2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Analysenwaage Typ 2604	Sartorius, Göttingen
Automatische Gammaprobenwechsler:	
- Wizard Typ 1470	Pharmacia, Freiburg
- BF 2310 C	Berthold, Berlin
Combitips (0,5; 1,25; 2,5; 5,0; 12,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Eindrückstopfen	Sarstedt, Hannover
Einmalspritzen 2 ml, 3 ml, 10 ml	Henke, Tutlingen
Elektronenmikroskop EM 902	Zeiss, Oberkochen
Glas-Teflon-Homogenisator	Kontes, New Jersey USA
Guillotine	Harvards, London GB
Homogenisationsmotor	IKA,Staufen i. Breisgau
HPLC Autosampler 565 2500	Bio-Tek Instruments, Neufarn
HPLC Autosampler ISS 200	Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim
HPLC Gradient Pump LKB 2249	Amersham Pharmacia, Freiburg
HPLC Pump System 52 X	Bio-Tek Instruments, Neufarn
HPLC-Säule, 5µM Eurospher 100 C18, 4x250 mm	Knauer, Berlin
Hybond P PVDF Membranen	Amersham Pharmacia, Freiburg
Küvetten, 1ml, Polystyrol	Sarstedt, Hannover
Laborwaage	Mettler,Gießen
lumineszenz-sensitiver Film BioMax MR1M	Kodak, Stuttgart
Magnetrührer Combimag RCH	IKA, Staufen i. Breisgau
Mikropräparationspinzetten	Moria-Dugast S.A., Paris F
pH-Meter 761	Knick, Berlin
Multipetten	Eppendorf, Hamburg
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten, einstellbar	Eppendorf, Hamburg

Pipettenspitzen 1000; 100; 10 µl	Eppendorf, Hamburg
Polyprep Säulen 10 ml	BIO-RAD, München
Polystyrol-Röhrchen 3,5 ml, 12 ml	Sarstedt, Hannover
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Hannover
Reaktionsgefäße 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Schüttelwasserbad	Köttermann, Hänigsen
Sep Pak Kartuschen C18	Waters, Mass. USA
Tischzentrifuge 5413	Eppendorf, Hamburg
Ultramikrotom	Leica, Solms
Ultraschall-Wasserbad	Amersham Pharmacia, Freiburg
Ultrazentrifuge L8-55	Beckman, Palo Alto USA
Ultrazentrifugenröhrchen 14 ml, 38 ml	Beckman, Palo Alto USA
Vakuum-Konzentrator	Savant, München
Vacuum-Pumpe RE 5	Vacuubrand, Wertheim
Wirbelmixer VF 2	IKA, Staufen i. Breisgau
Zentrifuge Cryofuge 8000	Heraeus Christ, Osterode

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acetonitril 99,9%	Merck, Darmstadt
2’,3’-zyklisches Adenosin Phosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammonium Molybdat	Sigma-Aldrich, Steinheim
ANS (8-Anilino-1-Naphtalin-1-Sulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Antikörper Synapsin	Calbiochem, Bad Soden
Antikörper Syntaxin	Calbiochem, Bad Soden
Antikörper für Glutamattransporter I	Prof. P. Kugler, Abteilung für Anatomie, Universität Würzburg
peroxidase-konjugierter Antikörper	Amersham Pharmacia, Freiburg
Antiserum gegen Thyroxin	Prof. Meinhold, UKBF Berlin
Antiserum gegen 3',3,5-Trijodthyronin	Prof. Meinhold, UKBF Berlin
Araldid	Sigma-Aldrich, Steinheim

Barbitalpuffer	Apotheke des UKBF Berlin
Bleicitrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovine Alkaline Phosphatase	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovines Gamma-Globulin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Brij 35 (Polyoxyethylen 23 Lauryl Ether)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cacodylatpuffer	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloramin T Trihydrat	Merck, Darmstadt
Criterion Precast Gel	BIO-RAD, München
L-Cystein	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cytochrom c	Sigma-Aldrich, Steinheim
3,3'-Dijod-L-Thyronin	Henning, Berlin
Na-Desoxicholat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Boehringer, Mannheim
EDTA (Titriplex)	Merck, Darmstadt
Ethylacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure 100 %	Merck, Darmstadt
Farbreagenz für Proteinbestimmung	BIO-RAD, München
Fiske und Subbarow Reducer	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hepes	Serva, Heidelberg
hormonfreies Rattenserum	Prof. Meinhold, UKBF Berlin
HPLC-Wasser	Sigma-Aldrich, Steinheim
Immidazol	Merck, Darmstadt
Ionenaustauscherharz Dowex 50 WX 8, 100-200 mesh	Serva, Heidelberg
Ionenaustauscherharz AG 1*2 Resin, 100-300 mesh	BIO-RAD, München
Isopropanol	Merck, Darmstadt
L-Iopansäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
^{125}Jod	Amersham Buchler, Braunschweig
^{125}J -Trijodthyronin ([^{125}I]-T_3)	AG Baumgartner, UKBF Berlin
^{125}J -Thyroxin ([^{125}I]-T_4)	AG Baumgartner, UKBF Berlin

^{125}J-3,3’-Dijodthyronin	Formula, Berlin
^{125}J-3,5-Dijodthyronin	Formula, Berlin
p-Jodonitrotetrazolium-Violet	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
di-Kaliumhydrogenphosphat wasserfrei	Merck, Darmstadt
Kaliumperchlorat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Merthiolat (Thimerosal)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol 100 %	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Steinheim
di-Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck, Darmstadt
β-NADH	Sigma-Aldrich, Steinheim
β-NADPH	Sigma-Aldrich, Steinheim
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumdisulfit	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxidplätzchen	Merck, Darmstadt
Orthophosphorsäure 85 %	Merck, Darmstadt
Osmium-Tetroxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phosphorwolframsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyethylenglykol 6000 (PEG)	Serva, Heidelberg
6-Propyl-2-Thiouracil (PTU)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Na-Pyruvat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rattenserum, hormonfrei	Prof. Meinhold, UKBF Berlin
Saccharose	Merck, Darmstadt
Na-Succinat	Sigma-Aldrich, Steinheim
3,3',5,5'-Tetrajod-L-Thyronin	Henning, Berlin
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Triethanolamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
3,3',5-Trijod-L-Thyronin	Henning, Berlin

Tris(hydroximethyl)aminomethan	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trockeneis (CO_2)	Eis-Czaby, Berlin
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wizard Genomic DNA Purification Kit	Promega, Madison, USA
Uranylacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
K-Zyanid	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.3 Medikamente

Desipramin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Carbamazepin	Novartis, Basel, CH
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Paroxetin	SmithKlineBeecham, Harlow, GB
Tianeptin	Servier, Orléans, F
Venlafaxin	Wyeth, Newbridge, IRL

2.1.4 Versuchstiere

Männliche Sprague-Dawley-Ratten	Tierzucht Schönwalde, Schönwalde

2.2 Methoden

2.2.1 Methodische Entwicklungen

2.2.1.1 Subzelluläre Fraktionierung

Die Grundlagen für die durchgeführte subzelluläre Fraktionierung bildeten die von Lovtrup-Rein und McEwen (1966) und McEwen et al. (1972) entwickelten Methoden zur Isolierung von Zellkernen einerseits, und die in den Arbeiten von Gray und Whittaker (1962), Whittaker et al. (1964) sowie Whittaker (1965) beschriebenen und von Dodd et al. (1981) modifizierten Methoden zur Präparation von Mitochondrien und Synaptosomen andererseits.

Das Prinzip dieser Methoden beruht auf der Trennung und Reinigung der durch Gewebe-Homogenisierung in Suspension vorliegenden Zellorganellen und Membranvesikel aufgrund ihrer Größe und Dichte in einer Reihe von differentiellen- und Dichtegradienten-Zentrifugationen. Bei der differentiellen Zentrifugation erfolgt die Trennung der Zellbestandteile aufgrund unterschiedlicher Sedimentationsgeschwindigkeiten, größere Strukturen sinken schneller auf den Boden des Zentrifugenröhrchens als kleinere Strukturen; die Dauer der Zentrifugation entscheidet über die Zusammensetzung des Niederschlags. Dagegen führt die Zentrifugation in einem Medium mit einem Dichtegradienten zu einem Gleichgewicht, bei dem die subzellulären Strukturen entsprechend ihrer Dichte in dem Zentrifugationsmedium angeordnet vorliegen.

Sämtliche Arbeitsschritte wurden in einem Kühlraum bei 4°C durchgeführt, um Enzymaktivitäten, insbesondere der Dejodase-Isoenzyme und proteolytischer Enzyme zu minimieren. Außerdem wurde versucht, der Homogenisationslösung 1mM Iopansäure hinzuzusetzen. Diese Konzentration an Iopansäure hemmt die Aktivitäten der Typ II- und der Typ III-Dejodasen annähernd komplett. Es zeigte sich jedoch, dass die Iopansäure in dieser Konzentration ausfällt. Eine Konzentration von 25 µM Iopansäure kristallisierte nicht aus, führte jedoch nur zu einer etwa 40%igen Hemmung der Aktivität der hochaktiven Typ III-Dejodase. Deshalb wurde getestet, ob die Konzentrationen von T4 und T3 in den Homogenaten verschiedener Hirnareale abnahmen, wenn diese bei 4°C 6 Stunden lang aufbewahrt wurden. 6 Stunden entsprechen etwa der Zeit, welche die gesamte Prozedur der subzellulären Fraktionierung benötigt. Weder die Konzentrationen von T3 noch jene von T4

veränderten sich jedoch innerhalb von 6 Stunden signifikant (Ergebnisse nicht gezeigt). Deshalb erschien es nicht erforderlich, Iopansäure zur Homogenisationslösung zuzusetzen, um die Aktivitäten der Dejodasen zu hemmen.
Die Zentrifugationen wurden in einer Beckman L8-55 Ultrazentrifuge durchgeführt; es wurde ein Kontron TST 41.14 Schwenkbecher-Rotor verwendet. Die isolierten Fraktionen wurden in 500µl einer 0,32M Saccharoselösung (*Homogenisationslösung*) resuspendiert, für 30 Minuten bei 14000g in einer Tischzentrifuge pelletiert, die Überstände dieser Zentrifugation wurden verworfen. Die Fraktionen wurden bis zur Extraktion der Schilddrüsenhormone bei –80°C gelagert. Die Resuspension der Myelin-Fraktion erfolgte in destilliertem Wasser.

