamp* bezeichnete Modus ermöglicht eine Beobachtung der spontanen Aktivität der Zelle oder der Veränderung des Potentials durch die Aktivierung exzitatorischer oder inhibitorischer synaptischer Eingänge.

### **2.2.3 Der *Patch-Clamp* Messplatz**

Die für *Voltage-* und *Current-Clamp* Messungen nötigen Schaltkreise befanden sich im Vorverstärker (HEKA Elektronik, Lambrecht), an welchem ein Elektrodenhalter mit Silberdrahtelektrode angebracht war. Mit Hilfe eines ferngesteuerten Mikromanipulators (Mini 25, Luigs & Neumann, Ratingen) konnte die Position der *Patch*-Elektrode in der X-, Y- und Z-Achse beliebig gesteuert werden. Das System verfügte ebenfalls über einen zweiten Mikromanipulator, mit dem eine zweite Elektrode (Stimulationselektrode, Iontophorese-Mikropipette) gelenkt werden konnte.

Die Signalverstärkung, -filterung und -digitalisierung erfolgte über einen an den Vorverstärker angeschlossenen Hauptverstärker (EPC 10 USB Double, HEKA Elektronik), welcher über einen Rechner (Mac Pro, Apple Inc.; Prozessor: 2,66 GHz Quad Core, Intel Xeon, Intel Corporation, Santa Clara, USA) mit Hilfe des dazugehörigen Aquisitionsprogramms PatchMaster (Version 2x67, HEKA Elektronik, Lambrecht) gesteuert werden konnte. Die Daten wurden mit einem Bessel-Tiefpassfilter (10 bzw. 5 kHz) gefiltert und je nach gemessenem Parameter mit einer Digitalisierungsfrequenz von 10 bis 50 kHz aufgenommen.

Die für die Messungen benötigten Pipetten wurden mit einem horizontalen Pipettenziehgerät (DMZ-Universal Puller, Zeitz, Martinsried) aus Borosilicatkapillaren mit Filament (GC150TF-10, Außendurchmesser: 1,5 mm; Innendurchmesser: 1,17 mm, Harvard Apparatus, Edenbridge, Großbritannien) hergestellt und mit Hilfe einer Injektionsnadel aus Plastik (MicroFil, WPI, Sarasota, USA) von hinten mit der entsprechenden internen Lösung gefüllt. Der Widerstand der

Pipetten wurde durch Veränderung des Hitze-Wertes (H) des Ziehprotokolls für die Bedürfnisse des jeweiligen Experiments eingestellt (siehe Tabelle 2.6).

<b>P(A)</b>				<b>P(B)</b>			
H	400	t(F1)	000	H	400–800	t(F1)	090
F(TH)	016	F1	000	F(TH)	018	F1	140
S(TH)	019	s(F2)	000	S(TH)	010	s(F2)	002
t(H)	050	F2	000	t(H)	030	F2	145
s(H)	046	AD	121	s(H)	000	AD	045

**Tabelle 2.6:** Parameter des Pipettenziehgeräts zur Herstellung von *Patch-Clamp* Pipetten



**Abbildung 2.1:** Der *Patch-Clamp* Messplatz

Mess- und Referenzelektrode wurden täglich vor Beginn der Messungen in Natriumhypochlorid-Lösung chloriert. Die gleichmäßige Beschichtung der Silberelektroden mit AgCl ist Voraussetzung zum einen für den stabilen Elektronenfluss, durch die reversible Reaktion  $\text{AgCl} + e^- \rightleftharpoons \text{Ag} + \text{Cl}^-$  und zum anderen für die Minimierung von Offsetpotentialen. Letztere entstehen, wenn das

Potential an den Grenzflächen zwischen Mess- bzw. Referenzelektroden und der Badlösung unterschiedlich ist, z. B. auf Grund des Abtragens der AgCl-Schicht der Messelektrode durch den wiederholten Wechsel der Pipetten. Außerdem können Offsetpotentiale durch Polarisierung der Elektroden entstehen, indem Kationen an der negativen Elektrode und Anionen an der positiven Elektrode akkumulieren.

Die Hirnschnitte wurden zur Messung in eine beheizbare Badkammer (Badcontroller, Luigs & Neumann) eines aufrechten BX51WI Mikroskops (Olympus, Hamburg) überführt, mit einem Gitter aus Platindraht und Nylonfäden fixiert und durch eine Schlauchpumpe (Ismatec, Wertheim) mit ACSF-*Patch*-Lösung mit einer Flussrate von etwa 2 ml/min kontinuierlich umspült. Die Visualisierung erfolgte an einem LCD Monitor (Samsung Syncmaster) über eine angeschlossene Infrarot-CCD-Kamera (VX-55, Till Photonics, Gräfelfing). Zur Lokalisation der relevanten Regionen wurde eine vierfache Vergrößerung (UPlan FL N, 4x/0.13, Olympus) genutzt, während eine vierzigfache Vergrößerung (LUMPlan FI/IR 40x/0.80W, Olympus) mit differentiellm Interferenzkontrast und vorschaltbarer zweifacher Kameralinse (Olympus) der Auflösung auf Einzelzellebene diene. Das Mikroskop verfügte über eine ferngesteuerte Motorisierung (Luigs & Neumann), mit welcher dessen Fokusebene und Position zur Badkammer in der XY-Ebene verändert werden konnte. Zur Dämpfung von mechanischen Schwingungen wurde ein Tisch mit aktiver Vibrationsisolierung genutzt (Active Workstation 780–360, Halcyonics, Göttingen), auf dem alle Komponenten des Messstandes montiert wurden. Der elektromagnetischen Abschirmung diene ein ihn umgebender Faraday-Käfig (institutsinterne Werkstatt) (siehe Abbildung 2.1). Zusätzlich wurden verschiedene Komponenten nach Bedarf an eine Erdung angeschlossen, um weitere elektrische Interferenzen zu beheben.

Mit interner Lösung gefüllte Pipetten wurden an den Elektrodenhalter des Vorverstärkers angebracht. Der Pipettenwiderstand wurde mit Hilfe des Ohm'schen Gesetzes ( $R=U/I$ ) über einen Rechteckpuls von 5 mV (Test-Puls) und der daraus resultierenden Stromantwort bestimmt und betrug je nach Experiment 3,0–4,5 M $\Omega$ .



Der durch ein angeschlossenes Drucksystem angelegte Überdruck verhinderte das Verstopfen der Glaspipette, während diese mit Hilfe des Mikromanipulators unter Sichtkontrolle in den Hirnschnitt und an die Zellen herangeführt wurde. DA Neurone der SN und VTA wurden anhand ihrer Lage und Form identifiziert. Das Offsetpotential, welches zum einen an den Grenzflächen zwischen der Elektroden und den sie umspülenden Lösungen und zum anderen durch die unterschiedliche Beweglichkeit der Ionen an der Grenzfläche zwischen Pipetten- und Badlösung (*liquid junction* Potential) entsteht, wurde unmittelbar vor Kontaktaufnahme mit der Zellmembran auf Null eingestellt. Der Wert für das *liquid junction* Potential wurde mit Hilfe des *Patcher's Power Tools* Plugin (PPT XOP, Version 2.18, Max Planck Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) berechnet und betrug für die Standard-interne Lösung etwa 15 mV (Neher, 1992; Barry, 1994).

Nach der Äquilibration von Cytoplasma und Pipettenlösung (s. u.) ist kein *liquid junction* Potential mehr vorhanden, da der Intrazellulärraum mit der Pipettenlösung gefüllt wird, so dass das angelegte Potential in Wirklichkeit um 15 mV negativer ist, als in den *Voltage-Clamp* Protokollen angegeben. Da für alle Experimente stets die gleichen Bad- und Pipettenlösungen verwendet wurden, wurde auf eine nachträgliche Korrektur der Daten um das *liquid junction* Potential verzichtet.

Nachdem die Pipette in unmittelbarer Nähe der Zellmembran herangeführt wurde, wurde durch Ausschalten des Überdrucks sowie durch leichtes Ansaugen der Membran eine enge Verbindung zwischen Glaskapillare und Membran erzeugt. Der Abfall der Stromantwort auf den Testpuls deutete dabei auf die Erhöhung des Widerstandes hin, welcher im Optimalfall im G $\Omega$ -Bereich lag (sog. Gigaseal). Das Erreichen dieser, als On-Cell bezeichneter Konfiguration war essentiell für die Stabilität der weiteren Messung.

Der schnelle, kapazitive Strom, welcher durch die Umladung der Pipette resultierte, wurde mit Hilfe des Patchmaster-Programms korrigiert. Danach wurde durch kurzes, starkes Ansaugen der Membranfleck unter der Pipettenöffnung aufgebrochen, ohne dabei die hochohmige Verbindung zwischen Pipette und Zelle zu lösen. Damit wurde der Zugang zum Zytoplasma gewährleistet – eine Konfiguration, die als Ganzzelleableitung (engl.: *Whole-Cell*)

bezeichnet wird. Durch das resultierende Füllen des Zellinneren mit neurobiotinhaltiger Pipettenlösung, konnte nach Beendigung der Messungen die Lage sowie der dopaminerge Phänotyp der gemessenen Zelle histologisch überprüft werden (siehe Abschnitt 2.3.1). Die Messungen wurden etwa 30 s nach dem Erzielen der *Whole-Cell* Konfiguration begonnen, um sicher zu stellen, dass der Äquilibrationsprozess des intrazellulären Milieus mit der Pipettenlösung möglichst abgeschlossen war (Fenwick et al., 1982). Der zeitliche Verlauf bis zum Erreichen des Diffusionsgleichgewichts hängt von der Größe der Pipettenöffnung sowie dem Cytoplasmavolumens ab und ist für kleine Moleküle wie Ionen schneller als für Proteine (Ogden und Stanfield, 1994).

Der langsame kapazitive Strom, der für die Umladung der Zellmembran nötig ist, wurde ebenfalls kompensiert und da biologische Membranen eine spezifische Kapazität von etwa  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  besitzen, konnte durch die Membrankapazität die Zellgröße geschätzt werden (Gentet et al., 2000). Bei der Kompensation kann nur die dominante, monoexponentielle Komponente berücksichtigt werden, die durch die Membrankapazität des Zellkörpers resultiert. Die fehlende Kompensation der Membrankapazität der neuronalen Fortsätze hat eine zeitlich verzögerte Umladung von distalen Membranbereichen zur Folge, die zu einer Verfälschung der Strommessungen in der *Voltage-Clamp* Konfiguration führt.

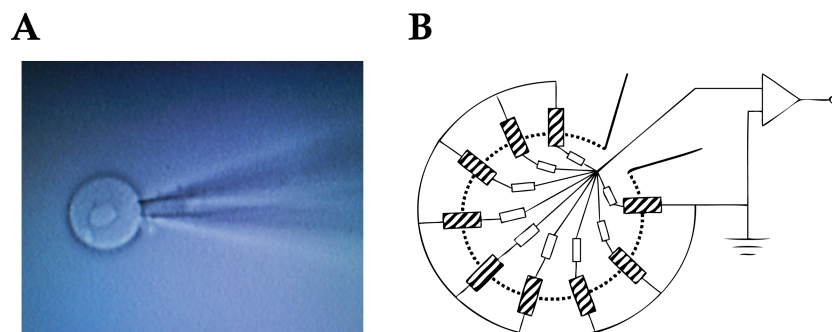
Der Serienwiderstand, der den Zugangswiderstand zur Zelle darstellt, wurde in *Voltage-Clamp* Messungen um etwa 70 % kompensiert. Im Idealfall entspricht er dem Pipettenwiderstand, kann aber durch Ansaugen von Membranfragmenten während des Öffnens der Zelle erhöht werden. Wird der Serienwiderstand nicht kompensiert, fällt ein Teil der angelegten Spannung über den Serienwiderstand und nicht über den Membranwiderstand ab. Dies führt zu einer Verfälschung der Kommandospannung um einen Wert, der laut dem Ohm'schen Gesetz proportional zum gemessenen Strom ist. Ein unkompensierter Widerstand von z. B.  $10 \text{ M}\Omega$  würde die angelegte Spannung bei einem Spannungssprung von  $-100$  auf  $-40 \text{ mV}$ , welcher einen  $1 \text{ nA}$  großen Strom verursacht, um  $10 \text{ mV}$  verfälschen. Für diese Arbeit wurden deshalb grundsätzlich nur *Voltage-Clamp* Messungen von Zellen verwendet, deren unkompensierter Serienwiderstand weniger als  $25 \text{ M}\Omega$  betrug. Die Grundcharakterisierung der DA SN und VTA Zellen sowie die Untersuchung synaptischer Ströme wurden in der *Whole-Cell*

Konfiguration durchgeführt, während die Charakterisierung der biophysikalischen A-Strom-Eigenschaften an von der Zelle exzidierten, den Zellkern umgebenden Membranstücken (engl.: *nucleated outside-out Patches*, siehe Abschnitt 2.2.4) untersucht wurden.

#### **2.2.4 Voltage-Clamp Messungen in der *nucleated outside-out* Konfiguration**

In runden, nicht verzweigten Zellen ist ein relativ guter Ionenfluss im Cytoplasma gewährleistet, sodass der intrazelluläre Widerstand im Vergleich zum Membranwiderstand vernachlässigt werden kann und die gesamte Spannung effektiv über dem Membranwiderstand abfällt. Bei stark verzweigten Zellen hingegen wirken die langgezogenen, mit Cytoplasma gefüllten Fortsätze wie intrazelluläre, in Serie geschaltete Widerstände, die mit steigender Länge der Fortsätze größer werden und den Ionenfluss erschweren. Wird der Wert dieser Widerstände vergleichbar groß zum Membranwiderstand, so fällt ein signifikanter Teil der Spannung über diesen Widerständen ab und führt zu einer unzureichenden Kontrolle des Potentials der distalen Teile der Zelle. Bei spontanaktiven Zellen, wie den DA Neuronen, können trotz Spannungsklemme Aktionspotentiale entstehen, welche den Ablauf der *Voltage-Clamp* Protokolle stören und eine verlässliche Charakterisierung von spannungsabhängigen Kanälen unmöglich machen. Zusätzlich besteht das sog. *space clamp* Problem, welches durch die Kapazität von langen und dünnen Fortsätzen entsteht und zu einer zeitlichen Verzögerung der Umladung von distalen Membransegmenten führt. Diese Probleme können durch das Generieren von zellfreien Membranstücken (engl. *Patches*) umgangen werden (Sather et al., 1992). Dafür wird ausgehend vom *Whole-Cell* Modus die Pipette langsam von der Zelle zurückgezogen, so dass ein Teil der Zellmembran sich von der Zelle löst und um die Pipettenöffnung eine Art Halbvesikel bildet. Diese Konfiguration wird als *outside-out* (Außenseite außen) bezeichnet, da die Außenseite der Zellmembran der Badlösung ausgesetzt ist. Dies löst zwar das Problem der schlechten Spannungskontrolle, hat aber durch die geringe Größe des isolierten Membranstückes relativ kleine Stromamplituden zur Folge. Außerdem können Ionenkanaleigenschaften in zellfreien Konfigurationen

verändert sein, wenn z. B. Ionenkanäle von ihren intrazellulären regulatorischen Proteinpartnern oder intrazellulären *Second-Messenger*-Systemen getrennt werden. Eine Kombination der beiden oben genannten Konfigurationen findet sich in den sogenannten *nucleated outside-out Patches*, die in dieser Arbeit für die Charakterisierung der A-Strom Eigenschaften angewandt wurden. Dafür wurden Pipetten mit einer größeren Öffnung verwendet, deren Widerstand etwa  $3,15\text{ M}\Omega$  betrug, so dass der Zellkern leicht an oder in die Pipettenöffnung angesaugt werden konnte (siehe Abbildung 2.2 A). Anschließend wurde der Zellkern mit der Pipette behutsam und unter Sichtkontrolle vom Zellkörper zurückgezogen, bis sich die Membran um den Zellkern schloss. Die Pipette wurde weiter nach oben bewegt, bis sie komplett aus dem Hirnschnitt entfernt war und der resultierende *outside-out Patch* keinen Kontakt zur Ursprungszelle hatte. Das so exzidierte Membranstück war größer als bei einem „kernlosen“ *outside-out Patch*, beinhaltete somit mehr Ionenkanäle und erzeugte höhere Stromamplituden, während gleichzeitig die Spannung, im Gegensatz zu einer verzweigten Zelle, gut geklemmt werden konnte.



**Abbildung 2.2: Nucleated outside-out Patches**

**A:** Bild eines *nucleated outside-out Patch*. **B:** Schematische Darstellung des elektrischen Schaltkreises der *nucleated outside-out* Konfiguration. Weiße Rechtecke: intrazelluläre Widerstände, schraffierte Rechtecke: Membranwiderstand (modifiziert nach Molleman, 2003).

War ein stabiler *nucleated outside-out Patch* gelungen, wurden die langsame kapazitive Komponente (etwa  $1\text{ pF}$ ) und der Serienwiderstand (etwa  $15\text{ M}\Omega$ , Kompensation: 70 %) kompensiert und die Messung begonnen. Da die Kinetik von Ionenkanälen mit steigender Temperatur schneller wird, wurden die Messungen zur besseren Auflösung bei Raumtemperatur ( $21\text{--}23^\circ\text{C}$ ) durchgeführt.

Der im Hirnschnitt verbliebene Zellkörper wurde während der Nucleusextraktion mit Neurobiotin gefüllt, so dass die Lage und der DA Phänotyp der Zelle trotz der Zellkernextraktion immunhistochemisch bestätigt werden konnte (siehe Abschnitt 2.3.1).

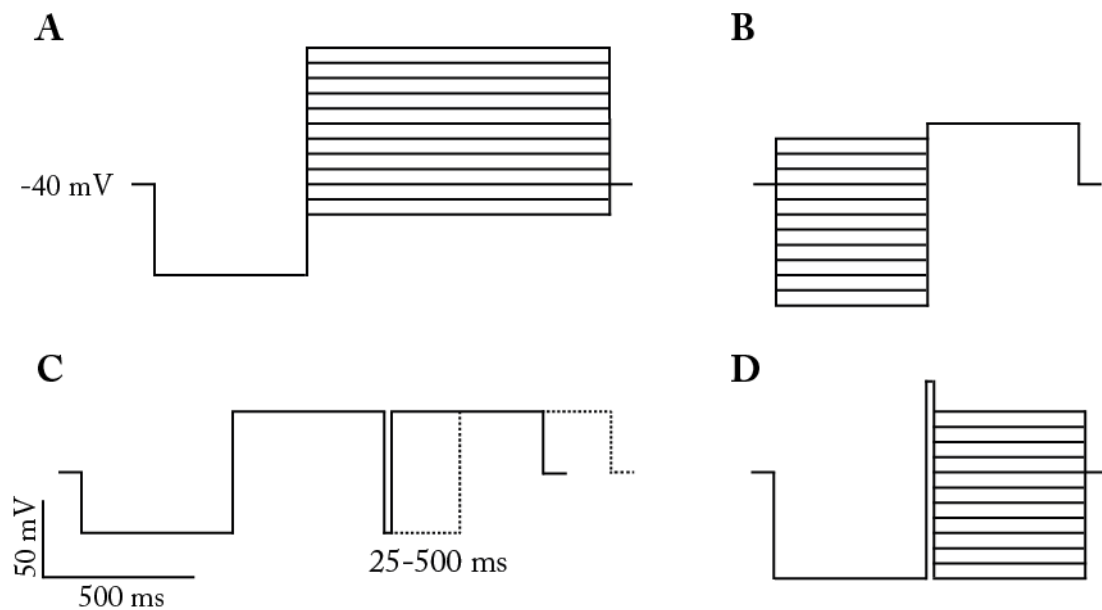
#### **2.2.4.1 Voltage-Clamp Protokolle**

Um die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung des A-Stroms zu untersuchen, wurde die Membran ausgehend von einem Haltepotential von  $-40$  mV mit einem  $500$  ms langen Präpuls auf  $-100$  mV hyperpolarisiert, so dass alle A-Typ Kaliumkanäle sich aus der Inaktivierung erholen konnten. Der nachfolgende  $500$  bzw.  $1000$  ms lange Testpuls auf  $-60$  mV, welcher sequenziell in  $10$  mV Schritten bis hin zu  $+50$  mV erhöht wurde, diente der Aktivierung des A-Stroms (siehe Abbildung 2.3 A). Der A-Strom manifestiert sich unter den oben genannten Bedingungen als Auswärtsstrom, und wird somit als positiver Ausschlag dargestellt. Aus den Stromantworten des Aktivierungsprotokolls wurde außerdem die Inaktivierungskinetik des A-Stroms bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.4.2).

Für die *Steady-State* Inaktivierungskurve wurde das Potential vom Präpuls in  $10$  mV Schritten von  $-120$  mV bis  $-10$  mV variiert, gefolgt von einem konstanten Spannungssprung auf  $+40$  mV (siehe Abbildung 2.3 B).

Für die Erholung aus der Inaktivierung wurde ein Doppelpulsprotokoll verwendet (siehe Abbildung 2.3 C). Nach einem Präpuls auf  $-80$  mV wurde ein erster Testpuls auf  $+40$  mV generiert, gefolgt von einer erneuten Hyperpolarisation auf  $-80$  mV mit einer variablen Dauer von  $25$  bis  $500$  ms, während der sich die Kanäle aus der Inaktivierung erholen konnten. Durch den zweiten Testpuls auf  $+40$  mV wurden die Kanäle zum Teil erneut aktiviert, wobei aus dem Verhältnis der Amplituden der beiden Testpulse die Geschwindigkeit der Erholung aus der Inaktivierung ermittelt wurde.

Um das Umkehrpotential des A-Stroms zu bestimmen wurde ein Deaktivierungsprotokoll durchgeführt (siehe Abbildung 2.3 D).



**Abbildung 2.3: Voltage-Clamp Protokolle zur Charakterisierung des A-Stroms**

Alle Protokolle wurden ab einem Haltepotential von  $-40$  mV ausgelöst. **A:** Aktivierungsprotokoll. **B:** Inaktivierungsprotokoll. **C:** Doppelpulsprotokoll zur Bestimmung der Erholung aus der Inaktivierung, **D:** Doppelpulsprotokoll zur Bestimmung des  $K^+$ -Gleichgewichtspotentials.

#### 2.2.4.2 Auswertung der Voltage-Clamp Messungen zur $I_A$ -Charakterisierung

##### Kinetik der Inaktivierung

Der Zeitverlauf der Inaktivierung des A-Stroms wurde in Igor Pro durch mit einer einfachen Exponentialfunktion gefittet, welche mit folgender Formel beschrieben werden kann:

$$f(t) = I_{\max} \cdot e^{-t/\tau_{\text{inac}}}$$

$I_{\max}$ : Stromamplitude;  $\tau_{\text{inac}}$ : Zeitkonstante der Inaktivierung

Die Zeitkonstante der Inaktivierung wurde an der Stromantwort auf den Spannungssprung auf  $-30$  mV des Aktivierungsprotokolls bestimmt, da bei diesem Potential der *delayed rectifier* Strom noch nicht aktiviert war und somit ein reiner A-Strom betrachtet werden konnte.

### ***Steady-State* Aktivierungs- und Inaktivierungskurven**

Für die *Steady-State* Aktivierungskurve wurde die Amplitude des Stroms gemessen, der durch die Potentialschritte auf  $-60$  bis  $+10$  mV ausgelöst wurde. Da bei Potentialen von über  $-20$  mV zusätzlich zum A-Strom auch eine leichte Aktivierung des *delayed rectifiers* zu beobachten war, wurde der gemittelte Plateau-Strom über die letzten 100 ms des Protokolls ( $I_{\text{Steady-State}}$ ) von dem initialen Strom abgezogen, um den reinen A-Strom zu ermitteln. Da bei verschiedenen Potentialen die Triebkraft für die den A-Strom ( $I_A$ ) tragenden Kaliumionen unterschiedlich ist und somit einen Einfluss auf die Amplitude des Stroms hat, wurde aus dem gemessenen Strom mit Hilfe des Ohm'schen Gesetzes die Leitfähigkeit ( $G$ ) für jeden Spannungssprung ( $U_m$ ) bestimmt. Dafür wurde folgende Formel verwendet:

$$G = \frac{I_K}{U_m - E_K}$$

Hierfür wurde das Kalium-Gleichgewichtspotential ( $E_K$ ) über ein Deaktivierungsprotokoll bestimmt. Definitionsgemäß beschreibt  $E_K$  das Potential, bei welchem kein Strom fließt, oder der Auswärtsstrom seine Richtung ändert und zu einem Einwärtsstrom wird und lag bei den Messungen bei  $-60$  mV. Die Diskrepanz des gemessenen vom mit Hilfe der Nernstgleichung errechneten  $E_K$ , welches bei  $-100$  mV liegt, lässt sich zum einen dadurch erklären, dass durch die verwendeten Lösungen ein *liquid junction* Potential von etwa 15 mV vorliegt. Somit handelt es sich bei einem gemessenem Potential von  $-60$  mV in Wirklichkeit um  $-75$  mV. Des Weiteren könnte die Ursache für das positivere Umkehrpotential eine potentielle Leitfähigkeit des A-Typ Kaliumkanals für Natriumionen sein (Sah et al., 1988; Bekkers, 2000). Außerdem kann die wiederholte Aktivierung von Kaliumkanälen und dem resultierenden Kaliumauswärtsstrom eine Akkumulation von Kaliumionen an der Außenseite der Membran verursachen, so dass die erhöhte Kaliumkonzentration zu einer Verschiebung von  $E_K$  zu positiveren Potentialen führt (Sykova et al., 1976; Cleemann und Morad, 1979).

Die ermittelte Leitfähigkeit wurde über dem entsprechenden Potential aufgetragen und für die resultierende Kurve in Igor Pro ein Boltzmann-Fit mit folgender Formel durchgeführt:

$$f(V) = \frac{G_{\max}}{1 + e^{\frac{V_{50} - V}{k}}}$$

Beim Potential  $V_{50}$  sind 50 % der Kanäle aktiviert,  $k$  beschreibt die Steilheit der sigmoidalen Kurve. Um die mittlere Kurve aus einer Zellgruppe abzuleiten, wurde für jede Zelle der Wert für die Leitfähigkeit auf die maximale Leitfähigkeit ( $G_{\max}$ ) der jeweiligen Zelle normiert, so dass eine Variante der Funktion mit  $G_{\max} = 1$  bestimmt werden konnte.

Außerdem wurde der prozentuale Anteil der verbleibenden Leitfähigkeit nach der Inaktivierung ( $G_{\text{Steady-State}}$ ), im Bezug auf die absolute Maximalleitfähigkeit (ohne Abzug von  $G_{\text{Steady-State}}$ ) bestimmt.

Mit einer ähnlichen Vorgehensweise wurde die Kurve der *Steady-State* Inaktivierung bestimmt. Hierfür konnte statt der Leitfähigkeit der Wert des Stroms verwendet werden, da der den A-Strom aktivierender Spannungspuls immer das gleiche Potential hatte, während das Potential des Vorpulses von  $-120$  auf  $-10$  mV variiert wurde. Erneut wurde der Strom gegen das entsprechende Potential aufgetragen und nach einem Boltzmann-Fit und der Normalisierung auf den Maximalstrom mit Hilfe von einem zweiten Boltzmann-Fit die Werte für  $V_{50}$  und  $k$  bestimmt. Der  $V_{50}$ -Wert der Inaktivierung gibt das Potential an, bei welchem sich 50 % der Kanäle im geschlossenen, aber aktivierbaren Zustand befinden, während der Rest in der geschlossenen, nicht-aktivierbaren Konformation vorliegt.

### **Erholung aus der Inaktivierung**

Die Erholung aus der Inaktivierung wurde durch ein Doppelpulsprotokoll untersucht. Mit dessen Hilfe kann bestimmt werden, wie lange das Membranpotential nach der Inaktivierung des Kanals bei einem negativen Potential liegen muss, um den Kanal in den geschlossenen, aktivierbaren Zustand zurückzuführen. Hierfür wurde die Amplitude der Stromantwort auf die beiden



Aktivierungspulse bestimmt, wobei der Wert des ersten Pulses als Maximalstrom diente, auf den die Stromamplitude des zweiten Pulses normiert wurde. Dieser relative Strom wurde über dem entsprechenden Interpuls-Intervall aufgetragen und die Erholung aus der Inaktivierung wurde mit folgender exponentiellen Funktion gefittet:

$$f(t) = 1 - e^{-t/\tau_{rec}}$$

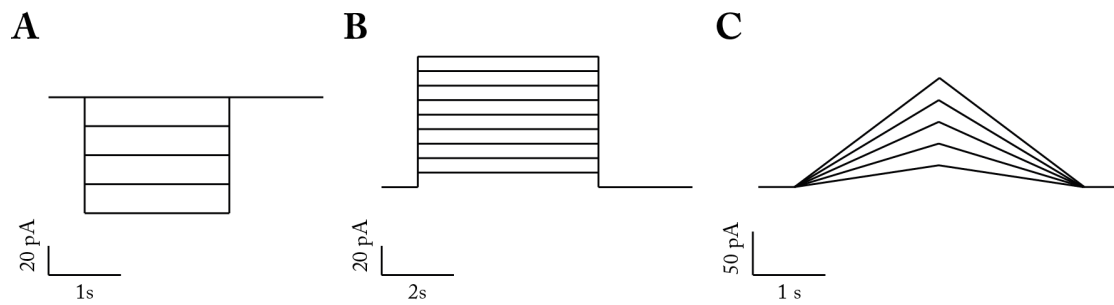
$\tau_{rec}$  entspricht dabei der Zeitkonstante der Erholung aus der Inaktivierung.

### **2.2.5 *Current-Clamp* Messungen zur Grundcharakterisierung DA SN und VTA Zellen**

Die Grundcharakterisierung der DA Zellen erfolgte im *Current-Clamp* Modus, in welchem hyper- sowie depolarisierende Ströme in die Zelle injiziert und die daraus resultierende Spannungsänderungen registriert wurden. Die Messungen wurden bei 37 °C durchgeführt, um möglichst physiologische Bedingungen zu gewährleisten.

Die Spontanaktivität wurde über einen Zeitraum von 25–30 s ohne Strominjektion vorgenommen, die gewählte Aufzeichnungsrate von 50 kHz ermöglichte die Untersuchung der Aktionspotentiale mit einer hohen zeitlichen Auflösung. Für die weitere Charakterisierung wurden nur spontanaktive Zellen verwendet.

Es folgte die Injektion hyperpolarisierender und depolarisierender Ströme von steigender Amplitude (siehe Abbildung 2.4). Die Hyperpolarisation erfolgte ohne vorherige Strominjektion und wurde stufenweise in –20 pA-Schritten gesteigert, bis ein Membranpotential von –80 mV erreicht wurde. Die Depolarisation erfolgte zum einen durch Injektion konstanter depolarisierender Ströme mit einer Dauer von 5 Sekunden, deren Amplitude zwischen +10 und +190 pA in 10 pA Schritten gesteigert wurde. Außerdem wurden rampenförmige Strominjektionen mit Steigungen zwischen 12,5 pA/s und 250 pA/s appliziert. Sowohl das Schritt- als auch das Rampenprotokoll wurden von einem Membranpotential von –60 mV initiiert, welches durch Injektion eines hyperpolarisierenden Stroms gewährleistet wurde.



**Abbildung 2.4: Current-Clamp Protokolle zur Grundcharakterisierung DA Neurone**  
A: Hyperpolarisierende Ströme in  $-20$  pA Schritten B: Stufen-Depolarisationsprotokoll in  $10$  pA Schritten. C: Depolarisierendes Rampenprotokoll. Die beiden Depolarisationsprotokolle wurden ab einem Membranpotential von  $-60$  mV begonnen.

### 2.2.5.1 Auswertung der Messungen für die Grundcharakterisierung

Für die Grundcharakterisierung DA SN und VTA Zellen wurden nur Zellen in Betracht gezogen, die spontanaktiv waren und deren DA Phänotyp nach den Versuchen durch eine TH-Färbung immunhistochemisch nachgewiesen werden konnte.

#### Spontanfrequenz

Die mittlere Spontanfrequenz ( $f_{\text{spontan}}$ ) jeder Zelle wurde durch Mittelung der Kehrwerte aller Interspikeintervalle (ISI) in den ersten 25–30 s direkt nach dem Öffnen der Zelle bestimmt.

$$f_{\text{spontan}} = 1/\text{ISI} [\text{Hz}]$$

#### Minimalfrequenz

Die Minimalfrequenz wurde anhand der rampenförmigen Strominjektionen bestimmt und entsprach der Frequenz, die aus dem Kehrwert des ersten ISI errechnet wurde. Außerdem wurde die mittlere Frequenz an dem ersten Depolarisationsschritt des Stufenprotokolls, der Aktionspotentiale auslöste, ermittelt.

**Maximalfrequenz**

Die durch das Stufenprotokoll ausgelöste Maximalfrequenz wurde aus dem Kehrwert des jeweils kleinsten ISI bestimmt.

$$f_{\max} = 1/\text{ISI}_{\min} \text{ [Hz]}$$

**Aktionspotentialparameter**

Die Aktionspotentialparameter wurden an hochaufgelösten AP ausgewertet, welche mit einer Digitalisierungsfrequenz von 50 kHz aufgenommen wurden, wobei pro Zelle mindestens zehn Aktionspotentiale ausgewertet wurden und deren Parameter anschließend gemittelt wurden. Neben der Maximalamplitude und der Amplitude der Nachhyperpolarisation (AHP: engl. *afterhyperpolarization*) wurden die Schwelle, die Dauer an der Schwelle sowie die Geschwindigkeit der De- und Repolarisation ermittelt. Für die Bestimmung der AP-Schwelle wurde die erste Ableitung des AP herangezogen, welche der Geschwindigkeit der Spannungsänderung entspricht. Als Schwelle wurde das Potential festgelegt, an dem die Geschwindigkeit der Spannungsänderung einen Wert von 5 V/s überschritt. Die AP-Schwelle sowie die Breite an der Schwelle wurden mit Hilfe einer Igor Prozedur ermittelt (Jan Gründemann, Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research, Basel, Schweiz). Die maximale Geschwindigkeit der Spannungsänderung während der De- und Repolarisation wurde ebenfalls aus der ersten Ableitung des AP bestimmt und entsprach jeweils deren Maximal- bzw. Minimalwert.

**Eingangswiderstand**

Die Injektion negativer Ströme steigender Amplitude verursachten in DA Zellen eine Hyperpolarisation, deren Größe zum einen vom Eingangswiderstand der Zelle und zum anderen von der Aktivierung hyperpolarisationsaktivierter Kationenkanäle abhängt. Aus den Potentialantworten der Hyperpolarisationsprotokolle wurde mit Hilfe des Ohm'schen Gesetzes der Eingangswiderstand der Zellen bestimmt, indem die Potentialantwort auf zwei aufeinanderfolgenden Strominjektionen durch die Differenz der beiden Ströme geteilt wurde.

$$R_{\text{Eingang}} = \frac{U_2 - U_1}{I_2 - I_1}$$

### ***Rebound delay***

Zusätzlich resultierte durch das Hyperpolarisationsprotokoll und der sich nachziehenden Erholung der A-Typ-Kaliumkanäle aus der Inaktivierung eine Verzögerung der Rückkehr der Spontanaktivität, was als *rebound delay* bezeichnet wird und als die Zeit ab Ende der Strominjektion bis zum ersten folgenden Aktionspotential definiert wurde. Der Wert für den *rebound delay* wurde bei der Strominjektion ermittelt, die eine Hyperpolarisation des Membranpotentials auf mindestens  $-80$  mV auslöste.

Am selben Protokollschritt wurde außerdem die Amplitude des sog. *sag* ausgewertet, einer Senkung der Hyperpolarisation, die in Subpopulationen von DA Neuronen beobachtet wird. Diese Depolarisation des Membranpotentials wird durch die Aktivierung von nicht-selektiven Kationenkanälen, den sog. HCN-Kanälen (engl.: *hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide gated*) ausgelöst. Die *sag*-Amplitude wurde als Differenz des initialen Hyperpolarisationspotentials und des sich am Ende der Strominjektion eingestellten Plateau-Potentials berechnet.

## **2.2.6 Messung synaptischer Ströme**

Die Messung evozierter inhibitorischer GABA-Ströme (eIPSC: *evoked inhibitory postsynaptic currents*) wurde unter pharmakologischer Blockade der exzitatorischen Eingänge vorgenommen. Zusätzlich zum AMPA-R-Antagonisten CNQX wurden der NMDA-R-Antagonist DL-AP5 sowie der nAChR-Blocker Mecamylamin hinzugefügt. Nachdem die *Whole-Cell* Konfiguration erreicht wurde, wurden Afferenzen mit Hilfe eines Stimulusisolators (A360, WPI) über eine lateral zur gemessenen Zelle platzierten bipolaren Stimulationselektrode stimuliert. Die Frequenz der Stimulation lag bei  $0,5$  Hz, während die Dauer und Amplitude zwischen  $0,1$ – $0,15$  ms bzw.  $10$ – $100$  mA variiert wurden, um eine optimale Stromantwort zu erzeugen. Die gemessene Zelle wurde dabei auf ein Potential von  $-70$  mV gehalten, um eine hohe Triebkraft für die den Strom tragenden Chloridionen zu gewährleisten. Auf Grund der gewählten CsCl-Konzentration der internen Lösung ( $140$  mM) manifestierte sich der GABA<sub>A</sub>-Strom als Ausstrom von Chloridionen und somit als Einwärtsstrom.

Anschließend wurden spontane synaptische GABA-Ströme gemessen, indem das Potential auf  $-70$  mV gehalten wurde und der Strom über einen Zeitraum von drei Minuten registriert wurde.

### 2.2.6.1 Auswertung evozierter und spontan auftretender IPSC

Für jede Zelle wurden zwischen 50 und 80 Stromspuren gemittelt, auf welchen ein deutlicher Einwärtsstrom zu sehen war. Anhand des gemittelten Stroms wurde die Kinetik der Deaktivierung bestimmt, die durch die folgende einfache Exponentialfunktion beschrieben werden konnte:

$$f(t) = I_{\max} \cdot e^{-t/\tau}$$

$I_{\max}$  entspricht der Stromamplitude und  $\tau$  der Zeitkonstante der Deaktivierung.

Die Frequenz der spontanen IPSC wurde durch den Quotienten der Anzahl der auftretenden Ereignisse und der Dauer der Messung bestimmt.

### 2.2.7 Injektion synaptischer Ströme

Um die Reaktion der Zelle auf synaptische Eingänge und den daraus resultierenden Strömen zu untersuchen, wurden im Programm Igor Pro (Version 6.02A, Wavemetrics Inc., Oregon, USA) Stromverläufe generiert, die in ihrer zeitlichen Abfolge den GABAergen und glutamatergen Stromantworten entsprechen. Diese wurden mit Hilfe des *Patcher's Power Tools* Plugin (PPT XOP, Version 2.18, Max Planck Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) aus Igor Pro exportiert und in Patchmaster als Stimulus eingesetzt. GABA<sub>A</sub>-Ströme wurden mit folgender Funktion dargestellt:

$$I(t) = -(1 - e^{-t/\tau_{\text{rise}}}) \cdot e^{-t/\tau_{\text{decay}}}$$

$I(t)$  gibt die Stromamplitude als Funktion der Zeit an,  $\tau_{\text{rise}}$  und  $\tau_{\text{decay}}$  entsprechen der Zeitkonstante der Aktivierung bzw. Deaktivierung, wobei  $\tau_{\text{rise}}$  5 ms und  $\tau_{\text{decay}}$  15 ms betrug.

Um den Eingang des GABA<sub>B</sub>-R-aktivierten GIRK-Stroms zu simulieren wurde folgende Gleichung verwendet:

$$I(t) = A \cdot (1 - e^{-t/\tau_m})^4 \cdot (Aw_{h_1} \cdot e^{-t/\tau_{h1}} + Aw_{h_2} \cdot e^{-t/\tau_{h2}})$$

$$I(t) = 11,3 \cdot (1 - e^{-t/38,1})^4 \cdot (10,2 \cdot e^{-t/122} + 1,1 \cdot e^{-t/587})$$

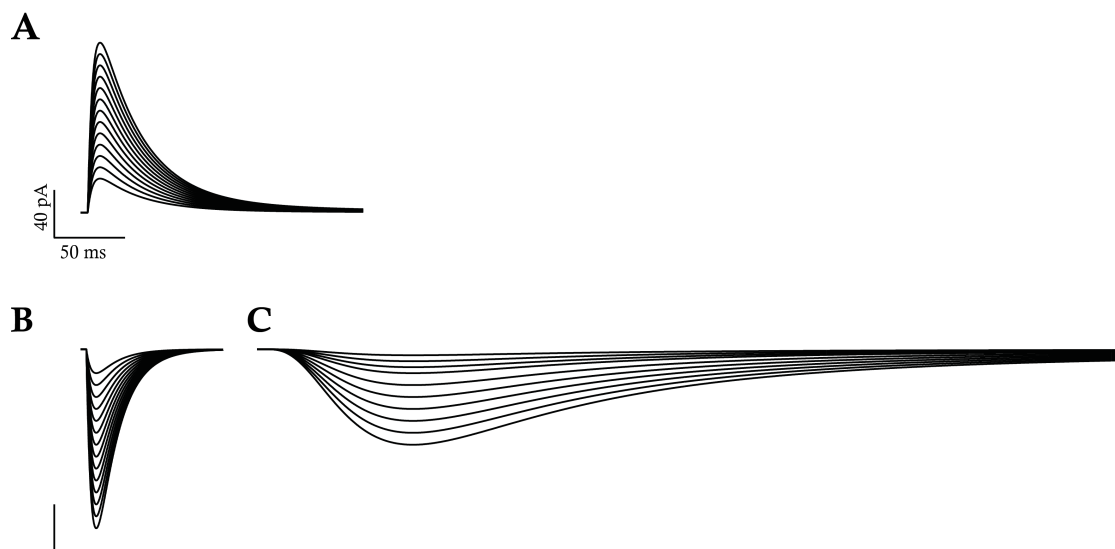
(Otis et al., 1993)

Ähnlich wurde für den NMDA-R-ähnlichen Strom vorgegangen, wobei die Deaktivierung mit einer doppelten Exponentialfunktion mit einer schnellen ( $\tau_{fast} = 40$  ms) und einer langsamen ( $\tau_{slow} = 200$  ms) Deaktivierungszeitkonstante dargestellt wurde. Die Zeitkonstante der Aktivierung betrug dabei 40 ms.

$$I(t) = A \cdot (1 - e^{-t/\tau_{rise}}) \cdot (A_{fast} \cdot e^{-t/\tau_{fast}} + A_{slow} \cdot e^{-t/\tau_{slow}})$$

$$I(t) = (1 - e^{-t/40}) \cdot (0,75 \cdot e^{-t/40} + 0,25 \cdot e^{-t/200})$$

Die resultierenden Kurven wurden auf 1 normiert und für jeden Stimulus mit der entsprechenden Stromamplitude multipliziert, so dass Ströme mit Amplituden von -20 bis -150 pA für GABA<sub>A</sub>, -5 bis -80 pA für GABA<sub>B</sub> und +30 bis +150 pA für NMDA-Ströme generiert wurden.



**Abbildung 2.5: In Igor-Pro generierte synaptische Ströme**

**A:** NMDA-ähnliche Ströme **B:** GABA<sub>A</sub>-ähnliche Ströme, **C:** GABA<sub>B</sub>-ähnliche Ströme

Die generierten synaptischen Ströme wurden im *Current-Clamp* in einer Frequenz von 0,1 Hz in die Zelle eingespeist, während gleichzeitig die Spontanaktivität 5 s vor und nach dem injizierten Strom registriert wurde. Im Gegensatz zur Injektion konstanter depolarisierender Ströme (Abschnitt 2.2.5) wurde hier das Membranpotential nicht auf  $-60$  mV hyperpolarisiert.

Für diese Versuche wurde die standard-intrazelluläre Lösung für *Whole-Cell* Elektrophysiologie mit Kaliumgluconat verwendet (siehe Tabelle 2.3).

### **2.2.7.1 Auswertung der Injektion künstlicher synaptischer Ströme**

#### **GABA-ähnliche Ströme**

Aus den Daten der GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>-ähnlichen Strominjektionen wurde ebenfalls die *rebound*-Verzögerung ausgewertet, wobei die Zeitverzögerung des ersten Aktionspotentials in Relation zu den ISIs vor und nach der Stimulation gesetzt wurde, um die Länge der resultierenden Pause in Abhängigkeit zur Spontanfrequenz zu erfassen. Das durch die GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>-ähnliche Strominjektion erreichte Membranpotential wurde über der resultierenden Latenzzeit aufgetragen, um deren Abhängigkeit zu untersuchen. Gleichzeitig wurde ein ISI-Histogramm dargestellt, um die Länge der Latenz in Bezug auf das mittlere ISI zu setzen.

