

Aus der Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Einfluss der Hochfrequenzstimulation des
Nucleus subthalamicus auf die Regulation
des nigro-striatalen Dopaminstoffwechsels
der Ratte**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

René Reese

aus Berlin

- Gutachter:
1. Professor Dr. med. A. Kupsch
 2. Professor Dr. med. Th. Gasser
 3. Professor Dr. med. J. Volkmann

Datum der Promotion: 01. Juni 2008

Meinen Eltern

Teile der vorliegenden Arbeit sind bereits veröffentlicht:

Wassilios Meissner, Daniel Harnack, **René Reese**, Gesine Paul, Torsten Reum, Mark Ansorge, Heike Kusserow, Christine Winter, Rudolf Morgenstern, Andreas Kupsch (2003) **High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus enhances striatal dopamine release and metabolism in rats.** *J Neurochem* 85: 601-609.

René Reese, Christine Winter, Agnes Nadjar, Daniel Harnack, Rudolf Morgenstern, Andreas Kupsch, Erwan Bezard, Wassilios Meissner (2008) **Subthalamic stimulation increases striatal tyrosine hydroxylase phosphorylation.** *NeuroReport* 19: 179-182.

Abkürzungsverzeichnis

6-OHDA	6-Hydroxydopamin
6R-BH4	6-Methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin
BSA	Bovine Serum Albumin
CaM	Calmodulin
CaM-KII	Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy-DNA
COMT	Catechyl-O-Methyl-Transferase
DA	Dopamin
DAT	Präsynaptischer Dopamintransporter
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylacetat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP	Nucleus entopeduncularis
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GAD	Glutamatdecarboxylase
GP	Globus pallidus
GPe	Globus pallidus externus
GPi	Globus pallidus internus
HFS	Hochfrequenzstimulation
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase
HVA	Homovanillinmandelsäure
i.p.	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
L-Dopa	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
MAO	Monoaminoxidase
min	Minute
MPPP	1-Methyl-4-phenyl-4-Propionpiperidin
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin

mRNA	messenger-RNA
NGF	Nervenwachstumsfaktor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PET	Positronenemissionstomographie
PKA	Proteinkinase A
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SMA	Supplementär-motorische Area
SSC	Saline Sodium Citrat
SNe	Substantia nigra pars compacta
SNr	Substantia nigra pars reticulata
STN	Nucleus subthalamicus
STN-HFS	Hochfrequenzstimulation im Nucleus subthalamicus
TH	Tyrosinhydroxylase
pTH	phosphorylierte Tyrosinhydroxylase
ZNS	Zentralnervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	10
1.1	Das Idiopathische Parkinson-Syndrom – Eine Übersicht	10
1.2	Die Hochfrequenzstimulation des Nucleus subthalamicus als vielversprechende Therapieoption des langjährigen Morbus Parkinson.....	12
1.3	Wirkmechanismen intrazerebraler Hochfrequenzstimulation.....	15
1.4	Das nigro-striatale dopaminerge System	19
1.5	Regulation des nigro-striatalen Dopaminstoffwechsels unter Hochfrequenzstimulation des Nucleus subthalamicus der Ratte.....	23
1.6	Entwicklung der Fragestellungen.....	24
2	MATERIAL UND METHODEN.....	25
2.1	Allgemeine Vorbemerkungen	25
2.2	Verwendete Tiere.....	25
2.3	Pharmakologische Behandlung	25
2.4	Narkose, stereotaktische Operation und Mikrodialyse	27
2.5	Aktivitätsmessung der Tyrosinhydroxylase in vitro.....	28
2.6	Semi-quantitative Bestimmung der Tyrosinhydroxylase-mRNA mittels RT-PCR	29
2.7	Radioaktive Quantifizierung der PCR-Produkte	31
2.8	Quantitative Bestimmung der striatalen Tyrosinhydroxylase-Konzentration und –Phosphorylierung	32
2.9	Histologische Verifizierung der Mikrodialysesonden- und Elektrodenlage	33
2.10	Statistische Methoden zur Analyse der erhobenen Daten.....	34
2.10.1	Statistische Auswertung der Mikrodialyse-Daten	34
2.10.2	Statistische Auswertung der TH-Aktivität und der TH-mRNA.	35
2.10.3	Statistische Auswertung der TH-Quantität und –Phosphorylierung.....	35

