

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Universitätsklinikum Charité
Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin
eingereicht über den
Fachbereich Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Untersuchungen zur Interaktion aminerg
Transmissionssysteme:
Auswirkungen serotonerger Läsionen auf den striatalen
hochaffinen Dopamin-Reuptake
im Gehirn der Ratte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Sonja Kay
Tierärztin aus Waren (Müritz)

Berlin 2001

Journal-Nr. 2552

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. F. G. Schmidt

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. H. Fink

Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. R. Morgenstern

Tag der Promotion: 24.05.2002

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 4 |
| TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS..... | 6 |
| 1. EINLEITUNG..... | 8 |
| 2. LITERATUR..... | 11 |
| 2.1. DAS DOPAMINERGE TRANSMISSIONSSYSTEM..... | 11 |
| 2.1.1. <i>Dopamin - ein klassischer Neurotransmitter: Geschichtlicher Abriss</i> | 11 |
| 2.1.2. <i>Dopaminerge Systeme des ZNS</i> | 12 |
| 2.1.3. <i>Das Striatum</i> | 14 |
| 2.1.3.1. Das Striatum im Basalgangliensystem..... | 14 |
| 2.1.3.2. Die Basalganglienschleife..... | 16 |
| 2.1.3.3. Striatale Hauptverknüpfungen | 18 |
| 2.1.3.4. Striatale Kompartimentierung und territoriale Gliederung | 18 |
| 2.1.3.5. Striatale Zytoarchitektur/ Elektrophysiologie | 20 |
| 2.1.3.6. Das Medium Spiny Neuron - Hauptintegrationselement des STR/ Synaptische Organisation | 21 |
| 2.1.3.7. Die dopaminerge Synapse im Striatum/ synaptische Transmission | 24 |
| 2.1.3.8. Der Dopamintransporter | 28 |
| 2.1.3.8.1. Lokalisation und Verteilung des DAT | 29 |
| 2.1.3.8.2. Struktur des DAT..... | 30 |
| 2.1.3.8.3. Transportfunktion und elektrophysiologische Eigenschaften des DAT..... | 31 |
| 2.1.3.8.4. Substrate und Inhibitoren des DAT | 33 |
| 2.1.3.8.5. Regulation und Beeinträchtigung der DAT-Funktion..... | 35 |
| 2.2. DAS SEROTONERGE TRANSMISSIONSSYSTEM | 43 |
| 2.2.1. <i>Serotonin - ein klassischer Neurotransmitter: Geschichtlicher Abriss</i> | 43 |
| 2.2.2. <i>Serotonerge Projektionen im ZNS</i> | 45 |
| 2.2.2.1. Die Raphekerne - Ursprungsgebiet des serotonergen Systems | 45 |
| 2.2.2.1.1. Klassifikation und Topographie..... | 45 |
| 2.2.2.1.2. Zytoarchitektur | 46 |
| 2.2.2.2. Projektion der Raphekerne..... | 48 |
| 2.2.3. <i>Serotonerge Rezeptoren im ZNS</i> | 49 |
| 2.2.4. <i>Läsion serotonerger Neurone im ZNS – Bedeutung und Wirkung von</i> <i>5,7-Dihydroxytryptamin</i> | 50 |
| 2.3. INTERAKTION ZWISCHEN SEROTONERREM UND DOPAMINERREM TRANSMISSIONSSYSTEM | 53 |
| 2.3.1. <i>Einleitung/ Interaktion von Transmissionssystemen</i> | 53 |
| 2.3.2.1. Abhängigkeit des dopaminergen Systems von serotonergen Mechanismen | 55 |
| 2.3.2.2.1. Anatomie | 55 |
| 2.3.2.2.2. 5-HT/ DA-Interaktion in den Ursprungsgebieten des mesotelencephalen dopaminergen Systems | 58 |
| 2.3.2.2.3. 5-HT/ DA- Interaktion in Terminalregionen | 61 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3.2.2. Interaktion in Abhängigkeit vom dopaminergen System | 65 |
| 2.3.2.3. Erkrankungen mit Beteiligung/ Beeinträchtigung von 5-HT- und DA-System | 67 |
| 2.4. <i>IN VIVO</i> BESTIMMUNG VON NEUROTRANSMITTERN IM ZNS | 71 |
| 2.4.1. <i>Einleitung</i> | 71 |
| 2.4.2. <i>Voltammetrie</i> | 72 |
| 2.4.2.1. Grundlagen | 72 |
| 2.4.2.2. Die Kohlefaserelektrode | 74 |
| 2.4.2.3. Einteilung voltammetrischer Verfahren | 75 |
| 2.4.2.4. Kontinuierliche Amperometrie | 75 |
| 3. ZIELSTELLUNG DER ARBEIT | 77 |
| 4. MATERIAL UND METHODEN | 78 |
| 4.1. VERSUCHSTIERE | 78 |
| 4.2. GERÄTE UND MATERIALIEN | 78 |
| 4.3. SUBSTANZEN UND LÖSUNGEN | 79 |
| 4.4. ORGANISATION DER EXPERIMENTE | 81 |
| 4.5. SEROTONERGE LÄSION/ SCHEINLÄSION | 82 |
| 4.6. KONTINUIERLICHE AMPEROMETRIE | 84 |
| 4.7. PERFUSION | 87 |
| 4.8. 5-HT-IMMUNHISTOCHEMIE | 87 |
| 5. VERSUCHSAUSWERTUNG UND STATISTIK | 89 |
| 5.1. 5-HT-IMMUNHISTOCHEMIE | 89 |
| 5.2. GEHALTSBESTIMMUNGEN | 89 |
| 5.3. KONTINUIERLICHE AMPEROMETRIE | 90 |
| 6. ERGEBNISSE | 93 |
| 6.1. CHARAKTERISIERUNG DES LÄSIONSERFOLGES | 93 |
| 6.1.1. <i>5-HT-Immunhistochemie</i> | 93 |
| 6.1.2. <i>Gehaltsbestimmungen</i> | 94 |
| 6.1.2.1. Gehaltsbestimmungen von DA und DOPAC im Striatum | 94 |
| 6.1.2.2. Gehaltsbestimmungen von 5-HT und 5-HIAA im Striatum | 95 |
| 6.1.2.3. Gehaltsbestimmungen von 5-HT und 5-HIAA im Hippocampus | 95 |
| 6.2. KONTINUIERLICHE AMPEROMETRIE | 96 |
| 6.2.1. <i>Kontinuierliche Amperometrie unter Anwendung von GBR 12909</i> | 96 |
| 6.2.1.1. Bestimmung der DA-Clearance vor und nach Applikation von GBR 12909 | 97 |
| 6.2.1.2. Charakterisierung der DAT-Blockade unter Wirkung von GBR 12909 | 100 |
| 6.2.1.3. Bestimmung des hochaffinen DA-Uptakes | 103 |
| 6.2.2. <i>Kontinuierliche Amperometrie unter Anwendung von Fluoxetin</i> | 107 |