#### **NMDA-ähnliche Ströme**

Es wurde die Maximalfrequenz der, durch die Injektion von NMDA-ähnlichen Strömen mit einer Amplitude von 100 pA, ausgelösten Aktionspotentiale ermittelt. Diese entsprach dem Kehrwert des ersten ISI.

### **2.2.8 Iontophoretische GABA-Applikation**

Um die Reaktion DA Zellen auf physiologische GABAerge Eingänge zu untersuchen, wurden GABA-Rezeptoren direkt aktiviert, indem GABA mittels Iontophorese direkt an die gemessene Zelle appliziert wurde. Mit Hilfe dieser Methode können geladene Moleküle mit hoher zeitlicher und räumlicher Präzision appliziert werden. Mit einem Strom, dessen Polarität der

Molekülladung entgegengesetzt ist, können die Moleküle in der Pipette gehalten werden, um mit einem Strom der gleichen Polarität ausgeworfen zu werden.

Für die GABA-Applikation wurde aus einer Borosilicatkapillare (G120F-4, Außendurchmesser: 1,20 mm, Innendurchmesser: 0,69 mm, Harvard Apparatus, Edenbridge, Großbritannien) eine Micropipette hergestellt (siehe Tabelle 2.6), mit 10 mM GABA Lösung befüllt und an einem Iontophorese-System (npi electronic GmbH, Tamm) montiert. Die Impedanz der Micropipetten betrug etwa 60 M $\Omega$ . Ein -10 pA großer Strom wurde kontinuierlich angelegt, um die bei pH = 4 positiv geladenen GABA-Moleküle in der Pipette zu halten. Die Pipette wurde mit einem zweiten Mikromanipulator in unmittelbarer Nähe einer zu messenden Zelle platziert. Nachdem die *Whole-Cell* Konfiguration erreicht wurde, wurde die Position der Iontophorese-Pipette optimiert, so dass der Auswurfstrom (+50 pA) mit der kleinstmöglichen Verzögerung eine Stromantwort in der Zielzelle verursachte. Die GABA-Applikation erfolgte im *Current-Clamp* Modus und die Spontanaktivität der Zellen wurde 5 s vor und nach einer 100 ms langen GABA-Applikation registriert.

### **2.2.8.1 Auswertung der iontophoretischen GABA-Applikation**

Wie bei der Injektion künstlicher inhibitorischer Ströme wurde auch hier die Dauer der inhibitorischen Pause bestimmt, die der Latenzzeit von Beginn der GABA-Applikation bis zum Auftreten des nächsten AP entspricht. Außerdem wurde die Dauer der ISI vor der GABA-Applikation analysiert, um sicher zu stellen, dass die gemessenen Zellen eine vergleichbare initiale Entladungsfrequenz hatten.

### **2.2.9 Bestätigung der Lage und des dopaminergen Phänotyps der gemessenen Zellen**

Nach Beendigung aller *Whole-Cell* Messungen wurde durch vorsichtiges Zurückziehen der Pipette von der Zelle ein *outside-out Patch* generiert. Dadurch blieb die Zelle nach Entfernung der Pipette intakt und mit interner Lösung gefüllt. Das in ihr enthaltene Neurobiotin sowie die von allen DA Neuronen exprimierte TH wurden nach Fixierung immunhistologisch nachgewiesen, wodurch die



Lokalisation sowie der DA Phänotyp der gemessenen Zellen nachgewiesen werden konnte (siehe Abschnitt 2.3.1). Die Lage der Zellen wurde in die entsprechenden Atlasvorlagen eingetragen, um sicher zu stellen, dass Zellen in vergleichbaren Regionen gemessen wurden.

### **2.2.10 Datenanalyse, statistische Auswertung und Darstellung**

Für die *offline*-Analyse mit dem Programm Igor Pro wurden die Daten mit dem Programm Fitmaster (Version 2x52, HEKA Elektronik) exportiert. In Igor Pro wurden die Funktionssammlung Neuromatic (Jason Rothman, ThinkRandom.com) sowie für die Auswertung der spontanen synaptischen Ströme die Prozedursammlung Taro Tools (von Taro Ishikawa, Department of Pharmacology, Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan) angewendet. Die in einzelnen Zellen ermittelten Werte wurden gemittelt und als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.: *standard error of the mean*) angegeben. Die Zellzahl pro ermitteltem Parameter wird als „n“ angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte in Microsoft® Excel® 2008 (Version 12.3.6 für Mac) sowie Prism (Version 5.0c für Mac OS X, GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA), Abbildungen wurden mit Igor Pro, Prism und Adobe® Illustrator® (CS5, Adobe® Systems GmbH, München) angefertigt.

Alle Daten wurden in Prism mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung getestet, bei positivem Ergebnis wurde zum Vergleich der zwei Gruppen ein ungepaarter t-Test nach Student durchgeführt. Bei nicht normal verteilten Datensätzen wurde statt des ungepaarten t-Tests der nichtparametrische Mann-Whitney-Test eingesetzt und bei unterschiedlicher Varianz erfolgte eine Korrektur nach Welch. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgelegt und die Signifikanzstufen folgendermaßen abgekürzt:

$p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*)

## 2.3 Immunhistochemie

### 2.3.1 Fluoreszenzfärbung von *Patch*-Schnitten

Eine immunhistochemische Färbung gegen die TH sowie das in der Pipettenlösung enthaltene Neurobiotin diente der Lokalisation und Bestätigung des DA Phänotyps der gemessenen Zellen, da diese in der VTA zum Teil elektrophysiologisch nicht von nicht-DA Zellen differenziert werden können. Dafür wurden die Mittelhirnschnitte nach Abschluss der elektrophysiologischen Versuche in ein mit 4 % PFA-Lösung gefülltes Gläschen überführt, bei 4 °C für 12–60 Stunden fixiert und anschließend bis zum Zeitpunkt der Färbung in Aufbewahrungslösung bei 4 °C gelagert. Alle Schritte der Immunfärbung wurden bei Raumtemperatur (21–23 °C) in Schnappdeckelgläschen durchgeführt, in welchen die Hirnschnitte frei in der Lösung schwebten (engl. *free floating slice immunohistochemistry*). Für die nötige Bewegung sorgte ein Schüttler, auf dem die Gläschen für die jeweilige Inkubationsdauer gestellt wurden. Nach vierfachem Waschen mit PBS (jeweils 10 min) wurden die unspezifischen Bindungen für 3 Stunden mit Blocking-Lösung maskiert. Anschließend wurden die Schnitte mit einem gegen die TH gerichteten primären Antikörper, welcher in *Carrier*-Lösung gelöst war, über Nacht bei RT inkubiert. Nach vierfachem Waschen mit PBS, wurden fluoreszenzfarbstoffgekoppelte Sekundärantikörper sowie Streptavidin in *Carrier*-Lösung verdünnt und auf das Gewebe gegeben. Es erfolgte erneut eine Inkubation über Nacht in einer lichtgeschützten Dose, um die Fluoreszenzfarbstoffe vor dem Ausbleichen zu schützen. Am dritten Tag wurden die Schnitte in PBS vier mal für je 10 Minuten gewaschen, auf Objektträgern (Superfrost Plus, Menzel GmbH, Braunschweig) aufgezogen, mit dem fluoreszenzschützenden Medium VECTASHIELD® H-1000 (Vector Laboratories, Burlingame, Kanada) eingedeckt, mit Nagellack versiegelt und in Objektträgerdosen (im Dunkeln) bei 4 °C gelagert.

### 2.3.2 Konfokalmikroskopische Analyse von *Patch*-Schnitten

Die fluoreszenzgefärbten Schnitte wurden zur Überprüfung der Lokalisation und des DA Phänotyps der Zellen mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (Zeiss LSM 510 Meta, Carl Zeiss AG, Göttingen) beurteilt und dokumentiert. Der Anregung von Alexa-488 diente ein Argon-Laser 488 nm (Emissionsfilter Bandpass 505–530 nm), während Alexa-568 mit einem Helium-Neon-Laser 543 nm (Emissionsfilter Bandpass 580–625 nm) angeregt wurde. Mit einem Zehnfachobjektiv (10x/0,3 Plan-Apochromat, Carl Zeiss AG) wurden Übersichtsbilder aufgenommen, die eine Bestimmung der Lage der gemessenen Zellen innerhalb der verschiedenen Subnuclei ermöglichten. Zur Kontrolle der Kolo-kalisation des Neurobiotin- und TH-Signals wurde ein 63x/1,4 Öl-Immersionso-bjektiv (Plan-Apochromat, Carl Zeiss AG) verwendet, über das Software-Programm (Zeiss LSM 510) wurde ein zusätzlicher zweifacher Zoom eingesetzt. Die gewählten Parameter lieferten eine optische Schnitt-dicke von unter 3  $\mu\text{m}$ , so dass eine Verfälschung der Ergebnisse durch Überlagerung von Signalen aus unterschiedlichen Zellen ausgeschlossen werden konnte.

## 3 Ergebnisse

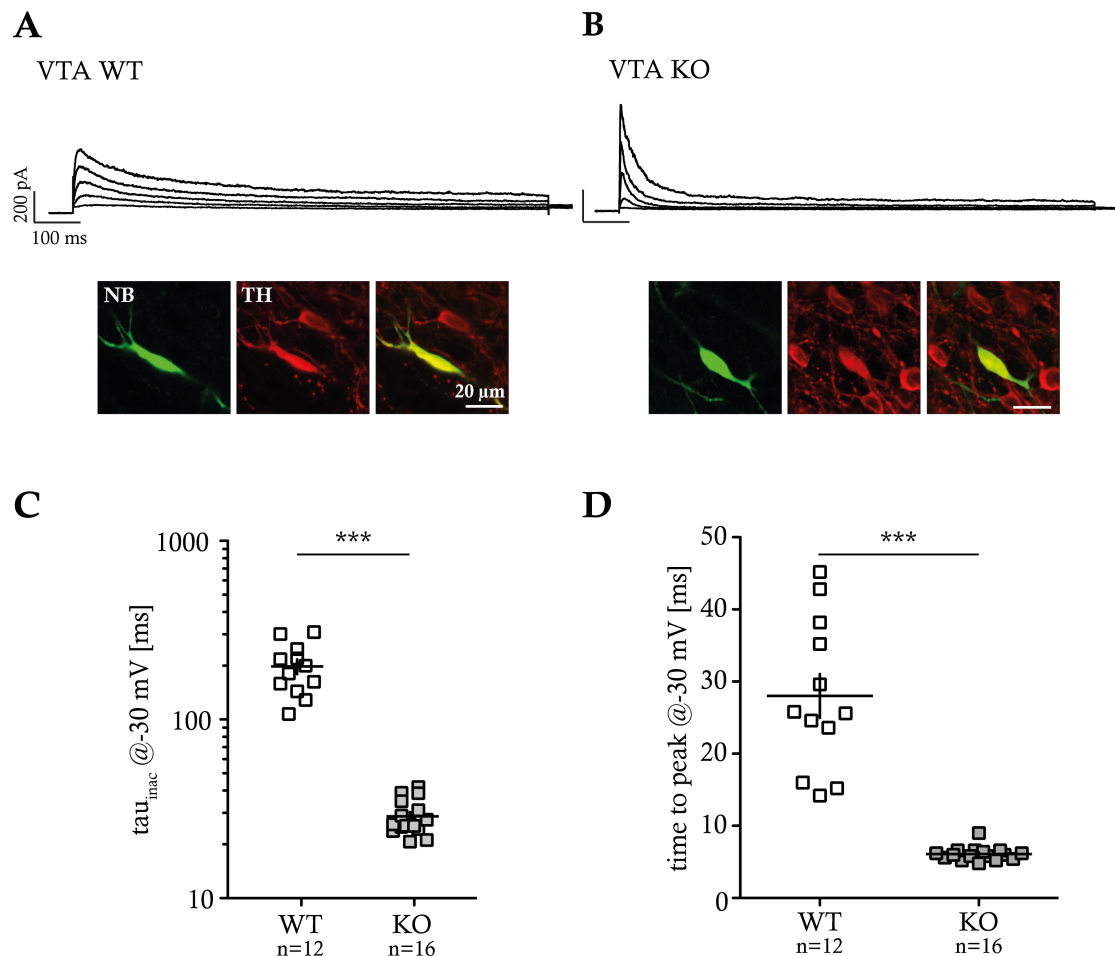
### 3.1 Biophysikalische Eigenschaften des A-Stroms in Subpopulationen DA Mittelhirnneurone

Um die Funktion der Kaliumkanaluntereinheit KChIP4 in DA Neuronen zu untersuchen, wurden *Patch-Clamp* Messungen von Zellen aus der SN und VTA von WT-Tieren mit solchen von KChIP4-KO-Tieren verglichen. Die biophysikalische Charakterisierung des A-Stroms wurde in der sog. *nucleated outside-out* Konfiguration durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.4). Obwohl zum Erreichen dieser Konfiguration der Zellkern aus dem Soma entfernt wurde, konnten die verbliebenen Zellkörper dennoch mit Neurobiotin (NB) gefüllt werden. Durch die anschließende immunhistochemische Färbung gegen das NB und die Tyrosinhydroxylase (TH) konnte sowohl die Lage als auch der DA Phänotyp der gemessenen Zellen bestätigt werden (siehe Abschnitt 2.3).

#### 3.1.1 Die Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik des A-Stroms ist abhängig von der KChIP4-Expression

Die Eigenschaften der Aktivierung und Inaktivierung des A-Stroms wurden mit Hilfe des Aktivierungsprotokolls untersucht (siehe Abschnitt 2.2.4.1). Die A-Typ Kaliumkanäle wurden dabei durch Sprünge auf immer positivere Potentiale aktiviert und im Laufe der anhaltenden Depolarisation erfolgte deren spontane Inaktivierung. Da die Kapazität der kernhaltigen Membranstücke, die als indirektes Maß ihrer Größe diente, in WT- und KO-Zellen nicht signifikant unterschiedlich war (siehe Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2), wurde darauf verzichtet, die gemessenen Ströme in Stromdichten (Strom/Membranfläche) umzurechnen. In Abbildung 3.1 und 3.2 (A, B) sind repräsentative Stromverläufe aus DA VTA bzw. SN Neuronen dargestellt, die im *Voltage-Clamp* Modus durch das Aktivierungsprotokoll ausgelöst wurden. Der Verlauf der Inaktivierung wurde mit einer monoexponentiellen Funktion gefittet, aus der die Zeitkonstante der

Inaktivierung ( $\tau_{\text{inac}}$ ) abgeleitet werden konnte. Diese entspricht der Zeit, nach der nur noch etwa 37 % ( $1/e$ ) der Kanäle aktiviert sind. Für den statistischen Vergleich wurde die Zeitkonstante der Inaktivierung bei dem Spannungssprung auf  $-30$  mV ausgewählt, da bei diesem Potential die  $K_{\text{v}4}$ -Kanäle bereits aktiviert waren, allerdings noch keine Aktivierung der *delayed rectifier* Kaliumströme beobachtet wurde.



### Abbildung 3.1: Parameter der Aktivierung und Inaktivierung des A-Stroms von DA VTA Neuronen

**A–B:** Repräsentative A-Ströme aus DA VTA Neuronen aus WT- (A) und KChIP4-KO-Tieren (B), ausgelöst durch Potentialsprünge auf  $-50$  bis  $-10$  mV in  $10$  mV Schritten. Die konfokalmikroskopischen Bilder (unten) zeigen die Immunreaktivität gegen das NB und die TH und dienen dem Nachweis des DA Phänotyps. Die mit NB gefüllten Zellen enthielten dabei im Gegensatz zu den Nachbarzellen keinen Zellkern, da dieser für die Generierung der *nucleated outside-out* Konfiguration aus dem Soma entfernt wurde. Trotzdem konnten die verbliebenen Zellkörper mit NB gefüllt und immunhistochemisch nachgewiesen werden. **C:** A-Ströme inaktivierten in DA VTA Neuronen aus KO-Tieren mit einer siebenfach schnelleren Kinetik als in DA VTA Neuronen aus WT-Tieren. **D:** In DA VTA Neuronen aus KO-Tieren erreichte der A-Strom im Mittel etwa fünf mal schneller die Maximalamplitude als in Zellen aus WT-Tieren.

Die Zeitkonstante der Inaktivierung lag in DA VTA Neuronen bei etwa 200 ms, was einer langsamen Inaktivierungskinetik entspricht (Abbildung 3.1 A, C), während der A-Strom von DA SN Neuronen durch eine etwa fünffach schnellere Inaktivierungskinetik charakterisiert war (Abbildung 3.2 A). Die  $\tau_{\text{inac}}$ -Werte der VTA zeigten außerdem eine größere Streuung als in der SN.

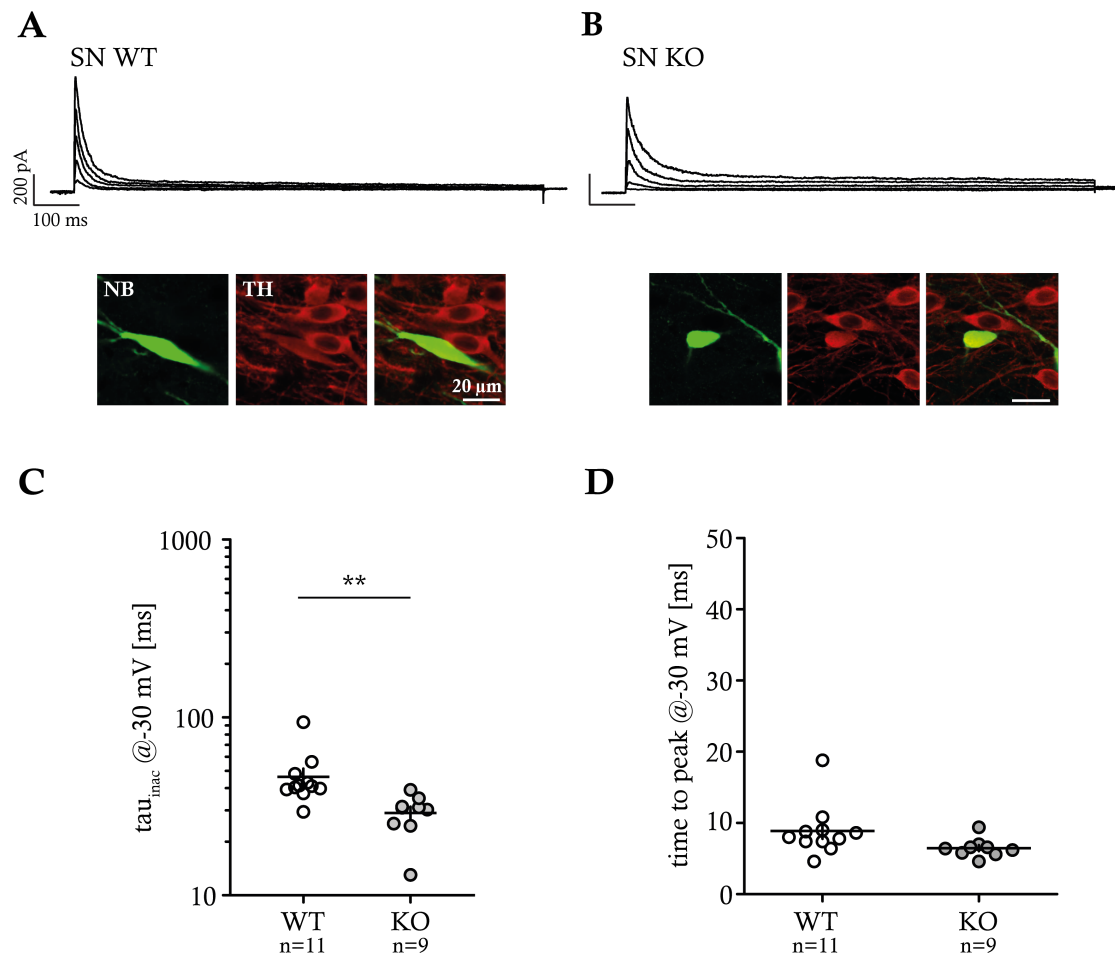
In DA VTA Zellen aus KChIP4-KO Tieren erwies sich die Zeitkonstante der Inaktivierung des A-Stroms als siebenfach geringer als in vergleichbaren Zellen aus WT-Tieren (VTA WT:  $198,1 \pm 18,5$  ms (n=12); VTA KO:  $28,7 \pm 1,6$  ms (n=16);  $p < 0,0001$ ; Abbildung 3.1 C). Die hohe Variabilität der  $\tau_{\text{inac}}$ -Werte, die im WT beobachtet wurde, war in Zellen aus KChIP4-KO Tieren ebenfalls nicht mehr vorhanden. Somit ähnelte das Inaktivierungsprofil des A-Stroms in DA VTA Neuronen des KO dem von DA SN Neuronen des WT. In DA SN Zellen zeigte sich ebenfalls eine Erhöhung der Inaktivierungsgeschwindigkeit, allerdings in einem geringeren Ausmaß als in der VTA (SN WT:  $46,4 \pm 5,2$  ms (n=11); SN KO:  $29,0 \pm 2,5$  ms (n=9);  $p = 0,0091$ ; Abbildung 3.2 C).

Die Zeit zum Erreichen des Maximalstroms (*time to peak*), die ebenfalls beim Sprung auf  $-30$  mV ausgewertet wurde, war in DA SN Neuronen aus WT- und KO-Tieren unverändert (SN WT:  $8,9 \pm 1,1$  ms (n=11); SN KO:  $6,5 \pm 0,4$  ms (n=9);  $p = 0,0646$ ; Abbildung 3.2 D), während in DA VTA Neuronen aus KO-Tieren der Maximalstrom in einer signifikant kürzeren Zeit erreicht wurde als in Zellen aus WT-Tieren (VTA WT:  $28,0 \pm 3,0$  ms (n=11); VTA KO:  $6,1 \pm 0,2$  ms (n=16);  $p < 0,0001$ ; Abbildung 3.1 D).

Die maximale Leitfähigkeit in DA VTA Neuronen aus KChIP4-KO-Tieren war signifikant geringer als in Zellen aus WT-Tieren (VTA WT:  $13,7 \pm 0,8$  nS (n=12); VTA KO:  $8,1 \pm 0,3$  nS (n=16);  $p = 0,0015$ ). Außerdem wurde eine signifikant geringere *Steady-State*-Leitfähigkeit ( $G_{\text{Steady-State}}$ ) in DA Neuronen aus KO-Tieren festgestellt (VTA WT:  $4,6 \pm 0,4$  nS (n=12); VTA KO:  $1,5 \pm 0,1$  nS (n=16);  $p = 0,0119$ ). In Zellen aus WT-Tieren betrug somit die Leitfähigkeit am Ende des Aktivierungsprotokolls etwa 35 % der Maximalleitfähigkeit, während dieser Wert in Neuronen aus KO-Tieren auf etwa 18,5 % reduziert war.

In DA SN Neuronen war die Maximalleitfähigkeit geringfügig aber signifikant vermindert (SN WT:  $15,4 \pm 0,6$  nS (n=11); SN KO:  $12,3 \pm 0,6$  nS (n=9);  $p = 0,0010$ ), während die *Steady-State*-Leitfähigkeit unverändert war (SN WT:

2,1 ± 0,3 nS (n=11); SN KO: 1,6 ± 0,1 nS (n=9); p=0,2547). Der prozentuale Anteil von  $G_{Steady-State}$  betrug in beiden Gruppen etwa 13 % der Maximalleitfähigkeit.



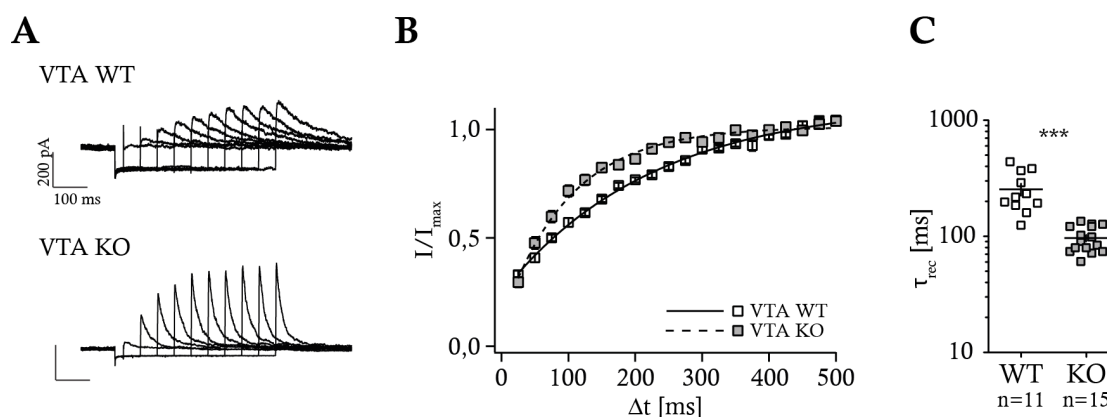
**Abbildung 3.2: Inaktivierungskinetik des A-Stroms in DA SN Neuronen**

**A–B:** Stromaufnahmen aus DA SN Neuronen von WT- und KChIP4-KO Tieren. Die Darstellung entspricht Abbildung 3.1. **C:** Die Zeitkonstante der Inaktivierung des A-Stroms von DA SN Neuronen aus KChIP4-KO-Tieren war etwa halb so groß, wie in WT-Tieren, was einer zweifach schnelleren Inaktivierungskinetik entspricht. **D:** Die Zeit zum Erreichen des Maximalstroms war in DA SN Neuronen aus KO-Tieren gegenüber Zellen aus WT-Tieren nicht signifikant verändert.

### 3.1.2 Rolle von KChIP4 für die Erholung aus der Inaktivierung

Sind A-Typ Kaliumkanäle nach einem anhaltenden Depolarisationspuls inaktiviert, muss das Membranpotential für eine gewissen Zeit bei einem negativen Wert verweilen, um die Kanäle zurück in die geschlossene, aber aktivierbare Konformation zu überführen. Die sogenannte Erholung des

A-Stroms aus der Inaktivierung wurde mit Hilfe eines Doppelpulsprotokolls mit variablen Interpulsintervallen zwischen 25 und 500 ms untersucht (siehe Abschnitt 2.2.4.1). Die relative Stromamplitude des zweiten Pulses wurde über die Zeit zwischen den zwei Doppelpulsen aufgetragen und ließ sich durch eine einfache Exponentialfunktion beschreiben. Zum statistischen Vergleich wurde die Zeitkonstante der Erholung aus der Inaktivierung ( $\tau_{\text{rec}}$ ) herangezogen, die dem Interpulsintervall entspricht, nach dem sich  $1 - 1/e$  ( $\approx 63\%$ ) der Kanäle aus der Inaktivierung erholt haben. In Abbildung 3.3 A bzw. Abbildung 3.4 A sind Beispiele von Stromantworten aus DA VTA und SN Neuronen aus WT- und KChIP4-KO-Tieren auf das Doppelpulsprotokoll dargestellt.



**Abbildung 3.3: Erholung des A-Stroms von DA VTA Neuronen aus der Inaktivierung**

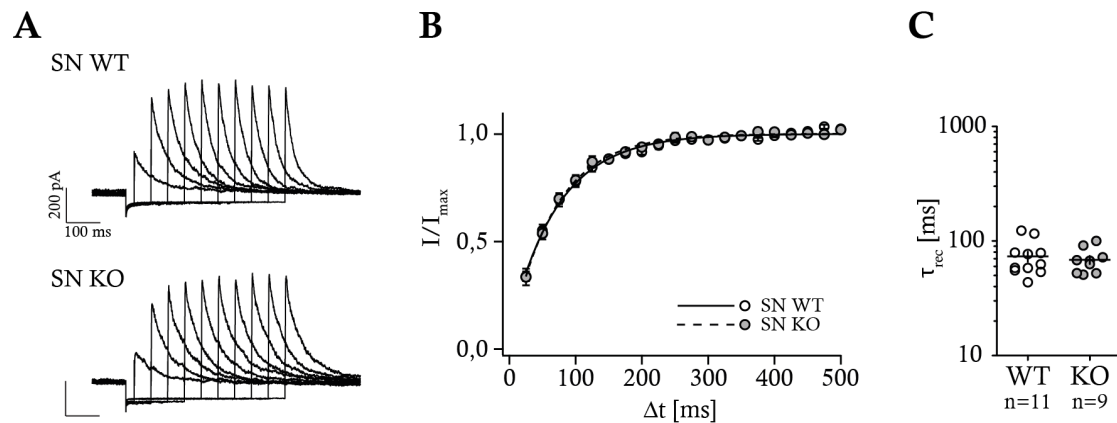
**A:** Stromantworten auf das Doppelpulsprotokoll in DA VTA Neuronen aus WT- und KO-Tieren. **B:** Exponentieller Verlauf der Erholung aus der Inaktivierung in DA VTA Neuronen **C:** Die Zeitkonstante der Erholung aus der Inaktivierung war in DA VTA Neuronen aus KO-Tieren signifikant geringer als in Zellen aus WT-Tieren, was eine schnellere Erholung aus der Inaktivierung bedeutet.

Als Maß für die Geschwindigkeit der Erholung aus der Inaktivierung wurde die Inaktivierungszeitkonstante ( $\tau_{\text{rec}}$ ) herangezogen. Die A-Ströme in DA VTA Neuronen aus WT-Tieren erholten sich sehr langsam aus der Inaktivierung (VTA WT:  $253,9 \pm 30,8$  ms ( $n=15$ )), während in DA VTA aus KChIP4-KO-Tieren die Erholung aus der Inaktivierung um den Faktor 2,5 schneller ablief (VTA KO:  $96,6 \pm 6,3$  ms ( $n=15$ );  $p=0,0005$ ; Abbildung 3.3 C).

In DA SN Neuronen verlief die Erholung aus der Inaktivierung schneller als in DA VTA Neuronen und war in Zellen aus WT- im Vergleich zu Neuronen aus KO-Tieren nicht signifikant unterschiedlich (SN WT:  $73,3 \pm 7,7$  ms ( $n=11$ );



SN KO:  $68,6 \pm 5,8$  ms (n=9);  $p=0,6456$ ; Abbildung 3.4 C). KChIP4 ist somit selektiv in DA VTA Neuronen für die langsamere Erholung aus der Inaktivierung von A-Typ Kaliumkanälen verantwortlich.

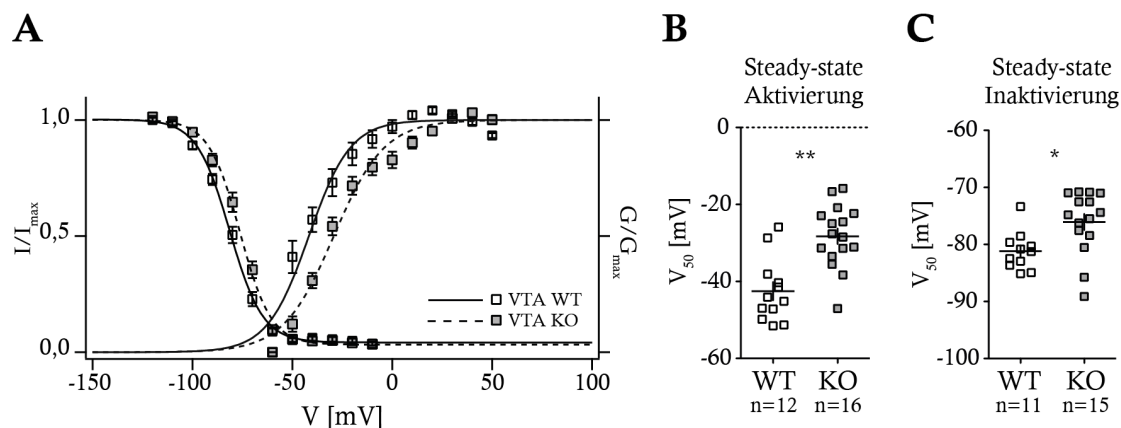


**Abbildung 3.4: Erholung des A-Stroms aus der Inaktivierung in DA SN Neuronen**

Die Darstellung entspricht Abbildung 3.3. Die Erholung aus der Inaktivierung war in DA SN Neuronen aus WT- und KO-Tieren nicht signifikant unterschiedlich.

### 3.1.3 Funktion von KChIP4 für *Steady-State* Parameter der Aktivierung und Inaktivierung des A-Stroms

Zur Untersuchung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und Inaktivierung des A-Typ Kaliumkanals in DA VTA bzw. SN Neuronen wurden *Steady-State* Aktivierungs- und Inaktivierungskurven angefertigt (siehe Abschnitt 2.2.4.2). Das halbmaximale Aktivierungspotential ( $V_{50}$ ), welches bei der Aktivierungskurve jenes Potential beschreibt, bei dem 50 % der Kanäle aktiviert sind, lag in DA VTA Neuronen aus KO-Tieren bei  $-28,3 \pm 2,0$  mV (n=16) und war somit signifikant positiver als in WT-Tieren (VTA WT:  $-42,5 \pm 2,4$  mV (n=12);  $p < 0,0001$ ; Abbildung 3.5 B). Die Aktivierungsrate war in DA VTA Neuronen aus KO-Tieren ebenfalls signifikant erhöht im Vergleich zu DA VTA Neuronen des WT (siehe Tabelle 3.1).

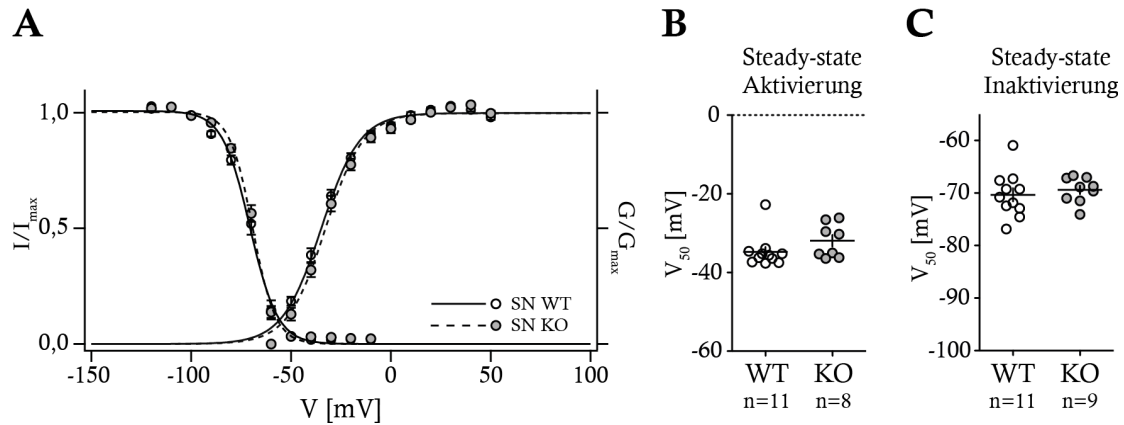


**Abbildung 3.5: Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und Inaktivierung von A-Typ Kaliumkanälen in DA VTA Neuronen**

**A:** *Steady-State* Aktivierungs- und Inaktivierungskurven von A-Typ Kaliumkanälen in VTA Neuronen aus WT- (offene Symbole) und KO-Tieren (geschlossene Symbole). **B–C:** Statistischer Vergleich des  $V_{50}$  der *Steady-State* Aktivierung bzw. Inaktivierung des A-Stroms. Das halbmaximale Aktivierungspotential (B) war in DA VTA Neuronen des KO signifikant positiver als im WT. **C:** Auch das  $V_{50}$  der *Steady-State* Inaktivierung (C) war im KO zu positiveren Werten verschoben.

Das Potential, bei dem 50 % der Kanäle geschlossen aber aktivierbar sind, wurde aus der *Steady-State* Inaktivierungskurve ermittelt. In DA VTA Zellen des KO konnte eine signifikante Verschiebung von  $V_{50}$  zu positiveren Potentialen im Vergleich zu Zellen des WT festgestellt werden (VTA WT:  $-81,2 \pm 1,0$  mV (n=11); VTA KO:  $-76,1 \pm 1,4$  mV (n=15);  $p=0,0121$ ; Abbildung 3.5 C). Die Rate der Inaktivierung in DA VTA Neuronen aus KO-Tieren unterschied sich nicht signifikant vom Wert der WT-Tiere (siehe Tabelle 3.1).

In SN DA Neuronen von WT und KChIP4-KO-Tieren waren die Parameter der *Steady-State* Aktivierung und Inaktivierung nicht signifikant unterschiedlich ( $V_{50}$  der Aktivierung: SN WT:  $-34,8 \pm 1,3$  mV (n=11); SN KO:  $-31,9 \pm 1,5$  mV (n=8);  $p=0,1485$ ;  $V_{50}$  der Inaktivierung: SN WT:  $-70,3 \pm 1,3$  mV (n=11); SN KO:  $-69,4 \pm 1,8$  (n=9);  $p=0,5663$ ; Abbildung 3.6 und Tabelle 3.2).



**Abbildung 3.6: Steady-State Aktivierungs- und Inaktivierungsparameter von A-Typ Kaliumkanälen in DA SN Neuronen**

**A:** *Steady-State* Aktivierungs- und Inaktivierungskurven von A-Typ Kaliumkanälen in DA SN Neuronen aus WT- (offene Symbole) und KO-Tieren (geschlossene Symbole). **B–C:** Statistischer Vergleich des  $V_{50}$  der *Steady-State* Aktivierung bzw. Inaktivierung des A-Stroms. Weder das Aktivierungs- noch das Inaktivierungs- $V_{50}$  war zwischen Zellen aus WT- und KO-Tieren signifikant unterschiedlich.

Die Lage der Zellen wurde während der Messungen notiert und zusammen mit dem DA Phänotyp anhand der konfokalen Analyse der immunhistochemischen NB- und TH-Färbung bestätigt (siehe Abschnitt 2.3). In der funktionellen Kartierung der gemessenen Zellen (siehe Abbildung 3.7) wurde der Wert der Inaktivierungszeitkonstante des A-Stroms durch die Größe der Symbole dargestellt. In den gemessenen Zellpopulationen wurden keine lagespezifischen Unterschiede in der Inaktivierungskinetik beobachtet.

Alle Werte der biophysikalischen Charakterisierung des A-Stroms in DA VTA und SN Neuronen aus WT- und KChIP4-KO-Tieren sind in Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2 zusammengefasst.

	VTA WT	n	VTA KO	n	p-Wert	
<b>Kapazität [pF]</b>	1,4 ± 0,1	12	1,2 ± 0,1	16	0,1420 <sup>W</sup>	ns
<b>Serienwiderstand [MΩ]</b>	14,9 ± 2,0	12	19,5 ± 4,1	16	0,3206 <sup>W</sup>	ns
<b>τ<sub>inac</sub> @-30 mV [ms]</b>	198,1 ± 18,5	12	28,7 ± 1,6	16	< 0,0001 <sup>W</sup>	***
<b>Time to peak @-30 mV [ms]</b>	28,0 ± 3,0	12	6,1 ± 0,2	16	< 0,0001 <sup>W</sup>	***
<b>G<sub>max</sub> [nS]</b>	13,7 ± 0,8	12	8,1 ± 0,3	16	0,0015 <sup>B</sup>	**
<b>G<sub>Steady-State</sub> [nS]</b>	4,6 ± 0,4	12	1,5 ± 0,1	16	0,0119 <sup>B</sup>	*
<b>τ<sub>rec</sub>[ms]</b>	253,9 ± 30,8	11	96,6 ± 6,3	15	0,0005 <sup>W</sup>	***
<b>Aktivierungs-V<sub>50</sub> [mV]</b>	-42,5 ± 2,4	12	-28,3 ± 2,0	16	0,0001	***
<b>Aktivierungsrate</b>	8,5 ± 1,1	12	12,2 ± 1,2	16	0,0315	*
<b>Inaktivierungs-V<sub>50</sub> [mV]</b>	-81,2 ± 1,0	11	-76,1 ± 1,4	15	0,0121	*
<b>Inaktivierungsrate</b>	7,7 ± 0,2	11	6,9 ± 0,3	15	0,1462 <sup>M</sup>	ns

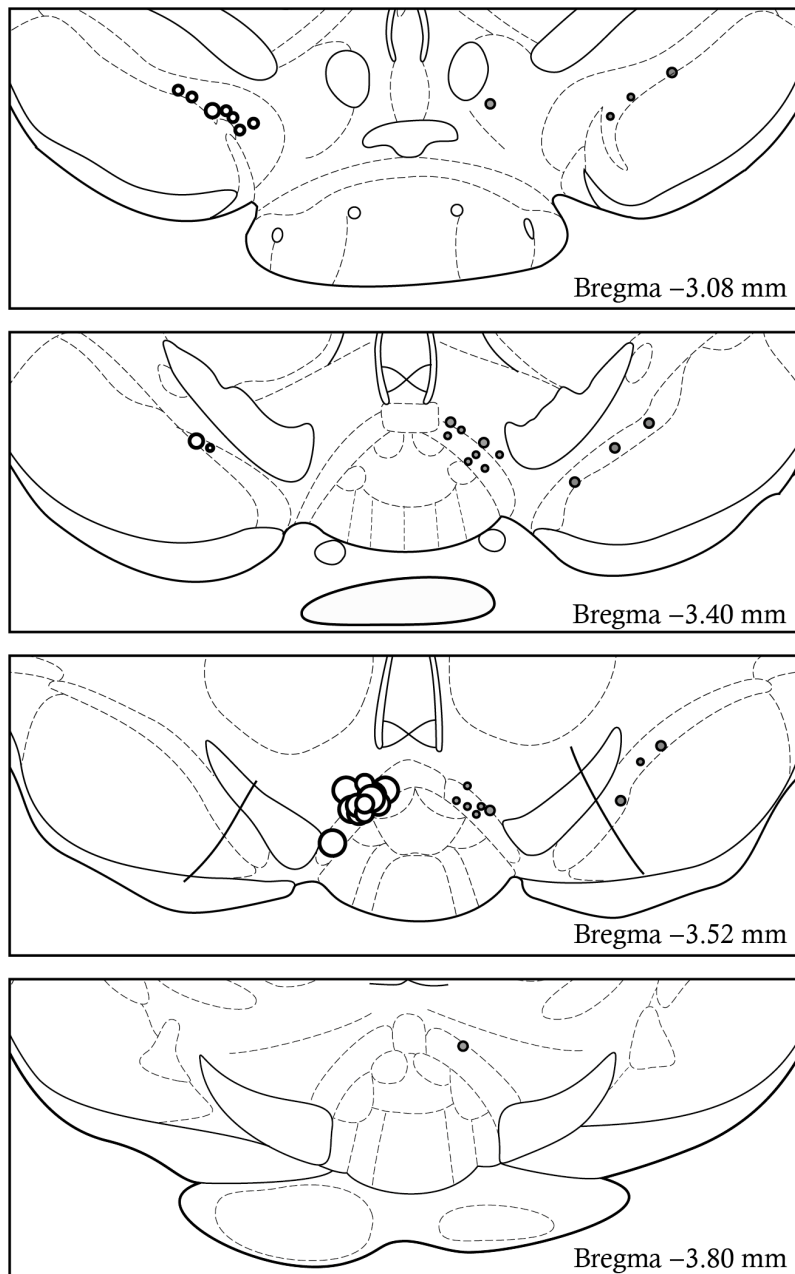
**Tabelle 3.1: Biophysikalische Parameter des A-Stroms von DA VTA Neuronen aus WT- und KChIP4-KO-Tieren**

<sup>W</sup>: Korrektur nach Welch; <sup>M</sup>: Mann-Whitney-Test; <sup>B</sup>Vergleich der Boltzmann-Funktionen

	SN WT	n	SN KO	n	p-Wert	
<b>Kapazität [pF]</b>	1,5 ± 0,1	11	1,4 ± 0,1	9	0,7116	ns
<b>Serienwiderstand [MΩ]</b>	11,2 ± 2,3	11	9,8 ± 0,7	9	0,5730 <sup>W</sup>	ns
<b>τ<sub>inac</sub> @-30 mV [ms]</b>	46,4 ± 5,2	11	29,0 ± 2,5	9	0,0091 <sup>W</sup>	**
<b>Time to peak @-30 mV [ms]</b>	8,9 ± 1,1	11	6,5 ± 0,4	9	0,0646 <sup>W</sup>	ns
<b>G<sub>max</sub> [nS]</b>	15,4 ± 0,6	11	12,3 ± 0,5	9	0,0010 <sup>B</sup>	***
<b>G<sub>Steady-State</sub> [nS]</b>	2,1 ± 0,3	11	1,6 ± 0,1	9	0,2547 <sup>B</sup>	ns
<b>τ<sub>rec</sub> [ms]</b>	73,3 ± 7,7	11	68,6 ± 5,8	9	0,6456	ns
<b>Aktivierungs-V<sub>50</sub> [mV]</b>	-34,8 ± 1,3	11	-31,9 ± 1,5	8	0,1485 <sup>M</sup>	ns
<b>Aktivierungsrate</b>	9,5 ± 0,3	11	10,0 ± 0,5	8	0,3957	ns
<b>InaktivierungsV<sub>-50</sub> [mV]</b>	-70,3 ± 1,3	11	-69,4 ± 0,8	9	0,5663	ns
<b>Inaktivierungsrate</b>	6,1 ± 0,2	11	5,3 ± 0,2	9	0,0098	**

**Tabelle 3.2: Biophysikalische A-Strom-Parameter von DA SN Neuronen aus WT- und KChIP4-KO Tieren**

<sup>W</sup>: Korrektur nach Welch; <sup>M</sup>: Mann-Whitney-Test; <sup>B</sup>Vergleich der Boltzmann-Funktionen



WT	$\tau_{inac}$	KO
•	< 30 ms	•
◦	30 – 50 ms	◦
◌	50 – 100 ms	◌
◉	100 – 150 ms	◉
◊	150 – 200 ms	◊
○	> 200 ms	●

**Abbildung 3.7: Funktionelle Kartierung der gemessenen Zellen anhand der Zeitkonstante der Inaktivierung des A-Stroms**

Kartierung der Lage der gemessenen Zellen aus WT- (linke Hälfte) und KChIP4-KO-Tieren (rechte Hälfte). Die Symbolgröße entspricht dem Wert der Inaktivierungszeitkonstante. Die Zellen befanden sich in vergleichbaren Arealen des Mittelhirns und es wurden keine lagespezifischen Unterschiede in der Inaktivierungszeitkonstante festgestellt (modifiziert nach Paxinos und Franklin, 2007).

