

Aus der Klinik für Neurologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. D. Kömpf

**Die *in vivo*-Wirkung von N-Methyl-Norsalsolinol auf den
Dopaminstoffwechsel bei der Ratte**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Jan Bürmann
aus Osnabrück

Lübeck 2005

1. Berichtersteller: Prof. Dr. med. A. Moser

2. Berichtersteller: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Olaf Jöhren

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2006

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 25.04.2006

gez. Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann

-Dekan der Medizinischen Fakultät-

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung

1.1: Der Morbus Parkinson: Definition, Klinik, Differentialdiagnosen, Epidemiologie	6
1.2: Pathologie des Morbus Parkinson	8
1.3: Neuroanatomie der Basalganglien, Auswirkungen des Dopaminmangels	9
1.4: Anatomie der Basalganglien bei der Ratte	11
1.5: Übersicht zum Dopaminstoffwechsel	12
1.6: Die Neurotoxin-Hypothese zur Pathogenese des Morbus Parkinson	14
1.7: N-Methyl-Norsalsolinol	16
1.8: Das in dieser Arbeit verwendete Parkinson-Modell	18
1.9: 6-Hydroxydopamin	19
1.10: Zielsetzung der Arbeit	21

2. Material

2.1 Stereotaktische Injektionen	22
2.2 Präparation und Homogenisation von nativem Hirngewebe	23
2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration im Homogenat	23
2.4 Bestimmung von Dopamin, DOPAC und HVA im Homogenat durch HPLC	24
2.5 TH-Proteinbestimmung im Homogenat durch Western-Blots	25
2.6 Transkardiale Perfusionsfixation der Hirne für die In situ-Hybridisierung	28
2.7 Anfertigung von Kryoschnitten	29
2.8 In situ-Hybridisierung der TH-mRNA auf Kryoschnitten von SN und VTA	30
2.9 Rechnerprogramme	34
2.10 Versuchstiere	34
2.11 Zulassung der Tierversuche	34

3. Methode

3.1 Gruppeneinteilung der Versuchstiere	35
3.2 Stereotaktische Injektionen	36
3.3 Präparation und Homogenisation von ACB, CP, SN/VTA sowie Nebennierengewebe	37
3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration im Hirnhomogenat	38
3.5 Bestimmung von Dopamin, DOPAC und HVA im Homogenat durch HPLC	39
3.6 Bestimmung der Gewebskonzentration der TH durch Western-Blots	40
3.7 Transkardiale Perfusionsfixation der Hirne für die In situ-Hybridisierung	44
3.8 Anfertigung der Kryoschnitte	44
3.9 In situ-Hybridisierung der TH-mRNA auf Kryoschnitten von SN und VTA	45

4. Aufarbeitung und Auswertung der Daten

4.1 Berechnung der Proteinkonzentration der einzelnen Proben des Hirnhomogenats	48
4.2 Auswertung der HPLC-Chromatogramme	49
4.3 Auswertung der Western-Blots zur Bestimmung der TH-Gewebskonzentration	50
4.4 Auswertung der In situ-Hybridisierung	52
4.5 Statistik	53

5. Ergebnisse

5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration im Homogenat	54
5.2 Bestimmung der Konzentration von Dopamin, DOPAC und HVA im Homogenat	54
5.3 TH-Proteinbestimmung im Homogenat durch Western-Blots	60
5.4 In situ-Hybridisierung der TH-mRNA auf Kryoschnitten von SN und VTA	62

<u>6. Diskussion</u>	
6.1 Die Auswirkungen von N-Methyl-Norsalsolinol auf die Gewebskonzentrationen an Dopamin, DOPAC und HVA	65
6.2 Die Auswirkungen von N-Methyl-Norsalsolinol auf die Gewebskonzentration des Enzyms Tyrosinhydroxylase	70
6.3 Die Auswirkungen von N-Methyl-Norsalsolinol auf die mRNA-Expression des Enzyms Tyrosinhydroxylase	74
6.4 Zusammenfassung der <i>in vivo</i> -Auswirkungen von N-Methyl-Norsalsolinol auf den Dopaminstoffwechsel	77
<u>7. Zusammenfassung</u>	81
<u>8. Verzeichnis der Abkürzungen</u>	83
<u>9. Literaturverzeichnis</u>	87
<u>10. Danksagung</u>	98
<u>11. Publikationsliste</u>	99
<u>11. Lebenslauf</u>	100

1. Einleitung

1.1: Der Morbus Parkinson: Definition, Klinik, Differentialdiagnosen, Epidemiologie

Der Morbus Parkinson (Synonyme: Parkinson-Krankheit, Paralysis agitans, Schüttellähmung) ist die hauptsächliche Ursache des Parkinson-Syndroms, das sich klinisch durch die klassische Trias Rigor, Tremor und Bradykinese manifestiert.

Benannt ist dieses Krankheitsbild nach dem Engländer James Parkinson, der es 1817 in seinem berühmten Aufsatz „An essay on the shaking palsy“ erstmals eingehend beschrieb.

Beim Morbus Parkinson kommt es aus bislang ungeklärter Ursache zu einer Degeneration v.a. der dopaminergen, melaninpigmentierten Neurone des im Mittelhirn gelegenen Kerngebietes Substantia nigra, Pars compacta. Dies führt zu einem Absinken der Dopaminkonzentration in den Basalganglien (Nucleus caudatus, Putamen, Nucleus accumbens), den Projektionsorten der Axone dieser Neurone. Der Dopaminmangel in den Basalganglien bewirkt außerdem eine mangelnde Inhibition der dortigen cholinergen Interneurone.

Der Verlust an Dopamin und das Übergewicht cholinergischer Interneurone werden als ursächlich für Rigor, Tremor und Bradykinese angesehen. Klinisch manifestieren sich diese Symptome nach einem Verlust von ca. 50 % der dopaminergen Neurone der Substantia nigra sowie einem Abfall der Dopaminkonzentration in den Basalganglien um ca. 80 % (Fearnley und Lees, 1991).

Eine definitive Diagnose des Morbus Parkinson ist nur post mortem histologisch möglich. Klinisch wird die Diagnose anhand der oben erwähnten Hauptsymptome gestellt. Der Tremor (häufig das Erstsymptom) ist hierbei ein Ruhetremor v.a. der Hände mit einer charakteristischen Frequenz von 3-5 Hz. Der Rigor stellt sich als kontinuierlicher Widerstand bei passiven Gelenkbewegungen dar („Zahnradphänomen“). Die Bradykinese zeigt sich dagegen anfangs als Störung der Feinmotorik, z.B. fällt es den Patienten schwer zu schreiben oder sich das Hemd zuzuknöpfen.

Charakteristisch ist hierbei jeweils ein asymmetrisches Auftreten dieser Beschwerden.

Ein weiteres wichtiges diagnostisches Kriterium der Parkinson-Krankheit ist die vorübergehende Besserung der Symptome nach Gabe von Dopamin-Agonisten oder der Dopaminvorstufe L-Dopa.

Außer den klassischen Kardinalsymptomen Rigor, Tremor und Bradykinese kommt es beim Morbus Parkinson im weiteren Verlauf sehr häufig zu charakteristischen Gangstörungen (einem kleinschrittigen, schlurfenden Gang) und erhöhter Fallneigung (Samii et al., 2004). Ebenfalls häufig sind vegetative Begleitsymptome wie Hypersalivation, Obstipation, Miktionsstörungen und orthostatische Hypotension (Jost, 2003).

Andere oft zu beobachtende Symptome sind Sprach- und Schreibstörungen (typischerweise eine leise, monotone Sprache und eine zum Zeilenende hin abnehmende Schriftgröße) sowie Verarmung an Mimik und Gestik. Weiterhin tritt bei fast der Hälfte der Patienten eine Depression auf (McDonald et al., 2003), auch Schlafstörungen und Demenz sind nicht selten (Emre, 2003). Die Kombination von Demenz und Antiparkinson-Medikation kann hierbei zu Halluzinationen und psychotischen Verhaltensweisen führen (Samii et al., 2004).

Insgesamt handelt es sich also um ein schweres, unaufhaltsam voranschreitendes Krankheitsbild, das zu einer starken Beeinträchtigung der Patienten führt.

Abzugrenzen vom eigentlichen, idiopathischen Morbus Parkinson sind die symptomatischen Parkinson-Syndrome. Hierzu zählen das medikamenteninduzierte Parkinson-Syndrom (v.a. nach Gabe von Neuroleptika; Jiminez-Jiminez et al., 1997), ein vaskuläres Parkinson-Syndrom (v.a. bei zerebraler Mikroangiopathie; Sibon und Tison, 2004, Barcia et al., 2004), ein durch Kopftraumen ausgelöstes Parkinson-Syndrom (Stern, 1991; das bekannteste Beispiel ist der ehemalige Boxweltmeister Muhammad Ali) sowie postenzephalitische Parkinson-Syndrome (z.B. bei der seltenen Enzephalitis lethargica (von Economo, 1931)).

Auch verschiedene Toxine können ein Parkinson-Syndrom auslösen, z.B. 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP), ein Nebenprodukt der chemischen Opiatsynthese. Hierauf wird in Abschnitt 1.6 noch ausführlich eingegangen.

Es folgt nun ein kurzer Exkurs zur epidemiologischen Bedeutung der Parkinson-Krankheit.

In Deutschland litten 1998 ca. 250 000 Menschen an Morbus Parkinson (Masuhr und Neumann, 1998). Die Prävalenz dieser Erkrankung in Industrieländern wird in den meisten Studien auf 0,3 % der Gesamtbevölkerung und ca. 1 % der Population der über 60-jährigen geschätzt (Rajput, 1992; de Rijk et al., 2000). Regionale Unterschiede zeigten sich kaum. Die Daten aus Entwicklungsländern sind aufgrund der unterschiedlichen Altersstruktur der Populationen hiermit nur wenig vergleichbar.

Die jährliche Inzidenz lag in einer Studie bei 13 Erkrankungsfällen/100 000 Menschen (Mayeux et al., 1995). Der Erkrankungsbeginn lag meist zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr (Inzelberg et al., 2002). Es wurde allerdings auch eine Variante mit Erkrankungsbeginn in früherem Lebensalter beschrieben, die 5-10 % aller Parkinsonpatienten betreffen soll (Golbe, 1991).

Diese Daten verdeutlichen die Häufigkeit der Parkinson-Krankheit in der klinischen Praxis und belegen die Wichtigkeit einer weiteren Ursachenforschung dieser Erkrankung.

1.2: Pathologie des Morbus Parkinson

Die charakteristischen, für die pathologische Diagnose zwingend erforderlichen Kennzeichen des Morbus Parkinson sind Lewy-Körper und Lewy-Neuriten. Diese wurden Anfang des 20. Jahrhunderts erstmals vom Deutschen Friederich Lewy beschrieben (Lewy, 1912; Lewy, 1913).

Es handelt sich hierbei um atypische intraneuronale Einschlusskörper (Jellinger, 1990). Diese Einschlusskörper enthalten unter anderem α -Synuklein, ein in präsynaptischen Membranen nachgewiesenes Protein ungeklärter Funktion (Spillantini et al., 1997; Clayton und George, 1999). Die Lewy-Körper sollen die Funktion der sie enthaltenden Neurone beeinträchtigen und ihr Absterben beschleunigen (Trojanowski et al., 1998).

Lewy-Körper treten ausschließlich in Neuronen auf, hauptsächlich in den dopaminergen Zellen der Substantia nigra und der Area tegmentalis ventralis, aber bei vielen Patienten auch in anderen Hirnregionen, z.B. Teilen des Kortex, im Corpus amygdaloideum, im Locus coeruleus, im Nucleus dorsalis nervi vagi sowie in Teilen des autonomen Nervensystems (Wakabayashi und Takahashi, 1997; Braak et al., 2003).

Neben diesem histologischen Korrelat in den noch lebenden Neuronen steht pathologisch bei der Parkinson-Erkrankung natürlich der Verlust bestimmter Neurone, vor allem der großen, dopaminergen, melaninpigmentierten Zellen der Substantia nigra, im Vordergrund. Bemerkenswert dabei ist, dass nur bestimmte Arten von Neuronen absterben, andere dagegen unversehrt bleiben. In der Pars compacta der Substantia nigra sind die dopaminergen Zellen massiv von diesem Zelltod betroffen, die dort ebenfalls vorkommenden GABA(γ -Aminobuttersäure)-ergen Neurone sowie die kleinen Interneurone dagegen nicht (Braak et al., 2000). Wie bereits erwähnt, führt ein Verlust von 50 % der dopaminergen Neurone zum Auftreten klinischer Symptome des Morbus Parkinson.

In den letzten Jahren ist bekannt geworden, dass vom Zelluntergang außer den dopaminergen Neuronen des Mittelhirns auch andere Zellsysteme betroffen sind. Hierzu zählen Teile des limbischen Systems wie der Hippocampus (Dickson et al., 1994) und das Corpus amygdaloideum (Braak et al., 1994). Diese Befunde könnten die oben erwähnten Störungen emotional ausgelöster Bewegungen wie Mimik und Gestik sowie die vegetativen Begleitsymptome des Morbus Parkinson erklären (Braak et al., 2000).

Auch im cholinergen Nucleus basalis Meynert konnten bei Parkinson-Patienten beträchtliche Zellverluste nachgewiesen werden (Jellinger, 1990). Zellverluste im Ncl. basalis Meynert könnten die Ursache für die oft beobachtete Demenzentwicklung im Rahmen des Morbus Parkinson sein (Braak et al., 2000).

1.3: Neuroanatomie der Basalganglien beim Menschen, Auswirkungen des Dopaminmangels

Die eigentlichen Basalganglien sind die im Marklager des Großhirns gelegenen Kerngebiete Nucleus caudatus, Putamen und Pallidum (oder Globus pallidus). Putamen und Ncl. caudatus werden gemeinsam auch als Striatum (oder Corpus striatum) bezeichnet. Funktionell zu den Basalganglien gehören außerdem der Nucleus subthalamicus sowie die im Mittelhirn gelegene Substantia nigra (SN).

Die Funktion der Basalganglien liegt vermutlich vor allem in der Modulation von Bewegungsentwürfen. Hierbei können sie motorische Bewegungen sowohl fördern als auch unterdrücken. Störungen der Basalganglien führen somit zu Hypo- oder Hyperkinesien, je nachdem, welcher Anteil betroffen ist.

Der Nucleus caudatus liegt beim Menschen am lateralen Rand des Seitenventrikels und legt sich ringförmig über das Putamen, das mit ihm entwicklungs- und funktionell eng verwandt ist. Getrennt werden beide Strukturen durch die Capsula interna. Ein beim Menschen relativ kleiner Anteil des Striatums, der in seinem ventrorostralen Bereich an der Verschmelzungsstelle der beiden Kerngebiete gelegen ist, wird auch als Nucleus accumbens bezeichnet (Trepel, 1999a).

Die dorsalen und ventralen Anteile (u.a. der Ncl. accumbens) des Striatums sind funktionell verschieden. Das dorsale Striatum enthält Afferenzen v.a. aus den präfrontalen Assoziationsfeldern und beeinflusst eher die Willkürmotorik, während das ventrale Striatum sehr viele Afferenzen aus Anteilen des limbischen Systems erhält und somit wohl u.a. die emotional geprägte Motorik koordiniert.

Die Neurone des Striatums haben unterschiedliche Effekte auf die Motorik. Einige Neurone erleichtern die Ausführung von Bewegungen, andere erschweren sie (Braak et al., 2000).

Die Substantia nigra ist dagegen im Mittelhirn gelegen, und zwar an der Grenze zwischen den Crura cerebri und dem Tegmentum mesencephali. Mikroskopisch kann man in ihr eine Pars compacta und eine Pars reticulata unterscheiden. Die Pars compacta enthält die dopaminergen, melaninhaltigen Neurone und ist Gegenstand der folgenden Betrachtungen (Trepel, 1999b).

Beim Menschen projizieren die dopaminergen Neurone der SN efferent vor allem über die Fibræ nigrostriatales in das Striatum. Dort führt Dopamin im Endeffekt zu einer Aktivierung bewegungserleichternd wirkender Neurone (Braak et al., 2000). Außerdem gibt es dopaminerge Efferenzen in die Formatio reticularis des Hirnstamms, die den generellen Muskeltonus beeinflussen, sowie zum limbischen System (Trepel, 1999b).

Der bei Morbus Parkinson durch die Degeneration der SN vorliegende Dopaminrückgang um mindestens 80 % führt nun zu einem Übergewicht der bewegungserschwerenden Anteile des Striatums. Somit erklärt sich durch den Ausfall der nigrostriatalen dopaminergen Bahn vor allem das die Patienten besonders belastende Symptom der Bradykinese. Der Rigor wird dagegen auf eine mangelnde dopaminerge Hemmung von Motoneuronen der Formatio reticularis des Hirnstammes zurückgeführt. Diese nun enthemmten Motoneurone projizieren ins Rückenmark und sorgen so möglicherweise für den bei Morbus Parkinson erhöhten Muskeltonus (Trepel, 1999b).

Für den Tremor könnte eine mangelhafte dopaminerge Inhibition von Bereichen der Formatio reticularis verantwortlich sein, die in rhythmischen Abständen spontan aktivierende Signale in den Thalamus und den motorischen Kortex senden (Trepel, 1999b).

1.4: Anatomie der Basalganglien bei der Ratte

Bei den in diesem Projekt als Versuchstiere verwendeten Ratten gibt es gewisse neuroanatomische Unterschiede hinsichtlich des Aufbaus der Basalganglien und der mit ihnen funktionell verbundenen Strukturen gegenüber dem Menschen.

Ähnlich wie beim Menschen wird auch bei der Ratte das Striatum unterteilt in einen ventralen Anteil, der viele Verbindungen zum limbischen System aufweist, und einen dorsalen Anteil, der efferent über den Thalamus in erster Linie die Willkürmotorik beeinflusst (Heimer et al. 1995). Zum ventralen Anteil werden bei der Ratte das Tuberculum olfactorium, der Nucleus accumbens, der im Verhältnis wesentlich größer als beim Menschen ist, sowie die ventralen Anteile von Ncl. caudatus und Putamen gerechnet (Heimer et al. 1995). Der dorsale Anteil besteht aus den restlichen Anteilen von Ncl. caudatus und Putamen. Im Gegensatz zum Menschen ist die Capsula interna, die Putamen und Ncl. caudatus voneinander trennt, bei der Ratte nicht vorhanden, so dass diese Strukturen gemeinsam als Caudatus/Putamen betrachtet werden (Heimer et al., 1995).

Die wichtigsten dopaminergen Mittelhirnkerngebiete bei der Ratte sind die Substantia nigra (SN) und Area tegmentalis ventralis (VTA). Die Area tegmentalis ventralis existiert auch im menschlichen Hirn, ist dort allerdings im Vergleich weniger groß und funktionell vermutlich weniger bedeutsam als bei der Ratte (German und Manaye, 1993).

Funktionell unterscheiden sich SN und VTA vor allem darin, dass die dopaminergen Neurone der SN vor allem in das dorsale Striatum, die der VTA dagegen vor allem in das ventrale Striatum, also in den Ncl. accumbens, projizieren (Heimer et al., 1995). Die dopaminerge Bahn von der SN zum dorsalen CP wird häufig auch als mesostriatale Verbindung, die von der VTA zum ventralen Striatum dagegen als mesolimbische Verbindung bezeichnet (Heimer et al., 1995). In weiten Teilen verlaufen die Axone beider Bahnen gemeinsam im sogenannten medialen Vorderhirnbündel (MFB). Diese Struktur

existiert im menschlichen Hirn nicht. Sie entspricht aber ungefähr den Verbindungsbahnen zwischen SN und Striatum, v.a. den Fibrae nigrostriatales. Wichtig ist, dass das MFB der Ratte auf beiden Seiten unilateral verläuft und nicht in relevantem Ausmaß auf die Gegenseite kreuzt (Heimer et al., 1995; Zuch et al., 2000).

1.5: Übersicht zum Dopaminstoffwechsel

Der erste Schritt zur Synthese von Dopamin (und auch den anderen Katecholaminen Adrenalin und Noradrenalin) ist die Hydroxylierung von L-Tyrosin zu L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-Dopa). Diese Reaktion wird vom Enzym Tyrosinhydroxylase (L-Tyrosin, Tetrahydropteridin, Sauerstoff: Oxidoreduktase (3-hydroxylierend), EC 1.14.16.2; TH) katalysiert (Nagatsu et al., 1964). Sie ist gleichzeitig der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der gesamten Katecholaminsynthese.

Als Kofaktoren dieser Reaktion werden Eisen(II)-Ionen sowie (6R)-L-Erythro-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH₄) benötigt (Scholz und Moser, 1998). Anschließend wird L-Dopa mit Hilfe der L-Dopa-Decarboxylase (aromatische L-Aminosäuren-Dekarboxylase, EC 4.1.1.28) zu Dopamin decarboxyliert:

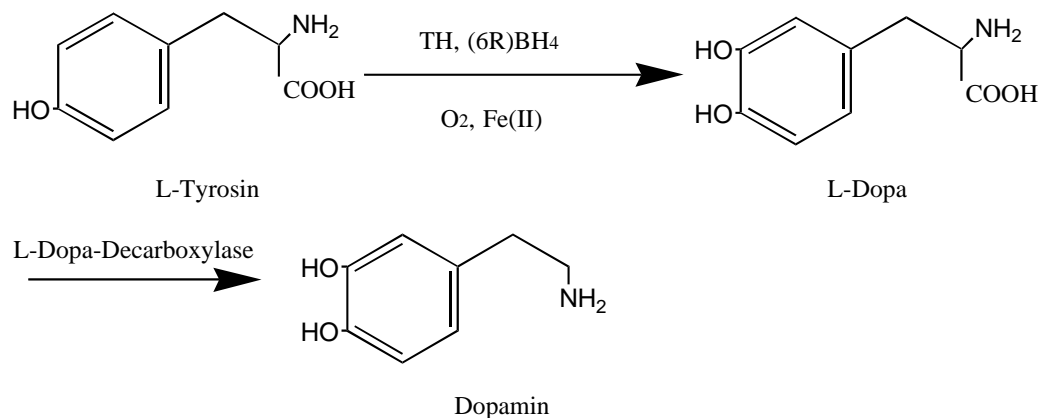


Abb. 1: Zu sehen ist zuerst die von der Tyrosinhydroxylase katalysierte Umwandlung von L-Tyrosin zu L-Dopa. Als Substrate dienen L-Tyrosin und O₂, als Kofaktoren Eisen-(II)-Ionen und (6R)-BH₄. Im 2. Schritt wird L-Dopa zu Dopamin decarboxyliert.

Das Enzym Tyrosinhydroxylase ist wegen seiner großen Bedeutung für den Katecholamin- und damit auch den Dopaminstoffwechsel eines der am besten untersuchten Enzyme überhaupt. Sowohl die molekulare Struktur als auch der genetische Code dieses Enzyms wurden inzwischen ermittelt (Nagatsu et al., 1993). Sowohl beim Menschen als auch bei

der Ratte ist die TH ein Proteintetramer, das aus 4 Untereinheiten zusammengesetzt ist (Scholz und Moser, 1998). Jede dieser Untereinheiten verfügt über ein C-terminales katalytisches Zentrum und ein N-terminales regulatorisches Zentrum.

Im katalytischen Zentrum werden die in Abbildung 2 dargestellten verschiedenen Substrate und Kofaktoren gebunden, die für die Hydroxylierung von L-Tyrosin zu L-Dopa benötigt werden. In der N-terminalen regulatorischen Region kann hingegen die enzymatische Aktivität der TH moduliert werden (Scholz und Moser, 1998).

Lokalisiert ist die TH im Zytoplasma katecholaminerger Neurone sowie chromaffiner Zellen des Nebennierenmarks (Hirata, 1998). Innerhalb der Neurone soll sie vor allem in den Nervenendigungen lokalisiert sein (Hucho, 1982).

Für den in den Synapsen freigesetzten Neurotransmitter Dopamin existieren verschiedene Abbauewege. Daneben ist allerdings auch eine Rückaufnahme in die dopaminergen Neurone über das Dopamin-Wiederaufnahmesystem möglich. Der wichtigste Abbaueweg ist die oxidative Desaminierung von Dopamin mit Hilfe des Enzyms Monoaminoxidase (Monoamin: Sauerstoff-Oxidoreduktase (desaminierend), E.C. 1.4.3.4; MAO) sowie die anschließende Oxidation des Zwischenproduktes zu 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure (DOPAC):

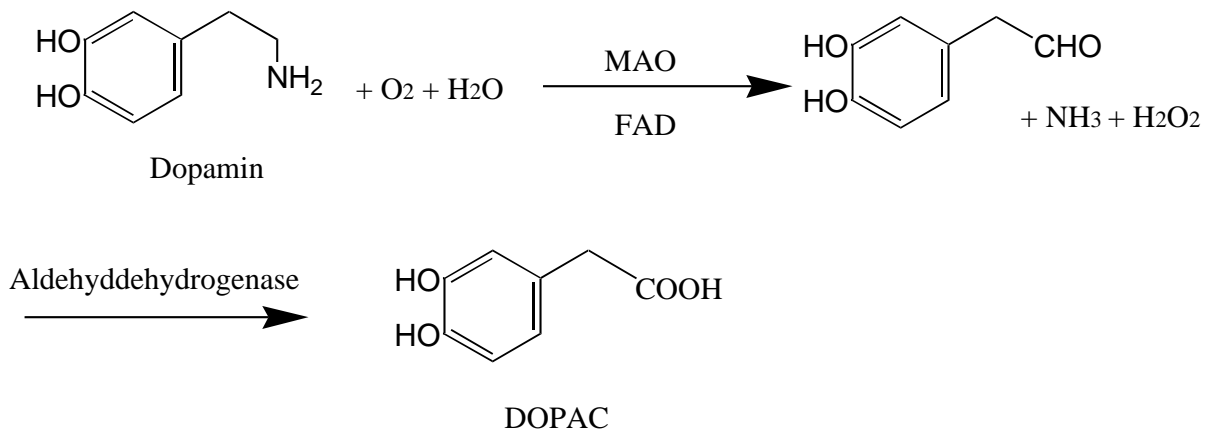


Abb. 2: Die erste Reaktion zeigt die von der MAO katalysierte oxidative Desaminierung von Dopamin. Benötigt wird für diese Reaktion ein Flavinkofaktor (FAD), als Nebenprodukt dieser Reaktion entsteht H₂O₂. Aus dem Zwischenprodukt entsteht im 2. Reaktionsschritt DOPAC.

DOPAC kann nun von der hauptsächlich im Extrazellularraum lokalisierten Catechol-O-Methyltransferase (EC 2.1.1.6; COMT) zu Homovanillinsäure (HVA), einem weiteren wichtigen Dopaminmetaboliten, umgewandelt werden:

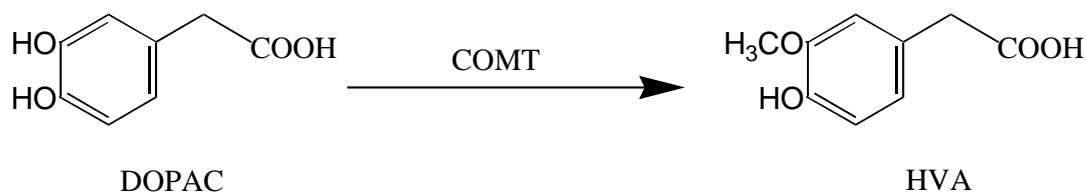


Abb. 3: Die von der COMT katalysierte Umwandlung von DOPAC zu HVA.

