

Aus dem Institut für Physiologie und Pathophysiologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Dominik Oliver

in Zusammenarbeit mit der Klinik für Neurologie

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Prämotorisches Modell der Parkinson-Krankheit:
Elektrophysiologische Charakterisierung von Locus coeruleus
Neuronen nach α -Synuklein-Überexpression im Mausmodell**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin (Dr. med.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Annette Roswitha Maria Paiba Samame, geborene Stöhr
aus Passau

Marburg, 2020

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 02.11.2020

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekan i. V. der Prodekan: Prof. Dr. R. Müller

Referent: Herr Prof. Dr. N. Decher

Korreferent: Herr Prof. Dr. K. Schepelmann

Widmung

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1. Die Parkinson-Krankheit	7
1.1.1. Klinik	7
1.1.2. Therapie	9
1.1.3. Pathophysiologie	9
1.2. Der Locus coeruleus	11
1.2.1. Anatomie des Locus Coeruleus	11
1.2.2. Funktion des Locus Coeruleus.....	12
1.2.3. Physiologie coeruleärer Neurone	13
1.2.4. Rolle des Locus Coeruleus bei der Parkinson-Krankheit.....	13
1.3. Tiermodelle der Parkinson Krankheit	14
1.4. Das neuronale Aktionspotential	15
1.5. Die Familie der kaliumselektiven Ionenkanäle.....	16
1.5.1. Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle (Kv Kanäle).....	16
1.5.2. Kalzium-aktivierte Kaliumkanäle (K _{Ca} Kanäle).....	17
1.6. Zielsetzung	19
2. Material und Methoden	20
2.1. Material.....	20
2.1.1. Versuchstiere.....	20
2.1.2. Lösungen	20
2.1.3. Enzyme und Antikörper.....	21
2.1.4. Sonstige Hilfsmittel	22
2.2. Injektion rekombinanter Adeno-assoziiertes Viren.....	22
2.3. Elektrophysiologische Messungen.....	23
2.3.1 Narkose und Präparation akuter Hirnschnitte	24
2.3.2. Aufbau des Messstandes	24
2.3.3. Das Patch-Clamp-Verfahren.....	26
2.3.4. Messprotokolle	28
2.3.5. Datenanalyse.....	29
2.4. Immunhistochemische Methoden.....	29

2.4.1. Aufbewahrung der gepatchten Hirnschnitte	29
2.4.2. Immunfluoreszenz-Färbung	29
2.4.3. Mikroskopie.....	30
2.5. Statistische Auswertungen	30
3. Ergebnisse.....	32
3.1. Immunhistochemische Kontrollfärbungen	32
3.1.1. Gepatchte Neurone sind Tyrosinhydroxylase-positiv	32
3.1.2. Gepatchte Neurone sind α -Synuklein-positiv	33
3.2. Spontanaktivität der Locus Coeruleus Neurone	33
3.2.1. Überexpression von A53T- α -Synuklein führt zeitabhängig zu einer erhöhten Feuerrate spontan-aktiver Locus Coeruleus Neurone	33
3.2.2. Überexpression von A53T- α -Synuklein bewirkt abhängig von der Zeit eine Abnahme der Nachhyperpolarisation	35
3.3. Kaliumauswärtsströme der LC Neurone	36
3.3.1. Keine Veränderung der transienten Kaliumauswärtsströme nach A53T- α Syn Überexpression	36
3.3.2. Keine Veränderung der verzögerten Kaliumgleichrichterströme nach A53T- α Syn Überexpression	38
3.3.3. Reduzierte Kalzium-aktivierte Kaliumströme nach A53T- α Syn Überexpression	40
4. Diskussion.....	42
4.1. Vulnerabilität der Locus Coeruleus Neurone	42
4.2. <i>In vivo</i> Mausmodell der prämotorischen Parkinson-Krankheit	43
4.3. Das Patch-Clamp-Verfahren	44
4.4. α -Synuklein vermittelt Hyperaktivität des Locus coeruleus	45
4.4.1. Korrelation zwischen Locus coeruleus Hyperaktivität und klinischen Symptomen	46
4.5. Pathophysiologische Veränderungen nach a-Synuklein Überexpression	47
4.5.1. Reduzierte Kalzium-aktivierte Kaliumströme vermitteln erhöhte Schrittmacheraktivität.....	47
4.5.2. Kalzium Homöostase und oxidativer Stress.....	48
5. Zusammenfassung	51

6. Summary	53
7. Literaturverzeichnis.....	55
8. Abkürzungsverzeichnis	61
9. Anhang	63

1. Einleitung

1.1. Die Parkinson-Krankheit

Die Parkinson-Krankheit (PK) ist nach der Alzheimer Erkrankung die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung, deren Prävalenz mit zunehmendem Alter steigt (de Lau und Breteler 2006). So sind laut der Metaanalyse von Pringsheim *et al.* weltweit etwa 41 von 100.000 der 40- bis 49-Jährigen und fast 2.000 von 100.000 der über 80-Jährigen davon betroffen. Aufgrund des demographischen Wandels ist in den kommenden Jahren mit einer weiter steigenden Prävalenz zu rechnen (Pringsheim et al. 2014).

Die Ätiologie ist wahrscheinlich multifaktoriell und es gibt aktuell noch keine verfügbaren Therapien, um die Erkrankung aufzuhalten oder zu heilen. Lange Zeit wurde angenommen, dass es neuropathologisch vor allem zu einem Verlust dopaminerger Neurone in der Substantia nigra kommt. Mittlerweile weiß man, dass auch andere Transmittersysteme betroffen sind. Darunter sind die noradrenergen Neurone im Locus coeruleus (LC) sehr früh betroffen (Dickson 2012).

1.1.1. Klinik

1.1.1.1. Motorische Symptome

Die Diagnose der PK wird in der Regel klinisch anhand motorischer Symptome gestellt und beruht auf den Kriterien der „UK Parkinson’s Disease Brain Bank“. Voraussetzungen für die Diagnosestellung sind eine Bradykinesie zusammen mit einem weiteren Symptom, wie Rigor, Ruhetremor oder posturale Instabilität (Hughes et al. 1992). Weitere stützende Kriterien für die Diagnose der PK sind ein unilateraler Beginn der Symptome, ein gutes Ansprechen auf eine Therapie mit Levodopa und das Auftreten von Dyskinesien unter einer dopaminergen Therapie. Meist beginnen die Symptome auf einer Körperseite und treten nach einigen Jahren auch kontralateral auf. Die Patienten zeigen eine gebückte Körperhaltung, einen Rigor mit einem möglichen Zahnradphänomen, einen schlurfenden Gang und ein reduziertes Mitschwingen der Arme beim Gehen. Die Bradykinesie kann zu einem ausdruckslosen Gesicht, einer sogenannten Hypomimie, führen. Das häufigste Symptom der PK ist ein Ruhetremor mit einer Frequenz von 4 bis 6 Hz (Jankovic 2008).

1.1.1.2. Nicht-motorische Symptome

Vor dem Auftreten der motorischen Symptome können die Patienten eine Vielzahl prämotorischer Symptome zeigen, welche bereits zehn oder mehr Jahre vor Diagnosestellung auftreten können (Schrag et al. 2015). Diese frühen nicht-motorischen Symptome können Zeichen einer prodromalen PK sein. Hierzu zählen unter anderem orthostatische Hypotension, Obstipation, Schlafstörungen und Hyposmie (Berg et al. 2015).

Zum einen zeigen sich häufig autonome Funktionsstörungen. Bei bis zu 20 % der Parkinson Patienten kann es rezidivierend zu einer symptomatischen orthostatischen Hypotension kommen, das heißt einem deutlichen Blutdruckabfall im Stehen. Dies kann einerseits primär durch die PK und andererseits sekundär durch die dopaminergen Medikamente erklärt werden (Senard et al. 2001). Die autonome Dysfunktion kann sich auch durch gastrointestinale Symptome, wie Dysphagie, prostprandiales Völlegefühl und Obstipation, bemerkbar machen (Jost 2010). Häufig leiden Patienten mit einer PK an einer Blasenfunktionsstörung, insbesondere an einer überaktiven Blase (Jost 2013).

Des Weiteren zeigen sich in den prämotorischen Stadien der PK gehäuft Schlafstörungen. *Rapid Eye Movement* (REM)-Schlaf-Verhaltensstörungen manifestieren sich meist Jahre bis Jahrzehnte vor den motorischen Symptomen. Die REM-Schlaf-Verhaltensstörung ist charakterisiert durch ein lebhaftes Träumen und den Verlust der REM-Schlaf-Atonie (St Louis, Boeve und Boeve 2017). Eine Metaanalyse von Zhang *et al.* errechnete eine Prävalenz der REM-Schlaf-Verhaltensstörung bei der PK von etwa 42 % (Zhang et al. 2017).

Zu den neuropsychiatrischen Symptomen der PK zählen visuelle Halluzinationen und Illusionen, die in bis zu 40 % der Fälle auftreten (Onofrj, Thomas und Bonanni 2007). Kognitive Defizite und Demenz sind ebenso häufige Symptome, die in frühen oder späten Stadien der PK auftreten können (Williams-Gray et al. 2006). Des Weiteren finden sich bei Parkinson Patienten im Vergleich zur allgemeinen Bevölkerung gehäuft Depressionen (Ishihara und Brayne 2006).

Eine der ersten Manifestationen der PK ist eine Hyposmie. Laut Ponsen *et al.* ist die idiopathische Hyposmie mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer PK assoziiert (Ponsen et al. 2004).

1.1.2. Therapie

Aktuell gibt es noch keine verfügbaren Therapien, welche die PK aufhalten oder gar heilen können. Die Behandlung mit dopaminergen Medikamenten ist lediglich symptomatisch und lindert die motorischen Beschwerden. Als Standardtherapeutikum wird Levodopa, ein Prodrug von Dopamin, eingesetzt. Das initiale Ansprechen hierauf ist sehr gut. Nach einiger Zeit kommt es jedoch zu immer kürzeren Ansprechraten und zu motorischen Komplikationen, wie Dyskinesien (Ahlskog und Muenter 2001). Weitere dopaminerge Medikamente sind Monoaminoxidase-B-Hemmer, Catechol-O-Methyltransferase-Hemmer, Amantadine und Dopaminrezeptor-Agonisten. Diese werden eingesetzt, um die Fluktuationen unter einer Levodopa-Therapie auszugleichen (Jankovic und Stacy 2007). Des Weiteren gibt es die Option eines neurochirurgischen Verfahrens – einer Tiefenhirnstimulation. Diese dient als Alternative für Patienten, die an einem hartnäckigen Tremor oder an den Langzeitnebenwirkungen einer Levodopa-Therapie leiden (Bronstein et al. 2011).

1.1.3. Pathophysiologie

Die motorischen Symptome der PK lassen sich neuropathologisch durch den Verlust dopaminergener Neurone der Substantia nigra pars compacta (SNpc) erklären. Als Teil der motorischen Basalganglienschleife sendet die SNpc dopaminerge Fasern in das Corpus striatum. Das Dopamin vermittelt dort auf komplexe Weise einen modulierenden und insgesamt motorikfördernden Effekt bei willkürlichen Bewegungsabläufen. Kommt es bei der PK nun zu einer Degeneration der dopaminergen SNpc Zellen, fällt diese modulierende Wirkung auf die Motoneurone des Motorkortex weg und es kommt zu den oben genannten motorischen Leitsymptomen wie der Hypokinesie (Purves, Augustine und al. 2001).

Histopathologisch finden sich in den betroffenen Neuronen die charakteristischen Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten. Dabei handelt es sich um eosinophile intraneuronale Einschlusskörperchen, die erstmals 1912 durch den namensgebenden Herrn Lewy beschrieben wurden (Pollanen, Dickson und Bergeron 1993, Gibb und Poewe 1986). Lewy-Körperchen bestehen aus Proteinaggregaten mit einem hohen Anteil an dem Protein α -Synuklein (α Syn) (Spillantini et al. 1998). Dabei handelt es sich um ein 140 Aminosäuren langes intrazelluläres Protein, welches durch Maroteaux 1988 entdeckt wurde und ausschließlich im Nervensystem exprimiert wird (Maroteaux, Campanelli und Scheller 1988).

1.1.3.1. Braak Stadien

Post-Mortem-Studien zeigen, dass die Lewy Pathologie nicht nur in der SNpc zu finden ist (Braak und Braak 2000). Die Lewy Pathologie findet sich in vorhersehbarer Abfolge in verschiedenen Regionen des humanen Nervensystems. Der Prozess beginnt vor allem im Dorsalen Motorischen Vagus Kern (DMV) und steigt bis zum zerebralen Kortex auf. Braak hat daraus sechs neuropathologische Stadien definiert (s. Abbildung 1.1).

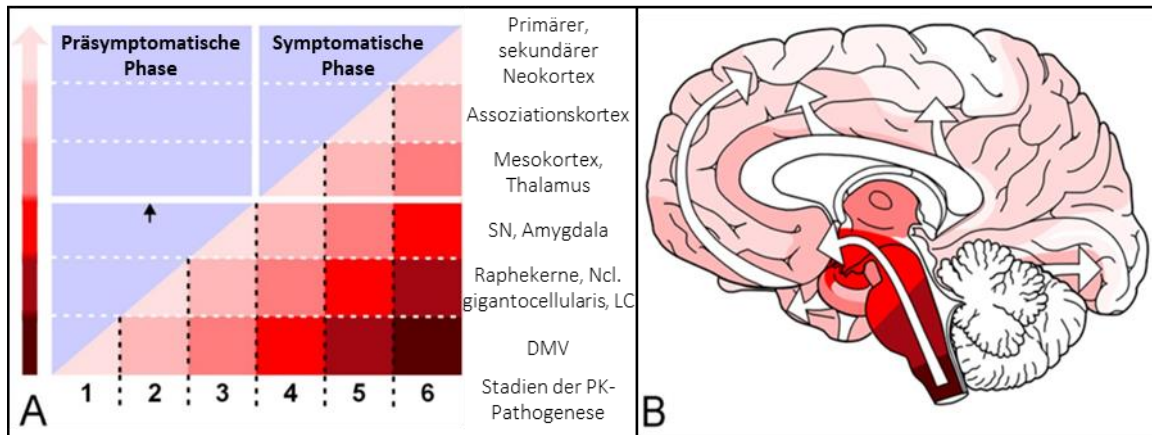


Abbildung 1.1: Stadien der PK Pathogenese nach Braak.

Braak *et al.* hat das Fortschreiten der pathologischen Veränderungen bei der PK anhand des Auftretens von Lewy-Körperchen in 6 Stadien eingeteilt. (A) Im Stadium 1 findet sich die Lewy-Pathologie im DMV. Die Pathologie breitet sich im Stadium 2 auf Kerngebiete des pontinen Tegmentums, darunter den LC, aus. Im Stadium 3 zeigen sich Lewy-Körperchen in der SNpc, die sich im Stadium 4 weiter auf das Mittelhirn ausbreiten. Im Stadium 5 und 6 erreicht der neurodegenerative Prozess sein volles Ausmaß und die Lewy-Körperchen finden sich auch im Neokortex. Die präsymptomatische Phase ist charakterisiert durch das Vorkommen von Lewy-Neuriten und Lewy-Körperchen in Gehirnen von asymptomatischen Personen. In der symptomatischen Phase wird eine individuelle neuropathologische Schwelle (schwarzer Pfeil) überschritten und die Patienten zeigen die charakteristischen motorischen Symptome einer PK. Die zunehmende Farbintensität der rot gefärbten Areale gibt das zunehmende Ausmaß der Pathologie in vulnerablen Hirnregionen wider.

(B) Die Abbildung zeigt den aufsteigenden pathologischen Prozess (weiße Pfeile). Die Farbintensitäten der gefärbten Areale entsprechen denen in (A). (Braak et al. 2004)

Im Stadium 1 finden sich wenige isolierte Lewy-Neuriten im DMV und in der benachbarten intermediären Formatio reticularis. Ebenso zeigen sich Einschlusskörperchen in einzelnen Neuronen des enterischen Nervensystems. Im Stadium 2 breitet sich die Pathologie auf die unteren Raphekerne und die magnozellular Formatio reticularis, insbesondere den Nucleus gigantocellularis, aus. Außerdem finden sich die ersten Lewy-Neuriten im Coeruleus-Subcoeruleus-Komplex. Die Stadien 1 bis 2 beschreiben die präsymptomatische Phase der PK. Der aufsteigende Prozess erreicht im Stadium 3 das basale Mittel- und Vorderhirn und es zeigen sich die ersten Lewy-Körperchen in der SNpc. Die Pathologie greift nun auch auf die Amygdala über. Im Stadium 4 sind zudem Anteile des zerebralen Kortex und das Ammonshorn betroffen.

Während der Stadien 3 bis 4 geht die präsymptomatische Phase in die klinisch manifeste Phase der PK über. In den Endstadien 5 und 6 erreicht der neurodegenerative Prozess sein volles Ausmaß und die Einschlusskörperchen finden sich ausgehend vom temporalen Mesokortex schrittweise im kompletten Neokortex. Die Patienten zeigen hier das gesamte Spektrum der PK-assoziierten klinischen Symptome (Braak et al. 2004).

1.1.3.2. α -Synuklein

Das in Lewy-Körperchen vorkommende α Syn ist ein 140 Aminosäuren langes intrazelluläres Protein, welches durch das Gen SNCA auf dem langen Arm von Chromosom 4 kodiert wird (Shibasaki et al. 1995).

Die physiologische Aufgabe von α Syn ist noch nicht vollständig geklärt. Es gibt starke Evidenz dafür, dass das Protein an den präsynaptischen Endigungen die synaptische Transmission reguliert und Effekte auf den Zyklus synaptischer Vesikel hat (Villar-Piqué, Lopes da Fonseca und Outeiro 2016). Synukleine scheinen die Clathrin-vermittelte Endozytose synaptischer Vesikel an den präsynaptischen Enden zu regulieren (Vargas et al. 2014). Burré et al. konnten zudem zeigen, dass α Syn an SNARE-Proteine bindet, die Bildung der SNARE-Komplexe fördert und dadurch die Membranfusion synaptischer Vesikel bei der synaptischen Transmission vermittelt (Burré et al. 2010).

Obwohl die meisten Fälle der PK sporadisch auftreten, gibt es einen kleinen Prozentsatz, bei dem die Krankheit aufgrund von Genmutationen familiär gehäuft auftritt. Die Tatsache, dass Duplikationen, Triplikationen oder *Missense* Mutationen (z.B. A53T, A30P oder G46L) des α Syn Gens familiäre Formen der PK auslösen, rechtfertigt die Annahme, dass α Syn eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der PK spielt (Krüger et al. 2001).

1.2. Der Locus coeruleus

1.2.1. Anatomie des Locus Coeruleus

Der LC befindet sich am Rand des vierten Ventrikels auf Höhe der Pons und ist beim Menschen mit etwa 13.000 Neuronen pro Hemisphäre relativ klein. Das Kerngebiet besitzt vor allem noradrenerge Neurone und ist damit die größte Noradrenalin-Quelle im zentralen Nervensystem (ZNS) (Foote, Bloom und Aston-Jones 1983).

Die noradrenergen Neurone des LC senden Fasern in fast alle Hirnstrukturen (Jones et al. 1977) (s. Abbildung 1.2). Es lassen sich drei efferente Bahnen finden: eine aufsteigende, eine zerebelläre und eine absteigende Bahn. Die aufsteigenden Fasern innervieren Strukturen des Mittelhirns, Thalamus, limbischen Systems und alle Areale des Neokortex. Die zerebellären Bahnen projizieren zu den zerebellären Kernen und dem zerebellären Kortex. Die absteigenden Fasern ziehen zu motorischen Kernen des unteren Hirnstamms und dann ins Rückenmark (Szabadi 2013).

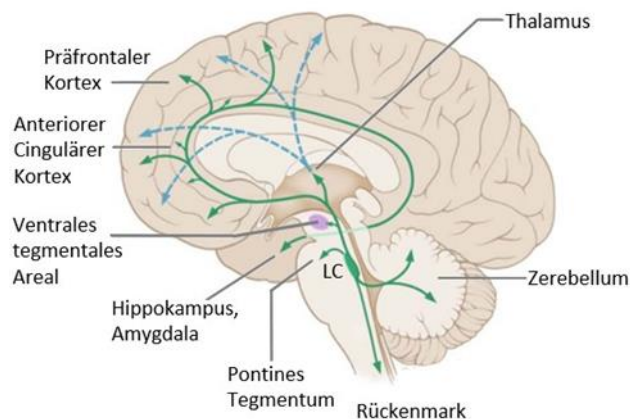


Abbildung 1.2: Die noradrenergen Projektionen des LC

Das Diagramm illustriert die noradrenergen Projektionen des LC zu kortikalen und subkortikalen Regionen, sowie zum Hirnstamm und Rückenmark. So können eine aufsteigende, eine zerebelläre und eine absteigende Bahn ausgehend vom LC unterschieden werden. Der LC ist die größte Noradrenalin-Quelle des ZNS.

(Quelle: in Anlehnung an Espay, LeWitt und Kaufmann 2014).

1.2.2. Funktion des Locus Coeruleus

Aufgrund seiner ausgedehnten Projektionen ist der LC an der Regulation einer Vielzahl von Funktionen beteiligt und spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Schlaf und Erregung, bei der Regulierung des autonomen Nervensystems und der Photomodulation, welche die Effekte von Licht auf physiologische Funktionen, wie die Erregung, vermittelt.