| | |
|--|------------|
| 7. DISKUSSION | 108 |
| 7.1. 5,7-DHT-LÄSION VON DRN UND MRN | 108 |
| 7.2. KONTINUIERLICHE AMPEROMETRIE/ KINETISCHES MODELL | 111 |
| 7.3. DER HOCHAFFINE STRIATALE DA-UPTAKE IN ABHÄNGIGKEIT VON 5-HT | 113 |
| 7.4. DIE STRIATALE DA-CLEARANCE IN ABHÄNGIGKEIT VON 5-HT | 125 |
| 8. ZUSAMMENFASSUNG | 128 |
| 9. SUMMARY | 130 |
| 10. LITERATURVERZEICHNIS | 132 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|--|
| 5-HT | Serotonin |
| 5-HIAA | 5-Hydroxyindolessigsäure |
| 5,7-DHT | 5,7-Dihydroxytryptamin |
| 6-OHDA | 6-Hydroxydopamin |
| BG | Basalganglien |
| CA | Kontinuierliche Amperometrie (Continuous Amperometry) |
| cAMP | cyclisches Adenosinmonophosphat |
| DA | Dopamin |
| DAT | Dopamintransporter |
| DRN | dorsal raphe nucleus |
| DOPAC | 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure |
| GABA | Gamma-Amino-Buttersäure |
| GAN | Giant Aspiny Neuron |
| GBR 12909 | 1-[2-[bis(4-Fluorophenyl)methoxy]ethyl]-4-(3-phenylpropyl) piperazin dihydrochlorid (GBR 12909-dihydrochlorid) |
| GP (GPe/ GPi) | Globus pallidus (GP externus/ GP internus) |
| HVA | Homovanillinsäure |
| IN | Interneuron |
| i.p. | intraperitoneal |
| L-DOPA | L-3,4-Dihydroxyphenylalanin |
| MFB | Mediales Vorderhirnbündel |
| MP | Morbus Parkinson |
| mPFC | medialer präfrontaler Kortex |
| MRN | median raphe nucleus |
| MSN | Medium Spiny Neuron |
| Ncl. | Nucleus |
| Nacc | Nucleus accumbens |
| PET | Positronen-Emissions-Tomographie |
| PN | Projektionsneuron |
| SN | Substantia nigra |
| SNC | Substantia nigra pars compacta |

