Aus dem Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie
Der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Helmut Haas

Koordinierte Expression erregender Mechanismen in wach-aktiven hypothalamischen Neuronen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Bettina Theresia Amberger

2007

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakulät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. Nat. Bernd Nürnberg

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Helmut Haas

Korreferent: Prof. Dr. med. Mario Siebler

Mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas
und für die herausragende Betreuung meiner
Doktorarbeit gilt meinem Doktorvater,
Herrn Professor Dr. med. H. L. Haas,
sowie meiner Betreuerin,
Frau PD Dr. rer. nat. Olga Sergeeva

Veröffentlichungen:

1) O. A. Sergeeva, B. T. Amberger, K. S: Eriksson, A. Scherer and H. L. Haas, *CO-ordinated expression of 5-HT$_{2C}$ receptors with the NCX1 Na$^+$/Ca^{2+} exchanger in histamnergic neurons*; Journal of Neurochemistry, 2003, 87, 657-664
2) O. A. Sergeeva, B. T. Amberger, V. S. Vorobjev, K. S: Eriksson and H. L. Haas, *AMPA receptor properties and coexpression with sodium-calcium exchanger in rat hypothalamic neurons*; European Journal of Neuroscience, 2004, Vol. 19, pp. 957-965
3) O. A. Sergeeva, Bettina T. Amberger and Helmut L. Haas, *Editing of AMPA and serotonin 2C receptors in individual central neurons, controlling wakefulness*; (in Revision)

Als Posterbeitrag:

1) Bettina Amberger, Olga Sergeeva, Krister Eriksson and Helmut Haas*; Two novel isoforms of the Na$^+$/Ca^{2+} exchanger 1 (NCX1.14 and NCX1.15) are candidates for the serotonin-induced excitation of the rat histaminergic neurons*; Deutsche Physiologentagung, Bochum, 2003
2) Amberger B. T., Sergeeva O. A., Eriksson K. S., Chepkova A. N., Vorobjev V. S., Shaonova I. N., Scherer A. and Haas H. L., *Expression of NCKX but not NCX correlates with the kinetics of glutamate responses and expression of AMPA receptors in rat histaminergic neurons*; Tagung der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft, Göttingen, 2003
3) Sergeeva O. A., Amberger B. T. and Haas H. L., *Editing of AMPA and 5-HT$_{2C}$ receptors pre-mRNAs in individual rat histaminergic neurons is not coordinated*; Deutsche Physiologentagung, Leipzig, 2004

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung **7**

2. Grundlagen **8**

2.1 Lage und Funktion des Hypothalamus 8

2.2 Aminerge Transmitter 10

2.2.1 Histamin 10

2.2.2 Serotonin 14

2.3 Glutamat 17

2.4 Das Natrium – Kalzium Austauschprotein NCX 21

2.5 Das Kalium abhängige Na^{+} – Ca^{2+} Austauschprotein NCKX 22

2.6 Adenosindeaminasen 24

2.7 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit 24

3. Material und Methoden **25**

3.1 Tier und Zellpräparation 25

3.2 Ganz-Zell Strom Aufzeichnung 27

3.3 Stoffapplikation 29

3.4 Datenanalyse 29

3.5 RNA Gewinnung und reverse Transkriptase 30

3.6 Immunhistochemie 37

4. Ergebnisse **39**

4.1 Koexpression von NCX und NCKX mit Serotonin Rezeptoren 39

4.2 NCX1 Antiserum färbt HDC pos. hypothalamische Neurone 41

4.3 Die verschiedenen NCX 1 Splicevarianten in der TM Region 42

4.4 Immunfärbung zeigt NCKX2 Protein in TM Neuronen 44

4.5 Die Expression von NCX und NCKX in Zusammenhang mit AMPA – Rezeptoren 45
4.6 Ca^{2+} Durchgängigkeit der AMPA Rezeptoren 47
4.7 Desensitisierungskinetik und AMPA Rezeptortypen 48
4.8 Cyclothiazid (CTZ) Modulation der Glutamat Antwort in TM Neuronen 49
4.9 Kainat Dosis-Wirkungskurve und Potenzierung durch CTZ 50
4.10 Glutamat und Kainat aktivieren über AMPA Rezeptoren vermittelte Ganz-Zell Ströme in TM Neuronen 51
4.11 Analyse der ADAR Expression 53
4.12 GluR2 Q/R Editing versus ADAR2 Expression 56
4.13 GluR2 R/G Editing korreliert mit der Expression von ADAR 56
4.14 Splicing innerhalb der coding Region von ADAR2 57
4.15 Editing an verschiedenen AMPA mRNA Positionen und ADAR Expression 58
4.16 Editing versus Eigenschaften der AMPA Rezeptoren 61
4.17 Editing des Serotonin 2c Rezeptors 63

5. Diskussion 66
5.1 Serotonin, NCX und NCKX 66
5.2 AMPA und NCX/NCKX 69
5.3 Editing AMPA und Serotonin 72

6. Zusammenfassung 76

7. Abkürzungsverzeichnis 77

8. Literaturverzeichnis 78

1. Einleitung

Der Nucleus tuberomamillaris (TM) im Hypothalamus mit seinen histaminergen Neuronen ist das Zentrum für die Regulation von Wachheit und Aufmerksamkeit. Zusammen mit anderen aminergen und peptidergen Systemen, deren Neurone Acetylcholin, Serotonin, Katecholamine und die Orexine (Hypocretine) enthalten, sind sie für die Homöostase wesentlicher Grundfunktionen zuständig.

Die Neurone des Nucleus tuberomamillaris zeigen eine regelmäßige Aktivität während Wachheit und stellen ihre Aktivität während des Schlafes ein. Ihre Aktivität wird während des Schlafes durch hemmende, GABA vermittelte Einflüsse aus der ventrolateralen präoptischen Area (VLPO) blockiert (Nitz and Siegel, 1996).

Die Aktivität der histaminergen Neurone wird durch Serotonin (Eriksson et al., 2001a) und die Orexine verstärkt (Eriksson et al., 2001b). Die Depolarisation durch diese Transmitter geschieht durch Aktivierung eines elektrogenen Natrium-Kalzium Austauschers. Weitere erregende Einflüsse stammen aus dem lateralen Hypothalamus (Yang and Hatton, 1997) und werden durch Glutamat, den wichtigsten erregenden Transmitter im Zentralnervensystem (ZNS) vermittelt, er bindet an verschiedene Rezeptoren, darunter schnelle ionotrope AMPA Rezeptoren (sie vermitteln schnelle exzitatorische postsynaptische Potentiale (EPSP), NMDA Rezeptoren (die unter bestimmten Umständen zu den EPSPs beitragen) und metabotrope Glutamat Rezeptoren (sie vermitteln langsame EPSPs). Die AMPA Rezeptoren, die in den TM Neuronen den Hauptteil der schnellen EPSPs unter normalen Bedingungen vermitteln sind nicht für Kalzium durchlässig (siehe unten).

Kalzium Homöostase ist äußerst wichtig für das Überleben der Zellen. Bei einer Überaktivierung des AMPA Rezeptors, zum Beispiel durch Kainat (ein Agonist am AMPA Rezeptor, der eine nicht desensitisierende Antwort verursacht und die Feuerrate der TM Neuronen erhöht), führt dies möglicherweise zur Aktivierung des Natrium-Kalzium Austauschers im Umkehrmodus, was eine Kalzium Anhäufung und ein Absterben der Zelle zur Folge hat.

In dieser Arbeit wurden Funktionen und Beziehungen der AMPA und Serotonin – Rezeptoren an den histaminergen Zellen untersucht:

1. Zusammenhänge der Expression von Serotonin$_{2C}$ Rezeptoren (5-HT$_{2C}$ Rezeptoren), AMPA Rezeptoren und der Austauscher für Natrium-Kalzium und für Natrium-Kalzium-Kalium. 2. Eine Analyse des Editingstatus (posttranskriptionelle

Modifikation auf Ebene der prä-mRNA) für AMPA- und Serotonin$_{2C}$ Rezeptoren, in Verbindung zur Expression der RNA editierenden Adenosindeaminase (ADAR).

2. Grundlagen

2.1 Lage und Funktion des Hypothalamus

Der Hypothalamus, an der Basis des Zwischenhirns gelegen, ist für die normale Funktion des Gesamtorganismus von größter Bedeutung. Begrenzt wird er nach frontal von der Lamina terminalis und der Comissura anterior. Kaudal schließen sich an den Hypothalamus die Corpora mamillaria an. Nach oben hin wird ein Teil der Begrenzung durch den Boden des 3. Ventrikels gebildet. Basal trifft man unmittelbar anliegend auf das Chiasma opticum und dahinter folgt der Übergang des Hypothalamus in den Hypophysenstiel.

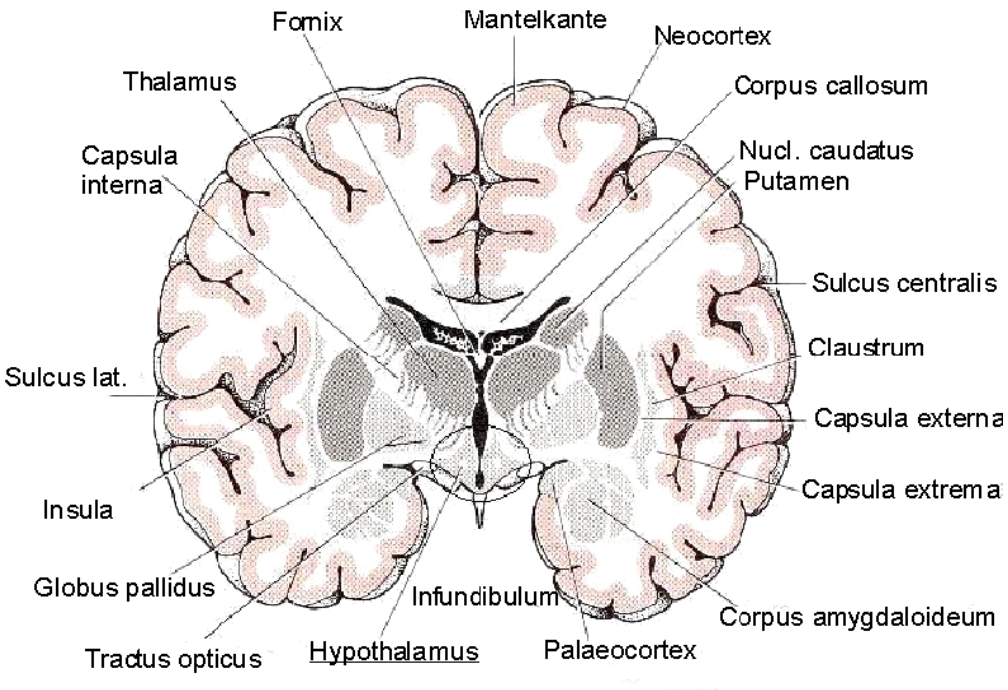


Abb. 1 Lage des Hypothalamus, Querschnitt durch ein menschliches Gehirn (modifiziert aus Anatomie; Schiebler, Schmidt, Zilles, 7. Auflage, Seite 741)

Der Hypothalamus ist der Regulator der vegetativen und endokrinen Funktionen des Körpers, hierzu zählen Temperaturregelung, Nahrungsaufnahme sowie der

Wasserhaushalt und die Kontrolle des Schlaf- Wachrhythmus. Diese Funktion wird durch ein weit reichendes Neuronensystem aus dem Nucleus tuberomamillaris reguliert (siehe Histamin). Der Hypothalamus gestaltet, als ein Teil des Limbischen Systems, die Verhaltensweisen eines Lebewesens wesentlich mit. Viele seiner Aufgaben erfüllt er in engem Zusammenhang mit dem endokrinen System, denn er produziert in Teilen seiner Kerngebiete selbst Hormone.

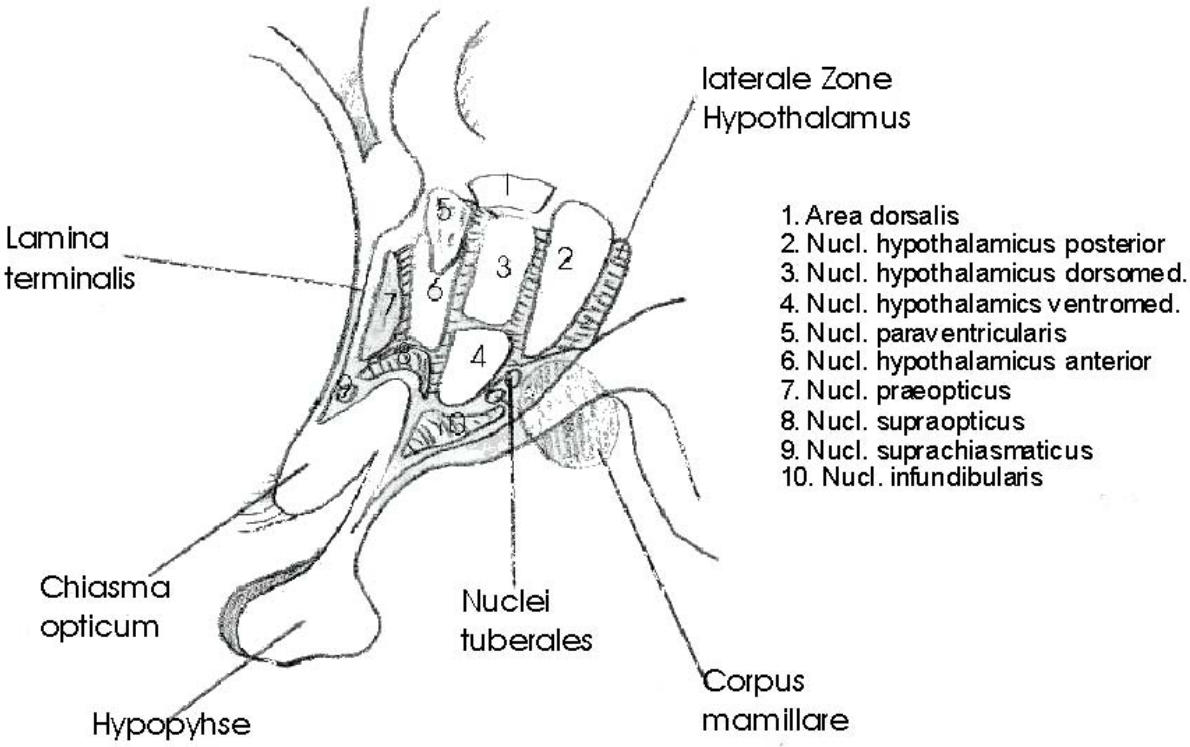


Abb. 2 Die Hypothalamuskerne des Menschen (modifizierte Zeichnung aus Anatomie; Schiebler, Schmidt, Zilles, 7. Auflage, Seite 751)

Seine verschiedenen Kerne hat man aufgrund ihrer anatomischen Lage zueinander bzw. ihrer Funktion nochmals zu Gruppen zusammengefasst:

Regio hypothalamica anterior

mit Nuclei praeoptici, Nucleus suprachiasmaticus, Nucleus paraventricularis, Nucleus supraopticus

Regio hypothalamica intermedia

mit Nucleus hypothalamicus ventromedialis, Nucleus dorsomedialis, Nucleus infundibularis

Regio hypothalamica posterior

mit Nucleus hypothalamicus posterior, Corpus mamillare

Regio hypothalamica lateralis

mit Nuclei tuberales

Die Kerne des Hypothalamus sind sowohl untereinander sehr eng verbunden als auch mit dem restlichen Gehirn fest verknüpft. Afferente Faserbündel stammen aus dem Limbischen System (Corpus amygdaloideum, Hippocampus), aus der Forma reticularis, aus dem peripheren vegetativen Nervensystem, aus dem Thalamus und anderen wichtigen Schaltzentralen der vegetativen Regulation. Die Efferenzen des Hypothalamus erreichen wiederum praktisch alle Strukturen des zentralen Nervensystems.

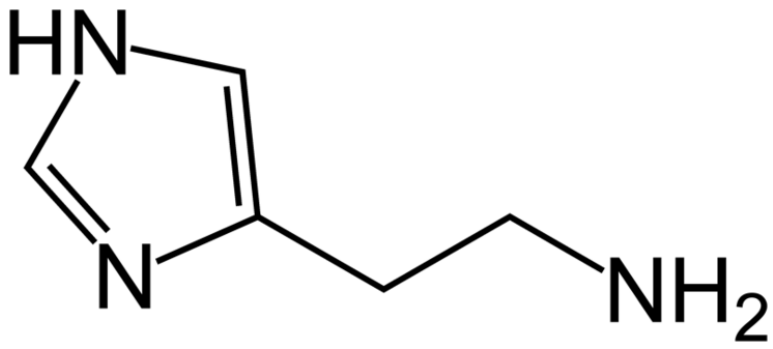
Eine weitere Besonderheit des Hypothalamus besteht darin, dass einige seiner Kerngebiete selbst Hormone produzieren. Diese kann man in Effektorhormone und Steuerhormone einteilen. Die Effektorhormone (antidiuretisches Hormon, Oxytocin) werden im Nucleus supraopticus und Nucleus paraventricularis gebildet und haben ihre Zielorgane in der Körperperipherie. Sie werden über axoplasmatischen Transport zur Neurohypophyse gebracht und dort bei Bedarf durch Exozytose freigesetzt. Bei den Steuerhormonen handelt es sich um Freisetzungs-fördernde und hemmende Hormone. Diese werden relativ diffus verteilt produziert, jedoch liegt der Schwerpunkt hier im periventrikulären Teil des Hypothalamus. Als Beispiele kann man hier Gonadoliberin (GnRH, Gonadotropin Realising Hormon) und Somatostatin (Somatotropin release inhibiting factor, SRIF) nennen. Diese und die vielen anderen Steuerhormone werden über axonalen Transport bis zu Kapillaren eines Pfortadersystems am Hypophysenstiel gebracht. Von dort aus gelangen sie über diese Kapillaren bis zum Hypophysenvorderlappen, wo sie aus einem sich erneut zu Kapillaren aufzweigenden System freigesetzt werden. Von dort aus steuern sie dann an der Adenohypophyse die Freisetzung der eigentlichen Effektorhormone.
Unser Interesse galt einem besonderen Kern im Hypothalamus: dem Nucleus tuberomamillaris. In diesem Kern befinden sich die histaminergen Neurone des ZNS.

2.2 Aminerge Transmitter

2.2.1 Histamin

Histamin: 4-(2´-Aminoaethyl)-Imidazol, ist ein biogenes Amin (Mediatorsubstanz). Es entsteht aus der Aminosäure L-Histidin durch Decarboxylierung, durch die

spezifische L-Histidindecarboxylase. In Form des biogenen Amins, Histamin, wird es (im ZNS) in den präsynaptischen Nervenendigungen in Vesikelbläschen bis zur Freisetzung gespeichert. Nach Freisetzung und Wirkung erfolgt die Inaktivierung, über die Histamin-N-methyltransferase und anschließend über Mono- bzw. Diaminoxidasen.



Histamin

Histamin ist ein Signalmolekül im Immunsystem, sowie in der Haut, des Weiteren übernimmt es eine wichtige Rolle über die Parietalzellen des Magen bei der Säureproduktion, stellt eine wichtige Komponente bei Allergien dar und ist einer der zentralen Transmitter bei der vegetativen Regulation durch das ZNS. Im Zuge der Therapie von Allergien mit Antihistaminika fiel als eine unerwünschte Nebenwirkung ein sedierender Effekt auf, der auf eine zentrale Wirkung der Pharmaka zurückzuführen war. Heute wird dieser Effekt therapeutisch bei leichten Schlafstörungen genutzt. Im ZNS finden sich in verschiedenen Gebieten Anreicherungen von Histamin, besonders auffallend in der Region des Hypothalamus. Hier konnte 1984, durch Einführung der immunhistochemischen Färbung nachgewiesen werden, dass der Nucleus tuberomamillaris der alleinige Sitz histaminerger Neurone ist und diese über ihre weitläufigen Verzweigungen Verbindungen in fast alle Regionen des Zentralnervensystems unterhalten (Panula et al., 1984; Watanabe et al., 1984).

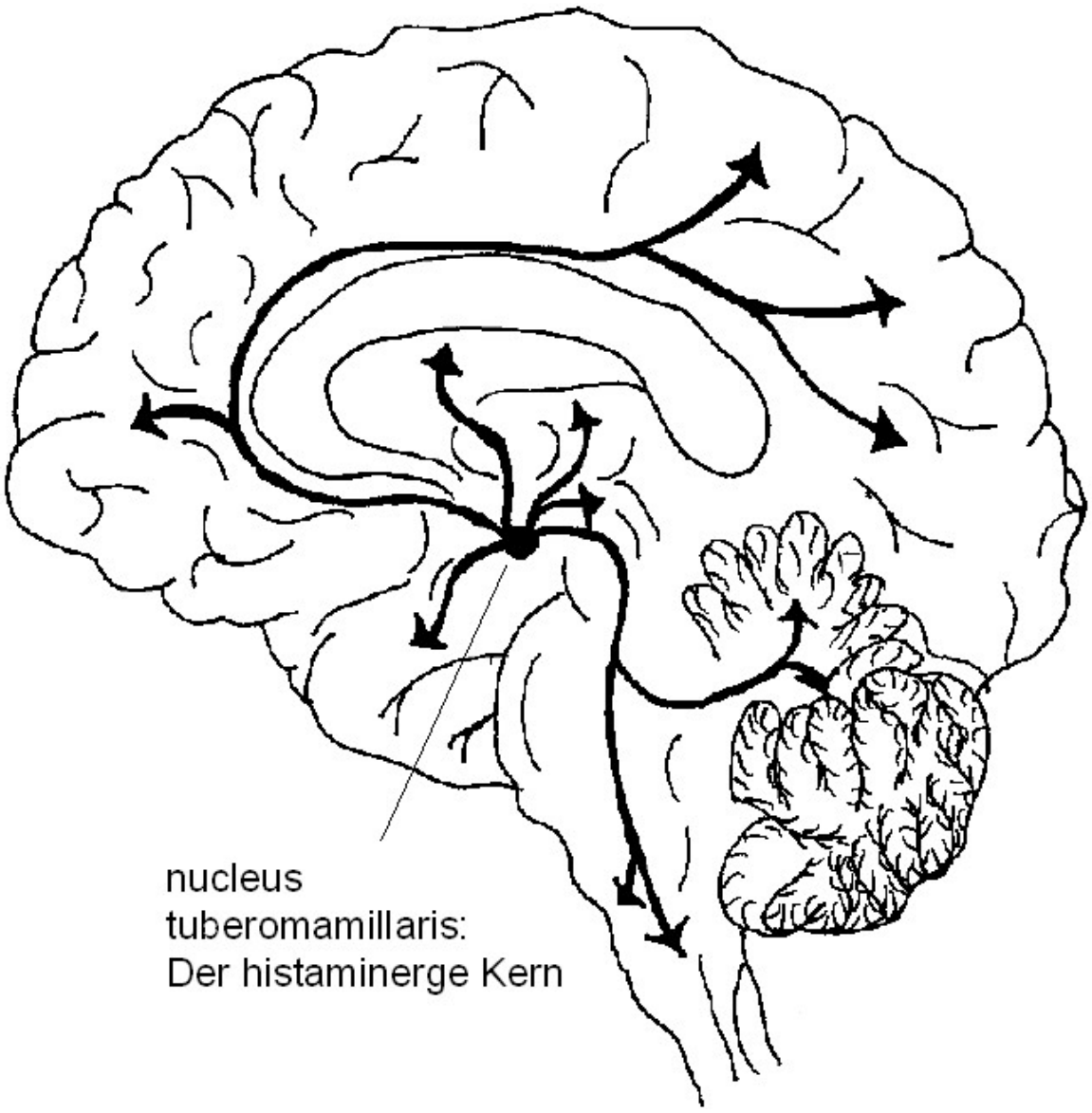


Abb. 3 Ausbreitung des histaminergen Systems im Zentralnervensystem. Der Nucleus tuberomamillaris ist die einzige Quelle der histaminergen Innervation des gesamten zentralen Nervensystems.

Es handelt sich bei den Neuronen um relativ große Zellen mit meist 2 oder 3 dicken Dendriten und einem Axon. Elektrophysiologisch lassen sich die histaminergen Neurone durch eine regelmäßige, langsame, spontane Feuerrate von 0-3Hz charakterisieren. Sie haben breitbasige Aktionspotentiale (1.8ms mittlere Amplitudendauer) und eine tiefe (15-20mV) und langdauernde Nachhyperpolarisation (Haas and Reiner, 1988). Ihr Aktivitätsgrad wechselt abhängig vom Schlaf – Wach – Rhythmus (Okakura et al.; 1992, Lin et al., 2000). Ihre Aktivität ist am höchsten im Wachzustand, niedriger im Tiefschlaf und gar nicht vorhanden während der REM Phasen des Schlafes. Neuere Befunde zeigen ein vollständiges Schweigen der histaminergen Neurone im gesamten Schlaf, eine Korrelation mit der Aktivität des

Bewusstseins. Die hemmenden Einflüsse auf dieses System während des Schlafes kommen aus der ventrolateralen präoptischen Area (VLPO) und werden durch GABA vermittelt (Sherin et al., 1996; Steininger et al., 2001). Beobachtungen durch Von Economo aus den Zwanziger Jahren des letzten Jahrhunderts zeigten, dass Opfer der Grippeepidemie, die seit 1918 20Millionen Tote weltweit gefordert hatte, mit Schlaflosigkeit (Insomnie) eine Läsion in der präoptischen Region, Patienten mit Hypersomnie (Encephalitis lethargica) einen Schaden in der posterioren Hypothalamusregion aufwiesen (Haas and Panula, 2003). Neben den weit reichenden efferenten Fasern dieses Systems unterliegt es auch einem komplexen Netzwerk aus Afferenzen. Besonders zu erwähnen hierbei die anderen wichtigen exzitatorischen Transmittersysteme aus dem Hirnstamm, adrenerge Fasern, Fasern der noradrenergen Gruppe sowie Verbindungen aus dem serotoninergen System. Nur wenige Fasern kommen aus Bereichen des Locus coeruleus, der Substantia nigra und der ventralen tegmentalen Area (Ericson et al., 1989). Neben Histamin spielen im Nucleus tuberomamillaris auch andere Transmitter im Zusammenspiel eine wichtige regulatorische Rolle der vegetativen Funktionen. Der erregende Transmitter Glutamat erreicht das System über AMPA und NMDA Rezeptoren, GABA bildet den wichtigsten inhibitorischen Einfluss, in geringerem Maße auch Glycin. Alle wichtigen Kerngebiete der Amine senden ebenfalls Fasern in dieses Gebiet, Serotonin z.B. erregt die histaminergen Neurone durch die Aktivierung eines Natrium-Kalzium Austauschers (NCX). Eine Erregung kommt auf dem gleichen Weg ebenfalls durch Orexin/Hypocretin zustande (Eriksson et al.; 2001a, b).

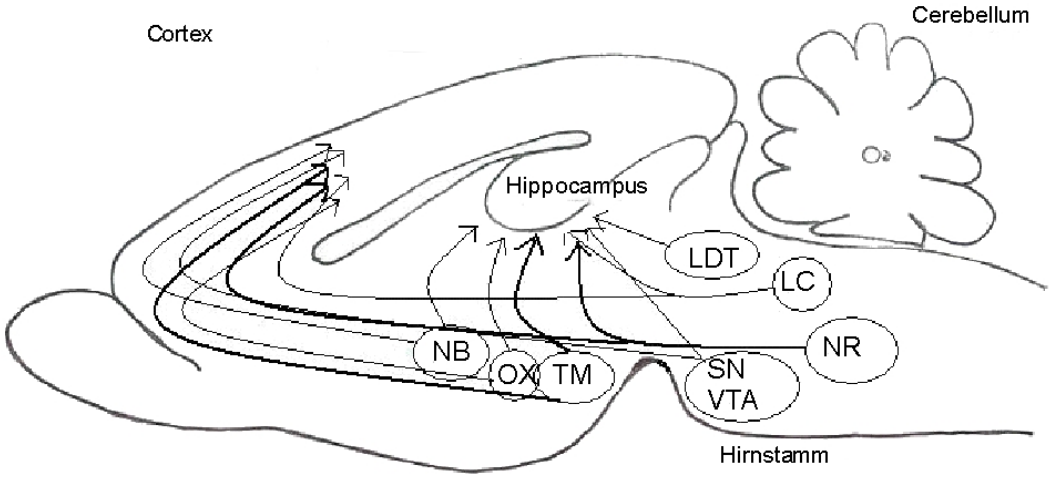


Abb. 4 schematische Darstellung der aminergen Systeme des Gehirns mit Teildarstellung ihrer Ausbreitung und ihrer Ursprungskerne am Beispiel des Rattengehirns; TM (Nucleus tuberomamillaris, histaminerg), NR (Nucleus raphe, serotoninerg), OX (Kerngebiet mit Orexinneurone), SN und VTA (Substantia nigra und ventrales Tegmentum, dopaminerg), LC (Locus coeruleus, noradrenerg), NB (Nucleus basalis und Septum, cholinerg), LDT (laterales dorsales Tegmentum)

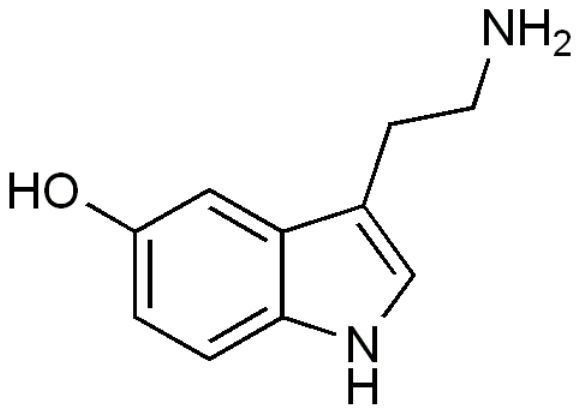
Es sind derzeit 4 G-Protein gekoppelte Histamin-Rezeptoren bekannt, von denen H1, H2 und H3 im Gehirn vorkommen. Die klassischen H1 Rezeptoren werden durch die alt bekannten Antihistaminika blockiert. Die H2 Rezeptoren (Black et al., 1972), steuern die Magensäuresekretion und die H2 Antagonisten revolutionierten die Magenulcustherapie (heute sind die H2-Antagonisten jedoch teilweise durch Protonenpumpeninhibitoren überholt). Die H3 Rezeptoren (Arrang et al., 1983), fungieren als Autorezeptoren an den Histamin-Zell-Somata und ihren Axonen sowie als Hetero-Rezeptoren an den Axonen vieler andersartiger Neurone. Die H4 Rezeptoren sind dem H3 Rezeptor strukturell ähnlich, kommen jedoch vor allem in der Peripherie (Blut) vor (Nguyen et al., 2001). Es handelt sich um Proteine, die ähnlich den anderen biogenen Aminen über G-Proteine unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden auslösen. Die Kaskaden unterscheiden sich je nach Rezeptorsubtyp. So ist der H1-Rezeptor mit einem Gq/11 Protein verbunden (Yamashita et al., 1991), was über aktivierte Phospholipase C zu den Boten (second messanger) Inositol-1,4,5-triphosphat und 1,2-Diacylglycerol führt, wohingegen der H2-Rezeptor mit einem Gs Protein gekoppelt ist, welches eine Aktivierung der Adenylatcyclase auslöst und so vermehrt zyklisches 3‘,5‘-Adenosinmonophosphat entsteht. Der H3-Rezeptor besitzt eine komplexere Genstruktur und kann aufgrund von alternativem Splicing in sechs Varianten vorkommen. Der H3 Autorezeptor ist über Gi/Go gekoppelt und spielt eine zentrale Rolle bei der Histaminsynthese und Freisetzung (Morisset et al., 2000; Drutel et al., 2001; Coge et al., 2001).

Das histaminerge System ist ein phylogenetisch altes System. Es reguliert wichtige Grundfunktionen des Körpers: Nahrungsaufnahme, Osmoregulation, Temperaturkontrolle, Energieverwaltung, sowie die Schlaf- Wach Aktivität und die Aufmerksamkeit (Haas and Panula, 2003; Brown et al.; 2001; Schwartz et al., 1991).