Die Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus und damit des Vigilanz-Levels ist eine der am intensivsten studierten Funktion des LC-Noradrenalin-Systems. Es gibt drei verschiedene Erregungszustände: der Wach-Zustand, der Tiefschlaf und der REM-Schlaf, welcher durch einen Verlust des Muskeltonus charakterisiert ist. Der LC spielt hierbei eine zentrale, vigilanzfördernde Rolle. Zum einen vermittelt er ein erhöhtes Vigilanz-Level durch kortikale Projektionen mit einem direkten alarmierenden Effekt und zum anderen durch Projektionen zu weiteren vigilanzsteigernden Arealen. Durch inhibitorische Projektionen unterdrückt er schließlich das Einsetzen des REM-Schlafes (Szabadi 2013).

Des Weiteren kann das LC-Noradrenalin-System über verschiedene Aktivitätsmodi im Wachzustand die Ausführung von Aufgaben und damit die Leistung optimieren. Der phasische Modus fördert durch eine vorübergehende systemweite Noradrenalinfreisetzung die fokussierte Aufmerksamkeit und verbessert die Ausführung einer bestimmten Aufgabe, indem

er als Aufmerksamkeitsfilter dient. Im tonischen Modus findet sich ein erhöhtes Grundlevel an freigesetztem Noradrenalin. Somit wird die Abweichung von einem aktuellen Verhalten ermöglicht, um andere Aufgaben auszuprobieren, die möglicherweise einen größeren Nutzen liefern (Aston-Jones und Cohen 2005).

Darüber hinaus spielt der LC eine zentrale Rolle bei der Kontrolle vielfältiger autonomer Funktionen. Generell führt die zentrale noradrenerge Aktivierung über den LC zu einem gesteigerten Sympathikotonus und einem reduzierten Parasympathikotonus. Zeichen einer Sympathikusaktivierung sind unter anderem erweiterte Pupillen, eine erhöhte Herzfrequenz und ein erhöhter Blutdruck (Szabadi 2013). Aufgrund der pH-Empfindlichkeit coeruleer Neurone dient der LC außerdem als zentraler Chemosensor (Oyamada et al. 1998).

1.2.3. Physiologie coeruleer Neurone

Wie oben bereits beschrieben kann die Aktivität des LC in die beiden Modi „phasisch“ und „tonisch“ eingeteilt werden. Diese sind im Wachzustand aktiv. Im tonischen Modus kommt es zu einzelnen, regelmäßigen Aktionspotentialen mit einer langsamen Frequenz, während es im phasischen Modus zu einer sehr hohen Entladungsrate kommt. Umso höher die Frequenzrate, desto größer ist die Wachsamkeit. Während des Tiefschlafes und REM-Schlafes bleiben die Entladungen komplett aus (Takahashi et al. 2010).

Der tonischen Aktivität der LC Neurone liegt die Fähigkeit zugrunde, intrinsisch Aktionspotentiale zu generieren. Dieser intrinsische Schrittmachermechanismus wurde in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien nachgewiesen (Foote, Aston-Jones und Bloom 1980, Alreja und Aghajanian 1991). Der zugrundeliegende Mechanismus dieser intrinsischen Aktivität ist noch nicht abschließend geklärt, jedoch sind bestimmte Ionenkanäle beteiligt - unter anderem Kalzium Kanäle und Kalzium aktivierte Kalium Kanäle (Matschke et al. 2018).

1.2.4. Rolle des Locus Coeruleus bei der Parkinson-Krankheit

Es liegt nahe, dass die fortschreitende Degeneration des LC bei der PK für einen Teil der prämotorischen Symptome verantwortlich ist. So geben Untersuchungen von García-Lorenzo *et al.* Evidenz dafür, dass der LC in die Pathophysiologie der REM-Schlafverhaltens-Störung bei Parkinson Patienten involviert ist (García-Lorenzo et al. 2013). Des Weiteren scheint der Verlust von noradrenergem Input auf den Neokortex für frühe kognitive Veränderungen verantwortlich zu sein (Vazey und Aston-Jones 2012). Auch die erhöhte Prävalenz von Depression und Angst

bei Parkinson Patienten lässt sich möglicherweise durch eine geringere Innervation des limbischen Systems durch den LC erklären (Remy et al. 2005).

Es existieren insgesamt jedoch nur wenige Artikel über die Rolle des LC bei der PK – insbesondere in Bezug auf den Einfluss und den zeitlichen Verlauf des Neuronenverlustes durch die α -Synukleinopathie im LC von Parkinson Patienten. Ebenso wenige Tiermodelle haben den LC bei der PK untersucht.

1.3. Tiermodelle der Parkinson Krankheit

Es gibt diverse Tiermodelle der PK, um die Pathomechanismen dieser neurodegenerativen Erkrankung besser zu verstehen und um geeignete Therapien zu entwickeln. Toxin-basierte Modelle der PK, welche auf der Zerstörung dopaminerger Neurone basieren, haben einen großen Fortschritt in der Entwicklung von symptomatischen Therapien wie der Dopaminersatztherapie gebracht. Um Medikamente zu entwickeln, welche den Erkrankungsverlauf verlangsamen, aufhalten oder gar rückgängig machen, werden Modelle benötigt, welche die α -Synukleinopathie als zentrales Element der PK besser repräsentieren (Van der Perren, Van den Haute und Baekelandt 2015).

Zu den verwendeten auf α Syn basierenden Modellen zählen transgene Modelle und Modelle, in welchen α Syn-kodierende Gene oder α Syn-Fibrillen in das ZNS eingespeist werden. Um die PK zu simulieren, wurden diverse transgene Mäuse generiert, welche α Syn überexprimieren. Die meisten transgenen Modelle überexprimieren humanes Wildtyp α Syn oder humanes A53T oder A30P α Syn. Die Punktmutationen A53T und A30P finden sich in familiären Formen der PK und stehen in Zusammenhang mit einem frühen und raschen Krankheitsverlauf. Sie besitzen eine erhöhte Aggregationsneigung im Vergleich zu Wildtyp α Syn (Li, Uversky und Fink 2001). In vielen, aber überraschenderweise nicht in allen α Syn überexprimierenden transgenen Mäusen bilden sich intrazelluläre Einschlusskörperchen mit unterschiedlicher anatomischer Verteilung. Die Überexpression von α Syn mit Hilfe viraler Vektoren war einer der ersten Versuche, eine α Syn vermittelte Degeneration dopaminerger Neurone in Säugetieren zu initiieren. Dieser Ansatz wurde mit der Zeit stark weiterentwickelt und wird mittlerweile in Ratten, Mäusen, Schweinen und nicht-humanen Primaten verwendet. Dabei werden Adeno-assoziierte Viren (AAV) standardmäßig als Vektoren verwendet. Die AAV Modelle sind nicht nur für verschiedene

Spezies zugänglich, sondern α Syn lässt sich damit auch gezielt in verschiedenen Hirnregionen überexprimieren (Koprach, Kalia und Brotchie 2017).

Für die prodromale PK gibt es nur wenige Tiermodelle. Henrich *et al.* haben das erste Mausmodell der α -Synukleinopathie im LC etabliert. Mittels rekombinanter Adeno-assoziiierter Viren (rAAV) wird humanes mutiertes A53T- α Syn in LC Neuronen von Wildtyp Mäusen in vivo überexprimiert. Die Injektion von rAAV-A53T- α Syn erfolgt unilateral in den rechten LC. Die gezielte Überexpression von α Syn resultiert in einer progressiven Neurodegeneration noradrenerger Neurone. Darüber hinaus akkumuliert phosphoryliertes α Syn als Indikator für aggregiertes α Syn in der LC Region (Henrich et al. 2018).

1.4. Das neuronale Aktionspotential

Für die Entstehung eines Aktionspotentials (AP) sind diverse spannungsgesteuerte Natrium (Na^+), Kalium (K^+) und Kalzium (Ca^{2+}) Kanäle von Bedeutung. Diese werden durch Depolarisation aktiviert. Wird die Reizschwelle von ca. -55 mV überschritten, werden alle verfügbaren spannungsgesteuerten Na^+ Kanäle geöffnet und die Entstehung eines AP wird initiiert (s. Abbildung 1.3). Dieses Prinzip wird als „Alles-oder-Nichts-Gesetz“ beschrieben. Ein neuronales AP dauert etwa 1-2 ms (Behrends et al. 2017).

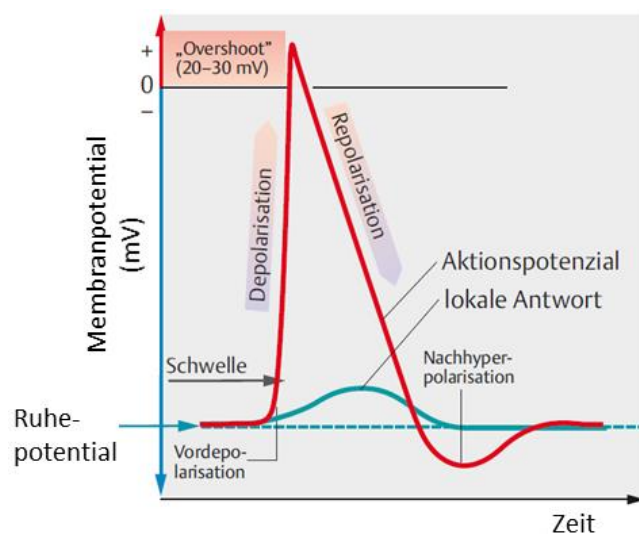


Abbildung 1.3: Das neuronale Aktionspotential.

Sobald das Membranpotential die Reizschwelle (schwarzer Pfeil) überschreitet, werden alle verfügbaren Na^+ Kanäle geöffnet. In der Depolarisationsphase kommt es durch den schnellen Na^+ Einstrom zu einem steilen Aufstrich. Durch die Inaktivierung der Na^+ -Kanäle und die Aktivierung verschiedener K^+ -Kanäle folgt darauf die Repolarisation. Durch einen andauernden K^+ Ausstrom kommt es zur Nachhyperpolarisation. (Quelle: Behrends et al. 2017).

In der Depolarisationsphase kommt es durch die Aktivierung spannungsabhängiger Na⁺ Kanäle zu einem schnellen Na⁺ Einstrom und damit zu einem steilen Anstieg bis zum Maximum des APs bei etwa +30 mV. Diese Na⁺ Kanäle inaktivieren innerhalb weniger als 1 ms wieder. In der Repolarisationsphase sind transiente K⁺ Auswärtsströme (I_{to}) sowie die verzögerten K⁺ Gleichrichterströme (I_{sus}) von Bedeutung, welche durch Depolarisation aktiviert werden. Durch einen andauernden K⁺ Ausstrom kommt es zur fortwährenden Repolarisation des Membranpotentials. Während des AP Peaks öffnen außerdem spannungsgesteuerte Ca²⁺ Kanäle, deren Ca²⁺ Einstrom dann Ca²⁺ abhängige K⁺ Kanäle (K_{Ca}) aktiviert. Der K_{Ca} vermittelte K⁺ Ausstrom bedingt maßgeblich die auf ein AP folgende Nachhyperpolarisation (NHP). In der Refraktärphase sind die Zellen aufgrund inaktiver Na⁺ Kanäle für eine gewisse Zeit nicht oder später nur schwer erregbar (Bean 2007, Sah und McLachlan 1992).

1.5. Die Familie der kaliumselektiven Ionenkanäle

K⁺ selektive Ionenkanäle sind durch ihre selektive Permeabilität für K⁺ gekennzeichnet. Durch das Öffnen von K⁺ Kanälen kommt es zu einem K⁺ Ausstrom, wodurch sich das Membranpotential der Zelle in Richtung des K⁺ Gleichgewichtspotentials verschiebt. Dieses liegt in zentralen Neuronen bei etwa -70 mV. Die K⁺ selektiven Ionenkanäle haben eine zentrale Bedeutung in der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials, der Repolarisation und Hyperpolarisation des APs (Hille 2001).

Es gibt eine Vielzahl verschiedener K⁺ selektiver Ionenkanäle: die spannungsabhängigen K⁺ Kanäle (Kv), die Ca²⁺ aktivierten K⁺ Kanäle (K_{Ca}), die einwärtsrektifizierenden K⁺ Kanäle (K_{ir}) und die Zwei-Poren-Domänen K⁺-Kanäle (K_{2P}) (Gutman et al. 2005).

1.5.1. Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle (Kv Kanäle)

Charakteristisch für die Kv Kanäle ist die Sensitivität gegenüber Spannungsänderungen der Zellmembran. Durch Depolarisation des Membranpotentials werden sie aktiviert und durch Repolarisation oder anhaltende Depolarisation deaktiviert (Hille 2001).

Die Kv Kanäle können durch verschiedenste Zusammensetzungen der Untereinheiten, welche Einfluss auf die Kinetik der Aktivierung, Deaktivierung und Inaktivierung haben, unterschieden werden. Es gibt zwei verschiedene Formen der Inaktivierung: die C-Typ Inaktivierung und die N-

Typ Inaktivierung. Bei der langsamen C-Typ Inaktivierung finden Konformationsänderungen des Kanalfilters und des extrazellulären Kanaleingangs statt. Die schnelle N-Typ Inaktivierung beschreibt den „ball and chain“-Mechanismus, bei dem eine Aminosäuresequenz die intrazelluläre Kanalpore verschließt und so den Durchtritt von Ionen verhindert (Kurata und Fedida 2006). Die C-Typ Inaktivierung ist charakteristisch für die verzögerten Kaliumgleichrichterkanäle, die mit einer gewissen Verzögerung nach Membrandepolarisation aktiviert werden und einen anhaltenden K^+ Ausstrom (I_{sus} , englisch für *sustained*) vermitteln. Die N-Typ Inaktivierung beschreibt die A-Typ Kaliumkanäle. Der schnelle, transiente A-Typ Strom, der als I_A oder I_{to} (englisch für *transient outward*) bezeichnet wird, wird durch depolarisierende Sprünge ausgehend von einem hyperpolarisiertem Haltepotential aktiviert und zeigt durch die schnelle Inaktivierung einen deutlichen Peak. Durch diese Eigenschaften sind sowohl die verzögerten Kaliumgleichrichterkanäle als auch die A-Typ K^+ Kanäle in der Lage die Entladungsfrequenz spontan-aktiver Neurone zu regulieren (Rudy 1988).

1.5.2. Kalzium-aktivierte Kaliumkanäle (K_{Ca} Kanäle)

Die K_{Ca} Kanäle werden durch einen intrazellulären Ca^{2+} Anstieg aktiviert und lassen daraufhin K^+ aus der Zelle strömen. Dieser K^+ Ausstrom führt über Repolarisation des Membranpotentials zur Deaktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+} Kanäle und zur Aktivierung von Na^+/Ca^{2+} Austauschern und damit zu einem reduzierten Ca^{2+} Einstrom. K_{Ca} Kanäle sind somit auch wichtige Regulatoren der intrazellulären Ca^{2+} Homöostase (Berkefeld, Fakler und Schulte 2010).

Es werden zwei Subtypen der K_{Ca} Kanäle unterschieden – K_{Ca} Kanäle mit großer Einzelkanalleitfähigkeit (BK) und K_{Ca} Kanäle mit kleiner Einzelkanalleitfähigkeit (SK). Die BK Kanäle regulieren einerseits den Tonus glatter Muskelzellen und die Abwehr von Mikroorganismen in Leukozyten sowie die Freisetzung von Hormonen und Transmittern. In zentralen Neuronen haben sie eine zentrale Funktion in der Repolarisation von APs und vermitteln die schnelle Phase der Nachhyperpolarisation (NHP) nach einem Aktionspotential (Berkefeld, Fakler und Schulte 2010).

Ebenso haben die SK Kanäle eine Vielzahl an Aufgaben von der Kontrolle der uterinen Kontraktilität und des Gefäßtonus, die Modulation der Hormonsekretion, die Kontrolle des Volumens roter Blutzellen bis hin zur Aktivierung von Mikroglia und Lymphozyten. In zentralen Neuronen regulieren sie die Erregbarkeit, das Entladungsmuster und die synaptische Signaltransduktion (Berkefeld et al. 2010). SK Kanäle haben eine wichtige Rolle in der Modulation der NHP erregbarer Zellen und regulieren so die AP-Frequenz. Ihr Vorliegen ist mit

Neurotransmitter-Rezeptoren, wie NMDA-Rezeptoren und nikotinergen Acetylcholinrezeptoren assoziiert. Werden diese ionotropen Rezeptoren aktiviert, kommt es zum Ca^{2+} Einstrom und die SK Kanäle werden aktiviert. Die SK Kanäle wirken daraufhin dem evozierten synaptischen Potential entgegen und können so maßgeblich zur Regulation der neuronalen Erregbarkeit beitragen (Dolga und Culmsee 2012). Ebenso sind SK Kanäle in LC Neuronen wichtige Regulatoren der intrinsischen Schrittmacheraktivität, indem sie einen Großteil der NHP in diesen Zellen vermitteln (Matschke et al. 2018).

1.6. Zielsetzung

Ziel des vorliegenden Projektes ist es, zur Prävention der PK beizutragen. Hierfür müssen die Krankheitsmechanismen vor Ausbruch der Erkrankung verstanden werden. Diese Arbeit soll helfen, die Rolle des LC bei der PK – insbesondere im prodromalen Stadium – besser zu verstehen. Hierbei liegt der Fokus auf den zeitabhängigen Veränderungen der elektrischen Aktivitätsmuster der noradrenergen LC Neurone in einem Mausmodell der prodromalen PK.

Als Grundlage für die elektrophysiologischen Messungen diente das von Henrich *et al.* etablierte prämotorische Mausmodell der PK, in welchem A53T- α Syn im LC mittels Adeno-assoziiierter Viren überexprimiert wurde (Henrich et al. 2018). In der Vergleichsgruppe wurde das Kontrollprotein Luziferase überexprimiert. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die Effekte nach Injektion speziell auf die α Syn Überexpression und nicht allgemein auf eine Proteinüberexpression zurückzuführen sind. Wir untersuchten im zeitlichen Verlauf die elektrophysiologischen Veränderungen von LC Neuronen durch Patch-Clamp-Messungen im akuten Hirnstamm-Schnitt.

Im Rahmen dieser elektrophysiologischen Messungen sollte das spontane Aktivitätsmuster und die verschiedenen Charakteristika der Aktionspotentiale nach α Syn und Luziferase Überexpression analysiert werden. Anschließend sollten mögliche Veränderungen verschiedener Stromkomponenten am Aktionspotential untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Versuchstiere

Für das Tiermodell wurden adulte männliche Mäuse des Stammes C57BL/6N (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Körpergewicht von 20-25 g verwendet. Diese Tiere wurden zu Beginn in Gruppen von bis zu fünf Tieren bei einem 12 Stunden Tag/ 12 Stunden Nacht Zyklus mit Futter und Wasser *ad libitum* gehalten. Nach Injektion der Vektoren erfolgte die Unterbringung in Einzelkäfigen. Zum Zeitpunkt der Injektion waren die Tiere 9 Wochen alt. Die Pflege der Tiere sowie alle durchgeführten Experimente waren in Übereinstimmung mit den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes (neugefasst im Jahre 2006) und wurden vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt.

2.1.2. Lösungen

2.1.2.1. Lösungen Elektrophysiologie

Präparationslösung	2,5 mM KCl, 1,25 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM PIPES, 10 mM Glucose, 200 mM Saccharose, 0,5 mM CaCl ₂ , pH 7,35 mit NaOH
Artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit (ACSF)	125 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 25 mM NaHCO ₃ , 1,25 mM NaH ₂ PO ₄ , 2 mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , 25 mM D-Glucose, pH 7,4 mit 95 % O ₂ /5 % CO ₂
Pipettenlösung	135 mM KGlucose, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 0,1 mM EGTA, 2 mM MgCl ₂ , 2mM MgATP, 0,2 mM Li ₂ GTP, 0,1 % Neurobiotin, pH 7,4 mit KOH
Gabazin-Stock	10 mM Gabazin in <i>aqua dest.</i>
CGP-Stock	10 mM CGP in <i>aqua dest.</i>
AP-5-Stock	20 mM AP-5 in <i>aqua dest.</i>
NBQX-Stock	5 mM NBQX in <i>aqua dest.</i>

2.1.2.2. Lösungen Immunhistochemie

10x phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ , 20 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4 mit NaOH, steril filtriert und autoklaviert
4% Paraformaldehyd	4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS, pH 7,4
Aufbewahrungslösung	30 % (w/v) Saccharose in PBS
0,1 M PB-Puffer	22 mM NaH ₂ PO ₄ und 77 mM Na ₂ HPO ₄ in <i>aqua dest.</i> , pH 7,4
0,3%-Triton-PB-Lösung	0,3 ml Triton in 99,7 ml 0,1 M PB-Puffer
Blocker-Lösung/Träger-Lösung	0,3 % Triton-PB (0,1 %)-Lösung, Eselserum
<i>Antifreeze</i>	400 ml destilliertes Wasser, 300 ml Ethylenglycol, 300 ml Glycerin, 1,57 g Natriumdihydrogenphosphatdihydrat, 5,18 g Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat

2.1.3. Enzyme und Antikörper

Primär AK TH	Anti-tyrosine hydroxylase, rb Hersteller: Millipore Artikel-Nr: AB 152 (Verdünnung 1:1000)
Primär AK Luziferase	Luciferase, goat Hersteller: Novus Artikel-Nr: NB 100-1677, 100 µg (Verdünnung 1:250)
Primär AK aSyn	Ms mAB anti-human α-synuclein, Syn211 Hersteller: Life technologies Artikel-Nr: AHB 0261 (Verdünnung 1:1000)

Sekundär AK TH	Alexa 488 anti-rabbit Hersteller: Invitrogen Artikel-Nr: A21206 (Verdünnung 1:500)
Sekundär AK Luziferase	Cy3-conjugated donkey, anti-goat Hersteller: Dianova Artikel-Nr: 705-165-147 (Verdünnung 1:500)
Sekundär AK aSynuklein	Cy ³ -conjugated Affini Pure Donkey, anti-mouse Artikel-Nr: 715-165-150 Hersteller: Dianova (Jackson) (Verdünnung 1:500)
Streptavidin	Streptavidin-AlexaFluor 647 Hersteller: Dianova Artikel-Nr: 016-600-084 (Verdünnung 1:500)

2.1.4. Sonstige Hilfsmittel

Eindeckmedium	Polyvinylalkohol-Einbettungsmittel mit DABCO Hersteller: Sigma-Aldrich
---------------	---

2.2. Injektion rekombinanter Adeno-assoziiierter Viren

Den Tieren wurden zwei verschiedene rekombinante Adeno-assoziierte Viren (AAV) injiziert. Diese trugen das Genom für humanes mutiertes A53T- α Syn oder das Kontrollprotein Luziferase (Abbildung 2.1 A). Zum Zeitpunkt der Injektion waren die Tiere 9 Wochen alt. Die stereotaktische Injektion der Vektoren erfolgte unilateral in den rechten LC (Abbildung 2.1 C).