1.6: Die Neurotoxin-Hypothese zur Pathogenese des Morbus Parkinson

Von einigen wenigen Ausnahmefällen abgesehen (Patienten mit bekannter Genmutation oder MPTP-Exposition, s.u.), ist die Ursache der Zelldegeneration, die zum Morbus Parkinson führt, weiterhin unbekannt. Aus heutiger Sicht handelt es sich wahrscheinlich um ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren, vor allem von Alterungsprozessen, genetischer Disposition und den Auswirkungen von Neurotoxinen.

Eine wichtige Richtung der modernen Parkinsonforschung beruht auf der Theorie, dass Neurotoxine an der Pathogenese dieser Erkrankung beteiligt sind. Die Untersuchung eines solchen endogenen Toxins, nämlich N-Methyl-Norsalsolinol, ist das Thema dieser Arbeit.

Ende der 70er Jahre trat bei einigen Personen, die sich selbst synthetisierte Opiate intravenös verabreicht hatten, ein irreversibles, L-Dopa-sensitives Parkinson-Syndrom auf (Davies et al., 1979). Histologisch zeigte sich eine umschriebene Degeneration der dopaminergen Neurone der SN. Im Unterschied zum idiopathischen Morbus Parkinson konnten in überlebenden Neuronen jedoch keine Lewy-Körper nachgewiesen werden, und es fand sich auch keine Beteiligung extranigraler Strukturen.

Als auslösende Substanz wurde später das Meperidin-Analogon 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP; siehe Abb. 1, S.15) identifiziert (Langston et al., 1983). Eine systemische Verabreichung von MPTP löste auch bei Primaten einen selektiven Zelluntergang der dopaminergen Neurone ausschließlich in der SN aus (Burns et al., 1983).

Am Beispiel des MPTP lassen sich sehr schön die verschiedenen möglichen Wirkmechanismen eines selektiv die dopaminergen Zellen schädigenden Neurotoxins darstellen. Seine Toxizität erklärt man sich heute folgendermaßen:

Als lipophile Substanz kann MPTP die Blut-Hirn-Schranke ungehindert überqueren. Im Hirn wird es, vermutlich in Gliazellen und serotonergen Neuronen (McNaught et al., 1998), mit Hilfe des dort lokalisierten Enzyms MAO B in seinen aktiven toxischen Metaboliten, das 1-Methyl-4-Phenylpyridiniumion (MPP^+), umgewandelt (Chiba et al., 1984).

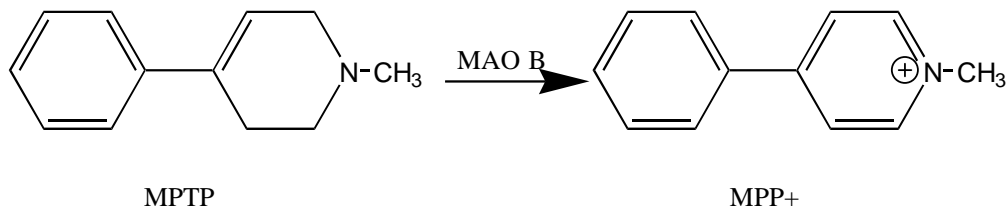


Abb. 4: MPTP und sein aktiver Metabolit MPP^+ .

MPP^+ wird nun über das Dopamin-Wiederaufnahmesystem selektiv von den dopaminergen Neuronen der SN aufgenommen (Javitch et al., 1985). Innerhalb der Zellen entfaltet es seine toxische Wirkung nun folgendermaßen:

Im Zytosol der dopaminergen Neurone hemmt MPP^+ die TH, das Schlüsselenzym der Dopaminsynthese (siehe Abschnitt 1.5), und bewirkt somit einen Abfall der Gewebkonzentration von Dopamin und seinen Metaboliten in den Basalganglien (Hirata und Nagatsu, 1985).

Außerdem wird MPP^+ innerhalb der dopaminergen Neurone energieabhängig in die Mitochondrien aufgenommen (Ramsay und Singer, 1986). Dort inhibiert es den Zitratzyklus und die mitochondriale Atmungskette (Mizuno et al., 1987; Cleeter et al., 1992). Dies führt zu einer Behinderung der zellulären Energiegewinnung in Form von ATP. Diese Energieverarmung der dopaminergen Neurone bewirkt eine Beeinträchtigung ihres Funktions- und Strukturstoffwechsels. Weiterhin kommt es intrazellulär zur vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wie Superoxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$) und Hydroxylradikalen ($\text{OH}\cdot$), was weitere Schädigungen der betroffenen Neurone nach sich zieht (Sun und Chen, 1998).

All diese Mechanismen sollen in ihrer Gesamtheit letztlich den Zelltod dopaminergener Neurone und das Auftreten des Parkinson-Syndroms nach Gabe von MPTP erklären (McNaught et al., 1998).

Die Entdeckung von MPTP war ein Meilenstein in der Erforschung der Ätiologie der Parkinson-Krankheit. Zum ersten Mal wurde ein einzelner chemischer Auslöser für ein klinisch dem Morbus Parkinson gleichendes Krankheitsbild gefunden. Das führte zur Suche nach strukturell ähnlichen chemischen Substanzen, die möglicherweise ebenso das dopaminerge nigrostriatale System schädigen und somit an der Entstehung des Morbus Parkinson beteiligt sein könnten.

1.7: N-Methyl-Norsalsolinol

N-Methyl-Norsalsolinol (2-Methyl-6,7-Dihydroxy-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin; N-M-Norsal) ähnelt strukturell dem MPTP. Seine Auswirkungen auf den Dopaminstoffwechsel bei der Ratte werden in dieser Arbeit untersucht.

Anfang der 90er Jahre wurde N-M-Norsal erstmals im menschlichen Hirn identifiziert, und zwar sowohl bei Parkinson-Patienten als auch bei gesunden Kontrollpersonen (Niwa et al., 1991). N-M-Norsal wurde auch im Liquor von Parkinsonpatienten, jedoch nicht von gesunden Kontrollpersonen, nachgewiesen (Moser und Köpff, 1992).

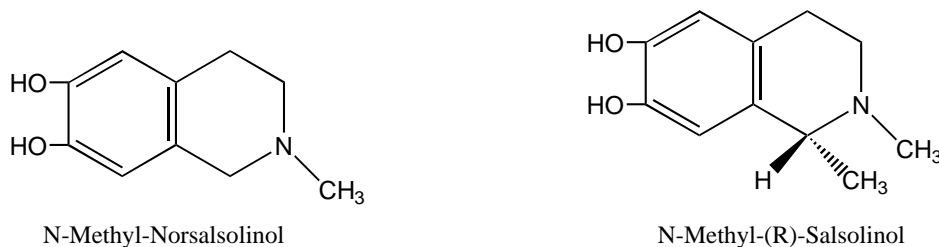


Abb. 5: N-Methyl-Norsalsolinol und N-Methyl-(R)-Salsolinol. Man beachte die strukturelle Ähnlichkeit zu MPTP (Abb. 4) und Dopamin (Abb. 1).

Als wichtigster endogener Syntheseweg für N-M-Norsal im Gehirn dient vermutlich die Pictet-Spengler-Kondensationsreaktion (Collins, 1980). Hierbei wird Dopamin als einer der Ausgangsstoffe angenommen (Niwa et al., 1998).

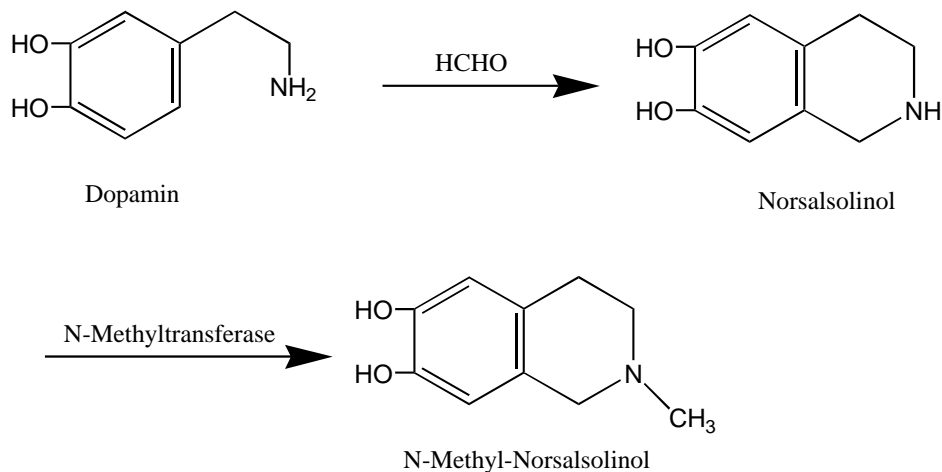


Abb. 6: Vermutlicher endogener Syntheseweg für N-M-Norsal im Hirn. Zuerst erfolgt die Pictet-Spengler-Kondensation von Dopamin und Formaldehyd (HCHO) zu Norsalsolinol, anschließend die Methylierung von Norsalsolinol zu N-M-Norsal.

Zu dieser nicht enzymatischen Synthese von N-M-Norsal aus Dopamin kommt es bei Parkinsonpatienten vermutlich im Rahmen eines hochregulierten, atypischen Dopaminstoffwechsels in den überlebenden dopaminergen Neuronen (Moser et al., 1995; Moser, 1998). N-M-Norsal kann die Blut-Hirn-Schranke in gewissem Umfang überschreiten (Thümen et al., 2002). Somit ist prinzipiell auch eine exogene Zufuhr ins Hirn möglich. Wahrscheinlich dürfte die endogene Synthese von N-M-Norsal im Hirn aber trotzdem größere Bedeutung besitzen.

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von N-M-Norsal mit MPTP und dem Nachweis dieser Substanz im Hirn von Parkinsonpatienten stellt sich nun die Frage, in wieweit diese Substanzen an der Pathogenese des Morbus Parkinson beteiligt sein könnten. In einer Vorarbeit wurde festgestellt, dass N-M-Norsal, ähnlich wie MPTP, durch die MAO zu einem positiv geladenen Ion oxidiert werden kann (Moser und Kömpf, 1992). Somit ist eine weitere Voraussetzung für eine mögliche toxische Wirkung dieser Substanz auf dopaminerge Neurone oder für eine Beeinflussung des Dopaminstoffwechsels gegeben.

Tatsächlich konnte *in vitro* ein Hemmeffekt von N-M-Norsal auf wichtige Enzyme des Dopaminstoffwechsels nachgewiesen werden. Die Aktivität der MAO (Minami et al., 1993; Moser et al., 1996a) und auch die der TH (Scholz et al., 1997) wurde *in vitro* durch N-M-Norsal gehemmt. Ein inhibitorischer Effekt auf die TH ist auch bei MPTP bekannt (Hirata und Nagatsu, 1985). Sollte eine Hemmung der TH durch N-M-Norsal auch *in vivo* bei Parkinsonpatienten erfolgen, könnte dies zum Absinken der striatalen

Dopaminkonzentration und somit zur Pathogenese dieser Erkrankung beitragen (Scholz et al., 1997).

Es wurde auch bereits versucht, mit Hilfe stereotaktischer Injektionen von N-M-Norsal in das Gehirn von Ratten die Auswirkungen dieser Substanz auf das nigrostriatale System sowie auf den Dopaminstoffwechsel am Tiermodell *in vivo* zu untersuchen. Hierbei konnten allerdings keine signifikanten *in vivo*-Wirkungen von N-M-Norsal auf die Zahl der dopaminergen Neurone und auf die Konzentrationen von Dopamin und seinen Metaboliten in den Basalganglien festgestellt werden (Moser et al., 1996c). Dies steht im Widerspruch zu den *in vitro* erzielten Hemmeffekten dieser Substanz auf wichtige Enzyme des Dopaminstoffwechsels wie die TH oder die MAO. Ein Ziel des aktuellen Projektes ist es, diese Diskrepanz aufzuklären.

Die dem N-M-Norsal strukturell eng verwandte und ebenfalls beim Menschen nachgewiesene Substanz N-Methyl-(R)-Salsolinol (Abb. 5, S.16) wurde in den letzten Jahren von einer japanischen Arbeitsgruppe sehr ausführlich untersucht. Hierbei zeigten sich *in vivo* biochemische und histologische Veränderungen, die dem Bild beim Morbus Parkinson des Menschen ähnelten (Naoi et al., 1996). Ein weiteres Ziel des vorliegenden Projektes ist somit der Vergleich der *in vivo*-Wirkungen von N-M-Norsal auf den Dopaminstoffwechsel der Ratte mit denen von N-Methyl-(R)-Salsolinol.

1.8 Das in diesem Projekt verwendete Parkinson-Modell

Ein prinzipielles Problem der Erforschung der Parkinson-Krankheit ist die Tatsache, dass diese Erkrankung bei Tieren nicht spontan auftritt (Gerlach und Riederer, 1996). Ersatzweise bedient man sich verschiedener Toxine, um am Tiermodell künstlich die hauptsächlichsten biochemischen und pathologischen Merkmale des Morbus Parkinson zu erzeugen.

In diesem Projekt wurde die Substanz N-Methyl-Norsalsolinol stereotaktisch einseitig in das linke MFB injiziert (wie in Moser et al., 1986, und in Moser et al., 1996c).

N-M-Norsal wird anschließend über das Dopamin-Transportsystem selektiv in die dopaminergen Neurone aufgenommen und innerhalb der Axone retrograd in die in SN bzw. VTA gelegenen Perikaryen transportiert. Durch anterograden Transport werden auch die axonalen Enden im Striatum (CP, ACB) erreicht, wo die TH hauptsächlich lokalisiert ist und somit auch der größte Teil der Dopaminsynthese stattfindet. Der Vorteil dieses

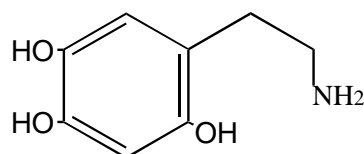
Injektionsortes gegenüber den anderen möglichen Injektionsorten Striatum bzw. SN ist, dass bei einer Injektion in das MFB weder in der SN noch im CP Schäden durch die stereotaktische Operation selbst entstehen. Da diese Hirnregionen die Orte sind, in denen später die Untersuchungen zum Dopaminstoffwechsel durchgeführt werden, würde ansonsten die Frage zu stellen sein, welcher Anteil möglicher Effekte dem Toxin selbst und welcher Schäden durch die Operation zuzuschreiben sind. Allerdings werden SN und CP natürlich auch durch eine Injektion in das MFB geschädigt. Außer Acht lassen sollte man die Operationsschäden bei einem derartigen Tiermodell also in keinem Fall.

Eine einseitige Injektion wurde vorgenommen, um die Messergebnisse auf der operierten Seite mit denen der gesunden Seite besser vergleichen zu können. Da die Fasern des MFB nicht auf die Gegenseite kreuzen, sind Effekte der injizierten Toxine ausschließlich auf der operierten Seite zu erwarten.

Als negative Kontrolle wurde einigen Tieren lediglich sterile NaCl-Lösung stereotaktisch injiziert. Damit sollte festgestellt werden, welche Veränderungen allein durch die stereotaktische Operation entstehen. Als positive Kontrolle wurde einer anderen Gruppe von Versuchstieren das bekannte Toxin 6-Hydroxydopamin injiziert (siehe 1.10).

Ein solches Tiermodell des Morbus Parkinson hat allerdings auch seine Grenzen. Es beschränkt sich auf das nigrostriatale System, während bei der menschlichen Parkinson-Krankheit auch andere Zellsysteme befallen sind (siehe 1.2). Außerdem sind auch die anatomischen Unterschiede zwischen Mensch und Ratte zu beachten.

1.9: 6-Hydroxydopamin



6-Hydroxydopamin (6-OHDA)

Abb. 7: Die chemische Struktur von 6-Hydroxydopamin (6-OHDA)

6-Hydroxydopamin (6-OHDA) wurde erstmals in den 60er Jahren zur Erforschung des autonomen Nervensystems verwendet (Porter et al., 1963). 6-OHDA kann wie Dopamin nach systemischer Gabe die Blut-Hirn-Schranke nicht überqueren (Gerlach und Riederer, 1996). Nach direkter Applikation in verschiedene Hirnstrukturen bewirkte 6-OHDA eine

selektive Zerstörung katecholaminerger und somit auch dopaminerger Neurone (Ungerstedt, 1968; Uretsky und Iversen, 1970). Im Hirngewebe verminderten sich außerdem die Konzentrationen von Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin (Zigmond und Stricker, 1989).

Aufgrund dieser Toxizität von 6-OHDA gegenüber dopaminergen Neuronen wird diese Substanz schon seit längerer Zeit zur Erzeugung experimenteller Läsionen der dopaminergen nigrostriatalen Bahn und somit von Tiermodellen des Morbus Parkinson genutzt. Auch eine einseitige Läsion der dopaminergen Neurone durch einseitige stereotaktische Injektion von 6-OHDA in das mediale Vorderhirnbündel von Ratten wurde bereits experimentell erzeugt (z.B. Zuch et al., 2000).

Die neurotoxische Wirkung von 6-Hydroxydopamin beruht nach heutiger Ansicht wahrscheinlich auf folgenden Mechanismen: Zunächst wird diese Substanz vom Wiederaufnahme-Transportsystem für Katecholamine in die entsprechenden Neurone aufgenommen, was ihre selektive Toxizität für katecholaminerge Neurone erklärt (Gerlach und Riederer, 1996). In diesen Zellen soll 6-OHDA nun über die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikalen Zellschädigungen verursachen (Sachs und Jonsson, 1975).

In diesem Projekt wurde 6-Hydroxydopamin als Testsubstanz verwendet, um sicherzustellen, dass die Versuchsbedingungen dazu geeignet sind, eventuelle toxische Effekte von N-Methyl-Norsalsolinol auch tatsächlich nachzuweisen. Wenn es bei dem hier verwendeten Tiermodell gelingt, bei den mit 6-OHDA behandelten Tieren eine deutliche Läsion der nigrostriatalen dopaminergen Bahn zu erzeugen und somit die vielfachen Vorergebnisse (s.o.) zu bestätigen, dann ist davon auszugehen, dass die Versuche valide durchgeführt und somit die Ergebnisse verwertbar sind.

1.10: Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit soll einen Beitrag zur Erforschung der Ätiologie des Morbus Parkinson leisten.

Möglicherweise sind endogene und exogene Neurotoxine an der Entstehung dieser Erkrankung beteiligt. In diesem Projekt wurde N-Methyl-Norsalsolinol (N-M-Norsal) untersucht. Diese vermutlich endogene Substanz wurde im Hirngewebe (Niwa et al., 1991) sowie im Liquor (Moser und Kömpf, 1992) von Parkinsonpatienten nachgewiesen. Sie weist strukturelle Ähnlichkeiten mit bekanntermaßen toxischen Verbindungen wie MPTP auf, die ein Parkinson-Syndrom beim Menschen auslösen können.

In vorangegangenen Projekten konnten *in vitro* inhibitorische Effekte von N-Methyl-Norsalsolinol auf wichtige Enzyme des Dopaminstoffwechsels, u.a. auf die Tyrosinhydroxylase (Scholz et al., 1997) nachgewiesen werden.

Ziel dieser Arbeit war es nun, die *in vivo*-Auswirkungen von N-M-Norsal auf den Dopaminstoffwechsel sowie auf die Gewebkonzentration und die mRNA-Expression der Tyrosinhydroxylase (TH), des Schlüsselenzyms der Dopaminsynthese, zu untersuchen.

Dies geschah am Tiermodell der Ratte im Vergleich zu einem etablierten chemisch-toxischen Parkinson-Modell.

Auch der zeitliche Verlauf der durch N-M-Norsal ausgelösten Veränderungen und mögliche kompensatorische Mechanismen als Reaktion auf den Dopaminmangel (z.B. eine vermehrte mRNA-Expression der TH) sollten erforscht werden. Und schließlich sollten die *in vivo*-Auswirkungen von N-M-Norsal mit denen der verwandten Substanz N-Methyl-(R)-Salsolinol (Naoi et al., 1996) und denen des bekannten Neurotoxins 6-Hydroxydopamin verglichen werden.

2. Material

2.1 Stereotaktische Injektionen

a) Chemikalien:

Aqua ad iniectabilia: B. Braun, Melsungen, Deutschland

Ascorbinsäure: Sigma Aldrich GMBH, Deisenhofen, Deutschland

Augmentan 1,2 g: GlaxoSmithKline GMBH, München, Deutschland

Cutasept F: Bode Chemie GMBH, Hamburg, Deutschland

6-Hydroxydopamin (6-OHDA): Sigma Aldrich GMBH

2-Methyl-6,7-Dihydroxy-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin (N-Methyl-Norsalsolinol): ICN Pharmaceuticals GMBH, Meckenheim, Deutschland

Pentobarbital-Natrium (53,33 mg Pentobarbital/ml): Apotheke UK-SH, Campus Lübeck, Lübeck, Deutschland

Ringerlösung: B. Braun

b) Lösungen und Puffer:

Augmentan-Infusionslösung:

1,2 g Augmentan in 31 ml Aqua ad iniectabilia lösen; 100 mg Wirkstoff/kg Körpergewicht intraperitoneal injizieren.

N-M-Norsal-Injektionslösung:

40 µg N-M-Norsal und 2 µg Ascorbinsäure (als Antioxidans) in 2,5 µl NaCl 0,9 % lösen.

6-OHDA-Injektionslösung:

8 µg 6-OHDA und 2 µg Ascorbinsäure in 2,5 µl NaCl 0,9 % lösen.

Kontroll-Injektionslösung:

2 µg Ascorbinsäure in 2,5 µl NaCl 0,9 % lösen.

c) Geräte und sonstiges Material:

Stereotaxierahmen: AD Krauth, Hamburg, Deutschland

Bohrer: Fine Science Tools Inc., Heidelberg, Deutschland

Hamilton-Spritze (10 µl): Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz

2.2 Präparation und Homogenisation von nativem Hirngewebe

a) Chemikalien:

Di-Natriumhydrogenphosphat: Merck KG, Darmstadt, Deutschland

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH₂PO₄*H₂O): Merck KG

Natriumhydroxidlösung (NaOH): Merck KG

b) Lösungen und Puffer:

Natriumphosphatpuffer (zur Präparation und Homogenisation von Hirngewebe):

Als Homogenisationspuffer wurde ein 100 mM Natriumphosphatpuffer verwendet (80 mM Di-Natriumhydrogenphosphat (11,4 g/l Puffer) und 20 mM Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (2,7 g/l Puffer) in destilliertem Wasser). Der pH-Wert wurde mit 8 %iger Natriumhydroxidlösung auf 7,4 eingestellt.

c) Geräte und sonstiges Material:

Glas-Teflon-Homogenisator (1 ml): Wheaton, Millville, New Jersey, USA

Kühlzentrifuge: 2 KD, Sigma Laborzentrifugen GMBH, Osterode, Deutschland

pH-Meter: Typ 761, Firma Knick, Berlin, Deutschland

Ultraschall-Homogenisator: Vibra Cell, Fisher Bioblock Scientific, Illkirch Cedex, Frankreich

2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration im Homogenat

a) Chemikalien: -

b) Lösungen und Puffer:

Kit für Proteinbestimmung im Hirnhomogenat (BCA-Kit):

BCA Protein Assay Kit, Pierce, Rockford, Illinois, USA

Albuminstandard-Ampullen (aus BCA-Kit):

1 ml-Ampullen, die 2,0 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA), gelöst in 0,9 % NaCl und 0,05 % Natriumazid, enthalten.

BCA-Reagenz A (aus BCA-Kit):

500 ml Reagenz, das Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Bicinchoninsäure (BCA) und Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxid enthält.

BCA-Reagenz B (aus BCA-Kit):

25 ml Reagenz, das 4 % Kupfersulfat enthält.

c) Geräte und sonstiges Material:

Photometer: PM Q II, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Wasserbad: Typ 1012, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland

2.4 Bestimmung von Dopamin, DOPAC und HVA im Homogenat durch HPLC

a) Chemikalien:

Dopamin: Sigma Aldrich GMBH

3,4-Dihydroxyphenylethylsäure (DOPAC): Sigma Aldrich GMBH

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA): Merck KG

Essigsäure (CH₃COOH): Merck KG

HPLC-Wasser: Merck KG

Homovanillinsäure (HVA): Sigma Aldrich GMBH

Natriumacetat (C₂H₃O₂Na*3H₂O): Merck KG

Natrium-Octansulfonsäure: Sigma Aldrich GMBH

Methanol *pro analysi*: Merck KG

b) Lösungen und Puffer:

Eluent (mobile Phase) für die Metaboliten-HPLC:

Für 1 Liter Eluent wurden 12,31 g Natriumacetat (Endkonzentration 0,15 M), 0,014 g EDTA, 0,0321 g 1-Natrium-Octansulfonsäure sowie 120 ml Methanol (Endkonzentration 12 % (v/v)) in 880 ml HPLC-Wasser gelöst und der pH-Wert mit Essigsäure auf 4,00 eingestellt. Vor der Verwendung wurde der Eluent für 10 Minuten mit Helium entgast.

c) Geräte und sonstiges Material:

Feinwaage zum Abwiegen: Sartorius research, Göttingen, Deutschland

Chromatographiesäule C18 (Europher RP, Partikelgröße 5 µm, 250 X 4,0mm), Vorsäule (35 X 4,00 mm): Firma Knauer, Berlin, Deutschland

Elektrochemischer Detektor: Typ 656, Firma Metrohm, Herisau, Schweiz

HPLC-Pumpe Typ 64, Säulenofen und Ofenkontrolleinheit: Firma Knauer

pH-Meter: Typ 761, Firma Knick

2.5 TH-Proteinbestimmung im Homogenat durch Western-Blots

a) Chemikalien:

Anti-Tyrosinhydroxylase-Antikörper (Maus): Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland

Bromphenolblau: Merck KG

Chemilumineszenzlösung (ECL): ECL western blotting reagents, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland

Dithiothreitol (DTT): Gibco BRL, Grand Island, New York, USA

Entwicklerkonzentrat: Kodak GBX Entwickler (Sigma Aldrich GMBH)

Ethylendiamintetraessigsäure * 2 H₂O (EDTA): Merck KG

Fixiererkonzentrat: Kodak GBX Fixierer (Sigma Aldrich GMBH)

Glycerol 10 %: Merck KG

Glycin: Merck KG

Magermilchpulver: Carl Roth GMBH, Karlsruhe, Deutschland

Meerrettich-Peroxidase(HRP)-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper (IgG, Schaf): ECL anti-mouse IgG, Amersham Pharmacia Biotech

Methanol pro analysi: Merck KG

NaCl (rein): Merck KG

Natriumdodecylsulfat rein (SDS): Fluka Biochemica, Buchs, Schweiz

Ponceau S Solution (0,1 % Ponceau S (w/v) in 5 % Essigsäure): Sigma Aldrich GMBH

Salzsäure (HCl) 1M: Merck KG

Tris-HCl ultrarein (Tris = Abk. für Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan): ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA

Tween 20 %: Merck-Schuchard, Hohenbrunn, Deutschland

b) Lösungen und Puffer:

Lösung für die Chemilumineszenz:

Für die auf die Blotmembranen gegebene Lösung wurden die ECL-Reagenzien 1 und 2 (aus den ECL western blotting reagents, s.o.) im Verhältnis 1:1 gemischt.