## 3.2 Funktionelle Bedeutung der KChIP4-Untereinheit für dopaminerge Mittelhirnneurone

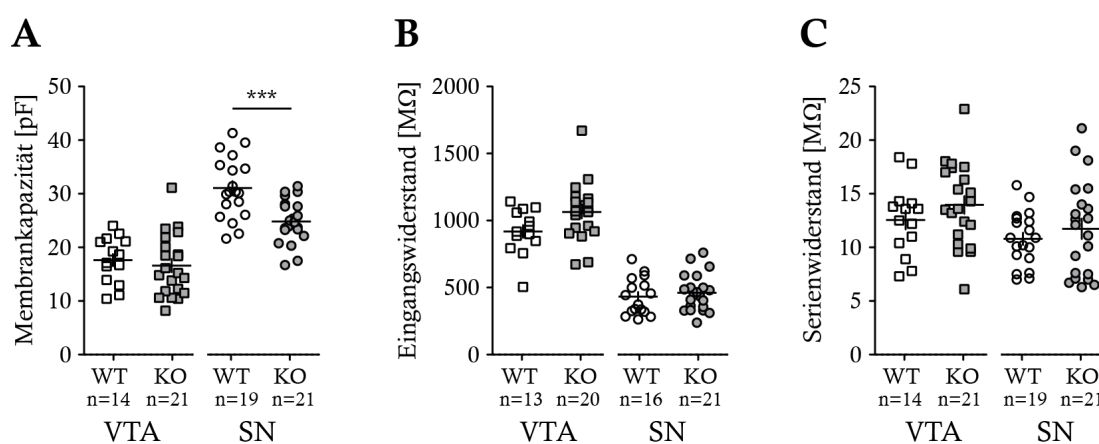
In diversen Studien konnte gezeigt werden, dass A-Typ Kaliumströme die Spontanaktivität sowie die Form von Aktionspotentialen beeinflussen können (Zhang und McBain, 1995; Liss et al., 2001; Kim et al., 2005; Yuan et al., 2005; Gentet und Williams, 2007). Um die Rolle der KChIP4-Untereinheit diesbezüglich zu untersuchen, wurde eine elektrophysiologische Grundcharakterisierung der DA SN und VTA Neurone aus KChIP4-KO-Tieren durchgeführt und mit entsprechenden Kontrollpopulationen aus WT-Tieren verglichen (siehe Abschnitt 2.2.5). Die *in vitro Patch-Clamp* Messungen wurden bei 37 °C in der *Whole-Cell* Konfiguration und unter Blockade der inhibitorischen GABA<sub>A</sub>-R- sowie der exzitatorischen AMPA-R-vermittelten synaptischen Eingänge durchgeführt. In die Analyse wurden nur spontanaktive Zellen einbezogen. Neben der Spontanfrequenz und den Aktionspotentialparametern wurde im *Current-Clamp* Modus die Reaktion der Zellen auf die Injektion depolarisierender und hyperpolarisierender Ströme untersucht. Die Neurone wurden während der Messung mit Neurobiotin gefüllt, sodass der DA Phänotyp anschließend immunhistochemisch durch eine kombinierte NB-TH-Färbung bestätigt werden konnte (siehe Abschnitt 2.3). Die gemessenen Zellen befanden sich in vergleichbaren Arealen des Mittelhirns (siehe Abbildung 3.17).

### 3.2.1 Passive Membraneigenschaften

Die Reaktion von Zellen auf injizierte Ströme wird maßgeblich von der Fläche der Membran und deren Eingangswiderstand ( $R_{\text{Eingang}}$ ) beeinflusst. Als Größenmaß für die Membranfläche wurde die langsame kapazitive Komponente ( $C_{\text{slow}}$ ) der Zellmembran herangezogen, da biologische Membranen eine spezifische Kapazität von etwa  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  besitzen (Cole, 1968; Gentet et al., 2000). Während die durchschnittliche Kapazität der DA VTA Neurone im KO unverändert im Vergleich zum WT war, ergab sich in DA SN Neuronen ein signifikant geringerer Wert für  $C_{\text{slow}}$ , was auf eine geringere Membranfläche der Somata und der proximalen Dendriten von DA SN Neurone in den KChIP4-KO-

Tieren hindeutet (siehe Abbildung 3.8 A). Eine immunhistochemische Analyse der Zellgröße wurde nicht durchgeführt.

Der Eingangswiderstand wurde mit Hilfe des Ohm'schen Gesetzes anhand des Hyperpolarisationsprotokolls bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.5.1) und war sowohl in Zellen aus WT- als auch aus KO-Tieren in VTA Neuronen mit etwa 950 M $\Omega$  etwa doppelt so hoch wie in DA SN Neuronen (etwa 450 M $\Omega$ ) (siehe Abbildung 3.8 B; Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4). Der Serienwiderstand war in allen gemessenen Zellen vergleichbar groß und lag in keinem Fall über 25 M $\Omega$  (siehe Abbildung 3.8 C).



**Abbildung 3.8: Passive Membraneigenschaften und Serienwiderstand von DA Neuronen der SN und VTA**

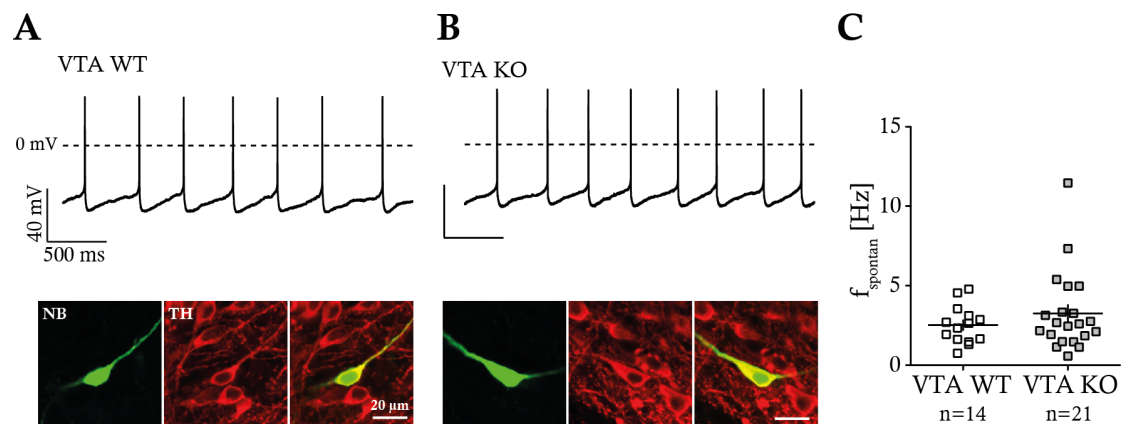
**A:** Die Membrankapazität war in SN Neuronen aus KO-Tieren signifikant geringer als in WT-Tieren, während die Werte von DA VTA Neuronen unverändert blieben. **B:** DA SN Neurone hatten sowohl im WT als auch im KO einen geringeren Eingangswiderstand als DA VTA Neurone. **C:** Der Serienwiderstand nahm in allen Gruppen vergleichbare Werte an.

### 3.2.2 KChIP4 hat keine Bedeutung für die Spontanfrequenz dopaminerger Neurone

Die gemessenen DA VTA und SN Neurone zeigten *in vitro* unter synaptischer Isolation eine regelmäßige Spontanaktivität, die in repräsentativen Beispielen in Abbildung 3.9 bzw. Abbildung 3.10 (A, B) zu sehen ist. Im WT waren DA VTA Neurone mit einer mittleren Spontanfrequenz von  $2,5 \pm 0,3$  Hz (n=14) fast doppelt so schnell wie SN Neurone, deren spontane Entladungsrate  $1,5 \pm 0,14$  Hz (n=16) betrug. Weder in der SN noch in der VTA zeigten sich signifikante

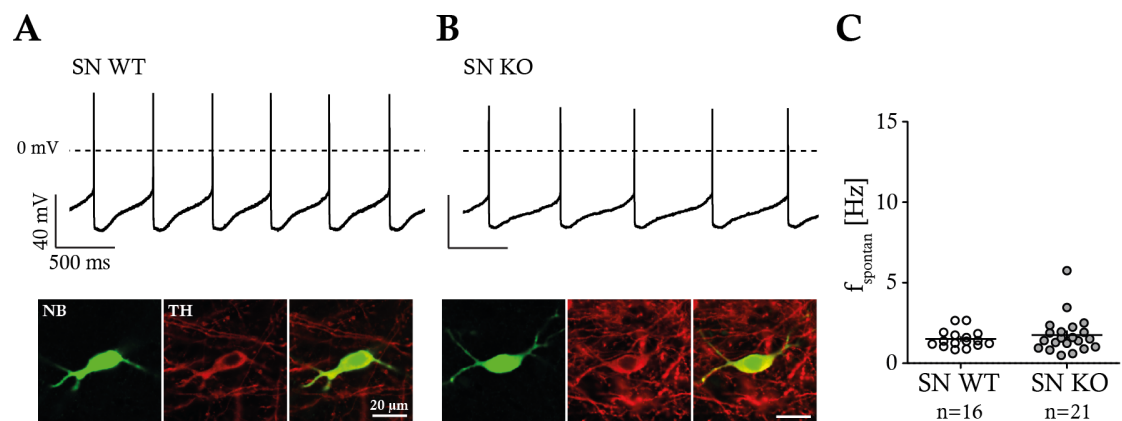


Unterschiede in der Spontanaktivität zwischen DA Zellen aus WT- und KO-Tieren (Werte siehe Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4).



**Abbildung 3.9: KChIP4 spielt keine Rolle für die Spontanfrequenz von DA VTA Neuronen**

**A–B:** Beispielmessungen spontanaktiver DA VTA Neurone aus WT- bzw. KO-Tieren (oben) mit entsprechender konfokalmikroskopischer Aufnahme der Neurobiotin-Signale sowie der TH-Expression (unten). **C:** Die Spontanfrequenz war in DA VTA Neuronen aus KO-Tieren nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu Zellen aus WT-Tieren.

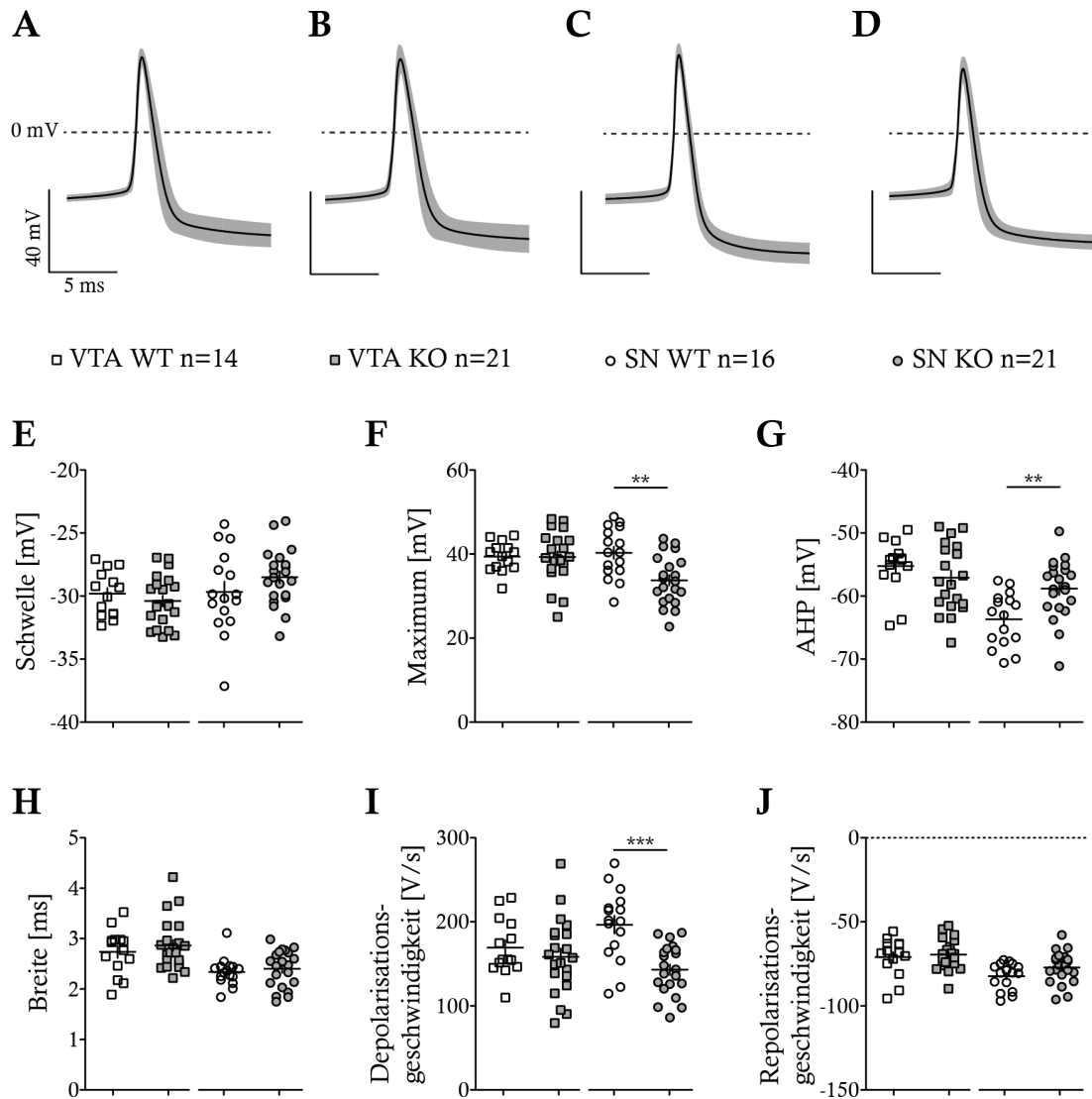


**Abbildung 3.10: KChIP4 beeinflusst nicht die Spontanfrequenz von DA SN Neuronen**

**A–B:** Originalaufnahmen spontanaktiver DA SN Neurone aus WT- bzw. KO-Tieren (oben). Konfokalmikroskopische Bestätigung des DA Phänotyps der gemessenen Zellen (unten). **C:** Statistischer Vergleich der Spontanfrequenz von DA SN Neuronen aus WT- und KO-Tieren. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Spontanfrequenz.

### **3.2.3 Die Bedeutung der KChIP4-Untereinheit für die Aktionspotentialparameter dopaminerger Mittelhirnneurone**

Um die Rolle der KChIP4-Untereinheit für Aktionspotentialparameter zu untersuchen, wurden diese in hoher zeitlicher Auflösung (50 kHz) aufgenommen und die Schwelle, Breite an der Schwelle, maximale Depolarisation und Nachhyperpolarisation sowie die Geschwindigkeit der Potentialänderung während der De- und Repolarisationsphase analysiert (siehe Abschnitt 2.2.5.1). Keiner der untersuchten Parameter unterschied sich signifikant zwischen DA VTA Neuronen aus WT- und KO-Tieren (siehe Abbildung 3.11 und Tabelle 3.4). In DA SN Neuronen wurde hingegen eine Verringerung der Amplitude der Aktionspotentiale festgestellt, die sich sowohl im maximal erreichten Depolarisationspotential, als auch in der Amplitude der Nachhyperpolarisation widerspiegelte (siehe Abbildung 3.11 F und G). Ebenfalls signifikant verändert war die Geschwindigkeit der Potentialänderung im Verlauf der Aufstrichphase des Aktionspotentials (siehe Abbildung 3.11 I). Die Schwelle der Aktionspotentiale war unverändert und lag in allen Zellen bei etwa  $-30$  mV (siehe Abbildung 3.11 E und Tabelle 3.4).



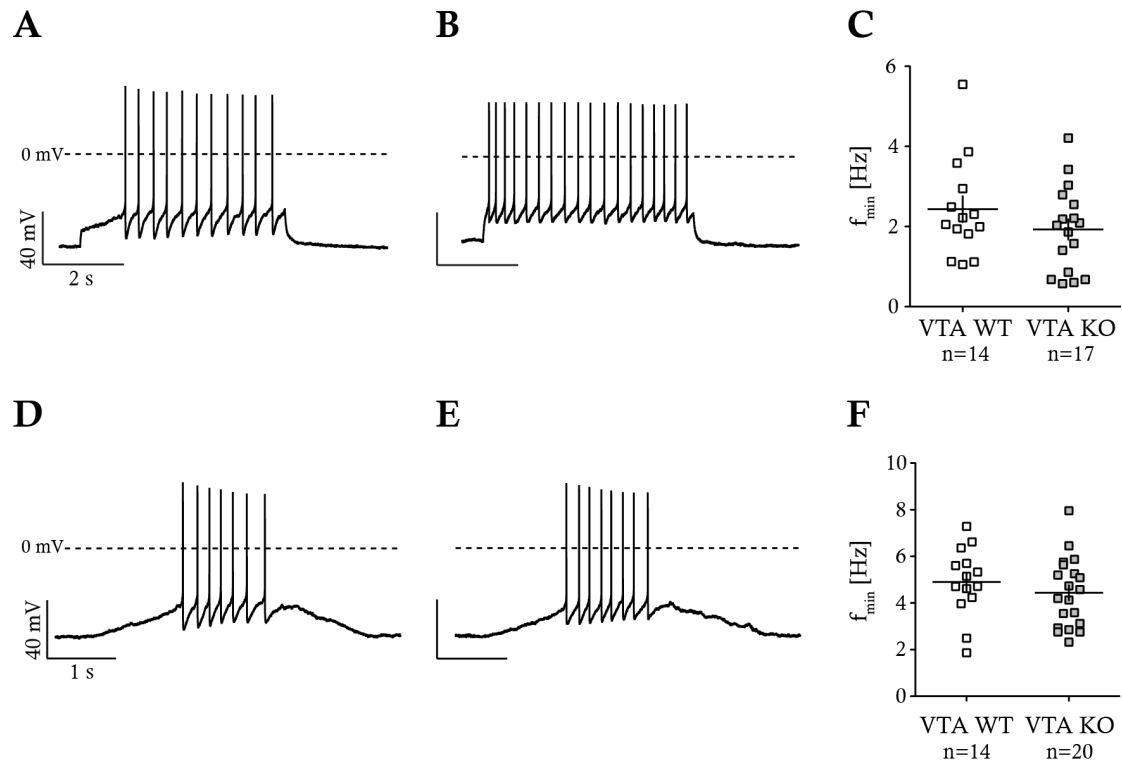
### Abbildung 3.11: Aktionspotentialparameter von DA Neuronen sind zum Teil abhängig von der KChIP4-Expression

**A–B:** Aktionspotentiale von DA VTA Neuronen aus WT- bzw. KChIP4-KO Tieren. Schwarze Spur: gemittelte Aktionspotentiale aller gemessener Zellen, grauer Schatten: Standardabweichung. **C–D:** Gemittelte Aktionspotentiale von DA SN Neuronen aus WT bzw. KChIP4-KO Tieren. Darstellung entspricht A–B. **E–J:** Aktionspotentialparameter von DA Mittelhirnneuronen. Die Aktionspotentiale von DA SN Neuronen aus KO-Tieren hatten eine geringere maximale Depolarisation (F) sowie eine geringere Nachhyperpolarisation (G) im Vergleich zu Zellen aus WT-Tieren. Die maximale Geschwindigkeit der Depolarisation war ebenfalls signifikant reduziert (I), während alle anderen Parameter unverändert waren. In DA VTA Neuronen unterschied sich keiner der untersuchten Parameter signifikant zwischen WT- und KO-Tieren.

### **3.2.4 KChIP4 bremst die Maximalfrequenz dopaminerger VTA Neurone**

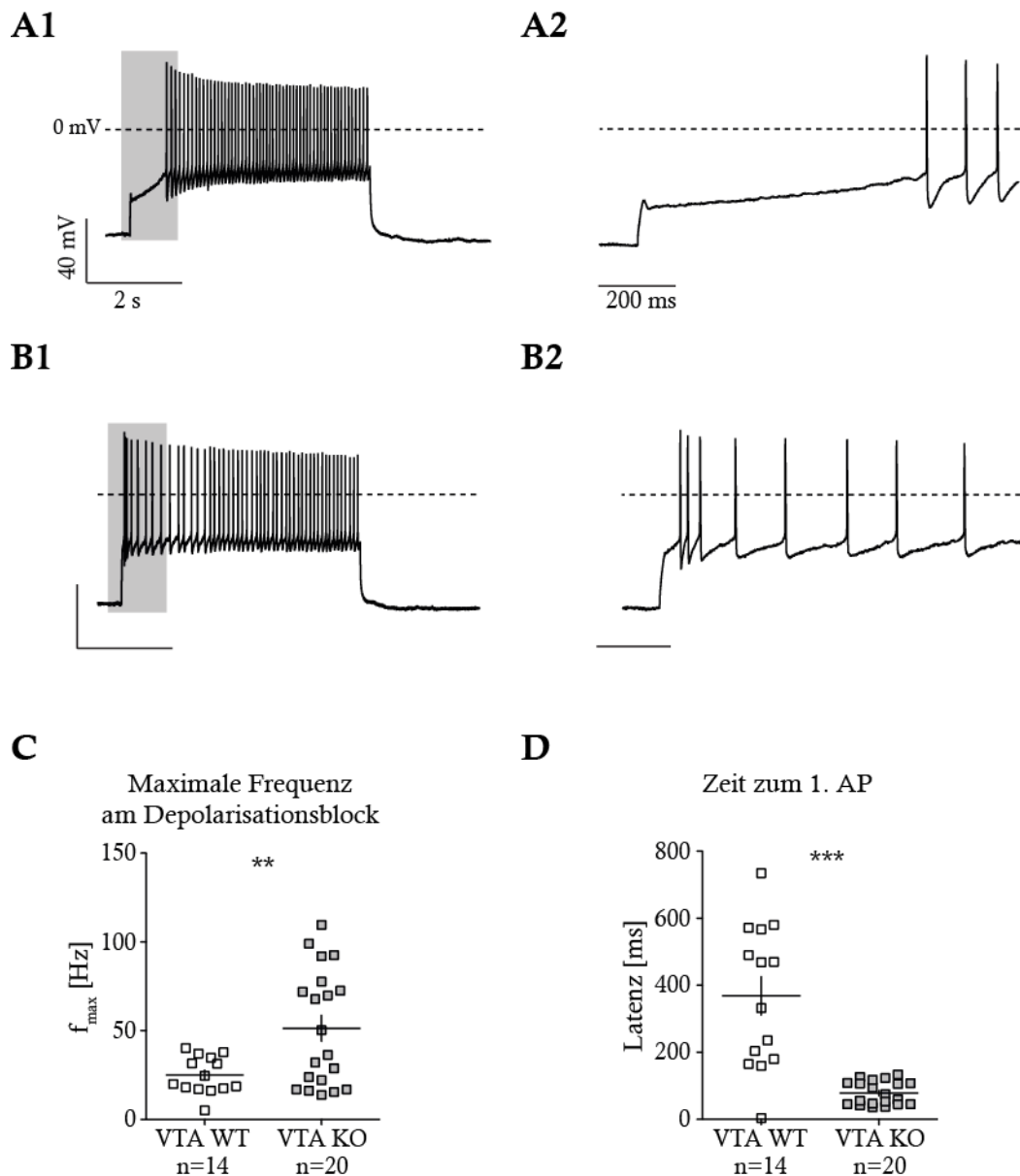
Der dynamische Frequenzbereich von DA Neuronen wurde mittels Injektion von depolarisierenden Strömen untersucht. Es wurden aufeinanderfolgende Strominjektionen von steigender Amplitude und einer Dauer von 5 Sekunden durchgeführt (Stufenprotokoll) sowie Stromrampen mit zunehmender Steigung appliziert. Die aus beiden Depolarisationsprotokollen ermittelte Minimalfrequenz (siehe Abschnitt 2.2.5.1) war in DA VTA Neuronen aus WT- und KO-Tieren nicht signifikant unterschiedlich (siehe Abbildung 3.12 und Tabelle 3.3).

Während in DA VTA Neuronen aus WT-Tieren eine Maximalfrequenz von  $25,0 \pm 2,8$  Hz ( $n=14$ ) erreicht wurde, wiesen DA VTA Neurone aus KO-Tieren eine signifikant höhere Maximalfrequenz auf (VTA KO:  $51,3 \pm 7,3$  Hz ( $n=20$ );  $p=0,0067$ ), wobei diese vor allem in den ersten 500 ms der Strominjektion erreicht wurde (Abbildung 3.13 C). Zellen aus WT-Tieren zeigten dagegen zu Beginn der Depolarisation eine deutliche Latenz zum ersten Aktionspotential, die durchschnittlich 370 ms dauerte. Diese Latenzzeit lag in VTA Neuronen aus KO-Tieren bei etwa 80 ms, und war somit signifikant geringer als in WT-Tieren (siehe Abbildung 3.13 D). In DA Neuronen der SN waren sowohl die Maximalfrequenz als auch die Latenzzeit zum ersten Aktionspotential unverändert (siehe Tabelle 3.4). Eine funktionelle Kartierung der Zellen anhand ihrer erreichten Maximalfrequenz zeigte keine deutlichen lagespezifischen Unterschiede (siehe Abbildung 3.14).



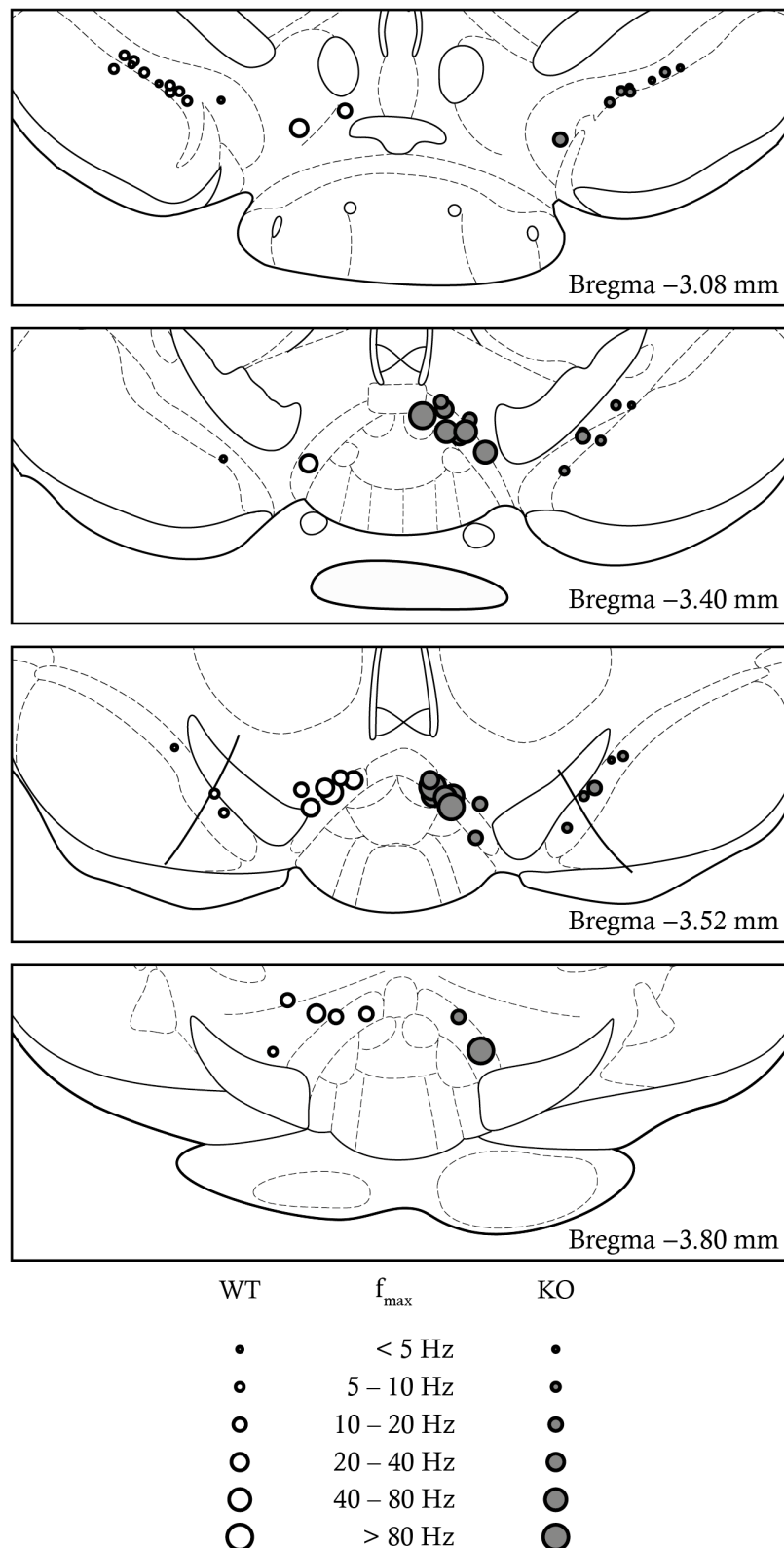
**Abbildung 3.12: Die Minimalfrequenz von DA VTA Zellen war unverändert**

**A–B:** Beispiele von Potentialantworten aus DA VTA Neuronen aus WT- bzw. KO-Tieren auf die erste Strominjektion, die Aktionspotentiale auslöste. **C:** Die in A bzw. B gemessene mittlere Frequenz war in WT- und KO-Tieren nicht signifikant unterschiedlich. **D–E:** Potentialantworten auf eine rampenförmige Depolarisation mit einer Steigung von 12,5 pA/s aus WT- bzw. KO-Tieren. **F:** Die aus dem ersten ISI berechnete Minimalfrequenz nahm in DA VTA Zellen aus WT- und KO-Tieren vergleichbare Werte an.



**Abbildung 3.13: DA VTA Neurone aus KChIP4-KO-Tieren erreichen eine höhere Maximalfrequenz**

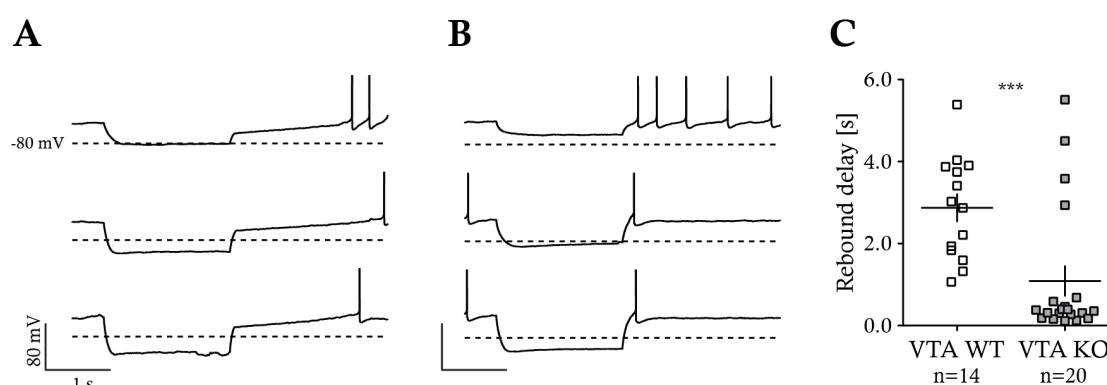
**A1–B1:** Potentialantworten von Neuronen aus WT- bzw. KChIP4-KO-Tieren nach einer 5 s langen Strominjektion Injektion von +150 pA. **A2–B2:** Vergrößerte Darstellung des in A1 und B1 grau hinterlegten Bereichs. **C:** Die durch Strominjektionen erreichte Maximalfrequenz war in DA VTA Neuronen aus KO-Tieren signifikant höher als in WT-Tieren. **D:** DA VTA Neurone aus WT-Tieren wiesen eine signifikant längere Latenz zum 1. Aktionspotential auf, als vergleichbare Zellen aus KO-Tieren.



**Abbildung 3.14: Frequenzkodierte Kartierung der gemessenen SN und VTA Neurone**  
 Funktionelle Kartierung der gemessenen Zellen aus WT-Tieren (linke Bildhälfte) und KChIP4-KO-Tieren (rechte Bildhälfte). Die Symbolgröße entspricht der Maximalfrequenz, die nach depolarisierenden Strominjektionen erreicht wurde (modifiziert nach Paxinos und Franklin, 2007).

### 3.2.5 KChIP4-Expression verlangsamt die Erholung nach einer Inhibition

Die Injektion hyperpolarisierender Ströme erzeugte sowohl in DA VTA als auch in DA SN Neuronen eine deutliche Hyperpolarisation, was zum Ausbleiben der Spontanaktivität führte (siehe Abbildung 3.15 und Abbildung 3.16). In DA SN Neuronen, die im Vergleich zu VTA Neuronen einen geringeren Eingangswiderstand aufwiesen (siehe Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4;  $R_{\text{Eingang}}$ ), erreichte das Potential erst nach Injektion von etwa  $-80$  pA den Wert von  $-80$  mV (Abbildung 3.16 A). In DA VTA Neuronen hingegen wurden der  $-80$  mV-Wert schon ab einer Stromstärke von  $-20$  pA erreicht (Abbildung 3.15 A). DA SN Neurone wiesen außerdem einen ausgeprägten „Sag“ auf, eine Depolarisation des Membranpotentials, die von HCN-Kanälen getragen wird und der hyperpolarisierenden Strominjektion entgegenwirkt. Die Amplitude des Sag wurde bei dem Stromschritt ausgewertet, der die Zelle auf ein Potential von mindestens  $-80$  mV hyperpolarisierte und zeigte in Zellen aus KO-Tieren keine Veränderung im Vergleich zu Neuronen aus WT-Tieren (etwa 17 mV, siehe Tabelle 3.4). In DA VTA Neuronen wies der Sag sowohl in WT- als auch in KO-Tieren eine geringere Amplitude auf, als in DA SN Neuronen, und lag im Mittel bei etwa 6 mV (siehe Tabelle 3.3).

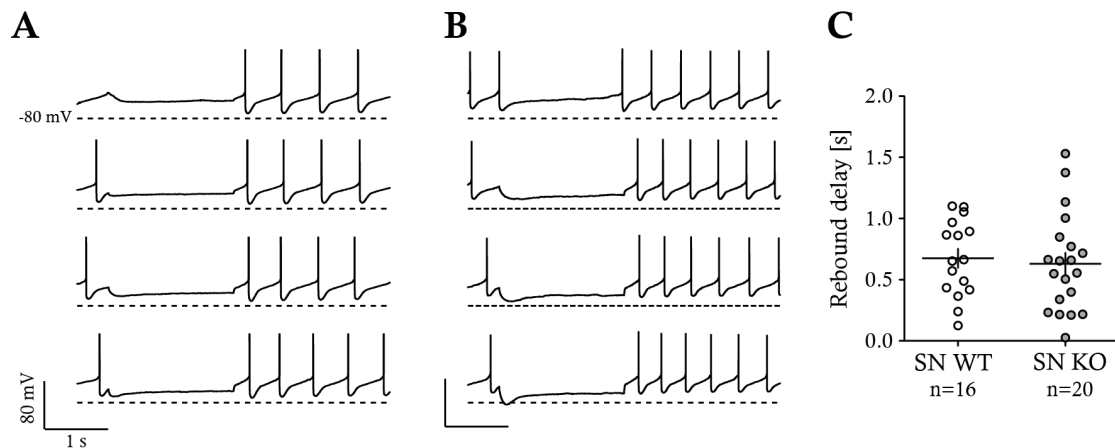


**Abbildung 3.15: KChIP4 erhöht selektiv in DA VTA Neuronen die Latenzzeit zum nächsten Aktionspotential nach einer Inhibition**

**A–B:** Hyperpolarisation von DA VTA Neuronen aus WT- bzw. KO-Tieren durch Injektion von  $-20$  bis  $-60$  pA. **C:** Die Latenzzeit zum ersten Aktionspotential war in Zellen aus KO-Tieren signifikant geringer als in WT-Tieren.



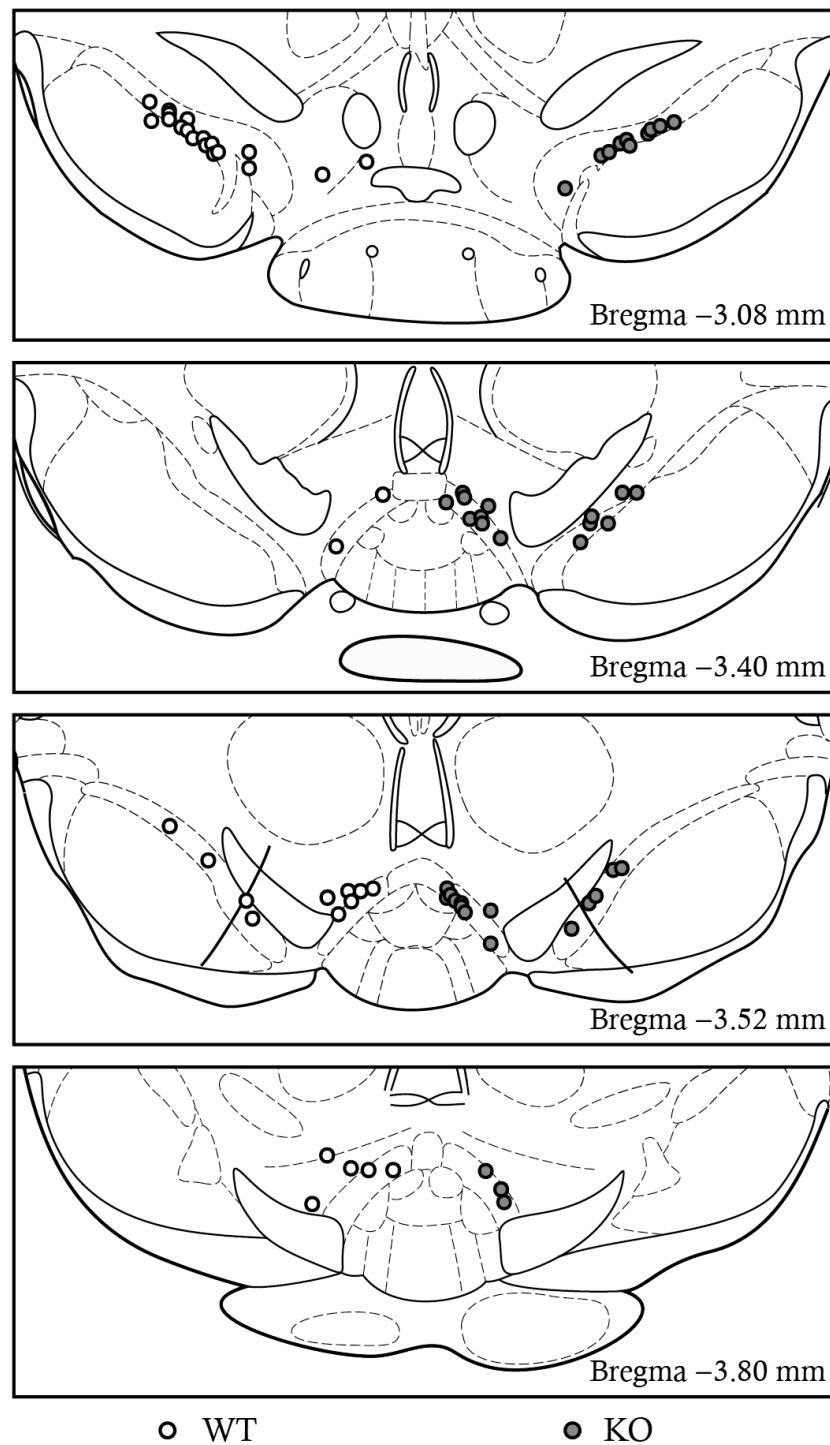
Anhand des Hyperpolarisationsprotokolls wurde außerdem die Latenzzeit vom Ende der Strominjektion bis zum nächsten Aktionspotential ausgewertet, die als *rebound delay* bezeichnet wird. Deren Auswertung erfolgte ebenfalls bei dem Stromschritt, der die Zelle auf ein Potential von  $-80$  mV hyperpolarisierte. Der *rebound delay* lag sowohl in WT- als auch in KO-Tieren in DA SN Neuronen bei etwa 700 ms (siehe Abbildung 3.16 und Tabelle 3.4). In DA VTA Neuronen hingegen wurde das nächste Aktionspotential nach Ende der Hyperpolarisation in WT-Tieren im Mittel erst nach drei Sekunden ausgelöst (VTA WT:  $2,9 \pm 0,3$  s (n=14)), während in DA VTA Neuronen aus KO-Tieren die Latenz nur etwa ein Drittel der Zeit betrug (VTA KO:  $1,1 \pm 0,4$  s (n=20);  $p=0,0007$ ; Abbildung 3.15 und Tabelle 3.3).



**Abbildung 3.16: Die Latenzzeit zum nächsten Aktionspotential war in DA SN Neuronen unabhängig von der KChIP4-Expression**

**A–B:** Injektion hyperpolarisierender Ströme ( $-20$  bis  $-80$  pA) in DA SN Neuronen aus WT- bzw. KO-Tieren. **C:** Die Latenzzeit zum nächsten Aktionspotential war zwischen WT- und KO-Tieren in DA SN Neuronen nicht signifikant unterschiedlich.

Alle Werte der Grundcharakterisierung von DA SN und VTA Neuronen aus WT- und KChIP4-KO-Tieren sind in Tabelle 3.4 und Tabelle 3.3 zusammengefasst.



**Abbildung 3.17: Kartierung aller gemessenen DA SN und VTA Neurone**

Die Zellen der SN und VTA aus WT- und KO-Tieren waren in ähnlichen Bereichen des Mittelhirns verteilt. Auf der linken Seite befinden sich die Zellen aus WT-Tieren, auf der rechten die von KO-Tieren (modifiziert nach Paxinos und Franklin, 2007).