Die AAVs wurden durch den mit einem Cytomegalievirus (CMV) kombinierten Promotor CBA (*Chicken β -actin*) gesteuert, der die Expression entweder von A53T- α Syn oder Luziferase regulierte. Um eine hohe Transkriptionsrate zu erreichen, enthielt der Vektor ein posttranskriptionell regulatorisches Element (WPRE für „woodchuck hepatitis virus

posttranscriptional regulatory element“). Der Vektor war zudem aus einer ITR-Sequenz (“inverted terminal repeat“) und einer BGH-pA-Sequenz (“bovine growth hormone polyadenylation sequence“) aufgebaut (Abbildung 2.1 B).

Die stereotaktischen Injektionen erfolgten durch Henrich *et al.* in der Klinik für Neurologie am Universitätsklinikum Marburg (Henrich et al. 2018).

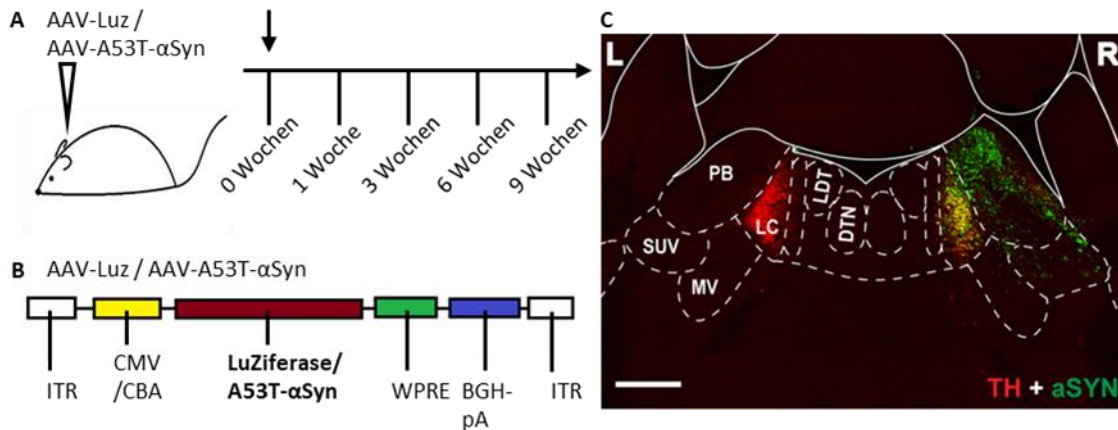


Abbildung 2.1: Versuchsaufbau.

(A) zeigt den zeitlichen Ablauf des Experiments. Nachdem den adulten Tieren zum Zeitpunkt 0 Wochen AAV-A53T- α Syn oder AAV-Luziferase stereotaktisch in den LC injiziert wurde, erfolgten elektrophysiologische Messungen nach 1, 3, 6 und 9 Wochen.

(B) Aufbau des rekombinanten Adeno-assoziierten Vektors (AAV). Der CMV/CBA Promotor (*Chicken β -actin* Promoter kombiniert mit dem eines Cytomegalievirus) steuerte die Expression entweder von A53T- α Syn oder Luziferase als Kontrollprotein. ITR: *inverted terminal repeat*. WPRE: *woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*; BGH-pA: *bovine growth hormone polyadenylation sequence*.

(C) Überblick über den pontinen Hirnstamm mit Färbungen gegen TH (rot) und humanes α Syn (grün) 3 Tage nach Virusinjektion. Die stereotaktische Injektion erfolgte unilateral in den rechten LC (Abbildung: Henrich et al. 2018). L: links, R: rechts, PB: Ncl. parabrachialis, SUV: Ncl. vestibularis superior, MV: Ncl. vestibularis medialis, LC: Locus Coeruleus, DTN: Ncl. tegmentalis dorsalis, LDT: Ncl. Tegmentalis laterodorsalis. Scale-Bar 500 μ m.

2.3. Elektrophysiologische Messungen

Die elektrophysiologischen Messungen wurden 1, 3, 6 und 9 Wochen nach Injektion der Vektoren durchgeführt (Abbildung 2.1 A).

2.3.1 Narkose und Präparation akuter Hirnschnitte

Unter Isofluran-Narkose wurde den Tieren intraperitoneal 1 ml einer Ketamin/Xylazin-Mischung injiziert. Nach Überprüfung der Reflexfreiheit wurde das Herz freipräpariert und transkardial die eiskalte Präparationslösung (siehe 2.1.2.1) perfundiert.

Die Mäuse wurden anschließend dekapitiert. Der Schädel wurde durch einen Schnitt entlang der Sutura Sagittalis eröffnet. Das Gehirn wurde sowohl zügig als auch vorsichtig herausgenommen und in die 0 °C kalte Präparationslösung überführt, um den metabolischen Stress der Neurone während der ischämischen Präparationsphase durch die hohe Zucker- und Magnesiumkonzentration in der Lösung herabzusetzen. Nach Entfernung des Frontalhirns mit einem koronaren Schnitt wurde der Hirnstammblock auf einem Schneideblock mittels Sekundenkleber fixiert. Die Präparation erfolgte auf Eis, um eine schnelle Kühlung des Gewebes zu erreichen.

Anschließend wurde der Hirnstammblock mittels des Vibratoms 7000 smz-2 (Campden Instruments, England) in koronare Hirnstammschnitte von 220 µm Dicke geschnitten. Die rechte Seite der Schnitte wurde vorsichtig mit einem kleinen Loch mit ausreichendem Abstand zum LC markiert, um diese nach dem Überführen in die Messkammer wiederzuerkennen. Pro Tier konnten in der Regel 2- 3 Schnitte, die den LC enthielten, visuell identifiziert werden. Daraufhin wurden die frischen Hirnstammschnitte zur Regeneration für 1 Stunde bei 30 °C in ACSF belassen und mit 95 % O₂/5 % CO₂ begast, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Neurone und einen konstanten pH-Wert von 7,4 zu gewährleisten. Für die elektrophysiologischen Messungen wurden die Schnitte in die Messkammer überführt und weiterhin kontinuierlich mit ACSF superfundiert.

2.3.2. Aufbau des Messtandes

2.3.2.1. Mikroskop und Bildaufzeichnung

Die elektrophysiologischen Messungen an Neuronen des LC im akuten Hirnschnitt wurden mittels der Patch-Clamp-Technik (Sakmann and Neher 1984) durchgeführt.

Aufgrund der Erschütterungsempfindlichkeit der elektrophysiologischen Messungen war der Messtand auf einem schwingungsgedämpften Tisch platziert und befand sich innerhalb eines Faradaykäfigs zur elektrischen Abschirmung.

Zur Mikroskopie wurde das aufrechte Zeiss Examiner.D1 Mikroskop (Carl Zeiss Microscopy, LLC, United States) verwendet. Unterhalb der Objektive befand sich der Objektisch mit der Aufzeichnungskammer. Diese Kammer verfügte über einen Zu- und Abfluss für die ACSF, die

somit kontinuierlich ausgetauscht werden konnte. Das Bild wurde mit einer Zeiss AxioCam MRm Kamera (Carl Zeiss Microscopy, LLC, United States) aufgezeichnet. Mit Hilfe der AxioVision-Software (Carl Zeiss Microscopy, LLC, USA) wurde die Durchführung der Patch-Clamp-Experimente am Monitor beobachtet.

2.3.2.2. Messpipetten und Pipettenhalterung

Die Patchpipetten wurden aus Borosilikat Glaskapillaren mit Filament GB 150TF- 8P (Science Products, Hofheim, Germany) mit Hilfe des Pipettenziehgerätes „DMZ-Universal Puller“ (Zeitz-Instruments, Deutschland) geformt. Der Widerstand der Messpipettenspitzen betrug 2,5-5 M Ω . Die mit intrazellulärer Flüssigkeit befüllte Patchpipette wurde daraufhin so in der Pipettenhalterung befestigt, dass ein chlorierter Silberdraht als Ableitelektrode in die intrazelluläre Flüssigkeit tauchte. Ein weiterer chlorierter Silberdraht diente als Referenzelektrode und wurde in der Badlösung platziert. Die Ableitelektrode wurde regelmäßig innerhalb einer 3 M-KCl-Lösung rechloriert.

Der Kontakt der Referenzelektrode zur Badlösung wurde über eine 150 mM K⁺-Agar-Brücke hergestellt. Diese verhinderte die Chlorid Diffusion und stabilisierte das Potential zwischen Referenzelektrode und Badlösung.

Die Pipettenhalterung mit integriertem Vorverstärker (CV203BU Headstage, Molecular Devices, LLC, USA) und damit die Patchpipette konnte über einen elektronischen Mikromanipulator („PatchMan NP2“, Eppendorf AG, Deutschland) präzise bewegt werden.

2.3.2.3. Datenaufnahme

Das Signal des Vorverstärkers wurde durch den MultiClamp 700B Verstärker (Molecular Devices, Sunnyvale CA, USA) intensiviert. Die Daten wurden mit einer Digitalisierungsfrequenz von 10 kHz mit dem Analog-Digital-Wandler Digidata 1440A (Molecular Devices, Sunnyvale CA, USA) aufgezeichnet und bei 1-5 kHz gefiltert. Vor Beginn jeder Messung wurde das „Offset-Potenzial“, welches an Übergängen zwischen der Ableitelektrode, der Pipettenlösung, der Badlösung und der Referenzelektrode entsteht, ausgeglichen.

Die Aufzeichnung der Messdaten erfolgte mit Hilfe der „Clampex 10.5“ Software (Molecular Devices, Sunnyvale CA, USA).

Alle *Whole-Cell* Messungen erfolgten bei einem Serienwiderstand von maximal 30 M Ω . Stieg der Serienwiderstand während der Messungen auf mehr als 30 M Ω an, so wurden die Daten verworfen. (vgl. 2.3.3.2)

2.3.3. Das Patch-Clamp-Verfahren

Die akuten Hirnschnitte wurden in die Messkammer überführt und mit Hilfe einer sogenannten Harfe fixiert. Es wurden zur elektrophysiologischen Messung geeignete, oberflächlich liegende LC Neurone anhand ihrer Morphologie mit vergleichsweise großen Somata identifiziert (Abbildung 2.2).

Alle Messungen wurden unter Anwesenheit von synaptischen Blockern durchgeführt, um intrinsische Aktivitäten zu isolieren. Es wurde Gabazin als GABA_A-Rezeptor-Antagonist, CGP als GABA_B-Rezeptor-Antagonist, AP-5 als NMDA-Rezeptor-Antagonist und NBQX als AMPA-Rezeptor-Antagonist verwendet.

Es gibt verschiedene Patch-Clamp Konfigurationen, um die Strom- oder Spannungsveränderungen eines Membranfleckes (*On-Cell*, *Inside-Out*, *Outside-Out*) oder der gesamten Zelle (*Whole-Cell*, *Perforated-Patch*) zu untersuchen. Zur elektrophysiologischen Charakterisierung der LC-Neurone wurde die *Whole-Cell* Konfiguration verwendet. Hierfür muss zuerst eine *On-Cell* Konfiguration hergestellt werden (s. Abbildung 2.3).

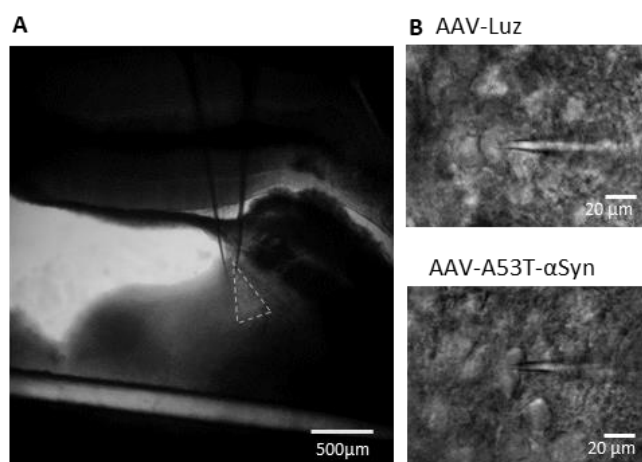


Abbildung 2.2: Erscheinungsbild der LC-Neurone unter dem Mikroskop während der Patch-Clamp-Messungen.

(A) Die Patchpipette nähert sich im Hirnschnittpräparat dem rechten LC (gestrichelte Linie), welcher sich am Rand des Vierten Ventrikels befindet. **(B)** Exemplarische Darstellung eines gepatchten LC-Neurons nach AAV-Luziferase und AAV-A53T-αSyn Überexpression.

2.3.3.1. Die *On-Cell* Konfiguration

Die Pipette wurde mit sterilfiltrierter Pipettenlösung befüllt und in der Pipettenhalterung eingespannt. Nach Anlegen eines leichten Überdrucks, um eine Kontamination der Pipettenöffnung zu verhindern, wurde die Messpipette in die Badlösung getaucht. Unter visueller Kontrolle und mit Hilfe des Mikromanipulators wurde die Pipette direkt vor dem ausgewählten Neuron platziert, sodass die Zellwand eine kleine Delle bildete. Es wurde vorsichtig ein Unterdruck erzeugt, bis sich ein Abdichtwiderstand zwischen Messpipette und

Zellmembran von mindestens 750 M Ω bis hin zu mehreren G Ω aufbaute. Dies entsprach dem *Gigaseal* und damit der *On-Cell*-Konfiguration. Die Ausbildung des Gigaseals wurde anhand der Änderung der Stromantwort auf einen Testpuls verfolgt und durch das Anlegen einer negativen Spannung von bis zu -60 mV unterstützt. Mit Hilfe des Verstärkers wurde die schnelle Kapazitätskomponente (C_{fast}) korrigiert.

2.3.3.2. Die *Whole-Cell* Konfiguration

Durch einen kurzen stärkeren Unterdruck wurde der Membranfleck unter der Messpipette aufgebrochen und die Zelle so in die *Whole-Cell*-Konfiguration überführt. Dieser Vorgang konnte durch Änderung der Stromantwort auf den Testpuls beobachtet werden. Dabei nahmen die kapazitiven Ströme zu. Diese langsame Kapazitätskomponente (C_{slow}) wurde ebenfalls korrigiert (vgl. 2.3.4.3.). Vor und nach den Messungen wurde zudem der Serienwiderstand (R_s) kontrolliert. Der R_s , welcher in Serie zu dem Membranwiderstand liegt, gibt Auskunft über die Qualität des Zugangs zur Zelle. Ein großer R_s zeigt an, dass Membranfragmente in die Öffnung der Patchpipette gelangt sind und führt dazu, dass ein Teil des Kommandopotentials bereits an ihm abfällt. Da so keine gute Spannungskontrolle der Zelle möglich ist, wurden nur Messungen mit einem R_s von höchstens 30 M Ω verwendet.

In der *Whole-Cell* Konfiguration diffundierte die Pipettenlösung inklusive Neurobiotin in die jeweils gemessene Zelle. Nach Beendigung der Patch-Clamp Messung wurde sichergestellt, dass sich die Zelle wieder verschloss. Somit konnten die gemessenen Zellen später immunhistochemisch gefärbt werden (vgl. 2.4.2).

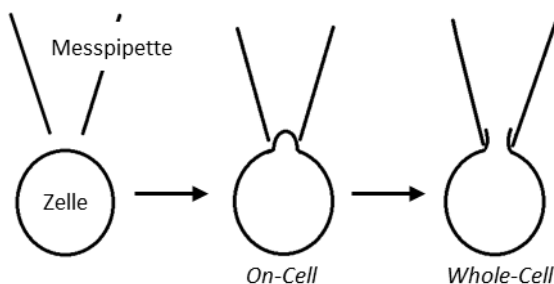


Abbildung 2.3: Patch-Clamp Konfigurationen

Dargestellt sind verschiedene Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik. Nach Annäherung der Messpipette an die Zelle, wird durch Unterdruck die *On-Cell* Konfiguration erzeugt. Durch Aufreißen des Membranflecks unter der Messpipette entsteht die *Whole-Cell* Konfiguration.

2.3.4. Messprotokolle

2.3.4.1. Die Spannungsklemme (*Voltage-Clamp*)

Die Spannungsklemme ist eine Messmethode zur Registrierung von Strömen an Zellmembranen. In der vorliegenden Arbeit wurden die transienten K^+ Auswärtsströme, die verzögerten K^+ Gleichrichterströme und die K_{Ca} Ströme der LC Neurone untersucht. Dabei wurde die Stromantwort auf depolarisierende oder hyperpolarisierende Spannungssprünge analysiert.

Bei der Spannungsklemme wird eine vorgegebene Kommandospannung kontinuierlich mit der Transmembranspannung der Zelle verglichen. Entsteht durch das Öffnen von Ionenkanälen eine Spannungsdifferenz, wird diese durch den angeschlossenen Operationsverstärker errechnet und hoch verstärkt an seinem Ausgang abgegeben. Es wird ein kompensatorischer Strom erzeugt, solange bis die Differenz wieder ausgeglichen ist. Dieser Strom wird über den Spannungsabfall an einem Rückkopplungswiderstand gemessen. Da der Kompensationsstrom und nicht der tatsächlich über die Zellmembran fließende Strom auf dem Monitor visualisiert wird, verläuft dieser mit identischer Intensität in die entgegengesetzte Richtung.

2.3.4.2. Die Stromklemme (*Current-Clamp*)

Mit Hilfe der Stromklemme in der *Whole-Cell* Konfiguration wurde die Membranspannung und damit die Spontanaktivität der LC Neurone gemessen. Somit konnten die Feuerrate, die APs und das Ruhemembranpotential analysiert werden.

Bei der Stromklemme wird der transmembranäre Strom der Zelle vorgegeben und konstant gehalten. Der Verstärker arbeitet ähnlich wie bei der Spannungsklemme. Nur wird in diesem Fall eine Ausgleichsspannung generiert, die der Verstärker aufzeichnet und die proportional zur Spannungsänderung der Zelle ist.

2.3.4.3. Kapazitätskorrektur

Die Kapazität ist definiert als diejenige Ladungsmenge, die benötigt wird, um das elektrische Potential eines Gegenstandes zu verändern. Bei jeder Spannungsänderung geht etwas Zeit für die kapazitive Umladung verloren. Die Kapazität des Vorverstärkers wird durch zusätzliche Korrekturschaltkreise herabgesetzt. Zudem spielen die kapazitiven Eigenschaften der Patchpipette sowie der Zellmembran eine wichtige Rolle. Eine Änderung der Kommandospannung bewirkt zunächst die Umladung der Kapazitäten von Pipette und Zellmembran, bevor das Membranpotential geändert wird. Als Antwort auf den Testpuls zeigen

sich in der *On-Cell* Konfiguration schnelle, kapazitive Ströme von Pipette und Pipettenhalterung. In der *Whole-Cell* Konfiguration zeigen sich langsamere Umladeströme der Zellmembran. Da diese kurzzeitigen Umladeströme die eigentlichen Messsignale stören, wurden sie durch zwei automatische Korrekturmechanismen des MultiClamp 700B Verstärkers ausgeglichen.

Die spezifische Kapazität biologischer Zellmembranen ist mit $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ für alle Zellen ungefähr gleich. Der Wert der langsamen Kapazität ist damit ein direktes Maß für die Membranfläche und damit die Zellgröße.

2.3.5. Datenanalyse

Die Daten wurden mit Hilfe der „Clampfit 10.5“ Software (Molecular Devices, Sunnyvale CA, USA) analysiert. Die weitere Auswertung erfolgte mit den Softwareprogrammen „Office Excel 2013“ (Microsoft) und OriginPro (OriginLab Corporation, Guangzhou, China).

2.4. Immunhistochemische Methoden

2.4.1. Aufbewahrung der gepatchten Hirnschnitte

Die Schnitte wurden nach den elektrophysiologischen Messungen für zwei bis drei Tage in 4 % Paraformaldehyd fixiert und anschließend in einer Aufbewahrungslösung mit 30 % Saccharose gelagert.