Laufpuffer (auch als „Elektrodenpuffer“ bezeichnet):

Für 1 Liter Puffer wurden 6,0 g Tris-HCl (Endkonzentration 50 mM), 28,7 g Glycin (Endkonzentration 380 mM) und 1,0 g SDS (Endkonzentration 0,1 %) in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst. Der pH stellt sich auf 8,8 ein.

Laemmli-Puffer (doppelt konzentriert):

Für 100 ml Puffer 3 g Tris-HCl (Endkonzentration 250 mM), 4 g SDS (Endkonzentration 4 %), 20 g Glycerol 10 % (2 %), 74 mg EDTA (2mM) und 4 ml 1M DTT (40 mM) in 50 ml destilliertem Wasser lösen und den pH mit 1M HCl auf 6,80 einstellen. Dann 4 ml Bromphenolblau-Stammlösung (0,5 % in H₂O) hinzugeben und mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100 ml auffüllen

1 M DTT-Lösung:

3,1 g DTT in 20 ml destilliertem Wasser lösen, anschließend filtrieren und bei -20 °C lagern.

Towbin-Puffer (zum Blotten):

Für 1 Liter Puffer 3 g Tris-HCl (25 mM), 14,4 g Glycin (192 mM) und 1,0 g SDS (Endkonzentration 0,1 %) zunächst in 750 ml destilliertem Wasser lösen. Kurz vor der Verwendung 200 ml Methanol (20 % (v/v)) hinzugeben und mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1000 ml auffüllen. Der pH stellt sich bei 8,3 ein.

Tris-gepufferte Salzlösung (TBS):

Für 1 Liter Puffer 8 g NaCl, 0,2 g KCl und 2 g Tris zunächst in 800 ml destilliertem Wasser lösen. Dann den pH mit 1M HCl auf 7,5 einstellen, mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von einem Liter auffüllen und vor Verwendung autoklavieren.

Mit Tween versetzte TBS (TBST):

Für 1 Liter TBST 10 ml Tween 20 % (Endkonzentration 0,2 %) mit TBS auf 1 Liter Gesamtvolumen auffüllen.

Entwickler für die Radiofilme:

828 ml Entwickler-Konzentrat mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 3,8 l verdünnen.

Fixierer für die Radiofilme:

828 ml Fixierer-Konzentrat mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 3,8 l verdünnen.

c) Geräte und sonstiges Material:

Autoklave: Dargatz

Blotmodul: *mini VE Blotter*, Hoefer Pharmacia Biotech, San Francisco, USA

Elektrophoresekammer: *mini VE complete*, Amersham Pharmacia Biotech

Filmkassette zum Exponieren von Röntgenfilmen: Sigma Aldrich GMBH

Gele für die Elektrophorese: NOVEX *precast gels* (10 % Tris-Glycin-Gele, Dicke 1,5 mm, Länge x Höhe 8 x 8 cm; die Gele enthalten also 10 % Acrylamidmonomere, davon 2,6 % des Vernetzers Bis-Acrylamid), Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Hamilton-Spritze (25 µl): Hamilton Bonaduz AG

Heizplatte: Magnetomix, Colora Messtechnik GmbH, Lorch, Deutschland

Hyperfilm ECL: Amersham Pharmacia Biotech

Mikrozentrifuge: Centrifuge 5415D, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Nitrozellulosemembran: *Nitrocellulose membrane Filter Sandwich*, Porengröße 0,2 µm, NOVEX, San Diego (California), USA

Filterpapier zum Blotting: *Blotting Paper*, 9 x 10,5 cm, Hoefer Pharmacia Biotech

PH-Meter: Typ 761, Firma Knick

Scanner: Kaiser proLite scan SC, Kaiser Fototechnik GmbH, Buchen, Deutschland

Schüttler: Unimax 1010, Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland

Stromgeber für die Elektrophorese: *Electrophoresis Power supply EPS 301*, Amersham Pharmacia Biotech

2.6 Transkardiale Perfusionsfixation der Hirne für die In situ-Hybridisierung

a) Chemikalien:

Isopentan: Fluka Chemika, Neu-Ulm, Deutschland

Liquemin: Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland

Di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat (Na₂HPO₄*12H₂O): Merck KG

NaCl (rein): Merck KG

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH₂PO₄*H₂O): Merck KG

Natriumhydroxid (NaOH) : Merck KG

Paraformaldehyd (reinst): Merck KG

Pentobarbital-Natrium (53,33 mg Pentobarbital/ml): Apotheke UK-SH, Campus Lübeck

Ringerlösung: B. Braun, Melsungen, Deutschland

Saccharose: Merck KG

b) Lösungen und Puffer:

heparinisierte Ringer-Lösung zur Bluttausspülung :

1000 ml Ringerlösung, mit 10000 IE Liquemin versetzt.

Paraformaldehyd (PFA) 4 %:

8 g Paraformaldehyd wurden in 200 ml PBS 0,1 M bei 60 °C mit Hilfe eines Plättchen Natriumhydroxid gelöst, anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und filtriert.

Saccharose 30 % in PBS:

Pro 100 ml 30 g Saccharose in PBS 0,1 M lösen.

PBS-Puffer 0,1 M:

PBS-Stammlösung (fünffach konzentriert):

In 1000 ml destilliertem Wasser

NaCl	45 g
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	1,352 g
Na ₂ HPO ₄ *12H ₂ O	14,307 g

lösen. Die PBS-Gebrauchslösung wurde aus der Stammlösung durch 1:5-Verdünnung erzeugt; ihr pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

c) Geräte und sonstiges Material:

pH-Meter: Typ 761, Firma Knick

2.7 Anfertigung von Kryoschnitten

a) Chemikalien:

Einbettmedium: Tissue Tek, Firma Miles Inc., Elkhart, USA

b) Lösungen und Puffer: -

c) Geräte und sonstiges Material:

Deckgläser: #1, Größe 24*50 mm, Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland

Kryotom: LEICA CM 3050, Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Deutschland

Objektträger: silanisierte Objektträger, Sigma Aldrich GMBH

2.8 In situ-Hybridisierung der TH-mRNA auf Kryoschnitten von SN und VTA

a) Chemikalien:

Ammoniumacetat (NH₄-Acetat) 6 M: Merck KG

[35S]-dATP: Amersham Pharmacia Biotech

Cacodylat-Puffer: Amersham Pharmacia Biotech (aus dem *3`-end labelling kit*)

Chloroform *pro analysi*: Merck KG

Denhardsche Lösung: Sigma Aldrich GMBH (*Denhard`s solution*; 50-fach konzentriert; enthält 5 g Polyvinylpyrrolidin, 5 g Rinderserumalbumin, 5 g Ficoll und 500 µl DEPC-Wasser)

Dextransulfat 50 %: Eppendorf-Netheler-Hinz GMBH, Hamburg, Deutschland

Diethylpyrocarbonat (DEPC): Sigma Aldrich GMBH

Dithiothreitol (DTT): Gibco BRL

Entwickler: Kodak GBX Entwickler (Sigma Aldrich GMBH)

Essigsäureanhydrit: Sigma Aldrich GMBH

Ethanol absolut *pro analysi*: Merck KG

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 0,5 M, pH 8,0: Gibco BRL

Fixierer: Kodak GBX Fixierer (Sigma Aldrich GMBH)

Formamid: Sigma Aldrich GMBH

Hefe-tRNA (25 mg/ml): Gibco BRL

Lachshoden-DNA (10mg/ml): Sigma Aldrich GMBH

NaCl 5 M: Sigma Aldrich GMBH

Natriumacetat (C₂H₃O₂Na*3H₂O): Merck KG

Natriumdodecylsulfat (SDS) 10 %: Gibco BRL

Natriumhydroxid (NaOH): Merck KG

Paraformaldehyd (reinst): Merck KG

Proteinase K: Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

Salzsäure (HCl) reinst 32 %: Merck KG

SSC-Puffer 20 x: Gibco BRL (3,0 M NaCl +0,3 M Natriumzitat, pH 7,0)

Terminale Transferase (Abk. TdT): Amersham Pharmacia Biotech (aus dem *3`-end-labelling kit*)

TH₁-Antisense-DNA-Sonde (100 pmol/µl): Gibco BRL

Triethanolamin (Abk. TEA): Sigma Aldrich GMBH

Tris-HCl-Puffer (pH 7,4): (Tris = Abk. für Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan): Sigma Aldrich GmbH

Wasser (supplied): Amersham Pharmacia Biotech (aus dem 3'-end-labelling kit)

b) Lösungen und Puffer:

DEPC-Wasser:

Pro Liter destilliertem Wasser 1 ml DEPC hinzugeben, die Lösung vor Benutzung in einer Glasflasche mit leicht angedrehtem Deckel über Nacht unterm Abzug stehen lassen; am nächsten Tag die Flaschen im Autoklaven für 15 min bei 120 °C autoklavieren.

Hybridisierungspuffer für die In situ-Hybridisierung:

Den Puffer immer frisch ansetzen (in einem 15 ml Eppendorfgefäß). Für ein Endvolumen 9 ml (ergibt später 10 ml Hybridisierungsmix)

1. 200 µl 1M Tris, pH 7,5 (Endkonzentration im Hybridisierungsmix 20 mM)
2. 5 ml Formamid (Endkonzentration 50 %)
3. 600 µl 5 M NaCl (Endkonzentration 0,3 M)
4. 20 µl 0,5 M EDTA (Endkonzentration 1 mM)
5. 200 µl 50-fache Denhardsche Lösung (Endkonzentration: einfach)
6. 2 ml 50 % Dextransulfat (Endkonzentration 10 %)
7. 980 µl DEPC-H₂O

zusammenpipettieren und gut durchmischen.

Hybridisierungsmix für die In situ-Hybridisierung:

Für 10 ml Hybridisierungsmix

1. 10 µl Oligonukleotid-DNA Sonde (Endkonzentration: 1 pmol/l)
2. 20 µl Ribomix (Endkonzentrationen: Lachshoden-DNA 100 µg/ml, Hefe-tRNA 250 µg/ml)
3. 900 µl Hybridisierungspuffer (s.o.)
4. 60 µl 2,5 M DTT (Endkonzentration 150 mM)
5. 20 µl 10 % SDS (Endkonzentration 0,2 %)

zusammenpipettieren, gut durchmischen und evtl. kurz an zentrifugieren.

2,5 M DTT-Lösung:

4g Dithiothreitol (DTT) in 13 ml 0,01 M Natriumacetat lösen

Ribomix:

Lachshoden-DNA (10 mg/ml) und Hefe-tRNA (25 mg/ml) 1:1 (v:v) mischen.

Proteinase K-Lösung in 0,03 M Tris-Puffer:

Für 200 ml Lösung 50 µl Proteinase K, 6 ml 1 M Tris-Puffer 194 ml DEPC-Wasser mischen.

0,25 % Essigsäureanhydrit in 0,1 M Triethanolamin (TEA):

Für 200 ml 197 ml DEPC-Wasser, 3 ml TEA, 840 µl HCl 32 % und 500 ml Essigsäureanhydrit vermischen.

Entwickler für die Radiofilme:

828 ml Entwickler-Konzentrat mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 3,8 l verdünnen.

Fixierer für die Radiofilme:

828 ml Fixierer-Konzentrat mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 3,8 l verdünnen.

Paraformaldehyd (PFA) 4 %:

8 g Paraformaldehyd wurden in 200 ml PBS 0,1 M bei 60 °C mit Hilfe eines Plättchen Natriumhydroxid gelöst, anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und filtriert.

PBS-Puffer 0,1 M:

PBS-Stammlösung (fünffach konzentriert):

In 1000 ml destilliertem Wasser

NaCl	45 g
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	1,352 g
Na ₂ HPO ₄ *12H ₂ O	14,307 g

lösen.

Die PBS-Gebrauchslösung wurde aus der Stammlösung durch 1:5-Verdünnung erzeugt; ihr pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

c) Geräte und sonstiges Material:

Autoklave: Dargatz

Backofen: Heraeus Instruments GmbH, Osterode, Deutschland

Deckgläser: #1, Größe 24*50 mm, Menzel GmbH

feuchte Plastikkammer: luftdicht verschließbare Plastikbox, auf dem Boden befeuchtet durch ein mit 2 X SSC-Puffer und 50%iges Formamid getränktes Papiertuch

Filmkassetten zum Exponieren von Röntgenfilmen: Sigma Aldrich GMBH

Hyperfilm ³H: Amersham Pharmacia Biotech

MicroSpin G-25-Säulen: Amersham Pharmacia Biotech

Mikrozentrifuge: Centrifuge 5415D, Eppendorf

Ofen für Hybridisierungsreaktion: WTC, Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland

Polypropylen-Gefäße: *Falcon tubes* (50 ml), Sigma Aldrich GMBH

Scanner für die In situ-Radiofilme: Kaiser prolite scan SC, Kaiser Fototechnik GmbH

Wärmeplatte: Medax Nagel GmbH, Kiel, Deutschland

Wasserbad: GFL 1005, Zilab GmbH, Adligenswil, Schweiz

2.9 Rechnerprogramme

HPLC-Software: Version 2.11, Firma Knauer

Einscannen und Auswertung der Röntgenfilme bei der In situ-Hybridisierung: Scion Image, Version Beta 3 b (unter www.scioncorp.com frei zum Download verfügbar; Windows-Version des Programms NIH Image)

Einscannen und Auswertung der Western-Blots: NIH Image Macintosh Version 1.61 (unter www.rsb.info.nih.gov/nih-image frei über das Internet erhältlich)

Textverarbeitung: Microsoft Word 2000, Microsoft Corporation, Redmond, USA

Tabellen- und Diagrammerstellung: Excel 97, Microsoft

Statistische Auswertung: SPSS für Windows, Version 10.0.7; SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA

2.10 Versuchstiere

Verwendet wurden bei allen Versuchen weibliche Wistar-Ratten (Züchter Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Körpergewicht von 250-300g.

2.11 Zulassung der Tierversuche

Sämtliche Tierversuche wurden genehmigt durch das Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein (Versuchsnummer 11 k 96, Versuchsleiter: Dr. Joachim Scholz).

3. Methode

3.1 Gruppeneinteilung der Versuchstiere

a) Gruppeneinteilung der Versuchstiere zur Untersuchung von Dopaminstoffwechsel und TH-Gewebskonzentration:

Gruppe A (40 µg N-M-Norsal plus 2 µg Ascorbinsäure in 2,5 µl NaCl 0,9 %):

Überlebenszeit 3 Tage: 3 Tiere

Überlebenszeit 21 Tage: 3 Tiere

Gruppe B (8 µg 6-OHDA plus 2 µg Ascorbinsäure in 2,5 µl NaCl 0,9 %):

Überlebenszeit 3 Tage: 3 Tiere

Überlebenszeit 21 Tage: 3 Tiere

Gruppe C (Kontrolle; 2 µg Ascorbinsäure in 2,5 µl NaCl 0,9 %):

Überlebenszeit 3 Tage: 3 Tiere

Überlebenszeit 21 Tage: 3 Tiere

b) Gruppeneinteilung der Versuchstiere zur Untersuchung der Expression der TH:

Gruppe A (40 µg N-M-Norsal plus 2 µg Ascorbinsäure in 2,5 µl NaCl 0,9 %):

Überlebenszeit 3 Tage: 4 Tiere

Überlebenszeit 21 Tage: 4 Tiere

Gruppe B (8 µg 6-OHDA plus 2 µg Ascorbinsäure in 2,5 µl NaCl 0,9 %):

Überlebenszeit 3 Tage: 4 Tiere

Überlebenszeit 21 Tage: 4 Tiere

Gruppe C (Kontrolle; 2 µg Ascorbinsäure in 2,5 µl NaCl 0,9 %):

Überlebenszeit 3 Tage: 3 Tiere

Überlebenszeit 21 Tage: 3 Tiere

3.2 Stereotaktische Injektionen

Die stereotaktischen Injektionen von N-M-Norsal, 6-OHDA bzw. NaCl-Lösung (als Kontrolle) wurden bei sämtlichen Versuchstieren wie folgt durchgeführt:

Als Versuchstiere dienten bei allen Versuchen weibliche Wistar-Ratten. Zunächst erfolgte in einem speziellen Käfig eine CO₂-Kurzarkose, danach wurde den so betäubten Tieren injiziert eine Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital intraperitoneal injiziert.

Der Kopf der narkotisierten Tiere wurde anschließend exakt symmetrisch im Stereotaxierahmen fixiert. Nach einer Rasur und Desinfektion der Kopfhaut mittels Cutasept erfolgte medial auf der Oberseite des Kopfes mit dem Skalpell ein Hautschnitt von kurz hinter der Augenhöhe bis kurz vor der Interaurallinie. Nach einer Spülung der Wunde mit Ringerlösung sowie der vollständigen Freilegung des Schädelknochens mit sterilen Wattetupfern identifizierte ich das so genannte „Bregma“ (die Schnittstelle von Koronar- und Sagittalnaht) und bestimmte anschließend die zugehörigen Koordinaten im Stereotaxierahmen durch Aufsetzen der Spitze der für die Injektion verwendeten Hamilton-Spritze. Von Bregma ausgehend wurden nun die Zielkoordinaten für die stereotaktische Injektion berechnet.

Injektionsort für alle Versuchstiere war das linke mediale Vorderhirnbündel (MFB). Die Zielkoordinaten (nach Paxinos und Watson, 1998), jeweils bezogen auf die ermittelten Koordinaten von Bregma im Stereotaxierahmen, waren: 2,5 mm posterior, 1,9 mm lateral (nach links) und 8,5 mm ventral.

Die linke Hirnhälfte (in welche die stereotaktische Injektion erfolgte) wird im folgenden Text als „ipsilateral“, die rechte als „kontralateral“ bezeichnet.

Senkrecht über der Injektionsstelle wurde der Schädel mit einem kleinen Handbohrer vorsichtig bis auf die Dura mater aufgebohrt. Die Spitze der Hamiltonspritze wurde nun langsam und gleichmäßig zum berechneten Zielpunkt herunter gefahren, wobei die Öffnung nach kaudal hin gerichtet war. Die Injektion der 2,5 µl Injektionslösung erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 0,5 µl/min.

Die Gesamtmenge an injizierter Substanz war für N-M-Norsal 40 µg (+ 2 µg Ascorbinsäure als Antioxidans), für 6-OHDA 8 µg (+ 2 µg Ascorbinsäure) sowie bei den Kontrolltieren lediglich 2 µg Ascorbinsäure in NaCl 0,9 %.

Nach 5 min Wartezeit wurde die Spritze langsam wieder aus der Injektionsstelle entfernt, die Wunde erneut gereinigt, desinfiziert und mit 2 Stichen genäht. Abschließend wurde das

Tier wieder aus dem Rahmen entfernt. Zur Meningitisprophylaxe erhielten alle Versuchstiere nach der Operation eine Antibiose von 100 mg/kg Körpergewicht des Antibiotikums Augmentan intraperitoneal injiziert.

3.3 Präparation und Homogenisation von ACB, CP, SN/VTA sowie Nebennierengewebe

Zur Gewinnung von nativem, unfixiertem Hirngewebe aus Ncl. accumbens (ACB), Caudatus/Putamen (CP) und Substantia nigra/Area tegmentalis ventralis (SN/VTA), das anschließend homogenisiert und für chromatographische Trennverfahren (siehe 3.5) sowie für die Anfertigung von Western-Blots (siehe 3.6) verwendet wurde, wurde wie folgt vorgegangen:

Die Tiere wurden im CO₂-Käfig mit CO₂ betäubt und danach mit einer Guillotine dekapitiert. Ihre Hirne wurden nun aus der Schädelkalotte herauspräpariert; bei einigen Tieren wurden auch die Nebennieren entfernt. Dieses am Enzym Tyrosinhydroxylase besonders reiche Gewebe wurde später als TH-Proteinstandard für die Western-Blots verwendet (siehe 4.3).

Sofort anschließend erfolgte aus beiden Hirnhemisphären die Präparation von ACB, CP sowie SN/VTA. Die Identifizierung dieser neuronalen Strukturen geschah nach dem Atlas von Paxinos und Watson (1998). Präpariert wurde auf Eis in 4 °C kalter Präparationslösung (Zubereitung siehe 2.2).

Das so herauspräparierte Hirngewebe wurde nun gewogen und im Verhältnis 1: 25 (w/v) mit dem oben erwähnten Natriumphosphatpuffer versetzt. Anschließend erfolgte die Homogenisation des im Puffer befindlichen Gewebes, zuerst per Hand mit 3 mal 10 Umdrehungen im Glas-Teflon-Homogenisator, dann maschinell für 1 Minute im Ultraschall-Homogenisator.

Danach wurde das entstandene Homogenat in der Kühlzentrifuge bei 0 °C für 10 Minuten bei einer Geschwindigkeit von 1000 g zentrifugiert und schließlich bis zur unten beschriebenen weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die bei einigen Tieren herauspräparierten Nebennieren wurden ebenfalls 1:25 (w/v) in Phosphatpuffer gegeben und auf die oben beschriebene Weise homogenisiert, zentrifugiert und gelagert.

Für alle weiteren mit dem Homogenat durchgeführten Versuche wurde ausschließlich Überstand verwendet.

3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration im Hirnhomogenat

Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Hirnhomogenat erfolgte mit der Protein-Nachweismethode unter Verwendung einer Bichinolinsäure (BCA) nach Smith et al. (1985).

Es handelt sich hierbei um ein photometrisches Proteinnachweisverfahren. Dieses beruht auf dem Prinzip, dass sich in Anwesenheit von Proteinen aus Kupferionen und BCA-Molekülen ein farbiger Chelatkomplex bildet. Dieser Chelatkomplex absorbiert nun proportional zur Proteinkonzentration einer Messlösung Licht bei einer Wellenlänge von 562 nm (Smith et al., 1985; Wiechelman et al., 1988). Das Ausmaß dieser Lichtabsorption kann photometrisch gemessen werden. Anschließend ist hieraus die Berechnung der Proteinkonzentration der untersuchten Messlösung möglich (siehe 4.1).

Technisch wurde zur Ermittlung der Proteinkonzentration im Homogenat (Hirngewebe bzw. Nebenniere) wie folgt vorgegangen:

Zunächst wurden die BCA-Reagenzien A und B im Verhältnis A:B = 50:1 gemischt.

Danach wurden je 0,1 ml Homogenat in 2 ml BCA-Reagenzgemisch pipettiert. Die so entstandenen Reaktionslösungen wurden gemischt und für 30 min bei + 60 °C im Wasserbad inkubiert. Nach anschließender Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Absorption der Reaktionslösungen bei 562 nm Wellenlänge photometrisch gemessen.

Danach wurde noch die Extinktion einer Leerprobe bestimmt. Diese enthielt nur Phosphatpuffer (ohne Homogenat) und BCA-Reagenzgemisch, ansonsten war sie aber genau wie die anderen Reaktionslösungen behandelt worden. Die Extinktion dieser Leerprobe wurde später als Leerwert für die Auswertung genutzt.

Für jede untersuchte Hirnregion wurde die Proteinkonzentration doppelt bestimmt. Dabei wurde für die Extinktionsmessungen einmal 1:200 (w/v) und einmal 1:50 (w/v) mit Phosphatpuffer verdünntes Homogenat verwendet.

Zur Bestimmung der Eichkurve wurden verdünnte Proben der Albuminstandard-Ampullen verwendet. Ansonsten wurden die Versuche genau wie für das Homogenat beschrieben durchgeführt, nur dass anstelle des Homogenats 0,1 ml Albuminstandardlösung und für die Leerprobe destilliertes Wasser statt Phosphatpuffer eingesetzt wurden.

Zur anschließenden Berechnung der Proteinkonzentrationen siehe Abschnitt 4.1.

3.5 Bestimmung von Dopamin, DOPAC und HVA im Homogenat durch HPLC

Im Gewebshomogenat von ACB, CP und SN/VTA führte ich eine quantitative Bestimmung der Gewebskonzentrationen von Dopamin sowie seinen Metaboliten DOPAC und HVA durch (nach Moser et al., 1993 und 1996c). Dies geschah mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und elektrochemischer Detektion.

Das Prinzip der HPLC beruht darauf, dass die in der mobilen Phase befindlichen Substanzen, die aus einer Lösung heraus voneinander getrennt werden sollen, durch die stationäre Phase während des Durchlaufs durch das Chromatographiesystem unterschiedlich lange zurückgehalten werden. Die mobile Phase ist der jeweilige Eluent (s.u.), die stationäre Phase befindet sich an den Säulen des Chromatographiesystems und besteht z.B. aus Kieselgel, Aluminiumoxid oder Zellulose.

Die Laufzeit durch dieses System, auch als „Retentionszeit“ bezeichnet, ist substanzspezifisch verschieden, da jede Verbindung in unterschiedlichem Ausmaß durch die Bestandteile der stationären Phase adsorbiert wird, und kann somit zur Identifikation chemischer Verbindungen verwendet werden.

Die Quantifizierung der so aufgetrennten Verbindungen geschieht mit einem elektrochemischen Detektor, bestehend aus einer Messzelle mit Arbeitselektrode, Referenzelektrode und Gegenelektrode.

Mit diesem Detektor wird eine proportional zur Konzentration des ihn gerade durchlaufenden Stoffes ansteigende elektrische Stromstärke gemessen und aufgezeichnet. Das geschieht folgendermaßen: Die beim Durchlauf der einzelnen Substanzen im elektrischen Feld des Detektors entstehenden Stromflüsse sind proportional zu ihrer Konzentration. Diese Stromflüsse zeigen sich in der graphischen Darstellung des Verlaufs der Stromstärke im Detektor pro Zeit, dem so genannten „Chromatogramm“, als Stromstärkenausschläge (engl. *peaks*).

Anhand der Retentionszeiten ihrer „Peaks“ können die einzelnen Substanzen identifiziert werden. Ihre Konzentration ermittelt man, indem man ihre jeweilige Peakhöhe ins Verhältnis zur vorher ermittelten Peakhöhe einer bekannten Standardkonzentration dieser Verbindung setzt.

Versuchsaufbau für die von mir durchgeführten HPLC-Messungen im Hirnhomogenat :

Sämtliche Stofftrennungen und Messungen erfolgten unter folgenden Messbedingungen (im weiteren Text als Standardbedingungen bezeichnet):

Flussrate der HPLC-Pumpe 1 ml/min, Druck 30 MPa, Temperatur 30 °C, Messfrequenz 1 Hz. Der elektrochemische Detektor arbeitete bei einer Betriebsspannung von + 0,8 V und einer Stromstärke von 5 nA. Die Chromatogramme wurden auf einem PC aufgezeichnet.

Als mobile Phase für die Trennung von Dopamin, DOPAC und HVA wurde die unter 2.4 als „Eluent für die Metaboliten-HPLC“ beschriebene Lösung verwendet.

Vor und nach jeder Messreihe wurden nun Standardmessungen mit je 80 µl von Standardlösungen durchgeführt, die jeweils 100 nmol/l Dopamin, DOPAC bzw. HVA enthielten. Anhand der Retentionszeiten der Peaks dieser Standards wurden die Substanzen in den Chromatogrammen des Hirnhomogenats identifiziert. Die Höhe dieser Peaks wurde später zur Berechnung der Stoffkonzentrationen im untersuchten Hirngewebe genutzt.