	VTA WT	n	VTA KO	n	p-Wert	
Kapazität [pF]	17,6 ± 1,2	14	16,6 ± 1,3	21	0,5701	ns
Serienwiderstand [MΩ]	12,6 ± 0,9	14	14,0 ± 0,8	21	0,2699	ns
R <sub>Eingang</sub> [MΩ]	953,3 ± 36,0	12	1064,0 ± 48,6	20	0,1189	ns
f <sub>spontan</sub> [Hz]	2,5 ± 0,3	14	3,3 ± 0,6	21	0,2578	ns
f <sub>min</sub> [Hz] (Rampenprotokoll)	6,7 ± 0,6	14	5,8 ± 0,5	20	0,2004	ns
f <sub>min</sub> [Hz] (Schrittprotokoll)	2,4 ± 0,3	14	1,9 ± 0,3	17	0,2304	ns
f <sub>max</sub> [Hz]	25,0 ± 2,8	14	51,3 ± 7,3	20	0,0026 <sup>W</sup>	**
Latenz zum 1. AP [ms]	368,6 ± 57,1	14	78,1 ± 7,8	20	0,0002 <sup>W</sup>	***
Sag-Amplitude [mV]	6,1 ± 1,5	14	6,5 ± 0,9	21	0,5557 <sup>M</sup>	ns
Rebound delay [s]	2,9 ± 0,3	14	1,1 ± 0,4	20	0,0007 <sup>M</sup>	***
AP-Schwelle [mV]	-29,8 ± 0,5	14	-30,4 ± 0,4	21	0,3949	ns
AP-Breite [ms]	2,7 ± 0,1	14	2,9 ± 0,1	21	0,4465	ns
AP-Maximum [mV]	39,4 ± 1,0	14	39,3 ± 1,4	21	0,9575 <sup>W</sup>	ns
AHP [mV]	-55,2 ± 1,2	14	-57,1 ± 1,1	21	0,2885	ns
AP-Amplitude [mV]	69,2 ± 1,0	14	69,7 ± 1,5	21	0,7943	ns
Depolarisationsrate [mV/ms]	169,3 ± 9,1	14	158,5 ± 10,0	21	0,4487 <sup>M</sup>	ns
Repolarisationsrate [mV/ms]	-71,0 ± 3,0	14	-69,5 ± 2,0	21	0,6687	ns

Tabelle 3.3: Ergebnisse der *Whole-Cell* Grundcharakterisierung von DA VTA Neuronen

<sup>W</sup>: Ungepaarter t-Test mit Korrektur nach Welch; <sup>M</sup>: Mann-Whitney-Test

	SN WT	n	SN KO	n	p-Wert	
<b>Kapazität [pF]</b>	31,1 ± 1,3	19	24,8 ± 0,9	21	0,0003	***
<b>Serienwiderstand [MΩ]</b>	10,8 ± 0,6	19	11,7 ± 1,0	21	0,4162 <sup>W</sup>	ns
<b>R<sub>Eingang</sub> [MΩ]</b>	433,6 ± 34,6	16	461,7 ± 30,1	21	0,5438	ns
<b>f<sub>spontan</sub> [Hz]</b>	1,5 ± 0,1	16	1,8 ± 0,3	21	0,6790 <sup>M</sup>	ns
<b>f<sub>max</sub> [Hz]</b>	5,7 ± 0,4	15	7,3 ± 0,9	19	0,1154 <sup>W</sup>	ns
<b>Latenz zum 1. AP [ms]</b>	169,5 ± 23,9	14	208,4 ± 43,0	17	0,4354 <sup>W</sup>	ns
<b>Sag-Amplitude [mV]</b>	17,0 ± 0,9	16	17,3 ± 1,1	21	0,8082	ns
<b>Rebound delay [s]</b>	0,7 ± 0,1	16	0,6 ± 0,1	20	0,7177	ns
<b>AP-Schwelle [mV]</b>	-29,7 ± 0,8	16	-28,5 ± 0,5	21	0,2096	ns
<b>AP-Breite [ms]</b>	2,3 ± 0,1	16	2,4 ± 0,1	21	0,5889	ns
<b>AP-Maximum [mV]</b>	40,3 ± 1,5	16	33,8 ± 1,3	21	0,0019	**
<b>AHP [mV]</b>	-63,7 ± 1,1	16	-58,8 ± 1,0	21	0,0025	**
<b>AP-Amplitude [mV]</b>	70,0 ± 1,9	16	62,3 ± 1,5	21	0,0030	**
<b>Depolarisationsrate [mV/ms]</b>	196,5 ± 10,8	16	143,0 ± 6,6	21	<0,0001	***
<b>Repolarisationsrate [mV/ms]</b>	-82,3 ± 2,0	16	-77,2 ± 2,1	21	0,0896	ns

**Tabelle 3.4: Ergebnisse der *Whole-Cell* Grundcharakterisierung von DA SN Neuronen**

<sup>W</sup>: Ungepaarter t-Test mit Korrektur nach Welch; <sup>M</sup>: Mann-Whitney-Test

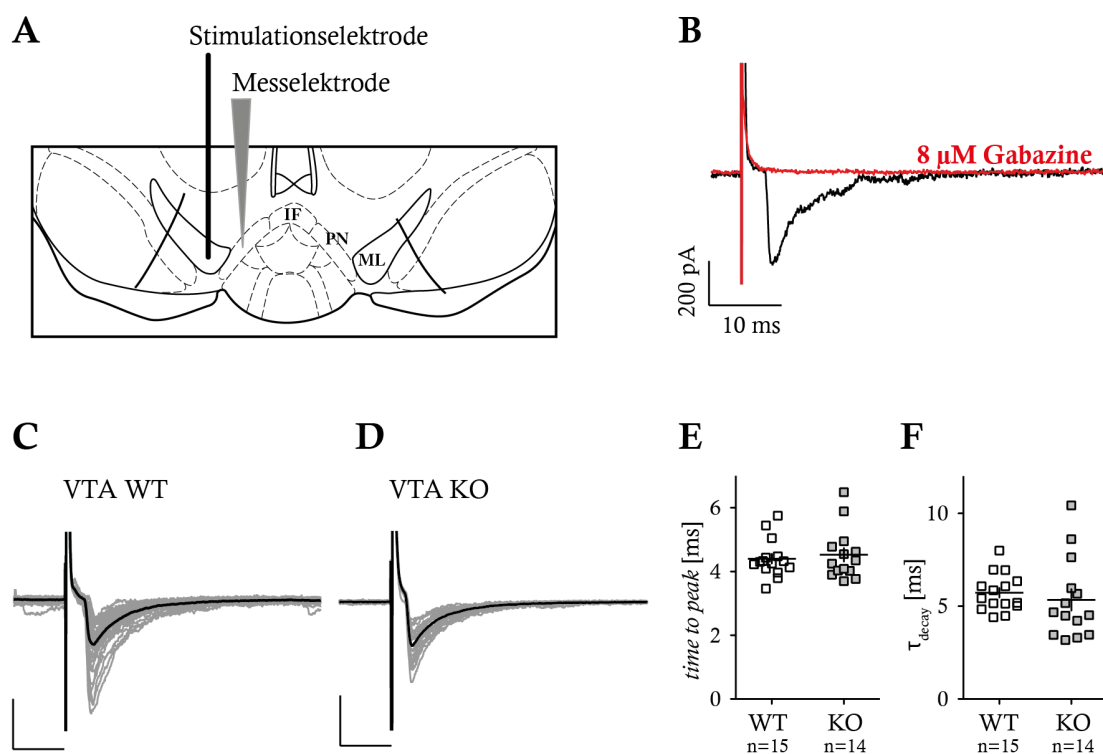
## 3.3 KChIP4 moduliert die Verarbeitung von inhibitorischen synaptischen Eingängen in dopaminergen VTA Neuronen

### 3.3.1 Inhibitorische synaptische Eingänge sind unverändert

Bevor die Rolle von KChIP4 für die Verarbeitung inhibitorischer synaptischer Eingänge untersucht werden konnte, wurden die Eigenschaften GABAerger Eingänge auf DA VTA Neuronen analysiert, um auszuschließen, dass diese im KChIP4-KO kompensatorisch verändert waren (siehe Abschnitt 2.2.6.1). Hierfür wurden evozierte synaptische Ströme mit Hilfe einer bipolaren Stimulations-elektrode ausgelöst (siehe Abbildung 3.18 A). Durch Zugabe von Antagonisten der ionotropen Glutamat- und Acetylcholinrezeptoren, konnten GABA-vermittelte synaptische Ströme (eIPSC: *evoked inhibitory postsynaptic currents*) isoliert und in DA Neuronen in der *Whole-Cell* Konfiguration im *Voltage-Clamp* Modus gemessen werden.

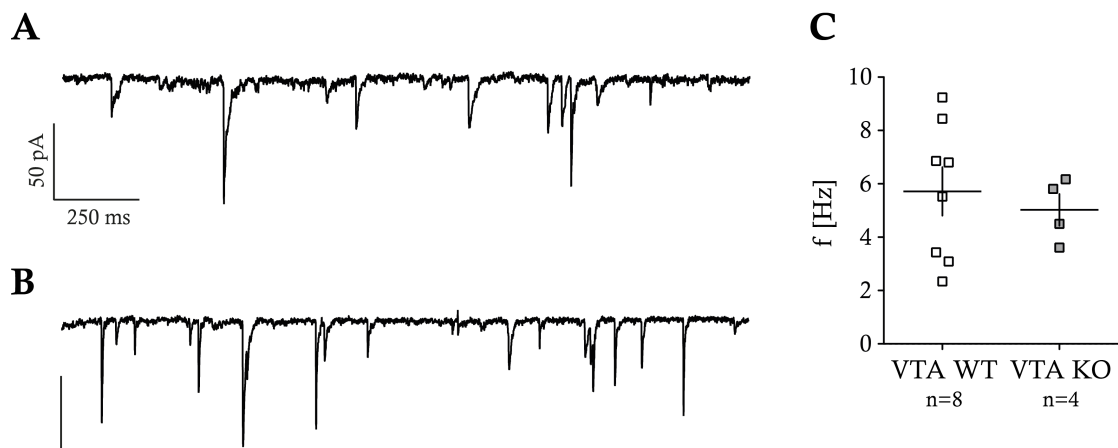
Die eIPSC manifestierten sich dabei als Einwärtsströme, was sich durch die hohe Chloridkonzentration der Pipettenlösung und dem gewählten Haltepotential von  $-70$  mV erklären lässt. Das gemessene Umkehrpotential der Ströme, welches bei  $0$  mV lag, entspricht dem errechneten Wert für das Chloridumkehrpotential. Außerdem blockierte der GABA<sub>A</sub>-R-Blocker Gabazine die eIPSC (siehe Abbildung 3.18 B). Bei den gemessenen Strömen handelte es sich somit um GABA<sub>A</sub>-R-vermittelte Chloridauswärtsströme. In Abbildung 3.18 C und D sind einzelne eIPSC (graue Stromspuren) aus Neuronen von WT- bzw. KO-Tieren dargestellt. Diese wurden für jede Zelle gemittelt (schwarze Stromspur) und deren Aktivierungs- und Deaktivierungsparameter ermittelt. Auf eine Bestimmung der Stromamplitude wurde verzichtet, da diese von der Anzahl der stimulierten Axone abhängig ist und der Vergleich zwischen den verschiedenen Zellpopulationen keine sinnvolle Aussage liefern würde. Weder die Zeit zum Erreichen des Maximalstroms (*time to peak*; Abbildung 3.18 E) noch die

Deaktivierungskinetik ( $\tau_{\text{decay}}$ ; Abbildung 3.18 F) der GABAergen IPSCs waren zwischen DA Neuronen aus WT- und KO-Tieren signifikant unterschiedlich. Neben den Parametern der eIPSC wurde die Frequenz der spontan im Hirnschnitt auftretenden IPSC (sIPSC) untersucht. Dafür wurde das Potential der Zellen auf  $-70$  mV gehalten und für drei Minuten der über die Membran fließende Strom gemessen (siehe Abbildung 3.19). Aus der Anzahl der registrierten synaptischen Stromereignisse wurde deren Frequenz ermittelt, die in DA VTA Neuronen des KO im Vergleich zum WT unverändert war. Somit konnte eine kompensatorische Veränderung der GABAergen synaptischen Eingänge in DA VTA Neuronen des KChIP4-KO ausgeschlossen werden.



**Abbildung 3.18: GABAerge eIPSC waren in DA VTA Neuronen von KChIP4-KO-Tieren unverändert**

**A:** Die Stimulationselektrode wurde lateral zur Messelektrode im Bereich des medialen Lemniscus (ML) platziert. PN: Ncl. paranigralis, IF: Ncl. interfascicularis (modifiziert nach Paxinos und Franklin, 2007). **B:** Blockade der eIPSCs durch den GABA<sub>A</sub>-R-Antagonisten Gabazine. **C–D:** eIPSCs (grau) in DA VTA Neuronen aus WT- bzw. KO-Tieren. Die schwarze Stromspur entspricht dem Mittelwert aus allen in grau dargestellten eIPSCs. **E–F:** Sowohl die Zeit zum Maximalstrom als auch die Inaktivierungskinetik der eIPSCs waren in DA VTA Neuronen aus KO-Tieren unverändert im Vergleich zu den Werten aus WT-Tieren.



**Abbildung 3.19: Frequenz spontaner GABA<sub>A</sub>-R-vermittelter Ereignisse**

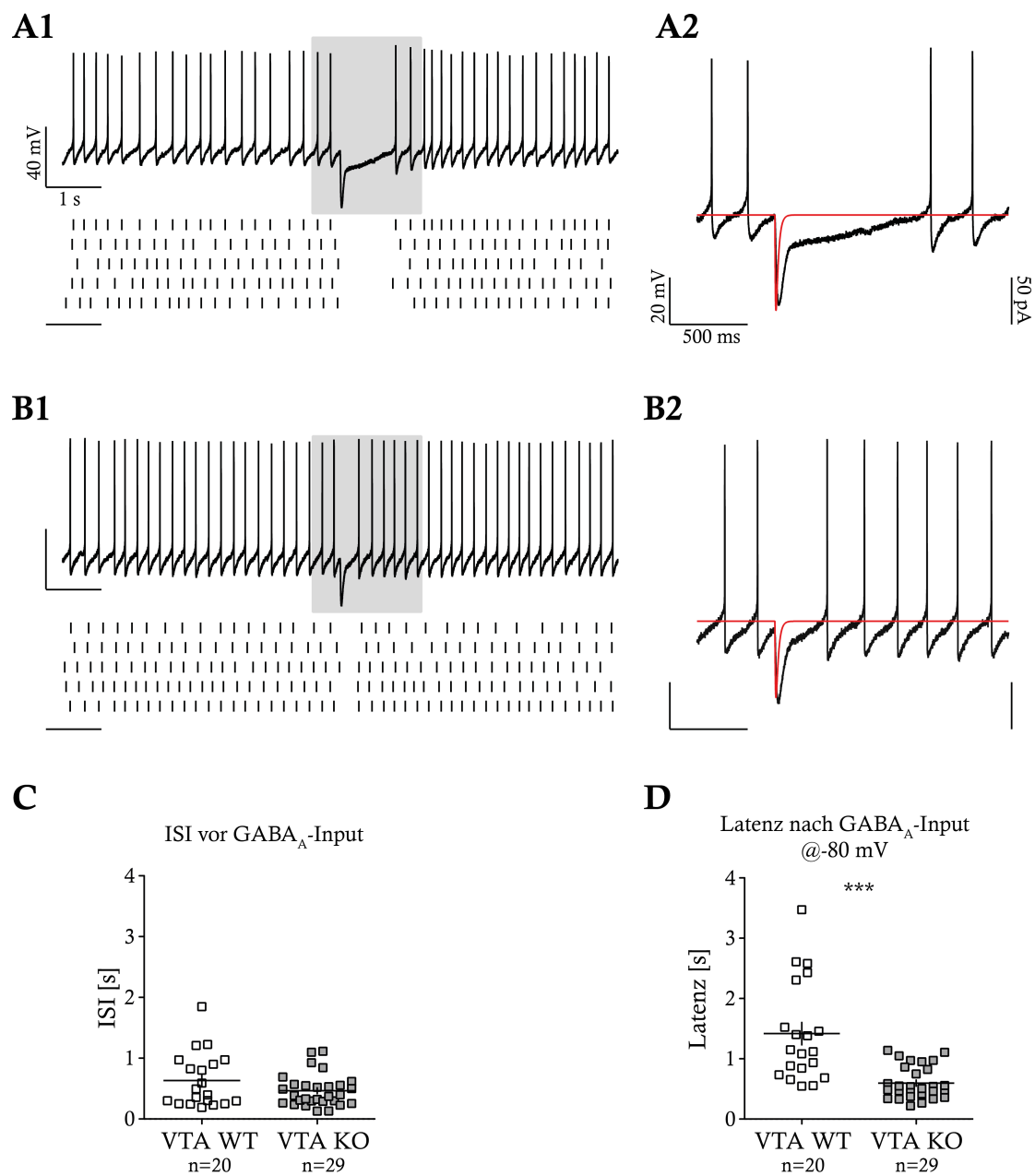
**A–B:** Ausschnitt einer dreiminütigen Messung der spontan auftretenden IPSC (sIPSC) gemessen in DA VTA Neuronen aus WT- (A) und KChIP4-KO-Tieren (B). **C:** Die Frequenzen der sIPSC in DA VTA Neuronen aus WT- und KO-Tieren waren nicht signifikant unterschiedlich.

### 3.3.2 KChIP4 beeinflusst die Verarbeitung inhibitorischer synaptischer Eingänge in dopaminergen VTA Neuronen

Aus der Injektion hyperpolarisierender Ströme wurde deutlich, dass DA Neurone des KChIP4-KO ein verändertes *rebound*-Verhalten nach einer Inhibition aufweisen (siehe Abschnitt 3.2.5). Da die Strominjektion des Hyperpolarisationsprotokolls mit einer Dauer von zwei Sekunden nicht einer physiologischen Inhibition entspricht, wurden hyperpolarisierende Ströme generiert, die in ihrer Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik GABAergen IPSC ähnlich sind (siehe Abschnitt 2.2.7), um die potentielle Rolle von KChIP4 in der Verarbeitung inhibitorischer synaptischer Eingänge zu untersuchen.

#### 3.3.2.1 Simulation synaptischer GABA-Eingänge in DA VTA Neuronen

Die Injektion von GABA<sub>A</sub>-R-ähnlichen Strömen resultierte in DA VTA Neuronen in einer Inhibition der Spontanaktivität durch eine Hyperpolarisation des Membranpotentials, deren Ausmaß in Neuronen aus WT-Tieren von der injizierten Stromamplitude abhängig war (siehe Abbildung 3.20 und Abbildung 3.21).



**Abbildung 3.20: Rolle von KChIP4 für die Verarbeitung künstlicher GABA<sub>A</sub>-Eingänge**

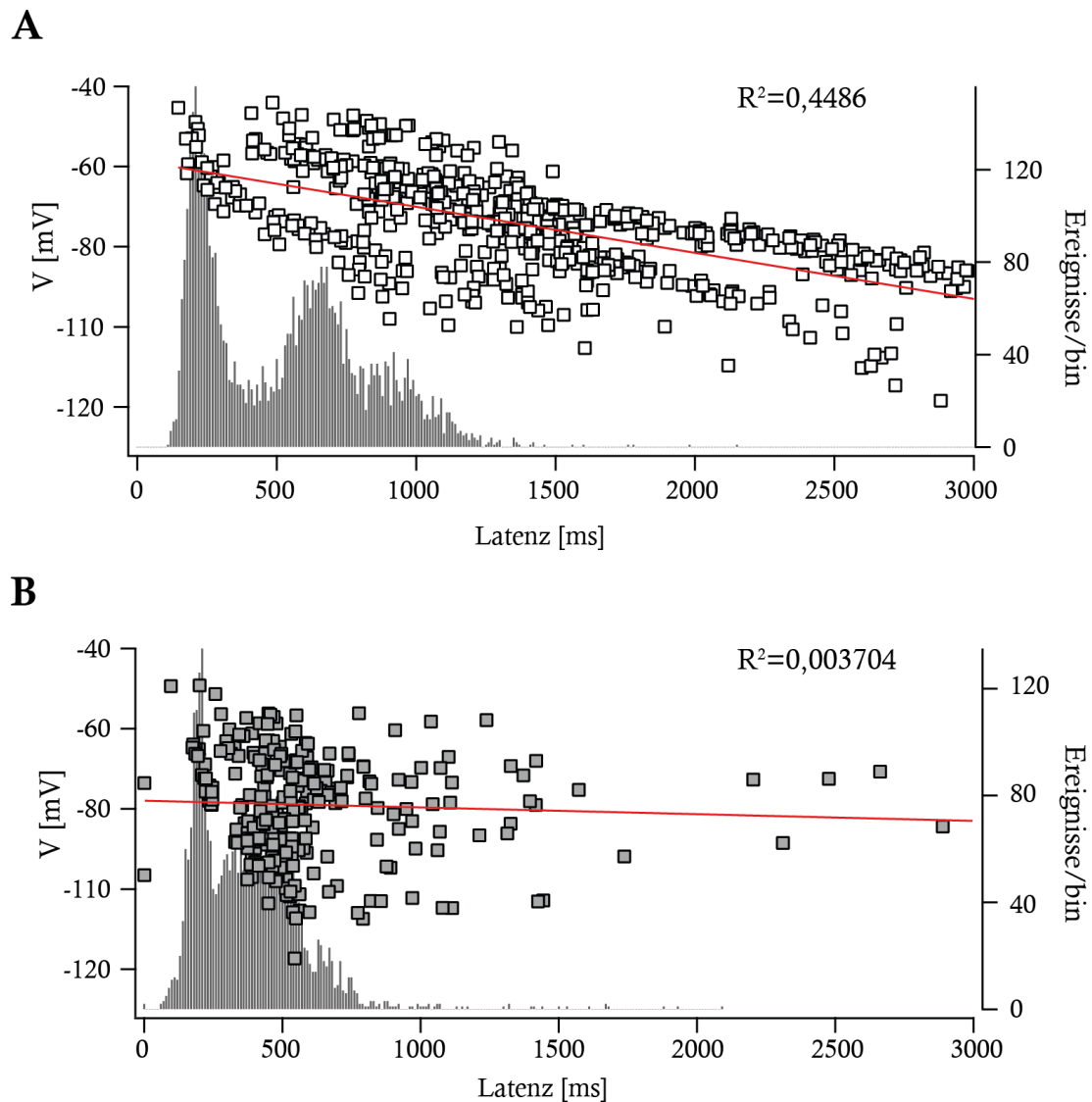
**A1–B1:** Repräsentative Messungen aus DA VTA Neuronen des WT bzw. KO (oben), korrespondierende Rasterplots (unten). Die Spontanaktivität wurde 5 s vor und nach der GABA<sub>A</sub>-Strominjektion aufgenommen. Der grau hinterlegte Bereich wird vergrößert in **A2** bzw. **B2** dargestellt. Rot: injizierte GABA<sub>A</sub>-ähnliche Stromspur. **C:** Die interspikeintervalle (ISI) aus DA VTA Neuronen von WT- und KO-Tieren unterschieden sich nicht signifikant voneinander, die Spontanfrequenz war somit unverändert. **D:** Die Latenzzeit zum nächsten Aktionspotential nach der Strominjektion war in DA VTA Neuronen aus KO-Tieren signifikant kürzer als in Neuronen von WT-Tieren.



Für die statistische Auswertung der Dauer der inhibitorischen Pause wurden Messungen herangezogen, bei welchen das durch die Strominjektion erreichte Potential zwischen  $-75$  und  $-85$  mV lag. In DA VTA Neuronen des WT war die Pause in der Spontanaktivität weitaus länger als die eigentliche Dauer der Strominjektion; die Latenzzeit bis zum nächsten Aktionspotential betrug dabei  $1418,0 \pm 185,2$  ms ( $n=20$ ). In DA VTA Neuronen aus KO-Tieren war die Pause signifikant kürzer als im WT und das nächste Aktionspotential wurde im Mittel schon nach  $596,0 \pm 50,3$  ms ( $n=29$ ;  $p<0,0001$ ) ausgelöst (siehe Abbildung 3.20). Die Spontanfrequenz von Neuronen aus KChIP4-KO-Tieren war nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu Zellen aus WT-Tieren (Abbildung 3.20 C).

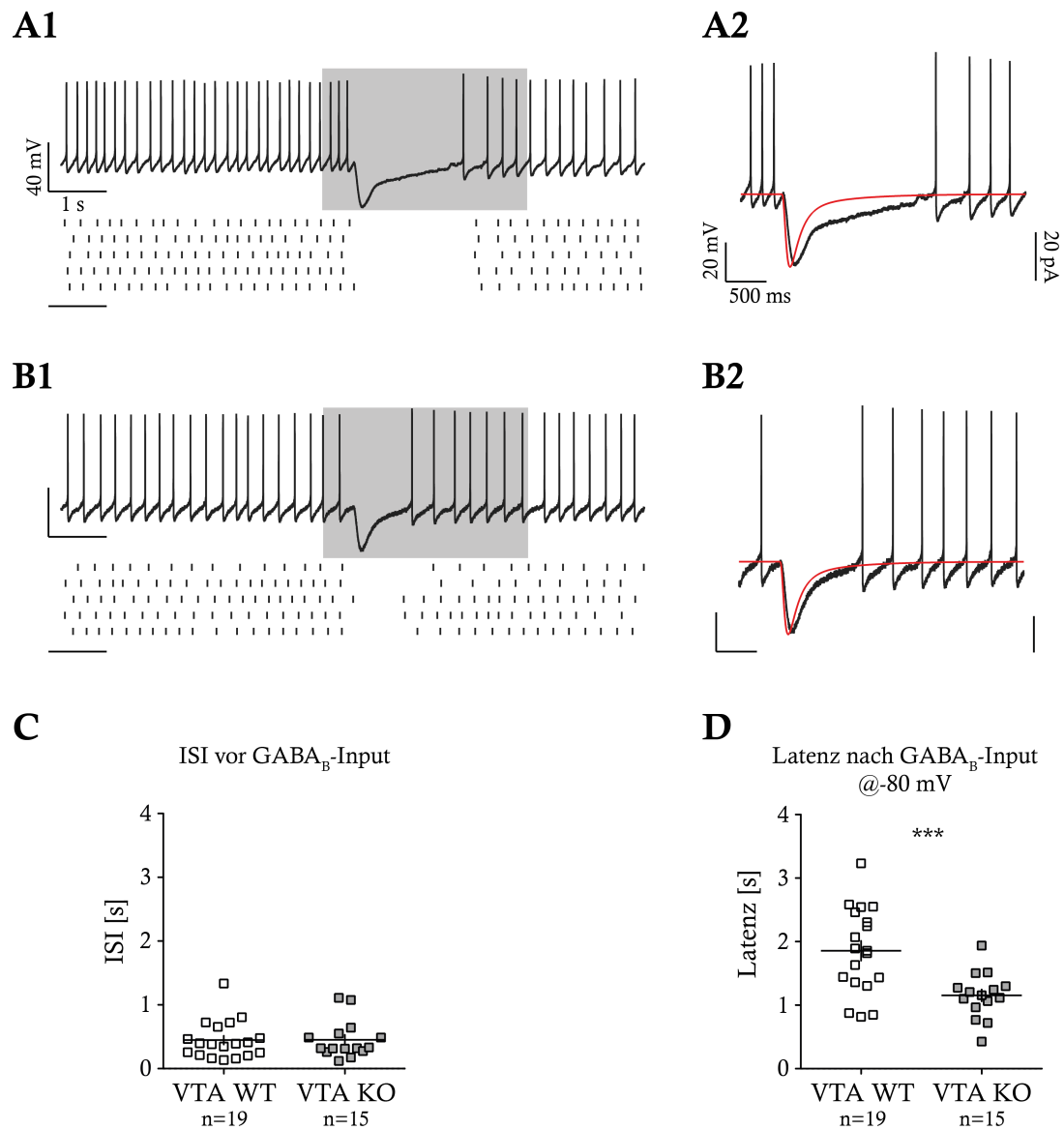
In Abbildung 3.21 ist die Abhängigkeit der Latenzzeit zum nächsten Aktionspotential (x-Achse) vom – durch die GABA<sub>A</sub>-ähnliche Strominjektion – erreichten Membranpotential (linke y-Achse) dargestellt. Um einen Vergleich der Dauer der hyperpolarisationsinduzierten Pause mit der Dauer der normalen Interspikeintervalle (ISI) zu ermöglichen, wurde im selben Graphen ein ISI-Histogramm aufgeführt. In DA VTA Neuronen aus WT-Tieren lag eine lineare Abhängigkeit der Latenzzeit vom Membranpotential vor (Pearson's  $R^2=0,4486$ ), so dass die Latenz bei negativeren Potentialen immer länger wurde und bei Potentialen unter  $-60$  mV bereits größer als die Dauer der normalen ISI war. In DA VTA Neuronen aus KO-Tieren zeigte sich hingegen keine Korrelation zwischen den beiden Größen ( $R^2=0,003704$ ) und die Latenzzeit zum nächsten Aktionspotential hatte eine vergleichbare Dauer mit der Pause zwischen zwei spontanen Aktionspotentialen.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei Strominjektionen beobachtet, die in ihrer Kinetik GABA<sub>B</sub>R-vermittelten synaptischen Strömen ähnelten (Abbildung 3.22). Die Latenzzeit zum nächsten AP betrug in DA VTA Neuronen aus WT-Tieren  $1856,0 \pm 154,4$  ms ( $n=19$ ), während in DA VTA Neuronen aus KO-Tieren das nächste AP im Mittel nach  $1153,0 \pm 93,29$  ms ( $n=15$ ;  $p=0,0009$ ) auftrat. Auch hier unterschied sich die Spontanfrequenz vor der Strominjektion nicht signifikant zwischen Zellen aus WT- und KO-Tieren.



**Abbildung 3.21: Abhängigkeit der Latenzzeit vom erreichten Membranpotential**

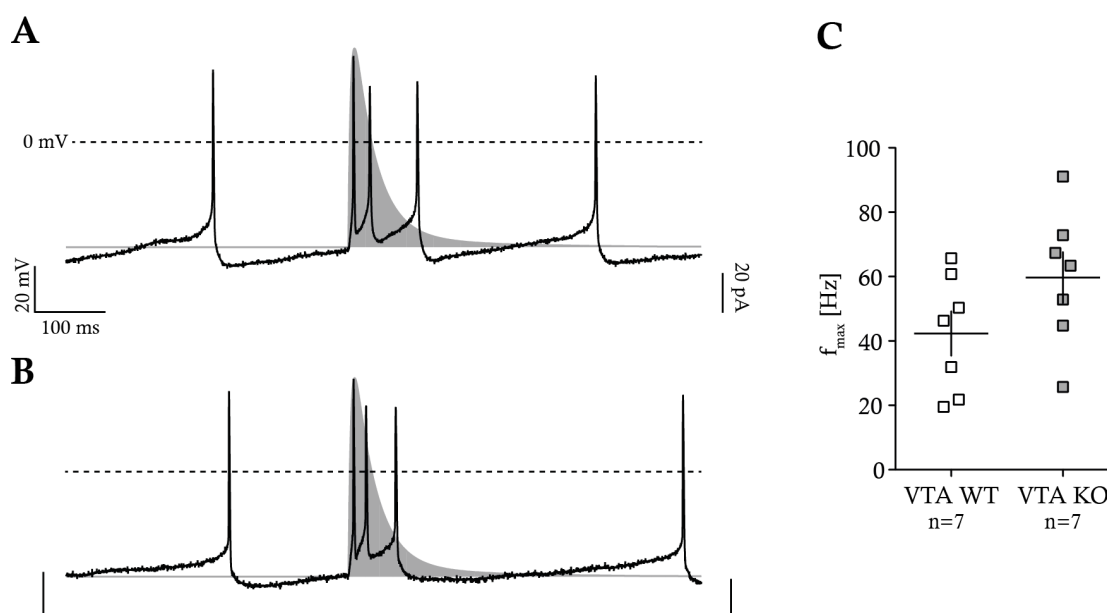
**A–B:** Für DA VTA Neurone des WT bzw. KO wurde das durch die Strominjektion erreichte Potential (linke y-Achse) gegen die Zeitdifferenz ab dem Beginn der Strominjektion bis zum Auftreten des nächsten AP (x-Achse) von allen gemessenen Zellen aufgetragen. Im Hintergrund ist ein ISI-Histogramm dargestellt (Anzahl der Ereignisse/bin auf der rechten y-Achse), um die Dauer der Latenz in Bezug zu der Dauer der ISI zu stellen. Die Pause überschritt in Neuronen aus WT-Tieren (A) bei Potentialen unter  $-80$  mV die Dauer eines normalen ISI und war linear vom Potential abhängig. In Zellen aus KO-Tieren (B) nahm die Pause ISI-ähnliche Werte an und es bestand keine signifikante lineare Korrelation zwischen der Latenzzeit und dem erreichten Membranpotential.



**Abbildung 3.22: Rolle von KChIP4 in der Verarbeitung künstlicher GABA<sub>B</sub>-Eingänge**  
**A-B:** Repräsentative Messungen aus DA VTA Neuronen aus WT- bzw. KO-Tieren mit korrespondierenden Rasterplots. Die Strominjektion erfolgte 5 s nach Beginn der Messung und die Spontanaktivität wurde für weitere 5 s registriert. **A2-B2:** Vergrößerung des in A1 bzw. B1 grau hinterlegten Bereiches. Rot: injizierter GABA<sub>B</sub>-ähnlicher Strom  
**C:** ISI aus DA VTA Neuronen des WT und KO vor der Strominjektion unterschieden sich nicht signifikant voneinander; die Spontanfrequenz war somit unverändert. **D:** Die Latenzzeit zum nächsten AP war in DA VTA Neuronen aus KO-Tieren signifikant kürzer als in Zellen aus WT-Tieren.

### 3.3.2.2 Simulation synaptischer NMDA-Eingänge in DA VTA Neuronen

Der Einfluss von KChIP4 auf die Verarbeitung exzitatorischer synaptischer Eingänge wurde durch die Injektion NMDA-ähnlicher Ströme untersucht. Im Gegensatz zur Injektion konstanter depolarisierender Ströme (Abschnitt 3.2.4), wurde das Membranpotential vor der NMDA-ähnlichen Strominjektion nicht auf  $-60$  mV hyperpolarisiert. Die Strominjektionen lösten in DA VTA Neuronen meist ein bis drei hochfrequente Aktionspotentiale aus, deren Maximalfrequenz durch den Kehrwert des ersten ISI bestimmt wurde und in Neuronen aus WT- und KChIP4-KO-Tieren nicht signifikant unterschiedlich war (VTA WT:  $42,3 \pm 6,9$  Hz (n=7); VTA KO:  $59,7 \pm 7,8$  Hz (n=7);  $p=0,1255$ ).



**Abbildung 3.23 Kein Einfluss von KChIP4 auf die Verarbeitung künstlicher NMDA-Eingänge**

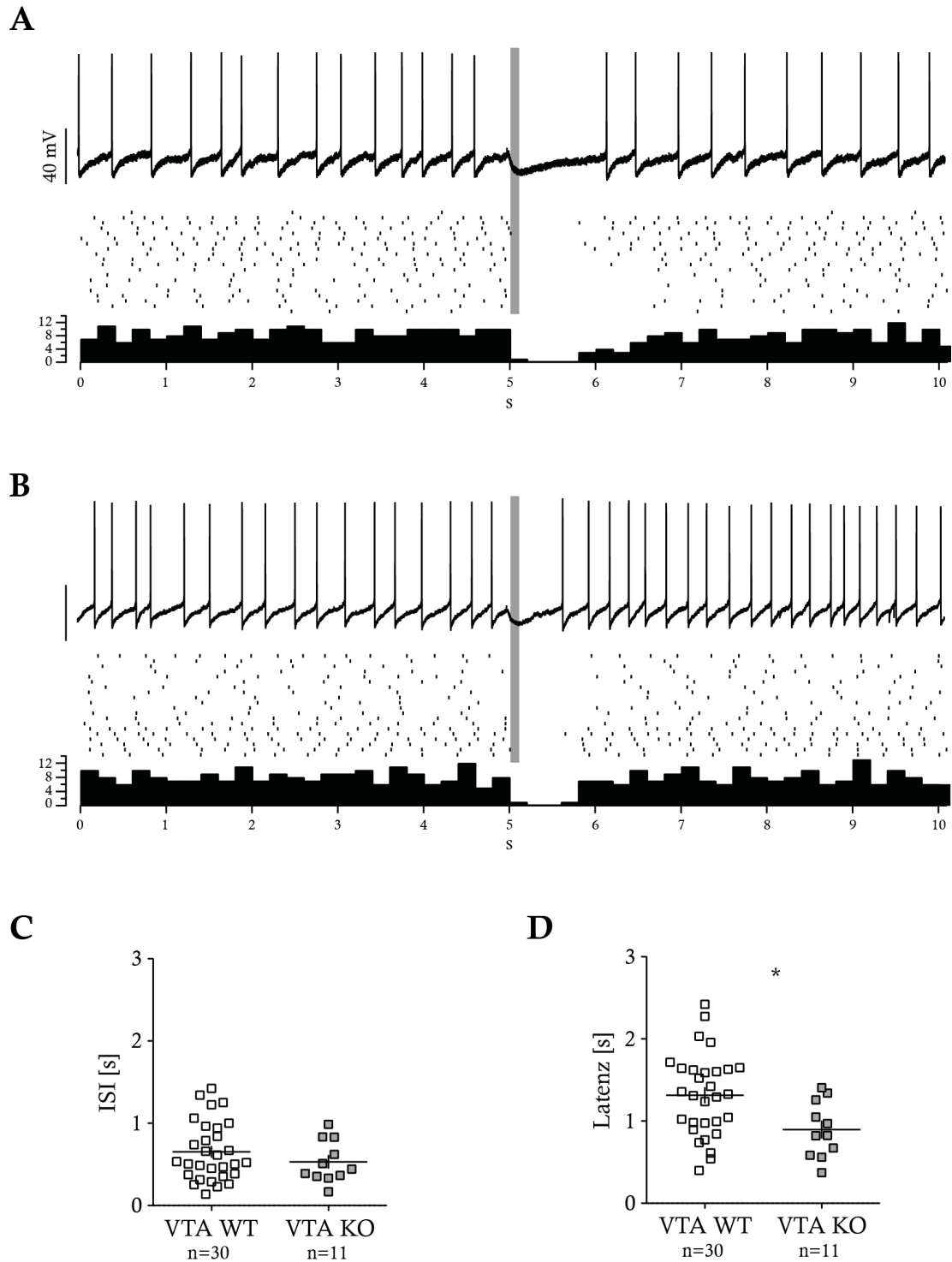
**A–B:** Potentialantworten von DA VTA Neuronen aus WT- bzw. KChIP4-KO-Tieren auf die Injektion eines NMDA-ähnlichen Stroms (graue Fläche) mit einer Amplitude von 100 pA. **C:** Die Maximalfrequenz wurde anhand des ersten ISI berechnet und unterschied sich nicht signifikant zwischen Zellen aus WT- und KO-Tieren.

### 3.3.3 KChIP4 verlängert die Pause in der elektrischen Aktivität nach physiologischer GABA-Rezeptoraktivierung

Um die physiologische Relevanz von KChIP4 für die GABA-induzierte Inhibition von DA VTA Neuronen zu überprüfen, wurden GABA-R durch

iontophoretische GABA-Applikation aktiviert und der Effekt auf die Spontanaktivität von DA VTA Neuronen untersucht (siehe Abschnitt 2.2.8). In diesen Versuchen wurden lediglich AMPA-R pharmakologisch blockiert. Etwa 50 % der Zellen wiesen dabei keine oder nur eine sehr langsame Spontanaktivität auf, sodass in einigen Fällen eine geringe Strominjektion erforderlich war, um eine initiale Aktivität zu erzielen. Die gemittelten ISI aus WT- und KO-Zellen waren nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 3.24 C) und die resultierende Hyperpolarisation erreichte ähnliche Werte, sodass die Ausgangsbedingungen für alle gemessenen Zellen vergleichbar waren. Bei Kontrollmessungen mit Zugabe von Gabazine wurde kein postsynaptischer Strom registriert, sodass davon ausgegangen werden kann, dass der gemessene Strom vorwiegend durch GABA<sub>A</sub>-R vermittelt wurde. Die Dauer der GABA-Applikation wurde auf 100 ms eingestellt. Durch die nötige Diffusion von GABA von der Applikationspipette zu den GABA-Rezeptoren wies der postsynaptisch registrierte Strom eine Verzögerung auf, die von der Entfernung der Micropipette zur gemessenen Zelle abhängig war.

In Abbildung 3.24 sind Beispielmessungen aus DA VTA Neuronen aus WT- (A) und KO-Tieren (B) während der Applikation von 10 mM GABA dargestellt. Die Aktivität der Zellen wurde 5 s vor und nach der GABA-R-Stimulation registriert; der graue Balken entspricht der Dauer der Iontophorese. In beiden Zellen ist eine deutliche Hyperpolarisation des Membranpotentials zu beobachten, die allerdings länger ausfällt als die tatsächliche Dauer der GABA-Applikation. In DA Neuronen aus WT-Tieren betrug die inhibitorische Pause im Mittel  $1314,00 \pm 91,71$  ms (n=30), während sie in Zellen aus KO-Tieren mit  $896,10 \pm 102,90$  ms signifikant kürzer war (n=11; p=0,0472). Diese Ergebnisse waren somit kohärent zu den Daten aus den künstlichen GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>-ähnlichen Strominjektionen. Der Unterschied der Länge der inhibitorischen Pause war zwar unter physiologischer GABA-R-Stimulation geringer, als bei der Injektion künstlicher GABA-Ströme, erreichte aber dennoch das Signifikanzniveau (siehe Abbildung 3.24 D).



**Abbildung 3.24: KChIP4 verlängert die GABA-induzierte inhibitorische Pause**

**A:** Potentialänderung eines DA VTA Neurons aus einem WT-Tier nach iontophoretischer Applikation von 10 mM GABA. Der graue Balken entspricht der Dauer des Auswurfstroms (100 ms). Die im Rasterplot (Mitte) dargestellten APs sind unten in einem Histogramm zusammengefasst. **B:** Darstellung der entsprechenden Messung aus einem DA VTA Neuron eines KChIP4-KO-Tieres. **C:** Das mittlere ISI und somit auch die durchschnittliche Frequenz vor der GABA-Applikation unterschied sich nicht signifikant zwischen WT- und KO-Tieren. **D:** Die Latenzzeit zum nächsten AP war in DA VTA Neuronen aus KO-Tieren signifikant kürzer als in WT-Tieren.

## 4 Diskussion

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit war die Aufklärung der Bedeutung der KChIP4a-Untereinheit für DA Mittelhirnneurone der Maus. Es konnte gezeigt werden, dass die vor allem in DA VTA Neuronen exprimierte Splice-Variante KChIP4a für die charakteristischen A-Strom-Eigenschaften dieser Neurone essentiell ist. Des Weiteren wurde eine potentielle Rolle von KChIP4 für die Verarbeitung inhibitorischer synaptischer Eingänge festgestellt.

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Kontext der vorhandenen Literatur diskutiert. Neben methodischen Aspekten wird zunächst auf die Rolle von KChIP4 für die biophysikalischen Eigenschaften des A-Stroms in DA Neuronen eingegangen und in den Kontext der relevanten Literatur zur Modulation des A-Stroms durch akzessorische Untereinheiten eingeordnet. Die ermittelte Funktion der KChIP4-Untereinheit für DA VTA Neurone wird anschließend im Vergleich mit schon bekannten Funktionen des A-Stroms für weitere neuronale Zellpopulationen erläutert. Abschließend wird die mögliche Rolle des KChIP4-modulierten Stroms für die Informationsverarbeitung auf Netzwerk- und Verhaltensebene sowie ein Ausblick für zukünftige weiterführende Experimente diskutiert.

### 4.1 Methodische Aspekte

#### 4.1.1 *Voltage-Clamp* Experimente in kernhaltigen *Patches*

Für die biophysikalische Charakterisierung des A-Stroms wurde die *nucleated outside-out* Konfiguration gewählt (Sather et al., 1992). Diese hat gegenüber der einfachen *outside-out* Konfiguration den Vorteil, dass durch die größere Membranfläche mehr Kanäle zur Verfügung stehen, sodass die gemessenen Ströme größer ausfallen und eine bessere Analyse der Stromparameter ermöglicht wird. Außerdem wird das sog. *space-clamp* Problem umgangen, welches in der *Whole-Cell*

Konfiguration durch die Verzweigung der Dendriten und den entstehenden Serienwiderständen zustande kommt (siehe Abschnitt 2.2.4). Im kugelförmigen *Patch* fällt der größte Teil der angelegten Spannung über die Membran ab, sodass das Potential optimal kontrolliert werden kann.

Trotzdem müssen zwei Arten von Fehlern berücksichtigt werden, die durch den Serienwiderstand verursacht werden: der Spannungsfehler und der Zeitfehler. Der Spannungsfehler entsteht durch den Abfall eines Teils der Spannung über dem Serienwiderstand, der sich aus dem Pipetten- und dem Zugangswiderstand zusammensetzt. Der Pipettenwiderstand lag bei etwa 3,2 M $\Omega$ , der Zugangswiderstand wurde durch Ansaugen des Zellkerns an oder in die Pipettenöffnung zusätzlich erhöht. Der resultierende Serienwiderstand erreichte in den *nucleated outside-out* Experimenten Werte zwischen 5 und 35 M $\Omega$  und wurde um 70 % kompensiert. Der entstehende Spannungsfehler kann durch das Ohm'sche Gesetz ausgerechnet werden und entsprach bei einem Serienwiderstand von 15 M $\Omega$  und einem Strom von etwa 200 pA, der durch den Spannungsschritt von -100 auf -30 mV im Mittel gemessen wurde, lediglich 3 mV.