2.4.2. Immunfluoreszenz-Färbung

Für die immunhistochemische Färbung wurden die 200 μm dicken Hirnschnitte mit dem Kryostat Leica CM3050 S (Nussloch, Deutschland) in 20 μm dicke Schnitte geschnitten und anschließend in der Antifreeze-Lösung bei 4 °C aufbewahrt.

Anschließend wurden die Neurone gegen Tyrosinhydroxylase (TH), Neurobiotin und αSyn immunhistochemisch gefärbt. Somit konnte nach den elektrophysiologischen Untersuchungen stichprobenartig überprüft werden, ob die gepatchten Neurone TH-positive LC Neurone sind und αSyn überexprimierten.

2.4.2.1. Dreifach-Färbung gegen Tyrosinhydroxylase, Neurobiotin und α -Synuklein

Am ersten Tag wurden die Hirnschnitte dreimal für jeweils fünf Minuten mit etwa 4 ml PB-Lösung gewaschen und mit der Blocker-Lösung in 1 ml Well-Platten bei Raumtemperatur und auf dem langsamen Schüttler für 60 Minuten präinkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem α Syn Primär Antikörper (AK) in der Verdünnung 1:1000. Hierfür wurde der AK entsprechend der Verdünnung der Träger-Lösung zugegeben und die Schnitte wurden darin in 1 ml Well-Platten bei 4 °C und auf dem langsamen Schüttler für zwei Tage inkubiert. Am zweiten Tag des Färbevorgangs wurde der TH Primär AK entsprechend der Verdünnung 1:1000 zu den Ansätzen appliziert. Am dritten Tag wurden die Schnitte dreimal fünf Minuten mit etwa 4 ml PB-Lösung und einmal fünf Minuten mit etwa 4 ml Triton-PB-Lösung gewaschen. Im Anschluss wurden die Schnitte mit den Sekundär AK und Streptavidin für zwei Stunden bei Raumtemperatur, auf dem langsamen Schüttler und mit Alufolie verpackt inkubiert. Die Inkubationslösung bestand aus der Träger-Lösung mit dem Streptavidin, dem TH Sekundär AK und dem α Syn Sekundär AK jeweils in der Verdünnung 1:500. Streptavidin bindet das intrazellulär akkumulierte Neurobiotin. Nach einem erneuten Waschvorgang, bestehend aus fünfmal fünf Minuten mit etwa 4 ml Triton-PB-Lösung in Alufolie verpackt, wurden die Hirnschnitte auf Objektträger aufgezo-gen. Dies erfolgte in einer mit Natriumchlorid gefüllten Schale. Nach dem Trocknen der Schnitte wurden diese mit dem Einbettungsmittel eingedeckelt und bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

2.4.3. Mikroskopie

Die Kolokalisationsanalyse wurde mittels eines AxioImager M2 Mikroskops (Zeiss) durchgeführt. Dieses war mit EC Plan-Neofluar Objektiven (2,5x/0,085 M27, 5x/0,16 M27, 10x/0,3 M27, 20x/0,50 M27, 40x/1,30 Oil) und den Filtern 43 HE Cy 3 shift free, 38 HE eGFP shift free und 50 Cy 5 shift free ausgestattet. Die Bilder wurden mit Hilfe der Kamera AxioCam 503 color (Zeiss) und der Software ZEN 2 pro (Zeiss) aufgenommen. Die Bildbearbeitung erfolgte mit der Software „ImageJ win64“.

2.5. Statistische Auswertungen

Die in dieser Arbeit aufgeführten Mittelwerte, Standardfehler und Signifikanzlevel wurden mit Hilfe des Programms Excel (Microsoft) berechnet.

Zunächst erfolgte die Testung der Datensätze auf Normalverteilung mittels des Shapiro-Wilk Tests. In normalverteilten Datensätzen wurde die statistische Signifikanz mit Hilfe des Student's *t*-Tests überprüft. Die nicht-normalverteilten Datensätze wurden mittels des Mann-Whitney U Tests analysiert. Diese beiden Tests ermittelten den p-Wert. Umso kleiner der p-Wert ist, desto höher ist die Signifikanz. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant gewertet und mit * markiert. Als weitere Signifikanzniveaus wurden $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***) festgelegt. Die Graphiken wurden mit dem Programm OriginPro7 (OriginLab, Northhampton, USA) erstellt.

3. Ergebnisse

3.1. Immunhistochemische Kontrollfärbungen

3.1.1. Gepatchte Neurone sind Tyrosinhydroxylase-positiv

Nach den elektrophysiologischen Messungen wurde stichprobenartig überprüft, ob es sich bei den gepatchten und somit mit Neurobiotin gefüllten Neuronen um LC Neurone handelt. Dies wurde mittels einer immunhistochemischen Färbung gegen Neurobiotin und TH durchgeführt. TH findet sich in Zellkörpern von dopaminergen und noradrenergen Neuronen und somit auch in den noradrenergen Neuronen des LC (Pickel et al. 1975). Die immunhistochemischen Färbungen verifizierten, dass alle überprüften Zellen, die gepatcht wurden, sich in der TH-positiven LC-Region befanden und TH-positiv waren (s. Abbildung 3.1.A). Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass es sich bei den untersuchten Zellen um noradrenerge Neurone des LC handelt. Dies bestätigte die korrekte Auswahl der Neurone während des Patch-Clamp-Verfahrens.

A AAV-A53T- α Syn

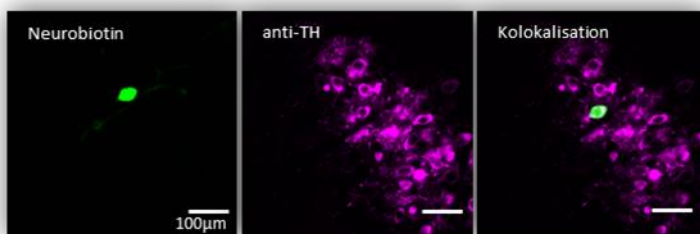
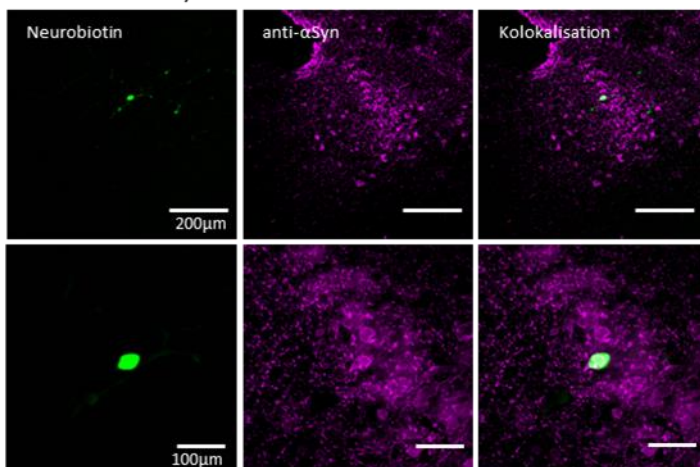


Abbildung 3.1: Immunhistochemische Kontrollfärbungen nach den elektrophysiologischen Messungen.

(A) Exemplarische Darstellung eines gepatchten LC Neurons 6 Wochen nach AAV-A53T- α Syn Injektion. Nach den elektrophysiologischen Messungen wurde stichprobenartig überprüft, ob das gepatchte und mit Neurobiotin gefüllte Neuron (grün-gefärbt) ein TH-immunoreaktives LC-Neuron (magenta-gefärbt) ist.

B AAV-A53T- α Syn



In **(B)** ist die immunhistochemische Färbung von Neurobiotin (grün-gefärbt) und α Syn (magenta-gefärbt) eines gepatchten Neurons (Zeitpunkt: 6 Wochen nach AAV-A53T- α Syn Injektion) in 10-facher (oben) und 40-facher (unten) Vergrößerung dargestellt. Die Kolokalisation bestätigt, dass das elektrophysiologisch untersuchte Neuron α Syn-positiv ist.

3.1.2. Gepatchte Neurone sind α -Synuklein-positiv

Darüber hinaus war für diese Arbeit von Interesse, ob die untersuchten Zellen der A53T- α Syn Gruppe tatsächlich α Syn überexprimierten. Henrich *et al.* hatten bereits bei der Etablierung des prämotorischen Mausmodelles gezeigt, dass die Infektionsrate nach Virusinjektion für A53T α Syn etwa 85% betrug (Henrich et al. 2018). Diese Beobachtung konnte mittels der immunhistochemischen Färbungen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Wie die beispielhaft in Abbildung 3.1 B dargestellte Kolo-kalisation von Neurobiotin und α Syn zeigt, wurde α Syn erfolgreich im LC überexprimiert und die gepatchten TH-positiven LC Neurone waren auch α Syn-positiv.

3.2. Spontanaktivität der Locus Coeruleus Neurone

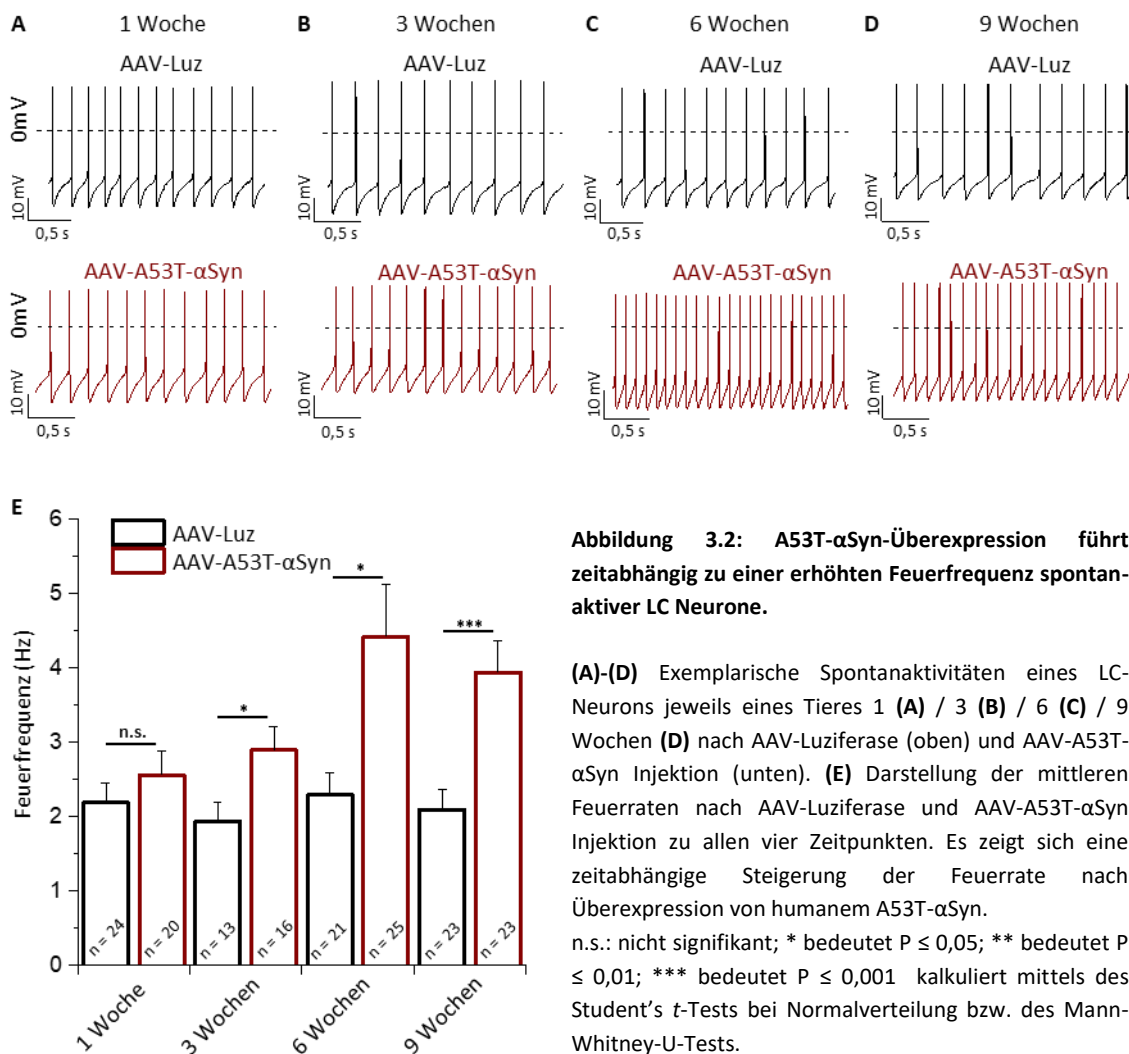
Die Spontanaktivität der LC Neurone wurde bei Raumtemperatur in der *Whole-Cell* Konfiguration aufgezeichnet. Die ACSF enthielt Antagonisten glutamaterger und GABAerger Rezeptoren, um zu gewährleisten, dass das autonome Aktivitätsmuster nicht durch synaptische Eingänge verändert ist (Williams et al. 1984). Alle untersuchten Zellen waren spontan-aktiv. Es wurden die Feuerfrequenz und die einzelnen APs analysiert. Insgesamt wurden in der α Syn und Luziferase Gruppe zu allen vier Zeitpunkten nach Injektion 165 Zellen ausgewertet.

3.2.1. Überexpression von A53T- α -Synuklein führt zeitabhängig zu einer erhöhten Feuerrate spontan-aktiver Locus Coeruleus Neurone

In einem Mausmodell, welches α Syn überexprimiert (A53T-SNCA), zeigte sich eine erhöhte intrinsische Schrittmacheraktivität dopaminergener Neurone der Substantia nigra (Subramaniam et al. 2014). Um zu überprüfen, ob die virale Überexpression des A53T- α Syn einen ähnlichen Effekt auf die Elektrophysiologie von LC Neuronen hat, wurde in dieser Arbeit die intrinsische Schrittmacheraktivität der noradrenergen Neurone des LC zu vier verschiedenen Zeitpunkten nach Vektor-Injektion untersucht.

Die Frequenz der spontan-aktiven LC Neurone wurde in der *Whole-Cell Current-Clamp* Konfiguration einheitlich nach zwei Minuten stabiler Messungen ausgewertet. Repräsentative AP-Folgen 1, 3, 6 und 9 Wochen nach AAV-A53T- α Syn und AAV-Luziferase Injektion sind in den

Abbildungen 3.2 A-D illustriert. Eine Woche nach Virusinjektion zeigte sich in den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied in der Feuerrate. Die Neurone feuerten nach AAV-Luziferase Überexpression mit einer Frequenz von $2,2 \pm 0,3$ Hz und nach AAV-A53T- α Syn Überexpression mit einer Frequenz von $2,6 \pm 0,3$ Hz (s. Abbildung 3.2 A und E). Diese Werte für die spontane Feuerrate der LC Neurone stimmen mit Ergebnissen aus anderen Studien überein (Matschke et al. 2018), (Williams et al. 1984). Im zeitlichen Verlauf nahm die AP-Frequenz nach AAV-A53T- α Syn Injektion signifikant zu. So stieg die Feuerrate 9 Wochen nach AAV-A53T- α Syn Überexpression auf $3,9 \pm 0,4$ Hz an. Die Frequenz der LC Neurone nach Luziferase Überexpression blieb weitestgehend unverändert bei $2,1 \pm 0,3$ Hz (s. Abbildung 3.2 B-E).



3.2.2. Überexpression von A53T- α -Synuklein bewirkt abhängig von der Zeit eine Abnahme der Nachhyperpolarisation

Um zu überprüfen, welchen genauen Einfluss die Überexpression von A53T- α Syn auf die APs hat, wurden diese im Einzelnen analysiert. Abbildung 3.3 A-D zeigt repräsentative APs der A53T- α Syn- und Luziferase-Gruppe zu den Zeitpunkten 1, 3, 6 und 9 Wochen nach Injektion der viralen Vektoren. Die AP-Breite wurde bei halbmaximaler Amplitude (APD_{50}) abgelesen. Darin zeigte sich zu allen vier Messzeitpunkten kein signifikanter Unterschied in der A53T- α Syn- und Luziferase-Gruppe (s. Abbildung 3.3 E). Somit scheint die A53T- α Syn Überexpression keinen Einfluss auf die AP-Dauer zu haben.

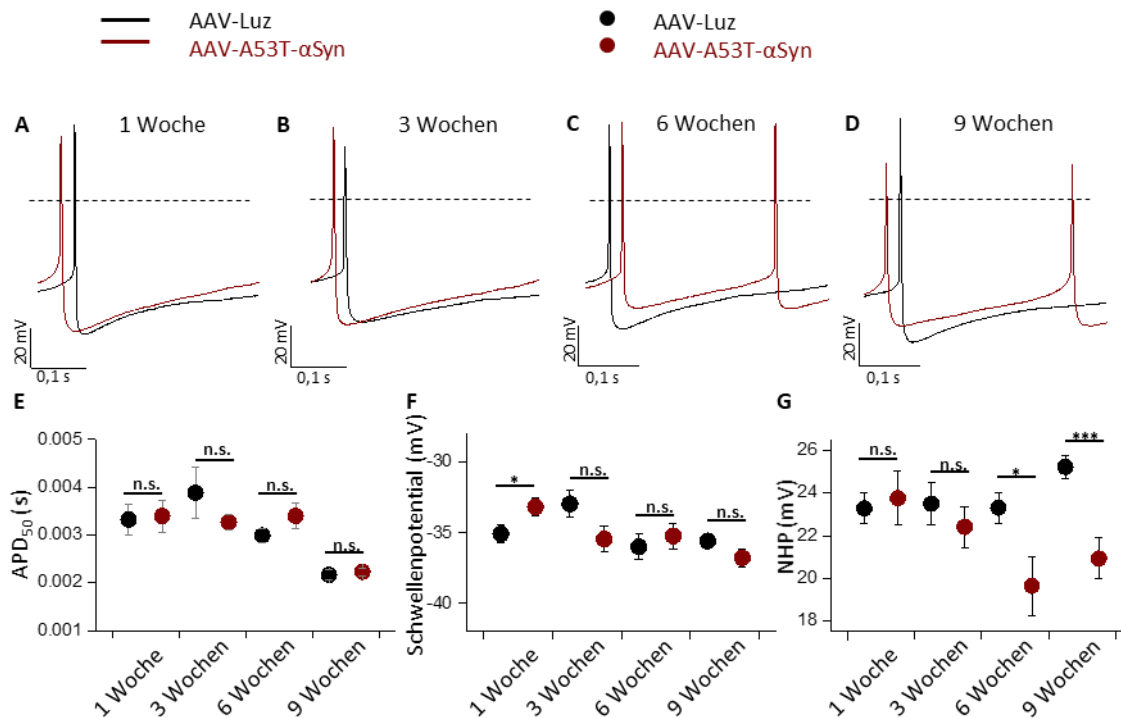


Abbildung 3.3: α Syn Überexpression induziert eine Reduktion der Nachhyperpolarisation.

(A)-(D) zeigen überlagerte Aktionspotentiale repräsentativer *Whole-Cell* Patch-Clamp Aufnahmen nach AAV-Luziferase und AAV-A53T- α Syn Überexpression zu den Zeitpunkten 1, 3, 6 und 9 Wochen nach Virusinjektion.

(E) In der Auswertung der APD_{50} Werte als Maß für die Aktionspotentialdauer war zwischen der Luziferase und α Syn Gruppe kein signifikanter Unterschied detektierbar. In (F) werden die Schwellenpotentiale dargestellt. Es zeigt sich lediglich ein erhöhtes Schwellenpotential 1 Woche nach AAV-A53T- α Syn Überexpression. Zu allen späteren Zeitpunkten wurde kein signifikanter Unterschied nach Luziferase und α Syn Überexpression gefunden.

(G) illustriert die Nachhyperpolarisation (NHP) 1, 3, 6 und 9 Wochen nach Injektion. Die Überexpression von A53T- α Syn bewirkte abhängig von der Zeit eine signifikante Abnahme der Nachhyperpolarisation im Vergleich zur Überexpression von Luziferase.

(E)-(G): n = 24 (AAV-Luziferase, 1 Woche), n = 12 (AAV-Luziferase, 3 Wochen), n = 19 (AAV-Luziferase, 6 Wochen), n = 23 (AAV-Luziferase, 9 Wochen), n = 20 (AAV-A53T- α Syn, 1 Woche), n = 14 (AAV-A53T- α Syn, 3 Wochen), n = 20 (AAV-A53T- α Syn, 6 Wochen), n = 22 (AAV-A53T- α Syn, 9 Wochen).

n.s.: nicht signifikant; * bedeutet $P \leq 0,05$; *** bedeutet $P \leq 0,001$ kalkuliert mittels des Student's *t*-Tests bei Normalverteilung bzw. des Mann-Whitney-U-Tests.

Von weiterem Interesse war in dieser Arbeit das Schwellenpotential. Dieses lag 1 Woche nach Luziferase Überexpression bei $-35,1 \pm 0,6$ mV und 1 Woche nach α Syn Überexpression bei $-33,2 \pm 0,6$ mV (s. Abbildung 3.3 F). Bis auf dieses erhöhte Schwellenpotential 1 Woche nach A53T- α Syn Überexpression fand sich kein signifikanter Unterschied zu allen späteren Zeitpunkten zwischen den beiden Gruppen und das mittlere Schwellenpotential lag 9 Wochen nach Virusinjektion bei $35,6 \pm 0,4$ mV (AAV-Luziferase) und $36,8 \pm 0,6$ mV (AAV-A53T- α Syn). Somit scheint die α Syn Überexpression keinen Einfluss auf das Schwellenpotential der APs zu haben.