Nun erfolgten die eigentlichen Messungen. Hierbei erstellte ich von jedem Tier aus je 80 µl Überstand des Homogenats Chromatogramme von ACB, CP und SN, jeweils rechts und links. Aus diesen Chromatogrammen wurden dann die Peakhöhen von Dopamin, DOPAC und HVA bestimmt.

Näheres zur Auswertung der Chromatogramme und zur weiteren Verwertung der Daten siehe Abschnitt 4.2.

3.6 Bestimmung der Gewebskonzentration der TH durch Western-Blots

Die Semiquantifizierung des in den einzelnen Homogenatsproben von ACB, CP und SN/VTA enthaltenen TH-Proteins erfolgte durch Western-Blots.

Hierbei wurden die im Homogenat enthaltenen Proteine zunächst durch eine Natriumdodecylsulfat(SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (Abkürzung für das gesamte Verfahren: SDS-PAGE). Die SDS-PAGE wurde durch Laemmli (1970) in ihrer heutigen Form etabliert. Dieses Verfahren ermöglicht eine Auftrennung von Proteinen nur nach ihrem Molekulargewicht, unabhängig von ihrer Eigenladung sowie ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur. Für eine genauere Beschreibung der chemisch-physikalischen Details der SDS-PAGE siehe Garfin (1990).

Anschließend wurden die so aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert („geblottet“). Dieses Verfahren geht auf Towbin et al. (1979) zurück. In meinen Versuchen verwendete ich das sogenannte Semidry-Blot-Verfahren (Görg und Westermeier, 1998).

Hierbei wird in einer speziellen Blotapparatur das Elektrophoresegel mit den aufgetrennten Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Blotmembran) gepresst und anschließend ein elektrisches Feld erzeugt. Hierdurch kommt es zur Anheftung der Proteine an die Nitrozellulosemembran. Diese Fixierung ermöglicht die weitere immunologische Identifizierung und Quantifizierung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine.

Die spezifische Markierung der nun an der Blotmembran heftenden TH-Moleküle erfolgte durch Inkubation mit einem spezifischen murinen Anti-TH-Primärantikörper und danach mit einem mit Meerrettich-Peroxidase(HRP)-gekoppelten Anti-Maus-IgG-Antikörper (Nakane und Kawaoi, 1974).

Die Erzeugung eines spezifischen, der Menge an TH-Protein proportionalen Signals geschah nun nach dem Prinzip der Chemilumineszenz (ECL; Whitehead et al., 1979; Akhavan-Tafti et al., 1995). Bei dieser Methode wird durch Zugabe einer speziellen Lumineszenzlösung auf die Blotmembran Licht emittiert. Die Menge an emittiertem Licht ist proportional zur Anzahl an durch die TH-Proteinmoleküle gebundenen peroxidasehaltigen Antikörpern und somit auch zur Menge an TH-Protein.

Da keine absolute Mengenbestimmung der TH möglich war, wurde eine Semiquantifizierung dieses Proteins durch den Vergleich der Western-Blots mit einer Standardreihe aus Blots der Nebenniere der Ratte vorgenommen.

Genauere Durchführung der Western-Blots:

Zunächst erfolgte die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Für diese Elektrophorese wurden vorgefertigte Gele verwendet (12 % Tris-Glycin-Gele). Diese Gele enthielten jeweils 10 Vertiefungen (engl. *wells*), in die später die Proben hineingegeben wurden.

Die Homogenatsproben wurden nun folgendermaßen vorbehandelt: Es wurde jeweils eine bestimmte Menge an Homogenat mit 2-fach konzentriertem Laemmli-Puffer (dieser enthielt u.a. SDS und DTT; Rezept siehe 2.5) auf ein Gesamtvolumen von 35 µl aufgefüllt.

Hierbei wurde genau soviel Homogenat verwendet, dass in ihm eine vorgegebene Menge an Protein enthalten war.

Bei den mitgeführten Nebennierenstandards waren dies je einmal 2,4,6 und 8 µg Protein, beim ACB-Homogenat je 7 µg sowie beim CP- und SN-Homogenat je 6 µg Protein (Beispiel: Betrag die Proteinkonzentration einer Probe aus der SN = 5 mg/ml, wurden für 6 µg Protein 1,2 µl Homogenat mit 33,8 µl Laemmli-Puffer versetzt). Die im Laemmli-Puffer befindlichen Proben wurden nun gemischt, für 5 min auf einer Heizplatte auf 100 °C erhitzt (zum Denaturieren der Proteine mit Hilfe des im Puffer enthaltenen SDS) und danach kurz an zentrifugiert.

Die Gele wurden nun für einige Minuten in einem Tuppergefäß mit Laufpuffer äquilibriert und anschließend senkrecht in die Elektrophoresekammer eingespannt. Als nächstes wurde diese Kammer mit Laufpuffer aufgefüllt. Danach wurden die Proben (je 35 µl) in die dafür vorgesehenen Vertiefungen der Gele mit einer Hamilton-Spritze aufgetragen. Pro Gel waren das insgesamt 10 Proben (4 Nebennierenstandards, 2 ACB-Proben, 2 CP-Proben und 2 SN-Proben). Die Homogenatsproben stammten jeweils von demselben Tier, je einmal aus der ipsilateralen und kontralateralen Hirnhälfte.

Die Elektrophorese erfolgte nun für 60 min bei einer Stromstärke von 45 mA und einer Spannung von 125 V. Hierbei wurden die in den Proben enthaltenen Proteine ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt.

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele vor ihrer weiteren Verwendung in Laufpuffer gelagert.

Als nächster Schritt erfolgte der eigentliche Blotvorgang, also die Übertragung und Fixierung der im Trenngel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran. Angewendet wurde hierzu die Semidry-Blot-Methode (Görg und Westermeier, 1998).

Als erstes wurden die für den Blotvorgang benötigten Materialien (das Gel aus der Elektrophorese, einige Filterpapierstücke, die Nitrozellulosemembran sowie die Schwämme aus dem Blotmodul) für 5 Minuten in Towbin-Puffer äquilibriert.

Nun wurde das Blotmodul in folgender Reihenfolge gefüllt: Auf die Kathodenseite kam zunächst ein Schwamm, darauf zwei Stücke Filterpapier und als nächstes das äquilibrierte Gel. Auf die noch freie Gelseite wurde nun die Nitrozellulosemembran gelegt; zum Vermeiden von Luftblasen wurde diese Membran anschließend mit einer Rolle

ausgestrichen. Zur Anodenseite des Moduls hin kamen auf die Nitrozellulosemembran nun noch ein Filterpapierstück sowie direkt an die Anode 2 weitere Schwämme.

Das Blotmodul wurde danach zusammengeklappt, mit Towbin-Puffer aufgefüllt und in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Zur Kühlung wurde die Elektrophoresekammer für den Blotvorgang mit auf 4 °C gekühltem destilliertem Wasser sowie einigen Kühlelementen gefüllt.

Der Proteintransfer vom Gel auf die Nitrozellulosemembran erfolgte für 90 Minuten bei 375 mA und einer Spannung von 25 V.

Nach dem Blotvorgang wurde die Blotmembran zur Kontrolle für 5 Minuten in Ponceau angefärbt, um die Proteinbanden darzustellen, und anschließend mit destilliertem Wasser wieder entfärbt. Um unspezifische Bindungen der im Folgenden verwendeten Antikörper zu verhindern, wurde die Membran danach für 60 min auf einem Schüttler mit 3 %iger Magermilchlösung (in TBST) blockiert.

Nun erfolgte über Nacht, ebenfalls auf einem Schüttler, die Inkubation der Nitrozellulosemembran mit dem Primärantikörper (einem von der Maus stammenden Anti-TH-Antikörper, aus der Stammlösung 1:1000 verdünnt).

Am nächsten Tag wurde die Membran zunächst 3 mal für 15 Minuten in TBST gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (einem HRP-gekoppelten, vom Schaf stammenden Anti-Maus-Antikörper). Sie wurde mit dem 1:4000 in 3 %iger Magermilchlösung (in TBST) verdünnten Antikörper durchgeführt und dauerte 90 Minuten. Danach wurden die Blotmembranen erneut in TBST gespült (3 x 20 min).

Als nächster Schritt wurden in der Dunkelkammer auf jede so vorbehandelte Blotmembran 2,5 ml ECL-Substratlösung pipettiert. Die Inkubation dauerte 5 min. Danach wurde die Lösung vorsichtig mit einem Papiertuch abgetupft. In einer Röntgenfilmkassette wurden die Blotmembranen nun für maximal 5 min einem Röntgenfilm exponiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Filme dann für 4 min entwickelt, kurz mit Wasser gespült, 5 min fixiert, erneut gespült und luftgetrocknet.

Zur anschließenden Auswertung wurden die Röntgenfilme für die Bearbeitung mittels PC zunächst digitalisiert. Anschließend erfolgte die Semiquantifizierung des auf den Radiofilmen erzielten Signals (siehe 4.3).

3.7 Transkardiale Perfusionsfixation der Hirne für die In situ-Hybridisierung

Die Tiere, aus deren Hirnen Kryoschnitte für die In situ-Hybridisierung angefertigt werden sollten, wurden am Tötungszeitpunkt zunächst mit CO₂ betäubt. Darauf wurde ihnen intraperitoneal eine letale Dosis Pentobarbital (600mg Pentobarbital/kg Körpergewicht) injiziert.

Anschließend wurde nach eingetretener völliger Schmerzfreiheit der Tiere mit einer großen Schere zuerst mit einem queren Schnitt die Bauchhöhle eröffnet und danach ein medialer Längsschnitt durch die Bauchdecke bis zum Processus xiphoideus des Sternums durchgeführt. Seitlich des Schnitts wurde das Fell subkutan gelöst und zur Seite geschlagen. Nun wurde unterhalb des Sternums die Bauchmuskulatur durchtrennt und der Rippenbogen freigelegt. Darauf erfolgte beidseits lateral die Durchtrennung des Rippenbogens, der dann zum Kopf hin zurückgebogen und dort mit einer Klemme befestigt wurde. Das jetzt freigelegte, noch schlagende Herz wurde mobilisiert und mit einer Pinzette festgehalten. Mit einer kleinen Schere wurde dann der linke Ventrikel eröffnet und eine Knopfkanüle vorsichtig in den Bulbus aortae eingeführt. Auch der rechte Ventrikel wurde zum Blutabfluss eröffnet und das Herz abschließend mit einer kleinen Klemme fixiert. Nacheinander erfolgte dann mit einer Geschwindigkeit von 2-3 Tropfen/min bei einem hydrostatischen Druck von 50-100 cm H₂O die Infusion von 200 ml heparinierter Ringer-Lösung (10000 IE Liquemin/l) zur Blutauswaschung sowie von 200 ml PFA 4 % in PBS zur Fixation des Gehirns.

Anschließend erfolgten die Dekapitation der Tiere und die Präparation ihrer Gehirne, welche danach noch für 12-24 Stunden in 4%igem PFA immersionsfixiert wurden.

Nach der Immersionsfixation durchlief jedes Hirn zur Spülung 4 Bäder mit PBS (0,1 M, pH 7,4) und wurde danach zur Kryoprotektion bis zu seinem Absinken in 30%iger Saccharoselösung gelagert (Dauer bis zum Absinken je nach Hirn 36-96 h). Die so vorbehandelten Hirne wurden kurz in PBS gespült, auf Zellstoff gewendet und schließlich 10 min lang bei -30 °C in Isopentan auf Trockeneis eingefroren.

Die Lagerung der Hirne erfolgte in luftdicht abgeschlossenen Behältern bei - 80 °C.

3.8 Anfertigung der Kryoschnitte

Das Schneiden der Hirne erfolgte bei einer Temperatur von -25 °C im Kryotom. Die Dicke der Kryoschnitte betrug jeweils 15 µm.

Es wurden pro Hirn 8 Schnittserien in koronarer Ausrichtung (je 2 Schnitte pro Serie) erstellt. Diese Serien wurden im Abstand von 250 µm jeweils doppelt angefertigt. Die zwischen ihnen aufgefangenen Schnitte wurden für das Projekt meines Doktorandenkollegen K. Mende verwendet.

Beginn der 1. Schnittserie war (nach Paxinos und Watson, 1998) + 4,5 mm interaural (ungefährer Beginn der Substantia nigra, Pars compacta), das Ende der letzten Schnittserie lag bei +2,5 mm interaural (ungefähres Ende von Substantia nigra und VTA).

Die angefertigten Schnitte wurden auf silanisierte Objektträger aufgetragen (je 2 Schnitte auf einen Objektträger). Um ein optimales Auffangen der Schnitte zu ermöglichen, wurden die Objektträger vor dem Auftragen bei ca. 4 °C auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Schnitte für 2-3 min bei + 55 °C auf einer Wärmeplatte angetrocknet.

Nachdem sie wieder auf Zimmertemperatur abgekühlt waren, wurden sie in luftdicht verpackten Objektträgerkästen bei -80 °C eingefroren und gelagert.

3.9 In situ-Hybridisierung der TH-mRNA auf Kryoschnitten von SN und VTA

Die In situ-Hybridisierung ist eine Methode zum Nachweis von mRNA, in diesem Fall der TH-mRNA, *in situ*, d.h., in ihrer ursprünglichen Lage in den Zellen. Dieses Verfahren wurde etabliert durch Young WS 3rd et al. (1986). Das in dieser Arbeit verwendete Protokoll stützt sich im Wesentlichen auf Wisden und Morris (1994) sowie Jöhren et al. (2001).

Das Prinzip dieser Methode ist, dass radioaktiv markierte Oligonukleotid-DNA-Sonden, deren Basenfolge komplementär zur gesuchten mRNA ist, unter optimalen Reaktionsbedingungen auf die Hirnschnitte gegeben werden und so an die passende mRNA gebunden werden. Dies ist möglich, da die RNA zumindest bei Nagetieren mindestens 12 Stunden post mortem stabil ist und in ihrer ursprünglichen Lage verbleibt (Ross et al., 1992).

In diesem Projekt wurden Kryoschnitte von SN und VTA mit [³⁵S]-dATP-markierten TH₁-Antisense-Sonden zum Nachweis der TH-mRNA inkubiert. Die so behandelten Hirnschnitte wurden gewaschen und anschließend einem Röntgenfilm exponiert. Dabei kam es auf dem Film zur Schwärzung der Hirnregionen, in denen radioaktiv markierte Oligonukleotidsonden gebunden worden waren.

Dieses Signal war proportional zur Menge an gebundenen Sonden und konnte softwareunterstützt semiquantifiziert werden (siehe 4.4).

Genauer Versuchsaufbau:

Grundsätzlich wurden in diesem Projekt zur Vermeidung einer Kontamination des Gewebes mit RNAsen vor dem nächtlichen Hybridisierungsvorgang ausschließlich für 6 h bei 180 °C im Backofen gebackene Glasgefäße sowie DEPC-Wasser für alle Verdünnungen verwendet.

Als erstes erfolgte die Markierung der Oligonukleotidsonden. Verwendet wurden für diese Markierung TH₁-Antisense-Sonden (zuvor aus der Stammlösung (100 pmol/μl) um 1:100 auf 1 pmol/μl verdünnt). Die Markierungsreaktion wurde im Isotopenlabor (S1-Labor) unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

In ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vom Typ Eppendorf (im folgenden als „Eppendorf-Gefäß“ bezeichnet) wurden 5 ml Cacodylat-Puffer (Kofaktor der TdT), 10 μl TH₁-Antisense-Sonde, 25 μl Wasser („supplied“), 5 μl [³⁵S]-dATP sowie 5 μl terminale Transferase (TdT) pipettiert.

Anschließend erfolgte in diesem Eppendorf-Gefäß die Markierungsreaktion der Sonden (90 min bei 37 °C im Wasserbad, danach Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 5 μl 0,5 M EDTA). Zur Entfernung ungepaarter Oligonukleotide wurden die nun markierten Sonden in eine MicroSpin G25-Säule pipettiert und diese Säulen in einem weiteren Eppendorf-Gefäß 2 min bei 3000 rpm zentrifugiert.

Zu den fertigen Sonden wurden 2 μl 2,5 M DTT als Antioxidans gegeben. Die Lagerung der Sonden bis zu ihrer Verwendung erfolgte bei -20 °C.

Danach wurden die Objektträger mit den Hirnschnitten aufgetaut (erst bei Raumtemperatur, dann 5 min bei 37 °C auf der Wärmeplatte) und wie folgt vorbehandelt:

2 mal 1 min in PBS gespült, 5 min in Proteinase K- Lösung inkubiert, wieder 2 mal 1 min in PBS gespült, als nächstes 5 min in 4 % Paraformaldehyd nachfixiert, danach erneut 2 mal 1 min in PBS gespült, dann 10 min mit 0,25 % Essigsäureanhydrit in 0,1 M TEA behandelt, schließlich mit einer Alkoholreihe entwässert (1 min 70 % Ethanol, 2 min 95 % Ethanol, 1 min 100 % Ethanol, 5 min Chloroform, 1 min 100 % Ethanol, 1 min 95 % Ethanol) und vor der Hybridisierungsreaktion für 30-60 min luftgetrocknet.

Als nächstes wurde der für die folgende Reaktion benötigte Hybridisierungspuffer in einem sterilen 50 ml-Polypropylengefäß angesetzt. Dieser Puffer enthielt bei einem Gesamtvolumen von 9 ml Formamid, Dextransulfat, Tris-Puffer, NaCl, EDTA sowie Denhardsche Lösung, gelöst in DEPC-H₂O. Die Endkonzentrationen dieser Substanzen im späteren Hybridisierungsmix lagen bei 50 % Formamid, 10 % Dextransulfat, 20 mM Tris (pH 7,5), 0,3 M NaCl, 1 mM EDTA sowie einfacher Denhardscher Lösung. Für die genaue Zusammensetzung dieses Puffers siehe Abschnitt 2.8.

Im Isotopenlabor wurde nun der endgültige Hybridisierungsmix für die Hybridisierungsreaktion hergestellt. Dieser bestand aus dem oben beschriebenen Hybridisierungspuffer sowie zusätzlich Ribomix (mit Lachshoden-DNA und Hefe-tRNA zur Vermeidung unspezifischer Nukleotidbindungen), DTT, SDS sowie der mit [³⁵S]-dATP-markierten TH₁-Antisense-Sonde (Endkonzentration im Hybridisierungsmix 1 pmol/l). Für die genaue Zusammensetzung siehe wiederum Abschnitt 2.8.

Die Objektträger wurden nun in feuchten Plastik-Reaktionskammern platziert. Auf jeden Objektträger wurden 150 µl Hybridisierungsmix pipettiert. Anschließend wurden die Objektträger mit Deckgläsern bedeckt. Die Hybridisierungsreaktion erfolgte für 16-20 h bei 42 °C im Ofen.

Hiernach wurden die Hirnschnitte auf den Objektträgern zum Entfernen der Reaktionslösung und der nicht hybridisierten Oligonukleotid-Probe gewaschen.

Zunächst wurden die Deckgläser mit 1 x SSC-Puffer von den Objektträgern gespült. Dann wurden die Objektträger in Bädern von 5 min 1 x SSC (mit 2 mM DTT) bei Raumtemperatur, 30 min 1 x SSC (2 mM DTT) bei 55 °C im Wasserbad, 1 min in 1 x SSC (2 mM DTT) wieder bei Raumtemperatur und schließlich 1 min in 0,1 x SSC (2 mM DTT) getaucht. Danach wurden sie mit einer Alkoholreihe entwässert (1 min 70 % Ethanol mit 300 mM NH₄-Acetat, 1 min 95 % Ethanol mit 300 mM NH₄-Acetat, zum Schluss kurz 100 % Ethanol) und schließlich für 30-60 min an der Luft getrocknet.

Nach dem Trocknen wurden die Objektträger in der Dunkelkammer für 7 Tage in einer Röntgenfilmkassette einem Röntgenfilm exponiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden sie dann für 4 min entwickelt, kurz mit Wasser gespült, 5 min fixiert, erneut gespült und luftgetrocknet. Zum Schluss erfolgte computergestützt die semiquantitative Auswertung des entstandenen radioaktiven Signals (siehe Abschnitt 4.4).

4. Aufarbeitung und Auswertung der Daten

4.1 Berechnung der Proteinkonzentration der einzelnen Proben des Hirnhomogenats

Von den photometrisch ermittelten Extinktionswerten sämtlicher untersuchter Proben (Proteinstandardlösungen und Homogenatsproben) wurden zunächst die Extinktionswerte der zugehörigen Leerproben subtrahiert. Diese Leerproben enthielten kein Protein, sondern lediglich Puffer (wie für das Homogenat) bzw. destilliertes Wasser (wie in den Proteinstandards) sowie BCA-Reagenzien (siehe 3.4).

Danach wurde aus den korrigierten Extinktionswerten der einzelnen Albuminlösungen mit bekannter Proteinkonzentration eine Eichgerade erstellt. Dargestellt wurde diese Eichgerade mit der Formel:

Formel 1:

$$y = m * x + b$$

y = Extinktion, m = Steigung der Eichgeraden, x = Proteinkonzentration (mg/ml)
b = Schnittpunkt der Eichgeraden mit der y-Achse

Durch Einsetzen in diese Gleichung konnte nun für jede Homogenatsprobe die zugehörige Proteinkonzentration berechnet werden. Dies war möglich, weil nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (Formel 2) die photometrisch gemessene Extinktion jeder Probe proportional zu ihrer Proteinkonzentration ist. Da in den von mir durchgeführten Proteinbestimmungen Extinktionskoeffizient und Schichtdicke der Messlösung konstant blieben, beeinflussten sie diese Proportionalität nicht.

Formel 2:

$$E = e * c * d$$

E = Extinktion, e = Extinktionskoeffizient (konstant), c = Konzentration der untersuchten Substanz, d = Schichtdicke der Messlösung im Strahlengang

Die auf diese Weise ermittelten Proteinkonzentrationen wurden für die Berechnung der Konzentrationen von Dopamin und seinen Metaboliten (4.2) sowie der Konzentration an TH-Protein (4.3) in den einzelnen Homogenatsproben verwendet, da als Bezugsgröße hierfür jeweils eine Proteinmenge diente.

4.2 Auswertung der HPLC-Chromatogramme

Die Umrechnung der Peakhöhen von Dopamin, DOPAC und HVA aus den Chromatogrammen der einzelnen Hirnhomogenatsproben (siehe 3.5) in Konzentrationswerte (jeweils pmol/mg Hirnprotein) erfolgte per Dreisatz mit Hilfe der Chromatogramme von Standardlösungen mit bekannter Stoffkonzentration (100 nM).

Die Chromatogramme dieser Standards waren jeweils vor und nach jeder Messreihe erstellt worden. Für die Konzentrationsberechnungen jeder Messreihe wurden jeweils die Mittelwerte der Peakhöhe beider Standard-Chromatogramme verwendet.

Umrechnung einer Peakhöhe in einen Konzentrationswert am Beispiel des Dopamins:

Formel 3:

$$C_{DA}(\text{nmol/l}) = (H_{DA}(\text{mA}) / H_{\text{Standard}}(\text{mA})) * 100 \text{ nmol/l}$$

C_{DA} = Dopaminkonzentration im Hirnhomogenat, H_{DA} = Peakhöhe für Dopamin im Chromatogramm, H_{Standard} = Peakhöhe des Dopaminstandards,
100 nmol/l = Konzentration des Dopaminstandards

Danach wurde die Dopaminkonzentration im Homogenat von nmol/l in pmol/ml umgerechnet. Anschließend erfolgte wie folgt die Berechnung der Dopaminkonzentration in pmol/mg Hirnprotein:

Formel 4:

$$C_{DA}(\text{pmol/mg Protein}) = C_{DA}(\text{pmol/ml}) / C_{\text{Protein}}(\text{mg/ml})$$

C_{DA} = Dopaminkonzentration im Hirnhomogenat
 C_{Protein} = Proteinkonzentration im Hirnhomogenat

Nun wurde für jede Gruppe an Versuchstieren (je 3 Tiere) der Mittelwert sowie die Standardabweichung (SD) und die Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) für die Konzentrationen an Dopamin, DOPAC und HVA ipsilateral und kontralateral in jeder einzelnen Hirnregion gebildet.

Außerdem wurde der Quotient Dopamin/DOPAC als Parameter des Dopaminumsatzes bestimmt (siehe Moser et al., 1996c).

Als letztes wurden die Konzentrationen an Dopamin, DOPAC und HVA in den untersuchten Regionen der ipsilateralen Hirnhälfte in % der jeweiligen Konzentrationen der kontralateralen Hirnhälfte berechnet. Dies geschah nach der Formel:

Formel 5:

$$A = 100 \% + ((li-re)/re) * 100 \%$$

A = Konzentration ipsilaterale Hirnhälfte in % der kontralateralen Hirnhälfte
li = Konzentration in der ipsilateralen Hirnhälfte
re = Konzentration in der kontralateralen Hirnhälfte

Die so erhaltenen Ergebnisse wurden tabellarisch dargestellt (siehe 5.2).

4.3 Auswertung der Western-Blots zur Bestimmung der TH-Gewebskonzentration

Die Röntgenfilme, auf denen das Chemilumineszenzsignal der wie unter 3.6 beschrieben behandelten Western-Blots zu einer der jeweiligen Signalintensität proportionalen Schwärzung in Form von Banden geführt hatte, wurden zunächst mit Hilfe eines Scanners und des Programms NIH Image in einen Macintosh-Rechner eingescannt. Mit diesem Programm wurde auch die semiquantitative Auswertung der Signale auf dem Film durchgeführt.

Zur Auswertung wurde nun wie folgt vorgegangen:

Nach dem Einlesen der eingescannten Abbildungen der Blotmembranen in NIH Image wurde zunächst der Hintergrund als unspezifisches Signal von allen Grauwerten abgezogen. Danach wurde der Filmteil, der die geschwärzten Banden enthielt, eingerahmt. Aus diesem Filmteil konnte nun ein Balkendiagramm erstellt werden, in dem die optische Dichte der Banden (y-Achse) gegen die Breite des Films (x-Achse) aufgetragen war. Als nächstes wurde dann die Fläche der einzelnen Banden, die jeweils dem Signal einer einzelnen Homogenatsprobe entsprachen, eingegrenzt.

Mit Hilfe der verwendeten Software konnte nun eine Tabelle erstellt werden, in der das Produkt aus optischer Dichte und Fläche für jede einzelne Bande dargestellt wurde.

Das so ermittelte Produkt aus optischer Dichte und Fläche der einzelnen Banden war, wie bereits erwähnt, proportional zum TH-Proteingehalt der den einzelnen Banden entsprechenden Gewebshomogenatsproben.

Als nächster Schritt wurde eine Eichkurve aus den Nebennierenstandards erstellt. Hierzu wurde mit dem Programm Excel ein Diagramm angefertigt, in dem die Signalintensität der

einzelnen Nebennierenstandards gegen ihren jeweiligen Proteingehalt (in μg) aufgetragen wurde. Aus diesem Diagramm konnte nun die Eichgerade als Ausgleichsgerade zwischen Signalwerten der Standards ermittelt werden.

Dargestellt wurde diese Eichgerade in der Form:

Formel 6:

$$y = m * x + b \quad \text{oder:} \quad x = (y-b) / m$$

y = Signalintensität der jeweiligen Bande, m = Steigung der Eichgeraden, x = Proteingehalt des Nebennierenhomogenats (μg), b = Schnittpunkt der Eichgeraden mit der y -Achse

Für jede Blotmembran, auf der jeweils Homogenat eines einzelnen Tieres untersucht worden war, wurde auf diese Art eine eigene Eichgerade erstellt.