| | |
|-------|---|
| SNr | Substantia nigra pars reticulata |
| STN | Nucleus subthalamicus |
| SPECT | Single-Photon-Emissions-Computertomographie |
| STR | Striatum |
| TTX | Tetrodotoxin |
| VTA | Area tegmentalis ventralis |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabellen:

| | | |
|-----------|--|-----|
| Tabelle 1 | Ursprungs- und Terminalgebiete dopaminerger Systeme im ZNS | 13 |
| Tabelle 2 | Subtypen von DA-Rezeptoren | 27 |
| Tabelle 3 | Klassifikation und Lage der Raphekerne bei Säugetieren | 46 |
| Tabelle 4 | Klassifikation von 5-HT-Rezeptoren | 50 |
| Tabelle 5 | 5-HT-Rezeptoren in STR, Nacc, SN und VTA | 58 |
| Tabelle 6 | Gehalte von 5-HT und 5-HIAA im STR nach Läsion des MRN und DRN | 95 |
| Tabelle 7 | Gehalte von 5-HT und 5-HIAA im Hippocampus nach Läsion des MRN und DRN | 96 |
| Tabelle 8 | Charakterisierung der DAT-Blockade unter Wirkung von GBR 12909 | 102 |

Abbildungen:

| | | |
|--------------|--|----|
| Abbildung 1 | Das dorsale und ventrale striatopallidale System | 15 |
| Abbildung 2 | Die Basalganglienschleife mit Darstellung von direktem und indirektem Projektionsweg | 17 |
| Abbildung 3 | Topographie der synaptischen Eingänge des MSN | 22 |
| Abbildung 4 | Die Synthese von Dopamin | 25 |
| Abbildung 5 | Die dopaminerge Synapse | 28 |
| Abbildung 6 | Die Struktur des DAT | 31 |
| Abbildung 7 | Serotonerge Projektion im ZNS | 49 |
| Abbildung 8 | Das Grundprinzip der Voltammetrie | 73 |
| Abbildung 9 | Oxydation eines Katecholaminmoleküls | 73 |
| Abbildung 10 | Die Kohlefaserelektrode | 84 |
| Abbildung 11 | Kontinuierliche Amperometrie/ Elektrodenlokalisierung im ZNS | 86 |
| Abbildung 12 | Die striatale DA-Clearance nach elektrischer Stimulation | 90 |
| Abbildung 13 | a) Scheinläsion/ Läsion des DRN | 93 |
| | b) Scheinläsion/ Läsion des MRN | 94 |
| Abbildung 14 | Striatale DA-Clearance vor und nach Gabe von GBR 12909 bei Ratten mit Läsion des MRN im Alter von 7 Wochen | 99 |

| | | |
|--------------|---|-----|
| Abbildung 15 | Striatale DA-Clearance vor und nach Gabe von GBR 12909 bei Ratten mit Läsion des DRN im Alter von 7 Wochen | 99 |
| Abbildung 16 | Striatale DA-Clearance vor und nach Gabe von GBR 12909 bei Ratten mit Läsion des MRN im Alter von 10 Monaten | 101 |
| Abbildung 17 | Striatale DA-Clearance vor und nach Gabe von GBR 12909 bei Ratten mit Läsion des DRN im Alter von 10 Monaten | 101 |
| Abbildung 18 | Hochaffiner DA-Uptake im STR nach Läsion des MRN bei Ratten im Alter von 7 Wochen | 104 |
| Abbildung 19 | Hochaffiner DA-Uptake im STR nach Läsion des DRN bei Ratten im Alter von 7 Wochen | 104 |
| Abbildung 20 | Hochaffiner DA-Uptake im STR nach Läsion des MRN bei Ratten im Alter von 10 Monaten | 106 |
| Abbildung 21 | Hochaffiner DA-Uptake im STR nach Läsion des DRN bei Ratten im Alter von 10 Monaten | 106 |
| Abbildung 22 | Hochaffiner DA-Uptake im STR vor und nach Fluoxetinbehandlung bei Ratten im Alter von 10 Wochen | 107 |

