

**Wirkung**  
**genetischer und pharmakologischer**  
**Modulation der Actinpolymerisation auf die**  
**Dopamin- und Glutamat-Freisetzung**  
**im Striatum der Maus**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

vorgelegt von: Carsten Gisbert Weißbrich  
aus: Koblenz

2005

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Fink  
2. Gutachter: PD Dr. Krepp

Tag der mündlichen Prüfung: 11.10.2005

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
Direktor: Prof. Dr. Dr. Manfred Göthert

Meiner Steff



# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>7</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>9</b>
1.1. Bedeutung des Actin bei der exocytotischen Neurotransmitterfreisetzung	9
1.2. Effekte von Gelsolin auf das Cytoskelett	10
1.3. Wirkmechanismus von Cytochalasin D	12
1.4. Klinische Relevanz gestörter Dopamin- und Glutamatfreisetzung im Striatum	12
1.5. Wechselseitige Beeinflussung dopaminerger und glutamaterger Neurone im Putamen	15
1.5.1. Stimulation der Dopamin-Freisetzung durch Glutamat	16
1.5.2. Modulation der Glutamat-Freisetzung durch Dopamin	16
1.6. Fragestellung	17
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>18</b>
2.1. Chemikalien und Materialien	18
2.2. Arbeitsgeräte	19
2.3. Versuchstiere	19
2.4. Präparation striataler Minislices	20
2.5. Superfusion und Freisetzung der Neurotransmitter in vitro	23
2.5.1. Freisetzung von [ <sup>3</sup> H]-Dopamin	23
2.5.2. Freisetzung von Glutamat	23
2.5.2.1. Erstellen der Glutamat-Kalibrierungskurve	24
2.5.2.2. Bestimmung von endogenem Glutamat mittels HPLC	24
2.5.2.3. Aufbau der HPLC	25
2.6. Auswertung und Statistik	25
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>27</b>
3.1. Basale [ <sup>3</sup> H]-Dopamin-Freisetzung	27
3.2. Regionale Unterschiede der [ <sup>3</sup> H]-Dopamin-Freisetzung im caudaten Putamen bei C57Bl/6-Mäusen	27
3.2.1. [ <sup>3</sup> H]-Dopamin-Gesamtaufnahme in Terminale verschiedener Regionen des caudaten Putamen	27

3.2.2.	[ <sup>3</sup> H]-Dopamin-Freisetzung verschiedener Regionen im caudaten Putamen	27
3.3.	Modifikation der Actinpolymerisation durch Cytochalasin D oder Gelsolin	35
3.3.1.	Effekt von Cytochalasin D auf die NMDA-Rezeptor vermittelte [ <sup>3</sup> H]-Dopamin-Freisetzung bei C57Bl/6-Mäusen	35
3.3.2.	Effekt von Gelsolin auf die NMDA-Rezeptor vermittelte [ <sup>3</sup> H]-Dopamin-Freisetzung	37
3.4.	Wirkung von Gelsolin auf die Freisetzung von endogenem Glutamat im caudaten Putamen	39
<b>3.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>40</b>
4.1.	Versuchsmodell	40
4.2.	NMDA-Rezeptor vermittelte [ <sup>3</sup> H]-Dopamin-Freisetzung in verschiedenen Regionen des caudaten Putamen	41
4.3.	Wirkung modifizierter Actinpolymerisation auf die Neurotransmitterfreisetzung im caudaten Putamen	44
4.3.1.	Einfluß des Pilzgiftes Cytochalasin D auf die NMDA-Rezeptor vermittelte [ <sup>3</sup> H]-Dopamin-Freisetzung bei C57Bl/6-Mäusen	44
4.3.2.	Einfluß von Gelsolin auf die NMDA-Rezeptor vermittelte [ <sup>3</sup> H]-Dopamin-Freisetzung	46
4.3.3.	Einfluß von Gelsolin auf die K <sup>+</sup> (15 mM) vermittelte Glutamat-Freisetzung	47
4.4.	Physiologische und klinische Relevanz einer Modifikation der Actinpolymerisation im Hinblick auf die Neurotransmitterfreisetzung im caudaten Putamen	48
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>50</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>52</b>
<b>7.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>60</b>
<b>8.</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>61</b>
<b>9.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>62</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Ach	Acetylcholin
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AUC	area under the curve
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Calcium-Konzentration
CaCl	Calciumchlorid
Ci	Curie; nCi: Nanocurie
DA	Dopamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
GABA	γ-Aminobuttersäure
[ <sup>3</sup> H]	Tritium
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
i.S.	im Sinne
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
min	Minute(n)
μm	Mikrometer
mM	Millimol
MPP+	1-Methyl-4-Phenylpyridinium
n	Stichprobenumfang
Na <sup>+</sup>	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
Ncl	Nucleus

M	Mol; nM: Nanomol
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
o.g.	oben genannt(e/s/r)
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler des Mittelwertes)
SNARE	Soluble NSF Attachment Protein Receptor
s.o.	siehe oben
TTX	Tetrodotoxin
VDCC	spannungsabhängige Calciumkanäle
vgl.	vergleiche
ZNS	Zentrales Nervensystem



# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Bedeutung des Actin bei der exocytotischen Neurotransmitterfreisetzung

Bei der Exocytose fusioniert ein intrazelluläres Vesikel mit der Zellmembran, um daraufhin seinen Inhalt in den Extrazellulärraum freizugeben (Südhof, 2004). In sekretorischen Zellen stabilisiert das Cytoskelett die Lage der Vesikel bei nicht depolarisierter Zellmembran. Actinfilamente stehen sowohl mit der Plasmamembran als auch mit den sekretorischen Vesikeln in Verbindung. Actinfilamente sind polare Strukturen. Sie weisen ein langsam wachsendes Minus-Ende und ein schnell wachsendes Plus-Ende auf (Burgoyne, 1990). Das subplasmalemmale Cytoskelett besteht in den Regionen der Transmitter-Freisetzung vornehmlich aus filamentösem Actin (F-Actin). Verschiedene Actin-bindende Proteine bilden dort mit dem F-Actin den Exocytoseapparat (Aunis und Bader, 1988). Die Vesikel stehen über das Verankerungsprotein alpha-Actinin mit dem F-Actin in Verbindung. So werden die Vesikel bei nicht depolarisierter Membran im subplasmalemalen Exocytosebereich stabilisiert (Trifaro et al., 1992). Die synaptischen Vesikel sind auf ihrer Oberfläche mit einer Vielzahl von Proteinen ausgestattet, die während des vesikulären Kreislaufs von Exocytose bis Endocytose regulierende Funktionen einnehmen. Vor allem unmittelbar vor der  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten Exocytose sind mehrere Proteine von großer Bedeutung. Nachdem die Vesikel mit Neurotransmittern gefüllt wurden, docken sie im Bereich der aktiven Zone an die präsynaptische Membran an. Dort formen SNARE-Proteine und Synaptotagmin 1 und 2 einen Protein-Vesikel-Komplex, welcher den Vesikel in einem instabilen Zwischenzustand ruhen läßt (Priming) (Südhof, 2004). Der Prozess der Exocytose wird durch das ankommende Aktionspotential initiiert. Die Depolarisation öffnet spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (VDCC), wodurch sich am terminalen Ende der sekretorischen Zelle ein Einwärtsstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  durch N- und P-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vollzieht. Steigt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den mikromolaren Bereich, so kommt es durch eine Konformationsänderung des Proteinkomplexes zu einer weiteren Destabilisierung und vollständigen Fusion von Vesikel und Plasmamembran mit nachfolgender Ausschüttung der Neurotransmitter in den synaptischen Spalt (Südhof, 2004). Die o.g.  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle befinden sich vermehrt in der Nähe der aktiven Zonen der präsynaptischen Zellmembran. Nach einer

Zellstimulation erreicht  $[Ca^{2+}]_i$  im Bereich der aktiven Zone deshalb ein Vielfaches der Konzentration anderer Zellareale (Smith und Augustin, 1988).

Neben der vesikelstabilisierenden Funktion übt Actin direkten Einfluß auf die Ionenkanäle aus. So wurde gezeigt, daß eine durch das Pilzgift Cytochalasin D verursachte Modifikation der Polymerisationsdynamik von Actinfilamenten den  $Ca^{2+}$ -Strom durch spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle (VDCC) und durch NMDA-Rezeptor-Kanäle reduziert (Furukawa et al., 1997). NMDA-Rezeptoren sind an F-Actin gekoppelt. Aus dem stimulationsbedingten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg resultiert eine Aktivierung von Gelsolin, das diese Actinfilamente spaltet, welches einen „rundown“ des NMDA-Kanals auslöst. Der  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg sistiert dadurch selbstlimitierend (Rosenmund und Westbrook, 1993). Die auf diesem Weg erreichte Begrenzung des  $Ca^{2+}$ -Einstroms schützt die Zelle zudem vor  $Ca^{2+}$ -induzierter Exzitotoxizität (Endres et al., 1998).

## 1.2. Effekte von Gelsolin auf das Cytoskelett

Gelsolin ist ein actinbindendes Protein. Das 83-kDa-Protein wird in fast allen Geweben exprimiert, u.a. auch im Nervengewebe der Wirbeltiere. Das cytosolische Gelsolin besteht aus sechs homologen Untereinheiten (G1-G6) (Wegner et al., 1994; Gremm und Wegner, 2000). Nach seiner Aktivierung durch einen Anstieg des  $[Ca^{2+}]_i$  in den mikromolaren Bereich durchtrennt Gelsolin das gebundene Actinfilament.

Die Durchtrennung geschieht, indem das Gelsolin die nicht-kovalenten Bindungen zwischen den Actinmonomeren aufbricht. Die Produkte dieser Spaltung sind zwei Actinfilamente, von denen das „barbed end“ mit hoher Affinität an Gelsolin gebunden bleibt (Janmey et al., 1985). Die Aktivität des Gelsolin in der Zelle wird von dem vorhandenen  $[Ca^{2+}]_i$ , dem pH-Wert und der Phosphoinositol-Phosphat-Konzentration reguliert (Janmey und Stossel, 1987a). Steigt  $[Ca^{2+}]_i$  in der Zelle in den mikromolaren Bereich, so erfährt das Gelsolinmolekül eine Konformationsänderung. Die vorher geschlossene Form wird zu einem offenen Molekül transformiert, das seine actinbindenden Untereinheiten G1, G2 und G4 freiliegend präsentiert. Das offene Molekül bindet mit seiner Untereinheit G2 an longitudinal verbundene Actinmonomere. Durch diese Verbindung wird die Untereinheit G1 räumlich so positioniert, daß sie in der Lage ist, die Actin-Actin-Verbindung zu durchtrennen (Kinosian et al., 1998). Ein pH-Wert-Abfall unter 6,0 verursacht eine ähnliche Konformationsänderung der

Gelsolinuntereinheiten, wie sie bei einer Aktivierung durch  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg zu beobachten ist. Dementsprechend ergibt sich ein Synergismus aus einem Anstieg des  $[Ca^{2+}]_i$  und einem Abfall des pH-Wertes: Fällt der pH-Wert, so werden weniger  $Ca^{2+}$ -Ionen benötigt, um zu einer Aktivierung zu führen (Lamb et al., 1993).

Phosphoinositol-4,5-Bisphosphat dissoziiert entstandene Gelsolin-Actin-Komplexe und verhindert damit die Durchtrennung weiterer Actinmoleküle durch Gelsolin (Janmey et al., 1987b).

Gelsolin reguliert sowohl somatodendritisch als auch präsynaptisch das Ausmaß des  $[Ca^{2+}]_i$  – Anstieges nach Membrandepolarisation (Furukawa et al., 1997), indem es die Verbindung von spannungsgesteuerten  $Ca^{2+}$ -Kanälen und NMDA-Rezeptoren zum Actincytoskelett zerschneidet. Dadurch verlieren diese Ionenkanäle ihre Leitfähigkeit zum großen Teil („rundown“).

Entsprechend zeigen die Neurone von Gelsolin-knock-out Mäusen (Gsn<sup>-/-</sup>) bei einer Stimulation durch Glutamat einen wesentlich höheren Anstieg des  $[Ca^{2+}]_i$  als Neurone von Wildtyp-Mäusen (Gsn<sup>+/+</sup>). Der  $Ca^{2+}$ -Influx resultiert in diesem Bereich der Zelle aus dem Strom durch spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle (VDCC) und durch NMDA-Rezeptor-Kanäle. Beide Kanalproteine stehen mit Actinfilamenten in Verbindung. Die durch aktiviertes Gelsolin verursachte Depolymerisation dieser Actinfilamente bei Gsn<sup>+/+</sup> Neuronen führt nach Zellstimulation im Vergleich zu Gsn<sup>-/-</sup> Neuronen zu einem geringeren  $Ca^{2+}$ -Influx durch spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle (VDCC) und NMDA-Rezeptor-Kanäle (Furukawa et al., 1997).

Deshalb wirkt Gelsolin bei Glutamat- bzw.  $Ca^{2+}$ -Exzitotoxizität neuroprotektiv. Ein ischämiebedingter  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg wird durch die actinmodulierende Eigenschaft des Gelsolin abgeschwächt und dementsprechend ist die  $Ca^{2+}$ -bedingte Exzitotoxizität bei Gelsolin-defizienten Neuronen (Gsn<sup>-/-</sup>) in vitro und in vivo ausgeprägter als in Wildtypneuronen (Endres et al., 1998; Sattler et al., 2000).

Ein exzessiver  $Ca^{2+}$ -Influx, hervorgerufen durch ischämiebedingte Glutamat-Stimulation von Neuronen, würde durch eine Kaskade von Reaktionen, die über die Aktivierung verschiedener Caspasen verläuft, die Apoptose einleiten und zum Zelltod führen (Fink et al., 2002).

Der  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg ist nicht nur bei pathophysiologischen Mechanismen wie der Ischämie von Bedeutung, sondern trägt auch entscheidend zum physiologischen Prozeß der exocytotischen Transmitter-Freisetzung bei (s.o.). So stellt sich die Frage, inwiefern Vorhandensein oder Fehlen

von Gelsolin die Freisetzung von Neurotransmittern beeinflussen kann, in dieser Arbeit von Dopamin und Glutamat im Putamen.

### **1.3. Wirkmechanismus von Cytochalasin D**

Cytochalasin D ist ein Gift des Pilzes *Helminthosporium sp.*, das spezifisch Actinfilamente zerschneidet. Cytochalasin D haftet auf dem Plus-Ende (capping) und verhindert die schnelle Phase der Elongation von Actinfilamenten. Außerdem zerschneidet es Actinfilamente (Hartwig und Stossel, 1979). Zusammen mit dem physiologisch kontinuierlich stattfindenden Abtrennen von Actinmonomeren am Minus-Ende kommt die Beeinflussung durch Cytochalasin D einer Depolymerisation des Actinfilamentes gleich, da das dynamische Gleichgewicht des windmühlenartigen Anbauens und Abtrennens von Actinmonomeren in Richtung G-Actin verschoben wird (Cooper, 1987).

Der genaue Mechanismus von Cytochalasin D in vivo ist jedoch noch nicht aufgeklärt. Die allgemeine Annahme, daß Cytochalasin D Actinfilamente durch Zerschneiden depolymerisiert, ist bisher durch keinerlei Daten bewiesen. Sicher ist aber, daß Cytochalasin D die Kinetik der Actinpolymerisation in einer Weise beeinflusst, die der Depolymerisation von Actinfilamenten entspricht (Stevenson und Begg, 1994).

Durch seine Wirkung auf die Actinfilamente der Zelle kann Cytochalasin D verschiedene actinabhängige Zellfunktionen beeinträchtigen und teilweise als pharmakologisches Substitut für endogenes Gelsolin benutzt werden.

### **1.4. Klinische Relevanz gestörter Dopamin- und Glutamatfreisetzung im Striatum**

Die Basalganglien sind eine Gruppe subcorticaler Kernregionen, deren Verbindungen untereinander unerlässlich für den effizienten Ablauf motorischer Bewegungen sind. Die Planung, Initiierung und Ausführung von Bewegungen basieren auf dem Zusammenspiel der in den Basalganglien ausgeschütteten Neurotransmitter. In diesem motorischen Netzwerk werden geplante Bewegungen durch die Neurotransmitter  $\gamma$ -Amino-Buttersäure (GABA), Glutamat, Dopamin und Acetylcholin moduliert (Smeets et al., 2000).

Das Striatum besteht aus Nucleus caudatus und Nucleus lentiformis, der seinerseits aus dem außenliegendem Putamen und dem inneren Pallidum besteht. Putamen und Nucleus caudatus haben einen weitgehend identischen histologischen Aufbau. Sie bestehen zu 90% (bei der Ratte) aus mittelgroßen dornentragenden Projektionen (medium spiny neurons), die überwiegend GABA (als Co-Transmitter Enkephalin, Dynorphin und Substanz P) als Transmitter freisetzen (Pollack, 2001). Der zweite Zelltyp im Striatum sind große nicht dornentragende (aspiny) cholinerge Interneurone (Carpenter, 1991). Charakteristisch ist die Struktur aus cholinacetyltransferase-armen Striosomen und der umgebenden Matrix (Soka et al., 2002).

Die überwiegend aus der ipsilateralen Hemisphäre stammenden striatalen Afferenzen kommen aus nahezu allen Großhirnrindenarealen (corticostriatale Projektionen), insbesondere aus dem motorischen, sensorischen und präfrontalen Assoziationscortex sowie aus der Substantia nigra pars compacta (nigrostriatale Projektionen). Hierbei projizieren die Fasersysteme des

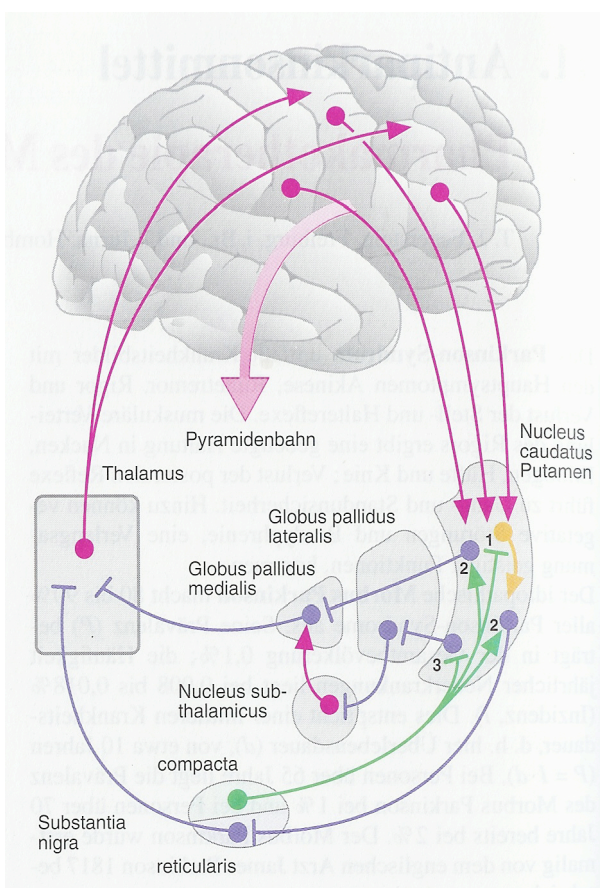


Abb. 1: Corticostriataler Regelkreis. Pfeilspitzen: Aktivierung; Balken: Hemmung; rot: Glutamat; blau: GABA; grün: Dopamin; gelb: Acetylcholin; 1,2,3: Wirkungen und potentielle Fehlfunktionen von Dopamin (Feuerstein und Jurna, 1998).

Assoziationscortex und des sensomotorischen Cortex in verschiedene Regionen des Striatums. Der sensomotorische Cortex projiziert vornehmlich auf dorsomediale und dorsolaterale Anteile des Putamen, wohingegen die Fasern des Assoziationscortex vor allem in das ventromediale Putamen rostral der Commissura anterior projizieren (Pollack, 2001).