Nun wurden die Signalintensitäten der untersuchten Hirnhomogenatsproben mit Hilfe der jeweiligen Eichgeraden in „willkürliche Einheiten Nebenniere“ umgerechnet. Dies geschah nach der Formel:

Formel 7:

$$E_{\text{NN}} = ((y-b) / x) * 1000 / M_{\text{Protein}}(\mu\text{g}).$$

E_{NN} = willkürliche Einheiten Nebenniere (pro μg Hirnprotein), y = Signalwert der jeweiligen Hirnhomogenatsprobe, b = Schnittpunkt der Eichgeraden mit der y -Achse, x = Steigung der Eichgeraden, M_{Protein} = Proteinmenge

Die so ermittelten willkürlichen Einheiten Nebenniere ermöglichten nun einen Vergleich zwischen dem TH-Proteingehalt der einzelnen untersuchten Hirnregionen.

Hierzu wurden, ähnlich wie bei der Bestimmung der Gewebskonzentrationen von Dopamin und seinen Metaboliten (siehe 4.2), die Konzentrationen an TH-Protein (in willkürlichen Einheiten Nebenniere) in den untersuchten Regionen der ipsilateralen Hirnhälfte in % der jeweiligen Konzentrationen der kontralateralen Hirnhälfte berechnet.

Dies geschah wiederum nach der Formel:

Formel 8:

$$A = 100 \% + ((li-re)/re) * 100 \%$$

A = mittlere TH-Gewebskonzentration ipsilaterale Hirnhälfte in % der kontralateralen Hirnhälfte, li = mittlere TH-Gewebskonzentration in der ipsilateralen Hirnhälfte, re = mittlere TH-Gewebskonzentration in der kontralateralen Hirnhälfte

Nun wurde für jede Gruppe an Versuchstieren der arithmetische Mittelwert, SD und SEM der Seitendifferenzen der Signalintensitäten berechnet, jeweils getrennt nach Hirnregionen. Die so erhaltenen Ergebnisse wurden tabellarisch dargestellt (siehe 5.3).

4.4 Auswertung der In situ-Hybridisierung

Zunächst wurden die einzelnen auf den exponierten Filmen sichtbaren Abbildungen der hybridisierten Hirnschnitte mit Hilfe eines Scanners mit einer 20 mm-Linse und des Programms Scion Image in den Computer eingescannt und gespeichert.

Die Quantifizierung des radioaktiven Signals, das durch die mit den radioaktiven Sonden markierte TH₁-mRNA abgegeben worden war, geschah nun folgendermaßen:

Im Programm Scion Image wurden zunächst die durch die radioaktiven Oligosonden geschwärzten Bereiche, also die TH-mRNA-enthaltenden Neurone von Substantia nigra und VTA, möglichst genau und eng eingegrenzt (jeweils getrennt nach rechter und linker Hirnhälfte sowie nach SN (lateral) und VTA (medial); die Identifizierung dieser Strukturen erfolgte nach Paxinos und Watson, 1998). Danach wurden, ähnlich wie bei der Auswertung der Western-Blots, in jeder einem Hirnschnitt entsprechenden Abbildung beidseits die Fläche und die optische Dichte der vorher eingegrenzten geschwärzten Regionen (SN und VTA) ermittelt.

Um die unspezifische Schwärzung des Hintergrundes zu eliminieren, wurde in jedem abgebildeten Hirnschnitt die optische Dichte einer beliebigen, nicht spezifisch markierten Hirnregion als Hintergrundsignal vom optischen Dichtewert der spezifisch markierten Gebiete abgezogen.

Die so erhaltenen Daten (optische Dichte, Fläche und Hintergrundsignal) wurden in eine Excel-Tabelle eingefügt.

Als Signalintensität jeder Hirnregion in jedem einzelnen Schnitt wurde das Produkt aus Fläche und optischer Dichte abzüglich des Hintergrundsignals betrachtet. Nun erfolgte aus den 8 zu jedem Versuchstier angefertigten Hirnschnitten jeweils die Berechnung des Mittelwerts dieser Signalintensität für SN links, SN rechts, VTA links und VTA rechts.

Anschließend wurde die Seitendifferenz der Signalintensitäten für SN und VTA nach Formel 9 berechnet (siehe folgende Seite).

Formel 9:

$$D (I) = [(MW I (links) - MW I (rechts)) / MW I (rechts)] * 100 \%$$

D = Differenz, MW = Mittelwert

I = Signalintensität der jeweiligen Hirnregion (effektive optische Dichte * Fläche)

Aus den so erhaltenen Mittelwerten der Seitendifferenzen des Signals der radioaktiv markierten TH₁-mRNA für die einzelnen Hirnregionen jedes Einzeltieres wurden nun für jede Gruppe an Versuchstieren erneut Mittelwert, SD und SEM berechnet. Das Ganze wurde anschließend graphisch anhand von Diagrammen dargestellt (siehe 5.4).

4.5 Statistik

Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mit dem Programm SPSS. Für die Mittelwertsvergleiche wurden jeweils t-Tests für unabhängige Stichproben durchgeführt. Zusätzlich erfolgten nicht parametrische Gruppenvergleiche mit dem U-Test nach Mann-Whitney. Als statistisch signifikant wurden Testwerte angesehen, für deren Eintreten die Wahrscheinlichkeit bei kleiner als 5 % lag ($p < 0,05$).

Für nähere Einzelheiten zu den statistischen Rechenverfahren siehe Bortz (1999).

5. Ergebnisse

5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration im Homogenat

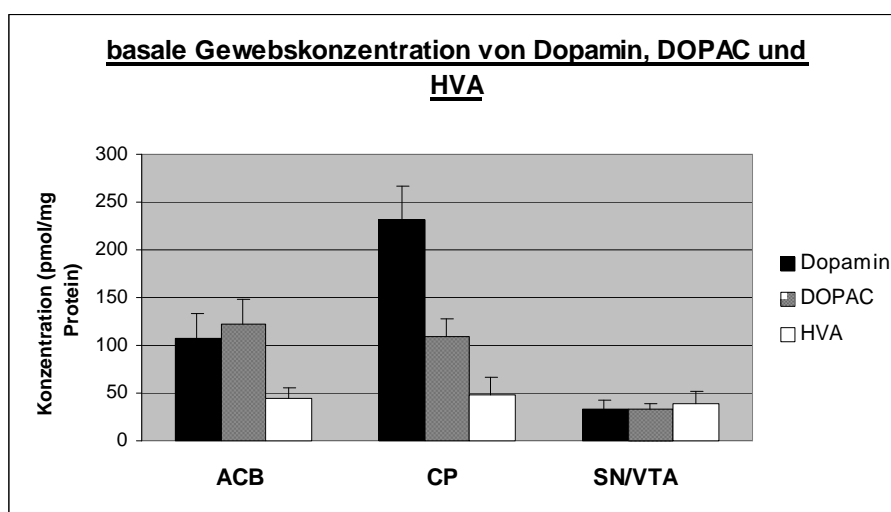
Die Ermittlung der Proteinkonzentration in jeder einzelnen Homogenatsprobe (ACB, CP, SN/VTA bzw. Nebenniere der Versuchstiere) erfolgte wie unter 3.4 und 4.1 beschrieben. Hierbei ergaben sich Proteinkonzentrationen zwischen 0,74 und 7,33 mg Protein pro ml Gewebshomogenat.

5.2: Bestimmung der Konzentrationen von Dopamin, DOPAC und HVA im Homogenat

Die chromatographische Trennung von Dopamin, DOPAC und HVA aus dem Homogenat der Hirnregionen ACB, CP und SN/VTA und die anschließende Berechnung der Seitendifferenzen ihrer Gewebskonzentrationen wurde wie in den Abschnitten 3.5 und 4.2 beschrieben durchgeführt.

Als erstes ist die basale Gewebskonzentration an Dopamin und seinen Hauptmetaboliten DOPAC und HVA in den verschiedenen Hirnregionen in Diagramm 1 dargestellt:

Diagramm 1:



Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm SEM) der Gewebskonzentrationen in der kontralateralen Hirnhälfte der Tiere der Kontrollgruppe (n = 3 Tiere) 3 Tage nach der stereotaktischen Injektion.

Man sieht deutlich, dass die Dopaminkonzentration im CP am höchsten ist. Die Konzentration des Dopaminmetaboliten DOPAC liegt im ACB und im CP ebenfalls deutlich höher als in der SN/VTA.

Dagegen unterscheidet sich die basale Gewebskonzentration des anderen Dopaminmetaboliten HVA in allen 3 Hirnregionen nur wenig. Im ACB und im CP liegt sie deutlich niedriger als die Konzentration des anderen Metaboliten DOPAC.

Aufgrund der dort vorhandenen höchsten Dopaminkonzentration werden im folgenden die Wirkungen von N-Methyl-Norsalsolinol (N-M-Norsal) und der Positivkontrolle 6-OHDA vorrangig im CP betrachtet.

Es folgt eine tabellarische Übersicht der Ergebnisse der chromatographischen Bestimmungen nach 3 Tagen Überlebenszeit:

Tabelle 1:

	<u>Ergebnisübersicht nach 3 Tagen:</u>					
	<u>Kontrolle</u>		<u>N-M-Norsal</u>		<u>6-OHDA</u>	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
<u>Ncl. accumbens</u>						
Dopamin	52,1	24,9	58,9	28,9	42	4,7
DOPAC	93,6	6,6	122,6	57,9	64,3 *	7,1
HVA	115,4	12,6	70,6	21,6	54,3 *	7,4
<u>Caudatus/Putamen</u>						
Dopamin	84,9	13,1	122,7	48,6	47,9	11,1
DOPAC	126,5	19	215,1	124	47,5 *	9,4
HVA	138	20	154	72,5	32,2 *	4,5
<u>SN/VTA</u>						
Dopamin	100,4	62,1	118,5	17	197,5	18,8
DOPAC	145,2	94,6	166,5	37	180,1	49,9
HVA	209,8	145	138,9	6,3	113	13

Alle Werte entsprechen den Mittelwerten der ipsilateralen Gewebskonzentrationen von Dopamin, DOPAC und HVA in % der jeweiligen Konzentrationen der kontralateralen Seite.

Gruppengröße: jeweils n = 3

* = t-Test und Mann-Whitney-Test sind signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (p < 0,05)

Im ACB finden sich in der Kontrollgruppe sowie in der N-M-Norsal-Gruppe ipsilateral jeweils eine recht deutliche Dopaminreduktion, DOPAC und HVA zeigen dagegen nur geringe Seitendifferenzen. Statistisch signifikante Abweichungen der N-M-Norsal-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe liegen nicht vor.

In der Positivkontrollgruppe (6-OHDA) ist hier ipsilateral die Konzentration an Dopamin und im Gegensatz zu den anderen Gruppen auch die der Metaboliten DOPAC und HVA jeweils deutlich vermindert. Die Verringerungen der Konzentrationen an DOPAC und HVA sind im Seitenvergleich statistisch signifikant gegenüber der Kontrollgruppe, die der Dopaminkonzentration dagegen nicht.

Im CP zeigen sich nach 3 Tagen in der Kontrollgruppe und in der N-M-Norsal-Gruppe nur geringe Seitendifferenzen. Die Veränderungen nach N-M-Norsal-Injektion sind sämtlich statistisch nicht signifikant. 3 Tage nach 6-OHDA-Injektion sind dagegen im CP, ähnlich wie im ACB, die ipsilateralen Gewebskonzentrationen von Dopamin, DOPAC und HVA im Vergleich zur Gegenseite auf unter 50 % gefallen. Das Absinken der Konzentrationen an DOPAC und HVA ist wiederum statistisch signifikant.

In der SN/VTA sind nach 3 Tagen im Unterschied zu den Basalganglien in allen Gruppen ipsilateral weder Dopamin noch seine Metaboliten vermindert, sondern eher erhöht, besonders nach 6-OHDA-Injektion.

21 Tage postoperativ gestalten sich die Seitendifferenzen der Gewebskonzentrationen an Dopamin, DOPAC und HVA folgendermaßen (Tabelle 2, folgende Seite):

In der Kontrollgruppe sind die Seitendifferenzen nach 3 Wochen in allen untersuchten Regionen gering. Nicht wesentlich davon verschieden ist der Effekt der hauptsächlich untersuchten Substanz N-Methyl-Norsalsolinol. Es zeigen sich jeweils nur geringe Seitenunterschiede, die sämtlich gegenüber der Kontrollgruppe statistisch nicht signifikant sind. In der 6-OHDA-Gruppe zeigt sich dagegen nach 21 Tagen ein drastischer Effekt auf die Seitendifferenz von Dopamin, DOPAC und HVA in allen untersuchten Hirnregionen.

Im ACB ist links die Dopaminkonzentration auf weniger als 10 %, im CP sogar auf weniger als 1 % der Gegenseite abgesunken. Beide Veränderungen sind statistisch signifikant gegenüber der Kontrollgruppe. Auch die Dopaminmetaboliten sind in beiden Regionen ipsilateral gegenüber der Gegenseite jeweils signifikant vermindert. In SN/VTA sind 3 Wochen nach der Injektion ipsilateral sogar weder Dopamin noch DOPAC oder HVA chromatographisch überhaupt nachweisbar.

Tabelle 2:

	Ergebnisübersicht nach 21 Tagen:					
	Kontrolle		N-M-Norsal		6-OHDA	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
<u>Ncl. accumbens</u>						
Dopamin	77,6	11,6	121,4	22,1	6,4 *	6,4
DOPAC	103,7	12,2	144,9	45,5	13,4 *	7,4
HVA	108	24,7	111,2	33,9	n. nwb. *	
<u>Caudatus/Putamen</u>						
Dopamin	87,3	5,8	68,2	7,9	0,7 *	0,7
DOPAC	117	20,3	92,2	18,4	9,4 *	6
HVA	90,1	13,4	151,9	3,1	20,4 *	20,4
<u>SN/VTA</u>						
Dopamin	80,2	16,1	141,7	42,8	n. nwb.	
DOPAC	75,8	24,2	97	30,9	n. nwb.	
HVA	50	50	72,4	40,8	n. nwb.	

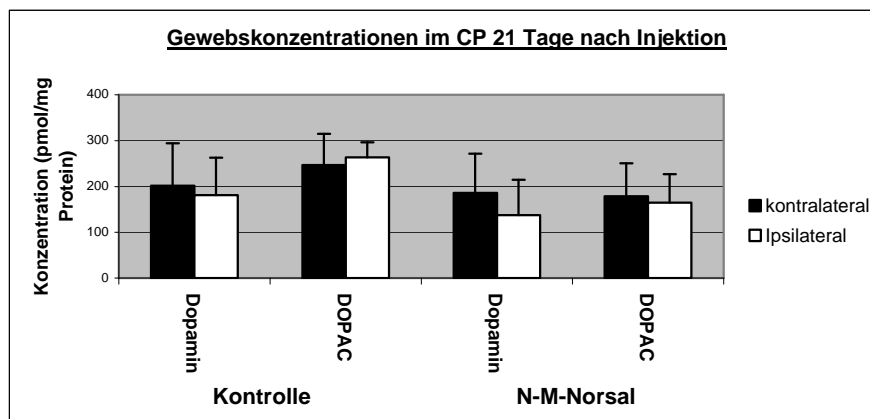
Gruppengröße: n = 3

* = t-Test und Mann-Whitney-Test sind signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (p < 0,05).

n. nwb. = Substanz nicht nachweisbar

Zur weiteren Veranschaulichung sowie zur Darstellung des bilateralen Effektes der stereotaktischen Injektionen folgen nun 2 Diagramme, die die Veränderungen der Konzentrationen an Dopamin und seinem Hauptmetaboliten DOPAC im CP, der Region mit der höchsten Dopaminkonzentration, nach 21 Tagen darstellen.

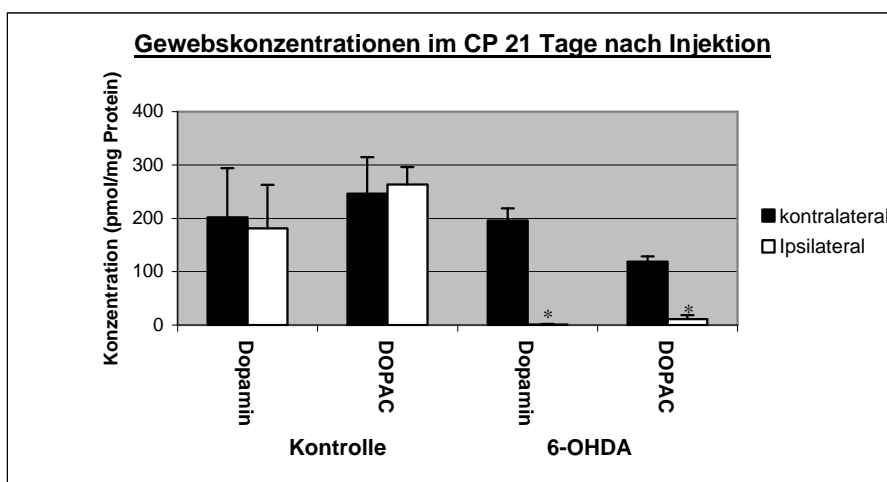
Diagramm 2:



Die mit N-Methyl-Norsalsolinol behandelten Tiere unterscheiden sich hierbei im Mittel nur wenig von den Kontrolltieren. Auch bilateral gibt es nur geringe, statistisch nicht signifikante Abweichungen (Diagramm 2).

3 Wochen nach 6-OHDA-Injektion sind im CP hingegen Dopamin und DOPAC statistisch signifikant auf weniger als 10 % der Konzentrationen der Gegenseite abgesunken (Diagramm 3). Die nicht operierten Hirnhälften unterscheiden sich dagegen kaum.

Diagramm 3:

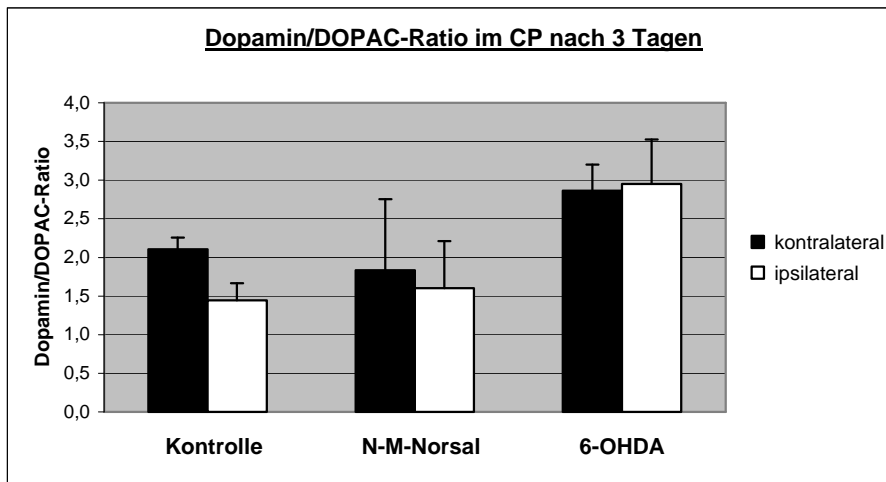


* = t-Test und Mann-Whitney-Rangsummentest sind ipsilateral für den Vergleich gegenüber der Kontrollgruppe statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Die Effekte von N-Methyl-Norsalsolinol und 6-OHDA auf die weitere Verstoffwechslung des Dopamins sind nun noch (wieder am Beispiel des CP) anhand des Quotienten Dopamin/DOPAC dargestellt.

Ein niedriger DA/DOPAC-Quotient weist auf eine hohe Dopaminfreisetzung mit anschließender Verstoffwechslung hin, ein hoher Quotient ist dagegen ein Anzeichen für eine geringere Dopaminfreisetzung (Erläuterungen siehe Abschnitt 6.1, S.66). Nach 3 Tagen ergeben sich folgende Quotienten (siehe nächste Seite):

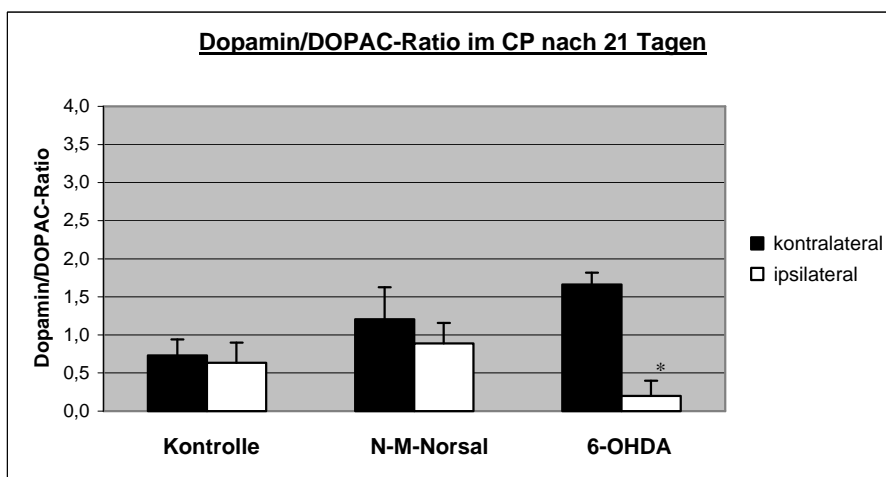
Diagramm 4:



Zwischen N-M-Norsal und Kontrolle zeigt sich zu diesem Zeitpunkt kein Unterschied im Ausmaß des Dopaminabbaus. Ipsilateral ist der Dopamin/DOPAC-Quotient jeweils leicht erniedrigt im Vergleich zu kontralateral. In der Positivkontrolle (6-OHDA) besteht dagegen nach 3 Tagen noch keine nennenswerte Seitendifferenz des Dopamin/DOPAC-Quotienten.

Nach 3 Wochen stellen sich die Quotienten folgendermaßen dar:

Diagramm 5:



* = t-Test ist ipsilateral für den Vergleich gegenüber der Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,05$).

In der Kontrollgruppe und in der N-M-Norsal-Gruppe ist der Dopamin/DOPAC-Quotient jeweils (wie bereits nach 3 Tagen) ipsilateral leicht niedriger als kontralateral. Die Seitendifferenz dieses Quotienten zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den N-M-Norsal-Tieren und den Kontrolltieren.

3 Wochen nach 6-OHDA-Injektion liegt der Dopamin/DOPAC-Quotient auf der operierten Seite dagegen deutlich niedriger als auf der Gegenseite. Diese Seitendifferenz ist im t-Test statistisch signifikant gegenüber der Kontrollgruppe. Im Mann-Whitney-Test wird eine statistische Signifikanz knapp verfehlt ($p = 0,083$), da bei einem Tier der 6-OHDA-Gruppe zu diesem Zeitpunkt auf der injizierten Seite weder Dopamin noch DOPAC nachgewiesen und somit auch kein Dopamin/DOPAC-Quotient ermittelt werden konnte. Durch die so verkleinerte Gruppengröße ist 0,083 das kleinstmögliche p im Mann-Whitney-Test.

5.3 TH-Proteinbestimmung im Homogenat durch Western-Blots

Die in dieser Versuchsreihe durchgeführten Western-Blots hatten zum Ziel, die Seitenunterschiede an Tyrosinhydroxylase-Protein zwischen ipsilateraler und kontralateraler Hirnhemisphäre zu ermitteln (siehe Abschnitte 3.6 und 4.3).

Bei den im folgenden dargestellten Ergebnissen beziehe ich mich immer auf die Seitendifferenzen der Signalintensität zwischen den Homogenatsproben der ipsilateralen und kontralateralen Hirnhälfte.

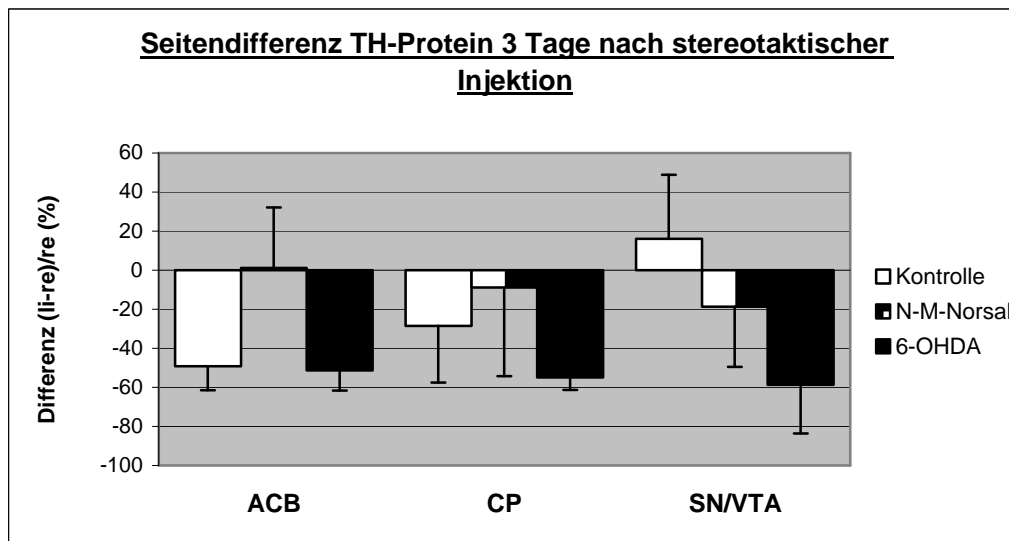
Die Mittelwerte der Seitendifferenzen der TH-Gewebkonzentrationen zum Zeitpunkt 3 Tage nach stereotaktischer Injektion sind in Diagramm 6 dargestellt (siehe folgende Seite).

Es zeigen sich 3 Tage nach der stereotaktischen Injektion in der Kontrollgruppe ein deutlicher ipsilateraler Rückgang an TH-Protein im ACB (im Vergleich zu kontralateral -49 % +/- 12 %) sowie ein weniger deutlicher TH-Rückgang im CP (-28 % +/- 29 %), in der SN/VTA dagegen ein leichter ipsilateraler Anstieg der TH (+16 % +/- 33 %).

Die mit N-Methyl-Norsalsolinol behandelten Tiere weisen zum Zeitpunkt 3 Tage in allen untersuchten Hirnregionen nur geringe Seitendifferenzen an TH-Protein auf. Statistisch signifikante Abweichungen gegenüber der Kontrollgruppe zeigen sich nicht.

In der 6-OHDA-Gruppe ergibt sich nach 3 Tagen Überlebenszeit in allen untersuchten Hirnregionen ein recht deutlicher ipsilateraler Verlust an TH-Protein (im ACB -51 % (+/- 10 %), im CP -55 % (+/- 6 %), in der SN/VTA -59 % (+/- 25 %)). Allerdings sind diese Veränderungen statistisch nicht signifikant.