Zusätzlich zum Spannungsfehler entsteht durch den Serienwiderstand bei jedem Spannungssprung ein kinetischer Fehler, da bei jeder Umladung der Membran diese sich wie ein Kondensator mit Kapazität  $C_m$  verhält. Der Umladungsprozess ist exponentiell und dessen Zeitkonstante  $\tau$  ist proportional zum Widerstand des RC-Glieds:

$$\tau = R_s \cdot C_m \cdot \frac{R_m}{R_m + R_s}$$

Da der Membranwiderstand  $R_m$  viel größer ist als der Serienwiderstand  $R_s$ , kann der Bruch vernachlässigt werden. Weiterhin gilt, dass Zeitkonstanten, die über fünfmal länger sind als der Zeitfehler, unverfälscht aufgenommen werden können. Der Zeitfehler bei einem Serienwiderstand von 15 M $\Omega$  und einer Membrankapazität von 1 pF, wie sie bei den *nucleated outside-out Patches* gemessen wurde, entspricht lediglich 15  $\mu$ s, sodass er die Messung nicht signifikant beeinflusst.

Ein weiterer Spannungsfehler, der bei *Voltage-Clamp* Experimenten berücksichtigt werden müsste ist das sog. *liquid junction* Potential, welches durch die



unterschiedliche Beweglichkeit von Ionen an der Grenzfläche zwischen Bad- und Pipettenlösung zustande kommt (Neher, 1992; Barry, 1994). Es wird beim automatischen Abgleich des Offsetpotentials korrigiert, da jedoch beim Übergang in die *Whole-Cell* Konfiguration die Pipettenlösung nicht mehr mit der Badlösung in Kontakt kommt, führt dies zu einer Verfälschung des Kommandopotentials. Die Berechnung des *liquid junction* Potentials wurde mit dem Igor-Plugin *Patcher's Power Tools* (PPT XOP, Version 2.18, Max Planck Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) vorgenommen (Barry, 1994) und lag für die standard-interne Lösung mit Kaliumgluconat bei etwa 15 mV. Dies bedeutet, dass die Zelle bei einem angelegten Kommandopotential von  $-60$  mV in Wirklichkeit auf  $-75$  mV gehalten wurde. Da alle Messungen allerdings mit den gleichen Lösungen durchgeführt wurden, wurde auf eine nachträgliche Korrektur der Werte um das *liquid junction* Potential verzichtet.

Die Analyse der A-Strom-Eigenschaften wurde statt bei physiologischen  $37$  °C bei Raumtemperatur ( $21$ – $23$  °C) durchgeführt, da bei diesem Temperaturunterschied die Gatingprozesse um ein fünffaches verlangsamt werden (Hille, 2001) und so eine bessere Auflösung deren Kinetik erreicht wurde. Allerdings wird dadurch der genaue Datenvergleich mit anderen Studien erschwert, da diese nicht immer bei vergleichbaren Temperaturen durchgeführt wurden. Wichtig zu beachten ist außerdem, dass die modulatorischen Eigenschaften von einigen akzessorischen Untereinheiten temperaturabhängig sind, sodass z.B. die DPP6-vermittelte Beschleunigung der Inaktivierungskinetik von  $K_v4.3$ -Kanälen, welche bei  $23$  °C beobachtet wird, bei  $37$  °C sehr stark reduziert ist (Radicke et al., 2013). Für eine temperaturabhängige Veränderung der Effekte von KChIP4 auf die Kinetik des A-Stroms finden sich in der Literatur keine Hinweise.

#### **4.1.2 Bestätigung des DA Phänotyps der gemessenen Zellen**

In früheren Studien von VTA Neuronen wurden für die Identifizierung DA Zellen elektrophysiologische Parameter herangezogen, die vermeintlich alle DA Neurone ausmachen (Shi, 2009). Dabei wurde unter anderem die Anwesenheit des *Sag* bei Injektion hyperpolarisierender Ströme herangezogen, der durch die Aktivierung

von HCN-Kanälen verursacht wird (Fiorillo und Williams, 2000; Beckstead und Williams, 2007; Yang et al., 2009; Courtney et al., 2012). Dabei wurde teilweise die Abwesenheit des *Sag* als Kriterium genutzt, um vermeintlich nicht-DA Neurone aus der Analyse auszuschließen. Da in der VTA atypische DA Neurone liegen, die von einer Abwesenheit des  $I_h$ -Stroms gekennzeichnet sind (Margolis et al., 2006; Lammel et al., 2008; Zhang et al., 2010), würden durch eine rein elektrophysiologische Beurteilung des DA-Phänotyps ebendiese Neurone als nicht-DA definiert und ausgeschlossen werden, was zur einer Verfälschung des Datensatzes führen würde. Daher wurde in dieser Arbeit der DA Phänotyp stets immunhistochemisch bestätigt. Während die kombinierte TH- und Neurobiotinfärbung nach Messungen in der *Whole-Cell* Konfiguration schon in früheren Studien angewandt wurde (Neuhoff et al., 2002; Liss et al., 2005; Lammel et al., 2008), wurden in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal elektrophysiologische *in vitro* Messungen in der *nucleated outside-out* Konfiguration mit anschließendem immunhistochemischem Nachweis der Lage und des Zellphänotyps kombiniert. Die Kernextraktion wurde etwa 30 Sekunden nach dem Erlangen der *Whole-Cell* Konfiguration begonnen, sodass der Intrazellulärraum maximal 2–3 Minuten in Kontakt mit der neurobiotinhaltigen Pipettenlösung stand. Trotz der kurzen Äquilibrationszeit und der Nucleusextraktion, konnten die im Hirnschnitt verbliebenen Zellkörper erfolgreich mit Neurobiotin gefüllt und dessen Kolokalisation mit dem TH-Signal konfokalmikroskopisch untersucht werden. Dadurch konnte bestätigt werden, dass es sich bei allen gemessenen Zellen um DA Neurone handelte.

In dieser Arbeit wurde keine retrograde Markierung der DA Neurone zur Identifikation deren Projektionsgebietes durchgeführt. Stephan Lammel zeigte 2008, dass die mesolimbischen, in den lateralen *shell* des NAc (NAc lSh) projizierenden Neurone einen schnellen A-Strom besitzen, der vergleichbar zu dem A-Strom nigrostriataler DA Neurone ist. Im Gegensatz dazu inaktiviert der A-Strom von mesocorticalen, mesoamygdalären und mesolimbischen *core* und *medial shell* Neuronen (NAc C bzw. NAc mSh) mit einer signifikant langsameren Kinetik (Lammel, 2008). Die Lokalisation der in der vorliegenden Arbeit gemessenen Zellen in Kombination mit einem Vergleich der Ergebnisse mit

früherer Arbeiten (Krabbe, 2008; Lammel et al., 2008) deuten darauf hin, dass in dieser Arbeit hauptsächlich mesolimbische, in den NAc C und NAc mSh projizierende sowie mesocorticale und mesoamygdaläre VTA Neurone gemessen wurden.

Der Befund aus der Arbeit von Stephan Lammel, dass die Somata von DA VTA Neuronen kleiner sind, als die von DA SN Neuronen, konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Analyse der langsamen Kapazitiven Komponente ( $C_{\text{slow}}$ ) in der *Whole-Cell* Konfiguration bestätigt werden (Lammel, 2008). Da biologische Membranen eine spezifische Kapazität von  $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$  besitzen (Cole, 1968; Gentet et al., 2000), kann anhand von  $C_{\text{slow}}$  die Membranfläche des Somas und der proximalen Dendriten geschätzt werden und so ein Größenvergleich zwischen den verschiedenen Subpopulationen erfolgen. Ein überraschendes Ergebnis stellt die etwa 30 % geringere Membrankapazität von DA SN Neuronen aus KChIP4-KO-Tieren im Vergleich zu Zellen aus WT-Tieren dar. Da keine immunohistochemische Analyse der Zellgröße durchgeführt wurde, bleibt ungeklärt, ob sich dieser elektrophysiologische Befund auch in der Morphologie der Zellen widergespiegelt.

## **4.2 KChIP4-Expression verleiht dem A-Strom von DA VTA Neuronen seine charakteristischen Eigenschaften**

DA Mittelhirnneurone weisen einen  $K_{\text{V}}4.3$ -getragenen A-Strom auf, der in SN Neuronen maßgeblich für die Kontrolle der Spontanfrequenz verantwortlich ist (Liss et al., 2001; Liss et al., 2002; Krabbe, 2008). Durch Kombination von *in vitro Patch-Clamp* Messungen mit anschließender RT-qPCR konnte in Mäusen im Alter von P14 gezeigt werden, dass in DA Neuronen zusätzlich zur  $K_{\text{V}}$   $\alpha$ -Untereinheit die akzessorischen Untereinheiten KChIP1, KChIP3.1 und KChIP4a exprimiert werden, wobei die Kombinationen 1+3, 3+4a, 1+3+4a oder nur 3 auftreten. Die KChIP4a Expression ist dabei stets mit einer langsamen Inaktivierungskinetik des

A-Stroms assoziiert (Liss et al., 2002). Die Beteiligung des A-Stroms an der Diversität des DA Mittelhirnsystems konnte außerdem durch Untersuchungen an retrograd identifizierten DA Neuronen gezeigt werden. Mesolimbische DA VTA Neurone, die in den NAc C projizieren, weisen einen A-Strom mit signifikant langsamerer Inaktivierungskinetik auf, im Vergleich zu dem von klassischen mesostriatalen DA Neuronen (Krabbe, 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde zwar keine Aufteilung der VTA Subpopulationen nach Projektionsgebieten durchgeführt, der Unterschied der A-Strom-Parameter zwischen DA SN und VTA Neuronen konnte allerdings auch hier bestätigt und deren Abhängigkeit von der KChIP4-Expression gezeigt werden.

#### **4.2.1 KChIP4 bestimmt die Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik**

Durch die Verwendung von KChIP4-KO-Tieren konnte demonstriert werden, dass die Expression von KChIP4 ausreichend ist, um dem A-Strom von DA VTA Neuronen seine charakteristischen Eigenschaften zu verleihen. Die Deletion des KChIP4-Gens resultierte in einer siebenfach schnelleren Inaktivierungskinetik in DA VTA Neuronen. Auch die Geschwindigkeit der makroskopischen Aktivierung des A-Stroms scheint selektiv in DA VTA Neuronen von der KChIP4-Expression abhängig zu sein. Während die Zeit zum Erreichen des Maximalstroms in DA SN Neuronen im KChIP4-KO nicht signifikant unterschiedlich zu Werten aus WT-Tieren war, wurde in DA VTA Neuronen aus KO-Tieren eine signifikant schnellere Aktivierung festgestellt. Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl die langsame Aktivierungs- als auch Inaktivierungskinetik des A-Stroms in DA VTA Neuronen durch die Expression von KChIP4 gewährleistet wird. Die etwa zweifache Beschleunigung der Inaktivierungskinetik in DA SN Neuronen deutet auf eine geringe Expression von KChIP4 auch in diesen Neuronen.

Zum Vergleich der Aktivierungs- und Inaktivierungsparameter des A-Stroms in DA VTA und SN Neuronen aus WT- und KChIP4-KO-Tieren wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (engl. *one-way analysis of variance*; ANOVA) genutzt. Da ein signifikanter Unterschied zwischen den vier Gruppen vorlag ( $p < 0,0001$ ), wurde anschließend ein Bonferoni *post-hoc* Test durchgeführt, um zu überprüfen, welche

Gruppen sich voneinander unterscheiden. In WT-Tieren verlief die Inaktivierung des A-Stroms in DA SN Neuronen mehr als vier Mal so schnell wie in DA VTA Neuronen ( $p < 0,05$ ). Gleiches gilt für die Aktivierung: die Zeit zum Erreichen des Maximalstroms war in DA SN Neuronen etwa halb so lang wie in DA VTA Neuronen ( $p < 0,05$ ). Dass die KChIP4-Expression ausreichend ist, um die unterschiedliche A-Strom-Kinetik zwischen DA SN und VTA Neuronen zu gewährleisten, wird dadurch ersichtlich, dass sich der A-Strom von DA VTA Neuronen aus KChIP4-KO-Tieren von dem aus DA SN Neuronen nicht mehr unterscheidet (ANOVA; Daten nicht gezeigt).

Außerdem wurde der *Steady-State*-Strom am Ende der einzelnen Depolarisationsschritte bestimmt und daraus die maximale Leitfähigkeit nach der Inaktivierung des A-Stroms errechnet. Diese war in DA VTA Neuronen aus KO-Tieren signifikant geringer als in Zellen aus WT-Tieren. Somit verläuft die makroskopische Inaktivierung des A-Stroms bei Abwesenheit von KChIP4 nicht nur schneller ab, sondern der Anteil der  $K_v$ -Kanäle, die am Ende der 1000 ms langen Depolarisation noch in der geöffneten Konformation vorliegen, ist signifikant reduziert.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Rolle von KChIP4 für die Inaktivierungskinetik von A-Strömen entspricht weitestgehend den Ergebnissen aus der vorhandenen Literatur. Schon bei der Entdeckung von KChIP4a wurde festgestellt, dass dessen Expression die Inaktivierungskinetik um einen Faktor zwölf verlangsamen kann (Holmqvist et al., 2002). Dieser Effekt konnte in weiteren Studien an heterologen Expressionssystemen reproduziert werden (Jerng et al., 2007; Jerng und Pfaffinger, 2008; Liang et al., 2010; Tang et al., 2013). Die KChIP4a-vermittelte langsame Inaktivierungskinetik wurde später auch in nativen Geweben bestätigt. Durch Kombination von elektrophysiologischen Messungen des A-Stroms mit anschließender RT-PCR in Neuronen aus dem Globus Pallidum (GP) und dem basalen Vorderhirn konnte gezeigt werden, dass eine langsame Inaktivierungskinetik des A-Stroms mit der Expression der KChIP4a Splice-Variante korrelierte (Baranauskas, 2004). Die Inaktivierungszeitkonstanten betragen 336 ms in GP-Neuronen und 221 ms in Neuronen des basalen Vorderhirns und lagen somit in einem ähnlichen Bereich wie in DA VTA Neuronen (etwa 200 ms). Ähnliche Versuche in DA Neuronen von juvenilen

Mäusen zeigten eine Korrelation zwischen der Inaktivierungszeitkonstante und dem Expressionsverhältnis von KChIP4a zu KChIP1 (Liss et al., 2002). Außerdem wurde zum ersten Mal die langsame Inaktivierungskinetik des A-Stroms von DA VTA Neuronen im Vergleich zu DA SN Neuronen gezeigt, ein Befund, der später in adulten Mäusen in retrograd markierten DA Subpopulationen bestätigt wurde (Krabbe, 2008). Auch die in der vorliegenden Arbeit ermittelte langsamere Aktivierung bei KChIP4a-Expression ist in der Literatur dokumentiert (Holmqvist et al., 2002).

Cerebelläre Purkinjezellen weisen einen langsamen A-Strom mit einer Inaktivierungszeitkonstante von etwa 100 ms auf (Wang et al., 1991; Sacco und Tempia, 2002). Das genaue KChIP-Expressionsprofil dieser Zellen wurde zwar noch nicht untersucht, die Expression von KChIP4 konnte allerdings mittels *in situ* Hybridisierung nachgewiesen werden (Xiong et al., 2004), sodass die langsame Inaktivierung des A-Stroms vermutlich durch Expression der KChIP4a Splice-Variante zustande kommt. Pyramidenzellen der CA1- und CA3-Region des Hippocampus besitzen hingegen schnell inaktivierende A-Ströme, die bei einem Potential von +50 mV mit einer Zeitkonstante von 25 bzw. 14 ms inaktivieren (Klee et al., 1995). Die A-Ströme von serotonergen Neuronen aus dem dorsalen Raphekern, welche ähnliche Spontanfrequenzen aufweisen wie DA SN Neurone (Prinz et al., 2013), besitzen ebenfalls schnelle A-Ströme mit einer Inaktivierungszeitkonstante von etwa 30 ms (Penington und Tuckwell, 2012).

In Neuronen können mehrere Mitglieder der KChIP- und DPPL-Familien gleichzeitig exprimiert sein (Liss et al., 2002; Liss und Roeper, 2004; Zagha et al., 2005; Maffie und Rudy, 2008), welche die A-Strom-Parameter differentiell beeinflussen können. Dies wird vor allem bei der Betrachtung der Erholung aus der Inaktivierung deutlich (siehe Abschnitt 4.2.3) und muss bei dem Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit Versuchsergebnissen aus heterologen Expressionssystemen beachtet werden.

#### 4.2.2 Einfluss von KChIP4 auf die Leitfähigkeit von A-Typ Kaliumkanälen

Die Rolle von KChIP4a für die Oberflächenexpression wurde in dieser Arbeit nicht direkt untersucht, allerdings können aus den Werten der Leitfähigkeit von A-Typ Kaliumkanälen indirekte Schlüsse gezogen werden. Diese war sowohl in DA VTA als auch in DA SN Neuronen aus KChIP4-KO-Tieren gegenüber den Werten aus WT-Tieren signifikant geringer. Dies könnte zum einen durch einen Einfluss von KChIP4a auf die Oberflächenexpression von  $K_v4$ -Kanälen und zum anderen durch die beschleunigte Inaktivierung erklärt werden.

Bezüglich der Rolle von KChIP4a für die Oberflächenexpression von  $K_v$ -Kanälen finden sich in der Literatur gegensätzliche Befunde. Mehrere Gruppen haben in Untersuchungen an Zelllinien festgestellt, dass die Koexpression von KChIP4a sowie weiteren KChIPs mit einer KIS-Domäne zu einer Retention der  $K_v$ -Kanäle im endoplasmatischen Retikulum führt, während KChIP1, 2 und 3 deren Translokation an die Oberfläche fördern (Shibata et al., 2003; Jerng und Pfaffinger, 2008; Tang et al., 2013). Die KIS-Domäne antagonisiert dabei die Funktion der *Core*-Domäne, welche in allen KChIPs beinhaltet ist und eine Erhöhung der Oberflächenexpression vermittelt. Tang und Kollegen zeigten, dass das ER-Retentionsmotiv durch die Aminosäuren 12–17 der KIS-Domäne gebildet wird und einen negativen Effekt auf die Oberflächenexpression ausübt, ohne einen Einfluss auf die Inaktivierungskinetik zu haben (Tang et al., 2013). Desweiteren antagonisiert KChIP4a bei Koexpression mit den anderen KChIPs deren fördernde Auswirkung auf die Oberflächenexpression (Shibata et al., 2003).

Im Gegensatz dazu stehen Ergebnisse, die in COS-7- und HEK293-Zellen eine phosphorylierungsabhängige 1,5 bis 2-fache Erhöhung der Oberflächenexpression von  $K_v4.2$  und  $K_v4.3$  mit einer korrespondierenden Erhöhung der Stromdichte bei Anwesenheit von KChIP4a zeigten (Lin et al., 2010).

Führt die KChIP4a-Expression tatsächlich zu einer Retention von  $K_v4$  im endoplasmatischen Reticulum und okkludiert weiterhin die KChIP1–3-abhängige Translokation an die Zelloberfläche – entsprechend der Ergebnisse von Shibata, Jerng und Tang – so sollte in WT-Tieren die maximale Leitfähigkeit in DA VTA

Neuronen geringer sein als in DA SN Neuronen. Dem entsprechend sollte in DA VTA Neuronen aus KChIP4-KO-Tieren eine erhöhte Stromdichte gegenüber Zellen aus WT-Tieren vorhanden sein, da der negative Effekt von KChIP4a auf die Oberflächenexpression ausbleiben würde. Beim Vergleich der maximalen Leitfähigkeit zwischen DA SN und VTA Neuronen in WT-Tieren lässt sich tatsächlich eine Tendenz zu geringeren Werten in der VTA beobachten, gleichzeitig aber auch eine Verminderung der Leitfähigkeit sowohl in DA SN als auch VTA Neuronen aus KChIP4-KO-Tieren. Eine Erklärung für die geringere Leitfähigkeit in Neuronen aus KChIP4-KO-Tieren könnte in der schnelleren Inaktivierungskinetik zu finden sein. So könnte ein Anteil der Kanäle bereits während der makroskopischen Aktivierung des A-Stroms inaktiviert werden, bevor die Maximalamplitude des Stroms erreicht wurde, so dass trotz einer gesteigerten Oberflächenexpression die maximale Leitfähigkeit geringere Werte annimmt.

Die verminderte Leitfähigkeit in DA Neuronen aus KO-Tieren könnte alternativ anhand der Ergebnisse von Lin und Kollegen erklärt werden, die einen fördernden Einfluss von KChIP4a auf die Oberflächenexpression von  $K_{V4}$ -Kanälen demonstrierten (Lin et al., 2010). Die Abwesenheit von KChIP4a in den KO-Tieren würde in diesem Fall die geringere Leitfähigkeit in DA VTA Neuronen erklären, da die KChIP4-Deletion mit einer verminderten Oberflächenexpression von  $K_{V4}$ -Kanälen einhergehen würde. Die Ursache für den nur geringfügigen Unterschied in der Leitfähigkeit zwischen DA SN und VTA Neuronen in WT-Tieren könnte in der überlappenden Funktion von KChIP4 und der anderen gleichzeitig exprimierten KChIPs zu finden sein. DA SN Neurone weisen eine starke KChIP1- und KChIP3-Expression auf, während KChIP4a wenn überhaupt nur in geringem Maße exprimiert wird. Somit könnte in DA SN Neuronen von WT-Tieren die Hochregulation von KChIP1/3 die Abwesenheit von KChIP4a kompensieren, sodass in diesen Neuronen keine geringere Leitfähigkeit im Vergleich zu DA VTA Neuronen beobachtet wird. Eine kompensatorische Erhöhung der KChIP-Expression wurde z. B. in corticalen Pyramidenzellen aus KChIP3-KO-Tieren beobachtet (Norris et al., 2010). Die Expressionslevels der verschiedenen KChIPs wurden in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht untersucht.



Es ist außerdem wichtig zu beachten, dass durch die Verwendung der *nucleated outside-out* Konformation lediglich Ströme von A-Typ Kanälen des somatischen Kompartiments und nicht von dendritisch lokalisierten Kanälen gemessen wurden. Zwar ist unter normalen Bedingungen in DA SN Neuronen die größte Dichte an A-Typ Kanälen am Soma zu finden (Gentet und Williams, 2007), es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die Deletion von KChIP4 zu einer Veränderung der Oberflächenexpression selektiv in den Dendriten geführt hat, die mit den gewählten experimentellen Bedingungen nicht erfasst werden konnte.

### **4.2.3 Rolle von KChIP4 für die Erholung aus der Inaktivierung**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Erholung aus der Inaktivierung ebenfalls von der KChIP4-Expression abhängig ist. Der A-Strom von DA VTA Neuronen, der sich in WT-Tieren erheblich langsamer aus der Inaktivierung erholte als in DA SN Neuronen, zeigte in KChIP4-KO-Tieren eine signifikant schnellere Erholung aus der Inaktivierung. In DA SN Neuronen wurde kein Unterschied in der Zeitkonstante der Erholung aus der Inaktivierung festgestellt, was sich durch die vermutlich sehr geringe Expression von KChIP4 in diesen Neuronen erklären lässt. Somit scheint die KChIP4-Expression für die langsamere Erholung aus der Inaktivierung in DA VTA Neuronen verantwortlich zu sein.

Studien in heterologen Expressionssystemen zeigten, dass die Erholung aus der Inaktivierung bei Koexpression von KChIP1 und KChIP3 deutlich schneller abläuft als bei alleiniger  $K_v4.3$ -Expression, dass KChIP4a die Erholung aus der Inaktivierung allerdings nicht direkt beeinflusst (An et al., 2000; Holmqvist et al., 2002; Jerng et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings ein Einfluss von KChIP4 auf die Zeitkonstante der Erholung aus der Inaktivierung festgestellt, in Form einer signifikant schnelleren Erholung aus der Inaktivierung in DA VTA Neuronen aus KChIP4-KO-Tieren. Holmqvist und Kollegen konnten demonstrieren, dass die Effekte der KChIPs auf die A-Strom-Kinetik von ihrem relativen Expressionsverhältnis abhängen, sodass die KChIP4a-vermittelte Verlangsamung der Inaktivierungskinetik durch eine höhere Expression von

KChIP1 okkludiert werden kann (Holmqvist et al., 2002). Eine ähnliche kompetitive Beziehung konnte auch zwischen KChIP4a und KChIP2 gezeigt werden, in Zusammenhang mit der KChIP2-vermittelten Steigerung der Oberflächenexpression der  $K_{v4.2}$   $\alpha$ -Untereinheit (Shibata et al., 2003). Somit könnte der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Effekt von KChIP4 auf die Erholung aus der Inaktivierung ebenfalls indirekt durch die kompetitive Verdrängung der anderen KChIPs von der  $K_v$   $\alpha$ -Untereinheit vermittelt werden.

#### **4.2.4 Bedeutung von KChIP4 für die *Steady-State* Parameter des $I_A$**

Sowohl das halbmaximale Aktivierungs- als auch das Inaktivierungspotential ( $V_{50}$ ) des A-Stroms wurden durch die Deletion von KChIP4 beeinflusst. In DA VTA Neuronen aus KChIP4-KO-Tieren wurde eine Verschiebung der Aktivierungskurve zu positiveren Potentialen festgestellt. Außerdem wurde die Aktivierungsrate des A-Stroms bei Abwesenheit von KChIP4 erhöht. Ein ähnlicher Effekt, wenn auch in geringerem Ausmaß, wurde bei der *Steady-State* Inaktivierungskurve beobachtet: Der  $V_{50}$ -Wert der Inaktivierung war in DA VTA Neuronen aus KO-Tieren im Vergleich zu WT-Tieren um etwa 5 mV nach rechts verschoben. Die Expression von KChIP4 ist somit ausreichend um sowohl die Schwelle der A-Strom-Aktivierung und Inaktivierung zu negativeren Potentialen zu verschieben, als auch um die Aktivierungsrate zu beschleunigen.

Durch ihre Eigenschaft zur Inaktivierung aus der geschlossenen Konformation können  $K_v4$ -Kanäle nur in einem geringen Bereich, dem sog. *Window* der Überlappung von Inaktivierungs- und Aktivierungskurve geöffnet werden und die zelluläre Aktivität beeinflussen (Jerng und Covarrubias, 1997; Bähring et al., 2001; Kaulin et al., 2008). Da die Verschiebung des Aktivierungs- und Inaktivierungs- $V_{50}$  durch KChIP4-Expression zwar in dieselbe Richtung, aber nicht symmetrisch ist, könnte eine potentielle Rolle von KChIP4 sein, durch die größere Verschiebung des Aktivierungs- $V_{50}$  zu negativeren Potentialen einen größeren *Window*-Bereich für einen funktionsfähigen A-Strom in unterschwelligen Potentialen zu gewährleisten. In DA SN Neuronen wurden keine Unterschiede im  $V_{50}$  der Aktivierung oder Inaktivierung zwischen WT- und KO-Tieren festgestellt, was mit der vermutlich

sehr geringen KChIP4-Expression dieser Zellpopulation zusammenhängt (Lammel, 2004). Im Vergleich zu DA VTA Neuronen wies der A-Strom von DA SN Neuronen aus WT-Tieren allerdings ein um 8 mV positiveres Aktivierungs- $V_{50}$  sowie ein um 11 mV positiveres Inaktivierungs- $V_{50}$  auf, was ebenfalls für den beschriebenen Einfluss von KChIP4 auf die *Steady-State* Kurven spricht. Somit scheint die Expression von KChIP4 für die charakteristischen *Steady-State* Parameter des A-Stroms von DA VTA Neuronen verantwortlich zu sein, sodass bei einer Deletion von KChIP4 die A-Strom-Parameter von DA VTA Neuronen den von DA SN Neuronen ähnlicher werden.

Es ist allerdings unklar, ob KChIP4a direkt die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und Inaktivierung beeinflusst, oder ob es sich bei der Verschiebung der Kurven in Neuronen aus KO-Tieren um einen indirekten Effekt handelt. Eine Untersuchung der A-Strom-Parameter mit Hilfe eines Computermodells zeigte, dass eine langsamere Erholung aus der Inaktivierung zu einer Linksverschiebung der Inaktivierungskurve führt (Fineberg et al., 2012), sodass die Rechtsverschiebung in DA VTA Neuronen aus KChIP4-KO-Tieren potentiell indirekt durch die signifikant schnellere Erholung des A-Stroms aus der Inaktivierung resultiert. Laut einer weiteren aktuellen Studie an rekonstituierten  $K_{v4.3}$ -Kanälen, fördert die KChIP4a-Expression die *Closed-State* Inaktivierung (CSI), was gleichzeitig zu einer Verschiebung des halbmaximalen Inaktivierungspotentials zu negativeren Potentialen führt (Tang et al., 2013). Dabei spielt das Motiv der Aminosäuren 19–21 (Valin-Lysin-Leucin; VKL) der KIS-Domäne der KChIP4a-Untereinheit eine entscheidende Rolle (Tang et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der KChIP4-Expression auf die CSI nicht direkt untersucht, allerdings stimmt die hyperpolarisierte Inaktivierungskurve von Neuronen aus WT-Tieren mit den Ergebnissen der Studie von Tang und Kollegen überein.

#### **4.2.5 Vergleich mit Ergebnissen aus heterologen Expressionssystemen und anderen neuronalen Populationen**

Die Werte für das  $V_{50}$  der Aktivierung von  $K_{v4}$ -Strömen bei Koexpression von KChIP4, welche in heterologen Expressionssystemen ermittelt wurden (Holmqvist

et al., 2002; Gebauer, 2004; Tang et al., 2013), lagen in einem weitaus positiveren Bereich, als die Werte der vorliegenden Arbeit. Während der hier gemessene Wert für das Aktivierungs- $V_{50}$  in DA VTA Neuronen aus WT-Tieren etwa  $-43$  mV betrug, lag er bei der ersten KChIP4a-Studie von Holmqvist und Kollegen bei etwa  $+30$  mV (Holmqvist et al., 2002). Auch in einer detaillierten Untersuchung der Rolle von verschiedenen KChIP-Varianten bei Koexpression mit  $K_v4.2$   $\alpha$ -Untereinheiten wurden Werte zwischen  $-5$  und  $+20$  mV (Gebauer, 2004) sowie in der aktuellen Studie von Tang und Kollegen um  $-10$  mV ermittelt (Tang et al., 2013).

Die in dieser Arbeit gezeigte signifikante Beteiligung von KChIP4 für die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung in DA VTA Neuronen in Form einer Verschiebung von  $V_{50}$  zu negativen Potentialen steht ebenfalls im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Studien (Holmqvist et al., 2002; Gebauer, 2004; Jerng und Pfaffinger, 2008; Tang et al., 2013). Tang und Kollegen konnten keinen Effekt der KChIP4a-Expression auf die Aktivierungskurve finden (Tang et al., 2013), in weiteren Studien wurde sogar eine Verschiebung zu positiveren Potentialen festgestellt (Holmqvist et al., 2002; Gebauer, 2004; Jerng und Pfaffinger, 2008).

Die Ergebnisse von Studien, in welchen die Rolle von KChIP4a für das Inaktivierungs- $V_{50}$  untersucht wurde, unterscheiden sich ebenfalls erheblich voneinander. Holmqvist und Kollegen haben im Gegensatz zu den Ergebnissen der genannten aktuellen Studien und der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss von KChIP4a auf die Parameter der *Steady-State* Inaktivierungskurven feststellen können (Holmqvist et al., 2002). Jerng und Pfaffinger beschreiben dagegen eine geringe Rechtsverschiebung der Inaktivierungskurve durch Koexpression von KChIP4a mit  $K_v4.2$ , während in der Arbeit von Tang und Kollegen das Inaktivierungs- $V_{50}$  bei Koexpression von KChIP4a mit  $K_v4.3$  hyperpolarisiertere Werte annimmt (Jerng und Pfaffinger, 2008; Tang et al., 2013). Die Expression der zwei weiteren KChIPs, die ähnlich wie KChIP4a die Inaktivierungskinetik des A-Stroms verlangsamen können (KChIP2x und KChIP3x), hat keinen Einfluss auf die CSI und resultiert in einer Verschiebung sowohl der *Steady-State* Aktivierungs- als auch Inaktivierungskurve zu positiveren Potentialen (Jerng und Pfaffinger, 2008).

Da die genannten Studien in heterologen Expressionssystemen durchgeführt wurden und stets die Rolle einer einzigen akzessorischen Untereinheit auf die A-Strom-Parameter untersucht wurde, lässt sich die Diskrepanz zu den Ergebnissen aus neuronalen Zellen vermutlich durch deren gleichzeitige Expression von mehreren akzessorischen Proteinen (weitere KChIPs und DPPLs) sowie Veränderung der A-Strom-Parameter durch Phosphorylierung erklären. Generell liegen die  $V_{50}$ -Werte der Aktivierungs- und Inaktivierung nativer A-Ströme in weitaus negativeren Bereichen, im Vergleich zu den rekonstituierten Strömen: In verschiedenen Neuronenpopulationen finden sich Aktivierungs- $V_{50}$  zwischen  $-47$  und  $0$  mV sowie Inaktivierungs- $V_{50}$  zwischen  $-93$  und  $-56$  mV (Jerng et al., 2004a). Dies unterstreicht die Bedeutung der Zusammensetzung des ternären  $K_V$ -Kanalkomplexes für die funktionellen Eigenschaften der nativen A-Ströme (Maffie und Rudy, 2008).

In Purkinjezellen, deren A-Strom mit einer Zeitkonstante von  $100$  ms inaktiviert und somit einen eher langsamen A-Strom darstellt, liegt das halbmaximale Aktivierungspotential bei etwa  $-40$  mV und entspricht somit in etwa dem  $V_{50}$ -Wert des A-Stroms in DA VTA Neuronen ( $-43$  mV) (Wang et al., 1991; Sacco und Tempia, 2002). Pyramidenzellen der CA1 und CA3-Region des Hippocampus besitzen hingegen schnell inaktivierende A-Ströme und der  $V_{50}$ -Wert der *Steady-State* Aktivierung ist mit  $-25$  mV positiver als in DA SN und VTA Neuronen, während das Potential der halbmaximalen Inaktivierung mit  $-86$  mV in einem ähnlichen Bereich liegt, wie in DA VTA Neuronen, allerdings negativer ist, als in DA SN Neuronen (Klee et al., 1995). In serotonergen Neuronen, die SN-ähnliche A-Ströme besitzen, sind die Werte des halbmaximalen Aktivierungs- bzw. Inaktivierungspotentials mit  $-53$  mV bzw.  $-92$  mV allerdings erheblich negativer als die hier gemessenen Werte für DA SN und VTA Neurone (Jerng et al., 2004a; Penington und Tuckwell, 2012).

#### **4.2.6 Frühere Studien der A-Strom-Parameter in DA VTA Neuronen**

Koyama und Appel untersuchten die A-Strom-Eigenschaften von dissoziierten VTA Neuronen aus juvenilen Ratten (Koyama und Appel, 2006b). Einige Werte

stimmen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein, andere hingegen unterscheiden sich erheblich. Die Werte für das  $V_{50}$  der Aktivierung und Inaktivierung liegen mit  $-38$  bzw.  $-75$  mV in einem ähnlichen Bereich wie die Werte aus der vorliegenden Arbeit ( $-43,5$  bzw.  $-81,2$  mV). Die Kinetik der Inaktivierung, die Zeit zum Erreichen des Maximalstroms sowie die Kinetik der Erholung aus der Inaktivierung sind bei Koyama und Appel allerdings sehr viel schneller, was sich zum einen durch die etwas höhere Messtemperatur ( $23$ – $25$  °C; in der vorliegenden Arbeit:  $21$ – $23$  °C) und zum anderen durch einen möglichen Unterschied der gemessenen Subpopulationen erklären lassen könnte. Da die Versuche an dissoziierten Zellen durchgeführt wurden, konnten keine Angaben zur Lokalisation der Zellen gemacht werden. Weiterhin wurde die DA Identität lediglich anhand der Spontanfrequenz sowie der Breite der Aktionspotentiale und deren Nachhyperpolarisation festgemacht. Die ermittelten Werte dieser Parameter sowie der etwa  $700$  ms lange *rebound delay* nach einer Hyperpolarisation (siehe Abschnitt 3.2.5) deuten allerdings eher auf klassische DA Neurone hin, die vor allem in der lateralen VTA zu finden sind und in das dorsale Striatum und den NAc lSh projizieren (Lammel et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurden dagegen ausschließlich Neurone aus der medialen VTA gemessen, wo sich vorwiegend mesocorticale und mesolimbische (*core*) DA Neurone befinden. Somit könnte es sich bei den von Koyama und Appel gemessenen Zellen lediglich um eine andere Subpopulation von VTA Neuronen handeln. Außerdem handelt es sich in der Koyama und Appel Arbeit um Gesamtströme der Membran, während in der vorliegenden Arbeit durch die Wahl der *nucleated outside-out* Konfiguration ausschließlich Ströme von Kanälen des somatischen Kompartiments gemessen wurden.

Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen *Steady-State* Parameter unterscheiden sich stark von den Werten, die in retrograd markierten Subpopulationen DA Neurone ermittelt wurden (Krabbe, 2008). Das halbmaximale Potential sowohl der Aktivierung als auch der Inaktivierung lag bei deutlich positiveren Potentialen als in der vorliegenden Arbeit. Außerdem ist die Inaktivierungskinetik in der vorliegenden Arbeit langsamer. Die Werte der retrograd markierten Neurone aus adulten Tieren stimmen allerdings mit den Daten von nicht mit *beads* beladenen

Zellen aus juvenilen Tieren weitgehend überein (Krabbe, 2008). Eine mögliche Ursache für diesen Unterschied könnte sich in den gemessenen Subpopulationen finden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen zwar nicht durch retrograde Markierung nach ihren Projektionsgebieten differenziert, es wurden aber ausschließlich Neurone im intermediären Mittelhirn in der medialen VTA gemessen (siehe Abbildung 3.7 und Abbildung 3.17). In dieser Region liegen hauptsächlich mesocortikale sowie z. T. mesolimbische (*core*) DA Neurone (Lammel et al., 2008). In der Arbeit von Krabbe hingegen wurden ausschließlich retrograd markierte mesolimbische (*core*) Neurone gemessen, die sich in der medialen aber auch in der lateralen VTA befinden, sodass sich ein Unterschied in der Zusammensetzung des gemessenen Zellpools zwischen den zwei Arbeiten ergibt. Lammel zeigte 2004 die höchste Immunreaktivität für KChIP4 in mesocorticalen DA Neuronen (Lammel, 2004). Unter der Annahme, dass eine stärkere KChIP4-Expression in einer größeren Linksverschiebung der Aktivierungs- und Inaktivierungskurve resultiert, könnte man erwarten, dass eine gemischte mesocorticolimbische Population negativere  $V_{50}$  aufweist als eine Gruppe aus mesolimbischen (*core*) Neuronen.

#### 4.2.7 Interaktion zwischen $K_v \beta$ -Untereinheiten

A-Strom-Parameter werden zusätzlich zu den KChIPs auch durch die Koexpression von DPPL-Proteinen erheblich moduliert (siehe Abschnitt 1.3.2.2) (Maffie und Rudy, 2008). Aus den Genen für DPP6 und DPP10 können durch alternatives Splicing mehrere Varianten entstehen, die unterschiedliche Einflüsse auf die Parameter des A-Stroms haben und auch differentiell mit KChIPs konkurrieren können.

Dabei okkludiert z. B. DPP10a bei Koexpression mit  $K_v4.2$  und KChIP4a in Oocyten die KChIP4a-vermittelten Effekte auf die Inaktivierungskinetik und die Erholung aus der Inaktivierung, sodass trotz KChIP4a-Expression ein schnell inaktivierender und sich schnell aus der Inaktivierung erholender A-Strom vorliegt (Jerng et al., 2007). Da in DA VTA Neuronen des WT ein sehr langsamer A-Strom mit einer langsamen Erholung aus der Inaktivierung vorliegt, ist die Expression von

DPP10a in diesen Zellen unwahrscheinlich. Da die Splice-Varianten DPP10c und DPP10d hingegen bei ihrer Koexpression mit KChIP3 oder KChIP4a nicht dominant sind (Jerng et al., 2007), kann zu deren Expression keine Aussage getroffen werden.

DPP6 gewährleistet unter anderem subzelluläre Expressionsunterschiede von A-Typ Kaliumkanälen (Sun et al., 2011). In hippocampalen CA1 Neuronen folgt die Expression von A-Typ Kaliumkanälen einem Gradienten, so dass die A-Stromdichte in Richtung der Dendriten mit steigender Entfernung vom Soma immer weiter zunimmt (Hoffman et al., 1997), eine Eigenschaft, die von der DPP6-Expression abhängig ist (Sun et al., 2011). Im Gegensatz dazu konnte in DA SN Neuronen gezeigt werden, dass die höchste A-Stromdichte am Soma zu finden ist (Gentet und Williams, 2007), was mit Ergebnissen korrespondiert, die keine nennenswerten Unterschiede in der A-Strom-Amplitude zwischen Messungen an dissoziierten VTA Neuronen und entsprechenden Neuronen in Hirnschnitten feststellten (Khaliq und Bean, 2008). Während die DPP6-Expression für nigrostriatale DA Neurone mittels RT-PCR nachgewiesen werden konnte (Liss und Roeper, 2004), wurde die Expression in DA VTA Neuronen bisher noch nicht untersucht. Eine mögliche Erklärung für die beobachteten Unterschiede wäre, dass DPP6 in DA Neuronen eine andere Rolle spielt, als in hippocampalen Neuronen. Alternativ könnte die Expression so gering sein, dass kein nennenswerter Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von A-Typ Kaliumkanälen ausgeübt wird.

In den letzten Jahren wurden weitere KChIPs mit einer KIS-Domäne entdeckt, die KChIP2x und KChIP3x benannt wurden und ähnliche Effekte auf die Inaktivierungskinetik von A-Strömen aufweisen, wie KChIP4a (Jerng und Pfaffinger, 2008). Da die langsame Inaktivierungskinetik des A-Stroms in DA VTA Neuronen allerdings durch die Deletion von KChIP4 komplett okkludiert wurde, kann davon ausgegangen werden, dass diese Varianten nicht in DA Neuronen exprimiert werden.



---

## 4.3 Funktionelle Rolle des A-Stroms für DA Mittelhirnneurone

### 4.3.1 KChIP4 hat keinen Einfluss auf die Spontanfrequenz von DA Neuronen

In zahlreichen Neuronenpopulationen konnte gezeigt werden, dass der A-Strom maßgeblich die Spontanaktivität sowie die Schwelle, Breite und Weiterleitung von Aktionspotentialen beeinflusst (Zhang und McBain, 1995; Liss et al., 2001; Kim et al., 2005; Yuan et al., 2005; Gentet und Williams, 2007). In DA SN Neuronen wurde eine inverse Korrelation zwischen der A-Stromdichte und der Spontanfrequenz festgestellt (Liss et al., 2001). Die Rolle des A-Stroms für die Spontanfrequenz von DA Neuronen konnte in der SN durch den Kanalblocker 4-Aminopyridin (4-AP) in adulten Tieren bestätigt werden. Der Effekt von 4-AP war in mesolimbischen VTA Neuronen allerdings weitaus geringer als in der nigrostriatalen Subpopulation und lieferte somit keinen eindeutigen Beweis für eine Beteiligung des A-Stroms in der Kontrolle der Spontanfrequenz (Krabbe, 2008).

Khaliq und Kollegen konnten in juvenilen Tieren zeigen, dass in DA VTA Neuronen der A-Strom in der Zeit zwischen zwei Aktionspotentialen aktiviert werden kann (Khaliq und Bean, 2008). Die Tatsache, dass die A-Strom-Aktivierung stark von der Depolarisationsrate abhängt und somit eine steilere Depolarisation einen größeren A-Strom hervorruft, suggeriert, dass dieser Strom sehr effektiv die Spontanfrequenz kontrollieren könnte. Allerdings handelt es sich bei den gemessenen Zellen dieser Studie höchstwahrscheinlich um DA VTA Neurone mit klassischen elektrophysiologischen Parametern (insbesondere Anwesenheit von  $I_h$ ), sodass die Schlussfolgerungen nicht direkt auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit übertragen werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurden weder in DA SN noch in VTA Neuronen Unterschiede in der Spontanfrequenz zwischen WT- und KChIP4-KO-Tieren beobachtet. Die schnellere Frequenz der DA VTA Neurone im Vergleich zu DA SN Neuronen – trotz ihres langsamer inaktivierenden A-Stroms – sowie die

Abwesenheit eines Frequenzunterschieds zwischen Neuronen aus WT- und KO-Tieren in dieser Population deuten auf einen Frequenzmechanismus hin, der unabhängig von der Inaktivierungskinetik des A-Stroms ist. Anhand dieser Daten kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass der A-Strom tatsächlich eine Rolle für die Kontrolle der Spontanfrequenz in DA VTA Neuronen spielen könnte. In DA Neuronen der SN, deren Spontanfrequenz nachweislich durch die A-Stromdichte bestimmt wird (Liss et al., 2001), lässt sich der fehlende Unterschied in der Spontanfrequenz zwischen Zellen aus WT- und KChIP4-KO-Tieren vermutlich durch deren geringe KChIP4-Expression erklären (Lammel, 2004). Die A-Stromdichte korreliert in diesen Zellen sowohl mit der Anzahl von  $K_{v4.3}$ - als auch von KChIP3.1-Molekülen, sodass in diesen Neuronen die Spontanfrequenz durch Expression dieser beiden Proteine moduliert wird (Liss et al., 2001).