Des Weiteren wurde die maximale NHP Amplitude analysiert (s. Abbildung 3.3 F). Hierfür wurde nach zwei Minuten stabiler Messungen die Differenz zwischen dem Schwellenpotential und dem tiefsten Punkt des APs bestimmt. Zum Messzeitpunkt 1 Woche fand sich in beiden Gruppen eine ausgeprägte NHP mit einer mittleren Amplitude von $23,3 \pm 0,7$ mV (AAV-Luziferase) und $23,8 \pm 1,3$ mV (AAV-A53T- α Syn). Die A53T- α Syn Überexpression bewirkte abhängig von der Zeit eine signifikante Abnahme der NHP im Vergleich zur Luziferase Überexpression. 9 Wochen nach Virusinjektion lag die mittlere NHP in der α Syn Gruppe nur noch bei $20,9 \pm 1,0$ mV im Vergleich zu $25,2 \pm 0,5$ mV in der Luziferase Gruppe. Die Abnahme der NHP zeigt sich ebenfalls in der exemplarischen Überlagerung der APs in Abbildung 3.3 A-D.

Die Analysen der APs deuten somit darauf hin, dass durch die α -Syn Überexpression die Amplitude der NHP abnimmt, während das Schwellenpotential und die AP-Breite unverändert bleiben.

3.3. Kaliumauswärtsströme der LC Neurone

Da die NHP maßgeblich durch K^+ Auswärtsströme reguliert wird (s. 1.4), wurden darauffolgend die transienten K^+ Auswärtsströme, die K^+ Gleichrichterströme und die K_{Ca} Ströme untersucht.

3.3.1. Keine Veränderung der transienten Kaliumauswärtsströme nach A53T- α Syn Überexpression

In der von Subramaniam *et al.* veröffentlichten Studie wurde gezeigt, dass die erhöhte Schrittmacheraktivität dopaminerger Neuronen der SNpc in einem transgenen Mausmodell der PK durch reduzierte A-Typ Ströme vermittelt wird (Subramaniam et al. 2014).

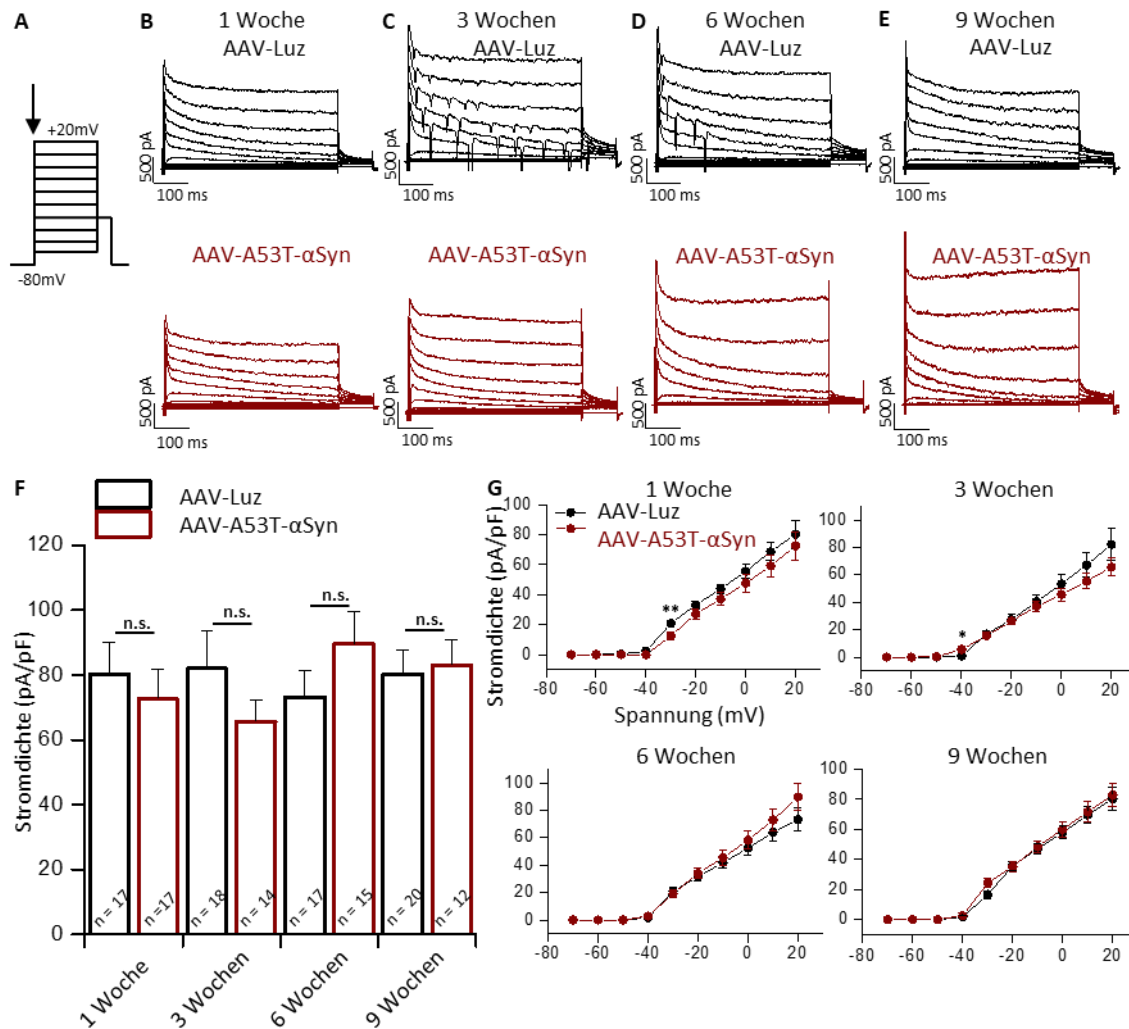


Abbildung 3.4: Kein Hinweis auf veränderte transiente Kaliumauswärtsströme nach AAV-A53T- α Syn Überexpression.

(A): Spannungsprotokoll zur Aktivierung der transienten Kaliumauswärtsströme. Ausgehend von einem hyperpolarisierten Haltepotential von -80 mV werden schrittweise Spannungssprünge auf bis zu +20 mV durchgeführt. Die maximalen Stromamplituden wurden jeweils zu Beginn des depolarisierenden Spannungssprungs abgelesen (siehe schwarzer Pfeil). **(B)-(E):** Exemplarische Stromantworten auf die Spannungssprünge zu allen vier Zeitpunkten nach Überexpression von AAV-Luziferase (oben) und AAV-A53T- α Syn (unten). **(F)** illustriert die mittleren transienten Kaliumauswärtsströme 1, 3, 6 und 9 Wochen nach AAV-Luziferase und AAV-A53T- α Syn Injektion. Zu allen vier Zeitpunkten ließ sich kein signifikanter Unterschied der transienten Kaliumauswärtsströme nach α Syn oder Luziferase Überexpression zeigen. **(G)** Abbildungen der Strom-Spannungskurven der transienten Kaliumauswärtsströme zu allen vier Zeitpunkten nach AAV-Luziferase und AAV-A53T- α Syn Injektion. Die Kurven verlaufen annähernd linear nach Erreichen eines Schwellenpotentials bei etwa -35 mV. n.s.: nicht signifikant. ** bedeutet $P \leq 0,01$ kalkuliert mittels des Student's t -Tests bei Normalverteilung bzw. des Mann-Whitney-U-Tests.

Um zu überprüfen, ob in der vorliegenden Arbeit der transiente K^+ Auswärtsstrom für den frequenzsteigernden und NHP-reduzierenden Effekt nach α Syn Überexpression im LC verantwortlich sein könnte, wurden die Stromantworten auf depolarisierende Spannungssprünge analysiert. Transiente K^+ Auswärtsströme werden durch depolarisierende

Sprünge ausgehend von einem hyperpolarisierten Haltepotential aktiviert (s. 1.4.1). Zur Untersuchung der transienten K^+ Auswärtsströme wurde das in Abbildung 3.4 A abgebildete Spannungsprotokoll verwendet. Die Spannung wurde stufenweise von -80 mV auf bis +20 mV erhöht. Der transiente K^+ Auswärtsstrom wurde bei +20 mV abgelesen und anschließend auf die Kapazität normalisiert. Beispielhaft sind in Abbildung 3.3 B-E die Stromprotokolle nach A53T- α Syn und Luziferase Überexpression zu allen vier Messzeitpunkten dargestellt. Die mittlere Stromdichte der transienten K^+ Auswärtsströme betrug 1 Woche nach Virusinjektion $80,3 \pm 9,7$ pA/pF (AAV-Luziferase) und $72,6 \pm 9,2$ pA/pF (AAV-A53T- α Syn). Auch im Verlauf zeigte sich kein signifikanter Unterschied nach A53T- α Syn und Luziferase Überexpression (s. Abbildung 3.4 F). Ebenso zeigen die Strom-Spannungs-Kurven 1, 3, 6 und 9 Wochen nach Virusinjektion keine Unterschiede auf (s. Abbildung 3.4 G). Durch zunehmende Depolarisation fließt ein größerer transienter Kaliumauswärtsstrom. Die Strom-Spannungs-Kurve verläuft in etwa linear nach Erreichen eines Schwellenpotentials von etwa -35 mV.

3.3.2. Keine Veränderung der verzögerten Kaliumgleichrichterströme nach A53T- α Syn Überexpression

Verzögerte K^+ Gleichrichterströme gehören zu den spannungsabhängigen K^+ Kanälen und spielen eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung des Membranpotentials, um die elektrische Erregbarkeit von Neuronen zu modulieren (Gutman et al. 2005). Da eine veränderte Leitfähigkeit dieser K^+ Kanal-Familie Auswirkungen auf die AP-Frequenz haben könnte, waren auch diese Kanäle von großem Interesse in vorliegender Arbeit.

Verzögerte Kaliumgleichrichterkanäle werden mit einer gewissen Verzögerung nach Membrandepolarisation aktiviert (s. 1.4.1). Das Spannungsprotokoll zur Aktivierung der verzögerten K^+ Gleichrichterströme ist in Abbildung 3.5 A abgebildet. Es erfolgte zuerst ein depolarisierender Spannungssprung von -80 mV auf -40 mV für 0,1 Sekunde und darauffolgend eine stufenweise Depolarisation auf bis +20 mV. Als Folge des ersten Spannungssprungs zu -40 mV erfolgt die schnelle N-Typ Inaktivierung der transienten (A-Typ) K^+ Ströme, sodass eine isolierte Analyse der verzögerten K^+ Auswärtsströme zu Beginn des zweiten Spannungssprungs möglich ist.

Beispielhafte Stromantworten sind in den Abbildungen 3.5 B-E illustriert. Der Strom wurde einheitlich zu einem festen Zeitpunkt (siehe Pfeil in Abbildung 3.5 A) abgelesen und anschließend auf die Kapazität normalisiert. Die mittlere Stromdichte der verzögerten K^+ Gleichrichterströme in den untersuchten LC Neuronen betrug 1 Woche nach Virusinjektion etwa

65,3 ± 11,7 pA/pF (AAV-Luziferase) und 58,0 ± 9,8 pA/pF (AAV-A53T-αSyn). Zu keinem Zeitpunkt nach Virusinjektion zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der A53T-αSyn und Luziferase Gruppe (Abbildung 3.5 F). Ebenso wurden Strom-Spannungs-Kurven erstellt, die sowohl nach A53T-αSyn als auch nach Luziferase Überexpression ähnliche Verläufe zeigten (Abbildung 3.5 G).

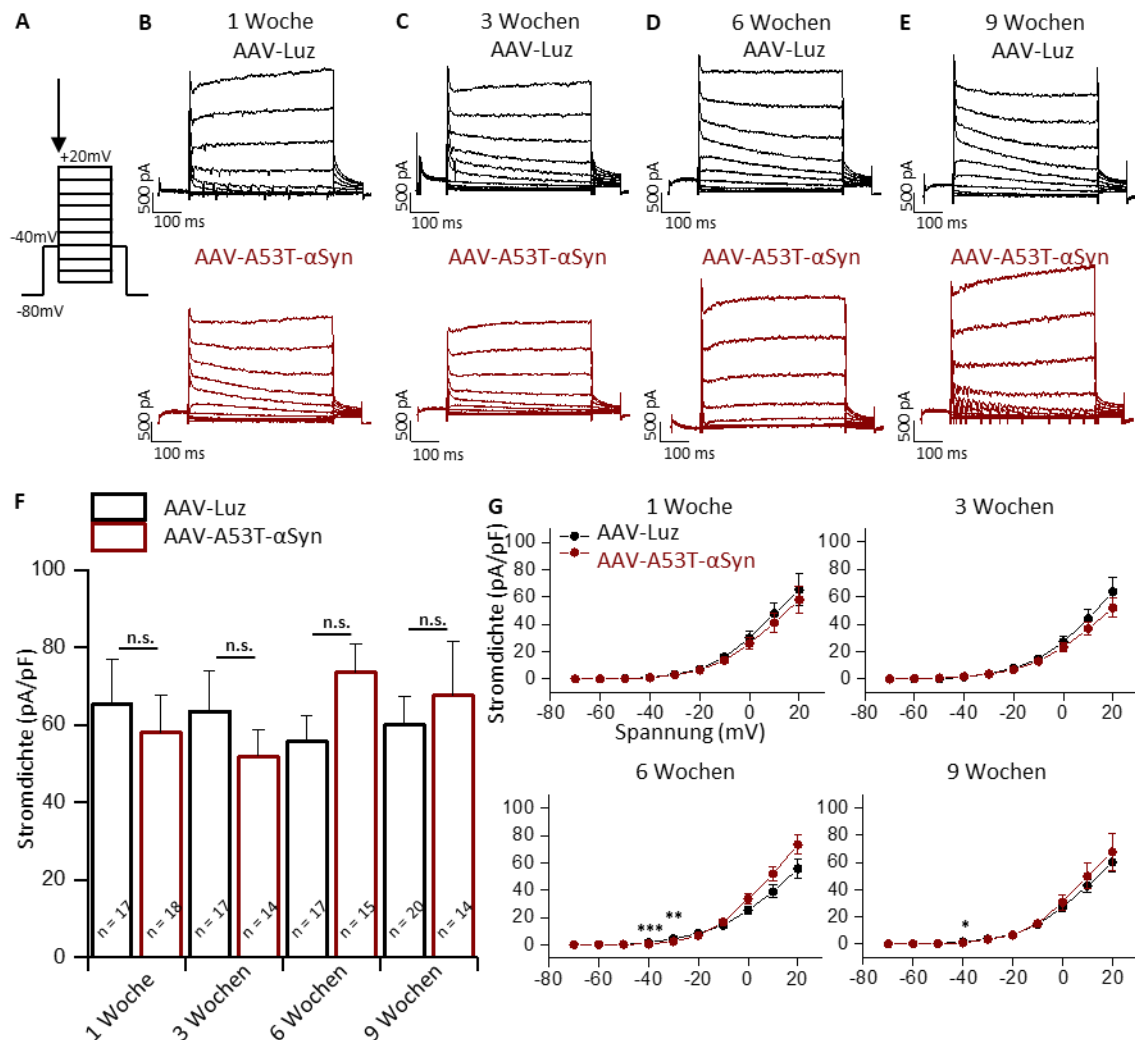


Abbildung 3.5: Kein Hinweis auf veränderte verzögerte Kaliumgleichrichterströme nach AAV-A53T-αSyn Überexpression.

(A) Spannungsprotokoll zur Aktivierung der verzögerten Kaliumgleichrichterströme. Auf den ersten Spannungssprung zu -40 mV erfolgte die schnelle Inaktivierung der transienten Kaliumströme. Während des zweiten Spannungssprungs (siehe schwarzer Pfeil) flossen hauptsächlich die langsam inaktivierenden, durch verzögerte Kaliumgleichrichterkanäle vermittelten Ströme. (B)-(E) Exemplarische Darstellung verzögerter Kaliumgleichrichter-Ströme zu allen vier Zeitpunkten nach Überexpression von AAV-Luziferase (oben) und AAV-A53T-αSyn (unten). (F) Illustration der mittleren verzögerten Kaliumgleichrichterströme 1, 3, 6 und 9 Wochen nach AAV-Luziferase und AAV-A53T-αSyn Injektion. Mit Ausnahme eines erhöhten verzögerten Kaliumgleichrichterstromes 6 Wochen nach AAV-A53T-αSyn Überexpression war kein signifikanter Unterschied detektierbar.

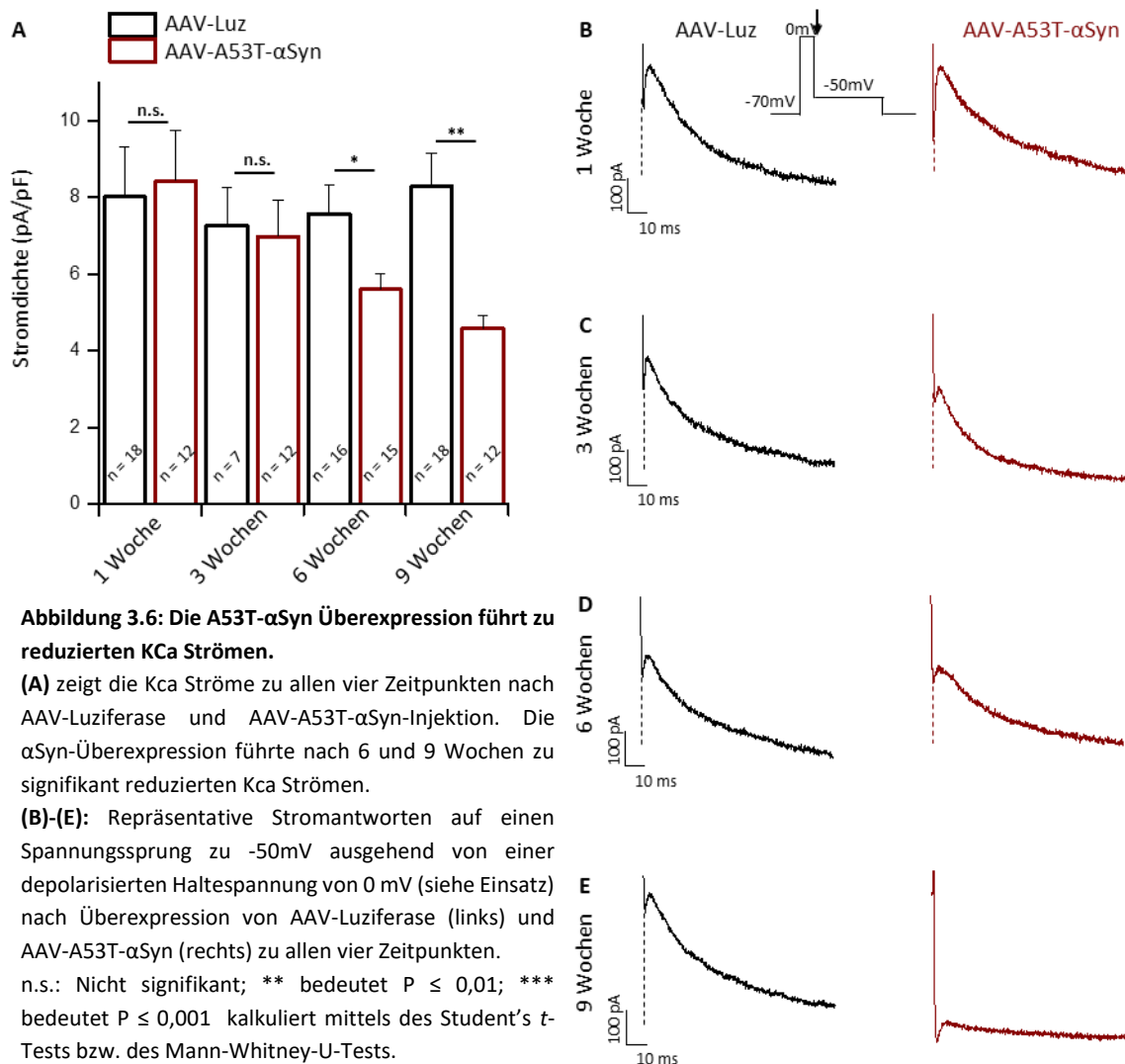
(G) Abbildungen der Strom-Spannungs-Kurven der verzögerten Kaliumgleichrichterströme zu allen vier Zeitpunkten nach AAV-Luziferase und AAV-A53T-αSyn Injektion. In beiden Gruppen zeigen sich ähnliche Kurvenverläufe.

n.s.: nicht signifikant; ** bedeutet $P \leq 0,01$; *** bedeutet $P \leq 0,001$ kalkuliert mittels des Student's t-Tests bei Normalverteilung bzw. des Mann-Whitney-U-Tests.

3.3.3. Reduzierte Kalzium-aktivierte Kaliumströme nach A53T- α Syn

Überexpression

In dopaminergen Neuronen der SNpc sind K_{Ca} Kanäle bei der Regulierung der NHP und AP-Frequenz von zentraler Bedeutung. Die Applikation von Apamin, einem selektiven Inhibitor der SK Kanäle, vermittelt in SNpc Neuronen eine reduzierte NHP und einen Anstieg der Feuerrate (Shepard and Bunney 1991). So zeigten Matschke *et al.* in Patch-Clamp Untersuchungen bei Mäusen, dass der SK Kanalblocker Apamin auch in LC Neuronen die NHP reduziert und die Feuerrate erhöht (Matschke *et al.* 2018). SK Kanäle sind somit von großem Interesse in vorliegender Arbeit.