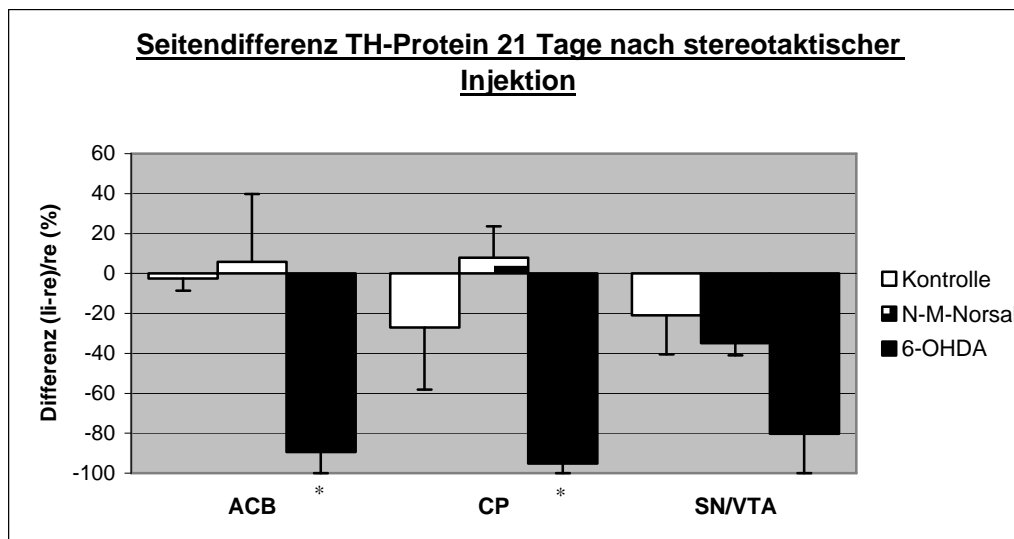
Diagramm 6:



Mittelwerte der TH-Seitendifferenzen +/- SEM, Gruppengröße jeweils n = 3.

Nach 21 Tagen Überlebenszeit verändern sich die Seitendifferenzen an Tyrosinhydroxylase folgendermaßen:

Diagramm 7:



Mittelwerte der TH-Seitendifferenzen +/- SEM, Gruppengröße: n = 3.

* = t-Test und Mann-Whitney-Test sind signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (p < 0,05)

In der Kontrollgruppe zeigt sich in allen Fällen ein leichter bis minimaler ipsilateraler Rückgang an TH-Protein (im ACB -3 % (+/- 6 %), im CP -27 % (+/- 31 %) und in der SN/VTA -21 % (+/- 20 %)).

3 Wochen nach Injektion von N-M-Norsal ist die TH-Gewebskonzentration in ACB und CP fast nicht seitenverschieden (ipsilateral zu kontralateral im ACB +6 % (+/- 34 %) und im CP +8 % (+/- 16 %). In der SN/VTA geht die TH ipsilateral dagegen im Seitenvergleich um ca. ein Drittel zurück (-35 % +/-6 %), allerdings nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle.

In der Positivkontrollgruppe 6-OHDA ist der Effekt nach 21 Tagen Überlebenszeit dagegen in allen untersuchten Hirnregionen sehr deutlich. Der ipsilaterale Rückgang der TH-Gewebskonzentration beträgt im Seitenvergleich im ACB -89 % (+/- 11 %), im CP -95 % (+/- 5 %) sowie in der SN/VTA -80 % (+/- 20 %). Die Veränderungen in ACB und CP waren statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrolle. In den Mittelhirnkerngebieten SN/VTA wurde eine Signifikanz statistisch knapp verfehlt ($p = 0,083$).

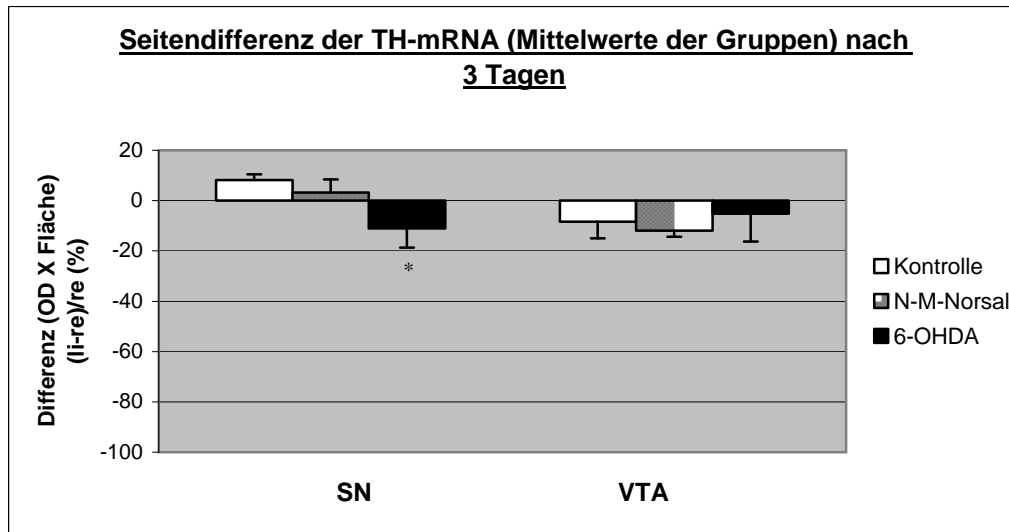
5.4 In situ-Hybridisierung der TH-mRNA auf Kryoschnitten von SN und VTA

Bei dieser Methode war mit Hilfe radioaktiv markierter, komplementärer Oligonukleotid-DNA-Sonden auf Kryoschnitten der Hirnregionen SN und VTA die in den Zellkernen der dortigen dopaminergen Neurone vorhandene TH-messenger-RNA gebunden worden. Anschließend wurden die Seitenunterschiede des durch die TH-mRNA erzeugten radioaktiven Signals zwischen den Hirnhälften ermittelt (siehe 3.9 und 4.4).

Im Gegensatz zu den chromatographischen Stofftrennungen sowie den Bestimmungen der Seitendifferenzen des TH-Proteins mittels Western-Blot ist bei der In situ-Hybridisierung zusätzlich eine Unterscheidung der Kernregionen SN und VTA möglich. Daher sind im folgenden die Effekte der untersuchten Substanzen auf die TH-Genexpression jeweils für SN und VTA getrennt aufgeführt.

Die Mittelwerte der Seitendifferenzen der TH-mRNA 3 Tage nach stereotaktischer Injektion in den einzelnen Gruppen (Kontrolle, N-M-Norsal und 6-OHDA) sind im folgenden Diagramm dargestellt:

Diagramm 8:



Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte der mittleren Seitendifferenz (+/- SEM).

Gruppengröße: n = 3 für die Kontrollgruppe bzw. n = 4 für N-M-Norsal und 6-OHDA.

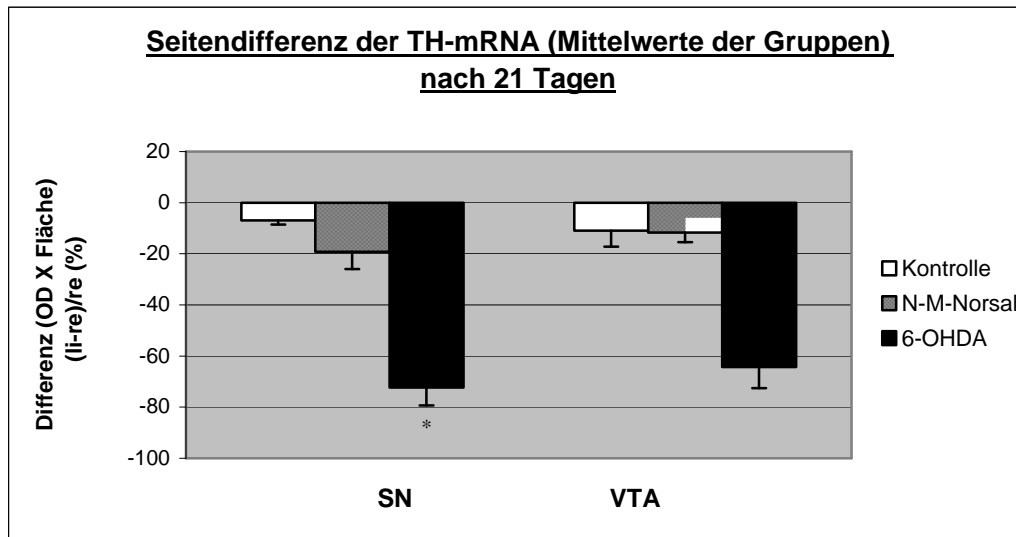
* = Mann-Whitney-Test ist signifikant für den Vergleich gegenüber der Kontrollgruppe (p < 0,05).

In der SN ergibt sich 3 Tage nach Injektion eine Seitendifferenz der TH-mRNA (ipsilateral gegen kontralateral) von +8 % (+/- 2 %) in der Kontrollgruppe, von +3 % (+/- 5 %) für N-M-Norsal sowie von -11 % (+/- 8 %) für 6-OHDA. Die Abnahme der TH-mRNA in der SN nach 6-OHDA-Applikation sind zu diesem Zeitpunkt trotz der geringen absoluten Differenz im Mann-Whitney-Rangsummentest (allerdings nicht im t-Test) statistisch signifikant.

In der Region VTA zeigen sich folgende Seitendifferenzen (wieder ipsilateral gegenüber kontralateral): -8 % (+/- 7 %) für die Kontrolle, -12 % (+/-2 %) für N-M-Norsal und -5 % (+/- 10 %) für 6-OHDA. Statistisch signifikante Abweichungen gegenüber der Kontrolle treten hier weder bei N-M-Norsal noch bei 6-OHDA auf.

21 Tage nach der stereotaktischen Injektion zeigt sich dagegen ein anderes Bild:

Diagramm 9:



Gezeigt sind wiederum die Mittelwerte der mittleren Seitendifferenz +/- SEM. Gruppengröße: n = 3 für die Kontrollgruppe, n = 4 für N-M-Norsal und 6-OHDA.

* = t-Test und Mann-Whitney-Test sind signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (p < 0,05).

In der SN ergeben sich nun Seitendifferenzen für die TH-mRNA (wieder ipsilateral gegenüber kontralateral) von -7 % (+/- 2 %) in der Kontrollgruppe, -19 % (+/- 7 %) für N-M-Norsal und -72 % (+/- 7 %) für 6-OHDA.

Ein ähnliches Bild zeigt sich auch in der VTA (-11 % (+/- 6 %) für die Kontrolle, -12 % (+/- 4 %) für N-M-Norsal sowie -64 % (+/- 8 %) für 6-OHDA.

Die Veränderungen für N-Methyl-Norsalsolinol gegenüber der Kontrollgruppe sind statistisch nicht signifikant.

In der Positivkontrollgruppe 6-OHDA ist der Rückgang der TH-mRNA-Expression in der ipsilateralen SN dagegen sowohl im t-Test als auch im Mann-Whitney-Rangsummentest statistisch signifikant. In der VTA wird eine statistische Signifikanz knapp verfehlt (p = 0,058), bedingt allerdings durch den Wert eines einzelnen Tieres, das in dieser Region nur eine geringe Seitendifferenz des durch die TH-mRNA erzeugten radioaktiven Signals aufweist.

6. Diskussion

6.1 Die Auswirkungen von N-Methyl-Norsalsolinol auf die Gewebkonzentrationen an Dopamin, DOPAC und HVA

Die basale Gewebkonzentration an Dopamin, im Homogenat der rechten, nicht operierten Hirnhälfte von Kontrolltieren ermittelt, beträgt im CP durchschnittlich 231 pmol/mg Hirnprotein, im ACB 107 pmol/mg sowie in den dopaminergen Mittelhirnkerngebieten SN und VTA 34 pmol/mg (siehe Diagramm 1, S. 54). Auch die Konzentration des Dopaminhauptmetaboliten DOPAC liegt in den Basalganglien im Durchschnitt deutlich höher als im Mittelhirn (ACB: 123 pmol/mg Protein; CP: 110 pmol/mg Protein; SN/VTA 34 pmol/mg Protein). Dagegen unterscheidet sich die basale Gewebkonzentration des anderen Dopaminmetaboliten HVA in allen 3 Hirnregionen nur wenig (ACB: 44 pmol/mg Protein; CP: 47 pmol/mg Protein; SN/VTA: 40 pmol/mg Protein).

Deutlich höhere basale Dopamin- und DOPAC-Konzentrationen im Striatum gegenüber der SN wurden bereits in vielen früheren Arbeiten nachgewiesen (z.B. Ichitani et al., 1994). Diese Ergebnisse, vor allem in Bezug auf die Dopaminkonzentration, stehen in Einklang mit der Beobachtung, dass die enzymatische Aktivität der Tyrosinhydroxylase (TH), des Schlüsselenzyms der Dopaminsynthese (Nagatsu et al., 1964; siehe Abschnitt 1.6), im Hirn der Ratte im CP sowie im ACB am höchsten ist (Hirata et al., 1983). Dies ist auch deshalb plausibel, da die TH vermutlich überwiegend in den Endigungen der dopaminergen Neurone lokalisiert ist (Hucho, 1982). Diese Endigungen befinden sich großteils im CP bzw. ACB.

Es folgt nun eine Erörterung der Auswirkungen der stereotaktischen Injektionen sowie der Neurotoxine auf die Gewebkonzentrationen von Dopamin und seinen Metaboliten DOPAC und HVA.

3 Tage nach der stereotaktischen Injektion zeigt sich in der Kontrollgruppe im ACB, in geringerem Ausmaß auch im CP, ein Rückgang der Dopaminkonzentration auf der injizierten Seite im Vergleich zur Gegenseite (siehe Tabelle 1, S. 55). Dagegen sind die Dopaminmetaboliten DOPAC und HVA ipsilateral gegenüber der Gegenseite in diesen Regionen erhöht.

Der Dopaminrückgang dürfte auf die durch die Operation erzeugte Läsion der mesolimbischen bzw. nigrostriatalen dopaminergen Bahn zurückzuführen sein.

Der Anstieg der Metabolitenkonzentrationen bewirkt auch ein ipsilaterales Absinken des Dopamin/DOPAC-Quotienten (siehe Diagramm 4, S. 59).

DOPAC entsteht mit Hilfe der Enzyme MAO und Aldehyddehydrogenase aus Dopamin (siehe Abschnitt 1.5). Ein hoher Wert des Dopamin/DOPAC-Quotienten spricht für einen geringen Dopaminumsatz (dann ist viel Dopamin im Vergleich zu seinem Hauptmetaboliten vorhanden), ein geringer Wert entsprechend für eine stärkere Verstoffwechslung des Dopamins (Zigmond et al. 1984). Da vor allem an den Synapsen freigesetztes Dopamin verstoffwechselt wird, ist der Dopamin/DOPAC-Quotient ein guter Parameter für die Aktivität der dopaminergen Neurone. Ein niedriger Quotient spricht für eine hohe Entladungsrate, ein hoher Quotient dagegen für eine niedrige Entladungsrate (Zigmond et al., 1984).

Die Veränderungen des Dopamin/DOPAC-Quotienten nach 3 Tagen in der Kontrollgruppe lassen also möglicherweise auf eine postoperativ kompensatorisch erhöhte Dopaminfreisetzung in den Basalganglien auf der operierten Seite schließen.

In der SN/VTA zeigt sich zu diesem Zeitpunkt bei den Kontrolltieren ein leichter ipsilateraler Anstieg der Konzentrationen von Dopamin, DOPAC und HVA. Diese Hirnregion scheint also durch die stereotaktische Operation zu diesem Zeitpunkt nicht beeinflusst worden zu sein.

Für N-Methyl-Norsalsolinol (N-M-Norsal) ergibt sich nach 3 Tagen ein ähnliches Bild wie in der Kontrollgruppe. Dopamin ist im ACB ipsilateral vermindert, im CP allerdings im Mittel im Vergleich zur Gegenseite leicht erhöht. Ebenso findet sich ein abgesunkener DA/DOPAC-Quotient in diesen Regionen. In der SN/VTA zeigt sich wiederum eher ein Anstieg der Gewebkonzentrationen von Dopamin und seinen Metaboliten.

Es bestehen also 3 Tage nach der stereotaktischen Injektion keine Anhaltspunkte für eine Beeinflussung der Gewebkonzentrationen von Dopamin, DOPAC und HVA oder der Freisetzung bzw. des Abbaus von Dopamin durch spezifische Effekte von N-M-Norsal.

Beim auf katecholaminerge Neurone bekanntermaßen toxisch wirkenden 6-Hydroxydopamin (6-OHDA; siehe Abschnitt 1.9) findet man dagegen schon 3 Tage nach der stereotaktischen Injektion erste Zeichen einer spezifischen Veränderung im Dopaminstoffwechsel.

Die Gewebkonzentrationen der Dopaminmetaboliten DOPAC und HVA sind ipsilateral im Vergleich zu kontralateral im ACB und im CP deutlich und statistisch signifikant abgesunken. Auch für Dopamin ist hier ipsilateral ein Rückgang festzustellen, der allerdings nicht statistisch signifikant ist.

Diese Befunde dürften anzeigen, dass durch 6-OHDA sowohl die mesolimbische als auch die nigrostriatale dopaminerge Bahn in stärkerem Ausmaß geschädigt werden als in der Kontrollgruppe. Möglicherweise können auch axonale Transportprozesse, die die TH in Richtung der Nervenendigungen in den Basalganglien transportieren, nur noch eingeschränkt ablaufen.

In den Regionen SN und VTA, den Orten der Perikaryen der dopaminergen Neurone, sind die Konzentrationen von Dopamin, DOPAC und HVA dagegen auf der operierten Seite höher als auf der Gegenseite. Hier ist der Funktionsstoffwechsel also augenscheinlich 3 Tage nach 6-OHDA-Injektion noch intakt.

21 Tage nach der stereotaktischen Operation bestehen in der Kontrollgruppe in sämtlichen untersuchten Hirnregionen keine größeren Konzentrationsunterschiede an Dopamin, DOPAC oder HVA zwischen der operierten und der nicht operierten Hirnhälfte (siehe Tabelle 2, S. 57). Die im Mittel überall ipsilateral leicht zurückgegangene Dopaminkonzentration könnte, ähnlich wie zum Zeitpunkt 3 Tage, auf eine leichte residuale Schädigung der dopaminergen Bahnen durch die stereotaktische Operation zurückzuführen sein. Dafür würde auch der ipsilateral weiterhin niedrigere Dopamin/DOPAC-Quotient sprechen, der wiederum auf eine kompensatorisch erhöhte Dopaminfreisetzung in den nicht geschädigten Neuronen hindeuten könnte (siehe Diagramm 5, S. 59). Aufgrund der prozentual geringen Ausprägung dieser Veränderungen sollte ihre Bedeutung allerdings nicht überschätzt werden.

21 Tage nach Injektion von N-M-Norsal zeigen sich, wie schon zum Zeitpunkt 3 Tage, keine signifikanten Unterschiede der Konzentrationen und der Seitendifferenzen an Dopamin, DOPAC oder HVA im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Im CP liegt die Dopaminkonzentration ipsi- und bilateral etwas niedriger als in der Kontrollgruppe (siehe Diagramm 3, S. 58), im ACB bzw. in der SN/VTA ist sie dagegen auf der ipsilateralen Seite sogar höher als kontralateral (siehe Tabelle 2, S. 57).

Ähnlich wie in der Kontrollgruppe ist auch bei N-M-Norsal im CP der Dopamin/DOPAC-Quotient ipsilateral leicht abgesunken. Die Seitendifferenz dieses Quotienten zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe.

Anhaltspunkte für spezifisch durch N-Methyl-Norsalsolinol ausgelöste Veränderungen der Gewebkonzentrationen von Dopamin und seinen Metaboliten bestehen also auch zu diesem Zeitpunkt nicht.

Bei den mit dem bekannten Neurotoxin 6-OHDA behandelten Tieren ist dagegen nach 21 Tagen in sämtlichen untersuchten Kerngebieten des nigrostriatalen bzw. mesolimbischen Systems ein gravierender Konzentrationsrückgang an Dopamin, DOPAC und HVA auf der injizierten Seite festzustellen. In den Regionen ACB und CP waren diese Veränderungen statistisch signifikant.

In der SN/VTA waren ipsilateral weder Dopamin noch seine Metaboliten DOPAC und HVA mittels HPLC nachzuweisen. Weil für diese Region die Gruppengröße zum Zeitpunkt 21 Tage nur $n = 2$ betrug, konnte hier aus methodischen Gründen rein rechnerisch keine statistische Signifikanz erzielt werden. Da die Konzentrationen aller 3 Substanzen ipsilateral in den nicht mehr messbaren Bereich abgesunken waren, ist allerdings augenscheinlich schon von einem deutlichen Effekt von 6-OHDA auch in dieser Hirnregion auszugehen.

Der Dopamin/DOPAC-Quotient ist im CP 21 Tage nach 6-OHDA-Injektion ipsilateral statistisch signifikant deutlicher als in der Kontrollgruppe abgesunken (siehe Diagramm 5). Dieses Absinken dürfte auf eine kompensatorisch erhöhte Entladungsrate der überlebenden dopaminergen Neurone der SN/VTA zurückzuführen sein (Zigmond et al., 1984).

Die Ergebnisse bezüglich des bekannten Neurotoxins 6-OHDA stimmen mit zahlreichen Vorergebnissen überein, in denen nach einseitiger Applikation dieser Substanz in das nigrostriatale System ebenfalls ein drastischer ipsilateraler Rückgang der Gewebkonzentrationen an Dopamin und seinen Metaboliten in den Basalganglien sowie in den dopaminergen Mittelhirnkerngebieten nachgewiesen wurde (z.B. Zigmond et al., 1984; Ichitani et al., 1994; Thomas et al., 1994; Scarr et al., 1994; Gerlach und Riederer, 1996; Moser et al., 1996c).

Thomas et al. (1994), die eine Dosis von 5 µg 6-OHDA in das MFB injiziert hatten, ermittelten einen Rückgang der Dopaminkonzentration in den Basalganglien (CP, ACB) nach 4-7 Wochen Überlebenszeit um 70-95 %, abhängig von der Anzahl der überlebenden TH-immunreaktiven Neurone in der Substantia nigra.

Moser et al. (1996c), die exakt denselben Versuchsaufbau wie in diesem Projekt verwendet hatten, erhielten auf der Seite der Läsion im CP einen Dopaminrückgang um 76 % sowie im ACB um 81 %, also eine vergleichbare, allerdings etwas weniger ausgeprägte Seitendifferenz als in diesen Versuchen, in denen der Dopaminrückgang jeweils mehr als 90 % betrug. Auch der (allerdings im Vergleich zu Dopamin geringere) ipsilaterale Konzentrationsrückgang der Dopaminmetaboliten DOPAC und HVA, verbunden mit einem Absinken des Dopamin/DOPAC-Quotienten, korreliert mit den oben erwähnten Vorarbeiten (Zigmond et al., 1984; Ichitani et al., 1994; Scarr et al., 1994; Moser et al., 1996c). Auch hier sind die Abweichungen noch deutlicher als bei Moser et al. (1996c).

Der Rückgang der Konzentrationen an Dopamin und seinen Metaboliten nach 6-OHDA-Applikation wird zum einen durch einen toxischen Effekt dieser Substanz auf dopaminerge Neurone erklärt (Ungerstedt, 1968; Uretsky und Iversen, 1970). Zum anderen inhibiert 6-OHDA die enzymatische Aktivität der TH, was zu einer noch weiter verminderten Dopaminproduktion führt (Gerlach und Riederer, 1996). Näheres zu den genauen Wirkmechanismen von 6-OHDA siehe Abschnitt 1.9.

Das Absinken des Dopamin/DOPAC-Quotienten zeigt wiederum eine kompensatorisch erhöhte Entladungsrate der überlebenden dopaminergen Neurone an.

Die biochemischen Veränderungen in den dopaminergen Kerngebieten nach 6-OHDA-Applikation zeigen, dass das von mir verwendete Modell geeignet war, um bei einem auf dopaminerge Zellen toxischen und den Dopaminstoffwechsel beeinflussenden Toxin eine Läsion des nigrostriatalen und des mesolimbischen dopaminergen Systems zu erzeugen.

Mit der in diesem Projekt untersuchten Substanz N-Methyl-Norsalsolinol lassen sich hingegen *in vivo* offensichtlich keine Änderungen der Dopaminkonzentration oder des Dopaminstoffwechsels in den von mir untersuchten Hirnregionen erzielen. Der in einigen Regionen zu beobachtende leichte, statistisch nicht signifikante Konzentrationsrückgang an Dopamin und seinen Metaboliten bzw. das leichte Absinken des Dopamin/DOPAC-Quotienten unterscheiden sich nicht wesentlich von den Veränderungen bei den Kontrolltieren.

Diese geringen Effekte sind somit wohl auf durch die stereotaktische Operation verursachte Schäden des nigrostriatalen bzw. mesolimbischen Systems zurückzuführen. Moser et al. (1996c) hatten nach Injektion einer geringeren Menge an N-Methyl-Norsalsolinol (8 µg gegenüber 40 µg in diesem Versuch) einen leichten, statistisch nicht signifikanten Rückgang der Dopaminkonzentration im CP (um 18 %) bzw. im ACB (um 31 %) und auch der Konzentrationen an DOPAC und HVA in diesen Regionen erzielen können. Dass in diesem Projekt mit einer fünffachen Dosis an N-Methyl-Norsalsolinol die Veränderungen noch geringer waren (im ACB lag die Konzentration an Dopamin und seinen Metaboliten auf der operierten Seite sogar höher als auf der Kontrollseite), zeigt, dass N-Methyl-Norsalsolinol mit allergrößter Wahrscheinlichkeit die Dopaminsynthese und den Dopaminstoffwechsel in den Basalganglien und in den mesenzephalen dopaminergen Kerngebieten nicht beeinflusst.

6.2 Die Auswirkungen von N-Methyl-Norsalsolinol auf die Gewebekonzentration des Enzyms Tyrosinhydroxylase

Mit Hilfe von Western-Blots wurden in diesem Projekt erstmalig die *in vivo*-Auswirkungen von N-Methyl-Norsalsolinol auf die Gewebekonzentration der Tyrosinhydroxylase, des Schlüsselenzyms der Dopaminsynthese, in den Basalganglien sowie den dopaminergen Mittelhirnkerngebieten SN und VTA untersucht. Näheres zur Methodik der Western-Blots siehe in den Abschnitten 3.6 und 4.3.

Zu beachten ist bei der Interpretation der Ergebnisse, dass aus methodischen Gründen jeweils nur eine Seitendifferenz der Intensität des durch die TH verursachten Signals ermittelt werden konnte, und zwar jeweils zwischen ipsilateraler und kontralateraler Hirnhälfte.

Ein direkter, quantitativer Vergleich der TH-Proteinkonzentrationen der einzelnen Hirnregionen zwischen unterschiedlichen Versuchstieren ist bei dieser Technik v.a. deshalb nicht möglich, da für jedes Tier eine eigene Blotmembran und ein eigener Radiofilm verwendet wurden. Die Expositionszeiten der Radiofilme und auch die Vorbehandlung der einzelnen Blots (Inkubationszeiten usw.) waren jedoch nie völlig gleich. Somit kann dieselbe Proteinkonzentration auf unterschiedlichen Filmen zu verschiedenen Signalintensitäten führen.

Die Seitendifferenzen der Konzentrationen an TH-Protein von verschiedenen Tieren konnten dagegen miteinander verglichen werden, da sie bei jedem Tier aus Signalintensitäten ein und desselben Films ermittelt wurden.

Daher ist bei den im weiteren dargestellten Ergebnissen zu beachten, dass bilaterale Effekte auf die TH-Gewebskonzentrationen, die möglicherweise durch die einseitigen stereotaktischen Injektionen entstehen könnten, aus methodischen Gründen nicht dargestellt werden können.