Die Erregung der Neurone der skeletomotorischen Schleife im prämotorischen und somatosensorischen Cortex bewirkt die Freisetzung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat aus ihren Axonterminalen im Putamen. Dort wird die Information verarbeitet und führt zur Aktivierung GABAerger, also inhibitorischer, Neurone.

Über einen indirekten und einen direkten Projektionsweg leiten diese Neurone mit ihren Axonen die Information zu den *output*-Kernen der Basalganglien, dem Globus pallidus medialis. Eine

weitere Projektion findet zur Substantia nigra pars reticulata statt. Der direkte Weg ist eine monosynaptische Verbindung zwischen dem Putamen und dem Globus pallidus medialis (Bolam et al., 2000). Der indirekte Projektionsweg beschreibt eine trisynaptische Schleife. Ausgehend vom Putamen ziehen GABAerge Projektionen zum Globus pallidus lateralis. Die dort verarbeitete Information wird wiederum durch GABAerge Neurone zum Nucleus subthalamicus weitergeleitet. Dort findet eine Umschaltung auf glutamaterge Neurone statt, die zum Globus pallidus medialis projizieren (Crossman et al., 2000).

Der direkte und indirekte Projektionsweg vom Putamen zum Globus pallidus medialis sowie die Bahnen über die Substantia nigra pars reticulata regeln synergistisch den *Output* der Basalganglien zum Thalamus (Gerfen et al., 1990).

Eine wichtige Rolle als Modulator in dem komplexen Zusammenspiel exzitatorischer und inhibitorischer Projektionen auf dem Weg durch die Basalganglien spielen Projektionen von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra pars compacta auf den Nucleus caudatus und das Putamen. Diese Neurone erhalten stimulierende Afferenzen aus der Substantia nigra pars reticulata. Nach einer Stimulation findet eine phasische Dopamin-Ausschüttung an den dopaminergen Terminals im Putamen statt. Das freigesetzte Dopamin wirkt im Putamen über D<sub>1</sub>-Rezeptoren auf GABAerge Neuronen der direkten Schleife exzitatorisch (Nr. 2 in Abb. 1), über D<sub>2</sub>-Rezeptoren auf GABAergen Neuronen der indirekten Schleife inhibitorisch (Nr. 3 in Abb. 1). Ebenso hemmt Dopamin im Putamen gelegene cholinerge Interneurone (Nr. 1 in Abb. 1), welche ihrerseits durch Ausschüttung von Acetylcholin die GABAergen striatalen Neurone der direkten Schleife aktivieren.

Der phasischen Dopamin-Freisetzung steht eine tonische gegenüber. Diese wird durch glutamaterge corticostriatale Projektionen induziert. Glutamat ist Ligand am präsynaptischen NMDA-Rezeptor auf dopaminergen Terminalen im Striatum (Krebs et al., 1991a) und stimuliert die Dopaminfreisetzung aus dopaminergen Terminalen.

Wie wichtig das Zusammenspiel der striatalen Neurotransmitter für koordinierte Bewegungen ist, zeigt die Fehlfunktion bei Morbus Parkinson. Morbus Parkinson liegt der Untergang nigrostriataler, dopaminergener Neurone zugrunde. Es handelt sich um ein hypokinetisch-hypertones Syndrom mit den Symptomen Tremor, Rigor, Akinese. Hinzu kommen in wechselndem Ausmaß autonome Dysfunktionen und psychiatrische Symptome.

Die hypokinetische, rigide Symptomatik bei Morbus Parkinson basiert auf einer striatalen Enthemmung nach Degeneration dopaminergener Neurone der Substantia nigra pars compacta

(Johnson, 2000). Die Hauptsymptome Bradyphrenie und Akinese gelten als Minus-Symptome. Sie sind auf eine verminderte D<sub>1</sub>- und D<sub>2</sub>-Rezeptorstimulation der GABAergen Neurone im Striatum nach Degeneration der dopaminergen Neurone der Substantia nigra pars compacta zurückzuführen.

Der daraus resultierende Dopamin-Mangel hat eine geringere Aktivierung der D<sub>1</sub>-Rezeptoren an den GABAergen Neuronen der direkten Schleife zur Konsequenz, was zu einer gesteigerten GABAergen Hemmung im Thalamus führt (Nr. 2 in Abb. 1). Eine verminderte Aktivierung der D<sub>2</sub>-Rezeptoren an den GABAergen Neuronen der indirekten Schleife führt zu einer Enthemmung dieser Neurone und schließlich auch zu einem Übermaß an GABAerger Hemmung im Thalamus (Nr. 3 in Abb. 1). Durch die vermehrte Hemmung im Thalamus wird dessen Filterfunktion für sensomotorische Informationen zum Cortex verstärkt.

Zusätzlich gerät die im Putamen herrschende wichtige Balance zwischen dopaminergem und cholinergem Transmission zugunsten des Acetylcholins aus dem Gleichgewicht (Nr. 1 in Abb. 1). Dadurch entstehen die Plus-Symptome Rigor und Tremor. Aus der Enthemmung der cholinergen Interneurone im Striatum resultiert eine übermäßige Aktivierung GABAerger Neurone der direkten Schleife über die Substantia nigra pars reticulata zum Thalamus durch die Ausschüttung von Acetylcholin. Das Ergebnis ist eine Enthemmung des Thalamus. Das klinische Korrelat der motorischen Überaktivität sind Tremor und Rigor.

Vor dem Hintergrund der neurochemisch verschiedenen Gebiete innerhalb des Striatums ist einsichtig, daß funktionelle in vitro Untersuchungen sehr gezielt an einzelnen Striatumstrukturen durchgeführt werden sollten. Eine solche Technik, die auch die molekularbiologische Untersuchung *desselben* Präparates ermöglicht, ist bisher bei der Maus nicht angewendet worden.

## **1.5. Wechselseitige Beeinflussung dopaminergem und glutamaterger Neurone im Putamen**

### **1.5.1. Stimulation der Dopamin-Freisetzung durch Glutamat**

Glutamat induziert eine Ca<sup>2+</sup>- und dosisabhängige (20-1000 µM) Dopamin-Freisetzung im Striatum (Giorguieff et al., 1977; Roberts und Sharif, 1978). Dabei aktiviert Glutamat NMDA-

Rezeptoren (N-Methyl-D-Aspartat) auf dopaminergen Neuronen (Krebs et al., 1991a). Der NMDA-Rezeptor umfaßt einen Ionenkanal, der eine hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Leitfähigkeit aufweist und durch  $\text{Mg}^{2+}$  in physiologischer Konzentration blockiert wird (Nowak et al., 1984).

Wie diese glutamaterge Modulation morphologisch organisiert ist, ist nicht ganz klar. Ein direkter axo-axonaler Kontakt zwischen dopaminergen und glutamatergen Neuronen ist denkbar. In jedem Fall sind NMDA-Rezeptoren auf den präsynaptischen dopaminergen Nervenendigungen exprimiert, da eine Blockade der axonalen Erregungsleitung mit dem  $\text{Na}^+$ -Kanalblocker Tetrodotoxin (TTX) keine Veränderung der NMDA-induzierten Dopaminfreisetzung hervorruft (Krebs et al., 1991a).

Aus der Stimulation von NMDA-Rezeptoren resultiert aufgrund der hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Leitfähigkeit dieses Kanals ein starker  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx mit einer physiologisch kurzen Erhöhung der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Eine andauernde Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  schädigt das Neuron. Neben der Freisetzung-stimulierenden Wirkung auf die Dopamin-Freisetzung kann Glutamat daher eine exzitotoxische Schädigung dopaminergere Neurone hervorrufen.

### **1.5.2. Modulation der Glutamat-Freisetzung durch Dopamin**

Die stimulierende Wirkung von Glutamat auf die Dopamin-Freisetzung wurde in mehreren Studien sowohl in vitro, als auch in vivo beschrieben (s.o.). Mit ähnlichen Methoden konnte gezeigt werden, daß Dopamin über den  $\text{D}_2$ -Rezeptor einen inhibitorischen Effekt auf die Glutamat-Freisetzung hat (Yamamoto und Davy, 1992). Jedoch gibt es auch Hinweise aus in vivo-Studien, daß Dopamin über  $\text{D}_1$ -Rezeptoren vermittelt auch auf die Glutamat-Freisetzung stimulierend wirkt (Morari et al., 1998). Es kann gefolgert werden, daß Dopamin sowohl inhibitorisch ( $\text{D}_2$ -Rezeptor vermittelt) als auch exzitatorisch ( $\text{D}_1$ -Rezeptor vermittelt) auf die Glutamat-Freisetzung einwirkt (Marti et al., 2002).



## 1.6. Fragestellung

Bei der Maus stellt das caudate Putamen den größten morphologisch einheitlichen Teil des Striatums rostral von Bregma dar. Dieses Gebiet wird sowohl bei neurotoxischen Parkinsonmodellen (Moratalla et al., 1992) als auch bei cerebralen Ischämie-Modellen mit Okklusion der Arteria cerebri media (Fink et al., 1998) vom Zelluntergang betroffen. Eine funktionelle in vitro Prüfung der Neuronen bzw. Projektionen in diesem Gebiet ist deshalb eine wertvolle Methode. Ein Mausmodell würde die Verwendung von transgenen oder knockout-Mäusen ermöglichen.

Deshalb war es Ziel dieser Arbeit, zu untersuchen

1. ob die NMDA-Rezeptor-vermittelte Freisetzung von Dopamin gleichmäßig und reproduzierbar in verschiedenen Regionen des caudaten Putamens der Maus erfolgt, und, da eine verlangsamte Actindepolymerisation bei Gelsolin-defizienten Mäusen (Gsn<sup>-/-</sup>) die Noradrenalin-Freisetzung erhöht (Fink et al., 2002),
2. ob auch die Dopamin-Freisetzung im Putamen durch verlangsamte Actindepolymerisation bei Gsn<sup>-/-</sup> Mäusen erhöht ist,
3. ob die Glutamat-Ausschüttung im Putamen durch verlangsamte Actindepolymerisation bei Gsn<sup>-/-</sup> Mäusen erhöht ist.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Chemikalien und Materialien

[ <sup>3</sup> H]- DA (Dihydrophenylethylamine-Hydrochloride)	Merck, Darmstadt, D
L(+)- Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt, D
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Merck, Darmstadt, D
L-Glucose	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Calciumchloriddihydrat	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, D
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)	Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA
Cytochalasin D	Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt, D
Soluene 350	Packard, Meriden, CT, USA
Toluol	Merck, Darmstadt, D
Lumagel® (Szintillator)	Lumac, Groningen, NL
Fast Turn Cap Mini Poly-Q Vials	Beckman, Fullerton, CA, USA

Zusammensetzung des modifizierten Krebs-Henseleit-Puffers (mM):

L(+)-Ascorbinsäure	0,06
EDTA	0,03
Glucose	11,0
NaCl	118,0
KCl	4,3
CaCl	1,3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2
NaHCO <sub>3</sub>	25,0

Der KH-Puffer wurde mit deionisiertem Wasser angesetzt, das in einer hauseigenen Reinstwasseranlage (PSC Filter 750, Sybron, Barnstead) gewonnen wurde. Die KH- Pufferlösung wurde mit einem Gasgemisch aus 5% CO<sub>2</sub> und 95% O<sub>2</sub> auf pH= 7,4 equilibriert.

## 2.2. Arbeitsgeräte

GF/C- Filter	Whatman International Ltd., Maidstone, UK
Superfusionskammer	Eigenkonstruktion Fink, UKB, D
Ventilautomat + Fraktionssammler	Eigenkonstruktion Fink, UKB, D
PLG- Schlauchpumpe	Desaga, Heidelberg, D
Vibroslice	Campden Instruments Ltd., Lafayette, Indiana, USA

## 2.3. Versuchstiere

Es wurden Wildtyp C57Bl/6-Mäuse für die Experimente verwendet. Das Alter der Mäuse betrug zwischen 9 und 13 Wochen das Gewicht zwischen 23 und 30 g.

Gelsolin knock-out Mäuse (Gsn<sup>-/-</sup>) wurden auf gemischtem genetischen Hintergrund aus 129/SV und C57Bl/6 Mäusen gezüchtet (Witke et al., 1995), da sie im reinen C57Bl/6-Hintergrund nicht

lebensfähig waren. Die Versuchstiere wogen zum Zeitpunkt der Gehirnentnahme zwischen 26 und 32 g und waren zwischen 10 und 14 Wochen alt.

Die Mäuse wurden zu je 6 Tieren in Makrolonkäfigen gehalten. Die Temperatur in den klimatisierten Räumen betrug 26°C bei 12-Stunden-Hell-/ 12-Stunden-Dunkel-Rhythmus. Die Tiere erhielten Futter und Wasser ad libitum (Haltungsdiät Altromin 1324: Altromin, Lage, Deutschland).

#### 2.4. Präparation striataler Minislices

Das Gehirn wurde unmittelbar nach der Dekapitation freipräpariert. Einem transorbitalen Schnitt folgte die Eröffnung der Kalotte mittels eines Schnittes entlang der Sagittalnaht. Mit der Pinzette wurden die beiden parietalen Schädelhälften nach temporal weggeklappt. Von dem freiliegenden Hirn wurde vorsichtig die Dura mater entfernt (Palkovits und Brownstein, 1988). Das Gehirn wurde mit dem Flachspatel von den Hirnnerven getrennt und bis zur weiteren Verarbeitung in gekühltem Krebs-Henseleit Puffer aufbewahrt.

Zur Präparation der striatalen Hirnschnitte wurde das Gehirn auf einen gekühlten (4°C) Metallblock gelegt. Durch einen coronaren Schnitt mit einem Skalpell wurde das Gehirn bei Bregma -0,5 geteilt. Der frontale Hirnteil wurde auf dem Probenhalter eines Vibratoms (Campden Vibroslice; Abb. 3) mit Sekundenkleber fixiert (Abb. 2).



Abb. 2: Frontales Hirnpräparat  
im Vibratom

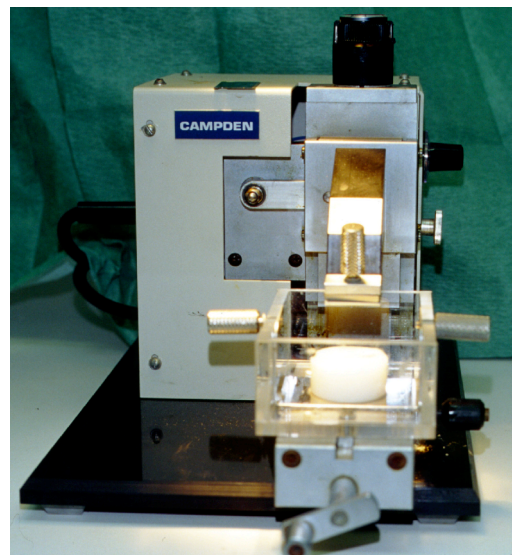


Abb. 3: Vibratom

Es wurden 300 µm dicke Schnitte angefertigt. Aus den Schnitten Bregma (+0,9) – (+0,6); (+0,6) – (+0,3) und (+0,3) – (0,0) (Abb. 4) wurden mit Hilfe einer runden Stanze (Durchmesser 1mm) Minislices (dorsomedial/ lateral/ ventromedial) aus dem Putamen entnommen. Die gewonnenen Präparate wurden 30 min lang in einem Schüttelwasserbad bei 37°C in modifiziertem Krebs-Henseleit Puffer inkubiert. Die Inkubationslösung enthielt für Dopaminfreisetzungsexperimente 50 nM [<sup>3</sup>H]-DA (spezifische Aktivität: 48,2 Ci/mmol). Danach wurden die Minislices in Superfusionskammern auf Whatman GF/C-Filtern platziert.

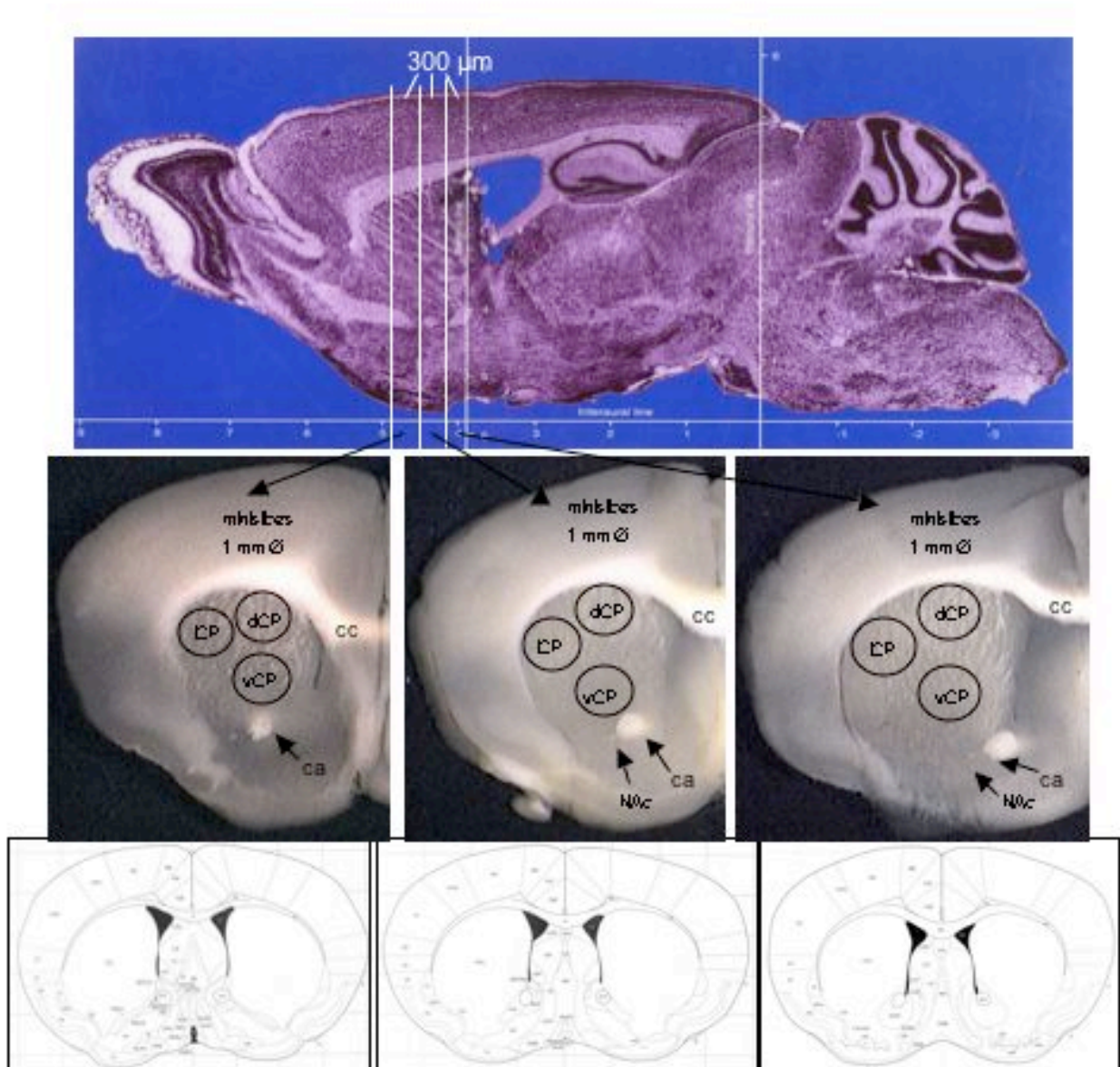


Abb. 4: Stereotaktische Zuordnung der untersuchten Hirnregionen. Oben: Parasagittalebene des Mäusehirns; Mitte: Original coronare Hirnschnitte von Bregma +0,9 bis 0,0 mit einer Dicke von 300 µm; Unten: Zuordnung der untersuchten Regionen im Atlas. Obere und untere Abb. aus: Franklin K, Paxinos G: The mouse brain in stereotaxic coordinates, Academic Press, San Diego, 1997

## 2.5. Superfusion und Freisetzung der Neurotransmitter in vitro

Die Minislices wurden 62 min lang superfundiert. Bei NMDA-Rezeptor induzierter Neurotransmitter-Freisetzung wurde ein  $Mg^{2+}$ -freier Krebs-Henseleit Puffer verwendet, um eine Blockade des NMDA-Rezeptorionkanals durch  $Mg^{2+}$ -Ionen zu verhindern. Das Superfusat wurde in 5-min-Fractionen in Minivials gesammelt. Die Sammelphase begann nach der 17. min, da der basale Tritium-Efflux in den ersten 17 min noch exponentiell abfiel. Nach der 30. min wurde in den jeweiligen Experimenten das zu untersuchende Pharmakon der Superfusionslösung zugesetzt. Von der 31. bis nach der 62. min war das Pharmakon kontinuierlich im Superfusat enthalten, einschließlich der Stimulationsphase.

### 2.5.1. Freisetzung von [ $^3H$ ]-Dopamin

Die Stimulation erfolgte durch Zugabe von NMDA 1 mM zur Superfusionslösung für die Dauer von 2 min nach der 40. min. Das Superfusat umspülte die Minislices mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,6 ml/min, so daß eine Fraktion 3,0 ml enthielt.

Die Radioaktivität der gesammelten Fraktionen wurde nach Zugabe von Szintillationscocktail (Beckmann Ready Gel<sup>TM</sup>) zum Superfusat im Verhältnis 1:1,5 durch Flüssigkeitsszintillationszählung (Ausbeute 25%, Gesamtquenench 75%) in einem  $\beta$ -Counter (Beckmann LS 1801) bestimmt. Die Minislices wurden (nach vollständiger Auflösung in 0,5 ml Soluene<sup>®</sup>) in 6 ml Szintillationscocktail aufgenommen. Ihre Radioaktivität wurde ebenfalls in einem  $\beta$ -Counter (Beckmann LS 1801) gemessen.

### 2.5.2. Freisetzung von Glutamat

Die Stimulation erfolgte durch  $K^+$  15 mM für die Dauer von 2 min nach der 40. min. Das Superfusat umspülte die Minislices mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min. Das endogen freigesetzte Glutamat wurde in Fraktionen von je 5 min gesammelt, so daß jede Fraktion am Ende 1,0 ml enthielt. Das Superfusat wurde anschließend in den Sammelröhrchen bei  $-80^{\circ}C$  tiefgefroren.

Das freigesetzte endogene Glutamat wurde nach dem Auftauen mit OPA-Reagenz (25 mg 1,2 Phtaldialdehyd, 1 ml Methanol, 9 ml Boratpuffer pH 9,2, 26,5  $\mu\text{l}$  2-Mercaptoethanol) in einem Verhältnis von 1:1 derivatisiert. Die Bestimmung der freigesetzten Glutamat-Menge erfolgte mit High Performance Liquid Chromatography (HPLC) mit einem Fluoreszenzdetektor. Hierzu wurden täglich vor den Glutamat-Konzentrationsbestimmungen zwei Kalibrierungskurven erstellt.

#### **2.5.2.1. Erstellen der Glutamat-Kalibrierungskurve**

Die Kalibrierungskurven bestanden aus der gemessenen Emission bei 445 nm (in mV) für die Eichwerte 10 pmol/50  $\mu\text{l}$ , 3 pmol/50  $\mu\text{l}$  und 1 pmol/50  $\mu\text{l}$  für  $\text{Na}^+$ -Glutamat. Bei der charakteristischen Retentionszeit für Glutamat wurden aus dem Chromatogramm die Höhen der peaks den Glutamat-Eichwerten zugeordnet und lieferten die Werte der Kalibrierungskurve. Aus den ermittelten Peak-Höhen der unbekanntenen Proben konnte die absolute Glutamat-Konzentration anhand der Kalibrierungskurve berechnet werden.

Die daraus ermittelte absolute Glutamat-Menge in der Lösung wurde schließlich in die absolute Glutamat-Menge bezogen auf das Feuchtgewicht des Minislices ( $\pi \times 0,5 \text{ mm}^2 \times 300 \mu\text{m}$ ;  $\delta = 1 \text{ g/cm}^3$ ) pro Fünf-min-Fraktion umgerechnet.

#### **2.5.2.2. Bestimmung von endogenem Glutamat mittels HPLC**

Die HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ist ein Verfahren der Säulen-Flüssigkeits-Chromatographie. Dabei handelt es sich um ein Trennverfahren, bei dem die Probenflüssigkeit mittels einer flüssigen Phase (Eluent) unter hohem Druck über die stationäre Phase (Trennsäule) transportiert wird. Die Stofftrennung erfolgt durch Verteilung zwischen einer ruhenden (stationären) und einer sich bewegenden (mobilen) Phase. Bei der verwendeten Adsorptionschromatographie werden die Probenmoleküle durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen reversibel an die stationäre Phase gebunden. Die Verweildauer der Substanzen an der stationären Phase ist aufgrund der unterschiedlich starken Wechselwirkung mit der Oberfläche der



stationären Phase unterschiedlich lang. So werden die Probesubstanzen nach unterschiedlicher Retentionszeit von der Säule gewaschen.

### **2.5.2.3. Aufbau der HPLC**

Die zur Aminosäureanalytik erforderliche Hochdruckgradienten-HPLC-Anlage besteht aus 2 Pumpen (Waters 510), Einspritzsystem, Trennsäule, Fluoreszenzdetektor mit Auswert-PC. Als Säule wurden Nucleosil C18 Trennpartikel mit Korngrößen von 5  $\mu\text{m}$  (4,6 mm Säulendurchmesser) verwendet. Zur Detektion wurde ein Fluoreszenzdetektor (Shimadzu RF-551) mit Durchflußzelle verwendet. Die Chromatogramme wurden mit einem PC mit WATERS Maxima Software aufgezeichnet und analysiert.

## **2.6. Auswertung und Statistik**

Da die Radioaktivität (Tritium-Menge) der einzelnen Superfusatfraktionen und der Minislices nach Versuchsende bestimmt wurde, konnte der Tritium-Gehalt der Minislices bei Versuchsbeginn oder zu jedem beliebigen Zeitpunkt während der Superfusion errechnet werden. Es wurde angenommen, daß der basale Tritium-Efflux während einer Superfusatfraktion linear abfällt. Daraus wurde der Anteil des Tritium-Gehaltes eines Putamen-Minislices zu Beginn der jeweiligen Superfusatfraktion errechnet. Der basale Tritium-Efflux wurde in der Sammelperiode unmittelbar vor der Stimulation bestimmt und als fraktionelle Rate pro Minute angegeben.

Die Stimulus induzierte Tritium-Freisetzung wurde durch Subtraktion des basalen Tritium-Effluxes vom Gesamtefflux während der Stimulationsperiode und der folgenden 10 min berechnet. Sie wurde als Prozentwert des zu Beginn der Stimulationsperiode im Gewebe (Minislice) enthaltenen Tritium angegeben.

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) von n (n= Anzahl der Versuche) unabhängigen Experimenten ausgedrückt.

Ob eine signifikante Veränderung gegenüber einer anderen Prüfgruppe besteht, wurde mit dem zweiseitigen t-Test für unverbundene Stichproben oder dem einseitigen ANOVA gefolgt von einem t-Test überprüft. P-Werte  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant anerkannt.

Alle Graphiken wurden mit GraphPad Prism, Version 3.0 oder GraphPad Prism, Version 4.0 (Graph Pad Inc., San Diego, CA, USA) erstellt.

### **3. ERGEBNISSE**

#### **3.1. Basale [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung**

In Kontrollexperimenten nahm der basale Tritium-Efflux nach einer zehnminütigen, exponentiell abfallenden Phase von der 17. bis zur 62. min nur noch gering und annähernd linear ab. In der unmittelbar der Stimulation vorangehenden Sammelfraktion betrug der basale Tritium-Efflux bei der Kontrollgruppe der Wildtyp C57Bl/6-Mäuse  $0,077 \pm 0,005$  nCi bei  $n = 86$  (Anhang, Tab. 1). Der basale Efflux bei den Gsn<sup>+/+</sup> Mäusen ( $0,081 \pm 0,006$  nCi;  $n = 24$ ) unterschied sich nicht von dem der Gsn<sup>-/-</sup>-Mäuse ( $0,087 \pm 0,007$  nCi;  $n = 21$ ) (Anhang, Tab. 7).

#### **3.2. Regionale Unterschiede der [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung im caudaten Putamen bei C57Bl/6-Mäusen**

##### **3.2.1. [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Gesamtaufnahme in Terminale verschiedener Regionen des caudaten Putamen**

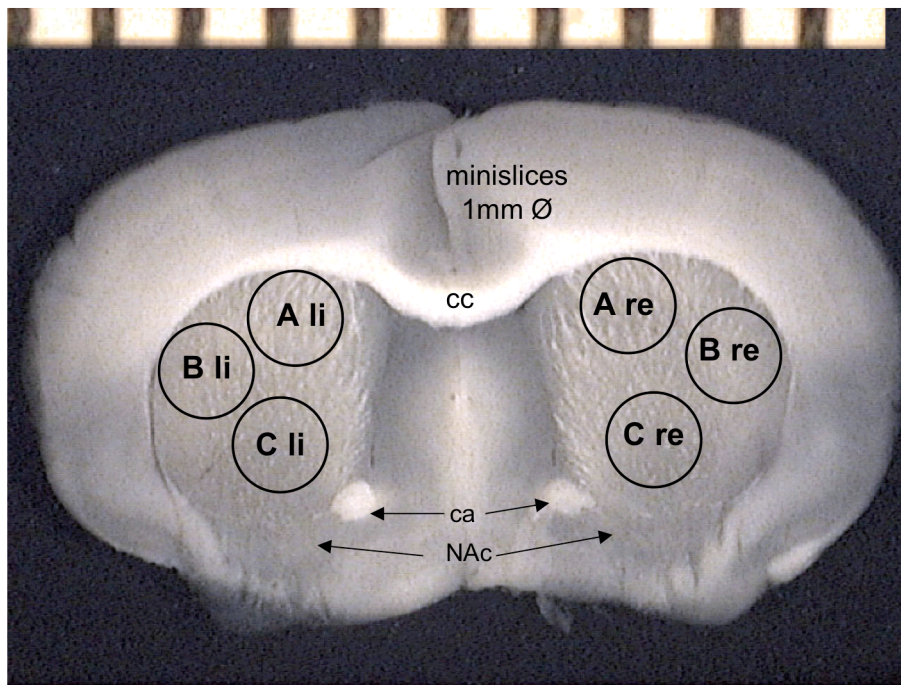
Die [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Gesamtaufnahme durch Nervenendigungen der drei untersuchten Regionen des Putamen nach 30minütiger Inkubation in [<sup>3</sup>H]-Dopamin, zeigte keine signifikanten Unterschiede (dorsomediales caudates Putamen:  $43,40 \pm 3,04$  nCi;  $n = 26$ ; laterales caudates Putamen:  $39,66 \pm 2,72$  nCi;  $n = 25$ ; ventromediales caudates Putamen:  $37,08 \pm 1,66$  nCi;  $n = 27$ ) (Anhang, Tab. 2).

##### **3.2.2. [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung verschiedener Regionen im caudaten Putamen**

In den Kontrollexperimenten bei Wildtyp C57Bl/6-Mäusen wurde eine durchschnittliche NMDA-induzierte [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung von  $1,899 \pm 0,109$  nCi, bei  $n = 86$  gemessen (Anhang, Tab. 1).

Die [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung nach einer Stimulation wurde an drei verschiedenen Regionen in der coronaren Ebene des caudaten Putamen untersucht. Es handelte sich hierbei um runde Ausstanzungen mit einem Durchmesser von 1,0 mm und einer Schnittdicke von 300  $\mu$ m aus dem

caudaten Putamen rostral von Bregma (Bregma +0,9 – Bregma 0,0). Abb. 5 zeigt die verwendeten Regionen aus dem dorsomedialen, dem lateralen und dem ventromedialen caudaten Putamen, die bei 10 Wildtyp C57Bl/6-Mäusen untersucht wurden. Die Dopamin-Ausschüttung nach NMDA 1 mM-Stimulation zeigte signifikante Unterschiede zwischen dem dorsomedialen ( $5,42 \pm 0,48$  % des Tritium-Gehaltes im Gewebe;  $n = 26$ ) dem lateralen ( $4,10 \pm 0,37$  % des Tritium-Gehaltes im Gewebe;  $n = 25$ ) und dem ventromedialen caudaten Putamen ( $11,73 \pm 0,88$



**A li:** dorsomedial links

**B li:** lateral links

**C li:** ventromedial links

**A re:** dorsomedial rechts

**B re:** lateral rechts

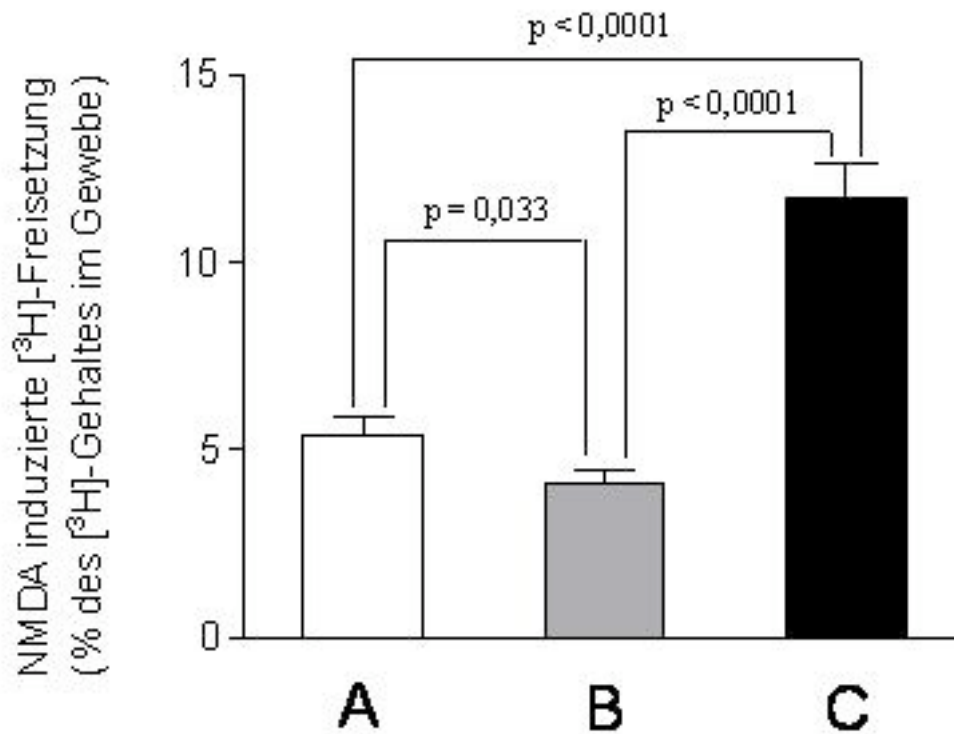
**C re:** ventromedial rechts

**Abb. 5.** Original Hirnschnittpräparat einer C57Bl/6-Maus bei Bregma +0,9. Ausstanzungen mit einem Durchmesser von 1,0 mm aus dem jeweils linken und rechten caudaten Putamen. Maßeinheit am oberen Bildrand in mm. cc: Corpus callosum; NAc: Ncl. accumbens; ca: Commissura anterior

% des Tritium-Gehaltes im Gewebe; n = 27) (Abb. 6; Anhang, Tab. 3A). Im ventromedialen Putamen war die NMDA-induzierte [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung etwa doppelt so hoch wie im dorsomedialen Putamen.

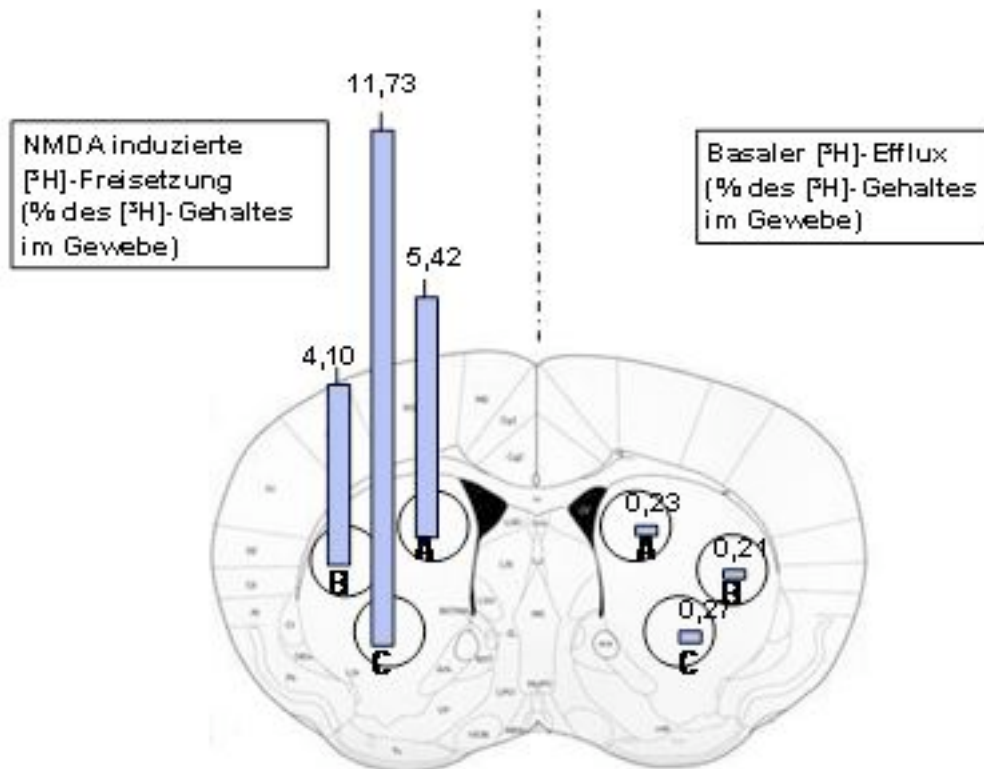
Der basale Tritium-Efflux (Abb. 7, rechte Seite) war in der ventromedialen Region im Vergleich zu der lateralen Region etwas erhöht ( $p < 0,05$ , t-test, n = 25-27). Die dorsomediale und laterale sowie die dorsomediale und ventromediale Putamenregion unterschieden sich dagegen nicht.

Betrachtete man die NMDA-Rezeptor-vermittelte Tritium-Freisetzung rechts und links separat, fallen etwas höhere Dopaminfreisetzungsraten in allen Regionen des rechten caudaten Putamens auf (Dorsomedial links:  $4,87 \pm 0,74$  % des Tritium-Gehaltes im Gewebe; n = 12; rechts:  $5,89 \pm 0,61$  % des Tritium-Gehaltes im Gewebe; n = 14;  $p = 0,295$ . Lateral links:  $3,80 \pm 0,38$  % des Tritium-Gehaltes im Gewebe; n = 11; rechts:  $4,34 \pm 0,59$  % des Tritium-Gehaltes im Gewebe; n = 14;  $p = 0,474$ . Ventromedial links:  $10,54 \pm 0,89$  % des Tritium-Gehaltes im Gewebe; n = 13; rechts:  $12,83 \pm 1,44$  % des Tritiumgehaltes im Gewebe; n = 14;  $p = 0,197$ ; Anhang, Tab. 3B).



**Abb. 6:** NMDA (1 mM) induzierte [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung in Minislices der verschiedenen Putamenregionen A, B und C von C57Bl/6 -Mäusen, die mit einer Mg<sup>2+</sup>-freien Lösung superfundiert wurden. NMDA (1 mM) wurde ab der 40. min für 2 min zur Superfusionslösung gegeben. Prozentualer Anteil des freigesetzten [<sup>3</sup>H]-Dopamin am Gesamt-[<sup>3</sup>H]-Dopamin-Gehalt im Gewebe des jeweiligen Minislices.

Mittelwert ± SEM aus n = 25-27.

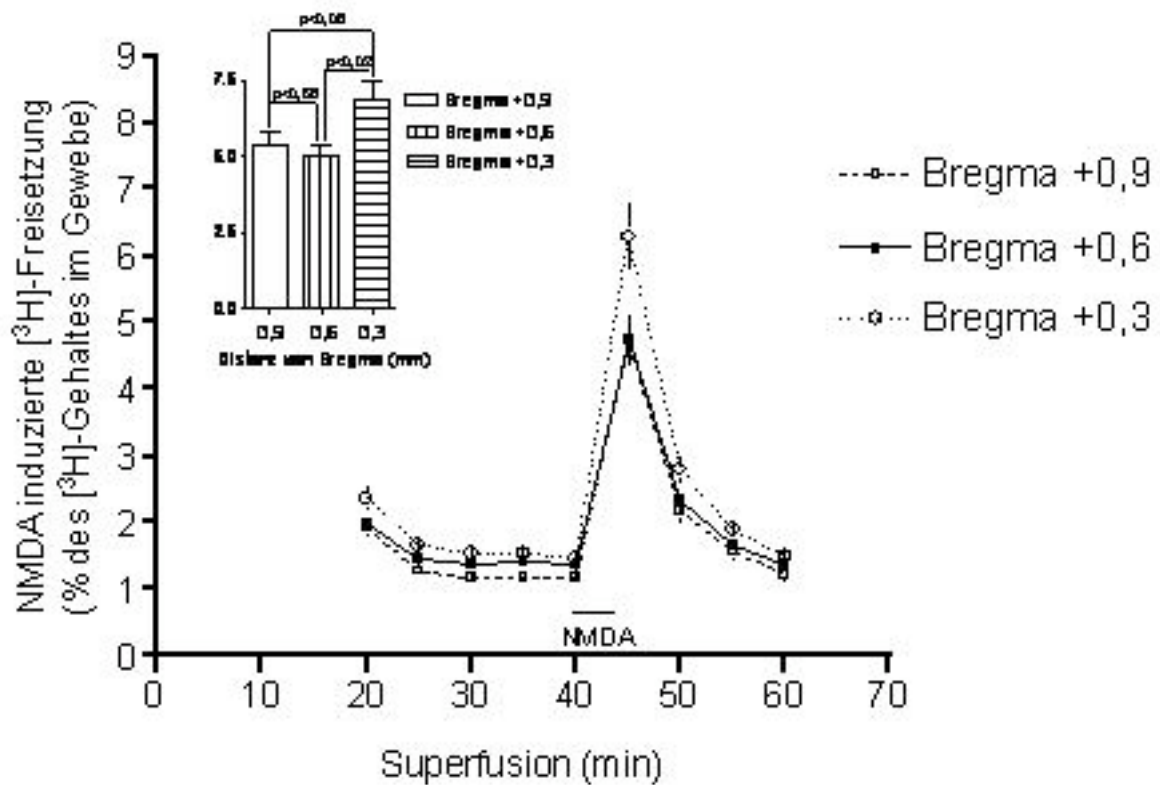


**Abb. 7:** Regionale Zuordnung der NMDA-(1 mM) induzierten  $[^3\text{H}]$ -Dopamin-Freisetzung in Minislices aus dem dorsomedialen (A), lateralen (B) und ventromedialen (C) caudaten Putamen von C57BL/6-Mäusen (links) und des jeweiligen basalen  $[^3\text{H}]$ -Dopamin-Efflux (rechts). Die linke Seite der Grafik zeigt die gleichen Daten wie Abb. 7. NMDA (1 mM) wurde ab der 40. min für 2 min zu der  $\text{Mg}^{2+}$ -freien Superfusionslösung gegeben. Mittelwert  $\pm$  SEM aus  $n = 25-27$  in den Ebenen Bregma +0,9, +0,6, +0,3mm. Darstellung der Daten aus Abb. 6, morphologisch zugeordnet.

Die NMDA-induzierte [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung wurde nicht nur an den 3 Positionen dorsomedial (A), lateral (B) und ventromedial (C) innerhalb einer coronaren Schnittebene, sondern auch in verschiedenen Schnittebenen des Putamens von C57Bl/6-Mäusen untersucht. Drei verschiedene Ebenen im Abstand von 300 µm wurden im Putamen betrachtet. Die Ebenen lagen bei Bregma +0,9, +0,6 und +0,3 (Abb. 9). Hierzu wurden aus jeder Ebene die Mittelwerte der Freisetzungsergebnisse der Minislices A, B und C (Abb. 5) beider Hemisphären ermittelt.

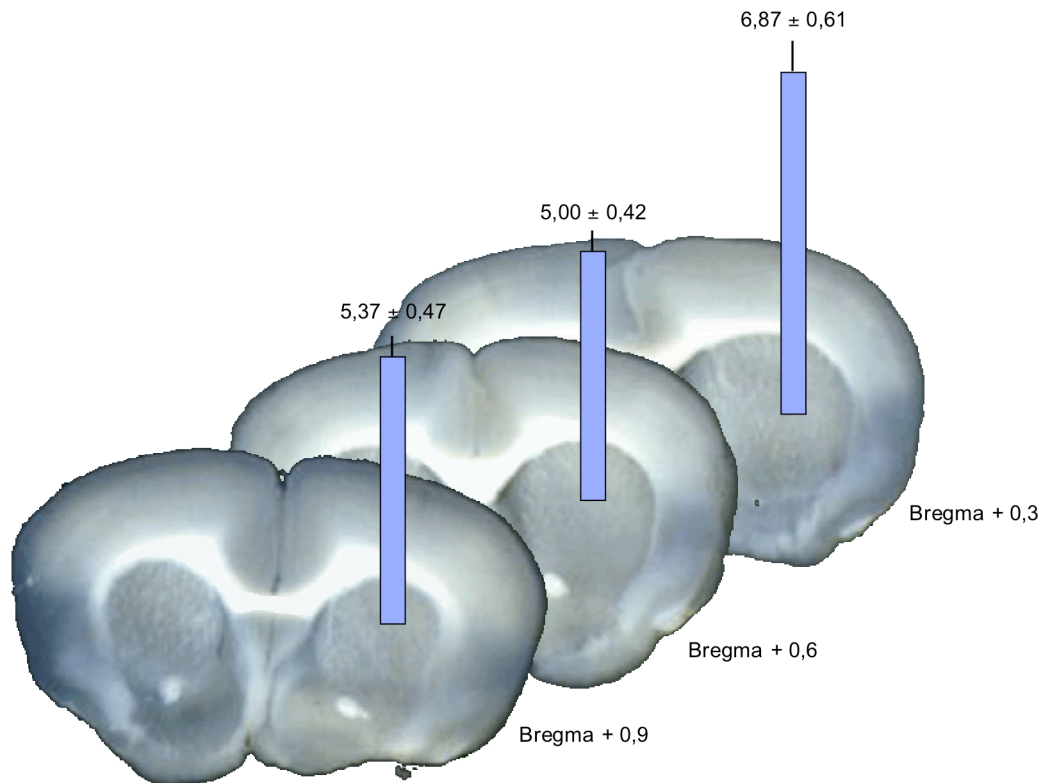
Die NMDA-induzierte [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung bei Bregma +0,9 ( $5,37 \pm 0,47$  % des Tritium-Gehaltes im Gewebe; n = 27) und Bregma +0,6 ( $5,00 \pm 0,42$  % des Tritium-Gehaltes im Gewebe; n = 30) nach einer zweiminütigen NMDA-Rezeptor vermittelten Stimulation war nahezu identisch (p = 0,563). Weiter caudal bei Bregma +0,3 war jedoch eine höhere fraktionelle Ausschüttung zu erkennen ( $6,87 \pm 0,61$  % des Tritium-Gehaltes im Gewebe; n = 26; p = 0,013 vs Bregma 0,6 und p = 0,055 vs. Bregma 0,9). (Abb. 8; Anhang, Tab. 4).





**Abb. 8:** Fraktionelle Darstellung der  $[^3\text{H}]$ -Dopamin-Freisetzung mit NMDA-Rezeptor Stimulation im caudaten Putamen in verschiedenen Distanzen von Bregma bei C57Bl/6-Mäusen, die  $\text{Mg}^{2+}$ -frei superfundiert wurden. NMDA 1 mM wurde ab der 40. min für 2 min zur Superfusionslösung gegeben.

*Einschub links oben:* Gesamt- $[^3\text{H}]$ -Dopamin-Freisetzung während der Stimulationsperiode und der folgenden 10 min nach Abzug des basalen Efflux (area under the curve).



**Abb. 9:** [ $^3\text{H}$ ]-Dopamin-Freisetzung mit NMDA-Rezeptor Stimulation im caudaten Putamen in verschiedenen Distanzen von Bregma bei C57Bl/6-Mäusen, die  $\text{Mg}^{2+}$ -frei superfundiert wurden. NMDA 1 mM wurde ab der 40. min für 2 min zur Superfusionslösung gegeben.

Darstellung der drei Bregma-Abschnitte mit einer jeweiligen Schichthöhe von 300  $\mu\text{m}$ . Die Balken zeigen die Gesamt- $^3\text{H}$ -Dopamin-Freisetzung durch die Stimulation nach Abzug des basalen Efflux; gezeigt ist der Mittelwert aus jeweils 3 Regionen A, B und C (Abb. 5) der beiden Hemisphären. Darstellung der Daten aus Abb. 8, morphologisch zugeordnet.

### 3.3. Modifikation der Actinpolymerisation durch Cytochalasin D oder Gelsolin

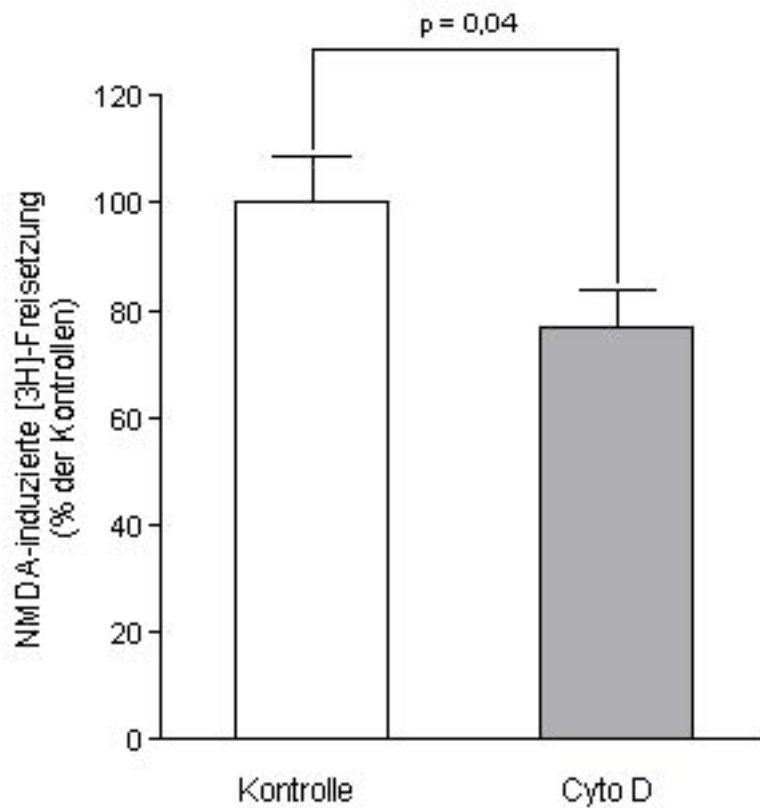
#### 3.3.1. Effekt von Cytochalasin D auf die NMDA-Rezeptor vermittelte [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung bei C57Bl/6-Mäusen

Um die Bedeutung des zellulären Actincytoskeletts bei der exocytotischen Freisetzung in Neuronen des caudaten Putamen zu untersuchen, wurde die Actindepolymerisation zunächst pharmakologisch durch Cytochalasin D beschleunigt und anschließend genetisch durch Gelsolindefizienz verlangsamt. Putamen-Minislices von C57Bl/6-Mäusen wurden vor NMDA-Stimulation mit dem Pilzgift Cytochalasin D inkubiert. Cytochalasin D modifiziert die Dynamik aus ständiger Polymerisation und Depolymerisation von Actinfilamenten, indem es F-Actin zerschneidet und so das Verhältnis zur Depolymerisation (G-Actin) verschiebt.

Die untersuchten Neurone entstammen den Putamenregionen A und B aus Abb. 5 bei Bregma 0,9, Bregma 0,6 und Bregma 0,3. Nach Inkubation mit Cytochalasin D war die NMDA-induzierte [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung vermindert (Abb. 10). Eine durch NMDA 1 mM induzierte Stimulation von zwei min induzierte in der Kontrollgruppe einen Anstieg der [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung ( $6,32 \pm 0,57$  % des Tritium-Gehaltes im Gewebe;  $n = 61$ ), während nach Zugabe von 1  $\mu$ M Cytochalasin D ab der 30. min des Experiments die [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Ausschüttung um 23 % (Abb. 10; Anhang, Tab. 5) geringer war.

Cytochalasin D hatte keinen Effekt auf den basalen Efflux (Kontrollgruppe  $0,074 \text{ nCi} \pm 0,003 \text{ nCi}$ ,  $n = 61$ ; Cytochalasin D  $0,078 \pm 0,004 \text{ nCi}$ ,  $n = 59$ ; Anhang, Tab. 5).

Ebensowenig veränderte es die Dopamin-Aufnahme in die dopaminergen Terminale (Cytochalasin D behandelte Minislices:  $46,89 \text{ nCi} \pm 1,81$ ;  $n = 59$ ; Kontrollgruppe:  $45,28 \text{ nCi} \pm 1,36$ ;  $n = 61$ ; Anhang, Tab. 6).



**Abb. 10:** Einfluß des Pilzgiftes Cytochalasin D auf die NMDA [1 mM]-induzierte Tritium-Freisetzung aus Putamenminislices von C57Bl/6-Mäusen. Das Gewebe wurde mit  $Mg^{2+}$ -freier Lösung superfundiert. Cytochalasin D wurde dem Superfusat von der 30. min bis zum Ende des Experimentes zugefügt. Die Tritium-Freisetzung wurde in Prozent der Tritium-Freisetzung der Kontrollen angegeben. NMDA wurde ab der 40. min für 2 min zum Superfusat gegeben. Mittelwert  $\pm$  SEM aus  $n = 59-61$ .

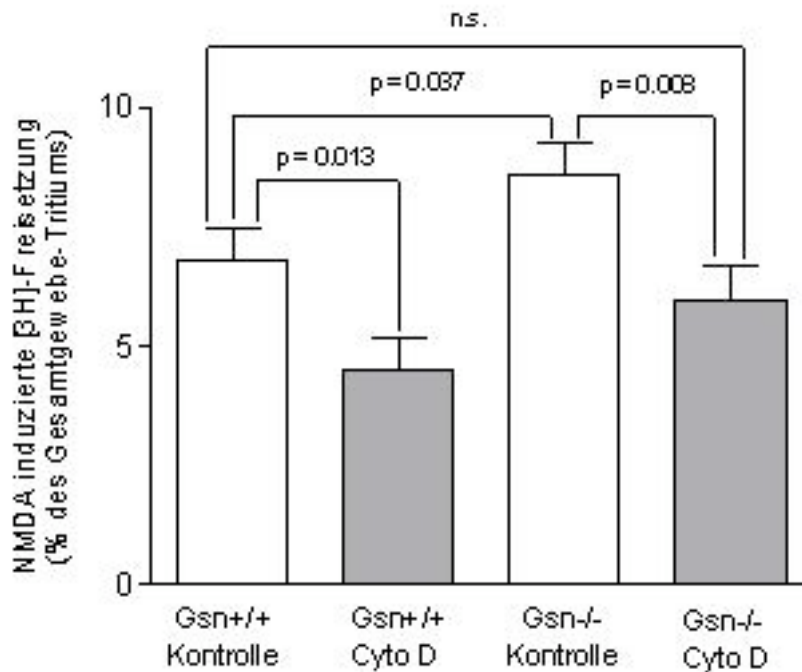
### 3.3.2. Effekt von Gelsolin auf die NMDA-Rezeptor vermittelte [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung

Nach der pharmakologisch durch Cytochalasin D beschleunigten Actindepolymerisation wurde die Actindepolymerisation durch knockout des Gelsolins verlangsamt. An Hirngewebe von Gelsolin knockout Mäusen wurde der Einfluß der Gelsolindefizienz auf die NMDA-induzierte [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung im caudaten Putamen untersucht.

In der Kontrollgruppe war Wildtyp-Gelsolin konstitutiv in den Neuronen exprimiert (Gsn<sup>+/+</sup>), während die Gsn<sup>-/-</sup> Neurone keine Gelsolin-Immunreaktivität aufwiesen. In Gsn<sup>-/-</sup> Minislices war die NMDA-induzierte [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung um 41,4 % höher als in Minislices entsprechender Gsn<sup>+/+</sup> Mäuse (Gsn<sup>+/+</sup> 1,954 ± 0,21 nCi; Gsn<sup>-/-</sup> 2,763 ± 0,276 nCi; p = 0,037 bei n = 21-24). Der basale [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Efflux war in beiden Genotypen gleich (Gsn<sup>+/+</sup> 0,081 ± 0,006 nCi; n = 24; Gsn<sup>-/-</sup> 0,087 ± 0,007 nCi; n = 21).

Im nächsten Schritt wurden slices beider Genotypen in Anwesenheit von Cytochalasin D mit NMDA stimuliert. Cytochalasin D war in der Superfusionslösung ab der 30. min des Experiments enthalten. Sowohl bei Gsn<sup>+/+</sup> als auch bei Gsn<sup>-/-</sup> Neuronen bewirkte dies eine Verminderung der NMDA-induzierten [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung (Gsn<sup>+/+</sup> 1,461 ± 0,224 nCi; Gsn<sup>-/-</sup> 1,861 ± 0,25 nCi bei n = 16-18) (Abb. 11; Anhang, Tab. 7).

Nach Cytochalasin D-Behandlung war die in Gsn<sup>-/-</sup> Minislices beobachtete Erhöhung der NMDA-induzierten [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung nicht mehr erkennbar (Abb. 11; Anhang, Tab.7), sondern lag auf Wildtypniveau.

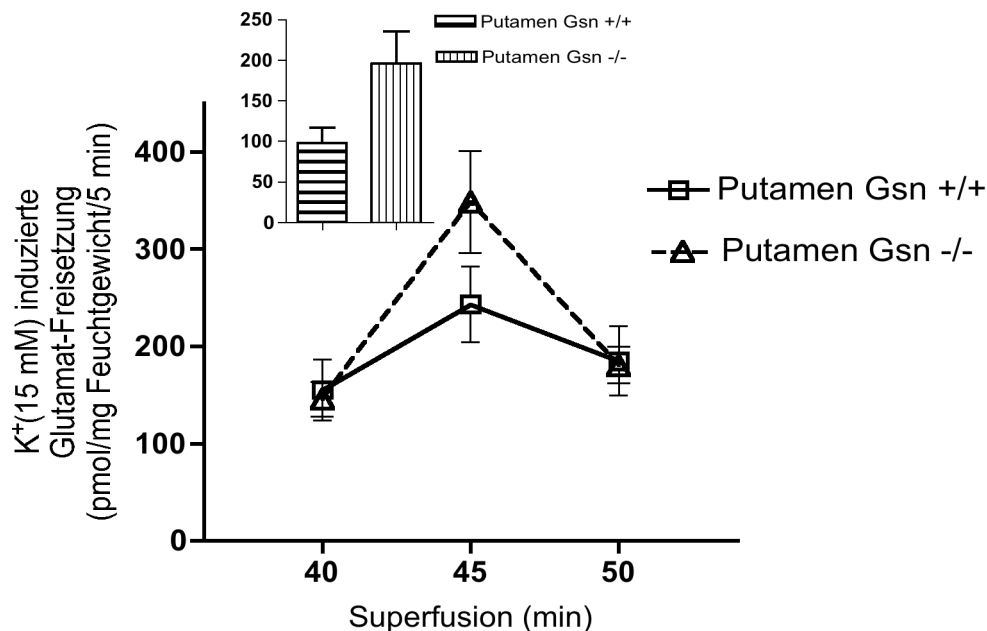


**Abb. 11:** Einfluß von Cytochalasin D (Cyto D) auf die NMDA-induzierte [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung im caudaten Putamen Gelsolin-defizienter Mäuse (Gsn<sup>-/-</sup>) und entsprechender Wildtypmäuse (Gsn<sup>+/+</sup>). Das Hirngewebe wurde mit Mg<sup>2+</sup>-freiem Puffer superfundiert. Cytochalasin D wurde dem Superfusat von der 30. min bis zum Ende des Experiments zugefügt. NMDA [1 mM] wurde dem Superfusat ab der 40. min für 2 min zugegeben. Mittelwert ± SEM aus n = 8 Mäusen. Einseitiger ANOVA und t-Test wurden durchgeführt.

### 3.4. Wirkung von Gelsolin auf die Freisetzung von endogenem Glutamat im caudaten Putamen

Die  $K^+$  (15 mM)-induzierte Freisetzung von endogenem Glutamat im caudaten Putamen wurde ebenfalls an Putamen-Minislices von Gsn<sup>+/+</sup> und Gsn<sup>-/-</sup> Mäusen untersucht.

In den untersuchten Regionen des caudaten Putamen (dorsomedial, ventromedial und lateral; siehe Abb. 5) bei Bregma 0,3-0,0 war die  $K^+$ (15 mM)-induzierte Freisetzung von endogenem Glutamat in Gsn<sup>-/-</sup> Minislices im Vergleich zu Gsn<sup>+/+</sup> Minislices erhöht (Abb.12; Anhang, Tab. 8).



**Abb. 12:** Einfluß von Gelsolin auf die  $K^+$ (15 mM)-induzierte Freisetzung von endogenem Glutamat im caudaten Putamen von Gelsolin-defizienten Mäusen (Gsn<sup>-/-</sup>) versus Wildtyp (Gsn<sup>+/+</sup>). Die untersuchten Minislices stammen aus den Regionen A, B und C (Abb. 5), gezeigt ist der Mittelwert aus 3 Regionen beider Hemisphären. Die Depolarisation wurde durch einen Anstieg der  $K^+$ -Konzentration im Superfusat um 15 mM von der 40.-42 min ausgelöst. Die  $K^+$ -induzierte Freisetzung von endogenem Glutamat ist bezogen auf das Feuchtgewicht der Putamen-Minislices pro 5 min Fraktion dargestellt. *Einschub:* Gesamt-Glutamat-Freisetzung während der Stimulationsperiode und der folgenden 10 min nach Abzug des basalen Efflux (area under the curve).

## 4. DISKUSSION

### 4.1. Versuchsmodell

Für die Analyse der Neurotransmitterfunktion wurde die ursprünglich für das Rattengehirn entwickelte Microdissektionsmethode (Palkovits und Brownstein, 1988) für das Mausgehirn adaptiert. Diese Technik ist ideal geeignet, um definierte Hirnareale oder Kerngebiete als *in vitro* Präparat für die Neurotransmitterfreisetzung als Funktionsanalyse zu gewinnen, um anschließende Genexpressionsanalysen oder auch histologische Untersuchungen am gleichen Gewebe durchführen zu können. Obwohl die Maus aufgrund ihrer geringen Größe für viele Paradigmen schlechter geeignet ist als die Ratte, bietet sie wegen der Verfügbarkeit oder relativ leichten Herstellbarkeit von Mutanten (transgen, knockout, knockin; konstitutiv, zellspezifisch, konditionell) für die Grundlagenforschung unschätzbare Vorteile.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein *in vitro* Mausmodell zur funktionellen Analyse der Neurotransmitterfreisetzung im Striatum etabliert und charakterisiert. Mit diesem Modell wurde anschließend der Einfluß von beschleunigter oder verzögerter Actinpolymerisation/-depolymerisation auf die Freisetzung von Glutamat und die durch Glutamat induzierte Freisetzung von Dopamin untersucht.

Die stimulierte Tritium-Freisetzung in mit [<sup>3</sup>H]-Dopamin vorinkubierten Mäusehirnputamen-Minislices kann als [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung betrachtet werden, da [<sup>3</sup>H]-Dopamin kaum metabolisiert wird und den Hauptteil der nach NMDA-Stimulation freigesetzten Tritium-Menge ausmacht. Da die NMDA-Rezeptor induzierte [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung vollständig Ca<sup>2+</sup>-abhängig ist, kann die gemessene Tritium-Menge als exocytotisch freigesetzte Transmittermenge interpretiert werden (Starke et al., 1989). Folglich kann man die NMDA-induzierte Tritium-Freisetzung aus [<sup>3</sup>H]-Dopamin markierten Striatumslices als quasiphysiologische Dopamin-Freisetzung ansehen.

Als Alternative zu der hier verwendeten Superfusionstechnik, die die regionenspezifische Untersuchung der Dopamin-Freisetzung im Putamen gestattet, wäre die *in vivo* Microdialyse oder die cyclische Voltammetrie (Cragg, 2003) denkbar gewesen. Die Microdialyse ermöglicht es, Hirnabschnitte stereotaktisch zielgenau zu positionieren. Ein Problem besteht jedoch in den



läsionsbedingten Artefakten, die von der Sonde erzeugt werden. Ein weiterer Nachteil besteht im Falle von Schadensmodellen wie z.B. einem Hirninfarktmodell darin, daß man das Ausmaß des Schadens nicht sicher vorhersagen kann und deshalb nicht genau zuordnen kann, ob die platzierte Sonde z.B. in Core oder Penumbra einer Infarktzone steckt. Die Position müßte deshalb im nachhinein histologisch überprüft werden.

Die *in vitro* Superfusion stellt keinen Tierversuch i.S. des Gesetzes dar, die Microdialyse sehr wohl. Umgekehrt erlaubt die Microdialyse sequentielle Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten, während die Superfusion nur Aussagen zu einem bestimmten Zeitpunkt erlaubt. Das *in vitro* Freisetzungsverfahren ist außerordentlich gut reproduzierbar, was sich in einer sehr geringen Standardabweichung niederschlägt und so auch die Untersuchung von 20-30% Differenzen bei 6-8 Gehirnen/Gruppe ermöglicht. Die cyclische Voltammetrie ist in ihren Aussagemöglichkeiten dem Superfusionsverfahren gleichwertig, ist allerdings auf katecholaminerge Transmitter begrenzt.

#### **4.2. NMDA-Rezeptor vermittelte [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung in verschiedenen Regionen des caudaten Putamen**

In den durchgeführten Experimenten wurde die [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung putamaterger Minislices durch die Stimulation präsynaptischer NMDA-Rezeptoren auf den dopaminergen Nervenendigungen ausgelöst. Die Mäusehirnputamen-Minislices wurden in [<sup>3</sup>H]-Dopamin vorinkubiert, bevor die Superfusion erfolgte. Die ersten 17 min der Superfusion dienten dem Auswaschen von nicht aufgenommenem [<sup>3</sup>H]-Dopamin und der Beseitigung des initial hohen und exponentiell abfallenden basalen Effluxes.

Basierend auf der Erkenntnis, daß das Putamen ein sowohl anatomisches als auch neurochemisch heterogenes Gebilde darstellt (Patel et al., 1992; Iravani und Kruk, 1996), soll eine gut reproduzierbare, regionenspezifische neuronale Funktionsprüfung etabliert werden. Zu diesem Zweck wurden im Bereich Bregma +0,9 bis Bregma 0,0 des caudaten Putamen drei benachbarte Schnittebenen mit jeweils drei Regionen in beiden Hemisphären untersucht. Beim Mäusehirn ist es kaum möglich, Nucleus caudatus und Putamen exakt voneinander getrennt zu untersuchen,

aber die Präparate in dieser Arbeit wurden so ausgestanzt, daß sie mit großer Wahrscheinlichkeit keine Anteile des Nucleus accumbens umfassen.

Die quantitative [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung in verschiedenen Regionen einer coronaren Schnittebene des Putamen weist deutliche Unterschiede auf. Sowohl die in Abb. 6 markierten Bereiche A (dorsomediales Putamen) und B (laterales Putamen) als auch die Bereiche A und C (ventromediales Putamen) und B und C unterscheiden sich jeweils signifikant in ihrer Freisetzung (Abb. 6 + 7). Im ventromedialen Putamenbereich (Bereich C) liegt die [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung im Vergleich zu den anderen Bereichen (A + B) mehr als doppelt so hoch. Der dorsomediale Bereich (A) weist eine um ungefähr ein Drittel höhere Freisetzung als der laterale Bereich (B) des Putamen auf. Aber es fanden sich nicht nur in der coronaren Ebene unterschiedliche NMDA-induzierte [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzungen, sondern auch ein rostro-caudaler Gradient mit Zunahme der [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung nach caudal im caudaten Putamen (Abb. 8 + 9).

Dies könnte durch eine unterschiedliche Dichte dopaminerger Projektionsterminale verursacht werden, wie sie im Rattenhirn gezeigt wurde (Beal und Martin, 1985). Die durch HPLC ermittelte Dopamin-Konzentration war in rostralen Minislices im Durchschnitt höher als in caudalen Gebieten des Putamen. In der coronaren Ebene wurde jedoch keine unterschiedliche Dopamin-Verteilung nachgewiesen. Der basale Efflux ist bei der hier verwendeten Versuchsanordnung in sämtlichen Regionen gleich (Abb. 7), was eher gegen diese Hypothese spricht. Auch die homogene Gesamt-Tritium-Aufnahme in den einzelnen Putamenregionen (keine Abb.) spricht gegen eine inhomogene Verteilung dopaminerger Nervenendigungen bei den hier verwendeten Minislices. Außerdem führten Beal und Martin keine Freisetzungsexperimente durch, sondern bestimmten die Dopamin-Konzentration in den unstimulierten dopaminergen Terminalen der Minislices. Somit sagen ihre Ergebnisse nichts über unterschiedliche freisetzungsmulierende Mechanismen an den dopaminergen Terminalen aus.

Als beeinflussender Faktor kommt die heterogene Verteilung anderer modulierender Transmitter im Putamen in Betracht (Patel et al., 1992). Die ebenso im Putamen freigesetzten Transmitter Glutamat, Acetylcholin und  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) könnten selbstverständlich in regional unterschiedlichem Ausmaß die [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung modulieren.

Der in den Experimenten benutzte Stimulus NMDA, sowie der endogene Neurotransmitter Glutamat sind Agonisten am NMDA-Rezeptor (Nowak et al., 1984). Es ist denkbar, daß die Dichte präsynaptischer oder dendritischer NMDA-Rezeptoren in verschiedenen Regionen des Putamen variiert. Dadurch fiel die Antwort auf den Stimulus durch einen Agonisten am NMDA-

Rezeptor unterschiedlich aus. So wurden bereits regionenspezifische Unterschiede in der NMDA induzierten Dopamin-Freisetzung im Putamen beschrieben. Krebs et al. (1991b) fanden in in vitro Superfusionsexperimenten eine unterschiedliche [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung in verschiedenen striatalen Kompartimenten nach NMDA-Stimulation. Auch gibt es Untersuchungen über den Einfluß von GABA auf die putamaterge Dopamin-Freisetzung. Ein direkter Einfluß von GABA über präsynaptische GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren auf dopaminergen Terminals, sowie die indirekte Modulation über GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren vermindern jeweils die Dopamin-Freisetzung (Smolders et al., 1995). Auch die NMDA-induzierte Dopamin-Freisetzung fällt unter dem Einfluß von GABA geringer aus (Whitehead et al., 2001). Regional heterogene Inhibierung durch GABA könnte so auch zu einer regional unterschiedlichen Dopamin-Freisetzung nach NMDA-Stimulus führen. Acetylcholin als weiterer Transmitter im Putamen ist ebenfalls in der Lage die Dopamin-Freisetzung zu modulieren. Der Neurotransmitter Acetylcholin kann sowohl über muscarinerge als auch über nicotinerge Rezeptoren die Dopamin-Freisetzung im Putamen beeinflussen. Verschiedene Muscarinrezeptor-Subtypen stimulieren oder inhibieren die Dopamin-Freisetzung (De Klippel et al.; 1993). Nicotinrezeptoren stimulieren die Dopamin-Freisetzung direkt und verstärken die NMDA-Rezeptor-induzierte Dopamin-Freisetzung (Kaiser und Wonnacott; 2000). Auch das freigesetzte [<sup>3</sup>H]-Dopamin selbst hemmt über präsynaptische D<sub>2</sub>-Autorezeptoren die weitere Dopamin-Freisetzung (Cragg, 2003; Limberger et al., 1991). Vor allem bei einer Dauerstimulation wurden autorezeptorabhängige Verminderungen der Dopamin-Freisetzung gezeigt, während bei Stimulation mit Einzelimpulsen kein Autorezeptor-Einfluß auf die Dopamin-Freisetzung stattfindet. Es ist aber denkbar, daß die dopaminergen Terminale der untersuchten Regionen unterschiedliche Dichten von D<sub>2</sub>-Autorezeptoren aufweisen (Benoit-Marand et al., 2001; Phillips et al., 2002).

Letztlich könnte die durch Stimulation freigesetzte [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Menge auch durch unterschiedliche Dopamin-Wiederaufnahme in verschiedenen Putamenregionen beeinflusst werden. Eine inhomogene Verteilung von Dopamin-Wiederaufnahmetransportern wurde beschrieben, wobei ein rostro-caudaler, sowie ein latero-medialer Gradient abnehmender Dopamin-Wiederaufnahme besteht (Glynn und Yamamoto, 1989), der genau zu den hier gefundenen Gradienten (Abb. 7 + 8) paßt. Welcher Mechanismus in dem verwendeten Modell welchen Einfluß hat, wurde in dieser Arbeit nicht differenziert.

### 4.3. Wirkung modifizierter Actinpolymerisation auf die Neurotransmitterfreisetzung im caudaten Putamen

#### 4.3.1. Einfluß des Pilzgiftes Cytochalasin D auf die NMDA-Rezeptor vermittelte [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung bei C57Bl/6-Mäusen

Cytochalasin D zerschneidet Actinfilamente (Stevenson und Begg, 1994), hat also ähnliche Effekte wie die physiologische Actindepolymerisation durch z.B. Gelsolin. Es wurde verwendet, um pharmakologisch die Actindepolymerisation zu beschleunigen und das Gleichgewicht zwischen F-Actin und G-Actin zum globulären Actin zu verschieben. In der Konsequenz hat Cytochalasin D ähnliche Effekte wie das endogene Gelsolin, so daß es einen gegensätzlichen Effekt wie Gelsolin-Defizienz haben müßte bzw. den Effekt der Gelsolin-Defizienz zumindest teilweise kompensieren müßte.

Cytochalasin D reduzierte die NMDA-Rezeptor-vermittelte [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Ausschüttung gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 10). Der basale [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Efflux, der unmittelbar vor der Stimulation gemessen wurde und den geringen Transmitteraustritt durch Diffusion und Wiederaufnahmetransporter reflektiert, wurde nicht durch Cytochalasin D beeinträchtigt.

Eine direkte Beeinträchtigung des exocytotischen Freisetzungapparates durch Cytochalasin D würde die reduzierte Freisetzung nicht erklären, da eine Actindepolymerisation durch das Actinschneidende Protein Scinderin in der Freisetzungszone die exocytotische Neurotransmitterfreisetzung fördert (Vitale et al., 1991). Viel eher erklärt die beschleunigte Actindepolymerisation und ihre Wirkung auf plasmalemmale Ca<sup>2+</sup>-Kanäle die herabgesetzte Dopamin-Freisetzung.

Die exocytotische Transmitterfreisetzung nach Depolarisation fällt bei einem reduzierten [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg geringer aus (Fink und Göthert, 1996). Das ansteigende [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> führt durch Inaktivierung von NMDA-Kanälen zu einer Begrenzung des schnellen transmembranären Ca<sup>2+</sup>-Einstrom (Legendre et al., 1993) durch diese Kanäle. Eine Schlüsselposition in diesem selbstlimitierenden Prozeß nimmt das Actincytoskelett ein.

Sowohl NR<sub>1</sub> als auch NR<sub>2</sub> Untereinheiten des NMDA-Rezeptors sind an das Actincytoskelett gekoppelt (Rosenmund und Westbrook, 1993). An Hippocampus-Neuronen hemmt das ansteigende [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> den Strom durch den NMDA-Rezeptor-Kanal innerhalb von Millisekunden,

die sog. Inaktivierung, die noch nicht auf biochemischen Änderungen der Actinkopplung beruht. Daneben bewirkt  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg, daß Actinfilamente, die über ein Kopplungsprotein die Funktion des NMDA-Rezeptors stabilisieren, durch das  $Ca^{2+}$ -aktivierte Gelsolin gespalten werden. Es folgen der relativ langsame rundown des NMDA-Kanals und daraus resultierend die minutenlange Limitierung des  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs (Rosenmund und Westbrook, 1993). Dieses Modell wird von neueren Arbeiten gestützt, die den postsynaptischen Membranbereich (PSD), an dem die rezeptorvermittelte Signalübertragung stattfindet, genauer untersucht haben. Der membranständige NMDA-Rezeptor ist mit seinem C-terminalen Ende über das subplasmalemmale Protein PSD-95 an eine Vielzahl interagierende Proteine gebunden. Cytoplasmatische Untereinheiten des NMDA-Rezeptors verfügen via  $\alpha$ -Actinin und Calmodulin über einen direkten Kontakt zum subplasmalem Actincytoskelett (Scannevin und Huganir, 2000; Sheng und Kim, 2002), so daß die Rezeptoraktivität direkt von dynamischen Polymerisationsvorgängen des Actincytoskeletts abhängt.

Mit Cytochalasin D vorbehandelte Neurone zeigten einen verminderten  $Ca^{2+}$ -Influx durch NMDA-Rezeptorkanäle und einen entsprechend verminderten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg (Rosenmund und Westbrook, 1993). Der bei hippocampalen Neuronen gezeigte Effekt von Cytochalasin D in dem beschriebenen Modell ist auch bei neocorticalen Neuronen dokumentiert (Fink et al., 2002). Bei Cytochalasin D-Vorbehandlung kommt es aufgrund eines verminderten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs zu einer signifikant geringeren NMDA-Rezeptor-vermittelten Noradrenalin-Ausschüttung nach NMDA-Stimulation.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit passen zu dieser Vorstellung. Die Modifikation der Actinpolymerisationsdynamik durch Cytochalasin D resultiert auch im caudaten Putamen von Mäusen in einer verminderten Ausschüttung von Dopamin nach NMDA-Stimulation, d.h. beschleunigte NMDA-Rezeptorkanal-Abkopplung durch beschleunigte F-Actin-Depolymerisation. Dieser Cytochalasin D-Effekt auf die NMDA-Rezeptor-vermittelte Neurotransmitterfreisetzung ist weder regionspezifisch, noch auf einen bestimmten Neurotransmitter beschränkt. Einzig das Ausmaß des Cytochalasin D-Effekts auf die Neurotransmitterfreisetzung variiert zwischen verschiedenen Neuronenpopulationen. Die Noradrenalin-Freisetzung im Neocortex wird um 38 % reduziert (Fink et al., 2002), wohingegen die Dopamin-Freisetzung im Putamen lediglich um 23 % reduziert wird (Abb. 10 dieser Arbeit).

### 4.3.2. Einfluß von Gelsolin auf die NMDA-Rezeptor vermittelte [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung

Als Modell wurde neben der pharmakologischen Beeinflussung durch Cytochalasin D auch die genetische Beeinflussung der Actinpolymerisationsdynamik durch Gelsolin-Defizienz verwendet. Gelsolin moduliert  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig die Actinpolymerisationsdynamik (Endres et al., 1998). Es wurden *Gsn*<sup>-/-</sup> Mäuse und die korrespondierenden Wildtyp-Mäuse (*Gsn*<sup>+/+</sup>) verwendet (Wittke et al., 1995).

Die NMDA-Rezeptor vermittelte Dopamin-Freisetzung beider Gruppen wurde auch unter Cytochalasin D-Einfluß gemessen, um die genetische Modifikation des Actincytoskeletts durch die gegenläufige pharmakologische Modifikation zu kompensieren.

Vergleicht man die NMDA-induzierte Dopamin-Freisetzung der *Gsn*<sup>-/-</sup> Neurone, jeweils mit und ohne Cytochalasin D-Vorbehandlung, mit der entsprechenden Freisetzung der *Gsn*<sup>+/+</sup> Neurone mit und ohne Cytochalasin D-Vorbehandlung, so erkennt man eine annähernd identische prozentuale Reduktion durch Cytochalasin D. Bei *Gsn*<sup>-/-</sup> Neuronen führt die verlangsamte Depolymerisation von Actinfilamenten zu einer höheren Dichte von Actinfilamenten und damit zu einer wahrscheinlicheren und längeren Kopplung von NMDA-Rezeptoren daran, was einen verlängerten und höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx und erhöhte Dopamin-Freisetzung bedeutet. Der fehlende Gelsolin-Effekt läßt sich aber funktionell bei *Gsn*<sup>-/-</sup> Neuronen durch Cytochalasin D ausgleichen, so daß bei *Gsn*<sup>-/-</sup> plus Cytochalasin D der gleiche  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx (nicht gezeigt) und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Dopamin-Freisetzung auftreten wie bei *Gsn*<sup>+/+</sup> unbehandelt (Abb. 11).

Cytochalasin D und Gelsolin weisen einen ähnlichen, aber nicht gleichen, Angriffspunkt und Wirkmechanismus bei der NMDA-Rezeptor-vermittelten Freisetzung von Dopamin auf. Beide hemmen über eine Modifikation der Actinpolymerisation die stimulationsbedingte Überladung der Zellen mit  $\text{Ca}^{2+}$  (Furukawa et al., 1997). In whole-cell patch-clamp Experimenten an kultivierten Hippocampusneuronen wurde demonstriert, daß *Gsn*<sup>-/-</sup> Neurone durch eine Cytochalasin D-Vorbehandlung einen ähnlichen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg nach NMDA-Rezeptor-Stimulation aufwiesen wie *Gsn*<sup>+/+</sup> Neurone ohne Cytochalasin D-Einfluß. Ein stark erhöhter  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg nach NMDA-Rezeptor Stimulation wurde hingegen bei *Gsn*<sup>-/-</sup> Neuronen ohne Cytochalasin D-Vorbehandlung gemessen.

Auch in neocorticalen Synaptosomen ist der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg nach  $\text{K}^+$ -induzierter Depolarisation höher bei *Gsn*<sup>-/-</sup> als bei *Gsn*<sup>+/+</sup> Neuronen (Fink et al., 2002).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen daher das folgende Modell: Gelsolin wird durch die  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahme nach Zellstimulation aktiviert. Dieses führt zu dynamischen Veränderungen des Actincytoskeletts in Richtung Depolymerisation der Actinfilamente, wodurch ein weiterer  $Ca^{2+}$ -Influx durch den NMDA-Kanal oder spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle (VDCC) sistiert. Dadurch wird  $[Ca^{2+}]_i$  stabilisiert (Endres et al., 1998; Harms et al., 2004) und die  $Ca^{2+}$ -abhängige Freisetzung von Neurotransmittern wird limitiert. Das Fehlen von Gelsolin bewirkt unter physiologischen Bedingungen einen erhöhten  $Ca^{2+}$ -Influx nach einer Depolarisation. Dadurch wird die  $Ca^{2+}$ -abhängige exocytotische Dopamin-Freisetzung verstärkt.

#### 4.3.3. Einfluß von Gelsolin auf die $K^+$ (15 mM) vermittelte Glutamat-Freisetzung

Glutamat ist im ZNS der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter. Glutamat spielt nicht nur eine wichtige Rolle bei der physiologischen Neurotransmission, sondern besitzt unter pathophysiologischen Bedingungen wie z.B. einer cerebralen Ischämie auch eine exzitotoxische Wirkung (Tymianski et al., 1993). Ein Übermaß an freigesetztem Glutamat verursacht in den jeweiligen Zielneuronen Zellschädigungen, die durch einen langanhaltenden NMDA-Rezeptor vermittelten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg ausgelöst werden (Furukawa et al., 1997).

Eine Hemmung der Glutamat-Freisetzung erscheint deshalb als möglicher Therapieansatz bei cerebraler Ischämie oder amyotropher Lateralsklerose (ALS). Hill und Brotschie (1999) zeigten z.B., daß die Blockade der überwiegend präsynaptisch lokalisierten P- und Q-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle durch  $\Omega$ -Agatoxin-IVA und  $\Omega$ -Conotoxin-MVIIC die Glutamat-Freisetzung vermindert. Eine Reduktion des einströmenden  $Ca^{2+}$  durch die Substanz Riluzole (Rilutek<sup>®</sup>) inhibiert ebenfalls die  $Ca^{2+}$ -abhängige Glutamat-Freisetzung (Wang et al., 2004) und ist möglicherweise zur Therapie der ALS geeignet (Miller et al., 2001). Allerdings hat Riluzole weitere Effekte, so daß eine Wirkung nicht ausschließlich der  $Ca^{2+}$ -Kanalblockade zugeordnet werden kann. Wegen des bisher geringen klinischen Effektes solcher Neuroprotektion werden viele andere Mechanismen geprüft, so z.B. bei ALS die Erhöhung der Glutamat-Wiederaufnahme durch erhöhte Transporterexpression (Rothstein et al., 2005).

In dieser Arbeit wurde der Effekt von Gelsolin auf die Freisetzung von endogenem Glutamat aus putamatergen Nervenendigungen untersucht. Nach  $K^+$  15 mM-Stimulation zeigten die Neurone Gelsolin-defizienter Mäuse (Gsn<sup>-/-</sup>) eine signifikant höhere Glutamat-Freisetzung als die

Kontrolle (Gsn<sup>+/+</sup>). Eine direkte Beeinflussung des Exocytoseapparates ist dabei unwahrscheinlich, da in einem solchen Fall die Gelsolin-vermittelte Actindepolymerisation zu einer höheren Glutamat-Freisetzung führen müßte (Vitale et al., 1991).

Die Ursache für die erhöhte Glutamat-Freisetzung bei Gsn<sup>-/-</sup> Neuronen liegt höchstwahrscheinlich ebenfalls im stärkeren Ca<sup>2+</sup>-Influx nach Stimulation. Anders als in den Dopamin-Freisetzungsexperimenten wurde hier die Transmitterfreisetzung nicht durch NMDA-Rezeptor-Stimulation induziert, sondern durch direkte Membrandepolarisation durch schnelle Erhöhung der K<sup>+</sup>-Konzentration im Medium. Dieses Verfahren involviert nur spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, die aber ebenso wie NMDA-Rezeptorkanäle an das Actincytoskelett gebunden sind (Fink et al., 2002). Gelsolin reduziert durch seine actinmodulierende Wirkung den Ca<sup>2+</sup>-Influx nicht nur durch NMDA-Rezeptor-Kanäle sondern auch durch spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (VDCC) (Furukawa et al., 1997).

#### **4.4. Physiologische und klinische Relevanz einer Modifikation der Actinpolymerisation im Hinblick auf die Neurotransmitterfreisetzung im caudaten Putamen**

Das hier etablierte Modell ist geeignet zum Testen der Transmitterfreisetzung (als wesentliche neuronale Funktion) im caudaten Putamen der Maus. Damit kann das Ausmaß der Schädigung bestimmter Neurone und / oder bestimmter Gebiete quantifiziert werden; z.B. bei Parkinsonmodellen wie MPP<sup>+</sup> (Moratalla et al., 1992), Ischämie modellen mit Basalganglienbeteiligung (Fink et al., 1998), transgenen Huntingtonmausmodellen wie die R 6/2-Maus (Ona et al., 2000).

Ausgehend von diesen Experimenten könnte das endogene Gelsolin gehemmt werden, um die Freisetzung von Dopamin zu erhöhen. Da dies nicht auf den Transmitter Dopamin beschränkt wäre, sondern auch andere exocytotisch freigesetzte Transmitter wie Glutamat betreffen würde, wäre es zumindest bei M. Parkinson keine sinnvolle therapeutische Maßnahme. Es müßte damit gerechnet werden, daß gleichzeitig vermehrt exzitotoxische Schädigungen von Neuronen auftreten.

Eine therapeutische Strategie könnte umgekehrt darin bestehen, durch pharmakologische Beeinflussung eine Destabilisierung des Actincytoskeletts im Sinne des Gelsolin zu erreichen. Somit würde der Ca<sup>2+</sup>-Influx und die Freisetzung von Glutamat aus den Terminals vermindert.



Die glutamaterge Überaktivität im Putamen könnte infolgedessen reduziert werden. Zelluntergänge durch erhöhte Exzitotoxizität wie bei einigen Formen der ALS könnten möglicherweise vermindert werden.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Störungen von striatalen Neuronen oder von Projektionen auf striatale Neurone führen zu Krankheitsbildern wie z.B. M. Parkinson und Chorea Huntington. Um die Ätiologie und Pathogenese solcher Störungen oder potentielle Therapien zu untersuchen, werden in der Grundlagenforschung seit ca. 10 Jahren genetisch veränderte Mäuse verwendet. Während sich die Morphologie und Genexpression an der Maus gut studieren läßt, ist es kaum möglich die Funktion kleiner Areale oder Neuronenverbände zu analysieren und diese mit der lokalen Genexpression zu korrelieren. An einer Einzelzelle ist das durch patch-clamp / single cell RT-PCR möglich, wird aber einen Schritt weiter bei Transmitterfreisetzung / Proteinexpression schwierig, weil einerseits genügend Gewebe für diese Bestimmungen, andererseits möglichst wenig Gewebe zur Wahrung der regionalen Spezifität vereinbart werden müssen. In dieser Arbeit wurde deshalb eine Technik etabliert, mit der einzelne Striatumregionen der Maus (1,0 x 0,3 mm; Durchmesser x Dicke) in vitro funktionell, d.h. durch Quantifizierung der Dopamin- und Glutamatfreisetzung, aber (am gleichen Präparat) auch molekularbiologisch oder histologisch untersucht werden können, was eine spezifischere Aussage erlaubt als das Homogenat des gesamten Striatums. Als Anwendung der entwickelten Methode wurde die Wirkung von Actincytoskelettveränderungen auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Neurotransmitterfreisetzung im caudaten Putamen der Maus untersucht. Diese Veränderungen wurden pharmakologisch durch das Pilzgift Cytochalasin D ( $\rightarrow$  weniger Actinfilamente) oder genetisch durch knockout des Gelsolins bei Mäusen ( $\rightarrow$  mehr Actinfilamente) erreicht.

Bei allen Dopamin-Freisetzungsexperimenten wurden Maushirnpuramen-Minislices mit [ $^3\text{H}$ ]-Dopamin vorinkubiert und anschließend  $\text{Mg}^{2+}$ -frei superfundiert. Die Stimulation der [ $^3\text{H}$ ]-Dopamin-Freisetzung erfolgte für eine Dauer von 2 min durch den Zusatz von 1 mM NMDA. Die Glutamat-Freisetzung wurde durch 2 min Erhöhung von  $\text{K}^+$  auf 15 mM stimuliert. Die freigesetzte Glutamat-Menge wurde mit Hilfe der High Performance Liquid Chromatography (HPLC) bestimmt.

Die Dopamin-Freisetzung im caudaten Putamen wurde in drei coronaren Schnittebenen rostral von Bregma sowie innerhalb dieser Schnittebenen dorsomedial, lateral und ventromedial untersucht. In den drei coronaren Schnittebenen stieg die durchschnittliche NMDA-induzierte Dopamin-Freisetzung von rostral nach caudal um 37% an. Auch in den drei Regionen innerhalb einer Schnittebene stieg die NMDA-induzierte Dopamin-Freisetzung von dorsolateral nach

ventromedial um 186% an. Die Ursache dieser Gradienten zu finden war nicht Gegenstand der Arbeit. Als Mechanismen kommen unterschiedliche Dichte von D<sub>2</sub>-Autorezeptoren, von NMDA-, GABA-, Muscarin-, Nicotin-Rezeptoren, unterschiedliche Dopamin-Wiederaufnahmeeffizienz oder unterschiedliche Zahl dopaminerger Projektionen in Betracht. Zu den Daten würde sehr gut passen, daß die Expression plasmalemmaler Dopamintransporter mit den gleichen Gradienten abnimmt, wie die NMDA-induzierte Dopamin-Freisetzung zunimmt.

Cytochalasin D führt über die Reduktion der Actinfilamente zu einer reduzierten NMDA-induzierten Dopaminfreisetzung. Die Abwesenheit von Gelsolin (Gsn), das Actinfilamente zerteilt, führt über die Akkumulation von Actinfilamenten schließlich zu einer erhöhten Dopamin-Freisetzung. Dies wurde durch vergleichende Untersuchungen an Striatumpräparaten von Gsn<sup>-/-</sup> und Gsn<sup>+/+</sup> Mäusen gezeigt. Hintergrund dieser Effekte ist, daß NMDA- und spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle an Actinfilamente gekoppelt sind und bei Entkopplung durch Actinfilamentdepolymerisation ihre Leitfähigkeit weitgehend verlieren.

Mit der etablierten Microdissektionstechnik am Mausgehirn und in vitro Transmitterfreisetzung können also gezielt und reproduzierbar ca. 0,25 mm<sup>3</sup> große Regionen im Striatum der Maus funktionell auf ihre Dopamin- und Glutamatfreisetzung untersucht werden, wobei das Hirngewebe anschließend immer noch für molekularbiologische Zwecke zur Verfügung steht. Das Verfahren gestattet auch die Gewebeanalyse lokal begrenzter Schadensparadigmen wie fokaler Hirninfarktmodelle oder intrastriataler Toxininjektionen.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- Aunis D, Bader MF. The cytoskeleton as a barrier to exocytosis in secretory cells. *J Exp Biol* 1988; 139 :253-266
- Beal MF, Martin JB. Topographical dopamine and serotonin distribution and turnover in rat striatum. *Brain Research* 1985; 358: 10-15
- Benoit-Marand M, Borrelli E, Gonon F. Inhibition of dopamine release via presynaptic D2 receptors: Time course and functional characteristics in vivo. *J Neurosci* 2001; 21: 9134-9141
- Bolam JP, Hanley JJ, Booth PA, Bevan MD. Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat* 2000; 196: 527-542
- Burgoyne RD. Secretory vesicle-associated proteins and their role in exocytosis. *Annu Rev Physiol* 1990; 52: 647-659
- Carpenter MB. *The Central Nervous System: structure and function*. Oxford University Press, New York, 1991
- Cooper JA. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* 1987; 105: 1473-1478
- Cragg SJ. Variable dopamine release probability and short-term plasticity between functional domains of the primate striatum. *J Neurosci* 2003; 15: 4378-4385
- Crossman AR. Functional anatomy of movement disorders. *J Anat* 2000; 196: 519-525
- Endres M, Fink KB, Zhu J, Stagliano NE, Bondada V, Geddes JW, Azuma T, Mattson MP, Kwiatkowski DJ, Moskowitz MA. Neuroprotective effects of gelsolin during murine stroke. *J Clin Invest* 1998; 103: 347-354

- Feuerstein TJ, Jurna I. Pharmakotherapie des Morbus Parkinson. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K, Hrsg.. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Heidelberg-Berlin-Oxford: Spektrum Akademischer Verlag, 1998: 279-284
- Fink K, Göthert M. Both ethanol and ifenprodil inhibit NMDA-evoked release of various neurotransmitters at different, yet proportional potency: potential relation to NMDA receptor subunit composition. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1996; 354: 312-319
- Fink K, Zhu J, Namura S, Shimizu-Sasamata M, Endres M, Ma J, Dalkara T, Yuan J, Moskowitz MA. Prolonged therapeutic window for ischemic brain damage caused by delayed caspaseactivation. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18: 1071-1076
- Fink KB, Andrews LJ, Butler WE, Ona VO, Li M, Bogdanov M, Endres M, Khan SQ, Namura S, Stieg PE, Beal MF, Moskowitz MA, Yuan J, Friedlander RM. Reduction of post-traumatic brain injury and free radical production by inhibition of the caspase-1 cascade. *Neuroscience* 1999; 94: 1213-1218
- Fink KB, Paehr M, Djoufack PC, Weissbrich C, Bösel J, Endres M. Effects of cytoskeletal modifications on  $Ca^{2+}$  influx after cerebral ischemia. *Amino Acids* 2002; 23: 325-329
- Franklin K, Paxinos G. The mouse brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press, 1997
- Furukawa K, Fu W, Li Y, Witke W, Kwiatkowski DJ, Mattson MP. The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and nmda receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. *J Neurosci* 1997; 17: 8178-8186
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ Jr, Sibley DR. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 1990; 250: 1429-1432

- Giorgiueff MF, Le Floch ML, Glowinski J, Besson MJ. Involvement of cholinergic presynaptic receptors of nicotinic and muscarinic types in the control of the spontaneous release of dopamine from striatal dopaminergic terminals in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1977; 200: 535-544
- Glynn GE, Yamamoto BK. In vivo neurochemical and anatomical heterogeneity of the dopamine uptake system in the rat caudate putamen. *Brain Res* 1989; 481: 235-241
- Gremm D, Wegner W. Gelsolin as a calcium-regulated actin filament-capping protein. *Eur J Biochem* 2000; 267: 4339-4345
- Harms C, Bosel J, Lautenschlager M, Harms U, Braun JS, Hortnagl H, Dirnagl U, Kwiatkowski DJ, Fink K, Endres M. Neuronal gelsolin prevents apoptosis by enhancing actin depolymerization. *Mol Cell Neurosci* 2004; 25: 69-82
- Hartwig JH, Stossel TP. Cytochalasin B and the structure of actin gels. *J Mol Biol* 1979; 134: 539-553
- Hill MP, Brotschie JM. Control of glutamate release by calcium channels and kappa-opioid receptors in rodent and primate striatum. *Br J Pharmacol* 1999; 127: 275-283
- Iravani MM, Kruk ZL. Real-time effects of N-methyl-D-aspartic acid on dopamine release in slices of rat caudate putamen: a study using fast cyclic voltammetry. *J Neurochem* 1996; 66: 1076-1085
- Janmey PA, Chaponnier C, Lind SE, Zaner KS, Stossel TP, Yin HL. Interactions of gelsolin and gelsolin-actin complexes with actin. Effects of calcium on actin nucleation, filament severing, and end blocking. *Biochemistry* 1985; 24: 3714-3723
- Janmey PA, Stossel TP. Modulation of gelsolin function by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Nature* 1987; 325: 362-364

- Janmey PA, Iida K, Yin HL, Stossel TP. Phosphoinositide micelles and polyphosphoinositide-containing vesicles dissociate endogenous gelsolin-actin complexes and promote actin assembly from the fast-growing end of actin filaments blocked by gelsolin. *J Biol Chem* 1987; 262: 12228-12236
- Johnson WG. Late-onset neurodegenerative disease—the role of protein insolubility. *J Anat* 2000; 196: 609-616
- Kaiser S, Wonnacott S.  $\alpha$ -Bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors indirectly modulate [3H]dopamine release in rat striatal slices via glutamate release. *Mol Pharmacol* 2000; 58: 312-318
- De Klippel N, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. Effect of M1- and M2-muscarinic drugs on striatal dopamine release and metabolism: an in vivo microdialysis study comparing normal and 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Brain Res* 1993; 630: 57-64
- Kinosian HJ, Newman J, Lincoln B, Selden LA, Gershman LC, Estes JE.  $Ca^{2+}$  regulation of gelsolin activity: binding and severing of F-actin. *Biophys J* 1998; 75: 3101-3109
- Krebs MO, Desce JM, Kemel ML, Gauchy C, Godeheu G, Cheramy A, Glowinski J. Glutamatergic control of dopamine release in the rat striatum: Evidence for presynaptic N-Methyl-D-Aspartate receptors on dopaminergic nerve terminals. *J Neurochem* 1991; 56: 81-85
- Krebs MO, Trovero F, Desban M, Gauchy C, Glowinski J, Kemel ML. Distinct presynaptic regulation of dopamine release through NMDA receptors in striosome- and matrix-enriched areas of the rat striatum. *J Neurosci* 1991; 11: 1256-1262
- Lamb JA, Allen PG, Thuan BY, Janmey PA. Modulation of gelsolin function. *J Biol Chem* 1993; 268: 8999-9004

- Legendre P, Rosenmund C, Westbrook GL. Inactivation of NMDA channels in cultured hippocampal neurons by intracellular calcium. *J Neurosci* 1993; 13: 674-684
- Limberger N, Trout SJ, Kruk ZL, Starke K. „Real time“ measurement of endogenous dopamine release during short trains of pulses in slices of rat neostriatum and nucleus accumbens: role of autoinhibition. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1991; 344: 623-629
- Marti M, Mela F, Bianchi C, Beani L, Morari M. Striatal dopamine-NMDA receptor interactions in the modulation of glutamate release in the substantia nigra pars reticulata in vivo: opposite role of D1 and D2 receptors. *J Neurochem* 2002; 83: 635-644
- Miller RG, Mitchell, JD Moore DH. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. In : *The Cochrane Library*, Issue 3, 2001. Oxford.
- Morari M, Marti M, Sbrenna S, Fuxe K, Bianchi C, Beani L. Reciprocal dopamine-glutamate modulation of release in the basal ganglia. *Neurochem Int* 1998; 33: 383-397
- Moratalla R, Quinn B, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW, Graybiel AM. Differential vulnerability of primate caudate-putamen and striosome-matrix dopamine systems to the neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurobiol* 1992; 89: 3859-3863
- Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 1984; 307: 462-465
- Ona VO, Li M, Vonsattel JP, Andrews LJ, Khan SQ, Chung WM, Frey AS, Menon AS, Li XY, Stieg PE, Yuan J, Penney JB, Young AB, Cha JH, Friedlander RM. Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. *Nature* 1999; 399: 263-267



- Palkovits M, Brownstein MJ. Maps and guides to microdissection. New York, Amsterdam, London: Elsevier Science Publishing Co.,Inc., 1988
- Patel J, Trout SJ, Kruk ZL. Regional differences in evoked dopamine efflux in brain slices of rat anterior and posterior caudate putamen. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1992; 346: 267-276
- Phillips PE, Hancock PJ, Stamford JA. Time window of autoreceptor-mediated inhibition of limbic and striatal dopamine release. *Synapse* 2002; 44: 15-22
- Pollack AE. Anatomy, physiology, and pharmacology of the basal ganglia. *Neurol Clin* 2001; 19: 523-534
- Roberts PJ, Sharif NA. Effects of l-glutamate and related amino acids upon the release of [3H]dopamine from rat striatal slices. *Brain Res* 1978; 157: 391-395
- Rosenmund C, Westbrook GL. Calcium-induced actin depolymerization reduces NMDA channel activity. *Neuron* 1993; 10: 805-814
- Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, Jin L, Dykes Hoberg M, Vidensky S, Chung DS, Toan SV, Bruijn LI, Su ZZ, Gupta P, Fisher PB. Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 2005; 433: 73-77
- Sattler R, Xiong Z, Lu WY, MacDonald JF, Tymianski M. Distinct roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in excitotoxicity. *J Neurosci* 2000; 20: 22-33
- Scannevin RH, Huganir RL. Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. *Nature Rev Neurosci* 2000; 1: 133-141
- Sheng M, Kim MJ. Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science* 2002; 298: 776-780

- Smeets WJ, Marin O, Gonzalez A. Evolution of the basal ganglia: new perspectives through a comparative approach. *J Anat* 2000; 196: 501-517
- Smith SJ, Augustine GJ. Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release. *Trends Neurosci* 1988; 11: 458-464
- Smolders I, De Klippel N, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. Tonic GABA-ergic modulation of striatal dopamine release studied by in vivo microdialysis in the freely moving rat. *Eur J Pharmacol* 1995; 284: 83-91
- Saka E, Iadarola M, Fitzgerald DJ, Graybiel AM. Local circuit neurons in the striatum regulate neural and behavioral responses to dopaminergic stimulation. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99: 9004-9009
- Starke K, Göthert M, Kilbinger H. Modulation of neurotransmitter release by presynaptic autoreceptors. *Physiol Rev* 1989; 69: 844-989
- Stevenson BR, Begg DA. Concentration-dependent effects of cytochalasin D on tight junctions and actin filaments in MDCK epithelial cells. *J Cell Sci* 1994; 107: 367-375
- Südhof TC. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 2004; 27: 509-547
- Trifaro JM, Rodriguez del Castillo A, Vitale ML. Dynamic changes in chromaffin cell cytoskeleton as prelude to exocytosis. *Mol Neurobiol* 1992; 6: 339-358
- Tymianski M, Charlton MP, Carlen PL, Tator CH. Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. *J Neurosci* 1993; 13: 2085-2104
- Vitale ML, Rodriguez Del Castillo A, Tchakarov L, Trifaro JM. Cortical filamentous actin disassembly and scinderin redistribution during chromaffin cell stimulation precede exocytosis, a phenomenon not exhibited by gelsolin. *J Cell Biol* 1991; 113: 1057-1067

- Wang SJ, Wang KY, Wang WC. Mechanisms underlying the riluzole inhibition of glutamate release from rat cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes). *Neuroscience* 2004; 125: 191-201
- Wegner A, Aktories K, Ditsch A, Just I, Schoepper B, Selve N, Wille M. Actin-gelsolin interaction. *Adv Exp Med Biol* 1994; 358: 97-104
- Whitehead KJ, Rose S, Jenner P. Involvement of intrinsic cholinergic and GABAergic innervation in the effect of NMDA on striatal dopamine efflux and metabolism as assessed by microdialysis studies in freely moving rats. *Eur J Neurosci* 2001; 14: 851-860
- Witke W, Sharpe AH, Hartwig JH, Azuma T, Stossel TP, Kwiatkowski DJ. Hemostatic, inflammatory and fibroblast responses are blunted in mice lacking gelsolin. *Cell* 1995; 81: 41-51
- Yamamoto BK, Davy S. Dopaminergic modulation of glutamate release in striatum as measured by microdialysis. *J Neurochem* 1992; 58: 1736-1742

## 7. DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater Prof. Dr. med. K. Fink danke ich für die Überlassung des Themas, seine ständige Hilfsbereitschaft, exzellente Betreuung und Beratung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Darüberhinaus danke ich allen Mitarbeitern des Institutes für Pharmakologie für die freundliche Aufnahme und kollegiale Zusammenarbeit.

Für die technische Unterstützung bei den Laborarbeiten möchte ich zudem Frau H. Burisch besonders danken.

Herzlich bedanken möchte ich mich vor allem bei meiner Frau Stefanie für ihre konstruktiven Anregungen, motivierenden Worte und so Vieles mehr.

## 8. LEBENS LAUF

Vor- und Zuname Carsten Gisbert Weißbrich

Staatsangehörigkeit deutsch

### Schulbildung

1982 – 1986 Grundschule St. Maximin Koblenz-Horchheim  
 1986 – 1988 Privates St. Johannes-Gymnasium Lahnstein  
 1988 – 1989 Costa Mesa High School, Costa Mesa, Kalifornien; USA  
 1989 – 1996 Privates St. Johannes-Gymnasium Lahnstein  
 Juni 1996 Erlangen der allgemeinen Hochschulreife

### Wehrdienst

Juli 1996 Eintritt i.d. Bundeswehr als ROA (Reserveoffizieranwärter SaZ 2)  
 Januar 1998 Laufbahnwechsel zum SanOA (Sanitätsoffizieranwärter SaZ 17)

### Hochschulausbildung

April 1998 – Mai 2004 Studium der Humanmedizin an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
 Februar 2002 – April 2002 Auslandsfamulatur: Department of Anaesthesiology, University of California (UCSF), San Francisco; USA  
 Aug 2003 – Dez 2003 Auslandstertial des Praktischen Jahres: Abteilung Anästhesie und Intensivmedizin, Kantonales Spital Walenstadt, Schweiz  
 März 2000 Ärztliche Vorprüfung  
 März 2001 1. Teil der Ärztlichen Prüfung  
 März 2003 2. Teil der Ärztlichen Prüfung  
 Mai 2004 3. Teil der Ärztlichen Prüfung

### Berufliche Ausbildung

seit Mai 2004 Arzt in Weiterbildung: Anästhesie, Notfall- und Intensivmedizin am Bundeswehrzentral Krankenhaus (BwZK) in Koblenz

## 9. ANHANG

- Tabelle 1: [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung und basaler Tritium-Efflux bei C57BL/6
- Tabelle 2: Gesamtaufnahme von [<sup>3</sup>H]-Dopamin bei C57Bl/6 in nCi
- Tabelle 3A: [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung der Putamenregionen A, B und C bei C57Bl/6
- Tabelle 3B: Freisetzungsdaten aus Tab. 3A getrennt nach linker und rechter Hemisphäre
- Tabelle 4: [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung in verschiedenen Distanzen von Bregma bei C57Bl/6
- Tabelle 5: Einfluß von Cyto D auf die [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung bei C57Bl/6
- Tabelle 6: Gesamtaufnahme von [<sup>3</sup>H]-Dopamin bei C57Bl/6 mit und ohne Cyto D
- Tabelle 7: Einfluß von Cyto D auf die [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung bei Gsn<sup>-/-</sup> und Gsn<sup>+/+</sup>
- Tabelle 8: Freisetzung von endogenem Glutamat bei Gsn<sup>-/-</sup> und Gsn<sup>+/+</sup>

Maus ID	NMDA-induzierte [ <sup>3</sup> H]-Freisetzung (nCi)					Basaler [ <sup>3</sup> H]-Efflux (nCi)				
	#1	#2	#3	#4	#5	#1	#2	#3	#4	#5
n=5	0,85	0,38	0,96	2,74	1,52	0,09	0,04	0,10	0,06	0,06
Mäuse	1,67	1,95	1,09	2,17	1,03	0,11	0,06	0,09	0,06	0,06
C57Bl/6	2,23	2,98	1,10	1,54	3,13	0,18	0,04	0,06	0,04	0,09
	2,17	0,99	2,47	1,93	2,91	0,13	0,05	0,06	0,08	0,08
	0,88	0,91	3,54	1,40	2,08	0,10	0,04	0,04	0,10	0,07
	0,42	0,88	1,15	1,24	1,75	0,04	0,03	0,07	0,07	0,06
	1,70	0,60	1,54	2,41	1,49	0,10	0,04	0,07	0,07	0,07
	1,06	2,53	1,10	1,08	2,00	0,08	0,05	0,05	0,10	0,08
	2,27	2,03	2,21	1,91	1,57	0,06	0,05	0,05	0,07	0,09
	2,57	2,36	1,04	1,78	2,79	0,09	0,05	0,07	0,06	0,07
	2,06	4,13	2,51	1,64	2,68	0,16	0,05	0,06	0,07	0,10
	1,56	1,75	1,37	2,08	5,45	0,09	0,06	0,06	0,11	0,08
	1,76	2,15	1,12	2,86	0,99	0,08	0,05	0,07	0,13	0,09
	1,55	1,69	1,46	1,05		0,11	0,07	0,07	0,08	
	0,76	2,21				0,05	0,08			
	0,80	2,46				0,09	0,06			
	1,40	0,54				0,11	0,02			
	0,93	2,14				0,07	0,04			
	0,77	1,04				0,05	0,04			
	3,11	3,49				0,07	0,11			
	1,52	3,78				0,38	0,07			
	2,51	5,11				0,06	0,06			
		4,78					0,09			
MEAN					1,899					0,077
SEM					0,109					0,005
n					86					86

**Tabelle 1:** NMDA-induzierte [<sup>3</sup>H]-Freisetzung als Surrogatparameter für die [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung und basaler Tritium-Efflux im caudaten Putamen von C57Bl/6-Mäusen. Das Hirngewebe wurde mit Mg<sup>2+</sup>-freiem Puffer superfundiert. NMDA (1 mM) wurde dem Superfusat ab der 40. min für 2 min zugegeben. Mittelwert ± SEM aus n = 86, präpariert aus 5 Mausgehirnen.

		[ <sup>3</sup> H]-Gesamtaufnahme im Gewebe (nCi)		
		<sup>3</sup> H-DA	<sup>3</sup> H-DA	<sup>3</sup> H-DA
		Minislice	Minislice	Minislice
nCi		A	B	C
n=8		63,15	60,02	40,59
Mäuse		49,00	69,64	53,57
C57Bl/6		68,74	27,45	48,68
		54,65	17,27	39,66
		17,09	36,83	22,65
		52,37	40,24	35,97
		43,16	37,38	29,94
		50,63	43,99	36,80
		30,03	33,53	41,64
		30,19	38,54	28,00
		19,04	28,88	29,79
		32,87	42,84	31,91
		63,63	63,16	31,78
		59,91	66,28	40,23
		56,12	39,83	40,25
		74,56	21,72	48,24
		24,78	26,70	56,33
		29,61	26,77	37,13
		26,40	44,17	44,26
		41,07	29,88	39,39
		35,02	50,93	34,81
		49,29	39,68	33,23
		46,58	28,91	41,78
		40,77	37,35	38,21
		33,16	39,50	24,06
		36,69		27,39
				24,74
MEAN		43,40	39,66	37,08
SEM		3,04	2,72	1,66
n		26	25	27
Student-t		A vs. B	B vs. C	A vs. C
		0,364	0,414	0,070

**Tabelle 2:** Gesamtaufnahme von [<sup>3</sup>H]-Dopamin ([<sup>3</sup>H]-DA) in Minislices aus den im Text bezeichneten Putamenregionen A (dorsomedial), B (lateral) und C (ventromedial) von C57Bl/6- Mäusen in nCi. Die Inkubationslösung enthielt 50 nM [<sup>3</sup>H]-DA (spezifische Aktivität: 48,2 Ci/mmol). Mittelwert ± SEM aus n = 25-27, präpariert aus 8 Mausgehirnen.



%	NMDA-induzierte [ <sup>3</sup> H]-Freisetzung (% des [ <sup>3</sup> H]-Gehaltes im Gewebe)			Basaler [ <sup>3</sup> H]-Efflux (% des [ <sup>3</sup> H]-Gehaltes im Gewebe)		
	<sup>3</sup> H-DA	<sup>3</sup> H-DA	<sup>3</sup> H-DA	<sup>3</sup> H-DA	<sup>3</sup> H-DA	<sup>3</sup> H-DA
	Minislice	Minislice	Minislice	Minislice	Minislice	Minislice
	A	B	C	A	B	C
n =8	2,46	2,68	4,70	0,25	0,31	0,34
Mäuse	3,58	4,43	7,59	0,24	0,27	0,21
C57Bl/6	3,88	2,85	9,32	0,31	0,17	0,31
	7,03	2,37	10,31	0,41	0,14	0,25
	2,88	4,89	6,09	0,15	0,22	0,23
	2,56	4,12	12,27	0,12	0,20	0,23
	8,05	4,29	11,89	0,23	0,16	0,26
	10,43	2,51	11,26	0,15	0,16	0,25
	4,24	4,24	16,94	0,17	0,21	0,22
	2,34	6,51	10,72	0,22	0,25	0,17
	4,67	2,86	9,73	0,23	0,26	0,18
	6,37	3,23	12,92	0,18	0,23	0,19
	5,76	2,33	13,28	0,43	0,25	0,19
	3,64	3,83	3,49	0,20	0,29	0,24
	5,67	4,22	13,41	0,26	0,32	0,28
	3,78	2,34	5,69	0,26	0,16	0,14
	4,76	4,00	7,95	0,20	0,15	0,20
	3,13	6,40	7,69	0,15	0,21	0,29
	6,69	9,84	13,02	0,16	0,24	0,26
	7,60	3,33	12,27	0,25	0,13	0,33
	10,80	7,54	16,75	0,23	0,13	0,53
	6,18	4,76	19,02	0,25	0,19	0,37
	8,41	3,05	20,51	0,29	0,19	0,24
	4,02	3,76	20,77	0,21	0,16	0,38
	8,43	2,11	16,18	0,22	0,17	0,33
	3,62		11,35	0,28		0,35
			11,57			0,40
MEAN	5,42	4,10	11,73	0,23	0,21	0,27
SEM	0,48	0,37	0,88	0,01	0,01	0,02
n	26	25	27	26	25	27
Student-t	A vs. B	B vs. C	A vs. C			
	0,033	<0,0001	<0,0001			

**Tabelle 3A:** NMDA (1 mM)-induzierte [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung in Minislices der Putamenregionen A, B und C von C57Bl/6 -Mäusen, die mit einer Mg<sup>2+</sup>-freien Lösung superfundiert wurden. NMDA (1 mM) wurde ab der 40. min für 2 min zur Superfusionslösung gegeben. Prozentualer Anteil des freigesetzten [<sup>3</sup>H]-Dopamin am Gesamt-[<sup>3</sup>H]-Dopamin-Gehalt im Gewebe des jeweiligen Minislices.

Mittelwert ± SEM aus n = 25-27; präpariert aus 8 Mausgehirnen aus Schnitten Bregma +0,6 bis Bregma 0,0.

Den Tab. 1, Tab. 4, Tab. 7 und Tab. 8 liegen verschiedene Experimentalserien zugrunde. Die Tab. 2, Tab. 3A und Tab. 3B, sowie Tab. 5 und Tab. 6 beziehen sich jeweils auf dieselbe Experimentalserie.

NMDA-induzierte [ <sup>3</sup> H]-Freisetzung (% des [ <sup>3</sup> H]-Gehaltes im Gewebe)							Basaler [ <sup>3</sup> H]-Efflux (% des [ <sup>3</sup> H]-Gehaltes im Gewebe)					
	links			rechts			links			rechts		
	<sup>3</sup> H-DA Minislice	<sup>3</sup> H-DA Minislice	<sup>3</sup> H-DA Minislice	<sup>3</sup> H-DA Minislice	<sup>3</sup> H-DA Minislice	<sup>3</sup> H-DA Minislice	<sup>3</sup> H-DA Minislice	<sup>3</sup> H-DA Minislice	<sup>3</sup> H-DA Minislice	<sup>3</sup> H-DA Minislice	<sup>3</sup> H-DA Minislice	<sup>3</sup> H-DA Minislice
%	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
n = 8	2,46	2,68	4,70	5,76	3,23	3,49	0,25	0,31	0,34	0,43	0,23	0,24
Mäuse	3,58	4,43	7,59	3,64	2,33	13,41	0,24	0,27	0,21	0,20	0,25	0,28
C57Bl/6	3,88	2,85	9,32	5,67	3,83	5,69	0,31	0,17	0,31	0,26	0,29	0,14
	7,03	2,37	10,31	3,78	4,22	7,95	0,41	0,14	0,25	0,26	0,32	0,20
	2,88	4,89	6,09	4,76	2,34	7,69	0,15	0,22	0,23	0,20	0,16	0,29
	2,56	4,12	12,27	3,13	4,00	13,02	0,12	0,20	0,23	0,15	0,15	0,26
	8,05	4,29	11,89	6,69	6,40	12,27	0,23	0,16	0,26	0,16	0,21	0,33
	10,43	2,51	11,26	7,60	9,84	16,75	0,15	0,16	0,25	0,25	0,24	0,53
	4,24	4,24	16,94	10,80	3,33	19,02	0,17	0,21	0,22	0,23	0,13	0,37
	2,34	6,51	10,72	6,18	7,54	20,51	0,22	0,25	0,17	0,25	0,13	0,24
	4,67	2,86	9,73	8,41	4,76	20,77	0,23	0,26	0,18	0,29	0,19	0,38
	6,37		12,92	4,02	3,05	16,18	0,18		0,19	0,21	0,19	0,33
			13,28	8,43	3,76	11,35			0,19	0,22	0,16	0,35
				3,62	2,11	11,57				0,28	0,17	0,40
MEAN	4,87	3,80	10,54	5,89	4,34	12,83	0,22	0,21	0,23	0,24	0,20	0,31
SEM	0,74	0,38	0,89	0,61	0,59	1,44	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,03
n	12	11	13	14	14	14	12	11	13	14	14	14
Student-t re vs. li	0,295	0,474	0,197									

**Tabelle 3B:** Tab. 3B zeigt die Freisetzungsdaten aus Tab 3A getrennt nach rechter und linker Hemisphäre. Mittelwert ± SEM aus n = 11-14, präpariert aus 8 Mausgehirnen.

%	NMDA-induzierte [ <sup>3</sup> H]-Freisetzung (% des [ <sup>3</sup> H]-Gehaltes im Gewebe)			Basaler Efflux (% des [ <sup>3</sup> H]-Gehaltes im Gewebe)		
	<sup>3</sup> H-DA Bregma	<sup>3</sup> H-DA Bregma	<sup>3</sup> H-DA Bregma	<sup>3</sup> H-DA Bregma	<sup>3</sup> H-DA Bregma	<sup>3</sup> H-DA Bregma
	+0,9	+0,6	+0,3	+0,9	+0,6	+0,3
n = 8	1,17	3,04	4,93	0,18	0,29	0,23
Mäuse	1,39	3,27	11,44	0,15	0,25	0,33
C57Bl/6	6,41	6,71	9,87	0,25	0,26	0,32
	3,73	5,10	14,57	0,22	0,28	0,40
	2,30	2,60	3,49	0,09	0,23	0,27
	2,65	7,56	10,57	0,16	0,22	0,28
	6,52	6,56	3,48	0,19	0,28	0,31
	7,81	2,12	8,39	0,21	0,23	0,42
	9,27	2,80	9,75	0,21	0,27	0,42
	8,30	7,40	3,30	0,22	0,26	0,31
	4,89	3,02	3,53	0,35	0,45	0,25
	4,39	6,46	2,96	0,24	0,28	0,31
	5,14	1,35	7,71	0,14	0,26	0,38
	5,55	6,70	3,47	0,23	0,24	0,18
	5,12	2,37	4,50	0,18	0,25	0,17
	4,64	2,56	5,81	0,22	0,17	0,23
	5,35	11,06	9,11	0,18	0,24	0,22
	8,71	3,13	5,80	0,41	0,46	0,24
	5,90	5,16	5,70	0,17	0,24	0,24
	10,37	4,70	10,94	0,23	0,29	0,32
	2,15	6,16	8,01	0,23	0,35	0,39
	5,58	3,74	7,23	0,27	0,41	0,25
	4,07	5,44	3,69	0,43	0,23	0,28
	4,29	9,51	8,73	0,35	0,27	0,20
	4,37	3,46	5,23	0,22	0,19	0,26
	9,18	7,81	6,30	0,21	0,21	0,29
	5,70	4,08		0,25	0,25	
		5,67			0,24	
		5,42			0,26	
		5,16			0,31	
MEAN	5,37	5,00	6,87	0,23	0,27	0,29
SEM	0,47	0,42	0,61	0,01	0,01	0,01
n	27	30	26	27	30	26
Student-t	0,9 vs. 0,6 0,563	0,6 vs. 0,3 0,013	0,9 vs. 0,3 0,055			

**Tabelle 4:** NMDA (1 mM)-induzierte [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung im caudaten Putamen in verschiedenen Distanzen von Bregma bei C57Bl/6- Mäusen, die mit einer Mg<sup>2+</sup>-freien Lösung superfundiert wurden. NMDA (1 mM) wurde ab der 40. min für 2 min zur Superfusionslösung gegeben. Prozentualer Anteil des freigesetzten [<sup>3</sup>H]-Dopamin am Gesamt-[<sup>3</sup>H]-Dopamin-Gehalt im Gewebe des jeweiligen Minislices. Mittelwert ± SEM aus n = 26-30; präpariert aus 8 Mausgehirnen.

	NMDA-induzierte [ <sup>3</sup> H]-Freisetzung (in nCi und % des [ <sup>3</sup> H]-Gehaltes im Gewebe)								Basaler [ <sup>3</sup> H]-Efflux (in nCi und % des [ <sup>3</sup> H]-Gehaltes im Gewebe)							
	Kontrolle				Cyto D				Kontrolle				Cyto D			
	%		(nCi)		%		(nCi)		%		(nCi)		%		(nCi)	
n=7	6,79	4,84	1,652	0,960	4,69	5,40	1,690	1,018	0,32	0,24	0,079	0,048	0,18	0,37	0,065	0,071
Mäuse	9,22	1,57	1,905	0,405	8,79	10,63	3,548	2,494	0,39	0,35	0,082	0,092	0,27	0,30	0,109	0,071
C57Bl/6	20,43	3,52	4,595	0,801	1,58	1,60	0,476	0,258	0,32	0,33	0,073	0,088	0,19	0,42	0,057	0,069
	20,56	4,33	4,278	1,100	2,20	5,21	0,525	1,771	0,46	0,20	0,098	0,052	0,20	0,27	0,049	0,092
	3,33	10,23	1,224	1,905	9,43	4,29	2,332	1,303	0,22	0,27	0,080	0,051	0,34	0,26	0,086	0,079
	14,85	8,34	4,976	2,110	14,46	2,08	3,223	0,629	0,27	0,20	0,091	0,051	0,22	0,24	0,068	0,072
	8,90	4,79	1,423	1,436	2,74	5,98	0,553	0,636	0,41	0,50	0,067	0,154	0,30	0,64	0,045	0,070
	10,07	11,88	3,874	4,232	6,60	15,32	1,503	3,598	0,23	0,34	0,082	0,123	0,37	0,39	0,086	0,093
	12,45	16,64	2,508	2,692	8,61	2,28	1,435	0,728	0,39	0,43	0,080	0,071	0,47	0,29	0,080	0,094
	4,68	3,62	1,196	1,018	2,14	10,18	0,402	2,990	0,21	0,30	0,054	0,086	0,26	0,59	0,049	0,179
	1,82	5,18	0,573	1,355	1,83	9,81	0,395	1,832	0,23	0,39	0,073	0,104	0,23	0,54	0,050	0,104
	4,64	6,08	1,349	1,979	2,00	5,77	0,436	1,614	0,22	0,04	0,065	0,126	0,19	0,78	0,042	0,227
	11,06	1,95	2,523	0,439	4,79	1,07	1,139	0,239	0,24	0,30	0,055	0,068	0,32	0,17	0,077	0,038
	1,93	3,13	0,038	0,572	3,73	2,91	0,886	1,077	0,21	0,46	0,064	0,086	0,30	0,20	0,072	0,075
	4,50	2,87	1,140	0,834	1,84	4,24	0,394	0,927	0,17	0,18	0,043	0,053	0,15	0,53	0,032	0,119
	5,81	2,96	1,062	0,672	6,68	7,95	1,588	1,689	0,23	0,31	0,045	0,072	0,29	0,36	0,070	0,078
	5,35	7,71	2,264	1,164	9,33	2,53	1,406	0,595	0,18	0,38	0,079	0,058	0,35	0,27	0,054	0,065
	8,71	3,47	1,146	0,797	8,79	5,76	2,818	1,097	0,41	0,18	0,055	0,042	0,29	0,46	0,094	0,090
	5,90	5,16	2,040	1,172	4,10	3,29	1,289	0,911	0,17	0,24	0,060	0,055	0,27	0,49	0,085	0,139
	10,37	4,70	3,191	0,967	1,88	3,10	0,577	0,610	0,23	0,29	0,072	0,061	0,25	0,23	0,077	0,046
	4,69	1,63	1,227	0,360	5,09	1,27	1,240	0,350	0,55	0,36	0,147	0,081	0,27	0,31	0,067	0,085
	5,70	9,11	1,772	1,733	4,24	2,48	1,571	0,757	0,24	0,22	0,076	0,042	0,30	0,36	0,114	0,111
	1,37	5,80	0,367	1,775	14,03	6,48	2,998	1,839	0,24	0,24	0,066	0,074	0,31	0,24	0,068	0,070
	2,15	6,16	0,581	1,958	1,32	5,83	0,502	1,648	0,23	0,35	0,062	0,114	0,18	0,42	0,070	0,123
	5,58	3,74	1,203	1,285	1,87	2,09	0,512	0,690	0,27	0,41	0,059	0,144	0,25	0,15	0,069	0,051
	2,40	5,44	0,616	1,547	1,30	3,41	0,400	0,961	0,20	0,23	0,052	0,067	0,21	0,28	0,064	0,081
	7,23	9,51	2,095	2,696	3,69	4,42	1,230	1,507	0,25	0,27	0,074	0,078	0,19	0,20	0,063	0,070
	7,81	10,94	2,052	2,544	5,80	1,59	1,503	0,448	0,21	0,32	0,055	0,076	0,25	0,24	0,065	0,069
	3,69	8,01	0,968	1,974	1,73	6,46	0,488	1,517	0,28	0,39	0,075	0,099	0,16	0,22	0,046	0,053
	1,60	1,57	0,431	0,520		2,86		0,355	0,14	0,18	0,039	0,061		0,24		0,030
		3,46		0,991						0,19		0,055				
MEAN	6,32		1,611		4,86		1,240		0,29		0,074		0,31		0,078	
SEM	0,57		0,144		0,45		0,115		0,01		0,003		0,02		0,004	
n	61		61		59		59		61		61		59		59	
Student-t					0,040		0,041						0,259		0,526	

**Tabelle 5:** Einfluß von Cytochalasin D (Cyto D) auf die NMDA (1 mM)-induzierte [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung aus Putamenminislices von C57Bl/6-Mäusen. Das Gewebe wurde mit Mg<sup>2+</sup>-freier Lösung superfundiert. Cytochalasin D wurde dem Superfusat von der 30. min bis zum Ende des Experimentes zugegeben. Die Tritium-Freisetzung wurde in Prozent des Tritium-Gehaltes im Gewebe angegeben. NMDA wurde ab der 40. min für 2 min zum Superfusat gegeben. Mittelwert ± SEM aus n = 59-61, präpariert aus 7 Mausgehirnen.

[ <sup>3</sup> H]-Gesamtaufnahme im Gewebe (nCi)				
nCi	<sup>3</sup> H-DA		<sup>3</sup> H-DA	
	Kontrolle		Cyto D	
n=7	36,86	39,25	35,25	50,28
Mäuse	49,03	42,34	42,44	46,39
C57Bl/6	36,28	34,64	31,30	82,20
	45,11	40,00	56,89	22,65
	37,68	56,77	49,32	36,37
	51,21	49,59	45,09	53,80
	63,78	30,42	53,67	55,84
	33,78	36,81	63,18	34,87
	49,95	47,39	27,11	81,64
	37,75	66,63	34,64	44,46
	39,48	44,20	36,01	43,12
	39,88	43,67	25,98	43,06
	63,04	51,13	28,49	51,43
	50,84	39,70	46,80	41,56
	38,08	33,13	50,99	48,70
	44,09	41,20	51,41	27,23
	32,21	27,68	52,41	44,79
	33,49	34,18	31,53	83,88
	33,89	50,61	36,74	47,37
	34,03	49,21	46,58	50,40
	61,70	43,40	52,30	59,85
	28,30	43,22	64,72	48,16
	51,89	50,59	38,94	45,10
	47,59	45,17	45,33	44,63
	54,03	46,04	72,26	54,35
	53,32	44,63	69,64	35,74
	59,88	41,43	40,74	25,67
	66,53	53,63	41,14	46,43
	35,20	74,39	47,84	
	68,00	41,80	46,91	
	42,63		50,96	
MEAN		45,28		46,89
SEM		1,36		1,81
n		61		59
Student-t				0,47

**Tabelle 6:** Gesamtaufnahme von [<sup>3</sup>H]-Dopamin ([<sup>3</sup>H]-DA) der Putamenminislices bei C57Bl/6 Mäusen mit und ohne Cytochalasin D (Cyto D)- Behandlung. Die Inkubationslösung enthielt 50 nM [<sup>3</sup>H]-DA (spezifische Aktivität: 48,2 Ci/mmol). Mittelwert ± SEM aus n = 59-61, präpariert aus 7 Mausgehirnen.

	NMDA-induzierte [ <sup>3</sup> H]-Freisetzung (in nCi und % des [ <sup>3</sup> H]-Gehaltes im Gewebe)								Basaler [ <sup>3</sup> H]-Efflux (in nCi und % des [ <sup>3</sup> H]-Gehaltes im Gewebe)							
	Gsn+/+				Gsn-/-				Gsn+/+				Gsn-/-			
	Kontrolle		Cyto D		Kontrolle		Cyto D		Kontrolle		Cyto D		Kontrolle		Cyto D	
	nCi	%	nCi	%	nCi	%	nCi	%	nCi	%	nCi	%	nCi	%	nCi	%
n=7	0,625	5,08	0,422	4,17	3,729	8,13	0,533	6,27	0,106	0,19	0,086	0,26	0,116	0,15	0,072	0,24
Mäuse	1,044	2,64	0,936	6,05	1,045	11,59	0,953	3,94	0,114	0,22	0,118	0,28	0,102	0,31	0,114	0,31
Gsn+/+	1,889	3,31	0,501	2,00	0,854	9,63	0,858	11,13	0,117	0,31	0,095	0,23	0,040	0,26	0,078	0,25
	3,169	12,09	0,490	2,13	3,033	8,98	2,082	7,56	0,100	0,26	0,111	0,33	0,056	0,23	0,080	0,26
n=7	3,626	6,91	2,389	6,35	0,605	7,93	0,556	11,27	0,123	0,22	0,078	0,27	0,055	0,26	0,062	0,19
Mäuse	1,126	4,02	3,172	5,80	3,128	5,41	0,743	2,64	0,051	0,40	0,108	0,26	0,085	0,25	0,061	0,29
Gsn-/-	1,377	5,34	1,123	1,57	3,247	6,66	2,279	4,20	0,052	0,24	0,071	0,40	0,089	0,18	0,088	0,34
	0,579	6,97	1,933	6,38	3,329	10,12	1,291	2,04	0,049	0,21	0,091	0,38	0,086	0,20	0,103	0,08
	0,742	3,45	0,658	7,89	1,276	7,37	2,801	4,71	0,070	0,29	0,077	0,31	0,099	0,21	0,064	0,19
	2,965	7,98	0,667	7,93	1,948	8,92	2,693	4,60	0,064	0,26	0,105	0,29	0,053	0,21	0,094	0,24
	1,898	11,96	2,009	1,90	2,526	5,58	4,035	6,94	0,061	0,35	0,086	0,38	0,054	0,28	0,068	0,28
	1,170	7,42	2,412	2,25	1,907	9,79	0,764	6,26	0,118	0,21	0,109	0,28	0,055	0,20	0,030	0,29
	1,542	4,91	0,730	1,77	3,705	3,87	1,244	7,55	0,047	0,21	0,061	0,33	0,088	0,28	0,050	0,26
	0,868	10,48	1,286	1,53	2,076	6,11	1,533	11,62	0,074	0,37	0,078	0,34	0,105	0,29	0,081	0,42
	2,297	8,48	2,592	7,42	3,819	14,03	2,408	3,28	0,076	0,51	0,104	0,24	0,078	0,42	0,099	0,43
	3,150	5,78	2,054	7,11	2,151	7,69	2,909	2,88	0,090	0,13	0,076	0,35	0,158	0,19	0,137	0,34
	1,587	7,70			2,202	10,71	2,414	2,90	0,068	0,23			0,106	0,18	0,084	0,26
	2,477	3,17			4,912	16,36	3,398	7,63	0,108	0,23			0,150	0,27	0,125	0,29
	3,395	12,51			3,194	4,02			0,122	0,21			0,080	0,42		
	3,841	2,21			4,412	12,74			0,123	0,37			0,070	0,39		
	1,647	2,78			4,925	4,18			0,042	0,30			0,093	0,40		
	1,892	6,10							0,057	0,38						
	0,885	9,68							0,065	0,30						
	3,113	11,41							0,057	0,38						
Mean	1,954	6,77	1,461	4,52	2,763	8,56	1,861	5,97	0,081	0,28	0,091	0,31	0,087	0,27	0,083	0,28
SEM	0,210	0,67	0,224	0,64	0,276	0,72	0,250	0,72	0,006	0,02	0,004	0,01	0,007	0,02	0,006	0,02
n	24	24	16	16	21	21	18	18	24	24	16	16	21	21	18	18
Student-t	Ctrl++ vs. CytoD--		Ctrl++ vs. CytoD++		Ctrl++ vs. Ctrl--		Ctrl-- vs. CytoD--									
	0,213		0,013		0,037		0,008									

**Tabelle 7:** Einfluß von Cytochalasin D (Cyto D) auf die NMDA-induzierte [<sup>3</sup>H]-Dopamin-Freisetzung im caudaten Putamen Gelsolin-defizienter Mäuse (Gsn-/-) und entsprechender Wildtypmäuse (Gsn+/+). Der Gsn+/+ Wildtyp ist ein gemischter Hintergrund aus SV129 und C57Bl/6, da gelsolindefiziente Mäuse mit reinem C57Bl/6 Hintergrund nicht lebensfähig sind. Das Hirngewebe wurde mit Mg<sup>2+</sup>-freiem Puffer superfundiert. Cytochalasin D wurde dem Superfusat von der 30. min bis zum Ende des Experiments zugefügt. NMDA [1 mM] wurde dem Superfusat ab der 40. min für 2 min zugegeben. Mittelwert ± SEM aus n = 16-24, präpariert aus je 7 Gsn+/+ und Gsn-/- Mausgehirnen.

K <sup>+</sup> (15mM)-induzierte Glutamat-Freisetzung (pmol/mg Feuchtgewicht/5min)									
Gsn+/+					Gsn-/-				
	40 min	45 min	50 min	AUC		40 min	45 min	50 min	AUC
n=4	170,74	205,21	132,56	53,56	n=4	87,49	174,24	116,66	72,16
Mäuse	58,68	143,34	101,68	63,16	Mäuse	181,85	513,55	252,41	296,42
Gsn+/+	48,32	297,23	100,66	222,74	Gsn-/-	96,02	278,60	149,85	155,66
	113,48	206,80	121,96	89,08		325,62	821,42	207,22	555,00
	369,80	524,66	368,46	155,53		132,25	204,41	125,71	75,43
	49,72	119,15	84,21	52,18		256,74	510,64	354,61	204,96
	166,92	237,20	166,92	70,28		153,95	433,66	196,23	258,57
	153,74	303,47	164,72	144,24		74,01	569,84	148,01	458,83
	304,19	288,81	397,53	93,34		98,83	118,60	138,73	116,40
	67,66	108,37	75,06	37,00		109,62	196,09	124,60	78,98
						218,74	305,61	167,40	112,54
						134,75	258,87	200,35	91,31
						61,32	148,01	71,36	81,67
						116,43	209,02	170,21	65,70
						60,76	183,02	99,93	102,68
						239,52	339,41	293,54	72,88
						196,28	841,86	321,06	583,19
						82,99	168,10	112,59	135,85
MEAN	150,32	243,42	171,38	98,11		145,95	348,61	180,58	195,46
SEM	34,91	38,61	36,63	18,53		17,78	52,35	18,67	39,97
n	10	10	10	10		18	18	18	18

**Tabelle 8:** Einfluß von Gelsolin bzw. Gelsolindefizienz auf die K<sup>+</sup>(15mM)-induzierte Freisetzung von endogenem Glutamat im caudaten Putamen Gelsolin-defizienter Mäuse (Gsn-/-) und entsprechender Wildtypmäuse (Gsn+/+). Die Depolarisation wurde durch einen Anstieg der K<sup>+</sup>-Konzentration im Superfusat um 15 mM von der 40.-42. min ausgelöst. Die K<sup>+</sup>-induzierte Freisetzung von endogenem Glutamat ist bezogen auf das Feuchtgewicht der Putamen-Minislices pro 5 min Fraktion dargestellt. Mittelwert ± SEM aus n = 10-18; präpariert aus je 4 Mausgehirnen von Gsn +/+ und Gsn -/- Mäusen. AUC (area under the curve) stellt die Gesamt-Glutamat-Freisetzung während der Stimulationsperiode und der folgenden 10 min nach Abzug des basalen Efflux dar.