Die K_{Ca} Kanäle werden durch einen intrazellulären Ca^{2+} Anstieg aktiviert (s. 1.4.2). Durch einen Spannungssprung von -70 mV auf 0 mV werden Ca^{2+} Kanäle aktiviert und verzögert kommt es durch den intrazellulären Ca^{2+} Anstieg zur Aktivierung der K_{Ca} Kanäle. 1 Woche nach Virusinjektion betrug die Stromdichte der LC Neurone in der Luziferase Gruppe $8,0 \pm 1,3$ pA/pF und in der A53T- α Syn Gruppe $8,4 \pm 1,3$ pA/pF (Abbildung 3.6 A). Während die Stromdichte der K_{Ca} Kanäle 9 Wochen nach AAV-Luziferase Injektion mit etwa $8,3 \pm 0,9$ pA/pF stabil blieb, lag die Stromdichte 9 Wochen nach AAV-A53T- α Syn Injektion nur noch bei etwa $4,6 \pm 0,3$ pA/pF. Repräsentative K_{Ca} Stromantworten sind in den Abbildungen 3.6 B-E illustriert. Somit bewirkt die α Syn Überexpression in unserem prämotorischen Mausmodell der PK eine zeitabhängige Reduktion der K_{Ca} Ströme in den noradrenergen Neuronen des LC.

Zusammenfassend nahm nach A53T- α Syn Überexpression die Feuerrate der spontan-aktiven LC Neurone abhängig von der Zeit signifikant zu. Darüber hinaus war eine signifikant reduzierte NHP nach AAV-A53T- α Syn Injektion im Vergleich zur Luziferase Injektion detektierbar. Gleichzeitig zeigten Messungen verschiedener K^+ Kanäle reduzierte K_{Ca} Ströme, welche nach A53T- α Syn Überexpression abhängig von der Zeit signifikant abnahmen.

4. Diskussion

Die PK zählt zu den häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen und ist gekennzeichnet durch die aus α Syn bestehenden Lewy-Körperchen. Neben den klassischen motorischen Symptomen wie Hypokinesie, Rigor, Tremor und posturale Instabilität zeigen sich auch nicht-motorische Symptome wie Schlafstörungen, Depression, Angst und kognitive Defizite (Sveinbjornsdottir 2016). Häufig wird die PK durch die Degeneration der dopaminergen Neurone der SNpc charakterisiert. Ein möglicherweise unterschätztes Merkmal der PK ist die Degeneration des LC im Hirnstamm – der größte Noradrenalin-produzierende Kern im ZNS (Rommelfanger und Weinshenker 2007). Der LC ist wichtig für die Regulation der Aufmerksamkeit, Erregung und Stimmung. Die LC Degeneration bei der PK hat eine potentielle Bedeutung bei bestimmten neuropsychiatrischen Auffälligkeiten wie Angst, Depression und Schlafstörungen (Sara 2009, Delaville, Deurwaerdère und Benazzouz 2011).

In letzter Zeit bekommt der LC eine immer größer werdende Aufmerksamkeit. Zum einen zeigen Post-Mortem-Studien, dass sich die α Syn Pathologie bereits sehr früh im LC zeigt. Die Lewy-Körperchen treten im LC auf, bevor sie in der SNpc zu finden sind (Braak und Del Tredici 2017, Del Tredici et al. 2002). Darüber hinaus haben verschiedene unabhängige Untersucher in Tiermodellen gezeigt, dass experimentelle Schädigungen des LC die Neuropathologie der PK und damit den Verlust dopaminergener Neurone in der SNpc fördern. Zudem kommt es durch die noradrenerge Degeneration zu einer Exazerbation der motorischen Symptome der PK (Marien, Briley und Colpaert 1993, Mavridis et al. 1991, Srinivasan und Schmidt 2003).

4.1. Vulnerabilität der Locus Coeruleus Neurone

Obwohl nicht ganz verstanden ist, warum die Neuropathologie, Dysfunktion und Degeneration des LC im Vergleich zu anderen Hirnarealen so früh beginnt, zeigen die noradrenergen LC Neurone verschiedene anatomische, morphologische und neurochemische Eigenschaften, die zu dieser Vulnerabilität beitragen können (Mather und Harley 2016).

Neurochemisch ist Noradrenalin an sich bereits ein Risikofaktor. Nach der synaptischen Freisetzung wird Noradrenalin durch Transporter ins Zytoplasma aufgenommen und kann autooxidieren oder in chemisch reaktive und toxische Metaboliten umgewandelt werden. Diese können dann Proteine, Lipide und Nukleotide zerstören (Goldstein 2013). Zudem synthetisieren

LC Neurone das granuläre Pigment Neuromelanin, welches neben Eisen und anderen Schwermetallen auch chemische Toxine und α Syn bindet. Möglicherweise schützt Neuromelanin anfangs die LC Neurone durch Bindung der schädigenden Agenzien und fördert im Verlauf jedoch die Neurodegeneration durch Freisetzung der Toxine (Pamphlett 2014).

Der LC liegt im dorsalen Pons direkt angrenzend an den vierten Ventrikel (Foote et al. 1983). Durch die Nähe zum Ventrikel haben die LC Neurone einen direkten Kontakt mit dem Liquor cerebrospinalis, welcher eine potentielle Quelle für chemische Toxine und neuroinflammatorische Moleküle sein kann. Des Weiteren innerviert der LC einen Großteil der Gehirnkapillaren und kann auch auf diesem Weg Toxine aus dem Blut aufnehmen (Pamphlett 2014). Die LC Axone sind in der Regel dünn, stark verzweigt, unmyelinisiert und mitunter die längsten Axone im Gehirn. Dies macht sie zusätzlich sehr fragil (Foote et al. 1983).

Auch physiologisch besitzen die LC Neurone Eigenschaften, die zu deren Vulnerabilität beitragen können. Die noradrenergen Neurone zeigen eine intrinsische Schrittmacheraktivität mit einer spontanen Entladungsfrequenz von 0-5 Hz. Bei Stress steigt die Feuerrate an und es zeigen sich phasische Entladungsmuster mit den sogenannten „Bursts“ (Berridge und Waterhouse 2003). Die Schrittmacheraktivität wird durch Ca^{2+} Kanäle aufrechterhalten. Das Ca^{2+} , welches in die Zelle gelangt, kann in Mitochondrien oxidativen Stress vermitteln. Somit könnte eine LC Hyperaktivität in den frühen Stadien den Ca^{2+} Einstrom und damit die mitochondriale Toxizität fördern (Sanchez-Padilla et al. 2014). Zusätzlich sind die LC Neurone elektrisch über Gap Junctions gekoppelt, welche das synchrone Entladen steuern. Somit kann sich die dysregulierte Aktivität einzelner LC Neurone auf den gesamten Kern ausbreiten und so den oxidativen Stress triggern (Alvarez et al. 2002, Weinshenker 2018).

Es ist davon auszugehen, dass die LC Neurone durch das Zusammenwirken all dieser Faktoren verstärkt anfällig für oxidativen Stress und die α Syn Pathologie sind.

4.2. *In vivo* Mausmodell der prämotorischen Parkinson-Krankheit

Die prodromale Phase der PK stellt das ideale Zeitfenster für krankheitsmodulierende Therapien dar (Oertel und Schulz 2016). Somit ist es von großer Bedeutung, Tiermodelle zu etablieren, welche die Testung neuer Therapien ermöglichen. Henrich et al. hat mit seiner Arbeit das erste *in vivo* Mausmodell der prämotorischen PK nach gezielter Überexpression von humanem mutierten A53T- α Syn im LC etabliert. α Syn wurde durch Injektion eines etablierten

rekombinanten AAV Vektors überexprimiert (Henrich et al. 2018). Dieser Vektor hat bereits in verschiedenen Tiermodellen der PK bewiesen, dass er eine progressive Neurodegeneration der Substantia nigra Neuronen induziert (Gleave et al. 2017, He et al. 2016, Ip et al. 2017, Koprach et al. 2010). Das AAV-Vektor-basierte Mausmodell von Henrich et al. generiert eine ausgeprägte α Syn Pathologie, einschließlich der Phosphorylierung und Aggregation von α Syn, sowie eine progressive noradrenerge Neurodegeneration (Henrich et al. 2018). An diesem geeigneten Modell der prodromalen PK wurden die elektrophysiologischen Messungen dieser Arbeit durchgeführt.

In diesem Zusammenhang wäre es noch relevant, zu untersuchen, ob die Überexpression von Wildtyp α Syn im LC ähnliche histopathologische und elektrophysiologische Veränderungen hervorruft. Mit der Annahme, dass Wildtyp α Syn weniger zur Aggregation neigt als mutiertes A53T- α Syn (Coskuner und Wise-Scira 2013, Li et al. 2001), kann man davon ausgehen, dass auch die histopathologischen und elektrophysiologischen Veränderungen weniger ausgeprägt sein werden. Dies muss jedoch noch in weiteren Untersuchungen im LC Modell gezeigt werden.

4.3. Das Patch-Clamp-Verfahren

Im pontinen Tegmentum finden sich neben dem LC weitere Kerngebiete wie der glutamaterge Nucleus mesencephalicus nervi trigemini und der cholinerge laterodorsale tegmentale Nucleus, welche direkt lateral an die LC-Region angrenzen (Allen 2015). Mithilfe von immunhistochemischen und elektrophysiologischen Kriterien zur Identifikation der LC Neurone wurde sichergestellt, dass innerhalb dieser Arbeit ausschließlich noradrenerge LC Neurone analysiert wurden. Es wurden AP-Charakteristika der noradrenergen Neurone, wie die AP-Breite, die Amplitude der NHP und das Schwellenpotential, analysiert. Mithilfe immunhistochemischer Färbungen erfolgte die stichprobenartige Überprüfung der Kolo-kalisation von Neurobiotin in den gepatchten Neuronen und TH, das Markerenzym der Katecholamin-Synthese (s. Abbildung 3.1).

Um die Pathogenese der PK zu verstehen, ist es essentiell die pathophysiologischen Mechanismen der elektrischen Aktivität der LC Neurone zu verstehen, da diese direkt an intrazelluläre Überlebens-Signalwege gekoppelt sind. Während der *Whole-Cell* Messungen im akuten Hirnstammschnitt konnte die spontane Schrittmacheraktivität der LC Neurone aufgezeichnet werden. Der DMV und die SNpc, welche auch während der PK Pathogenese

betroffen sind, besitzen ebenfalls spontan-aktive Neurone mit einer ähnlichen Schrittmacherfrequenz wie die des LC (Goldberg et al. 2012, Guzman et al. 2009). Diese potentiell zytotoxische Eigenschaft wurde bereits in Abschnitt 4.1.1. diskutiert.

Eine nennenswerte Limitation des Patch-Clamp-Verfahrens ist die Beschränkung auf ein einzelnes Neuron bei den Messungen. Patch-Clamp-Messungen in akuten Hirnschnitten erlauben die elektrophysiologische Charakterisierung einzelner Zellen. Neurone sind jedoch über chemische Synapsen und elektrisch über Gap Junctions miteinander gekoppelt und bilden im Gesamten ein großes neuronales Netzwerk (Qi, Radnikow und Feldmeyer 2015). Leider lässt sich mittels des Patch-Clamp-Verfahrens in akuten Hirnschnitten keine Aussage über dieses neuronale Netzwerk machen.

4.4. α -Synuklein vermittelt Hyperaktivität des Locus coeruleus

Eine sehr bedeutende Frage ist, wie die α Syn-Aggregate den LC und die Noradrenalin Transmission beeinflussen. In unserem prämotorischen Mausmodell der PK zeigte sich, dass die LC Neurone nach α Syn Überexpression mit einer zeitabhängig signifikant erhöhten Frequenz feuerten.

Eine α Syn Überexpression scheint auf die SNpc vergleichbare Effekte zu haben. In einem transgenen Mausmodell zeigte sich, dass die Überexpression von humanem A53T- α Syn eine erhöhte Feuerrate der dopaminergen SNpc Neurone induziert (Subramaniam et al. 2014). Gleichzeitig zeigen DMV Neurone eine unveränderte autonome Feuerrate nach A53T- α Syn Überexpression in transgenen Mäusen. Diese stresslose Schrittmacheraktivität erlangen die DMV Neurone anscheinend durch die Herunterregulation ihrer spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle (Lasser-Katz et al. 2017).

Neurochemisch hat man bei der Alzheimer-Krankheit bereits Hinweise für eine LC Hyperaktivität gefunden. Dabei handelt es sich um eine weitere neurodegenerativen Erkrankung mit teils ähnlichen Symptomen wie Angst, Depression und Schlafstörungen. So zeigen verschiedene Studien eine erhöhte Noradrenalin Freisetzung bei Alzheimer-Patienten (Raskind und Peskind 1994, Hoogendijk et al. 1999). Bei der PK zeigen sich in den bisherigen Studien unveränderte oder reduzierte Level an Noradrenalin und deren Metaboliten im Liquor cerebrospinalis (Eldrup et al. 1995). Hierbei wurden jedoch die späten Krankheitsstadien mit wahrscheinlich bereits stattgefundenener LC Degeneration untersucht. Zukünftige Studien, welche Noradrenalin und die

LC Funktion in den prämotorischen Stadien untersuchen, könnten neurochemische Evidenz für eine LC Hyperaktivität bei der anfänglichen PK liefern.

4.4.1. Korrelation zwischen Locus coeruleus Hyperaktivität und klinischen Symptomen

Insgesamt korreliert eine Hyperaktivität der LC Neurone und damit eine erhöhte Entladungsrate mit einer erhöhten Noradrenalin Freisetzung (Berridge und Abercrombie 1999).

Zum einen sind Angst und Depression häufige nicht-motorische Symptome der PK (Schapira, Chaudhuri und Jenner 2017) und stehen in Verbindung mit einer erhöhten LC Aktivität (Bremner et al. 1996). Beispielsweise fördert eine Aktivierung des LC zum einen ein Angst-ähnliches und aversives Verhalten (McCall et al. 2015) und ruft ebenso ein depressives Verhalten hervor (Simson and Weiss 1988). Gleichzeitig geben Post-Mortem-Studien umgekehrte Evidenz dafür, dass depressive Individuen eine LC Hyperaktivität aufzeigen (Ordway, Smith und Haycock 1994).

Die REM Schlafverhaltensstörung ist eine der ersten Symptome der PK und manifestiert sich oft Jahre vor dem Auftreten der motorischen Symptome (Schapira et al. 2017). Es wird angenommen, dass der LC den Muskeltonus während des normalen REM Schlafes blockiert. So zeigt sich eine klinische Korrelation zwischen einer LC Schädigung und der Ausprägung einer REM-Schlafverhaltensstörung (García-Lorenzo et al. 2013). In Tiermodellen wurde gezeigt, dass LC Neurone während des REM-Schlafes unterdrückt werden. Die noradrenergen Neurone sind in der Regel tonisch aktiv und versorgen das Gehirn mit Noradrenalin. Nur während des REM-Schlafes und während der Übergangsphase in den REM-Schlaf sind sie nicht aktiv (Poe 2017). Somit ist es naheliegend, dass eine Überaktivität der LC-Neurone mit REM-Schlafverhaltensstörungen in Verbindung steht.

Somit kann die LC Hyperaktivität bei der PK möglicherweise einen Teil der nicht-motorischen Symptome erklären.

4.5. Pathophysiologische Veränderungen nach α -Synuklein Überexpression

Bei der Frage nach dem Mechanismus für die erhöhte Feuerrate in LC Neuronen nach α Syn Überexpression fand sich in vorliegender Arbeit eine reduzierte NHP. Die restlichen Parameter bei der Analyse der AP-Charakteristika wie das Schwellenpotential und die AP-Dauer waren unverändert. So wurden bei weiteren Untersuchungen in den LC Neuronen nach AAV-A53T- α Syn Injektion zeitabhängig signifikant reduzierte NHP-Ströme gefunden. Abgesehen von den reduzierten K_{Ca} Kanal-Strömen waren die transienten K^+ Auswärtsströme und verzögerten K^+ -Gleichrichterströme unverändert nach α Syn-Überexpression. Diese neuen Ergebnisse geben Aufschluss über die elektrophysiologischen Veränderungen der LC Neurone und liefern ein weiteres Puzzleteil, um die pathologischen Veränderungen der PK zu verstehen.

In dem transgenen Mausmodell von Subramaniam et al. führt die Überexpression von A53T- α Syn in dopaminergen SNpc Neuronen wahrscheinlich vermittelt durch Oxidation zu einer Dysfunktion des A-Typ Kv4.3 Kanals. Der verringerte Kv4.3 vermittelte A-Typ K^+ Strom induziert so die erhöhte Feuerrate dopaminergener SNpc Neurone (Subramaniam et al. 2014).

4.5.1. Reduzierte Kalzium-aktivierte Kaliumströme vermitteln erhöhte Schrittmacheraktivität

In akuten Hirnschnitten von Ratten und Mäusen zeigen LC Neurone unter synaptischer Isolation eine intrinsische Schrittmacheraktivität mit einer Frequenz von 1-3 Hz (Sanchez-Padilla et al. 2014, Matschke et al. 2015). Elektrophysiologische Studien, welche vor allem in LC Neuronen von Ratten durchgeführt wurden, beschreiben verschiedene Na^+ Ströme (Shen und North 1993), Ca^{2+} Ströme (Chieng und Bekkers 1999, Matschke et al. 2015) und K^+ Ströme, welche beispielsweise über K_{Ca} Kanäle, verzögerte K^+ Gleichrichterkanäle und transiente K^+ Auswärtskanäle vermittelt werden (Forsythe, Linsdell and Stanfield 1992, Murai et al. 1997, Murai und Akaike 2005). Es finden sich jedoch nur wenige Studien, welche die bedeutenden Kanäle bei der Regulation der spontanen Schrittmacheraktivität der LC Neurone in Nagetieren untersuchen. Untersuchungen von LC Neuronen in Mäusen zeigen, dass möglicherweise Tetrodotoxin-sensitive Na^+ -Ströme in Kombination mit TEA-sensitiven K^+ Strömen eine entscheidende Funktion bei der Schrittmacheraktivität der noradrenergen Neurone haben (de Oliveira et al. 2010). Matschke et al. haben beobachtet, dass das Zusammenwirken von L- und T-Typ Ca^{2+} Kanälen essentiell für die intrinsische Schrittmacheraktivität der LC Neurone ist

(Matschke et al. 2015). So bewirkt die Aktivierung dieser beiden Kanäle einen Ca^{2+} Einstrom und damit eine SK-Kanal Aktivierung. SK Kanäle sind wiederum bedeutende Regulatoren der Ca^{2+} Homöostase in Neuronen des ZNS (Dolga und Culmsee 2012). Sie modulieren die NHP der LC Neurone und somit die AP-Frequenz. SK-Kanäle vermitteln bei Blockierung einen Frequenzanstieg und bei Aktivierung eine Frequenzabnahme der intrinsischen Schrittmacheraktivität (Matschke et al. 2015, Matschke et al. 2018, Sah und Davies 2000, Deignan et al. 2012). Dies stimmt mit den Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit überein - die erhöhte Feuerrate und reduzierte NHP der LC Neurone nach αSyn Überexpression trat zusammen mit reduzierten K_{Ca} Strömen auf. Die Annahme, dass SK Kanäle als wichtige Regulatoren der intrinsischen Schrittmacheraktivität in LC Neuronen agieren, wird durch die Tatsache unterstützt, dass die Expression von SK Kanälen die tonische Feuerfrequenz auch in verschiedenen anderen ZNS Neuronen reguliert (Stocker 2004, Deignan et al. 2012).

SK Kanäle sind spannungsunabhängig und werden allein durch Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration reguliert (Kuiper et al. 2012). Ca^{2+} bindet an Calmodulin, welches an den C-Terminus des SK Kanals gebunden ist und als Ca^{2+} Sensor dient. So vermittelt Calmodulin eine Konformationsänderung des Kanalproteins und die Öffnung der Kanalpore (Bruening-Wright et al. 2007).

Im ZNS sind SK Kanäle in der Regel in der Nähe von Neurotransmitterrezeptoren wie glutamatergen NMDA- oder nikotineren Acetylcholin-Rezeptoren lokalisiert und wirken exzitatorischen synaptischen Potentialen entgegen. Somit funktionieren sie als bedeutende Regulatoren der neuronalen Erregbarkeit (Faber, Delaney und Sah 2005, Dolga und Culmsee 2012).

Auch wenn ein Zusammenhang zwischen den SK Kanälen und der Schrittmacheraktivität offensichtlich ist, werden weitere Studien benötigt, um den genauen Mechanismus zu klären, wie K_{Ca} Kanäle die intrinsische Schrittmacheraktivität von noradrenergen LC Neuronen unter physiologischen Bedingungen regulieren.