3	ERGEBNISSE	36
3.1	Einfluss der STN-HFS auf den striatalen Dopaminstoffwechsel ohne pharmakologische Beeinflussung	36
3.2	Einfluss der STN-HFS auf den striatalen Dopaminstoffwechsel nach Hemmung der Monoaminoxidase	36
3.3	Einfluss der STN-HFS auf den striatalen Dopaminstoffwechsel nach Dopaminwiederaufnahmehemmung	39
3.4	Einfluss der STN-HFS auf den striatalen Dopaminstoffwechsel nach Entleerung der vesikulären Katecholaminspeicher durch Reserpin.....	41
3.5	Einfluss der STN-HFS auf die nigrale und striatale Aktivität der TH	43
3.6	Einfluss der STN-HFS auf die nigrale und striatale TH-mRNA-Expression	44
3.7	Einfluss der STN-HFS auf die striatale TH-Quantität und TH-Phosphorylierung	45
4	DISKUSSION	46
4.1	Einfluss der STN-HFS auf den striatalen Dopaminstoffwechsel nach Inhibition der Monoaminoxidase	47
4.2	Einfluss der STN-HFS auf den striatalen Dopaminstoffwechsel nach Dopaminwiederaufnahmehemmung	47
4.3	Einfluss der STN-HFS auf den striatalen Dopaminstoffwechsel nach Entleerung der vesikulären Katecholaminspeicher durch Reserpin.....	48
4.4	Einfluss der STN-HFS auf die striatale und nigrale TH-Aktivität und -mRNA-Expression, des striatalen TH-Proteingehaltes und der -Phosphorylierung	49
4.5	Kritische Betrachtung der Ergebnisse im Hinblick auf physiologische Bedingungen und Limitierung der Ergebnisinterpretation	50
4.6	Einbeziehen der Ergebnisse in die aktuellen Modelle zur Wirkung intrazerebraler Hochfrequenzstimulation und die Suche nach einem anatomischen Korrelat.....	52
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	55
6	LITERATURVERZEICHNIS	57

7	DANKSAGUNG	68
8	ERKLÄRUNG	69
9	LEBENS LAUF	70

5 Zusammenfassung

Die Hochfrequenzstimulation des Nucleus subthalamicus (STN-HFS) ist mittlerweile eine etablierte Therapieoption für langjährige Parkinson-Patienten, bei denen die Symptomkontrolle durch die dopaminerge Substitutionstherapie aufgrund von Nebenwirkungen wie Fluktuationen und L-Dopa induzierten Dyskinesien nicht mehr möglich ist. Durch die STN-HFS lassen sich zum einen alle Kardinalsymptome in hervorragendem Maße positiv beeinflussen, zum anderen ist es möglich, und zum maximalen Therapieerfolg bezüglich der L-Dopa induzierten Dyskinesien auch oftmals notwendig, die dopaminerge Medikation zu reduzieren.

In der Ratte ist kürzlich ein direkter Effekt der STN-HFS auf den striatalen Dopaminstoffwechsel nachgewiesen worden. Dabei zeigte sich in Vorstudien ein Anstieg der extrazellulär striatalen Konzentrationen der Metabolite 3,4-Dihydroxyphenylacetat (DOPAC) und Homovanillinmandelsäure (HVA), jedoch ohne Effekt auf Dopamin.