### **4.3.2 Differentielle Rolle von KChIP4 für die Aktionspotentialparameter von DA Subpopulationen**

Der A-Strom ist in mesolimbischen VTA Neuronen an der Repolarisation der Aktionspotentiale beteiligt (Krabbe, 2008). In der vorliegenden Arbeit wurden in DA VTA Neuronen aus KChIP4-KO-Tieren, die eine dramatische Beschleunigung der A-Strom-Inaktivierung aufweisen, keine veränderten Aktionspotentialparameter festgestellt. Somit scheint die Repolarisation der Aktionspotentiale entweder unabhängig von der Inaktivierungskinetik des A-Stroms zu sein, oder z. B. durch Veränderungen anderer Ströme kompensiert zu werden. Eine Erhöhung der Amplitude des *delayed rectifier* Kaliumstroms, der an der Repolarisation und Nachhyperpolarisation der Aktionspotentiale beteiligt ist (Kuznetsova et al., 2010), könnte die schnellere Inaktivierung des A-Stroms kompensieren und so die unveränderten Aktionspotentialparameter erklären. Im Gegensatz zu dieser Hypothese, ist die maximale Leitfähigkeit dieser Kanäle allerdings in DA VTA Neuronen aus KChIP4-KO-Tieren signifikant geringer als in Zellen aus WT-Tieren (Daten nicht gezeigt), sodass eine Kompensation des fehlenden A-Stroms durch *delayed rectifier* Ströme ausgeschlossen werden kann.

In der SN hingegen wurde eine verringerte Maximalamplitude in Kombination mit einer geringeren Depolarisationsgeschwindigkeit sowie eine verminderte Nachhyperpolarisation festgestellt. Da eine Blockade des A-Stroms durch 4-AP eine Erhöhung der Maximalamplitude zur Folge hat (Nedergaard, 1999; Krabbe, 2008), ist ein direkter Effekt der veränderten A-Strom-Kinetik für die geringere Maximalamplitude in Zellen aus den KChIP4-KO-Tieren eher unwahrscheinlich. Der A-Strom ist allerdings zusammen mit *delayed rectifier* Kaliumströmen an der Repolarisation des Aktionspotentials beteiligt (Krabbe, 2008; Kuznetsova et al., 2010). Die Leitfähigkeit der *delayed rectifier* Kaliumkanäle ist in DA SN Neuronen aus KO-Tieren signifikant geringer als in WT-Tieren (Daten nicht gezeigt), was in Kombination mit der schnelleren Inaktivierung des A-Stroms vermutlich zu einer langsameren und unvollständigen Repolarisation in Zellen aus KO-Tieren führt. Dies hat wiederum eine verminderte Verfügbarkeit von  $\text{Na}_v$  und  $\text{Ca}_v$ -Kanälen zur Folge, da für deren Erholung aus der Inaktivierung eine Hyperpolarisation des Membranpotentials benötigt wird (Kuznetsova et al., 2010). Da diese Kanäle die Aufstrichphase des Aktionspotentials tragen, würde deren verminderte Verfügbarkeit die geringere Depolarisationsgeschwindigkeit und Maximalamplitude erklären. Der reduzierte Calciumeinstrom während des Aktionspotentials würde zusätzlich in einer geringeren Aktivierung von SK-Kanälen resultieren und – da diese für die Nachhyperpolarisation zuständig sind (Nedergaard et al., 1993) – eine weitere Erklärung für die geringere Nachhyperpolarisation darstellen.

Außerdem könnte die Abwesenheit von KChIP4 einen direkten Einfluss auf die Amplitude von Calciumströmen haben. Es konnte bereits in Herzmuskelzellen gezeigt werden, dass KChIP2 die Amplitude von L-Typ Calciumströmen steigern kann, vermutlich durch direkte Bindung von KChIP2 an die N-terminale Domäne der  $\text{Ca}_v1.2$   $\alpha$ -Untereinheit, deren inhibitorische Wirkung dadurch aufgehoben wird (Thomsen et al., 2009a; Thomsen et al., 2009c). Somit resultiert die Abwesenheit von KChIP2 in einer Verminderung von L-Typ Calciumströmen, die auch bei KChIP4-KO-Tieren vorhanden sein könnte, wenn KChIP4 ebenfalls direkt L-Typ Calciumströme modulieren kann (Thomsen et al., 2009b). In diesem Fall wäre allerdings der größte Unterschied in DA VTA Zellen zu erwarten, da diese eine

höhere KChIP4-Expression aufweisen, als DA SN Neurone und somit von der KChIP4-Deletion stärker betroffen sein sollten. Diese zeigen allerdings keine veränderten Aktionspotentialparameter, sodass der direkte Einfluss von KChIP4 auf L-Typ Calciumströme eher unwahrscheinlich ist.

### **4.3.3 Bedeutung von KChIP4 für die Verarbeitung depolarisierender Ströme**

#### **4.3.3.1 Der langsame A-Strom beeinflusst die Reaktion von DA VTA Neuronen auf eine langanhaltende Depolarisation**

Um die Rolle von KChIP4 für die Verarbeitung von depolarisierenden Strömen zu untersuchen, wurden kontinuierliche und rampenförmige Ströme injiziert, ausgehend von einem Membranpotential von  $-60$  mV. Die aus beiden Protokollen ermittelte niedrigste Entladungsfrequenz war in DA VTA Neuronen aus KO-Tieren im Vergleich zur Kontrollpopulation nicht signifikant unterschiedlich. Bei der Injektion von konstanten depolarisierenden Strömen wurde allerdings in DA VTA Neuronen aus WT-Tieren eine prominente Latenz von etwa 400 ms zum ersten Aktionspotential beobachtet. Diese wird als *excitation delay* bezeichnet und wurde auch in früheren Studien in neuronalen Populationen festgestellt, die über einen A-Strom verfügen (Shibata et al., 2000; Ruscheweyh und Sandkühler, 2002; Melnick, 2011). Voraussetzung für die beobachtete Latenz war die initiale Hyperpolarisation des Membranpotentials auf  $-60$  mV, was die Erholung der A-Typ Kanäle aus der Inaktivierung und deren anschließende Aktivierung bei Beginn der Depolarisation ermöglicht, ein Ergebnis, das auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt). Die Verfügbarkeit von  $Na_v$ - und  $Ca_v$ -Kanälen wird durch die Hyperpolarisation ebenfalls erhöht, sodass die transiente Übererregbarkeit durch höhere T-Typ Calciumströme getragen werden könnte. Die für DA VTA Neurone charakteristische Latenz zum ersten Aktionspotential scheint von der langsamen Inaktivierungskinetik des A-Stroms abhängig zu sein, da in DA VTA Neuronen aus KChIP4-KO-Tieren, die eine schnelle A-Strom Kinetik aufweisen, die Latenzzeit signifikant verkürzt war. In diesen Neuronen wurde in

den ersten 500 ms stattdessen eine für DA Neurone untypische, hohe Entladungsfrequenz beobachtet. Diese Ergebnisse lieferten erste Hinweise dafür, dass die Kinetik des A-Stroms in DA VTA Neuronen einen Einfluss auf die Verarbeitung von synaptischen Eingängen haben könnte. In Pyramidenzellen des Hippocampus konnte bereits gezeigt werden, dass dendritisch lokalisierte A-Typ Kaliumkanäle die Amplitude und Ausbreitung von exzitatorischen postsynaptischen Potentialen dämpfen (Hoffman et al., 1997). Eine Blockade der A-Ströme führte zu einer Erhöhung der dendritischen Erregbarkeit, sodass vorher unterschwellige Reize zur AP-Generierung ausreichend waren (Hoffman et al., 1997).

Da die Minimalfrequenz von DA VTA Neuronen zwischen WT- und KO-Tieren nicht verändert war, bei Abwesenheit von KChIP4 allerdings signifikant höhere Maximalfrequenzen erreicht wurden, scheint KChIP4 einen entscheidenden Einfluss auf die Kontrolle des dynamischen Frequenzbereichs von DA VTA Neuronen zu haben. Der langsam inaktivierende A-Strom stellt dabei einen internen Bremsmechanismus für die maximal erreichte Frequenz dar, die bei der Verarbeitung von exzitatorischen Eingängen eine Rolle spielen könnte. Allerdings muss hier beachtet werden, dass dies nur im Falle einer vorherigen Hyperpolarisation zu tragen kommt, da diese für eine ausreichende Verfügbarkeit der A-Typ Kaliumkanäle notwendig ist.

#### **4.3.3.2 Der langsame A-Strom kann potentiell die Verarbeitung exzitatorischer synaptischer Eingänge beeinflussen**

Um die Rolle der A-Strom-Kinetik in der Verarbeitung von synaptischen Strömen weiter zu untersuchen, wurden in spontanaktive Zellen NMDA-ähnliche Ströme injiziert. Hier wurde, im Gegensatz zu den oben beschriebenen Depolarisationsschritten, keine Hyperpolarisation auf  $-60$  mV vorgenommen, um möglichst physiologische Bedingungen voraussetzen zu können. Die Injektion von NMDA-ähnlichen Strömen führte zu einer überschwelligeren Depolarisation des Membranpotentials und zur Generierung von hochfrequenten Aktionspotentialen, allerdings wurde zwischen Zellen als WT- und KO-Tieren kein Unterschied in der resultierenden AP-Frequenz beobachtet. Die Ursache für den fehlenden

Unterschied liegt vermutlich darin, dass die Strominjektion nicht von einem hyperpolarisierten Membranpotential durchgeführt wurde, sondern aus der Spontanaktivität. Bei diesen Potentialen erreicht der A-Strom vermutlich zu geringe Amplituden, da ein Großteil der  $K_{V4}$ -Kanäle im inaktivierten Zustand vorliegt. Eine potentielle Rolle für den langsamen A-Strom in der Integration exzitatorischer Eingänge kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, da deren Aktivierung direkt nach einer vorangegangenen Hyperpolarisation erfolgen könnte. Diese würde die Verfügbarkeit von A-Typ Kanälen erhöhen und somit eine Dämpfung der synaptischen Ströme ermöglichen. Das tatsächliche Membranpotential der Zellen *in vivo* wird maßgeblich durch die Balance zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Eingängen bestimmt (Lobb et al., 2011b) und ist nicht bekannt, so dass keine genauen Aussagen zur Verfügbarkeit der A-Typ Kanäle und deren Einfluss auf die synaptische Integration gemacht werden können.

### **4.3.4 KChIP4 kontrolliert die Dauer von GABA-induzierten Pausen**

Die lange Latenz von DA VTA Neuronen zum nächsten Aktionspotential nach Ende einer zwei Sekunden langen hyperpolarisierenden Strominjektion, der sog. *rebound delay*, wurde schon in früheren Studien an z. T. retrograd identifizierten Subpopulationen von DA Neuronen gezeigt (Neuhoff et al., 2002; Koyama und Appel, 2006b; Lammel et al., 2008) und konnte in dieser Arbeit reproduziert werden. Die Deletion von KChIP4 resultierte in einer signifikant verkürzten Latenzzeit selektiv in DA VTA Neuronen. Daraus kann geschlossen werden, dass die Expression von KChIP4 für den charakteristisch langen *rebound delay* von DA VTA Neuronen verantwortlich ist. Da die Dauer und Amplitude der hyperpolarisierenden Strominjektionen unphysiologisch waren, wurden anschließend Ströme injiziert, die in ihrer Amplitude und Kinetik postsynaptischen  $GABA_A$ - und  $GABA_B$ -Strömen nachempfunden waren, um die Beteiligung von KChIP4 für die Integration von inhibitorischen synaptischen Strömen zu bestätigen. Auch bei diesen Strömen wurde in DA VTA Neuronen aus WT-Tieren ein verzögertes Wiedereintreten der Spontanaktivität nach der Strominjektion beobachtet. Die entscheidende Rolle von KChIP4 für die Dauer der inhibitorischen Pause wurde

durch Messungen in DA VTA Neuronen aus KChIP4-KO-Tieren deutlich, die bei gleicher Hyperpolarisation eine signifikant kürzere Pause aufwiesen, als vergleichbare Zellen aus WT-Tieren.

Im WT zeigte sich weiterhin eine direkte Korrelation zwischen dem Ausmaß der Hyperpolarisation und der Dauer der inhibitorischen Pause, die durch die Erholung von zunehmend mehr A-Typ Kanälen aus der Inaktivierung erklärt werden kann. Durch die Hyperpolarisation auf  $-80$  mV, einem Potential, das in etwa dem halbmaximalen Inaktivierungspotential entspricht, erholen sich 50 % der Kanäle aus der Inaktivierung, die nach Ende der Strominjektion durch ihre Aktivierung die Rückkehr zum Schwellenpotential verzögern. Obwohl das Inaktivierungs- $V_{50}$  in Neuronen aus KChIP4-KO-Tieren um 5 mV positiver war als in WT-Tieren und somit bei gleicher Hyperpolarisation mehr Kanäle verfügbar sein sollten, war die Pause signifikant kürzer. Dies könnte sich zum einen durch die schnellere Inaktivierungskinetik erklären, die den Stromfluss zeitlich begrenzt, und zum anderen durch die Verschiebung des halbmaximalen Aktivierungspotentials des A-Stroms zu positiveren Werten im KO. Während in Neuronen aus WT-Tieren schon bei einem Potential von etwa  $-42$  mV 50 % der Kanäle aktiviert sind, muss dafür in Zellen aus KO-Tieren das Potential um 14 mV positiver sein. Daher werden bei gleichem Potential in Neuronen aus KO-Tieren weniger Kanäle aktiviert.

Die Amplitude des GABA<sub>A</sub>-vermittelten Chloridstroms und somit auch die Stärke der resultierenden Hyperpolarisation hängt vom Cl<sup>-</sup>-Umkehrpotential ( $E_{Cl}$ ) ab, welches bei Messungen in der *Whole-Cell* Konfiguration durch die Chloridkonzentration in der Bad- und Pipettenlösung bestimmt wird. Das  $E_{Cl}$  liegt in DA SN Neuronen bei  $-63$  mV (Gulácsi et al., 2003), für DA VTA Neurone finden sich in der Literatur keine Angaben. Wird allerdings auch in diesen Zellen ein  $E_{Cl}$  um  $-63$  mV vorausgesetzt, dann ist dies weitaus negativer als die Nachhyperpolarisation ( $-55$  mV), sodass bei deren Maximum noch Triebkraft für einen Cl<sup>-</sup>-Einstrom vorhanden ist. Obwohl durch die kontinuierliche Aktivierung von GABA-R lediglich eine Hyperpolarisation des Membranpotentials auf  $-65$  mV verursacht wurde (Daten nicht gezeigt), konnte gezeigt werden, dass selbst eine zeitlich begrenzte iontophoretische GABA-Applikation und die dadurch

resultierende Hyperpolarisation ausreichend ist, um einen relevanten Anteil der  $K_{V4}$ -Kanäle in die aktivierbare Konformation zu bringen und einen Effekt des A-Stroms auf die inhibitorische Pause zu verursachen. Ob der Effekt von KChIP4 auf die Verlängerung der  $GABA_A$ -abhängigen Pause in DA VTA Neuronen auch bei physiologischen Chloridkonzentrationen eine relevante Rolle spielt, könnte durch Messungen in der sog. *perforated-Patch* Konfiguration untersucht werden. Dabei wird der Membranfleck unter der Pipette nicht aufgebrochen, sondern mit Hilfe von porenbildenden Agenzien, wie z. B. dem Antibiotikum Gramicidin perforiert, welches durch seine Selektivität für monovalente Kationen einen Erhalt der physiologischen intrazellulären Chloridkonzentration ermöglicht (Kyrozis und Reichling, 1995). In der Literatur finden sich keine Messungen des physiologischen  $E_{Cl}$  in DA VTA Neuronen adulter Tiere. Ergebnisse aus juvenilen Tieren zeigen ein depolarisiertes  $E_{Cl}$  zwischen  $-40$  und  $-25$  mV, was zu einem Chloridauswärtsstrom und einer Membrandepolarisation nach Aktivierung von  $GABA_A$ - bzw. Glycin-Rezeptoren führt (Ye et al., 2001; Mansvelder et al., 2002). Somit stellen Daten aus juvenilen Tieren keine verlässliche Grundlage für Annahmen zur intrazellulären Chloridkonzentration in Zellen aus adulten Tieren dar.

Da in DA SN Neuronen die Hyperpolarisation im Zuge des Aktionspotentials mit  $-63$  mV im gleichen Potentialbereich wie das  $E_{Cl}$  liegt (Gulácsi et al., 2003) und der Cl-Strom bei diesen Potentialen am kleinsten ist, können diese Zellen durch Aktivierung des  $GABA_A$ -Rezeptors sehr wahrscheinlich nicht weiter hyperpolarisiert und deren Aktivität nicht inhibiert werden.

Die Tatsache, dass die GABA-induzierte Pause in DA VTA Neuronen aus KChIP4-KO-Tieren signifikant kürzer ausfällt, als in Zellen aus WT-Tieren, deutet darauf hin, dass die Expression von KChIP4 mit der hier gezeigten Modulation der A-Strom-Parameter an der Regulation der Länge von GABA-induzierten Pausen beteiligt sein könnte. Somit könnte spekuliert werden, dass KChIP4a den DA VTA Neuronen in einem physiologisch relevanten Bereich einen internen Verzögerungsmechanismus verleiht, um Pausen, die durch inhibitorische synaptische Eingänge vermittelt werden, zu verlängern und deren Effekt auf die Aktivität und somit auch die DA-Freisetzung in den Projektionsarealen zu verstärken.



Ob der A-Strom-vermittelte Verzögerungsmechanismus ausschließlich die Inhibition durch GABAerge Afferenzen verstärkt, oder die Integration aller inhibitorischen Eingänge (z. B. AChR, D2R) beeinflusst, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Hinweise dafür finden sich allerdings in der subzellulären Lokalisation von  $K_v4$ -Untereinheiten. Unpublizierte Experimente aus einer Kooperation mit Rafael Lujan und Kollegen (Universität Castilla-La Mancha in Albacete, Spanien) zeigten eine Expression der  $K_v4.3$   $\alpha$ -Untereinheit im gesamten somatodendritischen Kompartiment von DA SN Neuronen, mit einem postsynaptischen *clustering* an GABAergen Synapsen. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits für  $K_v4.2$  Kanäle im Hippocampus publiziert (Jinno et al., 2005). Ob diese enge Beziehung von  $K_v4$ -Kanälen und GABAergen Synapsen auch in DA VTA Neuronen vorhanden ist, wurde noch nicht untersucht, würde aber die Hypothese der selektiven Modulation von GABAergen Eingängen untermauern. Die Grundeigenschaften der GABAergen Eingänge wurden in dieser Arbeit ebenfalls untersucht, um eine kompensatorische Veränderung in DA Neuronen aus KChIP4-KO-Tieren auszuschließen. Weder die Deaktivierungskinetik von evozierten postsynaptischen Strömen (eIPSC) noch die Frequenz der spontanen  $GABA_A$ -vermittelten inhibitorischen postsynaptischen Ströme (sIPSC) waren verändert, wobei die Zellzahl für eine genaue statistische Beurteilung der spontanen IPSC noch aufgestockt werden, sowie die Analyse auf die Miniatur-IPSCs (mIPSC) erweitert werden sollte.

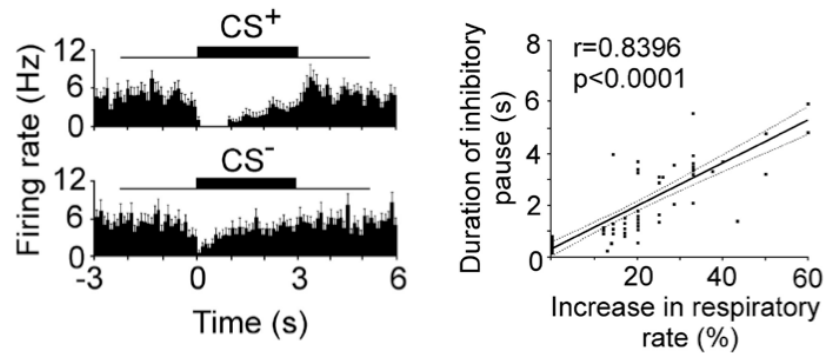
#### **4.4 Potentielle Relevanz von KChIP4 für die Verarbeitung von Belohnung und Aversion**

KChIP4a beeinflusst durch seine Effekte auf die A-Strom-Parameter in DA VTA Neuronen die Dauer einer  $GABA$ -vermittelten inhibitorischen Pause. Somit ist die Rolle dieser Untereinheit in Situationen zu suchen, in welchen eine phasische Inhibition von DA Neuronen auftritt. DA Neurone werden  $GABA_A$ -abhängig durch aversive Stimuli, wie z. B. einem elektrischen Schock am Fuß inhibiert (Tan et al., 2012), oder auch durch einen negativen RPE, d. h. wenn eine erwartete

Belohnung ausfällt oder kleiner ist als erwartet (Schultz, 1998; Steinberg et al., 2013). Die Inhibition von DA Neuronen spielt außerdem eine entscheidende Rolle für die Extinktion, einem Lernprozess, der in einem graduellen Ausbleiben einer Reaktion auf einen belohnungsassoziierten Stimulus resultiert, sobald die Stimulus-Belohnungs-Assoziation nicht mehr gegeben ist (Steinberg et al., 2013). Das Ausmaß der KChIP4a-Expression und die damit einhergehenden Unterschiede in der Aktivierungs- und Inaktivierungsparameter des A-Stroms könnten den verschiedenen Subpopulationen von DA VTA Neuronen eine differentielle Empfindlichkeit für diese Inhibition verleihen, sodass synaptische Ströme gleicher Amplitude Pausen unterschiedlicher Länge verursachen könnten.

#### **4.4.1 Bedeutung der Dauer von inhibitorischen Pausen**

Die Aktivität von DA Neuronen beeinflusst die Ausschüttung von DA in den Zielarealen und somit auch die Transmitterbesetzung der postsynaptischen Rezeptoren. Dreyer und Kollegen konnten 2010 mit Hilfe eines mathematischen Modells zeigen, dass Pausen in der Aktivität von DA Neuronen zu einer Dissoziation des Transmitters sowohl von den niedrigaffinen D1R, als auch von den hochaffinen D2R führen. Dabei ist der Unterschied in der Transmitterbesetzung bei D2R von der Dauer der Pause abhängig, sodass durch längere Pausen größere Unterschiede hervorgerufen werden (Dreyer et al., 2010). Dass die genaue Dauer der inhibitorischen Pause eine bedeutende Rolle für die Informationsverarbeitung und das resultierende Verhalten spielen kann, konnte bereits an einem Angstkonditionierungsparadigma an Ratten demonstriert werden, bei dem ein konditionierter Stimulus (Ton) mit einem Elektroschock gepaart wurde (Mileykovskiy und Morales, 2011). Die Dauer der Inhibition einer Subpopulation von DA VTA Neuronen bei Präsentation des konditionierten Stimulus war dabei proportional zum Ausmaß der Angstreaktion der Tiere (siehe Abbildung 4.1). Auch in wachen Primaten wurde eine lineare Beziehung zwischen der Dauer der Pause und des Wertes des negativen RPE gefunden (Bayer et al., 2007).



**Abbildung 4.1: Verhaltensrelevanz der Dauer der inhibitorischen Pause**

Links: Darstellung der Frequenzänderungen DA VTA Neurone bei Präsentation eines aversiven konditionierten Stimulus (CS<sup>+</sup>). Im Gegensatz zum nicht mit einem Shock-gepaarten Stimulus (CS<sup>-</sup>) zeigt sich bei der Präsentation des CS<sup>+</sup> eine Inhibition des DA Neurons, welche sich aus einer etwa 1 s langen Pause und einer nachfolgenden langsamen Steigerung der Spontanaktivität zusammensetzt. Rechts: Korrelation der Länge der inhibitorischen Pause mit der Erhöhung der respiratorischen Rate, die als read-out für die Stärke der Angstreaktion bei Präsentation des CS<sup>+</sup> eingesetzt wurde. Es ist eine deutliche Abhängigkeit der beiden Größen zu erkennen (modifiziert nach Mileykovskiy und Morales, 2011).

#### 4.4.2 Mögliche Verhaltensphänotypen der KChIP4-KO-Tiere

Die Rolle von DA im Belohnungsnetzwerk wird durch die Modulation der Aktivität der MSN des NAc vermittelt (Carlezon und Thomas, 2009). Eine Belohnung ist dabei stets mit einer erhöhten Aktivität der D1R-MSN des direkten Wegs und einer Inhibition von D2R-MSN des indirekten Wegs assoziiert; beides resultiert durch die erhöhte DA-Freisetzung von mesolimbischen DA VTA Neuronen (Kravitz et al., 2012). Im Gegensatz dazu kommt es im Fall eines aversiven Stimulus, der mit einer Pause von DA VTA Neuronen einhergeht, zu einer Erhöhung der Aktivität von D2-haltigen MSN. D2R sind aufgrund ihrer hohen Affinität zu DA (Richfield et al., 1989) bei einer Abwesenheit eines signifikanten Stimulus – die mit einer tonischen Aktivität von DA Neuronen und einer basalen DA-Konzentration einhergeht – mit DA besetzt (Dreyer et al., 2010). Eine Pause in der DA-Aktivität führt durch eine Reduktion des DA-Tonus zur Diffusion des Transmitters von den D2R (Dreyer et al., 2010), was zu einer Disinhibition der accumbalen MSN des indirekten Wegs führt (Surmeier et al., 2011). Die Erhöhung der Aktivität insbesondere von NAc Sh Neuronen konnte durch den Einsatz verschiedener aversiver Stimuli gezeigt werden (Roitman et al., 2005; Wheeler et

al., 2008; Roitman et al., 2010). Die Aktivität der D2R ist außerdem maßgeblich an der Regulation von striataler Plastizität beteiligt (Calabresi et al., 1997), sodass eine Pause in der D2R-Aktivität in Kombination mit exzitatorischen Eingängen in Folge von aversiven Stimuli zu Lernvorgängen führen, welche das Ausüben einer geeigneten Reaktion unterstützen würden (McCutcheon et al., 2012). Dabei moduliert DA die Balance der synaptischen Eingänge aus dem ventralen Subiculum des Hippocampus (vSub) und dem PFC auf die MSN (Goto und Grace, 2005). Hohe DA Konzentrationen begünstigen den vSub-NAc Pathway, der für das Beibehalten einer gelernten Reaktion sorgt, während bei niedrigen DA-Konzentrationen der PFC-NAc Pathway gefördert wird, der ein Wechsel zu neuen Strategien unterstützt (Goto und Grace, 2005). Bleibt eine Belohnung aus, führt die geringere Aktivität der DA Neurone (Hollerman und Schultz, 1998) und der resultierende Abfall der DA Konzentration zu einer präfrontal ermöglichten Strategieänderung.

Auf Grund der hier demonstrierten Rolle von KChIP4 für die Dauer der inhibitorischen Pause, könnte spekuliert werden, dass in KChIP4-KO Tieren die signifikant kürzere Pause der DA VTA Neurone nach dem Ausbleiben einer Belohnung nicht ausreichend ist, um den Wechsel vom hippocampalen zum präfrontalen Input zu schaffen, sodass die Tiere bei gleicher Informationslage keine erfolgreiche Strategieveränderung durchführen können. Dies könnte zu einer Beeinträchtigung der KChIP4-KO-Tiere bei Lernvorgängen führen, vor allem wenn diese durch die Präsentation von aversiven Stimuli getrieben werden. Da die Inhibition von DA Neuronen auch der Extinktion von belohnungsgetriebenen Lernvorgängen zugrunde liegt (Steinberg et al., 2013), wäre bei kürzeren GABA-induzierten Pausen in KChIP4-KO-Tieren eine langsamere Extinktion zu erwarten. Die Präsentation von aversiven Stimuli löst außerdem durch die Inhibition von DA VTA Neuronen eine Vermeidung des Ortes der Stimuluspräsentation aus (Lammel et al., 2012; Stamatakis und Stuber, 2012; Tan et al., 2012). Aufgrund der fehlenden KChIP4-vermittelten Verlängerung der inhibitorischen Pause, ist in KChIP4-KO-Tieren eine weniger ausgeprägte Vermeidungsreaktion zu erwarten, als in WT-Tieren. Diese Verhaltensphänotypen würden die hier postulierte Rolle von

KChIP4a für die Verlängerung der GABAergen Inhibition von DA VTA Neuronen bestätigen.

#### 4.4.3 Quellen der GABAergen Inhibition von DA VTA Neuronen

Die Pausen in der Aktivität von DA Neuronen werden durch GABAerge-Afferenzen vermittelt (Morikawa und Paladini, 2011). Als mögliche Quellen der GABAergen Inhibition kommen der RMTg, der NAc, das ventrale Pallidum sowie lokale GABAerge Neurone in Frage (siehe Abschnitt 1.1.3.2). Die Beteiligung dieser Strukturen in der Verarbeitung von belohnenden und aversiven Stimuli konnte durch die Verhaltenskorrelate ihrer direkten oder indirekten Aktivierung demonstriert werden. Optogenetische Stimulation von lokalen GABAergen VTA Neuronen ist ausreichend, um bei Mäusen eine sog. *conditioned place aversion* (CPA) auszulösen (Tan et al., 2012). Dabei wurden selektiv GABAerge Neurone mit Hilfe eines viral induzierten Channelrhodopsins (ChR) nur dann stimuliert, wenn sich die Maus auf einer bestimmten Seite einer zweigeteilten Kammer befand. Bei dem nachfolgenden Test wurde eine Aversion gegen diese Seite festgestellt, da die Tiere sich präferentiell auf der Seite aufhielten, auf der keine Stimulation erfolgte (Tan et al., 2012). Die indirekte Aktivierung des RMTg durch optogenetische Stimulation der LHb resultiert ebenfalls in passiven, aktiven und konditionierten Vermeidungsreaktionen (Stamatakis und Stuber, 2012).

In aktuellen Studien finden sich Hinweise auf eine differentielle Innervation der verschiedenen DA VTA Subpopulationen von den oben genannten GABAergen Strukturen. So scheint der RMTg präferentiell DA VTA Neurone, die in den NAc lSh projizieren, zu innervieren (Lammel et al., 2012), während in den NAc mSh projizierende Neurone selektiv GABAerge Afferenzen vom NAc erhalten (unpublizierte Beobachtungen von Stephan Lammel, Nancy Pritzker Laboratory, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Stanford University, USA). Letzteres bestätigt einen Befund aus den Achtzigerjahren, nach dem 33 % von potentiell DA VTA Neuronen durch Stimulation des NAc inhibiert werden (Maeda und Mogenson, 1980), steht allerdings im Gegensatz zu aktuellen Studien, die demonstrierten, dass eine Stimulation des NAc keinen Einfluss auf die

Aktivität von DA VTA Neurone hat (Hu et al., 2011; Sesia et al., 2013). Des Weiteren sollen die MSN des NAc nicht die DA, sondern fast ausschließlich die GABAergen VTA Neurone innervieren (Xia et al., 2011). Die genauen Eigenschaften und die Funktion der GABAergen Projektion aus dem NAc in die VTA sind somit noch ungeklärt, was eine Vorhersage deren Rolle im Kontext von belohnungsassoziierten Vorgängen erschwert.

In den NAc lSh projizierende DA VTA Neurone besitzen einen schnellen, SN-ähnlichen A-Strom (Lammel, 2008), somit ist die KChIP4-Expression dieser Zellen höchstwahrscheinlich gering und spielt keine Rolle in der Integration inhibitorischer Eingänge. Somit könnte KChIP4 selektiv in mesolimbischen, in den NAc mSh projizierenden DA VTA Neuronen die inhibitorische Pause durch GABAerge synaptische Eingänge verlängern und somit für die erfolgreiche Verarbeitung von aversiven Stimuli unabdingbar sein.

Durch Kombination von retrogradem *Tracing* mit Injektion eines adenoassoziierten Virus (AAV), welches für die Expression von Channelrhodopsin (ChR) in den axonalen Terminalen sorgt, konnte kürzlich außerdem gezeigt werden, dass mesocorticale DA VTA Neurone, im Gegensatz zu mesolimbischen DA Neuronen, nicht durch den RMTg inhibiert werden, sondern direkte, exzitatorische Eingänge von den LHb erhalten (Lammel et al., 2012). Somit werden diese Neurone in Folge eines aversiven Stimulus, der mit einer Exzitation der LHb korreliert (Matsumoto und Hikosaka, 2007), durch die glutamatergen Afferenzen aktiviert. Diese Ergebnisse stimmen mit dem früheren Befund der erhöhten synaptischen Plastizität der mesocorticalen Neurone bei aversiven Reizen überein (Lammel et al., 2011).

---

## 4.5 Weiterführende Experimente und Ausblick

### 4.5.1 Untersuchung des *in vivo* Entladungsmusters in Abhängigkeit von der KChIP4-Expression

Die Versuche der vorliegenden Arbeit begrenzen sich auf elektrophysiologische *in vitro* Messungen aus akuten Hirnschnitten. Diese stellen optimale Bedingungen für die Bestimmung der Rolle von KChIP4 für die biophysikalischen Eigenschaften des A-Stroms dar und konnten wichtige Hinweise für die Funktion dieser Untereinheit in der Verarbeitung von inhibitorischen Eingängen liefern. Einen eindeutigen Beweis dafür sowie weiterführende Informationen für die Bedeutung des KChIP4-modulierten A-Stroms für die verschiedenen Subpopulationen von DA VTA Neuronen kann allerdings nur die Untersuchung dieser Neurone im intakten Netzwerk liefern. Da jede Form von Anästhesie besonders das GABAerge System erheblich beeinflusst (Harrison et al., 1993; Krasowski et al., 1998; Zhuang et al., 2000; Kitamura et al., 2003), sind Messungen in anästhesierten Tieren für weiterführende *in vivo* Experimente ungeeignet. Der Einfluss der KChIP4-Deletion auf das spontane Entladungsverhalten von DA Neuronen sowie die Rolle von KChIP4 für die Verarbeitung von GABAergen Eingängen sollte daher an wachen Tieren untersucht werden. Nach den Ergebnissen der *in vitro* Versuche wäre es denkbar, dass spontane Pausen in der Aktivität von DA VTA Neuronen, die durch Aktivierung von inhibitorischen synaptischen Eingängen hervorgerufen werden, in KChIP4-KO-Tieren eine geringere Länge aufweisen als in WT-Tieren. Außerdem zu erwarten ist eine kürzere Inhibition von DA Neuronen von KChIP4-KO-Tieren im Fall eines negativen RPE, bei Präsentation eines aversiven Stimulus und während der Extinktion. Der Einfluss der Länge von GABA-induzierten Pausen und somit auch die diesbezügliche Rolle von KChIP4 für das belohnungsabhängige Lernverhalten könnte so in Kombination mit entsprechenden Verhaltenstests (siehe Abschnitt 4.4.2) untersucht werden.

Da besonders in der VTA nicht-DA von DA Neuronen anhand von elektrophysiologischen Parametern schwer zu unterscheiden sind (Ungless und

Grace, 2012), ist eine geeignete Methode zur Bestätigung des DA Phänotyps unabdingbar. Eine weitere Hürde in diesem Zusammenhang ist die Identifikation des Projektionsgebietes der gemessenen Zellen. Während dies für *in vitro* Messungen problemlos durch eine retrograde Markierung mit fluoreszierenden Latexkügelchen (*beads*) durchgeführt werden kann, da bei einer leichten Beladung mit *beads* die *in vitro* elektrophysiologischen Eigenschaften nicht signifikant beeinflusst werden (Lammel et al., 2008; Lammel et al., 2011; Krabbe, 2012), konnten in Pilotversuchen *in vivo* keine mit *beads* beladenen Zellen erfolgreich gemessen werden, da diese vermutlich nicht mehr spontanaktiv sind (Krabbe, 2012; Schiemann, 2012). Sowohl das Projektionsgebiet als auch der DA Phänotyp von *in vivo* gemessenen Neuronen können durch Kombination von Optogenetik mit Virus-Injektionen differenziert werden (Lima et al., 2009; Tye und Deisseroth, 2012). Dabei wird ein lichtsensitiver Ionenkanal, wie z.B. das Channelrhodopsin 2 (ChR2) selektiv in DA Neuronen exprimiert, um dann während der elektrophysiologischen Messungen *in vivo* durch Licht stimuliert zu werden und so die Neurone zu aktivieren. Die selektive Expression des ChR2 in gewählten Projektionsneuronen kann durch Injektion eines retrograd transportierten Virus – z. B. Rabies (RV) oder Herpes Simplex Viren (HSV1) – in das gewünschte Projektionsgebiet gewährleistet werden. Steht die Expression des ChR2 unter der Kontrolle eines für DA Neurone selektiven Promotors, wie z. B. des DAT-Promotors, wird das ChR2 selektiv in DA Neuronen exprimiert (Tye und Deisseroth, 2012). Somit können selektiv das gewählte Projektionsgebiet innervierende Neurone durch Aktivierung des ChR2 mit Licht stimuliert und dadurch während der elektrophysiologischen Messungen *in vivo* identifiziert werden (Lima et al., 2009). Alternativ könnte für die ChR2-Expression selektiv in DA Neuronen das Cre-Lox-System eingesetzt werden. Dabei wird ein virales Konstrukt eingesetzt, bei welchem die Expression von ChR2 durch eine STOP-Sequenz inhibiert wird, die vor der kodierenden Sequenz liegt und von sog. „loxP-Stellen“ flankiert wird. Die loxP-Sequenzen sind Ziel des Enzyms Cre-Rekombinase, welches die STOP-Sequenz zwischen den loxP-Stellen ausschneidet und somit die Expression des ChR2 ermöglicht. Wird dieses Virus in eine transgene Mauslinie injiziert, in welcher die Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des DAT-Promotors steht (Zhuang et al., 2005; Bäckman et al., 2006),



wird das ChR2 selektiv in DA Neuronen exprimiert. Die Verwendung dieses Systems in Kombination mit KChIP4-KO Tieren würde allerdings die Generierung von doppelt-transgenen Tieren voraussetzen, d. h. Tieren, die sowohl die KChIP4-Deletion als auch die DAT-abhängige Cre-Rekombinase-Expression in DA Neuronen aufweisen.

#### **4.5.2 Hat KChIP4 einen subpopulationsspezifischen Einfluss auf die Dauer von inhibitorischen Pausen?**

Eine Weiterführung der in Abschnitt 4.4.3 postulierten Hypothese zur differentiellen Rolle von KChIP4a für die Integration inhibitorischer GABAerger Eingänge in Subpopulationen von DA VTA Neuronen wäre, dass KChIP4 bei Präsentation eines aversiven Stimulus selektiv in mesolimbischen, in den NAc mSh projizierenden DA VTA Neuronen die Dauer der resultierenden Inhibition verlängert. Diese Hypothese beruht zum einen auf früheren Untersuchungen, die zeigten, dass der hier charakterisierte langsame A-Strom selektiv in medialen VTA Neuronen, die in den NAc mSh projizieren auftritt. Dagegen weisen in der lateralen VTA lokalisierte und in den NAc lSh projizierende DA Neurone eher einen SN-ähnlichen A-Strom auf (Lammel, 2008). Zum anderen deuten unpublizierte Beobachtungen darauf hin, dass in den medialen *shell* projizierende DA VTA Neurone selektiv GABAerge Inhibition aus dem NAc erhalten, während Projektionsneurone zum lateralen *shell* durch den RMTg inhibiert werden (unpublizierte Daten von Stephan Lammel, Nancy Pritzker Laboratory, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Stanford University, USA).

Um diese Hypothese zu untersuchen, müsste als erstes ermittelt werden, ob eine selektive Stimulation von accumbalen MSN tatsächlich ein Verhaltenskorrelat eines aversiven Stimulus auslösen kann, z. B. eine konditionierte oder passive Ortaversion. Dies könnte durch die selektive, virus-induzierte Expression eines stimulierenden Channelrhodopsins (z. B. ChR2) in MSN des NAc und einer Stimulation deren Terminalen in der VTA erfolgen (Lammel et al., 2012). Spielt KChIP4a die hier postulierte Rolle durch die Verstärkung der GABAergen Inhibition, so würde die *place aversion* in KChIP4-KO-Tieren weniger ausgeprägt

sein, als in WT-Tieren. Ist die Verlängerung der inhibitorischen Pause tatsächlich selektiv für in den NAc mSh projizierende DA VTA Neurone, so sollte bei Stimulation von GABAergen RMTg Neuronen, die hauptsächlich in den lateralen *shell* projizierende DA VTA Neurone innervieren, kein Unterschied in der *place aversion* zwischen WT- und KO-Tieren bestehen. Eine gleichzeitige Messung des Aktivitätsmusters von mesolimbischen in den NAc mSh bzw. NAc lSh projizierenden DA Neuronen nach Stimulation der MSN würde klarstellen, ob die inhibitorische Pause durch die Expression von KChIP4 beeinflusst wird.

Durch den Einsatz von Tieren, die eine selektive Expression des ChR2 in D1- oder D2-haltigen MSN aufweisen (Expression von ChR2 unter der Kontrolle des D1- bzw. D2R-Promotors oder Injektion eines adenoassoziierten Virus mit einem Cre-abhängigen ChR-Konstrukt in Tieren, die die Cre-Recombinase selektiv in D1R- oder D2R-MSN exprimieren), könnte außerdem getestet werden, durch welche Subpopulation von MSN die DA VTA Neurone inhibiert werden (Tye und Deisseroth, 2012).

Mit einem ähnlichen Versuch könnte außerdem untersucht werden, ob KChIP4 die Inhibition durch GABAerge VTA Neurone moduliert, indem die ChR-Expression selektiv in diesen Neuronen induziert wird. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivierung der lokalen GABAergen VTA Neurone ausreichend ist, um DA VTA Neurone zu inhibieren und dadurch eine *conditioned place aversion* zu verursachen, allerdings wurde nicht untersucht, welche Subpopulation von DA VTA Neuronen dabei durch die GABAergen VTA Neurone inhibiert werden (Tan et al., 2012).

### **4.5.3 Konditioneller Knock-Out und Re-Expression von KChIP4a**

Da bei den in dieser Arbeit verwendeten Tieren die KChIP4-Deletion nicht auf DA Neurone beschränkt, sondern im gesamten Organismus vorhanden ist, es sich also um einen globalen KChIP4-KO handelt, können Effekte der KChIP4-Deletion durch andere Systeme nicht ausgeschlossen werden. Außerdem könnten kompensatorische Mechanismen während der Entwicklung die Effekte der KChIP4-Deletion maskieren. Ersteres könnte zum einen durch einen

konditionellen KChIP4-KO umgangen werden, indem die KChIP4-Deletion durch einen DA-spezifischen Promotor kontrolliert wird. Dies könnte durch die Generierung von doppelt-transgenen Tieren erfolgen, die zum einen ein loxP-flankiertes (gefloxtes) KChIP4-Gen und zum anderen eine DAT-abhängige Cre-Expression aufweisen (Bäckman et al., 2006). Die für DA Neurone selektive Cre-Expression würde somit zu einer KChIP4-Deletion selektiv in allen DA Neuronen führen.

Statt der KChIP4-Deletion könnte auch die Expression eines dominant negativen (DN) KChIP4-Konstrukts eingesetzt werden. Da die KChIPs um die Bindung an die  $K_v \alpha$ -Untereinheit konkurrieren (Holmqvist et al., 2002), könnte die Expression einer KChIP4-Variante ohne KIS-Domäne die Wirkung von KChIP4a okkludieren, sodass dessen Rolle für die Aktivität von Subpopulationen DA Neurone gezeigt werden kann. Eine alternative Strategie für das selektive Ausschalten der KChIP4a-Expression wäre das Einbringen einer geeigneten siRNA (*small interfering RNA*) (Elbashir et al., 2001). Beide Strategien könnten durch eine virale Injektion erfolgen, sodass durch das Ausschalten von KChIP4 in adulten Tieren potentielle Kompensationsmechanismen während der Entwicklung, die im globalen KChIP4-KO vorhanden sein könnten, ausgeschlossen werden können.

Die hier postulierte Rolle der KChIP4a-Untereinheit könnte außerdem durch einen sog. *rescue* bestätigt werden. Die Re-Expression von KChIP4a selektiv in DA Mittelhirnneuronen von Tieren mit einer globalen KChIP4-Deletion (Injektion eines geeigneten Virus mit einem KChIP4a-Konstrukts in das Mittelhirn oder in DA Projektionsgebieten unter der Kontrolle eines DA-selektiven Promotors) sollte sowohl die in der vorliegenden Arbeit untersuchten biophysikalischen A-Strom-Parameter, als auch die in Abschnitt 4.4.2 postulierten Verhaltensunterschiede der KChIP4-KO-Tiere okkludieren.