3 Tage nach der stereotaktischen Injektion (siehe Diagramm 6 im Ergebnisteil) zeigt sich in der Kontrollgruppe ipsilateral im ACB (-49 %) und auch im CP (-28 %) ein recht deutlicher Rückgang der TH-Gewebskonzentration. Dieser Rückgang korreliert ziemlich genau mit dem in diesen Regionen nachgewiesenen Abfall der Dopaminkonzentration (siehe Tabelle 1 im Ergebnisteil). Somit dürfte der in der Kontrolle zu diesem Zeitpunkt in den Basalganglien zu beobachtende Dopaminmangel durch eine geringere Gewebskonzentration der TH in diesen Regionen hervorgerufen worden sein. Eine mögliche Erklärung für diese ipsilateral geringere TH-Konzentration wäre, dass durch den Vorgang der stereotaktischen Injektion in das mediale Vorderhirnbündel (MFB) die Neurone des nigrostriatalen und mesolimbischen Systems geschädigt wurden. Bei Schäden an diesen Neuronen wäre es denkbar, dass aktive Prozesse wie der axonale Transport der TH von ihrem Synthesort im Mittelhirn in die Basalganglien, wo dieses Enzym normalerweise hauptsächlich lokalisiert ist (Hucho, 1982; Hirata et al., 1983), nur eingeschränkt ablaufen können. Möglicherweise verwenden die Neurone auch ihre Energie zunächst für die Beseitigung der durch die Injektion entstandenen Schäden.

Im Mittelhirn (SN/VTA) weist die TH-Gewebskonzentration, wie auch die Dopaminkonzentration, in der Kontrollgruppe nach 3 Tagen dagegen keine Seitenunterschiede auf.

3 Tage nach N-Methyl-Norsalsolinol-Injektion sind weder im ACB noch im CP noch im Mittelhirn (SN/VTA) nennenswerte Seitendifferenzen der TH-Gewebskonzentration nachweisbar. Es bestehen auch keine statistisch signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse stimmen wiederum weitgehend mit den zu diesem Zeitpunkt nur wenig veränderten Dopaminkonzentrationen in diesen Hirnregionen überein (siehe Tabelle 1).

Nur im ACB ist Dopamin bei fast unveränderter TH-Proteinkonzentration ipsilateral etwas vermindert, wofür man eventuell einen (von Scholz et al. (1997) *in vitro* beschriebenen) Hemmeffekt von N-Methyl-Norsalsolinol auf die Tyrosinhydroxylase verantwortlich machen könnte. Da diese Diskrepanz zwischen Enzymkonzentration und Dopamin aber weder statistisch signifikant noch in den übrigen untersuchten Hirnregionen zu beobachten ist, dürfte es sich wahrscheinlich um einen Zufallsbefund ohne größere Aussagekraft handeln, gerade in Anbetracht der hohen Standardabweichungen.

In der Positivkontrollgruppe 6-OHDA ist 3 Tage postoperativ in den Basalganglien (ACB und CP) ipsilateral für die TH-Proteinkonzentration jeweils eine Seitendifferenz von ca. - 50 % gegenüber der Kontrollseite festzustellen. Diese Seitendifferenz liegt jeweils besonders im CP etwas, aber nicht statistisch signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Es ist also durchaus möglich, dass der ipsilaterale TH-Abfall ebenfalls durch Operationsfolgen und einen eingeschränkten TH-Transport in die Basalganglien verursacht wurde.

Der ipsilaterale Rückgang an TH-Protein korreliert ähnlich wie bei den Kontrolltieren mit einem Rückgang der Dopaminkonzentration in ähnlicher Größenordnung (siehe Tabelle 1). Im Mittelhirn (SN/VTA) zeigt sich in der 6-OHDA-Gruppe, im Gegensatz zu den Kontrolltieren, ebenfalls ein deutlicher Rückgang der TH-Proteinkonzentration (um 59 %). Dieser verfehlt allerdings die statistische Signifikanz und korreliert nicht mit den zu diesem Zeitpunkt eher erhöhten Dopaminwerten in dieser Hirnregion (siehe Tabelle 1). Somit ist es möglich, dass es sich um ein Artefakt handelt. Andererseits könnte diese Seitendifferenz der TH auch durch eine verminderte TH-Synthese oder durch eine bereits verringerte Anzahl dopaminerger Neurone infolge der toxischen Effekte des 6-OHDA hervorgerufen worden sein (Details siehe Abschnitt 1.10). Zudem liegt die TH-Konzentration im Mittelhirn niedriger als in den Basalganglien (Hirata et al., 1983), so dass den Befunden im ACB und im CP größere Bedeutung beizumessen ist als denen in der SN/VTA.

Nach 21 Tagen gestalten sich die Seitendifferenzen bezüglich der TH-Gewebkonzentration folgendermaßen (siehe Diagramm 7, S. 61):

In der Kontrollgruppe ist sowohl in den Regionen ACB und CP als auch in der SN/VTA jeweils ein leichter ipsilateraler Rückgang der TH-Konzentration zu verzeichnen (-3 % im ACB, -27 % im CP und -21 % in SN/VTA).

Dieser Rückgang ist jeweils verbunden mit einem Absinken der Dopaminkonzentration in derselben Hirnhälfte in ähnlicher Größenordnung (siehe Tabelle 2 im Ergebnisteil).

Wie schon zum Zeitpunkt 3 Tage nach der Injektion dürfte der Dopaminrückgang durch den Verlust an Tyrosinhydroxylase begründet sein. Als Ursache für diesen Verlust kommt in meinen Augen wiederum in erster Linie eine postoperative Schädigung des nigrostriatalen und des mesolimbischen Systems mit daraus resultierender verminderter Dopaminsynthese oder eingeschränkten axonalen Transportmechanismen in Frage. Außerdem sind die Seitendifferenzen relativ gering, so dass sie durchaus auch noch im Rahmen der normalen biologischen Varianz liegen könnten.

21 Tage nach Injektion von N-Methyl-Norsalsolinol sind in den Basalganglien fast keine Seitendifferenzen bezüglich der TH-Gewebkonzentration zu beobachten (ACB: ipsilateral +6 %, CP +8 %). In der SN/VTA ist ipsilateral eine Seitendifferenz von -35 % gegenüber der nicht operierten Seite zu verzeichnen. Keine dieser Differenzen zeigt eine größere oder statistisch signifikante Abweichung im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Die Veränderungen im CP und in der SN/VTA korrelieren nicht mit den Unterschieden in der Dopaminkonzentration in diesen Hirnregionen. Die Dopaminkonzentration ist hier jeweils auf der Seite mit der niedrigeren TH-Gewebkonzentration leicht erhöht (siehe Tabelle 2).

Dies ist in meinen Augen wenig plausibel und deutet vermutlich eher darauf hin, dass es sich bei den nach Injektion von N-Methyl-Norsalsolinol aufgetretenen geringen, statistisch nicht signifikanten Seitendifferenzen der TH-Gewebkonzentration um Variationen innerhalb der normalen biologischen Spannweite handelt.

Somit können weder 3 noch 21 Tage nach Injektion von 40 µg N-Methyl-Norsalsolinol spezifische, auf diese Substanz zurückzuführende Veränderungen der Gewebkonzentration der TH im ACB, im CP oder in der SN/VTA nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis passt zu den Befunden bezüglich der Gewebkonzentrationen an Dopamin und seinen Metaboliten DOPAC und HVA, die ebenfalls durch N-Methyl-Norsalsolinol mit größter Wahrscheinlichkeit nicht beeinflusst werden.

In der 6-OHDA-Gruppe zeigt sich nach 21 Tagen hingegen in allen untersuchten Hirnregionen der nach den Vorergebnissen (Ichitani et al., 1994; Gerlach und Riederer, 1996; Zuch et al., 2000) zu erwartende drastische Rückgang der TH-Gewebkonzentration auf der injizierten Seite.

Im ACB beträgt die Seitendifferenz -89 %, im CP -95 % und in der SN/VTA -80 %. Im ACB und im CP ist diese Seitendifferenz statistisch signifikant gegenüber der Kontrolle. In der SN/VTA wird eine statistische Signifikanz knapp verfehlt ($p = 0,083$). In Anbetracht der oben erwähnten Vorergebnisse, der Befunde aus den anderen Hirnregionen sowie des mit dem TH-Proteinrückgang korrelierenden Dopaminrückgangs in der ipsilateralen SN/VTA (siehe Tabelle 2) ist allerdings meiner Meinung nach davon auszugehen, dass dieser deutliche Rückgang durch die 6-OHDA-Injektion verursacht und biologisch relevant ist.

Der Grund für die ipsilaterale Abnahme der TH-Gewebskonzentration in der 6-OHDA-Gruppe ist höchstwahrscheinlich der durch 6-OHDA verursachte Zelltod dopaminerger Neurone in der SN und in der VTA. Dieser Zelltod ist bekanntermaßen auch mit einer Abnahme der TH-Immunreaktivität in den Basalganglien sowie in der SN/VTA verbunden (Ichitani et al., 1994; Zuch et al., 2000).

Die Abnahme der TH-Gewebskonzentration unter dem Einfluss von 6-OHDA korreliert mit vorangegangenen Western Blot-Analysen in TH-haltigem Gewebe nach Applikation von 6-OHDA. Hier war ebenfalls ein deutlicher Rückgang der TH-Konzentrationen nachgewiesen worden (Unnerstall und Ladner, 1994; Guo et al., 2001).

Der ipsilaterale Verlust an Dopamin liegt prozentual jeweils noch etwas höher als der Verlust an TH-Protein (siehe Tabelle 2). Hierfür könnte der bekannte inhibitorische Effekt von 6-OHDA auf die TH verantwortlich sein (Gerlach und Riederer, 1996).

Somit konnten in der Western-Blot-Versuchsreihe erneut die Vorergebnisse bezüglich der Positivkontrolle 6-OHDA reproduziert werden. Nennenswerte Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den mit N-Methyl-Norsalsolinol behandelten Tieren traten dagegen nicht auf.

6.3 Die Auswirkungen von N-Methyl-Norsalsolinol auf die mRNA-Expression des Enzyms Tyrosinhydroxylase

Ebenfalls erstmalig in diesem Projekt wurden die Auswirkungen einer stereotaktischen N-Methyl-Norsalsolinol-Injektion in das MFB auf die Expression der messenger-RNA des Enzyms Tyrosinhydroxylase in den mesenzephalen dopaminergen Kerngebieten SN und

VTA untersucht. Dies geschah mittels In situ-Hybridisierung auf Kryoschnitten des Mittelhirns (siehe 3.9 und 4.4).

Ähnlich wie bei den Western-Blots (siehe 6.2) war ein direkter, quantitativer Vergleich der Mengen an nachgewiesener TH-mRNA zwischen unterschiedlichen Tieren nicht möglich. Somit ist auch bei den unten aufgeführten Ergebnissen zu beachten, dass mögliche bilaterale Effekte auf die TH-Genexpression nicht dargestellt werden können.

3 Tage nach stereotaktischer Injektion zeigt sich in der Kontrollgruppe eine Seitendifferenz an TH-mRNA (ipsilateral gegen kontralateral) von +8 %, in der VTA hingegen von -8 % (siehe Diagramm 8, S. 63). Die Veränderungen sind also nur sehr gering und dürften im Rahmen der normalen interindividuellen Schwankungen liegen. Diese Befunde passen zu den Ergebnissen bezüglich der TH-Gewebskonzentration und der Dopaminkonzentration, wo ebenfalls nach 3 Tagen in der Kontrollgruppe in den dopaminergen Mittelhirnkerngebieten keine größeren Veränderungen festzustellen sind (siehe 6.1 und 6.2).

In der N-Methyl-Norsalsolinol-Gruppe bestehen nach 3 Tagen auf der injizierten Seite ebenfalls nur geringe Seitenunterschiede gegenüber der Kontrollseite (SN: +3 %, VTA: -12 %). Diese Veränderungen sind statistisch nicht signifikant gegenüber der Kontrolle. Dies stimmt wiederum mit den Beobachtungen aus den anderen Versuchen überein, in denen nach 3 Tagen kein Effekt von N-M-Norsal auf die TH- oder Dopamingewebskonzentration nachgewiesen werden konnte.

3 Tage nach 6-OHDA-Injektion zeigt sich in der SN ein ipsilateraler Rückgang des Signals der TH-mRNA gegenüber der Gegenseite um -11 %, in der VTA um -5 %. Die Veränderungen sind also beide prozentual noch recht gering. Der Rückgang in der SN ist im Mann-Whitney-Rangsummentest statistisch signifikant gegenüber der Kontrolle, nicht dagegen im t-Test. Der Rückgang in der VTA ist statistisch nicht signifikant.

Es könnte also sein, dass die dopaminergen Neurone der Substantia nigra schon nach 3 Tagen in ihrem Funktionsstoffwechsel soweit eingeschränkt sind, dass die Neusynthese von Enzymen wie der TH nur noch in vermindertem Ausmaß ablaufen kann. Andererseits ist es natürlich fraglich, ob dieser Rückgang der TH-mRNA um gut 10 % tatsächlich eine biologische Relevanz hat, besonders in Anbetracht der geringen Fallzahl von $n = 3$.

In der 6-OHDA-Gruppe ist nach 3 Tagen der Rückgang des Signals der TH-mRNA im Mittelhirn im Seitenvergleich prozentual deutlich geringer als das dortige Absinken der TH-Gewebskonzentration (siehe Diagramm 7). Dies könnte ein Anhalt dafür sein, dass durch vermehrte Neusynthese der TH versucht wird, den Verlust an diesem Enzym zu kompensieren.

21 Tage postoperativ besteht in der Kontrollgruppe eine Seitendifferenz des Signals der TH-mRNA von -7 % in der SN und von -11 % in der VTA (siehe Diagramm 9, S. 64). Diese geringe Seitendifferenz dürfte wiederum durch eine Schädigung der dortigen dopaminergen Neurone durch die stereotaktische Injektion in das MFB zu erklären sein. Der geringe Rückgang korreliert gut mit den Ergebnissen bezüglich der Dopamin- und der TH-Gewebskonzentration, wo ebenfalls bei den Kontrolltieren nach 21 Tagen in allen untersuchten Hirnregionen ipsilateral ein gewisser Rückgang zu verzeichnen ist (siehe Tabelle 2 sowie Diagramm 7).

In der Gruppe der Tiere 21 Tage nach Injektion von N-Methyl-Norsalsolinol zeigt sich in der SN eine Seitendifferenz von -19 % und in der SN/VTA von -12 %. Der Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe ist also jeweils nur gering und zudem statistisch nicht signifikant. In Anbetracht der Ergebnisse der Bestimmungen der TH- und Dopamingewebskonzentrationen (siehe wieder Tabelle 2 und Diagramm 7), die ebenfalls keine größeren oder signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den mit N-Methyl-Norsalsolinol behandelten Tieren aufweisen, ist auch hier nicht davon auszugehen, dass die Expression des Enzyms TH *in vivo* durch N-Methyl-Norsalsolinol in relevantem Ausmaß beeinflusst wird.

In der Positivkontrollgruppe (nach 6-OHDA-Injektion) liegt die Expression der TH nach 3 Wochen ipsilateral im Seitenvergleich in der SN um 72 % und in der VTA um 64 % niedriger. In der SN ist diese Seitendifferenz statistisch signifikant, in der VTA wird die Signifikanz aufgrund eines Tieres mit nur geringer Seitendifferenz knapp verfehlt ($p = 0,058$). Insgesamt kommt es augenscheinlich durch die bereits beschriebenen toxischen Auswirkungen von 6-OHDA, die zu einem Untergang TH-positiver dopaminergener Neurone führen, zu einer gegenüber der Kontrollseite deutlich verminderten Expression des Enzyms Tyrosinhydroxylase.

Der Rückgang des Signals der TH-mRNA ist prozentual geringer als die Abnahme der Gewebkonzentrationen der TH sowie von Dopamin und seinen Metaboliten DOPAC und HVA (siehe Tabelle 2 und Diagramm 7). Dies dürfte auf eine kompensatorisch erhöhte TH-Produktion in den überlebenden dopaminergen Neuronen in SN/VTA als Reaktion auf den Dopaminmangel in den Basalganglien sein. Ziel von solchen Kompensationsmechanismen in den überlebenden Neuronen ist es, die Folgen der toxischen Wirkung des 6-OHDA abzumildern.

Vorangegangene Arbeiten, in denen der Einfluss von 6-OHDA auf die Expression der TH-mRNA in den dopaminergen Regionen SN und VTA untersucht wurde, ließen sich in der Literatur nicht finden. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe passen jedoch zu den Befunden bezüglich der Auswirkungen dieser Substanz auf die Gewebkonzentrationen von Dopamin und seinen Metaboliten sowie auf die von fertigem TH-Protein, wo sich ebenfalls jeweils ein deutlicher Rückgang nach 6-OHDA-Applikation zeigt.

Zusammenfassend gesagt, wird durch die In situ-Hybridisierung der TH-mRNA kein Einfluss von N-Methyl-Norsalsolinol auf die Expression der TH nachgewiesen. Nach Injektion des bekannten Toxins 6-OHDA zeigt sich dagegen wiederum ein deutlicher Effekt auf der ipsilateralen Seite.

6.4 Zusammenfassung der *in vivo*-Auswirkungen von N-Methyl-Norsalsolinol auf den Dopaminstoffwechsel

Insgesamt konnte in diesem Projekt durch einseitige stereotaktische Injektion einer Dosis von 40 µg N-Methyl-Norsalsolinol (gegenüber 8 µg im Vorversuch von Moser et al. (1996c)) kein wesentlicher, von der Kontrollgruppe abweichender *in vivo*-Effekt dieser Substanz auf den Dopaminstoffwechsel bzw. auf die Gewebkonzentration und die Expression des Enzyms Tyrosinhydroxylase nachgewiesen werden.

Moser et al. (1996c) hatten in ihrem Projekt einen leichten, allerdings statistisch nicht signifikanten Rückgang der Gewebkonzentrationen an Dopamin, DOPAC und HVA festgestellt. Weiter zeigten sich dort unter dem Einfluss von N-Methyl-Norsalsolinol weder im CP noch in der SN histologische Unterschiede gegenüber Kontrolltieren. Auch die MAO-Aktivität hatte sich ipsilateral nicht verändert.

In Verbindung mit den Ergebnissen dieser Arbeit stützen diese Vorergebnisse in meinen Augen die These, dass N-Methyl-Norsalsolinol *in vivo* in physiologisch relevanten Dosen keine parkinsonähnlichen oder sonstigen Veränderungen des Dopaminstoffwechsels oder der Expression der TH bewirkt.

Die von Moser und Kömpf (1992) im Liquor von Parkinsonpatienten nachgewiesenen Konzentrationen an N-Methyl-Norsalsolinol lagen zwischen 15 und 60 pmol/ml, also in einem sehr niedrigen Bereich.

Wie sind diese Ergebnisse nun mit den übrigen Vorbefunden bezüglich der Wirkungen von N-Methyl-Norsalsolinol in Einklang zu bringen?

Scholz et al. (1997) hatten *in vitro* einen deutlichen inhibitorischen Effekt von N-Methyl-Norsalsolinol auf die Enzymaktivität der Tyrosinhydroxylase nachweisen können (nähere Details zum Dopaminstoffwechsel siehe Abschnitt 1.5). Es gibt Anhaltspunkte für eine nichtkompetitive Hemmung der TH durch N-Methyl-Norsalsolinol. Der genaue Mechanismus konnte allerdings bisher noch nicht aufgeklärt werden (Scholz et al., 1997; Scholz und Moser, 1998). Demzufolge würde man auch *in vivo* einen Rückgang der Dopaminkonzentration nach Injektion von N-Methyl-Norsalsolinol erwarten. Allerdings kann natürlich *in vitro* durch eine direkte Inkubation der TH mit N-Methyl-Norsalsolinol viel leichter ein Effekt erzielt werden als *in vivo*, wo die Toxine erst aus dem Injektionsort in die Zielregionen transportiert werden müssen, dort eine geringere Konzentration als bei den *in vitro*-Versuchen aufweisen und außerdem Verstoffwechslungen und vielfältigen anderen Einflüssen ausgesetzt sind. Es ist also durchaus möglich und in meinen Augen auch wahrscheinlich, dass die *in vitro* zu beobachtenden Veränderungen des Dopaminstoffwechsels keine tatsächliche biologische Relevanz haben. Zudem ist zu beachten, dass N-Methyl-Norsalsolinol eine strukturelle Ähnlichkeit zu Dopamin aufweist (siehe die Abb. 1, S. 12, und Abb. 5, S. 16). Dopamin bewirkt wie alle Katecholamine über einen negativen Rückkopplungsmechanismus eine Hemmung der enzymatischen Aktivität der TH (Fitzpatrick, 2000; Maass et al., 2003). Somit stellt sich in meinen Augen die Frage, wie spezifisch für N-Methyl-Norsalsolinol die durch diese Substanz *in vitro* mögliche Hemmung der TH-Aktivität überhaupt ist.

Ähnlich wie mit der TH-Aktivität verhält es sich mit der Beeinflussung der MAO-Aktivität durch N-Methyl-Norsalsolinol. Auch hier konnte *in vitro* ein inhibitorischer Effekt

nachgewiesen werden (Minami et al., 1993; Moser et al., 1996a), nicht dagegen *in vivo* (Moser et al., 1996c).

Dies stützt in meinen Augen die These, dass die Auswirkungen von N-Methyl-Norsalsolinol auf den Dopaminstoffwechsel wenig praktische Relevanz haben.

Auch die Hemmeffekte, die N-Methyl-Norsalsolinol (Morikawa et al., 1998) und sein aktiver Metabolit, das 2-Methyl-6,7-Dihydroxy-1,2,3,4-Tetrahydroisochinoliniumion (McNaught et al., 1995), auf den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette ausüben, konnten lediglich *in vitro* nachgewiesen werden. Diese leichten Wirkungen (durch das 2-Methyl-6,7-Dihydroxy-1,2,3,4-Tetrahydroisochinoliniumion z.B. wurde eine Abschwächung der Aktivität von Komplex I um 12,5 % erreicht (McNaught et al., 1995)) belegen zwar ein gewisses toxisches Potential von N-Methyl-Norsalsolinol.

Dass diese Toxizität aber stark genug ist, um *in vivo* eine Läsion des dopaminergen nigrostriatalen Systems zu bewirken, bleibt anhand der Ergebnisse dieser Arbeit und auch der Vorergebnisse von Moser et al. (1996c) fraglich.

Die parkinsonähnlichen biochemischen Veränderungen, die die chemisch verwandte Substanz N-Methyl-(R)-Salsolinol (Abb. 5, S. 16) nach Injektion in das Striatum ausgelöst hatte (Naoi et al., 1996; siehe Abschnitt 1.7, S. 18), konnten in diesem Projekt durch den Einsatz von N-Methyl-Norsalsolinol nicht reproduziert werden. Naoi et al. (1996) hatten durch N-Methyl-(R)-Salsolinol u.a. einen Abfall der Dopaminkonzentration und der TH-Aktivität im CP sowie in der SN um jeweils mehr als 50 % erzielt. Außerdem war die Zahl der TH-positiven dopaminergen Neurone in der SN nach einwöchiger kontinuierlicher Injektion von N-Methyl-(R)-Salsolinol deutlich vermindert, nicht dagegen in der VTA.

N-Methyl-Norsalsolinol scheint also *in vivo* weniger stark toxisch zu sein als N-Methyl-(R)-Salsolinol. Dazu würde auch die Beobachtung passen, dass eine einmalige einseitige Injektion von N-Methyl-(R)-Salsolinol bei Ratten parkinsonähnliche Bewegungsauffälligkeiten auslösen kann, andere TIQ-Derivate (u.a. auch N-Methyl-Norsalsolinol) hingegen nicht (Naoi et al., 1996).

In zwei neueren Arbeiten konnten auch nach intraperitonealer Injektion von N-Methyl-Norsalsolinol, das im Gegensatz zur früheren Ansicht in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überschreiten (Thümen et al., 2002), ähnlich wie in diesem Projekt keine wesentlichen Änderungen der Dopamin- und DOPAC-Konzentration im CP erzielt werden, weder im mittels Mikrodialyse gewonnenen Dialysat (Thümen et al., 2002; Thümen et al., 2003) noch im Gewebshomogenat (Thümen et al., 2003).

Dagegen ergaben sich nach intraperitonealer N-Methyl-Norsalsolinol-Injektion auffällige Veränderungen im Serotoninstoffwechsel (Thümen et al., 2003). Weiterhin zeigten sich bei den so behandelten Tieren Verhaltensauffälligkeiten, die möglicherweise den psychiatrischen Auffälligkeiten mancher Parkinsonpatienten nach systemischer L-Dopa-Therapie entsprechen (Rondot et al., 1984; Moser et al., 1996b; Thümen et al., 2003). Auch eine Modulation serotonerger Rezeptoren im Striatum konnte nachgewiesen werden (Moser et al., 2003). Die Erforschung der Effekte von N-Methyl-Norsalsolinol auf das serotonerge System verdient also sicherlich weiterhin Beachtung.

Insgesamt ist es aber eher unwahrscheinlich, dass N-Methyl-Norsalsolinol *in vivo* den Dopaminstoffwechsel in größerem Umfang beeinflusst. Somit dürfte diese Substanz auch nicht in relevantem Ausmaß an der Pathogenese der Parkinson-Krankheit beteiligt sein.

7. Zusammenfassung:

Seit der Entdeckung, dass durch MPTP beim Menschen und auch bei Tieren ein irreversibles Parkinson-Syndrom ausgelöst werden kann (Langston et al., 1983; Burns et al., 1983), ist die Erforschung endogener und exogener Toxine, die möglicherweise an der Entstehung dieser Erkrankung beteiligt sind, ein wichtiges Thema der Erforschung der Ätiopathogenese der Parkinson-Krankheit. In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen des möglicherweise endogenen Neurotoxins N-Methyl-Norsalsolinol (N-M-Norsal), das im menschlichen Hirngewebe (Niwa et al., 1991) sowie im Liquor von Parkinsonpatienten (Moser und Kömpf, 1992) nachgewiesen wurde, auf den Dopaminstoffwechsel sowie auf die Gewebskonzentration und die mRNA-Expression der Tyrosinhydroxylase (TH), des Schlüsselenzyms der Dopaminsynthese (Nagatsu et al., 1964), untersucht. Dies geschah *in vivo* am Tiermodell der Ratte.

Hierzu wurde den Versuchstieren eine Dosis von 40 µg N-Methyl-Norsalsolinol einseitig in das linke mediale Vorderhirnbündel (MFB) stereotaktisch injiziert. Das MFB ist ein Nervenbahnsystem bei der Ratte, das die dopaminergen Kerngebiete des Mittelhirns (Substantia nigra (SN) und Area tegmentalis ventralis (VTA)) mit den Basalganglien (Caudatus/Putamen (CP) sowie Nucleus accumbens (ACB)) verbindet. Somit erreicht N-Methyl-Norsalsolinol nach Injektion in das MFB sämtliche oben aufgeführten dopaminergen Hirnareale.

Zu 2 verschiedenen Zeitpunkten (3 und 21 Tage Überlebenszeit) wurden nun bei einem Teil der Versuchstiere im Gewebshomogenat des ACB, des CP sowie der SN/VTA mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) die Gewebskonzentrationen von Dopamin sowie den Dopaminmetaboliten DOPAC und HVA bestimmt. Außerdem wurden im Homogenat dieser Regionen Western-Blots zur Ermittlung von Veränderungen der Gewebskonzentration des Enzyms Tyrosinhydroxylase durchgeführt, und zwar jeweils im Vergleich zur rechten, nicht injizierten Hirnhälfte.