Die vorliegende Arbeit untersuchte nun die Effekte der STN-HFS auf das extrazellulär-striatale Dopamin (DA) und seiner Metabolite DOPAC und HVA in der gesunden Ratte unter pharmakologischer Beeinflussung mittels Mikrodialyse. So wurden die einzelnen Versuchsgruppen entweder mit dem Monoaminoxidase (MAO)-Hemmer Pargylin oder mit Reserpin, welches die präsynaptischen Dopaminspeicher irreversibel zerstört, vorbehandelt. Einer dritten Gruppe wurde, aufgrund der kurzen Halbwertszeit des Pharmakons, der Dopaminwiederaufnahmememmer Nomifensin direkt der Dialyseflüssigkeit zugeführt. Durch diese pharmakologische Beeinflussung sollte insbesondere die Diskrepanz des extrazellulär-striatalen Anstiegs der Metabolite des DA-Stoffwechsels ohne gleichzeitige Erhöhung des DA näher untersucht werden.

Darüber hinaus wurde eine mögliche Beeinflussung des Schrittmacherenzym der Katecholaminsynthese (und damit der von DA), der Tyrosinhydroxylase (TH), durch die STN-HFS untersucht. Dieses Enzym wird unter anderem durch eine Phosphorylierung verschiedener Serin-Enden (TH19, 31, 40) in seiner Aktivität gesteigert. So erfolgte zusätzlich die Bestimmung der Enzymphosphorylierung im Striatum sowie der –aktivität und TH-mRNA-Expression auch in der Substantia nigra pars compacta (SNc).

Die akute STN-HFS erhöhte die striatale Dopaminfreisetzung und unabhängig davon die extrazellulär-striatalen Konzentrationen der Metabolite DOPAC und HVA. Die Aktivität der Tyrosinhydroxylase im ipsilateralen Striatum, nicht jedoch in der SNc, war gesteigert. Ebenso fand sich eine erhöhte striatale TH-Phosphorylierungsrate insbesondere von TH19. Zumindest

unter den gewählten Untersuchungsbedingungen hatte die STN-HFS keinen Einfluss auf die striatale oder nigrale TH-mRNA-Expression.

Durch die Daten der vorliegenden Arbeit kann angenommen werden, dass die Wirkung der STN-HFS zumindest teilweise durch eine direkte extrazellulär-striatale Dopaminfreisetzung zustande kommt und damit eventuell auch die bei Parkinson-Patienten mögliche Reduktion dopaminergischer Medikamente erklären könnte. Die Steigerung der striatalen TH-Aktivität unter STN-HFS, welche möglicherweise durch die beobachtete Erhöhung der striatalen TH-Phosphorylierung zustande kommt, könnte, wie auch die erhöhte Dopaminausschüttung selbst, Ausdruck einer aktionspotenzialvermittelten Übertragung sein. Ein morphologisches Korrelat könnte eine elektrische Reizübertragung auf anatomische Faserverbindungen zwischen STN und SNc oder dem STN direkt benachbarte nigro-striatale Verbindungen darstellen.

7 Danksagung

Ich danke meinem Freund und wissenschaftlichen Mentor Herrn Dr. Dr. Wassilios Meissner für das intellektuelle Begleiten dieser und anderer Arbeiten auf jeder Stufe bis zur endgültigen Fertigstellung. Ohne ihn wäre ich in meinem wissenschaftlichen Werdegang nicht dort, wo ich jetzt stehe.

Weiterhin möchte ich meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Andreas Kupsch für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die wissenschaftliche und klinische Ausbildung danken, die mir durch ihn zuteil wurde.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Herrn Professor Dr. Rudolf Morgenstern und Herrn Professor Dr. Franz Theuring des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Charité Berlin, insbesondere Frau Dr. Heike Kusserow und Herrn Dr. Mark Ansorge. Ohne deren Unterstützung und Einsatz wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Auch den Mitarbeitern der französischen Arbeitsgruppe im CNRS UMR 5543 der Université Bordeaux II um Professor Bernard Bioulac, namentlich Dr. Erwan Bezard, Dr. Thomas Boraud, Dr. Abdelhamid Benazzouz und Dr. Christian Gross, möchte ich für ihre weitreichende Unterstützung und die wundervolle Zeit in Frankreich herzlich danken.

8 Erklärung

Ich, René Reese, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Einfluss der Hochfrequenzstimulation des Nucleus subthalamicus auf die Regulation des nigro-striatalen Dopaminstoffwechsels der Ratte“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

9 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.