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. R. Morgenstern, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Charité (Humboldt-Universität zu Berlin), für die Überlassung und Betreuung des Dissertationsthemas sowie die wissenschaftliche und fachliche Beratung. Ich bedanke mich herzlichst für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Überwindung bürokratischer Hindernisse und zeitlicher Hürden, die sich im Rahmen meiner perspektivischen beruflichen Auslandstätigkeit ergaben.

Herzlich danken möchte ich auch Frau Professor Dr. H. Fink für die unkomplizierte Übernahme der Betreuung dieser Arbeit am Fachbereich der Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. A. Marburger für die umfassende Einführung in die Methodik der stereotaktischen Operation und des voltammetrischen Verfahrens sowie die engagierte Betreuung der Versuche und Unterstützung bei technischen und fachlichen Fragen jeglicher Art. Ich bedanke mich herzlich für ihre freundschaftliche Hilfe bei der Durchsicht und Korrektur des Manuskripts, trotz räumlicher Distanz und arbeitsintensiven Verpflichtungen.

Vielen Dank an Frau Professor Dr. H. Hörtnagel für die Gehaltsbestimmungen von Parametern in ausgesuchten Hirnregionen, durchgeführt in ihrer Arbeitsgruppe am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Charité (Humboldt-Universität zu Berlin).

Danken möchte ich weiterhin Frau R. Winter für die umsichtige und engagierte Durchführung der immunhistologischen Färbungen, für die Hilfe bei der labortechnischen Vorbereitung der Versuche sowie das nette Arbeitsklima während unserer Zusammenarbeit.

Ich möchte der gesamten Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. R. Morgenstern für die angenehme Arbeitsatmosphäre während meiner Tätigkeit am Institut danken. Ein herzliches Dankeschön an Anna Scharkoff und Tom Fischer für die gemeinsame „Doktorandenzeit“, mit allem Humor und hilfsbereitem Miteinander.

Für die freundliche Hilfeleistung bei der Bearbeitung von Abbildungen sowie beim Ausdruck der Arbeit möchte ich Frau H. Glatte recht herzlich danken. Den Tücken, die beim „Mal-Eben-Schnell-Ausdrucken“ gesetzmäßigerweise auftreten, konnte somit erfolgreich vorgebeugt werden.

Frau R. Rinke danke ich für die (oftmals detektivische) fachliche Hilfe bei der Suche nach Referenzliteratur.

Ich möchte weiterhin meiner Familie einen herzlichen Dank aussprechen, besonders meinem Vater sowie meinen Brüdern Andreas und Roland.

Ich möchte all meinen Freunden herzlichst danken, die mich während dieser Zeit auf ganz individuelle Weise unterstützt, motiviert und ermutigt haben. Besonders danke ich Jörg Henning und Gesine Paul für das Korrekturlesen der Arbeit, Taras Bondartschuk und Olaf Fritze für die Hilfe bei „technischen Details“ sowie Christina Berg und Susan Trojan für das moralische Rückgrad.

Lebenslauf

Name: Sonja Kay
Geburtsdatum: 08.02.1971
Geburtsort: Waren (Müritz)
Familienstand: ledig

Ausbildung

1977-1987 Polytechnische Oberschule „Fritz-Reuter“ Waren (Müritz)
1987-1990 Betriebsberufsschule Jürgenstorf
Abschluss: Facharbeiter für Tierproduktion mit Abitur

Studium

1990 Immatrikulation am Fachbereich Veterinärmedizin der Humboldt-Universität zu Berlin
1992 Übernahme des Fachbereiches Veterinärmedizin der Humboldt-Universität an die Freie Universität Berlin
1996 Abschluss des Studienganges Veterinärmedizin mit der Tierärztlichen Prüfung an der Freien Universität Berlin und Erlangung der Approbation als Tierärztin am 03.07.1996

Promotion

1996 Doktorandin am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät (Charité) der Humboldt-Universität zu Berlin

Berlin, August 2001

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Sonja Kay

Berlin, 04.08.2001