2.2.2 Serotonin

Serotonin ist ein biogenes Amin, welches eine wichtige Funktion bei vegetativen Prozessen, zum Beispiel der Schmerzregulation, der Schlafregulation, der Nahrungsaufnahme und dem Sexualverhalten spielt. Durch Hydroxylierung (zytosolische Tryptophanhydroxylase) wird aus der Aminosäure L-Tryptophan zuerst 5-Hydroxytryptamin und anschließend durch Decarboxylierung (5-Hydroxytryptophan-Decarboxylase) Serotonin (synonym: 5-HT, 5-Hydroxytryptophan)

hergestellt. Bis zur Freisetzung wird es in präsynaptischen Nervenendigungen in Vesikeln gespeichert. Nach Freisetzung wird seine Wirkung durch Wiederaufnahme in die Zelle beendet. Dort wird es entweder wieder in die Vesikel eingeschleust, oder wird über eine Monoaminooxydase (MAO) abgebaut. Der Wiederaufnahmemechanismus zur Beendigung der Serotoninwirkung hat heutzutage in der Pharmakotherapie psychischer Erkrankungen einen sehr großen Stellenwert erreicht. Durch die Behandlung mit spezifischen Wiederaufnahmehemmstoffen (selektive Serotonin reuptake inhibitors) können derzeit vor allem depressive Erkrankungen sehr gut behandelt werden.



Serotonin

Im Körper kann man höhere Konzentrationen dieses Transmitters vor allem im Blut und im Verdauungssystem, welches ca. 90% des Gesamtserotonins des Körpers aufweist, messen. Jedoch spielt es auch eine sehr wichtige Rolle im Zentralnervensystem. Hierbei waren in der Vergangenheit besonders auffallend das Auftreten von affektiven Psychosen bei einem Serotonin-Rezeptor-Polymorphismus (Lesch et al., 1996), das Auftreten von depressiven Verstimmungen bei einem Mangel an Serotonin (Smith et al., 1999), sowie das Auftreten von Angstzuständen, Persönlichkeitsveränderungen, Migräne und anderen psychischen Phänomenen als Symptome unspezifischer Veränderungen im Serotoninhaushalt des Gehirns. Der Organismus verfügt über eine Vielzahl verschiedener bisher bekannter Serotoninrezeptoren. Sie kommen im Kortex, Hippocampus, Corpus striatum vor, ihr Hauptanteil befindet sich aber im Nucleus raphe. Dieser weist eine hohe Rezeptorendichte (Autorezeptoren) auf und ist der Hauptursprungsort abgehender Bahnen dieses Systems (Parent et al., 1981). Die verschiedenen Serotoninrezeptoren gehören der Superfamilie mit sieben transmembranösen Regionen an, die über ein G-Protein an die intrazelluläre Signalkaskade gekoppelt sind. Eine Ausnahme bildet hier der 5-HT3 Rezeptor, er ist ein Liganden gesteuerter

Ionenkanal. Es bestehen mehrere Hauptgruppen der Serotoninrezeptoren, wobei in jeder Hauptgruppe mehrere Formen des Rezeptors vorkommen können (Hoyer, 1990).

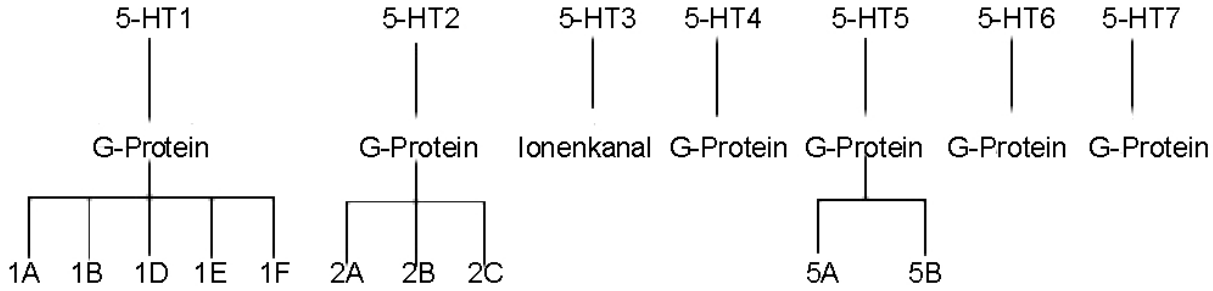


Abb. 5 Gruppeneinteilung der Serotoninrezeptoren (mittlere Spalte steht für die Signalkaskade, die Ausnahme der G-Protein (G-Prot.) gekoppelten Formen bildet der 5-HT_3 Rezeptor, er ist ein ligandengesteuerter Ionenkanal

Von besonderem Interesse im Zusammenhang mit dieser Arbeit ist der 5-HT_2-Rezeptor, mit seiner Unterform 5-HT_{2C}. Die höchste Expressionsdichte dieses Rezeptors fand man im Plexus choroideus. Ein Nachweis in peripheren Geweben gelang bisher nicht. Es handelt sich um einen G – Protein (Gq/G11) gekoppelten Rezeptor mit Aktivierung der Phospholipase C und der Umwandlung von Phosphatidylinositol in Inositoltrisphosphat (ITP) und Diacylglycerol, daraufhin kommt es zu einer Freisetzung von Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum mit nachfolgender Aktivierung entsprechender enzymatischer Vorgänge (Ike et al., 1995). Von dieser Rezeptorunterart existieren keine Splicevarianten, jedoch entstehen mehrere Varianten durch posttranskriptionelle Modifikation in der zweiten Schleife des Proteins. Dieses so genannte Editing (posttranskriptionelle Modifikation des genomisch kodierten Codes durch enzymatische Verwandlung von Adenosin in Inosin) kann an fünf Positionen (A,B,C,D,E) des 2C Subtyps stattfinden (Burns et al., 1997). Hierbei können folgende Modifikationen auftreten:

A Position: Isoleucin ausgetauscht durch Valin

B Position: Isoleucin ausgetauscht durch Valin (bei Austausch Position A+B), wobei ein alleiniger Austausch in der B Position ein Methionin ergibt

C Position: Asparagin ausgetauscht durch Serin

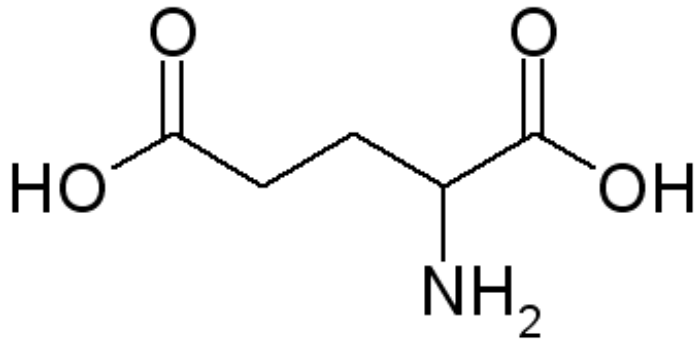
E (C´) Position: Asparagin ausgetauscht durch Aspartat, wobei ein Austausch an den Positionen C und E Glycin ergibt

D Position: Isoleucin ausgetauscht durch Valin.

Im ZNS wird eine Mischung aus den verschiedensten Editierungsformen exprimiert (Burns et al., 1997; Niswender et al., 1999), jedoch ist die physiologische Bedeutung, vor allem der einzelnen Positionen noch nicht geklärt. Eine Auswirkung des Editings konnte in Studien gezeigt werden, zum Beispiel bei Editierung der Position C´ Nachweis einer niedrigeren Aktivität des second messanger Phospholipase C als in uneditierten Zellen (Burns et al., 1997; Niswender et al., 1999; Fitzgerald et al., 1999; Wang et al., 2000).

2.3 Glutamat

Die Aminosäure L-Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Transmitter im Zentralnervensystem. Diese Aminosäure interagiert mit vielen verschiedenen Typen des Glutamat-Rezeptors sowohl prä- als auch postsynaptisch.



Glutaminsäure

Man kann die verschiedenen Rezeptortypen nach bestimmten Kriterien in mehrere Gruppen einordnen. Zum einen unterscheidet man die großen Familien der metabotropen und die der ionotropen Rezeptoren. Während die metabotropen Rezeptoren, nach Aktivierung durch den Transmitter, über eine an ein G-Protein gekoppelte Signalkaskade ihre Wirkung entfalten, sind die ionotropen Rezeptoren, Liganden gesteuerte Ionenkanäle, die in der Regel eine Durchgängigkeit für Natrium und Kalzium (je nach Lokalisation unterschiedlich ausgeprägt) (Mayer and Westbrook, 1987; Colquhoun et al., 1992; Hestrin, 1993; Livsey et al., 1993; Jonas and Spruston, 1994) aufweisen. Die ionotropen Rezeptoren sind für diese Arbeit von besonderem Interesse. Die einzelnen Mitglieder der großen Familie der ionotropen

Rezeptoren wurde nach den, an den verschiedenen Subtypen selektiv wirkenden Agonisten, benannt. Man unterscheidet heute

- NMDA (N-methyl D-Aspartat) – Rezeptoren
- Kainat – Rezeptoren
- AMPA (alpha-amino 3-hydroxy 5-methyl 4-isoxazol Propionsäure) – Rezeptoren

Diese unterschiedlichen Gruppen enthalten jeweils wieder verschiedene Untergruppen, wie in Abb. 6 dargestellt. Darin sind auch hier nicht erwähnte Untergruppen berücksichtigt (Hollmann and Heinemann, 1994).

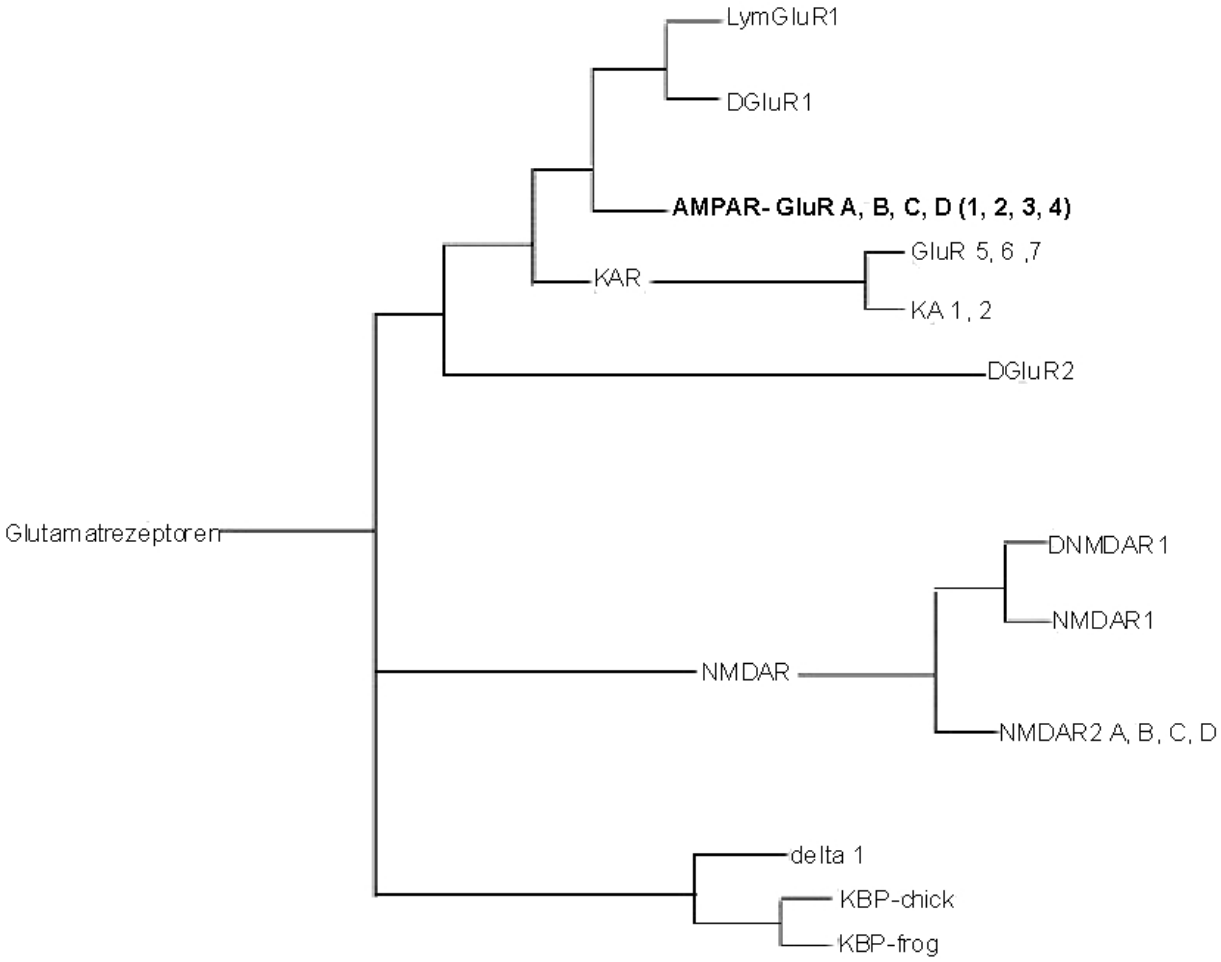


Abb. 6 Die Familie der Glutamatrezeptoren: eine Darstellung der verschiedenen Rezeptoruntertypen, die drei großen Gruppen hierbei AMPA Rezeptoren (in dieser Arbeit zu untersuchende Form), KAR (Kainatrezeptoren), und NMDA Rezeptoren. DGluR1 u. DGluR2: Rezeptoren der Drosophila; LymGluR1: Rezeptor der Lymnea; sowie KBR des Huhns und des Froschs

Für den AMPA – Rezeptor gibt es vier Untereinheiten, die ein meist heteromeres Tetramer bilden. Die Benennung erfolgt nach seinen Untereinheiten GluR1, GluR2, GluR3 und GluR4 (Gasic and Hollmann, 1992). Synonym werden auch die

Bezeichnungen GluRA, GluRB, GluRC und GluRD verwendet (Wisden and Seeburg, 1993). Die kinetischen Eigenschaften der Rezeptoren werden unter anderem durch die Zusammensetzung aus diesen einzelnen Untereinheiten bestimmt (Sommer et al., 1990). Zwischen den Untereinheiten liegt eine Identität in der Gensequenz von ungefähr 70% vor. Die jeweilige Länge der einzelnen Gensequenzen für die Untereinheiten beträgt circa 900 Aminosäuren. Eine Untereinheit hat drei aus alpha – Helices gebildete transmembranöse Domänen (M1, M3, M4) und eine Schleife (loop) (M2), die die Membran nur antippt und die Kanalpore bildet. Die glutamatbindende Seite wird aus zwei Teilen geformt, einmal aus zwei Schlingen, sowie aus dem freien Aminosäureterminal und aus der extrazellulär liegenden Schleife, die die transmebranösen Domänen M3 und M4 verbindet (Hollmann and Heinemann, 1994). Die Gene der AMPA Rezeptor Untereinheiten enthalten jeweils 17 Exone. Zwei Stellen dieser Sequenz mit der Länge von 38 Aminosäuren sind noch von besonderem Interesse. Es handelt sich hierbei um die Exone 14 und 15, die das so genannte flip/flop Modul bilden. Durch alternatives Splicing entstehen hier für jede Untereinheit zwei weitere Unterformen (Sommer et al., 1990; Mosbacher et al., 1994). Diese beeinflussen ebenfalls die kinetischen Eigenschaften der Rezeptoren. Die Flopvariante weist hierbei die schnelleren, die Flipvariante die langsameren elektrophysiologischen Eigenschaften auf (Sommer et al., 1990) . Die AMPA-Rezeptoren GluRC und GluRD besitzen in ihrer flop Version die kürzesten Desensitisierungskonstanten der AMPA-Rezeptoren. Über diesen Mechanismus wird der Zeitverlauf der postsynaptischen Leitfähigkeitsänderung reguliert. Schließlich ist noch eine Besonderheit zu erwähnen, die die Unterform GluRB aufweist. Es handelt sich hierbei um das so genannte RNA-Editing (Sommer et al., 1991; Lomeli et al., 1994). Die Veränderung durch Editing zeigte in einigen Fällen eine bedeutende Konsequenz für die zelluläre Funktion. Im Falle des GluRB kommt es zu Änderungen der Elektonenpermeabilität und einer Änderung der elektrophysiologischen Eigenschaften. Es kommt beim Editing zu einem Codonwechsel, bezogen auf die genomisch kodierte Sequenz, durch Modifikation der prä-mRNA. Es entsteht eine Diskrepanz zwischen kodierender Sequenz (Q: CAG für einen Glutaminrest) und abgeleiteter Sequenz (R: CGG für einen Argininrest). Damit eine Editierung vorgenommen werden kann, ist eine im 3'Ende-benachbarten Intron zur Editierungsstelle liegende komplementäre Sequenz (ECS=Editing site Complementary Sequence) notwendig (Melcher et al., 1995).

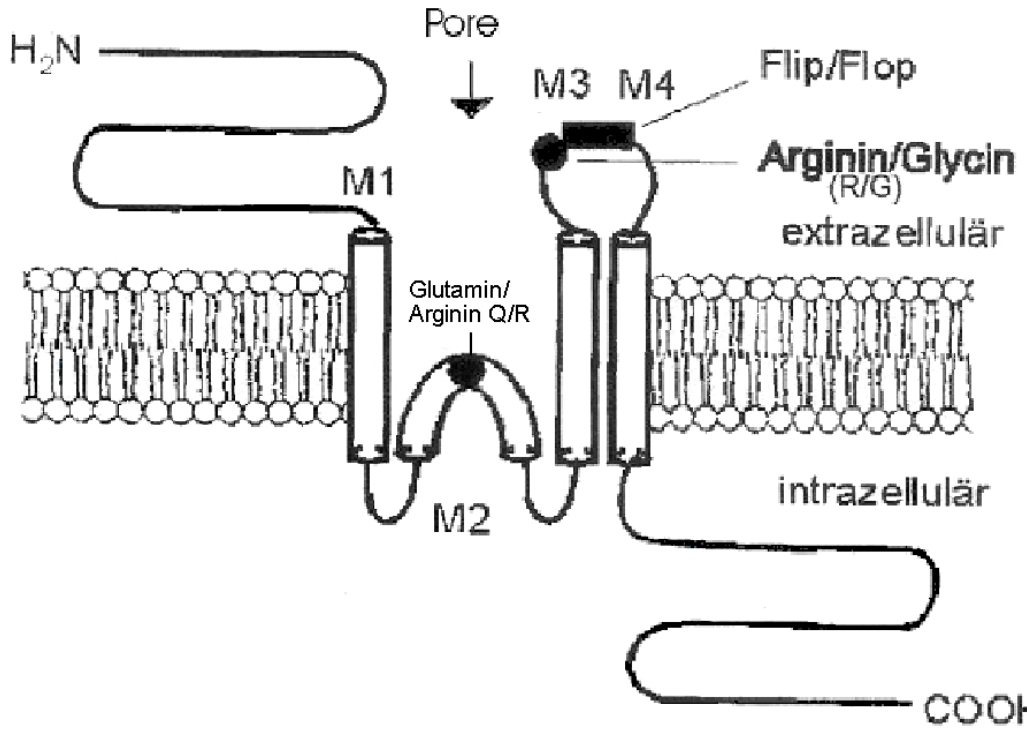


Abb. 7 Struktur des Glutamatrezeptors (als Beispiel GluRB Untereinheit) (modifiziert nach Geiger, Universität Freiburg, Physiologie I), M1-4: transmembranöse Domänen, Q/R und R/G: Editingpositionen mit den dazugehörigen Aminosäuren

Diese wirkt an der für die Editierung notwendigen Faltung mit. Eine exakte Aufklärung aller an diesem besonderen Phänomen beteiligten Mechanismen und Substanzen ist noch nicht erfolgt. Durch den Austausch des Glutaminrestes durch einen Argininrest, welcher über eine positive Ladung verfügt, kommt es aufgrund der verschobenen Lage im Kanal zu einer Änderung der Kalziumpermeabilität (Hollmann et al., 1991; Hume et al., 1991; Burnashev et al., 1992; Burnashev et al., 1995). Diese wird dadurch auf ein Minimum reduziert. Dieser Mechanismus dient dem Schutz vor der toxischen Wirkung durch Kalziumüberladung.

Neben der Q/R Position existiert noch eine zweite Editierungsstelle. Diese liegt auf Exon 13 kurz vor dem flip/flop Modul. Die Position kommt in den Formen GluRB, C, und D vor. Diese Stelle nennt man die R/G Position (Lomeli et al., 1994). Hierbei wird ein Argininrest durch einen Glycinrest ausgetauscht. Dieser Austausch steht in engem Zusammenhang mit dem flip/flop Modul und beeinflusst ebenfalls die kinetischen Eigenschaften der verschiedenen Unterformen (Seeburg, 1996).

2.4 Das Natrium – Kalzium Austauschprotein NCX

Kalzium spielt eine zentrale Rolle in der Regulierung der Stoffwechselvorgänge einer Zelle. Kalzium dient in vielen Fällen als intrazellulärer Botenstoff (second messanger) von Signalvorgängen. Bei der Regulierung des Kalziumhaushaltes sind viele verschiedene Proteine und Regelkreise beteiligt. Man sieht in Störungen in diesen Systemen mit eine wichtige Ursache von Krankheiten zum Beispiel bei Herzkrankheiten oder auch im Zusammenhang mit Schlaganfällen. Ein wichtiger Bestandteil für die Regelung des Kalziumgleichgewichtes stellt die Gruppe der Natrium – Kalzium Austauschproteine, kurz NCX, dar (Yau and Nakatani, 1984; Nakatani and Yau, 1988). Die Proteine dieser Familie gehören einer großen Superfamilie von Membranproteinen an, die sich auszeichnen durch das Vorhandensein von zwei α Schleifen (α-Repeats) (Schwarz and Benzer, 1997). Diese Schleifen stellen Regionen von intramolekularer Gleichheit innerhalb der transmembranösen Abschnitte dar. Viele Untersuchungen weisen auf eine wichtige Rolle dieser Strukturen beim Ionenaustausch hin (Nicoll et al., 1996). Von NCX wurden bisher die Gene von drei Unterformen geklont. Zum ersten Mal konnte das Gen des Na^+/Ca^{2+} (Natrium/Kalzium) Austauschproteins 1990 von Nicoll (Nicoll et al., 1990) geklont werden. Dies gelang ihm aus dem Herzmuskel eines Hundes. Von diesem Zeitpunkt an konnte vor allem die molekularbiologische Erforschung dieser Proteine stark vorangetrieben werden. Es kommt in verschiedensten Expressionsarten und Mustern in fast allen Geweben des Körpers vor. Man fand die Austauschproteine sowohl auf den post- als auch auf den präsynaptischen Membranen der Synapsen, sowie in der Membran des endoplasmatischen Retikulums. Im Zentralnervensystem konnte man hierbei genaue Karten mit den Expressionsmustern der einzelnen Unterformen des Proteins aufstellen. Man konnte im Kortex des Großhirns alle drei Unterformen in hoher Dichte nachweisen, in der Molekularzellschicht im Kleinhirn konnten sie jedoch nicht gefunden werden.

Die NCX Familie besteht bisher aus drei Mitgliedern, dem NCX1, NCX2 und NCX3. Besonders interessant ist in dieser Familie der Subtyp NCX1. Dieser zeigt eine Reihe von Isoformen, die durch alternatives Splicing verschiedener Exone (A, B, C, D, E, F) entstehen (Kofuji et al., 1994; Quednau et al., 1997). Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnten von den vielen verschiedenen möglichen Isoformen (Exon A und B schließen sich gegenseitig aus), 15 in Lebewesen nachgewiesen werden. Das

Auftreten der unterschiedlichen Splicevarianten ist abhängig vom Gewebe, Exon A enthaltende Formen werden vor allem in erregbarem Gewebe (Herz, Neurone), die Formen, die Exon B enthalten vor allem in unerregbarem Gewebe (Niere, Gliazellen) gefunden (Schulze et al., 2002). Die Aufgabe der Austauschproteine besteht vor allem darin, dass sie, zusammen mit Kalziumpumpen, das Kalziumgleichgewicht der Zelle wahren, welches für ihre richtige Funktionsweise und ihr Überleben unbedingt notwendig ist. Der Austauscher wird durch einen, durch eine Na^+/K^+ (Natrium/Kalium) ATPase erzeugten (Li et al., 2000), Natriumgradienten angetrieben um so das Kalzium aus dem Zellinneren nach außen zu transportieren. Das Austauschprotein transportiert auf diese Weise drei Natriumionen für ein Kalziumion.

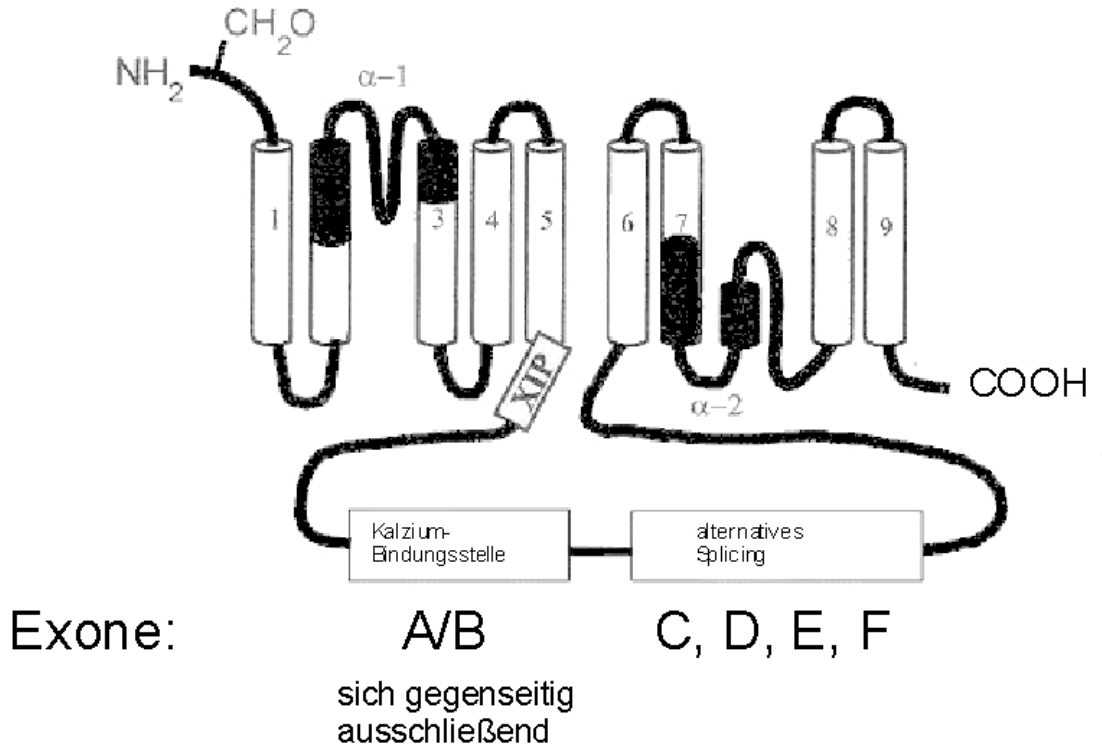


Abb. 8 Struktur des Natrium-Kalzium Austauschers NCX1, Abschnitte 1-9: Darstellung der transmembranösen Anteile, die Exone befinden sich in der zweiten α-Schleife, zu Beginn mit der wichtigen Kalziumbindungsstelle und den sich gegenseitig ausschließenden Exone A und B, im hinteren Teil folgt die Region, in der durch alternatives Splicing und daraus folgender unterschiedlicher Kombination der Exone, Isoformen mit verschiedenen Eigenschaften entstehen

2.5 Das Kalium abhängige Natrium – Kalzium Austauschprotein NCKX

Neben dem Natrium – Kalzium Austauscher spielt bei der Kalziumhomöostase sowie bei der Regulation bestimmter Zellfunktionen ein weiteres Mitglied der oben genannten Superfamilie eine wichtige Rolle. Das Kalium abhängige Natrium-Kalzium

Austauschprotein, kurz NCKX, transportiert bei vorhandenem Kaliumgradienten und vorhandenem Natriumgradienten für vier Natrium in die Einwärtsrichtung, ein Kalzium und ein Kalium in die Auswärtsrichtung (Cervetto et al., 1989; Schnetkamp et al., 1995). Diese Art des Kalziumauswärtstransportes wurde zuerst im äußeren Segment von retinalen Photorezeptoren beschrieben. Man fand heraus, dass dieser Mechanismus einen wichtigen Bestandteil für die Dunkeladaptation des Auges darstellt. Man konnte bisher von diesem Protein verschiedene Unterformen beschreiben, wobei die Untersuchung verschiedener Gewebe ergab, dass NCKX1 bisher nur im Auge nachgewiesen werden konnte, eine Expression in geringem Maße in anderen Geweben kann derzeit aber nicht ausgeschlossen werden. Von NCKX1 entstehen durch alternatives Splicing vier Isoformen (Poon et al., 2000). Im Gehirn konnte man NCKX2 (Tsoi et al., 1998), NCKX3 (Kraev et al., 2001) und NCKX4 (Li et al., 2002) jeweils in unterschiedlichem Ausmaß, in verschiedenen Arealen, sowie abhängig von der Entwicklungsstufe des Lebewesens nachweisen. Diese Beobachtungen sprechen für einen sehr komplexen Regelkreis in das diese Proteingruppe mit eingebunden ist (Lytton et al., 2002).

Die Zusammenhänge in der Regulation der Kalziumhomöostase mit NCKX benötigen noch einige weitere Untersuchungen, die Struktur hingegen ist nun weitgehend bekannt. Bei NCKX2 (im Gehirn am stärksten exprimiert) kodiert die cDNA für ein 670 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 75kDa (Lytton et al., 2002). Es weist zwölf transmembranöse Regionen auf, die von einer intrazellulären Schleife in zwei Gruppen aufgeteilt werden, die ersten fünf und die hinteren sechs. Man kann eine große strukturelle Ähnlichkeit zu den NCX Proteinen nachweisen (gleiche Superfamilie).

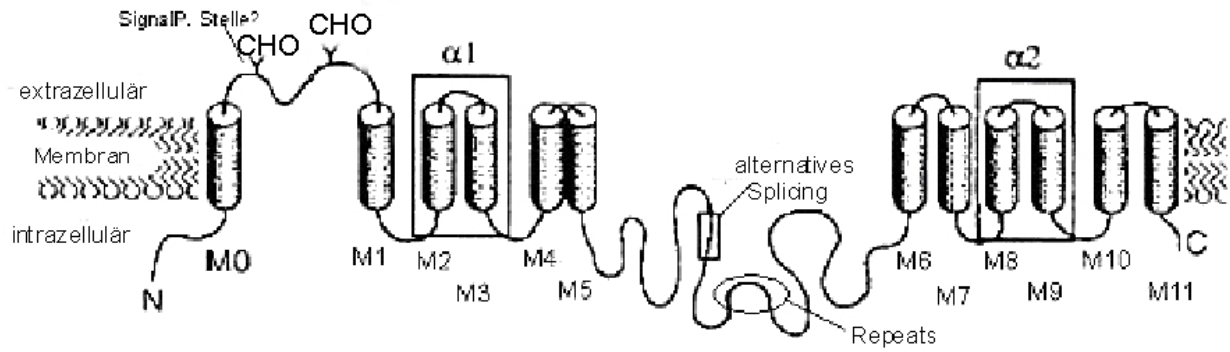


Abb. 9 Angenommene Struktur des Kalium abhängigen Natrium-Kalzium Austauschers (NCKX1) (modifiziert aus Poon et al. 2000;(Poon et al., 2000). CHO (mögliche Glykosilierungsposition), M0-11 (transmembranöse Segmente), α1 und α2 (subunit repeats)

2.6 Adenosindeaminasen

Eine Gruppe der Adenosindeaminasen (ADAR) ist in der Lage RNA Sequenzen, durch Umwandlung von Adenosin in Inosin, zu verändern. Sie spielen eine wichtige Rolle in der post transkriptionellen Genmodifikation in den Neuronen von Säugetieren (Niswender, 1998), das Ausmaß ihrer Aktivität hat hohen Einfluss auf Krankheitsbilder wie die Epilepsie (Vollmar et al., 2004) oder Depressionen. Der genaue Mechanismus als auch die Regulation dieses Umwandelvorganges sind noch unbekannt. Dieses Enzym existiert in drei verschiedenen Subtypen, wobei in vitro Experimente an verschiedenen Doppelstrang RNA Strukturen, unterschiedliche Aktivität der einzelnen Formen zeigten. Wobei ADAR1 und ADAR2 Aktivität an verschiedenen Substraten in unterschiedlichem Ausmaß zeigten (Melcher et al., 1996; Maas et al., 1996), trat in allen Versuchen mit ADAR3 keine Aktivität auf (Melcher et al., 1996). Spezifische Substrate bei Säugetieren zum Editing von Adenosin zu Inosin (A→ I) sind AMPA Rezeptoren, Serotonin Rezeptoren und ADAR2 prä-mRNA. In diesen Fällen führt das Editing zur Veränderung eines kodierenden Codons und somit zur Veränderung der daraus abzulesenden Proteinsequenz (Sommer et al., 1991; Burns et al., 1997).