2.2.1.1.1 Homogenisierung

Die tiefgekühlten Gewebeproben wurden gewogen, mit einem Skalpell kleingeschnitten und in einen eisgekühlten Glas/Teflon-Homogenisator mit 200µm Wandabstand überführt. Die Homogenisierung erfolgte nach dem vollständigen Auftauen der Proben im zehnfachen Gewebevolumen der *Homogenisationslösung* (V/W), einer 0,32M Saccharoselösung, durch 20 langsame Hübe bei 750 UpM (Umdrehungen pro Minute) des Stempels. Das Homogenat wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt, ein Aliquot von 100µl wurde zur Quantifizierung der Schilddrüsenhormone abgenommen und auf Eis gelagert.
Bei der Homogenisierung zerreißen viele der Zell- und Organellenmembranen in Bruchstücke, kleinere Fragmente der Plasmamembran bilden Membranvesikel. Myelinisierte Axonabschnitte liegen ebenfalls in Form von Vesikeln vor, die unterschiedliche Anteile axonalen Zytoplasmas umschließen. Synaptische Axonendigungen reißen von den Axonen und bilden Synaptosomen.

2.2.1.1.2 Zentrifugation des Homogenats

Das Homogenat wurde für 15 Minuten bei 850g (2600 UpM) zentrifugiert; bei Homogenats-Volumina unter 1,5ml wurde die Zentrifugationsdauer auf 12 Minuten reduziert. Der resultierende Niederschlag, das „crude nuclear pellet“, wurde in 2ml Homogenisationslösung resuspendiert und für 10 Minuten bei 600g (2200 UpM) zentrifugiert. Aus dem gewaschenen Pellet wurden die Zellkerne isoliert, die Überstände beider Zentrifugationen wurden vereinigt

und zur Präparation der Mitochondrien, der Myelinfraktion, der Synaptosomen und der Mikrosomen verwendet.
Bei beiden differentiellen Zentrifugationsschritten werden die Zellbestandteile aufgrund unterschiedlicher Sedimentationsgeschwindigkeiten getrennt. Neben größeren Membranfragmenten und unvollständig homogenisiertem Gewebe weisen Zellkerne die höchste Sedimentationsgeschwindigkeit auf, gefolgt von myelinisierten Axonabschnitten. Ein Teil des Myelins gelangt bei der Zentrifugation zusammen mit den Zellkernen in das Pellet. Mitochondrien, Synaptosomen und Mikrosomen sedimentieren langsamer und verbleiben größtenteils in den Überständen. Die beschriebenen Zentrifugationsbedingungen sind ein Kompromiss zwischen einer möglichst hohen Ausbeute an Zellkernen einerseits, und einem nach Möglichkeit geringen Anteil Myelin im „crude nuclear pellet“ andererseits. Durch die Resuspendierung und erneute Zentrifugation des ersten Pellets („Waschschritt“) wurde die Myelinausbeute in den weiterzuverarbeitenden Überständen fast verdoppelt, gemessen an der Aktivität des im Myelin lokalisierten Enzyms 2’,3’-zyklische Nukleotid3’-Phosphohydrolase (CNPase, Abschnitt 2.2.1.2.3); ein Verlust von etwa 10% der Zellkerne durch diesen Schritt, von 64,7±3,2 % der Gesamt-DNA auf 55,1±4,7 %, wurde dafür in Kauf genommen (Abschnitt 2.2.1.2.1).

2.2.1.1.3 Isolierung der Zellkerne

Das gewaschene „crude nuclear pellet“ wurde in 14ml einer 1,3M Saccharoselösung, 1mM Magnesiumchlorid, 1mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6.5 resuspendiert und für 45 Minuten bei 53500g (19700 UpM) ultrazentrifugiert. Das resultierende Pellet enthielt die gereinigte Fraktion der Zellkerne. Die an der Oberfläche des Überstandes entstandene kompakte Phase, der „overlayer“, enthielt unvollständig homogenisiertes Gewebe, größere Membranfragmente und einen Teil der myelinisierten Axonfragmente. Der Overlayer sowie der Überstand wurden verworfen.
Auf eine weitere Fraktionierung der isolierten Zellkerne in gliale und neuronale wurde verzichtet. Einerseits war sie bei Vorversuchen mit großen Einbußen der Ausbeute verbunden. Andererseits ist eine morphologische Identifizierung der gewonnenen Zellkern-Fraktionen als neuronale oder gliale nicht möglich. So sind die beschriebenen Kriterien, wie Größe, Dichte

und Anzahl der sichtbaren Nucleoli (Lovtrup-Rein, McEwen, 1966) nicht eindeutig einem Zelltyp zuzuordnen. Außerdem treten während der Ultrazentrifugation der Zellkerne in hochmolarer Saccharoselösung morphologische Veränderungen auf (Olpe et al., 1974).

Die Ausbeute der Zellkerne nach der Methode von Lovtrup-Rein und McEwen (1966) betrug 11-14% der DNA des eingesetzten Gewebehomogenats, bei Verwendung eines Detergenz 28-35% (siehe unten). Zur Optimierung der Ausbeute der Zellkerne wurden Modifikationen mehrerer Parameter bei der Fraktionierung von Gewebe des parietooccipitalen Kortex untersucht. Die Qualität der Präparationen wurde lichtmikroskopisch kontrolliert.

Dichte des Isolationsmediums

In einem Experiment wurde die Dichte der zur Isolierung verwendeten Saccharoselösung reduziert, um die Sedimentierung der Zellkerne zu erleichtern. Die Ausbeute ließ sich von 25,5% mit 2,0M Saccharoselösung auf 50,8% mit 1,3M Lösung erhöhen. Bei weiterer Reduktion der Saccharose-Konzentration auf 1,0M stieg zwar der DNA-Gehalt der Fraktion nochmals an, die gewonnene Fraktion war jedoch mit Bestandteilen des „Overlayers“ kontaminiert (Tabelle 2.1). Alle Lösungen enthielten 1mM Magnesiumchlorid und 1mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6.5.

Tabelle 2.1: Einfluss der Dichte des Isolationsmediums auf die DNA-Ausbeute der Zellkern-Fraktion, bezogen auf die DNA des eingesetzten Gewebehomogenates [% ± Standardfehler des Mittelwertes]

Molarität der Saccharoselösung	DNA-Ausbeute der Fraktion [% des Homogenats]
2,0 M	25,5 ± 3,5
1,8 M	32,0 ± 3,3
1,6 M	33,5 ± 2,5
1,3 M	50,8 ± 3,6
1,0 M	63,5 ± 5,2

Dauer der Ultrazentrifugation

Die Verlängerung der Dauer der Ultrazentrifugation von 45 auf 90 Minuten führte nicht zu einer signifikanten Erhöhung der DNA-Ausbeute.

Behandlung mit einem Detergenz

Die Wirkung einer Detergenzbehandlung der Zellkerne in Anlehnung an die Arbeiten von Lovtrup-Rein und McEwen (1966) und Vakakis et al. (1991) wurde folgendermaßen untersucht: das ungewaschene „crude nuclear pellet“ (Abschnitt 2.2.1.1.2) wurde in 0,32M Saccharoselösung mit 1% Brij 35, einem relativ milden, nicht-ionischen Detergenz resuspendiert und weiterverarbeitet wie in den Abschnitten 2.2.1.1.2 und 2.2.1.1.3 beschrieben. Die DNA-Ausbeute erhöhte sich von 52,3±5,1% bei den unbehandelten Kontrollfraktionen auf 69,3±6,2% bei den detergenzbehandelten Proben. Allerdings beeinträchtigt eine Detergenzbehandlung die Integrität der äußeren Kernmembran (Vakakis et al., 1991). Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass der detergenzhaltige Überstand über dem gewaschenen „crude nuclear pellet“ nicht mit dem Überstand der ersten Zentrifugation weiterverarbeitet werden kann, da das Detergenz die übrigen Fraktionen beschädigen würde.

Auf die Detergenzbehandlung wurde daher in der vorliegenden Untersuchung der Schilddrüsenhormonkonzentrationen verzichtet.

2.2.1.1.4 Isolierung der Mitochondrien

Die Isolierung der nicht-synaptischen Mitochondrien erfolgte durch Zentrifugation in einem diskontinuierlichen Dichtegradienten. Die vereinigten Überstände über dem „crude nuclear pellet“ (Abschnitt 2.2.1.1.2) wurden mit Homogenisationslösung auf 9ml aufgefüllt, gemischt und mittels einer Spritze mit 4ml einer 1,2M Saccharoselösung unterschichtet. Während der Zentrifugation für 30 Minuten bei 187000g (39000 UpM) sanken die Mitochondrien auf den Boden des Zentrifugenröhrchens, die weniger dichten Synaptosomen, myelinisierten Axonabschnitte und Mikrosomen bildeten oberhalb der 1,2M Lösung eine kompakte Interphase (I1). Diese Interphase wurde mit einer Transferpipette in etwa 1ml Volumen abgesaugt und weiterverarbeitet, der 0,32M Überstand sowie die 1,2M Phase wurden verworfen.