## 4.6 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurde ein kausaler Zusammenhang der KChIP4-Expression und den differentiellen biophysikalischen Eigenschaften des A-Stroms in Subpopulationen von DA Mittelhirnneuronen bestätigt. Die KChIP4a-Expression ist ausreichend, um die charakteristischen A-Strom-Eigenschaften von DA VTA Neuronen zu gewährleisten. Die langsame Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik sowie die charakteristischen *Steady-State* Parameter spielen weder eine Rolle in der Kontrolle der *in vitro* Spontanfrequenz, noch beeinflussen sie die Aktionspotentialparameter von DA VTA Neuronen. Der langsame A-Strom ist allerdings für den charakteristisch langen *rebound delay* von DA VTA Neuronen nach einer Inhibition verantwortlich. Es konnte gezeigt werden, dass der langsame, KChIP4-abhängige A-Strom einen Verzögerungsmechanismus selektiv in DA VTA Neuronen darstellt, der die Dauer von GABA-vermittelten inhibitorischen Pausen verlängern kann. Somit konnte in DA VTA Neuronen eine Rolle von KChIP4 für die Integration von inhibitorischen Eingängen nachgewiesen werden, welche beim Ausbleiben einer erwarteten Belohnung oder bei Präsentation eines aversiven Stimulus eine Pause in der Aktivität von DA Neuronen verursachen. Weiterführende Experimente werden zeigen, welchen subpopulationsspezifischen Einfluss KChIP4 im DA Mittelhirnsystem für belohnungs- und aversionsassoziierte Lernvorgänge hat.

# Literaturverzeichnis

- Adelman JP, Maylie J und Sah P (2012). Small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels: form and function. *Annu Rev Physiol* 74, 245-269.
- Ahern CA und Horn R (2004). Stirring up controversy with a voltage sensor paddle. *Trends Neurosci* 27, 303-307.
- Amarillo Y, De Santiago-Castillo JA, Dougherty K, Maffie J, Kwon E, Covarrubias M und Rudy B (2008). Ternary Kv4.2 channels recapitulate voltage-dependent inactivation kinetics of A-type K<sup>+</sup> channels in cerebellar granule neurons. *J Physiol (Lond)* 586, 2093-2106.
- An WF, Bowlby MR, Betty M, Cao J, Ling HP, Mendoza G, Hinson JW, Mattsson KI, Strassle BW, Trimmer JS, *et al.* (2000). Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* 403, 553-556.
- Anderson D, Mehaffey WH, Iftinca M, Rehak R, Engbers JD, Hameed S, Zamponi GW und Turner RW (2010). Regulation of neuronal activity by Cav3-Kv4 channel signaling complexes. *Nature Neuroscience*, 1-7.
- Apkon M und Nerbonne JM (1988). Alpha 1-adrenergic agonists selectively suppress voltage-dependent K<sup>+</sup> current in rat ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 8756-8760.
- Bäckman CM, Malik N, Zhang Y, Shan L, Grinberg A, Hoffer BJ, Westphal H und Tomac AC (2006). Characterization of a mouse strain expressing Cre recombinase from the 3' untranslated region of the dopamine transporter locus. *Genesis* 44, 383-390.
- Bähring R, Barghaan J, Westermeier R und Wollberg J (2012). Voltage sensor inactivation in potassium channels. *Front Pharmacol* 3, 100.
- Bähring R und Covarrubias M (2011). Mechanisms of closed-state inactivation in voltage-gated ion channels. *J Physiol* 589, 461-479.
- Bähring R, Dannenberg J, Peters HC, Leicher T, Pongs O und Isbrandt D (2001). Conserved Kv4 N-terminal domain critical for effects of Kv channel-interacting protein 2.2 on channel expression and gating. *The Journal of biological chemistry* 276, 23888-23894.
- Balcita-Pedicino JJ, Omelchenko N, Bell R und Sesack SR (2011). The inhibitory influence of the lateral habenula on midbrain dopamine cells: ultrastructural

- evidence for indirect mediation via the rostromedial mesopontine tegmental nucleus. *J Comp Neurol* 519, 1143-1164.
- Baranauskas G (2004). Cell-type-specific splicing of KChIP4 mRNA correlates with slower kinetics of A-type current. *Eur J Neurosci* 20, 385-391.
- Barghaan J und Bähring R (2009). Dynamic coupling of voltage sensor and gate involved in closed-state inactivation of kv4.2 channels. *J Gen Physiol* 133, 205-224.
- Barry PH (1994). JPCalc, a software package for calculating liquid junction potential corrections in patch-clamp, intracellular, epithelial and bilayer measurements and for correcting junction potential measurements. *J Neurosci Methods* 51, 107-116.
- Baukrowitz T und Yellen G (1995). Modulation of K<sup>+</sup> current by frequency and external [K<sup>+</sup>]: a tale of two inactivation mechanisms. *Neuron* 15, 951-960.
- Bayer HM und Glimcher PW (2005). Midbrain dopamine neurons encode a quantitative reward prediction error signal. *Neuron* 47, 129-141.
- Bayer HM, Lau B und Glimcher PW (2007). Statistics of midbrain dopamine neuron spike trains in the awake primate. *Journal of Neurophysiology* 98, 1428-1439.
- Bayer VE und Pickel VM (1990). Ultrastructural localization of tyrosine hydroxylase in the rat ventral tegmental area: relationship between immunolabeling density and neuronal associations. *J Neurosci* 10, 2996-3013.
- Beaulieu JM, Gainetdinov RR und Caron MG (2009). Akt/GSK3 signaling in the action of psychotropic drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49, 327-347.
- Beck EJ, Bowlby M, An WF, Rhodes KJ und Covarrubias M (2002). Remodelling inactivation gating of Kv4 channels by KChIP1, a small-molecular-weight calcium-binding protein. *J Physiol (Lond)* 538, 691-706.
- Beckstead MJ, Grandy DK, Wickman K und Williams JT (2004). Vesicular dopamine release elicits an inhibitory postsynaptic current in midbrain dopamine neurons. *Neuron* 42, 939-946.
- Beckstead MJ und Williams JT (2007). Long-term depression of a dopamine IPSC. *J Neurosci* 27, 2074-2080.
- Bekkers JM (2000). Properties of voltage-gated potassium currents in nucleated patches from large layer 5 cortical pyramidal neurons of the rat. *J Physiol* 525 Pt 3, 593-609.

- Berridge KC und Kringelbach ML (2008). Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals. *Psychopharmacology* 199, 457-480.
- Bezánilla F und Armstrong CM (1972). Negative conductance caused by entry of sodium and cesium ions into the potassium channels of squid axons. *J Gen Physiol* 60, 588-608.
- Birnbaum SG, Varga AW, Yuan L-L, Anderson AE, Sweatt JD und Schrader LA (2004). Structure and function of Kv4-family transient potassium channels. *Physiol Rev* 84, 803-833.
- Björklund A und Dunnett SB (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 30, 194-202.
- Bolam JP, Hanley JJ, Booth PA und Bevan MD (2000). Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat* 196 (Pt 4), 527-542.
- Bolam JP und Smith Y (1990). The GABA and substance P input to dopaminergic neurones in the substantia nigra of the rat. *Brain Res* 529, 57-78.
- Börklund A und Hökfelt T (1984). Handbook of chemical neuroanatomy: Classical transmitters in the CNS, part I (Elsevier).
- Bourdeau ML, Laplante I, Laurent CE und Lacaille J-C (2010). KChIP1 modulation of Kv4.3-mediated A-type K<sup>+</sup> currents and repetitive firing in hippocampal interneurons. *Neuroscience*.
- Brazhnik E, Shah F und Tepper JM (2008). GABAergic afferents activate both GABAA and GABAB receptors in mouse substantia nigra dopaminergic neurons in vivo. *J Neurosci* 28, 10386-10398.
- Brinschwitz K, Dittgen A, Madai VI, Lommel R, Geisler S und Veh RW (2010). Glutamatergic axons from the lateral habenula mainly terminate on GABAergic neurons of the ventral midbrain. *Neuroscience* 168, 463-476.
- Brischoux F, Chakraborty S, Brierley DI und Ungless MA (2009). Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 4894-4899.
- Bromberg-Martin ES, Matsumoto M und Hikosaka O (2010a). Distinct tonic and phasic anticipatory activity in lateral habenula and dopamine neurons. *Neuron* 67, 144-155.
- Bromberg-Martin ES, Matsumoto M und Hikosaka O (2010b). Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron* 68, 815-834.

- Brozoski TJ, Brown RM, Rosvold HE und Goldman PS (1979). Cognitive deficit caused by regional depletion of dopamine in prefrontal cortex of rhesus monkey. *Science* 205, 929-932.
- Bubser M und Schmidt WJ (1990). 6-Hydroxydopamine lesion of the rat prefrontal cortex increases locomotor activity, impairs acquisition of delayed alternation tasks, but does not affect uninterrupted tasks in the radial maze. *Behav Brain Res* 37, 157-168.
- Bunney BS, Walters JR, Roth RH und Aghajanian GK (1973). Dopaminergic neurons: effect of antipsychotic drugs and amphetamine on single cell activity. *J Pharmacol Exp Ther* 185, 560-571.
- Burgoyne RD (2007). Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca<sup>2+</sup> signalling. *Nat Rev Neurosci* 8, 182-193.
- Burgoyne RD und Weiss JL (2001). The neuronal calcium sensor family of Ca<sup>2+</sup>-binding proteins. *Biochem J* 353, 1-12.
- Butler A, Wei AG, Baker K und Salkoff L (1989). A family of putative potassium channel genes in *Drosophila*. *Science* 243, 943-947.
- Buxbaum JD, Choi EK, Luo Y, Lilliehook C, Crowley AC, Merriam DE und Wasco W (1998). Calsenilin: a calcium-binding protein that interacts with the presenilins and regulates the levels of a presenilin fragment. *Nat Med* 4, 1177-1181.
- Calabresi P, Saiardi A, Pisani A, Baik JH, Centonze D, Mercuri NB, Bernardi G und Borrelli E (1997). Abnormal synaptic plasticity in the striatum of mice lacking dopamine D2 receptors. *J Neurosci* 17, 4536-4544.
- Cameron DL und Williams JT (1993). Dopamine D1 receptors facilitate transmitter release. *Nature* 366, 344-347.
- Carboni E, Tanda GL, Frau R und Di Chiara G (1990). Blockade of the noradrenaline carrier increases extracellular dopamine concentrations in the prefrontal cortex: evidence that dopamine is taken up in vivo by noradrenergic terminals. *J Neurochem* 55, 1067-1070.
- Carlezon WA und Thomas MJ (2009). Biological substrates of reward and aversion: a nucleus accumbens activity hypothesis. *Neuropharmacology* 56 Suppl 1, 122-132.
- Carr DB und Sesack SR (2000a). GABA-containing neurons in the rat ventral tegmental area project to the prefrontal cortex. *Synapse* 38, 114-123.



- Carr DB und Sesack SR (2000b). Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. *J Neurosci* 20, 3864-3873.
- Carrasquillo Y, Burkhalter A und Nerbonne JM (2012). A-type K<sup>+</sup> channels encoded by Kv4.2, Kv4.3 and Kv1.4 differentially regulate intrinsic excitability of cortical pyramidal neurons. *The Journal of Physiology* 590, 3877-3890.
- Carrión AM, Link WA, Ledo F, Mellström B und Naranjo JR (1999). DREAM is a Ca<sup>2+</sup>-regulated transcriptional repressor. *Nature* 398, 80-84.
- Chan CS, Guzman JN, Ilijic E, Mercer JN, Rick C, Tkatch T, Meredith GE und Surmeier DJ (2007). 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature* 447, 1081-1086.
- Chen BT, Patel JC, Moran KA und Rice ME (2011). Differential calcium dependence of axonal versus somatodendritic dopamine release, with characteristics of both in the ventral tegmental area. *Front Syst Neurosci* 5, 39.
- Chergui K, Charlety PJ, Akaoka H, Saunier CF, Brunet JL, Buda M, Svensson TH und Chouvet G (1993). Tonic activation of NMDA receptors causes spontaneous burst discharge of rat midbrain dopamine neurons in vivo. *Eur J Neurosci* 5, 137-144.
- Chiodo LA, Bannon MJ, Grace AA, Roth RH und Bunney BS (1984). Evidence for the absence of impulse-regulating somatodendritic and synthesis-modulating nerve terminal autoreceptors on subpopulations of mesocortical dopamine neurons. *Neuroscience* 12, 1-16.
- Christoph GR, Leonzio RJ und Wilcox KS (1986). Stimulation of the lateral habenula inhibits dopamine-containing neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area of the rat. *J Neurosci* 6, 613-619.
- Cleemann L und Morad M (1979). Extracellular potassium accumulation in voltage-clamped frog ventricular muscle. *J Physiol* 286, 83-111.
- Cohen JY, Haesler S, Vong L, Lowell BB und Uchida N (2012). Neuron-type-specific signals for reward and punishment in the ventral tegmental area. *Nature* 482, 85-88.
- Cole KS (1968). *Membranes, Ions, and Impulses: A Chapter of Classical Biophysics* (University of California Press).
- Connor JA und Stevens CF (1971). Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata. *J Physiol (Lond)* 213, 21-30.

- Cornwall J, Cooper JD und Phillipson OT (1990). Afferent and efferent connections of the laterodorsal tegmental nucleus in the rat. *Brain Res Bull* 25, 271-284.
- Courtney NA, Mamaligas AA und Ford CP (2012). Species differences in somatodendritic dopamine transmission determine D2-autoreceptor-mediated inhibition of ventral tegmental area neuron firing. *J Neurosci* 32, 13520-13528.
- Covarrubias M, Bhattacharji A, De Santiago-Castillo JA, Dougherty K, Kaulin YA, Na-Phuket TR und Wang G (2008). The neuronal Kv4 channel complex. *Neurochem Res* 33, 1558-1567.
- Cragg S, Rice ME und Greenfield SA (1997). Heterogeneity of electrically evoked dopamine release and reuptake in substantia nigra, ventral tegmental area, and striatum. *J Neurophysiol* 77, 863-873.
- Cruz HG, Ivanova T, Lunn M-L, Stoffel M, Slesinger PA und Lüscher C (2004). Bi-directional effects of GABA(B) receptor agonists on the mesolimbic dopamine system. *Nat Neurosci* 7, 153-159.
- Cuello LG, Jogini V, Cortes DM, Pan AC, Gagnon DG, Dalmas O, Cordero-Morales JF, Chakrapani S, Roux B und Perozo E (2010). Structural basis for the coupling between activation and inactivation gates in K(+) channels. *Nature* 466, 272-275.
- Cui G, Jun SB, Jin X, Pham MD, Vogel SS, Lovinger DM und Costa RM (2013). Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature* 494, 238-242.
- Cui M, Aras R, Christian WV, Rappold PM, Hatwar M, Panza J, Jackson-Lewis V, Javitch JA, Ballatori N, Przedborski S, *et al.* (2009). The organic cation transporter-3 is a pivotal modulator of neurodegeneration in the nigrostriatal dopaminergic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 8043-8048.
- Dabrowska J und Rainnie DG (2010). Expression and distribution of Kv4 potassium channel subunits and potassium channel interacting proteins in subpopulations of interneurons in the basolateral amygdala. *Neuroscience* 171, 721-733.
- Dahlstroem A und Fuxe K (1964). Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand Suppl* 232:231-255.
- Daubner SC, Le T und Wang S (2011). Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 508, 1-12.

- Dauer W und Przedborski S (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39, 889-909.
- Decher N, Barth AS, Gonzalez T, Steinmeyer K und Sanguinetti MC (2004). Novel KChIP2 isoforms increase functional diversity of transient outward potassium currents. *J Physiol (Lond)* 557, 761-772.
- Ding JB, Guzman JN, Peterson JD, Goldberg JA und Surmeier DJ (2010). Thalamic gating of corticostriatal signaling by cholinergic interneurons. *Neuron* 67, 294-307.
- Dougherty K, De Santiago-Castillo JA und Covarrubias M (2008). Gating charge immobilization in Kv4.2 channels: the basis of closed-state inactivation. *J Gen Physiol* 131, 257-273.
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT und MacKinnon R (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* 280, 69-77.
- Dreyer JK, Herrik KF, Berg RW und Hounsgaard JD (2010). Influence of phasic and tonic dopamine release on receptor activation. *J Neurosci* 30, 14273-14283.
- Drion G, Massotte L, Sepulchre R und Seutin V (2011). How modeling can reconcile apparently discrepant experimental results: the case of pacemaking in dopaminergic neurons. *PLoS Comput Biol* 7, e1002050.
- Duan H und Wang J (2010). Selective transport of monoamine neurotransmitters by human plasma membrane monoamine transporter and organic cation transporter 3. *J Pharmacol Exp Ther* 335, 743-753.
- Duncan CE, Schofield PR und Weickert CS (2009). K(v) channel interacting protein 3 expression and regulation by haloperidol in midbrain dopaminergic neurons. *Brain Research* 1304, 1-13.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K und Tuschl T (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Engel K, Zhou M und Wang J (2004). Identification and characterization of a novel monoamine transporter in the human brain. *J Biol Chem* 279, 50042-50049.
- Eshleman AJ, Carmolli M, Cumbay M, Martens CR, Neve KA und 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.

- Falkenburger BH, Barstow KL und Mintz IM (2001). Dendrodendritic inhibition through reversal of dopamine transport. *Science* 293, 2465-2470.
- Fenwick EM, Marty A und Neher E (1982). A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *J Physiol* 331, 577-597.
- Fergus DJ, Martens JR und England SK (2003). Kv channel subunits that contribute to voltage-gated K<sup>+</sup> current in renal vascular smooth muscle. *Pflugers Arch* 445, 697-704.
- Fineberg JD, Ritter DM und Covarrubias M (2012). Modeling-independent elucidation of inactivation pathways in recombinant and native A-type Kv channels. *J Gen Physiol* 140, 513-527.
- Fiorillo CD (2013). Two dimensions of value: dopamine neurons represent reward but not aversiveness. *Science* 341, 546-549.
- Fiorillo CD, Song MR und Yun SR (2013a). Multiphasic temporal dynamics in responses of midbrain dopamine neurons to appetitive and aversive stimuli. *J Neurosci* 33, 4710-4725.
- Fiorillo CD und Williams JT (2000). Cholinergic inhibition of ventral midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* 20, 7855-7860.
- Fiorillo CD, Yun SR und Song MR (2013b). Diversity and homogeneity in responses of midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* 33, 4693-4709.
- Floresco SB (2013). Prefrontal dopamine and behavioral flexibility: shifting from an "inverted-U" toward a family of functions. *Front Neurosci* 7, 62.
- Floresco SB und Magyar O (2006). Mesocortical dopamine modulation of executive functions: beyond working memory. *Psychopharmacology* 188, 567-585.
- Foeger NC, Marionneau C und Nerbonne JM (2010). Co-Assembly of Kv4 {alpha} Subunits with K<sup>+</sup> Channel Interacting Protein 2 Stabilizes Protein Expression and Promotes Surface Retention of Channel Complexes. *The Journal of biological chemistry*.
- Foeger NC, Norris AJ, Wren LM und Nerbonne JM (2012). Augmentation of Kv4.2-encoded currents by accessory dipeptidyl peptidase 6 and 10 subunits reflects selective cell surface Kv4.2 protein stabilization. *J Biol Chem* 287, 9640-9650.
- Ford CP, Gantz SC, Phillips PEM und Williams JT (2010). Control of extracellular dopamine at dendrite and axon terminals. *J Neurosci* 30, 6975-6983.

- Ford CP, Mark GP und Williams JT (2006). Properties and opioid inhibition of mesolimbic dopamine neurons vary according to target location. *J Neurosci* 26, 2788-2797.
- Frank MJ (2005). Dynamic dopamine modulation in the basal ganglia: a neurocomputational account of cognitive deficits in medicated and nonmedicated Parkinsonism. *J Cogn Neurosci* 17, 51-72.
- Fujiyama F, Sohn J, Nakano T, Furuta T, Nakamura KC, Matsuda W und Kaneko T (2011). Exclusive and common targets of neostriatofugal projections of rat striosome neurons: a single neuron-tracing study using a viral vector. *Eur J Neurosci* 33, 668-677.
- Fuller RW und Steinberg M (1976). Regulation of enzymes that synthesize neurotransmitter monoamines. *Adv Enzyme Regul* 14, 347-390.
- Galvan A und Wichmann T (2008). Pathophysiology of parkinsonism. *Clin Neurophysiol* 119, 1459-1474.
- Gantz SC, Bunzow JR und Williams JT (2013). Spontaneous inhibitory synaptic currents mediated by a G protein-coupled receptor. *Neuron* 78, 807-812.
- Gariano RF und Groves PM (1988). Burst firing induced in midbrain dopamine neurons by stimulation of the medial prefrontal and anterior cingulate cortices. *Brain Res* 462, 194-198.
- Gariano RF, Sawyer SF, Tepper JM, Young SJ und Groves PM (1989a). Mesocortical dopaminergic neurons. 2. Electrophysiological consequences of terminal autoreceptor activation. *Brain Research Bulletin* 22, 517-523.
- Gariano RF, Tepper JM, Sawyer SF, Young SJ und Groves PM (1989b). Mesocortical dopaminergic neurons. 1. Electrophysiological properties and evidence for soma-dendritic autoreceptors. *Brain Research Bulletin* 22, 511-516.
- Gebauer M (2004). Untersuchung der Inaktivierung des humanen Kv4.2-Kanals und der Effekte von Kv-Kanal-interagierenden Proteinen (KChIPs). Dissertation, Universität Hamburg
- Gebauer M, Isbrandt D, Sauter K, Callsen B, Nolting A, Pongs O und Bähring R (2004). N-type inactivation features of Kv4.2 channel gating. *Biophysical Journal* 86, 210-223.
- Geffen LB, Jessell TM, Cuello AC und Iversen LL (1976). Release of dopamine from dendrites in rat substantia nigra. *Nature* 260, 258-260.
- Geisler S, Derst C, Veh RW und Zahm DS (2007). Glutamatergic afferents of the ventral tegmental area in the rat. *J Neurosci* 27, 5730-5743.

- Gentet LJ, Stuart GJ und Clements JD (2000). Direct Measurement of Specific Membrane Capacitance in Neurons. *Biophysical Journal* 79, 314-320.
- Gentet LJ und Williams SR (2007). Dopamine gates action potential backpropagation in midbrain dopaminergic neurons. *J Neurosci* 27, 1892-1901.
- Gerfen CR (1985). The neostriatal mosaic. I. Compartmental organization of projections from the striatum to the substantia nigra in the rat. *J Comp Neurol* 236, 454-476.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ und Sibley DR (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250, 1429-1432.
- Gerfen CR und Surmeier DJ (2011). Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu Rev Neurosci* 34, 441-466.
- Giros B, Wang YM, Suter S, McLeskey SB, Pifl C und Caron MG (1994). Delineation of discrete domains for substrate, cocaine, and tricyclic antidepressant interactions using chimeric dopamine-norepinephrine transporters. *J Biol Chem* 269, 15985-15988.
- Gonçalves L, Seigo C und Metzger M (2012). Differential projections from the lateral habenula to the rostromedial tegmental nucleus and ventral tegmental area in the rat. *J Comp Neurol* 520, 1278-1300.
- Gonon FG (1988). Nonlinear relationship between impulse flow and dopamine released by rat midbrain dopaminergic neurons as studied by in vivo electrochemistry. *Neuroscience* 24, 19-28.
- González-Hernández T, Afonso-Oramas D und Cruz-Muros I (2009). Phenotype, compartmental organization and differential vulnerability of nigral dopaminergic neurons. *J Neural Transm Suppl*, 21-37.
- Goto Y und Grace AA (2005). Dopaminergic modulation of limbic and cortical drive of nucleus accumbens in goal-directed behavior. *Nature Neuroscience* 8, 805-812.
- Grace AA und Bunney BS (1983a). Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--1. Identification and characterization. *Neuroscience* 10, 301-315.
- Grace AA und Bunney BS (1983b). Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--2. Action potential generating mechanisms and morphological correlates. *Neuroscience* 10, 317-331.

- Grace AA und Bunney BS (1984a). The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *J Neurosci* 4, 2877-2890.
- Grace AA und Bunney BS (1984b). The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *J Neurosci* 4, 2866-2876.
- Grace AA und Onn SP (1989). Morphology and electrophysiological properties of immunocytochemically identified rat dopamine neurons recorded in vitro. *J Neurosci* 9, 3463-3481.
- Granados-Fuentes D, Norris AJ, Carrasquillo Y, Nerbonne JM und Herzog ED (2012). I(A) channels encoded by Kv1.4 and Kv4.2 regulate neuronal firing in the suprachiasmatic nucleus and circadian rhythms in locomotor activity. *J Neurosci* 32, 10045-10052.
- Groves PM, Wilson CJ, Young SJ und Rebec GV (1975). Self-inhibition by dopaminergic neurons. *Science* 190, 522-528.
- Gruber C, Kahl A, Lebenheim L, Kowski A, Dittgen A und Veh RW (2007). Dopaminergic projections from the VTA substantially contribute to the mesohabenular pathway in the rat. *Neurosci Lett* 427, 165-170.
- Gu H, Wall SC und Rudnick G (1994). Stable expression of biogenic amine transporters reveals differences in inhibitor sensitivity, kinetics, and ion dependence. *J Biol Chem* 269, 7124-7130.
- Gulácsi A, Lee CR, Sík A, Viitanen T, Kaila K, Tepper JM und Freund TF (2003). Cell type-specific differences in chloride-regulatory mechanisms and GABA(A) receptor-mediated inhibition in rat substantia nigra. *J Neurosci* 23, 8237-8246.
- Guzman JN, Sánchez-Padilla J, Chan CS und Surmeier DJ (2009). Robust pacemaking in substantia nigra dopaminergic neurons. *J Neurosci* 29, 11011-11019.
- Hagiwara S, Kusano K und Saito N (1961). Membrane changes of Onchidium nerve cell in potassium-rich media. *J Physiol (Lond)* 155, 470-489.
- Hallett PJ, Spoelgen R, Hyman BT, Standaert DG und Dunah AW (2006). Dopamine D1 activation potentiates striatal NMDA receptors by tyrosine phosphorylation-dependent subunit trafficking. *J Neurosci* 26, 4690-4700.
- Hammond PI, Craig TA, Kumar R und Brimijoin S (2003). Regional and cellular distribution of DREAM in adult rat brain consistent with multiple sensory processing roles. *Brain Res Mol Brain Res* 111, 104-110.

- Harrison NL, Kugler JL, Jones MV, Greenblatt EP und Pritchett DB (1993). Positive modulation of human gamma-aminobutyric acid type A and glycine receptors by the inhalation anesthetic isoflurane. *Mol Pharmacol* 44, 628-632.
- Hausser M, Stuart G, Racca C und Sakmann B (1995). Axonal initiation and active dendritic propagation of action potentials in substantia nigra neurons. *Neuron* 15, 637-647.
- Heginbotham L, Lu Z, Abramson T und MacKinnon R (1994). Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence. *Biophysical Journal* 66, 1061-1067.
- Hille B (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes* (3rd Edition) (Sinauer Associates Inc.).
- Hoffman DA und Johnston D (1998). Downregulation of transient K<sup>+</sup> channels in dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons by activation of PKA and PKC. *J Neurosci* 18, 3521-3528.
- Hoffman DA, Magee JC, Colbert CM und Johnston D (1997). K<sup>+</sup> channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature* 387, 869-875.
- Hollerman JR und Schultz W (1998). Dopamine neurons report an error in the temporal prediction of reward during learning. *Nature Neuroscience* 1, 304-309.
- Holmqvist MH, Cao J, Hernandez-Pineda R, Jacobson MD, Carroll KI, Sung MA, Betty M, Ge P, Gilbride KJ, Brown ME, *et al.* (2002). Elimination of fast inactivation in Kv4 A-type potassium channels by an auxiliary subunit domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 1035-1040.
- Hong S und Hikosaka O (2008). The globus pallidus sends reward-related signals to the lateral habenula. *Neuron* 60, 720-729.
- Hong S und Hikosaka O (2013). Diverse sources of reward value signals in the basal ganglia nuclei transmitted to the lateral habenula in the monkey. *Front Hum Neurosci* 7, 778.
- Hong S, Zhou TC, Smith M, Saleem KS und Hikosaka O (2011). Negative reward signals from the lateral habenula to dopamine neurons are mediated by rostromedial tegmental nucleus in primates. *J Neurosci* 31, 11457-11471.
- Hoshi T, Zagotta WN und Aldrich RW (1990). Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* 250, 533-538.



- Hoshi T, Zagotta WN und Aldrich RW (1991). Two types of inactivation in Shaker K<sup>+</sup> channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron* 7, 547-556.
- Hu WH, Bi YF, Zhang K, Meng FG und Zhang JG (2011). High-frequency electrical stimulation in the nucleus accumbens of morphine-treated rats suppresses neuronal firing in reward-related brain regions. *Med Sci Monit* 17, BR153-160.
- Hyland BI, Reynolds JN, Hay J, Perk CG und Miller R (2002). Firing modes of midbrain dopamine cells in the freely moving rat. *Neuroscience* 114, 475-492.
- Ikemoto S (2007). Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res Rev* 56, 27-78.
- Ishiwa D, Nagata I, Ohtsuka T, Itoh H, Kamiya Y, Ogawa K, Sakai M, Sekino N, Yamada Y, Goto T, *et al.* (2008). Differential effects of isoflurane on A-type and delayed rectifier K channels in rat substantia nigra. *Eur J Pharmacol* 580, 122-129.
- Jensen MØ, Jogini V, Borhani DW, Leffler AE, Dror RO und Shaw DE (2012). Mechanism of voltage gating in potassium channels. *Science* 336, 229-233.
- Jerng HH und Covarrubias M (1997). K<sup>+</sup> channel inactivation mediated by the concerted action of the cytoplasmic N- and C-terminal domains. *Biophys J* 72, 163-174.
- Jerng HH, Dougherty K, Covarrubias M und Pfaffinger PJ (2009). A novel N-terminal motif of dipeptidyl peptidase-like proteins produces rapid inactivation of KV4.2 channels by a pore-blocking mechanism. *Channels (Austin)* 3, 448-461.
- Jerng HH, Kunjilwar K und Pfaffinger PJ (2005). Multiprotein assembly of Kv4.2, KChIP3 and DPP10 produces ternary channel complexes with ISA-like properties. *The Journal of Physiology* 568, 767-788.
- Jerng HH, Lauver AD und Pfaffinger PJ (2007). DPP10 splice variants are localized in distinct neuronal populations and act to differentially regulate the inactivation properties of Kv4-based ion channels. *Molecular and Cellular Neuroscience* 35, 604-624.
- Jerng HH und Pfaffinger PJ (2008). Multiple Kv channel-interacting proteins contain an N-terminal transmembrane domain that regulates Kv4 channel trafficking and gating. *J Biol Chem* 283, 36046-36059.

- Jerng HH und Pfaffinger PJ (2012). Incorporation of DPP6a and DPP6K variants in ternary Kv4 channel complex reconstitutes properties of A-type K current in rat cerebellar granule cells. *PLoS ONE* 7, e38205.
- Jerng HH, Pfaffinger PJ und Covarrubias M (2004a). Molecular physiology and modulation of somatodendritic A-type potassium channels. *Molecular and Cellular Neuroscience* 27, 343-369.
- Jerng HH, Qian Y und Pfaffinger PJ (2004b). Modulation of Kv4.2 channel expression and gating by dipeptidyl peptidase 10 (DPP10). *Biophysical Journal* 87, 2380-2396.
- Jerng HH, Shahidullah M und Covarrubias M (1999). Inactivation gating of Kv4 potassium channels: molecular interactions involving the inner vestibule of the pore. *J Gen Physiol* 113, 641-660.
- Jhou TC, Fields HL, Baxter MG, Saper CB und Holland PC (2009a). The rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to midbrain dopamine neurons, encodes aversive stimuli and inhibits motor responses. *Neuron* 61, 786-800.
- Jhou TC, Geisler S, Marinelli M, Degarmo BA und Zahm DS (2009b). The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: A structure targeted by the lateral habenula that projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta. *J Comp Neurol* 513, 566-596.
- Ji H und Shepard PD (2007). Lateral habenula stimulation inhibits rat midbrain dopamine neurons through a GABA(A) receptor-mediated mechanism. *J Neurosci* 27, 6923-6930.
- Jin X und Costa RM (2010). Start/stop signals emerge in nigrostriatal circuits during sequence learning. *Nature* 466, 457-462.
- Jinno S, Jeromin A und Kosaka T (2005). Postsynaptic and extrasynaptic localization of Kv4.2 channels in the mouse hippocampal region, with special reference to targeted clustering at gabaergic synapses. *Neuroscience* 134, 483-494.
- Jo YS, Lee J und Mizumori SJ (2013). Effects of prefrontal cortical inactivation on neural activity in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 33, 8159-8171.
- Johnson SW und North RA (1992). Two types of neurone in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs. *The Journal of Physiology* 450, 455-468.
- Kaenmaki M, Tammimaki A, Myohanen T, Pakarinen K, Amberg C, Karayiorgou M, Gogos JA und Mannisto PT (2010). Quantitative role of COMT in

- dopamine clearance in the prefrontal cortex of freely moving mice. *J Neurochem* 114, 1745-1755.
- Kamb A, Tseng-Crank J und Tanouye MA (1988). Multiple products of the *Drosophila* Shaker gene may contribute to potassium channel diversity. *Neuron* 1, 421-430.
- Kaufling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier M-J und Barrot M (2009). Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat. *J Comp Neurol* 513, 597-621.
- Kaufling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier M-J und Barrot M (2010). gamma-Aminobutyric acid cells with cocaine-induced DeltaFosB in the ventral tegmental area innervate mesolimbic neurons. *Biol Psychiatry* 67, 88-92.
- Kaulin YA, De Santiago-Castillo JA, Rocha CA und Covarrubias M (2008). Mechanism of the modulation of Kv4:KChIP-1 channels by external K<sup>+</sup>. *Biophysical Journal* 94, 1241-1251.
- Kellendonk C, Simpson EH, Polan HJ, Malleret G, Vronskaya S, Winiger V, Moore H und Kandel ER (2006). Transient and selective overexpression of dopamine D2 receptors in the striatum causes persistent abnormalities in prefrontal cortex functioning. *Neuron* 49, 603-615.
- Kesner RP, Bierley RA und Pebbles P (1981). Short-term memory: the role of d-amphetamine. *Pharmacol Biochem Behav* 15, 673-676.
- Khaliq ZM und Bean BP (2008). Dynamic, nonlinear feedback regulation of slow pacemaking by A-type potassium current in ventral tegmental area neurons. *J Neurosci* 28, 10905-10917.
- Khaliq ZM und Bean BP (2010). Pacemaking in dopaminergic ventral tegmental area neurons: depolarizing drive from background and voltage-dependent sodium conductances. *J Neurosci* 30, 7401-7413.
- Khanna R, Myers MP, Lainé M und Papazian DM (2001). Glycosylation increases potassium channel stability and surface expression in mammalian cells. *J Biol Chem* 276, 34028-34034.
- Kim J, Nadal MS, Clemens AM, Baron M, Jung S-C, Misumi Y, Rudy B und Hoffman DA (2008). Kv4 accessory protein DPPX (DPP6) is a critical regulator of membrane excitability in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Journal of Neurophysiology* 100, 1835-1847.
- Kim J, Wei D-S und Hoffman DA (2005). Kv4 potassium channel subunits control action potential repolarization and frequency-dependent broadening in rat

- hippocampal CA1 pyramidal neurones. *The Journal of Physiology* 569, 41-57.
- Kim KM, Baratta MV, Yang A, Lee D, Boyden ES und Fiorillo CD (2012). Optogenetic mimicry of the transient activation of dopamine neurons by natural reward is sufficient for operant reinforcement. *PLoS ONE* 7, e33612.
- Kin Y, Misumi Y und Ikehara Y (2001). Biosynthesis and characterization of the brain-specific membrane protein DPPX, a dipeptidyl peptidase IV-related protein. *J Biochem* 129, 289-295.
- Kitamura A, Marszalec W, Yeh JZ und Narahashi T (2003). Effects of halothane and propofol on excitatory and inhibitory synaptic transmission in rat cortical neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 304, 162-171.
- Klee R, Ficker E und Heinemann U (1995). Comparison of voltage-dependent potassium currents in rat pyramidal neurons acutely isolated from hippocampal regions CA1 and CA3. *J Neurophysiol* 74, 1982-1995.
- Koga E und Momiyama T (2000). Presynaptic dopamine D2-like receptors inhibit excitatory transmission onto rat ventral tegmental dopaminergic neurones. *J Physiol (Lond)* 523 Pt 1, 163-173.
- Koyama S und Appel SB (2006a). Characterization of M-current in ventral tegmental area dopamine neurons. *J Neurophysiol* 96, 535-543.
- Koyama S und Appel SB (2006b). A-type K<sup>+</sup> current of dopamine and GABA neurons in the ventral tegmental area. *J Neurophysiol* 96, 544-554.
- Krabbe S (2008). Die funktionelle Bedeutung von A-Typ Kaliumkanälen in retrograd identifizierten dopaminergen Neuronen des Mittelhirns der Maus. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg
- Krabbe S (2012). Elektrophysiologische in vivo und in vitro Eigenschaften von dopaminergen Mittelhirnneuronen im D2-Rezeptor-Überexpressionsmodell der Schizophrenie. Dissertation, Philipps-Universität Marburg
- Krabbe S, Lammel S, Liss B und Roeper J (2008). A-type potassium channels contribute to the functional diversity of the dopaminergic midbrain system. Paper presented at: Society for Neuroscience Annual Meeting (Washington, DC).
- Krasowski MD, Koltchine VV, Rick CE, Ye Q, Finn SE und Harrison NL (1998). Propofol and Other Intravenous Anesthetics Have Sites of Action on the gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Distinct from That for Isoflurane. *Molecular Pharmacology* 53, 530-538.

- Kravitz AV, Tye LD und Kreitzer AC (2012). Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. *Nature Neuroscience* 15, 816-818.
- Kunjilwar K, Qian Y und Pfaffinger PJ (2013). Functional stoichiometry underlying KChIP regulation of Kv4.2 functional expression. *J Neurochem*, n/a-n/a.
- Kuznetsova AY, Huertas MA, Kuznetsov AS, Paladini CA und Canavier CC (2010). Regulation of firing frequency in a computational model of a midbrain dopaminergic neuron. *J Comput Neurosci* 28, 389-403.
- Kyrozis A und Reichling DB (1995). Perforated-patch recording with gramicidin avoids artifactual changes in intracellular chloride concentration. *Journal of Neuroscience Methods* 57, 27-35.
- Lacey MG (1993). Neurotransmitter receptors and ionic conductances regulating the activity of neurones in substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area. *Prog Brain Res* 99, 251-276.
- Lacey MG, Mercuri NB und North RA (1988). On the potassium conductance increase activated by GABAB and dopamine D2 receptors in rat substantia nigra neurones. *The Journal of Physiology* 401, 437-453.
- Lacroix JJ, Campos FV, Frezza L und Bezanilla F (2013). Molecular bases for the asynchronous activation of sodium and potassium channels required for nerve impulse generation. *Neuron* 79, 651-657.
- Lammel S (2004). Expressionsanalyse der Kaliumkanal beta-Untereinheit KChIP4 in dopaminergen Mittelhirnneuronen. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Lammel S (2008). Identifikation eines dualen mesokortikolimbischen Dopaminsystems mit selektiven axonalen Projektionen in der adulten Maus (*Mus musculus* L.). Dissertation, Philipps-Universität Marburg
- Lammel S, Hetzel A, Häckel O, Jones I, Liss B und Roeper J (2008). Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. *Neuron* 57, 760-773.
- Lammel S, Ion DI, Roeper J und Malenka RC (2011). Projection-specific modulation of dopamine neuron synapses by aversive and rewarding stimuli. *Neuron* 70, 855-862.
- Lammel S, Lim BK, Ran C, Huang KW, Betley MJ, Tye KM, Deisseroth K und Malenka RC (2012). Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature* 491, 212-217.

- Liang P, Chen H, Cui Y, Lei L und Wang K (2010). Functional rescue of Kv4.3 channel tetramerization mutants by KChIP4a. *Biophys J* 98, 2867-2876.
- Lima SQ, Hromadka T, Znamenskiy P und Zador AM (2009). PINP: a new method of tagging neuronal populations for identification during in vivo electrophysiological recording. *PLoS ONE* 4, e6099.
- Lin L, Sun W, Kung F, Dell'Acqua ML und Hoffman DA (2011). AKAP79/150 impacts intrinsic excitability of hippocampal neurons through phosphoregulation of A-type K<sup>+</sup> channel trafficking. *J Neurosci* 31, 1323-1332.
- Lin L, Sun W, Wikenheiser AM, Kung F und Hoffman DA (2010). KChIP4a regulates Kv4.2 channel trafficking through PKA phosphorylation. *Mol Cell Neurosci* 43, 315-325.
- Liss B, An WF und Roeper J (2002). Differential co-expression of KChIP-subunits defines inactivation kinetics of A-type potassium channels in dopaminergic VTA neurons. In Society for Neuroscience Meeting (Orlando, FL, Society for Neuroscience).
- Liss B, Bruns R und Roeper J (1999). Alternative sulfonylurea receptor expression defines metabolic sensitivity of K-ATP channels in dopaminergic midbrain neurons. *EMBO J* 18, 833-846.
- Liss B, Franz O, Sewing S, Bruns R, Neuhoff H und Roeper J (2001). Tuning pacemaker frequency of individual dopaminergic neurons by Kv4.3L and KChip3.1 transcription. *EMBO J* 20, 5715-5724.
- Liss B, Haeckel O, Wildmann J, Miki T, Seino S und Roeper J (2005). K-ATP channels promote the differential degeneration of dopaminergic midbrain neurons. *Nature Neuroscience* 8, 1742-1751.
- Liss B und Roeper J (2004). Correlating function and gene expression of individual basal ganglia neurons. *Trends Neurosci* 27, 475-481.
- Liss B und Roeper J (2008). Individual dopamine midbrain neurons: functional diversity and flexibility in health and disease. *Brain Res Rev* 58, 314-321.
- Lobb CJ, Troyer TW, Wilson CJ und Paladini CA (2011a). Disinhibition bursting of dopaminergic neurons. *Front Syst Neurosci* 5, 25.
- Lobb CJ, Wilson CJ und Paladini CA (2010). A dynamic role for GABA receptors on the firing pattern of midbrain dopaminergic neurons. *Journal of Neurophysiology* 104, 403-413.
- Lobb CJ, Wilson CJ und Paladini CA (2011b). High-frequency, short-latency disinhibition bursting of midbrain dopaminergic neurons. *Journal of Neurophysiology* 105, 2501-2511.

- Long SB, Campbell EB und Mackinnon R (2005). Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* 309, 903-908.
- Lu B, Su Y, Das S, Wang H, Wang Y, Liu J und Ren D (2009). Peptide neurotransmitters activate a cation channel complex of NALCN and UNC-80. *Nature* 457, 741-744.
- Maeda H und Mogenson GJ (1980). An electrophysiological study of inputs to neurons of the ventral tegmental area from the nucleus accumbens and medial preoptic-anterior hypothalamic areas. *Brain Res* 197, 365-377.
- Maffie J und Rudy B (2008). Weighing the evidence for a ternary protein complex mediating A-type K<sup>+</sup> currents in neurons. *J Physiol (Lond)* 586, 5609-5623.
- Mansvelder HD, Keath JR und McGehee DS (2002). Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas. *Neuron* 33, 905-919.
- Margolis EB, Lock H, Hjelmstad GO und Fields HL (2006). The ventral tegmental area revisited: is there an electrophysiological marker for dopaminergic neurons? *J Physiol (Lond)* 577, 907-924.
- Margolis EB, Mitchell JM, Ishikawa J, Hjelmstad GO und Fields HL (2008). Midbrain dopamine neurons: projection target determines action potential duration and dopamine D(2) receptor inhibition. *Journal of Neuroscience* 28, 8908-8913.
- Marionneau C, Townsend RR und Nerbonne JM (2010). Proteomic analysis highlights the molecular complexities of native Kv4 channel macromolecular complexes. *Semin Cell Dev Biol*.
- Martina M, Schultz JH, Ehmke H, Monyer H und Jonas P (1998). Functional and molecular differences between voltage-gated K<sup>+</sup> channels of fast-spiking interneurons and pyramidal neurons of rat hippocampus. *J Neurosci* 18, 8111-8125.
- Matsuda W, Furuta T, Nakamura KC, Hioki H, Fujiyama F, Arai R und Kaneko T (2009). Single nigrostriatal dopaminergic neurons form widely spread and highly dense axonal arborizations in the neostriatum. *J Neurosci* 29, 444-453.
- Matsumoto M und Hikosaka O (2007). Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature* 447, 1111-1115.
- Matsumoto M und Hikosaka O (2009). Two types of dopamine neuron distinctly convey positive and negative motivational signals. *Nature* 459, 837-841.