2.7 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Wie funktioniert die Erregung histaminerger Neurone?
Die Neurone des histaminergen Kerns unterhalten eine Schrittmacheraktivität, die im Schlaf durch GABAerge Hemmung unterdrückt wird. Im Wachzustand feuern die Histamin-Neurone allerdings ganz unterschiedlich bei Veränderungen der Aufmerksamkeit. Hier müssen erregende Eingänge zum Zuge kommen. Diese sollen analysiert werden.
1. AMPA-Rezeptoren und ihre Beziehungen zu Natrium-Kalzium-Austauschern (NCX). Korrelation elektrophysiologischer Resultate mit den Expressionsmustern von AMPA-Rezeptoren und NCX. Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion dieser Proteine.

2. Serotonin-Rezeptoren und ihre Beziehungen zu Natrium-Kalzium-Austauschern (NCX).
Zusammenhang pharmakologischer Beobachtungen eines möglichen Kandidaten für durch Serotonin ausgelöste Natriumströme in NCX

3. Posttranskriptionelle Analyse der AMPA und der Serotonin-Rezeptoren (Editing): Funktionelle Bedeutung des Editing. Einzelzelluntersuchungen mit korrelativer Darstellung der Expression des Editing-Status und er Adenosindeaminasen.

3. Material und Methoden

3.1 Tier und Zellpräparation

Bei allen verwendeten Tieren wurde darauf geachtet, dass die Haltung und die Behandlung der lebenden Tiere während der Arbeitsvorgänge den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes entsprachen. Die Versuche waren so angelegt, die Zahl der verwendeten Tiere möglichst klein zu halten, sowie Leiden der Tiere zu vermeiden.
Die Gewinnung des Materials erfolgte aus Gehirnen von drei bis vier Wochen alten männlichen Wistar Ratten. Die Tiere wurden enthauptet, das Gehirn möglichst vorsichtig und schnell entfernt und anschließend sofort in eiskalte Krebs – Ringer Lösung gelegt. Es wurden transversale Schnitte angefertigt, die die Tuberomamillarregion enthielten. Es entstanden jeweils ein bis zwei Schnitte pro Gehirn mit einer Dicke von 400µm. Hierfür wurde ein Vibratom (Vibroslicer, Campden Instruments) benutzt. Nach dem Schneiden wurde unter dem Mikroskop kontrolliert, dass die Schnitte auch wirklich die gewünschte Region enthielten. Die Schnitte wurden anschließend für mindestens eine Stunde in einer speziellen, vorher vorbereiteten, Lösung (in mM: NaCl 125, KCl 3.7, $CaCl_2$ 1.0, $MgCl_2$ 1.0, NaH_2PO_4 1.3, $NaHCO_3$ 23, D – Glukose 10, Phenolrot 0.01%) bei Zimmertemperatur inkubiert.

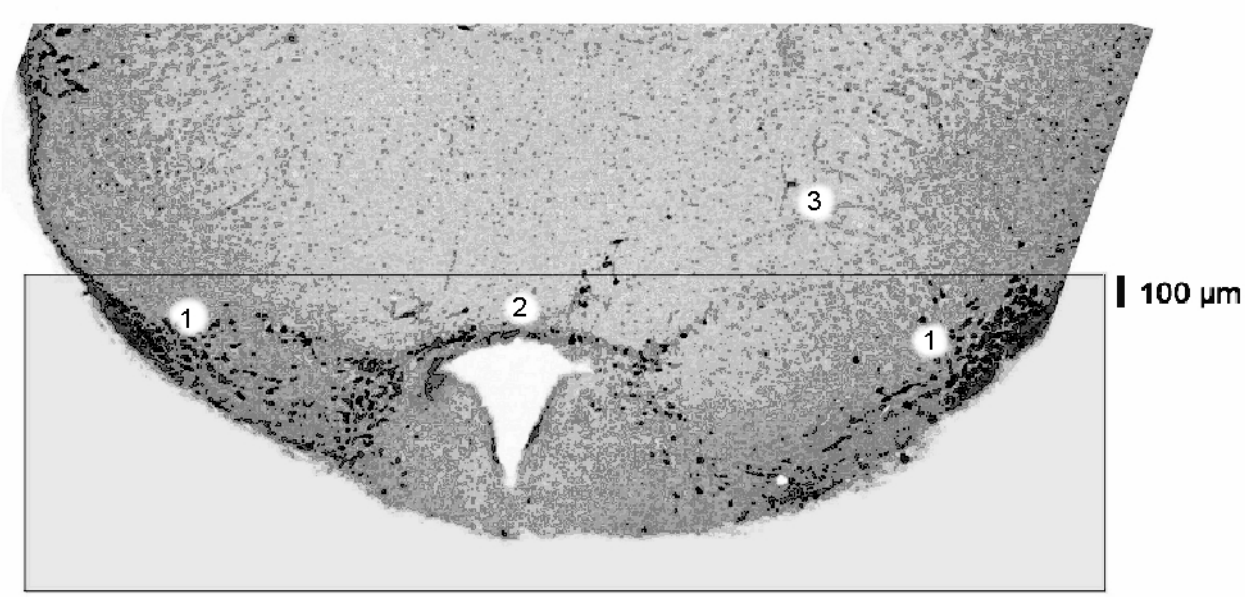


Abb. 10 Darstellung eines Schnittes der TM Region, mikroskopische Aufnahme eines unserer Präparate zeigt die mediane Eminenz mit dem Rezessus des dritten Ventrikels, die hervorgehobenen Zellen sind histaminerge Neurone, die mit gegen Adenosindeaminase gerichtete Antikörper gefärbt wurden; die histaminergen Neurone des TM bilden Untergruppen: 1: ventrolateral, 2: medial ventrikelnah, 3: diffus.

Der pH wird durch Carbogen-Begasung auf 7.4 eingerichtet. Danach wurden die Gesamtquerschnitte erneut zugeschnitten, um möglichst wenig Zellen aus anderen Gehirnregionen mit in den nächsten Ansatz zu nehmen und in oben genannter Lösung unter Zugabe von Papain (0.3 – 0.5mg/ml) bei 37°C erneut 40 Minuten lang inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Gewebe gründlich gespült. In einem kleinen Gefäß wurden in Registrierlösung (in mM: NaCl 150, KCl 3.7, $CaCl_2$ 2.0, $MgCl_2$ 2.0, HEPES 10, der pH wurde auf 7.4 mit NaOH eingestellt) die einzelnen Zellen durch vorsichtiges pipettieren voneinander getrennt. An diesen Schritt schloss sich die elektropysiologische Untersuchung der Einzelzellen an. War die Zelle in gutem, unbeschädigtem Zustand und es konnten somit verwertbare Messwerte erzielt werden, wurde die Zelle zur weiteren Verwendung ausgewählt und registriert. Die ausgewählten Zellen wurden auf einem Umkehrmikroskop digital fotografiert und ihre Größe wurde ausgemessen. Danach wurde das Zytoplasma der Zelle in die verwendete Elektrode gesaugt und die Zellidentifizierung wurde durch sc - RT - PCR Analyse durch Nachweis der Expression von Histidin – Decarboxylase (HDC) verifiziert.

3.2 Ganz-Zell-Strom Aufzeichnung

Zur Aufzeichnung elektrophysiologischer Eigenschaften wurde die Ganz-Zell Konfiguration der patch – clamp Technik benutzt. Somit wurde auch gleichzeitig die Lebensfähigkeit der einzelnen Neuronen überprüft, was durch die Aufzeichnung des Natriumsstroms der Zelle als Antwort auf unterschiedliche Depolarisationsströme erfolgte.

Die voltage - clamp Technik wurde bereits vor 60 Jahren von Hodgkin und Huxley sowie Cole entwickelt. Sie erlaubt den Effekt von Änderungen des Membranpotentials auf die Leitfähigkeit der Zellmembran für bestimmte Ionen zu messen. Das Verfahren wurde zur patch - clamp Technik weiterentwickelt (Neher and Sakmann, 1992), dass es schließlich möglich wurde nicht nur Änderungen über der ganzen Membran zu messen, sondern dass die Ströme einzelner Ionenkanäle aufgezeichnet werden können. Um Änderungen an der zu untersuchenden Zelle zu verhindern wird ein so genannter Kompensationsstrom erzeugt der genauso groß ist wie der Strom, der durch die Membran fließt und diesem entgegengesetzt ist. Auf diese Weise wird das Membranpotential gemessen und mit einer vorgegebenen Sollspannung verglichen. Bei Unterschieden zwischen der Sollspannung und dem gemessenen Wert wird ein kleiner Stromimpuls in die Zelle injiziert. Dieser Kompensationsstrom wird bei der voltage - clamp und patch - clamp Technik gemessen und lässt direkte Schlüsse auf die Leitfähigkeit der Zellmembran zu. Bei der patch - clamp Technik wird mit einer Mikropipette ein kleiner Fleck der Membran gegen die übrige Umgebung isoliert. Durch stärkeres Ansaugen dieses patches kann die Membran auch durchbrochen werden und es entsteht die Ganz-Zell Konfiguration. Die verwendeten Mikropipetten wurden aus Filament – beinhaltenden dickwandigen Brosilikat – Glasröhrchen hergestellt. Hierzu wurde ein Horizontalziehgerät (Sutter-Instruments) verwendet. Nachdem die so hergestellten Mikropipetten mit Lösung (in mM : 140 CsCl, 2 $MgCl_2$, , 0.5 $CaCl_2$, 5 EGTA, 10 HEPES/CsOH) gefüllt, auf einen pH von 7.3 eingerichtet waren, hatten sie einen Widerstand zwischen 2 und 5 MOhm. Die Ströme der Zellen wurden unter Hilfe eines EPC-9 Verstärkers bei –50mV Haltepotential gemessen. Nach vollständiger Einrichtung der Ganz-Zell Konfiguration war der Serienwiderstand (4-15MΩ) ausgeglichen (70-90%) und wurde regelmäßig kontrolliert.

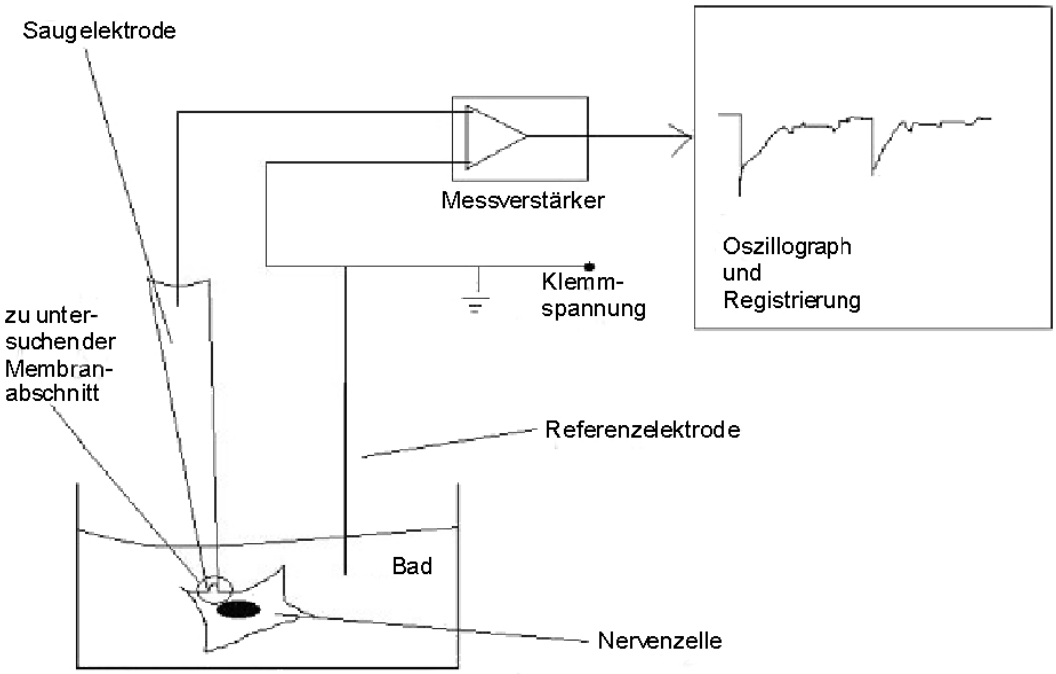


Abb. 11 Vereinfachtes Schema der patch - clamp Anordnung

Das Membranpotential wurde bei geringen Flüssigkeitsgrenzpotentialen (2.5mV) nicht korrigiert. Die Kalziumpermeabilität der AMPA Rezeptoren wurde durch ein Umkehrpotential von Kainat vermittelten Strömen entsprechend der Anleitung nach Robertson (Robertson et al., 1999) bestimmt.

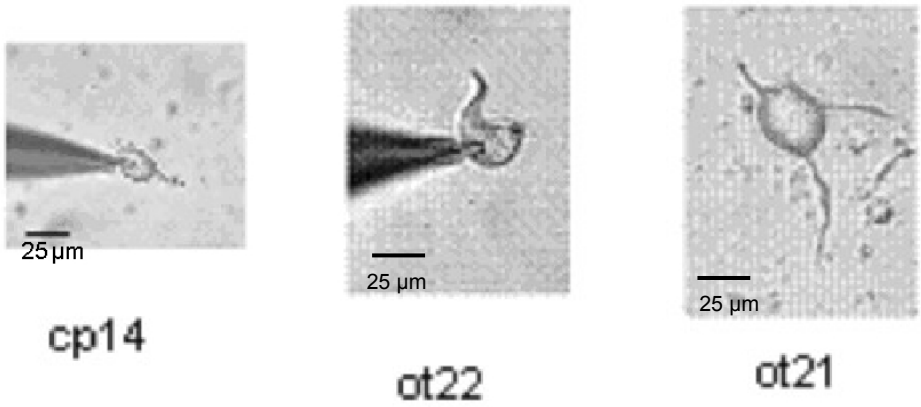


Abb. 12 Beispiele untersuchter isolierter Zellen, cp14 und ot22 an der Patch- Pipette.

Nachdem die elektrophysiologischen Untersuchungen abgeschlossen waren, wurde das Zytoplasma in die verwendete Elektrode mit steriler Kontrolllösung (s.o.) gesaugt. Die Daten wurden mit handelsüblicher Software (TIDA für Windows, HEKA, Lambrecht, Deutschland) gesammelt.

3.3 Stoffapplikation

Zur Gabe von Glutamat 1mM wurde die schnelle Perfusionstechnik (Sharonova et al., 1996) benutzt. Die isolierte Zelle wurde erst an das patch - clamp System angeschlossen und dann in das Applikationssystem übergeführt. Dort wurde sie dann kontinuierlich von Kontroll - Bad - Lösung (siehe Registrierlösung) umspült. Die Substanzen wurden über Glaskapillaren mit einem Durchmesser von 0.2mm zugegeben. Alle Lösungen flossen kontinuierlich, schwerkraftgesteuert, mit der gleichen Geschwindigkeit. Durch seitliches Bewegen der Kapillare mit der Zelle wurde diese entweder der Kontroll- oder der Test- Lösung ausgesetzt. Der Wechsel zwischen den Lösungen am offenen Ende der patch Elektrode erfolgte mit einer Zeitkonstante von 0.5ms oder weniger. Alle Stoffe und Salze erhielten wir von Sigma, Deisenhofen, Deutschland.

3.4 Datenanalyse

Die Beziehung der Zellantwort zur applizierten Konzentration von Kainat wurde mit Gleichung (1) berechnet:

$$R= R_{max}/(1+(EC_{50}/[ligand])^{n}$$

Die Potenzierung für AMPA Rezeptor vermittelte Ströme durch Cyclothiazid wurde mit Gleichung (2) berechnet:

$$R=1+ R_{max} /(1+EC_{50}/[ligand])^{n})$$

Wobei R_{max} die relative maximale durch einen Liganden ausgelöste Antwort ist. EC_{50} ist die Konzentration des Liganden, welche die halbmaximale Antwort auslöst. [ligand] ist die Konzentration des Liganden und n ist die Hill-Konstante. Die ausgewerteten Daten liegen als Mittelwert jeweils mit Angabe ± Standardabweichung vor, die Analyse erfolgte durch den nicht parametrischen Wilcoxon Test. Das Signifikantsniveau wurde hierfür auf $p<0.05$ festgelegt.

3.5 RNA Gewinnung und sc-RT-PCR

Allgemeines Vorgehen:

Nach der Registrierung wurde das Zytoplasma der Zelle mit steriler Kontrolllösung in die verwendete Elektrode gesaugt. Der Inhalt dieser Elektrode (8µl Lösung mit der Zelle) wurde nun in ein Eppendorf Gefäß gegeben, indem sich schon 7µl vorbereitete Lösung nach dem dazugehörigen Protokoll befanden („First strand cDNA synthesis kit“ (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland). Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C zur reversen Transkriptase Reaktion (RT) wurde diese Reaktion durch Tiefgefrieren bei –20°C gestoppt. Eine Identifizierung der einzelnen Zellen erfolgte durch den Nachweis der Expression von HDC (Histidin Decarboxylase). Die cDNA wurde durch sc-RT-PCR amplifiziert (Produktgröße: 457 Basenpaare). Die zur Erkennung der HDC cDNA verwendeten Primer waren:

upper: 5’-GATGATGGAGCCCAGTGAATA-3’

lower: 5’-AGTCCTCTGCAAGACGCCTC-3’.

Sie umgeben eine Region mit 3 Introns, welche einer genomische DNA-Länge von 6031bp gegen 457bp der cDNA entspricht. Die Sequenzierung (ABI, Model 377) des erhaltenen Produkts, zeigte Gleichheit zur für Ratten bekannten HDC-cDNA Sequenz (Genbank M29591).

Für den Amplifikationsprozess wurden folgende Lösungen und folgendes Protokoll verwendet: Die dünnwandigen PCR-Gefäßchen enthielten, 2-5µl first strand cDNA Lösung, 10xPCR Puffer (5µl), 100pM des sense und antisense Primers, 200µM von jedem dNTP und 2.5 units Taq polymerase. Das Reaktionsvolumen wurde dann auf 50µl durch Zugabe von nukleasefreiem Wasser aufgefüllt. Die Magnesiumkonzentration betrug in allen PCR Reaktionen 3mM. Die Taq Polymerase, der PCR Puffer, die Mg^{2+} Lösung, und alle vier dNTPs wurden bezogen von Qiagen, Erkrath, Deutschland. Alle Oligonukleotide wurden hergestellt durch die Firma MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland. Die Amplifikation wurde durchgeführt mit einem Thermocycler (Master cycler) der Firma Eppendorf, Deutschland. Der Ablauf war wie folgt: Denaturierung bei 94°C für eine Minute, Annealing (bei 49°C für AMPA Rezeptoren, bei 50°C für NCX, NCKX, ADAR und Serotoninrezeptoren und bei 53°C für HDC) für eine Minute, Extension bei 72°C für eine Minute und 30 Sekunden (wiederholt bis zu einer Zykluszahl von 40), dann die finale Elongation für zehn Minuten bei 72°C, sowie Kühlung bei 4°C. Es wurde eine zwei Stufen Amplifikation

in jedem Protokoll verwendet. Für die zweite Runde wurde als Muster (template) 1µl des Produktes der ersten Runde verwendet, die anderen Reagenzien entsprachen exakt denen der ersten Amplifikation, der Zyklusablauf wurde ebenfalls beibehalten.

Es wurde genauestens kontrolliert, dass das PCR Signal von der mRNA einer Einzelzelle stammte. Es wurden pro Experiment jeweils 3 Negativkontrollen durchgeführt. Dazu dienten: 1) Elektrodlösung wurde in ein Reaktionsgefäßchen als Lösung für die RT-PCR gegeben nachdem die mit dieser Lösung gefüllte Elektrode in der Registrierkammer mit einzelnen Neuronen in die Lösung getaucht wurde, jedoch ohne dabei eine Zelle angesaugt zu haben. 2) Um sicherzustellen, dass genomische DNA nicht zum PCR Produkt beitrug, wurden Neuronen aufgesaugt und auf die gleiche Weise (wie oben bereits beschrieben) weiterbehandelt, der Unterschied bestand nur darin dass die reverse Transkriptase Reaktion weggelassen wurde. 3) Die Kontamination aus extraneuronalen Quellen wurde dadurch überprüft, indem der aus der Zelle gewonnene Anteil der Versuchslösung mit Wasser ausgetauscht wurde. Kontrollen wurden an jedem Tag, an dem Experimente durchgeführt wurden gemacht. Sie wurden mit den HDC Primern amplifiziert, denn die Expression dieses Gens war gegenüber allen anderen in der TM Region am größten. Bei einer positiv entfallenen Kontrolle wäre das betreffende Experiment nicht zur Datenanalyse herangezogen worden. Außerdem fanden bei der Erstellung eines jeden PCR Protokolls zum Ausschluss einer Kontamination mit genomischer DNA Negativkontrollen statt. Diese zeigten nie einen Nachweis eines PCR Produktes in einer ähnlichen Größe wie die des zu erwartenden Produktes war.

Repräsentative Produkte der zweiten Runde wurden in Wasser purifiziert (PCR Purification kit von Qiagen) und anschließend in einer automatischen Sequenziermaschine (ABI, Model 377) in beide Richtungen sequenziert. Stellten sich aber bei der Gelelektrophorese nach der Amplifikation durch sc-RT-PCR Produkte von unterschiedlicher Größe in einer Zelle dar, wurden die DNA Banden aus dem Gel ausgeschnitten und getrennt dialysiert. Diese PCR Produkte wurden weiter präzipitiert mit 3M Natriumacetat (PH 7.0) und Ethanol; die getrockneten DNA Stücke wurden dann mit 10µl Wasser verdünnt und konnten somit anschließend getrennt voneinander sequenziert werden. Die in unseren Versuchen erhaltenen Sequenzen stimmten mit den bereits in der Genbank bekannten überein.

GENBANK, Zugangsnummern: M36418, M36419, M36420, M36421 für GluR1-4, flop; M29591 für HDC; AF021923 für NCKX2; AY009158 für NCKX3; U08141 für

NCX2; U53420 für NCX3; NCX1.4 (NaCa 4, Exone AD, U04939), NCX1.5 (NaCa 5, Exone ADF, U4940), NCX1.7 (NaCa 7, Exone BDF, U04933), NCX1.14 (ACDF, AY245282); NCX1.15 (BCDF; AY245281); für $5HT_{2A}$ 8393582; für $5HT_{2c}$ M21410.

Restriktionsanalyse

Als weiteres Verfahren zur genauen Identifizierung der amplifizierten Proben kam die Restriktionsanalyse mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen zum Einsatz, verwendete Enzyme stammten alle von der Firma New England Biolabs and Promega, USA. Für eine Probe wurde ein Totalvolumen zur Reaktion von 11µl angesetzt. Diese enthielt jeweils 5µl nukleasefreies Wasser, 1µl des spezifischen Enzyms, 1µl des zum spezifischen Enzyms gehörigen Puffers sowie 4µl der aufzutrennenden Amplifikationsprodukts. Dieses wurde dann bei 37°C für 2 Stunden inkubiert und anschließend zur Gelelektrophorese aufgetragen. Als Marker diente hierbei die 100 bp. Leiter, mit der 500 bp. Linie als Hauptmarker.

NCX und NCKX:

Die Amplifikation dieser Proteine ergab teilweise unterschiedliche Banden in der Gelelektrophorese. Die nach oben erläutertem Vorgehen durchgeführte Auftrennung ergab bereits bekannte Sequenzen der Ratte (Genbank, Zugangsnummern): Histidin Decarboxylase (M29591), NCX2 (U08141), NCX3 (U53420), NCKX2 (AF021923), NCKX3 (AY009158), $5\text{-}HT_{2A}$ (8393582), $5\text{-}HT_{2C}$ (M21410).

Folgende Splicevarianten von NCX1 sendeten Signale von den TM Neuronen, passend zu folgenden Nummern GENBANK Sequenzen: NCX1.4 (NaCa 4, Exone AD, # U04939), NCX1.5 (NaCa 5, Exone ADF, # U4940), NCX1.7 (NaCa 7, Exone BDF, # U04933), NCX1.14 (ACDF, AY245282); NCX1.15 (BCDF; AY245281).

Für die Amplifikation der verschiedenen NCX-Isoformen verwendeten wir folgende Primer:

NCX Dg up: 5´-GA(CT) GAC CAC GCG GGC ATC TT-3´;

NCX Dg lo: 5´-GCC AGG TT(CT) GT(CT) TTC TT(AGT) AGT AG-3´;

NCX1 up: 5´-TAA AAC CAT TGA AGG CAC AGC CC-3´;

NCX1 lo: 5´-TTT GCT GGT CAG TGG CTG CTT GTC-3´;

NCX2 up (+NCX Dg lo): 5´-CCA TGA AGA CTC TTC AGG TCA AG-3´;

NCX3 up1: 5´-TGG AGC GTC TTT GCC TAT-3´;

NCX3 lo1: 5´-CGG TAG AAA GCA CGG CTC TT-3´:

NCX3 up2: 5´-GAC AGA GGG TGA ACA C-3´.

Zur Identifizierung der verschiedenen Subtypen des NCX1 verwendeten wir die Restriktionsanalyse. Hierbei kamen vier verschiedene Enzyme zum Einsatz. Cla I (Exon A spezifisch), Ssp I (Exon B spezifisch) sowie Mbo I und Alu I, welche die bekannten Splicevarianten in je unterschiedliche Stücke auftrennten und somit eine Unterscheidung ohne erneute Sequenzierung möglich war.

Mbo I trennte die Isoform mit den Exone ACDF in Teilstücke mit den Längen von 70 + 267 bp. und ADF in 70 + 246 bp.; BCDF in 172 + 92 + 70 bp.; BDF in 92 + 70 + 151 bp. sowie AD gar nicht auf.

Alu I trennte die Isoform mit den Exone ACDF in Teilstücke mit den Längen von 128 + 150 + 59 bp., ADF in 58 + 257 bp., AD in 59 + 187 bp., BCDF in 128 + 147 + 59 bp. sowie BDF in 59 + 254 bp. auf.

Für die Amplifikation der verschiedenen NCKX-Isoformen verwendeten wir folgende Primer:

NCKX Dg up: 5´-TGG CCA T(AC)G T(GC)T G(CT)G ATG A-3´;

NCKX Dg lo: 5´-CCA CAC CAT (GC)A(GT) GTA (GCT)GA GAA-3´;

NCKX Dg up2: 5´-TC(AG) GCC CC(AGT) GA(AG) CT(CT) TTC AC(AC)-3´.

NCKX-cDNA wurde untereinander konkurrierend gleichzeitig mit den degenerierten Primern in zwei Runden amplifiziert. Die Produktgrößen betrugen für NCKX1 1704 bp., für NCKX2 1032 bp. und für NCKX3 1011 bp. . Diese wurden anschließend durch Verwendung einer subtypenspezifischen Restriktionsendonukleasen jeweils identifiziert. NCKX1 (Sma I: 130 + 1574 bp.), NCKX2 (Pvu II: 644 + 388 bp.), NCKX3 (Cla I: 634 + 377 bp.).

Aus früheren Studien ist jedoch bekannt dass die Isoform NCKX1 nur in der Netzhaut und in Thrombozyten exprimiert wird. Deshalb führten wir um unsere degenerierten Primer zu überprüfen eine Kontrollamplifikation aus Netzhautzellen durch. Die amplifizierten Produkte aus diesen Zellen wurden nicht nur durch die NCKX2 und NCKX3 spezifischen Enzyme geschnitten sondern auch durch das NCKX1 spezifische Enzym Sma I. Außerdem versuchten wir durch unsere degenerierten Primer auch eine vierte Isoform NCKX4 zu amplifizieren. Bisher gelang der Nachweis dieser Isoform nur bei Mensch und Maus. Eine Gensequenz für die Ratte existiert noch nicht. Da sich die Gensequenz für eine solche Isoform jedoch bei den beiden bekannten Sequenzen von Form eins bis drei sehr unterscheidet war

eine Amplifikation einer vierten Form für die Ratte, unter diesen Versuchsbedingungen sehr unwahrscheinlich und gelang letztendlich nicht.

Serotonin:

Die Serotonin Rezeptoren 5-$HT2_{(A,C)}$ wurden bei der ersten Runde mit den degenerierten Primer:

5-HT2 Dg up: 5´-GC(ACT) CCA A(CT)T A(CT)T T(CT)(CT) T(AG)A TGT C-3´;

5-HT2 Dg lo: 5´-GT(AG) AT(AG) AA(AG) AA(AGC) GGG CAC CAC AT-3´ amplifiziert.

In der zweiten Runde mit:

5-HT_{2C} up: 5´-GAT ATT TGT GCC CCG TCT GG-3´ und

5-HT_{2C} lo: 5´-CAG GGA TAG GAA CTG AAA CTC CTA TTG A-3´ (Größe des PCR Produktes 201 bp.); sowie

5-HT_{2A} up: 5´-ATT GCC GTG TGG ACC ATA TCT G-3´und

5-HT_{2A} lo: 5´-GCC TTT TGC TCA TTG CTG-3´ (Größe des PCR Produktes 374 bp.) amplifiziert.

AMPA:

Die Amplifikation der AMPA Rezeptoren erfolgte nach gleichem Standard wie bei den anderen Strukturen bereits beschrieben. Auch hier erfolgte die Amplifikation in einem zwei Stufenschema. In der ersten Runde der Amplifikation wurden alle vier Subtypen der AMPA Rezeptoren gleichzeitig konkurrierend unter der Verwendung von degenerierten Primern amplifiziert. In der zweiten Runde wurden die Subtypen mit spezifischen aufwärts (upstream) Primern und mit den bereits vorher verwendeten degenerierten abwärts (downstream) Primer amplifiziert.

Folgende Primer wurden verwendet, die ihnen zugeordneten Nummern entsprechen der Amplifikationsstufe in der sie verwendet wurden.

GLUR(A-D)

Up1, 2a 5´-CCT TTG GCC TAT GAG ATC TGG ATG TG-3´

Lo1,2b 5´-TCG TAC CAC CAT TTG YTT TTC A-3´

Lo2a 5´-AAG TTT CCW CCM ACT TTC ATS GT-3´

GLURA up2b 5´-CT TAC CAC AGA GGA AGG CAT GAT-3´

GLURB up2b 5´-GAG GAC TAC CGC AGA AGG AGT AGC-3´

GLURC up2b 5´-GTGT CCC CTA TAG AGA GGG CT-3´

GLURD up2b 5´-CAC TAG AAC TAC AGC TGA GG-3´

Zur Bestimmung der einzelnen Unterarten des AMPA Rezeptors im amplifizierten Produkt aus der ersten Runde (Primer up1,2a; lo2a) wurden Restriktionsanalysen mit spezifischen Enzymen für jede zu erwartende Untereinheit durchgeführt.

Bgl I (GLURA), Bsp 12861 (GLURB), Eco47III (GLURC), EcoR I (GLURD)

Die dabei entstandenen Fragmente wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und zeigten folgende Größen:

GLURA: 300 und 322 bp, GLURB: 478 und 144 bp, GLURC: 353 und 275 bp, GLURD: 411 und 211 bp

Zur Analyse der Splicevarianten wurde eine zweite Amplifikationsrunde durchgeführt (Primer lo1, 2b). Die Produkte (10µl) der zweiten Amplifikationsrunde GluR(A-D) wurden anschließend mit flip- oder flop- isoformspezifischen Restriktionsenzymen versetzt. GluRA cDNA wurde mit den Enzymen Bfa I (für die flip Variante, Größe der Fragmente 192 + 64 bp.) und Mse I (für die flop Variante, Größe der Fragmente 201 + 55 bp.) geschnitten. GluRB cDNA wurde mit den Restriktionsenzymen BsrS I (für die flip Variante, Größe der Fragmente 77 + 180 bp.) und Sca I (für die flop Variante, Größe der Fragmente 57 + 200 bp.) behandelt.

GluRC cDNA wurde in den aus der TM Region isolierten Zellen nicht gefunden. Für den Subtypen GluRD cDNA wurden die Restriktionsenzyme Hga I (für die flip Variante, Größe der Fragmente 47 + 214 bp.) und Hpa I (für die flop Variante, Größe der Fragmente 68 + 193 bp.) verwendet.