Ursprünglich wurde die Präparation der Mitochondrien mit einer Zentrifugationsdauer von 15 Minuten entsprechend Dodd et al. (1981) durchgeführt. Die elektronenmikroskopische Begutachtung von Mitochondrienfraktionen aus verschiedenen Hirnarealen zeigte jedoch, dass bei größeren Arealen mit Gewebegewichten zwischen 250 und 350mg, wie dem frontalen Kortex, die Mitochondrien in geringerer Reinheit und Zahl vorlagen. Durch

Weiterverarbeitung der 1,2M Phase, die mit Homogenisationslösung verdünnt und ultrazentrifugiert wurde, konnte ein weiteres mitochondriales Pellet erzielt werden, welches Mitochondrien in größerer Dichte enthielt als die eigentliche Mitochondrienfraktion. Die Verlängerung der Ultrazentrifugationsdauer von 15 auf 30 Minuten erhöhte im frontalen Kortex den Anteil der ins Pellet sedimentierten Mitochondrien um 60%, gemessen an dem mitochondrialen Enzym Succinat-Dehydrogenase (Abschnitt 2.2.1.2.2). Die spezifische Aktivität dieses Enzyms, ein Maß für die Reinheit der Fraktion, erhöhte sich um etwa 40%.

2.2.1.1.5 Isolierung der Synaptosomen und der Myelinfraktion

Die Interphase I1 (Abschnitt 2.2.1.1.4) wurde in 9ml Homogenisationslösung resuspendiert, gemischt und mittels einer Spritze mit 4ml einer 0,85M Saccharoselösung unterschichtet. Nach einer Ultrazentrifugation für 15 Minuten mit 187000g (39000 UpM) lagen die Synaptosomen als Pellet vor. Myelinisierte Axonabschnitte bildeten aufgrund ihrer geringeren Dichte eine Interphase (I2) oberhalb der 0,85M Saccharoselösung. Die Interphase wurde in einem Volumen von etwa 1ml mit einer Transferpipette abgesaugt und hypoosmotisch behandelt (Abschnitt 2.2.1.1.6). Der 0,32M Überstand wurde zur Präparation der mikrosomalen Fraktion weiterverarbeitet. Die 0,85M Phase wurde verworfen.
Bei der Isolierung von Synaptosomen und Myelin mit 0,8M Saccharoselösung nach Dodd et al. (1981) hatte die Myelin-Interphase keine klar definierte Phasengrenze, ein Teil des Myelins wanderte in die 0,8M Lösung hinein. Daher wurde die Dichte der Lösung auf 0,85M Saccharose erhöht.

2.2.1.1.6 Hypoosmotische Behandlung der Myelinfraktion zur Reduktion zytoplasmatischer Kontaminationen

Die Interphase I2 wurde in 4ml destilliertem Wasser resuspendiert, geschüttelt und 15 Minuten inkubiert, danach für 15 Minuten mit 12000g (10000 UpM) zentrifugiert. Die Myelinfraktion lag als Pellet vor, der Überstand wurde verworfen.
Bei der Homogenisierung bilden myelinisierte Axonabschnitte Membranvesikel, die Anteile des axonalen Zytoplasmas einschließen. Während der Inkubation in dem hypoosmotischen

Medium platzen die Vesikel, das Zytoplasma wird freigesetzt und verbleibt bei der Zentrifugation im Überstand.
Durch die hypoosmotische Behandlung wurde die zytoplasmatische Kontamination der Myelinfraktion um etwa 80% reduziert: die Aktivität des Zytoplasma-Markers Laktat-Dehydrogenase sank von 0,27±0,04 µmol/min/g Gewebe auf 0,055±0,006 µmol/min/g Gewebe (Abschnitt 2.2.1.2.5). Der Myelingehalt der Fraktion, gemessen als Aktivität des Enzyms CNPase (Abschnitt 2.2.1.2.3), änderte sich nicht messbar.

2.2.1.1.7 Präparation der Mikrosomen

Der 0,32M Überstand aus Abschnitt 2.2.1.1.5 wurde mit Homogenisationslösung bis zum Rand des Zentrifugenröhrchens aufgefüllt und für 30 Minuten bei 187000g (39000 UpM) ultrazentrifugiert. Das resultierende Pellet enthielt die Mikrosomen, der Überstand wurde verworfen.

2.2.1.2 Charakterisierung der subzellulären Fraktionen durch biochemische „Marker“

Alle Messungen wurden in Duplikaten angesetzt. Die Proben wurden soweit verdünnt, bis die Enzymaktivität bzw. die Konzentration im linearen Bereich der Messung lag. Zur Kontrolle der Linearität der enzymatischen Reaktionen wurden bei jeder Inkubation mehrere Proben zusätzlich in einer 1:2 Verdünnung eingesetzt. Aliquots zur Proteinquantifizierung wurden nach der Resuspension der Subfraktionen abgenommen.

2.2.1.2.1 DNA-Isolierung und Quantifizierung

Die Isolierung der DNA erfolgte in mehreren Schritten mit dem „Wizard® Genomic DNA Purification Kit“ (Promega, Madison, USA).
Die Fraktionen wurden in 0,32M Saccharoselösung resuspendiert und gegebenenfalls verdünnt. Zur Lysis der Zellkerne wurden je 100µl der Suspensionen mit 750µl „Nuclei Lysis Solution“ für 30 min bei 65°C inkubiert. Nach dem Abkühlen erfolgte ein enzymatischer Abbau der RNA durch Inkubation mit 4µl „RNAse Solution“ bei 37°C für 30 min. Eine Salz-

Fällung der Proteine wurde durch Zugabe von 250µl „Protein Precipitation Solution“ und Zentrifugation für 4 min bei 14000xg durchgeführt. Die im Überstand gelöste genomische DNA wurde durch mehrmaliges Invertieren mit 800µl Isopropanol ausgefällt und abzentrifugiert. Zur Entsalzung wurde das DNA-Pellet anschließend in 750µl 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet an der Luft getrocknet.
Nach Lösung des DNA-Pellets in 8mM NaOH wurde die DNA-Konzentration photometrisch ermittelt, wobei eine Extinktion von 1 bei einer Wellenlänge von 260nm einer Konzentration von 50µg / ml doppelsträngiger DNA entspricht.

2.2.1.2.2 Messung der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität

Die Bestimmung der Aktivität des mitochondrialen Enzyms Succinat-Dehydrogenase erfolgte nach der Methode von Pennington (1961). Der bei der Oxidation von Succinat zu Fumarat freiwerdende Wasserstoff wird auf ein Tetrazoliumsalz, INT (p-Jodonitrotetrazolium-Violet) übertragen, wobei der Farbstoff Formazan entsteht, der photometrisch quantifiziert werden kann.
Die Subfraktionen wurden in eisgekühltem 50mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4 resuspendiert und verdünnt. 50µl der verdünnten Proben wurden für 15 min bei 37°C in 500µl einer Lösung mit folgender Zusammensetzung inkubiert: 50mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4), 50mM Natriumsuccinat, 25mM Saccharose, 0,1% INT. Ein Leerwert wurde ohne Probe angesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500µl 25% Trichloressigsäure gestoppt. Der entstandene Farbstoff wurde mit 2ml Ethylacetat durch starkes Schütteln extrahiert, die wässrige Phase abzentrifugiert. Die Absorption (ΔE) der gefärbten organischen Phase wurde im Photometer bei 492nm gegen den Leerwert gemessen. Die Berechnung der Aktivität erfolgte mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von Formazan in Ethylacetat unter Berücksichtigung durchgeführter Verdünnungen nach folgender Formel:

$$\text{Units (µmol/h/mg Protein)} = 4x\ \Delta E_{15min} / 19{,}9 / \text{Protein (µmol/h/mg)}$$

2.2.1.2.3 Messung der 2',3'-zyklischen-Nukleotid 3'-Phosphohydrolase

Die Aktivität des myelinspezifischen Markerenzyms 2',3'-zyklische-Nukleotid 3'-Phosphohydrolase (CNPase) wurde mit der colorimetrischen Methode nach Kurihara und Takahashi (1973) gemessen. Dabei werden nacheinander zwei enzymatische Inkubationen durchgeführt: im ersten Schritt katalysiert die CNPase die Öffnung des zyklischen Moleküls 2',3'-Adenosinphosphat. Im zweiten Schritt wird durch Zugabe von boviner alkalischer Phosphatase der Phosphatrest des in der CNPase-Reaktion entstandenen Adenosin 2'-Phosphat hydrolytisch abgespalten. Die getrennte Inkubation beider Enzyme ermöglicht es, optimale Bedingungen für jedes der Enzyme einzustellen. Die Quantifizierung des freien Phosphats erfolgt photometrisch durch eine Farbreaktion.

Detergenz-Behandlung der Proben / Aktivierung der CNPase

Die Subfraktionen wurden in 300µl eisgekühltem Wasser resuspendiert, 200µl der Suspension wurden mit 100µl 0,2M Tris-Puffer, pH 7,5 und 200µl 1% Na-Desoxicholat für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Geeignete Verdünnungen der Proben wurden anschließend mit eiskaltem Wasser hergestellt.

CNPase-Inkubation

200µl der verdünnten Probe wurden mit 100µl 0,2M Immidazol-Puffer, pH 6,2 im Wasserbad auf 37°C temperiert. Die CNPase-Reaktion wurde durch Zugabe von 100µl 30mM Na-Adenosin 2',3'-Phosphat (zyklisch) gestartet, die Inkubation wurde für 20min bei 37°C im Schüttelwasserbad durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200µl 0,2M Na_2CO_3-Lösung gestoppt. Zusätzlich wurden drei verschiedene Leerwerte angesetzt:

- Leerwert A: an Stelle der Probe wird Wasser verwendet
- Leerwert B: das Substrat Na-2',3'-Adenosinphosphat Adenosin 2',3'-Phosphat (zyklisch) wurde durch Wasser ersetzt
- Leerwert C: die Probe wurde erst nach dem Stoppen der CNPase-Inkubation hinzugegeben

Phosphatase-Inkubation

300µl der gestoppten Probe wurden mit 4 units boviner alkalischer Phosphatase in 100µl Wasser für 60min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 1ml 7% Trichloressigsäure wurde

die Reaktion gestoppt. Zur Entfernung der Proteine wurden die Proben 10min bei 14000xg in einer Tischzentrifuge zentrifugiert.