Bei einem anderen Teil der Versuchstiere wurden am Kryotom 15 µm dicke Schnitte der Mittelhirnregionen SN und VTA angefertigt. Anschließend erfolgte auf diesen Hirnschnitten eine *In situ*-Hybridisierung der TH-mRNA zur Ermittlung von Veränderungen der Neusynthese des Enzyms TH unter dem Einfluss von N-Methyl-Norsalsolinol.

Als negative Kontrolle diente eine Gruppe von Versuchstieren, denen lediglich sterile NaCl-Lösung ohne Toxingehalt injiziert worden war, als Positivkontrolle wurde eine Gruppe mit 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) behandelte Tiere verwendet. 6-OHDA ist ein Toxin, das bekanntermaßen ähnlich wie MPTP zu einem selektiven Untergang dopaminerger Neurone führt.

Weder 3 noch 21 Tage nach der stereotaktischen Injektion konnten spezifische Auswirkungen von N-Methyl-Norsalsolinol auf die Gewebekonzentration von Dopamin oder den Dopaminstoffwechsel nachgewiesen werden. Auch bezüglich der Gewebekonzentration der TH oder des Signals der TH-mRNA gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit N-Methyl-Norsalsolinol behandelten Tieren und den Kontrolltieren. In manchen Hirnregionen waren die Gewebekonzentrationen an Dopamin bzw. TH-Protein sowie das Signal der TH-mRNA auf der injizierten Seite leicht vermindert. Derartige leichte Veränderungen waren allerdings auch bei den Kontrolltieren zu beobachten. Sie sind somit wahrscheinlich Folge der Läsion des dopaminergen Systems durch den Injektionsvorgang und nicht auf Auswirkungen von N-Methyl-Norsalsolinol zurückzuführen.

Nach 6-OHDA-Injektion zeigte sich dagegen auf der Seite der Injektion der erwartete drastische Rückgang der Konzentrationen an Dopamin und TH-Protein sowie ein einseitig vermindertes Signal der TH-mRNA. Dies zeigt, dass das verwendete Tiermodell prinzipiell geeignet war, eine Läsion des dopaminergen Systems zu erzeugen. Allerdings führte N-Methyl-Norsalsolinol offensichtlich zu keinen derartigen Veränderungen.

Somit ist aus den Ergebnissen dieser Arbeit zu schließen, dass N-Methyl-Norsalsolinol *in vivo* keine Veränderungen des Dopaminstoffwechsels verursacht. Auch die Gewebekonzentration sowie die Neusynthese des Enzyms Tyrosinhydroxylase wurden durch N-Methyl-Norsalsolinol nicht beeinflusst.

Zu klären bleiben sicherlich noch die kürzlich entdeckten Auswirkungen von N-Methyl-Norsalsolinol auf den Serotoninstoffwechsel (Thümen et al., 2003; Moser et al., 2003). Dagegen scheint der Einfluss dieser Substanz auf das dopaminerge System sehr gering zu sein. Somit ist es auch sehr unwahrscheinlich, dass N-Methyl-Norsalsolinol in relevantem Ausmaß an der Pathogenese der Parkinson-Krankheit beteiligt ist.

8. Verzeichnis der Abkürzungen

A = Ampere

ACB = Nucleus accumbens

BCA = Bicinchoninsäure, (engl. *bicinchoninic acid*)

BH₄ = 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin

BSA = Rinderserumalbumin (engl. *bovine serum albumine*)

bzw. = beziehungsweise

C = Kohlenstoff

°C = Grad Celsius

cm = Zentimeter (10⁻² Meter)

CO₂ = Kohlendioxid

COMT = Catechol-O-Methyltransferase

CP = Caudatus/Putamen

Cu = Kupfer

d = Tag

dATP = desoxy-Adenosintriphosphat

Da = Dalton

DEPC = Diethylpyrocarbonat

DNA = Desoxyribonukleinsäure (engl. *desoxyribonucleic acid*)

DOPAC = 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (engl. *dihydroxyphenylacetic acid*)

DTT = Dithiothreitol

E.C.: Enzyme Code (internationale Enzym-Klassifizierung)

ECL = engl. *enhanced chemiluminescent solution*

EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure

engl. = englisch

et al. = und andere (lat. *et alii*)

FAD = Flavin-Adenin-Dinukleotid

Fe = Eisen

g = Gramm

g = Erdbeschleunigung

GABA = γ -Aminobuttersäure

ggf. = gegebenenfalls

H = Wasserstoff

h = Stunde

HCl = Salzsäure

Hg. = Herausgeber

HPLC = Hochdruckflüssigkeitschromatographie (engl. *high performance liquid chromatography*)

HRP = Meerrettich-Peroxidase (engl. *horseradish peroxidase*)

HVA = Homovanillinsäure

H₂O = Wasser

H₂O₂ = Wasserstoffperoxid

Hz = Hertz

IE = internationale Einheiten

Ig = Immunglobulin

k = Kilo (10³)

kg = Kilogramm (10³ Gramm)

l = Liter

L-Dopa = 3,4-Dihydroxyphenylalanin

M = Mol * l⁻¹

M = mega (10⁶)

m = Meter

m = milli (10⁻³)

MAO = Monoaminoxidase

MAO A/B = Monoaminoxidase Typ A/ Typ B

2-MDTIQ = N-Methyl-Norsalsolinol (2-Methyl-6,7-Dihydroxy-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin)

MFB = mediales Vorderhirnbündel (engl. *medial forebrain bundle*)

mg = Milligramm (10⁻³ Gramm)

µg = Mikrogramm (10⁻⁶ Gramm)

min = Minute

ml = Milliliter (10⁻³ Liter)

µl = Mikroliter (10⁻⁶ Liter)

mm = Millimeter (10⁻³ Meter)

µm = Mikrometer (10⁻⁶ Meter)

MPP⁺ = 1-Methyl-4-Phenylpyridiniumion

MPTP = 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin

mRNA = messenger-RNA

N = Stickstoff
n = nano (10⁻⁹)
Na = Natrium
NaCl = Natriumchlorid
NADH = reduziertes Nikotinsäureamid-Adenindinukleotid
NaOH = Natriumhydroxid
Ncl. = Nucleus
NH₄-Acetat = Ammoniumacetat
nm = Nanometer (10⁻⁹ Meter)
NN = Nebenniere
n. nwb. = nicht nachweisbar
O = Sauerstoff
6-OHDA = 6-Hydroxydopamin
p = pico (10⁻¹²)
p = statistische Wahrscheinlichkeit
Pa = Pascal
PBS = Phosphatpuffer (engl. *phosphate buffered saline*)
PFA = Paraformaldehyd
pH = negativer Zehnerlogarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RNA = Ribonukleinsäure (engl. *ribonucleic acid*)
S = Schwefel
SDS = Natriumdodecylsulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*)
SDS-PAGE = SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SN = Substantia nigra
s.o. = siehe oben
sog. = sogenannte/-r
s.u. = siehe unten
suppl = engl. *supplement*
TBS = Tris-gepufferte Salzlösung (engl. *Tris-buffered saline*)
TBST = mit Tween versetzte TBS
TdT = terminale Transferase
TEA = Triethanolamin
TH = Tyrosinhydroxylase
TH₁ = Isoenzym 1 der TH
Tris = Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

tRNA = transfer-RNA

u.a. = unter anderem

V = Volt

v.a. = vor allem

VTA = Area tegmentalis ventralis (engl. *ventral tegmental area*)

v/v = engl. *volume/volume*

w/v = engl. *weight/volume*

z.B. = zum Beispiel

3rd = engl. *third*

9. Literaturverzeichnis:

Akhaven-Tafti H, Sugioka K, Arghavani Z, DeSilva R, Handley R, Sugioka Y, Eickholt R, Perkins MP, Schaap AP: Chemiluminescent detection of horseradish peroxidase by enzymatic generation of acridinium esters. *Clin Chem* 41: 1368-1369 (1995)

Barcia C, Emborg ME, Hirsch EC, Herrero MT: Blood vessels and parkinsonism. *Front Biosci* 9: 277-282 (2004)

Bortz J: Verfahren zur Überprüfung von Unterschiedshypothesen. In: Bortz J (Hg.): *Statistik für Sozialwissenschaftler*, 5. Auflage. S. 133-172. Springer, Berlin (1999)

Braak H, Braak E, Yilmazer D, Schultz C, De Vos RAI, Jansen ENH: Amygdala pathology in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 88: 493-500 (1994)

Braak H, Rüb U, Braak E: Neuroanatomie des Morbus Parkinson. *Nervenarzt* 71: 459-469 (2000)

Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E: Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24: 197-211 (2003)

Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM, Kopin IJ: A primate model of Parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 4546-4550 (1983)

Chiba K, Trevor AJ, Castagnoli N Jr: Metabolism of the neurotoxin tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 120: 574-578 (1984)

Clayton DF, George JM: Synukleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *J Neurosci Res* 58: 120-129 (1999)

- Cleeter MJW, Cooper JM, Schapira AHV: Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 1-methyl-4-phenylpyridinium: Evidence for free radical involvement. *J Neurochem* 58: 786-789 (1992)
- Collins MA: Neuroamine condensations in human subjects. *Adv Exp Med Biol* 126: 87-102 (1980)
- Davies GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM, Kopin IJ: Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res* 1: 249-254 (1979)
- De Rijk MC, Launer LJ, Berger K : Prevalence of Parkinson's disease in Europe: a collaborative study of population-based cohorts. *Neurology* 54 (11 suppl 5): S21-23 (2000)
- Dickson DW, Schmidt ML, Lee VMY, Zhao ML, Yen SH, Trojanowski JQ: Immunoreactivity profile of hippocampal CA2/3 neurites in diffuse Lewy body disease. *Acta Neuropathol* 87: 269-276 (1994)
- Emre M: Dementia associated with Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2: 229-237 (2003)
- Fearnley JM, Lees AJ: Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114: 2283-2301 (1991)
- Fitzpatrick PF: The aromatic amino acid hydroxylases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 74: 235-94 (2000)
- Garfin DE: One-dimensional gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 182: 425-441 (1990)
- Gerlach M, Riederer P: Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J Neural Transm* 103: 987-1041 (1996)
- German DC, Manaye KF: Midbrain dopaminergic neurons (nuclei A8, A9 and A 10): three-dimensional reconstruction in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 331: 297-309 (1993)

Görg A, Westermeier R: Elektrophoretische Verfahren. In: Lottspeich F, Zorbas H (Hg.): Bioanalytik. S. 247-252. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin (1998)

Golbe LI: Young-onset Parkinson's disease: A clinical review. *Neurology* 41: 168-173 (1991)

Guo X, Dawson VL, Dawson TM: Neuroimmunophilin ligands exert neuroregeneration and neuroprotection in midbrain dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 13: 1683-1693 (2001)

Heimer L, Zahm DS, Alheid GF: Basal ganglia. In: Paxinos G (Hg.): The rat nervous system. Second edition. S. 579-628. Academic Press Inc., San Diego, New York (1995)

Hirata Y, Togari A, Nagatsu T: Studies on tyrosine hydroxylase system in rat brain slices using high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Neurochem* 40: 1585-1589 (1983)

Hirata Y, Nagatsu T: Inhibition of tyrosine hydroxylation in tissue slices of the rat striatum by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Brain Res* 337: 193-196 (1985)

Hirata Y: Tyrosine hydroxylase: biochemical properties and short-term regulation in vitro and in vivo. In: Moser A (Hg.): Pharmacology of endogenous neurotoxins. S. 209-220. Birkhäuser, Boston (1998)

Hucho F: Synapsen, 1 Teil. In: Einführung in die Neurochemie, S. 185-195. Verlag Chemie, Weinheim (1982)

Ichitani Y, Okamura H, Nakahara D, Nagatsu I, Iyata Y: Biochemical and immunocytochemical changes induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine injection in the rat nigrostriatal dopamine neuron system: evidence for cell death in the substantia nigra. *Experimental Neurology* 130: 269-278 (1994)

Inzelberg R, Schechtman E, Paleacu D: Onset age of Parkinson's disease. *Am J Med Genet* 111: 459-460 (2002)

Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH: Parkinsonism inducing neurotoxin N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: Uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 2173-2177 (1985)

Jellinger K: New developments in the pathology of Parkinson's disease. *Advances in Neurology* 53: 1-16 (1990)

Jimenez-Jimenez FJ, Garcia-Ruiz PJ, Molina JA: Drug-induced movement disorders. *Drug Saf* 16: 180-204 (1997)

Jöhren O, Neidert SJ, Kummer M, Dendorfer A, Dominiak P: Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats. *Endocrinology* 142: 3324-3331 (2001)

Jost WH: Autonomic dysfunctions in idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol* 250 (suppl1): I 28-30 (2003)

Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 (1970)

Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I: Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analogue synthesis. *Science* 219: 979-980 (1983)

Lewy, FH: Paralysis agitans. I. Pathologische Anatomie. In: Lewandowski M (Hg.): *Handbuch der Neurologie*. S. 920-933. Springer Verlag, Berlin (1912)

Lewy FH: Zur pathologischen Anatomie der Paralysis agitans. *Dtsch Z Nervheilkd* 50: 50-55 (1913)

Maass A, Scholz J, Moser A: Modeled ligand-protein complexes elucidate the origin of substrate specificity and provide insight into catalytic mechanisms of phenylalanine hydroxylase and tyrosine hydroxylase. *Eur J Biochem* 270:1065-1075 (2003)

Masuhr KF, Neumann M: Parkinson-Krankheit. In: Masuhr KF, Neumann M (Hg.): *Neurologie*. S.189-196. Hippokrates Verlag, Stuttgart (1998)

Mayeux R, Marder K, Cote LJ: The frequency of idiopathic Parkinson's disease by age, ethnic group, and sex in northern Manhattan, 1988-1993. *Am J Epidemiol* 142: 820-827 (1995)

McDonald WM, Richard IH, DeLong MR: Prevalence, etiology, and treatment of depressions in Parkinson's disease. *Biol Psychiatry* 54: 363-375 (2003)

McNaught KSP, Thull U, Carrupt PA, Altomare C, Cellamare S, Carotti A, Testa B, Jenner P, Marsden CD: Inhibition of complex I by isoquinoline derivates structurally related to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Biochem Pharmacol* 50: 1903-1911 (1995)

McNaught KSP, Carrupt PA, Altomare C, Cellamare S, Carotti A, Testa B, Jenner P, Marsden CD: Isoquinoline derivates as endogenous neurotoxins in the aetiology of Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol* 56: 921-933 (1998)

Minami M, Maruyama W, Dostert P, Nagatsu T, Naoi M: Inhibition of type A and B monoamine oxidase by 6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines and their N-methylated derivates. *J Neural Transm* 92: 125-135 (1993)

Mizuno Y, Saitoh T, Sone N: Inhibition of mitochondrial α -ketoglutarate dehydrogenase by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion. *Biochem Biophys Res Commun* 143: 971-976 (1987)

Morikawa N, Naoi M, Maruyama W, Ohta S, Kotake Y, Kawai H, Niwa T, Dostert P, Mizuno Y: Effects of various tetrahydroisoquinoline derivates on mitochondrial respiration chain and the electron transfer complexes. *J Neural Transm* 105: 677-688 (1998)

Moser A, Reavill C, Jenner P, Marsden CD, Cramer H: Effect of somatostatin on dopamine sensitive adenylate cyclase activity in the CP of the rat. *Exp Brain Research* 62: 567-571 (1986)

Moser A, Kömpf D: Presence of methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines, derivatives of the neurotoxin isoquinoline, in parkinsonian lumbar CSF. *Life Sci* 50: 1885-1891 (1992)

Moser A, Vieregge P, Kömpf D: Cerebrospinal fluid dopamine metabolites levels after treatment with deprenyl in Parkinson's disease. In: Felgenhauer K, Holzgraefe M, Prange HW (Hg.): *CNS barriers and modern CSF diagnostics*. S. 427 – 429. VCH Publishers, New York (1993)

Moser A, Scholz J, Nobbe F, Vieregge P, Böhme V, Bamberg H: Presence of N-methyl-norsalsolinol in the CSF: correlations with dopamine metabolites of patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 131:183-189 (1995)

Moser A, Scholz J, Bamberg H, Böhme V: The effect of N-methyl-norsalsolinol on monoamine oxidase of the rat nucleus caudatus *in vitro*. *Neurochem Int* 28: 109-112 (1996a)

Moser A, Siebecker F, Vieregge P, Jaskowski P, Kömpf D: Salsolinol, catecholamine metabolites, and visual hallucinations in L-dopa treated patients with Parkinson's disease. *J Neural Transm* 103: 421-432 (1996b)

Moser A, Siebecker F, Nobbe F, Böhme V: Rotational behaviour and neurochemical changes in unilateral N-methyl-norsalsolinol and 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Exp Brain Res* 112: 89-95 (1996c)

Moser A: TIQ derivatives in the human central nervous system. In: Moser A (Hg.): *Pharmacology of endogenous neurotoxins*. S. 25-40. Birkhäuser, Boston (1998)

Moser A, Thümen A, Qadri F: Modulation of striatal serotonin and opioid receptor mRNA expression following systemic N-methyl-norsalsolinol administration. *J Neurol Sci* 216: 109-112 (2003)

Nagatsu T, Levitt M, Udenfried S: Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrin biosynthesis. *J Biol Chem* 239: 2910-2917 (1964)

Nagatsu T, Kaneda N, Kobayashi K, Ichinose H, Sasaoka T, Kiuchi K, Fujita K, Kurosawa Y: The human tyrosine hydroxylase gene. In: Naoi M, Parvez SH (Hg.): Tyrosine hydroxylase. S. 177-191. VSP, Utrecht (1993)

Nakane PK, Kawaoi A: Peroxidase-labelled antibody. A new method of conjugation. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 22: 1084-1091 (1974)

Naoi M, Maruyama W, Dostert P, Hashizume Y, Nakahara D, Takahashi T, Ota M: Dopamine-derived endogenous 1(R),2(N)-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, N-methyl-(R)-salsolinol, induced parkinsonism in rats: Biochemical, pathological and behavioral studies. *Brain Res* 709: 285-295 (1996)

Niwa T, Takeda N, Yoshizumi H, Tatematsu A, Yoshida M, Dostert P, Naoi M, Nagatsu T: Presence of 2-methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinoline and 1,2-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, novel endogenous amines, in parkinsonian and normal human brains. *Biochem Biophys Res Commun* 177: 603-609 (1991)

Niwa T, Kajita M, Nagatsu T: Isoquinoline Derivates. In: Moser A (Hg.): Pharmacology of endogenous neurotoxins. S. 3-23. Birkhäuser, Boston (1998)

Paxinos G, Watson C: The rat brain in stereotactic coordinates, 4th edition. Academic Press, San Diego, New York (1998)

Porter CC, Totara J, Stone CA: Effect of 6-hydroxydopamine and some other compounds on the concentration of norepinephrine in the hearts of mice. *J Pharmacol Exp Ther* 140: 308-316 (1963)

- Rajput AH: Frequency and cause of Parkinson's disease. *Can J Neurol Sci* 19 (1 suppl): 103-107 (1992)
- Ramsay RR, Singer TP: Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. *J Biol Chem* 261: 7585-7587 (1986)
- Rondot P, de Recondo J, Coignet A, Ziegler M: Mental disorders in Parkinson's disease after treatment with L-dopa. *Adv Neurol* 40: 259-269 (1984)
- Ross BM, Knowler JT, McCulloch J: On the stability of messenger RNA and ribosomal RNA in the brains of control human subjects and patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 58: 1810-1819 (1992)
- Sachs CH, Jonsson G: Mechanism of action of 6-hydroxydopamine. *Pharmacology* 24: 1-8 (1975)
- Samii A, Nutt JG, Ransom BR: Parkinson's disease. *Lancet* 363: 1783-1793 (2004)
- Scarr E, Wingerchuk DM, Juorio AV, Paterson IA: The effects of monoamine oxidase B inhibition on dopamine metabolism in rats with nigro-striatal lesions. *Neurochem Res* 12: 153-159 (1994)
- Scholz J, Bamberg H, Moser A: N-Methyl-norsalsolinol, an endogenous neurotoxin, inhibits tyrosine hydroxylase activity in the rat brain nucleus accumbens *in vitro*. *Neurochem. Int.* 31: 845-849 (1997)
- Scholz J, Moser A: Tyrosine hydroxylase and endogenous neurotoxins. In: Moser A (Hg.): *Pharmacology of endogenous neurotoxins*. S. 221-236. Birkhäuser, Boston (1998)
- Sibon I, Tison F: Vascular parkinsonism. *Curr Opin Neurol.* 17: 49-54 (2004)

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85 (1985). Erratum in: *Anal Biochem* 163: 279 (1987)

Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M: Alpha-Synuklein in Lewy bodies. *Nature* 388: 839-840 (1997)

Stern MB: Head Trauma as a risk for Parkinson's disease. *Mov Disord* 6: 95-97 (1991)

Sun AY, Chen YM: Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *J Biomed Sci* 5: 401-414 (1998)

Thomas J, Wang J, Takubo H, Sheng J, de Jesus S, Bankiewicz KS: A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model: further biochemical and behavioral characterization. *Experimental Neurology* 126: 159-167 (1994)

Thümen A, Behnecke A, Qadri F, Bäuml E, Moser A: N-Methyl-norsalsolinol, a putative dopaminergic neurotoxin, passes through the blood-brain barrier *in vivo*. *Neuroreport* 13: 25-28 (2002)

Thümen A, Behnecke A, Qadri F, Moser A: N-methyl-norsalsolinol modulates serotonin metabolism in the rat caudate nucleus: correlations with behavioural changes. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 6: 35-40 (2003)

Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354 (1979)

Trepel M: Basalganglien und assoziierte Strukturen, zentrale Regulation der Motorik. In: Trepel M (Hg.): *Neuroanatomie: Struktur und Funktion*, 2. Auflage. S. 186-195. Urban und Fischer Verlag, München (1999a)

Trepel M: Substantia nigra. In: Trepel M (Hg.): *Neuroanatomie: Struktur und Funktion*, 2. Auflage. S. 126-128. Urban und Fischer Verlag, München (1999b)

Trojanowski JQ, Lee VMY: Aggregation of neurofilament and α -Synuclein proteins in Lewy bodies – implications for the pathogenesis of Parkinson's disease and Lewy body dementia. *Arch Neurol* 55: 151-152 (1998)

Ungerstedt U: 6-Hydroxydopamine-induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* 5: 107-110 (1968)

Unnerstall JR, Ladner A: Deficits in the activation and phosphorylation of hippocampal tyrosine hydroxylase in the aged Fischer 344 rat following intraventricular administration of 6-hydroxydopamine. *J Neurochem.* 63: 280-290 (1994)

Uretsky NJ, Iversen LL: Effects of 6-hydroxydopamine on catecholamines containing neurons in the rat brain. *J Neurochem* 17: 269-278 (1970)

von Economo, C: Encephalitis lethargica: its sequela and treatment. Oxford Univ Press, London, 1931

Wakabayashi K, Takahashi H: Neuropathology of autonomic nervous system in Parkinson's disease. *Eur Neurol* 38 (suppl 2) : 2-7 (1997)

Whitehead TP, Kricka LJ, Carter TJN, Thorpe GHG: Analytical luminescence: Its potential in the clinical laboratory. *Clin Chem* 25: 1532-1546 (1979)

Wiechelmann KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD: Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for colour formation. *Anal Biochem* 175: 231-237 (1988)

Wisden W, Morris BJ: In situ hybridization with synthetic oligonucleotide probes. In: *In situ hybridization protocols for the brain*. S. 10-33. Academic Press, San Diego, New York (1994)

Young WS 3rd, Mezey E, Siegel RE: Quantitative in situ hybridization histochemistry reveals increased levels of corticotropin-releasing factor mRNA after adrenalectomy in rats. *Neurosci Lett.* 70: 198-203 (1986)

Zigmond MJ, Acheson AL, Stachowiak MK, Strickerm EM: Neurochemical compensation after nigrostriatal bundle injury in an animal model of preclinical parkinsonism. Arch Neurol 41: 856-861 (1984)

Zigmond MJ, Stricker EM: Animal models of Parkinsonism using selective neurotoxins: clinical and basic implications. In: Smythies JR, Bradley RJ (Hg.): International review of neurobiology, vol. 31, S. 10-79. Academic Press, San Diego, New York (1989)

Zuch CL, Nordstroem VK, Briedrick LA, Hoernig GR, Granholm AC, Bickford PC: Time course of degenerative alterations in nigral dopaminergic neurons following a 6-hydroxydopamine lesion. The Journal of Comparative Neurology 427: 440-454 (2000)

10. Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, in Zusammenarbeit mit dem Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, erstellt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Andreas Moser aus der Klinik für Neurologie für die Überlassung des Themas und für die verständnisvolle Betreuung. Für die anfängliche Betreuung danke ich ebenfalls Herrn Dr. med. Joachim Scholz.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. med. Olaf Jöhren aus dem Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie für seine hervorragende Einarbeitung in die Technik der In situ-Hybridisierung und nicht zuletzt auch dafür, dass er mir auch bei darüber hinausgehenden Fragen zu meiner Arbeit stets kompetent und hilfsbereit zur Seite stand.

Ebenfalls ein herzlicher Dank für die hilfsbereite und freundliche Einarbeitung und für die anschließende nette Zusammenarbeit geht an Frau Katharina Schnackenberg, Frau Karin Wieggers, Frau Marlies Reher sowie Frau Gisa Brunk aus dem Labor für Liquordiagnostik und Neuroimmunchemie. Außerdem danken möchte ich Frau Dr. Fatimunnisa Qadri, Frau Constanze Siggel und Frau Christine Eichholz aus dem Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie für die freundliche Hilfe und das sehr angenehme Arbeitsklima.

Ein Dank geht weiterhin an die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Tierhaltung für die Pflege der Tiere und die unkomplizierte Zusammenarbeit sowie an meinen Bruder Peter Bürmann, der mir bei der statistischen Auswertung des Datenmaterials behilflich war.

Als letztes möchte ich mich noch herzlich bei meinem Doktorandenkollegen Konrad Mende für die sehr angenehme und zuverlässige Zusammenarbeit in guten und gerade auch in weniger guten Zeiten bedanken.

10. Publikationsliste

Posterpräsentation:

Bürmann J, Mende K, Jöhren O, Scholz J, Moser A: Interference of N-methyl-norsalsolinol with the metabolism of dopamine *in vivo*. European Neurological Society (ENS) 12th Meeting, Berlin, Germany (22.-26.06. 2002)

11. Lebenslauf

Persönliche Daten :

Name: Bürmann
Vorname: Jan Christian
Geburtsdatum: 23.10.1977
Geburtsort: Osnabrück
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1983 – 1987 Heinrich-Schüren-Schule, Osnabrück (Grundschule)
1987 – 1989 Orientierungsstufe Innenstadt, Osnabrück
1989 – 1996 Gymnasium Carolinum, Osnabrück
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

01.08.1996 – 31.08.1997 Altenpflege im Bischof-Lilje-Altenzentrum, Osnabrück

Hochschulbildung:

Seit Oktober 1997 Studium der Humanmedizin, Universität zu Lübeck
September 1999 Ärztliche Vorprüfung
August 2000 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
September 2003 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2005 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Seit 01.07.2005 Assistenzarzt in der Neurologischen Klinik, Klinikum Darmstadt

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.