Alle Produkte der zweiten Amplifikationsrunde wurden zusätzlich zur Analyse durch Restriktionsanalyse und Gelelektrophorese noch in Wasser purifiziert und in beide Richtungen automatisch sequenziert. Die Ergebnisse entsprachen den bekannten Sequenzen der Genbank unter den Registrierungen M36418, M36419, M36420, M36421 (GLUR A-D flop Variante).

Um den spezifischen Nachweis der Q/R Editingposition zu erbringen wurden selektive Primer für die GluRB cDNA entworfen.

Up: 5´-GGA AGA GAA ACA CAA AGT AGT G-3´;

lo: 5´-TTT GCT TAG ACA GAT CCT CAG C-3´.

<u>Adenosindeaminase:</u>

In der ersten Amplifikationsrunde verwendeten wir degenerierte Primer:

Das Amplifikationsschema entsprach unserem entworfenen Standard.

Deg. Up1: 5`-AA(CT) GAC TG(CT) CA(CT) GC(AT) GA(AG) AT-3`
Deg. Lo1: 5`-G(GCT)A (GT)(GT)C C(CT)A (GC)CA C(AG)T TCC AGC-3`
Um die später geplante Restriktionsanalyse durchführen zu können amplifizierten wir in der zweiten Runde mit:
Lo2: 5`-GTC (AT)(GC)T (AG)CA GCA CAT GGT-3` und Primer up1.
Die Produkte die wir auf diesem Weg erhielten wurden dann unter Verwendung von subtypspezifischen Restriktionsenzymen aufgetrennt.
Hind III für ADAR1 mit Trennung der Fragmente auf die Größe von 277 und 119bp,
Nar I trennte die lange Isoform von ADAR2 in 232 und 182bp, (Melcher et al., 1996)
Mbo I ergab bei ADAR3 die Anteile mit 100 und 287bp.

In unserer Positivkontrolle (aus Gesamtgewebe TM) konnten wir alle drei Formen ADAR nachweisen. ADAR1 konnten wir in einem sehr hohen Anteil unserer Zelle (89%) nachweisen. Zur Überprüfung ob es sich hier um ein tatsächliches Ergebnis, oder um ein Artefakt, das durch die Art (degenerierte Primer, Vorstellung der kompetitiven Amplifikation) unseres Experimentes ausgelöst war, wählten wir zwei Neurone, die jeweils nur eine ADAR Form exprimierten: ADAR1 oder ADAR3 (denn diese Formen hatten im deg.lo2 Primer am meisten Fehlerbasen). Durch sich wiederholende Verdünnung der cDNA und daran anschließende Durchführung der sc-RT-PCR überprüften wir die Grenze für die Verdünnung, die noch einen Nachweis des Produktes erbrachte. Nach Austestung der Verdünnungsobergrenze, amplifizierten wir ADAR3 in verschiedener Konzentration seiner Grenzverdünnungsstufe alleine oder in Anwesenheit der 8fachen Konzentration der Grenzverdünnungsstufe von ADAR1. Am Ende von jeweils zwei Amplifikationsrunden führten wir eine Restriktionsanalyse mit dem ADAR3 spezifischen Enzym Mbo I durch und erhielten auch die spezifische ADAR3 287bp große Bande bei der Gelelektrophorese. Um die Messung quantifizieren zu können verwendeten wir das Gel Dokumentationssystem ChemiDoc XRS (BioRad, USA) und die „Quantity one“ Software. Die Intensität der 8fach Bande wurde auf 100% gesetzt. Die gemessene Intensität der einzelnen Verdünnungsstufenprodukte lag nahe an der zu erwartenden Intensität, bei linearer Amplifikation. In den Proben, denen wir ADAR1 zugefügt hatten erhielten wir einen Messwert für das ADAR3 Amplifikationsprodukt, der eine kompetitive Amplifikation nahe legt, die so erhaltenen Werte passten zu den vorher gemessenen Werten des Experiments. Diese

Überprüfung impliziert eine kompetitive Amplifikation bei genesteter ADAR Amplifikation.

Um auch die kürzere Form des Subtypens ADAR2 (Mittaz et al., 1997) mit zu erfassen verwendeten wir auch noch das Enzym Ssp I welches eine Aufspaltung mehrerer Isoformen erbrachte: Es trennte ADAR2 (lang) in Fragmente der Größe 197 und 217bp, ADAR2 (kurz) in Fragmente der Größe 197 und 187bp sowie ADAR3 in Teile mit 107 und 280bp.

Des Weiteren konnten wir noch eine Subtypen spezifische Amplifikation durchführen, die hierfür verwendeten Primer waren:

ADAR1up: 5`-GAA GTA CAA CCA CCA CAC TGC C-3`

ADAR2up: 5`-GCT CAT ATT TCA GAA GTC AG-3`

ADAR3up: 5`-GGC AAG GCG AGC ATT TCT TCA-3`

Diese verwendeten wir jeweils mit dem deg. Lo2 Primer. Als Produkte erhielten wir 331bp für ADAR1, 364bp für ADAR3 und 316 und 286bp für ADAR2 (lang) und (kurz). Die erhaltenen Sequenzen verglichen wir mit den hierfür bekannten aus der Genbank und sie stimmten überein. (Genbank Zugangsnummern: 13591903, U43534, U75486).

Auch bei diesen Produkten für den Subtyp ADAR2 führten wir nochmals eine Restriktionsanalyse durch mit Hhal, welches die lange Form in drei Fragmente (136, 107 und 73bp) teilte und die kurze Form in zwei Fragmente (213 und 73bp) trennte.

3.6 Immunhistochemie

Die Schnitte des Hypothalamus, die die TM Region beinhalteten (450µm dick) wurden in 4% Paraformaldehyd in 0.1 M Phosphatpuffer (PB) bei einem pH von 7.4 für 6-8 Stunden fixiert. Zum Schutz wurden sie, in 20% Saccharose eingefroren und so eingebettet auf eine Dicke von 40µm gefriergeschnitten. Die Teilschnitte wurden dann, auf mit Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen und getrocknet und eingefärbt.

Zuerst wurden die Teilschnitte in PBS mit 0.25% Triton X-100 (PBS-T) für fünf Minuten gewaschen. Dann folgte ein Vorinkubieren mit 1%igem normalem Ziegenserum und 1% normalem Eselserum in PBS-T für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Dieselbe Lösung wurde auch zur Verdünnung von polyklonalen

Meerschweinchen Antikörpern gegen HDC (Histidin Decarboxylase) auf 1:1000 und von Kaninchen gegen Ratte NCX1 Antiserum #1 (NCX11-A) auf 1:500 verwendet. Beide Antikörper stammen von Acris, Bad Nauheim, Deutschland). Die Antikörperlösung wurde zu den Teilschnitten für 12 – 16 Stunden bei 4°C gegeben. Nach dem Waschen wurden die Teilabschnitte mit Alexa Fluor 488- markiertem Ziegen-Anti-Meerschweinchenserum IgG (1:500; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) inkubiert, um die HDC Immunreaktion zu zeigen. Außerdem wurde Texas-Rot Esel gegen Kaninchen IgG (1:200, Dianova, Hamburg, Deutschland) zugegeben um die Reaktion mit dem gesuchten Protein, zum Beispiel NCX1, Immunreaktion darzustellen. Das Ganze inkubierten wir bei Raumtemperatur 90 Minuten lang. In jedem Experiment wurden zwei Negativkontrollen (in Einzelfärbung) durchgeführt. In diesen Kontrollen wurde einer der Primärantikörper durch Normalserum ersetzt und weiterhin inkubiert mit beiden Sekundärantikörpern wie gewohnt. In einigen Versuchen wurden monoklonale Antikörper der Maus gegen Neuronen spezifische Enolase (1:300 Acris) zusammen mit den NCX1 Antikörpern verwendet. In diesen Experimenten wurde außerdem Alexa Fluor 488-markiertes Ziegen-Anti-Maus IgG (1:500; Molecular Probes) angewendet. Zur Analyse der Färbungen verwendeten wir ein konventionelles Fluoreszenzmikroskop. Als Filter wurden passende für Fluorescein/AF488 und Texas Rot (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) verwendet. Weitere Filter waren XF22 mit Anregung bei 485±11nm und Emission bei 530±15nm für Alexa Fluor 488 und XF43 (580±13,5nm;630±15nm) für Texas Rot (Omega Optical Inc., Battelboro, VT, USA). Wir konnten keine Leckage für das Signal durch den inkorrekten Filter für die einzelnen Fluorchrome erkennen, auch nicht bei sehr starker Fluoreszenz.

4. Ergebnisse

4.1 Koexpression von NCX und NCKX mit Serotonin Rezeptoren

Die TM Neurone wurden durch den Nachweis der Histidin Decarboxylase (HDC) identifiziert. Die Mehrheit der HDC – positiven Zellen (n=44 von 48) exprimierten einen oder mehrere Austauscher (NCX/NCKX) Subtypen. Die vorherrschende Form unter ihnen war NCX1 (100% der Zellen), gefolgt von NCX2 (70%) und schließlich noch in mehr als der Hälfte NCKX3 (57%). Die Analyse erfolgte über sc-RT-PCR und anschließender Gelelektrophorese, mit weiterführender Untersuchung durch Sequenzierung oder der Behandlung mit Restriktionsendonukleasen (genaues Vorgehen s. o.). Es zeigte sich, dass die Amplifikation von NCX2 und NCX3 cDNA nur eine breite Bande im Gel ergab (281bp und 237bp), zeigte sich dass die Amplifikation der NCX1 spezifischen cDNA Produkte verschiedener Größen ergab (zwischen 244 und 337bp). Dies zeigte an, dass es sich hier um mehrere Splicevarianten in den verschiedenen Zellen handelte, vor allem in diesem Fall waren weitere Untersuchungen zur genauen Identifizierung nötig (siehe auch 4.3).

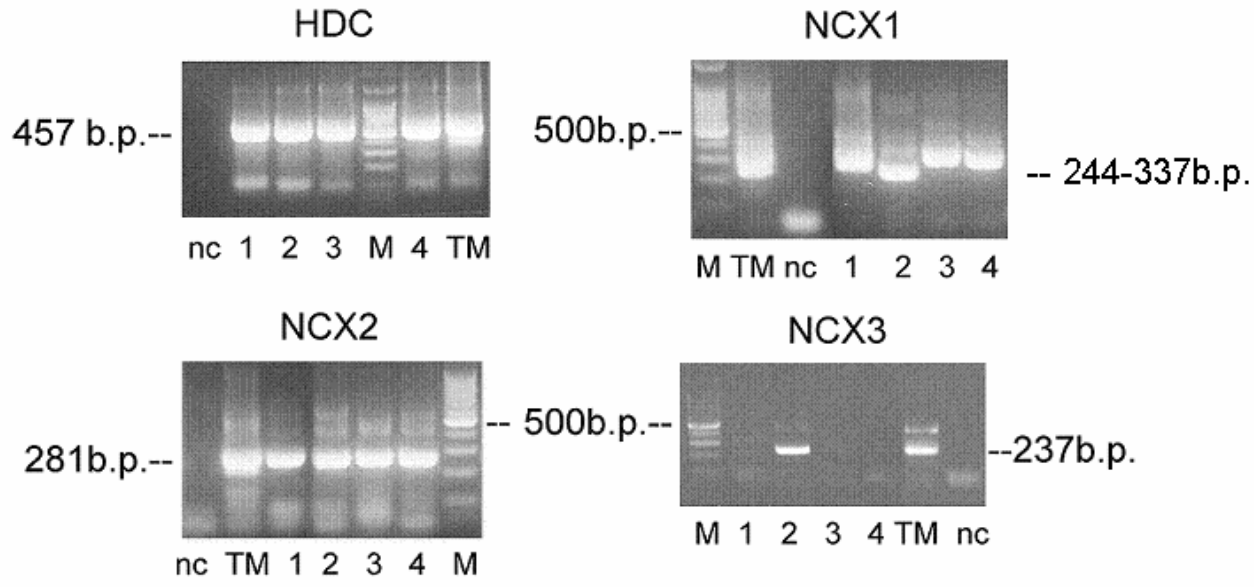


Abb. 13 exemplarische Abbildung der Gelelektrophorese, beispielhaft vier Einzelzellen (1-4), als Marker (M) wurde eine Einteilung mit 100bp Schritten verwendet in der der 500bp Anteil die stärkste Linie zeigt. Negativkontrolle (nc). TM stellt die Positivkontrolle mit RNA aus einem hypothalamischen Schnitt (nicht aus einer Einzellzelle)

Wir verglichen die Expression von NCKX Proteinen in TM Neuronen und denen des Hippocampus, in denen NCKX2 und NCKX3 stark exprimiert werden. Bei

Restriktionsanalyse zeigte sich, dass die PCR Produkte des Hippocampus durch beide spezifischen Enzyme, für NCKX2 und NCKX3 zu ähnlichen Längen zerschnitten wurden. Die aus der TM Region gewonnenen Produkte wurden jedoch durch das NCKX3 spezifische Enzym fast komplett zerlegt. Wenn man beide Enzyme gemeinsam den Positivkontrollen beider Regionen zugab blieb kein unzerschnittenes Produkt im Gel nachweisbar. Die Expression der NCKX Subtypen wurde in 21 verschiedenen Neuronen unter Verwendung der Restriktionsanalyse untersucht. In den beiden Runden der kompetitiven Amplifikation aller Mitglieder der NCKX Familie wurden zwei Sets von degenerierten Primern verwendet. NCKX1 wurde in der TM Region, wie erwartet, nie gefunden. Die Anwesenheit des NCKX3 wurde durch die Verwendung des Restriktionsenzyms Cla I bewiesen, welches das PCR Produkt in zwei Teile mit den Längen von 634 bp. und 377 bp. trennte. Diese Form wurde in 70% der Neuronen gefunden. NCKX2 wurde spezifisch durch die Restriktionsendonuklease Pvu II in zwei Teile mit den Längen von 644 bp. und 388 bp. getrennt. Jedoch fand sich dies nur in drei Neuronen, 14% entsprechend, wobei es sich hierbei in zwei der Zellen wieder um Koexpression mit NCKX3 handelt. PCR Produkte aus den TM Neuronen in denen nur eine Unterform des NCKX Proteins durch Restriktionsanalyse nachgewiesen werden konnte wurden sequenziert und somit der vorhandene cDNA Typ bestätigt. NCKX3 war in 62% mit NCX2 koexprimiert, mit NCX3 in 43% und mit beiden in 38% bezogen auf die 21 untersuchten Zellen. In sechs NCKX3 negativen Zellen zeigte sich in fünf davon NCX2 und in einer NCX2 und NCX3 zusammen.

Die mRNA des 5-HT2_C Rezeptors wurden in 75% gefunden wobei die mRNA des 5-HT2_A Rezeptors nur in 10% der Neuronen gefunden werden konnte. In allen Neuronen in denen der 5-HT2_C Rezeptor exprimiert wurde, wurde auch NCX1-mRNA gefunden. In vier der untersuchten Zellen wurde neben dem HDC Signal kein anderes Signal durch sc-RT-PCR gefunden. Eine Fraktion der 5-HT2_C Rezeptor positiven Zellen wiesen keine NCKX mRNA auf, in nur 14% der NCKX positiven Zellen fehlte die 5-HT2_C Rezeptor mRNA. Unter allen Subtypen wurde nur NCX1 in allen Zellen gefunden die auch 5-HT2_C Rezeptoren beinhalteten.

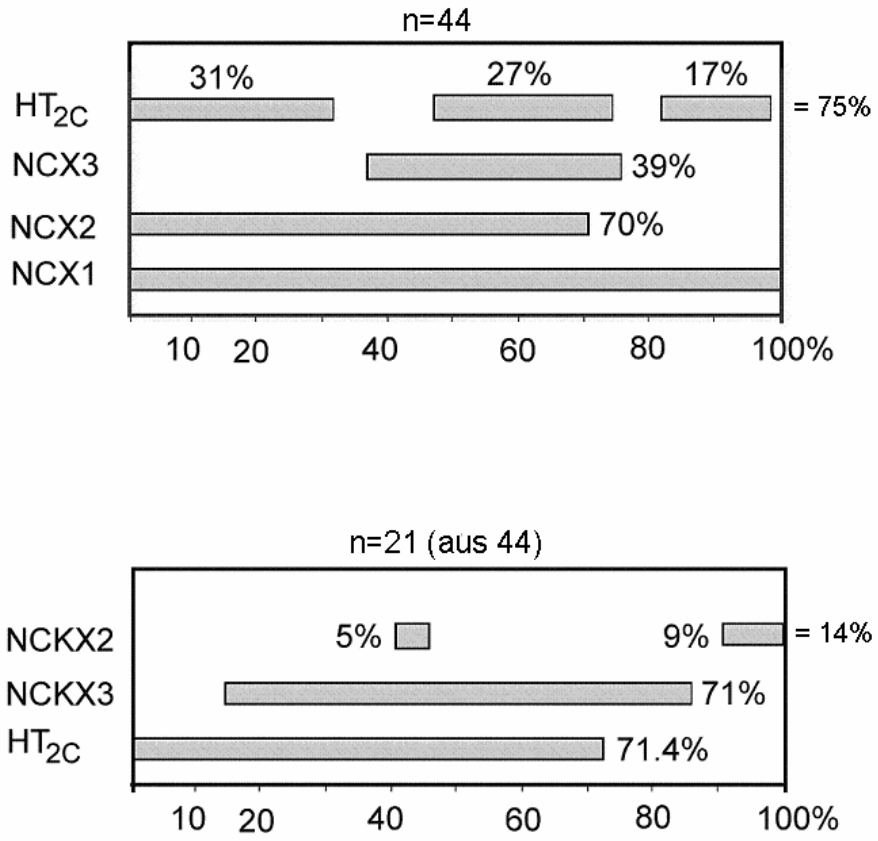


Abb. 14 Tabelle der prozentualen Aufteilung der verschiedenen Subtypen (NCX, NCKX und Serotoninrezeptoren) im Zusammenhang zueinander in den 44 untersuchten Neuronen, im unteren Teil der Abbildung 21 Zellen (aus der oberen Gruppe) in denen auch die NCKX Expression untersucht wurde

4.2 NCX1 Antiserum färbt HDC positive hypothalamische Neurone

Doppelimmunfluoreszenz Färbung mit Antikörpern gegen HDC aus Meerschweinchen und Antikörpern des Hasen gegen NCX, welche gegen die extrazellulären Proteinanteile der zu untersuchenden Strukturen gerichtet waren, zeigten eine gemeinsame Lokalisation der Färbungen innerhalb des Körpers der TM Neuronen. Dennoch konnte mit dem benutzten konventionellen Fluoreszenzmikroskop keine genaue Lokalisation der NCX1 Proteine durchgeführt werden: es könnte entweder intrazellulär oder extrazellulär oder sogar präsynaptisch, in den axonalen Endungen des Zellkörpers der TM Neurone liegen. Zusätzlich zu den doppelt gefärbten HDC/NCX1 Zellen, ließen sich noch kleine ovale Zellen mit einem ungefähren Durchmesser von 10µm, vermutlich aus glialem Ursprung, einfach für NCX1 anfärben. Eine zur Kontrolle durchgeführte Doppelfärbung mit Antiserum

gegen Neuronen spezifische Enolase, die negativ ausfiel, weist ebenfalls auf einen nicht neuronalen Ursprung dieser kleineren Zellen hin.

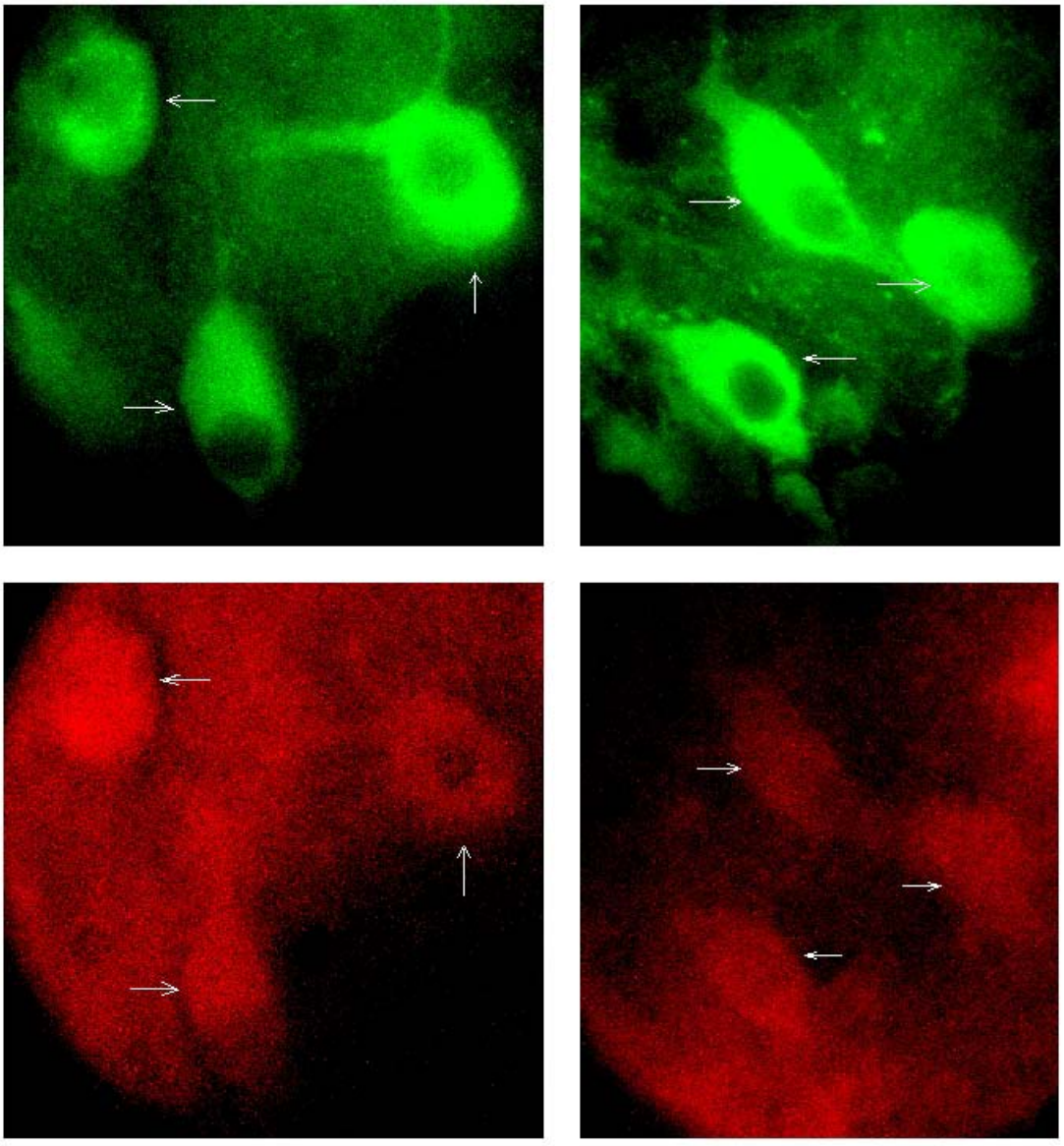


Abb. 15 Doppelimmunfluoreszenzfärbung für NCX1 und HDC; grün: HDC; rot: NCX1, die Pfeile kennzeichnen Beispielzellen für die erfolgreiche Färbung

4.3 Die verschiedenen NCX1 Splicevarianten in der TM Region

Durch Sequenzierung und Restriktionsanalyse wurden die Amplifikationsprodukte für NCX1 untersucht. In einigen Zellen kamen beide Methoden zum Einsatz, wenn ein eindeutiges Ergebnis durch ein Verfahren nicht zu erreichen war. Die Analysen wurden an 43 Neuronen durchgeführt. Das Exon A spezifische Restriktionsenzym

Cla I spaltet das amplifizierte NCX1 Produkt (welches Exon A enthält). Bei den verschiedenen Zusammensetzungen der Produkte aus verschiedenen Exonen ergaben sich hierbei folgende Restriktionsergebnisse: ACDF in 112 bp. + 225 bp.; ADF in 112 bp. + 204 sowie AD in 112 bp. + 135 bp., welche in 20 von 25 analysierten Neuronen enthalten waren. In den restlichen Neuronen spaltete die Exon B spezifische Endonuklease Ssp I in einer Zelle das NCX1 Produkt vollständig (zum Beispiel Zelle ot41), in vier weiteren nur teilweise, jedoch in Kombination mit Cla I wieder vollständig. In 24 von 27 Zellen konnte man die NCX1 Produkte erfolgreich sequenzieren und sie enthielten das Exon A. Die restlichen enthielten eine dem Exon B entsprechende Sequenz. In 10 Zellen waren die Produkte anhand der NCX1-cDNA Sequenzierung nicht eindeutig lesbar, was auf eine Mischung aus verschiedenen Isoformen zurückzuführen ist. Daraufhin entwickelten wir ein Restriktionsanalyseprotokoll (Verfahrensanleitung siehe unter Material, Methoden) worüber es möglich wurde die in diesen Neuronen enthaltenen Isoformen genau zu identifizieren.

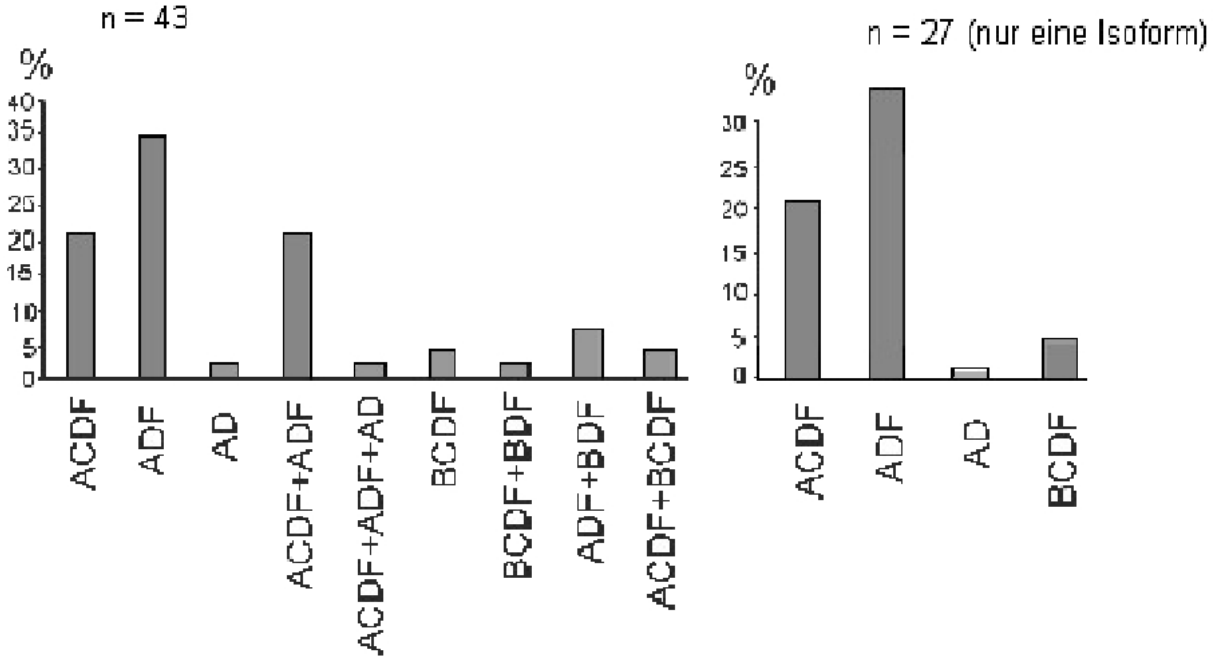


Abb. 16 Aufteilung der verschiedenen Splicevarianten (in %) in den 43 untersuchten Zellen; auf der rechten Seite sind die in 27 Zellen (=63%) alleinig exprimierten Varianten dargestellt. Die Zahlen stammen sowohl aus den Zellen die mit Restriktionsanalyse untersucht wurden, als auch aus den Zellen deren Produkt zur genauen Analyse sequenziert wurde.

Beim Zusammentragen aller Daten entstanden neun Gruppen mit unterschiedlichem Expressionsmuster der NCX 1 Isoformen. Es zeigten sich die verschiedenen Isoformen ADF, ACDF, BCDF, AD, BDF. Besonders bedeutend und auffallend waren

hierbei folgende Ergebnisse. In 27 Neuronen (63%) war nur eine Isoform zu finden: ACDF 21%(NCX1.14), ADF 35%(NCX1.5), AD 2%(NCX1.4), BCDF 5%(NCX1.15). Ein Neuron enthielt mRNA für drei unterschiedliche NCX 1 Isoformen, mit den Exone ACDF, ADF, AD. In den übrigen Zellen wurden jeweils zwei Isoformen, welche simultan exprimiert wurden, gefunden. Zellen mit der einzelnen Isoform NCX1.5 (ADF) oder NCX1.14(ACDF) oder beiden von diesen (21% der Zellen) traten vorherrschend unter den histaminergen TM Neuronen (diese 3 Gruppen stellen 77% der gesamten Zellanzahl dar) auf. In 40 der 43 untersuchten Zellen (93%) fand sich in NCX 1 das Exon A. In den drei anderen Zellen wurden nur Isoformen gefunden die das Exon B beinhalteten. In fünf der Zellen fanden sich Exon A und Exon B in den Zellen gemeinsam.

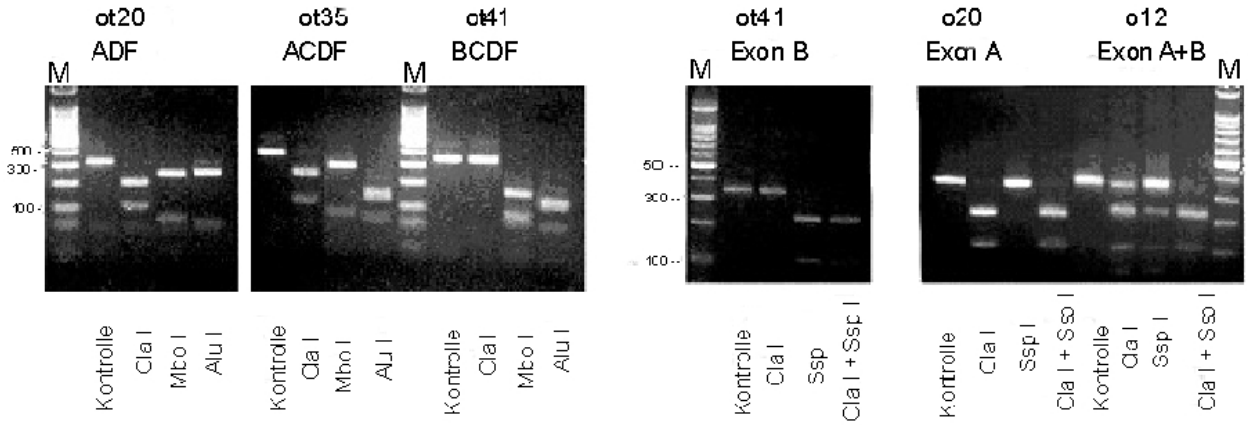


Abb. 17 Beispielhafte Darstellung der Ergebnisse der Restriktionsanalyse zum Nachweis der unterschiedlichen Isoformen an einigen Zellen, es wurden exonspezifische Restriktionsendonukleasen verwendet. M: Marker (100b.p. Staffelung, mit 500 bp. als stärkste Bande), die Kontrolle wurde jeweils ohne Restriktionsendonuklease durchgeführt. Oben angegeben die einzelnen Zellen mit den beinhaltenden Exone, unten aufgetragen, die verwendeten Enzyme

4.4 Immunfärbung zeigt das NCKX2 Protein in TM Neuronen

Durch doppelte Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen Histidin Decarboxylase und gegen NCKX2 Protein erhielten wir NCKX2 immunpositiv gefärbte Zellen über alle Teile des TM verteilt. Bei einer Analyse von 30 Gesichtsfeldern mit einem Durchmesser von 500µm wurden bei einer Anzahl von 393 HDC positiv gefärbten Zellen, 130 (33%) doppelt gefärbte Zellen, somit positiv

für das NCKX2 Protein gezählt. Folglich gelang der Nachweis von NCKX2-mRNA und Protein in den Zellkörpern eines Teils der Neuronen des TM Gebietes.