Farbreaktion zur Quantifizierung des freien Phosphats

Zu 500µl des Überstandes wurden nacheinander 50µl 2,5% Ammonium Molybdat in 5N Schwefelsäure und 450µl 0,11% Reduktions-Reagenz in Wasser nach Fiske und Subbarow hinzugegeben. Nachdem die Farbentwicklung abgeschlossen war (mindestens 60min) wurde die Absorption der Proben bei 720nm im Photometer gegen den Leerwert C gemessen. Die Berechnung der CNPase-Aktivität erfolgte unter Berücksichtigung aller Verdünnungsschritte mit Hilfe einer Eichgeraden. Dazu wurde die Farbreaktion mit einer Verdünnungsreihe aus einer 0,4mM Kaliumhydrogenphosphat-Lösung durchgeführt.

2.2.1.2.4 Messung der NADPH-Cytochrom c-Reduktase-Aktivität

Die Bestimmung der mikrosomalen NADPH-Cytochrom c-Reduktase-Aktivität erfolgte nach Sottocasa et al. (1967).

Die Subfraktionen wurden in 300µl eisgekühltem 0,05M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,7, 1mM Kaliumzyanid resuspendiert und gegebenenfalls verdünnt (Zyanid diente der Blockierung der mitochondrialen Cytochromoxidase). Zur Freisetzung des Enzyms aus den Mikrosomen wurden die verdünnten Proben für 2min in einem Ultrschall-Wasserbad behandelt.

100µl der Proben wurden mit 500µl des o.g. Phosphatpuffers und 200µl 0,5mM Cytochrom c in Phosphatpuffer zunächst im Photometer auf 30°C temperiert. Ein Leerwert wurde mit Puffer anstatt Probe angesetzt. Durch Zugabe von 200µl 0,5mM NADPH in Phosphatpuffer wurde die Reaktion gestartet. Während der Inkubation wurde die Extinktionsänderung ΔE bei 550nm gegen den Leerwert über einen Zeitraum von 5min alle 60s aufgezeichnet. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte unter Berücksichtigung der durchgeführten Verdünnungen mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von Cytochrom $c_{reduziert\ -\ oxidiert}$ bei 550nm nach folgender Formel:

$$\text{Units (µmol/min/mg Protein)} = \Delta E_{1min} / 18{,}7 / \text{Protein (µmol/min/mg)}$$

2.2.1.2.5 Messung der Laktat-Dehydrogenase-Aktivität

Die Aktivität des cytosolischen Enzyms Laktat-Dehydrogenase wurde nach der Methode von Johnson (1962) bestimmt; abweichend davon wurde die Freisetzung des Enzyms aus Membranvesikeln durch Behandlung mit einem Detergenz erreicht. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der photometrischen Messung der Abnahme des Coenzyms NADH, das bei der Laktat-Dehydrogenase-Reaktion zu NAD oxidiert wird.
Die Subfraktionen wurden in 300µl eisgekühltem Wasser resuspendiert, 200µl der Suspension wurden mit 20µl 10% Na-Desoxicholat für 10min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend 5min bei 10000xg in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden geeignete Verdünnungen mit eisgekühltem Wasser hergestellt.
Die Inkubation für 3min bei 30°C wurde im Photometer durchgeführt; dazu wurden 50µl der verdünnten Proben mit 950µl einer Lösung folgender Zusammensetzung inkubiert: 50mM Triethanolamin (pH7,4), 0,33mM Na-Pyruvat, 80µM β-NADH (reduziert). Die Extinktionsänderung über den Inkubationszeitraum wurde alle 15s aufgezeichnet. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte unter Berücksichtigung der durchgeführten Verdünnungen mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von NADH nach folgender Formel:

$$\text{Units (µmol/min/mg Protein)} = 0{,}33 \times \Delta E_{3min} / 6{,}27 / \text{Protein (µmol/min/mg)}$$

2.2.1.2.6 Messung der Konzentrationen von Synapsin, Syntaxin und des Glutamat-tranporters I durch Westernblots

Synapsin ist ein Marker für synaptische Vesikel, Syntaxin ist ein membrangebundenes Protein der synaptischen Plasmamembran. Die Bestimmung der Konzentrationen von Synapsin, Syntaxin und des in der Astrozytenmembran lokalisierten Glutamattransporters I durch Westernblots wurde von Dr. Murat Eravci (Abteilung für Radiologie und Nuklearmedizin, UKBF) durchgeführt.
Beim Westernblot werden die denaturierten Proteine durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Membran transferiert, wobei das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten bleibt. Die Quantifizierung erfolgt immunologisch durch zwei Antikörper: zunächst bindet ein spezifischer Antikörper an dem gesuchten Protein auf der

Membran; der zweite Antikörper ist mit einer quantifizierbaren Peroxidase konjugiert und bindet am ersten Antikörper.

Die Subfraktionen wurden in 0,32M Saccharoselösung resuspendiert und bis zu einer Proteinkonzentration von 0,13µg/µl verdünnt. Zu 30µl der Verdünnungen wurden 10µl des Probenpuffers (10% Glycerol, 10% SDS, 5% β-Mercaptoethanol, 5% BPB, 100mM Tris-HCl, pH6,8) hinzugegeben. Die Proben wurden zur Denaturierung der Proteine für 5min im Wasserbad bei 95°C inkubiert und anschließend bis zur Gelelektrophorese auf Eis gelagert. 20µl der Proben (entsprechend 2µg Protein) wurden auf ein „Criterion Precast Gel“ (BioRad) aufgetragen, die Elektrophorese wurde entsprechend der Anleitung des Criterion Systems von BioRad durchgeführt.

Das „Blotten“ der Elektrophoresegele wurde entsprechend der Methode von Towbin et al. (1979) auf „Hybond P PVDF“ Membranen (Amersham) bei 300mA über Nacht durchgeführt. Zum Blockieren wurden die Membranen in TBS-Lösung mit 10% Magermilchpulver und 0,1% Tween 20 über Nacht inkubiert und anschließend dreimal in TBS-Lösung mit 0,1% Tween 20 gewaschen.

Die Inkubation der Membranen mit dem ersten Antikörper erfolgte bei den Antikörpern für Synapsin und Syntaxin (Calbiochem) in einer Verdünnung von 1:1000 für 2h. Die Inkubation mit dem Antikörper für den Glutamattransporter I (Prof. P. Kugler, Universität Würzburg) wurde in einer Verdünnung von 1:30 über Nacht durchgeführt.

Nach dreimaligem Waschen in TBS-Lösung mit 0,1% Tween 20 wurden die Membranen mit dem peroxidase-konjugierten zweiten Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 inkubiert.

Die Messung des zweiten Antikörpers erfolgte durch Chemolumineszenz nach der Anleitung des „ECL western blot“ (Amersham). Die entsprechend behandelten Membranen wurden in Folie verpackt auf einem lumineszenz-sensitiven Film exponiert (Kodak BioMax MR). Die densitometrische Auswertung der Filme wurde am Computer mit dem Zero D Scan Programm (Scanalytics, Fairfax, USA) vorgenommen.

2.2.1.3 Charakterisierung der subzellulären Fraktionen durch Elektronenmikroskopie

Die Reinheit und die morphologische Qualität der subzellulären Fraktionen wurden elektronenmikroskopisch durch Frau Prof. Dr. Gisela Stoltenburg (Abteilung für Neuropathologie, UKBF) charakterisiert. Die Bearbeitung der subzellulären Fraktionen für die Elektronenmikroskopie wurde von Frau Hanna Plückhan (Abteilung für Neuropathologie des UKBF) durchgeführt.
Die subzellulären Fraktionen wurden unmittelbar nach der Präparation mit 2% Glutaraldehyd und 0,1M Cacodylatpuffer (pH7,2) überschichtet und über Nacht bei 4°C fixiert. Die Postfixierung erfolgte über 4h in gepuffertem 1% Osmium-Tetroxid. In einer Reihe von Spülschritten mit ansteigenden Acetonkonzentrationen (30%, 50%, 70%, 80%, 96% und 2x100% Aceton, je 15min) wurden die Proben dehydriert, zur En-bloc-Kontrastierung enthielt die 70% Acetonlösung 1% Phosphorwolframsäure und 0,5% Uranylacetat. Nach der Einbettung in Araldid, ein Epoxidharz, wurden die Fraktionen mit einem Leica Ultramicrotom ultradünn geschnitten (70nm). Die Schnitte wurden auf einen Kupfer-Netzträger aufgebracht und zur Kontrastierung mit Bleicitrat behandelt. Die Untersuchung der Schnitte erfolgte mit einem Zeiss EM 902 Transmissions-Elektronenmikroskop.

2.2.1.4 Weitere Untersuchungen zur Überprüfung der Validität der Hormon-quantifizierung in subzellulären Fraktionierungen

Zur Überprüfung der Validität der Hormonquantifizierungen in subzellulären Fraktionen wurden zwei Fragestellungen untersucht. Einerseits besteht die Möglichkeit, dass Hormonmoleküle während der mehrere Stunden dauernden Prozedur der subzellulären Fraktionierung von ihrer ursprünglichen Lokalisation abgelöst werden (z.B. Zellkerne oder Zytosol) und sich mehr oder weniger gleichmäßig an andere subzelluläre Strukturen anlagern. Eine andere Artefaktmöglichkeit betrifft die beobachteten Behandlungseffekte auf die Konzentrationen der Schilddrüsenhormone in einzelnen Fraktionen: es wäre denkbar, dass die Behandlung die chemischen oder physikalischen Eigenschaften einzelner subzellulärer Strukturen so verändert, dass sich während der Präparation unterschiedliche Hormonmengen daran anlagern können.

2.2.1.4.1 Subzelluläre Fraktionierung unter Zugabe von Trijodthyronin

Eine subzelluläre Fraktionierung wurde mit 12 Mittelhirnen durchgeführt, 6 dieser Hirnareale wurden unter Zugabe von 150pg Trijodthyronin homogenisiert. Durch T3-Quantifizierung wurde untersucht, in welche Fraktionen das zugegebene T3 während der Fraktionierung gelangt war.

2.2.1.4.2 Subzelluläre Fraktionierung von Hirnarealen Desipramin-behandelter Tiere unter Zugabe von radioaktiv-markiertem Trijodthyronin

Zur Untersuchung der Validität beobachteter Medikamenteneffekte bei der Quantifizierung der Schilddrüsenhormone wurden die Amygdalae einer mit Desipramin behandelten Tiergruppe unter Zugabe von radioaktiv markiertem T3 subfraktioniert. Die Behandlung der Versuchstiere war durchgeführt worden wie in Kapitel 2.2.2.2 beschrieben. Die Tiergruppe umfasste 6 Kontrolltiere und je 6 Tiere, die mit Desipramin der Dosierungen 5mg und 20mg / kg Körpergewicht behandelt worden waren. Jeder Gewebeprobe wurden vor der Homogenisation 100000 cpm ^{125}J–Trijodthyronin in der Homogenisationslösung zugegeben. Nach der Fraktionierung wurde die Radioaktivität in den Subfraktionen gemessen.
Die subchronische Behandlung mit dem Antidepressivum Desipramin hatte zu einer Erhöhung der T3-Konzentration im Myelin der Amygdala geführt (Abschnitt 3.3). Würde die beobachtete T3-Erhöhung im Myelin nicht den in-situ-Zustand widerspiegeln, sondern wäre ein Artefakt, das durch veränderte chemische oder physikalische Eigenschaften des Myelins erst während der Subfraktionierung auftritt, so müsste auch das radioaktive T3 vermehrt am Myelin der behandelten Tiere „hängenbleiben“.

2.2.1.5 Extraktion, Isolierung und Reinigung der Schilddrüsenhormone mittels HPLC (High pressure liquid chromatography)

Nach Durchführung der subzellulären Fraktionierung erfolgte die Extraktion der Schilddrüsenhormone (3,5-T2, T3, T4) mit Methanol. Zu jeder Subfraktion wurde 1 ml 99,9% Methanol hinzugefügt. Zusätzlich wurden zu jeder Probe radioaktiv markierte Schilddrüsenhormone gegeben und zwar jeweils etwa 200 cpm (counts per minute) ^{Jod125}3,5-

T2, ^{Jod125}T3 und ^{Jod125}T4 in 100 µl Methanol. Dies diente einerseits zur Identifizierung der Hormone nach Trennung durch die HPLC, andererseits konnte durch den Vergleich der am Ende der Extraktions- und Reinigungsprozedur wiedergefundenen Radioaktivität mit der eingesetzten Radioaktivität die Recovery berechnet werden.

Zur Extraktion wurden die Proben nach Zugabe von 1,2ml 99,9% Methanol und je 100µl radioaktiv markierten Schilddrüsenhormonen in einem Ultraschall-Wasserbad ca. 30 bis 60s behandelt, dann 1min geschüttelt und abschließend 30min bei 14000 Upm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen PTFE-Membranfilter (0,2µm Porengröße) filtriert und nach Zugabe von weiteren 100µl H_2O wurden die Proben ca. 10 Stunden in einem Vacuum-Konzentrator (Speed-Vac) getrocknet.

Zur Kontrolle der Extraktion und der HLPC-Reinigung wurden Leerproben („Blanks“) mitverarbeitet. Sie enthielten Methanol, die entsprechende Menge Radioaktivität (^{Jod125}3,5-T2, ^{Jod125}T3, ^{Jod125}T4), sowie 25µl Homogenisationslösung statt der Proben.

Das Pellet mit den Organellen-Fragmenten wurde bis zur Bestimmung des Proteingehaltes bei –20°C gelagert.

Die bisher von der Arbeitsgruppe des Verfassers zur Reinigung der Extrakte verwendete Methode der Säulenchromatographie (entwickelt von Morreale de Escobar et al. 1985) hat den Nachteil, dass in Arealen bzw. subzellulären Fraktionen mit geringen Hormonkonzentrationen nur jeweils ein Schilddrüsenhormon durch RIA gemessen werden kann. Außerdem waren die Hormonquantifizierungen insbesondere in den niedrigen Bereichen oft nicht reliabel, da durch die Säulenchromatographie nicht vollständig gereinigte Lipide die Reaktionen im RIA störten (Pinna et al. 1999). Aus diesem Grunde entwickelte der Autor zusammen mit G. Pinna eine Methodik zur Trennung und Aufreinigung der verschiedenen Jodothyronine mittels HPLC. Zur Trennung und Reinigung der Schilddrüsenhormone wurden die Hormon-Extrakte in 1400µl einer Suspensionslösung aus 36% Acetonitril, 64% HPLC-Wasser und zur Verhinderung der spontanen Dejodierung der Schilddrüsenhormone, zusätzlich mit 1% Essigsäure resuspendiert. Anschließend wurden die Proben für 10s geschüttelt und für 10min im Ultraschallbad behandelt. Diese Prozedur wurde zweimal wiederholt.

Die Trennung der Hormone erfolgte mit einer 5µm Eurospher 100-C18; 4 x 250 mm Säule (Knauer, Berlin). Die Säule wurde zunächst mit einer Lösung aus 36% Acetonitril und 64%

Wasser (enthielt 1% Essigsäure) bei einer Durchflussrate von 1ml / min äquilibriert. Nach Auftragen der Probe wurde ein linear ansteigender Gradient mit einer Endkonzentration von 45% Acetonitril und 55% Wasser (enthielt 1% Essigsäure) eingestellt. Die Endkonzentration wurde nach 21 min erreicht.

Das kleinere, hydrophilere Hormon T3 wurde nach etwa 7 bis 10 min eluiert, das größere, hydrophobere Hormon T4 nach etwa 15 bis 17 min. Nach 21 min wurde das System für 5 min auf 100% Acetonitril eingestellt, um die Säule von den eventuell darin verbliebenen Geweberesten zu säubern. Anschließend folgte eine 5-minütige Äquilibrierungsphase, in welcher die Ausgangskonzentration von 36% Acetonitril und 64% Wasser wieder eingestellt wurde.

Bei jenen Experimenten, bei welchen auch 3,5-T2 mitgemessen wurden, wurde eine Ausgangslösung von 32% Acetonitril und 68% Wasser eingestellt und ein ansteigender Gradient mit einer nach 24 Minuten zu erreichenden Endkonzentration von 45% Acetonitril und 55% Wasser gefahren. Das 3,5-T2 eluierte zuerst, also vor T3.

Die Trennung und Aufreinigung der Hormone wurde auch mit einer Lösung aus Methanol und Ammoniumacetat versucht. Die Ergebnisse zeigten jedoch wesentlich unschärfere, länger gestreckte „Hormonpeaks“ als bei der Anwendung von Acetonitril und Wasser.

Die Hormone wurden anhand ihres radioaktiven Signals in einem Gamma-Counter identifiziert, in Glasröhrchen gesammelt und anschließend in einem Vakuum-Verdampfer (Speed-Vac) etwa 10h getrocknet.

Die Glasröhrchen mit den getrockneten Hormonen T3 und T4 wurden im Gamma-Counter gemessen. Aus den Zählraten der Proben konnte der Wiederfindungsfaktor („Recovery“) der entsprechenden Hormone ermittelt werden. Dazu wurde die Aktivität des vor der Extraktion hinzugefügten markierten Hormons durch die Zählrate der Probe dividiert. Nach dem Deckeln der Röhrchen wurden die Proben bei –20°C gelagert.

2.2.2 Versuchstiergruppen

Bei allen Untersuchungen wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht von ca. 250 bis 300g verwendet. Die Tiere wurden jeweils zu viert in einem Käfig bei einer Temperatur von 20°C und einem simulierten 12-stündigen Tag-Nacht-Zyklus gehalten. Den Versuchstieren standen Futter und Wasser ad libidum zur Verfügung. Vor der ersten

pharmakologischen oder sonstigen Intervention hatten die Tiere eine Eingewöhnungszeit von ca. vier Wochen. Am Ende der jeweiligen Untersuchung wurden die Tiere zwischen 11.00 und 13.00 Uhr ohne Betäubung dekapitiert.

2.2.2.1 Kontrolltiere

Zur Entwicklung der in Kapitel 2.2.1 geschilderten Methoden waren die Hirnareale von insgesamt 24 Kontrolltieren erforderlich.

2.2.2.2 Subchronische Behandlung mit Antidepressiva

Verschiedene Versuchstiergruppen mit einer Gruppengröße von jeweils n=12 wurden 14 Tage lang mit drei verschiedenen Dosierungen des Antidepressivums Desipramin behandelt. Die Voruntersuchungen zeigten, dass T3 in allen Subfraktionen der größeren Hirnareale einer Ratte messbar war. In den kleineren Hirnarealen mussten jedoch die Gehirne von zwei Tieren (z.B. Hippocampus) oder sogar von drei Tieren (z.B. Amygdala) gepoolt werden, um T3 in allen Subfraktionen zu detektieren. Daher musste mit Gruppengrößen von n=12 gearbeitet werden. Die Desipramin-Dosierungen betrugen 5 mg/kg, 20 mg/kg und 40 mg/kg. Die Behandlungen wurden mit mehreren Dosierungen durchgeführt, da bis heute nicht bekannt ist, welche Dosierungen im Tierexperiment den in der Humanmedizin verabreichten Dosen exakt entsprechen. Eine lineare Umrechnung der bei der Ratte applizierten Dosis in mg/kg auf die beim Menschen medizierten Dosierungen ist nicht möglich, da die Resorption und insbesondere die Metabolisierung von Psychopharmaka bei Versuchstieren anders verläuft als beim Menschen (z. B. Öhman et al. 1977, Bauman et al. 1984). Desipramin wurde in 0,9%iger Kochsalzlösung gelöst und in einem Volumen von 1ml per Schlundsonde einmal pro Tag verabreicht. Eine Kontrollgruppe von ebenfalls 12 Tieren erhielt dasselbe Volumen an Kochsalzlösung über denselben Zeitraum appliziert. Die Tiere wurden 24 Stunden nach der letzten Pharmakaapplikation getötet.

Einer weiteren Versuchsgruppe von jeweils 12 Tieren wurde der serotonerge Wiederaufnahmehemmer Paroxetin in einer Dosierung von 20 mg/kg über einen Zeitraum von 14 Tagen intraperitoneal verabreicht. Das nicht wasserlösliche Paroxetin wurde in einer

mit Methylzellulose angedickten 0,9%igen NaCl-Lösung appliziert. 12 Kontrolltiere wurden entsprechend behandelt.

In einem weiteren Experiment wurden je 12 Tiere mit täglich 5 mg/kg Tianeptin bzw. mit 40 mg/kg Venlafaxin behandelt. Beide Medikamente sind wasserlöslich und wurden in isotonischer Kochsalzlösung intraperitoneal appliziert. Die Kontrolltiere erhielten ebenfalls Kochsalzlösung i.p. Auch dieser Versuch wurde 14 Tage lang durchgeführt.

2.2.2.3 Behandlung mit phasenprophylaktischen Medikamenten

12 Tiere wurden einer zweiwöchigen 0,15 %-Lithiumdiät unterzogen. Die entsprechende Diät wurde von der Firma Altromin (Lage) hergestellt. Die 14-tägige Applikation einer 0,15 %igen Lithiumdiät führte in den Vorversuchen zu einer mittleren Lithium-Serumkonzentration von 0,72 ± 0,8 mmol/l. Die Streuung betrug 0,58 bis 0,85 mmol/l (Baumgartner et al. 1997). Die Lithium-Dosierung führte dementsprechend zu Serumkonzentrationen, welche im Rahmen der Phasenprophylaxe bei manisch-depressiven Patienten erzielt werden sollen. In den Käfigen der mit Lithium behandelten Tiere wurde zusätzlich eine zweite Flasche angebracht, welche eine 0,9%ige NaCl-Lösung enthielt, um der mit der Lithium-Behandlung verbundenen Polyurie entgegenzuwirken. Die Behandlungsdauer betrug insgesamt 14 Tage.

12 weitere Tiere wurden 14 Tage lang mit einer 0,4%igen Carbamazepindiät behandelt. Diese Behandlung führte in Vorversuchen zu einer mittleren Serumkonzentration des Carbamazepins von 5,99 ± 1,90 mg/l (Baumgartner et al. 1997). Dieser Wert entspricht jenen Serumkonzentrationen, wie sie auch bei der Rezidivprophylaxe manisch-depressiver Patienten angestrebt wird (zwischen 4 und 12 mg/l). Das Carbamazepin wurde mit dem Futter verabreicht, welches ebenfalls von der Firma Altromin (Lage) hergestellt wurde. Weiterhin erhielten 12 Kontrollratten das von der Firma Altromin hergestellte Kontrollfutter.

2.2.2.4 Schlafentzug

Die Arbeitsgruppe des Verfassers hat mehrere Schlafentzugsexperimente durchgeführt, bei welchen die Ratten einzeln für 24 Stunden in sich langsam drehenden Trommeln platziert

wurden (z. B. Campos-Barros et al. 1993). Diese Methode des Schlafentzugs wurde von Borbely und Neuhaus (1979) beschrieben. Sie hat jedoch folgende Nachteile: Zum einen werden die Tiere isoliert, was einen zusätzlichen Stressfaktor bedeutet. Zum anderen werden sie zu permanenter motorischer Aktivität gezwungen, was wiederum eigene Effekte auf die zu untersuchenden Parameter auslösen könnte. Aus diesem Grunde wurde der Schlafentzug in der vorliegenden Arbeit wie folgt durchgeführt: Die Tiere wurden zwischen 6.00 Uhr morgens und 14.00 Uhr mittags, also über einen Zeitraum von acht Stunden durch verschiedene Manipulationen wachgehalten. Dabei blieben sie zu viert in den jeweiligen Käfigen zusammen. In den ersten Stunden genügte z. B. ein kurzes Anheben des Käfigdeckels oder ein kurzzeitiges Ein- und Ausschalten des Lichtes, um die Tiere für längere, teilweise 10 bis 15 Minuten dauernde Phasen wach zu halten. In den letzten Stunden mussten die Tiere durch gelegentliches Schütteln des Käfigs, auch durch Greifen und Hochziehen am Schwanz wachgehalten werden. Insgesamt entspricht dieser achtstündige Schlafentzug in etwa der Länge des bei depressiven Patienten antidepressiv wirksamen „partiellen Schlafentzugs“ in der zweiten Hälfte der Nacht. Er ist aufgrund der schonenderen Behandlung der Tiere ein besseres Modell für die Untersuchung der Schlafentzugseffekte als das von Borbely und Neuhaus beschriebene Modell. Bei 12 Tieren wurde der soeben beschriebene Schlafentzug durchgeführt, sie wurden mit 12 völlig unbehandelten Kontrolltieren zwischen 14.00 und 15.00 Uhr getötet.

2.2.2.5 Untersuchungen von Stressfaktoren (i.p.-Injektionen)

Zur Untersuchung von akuten Stresseffekten wurden bei jeweils 12 Ratten in einem Zeitraum von 1,5 Stunden jeweils drei i.p.-Injektionen mit isotonischer Kochsalzlösung durchgeführt (um 11.00, um 11.45 und um 12.30 Uhr). Die Ratten wurden zwei Stunden nach der ersten Intervention, also gegen 13.00 Uhr dekapitiert. Sie wurden mit ebenfalls 12 unbehandelten Kontrolltieren verglichen.

In einer weiteren Versuchsanordnung wurden die Effekte von chronischen i.p.-Injektionen untersucht. Jedes Tier erhielt einmal täglich eine i.p.-Injektion mit 1 ml isotonischer Kochsalzlösung. Die Tiere wurden 24 Stunden nach der letzten Injektion getötet und die Befunde mit jenen einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen.

2.2.2.6 Induktion einer hypothyreoten und einer hyperthyreoten Stoffwechsellage

Zur Induktion einer Hypothyreose wurden jeweils 12 Tiere über einen Zeitraum von sechs Wochen mit Methimazol und $KClO_4$ behandelt. Dem Trinkwasser wurden 0,025%-Methimazol sowie 1%-$KClO_4$ beigefügt.
Die Induktion einer Hyperthyreose erfolgte sowohl mit T4 als auch, in getrennten Versuchsgruppen mit T3. Eine relativ geringgradige, T4-induzierte Hyperthyreose wurde durch vierwöchige Beifügung von 24µg T4 / 30ml zum Trinkwasser erzielt. Bei einem durchschnittlichen Wasserkonsum von ca. 30 ml pro Ratte und Tag entspricht dies einer T4-Aufnahme von 24 µg pro Ratte und Tag.
Eine stärkere T4-induzierte Hyperthyreose wurde durch eine sechswöchige Behandlung mit 96µg T4 / 30ml Trinkwasser erzielt. Die Ratte nahm bei dieser Behandlung ca. 96 µg T4 pro Tag auf.
Eine T3-induzierte Hyperthyreose wurde durch den Zusatz von 20µg T3 auf 30ml Trinkwasser erzielt. Bei dieser Versuchsanordnung nahmen die Tiere ca. 20 µg T3 pro Tag aus dem Trinkwasser auf.
Die Gruppengröße betrug bei allen genannten Versuchsgruppen n = 12. Zur Stabilisierung der Schilddrüsenhormone in Leitungswasser enthielten alle Lösungen 1% BSA.

2.2.2.7 Hirnpräparation

Die Versuchstiere wurden ohne Betäubung zwischen 11.00 Uhr und 13.00 Uhr dekapiert. Die Präparation des Gehirns wurde nach der von Glowinski und Iversen (1966) beschriebenen Methode durchgeführt.

Nach der Dekapitation wurde der Schädel sofort vom Hinterhauptloch ausgehend mit einer Kornzange nach außen aufgebrochen. Das Gehirn wurde nach der Entfernung der Schädeldecke aus der Schädelbasis herausgenommen und auf eine eisgekühlte Messingplatte gelegt.

Das Gehirn wurde durch zwei transversale Schnitte mit einem Skalpell in drei Teile zerlegt (Abbildung 1).

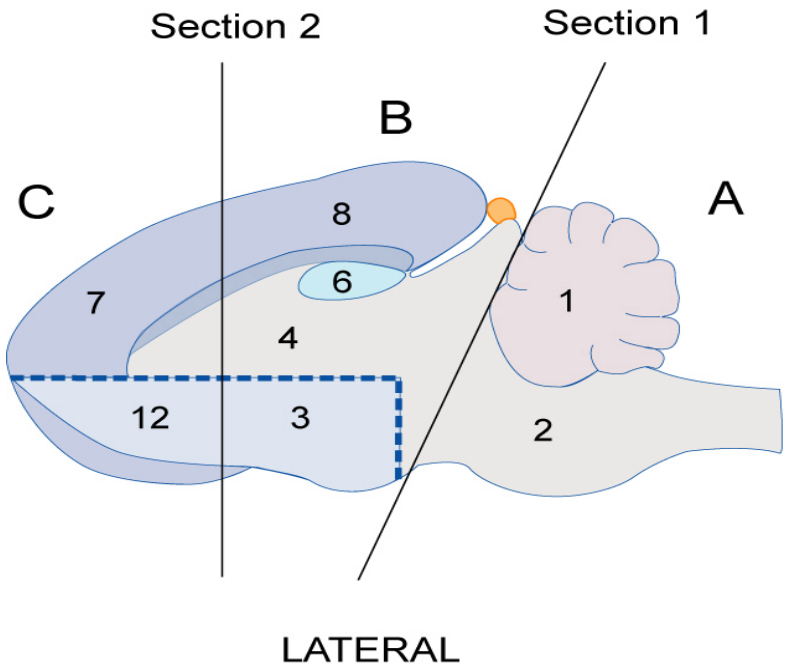

Abb.1: Zerlegung des Gehirns durch zwei transversale Schnitte in drei Teile. 1 = Cerebellum, 2 = Medulla, 3 = Hypothalamus, 4 = Mittelhirn, 6 = Hippocampus, 7 = frontaler Kortex, 8 = parietooccipitaler Kortex, 12 = limbisches Vorderhirn

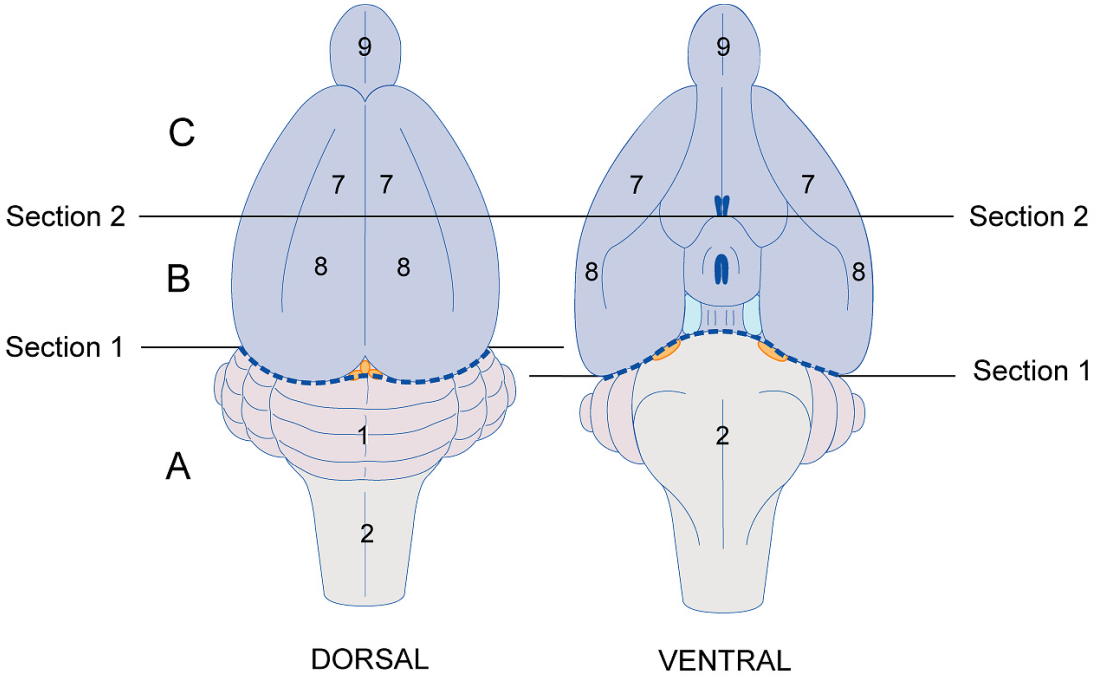

Abb.2: Zerlegung des Gehirns durch zwei transversale Schnitte; dorsale und ventrale Ansicht. 1 = Cerebellum, 2 = Medulla, 7 = frontaler Kortex, 8 = parietooccipitaler Kortex, 9 = olfaktorische Bulbi

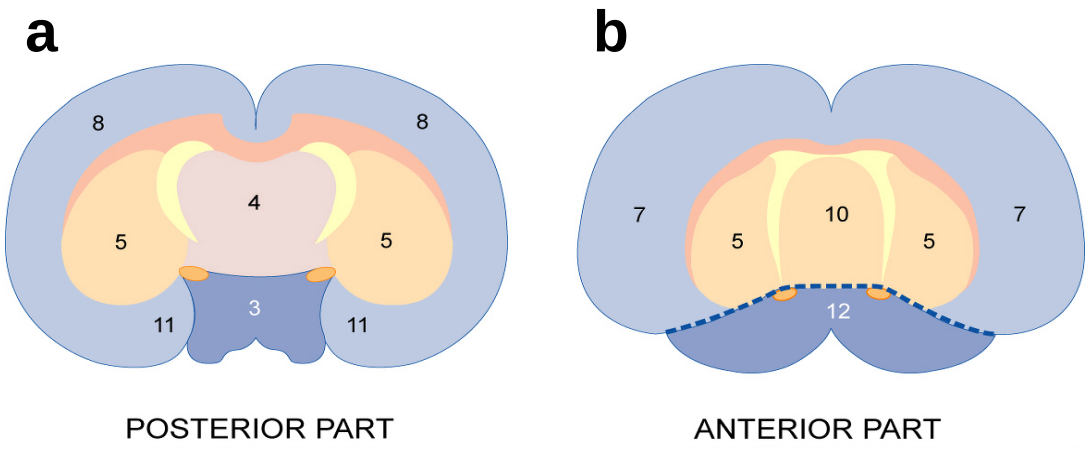

Abb.3: Ansicht der Schnittebenen des posterioren Teils (a) und des anterioren Teils (b). 3 = Hypothalamus, 4 = Mittelhirn, 5 = Striatum, 7 = frontaler Kortex, 8 = parietooccipitaler Kortex, 10 = Septum, 11 = Amygdala, 12 = limbisches Vorderhirn

Schnitt 1 trennt die Hirnareale Cerebellum und Medulla vom übrigen Gehirn (A in Abb. 1 + 2). Durch Schnitt 2 wird das restliche Gehirn in einen posterioren Teil (B in Abb. 1 + 2, Abb. 3a) und einen anterioren Teil (C in Abb. 1 + 2, Abb. 3b) getrennt.

Im posterioren Hirnabschnitt (B in Abb. 1 + 2, Abb. 3a) wurde zuerst der Hypothalamus (3 in Abb. 3a) isoliert. Anschließend wurden das Mittelhirn (4 in Abb. 3a), der hintere Teil der Striatums (5 in Abb. 3a), der Hippocampus (6 in Abb.1), die Amygdala (11 in Abb. 3a) und der parietooccipitale Kortex (8 in Abb. 3a) voneinander getrennt.

Im anterioren Hirnabschnitt (C in Abb. 1 + 2, Abb. 3b) wurden das limbische Vorderhirn (12 in Abb. 3b), das Septum (10 in Abb. 3b), der vordere Teil des Striatums (5 in Abb. 3b) und der Cortex frontalis (7 in Abb. 3b) separiert.

Alle Hirnareale wurden nach der Isolierung sofort auf Trockeneis (CO_2) platziert und tiefgefroren. Die einzelnen Areale wurden nachfolgend in 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäße transferiert und bis zum Tag der subzellulären Fraktionierung bei –80°C gelagert.

2.2.3 Radioimmunologische Bestimmung (RIA) der 3,5-T2-, T3- und T4 Konzentrationen

2.2.3.1 Messung der 3,5-T2-, T3- und T4 Konzentrationen in subzellulären Fraktionen

Die 3,5-T2-, T3- und T4-Quantifizierungen in subzellulären Fraktionen wurde nach der Methode von Pinna et al. (1997, 1999) durchgeführt. Mit dieser Methode können 3,5-T2-, T3- und T4- Gewebekonzentrationen sowohl in Homogenaten, als auch in subzellulären Fraktionen von kleinen Hirnarealen, wie z. B. Amygdala bestimmt werden.
Das Prinzip eines Radioimmunoassays (RIA) besteht in einer Konkurrenzreaktion zwischen einem radioaktiv markierten Antigen definierter Konzentration (Tracer) und dem zu untersuchenden (nicht-radioaktiven) Antigen unbekannter Konzentration, um die Bindung an einen im Unterschuss vorhandenen Antikörper. Im Falle der Quantifizierung der Schilddrüsenhormone konkurriert ein mit Jod 125 markiertes Schilddrüsenhormon als Tracer mit dem zu messenden Hormon um die Bindung am Antikörper. Je höher die Konzentration unmarkierter Hormone ist, desto mehr markierte Tracer-Moleküle (Antigene) werden vom Antikörper verdrängt.
Nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes werden die Antigen-Antikörper-Komplexe durch Ausfällen vom ungebundenen Antigen separiert. Die Radioaktivität des Niederschlages wird gemessen. Anhand einer Standardkurve mit bekannten Konzentrationen an unmarkierten Hormonen wird die jeweilige Konzentration der zu untersuchenden Probe bestimmt.

Die jeweiligen Antikörper wurden in der Arbeitsgruppe des Autors bereits früher durch Immunisierung von Kaninchen gegen Ratten-T2-, T3- bzw. T4-Moleküle produziert. Die Herstellung der T3- und T4-Tracer, d.h. mit Jod 125 markiertes T3 bzw. T4, wurde in der Arbeitsgruppe des Autors nach der Chloramin-T-Methode (Nakamura et al. 1977) durchgeführt. Ein spezifischer 3,5-T2-Tracer wurde von Rudy Thoma (Formula GmbH Berlin) zur Verfügung gestellt. Er wurde trägerfrei durch Halogenaustausch aus 3,5-Dibrom-L-Thyronin hergestellt (siehe Pinna et al. 1997).
Die markierten Jodthyronine unterliegen einer unspezifischen Dejodierung. Der Anteil freien Jodids wurde vor jedem Radioimmunoassay mittels Säulenchromatographie entfernt. Dazu wurde die benötigte Menge markierter Jodthyronine in 1 ml 50%iger Methanol-, 0,03%

Ortophosphorsäure-Lösung aufgenommen und auf die mit 2 ml 100 %igem Methanol vorgewaschene Sep-Pack-C_{18}-Kartusche aufgetragen. Anschließend wurde die Kartusche dreimal mit 1 ml 50%igem Methanol, 0,03% Ortophosphorsäure gewaschen. Die gereinigten Jodthyronine wurden mit 1ml 100%igem Methanol eluiert und in dem entsprechenden Phosphatpuffer verdünnt.

Für die 3,5-T2-, T3- und T4-Quantifizierungen wurden acht Standards zwischen 0,312pg und 40pg pro Ansatz aus einer jeweiligen Stammlösung durch Verdünnungen mit den jeweiligen Phosphatpuffern (siehe Tabelle 2.2) hergestellt.

Die nach der HPLC-Trennung getrockneten Proben wurden in jeweils 120µl eines Phosphatpuffers resuspendiert und 30min geschüttelt. Aus den 120µl wurden Doppelbestimmungen zu je 50µl gemeinsam mit 100µl des jeweiligen Tracers (ca. 4000 cpm) sowie 100µl der jeweiligen Antiserumverdünnung pipettiert.

Nach der Inkubation über Nacht auf einem Schüttler wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe durch Zentrifugation mit 3ml Trennlösung (0,04 M Natriumphosphatpuffer, pH 8, 0,6mM Merthiolat, 20% Polyethylenglykol, 0,13% bovines Gamma-Globulin) präzipitiert. Die Radioaktivität der Pellets wurde in einem Gamma-Counter gemessen. Die Gehalte der Schilddrüsenhormone in den Proben wurden anhand der Standardkurve mit einem Computerprogramm berechnet.

Die Sensitivität der radioimmunologischen Bestimmungen lag im niedrigen Picogrammbereich. Die ED 80 lag bei den T3-Quantifizierungen zwischen 1 und 1,5 pg/tube, bei den T4-Bestimmungen zwischen 2 und 2,6 pg/tube und bei den 3,5-T2-Bestimmungen zwischen 0,8 und 1,2 pg/tube.

Tabelle 2.2: Phospatpuffer für die Lösung der extrahierten Schilddrüsenhormone und zur Herstellung der Standardkurve

3,5-T2 RIA	T3 RIA	T4 RIA
0,04 M Natriumphosphatpuffer	0,04 M Natriumphosphatpuffer	0,04 M Natriumphosphatpuffer
0,6 mM Merthiolat	0,6 mM Merthiolat	0,6 mM Merthiolat
0,2 % bovines Serum-Albumin	0,2 % bovines Serum-Albumin	0,05 % bovines Serum-Albumin
pH 8	pH 8	pH 8

Tabelle 2.3: Tracerlösungen

3,5-T2 Tracer	T3 Tracer	T4 Tracer
0,04 M Natriumphosphatpuffer	0,04 M Natriumphosphatpuffer	0,04 M Natriumphosphatpuffer
0,6 mM Merthiolat	0,6 mM Merthiolat	0,6 mM Merthiolat
0,2 % bovines Serum-Albumin	0,2 % bovines Serum-Albumin	0,05 % bovines Serum-Albumin
0,01 % L-Cystein	0,01 % L-Cystein	0,01 % L-Cystein
pH 8	pH 8	pH 8
4000 cpm ^{J125}3,5-T2	4000 cpm ^{J125}T3	4000 cpm ^{J125}T4

2.2.3.2 Serumbestimmungen von T3 und T4

Die Serum-T3- und T4-Konzentrationen wurden ebenfalls durch RIA nach der Methode von Meinhold (1986) bestimmt. Die Standards wurden in hormonfreiem Serum aufgenommen (Stringer und Wynford-Thomas 1982). Die T3- und T4-Tracerlösungen enthielten 0,06% ANS (8-Anilino-1-Naphtalin-1-Sulfonsäure) zur Trennung der Hormone von ihren Serumbindungsproteinen.

T3-Ria für Rattenserum:

Je 20µl Serum wurden mit 20µl Phosphatpuffer (Tabelle 2.4), 100µl Tracerlösung (Tabelle 2.4) und 100µl Antiserum (Verdünnung des laboreigenen T3-Antiserums im Verhältnis 1:350000 in Phosphatpuffer) über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Zur Quantifizierung wurden acht Standards zwischen 2,5 und 100pg pro Ansatz aus einer T3-Stammlösung durch Verdünnung mit Phosphatpuffer hergestellt; zu jedem Ansatz wurden 20µl hormonfreies Rattenserum pipettiert.

Tabelle 2.4: Phospatpuffer und Tracerlösung für den T3-Serum-RIA

Phosphatpuffer	T3-Tracerlösung
0,04 M Natriumphosphatpuffer	0,04 M Natriumphosphatpuffer
0,6 mM Merthiolat	0,6 mM Merthiolat
0,2 % bovines Serum-Albumin	0,2 % bovines Serum-Albumin
pH 8	0,01% Cystein
	0,06% ANS
	30000 cpm / 100µl ^{125}J-T3
	pH 8

T4-RIA für Rattenserum:

Je 20µl Serum wurden mit 380µl Barbitalpuffer (Tabelle 2.5), 100µl Tracerlösung (Tabelle 2.5) und 100µl Antiserum (Verdünnung des laboreigenen T4-Antiserums im Verhältnis 1:1000 in Barbitalpuffer) über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Zur Quantifizierung wurden acht Standards zwischen 62,5 und 4000pg pro Ansatz aus einer T4-Stammlösung durch Verdünnung mit Barbitalpuffer hergestellt; zu jedem Ansatz wurden 20µl hormonfreies Rattenserum pipettiert.

Tabelle 2.5: Barbitalpuffer und Tracerlösung für den T4-Serum-RIA

Barbitalpuffer	Tracerlösung
0,08 M Diethylbarbiturat-NaCl	0,08 M Diethylbarbiturat-NaCl
0,02% Natriumazid	0,02% Natriumazid
0,2 % bovines Serum-Albumin	0,2 % bovines Serum-Albumin
pH 8,6	0,06% ANS
	20000 cpm / 100µl ^{125}J-T4
	pH 8,6

Die Präzipitation der Antigen-Antikörperkomlexe erfolgte bei der T3- wie bei der T4-Serumbestimmung mit der Polyethylenglykol-Methode wie in Kapitel 2.2.3.1 beschrieben, bei dem T4-Serum-RIA wurde der entsprechende Barbitalpuffer verwendet.

Die Radioaktivität der Pellets wurde in einem Gamma-Counter gemessen. Die Gehalte der Schilddrüsenhormone in den Proben wurden anhand der Standardkurve mit einem Computerprogramm berechnet.

2.2.4 Quantitative Proteinbestimmung

Zur Berechnung der Hormonkonzentrationen wurde die pro tube gemessene Menge an Schilddrüsenhormonen anhand der gemessenen „Recovery“ korrigiert und anschließend auf die in der jeweiligen Subfraktion gemessenen Proteinmenge bezogen.
Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer konzentrationsabhängigen Absorbtionsverschiebung einer sauren Coomassie-Brillant-Lösung (BIO-RAD-Protein-Assay).
Die aus der Extraktion hervorgegangenen Pellets mit den Organellen-Fragmenten wurden mit 250µl 1M NaOH überschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Resuspension wurden die Proben zunächst mit 750µl H_2O verdünnt und mit 0,25M NaOH bis zu einer geeigneten Proteinkonzentration weiter verdünnt.
Aus einer Protein-Stocklösung von 200µg Protein/ml 0,25M NaOH (je 50% Bovines-γ-Globulin und Bovines Serum-Albumin) wurde eine Verdünnungsreihe mit folgenden Proteinkonzentrationen hergestellt: 0,02mg/ml, 0,04mg/ml, 0,08mg/ml, 0,12mg/ml, 0,16mg/ml und 0,2mg/ml.
In jeden Ansatz wurden 700µl H_2O, 100µl Proteinprobe bzw. Standardverdünnung und 200 µl der Färbelösung (BIO-RAD-Protein-Assay) pipettiert.
Alle Standards bzw. Proben wurden in Duplikaten pipettiert, kurz geschüttelt und in Einwegküvetten (Sarsted) überführt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge λ von 595nm im Photometer gegen den Nullwert.
Der Proteingehalt wurde mit Hilfe eines Computerprogramms (Costat) ausgewertet. Dazu wurde aus der Extinktionen der Standardverdünnungen eine Regressionsgerade gebildet. Durch Einsetzen der Probenextinktionen in die Geradengleichung wurde die Proteinkonzentration errechnet und um die durchgeführten Verdünnungen korrigiert.

2.2.5 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen den Hormonkonzentrationen der Kontrollgruppe einerseits und den mit Psychopharmaka behandelten bzw. den „gestressten“ Tiergruppen sowie jenen Versuchsgruppen, bei denen eine Hypo- bzw. eine Hyperthyreose induziert

wurde andererseits, wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. Werte von $p < 0{,}05$ gelten als signifikant. Für die Auswertung aller Experimente wurden insgesamt 615 Einzelvergleiche durchgeführt. Unter Anwendung der P-Wert-Korrektur nach Bonferroni ergäbe dies ein Signifikanzniveau von $p < 0{,}000081$. Die Erfahrung zeigt jedoch, dass bei einem solchen niedrigen Signifikanzniveau im Bereich biologisch-pharmakologischer Forschung kaum je signifikante Ergebnisse erzielt werden. Eine rigide Anwendung der Bonferroni-Korrektur würde daher möglicherweise dazu führen, dass pharmakologisch *relevante* Unterschiede nicht beachtet werden. Außerdem ist die vorliegende Studie eine erste, möglichst breit angelegte (viele Hirnareale, viele subzelluläre Fraktionen) Studie ihrer Art und daher als Hypothesen-generierende Untersuchung geplant worden. Eine Korrektur der p-Werte ist daher weder sinnvoll noch erforderlich. Dies bedeutet aber auch, dass signifikante Ergebnisse in weiteren Untersuchungen verifiziert werden müssen, ehe sie als gesichert gelten können. Besonders wesentlich erscheint es, alle hier erhaltenen signifikanten Unterschiede auf ihre „Plausibilität“ hin kritisch zu diskutieren (siehe Diskussion).