4.5.2. Kalzium Homöostase und oxidativer Stress

Für neurodegenerative Erkrankungen wie die Alzheimer Krankheit und die PK ist eine Dysregulation der intrazellulären Ca^{2+} Homöostase charakteristisch. Unphysiologisch hohe intrazelluläre Ca^{2+} Level können zu dysregulierten metabolischen Prozessen führen und sind direkt mit Signalwegen gekoppelt, welche den Zelltod vermitteln (Beal 1998, Lipton und Nicotera 1998). Eine mögliche Erklärung für erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} Level ist die kontinuierlich

ansteigende Feuerrate in spontan-aktiven Zellen. In Neuronen der SN, des DMV und des LC – bei der PK betroffene neuronale Zellgruppen – wurde gezeigt, dass die intrinsische Schrittmacheraktivität von einem Ca^{2+} Einstrom durch spannungsabhängige Ca^{2+} Kanäle begleitet wird. Dies kann einen aktivitätsabhängigen oxidativen Stress zur Folge haben (Sanchez-Padilla et al. 2014, Surmeier, Obeso und Halliday 2017). Des Weiteren ist die Überstimulation von Ca^{2+} permeablen Glutamatrezeptoren, bekannt als Exzitotoxizität, ein anerkannter pathogenetischer Faktor bei der Entstehung der Alzheimer Krankheit und PK (Beal 1998, Zádori et al. 2014). Somit ist die Modulation der intrinsischen Schrittmacheraktivität und intrazellulären Ca^{2+} Homöostase über K_{Ca} Kanäle ein interessanter therapeutischer Ansatzpunkt, um die Neurone vor Ca^{2+} induzierter Toxizität zu schützen. In dopaminergen Neuronen des Mittelhirns reduzierte der SK2 / 3 Kanalaktivator CyPPA in einem AMPA-abhängigen Toxizitätsmodell die spontane Feuerrate und verhinderte den neuronalen Verlust. Gleichzeitig induzierte die Inhibierung der SK Kanäle mit NS8953 eine Abnahme der TH positiven dopaminergen Neurone (Benítez et al. 2011). Zudem regulierte der SK2 Kanal Aktivator NS309 oder 1-EBIO die Ca^{2+} Homöostase, reduzierte den Gehirnschaden in einem ischämischen Modell und schützte dopaminerge Neurone vor Glutamat- und Rotenon-induzierter Toxizität (Dolga et al. 2011, Dolga und Culmsee 2012, Dolga et al. 2014). Matschke et al. zeigten eine starke Expression von SK2 Kanälen, eine funktionelle Kopplung von spannungsabhängigen Ca^{2+} Kanälen mit den SK Kanälen und einen Einfluss dieser auf die spontane Schrittmacheraktivität in LC Neurone (Matschke et al. 2018). Somit könnten SK Kanäle ein vielversprechender therapeutischer Ansatzpunkt sein, um die noradrenergen LC Neurone vor den Ca^{2+} induzierten pathologischen Veränderungen in neurodegenerativen Erkrankungen zu bewahren. Weitere Studien sind nötig, um den möglicherweise protektiven Effekt von SK Kanalaktivatoren auf die Neurodegeneration in den frühen Stadien der PK zu untersuchen.

4.6. Ausblick

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung der PK sind bereits 30-50% der dopaminergen Neurone in der Substantia nigra untergegangen (Liu, Chan und Stoessl 2017). Zudem fehlen aktuell noch krankheitsmodifizierende Therapien, welche die Pathogenese der PK aufhalten oder gar rückgängig machen können (Oertel und Schulz 2016). Der zunehmende Fokus auf die prämotorischen Stadien der PK ist somit von großer Bedeutung, um rechtzeitig in die Pathogenese eingreifen zu können. Es werden neue diagnostische Methoden benötigt, um die

neurodegenerative Erkrankung frühzeitig zu erkennen. Die Diagnosestellung könnte auf klinischen Symptomen der prodromalen PK und „Neuroimaging“ basieren (Berg et al. 2015). So besteht die Möglichkeit, die Ausbreitung der Lewy Pathologie rechtzeitig einzudämmen. LC-basierende Therapeutika könnten an der Stressanfälligkeit der noradrenergen Neurone angreifen – beispielsweise Ca^{2+} Kanal Antagonisten, Antioxidantien oder antiinflammatorische Moleküle. Es werden weitere Behandlungsoptionen benötigt, um die LC Hyperaktivität einzudämmen und die Ausbreitung der Neuropathologie ausgehend vom LC zu verhindern. Es ist naheliegend, dass Ionenkanäle, welche der intrinsischen Schrittmacheraktivität zugrunde liegen, vielversprechende Ansatzpunkte für neue Therapeutika sein können, um die Neurodegeneration der PK aufzuhalten. Nach Erreichen der vollen Ausprägung der PK mit kognitiven Defiziten könnten Therapeutika von Nutzen sein, die die Noradrenalin Transmission erhöhen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die pathologischen Veränderungen während der prodromalen PK mit Fokus auf die neuronale Aktivität aufgezeigt. Um die gesamte Pathogenese der PK erklären zu können, werden noch weitere Studien benötigt.

5. Zusammenfassung

Die Parkinson-Krankheit ist nach der Alzheimer-Krankheit die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung, deren Prävalenz erwartungsgemäß in den kommenden Jahren weiter steigen wird. Charakteristisch für die Parkinson-Krankheit sind die Lewy-Körperchen, welche aus aggregierten α -Synukleinen bestehen. Die Lewy Pathologie findet sich aufsteigend in verschiedenen Arealen des Nervensystems und beginnt im Dorsalen Motorischen Vagus Kern. Im weiteren Verlauf finden sich die intraneuronalen Einschlusskörperchen zusätzlich in den Raphe Kernen und im Locus Coeruleus. Die Pathologie breitet sich weiter auf die Substantia nigra und Amygdala aus, bis sie schließlich zum zerebralen Kortex aufsteigt.

Durch den Untergang dopaminerger Neurone in der Substantia nigra pars compacta kommt es zu den klassischen motorischen Symptomen wie Hypokinesie, Tremor, Rigor und posturale Instabilität. Doch bereits Jahre zuvor zeigen sich häufig Symptome einer prodromalen Parkinson-Krankheit. Zu diesen prämotorischen Symptomen zählen Hyposmie, Obstipation, orthostatische Hypotension und Schlafstörungen. Der Locus Coeruleus besitzt eine möglicherweise unterschätzte Funktion bei der Pathogenese der Parkinson-Krankheit. Er triggert zum einen die motorischen Symptome der Erkrankung und wird zum anderen für einige der nicht-motorischen Symptome – wie Schlafstörungen, Depressionen und Angst - verantwortlich gemacht. Der Locus Coeruleus befindet sich am Rand des Vierten Ventrikels auf Höhe der Pons und ist die größte noradrenerge Quelle im Zentralen Nervensystem. Um eine kontinuierliche Noradrenalin-Ausschüttung zu gewährleisten, besitzen die Neurone des Locus Coeruleus eine intrinsische Schrittmacheraktivität.

So wurde in der vorliegenden Arbeit mit einem prämotorischen Mausmodell der Parkinson-Krankheit gearbeitet, bei welchem mit Hilfe von Adeno-assoziierten Viren humanes mutiertes A53T- α Synuklein im Locus Coeruleus überexprimiert wurde. In der Kontrollgruppe wurde Luziferase überexprimiert, um allgemeine Effekte einer Proteinüberexpression auszuschließen und Effekte speziell durch α -Synuklein zu untersuchen.

Mit Hilfe des Patch-Clamp-Verfahrens wurden elektrophysiologische Messungen an den Locus Coeruleus Neuronen im akuten Hirnschnitt durchgeführt. Die noradrenergen Neurone waren alle spontan-aktiv und zeigten die charakteristische intrinsische Schrittmacheraktivität mit einer Frequenz von 1-3 Hz. Nach Überexpression von A53T- α -Synuklein stieg die Feuerrate zeitabhängig signifikant an, während die Feuerrate nach Luziferase Überexpression stabil blieb.

So wurden die Aktionspotentiale im Einzelnen analysiert und es zeigte sich eine deutlich reduzierte Amplitude der Nachhyperpolarisation nach α -Synuklein Überexpression im Vergleich zur Luziferase Gruppe. Die Aktionspotentialbreite und das Schwellenpotential waren unverändert in beiden Gruppen.

Auf der Suche nach dem Mechanismus für die erhöhte Feuerrate und die reduzierte Nachhyperpolarisation wurden verschiedene Kaliumströme untersucht. Kaliumselektive Ionenkanäle haben eine zentrale Bedeutung bei der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials, der Repolarisation und der Nachhyperpolarisation der Aktionspotentiale. Zu den Kaliumströmen, welche in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, gehören die transienten Kaliumauswärtsströme, die verzögerten Kaliumgleichrichterströme und die Kalzium-aktivierten Kaliumströme. Die ersten beiden dieser Kaliumströme entstehen durch eine Depolarisation des Membranpotentials, während die Kalzium-aktivierten Kaliumströme durch einen intrazellulären Kalziumanstieg entstehen.

Die Stromantworten auf depolarisierende Spannungssprünge zeigten unveränderte transiente Kaliumauswärtsströme und Kaliumgleichrichterströme nach α -Synuklein und Luziferase Überexpression. Die Kalzium-aktivierten Kaliumströme nahmen im Verlauf nach A53T- α -Synuklein Überexpression jedoch signifikant ab, während diese Ströme nach Luziferase Überexpression stabil blieben. Somit ließ sich die erhöhte intrinsische Schrittmacheraktivität und reduzierte Nachhyperpolarisation in der vorliegenden Arbeit durch reduzierte Kalzium-aktivierte Kaliumkanäle erklären.

Demzufolge wird die Aktivierung von Kalzium-aktivierten Kaliumkanälen als ein vielversprechender Ansatzpunkt zur Neuroprotektion des Locus Coeruleus während der frühen Stadien der Parkinson-Krankheit postuliert.

6. Summary

The Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disorder after Alzheimer's disease with an increasing prevalence. The characteristic of the Parkinson's disease are the Lewy bodies, which mainly contain the aggregated α -synuclein. The Lewy pathology is located in distinct areas of the human nerve system and spreads continuously beginning in the dorsal motor nucleus. In the course of time the intraneuronal inclusion bodies reach the medullary raphe nuclei and the locus coeruleus. After the pathology has spread over the substantia nigra and amygdala, it finally reaches the cerebral cortex.

The degeneration of the dopaminergic substantia nigra pars compacta neurons causes the typical motor symptoms of Parkinson's disease including hypokinesia, tremor, rigor and postural instability. Some years in advance there are often symptoms of a prodromal Parkinson's disease. These premotor symptoms include hyposmia, constipation, orthostatic hypotension and sleep disorders. The locus coeruleus has a probably underestimated role in the pathogenesis of the Parkinson's disease. First it provides the motor symptoms of the disease and second it is likely to cause some of the non-motor symptoms like sleep disorders, depression and fear. The locus coeruleus is located next to the fourth ventricle at the level of the pons and it is the major noradrenergic source in the central nervous system. To guarantee a continuous release of norepinephrine the neurons of the locus coeruleus possess an intrinsic pacemaker activity.

In my thesis work I focused on a premotor mouse model of the Parkinson's disease, in which human mutant A53T- α -synuclein was overexpressed in the locus coeruleus through an adeno-associated virus. In the control group luciferase was overexpressed to exclude general effects of the protein overexpression and to examine specially the effects of α -synuclein.

Using the patch-clamp-technique I examined electrophysiological changes in the locus coeruleus neurons in acute brain slices. All of the noradrenergic neurons were spontaneously active and showed the characteristic intrinsic pacemaker activity with a frequency of 1-3 Hz. After overexpressing A53T- α -synuclein the firing frequency time-dependently increased significantly, while the firing rate after overexpressing luciferase remained constant. As a next step the action potentials were analysed separately and they showed a significant decrease of the afterhyperpolarisation amplitude post α -synuclein overexpression compared to the luciferase group. There was no difference in the action potential width and the threshold between these two groups.

Searching for mechanism behind this increased firing frequency and reduced afterhyperpolarization several potassium currents were examined. Potassium selective ion channels play a central role in maintaining the resting membrane potential, the repolarisation and afterhyperpolarisation of the action potentials. The potassium channels, which were examined in this here present work, include the transient outward potassium channels, the delayed rectifier potassium channels and the calcium-activated potassium channels. The first two potassium channels are activated by depolarisation of the membrane potential, whereas the calcium-activated potassium channels are activated by an intracellular calcium increase.

The current responses to depolarizing voltage steps showed unchanged transient outward potassium channels and delayed rectifier potassium channels post α -synuclein and luciferase overexpression. However the calcium-activated potassium channels significantly decreased after A53T- α -synuclein overexpression, whereas these currents stayed constant after luciferase overexpression. Therefore the increased intrinsic pacemaker activity and the reduced afterhyperpolarization could be explained by reduced calcium-activated potassium currents in this here present work.

As a consequence the activation of calcium-activated potassium channels is postulated as a promising approach protecting the neurons of the locus coeruleus during the early stages of Parkinson's disease.

7. Literaturverzeichnis

- Ahlskog, J. E. & M. D. Muentner (2001) Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov Disord*, 16, 448-58.
- Allen. 2015. Allen Mouse Brain Atlas. Available from: <http://mouse.brain-map.org>: Allen Institute for Brain & Science.
- Alreja, M. & G. K. Aghajanian (1991) Pacemaker activity of locus coeruleus neurons: whole-cell recordings in brain slices show dependence on cAMP and protein kinase A. *Brain Res*, 556, 339-43.
- Alvarez, V. A., C. C. Chow, E. J. Van Bockstaele & J. T. Williams (2002) Frequency-dependent synchrony in locus ceruleus: role of electrotonic coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 4032-6.
- Aston-Jones, G. & J. D. Cohen (2005) An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: adaptive gain and optimal performance. *Annu Rev Neurosci*, 28, 403-50.
- Beal, M. F. (1998) Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis. *Ann Neurol*, 44, S110-4.
- Bean, B. P. (2007) The action potential in mammalian central neurons. *Nat Rev Neurosci*, 8, 451-65.
- Behrends, J. C., J. Bischofberger, R. Deutzmann, H. Ehmke, S. Frings, S. Grissmer, M. Hoth, A. Kurtz, J. Leipziger, F. Müller, C. Pedain, J. Rettig, C. Wagner & E. Wischmeyer. 2017. *Duale Reihe Physiologie*. Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag KG.
- Benítez, B. A., H. M. Belálcazar, A. Anastasia, D. T. Mamah, C. F. Zorumski, D. H. Mascó, D. G. Herrera & G. A. de Erasquin (2011) Functional reduction of SK3-mediated currents precedes AMPA-receptor-mediated excitotoxicity in dopaminergic neurons. *Neuropharmacology*, 60, 1176-86.
- Berg, D., R. B. Postuma, C. H. Adler, B. R. Bloem, P. Chan, B. Dubois, T. Gasser, C. G. Goetz, G. Halliday, L. Joseph, A. E. Lang, I. Liepelt-Scarfone, I. Litvan, K. Marek, J. Obeso, W. Oertel, C. W. Olanow, W. Poewe, M. Stern & G. Deuschl (2015) MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Mov Disord*, 30, 1600-11.
- Berkefeld, H., B. Fakler & U. Schulte (2010) Ca²⁺-activated K⁺ channels: from protein complexes to function. *Physiol Rev*, 90, 1437-59.
- Berridge, C. W. & E. D. Abercrombie (1999) Relationship between locus coeruleus discharge rates and rates of norepinephrine release within neocortex as assessed by in vivo microdialysis. *Neuroscience*, 93, 1263-70.
- Berridge, C. W. & B. D. Waterhouse (2003) The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Brain Res Rev*, 42, 33-84.
- Braak, H. & K. Del Tredici (2017) Neuropathological Staging of Brain Pathology in Sporadic Parkinson's disease: Separating the Wheat from the Chaff. *J Parkinsons Dis*, 7, S71-S85.
- Braak, H., E. Ghebremedhin, U. Rüb, H. Bratzke & K. Del Tredici (2004) Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res*, 318, 121-34.
- Bremner, J. D., J. H. Krystal, S. M. Southwick & D. S. Charney (1996) Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety: I. Preclinical studies. *Synapse*, 23, 28-38.
- Bronstein, J. M., M. Tagliati, R. L. Alterman, A. M. Lozano, J. Volkmann, A. Stefani, F. B. Horak, M. S. Okun, K. D. Foote, P. Krack, R. Pahwa, J. M. Henderson, M. I. Hariz, R. A. Bakay, A. Rezai, W. J. Marks, E. Moro, J. L. Vitek, F. M. Weaver, R. E. Gross & M. R. DeLong (2011) Deep brain stimulation for Parkinson disease: an expert consensus and review of key issues. *Arch Neurol*, 68, 165.
- Bruening-Wright, A., W. S. Lee, J. P. Adelman & J. Maylie (2007) Evidence for a deep pore activation gate in small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *J Gen Physiol*, 130, 601-10.

- Burré, J., M. Sharma, T. Tsetsenis, V. Buchman, M. R. Etherton & T. C. Südhof (2010) Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science*, 329, 1663-7.
- Chieng, B. & J. M. Bekkers (1999) GABA(B), opioid and alpha2 receptor inhibition of calcium channels in acutely-dissociated locus coeruleus neurones. *Br J Pharmacol*, 127, 1533-8.
- Coskuner, O. & O. Wise-Scira (2013) Structures and free energy landscapes of the A53T mutant-type α -synuclein protein and impact of A53T mutation on the structures of the wild-type α -synuclein protein with dynamics. *ACS Chem Neurosci*, 4, 1101-13.
- de Lau, L. M. & M. M. Breteler (2006) Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, 5, 525-35.
- de Oliveira, R. B., M. C. Howlett, F. S. Gravina, M. S. Imtiaz, R. J. Callister, A. M. Brichta & D. F. van Helden (2010) Pacemaker currents in mouse locus coeruleus neurons. *Neuroscience*, 170, 166-77.
- Deignan, J., R. Luján, C. Bond, A. Riegel, M. Watanabe, J. T. Williams, J. Maylie & J. P. Adelman (2012) SK2 and SK3 expression differentially affect firing frequency and precision in dopamine neurons. *Neuroscience*, 217, 67-76.
- Del Tredici, K., U. Rüb, R. A. De Vos, J. R. Bohl & H. Braak (2002) Where does parkinson disease pathology begin in the brain? *J Neuropathol Exp Neurol*, 61, 413-26.
- Delaville, C., P. D. Deurwaerdère & A. Benazzouz (2011) Noradrenaline and Parkinson's disease. *Front Syst Neurosci*, 5, 31.
- Dickson, D. W. (2012) Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2.
- Dolga, A. M. & C. Culmsee (2012) Protective Roles for Potassium SK/K(Ca)₂ Channels in Microglia and Neurons. *Front Pharmacol*, 3, 196.
- Dolga, A. M., A. de Andrade, L. Meissner, H. G. Knaus, M. Höllerhage, P. Christophersen, H. Zischka, N. Plesnila, G. U. Höglinger & C. Culmsee (2014) Subcellular expression and neuroprotective effects of SK channels in human dopaminergic neurons. *Cell Death Dis*, 5, e999.
- Dolga, A. M., N. Terpolilli, F. Kepura, I. M. Nijholt, H. G. Knaus, B. D'Orsi, J. H. Prehn, U. L. Eisel, T. Plant, N. Plesnila & C. Culmsee (2011) KCa₂ channels activation prevents [Ca²⁺]_i deregulation and reduces neuronal death following glutamate toxicity and cerebral ischemia. *Cell Death Dis*, 2, e147.
- Eldrup, E., P. Mogensen, J. Jacobsen, H. Pakkenberg & N. J. Christensen (1995) CSF and plasma concentrations of free norepinephrine, dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), and epinephrine in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand*, 92, 116-21.
- Espay, A. J., P. A. LeWitt & H. Kaufmann (2014) Norepinephrine deficiency in Parkinson's disease: the case for noradrenergic enhancement. *Mov Disord*, 29, 1710-9.
- Faber, E. S., A. J. Delaney & P. Sah (2005) SK channels regulate excitatory synaptic transmission and plasticity in the lateral amygdala. *Nat Neurosci*, 8, 635-41.
- Foote, S. L., G. Aston-Jones & F. E. Bloom (1980) Impulse activity of locus coeruleus neurons in awake rats and monkeys is a function of sensory stimulation and arousal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 3033-7.
- Foote, S. L., F. E. Bloom & G. Aston-Jones (1983) Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol Rev*, 63, 844-914.
- García-Lorenzo, D., C. Longo-Dos Santos, C. Ewencyk, S. Leu-Semenescu, C. Gallea, G. Quattrocchi, P. Pita Lobo, C. Poupon, H. Benali, I. Arnulf, M. Vidailhet & S. Lehericy (2013) The coeruleus/subcoeruleus complex in rapid eye movement sleep behaviour disorders in Parkinson's disease. *Brain*, 136, 2120-9.
- Gibb, W. R. & W. H. Poewe (1986) The centenary of Friederich H. Lewy 1885-1950. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 12, 217-22.
- Gleave, J. A., L. R. Arathoon, D. Trinh, K. E. Lizal, N. Giguère, J. H. M. Barber, Z. Najarali, M. H. Khan, S. L. Thiele, M. S. Semmen, J. B. Koprach, J. M. Brotchie, J. H. Eubanks, L. E. Trudeau

- & J. E. Nash (2017) Sirtuin 3 rescues neurons through the stabilisation of mitochondrial biogenetics in the virally-expressing mutant α -synuclein rat model of parkinsonism. *Neurobiol Dis*, 106, 133-146.
- Goldberg, J. A., J. N. Guzman, C. M. Estep, E. Ilijic, J. Kondapalli, J. Sanchez-Padilla & D. J. Surmeier (2012) Calcium entry induces mitochondrial oxidant stress in vagal neurons at risk in Parkinson's disease. *Nat Neurosci*, 15, 1414-21.
- Goldstein, D. S. (2013) Biomarkers, mechanisms, and potential prevention of catecholamine neuron loss in Parkinson disease. *Adv Pharmacol*, 68, 235-72.
- Gutman, G. A., K. G. Chandy, S. Grissmer, M. Lazdunski, D. McKinnon, L. A. Pardo, G. A. Robertson, B. Rudy, M. C. Sanguinetti, W. Stühmer & X. Wang (2005) International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev*, 57, 473-508.
- Guzman, J. N., J. Sánchez-Padilla, C. S. Chan & D. J. Surmeier (2009) Robust pacemaking in substantia nigra dopaminergic neurons. *J Neurosci*, 29, 11011-9.
- He, Q., J. B. Koprach, Y. Wang, W. B. Yu, B. G. Xiao, J. M. Brotchie & J. Wang (2016) Treatment with Trehalose Prevents Behavioral and Neurochemical Deficits Produced in an AAV- α -Synuclein Rat Model of Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol*, 53, 2258-68.
- Henrich, M. T., F. F. Geibl, B. Lee, W. H. Chiu, J. B. Koprach, J. M. Brotchie, L. Timmermann, N. Decher, L. A. Matschke & W. H. Oertel (2018) A53T- α -synuclein overexpression in murine locus coeruleus induces Parkinson's disease-like pathology in neurons and glia. *Acta Neuropathol Commun*, 6, 39.
- Hille, B. 2001. *Ion Channels of Excitable Membranes*. USA: Sinauer Associates.
- Hoogendijk, W. J., M. G. Feenstra, M. H. Botterblom, J. Gilhuis, I. E. Sommer, W. Kamphorst, P. Eikelenboom & D. F. Swaab (1999) Increased activity of surviving locus ceruleus neurons in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 45, 82-91.
- Hughes, A. J., S. E. Daniel, L. Kilford & A. J. Lees (1992) Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 55, 181-4.
- Ip, C. W., L. C. Klaus, A. A. Karikari, N. P. Visanji, J. M. Brotchie, A. E. Lang, J. Volkman & J. B. Koprach (2017) AAV1/2-induced overexpression of A53T- α -synuclein in the substantia nigra results in degeneration of the nigrostriatal system with Lewy-like pathology and motor impairment: a new mouse model for Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun*, 5, 11.
- Ishihara, L. & C. Brayne (2006) A systematic review of depression and mental illness preceding Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand*, 113, 211-20.
- Jankovic, J. (2008) Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 79, 368-76.
- Jankovic, J. & M. Stacy (2007) Medical management of levodopa-associated motor complications in patients with Parkinson's disease. *CNS Drugs*, 21, 677-92.
- Jones, B. E., A. E. Halaris, M. McIlhany & R. Y. Moore (1977) Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. I. Axonal transport in central noradrenergic neurons. *Brain Res*, 127, 1-21.
- Jost, W. H. (2010) Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's Disease. *J Neurol Sci*, 289, 69-73.
- (2013) Urological problems in Parkinson's disease: clinical aspects. *J Neural Transm (Vienna)*, 120, 587-91.
- Koprach, J. B., T. H. Johnston, M. G. Reyes, X. Sun & J. M. Brotchie (2010) Expression of human A53T alpha-synuclein in the rat substantia nigra using a novel AAV1/2 vector produces a rapidly evolving pathology with protein aggregation, dystrophic neurite architecture and nigrostriatal degeneration with potential to model the pathology of Parkinson's disease. *Mol Neurodegener*, 5, 43.
- Koprach, J. B., L. V. Kalia & J. M. Brotchie (2017) Animal models of α -synucleinopathy for Parkinson disease drug development. *Nat Rev Neurosci*, 18, 515-529.

- Krüger, R., W. Kuhn, K. L. Leenders, R. Sprengelmeyer, T. Müller, D. Woitalla, A. T. Portman, R. P. Maguire, L. Veenma, U. Schröder, L. Schöls, J. T. Epplen, O. Riess & H. Przuntek (2001) Familial parkinsonism with synuclein pathology: clinical and PET studies of A30P mutation carriers. *Neurology*, 56, 1355-62.
- Kuiper, E. F., A. Nelemans, P. Luiten, I. Nijholt, A. Dolga & U. Eisel (2012) K(Ca)₂ and k(ca)₃ channels in learning and memory processes, and neurodegeneration. *Front Pharmacol*, 3, 107.
- Kurata, H. T. & D. Fedida (2006) A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation. *Prog Biophys Mol Biol*, 92, 185-208.
- Lasser-Katz, E., A. Simchovitz, W. H. Chiu, W. H. Oertel, R. Sharon, H. Soreq, J. Roeper & J. A. Goldberg (2017) Mutant α -Synuclein Overexpression Induces Stressless Pacemaking in Vagal Motoneurons at Risk in Parkinson's Disease. *J Neurosci*, 37, 47-57.
- Li, J., V. N. Uversky & A. L. Fink (2001) Effect of familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T on the structural properties, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. *Biochemistry*, 40, 11604-13.
- Lipton, S. A. & P. Nicotera (1998) Calcium, free radicals and excitotoxins in neuronal apoptosis. *Cell Calcium*, 23, 165-71.
- Liu, S. Y., P. Chan & A. J. Stoessl (2017) The underlying mechanism of prodromal PD: insights from the parasympathetic nervous system and the olfactory system. *Transl Neurodegener*, 6, 4.
- Marien, M., M. Briley & F. Colpaert (1993) Noradrenaline depletion exacerbates MPTP-induced striatal dopamine loss in mice. *Eur J Pharmacol*, 236, 487-9.
- Mather, M. & C. W. Harley (2016) The Locus Coeruleus: Essential for Maintaining Cognitive Function and the Aging Brain. *Trends Cogn Sci*, 20, 214-226.
- Matschke, L. A., M. Bertoune, J. Roeper, T. P. Snutch, W. H. Oertel, S. Rinné & N. Decher (2015) A concerted action of L- and T-type Ca(2+) channels regulates locus coeruleus pacemaking. *Mol Cell Neurosci*, 68, 293-302.
- Matschke, L. A., S. Rinné, T. P. Snutch, W. H. Oertel, A. M. Dolga & N. Decher (2018) Calcium-activated SK potassium channels are key modulators of the pacemaker frequency in locus coeruleus neurons. *Mol Cell Neurosci*, 88, 330-341.
- Mavridis, M., A. D. Degryse, A. J. Lategan, M. R. Marien & F. C. Colpaert (1991) Effects of locus coeruleus lesions on parkinsonian signs, striatal dopamine and substantia nigra cell loss after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in monkeys: a possible role for the locus coeruleus in the progression of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 41, 507-23.
- McCall, J. G., R. Al-Hasani, E. R. Siuda, D. Y. Hong, A. J. Norris, C. P. Ford & M. R. Bruchas (2015) CRH Engagement of the Locus Coeruleus Noradrenergic System Mediates Stress-Induced Anxiety. *Neuron*, 87, 605-20.
- Oertel, W. & J. B. Schulz (2016) Current and experimental treatments of Parkinson disease: A guide for neuroscientists. *J Neurochem*, 139 Suppl 1, 325-337.
- Onofrj, M., A. Thomas & L. Bonanni (2007) New approaches to understanding hallucinations in Parkinson's disease: phenomenology and possible origins. *Expert Rev Neurother*, 7, 1731-50.
- Ordway, G. A., K. S. Smith & J. W. Haycock (1994) Elevated tyrosine hydroxylase in the locus coeruleus of suicide victims. *J Neurochem*, 62, 680-5.
- Oyamada, Y., D. Ballantyne, K. Mückenhoff & P. Scheid (1998) Respiration-modulated membrane potential and chemosensitivity of locus coeruleus neurones in the in vitro brainstem-spinal cord of the neonatal rat. *J Physiol*, 513 (Pt 2), 381-98.
- Pamphlett, R. (2014) Uptake of environmental toxicants by the locus ceruleus: a potential trigger for neurodegenerative, demyelinating and psychiatric disorders. *Med Hypotheses*, 82, 97-104.
- Pickel, V. M., T. H. Joh, P. M. Field, C. G. Becker & D. J. Reis (1975) Cellular localization of tyrosine hydroxylase by immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*, 23, 1-12.

- Poe, G. R. (2017) Sleep Is for Forgetting. *J Neurosci*, 37, 464-473.
- Pollanen, M. S., D. W. Dickson & C. Bergeron (1993) Pathology and biology of the Lewy body. *J Neuropathol Exp Neurol*, 52, 183-91.
- Ponsen, M. M., D. Stoffers, J. Booij, B. L. van Eck-Smit, E. C. h. Wolters & H. W. Berendse (2004) Idiopathic hyposmia as a preclinical sign of Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 56, 173-81.
- Pringsheim, T., N. Jette, A. Frolkis & T. D. Steeves (2014) The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord*, 29, 1583-90.
- Purves, D., G. Augustine & F. D. e. al. 2001. *Neuroscience*. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Qi, G., G. Radnikow & D. Feldmeyer (2015) Electrophysiological and morphological characterization of neuronal microcircuits in acute brain slices using paired patch-clamp recordings. *J Vis Exp*, 52358.
- Raskind, M. A. & E. R. Peskind (1994) Neurobiologic bases of noncognitive behavioral problems in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 8 Suppl 3, 54-60.
- Remy, P., M. Doder, A. Lees, N. Turjanski & D. Brooks (2005) Depression in Parkinson's disease: loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system. *Brain*, 128, 1314-22.
- Rommelfanger, K. S. & D. Weinshenker (2007) Norepinephrine: The redheaded stepchild of Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol*, 74, 177-90.
- Rudy, B. (1988) Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience*, 25, 729-49.
- Sah, P. & P. Davies (2000) Calcium-activated potassium currents in mammalian neurons. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 27, 657-63.
- Sah, P. & E. M. McLachlan (1992) Potassium currents contributing to action potential repolarization and the afterhyperpolarization in rat vagal motoneurons. *J Neurophysiol*, 68, 1834-41.
- Sakmann, B. & E. Neher (1984) Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu Rev Physiol*, 46, 455-72.
- Sanchez-Padilla, J., J. N. Guzman, E. Ilijic, J. Kondapalli, D. J. Galtieri, B. Yang, S. Schieber, W. Oertel, D. Wokosin, P. T. Schumacker & D. J. Surmeier (2014) Mitochondrial oxidant stress in locus coeruleus is regulated by activity and nitric oxide synthase. *Nat Neurosci*, 17, 832-40.
- Sara, S. J. (2009) The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nat Rev Neurosci*, 10, 211-23.
- Schapira, A. H. V., K. R. Chaudhuri & P. Jenner (2017) Non-motor features of Parkinson disease. *Nat Rev Neurosci*, 18, 509.
- Schrag, A., L. Horsfall, K. Walters, A. Noyce & I. Petersen (2015) Prediagnostic presentations of Parkinson's disease in primary care: a case-control study. *Lancet Neurol*, 14, 57-64.
- Senard, J. M., C. Brefel-Courbon, O. Rascol & J. L. Montastruc (2001) Orthostatic hypotension in patients with Parkinson's disease: pathophysiology and management. *Drugs Aging*, 18, 495-505.
- Shen, K. Z. & R. A. North (1993) Excitation of rat locus coeruleus neurons by adenosine 5'-triphosphate: ionic mechanism and receptor characterization. *J Neurosci*, 13, 894-9.
- Shepard, P. D. & B. S. Bunney (1991) Repetitive firing properties of putative dopamine-containing neurons in vitro: regulation by an apamin-sensitive Ca(2+)-activated K+ conductance. *Exp Brain Res*, 86, 141-50.
- Shibasaki, Y., D. A. Baillie, D. St Clair & A. J. Brookes (1995) High-resolution mapping of SNCA encoding alpha-synuclein, the non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid precursor, to human chromosome 4q21.3-->q22 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 71, 54-5.
- Simson, P. E. & J. M. Weiss (1988) Altered activity of the locus coeruleus in an animal model of depression. *Neuropsychopharmacology*, 1, 287-95.

- Srinivasan, J. & W. J. Schmidt (2003) Potentiation of parkinsonian symptoms by depletion of locus coeruleus noradrenaline in 6-hydroxydopamine-induced partial degeneration of substantia nigra in rats. *Eur J Neurosci*, 17, 2586-92.
- St Louis, E. K., A. R. Boeve & B. F. Boeve (2017) REM Sleep Behavior Disorder in Parkinson's Disease and Other Synucleinopathies. *Mov Disord*, 32, 645-658.
- Stocker, M. (2004) Ca²⁺-activated K⁺ channels: molecular determinants and function of the SK family. *Nat Rev Neurosci*, 5, 758-70.
- Subramaniam, M., D. Althof, S. Gispert, J. Schwenk, G. Auburger, A. Kulik, B. Fakler & J. Roeper (2014) Mutant α -synuclein enhances firing frequencies in dopamine substantia nigra neurons by oxidative impairment of A-type potassium channels. *J Neurosci*, 34, 13586-99.
- Surmeier, D. J., J. A. Obeso & G. M. Halliday (2017) Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. *Nat Rev Neurosci*, 18, 101-113.
- Sveinbjornsdottir, S. (2016) The clinical symptoms of Parkinson's disease. *J Neurochem*, 139 Suppl 1, 318-324.
- Szabadi, E. (2013) Functional neuroanatomy of the central noradrenergic system. *J Psychopharmacol*, 27, 659-93.
- Takahashi, K., Y. Kayama, J. S. Lin & K. Sakai (2010) Locus coeruleus neuronal activity during the sleep-waking cycle in mice. *Neuroscience*, 169, 1115-26.
- Van der Perren, A., C. Van den Haute & V. Baekelandt (2015) Viral vector-based models of Parkinson's disease. *Curr Top Behav Neurosci*, 22, 271-301.
- Vargas, K. J., S. Makani, T. Davis, C. H. Westphal, P. E. Castillo & S. S. Chandra (2014) Synucleins regulate the kinetics of synaptic vesicle endocytosis. *J Neurosci*, 34, 9364-76.
- Vazey, E. M. & G. Aston-Jones (2012) The emerging role of norepinephrine in cognitive dysfunctions of Parkinson's disease. *Front Behav Neurosci*, 6, 48.
- Villar-Piqué, A., T. Lopes da Fonseca & T. F. Outeiro (2016) Structure, function and toxicity of alpha-synuclein: the Bermuda triangle in synucleinopathies. *J Neurochem*, 139 Suppl 1, 240-255.
- Weinshenker, D. (2018) Long Road to Ruin: Noradrenergic Dysfunction in Neurodegenerative Disease. *Trends Neurosci*, 41, 211-223.
- Williams, J. T., R. A. North, S. A. Shefner, S. Nishi & T. M. Egan (1984) Membrane properties of rat locus coeruleus neurones. *Neuroscience*, 13, 137-56.
- Williams-Gray, C. H., T. Foltynie, S. J. Lewis & R. A. Barker (2006) Cognitive deficits and psychosis in Parkinson's disease: a review of pathophysiology and therapeutic options. *CNS Drugs*, 20, 477-505.
- Zhang, X., X. Sun, J. Wang, L. Tang & A. Xie (2017) Prevalence of rapid eye movement sleep behavior disorder (RBD) in Parkinson's disease: a meta and meta-regression analysis. *Neurol Sci*, 38, 163-170.
- Zádori, D., G. Veres, L. Szalárdy, P. Klivényi, J. Toldi & L. Vécsei (2014) Glutamatergic dysfunctioning in Alzheimer's disease and related therapeutic targets. *J Alzheimers Dis*, 42 Suppl 3, S177-87.

8. Abkürzungsverzeichnis

AAV	<u>A</u> deno- <u>a</u> ssoziierte <u>V</u> iren
ACSF	Engl.: „ <u>a</u> r <u>t</u> i <u>f</u> i <u>c</u> i <u>a</u> l <u>c</u> e <u>r</u> e <u>b</u> r <u>o</u> s <u>p</u> i <u>n</u> a <u>l</u> <u>f</u> l <u>i</u> u <u>d</u> “
AK	<u>A</u> ntik <u>ö</u> rper
AMPA	Engl.: „ <u>a</u> l <u>p</u> h <u>a</u> - <u>a</u> m <u>i</u> n <u>o</u> - <u>3</u> - <u>h</u> y <u>d</u> r <u>o</u> x <u>y</u> - <u>5</u> - <u>m</u> e <u>t</u> h <u>yl</u> - <u>4</u> - <u>i</u> s <u>o</u> x <u>a</u> z <u>o</u> l <u>e</u> <u>p</u> r <u>o</u> p <u>i</u> o <u>n</u> i <u>c</u> <u>a</u> c <u>i</u> d“
AP	<u>A</u> ktionspotential
AP-5	Engl.: „ <u>a</u> m <u>i</u> n <u>o</u> - <u>5</u> - <u>p</u> h <u>o</u> s <u>p</u> h <u>o</u> n <u>o</u> v <u>a</u> l <u>e</u> r <u>i</u> c <u>a</u> c <u>i</u> d“
Aqua dest.	Doppelt destilliertes Wasser
BGH-pA-Sequenz	Engl.: „ <u>b</u> o <u>v</u> i <u>n</u> e <u>g</u> r <u>o</u> w <u>t</u> h <u>h</u> o <u>r</u> m <u>o</u> n <u>e</u> <u>p</u> o <u>l</u> y <u>a</u> d <u>e</u> n <u>y</u> l <u>a</u> t <u>i</u> o <u>n</u> <u>s</u> e <u>q</u> u <u>e</u> n <u>c</u> e“
BK Kanal	Ca ²⁺ aktivierter Kaliumkanal mit großer Einzelkanalleitfähigkeit
Ca ²⁺	Engl.: „ <u>C</u> alcium“
CBA	Engl.: „ <u>c</u> h <u>i</u> c <u>k</u> e <u>n</u> <u>β</u> - <u>a</u> c <u>t</u> i <u>n</u> “
CMV	<u>C</u> ytomegalie <u>v</u> irus
DMV	<u>D</u> orsaler <u>M</u> otorsicher <u>V</u> agus <u>k</u> ern
ITR	Engl.: „ <u>i</u> n <u>v</u> e <u>r</u> t <u>e</u> d <u>t</u> e <u>r</u> m <u>i</u> n <u>a</u> l <u>r</u> e <u>p</u> e <u>a</u> t“
K ⁺	Kalium
K _{Ca}	Ca ²⁺ aktivierter Kaliumkanal
K _{ir} Kanal	Einwärtsrektifizierender Kaliumkanal
K _v Kanal	Spannungsgesteuerter Kaliumkanal
LC	<u>L</u> ocus <u>C</u> oeruleus
Na ⁺	Natrium
NBQX	Engl.: „ <u>2</u> , <u>3</u> - <u>d</u> i <u>h</u> y <u>d</u> r <u>o</u> x <u>y</u> - <u>6</u> - <u>n</u> i <u>t</u> r <u>o</u> - <u>7</u> - <u>s</u> u <u>l</u> f <u>a</u> m <u>o</u> y <u>l</u> - <u>b</u> e <u>n</u> z <u>o</u> q <u>u</u> i <u>n</u> o <u>x</u> a <u>l</u> i <u>n</u> e- <u>2</u> , <u>3</u> - <u>d</u> i <u>o</u> n <u>e</u> “
NHP	<u>N</u> ach <u>h</u> yperpolarisation
NMDA	Engl.: „ <u>N</u> - <u>M</u> e <u>t</u> h <u>yl</u> - <u>D</u> - <u>a</u> s <u>p</u> a <u>r</u> t <u>a</u> t <u>e</u> “
PBS	Engl.: „ <u>p</u> h <u>o</u> s <u>p</u> h <u>a</u> t <u>e</u> - <u>b</u> u <u>f</u> f <u>e</u> r <u>e</u> d <u>s</u> a <u>l</u> i <u>n</u> e“
PK	<u>P</u> arkinson- <u>K</u> r <u>a</u> n <u>k</u> h <u>e</u> i <u>t</u>
REM	Engl.: „ <u>R</u> ap <u>i</u> d <u>E</u> y <u>e</u> <u>M</u> o <u>v</u> e <u>m</u> e <u>n</u> t“

Rs	Serienwiderstand
SK Kanal	Ca ²⁺ aktivierter Kaliumkanal mit kleiner Einzelkanalleitfähigkeit
SNpc	Substantia Nigra pars compacta
TH	Tyrosinhydroxylase
WPRE	Engl.: " <i>woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element</i> "
ZNS	Zentrales Nervensystem
αSyn	α-Synuklein

9. Anhang

Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen

Meine akademischen Lehrenden waren in Marburg:

Bartsch, Bauer, Baum, Becker, Bien, Brandt, Cetin, Czubayko, Decher, Dickschatt, Donner-Banzhoff, Efe, Eming, Ermisch, Falkenberg, Feuser, Fritz, Fuchs-Winkelmann, Gebhardt, Geraedts, Gress, Grosse, Grundmann, Hertl, Hofman, Hoyer, Jerrentrup, Josephs, Kann, Kill, Kinscherf, Kircher, König, Kussin, Lill, Lohoff, Luster, Mahnken, Maier, Möller, Moll, Mueller, Müller, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Oberkircher, Oberwinkler, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Peterlein, Pfützner, Plant, Reese, Renz, Richter, Riera-Knorrenschild, Riße, Roelke, Rost, Ruchholtz, Sevinc, Schäfer, Schmeck, Schneider, Schratt, Schüttler, Sekundo, Stiewe, Teymoortash, Thieme, Thum, Timmermann, Timmesfeld, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Weihe, Westermann, Wrocklage, Wulf