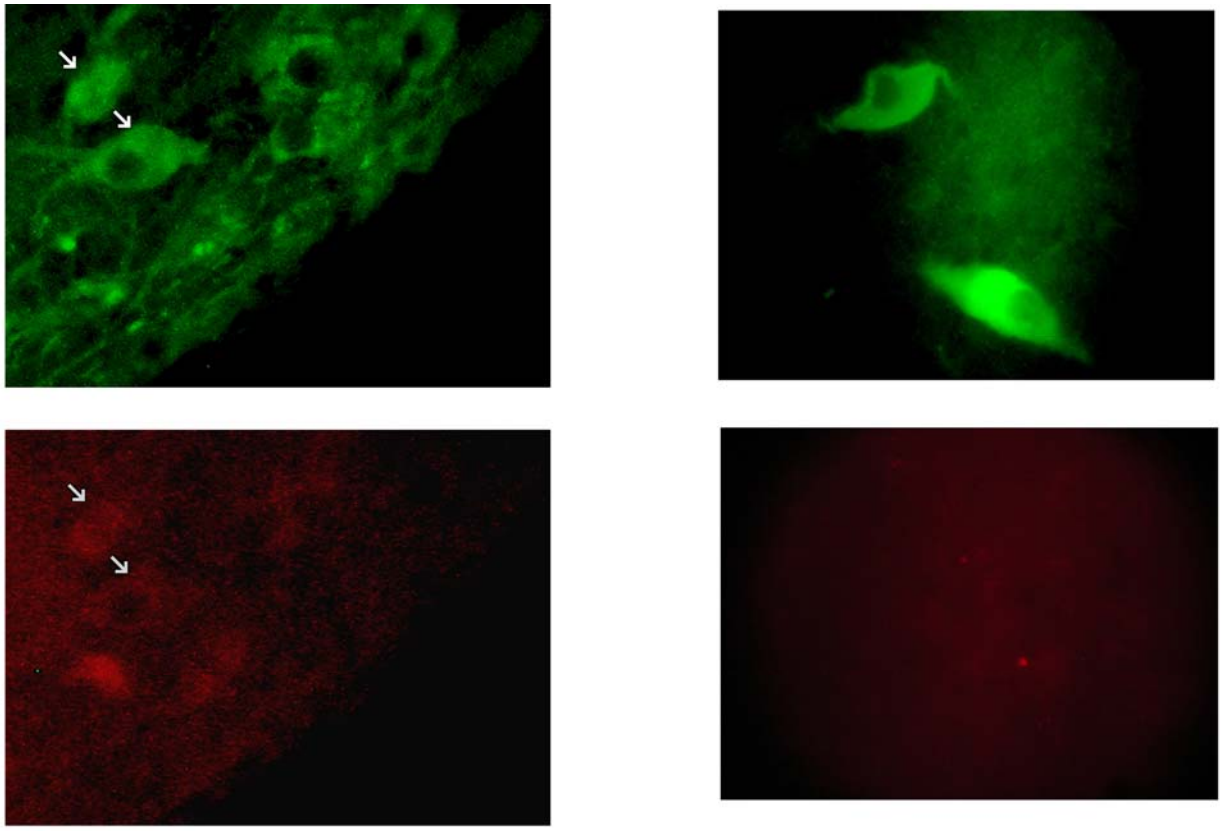


Abb. 18 Immunfluoreszenzuntersuchung auf eine Expression von NCKX2 in HDC positiven Zellen, grün: AF488 für HDC; rot: Texas red für NCKX2; die Pfeile weisen auf Beispielzellen der Doppelfärbung (links); die rechte Abbildung zeigt, in der Negativkontrolle keine Affinität durch den zweiten Antikörper der NCKX Färbung für HDC positiv gefärbte Zellen

4.5 Die Expression von NCX und NCKX in Zusammenhang mit AMPA Rezeptoren

Zur Analyse der Koexpression der mRNA welche für AMPA Rezeptoren kodiert sowie der für NCX und NCKX untersuchten wir 24 Neuronen aus der TM Region. Ein Nachweis der mRNA der verschiedenen Rezeptoren und Austauscher gelang in vielen Zellen und zeigte ebenfalls ein starkes gleichzeitiges Auftreten einiger Varianten. Die untersuchten Zellen hatten alle zuvor in der elektrophysiologischen Untersuchung eine Antwort auf einen Glutamatreiz gezeigt. Wir bildeten zwei Untergruppen der zu untersuchenden Neurone, ausgehend vom Ergebnis der Glutamatantwort und dem Nachweis der exprimierten flop Variante des Rezeptors.

Auf der einen Seite die Neurone mit der langsamen Desensitisierungskonstante zwischen 35 und 60ms (flop negativ) und auf der anderen Seite die schnellen mit Zeiten zwischen 14 und 28ms (flop positiv). Ein Nachweis der GLURD flop Variante und des zweiten Subtypen des Kalium abhängigen Natrium Kalzium Austauschers (NCKX2) gelang nur in den Zellen mit der schnellen Desensitisierungskonstante der Glutamatantwort. Die Unterform NCKX3 ließ sich sowohl in 68% der schnellen als auch in 40% der langsamen Zellgruppe nachweisen. Der Unterschied zwischen dem Auftreten der beiden Unterformen NCKX2 und NCKX3 zwischen beiden Gruppen war hoch signifikant (Fisher`s exact probability test P=0.0005 vs. P=0.2).

NCX1 ließ sich, wie bereits in den Punkten 4.1/4.3 auch hier in jedem untersuchten Neuron finden. Wobei sich auch diesmal eine Expression von fünf unterschiedlichen Isoformen zeigte. Es gelang der Nachweis durch Restriktionsanalyse, wobei bis zu drei Isoformen in jedem Neuron nachweisbar waren. Die Isoform NCX1.5 (Exone ADF) waren in 17 von 24 Zellen, Isoform NCX1.14 (ACDF) in 10 von 24 Zellen. Ein Nachweis des Exons B gelang wesentlich seltener, wir fanden es nur in vier der 19 Zellen die der Gruppe mit langsamer Zeitkonstante angehörten und in nur einer Zelle von fünf aus der schnellen Gruppe (P=0.46, Fisher`s exact probability test).

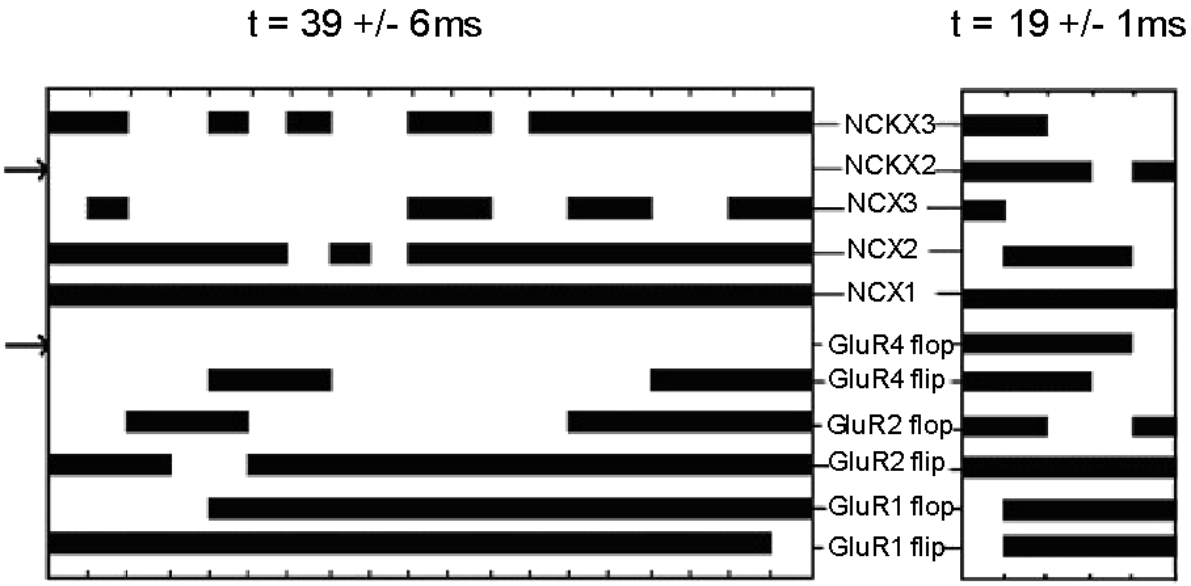


Abb. 19 Darstellung der möglichen Koexpression der verschiedenen Glutamatrezeptorsubtypen zusammen mit NCX und NCKX, in Form eines Balkendiagramms, die Zellen teilten sich in zwei Gruppen aufgrund ihrer Zeitkonstante für durch Glutamat induzierte Ströme, links = langsam, rechts = schnell

NCX2 ließ sich sowohl in der Mehrheit der langsamen (89%) als auch in einem Großteil der schnellen Gruppe (60%) nachweisen, während die Variante NCX3 nur in 42% und 20% der jeweiligen Gruppen zu finden war. Obwohl einige Formen ein starkes Auftreten in den TM Neuronen zeigten, konnte ein direkter Zusammenhang zwischen den Expressionen von AMPA Rezeptoren NCX und NCKX nicht gefunden werden.

4.6 Kalzium - Durchgängigkeit der AMPA Rezeptoren

Die Kalzium Durchgängigkeit der AMPA Rezeptoren wurde durch die Messung der Änderung, der durch die Applikation von Kainate ausgelösten Ströme in E_{rev} während dem Durchfluss von Lösungen mit verschiedenen Kalziumkonzentrationen bestimmt. In der extrazellulären Kontrolllösung (2.5 mM $CaCl_2$) betrug das Umkehrpotential beinahe 0mV. Bei Konzentrationsänderungen der extrazelluläre Lösung auf 30 mM $CaCl_2$ und 100 mM NMDG wurde das Umkehrpotential der Kainat aktivierten Ströme zu negativen Werten hin verschoben (-67 ± 2.9 mV, n=10). Von diesen Werten aus wurde die relative Durchgängigkeit (P, Permeabilität) der AMPA Rezeptoren für Kalzium im Vergleich mit monovalenten Kationen bestimmt, was ein Verhältnis $P_{(Kalzium)}/P_{(monovalente\ Kationen)}$ von 0.12±0.1 ergab.

Daraus ergab sich, dass die AMPA Rezeptoren in TM Neuronen für Kalzium undurchgängig sind, passend dazu, dass diese Zellen immer die GluRB Untereinheit exprimierten, welche vollständig editiert war an der Q/R Position, was wir durch Einzelzellsequenzierung nachweisen konnten (siehe unten). Die Editierung zeigte sich in acht Neuronen mit langsamer und in beiden Neuronen mit schneller Desensitisierung für Glutamat (n=10 = 100%).

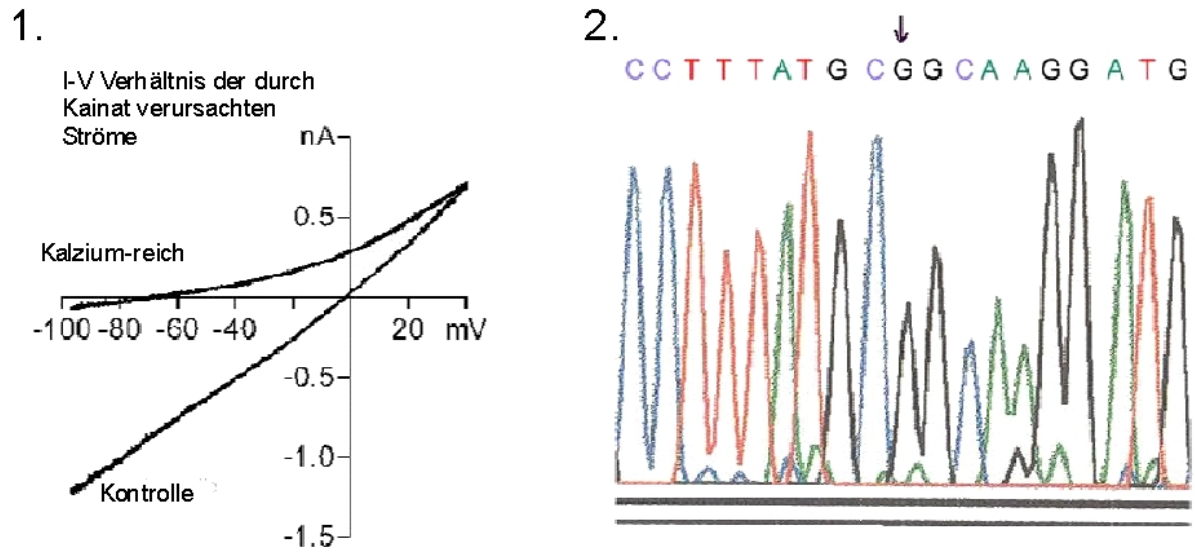


Abb. 20 Die Abbildung (1) zeigt die Undurchlässigkeit der AMPA Rezeptoren für Kalzium in den TM Neuronen. Gemessen wurde die Durchlässigkeit durch den Vergleich der durch Kainat ausgelösten Ströme in Lösungen unterschiedlicher Kalziumkonzentration. Spannungsrampen (20mV/s) von -100mV bis +40mV wurden an die TM Neuronen über die Patch-Pipette in der extrazelluläre Kontrolllösung angelegt (2,5mM Kalziumchlorid, Erev = 0±0.3mV) und in kalziumreicher Lösung (30mM Kalziumchlorid und 100mM NMDG, Erev = 67±2.9mV, n=10). Über die erhaltenen Werte wurde die Kalziumpermeabilität im Verhältnis zu monovalenten Kationen (Pca/Pcs) mit dem Wert 0.12±0.1 bestimmt.
Teil (2) zeigt einen Ausschnitt (Q/R Editing Position) der Sequenzierung einer Einzelzelle der TM Region, hier zeigt sich die Stelle editiert (Guanin).

4.7 Desensitisierungskinetik und AMPA Rezeptortypen

Um mögliche Zusammenhänge elektrophysiologischer Eigenschaften und ihren zugrunde liegenden molekularen Ursachen zu finden analysierten wir GLuR Untereinheitenexpression und die pharmakologischen Eigenschaften der durch Glutamat und Kainat vermittelten Zellantworten. Die Gesamtzahl unserer Zellen waren HDC positiv. In den 48 untersuchten Neuronen wiesen alle die GluRB Untereinheit auf, 36 die GluRA Untereinheit (75%), keine einzige Zelle zeigte Variante GluRC und 27 Zellen die GluRD Untereinheit (56%). Die Mehrzahl dieser GluRD positiven Zellen zeigten die flip Isoform (n=21, 78%). Nur sechs der GluRD Zellen zeigten die flop Variante wobei wiederum drei dieser Zellen gleichzeitig die flip Isoform zeigten. Die Positivkontrolle (Probe aus Gesamtgewebe TM) erbrachte den Nachweis aller vier GluR Subtypen, dies legt nahe, da GluRC in den Einzelzellen nicht gefunden werden konnte, dass sie sich in den Gliazellen befindet oder in den

Neuronen in einer sehr sehr geringen Konzentration. Eine Analyse der Splicevarianten von GluRA und GluRB erfolgte in den Zellen, die beide dieser Formen aufwiesen. Hierbei fanden sich GluRA flip in 92%, flop in 79% der Neurone, GluRB flip in 92% und flop in 50% bei einer untersuchten Neuronenzahl von 19 Stück.

Die Applikation von Glutamat (1mM) zu den TM Neuronen aktivierte einen großen Spitzenstrom der innerhalb von 100ms zu einem Gleichgewicht desensitisierte. Das Verhältnis vom Plateau der Amplitude zum Gipfel der Antwort ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen GluRD-positiven (0.45±0.03, n=27) und GluRD-negativen (0.55±0.03, n=21) Neuronen (Wilcoxon, p=0.11) ebenso nicht zwischen den flop-positiven dieses Untertyps (0.4±0.09, n=6) und den flop-negativen (0.46±0.03; Wilcoxen, p=0.074). Die Desensitisierung des Stromes folgte einer Exponentialfunktion, deren Zeitkonstante zwischen 14 und 60ms variierte (n=39). Die Glutamatantwort desensitisierte signifikant schneller in den GluRD flop-positiven Zellen (Tdes=20.7±1.8ms, Breite zwischen 14 und 28ms, n=6) als in den anderen Zellen (n=33, Wilcoxon, p=0.018) entweder bei nur vorhandener flip GluRD Variante (Tdes=47.9±2.1ms, N=16) oder bei den Zellen in denen sich keine GluRD Variante nachweisen ließ (Tdes=47.3±2.2ms, n=17, Breite zwischen 35 und 60ms). Es bestand kein Unterschied zwischen den beiden zuletzt erwähnten Gruppen (Wilcoxon, p=0.78). Die Größe der Neuronen mit verschiedener Kinetik zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen schnell (22.5±1.9µm, n=6), langsam (23.2±1.0µm, n=24), (Wilcoxon, p=0.75).

4.8 Cyclothiazid (CTZ) Modulation der Glutamat Antwort in TM Neuronen

Wir verglichen die relative Potenz und Effizienz von Cyclothiazid Potenzierung auf durch Glutamat ausgelöste Ströme in TM Neuronen. Gemessen wurde die Amplitude des einwärts gerichteten Stroms auf einer Skala mit Cyclothiazid Konzentrationen von 1 bis 500 µM . Die erhaltenen Daten wurden in die Gleichung (2) (siehe oben, Datenanalyse (3.5) eingesetzt. Die Kurven lieferten EC_{50} Werte von 13.3 ± 3.8 µM. Die Hill-Konstante lag bei 0.9 ± 0.2. Mit 200 µM Cyclothiazid konnten die Antworten bei 1mM Glutamat 6.3 ± 1.1 -fach, in Zellen denen die mRNA für die GluRD fehlte (n=11), gesteigert werden. Die CTZ Potenzierung der Glutamat Antwort zeigte keinen

signifikanten Unterschied (Wilcoxon Test, p=0,47) zwischen den Formen GluRD flop-negativ (n=7) und GluRD flop-positiv (n=4) (6.34±1.16 mal gegenüber 8.7±2.05mal größer, als die Spitzenantwort der Kontrollgruppe). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass flip Varianten der AMPA Rezeptoren immer auf den Zellkörpern der Neurone der TM Region mitexprimiert werden.

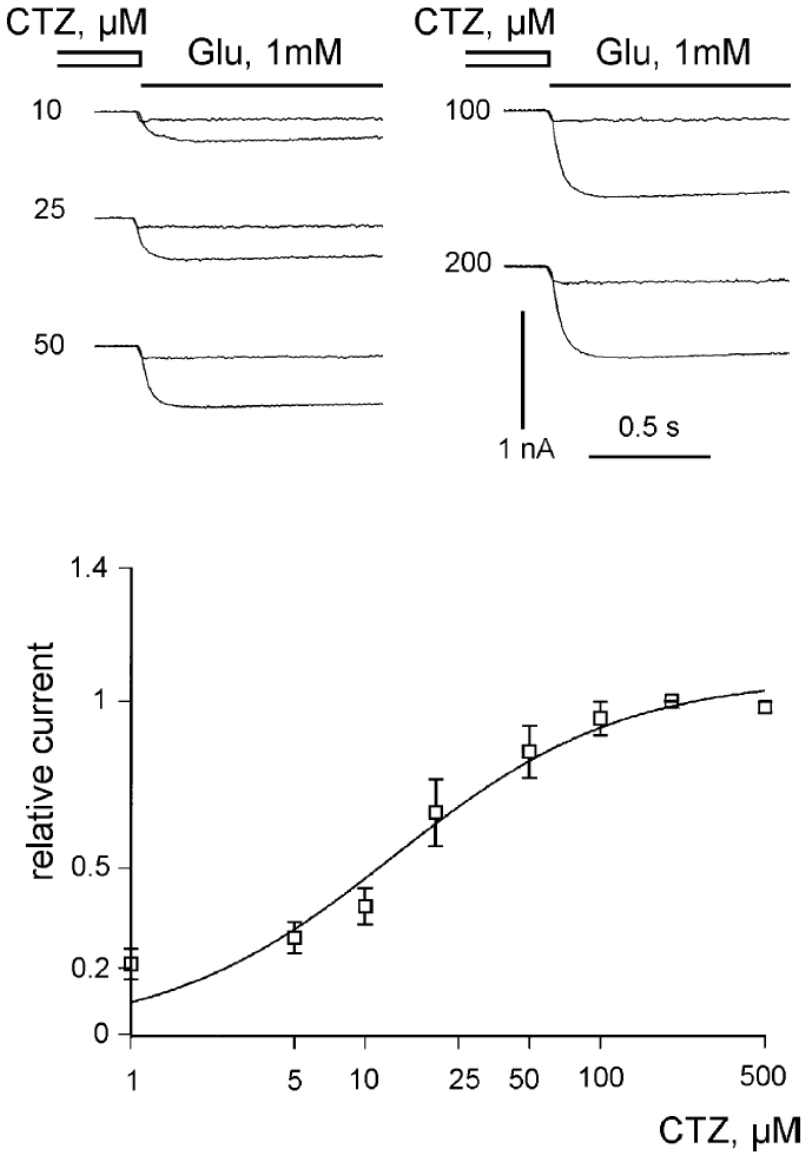


Abb. 21 Glutamatstrom - Modulation durch CTZ; der obere Teil der Abbildung zeigt aufgezeichnete Zellantworten auf Glutamat nach Zugabe von unterschiedlichen CTZ Konzentrationen, der untere Anteil zeigt die Dosis-Wirkungskurve der oberen Messungen.

4.9 Kainat Dosis-Wirkungskurve und Potenzierung durch CTZ

Die Kainat Dosis-Wirkungskurve wurde in der Kontrolle und nach der Vorbehandlung mit 200 µM Cyclothiazid erstellt. Auf die 20 Sekunden dauernde Vorbehandlung mit

Cyclothiazid folgte nach einer Verzögerung von 0.5 Sekunden eine Exposition mit Kainat für 2 Sekunden. Die Strom-Amplituden wurden im Verhältnis zum Maximalstrom, der durch Kainat in Anwesenheit von CTZ ausgelöst wurde, sowohl in Abwesenheit von Cyclothiazid und auch nach Vorbehandlung mit Cyclothiazid normalisiert. Nach der Applikation von 200 µM Cyclothiazid wurde die Dosis-Wirkungskurve für Kainat zu niedrigeren Konzentrationen hin verschoben. Die EC_{50} Werte für Kainat betrugen in Abwesenheit von Cyclothiazid 150 ± 30 µM und die Hill Konstante war bei 1.1 ± 0.19 (n=7). Nach erfolgter Vorbehandlung mit Cyclothiazid stiegen die EC_{50} Werte für Kainat auf 38 ± 2.7 µM an während die Hill Konstante unverändert bei 1.27 ± 0.2 (n=7) lag. Antworten auf Kainat, nach Vorbehandlung mit 200µM Cyclothiazid waren 2.1 ± 0.15 (n=9) größer als in der Kontrolle. Cyclothiazid zeigte positive Modulation am AMPA Rezeptor jedoch nicht am Kainat Rezeptor. Wir schlussfolgerten, dass Kainat und Glutamat die AMPA Rezeptoren in den TM Neuronen unter unseren Experimentbedingungen aktivierten.

4.10 Glutamat und Kainat aktivieren über AMPA Rezeptor vermittelte Ganz-Zell Ströme in TM Neuronen

Bei Antagonisierungsversuchen zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei der Hemmung der Glutamat Antwort durch NBQX (AMPA-Antagonist) (10µM) zwischen GluRD-positiven (44.8 ± 3.7%, n=8) und GluRD-negativen Zellen (55.4 ± 7%, n=7), (Wilcoxon, p=0.33). NBQX hemmte in Konzentrationen von 25 und 50µM die Spitzenantwort auf Glutamat bis auf 36 ± 3.6% (n=5) und bis auf 11.8 ± 6% (n=4), in beiden neuronalen Gruppen. Der NMDA- (N-methyl-D-aspartat) Rezeptor Antagonist, APV (5-amino phosphonovalerat, 50µM) zeigte unter unseren Versuchsbedingungen keinen Einfluss auf die Glutamatantwort (1µM) (n=6). In magnesiumfreier, Glycin (10µM) enthaltender Lösung, verringerte sich das Plateau der Stromamplitude jedoch bei gleicher APV Konzentration um 40 ± 2% in n=5.

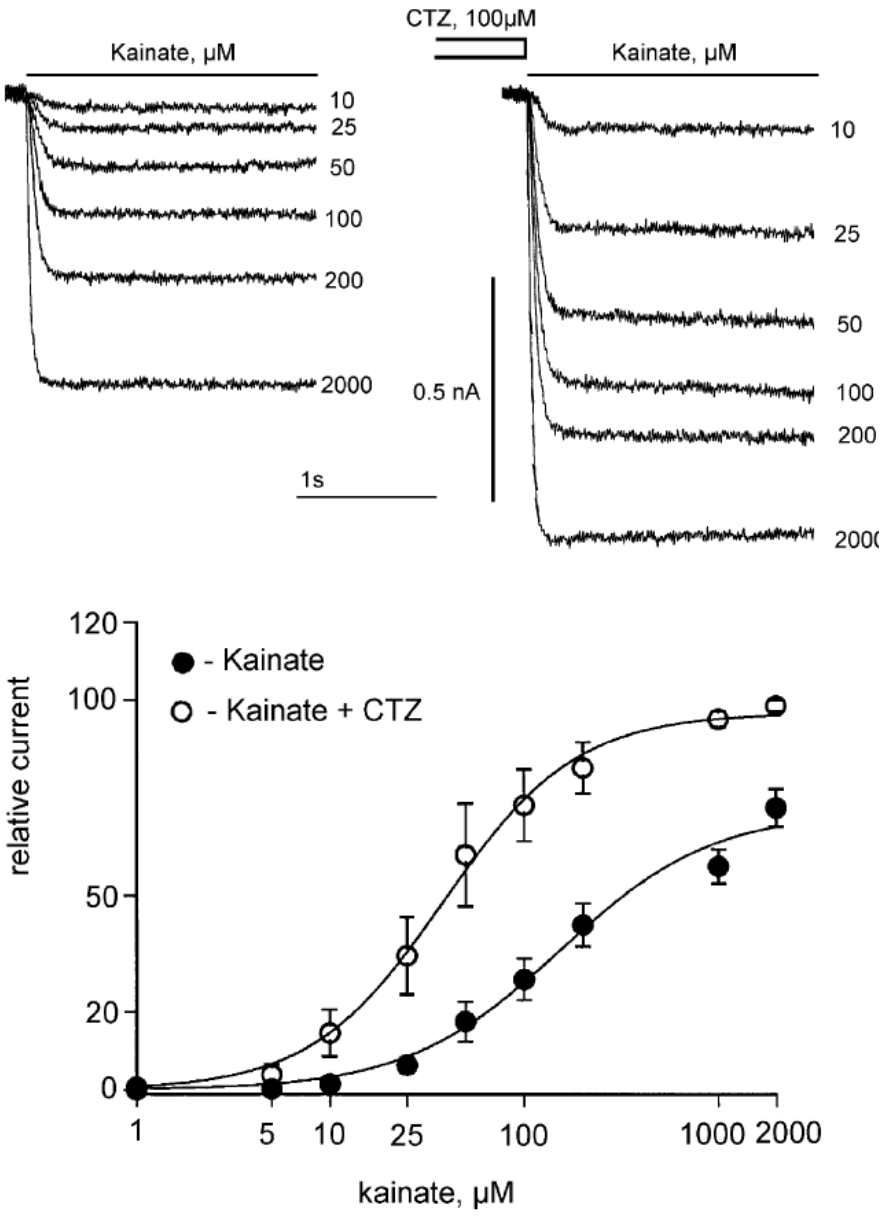


Abb. 22 Kainatsröme und Potenzierung durch CTZ; im oberen Teil der Abbildung aufgezeichnete Zellantworten auf Zugabe von Kainat, ohne und mit einer vorhergegangenen Behandlung mit CTZ; im unteren Bereich ein Vergleich der Dosis-Wirkungskurven der verschiedenen Messungen

Kainat (200µM) Antworten desensitisierten nicht in den TM Neuronen und sie wurden durch den spezifischen AMPA Rezeptor Antagonist SYM 2206 ((+/-) – 4 – (4-aminophenyl)-1,2-dihydro-1-methyl-2-propylcarbamoyl-6,7-methylenedioxyphthalazine, 100µM, n=3) komplett geblockt.

Wenn man Kainat (100µM) und Glutamat (1mM) gleichzeitig applizierte ergab sich keine Änderung der Potentialgröße, es kam zu keinem Zuwachs (n=4). Dies lässt schlussfolgern, dass beide Substanzen den gleichen Rezeptor stimulieren. Die Antworten werden sowohl von Glutamat als auch von Kainat vollständig über den AMPA Rezeptor vermittelt und nicht über den NMDA Rezeptor.

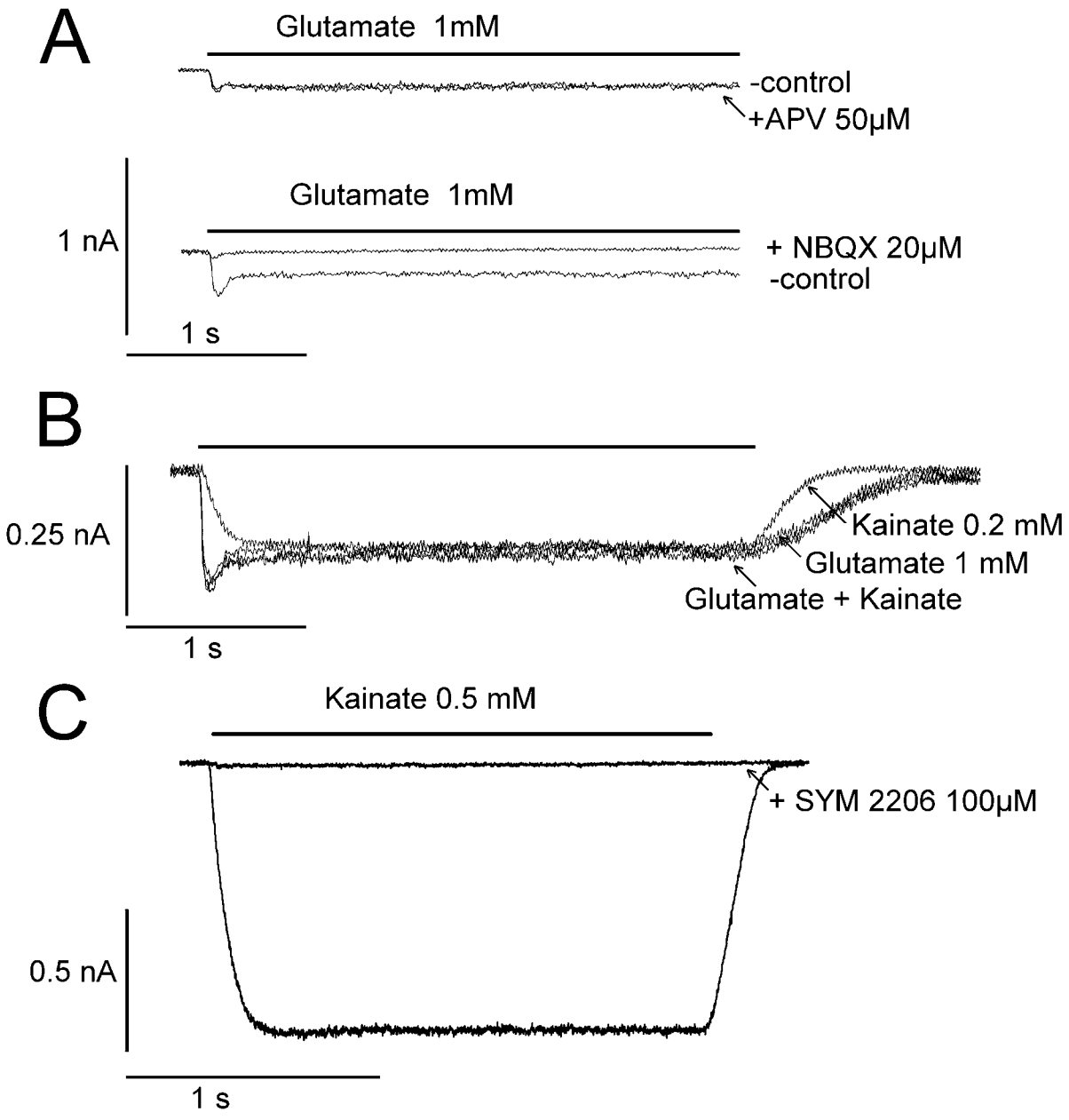


Abb. 23 pharmakologische Analyse der in TM Neuronen ausgelösten Potentiale durch Glutamat und Kainat und die unterschiedlichen modulierenden Effekte verschiedener Substanzen; A: NMDA Rezeptorantagonist APV bleibt ohne Effekt, AMPA Rezeptorantagonist NBQX zeigt einen deutlichen Effekt, indem er die Glutamatantwort verhindert; B: es zeigt sich kein addierender Effekt bei einer gemeinsamen Applikation von Kainat und Glutamat; C: der selektive AMPARezeptorantagonist SYM 2206 unterdrückt die Kainatantwort

4.11 Analyse der ADAR Expression

Sechsundfünfzig der 71 HDC positiven Neurone (Zellkörpergröße zwischen 16 und 35µm), welche wir aus dem Nucleus tuberomamillaris isoliert hatten, exprimierten die

GluRB Untereinheit. Wir testeten alle auf die Expression der flip/flop Splicevariante bei Untereinheit GluRD. Wie bereits gezeigt (s.o.), zeigte die GluRD flop Variante besondere elektrophysiologische Eigenschaften. Zellen mit positivem Ergebnis für diese Variante wurden bei dieser Untersuchung ausgeschlossen (n=4). Es blieben 52 Neurone, unter denen sich 47 fanden, die für eine oder mehrere ADAR Varianten positiv waren. Zur Analyse der einzelnen Subtypen verwendeten wir Einzelzell- RT-PCR und im Anschluss daran Restriktionsanalysen. Die am häufigsten auftretende Form war ADAR1 (89%), gefolgt von ADAR2 (81%) und schließlich ADAR3 in nur noch 49% der Neurone. Es kam hierbei dazu, dass die Subtypen spezifische Amplifikation für ADAR2, Produkte ergab, die sich in der Größe unterschieden. Es zeigte sich eine lange und eine kurze Splicevariante dieses Enzyms, dies wurde auch bereits früher von anderen Autoren beschrieben (Mittaz et al., 1997; Melcher et al., 1996). Es ergaben sich vier verschiedene Splicevarianten, als Ergebnis von zwei unterschiedlichen, voneinander unabhängigen Splicevorgängen, einmal in der Deaminase Domäne und die andere am 5´-Ende der kodierenden Sequenz. Bezeichnet wurden die Formen je mit S für short (kurz) und L für long (lang) sowie mit d für domain und c für coding. In der Mehrzahl der Zellen (15 von 25) fanden wir die Formen ADAR2Sd und ADAR2Ld gleichzeitig. In sechs Zellen zeigte sich nur ADAR2Sd, in drei von diesen in Kombination mit ADAR1 und in nur einer zusammen mit ADAR3. ADAR2Ld wurde alleine in vier Neuronen gefunden. Kohr et al (Kohr et al., 1998) zeigten in früheren Studien, dass die Subtypen spezifische Amplifikation eine höhere Rate an ADAR1 positiven Zellen als die Amplifikation mit degenerierten Primern lieferte. Wir benutzten in der ersten Amplifikationsrunde die selben Primer und verwendeten nur in der zweiten Runde einen zusätzlichen degenerierten Primer. Wir konnten durch semiquantitative Analyse bestätigen, dass im Vergleich zu ADAR3 für ADAR1 keine vorzuziehende Methode für die Amplifikation besteht (ADAR1 und ADAR3 spezifische Primer waren beide gleich divergent (3mismatch), während ADAR2 nur einen Mismatch mit ADAR1 und einen mit ADAR3 zeigte).

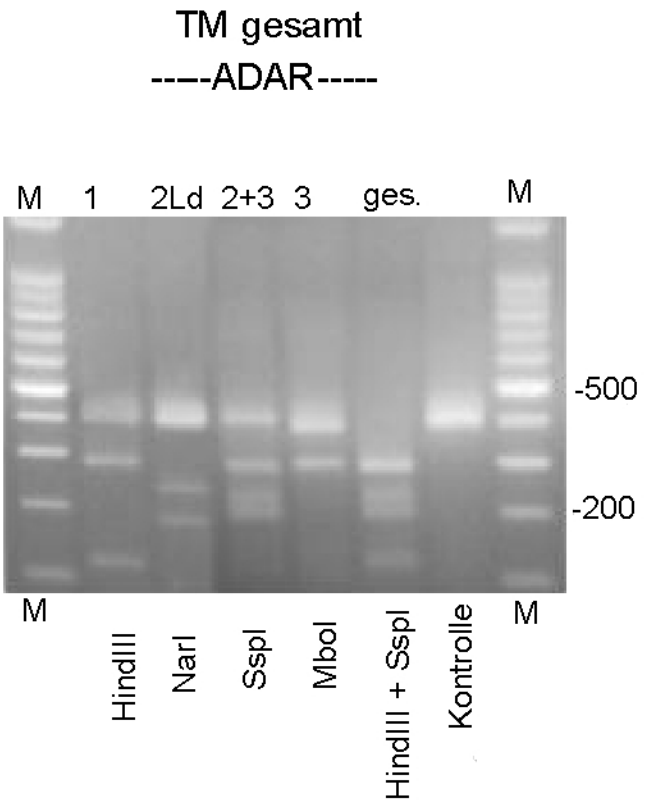


Abb. 24 exemplarische Darstellung einer ADAR Restriktionsanalyse am Beispiel von TM; oben angegeben: Ergebnis der Restriktionsanalyse bei den einzelnen Unterformen; M: Marker; unten angegeben die unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen

Wenn eine Mischung aus bekannter Menge von ADAR1 und ADAR3 cDNA amplifiziert wurde, mit dem neuen Primer „lo2“, entsprach die Menge der Produkte im Verhältnis, den Konzentrationen, die zu Beginn zugefügt wurden. Um den Beweis zu erbringen, dass die Abwesenheit von ADAR2 mRNA in den TM Neuronen, die zuvor ein negatives Ergebnis gezeigt hatten, nicht auf Ineffizienz, sondern durch den Neuronentyp bedingt war, (s.o. 81%positiv) überprüften wir Purkinje Neuronen mit der sc-RT-PCR, wie in einer Studie von Kohr et al. (Kohr et al., 1998). Wir isolierten 27 Zellen auf enzymatische Weise aus dem zerebellären Kortex, nach den TM Protokollen. Zwanzig dieser Zellen wiesen die GAD 67 (Glutamatdecarboxylase 67) auf, mit diesen arbeiteten wir weiter. All diese Zellen exprimierten, wie bereits bei Kohr nachgewiesen ADAR2. Nur drei Zellen zeigten nur ADAR2, neun Zellen zeigten ADAR1 und ADAR2 gleichzeitig und acht zeigten neben ADAR2 beide anderen Formen. In 19 Zellen wiesen wir ADAR2Sd und ADAR2Ld nach, nur eine Zelle zeigte alleine ADAR2Sd. In den Purkinjezellen war ADAR2 ubiquitär vorkommend, des Weiteren war aber auch das Auftreten von nur einer Isoform von ADAR2 selten in

diesen Zellen, was diese Zellen für eine Vergleichsanalyse von Koexpressionen mit GluR Editing ungeeignet machte. Im Gegensatz hierzu stellen die TM Neurone, mit ihrer Heterogenität eine perfekte Gruppe dar um einen Vergleich anzustellen:

Sie wiesen eine hohe Zell zu Zell Heterogenität der ADAR Expression auf, zeigten eine Koexpression von GluR und 5HT2cR in der Mehrzahl der Zellen, und zeigten bevorzugte oder ausschließliche Expression der dominanten flip Splicevariante des GluRB und die Expression alleine der flip Splicevariante der GluRD Einheit in allen untersuchten Neuronen.

4.12 GluR2 Q/R Editing versus ADAR2 Expression

Die Q/R Editingposition der untersuchten GluRB mRNA war in allen 33 Neuronen (100%) verändert. In dieser Zellgruppe fanden sich acht Zellen in denen ein Nachweis der ADAR2 mRNA fehlte, welches als Schlüsselenzym für die Editierung dieser Position angenommen wird (Melcher et al., 1996). In beiden unserer Analyseverfahren, Einzelzell- RT-PCR und Restriktionsanalyse zeigte sich das gleiche Ergebnis. Ein Nachweis von mRNA (ADAR2) gelang nicht, jedoch fand sich mRNA (ADAR1) in einer sehr hohen Konzentration. Es ist also möglich, dass ADAR1 ebenfalls diese Position unter gewissen Umständen editieren kann. Möglicherweise reicht schon das Vorhandensein des ADAR2 Subtypen in Konzentrationen aus, die unter der Nachweisgrenze liegen, um ein Editing durch ADAR1 möglich zu machen.

4.13 GluR2 R/G Editing korreliert mit der Expression von ADAR

Editing der GluRB R/G mRNA zeigte eine sehr große Variabilität in unseren untersuchten Neuronen. Als wir aber das Editing mit der Expression der ADAR Subtypen und Isoformen verglichen zeigte sich ein signifikanter Unterschied (ungepaarter Test, $p=0.037$), zwischen den Zellen die ADAR3 zeigten (Editing 75,8 ± 6,8%, n=8) und denen die kein ADAR3 aufwiesen (Editing 94,7 ± 3,9%, n=7), dies legte einen hemmenden Einfluss von ADAR3 auf den Vorgang des Editings nahe. Allerdings konnten wir keinen Nachweis erbringen ob es sich auch bei der Expression von ADAR1 und ADAR3 um eine Interaktion beim Editing handelt, denn

die Zellzahl (n=3) dieser Gruppe reichte zur statistischen Auswertung nicht aus. Neurone die beide Isoformen ADAR2 (lang) und (kurz) exprimierten hatten eine signifikant höhere Editingrate an der GluRB R/G Position (84,7 ± 4,6%, n=15) als Neurone die nur eine der beiden Formen (lang) (30,75 ± 8,75%, n=4, $p<0.0001$) oder (kurz) (58,8 ± 15,4%, n=6, $p=0.044$) aufwiesen. Der Unterschied zwischen der Editingrate bei Zellen die ADAR1 aufwiesen, denen ADAR2 aber fehlte (82 ± 6,6%, n=8) und Zellen die beide Formen exprimierten (84,7 ± 4,6, n=15) war nicht signifikant.

Wie kann die Präsenz von ADAR2(d) Isoformen die Editingrate erhöhen? Im Mausegehirn existieren die Formen ADAR1 und ADAR2 als Homodimere (Cho et al., 2003). Es ist aber nicht bekannt, ob die L and S Isoform dimerisieren. Ihre Expression mit gleichzeitigem Auftreten von maximalem Editing an der GluR R/G Position steht im Einklang mit einer solchen Möglichkeit. Unterschiedliche Expression von ADAR Isoformen und Subtypen reguliert möglicherweise in vivo das Editing.

4.14 Splicing innerhalb der coding Region von ADAR2

Zwei ADAR2 Isoformen der Ratte (Sc und Lc) beinhalten eine 47 Nukleotide lange Einfügung nach den ersten 28 Nukleotiden der kodierenden Region, sie treten nach Selbst-Editierung der ADAR2 prä-mRNA auf. Das eingefügte Fragment leitet einen Rahmenänderung ein, was zur Produktion eines Stumpf-Proteins führt (Rueter et al., 1999). Es wurde bereits früher gezeigt, dass Selbstediting linear mit der enzymatischen Aktivität von ADAR2 zusammenhängt. In malignen Gliomzellen in denen dieses Fragment fehlt, ist die GluR Q/R Position untereditiert (Maas et al., 2001). Ca. 60% der RNA im Gehirn der Ratte zeigt die 47 Nukleotid lange Einfügung. Das Verhältnis zwischen Glia und Neuronen bezüglich des Vorkommens dieser Einfügung ist unbekannt, denn alle bisherigen Untersuchungen fanden an Gesamtgewebe statt.

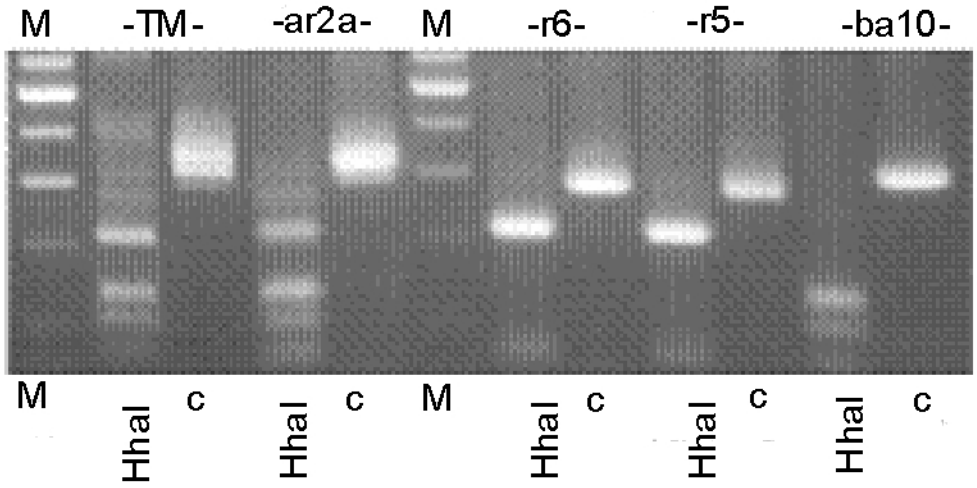


Abb. 25 Beispiel einer Restriktionsanalyse der verschiedenen ADAR2 Splicevarianten in verschiedenen Einzelzellen; M: Marker; TM: Positivkontrolle aus Gesamtgewebe; ar2a, r6, r5: Einzelzellen, unten: verwendetes Restriktionsenzym Hha I

Wir untersuchten ADAR2Sc und ADAR2Lc in einer separaten Auflistung der Neurone (n= 12), denn es wurde eine andere Amplifikationsstrategie nötig um diese Frage zu beantworten. In acht dieser Zellen wurden ADAR2 Amplimere entdeckt, wobei ADAR2Sc vorherrschte (n=3) oder alleine vorkam (n=5).

4.15 Editing an verschiedenen AMPAR mRNA Positionen und ADAR Expression

Wir analysierten das Editing an verschiedenen Positionen (-4, +3, +4) rund um die Q/R Stelle (Position 0). Im Gegensatz zu in früher durchgeführten Untersuchungen unter in vitro Bedingungen, konnten wir an den Stellen -4 und +3 in nativen TM Zellen nie ein Editing feststellen. Das Editing an Position +4 stellte sich variabel dar, jedoch nicht zusammenhängend mit einer Expression von ADAR1, welche Adenosin zu Inosin in in vitro Versuchen desaminierte (Maas et al., 1996).

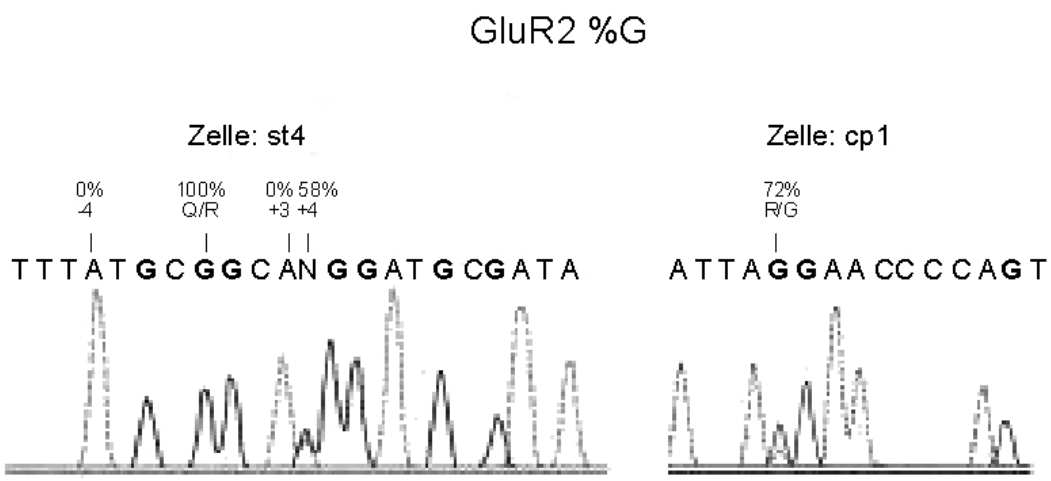


Abb. 26 Beispielhafter Auszug einer Sequenzierung der Editingpositionen verschiedener Einzellzellen an den Positionen R/G und Q/R des GluR2 Rezeptors, Angabe in % zugunsten der editierten Form

In ADAR1 positiven Zellen war Position +4 in 24,6 ± 5,45%, n=29 editiert, im Gegensatz zu ADAR1 negativen Zellen nur in 12,25 ± 5,78%, n=4; (t-test, p=0,42). Die R/G Position war in allen bis auf in drei Ratten zu 100% editiert. Es bestand eine Tendenz für eine Negativkorrelation zwischen dem Editing der GluRD R/G Position und der GluRB +4 Position (Pearson Korrelationskoeffizient -0.42, p=0,075). In der Gruppe der 100% editierten GluRD R/G Position war die +4 Position nur in 11,7 ± -3,2%, n=13 editiert im Gegensatz zu 39,3 ± 10,6%, n=6 in Neuronen in denen die Editingrate von GluRD unter 100% lag. Der Unterschied erwies sich als signifikant (t-test, p=0,0049). Die GluRB R/G Position war in 63,8 ± 8,6%, (n=13) und in 75,7 ± 7,14%, (n=6) editiert bei Neuronen mit kompletter und inkompletter Editierung der GluRD R/G Position, (t-test, p=0,4). So ergab sich kein Zusammenhang zwischen der Expression von ADAR und der Editierung der Positionen GluRD R/G und GluRB +4. Ebenso fand sich kein Zusammenhang zwischen der Editierung der GluRB und GluRD R/G Positionen. Das Editing von GluRD scheint individuell geregelt zu werden: denn in drei unserer Ratten ergab sich die R/G Position uneditiert, wobei sie in allen anderen Tieren komplett editiert war. Obwohl all diese Tiere das gleiche Alter hatten, muss es einen Grund geben für die Editierung dieser Stelle unabhängig von der Entwicklungskontrolle.

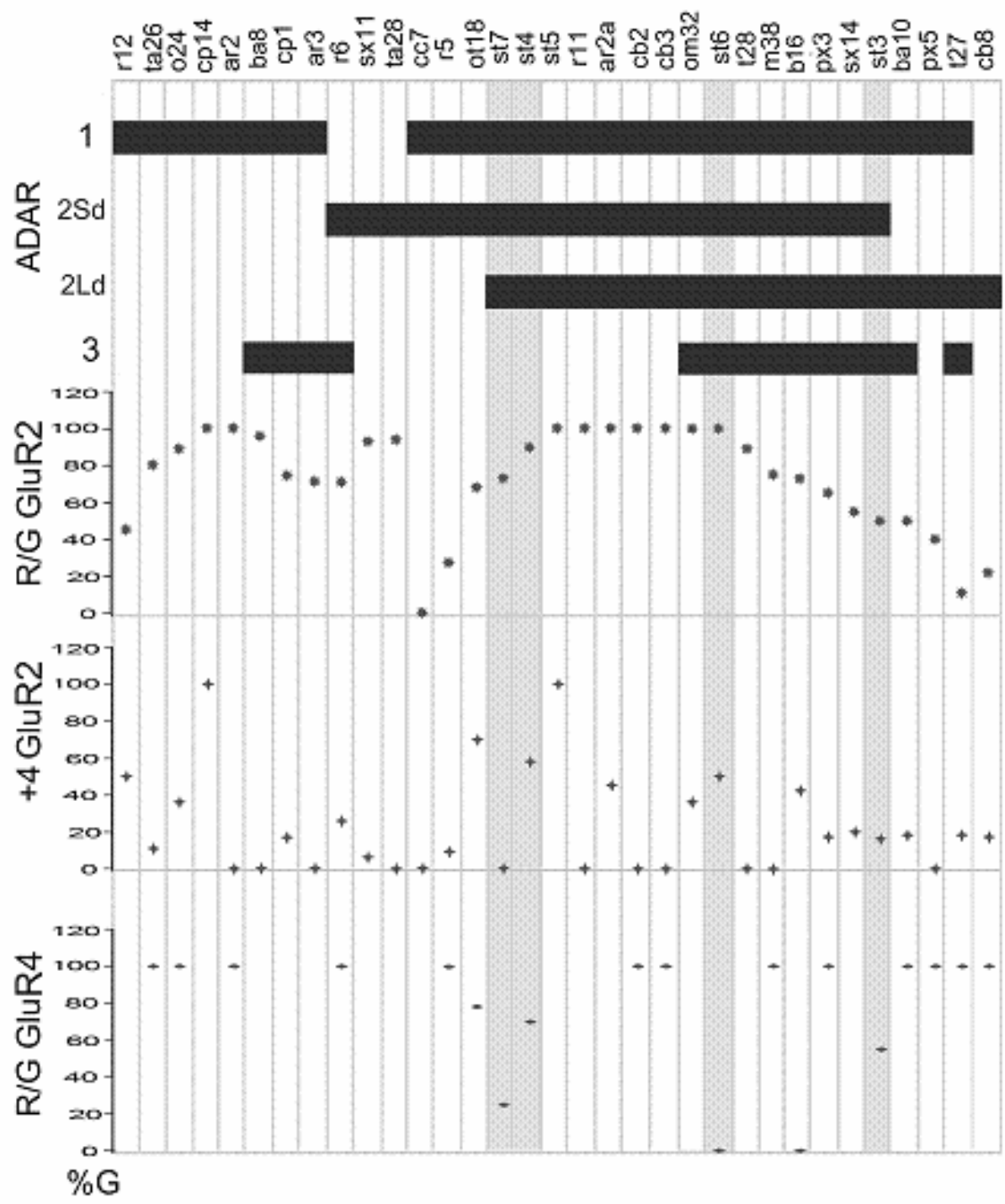


Abb. 27 Ergebnisse der Einzelzellanalyse in Gegenüberstellung der ADAR Expression und dem Editingstatus des AMPA Rezeptors; oben: Namen der Einzelzellen; seitlich: Editierungsposition der verschieden Glutamatrezeptoren sowie die ADAR Isoformen

4.16 Editing versus Eigenschaften der AMPA Rezeptoren

Es bleibt die Frage, steht das Editing in einer Beziehung zur Funktion des Proteins. Da es keine Antikörper gibt, die nur R oder G in der GluRB Untereinheit erkennen, nahmen wir das durch Glutamat ausgelöste Ganz-Zell Potential und das Ausmaß der Desensitisierung als Maß der Korrelation. Ein signifikanter Unterschied zwischen editierten und uneditierten Zellen wurde bereits früher nachgewiesen (Lomeli et al., 1994; Krampfl et al., 2002). Der Glutamat Ganz-Zell Strom (0.25-10mM) besteht aus einem raschen desensitisierenden Gipfel und einer Plateauphase. Diese Desensitisierung in Kombination mit der verspäteten Verteilung von Glutamat um die ganze Zelle führt zu einem Fehler in der Messung des Spitzenpotentials. Da die Austauschzeit der Lösung um eine runde Oberfläche proportional zum Radius ist (Pidoplichko, 1996), wählten wir für diese Untersuchung nur Neurone die optimal geklemmt waren (kein Leckstrom) und sich in Form und Größe ähnlich waren (23-25µm). Wir nahmen ähnliche Raum- und Spannungsprobleme für jede Zelle an. Das Peak/Plateau Verhältnis war bei maximaler Antwort (5mM Glutamat) signifikant unterschiedlich ($p=0.001$) zwischen beiden Gruppen: 1.73 ± 0.12 ($n=10$) in Neuronen in denen GluR R/G voll editiert war und 2.8 ± 0.22 ($n=9$) in Neuronen mit inkomplettem Editing. Schließlich korrelierte der Grad des Editings negativ mit dem Peak/Plateau Verhältnis (Pearson -0.68, $p=0.001$, $n=19$).

Im Gegensatz dazu korrelierte das Peak/Plateau nicht mit dem Verhältnis des Editings der GluRD R/G Position (Pearson Koeffizient 0,51 ; $p=0,2$). Neurone mit komplett editierter GluRD Position zeigten ein Peak/Plateau Verhältnis der Glutamat Antwort von $2,4 \pm 0,3$ ($n=4$) und in Neuronen mit einer Editingrate unter 100%, $2,2 \pm 0,3$ ($n=4$). Es zeigte sich zwischen diesen beiden Gruppen kein Unterschied (Wilcoxon, $p=1$). Verändert die GluRD Untereinheit die Funktionalität des AMAP Rezeptors? Es wurde bereits oben (Punkt 4.12) gezeigt, dass die Neurone, die die flop Variante exprimieren auch die schnellste Desensitisierungskonstante aufweisen. Folglich hat die Editierung der R/G Position keinen Einfluss auf die Eigenschaften der GluRD beinhaltenden nativen Rezeptoren: weder in Homomären Rezeptoren noch in Heteromären Rezeptorformen mit der Untereinheit GluRB denn dann ist diese Untereinheit dominant.

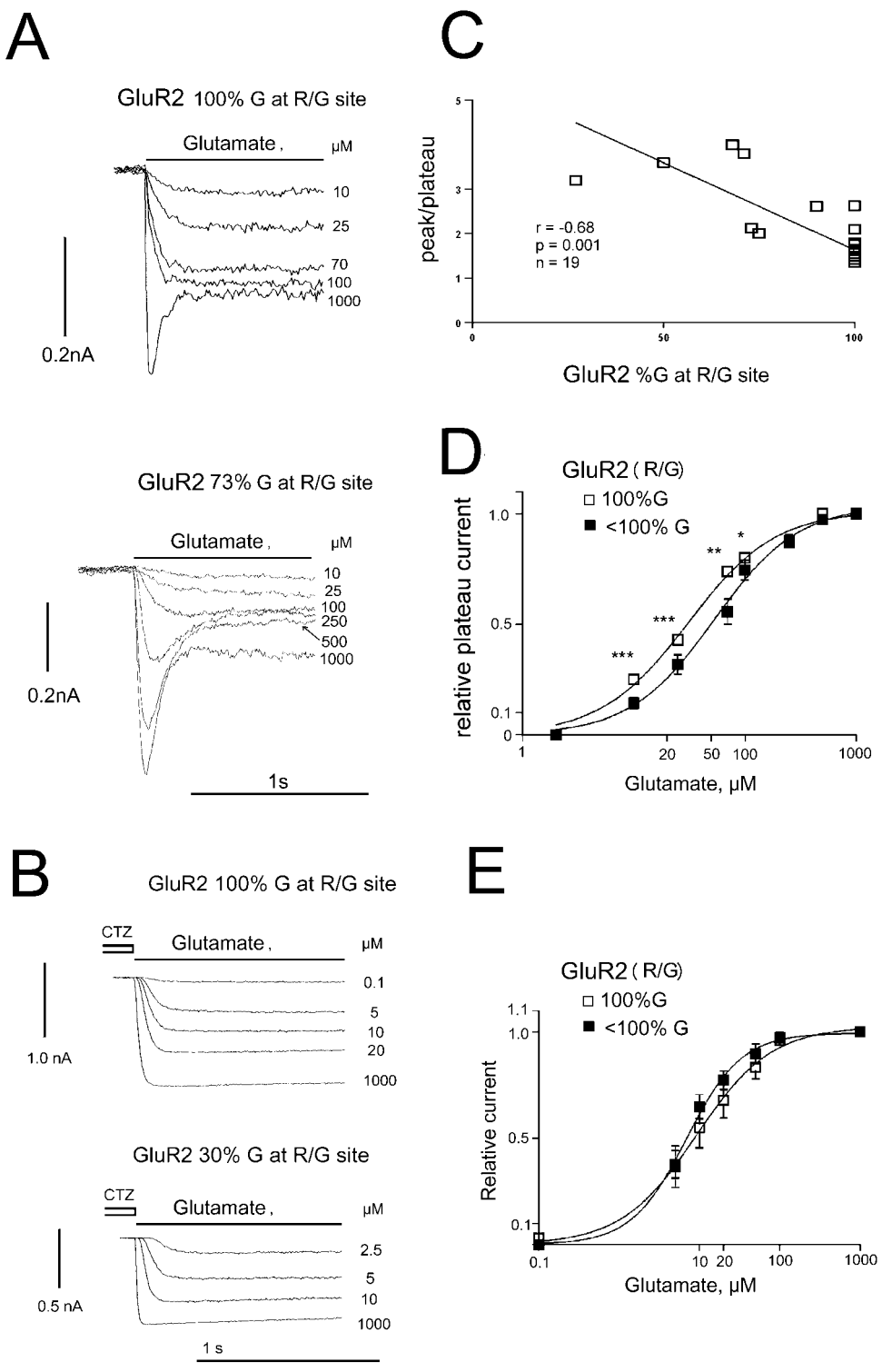


Abb. 28 elektrophysiologische Eigenschaften der AMPA-Rezeptoren in Abhängigkeit ihres Editingstatus
A: Vergleich der durch unterschiedliche Glutamatkonzentrationen ausgelöste Ströme bei voll editierter R/G Position und geringerer Ausprägung B: zeigt die gleiche Untersuchung wie A, jedoch wurde zuvor CTZ zugegeben (das die Desensitisierung der AMPAR blockiert). C: Verhältnis von Gipfel und Plateau gegen Ausmaß der Editierung. D, E: Dosis-Wirkungskurven für A,B.

Um korrekte Werte für die Glutamatspitzenantwort zu erhalten, applizierten wir zuvor CTZ (200µM), 20 Sekunden vor der Glutamatgabe (siehe oben). Die Dosis-

Wirkungskurve die wir für Glutamat erhielten war zwischen den voll editierten Neuronen an der GluRB R/G Position (9.14 ± 0.2µM, n=5) zu den uneditierten (6.9 ± 0.5µM, n=4) nicht unterschiedlich (p=0.27). Dies entsprach auch Ergebnissen die unter outside-out patch Technik an Oozyten durchgeführt wurde (Schlesinger et al., 2005).

Durch Glutamat ausgelöste Ströme zeigten in Abwesenheit von CTZ einen signifikanten Unterschied (p=0.0008) in ihrem EC_{50} zwischen den editierten Zellen (27.8 ± 8.9µM, n=9) und den untereditierten an der GluRB R/G Position (66 ± 12µM, n=8). Dies legt nahe, dass die Sensitivität gegenüber dem Agonisten der nicht-desensitisierenden GluRB Population abhängig von der Editierung der R/G Position ist.

4.17 Editing des Serotonin 2c Rezeptors

Die für den $Serotonin_{2C}$ Rezeptor kodierende mRNA fanden wir in 26 unserer auf ADAR Expression und AMPA Rezeptor Editing untersuchten Neurone (79%). Der 5-HT_{2C}R war immer an der A Position und in 88% der Fälle an der B Position editiert. An den Positionen E (31%), C (38%) und D (73%) kam es zu variablem Editing. Bezüglich der drei zuletzt genannten Positionen gab es nur eine Zelle die an allen Stellen editiert war, zwei Stellen in elf Zellen, eine Stelle in zwölf Zellen und keine auch nur in zwei Zellen. Dies zeigt dass die voll editierte Form 5-HT_{2C}R „VGV“ ebenso wie die uneditierte Form „INI“ in nur sehr wenigen TM Neuronen auftreten (1 Zelle von 26). Die „INI“ Isoform könnte in einigen Zellen vorhanden sein und zusätzlich zu den nicht vollständig editierten Formen in einer Minderheit mit auftreten. Frühere Studien hatte gezeigt, dass Serotonin Agonisten weniger potent waren an editierten Positionen verglichen mit uneditierten (Niswender et al., 1999; Berg et al., 2001). Die voll editierte Form „VGV“ ist gänzlich auf der Zelloberfläche exprimiert und ist internalisiert nach Bindung des Agonisten, während die nur teilweise editierte Form „VSV“ und die uneditierte Form „INI“ nur spärlich auf der Zelloberfläche zu finden sind, da sie proportional zu ihrer konstitutiven Aktivität internalisiert sind (Marion et al., 2004).

Wir fanden eine negative Korrelation zwischen dem Editing der Positionen C und D (Pearson Korrelations- Koeffizient -0,59, p=0,0032)in TM Neuronen. Es wird

vermutet, dass bei beiden dieser Stellen das Editing durch ADAR2 hervorgerufen wird; deshalb scheint es dass simultanes Editing in den gleichen Neuronen verhindert wird. Es fand sich kein anderer signifikanter Zusammenhang zwischen Paaren der fünf Editing Positionen. Keine einzige dieser Positionen zeigte eine Abhängigkeit von ADAR oder eine Korrelation mit dem Editing von GluRB. Die Expression von ADAR1und ADAR2 (lange und kurze Form) und das Fehlen von ADAR3, der Fall indem das Editing von GluRB am effektivsten war, trifft in unseren Untersuchungen mit dem niedrigsten Editing an allen fünf Stellen des 5-HT_{2C}Rezeptors in einem Neuron ar2a zusammen. (siehe Tabelle).

	ADAR			5-HT_{2C}R					GluR2			GluR4
Name	1	2	3	A	B	E	C	D	Q/R	Q/R+4	R/Ged	R/Ged
r12	+	-	-	100	100	6	0	10	100	50	45	-
ta26	+	-	-	83	85	0	67	28	100	11	80	100
o24	+	-	-	50	71	10	0	41	100	36	89	100
cp14	+	-	-	100	100	0	50	68	100	100	100	-
ba8	+	-	+	100	100	0	100	0	100	0	96	-
cp1	+	-	+	100	100	0	0	100	100	17	75	-
ar3	+	-	+	100	0	0	0	100	100	0	71	-
r6	-	+	+	100	95	0	0	50	100	26	71	100
ta28	-	+	-	78	77	0	17	69	100	0	94	-
cc7	+	+	-	100	0	0	0	100	100	0	0	-
r5	+	+	-	100	100	0	0	100	100	9	27	100
ot18	+	+	-	100	100	0	0	50	100	70	68	78
St4	+	+	-	100	100	100	0	0	100	58	90	70
St5	+	+	-	100	84	0	0	29	100	100	100	-
r11	+	+	-	83	100	0	0	100	100	0	100	-
ar2a	**+**	**+**	**-**	**6**	**16**	**0**	**10**	**12**	**100**	**45**	**100**	**-**
cb2	+	+	-	100	28	0	0	0	100	0	100	100
om32	+	+	+	100	100	63	0	41	100	36	100	-
St6	+	+	+	100	100	22	0	100	100	50	100	0
m38	+	+	+	89	89	7	100	0	100	0	75	100
b16	+	+	+	100	0	100	0	100	100	42	73	0
px3	+	+	+	100	100	0	0	0	100	17	65	100
Sx14	+	+	+	100	100	0	71	0	100	20	55	-
St3	+	+	+	100	100	0	27	100	100	16	50	55
ba10	+	+	+	67	68	45	68	80	100	18	50	100
px5	+	+	-	100	100	0	33	0	100	0	40	100

Abb. 29 Die Tabelle zeigt eine Gegenüberstellung des Editings der Serotonin- und AMPA-Rezeptoren im Vergleich zur ADAR Expression in Einzelzellen; erste Spalte: Namen der untersuchten Einzelzellen; von rechts nach links: Angabe der einzelnen Positionen mit Variabilität innerhalb der verschiedenen Rezeptoren/Enzyme

Position D war editiert in 50 ± 15% (n=7) der Neuronen denen die Expression von ADAR2 fehlte und in 49 ± 10% (n=19) die diese in nachweisbarer Menge exprimiert

(Mann-Whitney U-test, p=0,96). Das Editing der Position D korreliert negativ mit dem Editing der GluRD R/G Position (Pearson Korrelations- Koeffizient -0,6; p=0,027). In Neuronen, in denen das Editing zu 100% an der GluRD R/G Position vorlag, fand sich eine Editierung der D Position des 5-HT_{2C}R in 33 ± 13% (n=9, 7Ratten). In drei Ratten, in denen die R/G Stelle des GluRD uneditiert war (kleiner 100%), zeigte sich Editing an der 5-HT_{2C}R D Position in 70 ± 20% (n=5). Der Unterschied, der sich beim Editing der einzelnen Positionen zeigte, war signifikant (p=0,0006; Mann-Whitney U-test). Als wir eine negative Korrelation zwischen dem Editing der Stellen C und D in einer größeren Anzahl von Neuronen fanden, bewerteten wir nun das Ausmaß des Editings der Stelle C in den Neuronen mit uneditierter oder voll editierter GluRD R/G Position: es waren 5 ± 5% (n=5) und 30 ± 13% (n=9). Auf Grund des hohen Auftretens von 0% Editing an dieser Position in beiden Gruppen, war der Unterschied signifikant.

Wir konnten eine große Heterogenität des 5-HT_{2C}R Editings in individuellen Neuronen zeigen, sogar wenn sie vom gleichen Tier stammten. Das Ausmaß des Editings in den fünf verschiedenen Positionen für die ganze untersuchte Gruppe der Neuronen zeigte sehr ähnliche Ergebnisse zu denen die wir aus der Positivkontrolle erhielten, die ebenfalls den TM Nucleus enthielt. (90.6 ± 4.2% vs. 88 ± 1.2% in A; 77.4 ± 7% vs 84.5 ± 0.6% in B; 20.9 ± 6.5% vs 16.8 ± 5.9% in C; 13.6 ± 5.8% vs 4.3 ± 2.4% in E und 49.2 ± 8.1% vs 40 ± 8.2% in D). Es ergab A>B>D>C>E. Wir fanden eine negative Korrelation zwischen dem Ausmaß des Editings in den Positionen C und D innerhalb der individuellen Zellen, was einen unbekannten Mechanismus ahnen lässt der ein komplettes Editing des 5-HT_{2C}R verhindert. Indirekt, wurde die selbe negative Korrelation bei Studien von Gurevich (Gurevich et al., 2002a; Gurevich et al., 2002b) mit Tests an mRNA aus menschlichem präfrontalem Kortex gefunden.

5. Diskussion

5.1 Serotonin, NCX und NCKX

Wir haben hypothalamische, histaminerge Neurone auf ihr Expressionsmuster für einzelne Na^+/Ca^{2+} Austauscher Subtypen und Isoformen in einzelnen isolierten Neuronen untersucht und dies mit der Expression von Serotonin Rezeptoren verglichen. NCX1 mRNA konnte in allen Neuronen gefunden werden, welche den 5-HT_{2C} Rezeptor exprimierten, manchmal auch in Kombination mit anderen Subtypen des Austauscherkanals. Ebenfalls sehr häufig fanden sich die Formen NCX2 (70%) und NCKX3 (71%) in den untersuchten TM Neuronen. Allerdings konnte hier im Expressionsmuster kein Zusammenhang zur Expression des Serotoninrezeptors$_{2c}$ gefunden werden. In einigen Zellen die diesen exprimierten, fehlten die Austauschkanäle, oder sie traten in Zellen auf die keinen Nachweis des Serotoninrezeptors erbrachten. Bereits früher zeigte sich an in situ Hybridisierungsstudien (Wright et al., 1995; Gundlah et al., 1999) ein starkes mRNA Signal in dieser hypothalamischen Region für den 5-HT_{2C} Rezeptor relativ zum 5-HT_{1A} Rezeptor und zum 5-HT_{2A} Rezeptor. Die vorherrschende Expression des 5-HT_{2C} Rezeptor gegenüber dem 5-HT_{2A} Rezeptor stimmt auch überein mit unseren früheren pharmakologischen Studien über die Serotonin vermittelten Effekte in den TM Neuronen (Eriksson et al., 2001). Wir fanden keinen Zusammenhang zwischen der Expression der Serotoninrezeptoren$_{2c}$ und dem Kalium abhängigen Natrium - Kalzium Austauscher, übereinstimmend zu unseren Ergebnissen, bei Versuchen den Serotonin Effekt zu modulieren indem wir die extrazelluläre Kalium Konzentration änderten (Eriksson et al., 2001).

Die NCX 1 spezifischen Antikörper färbten histaminerge Neurone, die genaue Lokalisation dieses Proteins ist jedoch noch unklar. Frühere immunzytochemische Untersuchungen zeigten eine sehr hohe Konzentration des NCX Proteins in präsynaptischen Nervenendigungen, in den Nervenfortsätzen und im Wachstumskegel im Vergleich zu anderen Regionen der Zellen (Blaustein and Lederer, 1999). Auf dem Zellkörper scheint es so, als ob des NCX Protein in einem Muster verteilt ist, das dem des darunter liegenden Retikulums entspricht (Canitano et al., 2002). In Hippocampuskulturen fand man in Neuronen, zellspezifisch, NCX1

und NCX3 Proteine, mit sehr geringer Kolokalisation, während NCX2 in verschiedenen Formen von Gliazellen auftrat (Thurneysen et al., 2002). In den Kernen von Thalamus und Hypothalamus konnte RNA und Protein aller drei Subtypen gefunden werden, sie traten in den Zellkörpern der Neurone und/oder in ihren Fortsätzen auf (Canitano et al., 2002), dies steht in Übereinstimmung mit unseren in der sc-RT-PCR gefundenen Ergebnissen, die eine Koexpression der einzelnen Subtypen in individuellen Neuronen zeigte. Die Unterschiede die in den Ergebnissen aufgetreten sind, sind wahrscheinlich zurückzuführen auf die unterschiedlichen untersuchten Hirnregionen und die verschiedenen verwendeten Methoden.

Die Expression von NCX1 Subtypen ist gewebespezifisch und einige Gewebe zeigen eine Expression von vielen verschiedenen Splicingvarianten dieses Austauschers (Kofuji et al., 1992; Kofuji et al., 1993; Nakasaki et al., 1993; Quednau et al., 1997). Die NCX1 Splicevarianten sind das Ergebnis Gewebe-spezifischer RNA-Prozessierung, es entstehen verschiedene Kombination aus einigen der sechs Exone (Kofuji et al., 1994). Das unterschiedliche Auftreten verschiedener Isoformen in nur einer Gewebeart wurde zuvor noch nicht untersucht. Wir konnten mit der Zuhilfenahme von Sequenzierung und Restriktionsanalyse unserer PCR Produkte fünf Isoformen des NCX1 nachweisen.

In der Mehrzahl der Zellen (63%) wurde nur eine einzige Isoform gefunden; in 35% waren es zwei und in 2% wurden drei Isoformen des NCX1 Austauschers nebeneinander exprimiert. Die Exone A und B wurden in 5 Neuronen gleichzeitig gefunden. Die Mehrheit der Neurone enthielt eine Exon A beinhaltende Isoform des NCX1; bisher wurde angenommen, dass Exon B nur in nicht erregbaren Zellen vertreten sei (He et al., 1998; Schulze et al., 2002), es wurde nun aber auch gelegentlich in Neuronen gefunden. Exon A und Exon B beinhaltende Isoformen werden unterschiedlich moduliert durch Protein Kinase A (PKA) und Kalzium und haben unterschiedliche elektrophysiologische Eigenschaften, im Bezug auf ihre Spannungsabhängigkeit (Schulze et al., 2002).

Quantitative Untersuchungen der NCX1 Isoformen in Zellkulturen zeigten dass Astrozyten bevorzugt Exon B beinhaltende Isoformen exprimieren, während Neuronen die Exon A beinhaltenden Formen enthalten (He et al., 1998). Diese Studie zeigt, dass die PKA die neuronale Na^+/Ca^{2+} Austauscher Isoform AD aktiviert jedoch hat sie keinen Effekt auf die in den Astrozyten enthaltene Isoform BD. Auf

Grund von Analysen der geweblichen Verteilung von NCX1 Splicevarianten wurde vermutet, dass Exon A beinhaltende Isoformen in Zellen welche regelmäßige große Änderungen ihres Membranpotentials erfahren, so wie es in Herzzellen und in Neuronen der Fall ist, und dass Zellen die keine großen Änderungen in ihrem Membranpotential erfahren, die Exon B enthaltenen Isoformen exprimieren (He et al., 1998). Wir haben nun auch bestätigt, dass die Isoformen, welche Exon A beinhalten auch vorherrschend in den Neuronen der untersuchten Gehirnregion vorkommen. Jedoch konnten wir auch demonstrieren, dass es eine Minderheit von Neuronen gibt, die nur Exon B Isoformen, oder Exon A und Exon B beinhaltende Isoformen nebeneinander aufweisen. Die physiologische Bedeutung dieses Phänomens ist derzeit jedoch noch ungeklärt. Man kann vielleicht darüber spekulieren, ob es sich hierbei um verschiedene Entwicklungsstadien handelt, welche die Neuronen durchlaufen, im Vergleich zur Hauptgruppe der Neuronen (Exon A), möglicherweise sind sie aber auch unreif oder sogar apoptotisch.

Die Aktivität der NCX wird über die Proteinkinase C vermittelte Phosphorylierung gesteigert (Iwamoto et al., 1996). Proteinkinase A hemmt die NCX Aktivität in hippokampalen Neuronen und die Kalziumaffinität von NCX steigt 10-fach über einen Mechanismus der die Phospholipase C einbezieht (Hilgemann and Ball, 1996; Berberian et al., 1998), es scheint aber so, dass diese Modulation nur typisch für die Exon A beinhaltenden Isoformen der NCX 1 Isoformen ist (He et al., 1998).

Auf welchem Weg kann nun Serotonin eine neuronale Depolarisation auslösen? Es handelt sich bei dem hier untersuchten Serotoninrezeptor um eine Variante mit Koppelung an einen second messanger Mechanismus. Der $Serotonin_{2C}$ Rezeptor ist ein Phospholipase C gekoppelter Rezeptor (Berg et al., 1998). Die Aktivierung eines Phospholipase C gekoppelten Rezeptors kann nun den NCX Austauscher aktivieren (durch Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration) und führt so zu einer neuronalen Depolarisation. Es wird auch angenommen, dass auf diesem Weg eine Depolarisation von Neuronen in der basolateralen Amygdala und im ventromedialen Hypothalamus durch den metabotropen Glutamat Rezeptor induziert wird. Histamin löst über eine Aktivierung von Na^+/Ca^{2+} Austauschern eine Depolarisation in Neuronen des Nucleus supraopticus aus, als Folge eines Kalziumeinstroms (Smith and Armstrong, 1996; Keele et al., 1997; Lee and Boden, 1997).

Auf der Basis von sc-RT-PCR Daten in Verbindung mit Immunhistochemie schließen wir, dass NCX1 der am ehesten mögliche Mechanismus für die Serotonin vermittelte Erregung der histaminergen Neuronen ist, denn in allen Zellen, die den Rezeptor zeigten, konnten wir für dieses Protein kodierende mRNA nachweisen. Eine genaue Zuordnung der anderen gefundenen sehr unterschiedlichen Expressionsmuster lässt noch auf keinen spezifischen Zusammenhang schließen. Die verschiedene Expression von NCX/NCKX Subtypen und Isoformen in den einzelnen Zellen deutet auf Unterschiede in der Regulation der Kalzium Homöostase in einzelnen Zellregionen sowie auf Unterschiede von Zelle zu Zelle hin.

5.2 AMPA und NCX/NCKX

Durch unsere Einzelzellanalyse zeigten wir eine große Heterogenität der AMPA Rezeptor Expression und ihre unterschiedlichen Funktionen in histaminergen Neuronen. Zellen die nur die flip Splicevariante der GluRD Untereinheit exprimierten, zeigten eine langsame, die Zellen mit der flop Variante oder mit beiden, zeigten eine schnelle Desensitisierung auf Glutamat. Bereits früher konnte gezeigt werden, dass Interneurone im Neocortex und im Hippocampus schnelle Desensitisierung der Glutamat Antwort zeigten und die GluRD flop Splicevariante exprimierten (Geiger et al., 1995), hingegen zeigten Hauptneurone, denen die GluRD flop Variante fehlt, eine langsame Desensitisierungsantwort. Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen, in denen Interneurone Kalzium durchlässige AMPA Rezeptoren besitzen, zeigten nun alle untersuchten Neurone der aktuellen Studie AMPA Rezeptoren mit einer Kalzium Undurchlässigkeit. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit unseren anderen Ergebnissen, denn diese Zellen wiesen stets die GluRB Variante auf und wir fanden eine vollständige Editierung an der Q/R Position (Jonas et al., 1994). Eine hohe Wirksamkeit des Editings an dieser Stelle wurde bereits erwartet, denn TM Neuronen konnten selektiv durch spezifische Antikörper gegen Adenosindeaminase (Staines et al., 1987) angefärbt werden, und zeigten eine der höchsten Expressionen dieses prä-mRNA Editingenzyms im Gehirn. GluRC und GluRD Untereinheiten in ihrer flop Variante verleihen den heterogen exprimierten Rezeptoren die schnellste Desensitisierungskinetik (Lomeli et al., 1994). In nativen Zellen scheint das Verhältnis der Expression von GluRB-flip zu GluRD-flop Untereinheiten die

Desensitisierungseigenschaften zu bestimmen, während Untereinheit GluRC unbedeutend scheint (Geiger et al., 1995). Wir konnten Untereinheit GluRC in den TM Neuronen nicht nachweisen (entspricht einer Expression unter der Nachweisgrenze oder dem kompletten Fehlen), dies stimmt mit früheren Studien überein, in denen sich zeigte, dass deutlich weniger mRNA dieser Untereinheit zu finden war, als der Varianten GluRA und GluRB im Hauptanteil der untersuchten Neurone (Geiger et al., 1995).

Wir benutzten die Einzelzell- RT-PCR und fanden dabei NCX1, NCX2, NCX3 und NCKX2 und NCKX3 in TM Neuronen exprimiert. Bis zu drei verschiedene NCX Subtypen wurden in den untersuchten TM Neuronen exprimiert, sie standen aber in keiner koordinierten Koexpression zur Expression der GluR Untereinheiten. Ihre Expression korrelierte außerdem nicht mit der Kinetik der elektrophysiologisch ermittelten Glutamatantworten. Wie bereits früher gezeigt wurde, zeigten die NCX1 Splicevarianten, welche sich gegenseitig ausschließende Exone (A und B) enthalten, unterschiedliche funktionelle Eigenschaften (Schulze et al., 2002). Wir analysierten das Vorkommen der Exon B enthaltenen Splicevariante von NCX1. In Neuronen mit schneller und langsamer Desensitisierung der Glutamatantwort zeigte in der Expression keinen Unterschied. Auf der anderen Seite, zeigt die Familie der Kalium abhängigen Austauscher ein unterschiedliches Vorkommen in beiden Untergruppen der TM Neuronen. NCKX2 mRNA trat nur in Neuronen mit schneller Desensitisierung der Glutamatantwort auf, während NCKX3 in beiden Neuronengruppen exprimiert wurde.

Die funktionelle Bedeutung der unterschiedlichen Desensitisierungskinetik der AMPA Rezeptoren in verschiedenen histaminergen Neuronen ist unbekannt. Eine Möglichkeit ist, dass die Minderheit der TM Neuronen, welche kontralaterale Projektionen zum Beispiel in die Area präoptica und in den Kortex sendet, ihre Aktivität mit der Mehrheit der Zellen, welche ihre Projektionen ipsilateral haben (Inagaki et al., 1990), koordinieren muss und dafür eine schnellere Antwort auf die exzitatorischen ankommenden Signale benötigt. Liganden gesteuerte Histaminrezeptoren können in Wirbeltieren vorkommen (Diewald et al., 1997; Hatton and Yang, 2001) und solche Verbindungen würden mit schnelleren Signalen arbeiten als die Mehrzahl der Zellen, die sonstige Verhaltensweisen regulieren. Entsprechend der AMPA Rezeptor Untereinheiten Genexpression wird die Desensitisierung und Deaktivierungskinetik von Rezeptor vermittelten Strömen bestimmt und damit die

Anstiegs- und Abfallzeiten der EPSPs (Jonas and Spruston, 1994; Geiger et al., 1995).

Es wurde auch bereits gezeigt, dass NCKX2 der Hauptmechanismus der Kalziumclearance in neurohypophysialen Axonen der supraoptischen Neurone ist (Lee et al., 2002). Diese Autoren vermuteten dass hochfrequente Natriumspikes den Natriumgradienten verringern könnten, deshalb spielen Austauscher eine wichtige Rolle beim Abbau des Kalium Gradienten. Ihre in situ Hybridisierung zeigten eine Region, abhängig von der unterschiedlichen Verteilung von NCKX2 und NCKX3. Der Nucleus supraopticus und der Nucleus paraventricularis, welche Projektionen zur Neurohypophyse unterhalten, zeigten kaum NCKX3, aber in hohem Maße NCKX2. NCKX3 mRNA zeigte sich reichlich im Thalamus.

Die Immunhistochemie zeigte keine spezifische Lokalisation der NCKX2 positiven Zellen in den TM Neuronen. Sie stellten 33% der gesamten HDC positiven Zellen dar und waren diffus in allen Teilen des TM Nucleus verteilt. In ähnlicher Weise zeigte sich bei retrograder Verfolgung der Axone der HDC positiven Neuronen keine Korrelation im Hinblick auf die Lokalisation der Zellen und ihrer Efferenzen (Inagaki et al., 1990). Weil AMPA Rezeptoren in den TM Neuronen Kalzium undurchlässig sind, können sie keinen direkten Anstieg des intrazellulären Kalziums hervorrufen, aber möglicherweise induzieren sie ihn über Spannungsabhängige Kalziumkanäle (Takeshita et al., 1998), der Anstieg von intrazellulärem Natrium, bewirkt Depolarisation und / oder Aktivierung des Natrium-Kalzium Austauschers im Umkehrmodus (Hoyt et al., 1998).

Wir schlossen daraus, dass die unterschiedlichen Typen des Kaliumabhängigen Natrium-Kalzium Austauschers, welche wir in den TM Neuronen gefunden haben zusammen mit unterschiedlichen Desensitisierungseigenschaften der Glutamatrezeptoren, möglicherweise entweder ein Zusammenspiel zwischen AMPA Rezeptoren und NCKX Austauschern oder einen unterschiedlichen Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase in Neuronen mit schneller und langsamer Glutamat Antwort, widerspiegeln.

5.3 Editing AMPA und Serotonin

Neuronen des Nucleus Tuberomamillaris werden durch Glutamat über AMPA Rezeptoren und durch Serotonin über 5-HT_{2C}Rezeptoren erregt. Beide Rezeptorarten sind Angriffspunkte für Editing. Zum ersten Mal haben wir das Ausmaß von Editing dieser Rezeptoren ermittelt und das gleichzeitige Auftreten des Editing Enzyms ADAR in den selben Zellen in Kombination mit Ganz-Zell Aufzeichnung untersucht. Wir haben geschlussfolgert:

1. Sensitivität für Glutamat und Desensitisierung der AMPA Rezeptoren korrelieren mit dem Editing an der R/G Position der GluRB mRNA in TM Neuronen
2. Editing der GluRB R/G Position, in physiologisch signifikantem Ausmaß, korreliert mit der Expression von ADAR
3. Editing an anderen Positionen der AMPA Rezeptoren als auch bei 5-HT_{2C}Rezeptoren ist nicht von der ADAR Expression abhängig
4. Editing der Positionen GluRD R/G und D in 5-HT_{2C}Rezeptoren korreliert negativ miteinander. Überdies, wurde die GluRD R/G Position uneditiert nur in einer sehr kleinen Subgruppe von Ratten gefunden, in welcher jedoch die D Position des 5-HT_{2C}Rezeptors im Vergleich zu den anderen Tieren zu einem 2 mal höheren Anteil editiert war.

Frühere Studien haben gezeigt, dass ADAR2Sd und ADAR2Ld Isoformen sich in ihrer katalytischen Aktivität bei Menschen, jedoch nicht in Nagetieren unterscheiden (Lai et al., 1997; Rueter et al., 1999; Mittaz et al., 1997): die menschliche kurze Form ist im Editing der Positionen GluRB Q/R und R/G effektiver (Gerber et al., 1997). Die physiologische Aufgabe der einzelnen Splicevarianten ist noch nicht ganz klar.

Was bedeutet die Korrelation des Editings zwischen den Positionen GluRD R/G und der Position D im 5-HT_{2C}Rezeptor? Kann das Editing beider Positionen durch den gleichen Mechanismus reguliert werden, oder ist es nur ein Zufall? Aktivierung des 5-HT_{2C}Rezeptors und der AMPA Rezeptoren verursachen beide wichtige exzitatorische Inputs in den TM Neuronen. Serotonin wirkt über einen Natrium-Kalzium Austauscher (Eriksson et al., 2001; siehe oben) welcher wiederum mit AMPA Rezeptoren koexprimiert wird (siehe oben). Für eine koordinierte Funktion dieses Rezeptors kann es viele Gründe geben. Chronische Behandlung von Ratten mit Antidepressiva, die primär den Serotoninrezeptor$_{2C}$ betrafen beeinflusste

schließlich auch die Expression von GluRD und seine RNA Editierung (Barbon et al., 2006) im Kortex und im Hippocampus, im Einklang mit unseren Daten zeigt dies eine enge Verbindung in regulierenden Prozessen AMPA und 5-HT_{2C}Rezeptoren betreffend.

Auf Einzelzellebene haben wir eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit für komplett editierte als auch für uneditierte Formen des 5-HT_{2C}Rezeptors gefunden. Wir beschrieben eine negative Korrelation zwischen dem Editing der Positionen C und D, welche dafür verantwortlich sind, dass der 5-HT_{2C}Rezeptor voll editiert ist um eine geringere Antwortstärke auf Agonisten zu haben. In den TM Neuronen entstehen verschiedene Formen der teilweise editierten Transkripte. Die Arbeit von Marion et al., (Marion et al., 2004) zeigte dass nur teilweise editierte oder uneditierte Isoformen des 5-HT_{2C}Rezeptors, welche konstitutiv (ohne Ligandenbindung) aktiv sind und spontan internalisiert werden, einen hoch flexiblen Pool mit hoher Sensitivität gegenüber Agonisten darstellen. Wir fanden heraus, dass unterschiedliche Neurone vorzugsweise entweder die C Position oder die D Position editierte Isoform exprimieren. Die spezifische physiologische Funktion der unterschiedlich teilweise editierten Isoformen ist unklar. Jedoch ist Therapie in der Lage die durch Serotonin ausgelöste Übertragung durch Änderung des Verhältnisses von verschiedenen Isoformen zu modifizieren (Gurevich et al., 2002; Gurevich et al., 2002), dies legt nahe dass sich einige Isoformen für dichte andere für weniger dichte Innervation eignen.

In einer früheren Studie durchgeführt an transfizierten Zellen (Lomeli et al., 1994), zeigte dass eine Editierung an der R/G Position in der Lage ist die Deaktivierungskinetik der AMPA Rezeptoren zu beeinflussen. Jedoch zeigt wiederum eine spätere Studie, durchgeführt an outside-out patches entnommen von nativen Neuronen (Angulo et al., 1997; Geiger et al., 1995),dass diese Ergebnisse nicht direkt bestätigt werden konnten. Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede könnte in der von Zelle zu Zelle unterschiedlichen Expression der AMPA Rezeptoren liegen, wo unterschiedliche Untereinheiten oder das Verhältnis der flip/flop Splicevarianten die durch das Editing bedingten Merkmale verdecken. Wir haben nun Zellen untersucht mit ähnlichen Expressionsmerkmalen für AMPA Rezeptoren: die flip Variante ist die Hauptisoform des GluRA, GluRB und des GluRD (siehe oben). Wir haben in unserer Studie Ganz-Zell Ableitung versus outside-out patch Aufzeichnung einer zuvor erwähnten Studie verglichen, was auch die

unterschiedlichen Ergebnisse erklären kann. Wir haben den Grad der Desensitisierung der Ganz-Zell Glutamat Antwort als ein Korrelat für die GluRB R/G Editierung genommen; wohingegen ein kleines Fragment der Membran (outside-out) möglicherweise nicht das gleiche Verhältnis an editierten und uneditierten Rezeptoren aufweist. Unsere Ergebnisse zeigen bezüglich der Korrelation der Editierung an der GluRB R/G Position mit dem Ausmaß der Desensitisierung der durch Glutamat ausgelösten Antwort (Peak/Plateau ratio) eine Übereinstimmung. Dies steht auch in Einklang mit früheren Ergebnissen (Lomeli et al., 1994), über GluRA-flip/GluRB-flip Varianten in Oozyten exprimierten Heteromären. Im Vergleich zu diesen Untersuchungen zeigen sich in TM Neuronen die flip Isoformen vermehrt gegenüber den flop Isoformen (siehe oben). In dieser Untersuchung war das Peak/Plateau Verhältnis 1.6 mal kleiner in der Zellgruppe mit einer 100%igen Editierung der GluRB Untereinheit als in der Gruppe mit inkompletter Editierung an dieser Position, hingegen war in den Oozyten das Verhältnis 1.9 mal kleiner in editierten als in uneditierten. Das Ausmaß der Editierung an der GluRB R/G Position zeigte eine signifikante negative Korrelation mit dem Peak/Plateau Verhältnis, was nahe legt dass das Ausmaß der funktionellen Rezeptoren mit R oder G dem relativen Ausmaß der kodierenden mRNA entspricht.

Wir fanden heraus, dass die Editierung der GluRB Q/R Position nicht von der ADAR Expression in den TM Neuronen abhängig ist (Neurone, denen die ADAR2 fehlt, zeigten eine volle Editierung an der Q/R Position). Auf der anderen Seite jedoch zeigten alle untersuchten Purkinje Neurone (PN) ein positives Ergebnis für ADAR2. Editierung der GluRB Q/R Position in menschlichen PN konnte in mehr als 99% gezeigt werden sogar unter pathologischen Bedingungen, von denen bekannt ist, dass sie das Editing in Motoneuronen an der gleichen Position beeinflussen (als Beispiel: Amyotrophe Lateralsklerose) (Kwak and Kawahara, 2005; Kawahara et al., 2004). Dies steht im Einklang mit einem hohen Expressionslevel von ADAR2 in diesen Zellen gezeigt bei Kohr et al (Kohr et al., 1998), genauso wie in der aktuellen Untersuchung. ADAR2 Defekt Mäuse zeigen eine Reduktion (kein Fehlen) des mRNA Editings an dieser Position auf 40% und auf 10% an der entsprechenden mRNA und prä-mRNA Level (Higuchi et al., 2000). Dies legt die Möglichkeit nahe, dass ADAR1 (oder ein anderes bisher unbekanntes Enzym) unter bestimmten Umständen in der Lage ist diese Stelle zu editieren. Gewebe aus malignen Gehirntumoren ist charakterisiert durch eine uneditierte GluRB Q/R Position aber

einer Expression des ADAR2 in einer ähnlichen Höhe vergleichbar zum Kontrollgewebe; auf irgendeinem Weg wird die enzymatische Aktivität dieses Proteins beeinflusst (Maas et al., 2001). Deshalb gibt es keine lineare Beziehung zwischen dem Editing der GluRB Q/R Position und der ADAR2 Expression.

Wir zeigten eine ansteigende Sensitivität für Glutamat und das durch Glutamat ausgelöste Plateau bei komplett editierter GluRB R/G Position. Dieser Strom scheint nicht in die synaptische Übertragung verwickelt zu sein, ist aber wichtig für die tonische Erregung. Neuere Studien betonen die Bedeutung tonischer Hemmung oder Erregung für neuronale Aktivität (Farrant and Nusser, 2005; Cavelier et al., 2005).

So kommt durch diese Studien wieder etwas Licht in die Zusammenhänge des Editings bei AMPA Rezeptoren und 5-HT_{2C}Rezeptoren. Während ADAR2 mit der Editierung der GluRB R/G Position korreliert, hängt sie auf der anderen Seite nicht linear von der ADAR Expression ab. Es besteht eine komplexe Beziehung der Editierung mit Innervationsdichte, genetisch determinierten Faktoren und erregender Übertragung.

6. Zusammenfassung

Das histaminerge System mit Sitz im tuberomamillären Kern (TM) desHypothalamus ist zentrale Instanz für viele vegetative und endokrine Funktionen. Die histaminergen Neurone feuern nur während Wachheit und besonders während erhöhter Aufmerksamkeit. Sie sind mit einem Pacemaker-Rhythmus ausgestattet, der im gesamten Schlaf durch GABAerge Eingänge vor allem aus der prähypothalamischen Region (VLPO) unterdrückt wird. Erregende Eingänge sind auch vorhanden und noch wenig studiert worden. Glutamat wirkt über ionotrope und metabotrope Rezeptoren, Serotonin aus der dorsalen Raphe erregt durch Aktivierung eines Na^{+}-Ca^{2+}-Austauschers. Eine zentrale Regelgröße intakter Zellfunktion ist die Kalziumhomöostase. Ein möglicher Zusammenhang zwischen Erregung der Zellen durch verschiedene Systeme und dem Aufrechterhalten des Elektrolytgleichgewichts durch den Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) und den Kalium abhängigen Natrium-Kalzium-Austauscher (NCKX) sollte hier mit elektrophysiologischen, pharmakologischen und molekularen Analysen untersucht werden. Die Koexpression (mRNA) von NCX1 mit dem Serotoninrezeptor 2C war vollständig, das NCX1-Protein konnte auch durch Immunhistochemie in den histaminergen Neuronen nachgewiesen werden; ein Zusammenhang mit der Expression von NCKX zeigte sich dagegen nicht. Es traten fünf Splice-Varianten des NCX auf. Hierbei zeigten sich auch in einer Minderheit der Zellen Isoformen mit Exon B das bisher nicht im Gehirn vermutet wurde.

Auch für AMPA Rezeptoren konnten verschiedene Splice-Varianten in den TM Neuronen nachgewiesen werden, die flop Variante mit schneller, die flip Variante mit langsamer Desensitisierung. Von besonderem Interesse war hier auch die funktionell bedeutsame posttranskriptionelle Editierung der AMPA Rezeptoren durch RNA-Adenosin-Deaminasen (ADAR). An der Q/R Position der GluRB Variante trat eine komplette Editierung auf, das Kalziumundurchlässigkeit der Rezeptoren zur Folge hat. Eine koordinierte Expression mit NCX konnte nicht gefunden werden, jedoch zeigte sich NCKX2 nur in Neuronen mit schneller Desensitisierung. Bereits früher wurde gezeigt, dass diese Unterform die Kalziumclearance in supraoptischen Neuronen besorgt. Die hier untersuchten Neurone waren jedoch für Kalzium undurchlässig, möglicherweise bewirkt eine Aktivierung der AMPA Rezeptoren einen Kalziumeinstrom über spannungsabhängige Kalziumkanäle oder über einen Natrium-Kalzium Austauscher im Umkehrmodus. Verschiedene Koexpressionen reflektieren anscheinend eine unterschiedliche Regulation des Kalziumhaushalts bei schnellen und langsamen Glutamatantworten. Editing der R/G Position der GluRB Variante korreliert mit der Sensitivität für Glutamat und der Desensitisierung. Eine Korrelation mit der Position GluR Q/R und ADAR2 besteht nicht (im Kontrast zu Publikationen anderer Autoren). Editierung der R/G Position zeigt wiederum einen Zusammenhang mit der Expression verschiedener ADAR Typen. Jedoch hängt die ADAR Expression im Fall einer Edition an anderen Positionen der AMPA Rezeptoren und des Serotonin 2C Rezeptor mit diesen nicht zusammen. Es zeigt sich aber eine negative Korrelation des Editing der GluRD R/G Position mit der D Position des 5-HT_{2C}Rezeptors. Diese auf Einzelzellebene (Einzelzell-RT-PCR korreliert mit patch-clamp Registrierungen) einmaligen Untersuchungen haben wichtige Einblicke in molekulare Struktur-Funktionszusammenhänge und das Verständnis erregender Mechanismen unseres zentralen Wachsystems geliefert.

7. Abkürzungsverzeichnis

ADAR	Adenosindeaminase (acting on RNA)
AMPA(R)	alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-proprionat (Rezeptor)
ATPase	Adenosintriphosphatase
BMFZ	Biologisch medizinisches Forschungszentrum
bp	base pair (Basenpaare)
Ca^{2+}	Kalzium
cDNA	coding Desoxyribonukleinsäure
CTZ	Cyclothiazid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphate
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
GABA	Gammaaminobuttersäure
GluR	Glutamat – Rezeptor (1-4)
HDC	Histidindecarboxylase
K^+	Kalium
mRNA	messanger Ribonukleinsäure
Na^+	Natrium
NBQX	selektiver AMPA Antagonist
NCX	Natrium-Kalzium-Austauscher
NCKX	Kalium abhängiger Natrium-Kalzium-Austauscher
NMDA	N-methly-D-Aspartat
PCR	Polymerase Chain Reaktion (Polymerase Ketten Reaktion)
PKA	Proteinkinase A
sc-RT-PCR	single cell Reverse Transcription Polymerase Chain Reaktion
RNA	Ribonukleinsäure
SEM	standard error of the mean (Standardabweichung des Mittelwertes)
TM	Nucleus tuberomamillaris
ZNS	Zentralnervensystem
5HT-	5-Hydroxytryptophan

8. Literaturverzeichnis

1. Angulo MC, Lambolez B, Audinat E, Hestrin S, Rossier J (1997) Subunit composition, kinetic, and permeation properties of AMPA receptors in single neocortical nonpyramidal cells. J Neurosci 17: 6685-6696.
2. Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC (1983) Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. Nature 302: 832-837.
3. Barbon A, Popoli M, La Via L, Moraschi S, Vallini I, Tardito D, Tiraboschi E, Musazzi L, Giambelli R, Gennarelli M, Racagni G, Barlati S (2006) Regulation of Editing and Expression of Glutamate alpha-Amino-Propionic-Acid (AMPA)/Kainate Receptors by Antidepressant Drugs. Biol Psychiatry ..
4. Berberian G, Hidalgo C, DiPolo R, Beauge L (1998) ATP stimulation of Na+/Ca2+ exchange in cardiac sarcolemmal vesicles. Am J Physiol 274: C724-C733.
5. Berg KA, Cropper JD, Niswender CM, Sanders-Bush E, Emeson RB, Clarke WP (2001) RNA-editing of the 5-HT(2C) receptor alters agonist-receptor-effector coupling specificity. Br J Pharmacol 134: 386-392.
6. Berg KA, Maayani S, Goldfarb J, Scaramellini C, Leff P, Clarke WP (1998) Effector pathway-dependent relative efficacy at serotonin type 2A and 2C receptors: evidence for agonist-directed trafficking of receptor stimulus. Mol Pharmacol 54: 94-104.
7. Black JW, Duncan WA, Durant CJ, Ganellin CR, Parsons EM (1972) Definition and antagonism of histamine H 2 -receptors. Nature 236: 385-390.
8. Blaustein MP, Lederer WJ (1999) Sodium/calcium exchange: its physiological implications. Physiol Rev 79: 763-854.
9. Brown RE, Stevens DR, Haas HL (2001) The physiology of brain histamine. Prog Neurobiol 63: 637-672.
10. Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B (1992) Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. Neuron 8: 189-198.
11. Burnashev N, Zhou Z, Neher E, Sakmann B (1995) Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. J Physiol 485: 403-418.
12. Burns CM, Chu H, Rueter SM, Hutchinson LK, Canton H, Sanders-Bush E, Emeson RB (1997a) Regulation of serotonin-2C receptor G-protein coupling by RNA editing. Nature 387: 303-308.
13. Canitano A, Papa M, Boscia F, Castaldo P, Sellitti S, Taglialatela M, Annunziato L (2002a) Brain distribution of the Na+/Ca2+ exchanger-encoding genes NCX1, NCX2, and NCX3 and their related proteins in the central nervous system. Ann N Y Acad Sci 976:394-404.: 394-404.

14. Cavelier P, Hamann M, Rossi D, Mobbs P, Attwell D (2005) Tonic excitation and inhibition of neurons: ambient transmitter sources and computational consequences. Prog Biophys Mol Biol 87: 3-16.

15. Cervetto L, Lagnado L, Perry RJ, Robinson DW, McNaughton PA (1989) Extrusion of calcium from rod outer segments is driven by both sodium and potassium gradients. Nature 337: 740-743.

16. Coge F, Guenin SP, Audinot V, Renouard-Try A, Beauverger P, Macia C, Ouvry C, Nagel N, Rique H, Boutin JA, Galizzi JP (2001) Genomic organization and characterization of splice variants of the human histamine H3 receptor. Biochem J 355: 279-288.

17. Colquhoun D, Jonas P, Sakmann B (1992) Action of brief pulses of glutamate on AMPA/kainate receptors in patches from different neurones of rat hippocampal slices. J Physiol 458:261-87.: 261-287.

18. Diewald L, Heimrich B, Busselberg D, Watanabe T, Haas HL (1997) Histaminergic system in co-cultures of hippocampus and posterior hypothalamus: a morphological and electrophysiological study in the rat. Eur J Neurosci 9: 2406-2413.

19. Drutel G, Peitsaro N, Karlstedt K, Wieland K, Smit MJ, Timmerman H, Panula P, Leurs R (2001) Identification of rat H3 receptor isoforms with different brain expression and signaling properties. Mol Pharmacol 59: 1-8.

20. Ericson H, Blomqvist A, Kohler C (1989) Brainstem afferents to the tuberomammillary nucleus in the rat brain with special reference to monoaminergic innervation. J Comp Neurol 281: 169-192.

21. Eriksson KS, Sergeeva O, Brown RE, Haas HL (2001b) Orexin/hypocretin excites the histaminergic neurons of the tuberomammillary nucleus. J Neurosci 21: 9273-9279.

22. Eriksson KS, Stevens DR, Haas HL (2001g) Serotonin excites tuberomammillary neurons by activation of Na+/Ca2+-exchange. Neuropharmacology 40: 345-351.

23. Farrant M, Nusser Z (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. Nat Rev Neurosci 6: 215-229.

24. Fitzgerald LW, Iyer G, Conklin DS, Krause CM, Marshall A, Patterson JP, Tran DP, Jonak GJ, Hartig PR (1999) Messenger RNA editing of the human serotonin 5-HT2C receptor. Neuropsychopharmacology 21: 82S-90S.

25. Gasic GP, Hollmann M (1992) Molecular neurobiology of glutamate receptors. Annu Rev Physiol 54: 507-536.

26. Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P, Monyer H (1995a) Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca2+ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. Neuron 15: 193-204.

27. Gerber A, O'Connell MA, Keller W (1997) Two forms of human double-stranded RNA-specific editase 1 (hRED1) generated by the insertion of an Alu cassette. RNA 3: 453-463.

28. Gundlah C, Pecins-Thompson M, Schutzer WE, Bethea CL (1999) Ovarian steroid effects on serotonin 1A, 2A and 2C receptor mRNA in macaque hypothalamus. Brain Res Mol Brain Res 63: 325-339.

29. Gurevich I, Englander MT, Adlersberg M, Siegal NB, Schmauss C (2002a) Modulation of serotonin 2C receptor editing by sustained changes in serotonergic neurotransmission. J Neurosci 22: 10529-10532.

30. Gurevich I, Tamir H, Arango V, Dwork AJ, Mann JJ, Schmauss C (2002c) Altered editing of serotonin 2C receptor pre-mRNA in the prefrontal cortex of depressed suicide victims. Neuron 34: 349-356.

31. Haas H, Panula P (2003b) The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. Nat Rev Neurosci 4: 121-130.

32. Haas HL, Reiner PB (1988) Membrane properties of histaminergic tuberomammillary neurones of the rat hypothalamus in vitro. J Physiol Lond 399: 633-646.

33. Hatton GI, Yang QZ (2001) Ionotropic histamine receptors and H2 receptors modulate supraoptic oxytocin neuronal excitability and dye coupling. J Neurosci 21: 2974-2982.

34. He S, Ruknudin A, Bambrick LL, Lederer WJ, Schulze DH (1998a) Isoform-specific regulation of the Na+/Ca2+ exchanger in rat astrocytes and neurons by PKA. J Neurosci 18: 4833-4841.

35. Hestrin S (1993) Different glutamate receptor channels mediate fast excitatory synaptic currents in inhibitory and excitatory cortical neurons. Neuron 11: 1083-1091.

36. Higuchi M, Maas S, Single FN, Hartner J, Rozov A, Burnashev N, Feldmeyer D, Sprengel R, Seeburg PH (2000) Point mutation in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2. Nature 406: 78-81.

37. Hilgemann DW, Ball R (1996) Regulation of cardiac Na+,Ca2+ exchange and KATP potassium channels by PIP2. Science 273: 956-959.

38. Hollmann M, Hartley M, Heinemann S (1991) Ca2+ permeability of KA-AMPA--gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. Science 252: 851-853.

39. Hoyer D (1990) Serotonin 5-HT3, 5-HT4, and 5-HT-M receptors. Neuropsychopharmacology 3: 371-383.

40. Hoyt KR, Arden SR, Aizenman E, Reynolds IJ (1998) Reverse Na+/Ca2+ exchange contributes to glutamate-induced intracellular Ca2+ concentration increases in cultured rat forebrain neurons. Mol Pharmacol 53: 742-749.

41. Hume RI, Dingledine R, Heinemann SF (1991) Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. Science 253: 1028-1031.

42. Ike J, Canton H, Sanders-Bush E (1995) Developmental switch in the hippocampal serotonin receptor linked to phosphoinositide hydrolysis. Brain Res 678: 49-54.

43. Inagaki N, Toda K, Taniuchi I, Panula P, Yamatodani A, Tohyama M, Watanabe T, Wada H (1990) An analysis of histaminergic efferents of the tuberomammillary nucleus to the medial preoptic area and inferior colliculus of the rat. Exp Brain Res 80: 374-380.

44. Iwamoto T, Watano T, Shigekawa M (1996) A novel isothiourea derivative selectively inhibits the reverse mode of Na+/Ca2+ exchange in cells expressing NCX1. J Biol Chem 271: 22391-22397.

45. Jonas P, Racca C, Sakmann B, Seeburg PH, Monyer H (1994) Differences in Ca2+ permeability of AMPA-type glutamate receptor channels in neocortical neurons caused by differential GluR-B subunit expression. Neuron 12: 1281-1289.

46. Jonas P, Spruston N (1994a) Mechanisms shaping glutamate-mediated excitatory postsynaptic currents in the CNS. Curr Opin Neurobiol 4: 366-372.

47. Kawahara Y, Ito K, Sun H, Aizawa H, Kanazawa I, Kwak S (2004) Glutamate receptors: RNA editing and death of motor neurons. Nature 427: 801.

48. Keele NB, Arvanov VL, Shinnick-Gallagher P (1997) Quisqualate-preferring metabotropic glutamate receptor activates Na(+)- Ca2+ exchange in rat basolateral amygdala neurones. J Physiol (Lond) 499 (Pt 1): 87-104.

49. Kofuji P, Lederer WJ, Schulze DH (1994b) Mutually exclusive and cassette exons underlie alternatively spliced isoforms of the Na/Ca exchanger. J Biol Chem 269: 5145-5149.

50. Kohr G, Melcher T, Seeburg PH (1998a) Candidate editases for GluR channels in single neurons of rat hippocampus and cerebellum. Neuropharmacology 37: 1411-1417.

51. Kraev A, Quednau BD, Leach S, Li XF, Dong H, Winkfein R, Perizzolo M, Cai X, Yang R, Philipson KD, Lytton J (2001) Molecular cloning of a third member of the potassium-dependent sodium-calcium exchanger gene family, NCKX3. J Biol Chem 276: 23161-23172.

52. Krampfl K, Schlesinger F, Zorner A, Kappler M, Dengler R, Bufler J (2002) Control of kinetic properties of GluR2 flop AMPA-type channels: impact of R/G nuclear editing. Eur J Neurosci 15: 51-62.

53. Kwak S, Kawahara Y (2005) Deficient RNA editing of GluR2 and neuronal death in amyotropic lateral sclerosis. J Mol Med 83: 110-120.

54. Lai F, Chen CX, Carter KC, Nishikura K (1997) Editing of glutamate receptor B subunit ion channel RNAs by four alternatively spliced DRADA2 double-stranded RNA adenosine deaminases. Mol Cell Biol 17: 2413-2424.

55. Lee K, Boden PR (1997) Characterization of the inward current induced by metabotropic glutamate receptor stimulation in rat ventromedial hypothalamic neurones. J Physiol (Lond) 504 (Pt 3): 649-663.

56. Lee SH, Kim MH, Park KH, Earm YE, Ho WK (2002) K+-dependent Na+/Ca2+ exchange is a major Ca2+ clearance mechanism in axon terminals of rat neurohypophysis. J Neurosci 22: 6891-6899.

57. Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Muller CR, Hamer DH, Murphy DL (1996) Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. Science 274: 1527-1531.

58. Li L, Guerini D, Carafoli E (2000) Calcineurin controls the transcription of Na+/Ca2+ exchanger isoforms in developing cerebellar neurons. J Biol Chem 275: 20903-20910.

59. Li XF, Kraev AS, Lytton J (2002) Molecular cloning of a fourth member of the potassium-dependent sodium-calcium exchanger gene family, NCKX4. J Biol Chem 277: 48410-48417.

60. Lin JS, Gervasoni D, Hou Y, Vanni-Mercier G, Rambert F, Frydman A, Jouvet M (2000) Effects of amphetamine and modafinil on the sleep/wake cycle during experimental hypersomnia induced by sleep deprivation in the cat. J Sleep Res 9: 89-96.

61. Livsey CT, Costa E, Vicini S (1993) Glutamate-activated currents in outside-out patches from spiny versus aspiny hilar neurons of rat hippocampal slices. J Neurosci 13: 5324-5333.

62. Lomeli H, Mosbacher J, Melcher T, Hoger T, Geiger JR, Kuner T, Monyer H, Higuchi M, Bach A, Seeburg PH (1994a) Control of kinetic properties of AMPA receptor channels by nuclear RNA editing. Science 266: 1709-1713.

63. Lytton J, Li XF, Dong H, Kraev A (2002a) K+-dependent Na+/Ca2+ exchangers in the brain. Ann N Y Acad Sci 976:382-93.: 382-393.

64. Maas S, Melcher T, Herb A, Seeburg PH, Keller W, Krause S, Higuchi M, O'Connell MA (1996a) Structural requirements for RNA editing in glutamate receptor pre-mRNAs by recombinant double-stranded RNA adenosine deaminase. J Biol Chem 271: 12221-12226.

65. Maas S, Patt S, Schrey M, Rich A (2001a) Underediting of glutamate receptor GluR-B mRNA in malignant gliomas. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 14687-14692.

66. Marion S, Weiner DM, Caron MG (2004b) RNA editing induces variation in desensitization and trafficking of 5-hydroxytryptamine 2c receptor isoforms. J Biol Chem 279: 2945-2954.

67. Mayer ML, Westbrook GL (1987) Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. J Physiol 394:501-27.: 501-527.

68. Melcher T, Maas S, Herb A, Sprengel R, Seeburg PH, Higuchi M (1996d) A mammalian RNA editing enzyme. Nature 379: 460-464.

69. Melcher T, Maas S, Higuchi M, Keller W, Seeburg PH (1995) Editing of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor GluR-B pre-mRNA in vitro reveals site-selective adenosine to inosine conversion. J Biol Chem 270: 8566-8570.

70. Mittaz L, Scott HS, Rossier C, Seeburg PH, Higuchi M, Antonarakis SE (1997a) Cloning of a human RNA editing deaminase (ADARB1) of glutamate receptors that maps to chromosome 21q22.3. Genomics 41: 210-217.

71. Morisset S, Rouleau A, Ligneau X, Gbahou F, Tardivel-Lacombe J, Stark H, Schunack W, Ganellin CR, Schwartz JC, Arrang JM (2000) High constitutive activity of native H3 receptors regulates histamine neurons in brain. Nature 408: 860-864.

72. Mosbacher J, Schoepfer R, Monyer H, Burnashev N, Seeburg PH, Ruppersberg JP (1994) A molecular determinant for submillisecond desensitization in glutamate receptors. Science 266: 1059-1062.

73. Nakasaki Y, Iwamoto T, Hanada H, Imagawa T, Shigekawa M (1993) Cloning of the rat aortic smooth muscle Na+/Ca2+ exchanger and tissue-specific expression of isoforms. J Biochem (Tokyo) 114: 528-534.

74. Nakatani K, Yau KW (1988) Calcium and light adaptation in retinal rods and cones. Nature 334: 69-71.

75. Neher E, Sakmann B (1992) The patch clamp technique. Sci Am 266: 44-51.

76. Nguyen T, Shapiro DA, George SR, Setola V, Lee DK, Cheng R, Rauser L, Lee SP, Lynch KR, Roth BL, O'Dowd BF (2001) Discovery of a novel member of the histamine receptor family. Mol Pharmacol 59: 427-433.

77. Nicoll DA, Longoni S, Philipson KD (1990) Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na(+)-Ca2+ exchanger. Science 250: 562-565.

78. Nicoll DA, Quednau BD, Qui Z, Xia YR, Lusis AJ, Philipson KD (1996) Cloning of a third mammalian Na+-Ca2+ exchanger, NCX3. J Biol Chem 271: 24914-24921.

79. Niswender CM (1998) Recent advances in mammalian RNA editing. Cell Mol Life Sci 54: 946-964.

80. Niswender CM, Copeland SC, Herrick-Davis K, Emeson RB, Sanders-Bush E (1999b) RNA editing of the human serotonin 5-hydroxytryptamine 2C receptor silences constitutive activity. J Biol Chem 274: 9472-9478.

81. Nitz D, Siegel JM (1996) GABA release in posterior hypothalamus across sleep-wake cycle. Am J Physiol 271: R1707-R1712.

82. Okakura K, Yamatodani A, Mochizuki T, Horii A, Wada H (1992) Glutamatergic regulation of histamine release from rat hypothalamus. Eur J Pharmacol 213: 189-192.

83. Panula P, Yang HY, Costa E (1984) Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus. Proc Natl Acad Sci U S A 81: 2572-2576.

84. Parent A, Descarries L, Beaudet A (1981) Organization of ascending serotonin systems in the adult rat brain. A radioautographic study after intraventricular administration of [3H]5-hydroxytryptamine. Neuroscience 6: 115-138.

85. Pidoplichko VI (1996) Dependence of solution exchange time on cell or patch linear dimensions in concentration jump experiments using patch-clamped sensory neurones. Pflugers Arch 432: 1074-1079.

86. Poon S, Leach S, Li XF, Tucker JE, Schnetkamp PP, Lytton J (2000a) Alternatively spliced isoforms of the rat eye sodium/calcium+potassium exchanger NCKX1. Am J Physiol Cell Physiol 278: C651-C660.

87. Quednau BD, Nicoll DA, Philipson KD (1997a) Tissue specificity and alternative splicing of the Na+/Ca2+ exchanger isoforms NCX1, NCX2, and NCX3 in rat. Am J Physiol 272: C1250-C1261.

88. Robertson SJ, Burnashev N, Edwards FA (1999) Ca2+ permeability and kinetics of glutamate receptors in rat medial habenula neurones: implications for purinergic transmission in this nucleus. J Physiol 518: 539-549.

89. Rueter SM, Dawson TR, Emeson RB (1999a) Regulation of alternative splicing by RNA editing. Nature 399: 75-80.

90. Schlesinger F, Tammena D, Krampfl K, Bufler J (2005) Desensitization and resensitization are independently regulated in human recombinant GluR subunit coassemblies. Synapse 55: 176-182.

91. Schnetkamp PP, Tucker JE, Szerencsei RT (1995) Ca2+ influx into bovine retinal rod outer segments mediated by Na+/Ca2+/K+ exchange. Am J Physiol 269: C1153-C1159.

92. Schulze DH, Polumuri SK, Gille T, Ruknudin A (2002d) Functional regulation of alternatively spliced Na+/Ca2+ exchanger (NCX1) isoforms. Ann N Y Acad Sci 976:187-96.: 187-196.

93. Schwartz JC, Arrang JM, Garbarg M, Pollard H, Ruat M (1991) Histaminergic transmission in the mammalian brain. Physiol Rev 71: 1-51.

94. Schwarz EM, Benzer S (1997) Calx, a Na-Ca exchanger gene of Drosophila melanogaster. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 10249-10254.

95. Seeburg PH (1996) The role of RNA editing in controlling glutamate receptor channel properties. J Neurochem 66: 1-5.

96. Sharonova IN, Vorobjev VS, Skrebitsky V, Haas HL (1996) Histamine and NMDA-receptors in the hippocampus: polyamines and intracellular binding site. Inflamm Res 45 Suppl 1: S58-S59.

97. Sherin JE, Shiromani PJ, McCarley RW, Saper CB (1996) Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. Science 271: 216-219.

98. Smith BN, Armstrong WE (1996) The ionic dependence of the histamine-induced depolarization of vasopressin neurones in the rat supraoptic nucleus. J Physiol (Lond) 495 (Pt 2): 465-478.

99. Smith KA, Morris JS, Friston KJ, Cowen PJ, Dolan RJ (1999) Brain mechanisms associated with depressive relapse and associated cognitive impairment following acute tryptophan depletion. Br J Psychiatry 174:525-9.: 525-529.

100. Sommer B, Keinanen K, Verdoorn TA, Wisden W, Burnashev N, Herb A, Kohler M, Takagi T, Sakmann B, Seeburg PH (1990) Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. Science 249: 1580-1585.

101. Sommer B, Kohler M, Sprengel R, Seeburg PH (1991) RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. Cell 67: 11-19.

102. Staines WA, Daddona PE, Nagy JI (1987) The organization and hypothalamic projections of the tuberomammillary nucleus in the rat: an immunohistochemical study of adenosine deaminase- positive neurons and fibers. Neuroscience 23: 571-596.

103. Steininger TL, Gong H, McGinty D, Szymusiak R (2001) Subregional organization of preoptic area/anterior hypothalamic projections to arousal-related monoaminergic cell groups. J Comp Neurol 429: 638-653.

104. Takeshita Y, Watanabe T, Sakata T, Munakata M, Ishibashi H, Akaike N (1998) Histamine modulates high-voltage-activated calcium channels in neurons dissociated from the rat tuberomammillary nucleus. Neuroscience 87: 797-805.

105. Thurneysen T, Nicoll DA, Philipson KD, Porzig H (2002) Sodium/calcium exchanger subtypes NCX1, NCX2 and NCX3 show cell-specific expression in rat hippocampus cultures. Brain Res Mol Brain Res 107: 145-156.

106. Tsoi M, Rhee KH, Bungard D, Li XF, Lee SL, Auer RN, Lytton J (1998) Molecular cloning of a novel potassium-dependent sodium-calcium exchanger from rat brain. J Biol Chem 273: 4155-4162.

107. Vollmar W, Gloger J, Berger E, Kortenbruck G, Kohling R, Speckmann EJ, Musshoff U (2004) RNA editing (R/G site) and flip-flop splicing of the AMPA receptor subunit GluR2 in nervous tissue of epilepsy patients. Neurobiol Dis 15: 371-379.

108. Wang Q, O'Brien PJ, Chen CX, Cho DS, Murray JM, Nishikura K (2000) Altered G protein-coupling functions of RNA editing isoform and splicing variant serotonin2C receptors. J Neurochem 74: 1290-1300.

109. Watanabe T, Taguchi Y, Shiosaka S, Tanaka J, Kubota H, Terano Y, Tohyama M, Wada H (1984) Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats; a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker. Brain Res 295: 13-25.

110. Wisden W, Seeburg PH (1993) Mammalian ionotropic glutamate receptors. Curr Opin Neurobiol 3: 291-298.

111. Wright DE, Seroogy KB, Lundgren KH, Davis BM, Jennes L (1995) Comparative localization of serotonin1A, 1C, and 2 receptor subtype mRNAs in rat brain. J Comp Neurol 351: 357-373.

112. Yamashita M, Fukui H, Sugama K, Horio Y, Ito S, Mizuguchi H, Wada H (1991) Expression cloning of a cDNA encoding the bovine histamine H1 receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 88: 11515-11519.

113. Yang QZ, Hatton GI (1997) Electrophysiology of excitatory and inhibitory afferents to rat histaminergic tuberomammillary nucleus neurons from hypothalamic and forebrain sites. Brain Res 773: 162-172.

114. Yau KW, Nakatani K (1984) Electrogenic Na-Ca exchange in retinal rod outer segment. Nature 311: 661-663.

Lebenslauf:

Name:	Amberger, Bettina Theresia
Geburt:	25.04.1978 in Garmisch – Partenkirchen
Eltern:	Engelbert Amberger, Polizeibeamter
	Theresia Amberger, geb. Barnackyj, Krankenschwester
Anschrift:	Lehrer-Steig-Weg 27, 89081 Ulm
Schulausbildung:	1984 – 1988 Grundschule Mittenwald
	1988-1998 St. Irmengard Gymnasium
	Garmisch – Partenkirchen
Beruflicher Werdegang:	01.07.1998 Eintritt in die Deutsche Bundeswehr als Sanitätsoffiziersanwärter
Medizinstudium:	04/1999 – 05/2005 Heinrich – Heine Universität Düsseldorf
	Ärztliche Vorprüfung: Frühjahr 2000
	1. Staatsexamen: Frühjahr 2001
	2. Staatsexamen: Frühjahr 2004
	Praktisches Jahr: Hospital zum Heiligen Geist in Kempen, Wahlfach: Anästhesie
	3. Staatsexamen: Frühjahr 2005
Derzeitige Tätigkeit:	seit 05/2005 Assistenzärztin in der Abteilung für Anästhesiologie und Intensivmedizin des Bundeswehrkrankenhauses Ulm

Zusammenfassung (Abstract)

Das histaminerge System mit Sitz im tuberomamillären Kern (TM) desHypothalamus ist zentrale Instanz für viele vegetative und endokrine Funktionen. Die histaminergen Neurone feuern nur während Wachheit und besonders während erhöhter Aufmerksamkeit. Sie sind mit einem Pacemaker-Rhythmus ausgestattet, der im gesamten Schlaf durch GABAerge Eingänge vor allem aus der prähypothalamischen Region (VLPO) unterdrückt wird. Erregende Eingänge sind auch vorhanden und noch wenig studiert worden. Glutamat wirkt über ionotrope und metabotrope Rezeptoren, Serotonin aus der dorsalen Raphe erregt durch Aktivierung eines Na^{+}-Ca^{2+}-Austauschers. Eine zentrale Regelgröße intakter Zellfunktion ist die Kalziumhomöostase. Ein möglicher Zusammenhang zwischen Erregung der Zellen durch verschiedene Systeme und dem Aufrechterhalten des Elektrolytgleichgewichts durch den Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) und den Kalium abhängigen Natrium-Kalzium-Austauscher (NCKX) sollte hier mit elektrophysiologischen, pharmakologischen und molekularen Analysen untersucht werden. Die Koexpression (mRNA) von NCX1 mit dem Serotoninrezeptor 2C war vollständig, das NCX1-Protein konnte auch durch Immunhistochemie in den histaminergen Neuronen nachgewiesen werden; ein Zusammenhang mit der Expression von NCKX zeigte sich dagegen nicht. Es traten fünf Splice-Varianten des NCX auf. Hierbei zeigten sich auch in einer Minderheit der Zellen Isoformen mit Exon B das bisher nicht im Gehirn vermutet wurde.

Auch für AMPA Rezeptoren konnten verschiedene Splice-Varianten in den TM Neuronen nachgewiesen werden, die flop Variante mit schneller, die flip Variante mit langsamer Desensitisierung. Von besonderem Interesse war hier auch die funktionell bedeutsame posttranskriptionelle Editierung der AMPA Rezeptoren durch RNA-Adenosin-Deaminasen (ADAR). An der Q/R Position der GluRB Variante trat eine komplette Editierung auf, das Kalziumundurchlässigkeit der Rezeptoren zur Folge hat. Eine koordinierte Expression mit NCX konnte nicht gefunden werden, jedoch zeigte sich NCKX2 nur in Neuronen mit schneller Desensitisierung. Bereits früher wurde gezeigt, dass diese Unterform die Kalziumclearance in supraoptischen Neuronen besorgt. Die hier untersuchten Neurone waren jedoch für Kalzium undurchlässig, möglicherweise bewirkt eine Aktivierung der AMPA Rezeptoren einen Kalziumeinstrom über spannungsabhängige Kalziumkanäle oder über einen Natrium-Kalzium Austauscher im Umkehrmodus. Verschiedene Koexpressionen reflektieren anscheinend eine unterschiedliche Regulation des Kalziumhaushalts bei schnellen und langsamen Glutamatantworten. Editing der R/G Position der GluRB Variante korreliert mit der Sensitivität für Glutamat und der Desensitisierung. Eine Korrelation mit der Position GluR Q/R und ADAR2 besteht nicht (im Kontrast zu Publikationen anderer Autoren). Editierung der R/G Position zeigt wiederum einen Zusammenhang mit der Expression verschiedener ADAR Typen. Jedoch hängt die ADAR Expression im Fall einer Edition an anderen Positionen der AMPA Rezeptoren und des Serotonin 2C Rezeptor mit diesen nicht zusammen. Es zeigt sich aber eine negative Korrelation des Editing der GluRD R/G Position mit der D Position des 5-HT_{2C}Rezeptors. Diese auf Einzelzellebene (Einzelzell-RT-PCR korreliert mit patch-clamp Registrierungen) einmaligen Untersuchungen haben wichtige Einblicke in molekulare Struktur-Funktionszusammenhänge und das Verständnis erregender Mechanismen unseres zentralen Wachsystems geliefert.

Prof. Dr. med. Helmut Haas