- McAllister RE und Noble D (1966). The time and voltage dependence of the slow outward current in cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 186, 632-662.
- McCormack K, Tanouye MA, Iverson LE, Lin JW, Ramaswami M, McCormack T, Campanelli JT, Mathew MK und Rudy B (1991). A role for hydrophobic residues in the voltage-dependent gating of Shaker K<sup>+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2931-2935.
- McCutcheon JE, Ebner SR, Loriaux AL und Roitman MF (2012). Encoding of aversion by dopamine and the nucleus accumbens. *Front Neurosci* 6, 137.
- McGahon MK, Dawicki JM, Arora A, Simpson DA, Gardiner TA, Stitt AW, Scholfield CN, McGeown JG und Curtis TM (2007). Kv1.5 is a major component underlying the A-type potassium current in retinal arteriolar smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292, H1001-1008.
- Melnick IV (2011). A-type K<sup>+</sup> current dominates somatic excitability of delayed firing neurons in rat substantia gelatinosa. *Synapse* 65, 601-607.
- Mena-Segovia J, Winn P und Bolam JP (2008). Cholinergic modulation of midbrain dopaminergic systems. *Brain Res Rev* 58, 265-271.
- Mendez JA, Bourque MJ, Fasano C, Kortleven C und Trudeau LE (2011). Somatodendritic dopamine release requires synaptotagmin 4 and 7 and the participation of voltage-gated calcium channels. *J Biol Chem* 286, 23928-23937.
- Mercuri NB, Bonci A, Calabresi P, Stratta F, Stefani A und Bernardi G (1994). Effects of dihydropyridine calcium antagonists on rat midbrain dopaminergic neurones. *Br J Pharmacol* 113, 831-838.
- Mileykovskiy B und Morales M (2011). Duration of inhibition of ventral tegmental area dopamine neurons encodes a level of conditioned fear. *J Neurosci* 31, 7471-7476.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M und Caron MG (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78, 189-225.
- Molleman A (2003). Patch clamping: an introductory guide to patch clamp electrophysiology. 175.
- Morais-Cabral JH, Zhou Y und MacKinnon R (2001). Energetic optimization of ion conduction rate by the K<sup>+</sup> selectivity filter. *Nature* 414, 37-42.
- Morikawa H und Paladini CA (2011). Dynamic regulation of midbrain dopamine neuron activity: intrinsic, synaptic, and plasticity mechanisms. *Neuroscience* 198, 95-111.



- Morohashi Y, Hatano N, Ohya S, Takikawa R, Watabiki T, Takasugi N, Imaizumi Y, Tomita T und Iwatsubo T (2002). Molecular cloning and characterization of CALP/KChIP4, a novel EF-hand protein interacting with presenilin 2 and voltage-gated potassium channel subunit Kv4. *The Journal of biological chemistry* 277, 14965-14975.
- Murase S, Grenhoff J, Chouvet G, Gonon FG und Svensson TH (1993). Prefrontal cortex regulates burst firing and transmitter release in rat mesolimbic dopamine neurons studied in vivo. *Neurosci Lett* 157, 53-56.
- Murphy BL, Arnsten AF, Goldman-Rakic PS und Roth RH (1996). Increased dopamine turnover in the prefrontal cortex impairs spatial working memory performance in rats and monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 1325-1329.
- Nadal MS, Amarillo Y, Vega-Saenz de Miera E und Rudy B (2006). Differential characterization of three alternative spliced isoforms of DPPX. *Brain Res* 1094, 1-12.
- Nadal MS, Ozaita A, Amarillo Y, Vega-Saenz de Miera E, Ma Y, Mo W, Goldberg EM, Misumi Y, Ikehara Y, Neubert TA, *et al.* (2003). The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type K<sup>+</sup> channels. *Neuron* 37, 449-461.
- Nakamura TY, Coetzee WA, Vega-Saenz de Miera E, Artman M und Rudy B (1997). Modulation of Kv4 channels, key components of rat ventricular transient outward K<sup>+</sup> current, by PKC. *Am J Physiol* 273, H1775-1786.
- Nedergaard S (1999). Regulation of action potential size and excitability in substantia nigra compacta neurons: sensitivity to 4-aminopyridine. *Journal of Neurophysiology* 82, 2903-2913.
- Nedergaard S, Flatman JA und Engberg I (1993). Nifedipine- and omega-conotoxin-sensitive Ca<sup>2+</sup> conductances in guinea-pig substantia nigra pars compacta neurones. *J Physiol (Lond)* 466, 727-747.
- Neher E (1992). Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. In *Methods in Enzymology*, R Bernardo, ed. (Academic Press), pp. 123-131.
- Neher E und Sakmann B (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260, 799-802.
- Nestor MW und Hoffman DA (2012). Differential cycling rates of Kv4.2 channels in proximal and distal dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Hippocampus* 22, 969-980.

- Neuhoff H, Neu A, Liss B und Roeper J (2002). I(h) channels contribute to the different functional properties of identified dopaminergic subpopulations in the midbrain. *J Neurosci* 22, 1290-1302.
- Neve KA, Seamans JK und Trantham-Davidson H (2004). Dopamine receptor signaling. *J Recept Sig Trans* 24, 165-205.
- Nichols CG (2006). KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* 440, 470-476.
- Nirenberg MJ, Chan J, Liu Y, Edwards RH und Pickel VM (1996). Ultrastructural localization of the vesicular monoamine transporter-2 in midbrain dopaminergic neurons: potential sites for somatodendritic storage and release of dopamine. *J Neurosci* 16, 4135-4145.
- Nirenberg MJ, Chan J, Vaughan RA, Uhl GR, Kuhar MJ und Pickel VM (1997). Immunogold localization of the dopamine transporter: an ultrastructural study of the rat ventral tegmental area. *J Neurosci* 17, 5255-5262.
- Norris AJ, Foeger NC und Nerbonne JM (2010). Interdependent Roles for Accessory KChIP2, KChIP3, and KChIP4 Subunits in the Generation of Kv4-Encoded IA Channels in Cortical Pyramidal Neurons. *J Neurosci* 30, 13644-13655.
- Noskov SY, Berneche S und Roux B (2004). Control of ion selectivity in potassium channels by electrostatic and dynamic properties of carbonyl ligands. *Nature* 431, 830-834.
- Noskov SY und Roux B (2006). Ion selectivity in potassium channels. *Biophys Chem* 124, 279-291.
- Noskov SY und Roux B (2007). Importance of hydration and dynamics on the selectivity of the KcsA and NaK channels. *J Gen Physiol* 129, 135-143.
- Ogden D und Stanfield P (1994). Chapter 4 - Patch clamp techniques for single channel and whole-cell recordings. In *Microelectrode Techniques: The Plymouth Workshop Handbook*, D Ogden, ed. (Company of Biologists), pp. 1-26.
- Omelchenko N, Bell R und Sesack SR (2009). Lateral habenula projections to dopamine and GABA neurons in the rat ventral tegmental area. *Eur J Neurosci* 30, 1239-1250.
- Omelchenko N und Sesack SR (2005). Laterodorsal tegmental projections to identified cell populations in the rat ventral tegmental area. *J Comp Neurol* 483, 217-235.

- Omelchenko N und Sesack SR (2006). Cholinergic axons in the rat ventral tegmental area synapse preferentially onto mesoaccumbens dopamine neurons. *J Comp Neurol* 494, 863-875.
- Opazo F, Schulz JB und Falkenburger BH (2010). PKC links Gq-coupled receptors to DAT-mediated dopamine release. *J Neurochem* 114, 587-596.
- Otis TS, De Koninck Y und Mody I (1993). Characterization of synaptically elicited GABAB responses using patch-clamp recordings in rat hippocampal slices. *The Journal of Physiology* 463, 391-407.
- Overton P und Clark D (1992). Iontophoretically administered drugs acting at the N-methyl-D-aspartate receptor modulate burst firing in A9 dopamine neurons in the rat. *Synapse* 10, 131-140.
- Overton PG und Clark D (1997). Burst firing in midbrain dopaminergic neurons. *Brain Res Brain Res Rev* 25, 312-334.
- Paladini CA und Tepper JM (1999). GABA(A) and GABA(B) antagonists differentially affect the firing pattern of substantia nigra dopaminergic neurons in vivo. *Synapse* 32, 165-176.
- Paladini CA und Williams JT (2004). Noradrenergic inhibition of midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* 24, 4568-4575.
- Pan WX und Hyland BI (2005). Pedunculopontine tegmental nucleus controls conditioned responses of midbrain dopamine neurons in behaving rats. *J Neurosci* 25, 4725-4732.
- Papazian DM, Schwarz TL, Tempel BL, Jan YN und Jan LY (1987). Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* 237, 749-753.
- Paxinos G und Franklin KBJ (2007). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 3rd edn (Academic Press).
- Penington NJ und Tuckwell HC (2012). Properties of I(A) in a neuron of the dorsal raphe nucleus. *Brain Res* 1449, 60-68.
- Perrotti LI, Bolaños CA, Choi K-H, Russo SJ, Edwards S, Ulery PG, Wallace DL, Self DW, Nestler EJ und Barrot M (2005). DeltaFosB accumulates in a GABAergic cell population in the posterior tail of the ventral tegmental area after psychostimulant treatment. *Eur J Neurosci* 21, 2817-2824.
- Pioletti M, Findeisen F, Hura GL und Minor DL (2006). Three-dimensional structure of the KChIP1-Kv4.3 T1 complex reveals a cross-shaped octamer. *Nat Struct Mol Biol* 13, 987-995.

- Pongs O, Kecskemethy N, Muller R, Krah-Jentgens I, Baumann A, Kiltz HH, Canal I, Llamazares S und Ferrus A (1988). Shaker encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of *Drosophila*. *EMBO J* 7, 1087-1096.
- Prinz A, Selesnew L-M, Liss B, Roeper J und Carlsson T (2013). Increased excitability in serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus in the 6-OHDA mouse model of Parkinson's disease. *Experimental Neurology* 248C, 236-245.
- Puopolo M, Raviola E und Bean BP (2007). Roles of subthreshold calcium current and sodium current in spontaneous firing of mouse midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* 27, 645-656.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia A-S, McNamara JO und Williams SM (2004). *Neuroscience*, 3rd edn (Sinauer Associates).
- Putzier I, Kullmann PHM, Horn JP und Levitan ES (2009). Dopamine neuron responses depend exponentially on pacemaker interval. *Journal of Neurophysiology* 101, 926-933.
- Qi SY, Riviere PJ, Trojnar J, Junien J-L und Akinsanya KO (2003). Cloning and characterization of dipeptidyl peptidase 10, a new member of an emerging subgroup of serine proteases. *Biochem J* 373, 179-189.
- Radicke S, Riedel T, Cotella D, Turnow K, Ravens U, Schaefer M und Wettwer E (2013). Accessory subunits alter the temperature sensitivity of Kv4.3 channel complexes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 56, 8-18.
- Ren X, Hayashi Y, Yoshimura N und Takimoto K (2005). Transmembrane interaction mediates complex formation between peptidase homologues and Kv4 channels. *Molecular and Cellular Neuroscience* 29, 320-332.
- Rice ME, Cragg SJ und Greenfield SA (1997). Characteristics of electrically evoked somatodendritic dopamine release in substantia nigra and ventral tegmental area in vitro. *J Neurophysiol* 77, 853-862.
- Rice ME, Patel JC und Cragg SJ (2011). Dopamine release in the basal ganglia. *Neuroscience* 198, 112-137.
- Richfield EK, Penney JB und Young AB (1989). Anatomical and affinity state comparisons between dopamine D1 and D2 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 30, 767-777.
- Roeper J (2013). Dissecting the diversity of midbrain dopamine neurons. *Trends Neurosci* 36, 336-342.

- Roitman MF, Wheeler RA und Carelli RM (2005). Nucleus Accumbens Neurons Are Innately Tuned for Rewarding and Aversive Taste Stimuli, Encode Their Predictors, and Are Linked to Motor Output. *Neuron* 45, 587-597.
- Roitman MF, Wheeler RA, Tiesinga PHE, Roitman JD und Carelli RM (2010). Hedonic and nucleus accumbens neural responses to a natural reward are regulated by aversive conditioning. *Learning & Memory* 17, 539-546.
- Ruppersberg JP, Frank R, Pongs O und Stocker M (1991). Cloned neuronal IK(A) channels reopen during recovery from inactivation. *Nature* 353, 657-660.
- Ruscheweyh R und Sandkühler J (2002). Lamina-specific membrane and discharge properties of rat spinal dorsal horn neurones in vitro. *The Journal of Physiology* 541, 231-244.
- Sacco T und Tempia F (2002). A-Type potassium currents active at subthreshold potentials in mouse cerebellar purkinje cells. *The Journal of Physiology* 543, 505-520.
- Sah P, Gibb AJ und Gage PW (1988). Potassium current activated by depolarization of dissociated neurons from adult guinea pig hippocampus. *J Gen Physiol* 92, 263-278.
- Saitoh K, Isa T und Takakusaki K (2004). Nigral GABAergic inhibition upon mesencephalic dopaminergic cell groups in rats. *Eur J Neurosci* 19, 2399-2409.
- Salamone JD (2007). Functions of mesolimbic dopamine: changing concepts and shifting paradigms. *Psychopharmacology* 191, 389.
- Sather W, Dieudonné S, MacDonald JF und Ascher P (1992). Activation and desensitization of N-methyl-D-aspartate receptors in nucleated outside-out patches from mouse neurones. *The Journal of Physiology* 450, 643-672.
- Sawaguchi T und Goldman-Rakic PS (1991). D1 dopamine receptors in prefrontal cortex: involvement in working memory. *Science* 251, 947-950.
- Scannevin RH, Wang K, Jow F, Megules J, Kopsco DC, Edris W, Carroll KC, Lü Q, Xu W, Xu Z, *et al.* (2004). Two N-terminal domains of Kv4 K(+) channels regulate binding to and modulation by KChIP1. *Neuron* 41, 587-598.
- Schiemann J (2012). An exciting in vivo function of ATP-sensitive potassium channels in substantia nigra dopamine neurons - Implications for burst firing and novelty coding. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt

- Schiemann J, Schlaudraff F, Klose V, Bingmer M, Seino S, Magill PJ, Zaghoul KA, Schneider G, Liss B und Roeper J (2012). K-ATP channels in dopamine substantia nigra neurons control bursting and novelty-induced exploration. *Nature Neuroscience* 15, 1272-1280.
- Schrader LA, Anderson AE, Mayne A, Pfaffinger PJ und Sweatt JD (2002). PKA modulation of Kv4.2-encoded A-type potassium channels requires formation of a supramolecular complex. *J Neurosci* 22, 10123-10133.
- Schultz W (1986). Responses of midbrain dopamine neurons to behavioral trigger stimuli in the monkey. *Journal of Neurophysiology* 56, 1439-1461.
- Schultz W (1998). Predictive reward signal of dopamine neurons. *Journal of Neurophysiology* 80, 1-27.
- Schultz W, Apicella P und Ljungberg T (1993). Responses of monkey dopamine neurons to reward and conditioned stimuli during successive steps of learning a delayed response task. *J Neurosci* 13, 900-913.
- Schultz W, Dayan P und Montague PR (1997). A neural substrate of prediction and reward. *Science* 275, 1593-1599.
- Schwenk J, Zolles G, Kandias NG, Neubauer I, Kalbacher H, Covarrubias M, Fakler B und Bentrop D (2008). NMR analysis of KChIP4a reveals structural basis for control of surface expression of Kv4 channel complexes. *The Journal of biological chemistry* 283, 18937-18946.
- Sesack SR und Grace AA (2010). Cortico-Basal Ganglia reward network: microcircuitry. *Neuropsychopharmacology* 35, 27-47.
- Sesack SR, Hawrylak VA, Matus C, Guido MA und Levey AI (1998). Dopamine axon varicosities in the prelimbic division of the rat prefrontal cortex exhibit sparse immunoreactivity for the dopamine transporter. *J Neurosci* 18, 2697-2708.
- Sesack SR und Pickel VM (1992). Prefrontal cortical efferents in the rat synapse on unlabeled neuronal targets of catecholamine terminals in the nucleus accumbens septi and on dopamine neurons in the ventral tegmental area. *J Comp Neurol* 320, 145-160.
- Sesia T, Bizup B und Grace AA (2013). Nucleus accumbens high-frequency stimulation selectively impacts nigrostriatal dopaminergic neurons. *Int J Neuropsychopharmacol*, 1-7.
- Shen HW, Hagino Y, Kobayashi H, Shinohara-Tanaka K, Ikeda K, Yamamoto H, Yamamoto T, Lesch KP, Murphy DL, Hall FS, *et al.* (2004). Regional differences in extracellular dopamine and serotonin assessed by in vivo

- microdialysis in mice lacking dopamine and/or serotonin transporters. *Neuropsychopharmacology* 29, 1790-1799.
- Shepard PD und German DC (1984). A subpopulation of mesocortical dopamine neurons possesses autoreceptors. *European Journal of Pharmacology* 98, 455-456.
- Shi W-X (2009). Electrophysiological characteristics of dopamine neurons: a 35-year update. *J Neural Transm Suppl*, 103-119.
- Shibata R, Misonou H, Campomanes CR, Anderson AE, Schrader LA, Doliveira LC, Carroll KI, Sweatt JD, Rhodes KJ und Trimmer JS (2003). A fundamental role for KChIPs in determining the molecular properties and trafficking of Kv4.2 potassium channels. *J Biol Chem* 278, 36445-36454.
- Shibata R, Nakahira K, Shibasaki K, Wakazono Y, Imoto K und Ikenaka K (2000). A-type K<sup>+</sup> current mediated by the Kv4 channel regulates the generation of action potential in developing cerebellar granule cells. *J Neurosci* 20, 4145-4155.
- Shin KS, Maertens C, Proenza C, Rothberg BS und Yellen G (2004). Inactivation in HCN channels results from reclosure of the activation gate: desensitization to voltage. *Neuron* 41, 737-744.
- Silva NL, Pechura CM und Barker JL (1990). Postnatal rat nigrostriatal dopaminergic neurons exhibit five types of potassium conductances. *J Neurophysiol* 64, 262-272.
- Smith ID und Grace AA (1992). Role of the subthalamic nucleus in the regulation of nigral dopamine neuron activity. *Synapse* 12, 287-303.
- Snyder GL, Allen PB, Fienberg AA, Valle CG, Haganir RL, Nairn AC und Greengard P (2000). Regulation of phosphorylation of the GluR1 AMPA receptor in the neostriatum by dopamine and psychostimulants in vivo. *J Neurosci* 20, 4480-4488.
- Soh H und Goldstein SAN (2008). I SA channel complexes include four subunits each of DPP6 and Kv4.2. *J Biol Chem* 283, 15072-15077.
- Stamatakis AM, Jennings JH, Ung RL, Blair GA, Weinberg RJ, Neve RL, Boyce F, Mattis J, Ramakrishnan C, Deisseroth K, *et al.* (2013). A unique population of ventral tegmental area neurons inhibits the lateral habenula to promote reward. *Neuron* 80, 1039-1053.
- Stamatakis AM und Stuber GD (2012). Activation of lateral habenula inputs to the ventral midbrain promotes behavioral avoidance. *Nature Neuroscience* 15, 1105-1107.

- Starkus JG, Kuschel L, Rayner MD und Heinemann SH (1997). Ion conduction through C-type inactivated Shaker channels. *J Gen Physiol* *110*, 539-550.
- Steinberg EE, Keiflin R, Boivin JR, Witten IB, Deisseroth K und Janak PH (2013). A causal link between prediction errors, dopamine neurons and learning. *Nature Neuroscience* *16*, 966-973.
- Strop P, Bankovich AJ, Hansen KC, Garcia KC und Brunger AT (2004). Structure of a human A-type potassium channel interacting protein DPPX, a member of the dipeptidyl aminopeptidase family. *J Mol Biol* *343*, 1055-1065.
- Sun W, Maffie JK, Lin L, Petralia RS, Rudy B und Hoffman DA (2011). DPP6 establishes the A-type K(+) current gradient critical for the regulation of dendritic excitability in CA1 hippocampal neurons. *Neuron* *71*, 1102-1115.
- Surmeier DJ (2007). Dopamine and working memory mechanisms in prefrontal cortex. *The Journal of Physiology* *581*, 885.
- Surmeier DJ, Carrillo-Reid L und Bargas J (2011). Dopaminergic modulation of striatal neurons, circuits, and assemblies. *Neuroscience* *198*, 3-18.
- Sykova E, Shirayev B, Kriz N und Vyklicky L (1976). Accumulation of extracellular potassium in the spinal cord of frog. *Brain Res* *106*, 413-417.
- Takahashi YK, Roesch MR, Wilson RC, Toreson K, O'Donnell P, Niv Y und Schoenbaum G (2011). Expectancy-related changes in firing of dopamine neurons depend on orbitofrontal cortex. *Nat Neurosci* *14*, 1590-1597.
- Takeda H, Inazu M und Matsumiya T (2002). Astroglial dopamine transport is mediated by norepinephrine transporter. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* *366*, 620-623.
- Takimoto K, Yang E-K und Conforti L (2002). Palmitoylation of KChIP splicing variants is required for efficient cell surface expression of Kv4.3 channels. *J Biol Chem* *277*, 26904-26911.
- Tan KR, Yvon C, Turiault M, Mirzabekov JJ, Doehner J, Labouèbe G, Deisseroth K, Tye KM und Lüscher C (2012). GABA neurons of the VTA drive conditioned place aversion. *Neuron* *73*, 1173-1183.
- Tang Y-Q, Liang P, Zhou J, Lu Y, Lei L, Bian X und Wang K (2013). Auxiliary KChIP4a suppresses A-type K<sup>+</sup> current through endoplasmic reticulum (ER) retention and promoting closed-state inactivation of Kv4 channels. *The Journal of biological chemistry* *288*, 14727-14741.
- Tepper JM, Martin LP und Anderson DR (1995). GABAA receptor-mediated inhibition of rat substantia nigra dopaminergic neurons by pars reticulata projection neurons. *J Neurosci* *15*, 3092-3103.



- Thomsen MB, Foster E, Nguyen KH und Sosunov EA (2009a). Transcriptional and electrophysiological consequences of KChIP2-mediated regulation of CaV1.2. *Channels (Austin)* 3, 308-310.
- Thomsen MB, Sosunov EA, Anyukhovskiy EP, Ozgen N, Boyden PA und Rosen MR (2009b). Deleting the accessory subunit KChIP2 results in loss of I(to,f) and increased I(K,slow) that maintains normal action potential configuration. *Heart Rhythm* 6, 370-377.
- Thomsen MB, Wang C, Ozgen N, Wang HG, Rosen MR und Pitt GS (2009c). Accessory subunit KChIP2 modulates the cardiac L-type calcium current. *Circ Res* 104, 1382-1389.
- Threlfell S, Lalic T, Platt NJ, Jennings KA, Deisseroth K und Cragg SJ (2012). Striatal dopamine release is triggered by synchronized activity in cholinergic interneurons. *Neuron* 75, 58-64.
- Tkatch T, Baranauskas G und Surmeier DJ (2000). Kv4.2 mRNA abundance and A-type K(+) current amplitude are linearly related in basal ganglia and basal forebrain neurons. *J Neurosci* 20, 579-588.
- Tobler PN, Dickinson A und Schultz W (2003). Coding of predicted reward omission by dopamine neurons in a conditioned inhibition paradigm. *J Neurosci* 23, 10402-10410.
- Tobler PN, Fiorillo CD und Schultz W (2005). Adaptive coding of reward value by dopamine neurons. *Science* 307, 1642-1645.
- Tombola F, Pathak MM und Isacoff EY (2006). How does voltage open an ion channel? *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 23-52.
- Tritsch NX, Ding JB und Sabatini BL (2012). Dopaminergic neurons inhibit striatal output through non-canonical release of GABA. *Nature* 490, 262-266.
- Tsai H-C, Zhang F, Adamantidis A, Stuber GD, Bonci A, de Lecea L und Deisseroth K (2009). Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. *Science* 324, 1080-1084.
- Tye KM und Deisseroth K (2012). Optogenetic investigation of neural circuits underlying brain disease in animal models. *Nat Rev Neurosci* 13, 251-266.
- Ungless MA und Grace AA (2012). Are you or aren't you? Challenges associated with physiologically identifying dopamine neurons. *Trends Neurosci* 35, 422-430.
- Vallone D, Picetti R und Borrelli E (2000). Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev* 24, 125-132.

- Van Hoorick D, Raes A, Keyzers W, Mayeur E und Snyder DJ (2003). Differential modulation of Kv4 kinetics by KCHIP1 splice variants. *Mol Cell Neurosci* 24, 357-366.
- Varga AW, Yuan L-L, Anderson AE, Schrader LA, Wu G-Y, Gatchel JR, Johnston D und Sweatt JD (2004). Calcium-calmodulin-dependent kinase II modulates Kv4.2 channel expression and upregulates neuronal A-type potassium currents. *J Neurosci* 24, 3643-3654.
- Vertes RP (1991). A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 313, 643-668.
- Villalba-Galea CA, Sandtner W, Starace DM und Bezanilla F (2008). S4-based voltage sensors have three major conformations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 17600-17607.
- Wang DV und Tsien JZ (2011). Convergent processing of both positive and negative motivational signals by the VTA dopamine neuronal populations. *PLoS ONE* 6, e17047.
- Wang H, Yan Y, Liu Q, Huang Y, Shen Y, Chen L, Chen Y, Yang Q, Hao Q, Wang K, *et al.* (2007). Structural basis for modulation of Kv4 K<sup>+</sup> channels by auxiliary KCHIP subunits. *Nature Neuroscience* 10, 32-39.
- Wang H-G, He XP, Li Q, Madison RD, Moore SD, McNamara JO und Pitt GS (2013). The auxiliary subunit KCHIP2 is an essential regulator of homeostatic excitability. *J Biol Chem* 288, 13258-13268.
- Wang Y, Strahlendorf JC und Strahlendorf HK (1991). A transient voltage-dependent outward potassium current in mammalian cerebellar Purkinje cells. *Brain Research* 567, 153-158.
- Watabe-Uchida M, Zhu L, Ogawa SK, Vamanrao A und Uchida N (2012). Whole-brain mapping of direct inputs to midbrain dopamine neurons. *Neuron* 74, 858-873.
- Weihe E und Eiden LE (2000). Chemical neuroanatomy of the vesicular amine transporters. *FASEB J* 14, 2435-2449.
- Wheeler RA, Twining RC, Jones JL, Slater JM, Grigson PS und Carelli Regina M (2008). Behavioral and Electrophysiological Indices of Negative Affect Predict Cocaine Self-Administration. *Neuron* 57, 774-785.
- White FJ (1996). Synaptic regulation of mesocorticolimbic dopamine neurons. *Annu Rev Neurosci* 19, 405-436.

- Williams GV und Goldman-Rakic PS (1995). Modulation of memory fields by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex. *Nature* 376, 572-575.
- Wise RA (2009). Roles for nigrostriatal--not just mesocorticolimbic--dopamine in reward and addiction. *Trends Neurosci* 32, 517-524.
- Wolfart J, Neuhoff H, Franz O und Roeper J (2001). Differential expression of the small-conductance, calcium-activated potassium channel SK3 is critical for pacemaker control in dopaminergic midbrain neurons. *J Neurosci* 21, 3443-3456.
- Wu X, Kekuda R, Huang W, Fei YJ, Leibach FH, Chen J, Conway SJ und Ganapathy V (1998). Identity of the organic cation transporter OCT3 as the extraneuronal monoamine transporter (uptake2) and evidence for the expression of the transporter in the brain. *J Biol Chem* 273, 32776-32786.
- Xia Y, Driscoll JR, Wilbrecht L, Margolis EB, Fields HL und Hjelmstad GO (2011). Nucleus accumbens medium spiny neurons target non-dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 31, 7811-7816.
- Xiong H, Kovacs I und Zhang Z (2004). Differential distribution of KChIPs mRNAs in adult mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 128, 103-111.
- Xu Y, Ramu Y und Lu Z (2010). A shaker K<sup>+</sup> channel with a miniature engineered voltage sensor. *Cell* 142, 580-589.
- Yang K, Hu J, Lucero L, Liu Q, Zheng C, Zhen X, Jin G, Lukas RJ und Wu J (2009). Distinctive nicotinic acetylcholine receptor functional phenotypes of rat ventral tegmental area dopaminergic neurons. *The Journal of Physiology* 587, 345-361.
- Yao JJ, Gao XF, Chow CW, Zhan XQ, Hu CL und Mei YA (2012). Neuritin activates insulin receptor pathway to up-regulate Kv4.2-mediated transient outward K<sup>+</sup> current in rat cerebellar granule neurons. *J Biol Chem* 287, 41534-41545.
- Yao JJ, Sun J, Zhao QR, Wang CY und Mei YA (2013). Neuregulin-1/ErbB4 signaling regulates Kv4.2-mediated transient outward K<sup>+</sup> current through the Akt/mTOR pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 305, C197-206.
- Ye JH, Tao L, Ren J, Schaefer R, Krnjevic K, Liu PL, Schiller DA und McArdle JJ (2001). Ethanol potentiation of glycine-induced responses in dissociated neurons of rat ventral tegmental area. *J Pharmacol Exp Ther* 296, 77-83.
- Yuan W, Burkhalter A und Nerbonne JM (2005). Functional role of the fast transient outward K<sup>+</sup> current IA in pyramidal neurons in (rat) primary visual cortex. *J Neurosci* 25, 9185-9194.

- Zagha E, Ozaita A, Chang SY, Nadal MS, Lin U, Saganich MJ, McCormack T, Akinsanya KO, Qi SY und Rudy B (2005). DPP10 modulates Kv4-mediated A-type potassium channels. *J Biol Chem* 280, 18853-18861.
- Zahrt J, Taylor JR, Mathew RG und Arnsten AF (1997). Supranormal stimulation of D1 dopamine receptors in the rodent prefrontal cortex impairs spatial working memory performance. *J Neurosci* 17, 8528-8535.
- Zhang J, Chiodo LA und Freeman AS (1994). Influence of excitatory amino acid receptor subtypes on the electrophysiological activity of dopaminergic and nondopaminergic neurons in rat substantia nigra. *J Pharmacol Exp Ther* 269, 313-321.
- Zhang L und McBain CJ (1995). Potassium conductances underlying repolarization and after-hyperpolarization in rat CA1 hippocampal interneurons. *The Journal of Physiology* 488 ( Pt 3), 661-672.
- Zhang TA, Placzek AN und Dani JA (2010). In vitro identification and electrophysiological characterization of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Neuropharmacology* 59, 431-436.
- Zhou W, Qian Y, Kunjilwar K, Pfaffinger PJ und Choe S (2004). Structural insights into the functional interaction of KChIP1 with Shal-type K(+) channels. *Neuron* 41, 573-586.
- Zhou Y, Morais-Cabral JH, Kaufman A und MacKinnon R (2001). Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K<sup>+</sup> channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* 414, 43-48.
- Zhuang X, Belluscio L und Hen R (2000). G(olf)alpha mediates dopamine D1 receptor signaling. *J Neurosci* 20, RC91.
- Zhuang X, Masson J, Gingrich JA, Rayport S und Hen R (2005). Targeted gene expression in dopamine and serotonin neurons of the mouse brain. *J Neurosci Methods* 143, 27-32.

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Die Biosynthese von Dopamin.....	2
Abbildung 1.2: Das ventrale Mittelhirns im Coronarschnitt eines Maushirns .....	5
Abbildung 1.3: Das DA Mittelhirnsystem mit ausgewählten Projektionsgebieten	6
Abbildung 1.4: Afferenzen dopaminerge VTA Neurone.....	8
Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des Basalgangliennetzwerks .....	12
Abbildung 1.6: Schematische Darstellung ausgewählter Ionenkanäle und Neurotransmitterrezeptoren von DA Neuronen.....	21
Abbildung 1.7: Struktur spannungsgesteuerter Kaliumkanäle .....	30
Abbildung 2.1: Der <i>Patch-Clamp</i> Messplatz .....	53
Abbildung 2.2: <i>Nucleated outside-out Patches</i> .....	58
Abbildung 2.3: <i>Voltage-Clamp</i> Protokolle zur Charakterisierung des A-Stroms ...	60
Abbildung 2.4: <i>Current-Clamp</i> Protokolle zur Grundcharakterisierung DA Neurone.....	64
Abbildung 2.5: In Igor-Pro generierte synaptische Ströme .....	68
Abbildung 3.1: Parameter der Aktivierung und Inaktivierung des A-Stroms von DA VTA Neuronen.....	75
Abbildung 3.2: Inaktivierungskinetik des A-Stroms in DA SN Neuronen.....	77
Abbildung 3.3: Erholung des A-Stroms von DA VTA Neuronen aus der Inaktivierung.....	78
Abbildung 3.4: Erholung des A-Stroms aus der Inaktivierung in DA SN Neuronen.....	79
Abbildung 3.5: Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und Inaktivierung von A-Typ Kaliumkanälen in DA VTA Neuronen.....	80
Abbildung 3.6: <i>Steady-State</i> Aktivierungs- und Inaktivierungsparameter von A-Typ Kaliumkanälen in DA SN Neuronen.....	81
Abbildung 3.7: Funktionelle Kartierung der gemessenen Zellen anhand der Zeitkonstante der Inaktivierung des A-Stroms .....	84
Abbildung 3.8: Passive Membraneigenschaften und Serienwiderstand von DA Neuronen der SN und VTA .....	86

Abbildung 3.9: KChIP4 spielt keine Rolle für die Spontanfrequenz von DA VTA Neuronen.....	87
Abbildung 3.10: KChIP4 beeinflusst nicht die Spontanfrequenz von DA SN Neuronen.....	87
Abbildung 3.11: Aktionspotentialparameter von DA Neuronen sind zum Teil abhängig von der KChIP4-Expression.....	89
Abbildung 3.12: Die Minimalfrequenz von DA VTA Zellen ist unverändert .....	91
Abbildung 3.13: DA VTA Neurone aus KChIP4-KO-Tieren erreichen eine höhere Maximalfrequenz.....	92
Abbildung 3.14: Frequenzkodierte Kartierung der gemessenen SN und VTA Neurone.....	93
Abbildung 3.15: KChIP4 erhöht selektiv in DA VTA Neuronen die Latenzzeit zum nächsten Aktionspotential nach einer Inhibition .....	94
Abbildung 3.16: Die Latenzzeit zum nächsten Aktionspotential ist in DA SN Neuronen unabhängig von der KChIP4-Expression.....	95
Abbildung 3.17: Kartierung aller gemessenen DA SN und VTA Neurone.....	96
Abbildung 3.18: GABAerge eIPSC sind in DA VTA Neuronen von KChIP4-KO-Tieren unverändert .....	100
Abbildung 3.19: Frequenz spontaner GABA <sub>A</sub> -R-vermittelter Ereignisse.....	101
Abbildung 3.20: Rolle von KChIP4 für die Verarbeitung künstlicher GABA <sub>A</sub> -Eingänge.....	102
Abbildung 3.21: Abhängigkeit der Latenzzeit vom erreichten Membranpotential .....	104
Abbildung 3.22: Rolle von KChIP4 in der Verarbeitung künstlicher GABA <sub>B</sub> -Eingänge.....	105
Abbildung 3.23 Kein Einfluss von KChIP4 auf die Verarbeitung künstlicher NMDA-Eingänge.....	106
Abbildung 3.24: KChIP4 verlängert die GABA-induzierte inhibitorische Pause .....	108
Abbildung 4.1: Verhaltensrelevanz der Dauer der inhibitorischen Pause .....	137

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: ACSF-Lösungen der <i>in vitro</i> Elektrophysiologie .....	47
Tabelle 2.2: Eingesetzte Rezeptor-Pharmaka .....	47
Tabelle 2.3: Pipettenlösungen der <i>in vitro</i> Elektrophysiologie.....	48
Tabelle 2.4: Lösungen der Immunhistochemie .....	49
Tabelle 2.5: Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe der Immunhistochemie.....	50
Tabelle 2.6: Parameter des Pipettenziehgeräts zur Herstellung von <i>Patch-Clamp</i> Pipetten .....	53
Tabelle 3.1: Biophysikalische Parameter des A-Stroms von DA VTA Neuronen aus WT- und KChIP4-KO-Tieren.....	82
Tabelle 3.2: Biophysikalische A-Strom-Parameter von DA SN Neuronen aus WT- und KChIP4-KO Tieren.....	83
Tabelle 3.3: Ergebnisse der <i>Whole-Cell</i> Grundcharakterisierung von DA VTA Neuronen .....	97
Tabelle 3.4: Ergebnisse der <i>Whole-Cell</i> Grundcharakterisierung von DA SN Neuronen .....	98

# Abkürzungsverzeichnis

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen der deutschen Sprache sowie Maßeinheiten, die auf Empfehlungen der International Federation for Clinical Chemistry (IFCC) oder der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) beruhen oder zu den SI-Einheiten (Système Internationale d' Unités) gehören werden nicht gesondert aufgeführt.

4-AP	4-Aminopyridin
AADC	Aromatische-L-Aminosäuren-Decarboxylase
AAV	Adenoassoziertes Virus
ACh	Acetylcholin
ACSF	Artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit
ADP	Adenosindiphosphat
AHP	Nachhyperpolarisation (engl. <i>afterhyperpolarization</i> )
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure
AP	Aktionspotential
ATP	Adenosintriphosphat
BLA	Basolaterale Amygdala
BNST	Bed Nucleus der Stria Terminalis
BSA	Bovines Serumalbumin
CA1	Ammonshorn (Cornu ammonis area 1) der Hippocampusformation
CALP	Calsenilin-ähnliches Protein (engl. <i>calsenilin-like protein</i> )
CaMKII	Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase II
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Ca <sub>v</sub>	Spannungsgesteuerter Calciumkanal
CB	Calbindin
cDNA	komplementäre DNA (engl. <i>complementary DNA</i> )
ChR2	Channel-Rhodopsin 2
CNQX	6-Cyano-7-Nitroquinoxalin-2,3-Dion
COMT	Catechol-O-Methyltransferase



COS-Zelllinie	Fibroblastenähnliche Zelllinie (CV-1 ( <i>simian</i> ) in Origin, and carrying the SV40 genetic material)
CPA	Konditionierte Ortaversion (engl. <i>conditioned place avoidance</i> )
CPP	Konditionierte Ortvorliebe (engl. <i>conditioned place preference</i> )
CS	Superiore Colliculi
CSI	Inaktivierung aus der geschlossenen Konformation (engl. <i>closed state inactivation</i> )
D1R	Dopaminrezeptor 1
D2R	Dopaminrezeptor 2
DA	Dopamin, dopaminerg
DAT	Dopamintransporter
DL-AP5	DL-2-Amino-5-Phosphonopentanionsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Dominant negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DPPL	Dipeptidylpeptidase ähnliches Protein (engl. <i>dipeptidyl peptidase-like protein</i> )
DREAM	engl. <i>downstream regulatory element antagonist modulator</i>
EF-Hand	Calciumbindendes Aminosäurenmotiv
EGTA	Ethylen-Glycol-bis(2-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraacetat
eIPSC	Evozierter inhibitorischer postsynaptischer Strom (engl. <i>evoked inhibitory postsynaptic current</i> )
EP	Entopedunkulärer Nucleus
EPSC	Exzitatorische postsynaptische Ströme (engl. <i>excitatory postsynaptic current</i> )
ERK	Extracellulärsignal-regulierte Kinase
FERN-Domäne	Funktionelle, die Expression regulierende N-terminale Domäne (engl. <i>functional expression regulating N-terminal domain</i> )
G	Glycin
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GABA <sub>A</sub>	GABA-Rezeptor Typ A (ionotrop)
GABA <sub>B</sub>	GABA-Rezeptor Typ B (metabotrop)
G $\alpha$ <sub>i</sub>	$\alpha$ -Untereinheit eines inhibitorischen G-Proteins
G $\alpha$ olf	$\alpha$ -Untereinheit eines exzitatorischen G-Proteins

GIRK	G-Proteingekoppelter einwärtsrektifizierender Kaliumkanal (engl. <i>G-protein coupled inward rectifying K<sup>+</sup> channel</i> )
GPe	Externes Pallidumsegment
GPi	Internes Pallidumsegment
HCN	engl. <i>hyperpolarisation-activated, cyclic nucleotide-gated non-selective cation channel</i>
HEK-Zelllinie	Menschliche embryonale Nierenzellen (engl. <i>human embryonic kidney cellline</i> )
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)Piperazine-N'-(2-Ethanesulfonsäure)
HSV1	Herpes Simplex Virus 1
I <sub>A</sub>	A-Typ Kaliumstrom
IF	Nucleus interfascicularis
IPN	Interpedunkulärer Nucleus
IPSC	Inhibitorischer postsynaptischer Strom (engl. <i>inhibitory postsynaptic current</i> )
IPSP	Inhibitorisches postsynaptisches Potential
I <sub>to</sub>	Transienter Kaliumauswärtsstrom (engl. <i>transient outward K<sup>+</sup> current</i> )
KATP	ATP-abhängiger Kaliumkanal
KChIP	Kaliumkanal interagierendes Protein (engl. <i>K<sup>+</sup> channel interacting protein</i> )
KCNQ	Spannungsabhängige Kaliumkanäle der Familie K <sub>v</sub> 7
KcsA	Kaliumkanal des Bakteriums <i>Streptomyces lividans</i>
Kir	Einwärtsrektifizierender Kaliumkanal (engl. <i>inward rectifying K<sup>+</sup> channel</i> )
KIS-Domäne	engl. <i>K<sup>+</sup> channel inactivation suppressor domain</i>
KO	Knock-Out
K <sub>v</sub>	Spannungsgesteuerter Kaliumkanal
L-DOPA	L-Dihydroxyphenylalanin
LC	Locus Coeruleus
LDTg	Laterodorsaler tegmentaler Nucleus
LHb	Laterale Habenulae
MAO	Monoaminoxidase
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MFB	Mediales Vorderhirnbündel (engl. <i>medial forebrain bundle</i> )

mPFC	medialer präfrontaler Cortex
mRNA	Boten-Ribonucleinsäure (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i> )
MSN	engl: <i>medium spiny neuron</i>
NA	Noradrenalin, noradrenerg
NAc	Nucleus accumbens
NAc C	<i>Core</i> des Ncl. accumbens
NAc lSh	Lateraler <i>shell</i> des Ncl. accumbens
NAc mSh	Medialer <i>shell</i> des Ncl. accumbens
nACh	Nikotinerger Acetylcholinrezeptor
NALCN	Natrium Leckkanal (engl. <i>Na<sup>+</sup> leak channel</i> )
Na <sub>v</sub>	Spannungsgesteuerter Natriumkanal
Ncl.	Nucleus
NCS	Neuronales calciumbindendes Protein (engl. <i>neuronal calcium sensor</i> )
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OSI	Inaktivierung aus der geöffneten Konformation (engl. <i>open state inactivation</i> )
PBP	Ncl. parabrachialis pigmentosus
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
PFA	Paraformaldehyd
PFC	Präfrontaler Cortex
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PN	Ncl. paranigralis
PPN	Pedunculopontiner Nucleus
RMTg	Rostromedialer tegmentaler Nucleus
RPE	engl: <i>reward prediction error</i>
RRF	Retrorubrales Feld
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RT-qPCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion(engl. <i>real time quantitative polymerase chain reaction</i> )
RV	Rabies Virus
S.E.M.	Standardfehler (engl. <i>standard error of the mean</i> )

siRNA	kleine interferierende RNA (engl. <i>small interfering RNA</i> )
SK	Calciumabhängiger Kaliumkanal mit geringer Leitfähigkeit (engl. <i>small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel</i> )
SN	Substantia nigra
SNc	Substantia nigra pars compacta
SNr	Substantia nigra pars reticulata
SOP	Langsames oszillatorisches Potential (engl: <i>slow oscillatory potential</i> )
STN	Subthalamischer Nucleus
SUR	Sulfonylharnstoffrezeptor (engl. <i>sulfonyl urea receptor</i> )
T	Threonin
TH	Tyrosinhydroxylase
TM	Transmembrandomäne
TTX	Tetrodotoxin
V <sub>50</sub>	Halbmaximales Potential
VMAT2	Vesikulären Monoamintransporter vom Typ 2
VP	Ventrales Pallidum
VTA	Area tegmentalis ventralis
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin