

Aus der Klinik und Poliklinik
für Psychiatrie und Psychotherapie
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. (Asunc.) Helmut Beckmann

Signaltransduktion im Gehirn SIV-infizierter Rhesusaffen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Meta Jenuwein
aus Illertissen

Würzburg, November 2004

Referentin: Priv.-Doz. Dr. Eleni Koutsilieri

Koreferent: Prof. Dr. Axel Rethwilm

Dekan: Prof. Dr. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 07.02.2005

Die Promovendin ist Ärztin.

Meinen Eltern

Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen,
dass die Dinge so sind, wie sie sind.

Aristoteles

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Humanes Immundefizienz-Virus (HIV)	3
1.1.1 Eigenschaften des HIV	3
1.1.2 Morphologie des HIV	3
1.1.3 HIV als Krankheitserreger	4
1.1.4 Klinischer Verlauf der HIV-Infektion	5
1.2 HIV-Demenz	7
1.2.1 Klinischer Verlauf der HIV-Demenz	9
1.2.2 Histopathologie der HIV-Demenz	10
1.2.3 Pathogenese der HIV-Demenz	12
1.2.4 Therapiemöglichkeiten der HIV-Demenz	13
1.3 Das SIV/Rhesusaffen-Modell	15
1.4 Das dopaminerge System	20
1.4.1 Die drei wichtigsten dopaminergen Bahnen des Gehirns	20
1.4.2 Die dopaminerge Synapse	22
1.5 Involvierung des dopaminergen Systems in die HIV-Demenz	28
1.6 Offene Fragen	33
2. Material und Methoden	35
2.1 Material	35
2.1.1 Chemikalien	35
2.1.2 Geräte und Sonstiges	37
2.2 Methoden	37

<u>2.2.1 Versuchstiere</u>	37
<u>2.2.2 Archivierung</u>	39
<u>2.2.3 cAMP Messung</u>	40
<u>2.2.4 CREB Messung</u>	45
<u>2.2.5 Statistik und Graphische Darstellung der Ergebnisse</u>	60
<u>3. Ergebnisse</u>	61
<u>3.1 cAMP</u>	61
<u>3.1.1 cAMP Konzentration im Gehirn SIV-infizierter Rhesusaffen</u>	61
<u>3.1.2 cAMP Konzentration im Gehirn von SIV-infizierten, an AIDS erkrankten Rhesusaffen</u>	63
<u>3.1.3 Effekte von Selegilin und L-DOPA auf die cAMP Konzentration im Gehirn SIV-infizierter Rhesusaffen</u>	66
<u>3.2 CREB</u>	69
<u>3.2.1 Gesamt CREB im Gehirn SIV-infizierter Rhesusaffen</u>	69
<u>3.2.2 Effekte von Selegilin und L-DOPA auf das CREB Protein im Gehirn SIV-infizierter Rhesusaffen</u>	72
<u>3.3 Tabelle der verwendeten Versuchstiere</u>	77
<u>4. Diskussion</u>	79
<u>5. Zusammenfassung</u>	84
<u>6. Literaturverzeichnis</u>	86

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AIDS	acquired immune deficiency syndrome
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest.	einfach destilliertes Wasser
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	zyklisches 3', 5' - Adenosinmonophosphat
CD	cluster of differentiation
CCR5	Chemokinrezeptor, an dem die ersten beiden Aminosäuren (2 mal Cystein) direkt nebeneinander liegen
COMT	Katecholamin-O-Methyltransferase
CREB	cAMP responsive element binding protein
CXCR4	Chemokinrezeptor, an dem eine andere Aminosäure (X) die ersten beiden Cysteine trennt
DAT	Dopamintransporter
DDC	DOPAdecarboxylase
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylethylamin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dpi	dots per inch
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence (verstärkte Chemilumineszenz)
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
g	Gravitationskonstante (= 980 cm/sec)
gp	Glykoprotein
HAART	hoch aktive antiretrovirale Therapie
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HHV-8	Humanes Herpes Virus 8
HRP	horseradishperoxidase (Meerrettichperoxidase)
HSWB	High Salt Washing Buffer
HVA	Homovanillinsäure
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

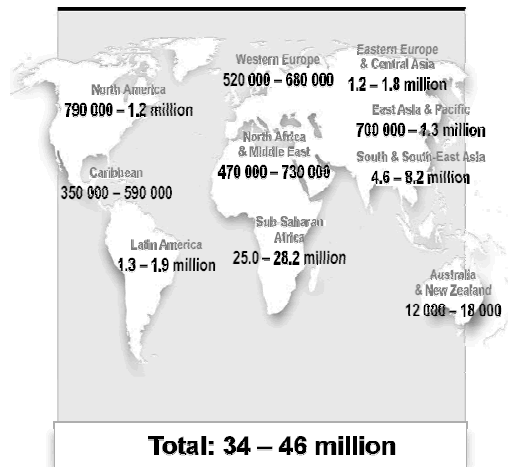
i.m.	intra muskulär
kDa	kilo Dalton
LSWB	Low Salt Washing Buffer
MAO	Monoaminoxidase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
3-MT	3-Methoxytyramin
N	Normalität (= Molarität/Wertigkeit)
NaOH	Natronlauge
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Nitric oxide (Stickstoff)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
p.o.	per os (orale Gabe)
PP	Polypropylen
RKI	Robert-Koch-Institut
rpm	rotations per minute (Drehungen pro Minute)
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
RNS	Ribonukleinsäure
SDS	sodium dodecyl sulfate
S.E.M.	Standard Error of the mean (Standardfehler)
SIV	Simianes Immundefizienz Virus
Tat	Transaktivierungsprotein
TH	Tyrosinhydroxylase
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
vpr	virales Protein
v/v	volume / volume
w/v	weight / volume
ZNS	Zentrales Nerven System

1. Einleitung

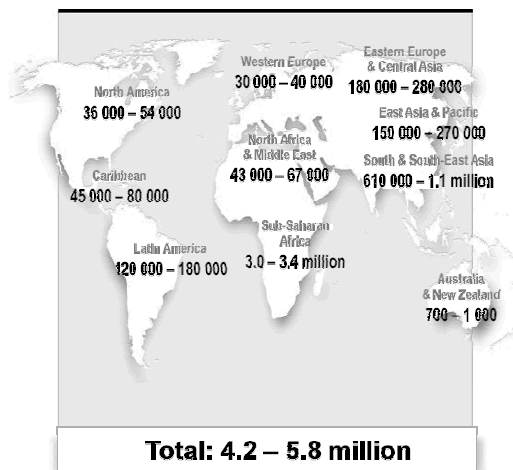
Erstmals wurden die Symptome einer HIV (Humanes Immundefizienz Virus) – Infektion 1981 in Kalifornien und in New York bei jungen homosexuellen Männern beobachtet. Die Patienten litten an einem unerklärlichen Zusammenbruch des Immunsystems mit persistierender Lymphadenopathie, tödlich verlaufenden Pneumonien und dem Auftreten von bis dahin bei jungen Menschen nur selten beobachteten Neoplasien, wie zum Beispiel das Kaposi-Sarkom. Die Pneumonien wurden durch den Erreger *Pneumocystis carinii* ausgelöst, dies war für junge Menschen ebenfalls untypisch. Die schwerste Form dieses neuen Krankheitsbildes wurde als AIDS (engl. *acquired immune deficiency syndrome*) bezeichnet. Die epidemische Ausbreitung in Großstädten und in bestimmten Gruppen, wie zum Beispiel bei den Homosexuellen, legte die Vermutung einer Infektionskrankheit nahe (Jung, 1998). 1983 konnte ein Retrovirus isoliert werden, das heute HIV-1 genannt wird. 1986 wurde ein weiteres Retrovirus HIV-2 entdeckt, das ebenfalls bei Menschen AIDS auslösen kann.

Die Erstinfektion des Menschen mit HIV war höchstwahrscheinlich eine Zoonose bei der Varianten des im Affen vorkommenden Immundefizienzvirus auf den Menschen übertragen wurden. Zu Beginn erfolgte die Weitergabe des HIV meist durch Homosexuelle, später aber auch durch intravenös Drogenabhängige und Bluttransfusionen bzw. Plasmaprodukte. Dadurch war auch die heterosexuell lebende Bevölkerung betroffen. Zunehmend wurden auch Frauen und Kinder infiziert. 1981 starben in den USA 219 Menschen an AIDS. 1985 gab es bereits 2469 Todesfälle (Falke und Gerken, 2001). Eine Vielzahl von Einzelepidemien führte zur Ausbildung einer Pandemie. Diese nahm im Laufe der Zeit immer größere Ausmaße an. Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) waren Ende 2003 weltweit ungefähr 40 Millionen Menschen mit HIV infiziert. Jährlich werden etwa fünf Millionen Menschen neu infiziert. Circa drei Millionen Menschen sterben jedes Jahr an den Folgen von AIDS (siehe Abbildung 1).

Geschätzte Verteilung der Erwachsenen und Kinder, die weltweit mit HIV infiziert sind



Geschätzte Verteilung der Erwachsenen und Kinder, die weltweit im Jahr 2003 neu mit HIV infiziert wurden



Geschätzte Verteilung der Erwachsenen und Kinder, die weltweit im Jahr 2003 an HIV/AIDS starben

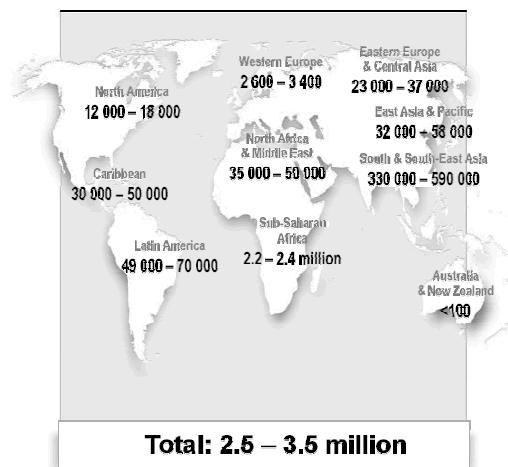


Abbildung 1: Epidemiologische Daten des HIV (nach UNAIDS/WHO, Stand Ende 2003)

1.1 Humanes Immundefizienz-Virus (HIV)

1.1.1 Eigenschaften des HIV

HIV gehört zu den Lentiviren, einer Untergruppe der Retroviren (Levy, 1994). Retroviren besitzen ein RNS-Genom, das im Zytoplasma der infizierten Zelle durch die viruseigene Reverse Transkriptase in DNS umgeschrieben wird. Als Voraussetzung für die Replikation muss dieses DNS-Retrotranskript mit Hilfe eines Integrase-Enzyms in das Wirtszellgenom eingebaut werden. Erst dann kann die Transkriptase der Wirtszelle das virale RNA-Genom vervielfältigen, sowie auch die messengerRNS herstellen, die für die Entstehung viraler Proteine notwendig ist.

Infektionen durch Lentiviren sind durch einen langsamen Krankheitsverlauf gekennzeichnet, der oftmals zum Tode führt. Lentiviren besitzen die Eigenschaft längere Zeit innerhalb von Zellen überleben zu können (Hirsch und Curran, 1996). Deswegen ist es auch möglich, dass HIV-Infizierte eine sehr lange Zeit im asymptomatischen Stadium der HIV-Infektion verweilen, bevor das AIDS-Stadium ausbricht.

Es gibt eine Vielzahl von Viren, die mit dem HIV verwandt sind und bei Tieren eine ähnliche Immunschwäche auslösen, dazu gehört auch das simiane Immundefizienzvirus (SIV) (siehe Tabelle 1).

Gruppe	Retroviren			
Untergruppe	Spumaviren	Lentiviren		Onkoviren
Beispiele	lösen im Menschen keine Krankheit aus	HIV SIV FIV BIV etc.	bei Menschen bei Affen bei Katzen bei Rindern	Humanes T-Zell Leukämie Virus

Tabelle 1: Einteilung der Retroviren

1.1.2 Morphologie des HIV

Zwei Kopien des RNS-Genoms sind zusammen mit den Enzymen Reverse Transkriptase, Integrase und Protease in ein helikales Nukleokapsid verpackt. Dieses Kapsid befindet sich in einem Zweitkapsid, welches wiederum von einer Lipidhülle umgeben ist. In dieser Lipidhülle sind Glykoproteinkomplexe, die sogenannten

Hüllproteine, verankert. Man unterscheidet das Transmembranprotein gp41 und das daran gebundene externe Glykoprotein gp120 (siehe Abbildung 2).

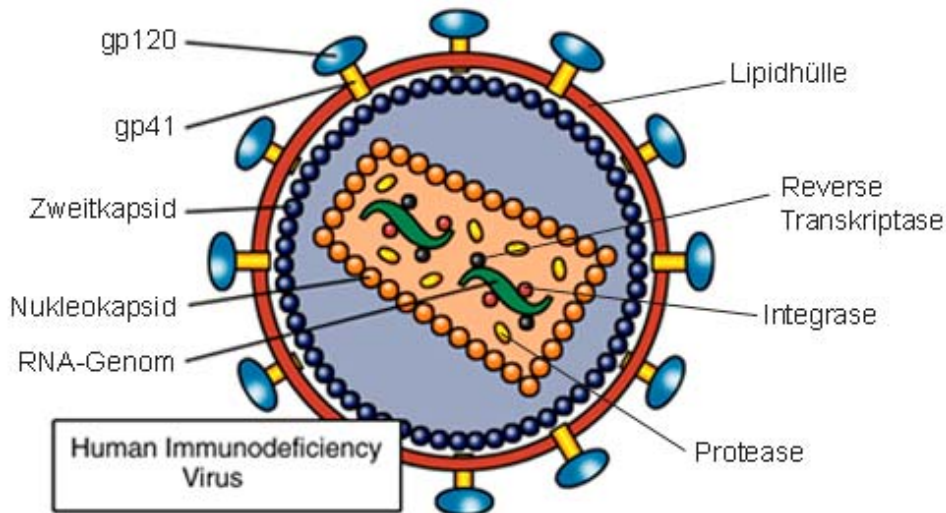


Abbildung 2: Die Struktur von HIV: RNA-Genom, Reverse Transkriptase, Integrase und Protease befinden sich in einem Nukleokapsid, das von einem Zweitkapsid umgeben wird. Dieses Zweitkapsid liegt innerhalb der Lipidhülle in der die Hüllproteine gp41 und das daran gebundene gp120 verankert sind (modifiziert nach Abbildung von www.avert.org).

1.1.3 HIV als Krankheitserreger

Momentan sind zwei pathogene AIDS-Stämme HIV-1 und HIV-2 bekannt, die sich in den Glykoproteinen (gp) der Virushülle unterscheiden. HIV-1 trat ursprünglich überwiegend in Zentralafrika und HIV-2 in Westafrika auf. Vor allem das HIV-1 wurde in die verschiedenen Regionen der Erde verbreitet. Der natürliche Wirt des HIV-1 ist der Schimpanse, der des HIV-2 der Mangaben-Affe. Die Affen erkranken selbst nicht an Immunschwäche, jedoch bleiben sie lebenslang infiziert. Nach wie vor ist ungeklärt, wann und wie die Artenbarriere Affe-Mensch überschritten wurde und das Immundefizienzvirus auf den Menschen übertragen wurde.

HIV hat die Eigenschaft einen Menschen latent zu infizieren und innerhalb des infizierten Organismus zu persistieren, d.h. auch bei einer hohen Anzahl von Antikörpern wird HIV nicht vollständig eliminiert. HIV verursacht bei Menschen eine Immunschwäche, die das Auftreten von zahlreichen Erkrankungen zulässt, die ein

gesundes Immunsystem problemlos abwehren würde. Das Risiko Neoplasien zu entwickeln ist durch die HIV-Infektion ebenfalls erhöht. Schließlich führt die progredient verlaufende Immunschwäche zum Endstadium AIDS der HIV-Infektion und letztlich - vor allem durch nicht mehr beherrschbare Komplikationen der Folgeerkrankungen - auch zum Tod.

HIV kann durch Sexualkontakt, durch kontagiöses Blut und dessen Produkte, sowie durch eine prä- oder perinatale Infektion von der Mutter auf ihr Kind übertragen werden. Ein bedeutender Faktor ist die Viruslast der Überträgerflüssigkeit: Befinden sich zum Beispiel weniger als 1500 Kopien RNS/ μ l im Vaginalsekret bzw. im Sperma ist das Übertragungsrisiko gering (Falke und Gerken, 2001).

1.1.4 Klinischer Verlauf der HIV-Infektion

Ist ein Wirt infiziert, befällt HIV zunächst die ortständigen Makrophagen, die Langerhans-Zellen der Haut oder des Darms, sowie die CD4+ Zellen. HIV bindet mit dem Hüllprotein gp120 an den CD4-Rezeptor der Zellmembran der Wirtszelle. Um in die Zelle eindringen zu können, muss zusätzlich ein Korezeptor (CXCR4 oder CCR5) vorhanden sein. Die infizierten Zellen transportieren das Virus in die regionalen Lymphknoten. Von dort aus können sich die Zellen über das gesamte lymphatische System verteilen. Infizierte Makrophagen dienen, ohne selbst Schaden zu nehmen, lange Zeit als Virusreservoir und verbreiten dadurch das Virus im ganzen Körper. Die HIV-Infektion ist durch einen chronischen Verlauf gekennzeichnet, der zur Zerstörung der humanen Immunantwort führt.

Im Stadium der akuten HIV-Infektion kommt es zu einer starken Vermehrung von HIV, und das Virus breitet sich über den gesamten Körper aus. Diese Primärinfektion verläuft in vielen Fällen symptomfrei. Bei ca. 30% der Infizierten tritt jedoch ein „mononukleoseartiges“ Krankheitsbild mit Fieber, Abgeschlagenheit, Angina und Lymphknotenschwellung auf. Diese Symptomatik geht mit einer initialen Virusvermehrung, einer ausgeprägten Virämie und einem Abfall der CD4+ Zellen einher und klingt nach 3-14 Tagen wieder ab (Dressler, 2002). Durch die einsetzende Immunantwort gegen HIV steigt die Zahl der CD4+ Zellen wieder an und die Viruslast geht zurück.

Das der akuten Infektion folgende Stadium wird als klinisch asymptomatisches Stadium bezeichnet. Ständig bilden sich neue Viren, die vom körpereigenen Immunsystem unmittelbar wieder zerstört werden. Die Dauer variiert individuell von einem Jahr bis zu 14 Jahren.

Danach bricht das Endstadium AIDS aus. Die Zahl der CD4+ Zellen im Blut ist nun soweit gesunken, dass das Immunsystem opportunistische Erreger nicht mehr abwehren kann. Ist die Viruslast des HIV im Plasma hoch, so ist die Zahl der CD4+ Zellen im Blut meist gering. Befinden sich viele CD4+ Zellen im Blut ist die Viruslast im Plasma niedrig (siehe Abbildung 3).

Der klinische Verlauf der HIV-Infektion

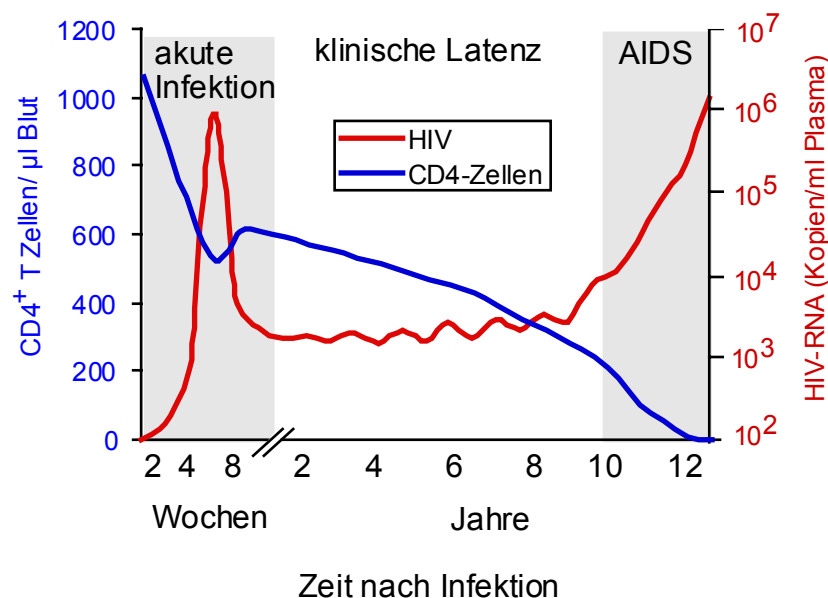


Abbildung 3: Klinischer Verlauf der HIV-Infektion: Zahl der CD4+ Zellen im Blut und die Viruslast (die Zahl der HIV-RNA Kopien im Plasma) im zeitlichen Verlauf der HIV-Infektion (Pantaleo et al., 1993).

Im AIDS-Stadium der Erkrankung treten eine Vielzahl von opportunistischen Infektionen, ausgelöst durch Bakterien, Viren, Pilze und Protozoen auf. Charakteristisch für AIDS sind Infektionen mit Mykobakterien, Zytomegalievirus, HHV-8, Candidainfektionen, Toxoplasmosen und Pneumonien multipler Genese (siehe Tabelle 2).

Häufige Erreger opportunistischer Infektionen bei HIV-Infektion		
Bakterien	<ul style="list-style-type: none"> • Mykobakterium tuberculosis → Tuberkulose • Atypische Mykobakterien → Disseminierte Erkrankungen (Fieberschübe, gastrointestinale Beschwerden) 	
Viren	<ul style="list-style-type: none"> • Zytomegalievirus (CMV) → Retinitis, Enzephalitis • HHV-8 → Kaposi-Sarkom • Herpes simplex Virus → Schleimhautulcerationen 	
Pilze	<ul style="list-style-type: none"> • Candida → Mundsoor, Bronchitis • Cryptococcus neoformans → Kryptokokkose (Lunge, ZNS) 	
Protozoen	<ul style="list-style-type: none"> • Pneumocystis carinii → Pneumonie • Toxoplasma gondii → Enzephalitis • Cryptosporidium parvum → Chronische Durchfälle 	

Tabelle 2: Häufige Erreger opportunistischer Infektionen bei der HIV-Infektion

Oftmals bilden sich zusätzlich maligne Lymphome oder andere aggressive Tumoren aus, wie das Kaposi-Sarkom, das mit dem HHV-8 (humanes Herpes Virus – 8) in Verbindung gebracht wird. AIDS ist ein Krankheitskomplex, der mit einer hohen Letalität einhergeht. Unbehandelt versterben innerhalb von 15 Jahren etwa zwei Drittel der Infizierten an den Folgen der HIV-Infektion (RKI, 2000).

In manchen Fällen entwickelt sich trotz vorhandener HIV-Infektion kein AIDS. Diese Patienten werden als „Langzeitüberlebende“ (engl. long term non progressors, LTNPs) bezeichnet.

1.2 HIV-Demenz

Nach Angaben der WHO entwickelt ein Drittel aller HIV infizierten Erwachsenen und die Hälfte aller infizierten Kinder eine dementielle Erkrankung. Die durch HIV ausgelöste, progressiv verlaufende Demenz wird als HIV (induzierte) Demenz, AIDS Demenz Komplex (ADC), HIV-assoziiertes kognitiv/motorisches Komplex oder Neuro-AIDS bezeichnet. Als häufigste Ursache für die Erkrankung an Demenz bei unter 60 Jahre alten Menschen gilt die HIV-Infektion (Janssen et al., 1992; McArthur et al., 1993). Die Prognose der HIV-Demenz ist schlecht. Die meisten Patienten versterben innerhalb von sechs Monaten nach Auftreten der ersten Symptome der Demenzerkrankung.

Die HIV-Demenz kann direkt auf die HIV-Infektion als solche zurückgeführt werden und ist nicht Folge einer opportunistischen Infektion oder eines malignen Prozesses. Der ursächliche Zusammenhang zwischen der HIV-Infektion des Gehirns und der HIV-Demenz wird durch folgende Sachverhalte bekräftigt:

- Bisher wurde noch kein anderer Krankheitserreger gefunden, auf den die HIV-Demenz zurückzuführen ist.
- Nur makrophagotrope Virusstämme, die Zellen im Gehirn infizieren, verursachen HIV-Demenz. Lymphotrope Stämme, die keine Zellen des Gehirns infizieren, verursachen auch keine Demenz.
- Die mit dem HIV verwandten Lentiviren für Tiere, wie zum Beispiel das simiane Immundefizienzvirus (SIV), infizieren ebenfalls deren Gehirn und verursachen neurologische Ausfallerscheinungen.
- Die HIV-Demenz tritt nur bei HIV-Infektion auf und ist bei keiner anderen immunsupprimierenden Krankheit beschrieben.
- Die antiretrovirale Therapie scheint zu einem Rückgang der Inzidenz der HIV-Demenz bei HIV-Infizierten zu führen (Dore et al., 1999; Sacktor et al., 2001).

Trotzdem spielt die Immunsuppression eine Rolle in der Entwicklung der HIV-Demenz, sie ist jedoch eher in koinzidentem und nicht in kausalem Zusammenhang zu sehen. Die meisten klinischen Zeichen der HIV-Demenz bilden sich im Endstadium der Infektion, in dem die Immunsuppression voll entwickelt ist (Zink et al., 1998).

Das Vorkommen von HIV im Gehirn ist Voraussetzung für das Auftreten der Demenzerscheinungen. Bereits zwei Wochen nach der Infektion ist HIV im Gehirn nachweisbar. Um in das Gehirn zu gelangen, muss HIV die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Die Blut-Hirn-Schranke ist eine anatomische und biochemische Barriere, die einen selektiven Übertritt von Zellen und Molekülen aus dem Blut in das Gehirn bewirkt. Zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke durch HIV sind verschiedene Möglichkeiten denkbar:

- Die Blut-Hirn-Schranke könnte durch die HIV-Infektion oder die einsetzende Immunreaktion zerstört werden. Das HIV selbst und auch infizierte Zellen könnten ungehindert in das Gehirn übertreten.

- Alternativ könnte HIV die Endothelzellen als wichtige anatomische Komponente des Gehirns direkt infizieren.
- Schließlich könnte das Virus auch durch infizierte Zellen, die die intakte Blut-Hirn-Schranke im Rahmen der normalen Zellwanderung passieren, ins ZNS gelangen.

Allgemein wird davon ausgegangen, dass HIV durch infizierte Makrophagen bereits in der Frühphase der Infektion ins Gehirn gelangt (Miller und Meucci, 1999). Eine intrathekale Synthese von Anti-HIV-Antikörpern lässt sich bereits in der asymptomatischen Phase der HIV-Erkrankung nachweisen (da Cunha und Eiden, 1993).

1.2.1 Klinischer Verlauf der HIV-Demenz

Konzentrations- und Gedächtnisstörungen sowie geistige Verlangsamung und kognitive Beeinträchtigung kennzeichnen die frühe Phase der HIV-Demenz. Psychomotorische Verlangsamung ist oft das erste Zeichen dieser Erkrankung und bezeichnend für einen negativen Krankheitsverlauf (Arendt et al., 1994). Im weiteren Verlauf können Wesensänderungen wie Antriebsminderung, Depression, Apathie und sozialer Rückzug auftreten. Zu den neurologischen Ausfällen, die im Rahmen der HIV-Demenz in Erscheinung treten, zählen Tremor, Bradykinesie sowie Gang- und Haltungsstörungen (Navia et al., 1986a). Die Gangstörungen beruhen auf einer spastischen Ataxie mit gesteigerten Muskeleigenreflexen (Price, 1996). Gleichgewichtsstörungen können ebenfalls vorkommen.

In der fortgeschrittenen Phase der HIV-Demenz verschlechtert sich das Gedächtnis der Patienten zunehmend, außerdem kommt es zu einer Progression der motorischen Störungen sowie der Wesensänderungen. Eine weitere Verschlechterung der Demenz zeichnet sich durch eine Zunahme der psychomotorischen Verlangsamung und durch eine globale kognitive Beeinträchtigung aus. Die motorischen Ausfälle können sogar das Auftreten von Tetraplegien beinhalten (Price, 1996). Die letzte Phase der HIV-Demenz mit Zeichen der Inkontinenz, Halluzination, Anfällen und Koma tritt kurz vor dem Tode auf (Navia et al., 1986a). Die Patienten sterben im Durchschnitt sechs Monate nach Ausbruch der Erkrankung (Harrison und McArthur, 1995).

Viele Symptome der HIV-Demenz sind mit denen der Parkinsonkrankheit vergleichbar. Apathie, psychomotorische Verlangsamung, Bewegungsarmut, Gangstörungen, ein hypomimetisches Gesicht sowie gestörte Augenbewegungen kennzeichnen beide

Krankheitsbilder. Die Parkinsonkrankheit ist durch den Verlust dopaminergener Neurone in der Substantia nigra charakterisiert (Bernheimer et al., 1973). Neurochemisch führt die Reduktion des Dopaminspiegels zu einer gestörten Funktion der Basalganglien (Ehringer und Hornykiewicz, 1960). Eine Beteiligung des dopaminergen Systems bei der HIV-Demenz ist wahrscheinlich (Lopez et al., 1999).

Wann und wie stark ein mit HIV-infizierter Patient klinische Zeichen einer HIV-Demenz entwickelt, hängt sowohl von den Virulenzfaktoren des Virus als auch von bestimmten Faktoren des Wirts ab. Zu den Virulenzfaktoren des Virus zählen Zelltropismus und das Vorhandensein bestimmter Gensequenzen, welche die Neurovirulenz hervorrufen. Die Immunantwort und die Expression virusspezifischer Rezeptoren und Korezeptoren spiegeln die Wirtsfaktoren wieder (Zink et al., 1998).

1.2.2 Histopathologie der HIV-Demenz

Histopathologisch ist die HIV-Demenz charakterisiert durch eine Abblassung des Myelins, einer Astrozytose und die Infiltration monozytärer Zellen in Form von Makrophagen und Mikroglia. Die infizierten Makrophagen und Mikroglia fusionieren zu mehrkernigen Riesenzellen (engl. MGC, multinucleated giant cells). Aus Lymphozytenansammlungen und Makrophagen bilden sich Mikrogliaknötchen. Lymphozytäre Infiltrate, reaktive Gliosen und variable fokale Nekrosen können ebenfalls im histologischen Bild vorhanden sein. Das Parenchym ist entweder unauffällig oder durch Schwammigkeit und Myelinverlust in oder um einen Herd verändert (Gray, 1993) (siehe Abbildung 4).

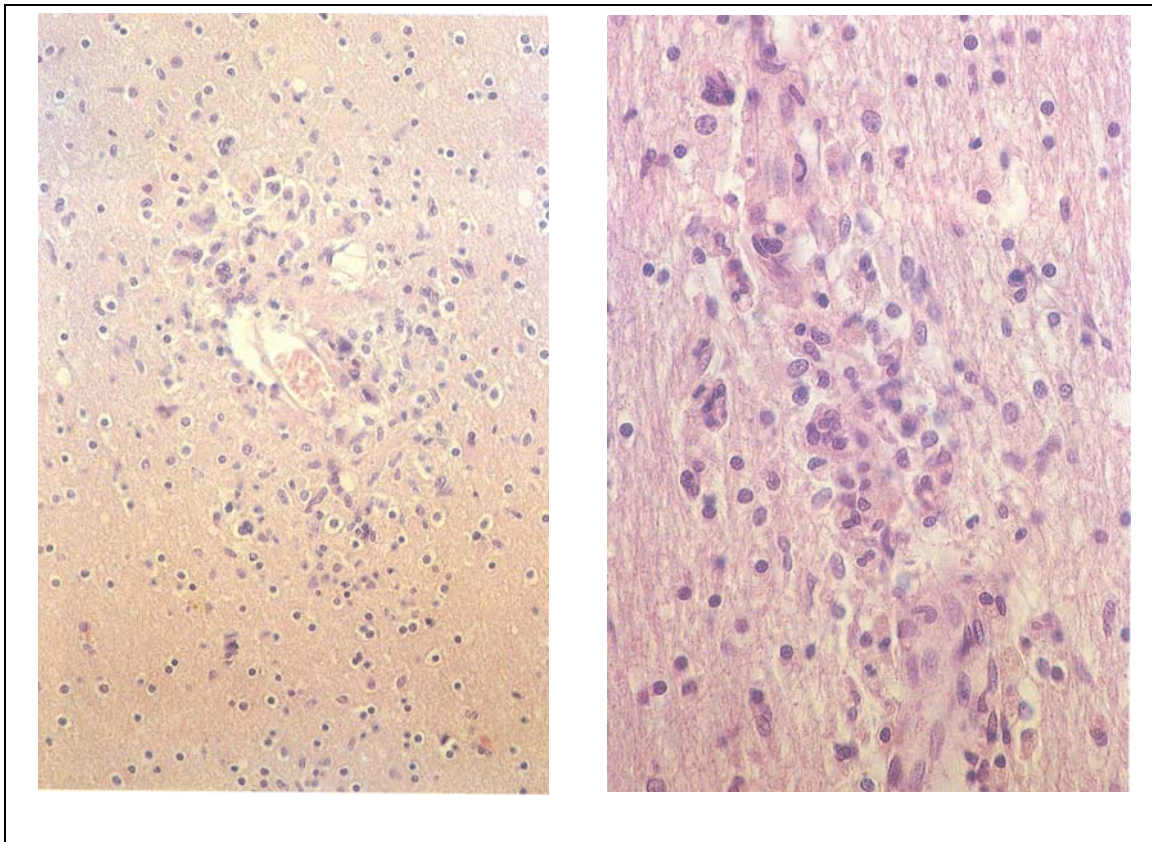


Abbildung 4: Histopathologie der HIV-Demenz: Typische perivaskuläre Anhäufung von Mikroglia, Makrophagen und multinukleären Riesenzellen (Gray, 1993)

Ungeklärt bleibt jedoch die Rolle der histologischen Kriterien und der Viruslast im Zusammenhang mit der HIV-Demenz. Obwohl bei den meisten Patienten mit einer HIV-Demenz eine hohe Viruslast im Gehirn zu finden ist, geht eine hohe Virusbelastung des Gehirns nicht immer mit der klinischen Manifestation neurologischer Ausfallerscheinungen einher. Zudem gelten die histologischen Merkmale als spezifisch, aber nicht als sensitiv (Sopper et al., 2002). Möglicherweise hängt die Entwicklung der HIV-Demenz nicht nur vom Ausmaß, sondern auch von der Dauer einer gesteigerten intraparenchymalen viralen Replikation ab, so wie es am SIV/Rhesusaffen-Modell nachgewiesen wurde (Demuth et al., 2000). Innerhalb des ZNS sind überwiegend die subkortikalen Regionen mit HIV infiziert. Dabei finden sich die höchsten Konzentrationen von viralem Antigen im Thalamus, den Basalganglien und im ventralen Mittelhirn (Brew et al., 1995; Wiley et al., 1998). Erst während des Endstadiums der HIV-Erkrankung entwickelt sich sehr langsam der Verlust neuronaler Zellen, sowie eine Atrophie des Gehirns (da Cunha und Eiden, 1993).

1.2.3 Pathogenese der HIV-Demenz

Die Pathogenese, die den funktionellen Veränderungen des Nervensystems bei einer HIV-Infektion zugrunde liegt, ist bis heute noch in einigen Teilen unverstanden. Sie ist jedoch sicherlich multifaktoriell. Ein Befall der Neuronen mit HIV kann *in vivo* nicht nachgewiesen werden. Neuronen exprimieren keinen CD4+ Rezeptor an ihrer Zellmembran. Somit können sie selbst nicht direkt vom HIV infiziert werden (Takahashi et al., 1996). Mikroglia und die perivaskulär gelegenen Makrophagen hingegen sind primäre Zielzellen der HIV-Infektion im Gehirn (Miller und Meucci, 1999). Makrophagen und Mikroglia bilden jedoch nur einen kleinen Teil aller Zellen des Gehirns. Zudem besteht kein direkter Zusammenhang zwischen der Viruslast im Gehirn und der klinischen Symptomatik. Dies führt zu der Annahme, dass ein indirekter Mechanismus für die Ausbildung der HIV-Demenz verantwortlich ist (Lipton, 1994). So könnten die Viren selbst neurotoxische Stoffe produzieren. Durch Expression der Korezeptoren (CCR5 bzw. CXCR4) auf der Zellmembran von Neuronen könnten diese viralen Proteine direkt auf die Neuronen einwirken (Westmoreland et al., 1998). So wird angenommen, dass die viralen Proteine gp120, gp41, Tat und vpr schädlichen Einfluss auf Neuronen und Astrozyten haben (Koutsilieri et al., 2002a).

Eine andere Möglichkeit ist, dass HIV-infizierte Makrophagen/Mikroglia oder immunaktivierte Makrophagen und Astrozyten Neurotoxine sezernieren (Lipton, 1998). Zu diesen Neurotoxinen zählen unter anderem proinflammatorische Zytokine, freie Radikale (NO^\bullet und $\text{O}_2^{\bullet-}$), Neopterin, Eicosanoide wie zum Beispiel Arachidonsäure, die Metaboliten der Eicosanoide, der PAF (engl. platelet-activating factor), Quinolinsäure und Glutamat (Griffin et al., 1991; Achim et al., 1993; Achim et al., 1994; Gelbard et al., 1994; Koutsilieri et al., 1999).

Neben dem Anstieg des erregend wirkenden Neurotransmitters Glutamat im Liquor von SIV-infizierten Makaken ist zugleich ein Abfall des hemmend wirkenden Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA) gefunden worden (Koutsilieri et al., 1999). Glutamat wirkt in hohen Konzentrationen als Exzitotoxin (Woodruff et al., 1988). Die Überstimulation von NMDA-Rezeptoren, zum Beispiel durch Glutamat, erhöht die intrazelluläre Kalzium-Konzentration und führt zur Zellyse und schließlich zum Zelltod (Lipton, 1998).

Im Liquor und im Autopsiematerial von HIV-Demenz Patienten zeigte sich eine vermehrte intrathekale Produktion der Zytokine IL-1, IL-6 sowie des Tumornekrosefaktors α (TNF- α) (Gallo et al., 1991; Tyor et al., 1992; Laverda et al., 1994; Wesselingh et al., 1994). Bei SIV infizierten Makaken konnte bereits in der asymptomatischen Phase der Erkrankung eine erhöhte Produktion von IL-6 und TNF- α durch Mikroglia festgestellt werden (Sopper et al., 1996). Diese Zytokine können auf Neuronen toxisch wirken, die intrazelluläre Kommunikation stören, sich chemotaktisch auf Zellen des Immunsystems auswirken oder die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke verändern und folglich zur Pathogenese neuronaler Störungen beitragen (Koutsilieri et al., 2002a). Zudem wird eine Beteiligung des dopaminergen System in der Ausbildung der HIV-Demenz vermutet (siehe 1.5).

1.2.4 Therapiemöglichkeiten der HIV-Demenz

Die HIV-Demenz beruht einerseits auf das Vorhandensein von HI-Viren im Gehirn, andererseits wird das ZNS bei der HIV-Demenz durch Exzitotoxizität und oxidativen Stress geschädigt. Es besteht zudem ein Ungleichgewicht der Neurotransmitterkonzentrationen im Gehirn. So sind zum Beispiel das dopaminerge, das glutamaterge sowie auch das GABAerge Neurotransmittersystem bei der HIV-Demenz dysreguliert. Daraus ergeben sich zwei Möglichkeiten der Therapie der HIV-Demenz. Die eine ist der Versuch, die Replikation des Virus durch antiretrovirale Substanzen zu unterdrücken. Die andere Möglichkeit besteht in der Einflussnahme auf die Verfügbarkeit der Neurotransmitter im ZNS durch Psychopharmaka, sowie dem Schutz der Gehirnzellen durch neuroprotektive Substanzen.

Da sich HIV innerhalb des Gehirns - „geschützt“ durch die Blut-Hirn-Schranke - befindet, ist das Virus im Gehirn einer antiretroviralen Therapie schwer zugänglich. Die verabreichten Medikamente müssen liquorgängig sein, um im Liquor in entsprechender Konzentration die Virusreplikation unterdrücken zu können. Ansonsten kann das Gehirn unter einer antiviralen Therapie sogar als Reservoir zur Virusreplikation dienen und als Ort für die Entstehung neuer resistenter Viren fungieren (Ellis et al., 2000).

Die derzeitige Behandlung einer HIV-Infektion im fortgeschrittenen Stadium ist die hoch aktive antiretrovirale Therapie (HAART). Hierbei handelt es sich um eine Kombinationstherapie - meist einer Trippletherapie - aus verschiedenen Inhibitoren der

Reversen Transkriptase und/oder der Protease von HIV. Die Umwandlung der viralen RNS in die provirale DNS wird beim Einsatz von Inhibitoren der Reversen Transkriptase unterdrückt. Die Proteaseinhibitoren verhindern die Reifung der Viruspartikel, so dass diese nicht mehr infektiös sind. Nach der Einführung der HAART sank die Prävalenz der HIV-Demenz nicht in dem Maße wie die anderer AIDS-definierender Erkrankungen (Dore et al., 1999). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass sich durch die HAART die Lebenszeit der HIV-infizierten Patienten zwar verlängert, dadurch aber auch die Wahrscheinlichkeit steigt, an einer HIV-Demenz zu erkranken (Simpson, 1998).

Obwohl die antiretrovirale Therapie zu einer Reduktion der Viruslast im Liquor und zur Verbesserung der kognitiven Funktionen bei der Mehrzahl der HIV-infizierten Personen führt, zeigt die HAART bei bis zu 50% der Patienten mit neurologischen Komplikationen keine erfolgreiche Langzeitwirkung. Die antiretrovirale Therapie scheint keine Verbesserung der Parkinsonkrankheit ähnlichen Symptomatik der HIV-Demenz zu zeigen (Mirsattari et al., 1998) und ebenso wenig die Dopaminkonzentration im Liquor auszugleichen (Gisslen et al., 1994). Die ungenügende Wirkung der HAART im Bezug auf die HIV-Demenz bekräftigt die Aussage, dass zwischen der Viruslast im Gehirn und der neurologischen Symptomatik kein direkter Zusammenhang besteht (siehe oben).

Im Rahmen der Neurotherapie werden spannungsabhängige Kalziumkanal-Antagonisten, zum Beispiel Nimodipine, zur Prävention von HIV-assoziiierter Nervenschädigung und zur Therapie neurologischer Störungen in Verbindung mit der HIV-Demenz bereits in klinischen Studien eingesetzt (Navia et al., 1998).

Da Exzitotoxizität und oxidativer Stress möglicherweise eine Rolle in der Pathogenese der HIV-Demenz spielen, wurden NMDA-Rezeptor Antagonisten und Antioxidantien ebenfalls schon in klinischen Studien getestet. Jedoch zeigte sich dadurch keine signifikante Verbesserung (McGuire und Marder, 2000).

Der Einsatz von Anti Parkinson Medikamenten ist umstritten. Bei einer Untergruppe von HIV-infizierten Patienten besserte sich die der Parkinsonkrankheit ähnlichen Symptomatik durch die Gabe von L-DOPA (Mintz et al., 1996). In HIV infizierten Makaken jedoch verursachte eine Behandlung mit L-DOPA, und die dadurch erhöhte

Dopaminverfügbarkeit im ZNS, degenerative Veränderungen des ZNS und beschleunigte die SIV Infektion. Dieselben Ergebnisse konnten bei der Behandlung mit Selegilin - ein den Dopaminabbau verzögerndes Medikament - erzielt werden (Czub et al., 2001). Der Einsatz von Dopamin erhöhenden Medikamenten in Verbindung mit retroviralen Infektionen des ZNS bleibt somit ein zweischneidiges Schwert, da eher neuropathologische Prozesse induziert werden, als dass eine neuroprotektive Wirkung erzielt wird.

Die durch indirekte Mechanismen, wie zum Beispiel oxidativen Stress und Exzitotoxizität ausgelösten, HIV-induzierten, neuronalen Schäden können aber auch irreversibel und somit keiner Therapie zugänglich sein (Lipton, 1994).

1.3 Das SIV/Rhesusaffen-Modell

Die Symptome der HIV-Demenz treten häufig erst im späten Stadium der HIV-Infektion auf. Zu diesem Zeitpunkt sind unter Umständen durch die HIV-Infektion im ZNS bereits irreversible Schäden aufgetreten, die nicht mehr therapierbar sind.

Es wird angenommen, dass die HIV-Demenz auf einer kumulativen Schädigung des Gehirns beruht, die in einem sehr frühen Stadium der HIV-Infektion beginnt. Deshalb ist es wichtig bereits in diesem frühen Stadium der HIV-Infektion Informationen über pathologische Prozesse im infizierten Organismus zu erhalten. Ein durch Untersuchungen des Gehirns sowie des Liquors gewonnenes, besseres Verständnis der Pathogenese der HIV-Demenz, bietet Zugang zu neuen Therapieansätzen. So kann es sinnvoll sein, schon in der frühen Phase der HIV-Infektion mit einer neuroprotektiven Therapie zu beginnen und dadurch möglicherweise eine irreversible neuronale Schädigung zu verhindern. Um diese Hypothese zu verifizieren, geeignete Substanzen für die Behandlung sowie Hinweise auf den optimalen Zeitpunkt des Behandlungsbeginns zu erlangen, sind Versuche im frühen Stadium der HIV-Infektion unabdingbar. Sie würden wesentlich zur Entwicklung gezielter Therapiestrategien für die Behandlung der HIV-Demenz beitragen.

In zweierlei Hinsicht ist es äußerst schwierig, solche Untersuchungen am Menschen durchzuführen:

- Entweder ist vielen HIV-Infizierten zu diesem frühen Zeitpunkt die HIV-Infektion noch gar nicht bekannt,
- oder denjenigen HIV-Infizierten, die von ihrer Infektion wissen, ist der genaue Zeitpunkt der Infektion meist unbekannt.

Außerdem ist es ethisch nicht vertretbar Biopsiematerial von Menschen für Forschungszwecke zu gewinnen. Autopsiematerial von noch in der asymptomatischen Phase verstorbenen Patienten ist aber außergewöhnlich selten. Differenzierte Daten über Ereignisse, die bereits im frühen asymptomatischen Stadium der Infektion auftreten, sowie über den Verlauf der HIV Erkrankung im subakuten Stadium, können deshalb nur unzureichend erhoben werden. Diese Umstände zwingen die Wissenschaft, Tiermodelle wie zum Beispiel das SIV/Rhesusaffen-Modell, heranzuziehen.

Blut, Liquor und Urin, sowie Gewebeproben des Gehirns und anderer Organe SIV-infizierter Rhesusaffen können zu jedem beliebigen Zeitpunkt der Infektion untersucht werden. Darüber hinaus können die Tiere mit SI-Virusstämmen, deren Gensequenz bekannt ist, infiziert werden. Hieraus lassen sich Information über Wirkung und Pathogenität einzelner Gene gewinnen (Norley und Kurth, 1997). An der Ausbildung der HIV-Demenz beteiligte Gene können dadurch identifiziert werden.

Das SIV/Rhesusaffen-Modell eignet sich besonders gut, um Rückschlüsse auf die HIV-Infektion des Menschen zu ziehen, denn das bei den Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) durch das Virus SIV_{mac} (mac steht für Rhesusmakaken) induzierte Krankheitsbild ist dem der menschlichen HIV-Infektion bis hin zum AIDS sehr ähnlich (Joag, 2000). SIV und HIV sind strukturell und funktionell eng miteinander verwandt. Beide gehören zur selben Subgruppe der Lentiviren und sind sich in der Organisation des Genoms, sowie in ihren Gensequenzen nahezu identisch (Hahn et al., 2000). Dabei hat SIV noch mehr Gemeinsamkeiten mit HIV-2, als mit HIV-1. Beide SIV und HIV-2 besitzen das vpx-Gen, während im HIV-1 stattdessen das vpu-Gen vorhanden ist. Die Zielzellen beider Virusstämme sind die CD4⁺ Lymphozyten, die ebenfalls CD4 exprimierenden Monozyten/Makrophagen und die dendritischen Zellen (Desrosiers, 1990) (siehe Tabelle 3).

	HIV	SIV
Viruszugehörigkeit	Retrovirus, Lentivirus	Retrovirus, Lentivirus
Genetische Übereinstimmung	HIV-1	43%
	HIV-2	72%
Strukturgene	Hüllprotein gp 120	Hüllprotein gp 130
Regulatorgene	nef, rev, vif, vpr, vpu (nur HIV-1), vpx (nur HIV-2)	nef, rev, viv, ,vpr, vpx
Viraler Rezeptor	CD 4 Antigen	CD 4 Antigen
Zielzellen	Monozyten/Makrophagen, CD4+ T-Zellen, dendritische Zellen	Monozyten/Makrophagen, CD4+ T-Zellen, dendritische Zellen
Zeichen der Immunerkrankung	Opportunistische Infektion der Lunge, des Magen-Darm-Trakts und des Gehirns, Lymphome, Kaposi-Sarkom, Neuro-AIDS	Opportunistische Infektion der Lunge, des Magen-Darm-Trakts und des Gehirns, Lymphome, Neuro-AIDS

Tabelle 3: Vergleich des HIV und des SIV (da Cunha und Eiden, 1993)

Die natürlichen Wirte von SIV sind die grüne Meerkatze, Paviane und Mangaben-Affen. Bei ihnen löst SIV keine Krankheit aus. Auch für den Menschen ist SIV bislang nicht infektiös. Wird das SIV jedoch auf andere Affenarten, wie zum Beispiel die Makaken übertragen, entwickeln diese eine Immunschwäche mit Symptomen, die der HIV-Infektion des Menschen entsprechen. Die Makaken zeigen zudem neurologische Veränderungen, die klinisch und pathologisch mit denen der HIV-Demenz vergleichbar sind (Burudi und Fox, 2001) (siehe Tabelle 4).

Neurologische Veränderung in der Frühphase der Erkrankung		
Neuropathologie	HIV	SIV
→ Perivaskuläre Infiltrate	✓	✓
→ Virales Antigen im Gehirnparenchym	Nicht nachweisbar	Nicht nachweisbar
→ Astrozytose	In grauer und weißer Substanz	Nur in grauer Substanz
→ Meningeale Infiltrate	✓	✓
→ Atrophie	Gering	Gering
→ Myelinabblassung	✓	Selten
Klinik	HIV	SIV
→ Retardierung	✓	✓
→ Motorische Störungen	Gering	Gering
→ Abnormalitäten	Subtile im psychologischen und psychiatrischen Bereich	Verminderte Reaktionszeit bei 75% der Tiere
Neurolog. Veränderung in der Spätphase der Erkrankung (AIDS-Stadium)		
Neuropathologie	HIV	SIV
→ Leukencephalopathie	✓	Selten
→ Mononukleäre Zellen mit multinukleären Riesenzellen	✓	✓
→ Virales Antigen/Virus	HIV Antigen oder RNA	SIV Antigen oder RNA
→ Astrozytose	In grauer und weißer Substanz	Nur in grauer Substanz
→ Atrophie	Schwer	Schwer
Klinik	HIV	SIV
→ Motorisch und kognitiv	Starke Störungen	Starke Störungen

Tabelle 4: Vergleich der neurologischen und neuropathologischen Veränderungen bei der Immunschwäche ausgelöst durch HIV beim Menschen und SIV beim Affen (da Cunha und Eiden, 1993)

Die Infektion des Gehirns findet bei SIV infizierten Makaken, wie auch bei HIV infizierten Menschen zu einem Zeitpunkt nahe der Infektion statt. SIV induziert ebenfalls Neuro-AIDS (Lackner et al., 1991). Perivaskuläre Makrophageninfiltrate, parenchymale Mikrogliaknötchen und mehrkernige Riesenzellen sind die als erstes auftretenden histopathologischen Veränderungen in SIV-infizierten Gehirnen der Makaken. Diese Veränderungen werden hauptsächlich in der zentralen weißen Substanz, den Basalganglien und der Brücke gefunden (Übersichtsartikel, Sopper et al., 2002). Reaktive Astrozyten umgeben normalerweise diese Infiltrate, sie kommen aber auch unabhängig von SIV-induzierten Läsionen vor. Die Mikrogliaknötchen und die

mehrkernigen Riesenzellen sind reich an viralem Antigen. Aber auch in verstreuten parenchymalen Mikrogliazellen und perivaskulären Makrophagen wurde virales Antigen gefunden (Czub et al., 1996). SIV-infizierte Rhesusaffen entwickeln genau wie die HIV-infizierten Menschen kognitive und motorische Beeinträchtigungen (Murray et al., 1992). Im Vergleich zu den zahlreichen histopathologischen Veränderungen ist die klinische neurologische Symptomatik bei SIV-infizierten Rhesusaffen nur sehr gering ausgeprägt. Offensichtliche neurologische Zeichen, wie Ataxie, Blindheit, Lethargie, Anfälle und Lähmungen treten erst in der späten AIDS-Phase unmittelbar vor dem Tode auf (Zink et al., 1997).

Das SIV-induzierte AIDS verläuft bei den Rhesusaffen in einem kürzeren zeitlichen Rahmen (Norley und Kurth, 1997). Etwa ein Drittel der Makaken, die mit einem pathogenen SI-Virus infiziert werden, entwickelt einen rapiden Verlauf der Erkrankung. Diese Tiere sterben innerhalb des ersten halben Jahres nach der Infektion. Die anderen Tiere mit einem langsameren Krankheitsverlauf überleben zwischen 8 Monaten und mehr als zwei Jahren (Sopper et al., 2002).

Histopathologisch zeigt sich eine Abblassung des Myelins im Gehirn bei den SIV-infizierten Makaken nur sehr selten (Rausch et al., 1994). Dies ist jedoch beim Menschen ein markantes Merkmal der HIV-Infektion des Gehirns (Budka et al., 1991). Weitere Unterschiede finden sich bei manchen durch das Virus ausgelösten Erkrankungen. So tritt vergleichsweise bei SIV-infizierten Rhesusaffen gewöhnlich keine Myelopathie und auch keine periphere Neuropathie auf (Price, 1996). Ebenso gibt es Unterschiede im Auftreten einzelner opportunistischer Infektionen.

Das Tiermodell bietet weitere Möglichkeiten: Medikamente, unter anderem neue Impfstoffe, können bezüglich ihrer Wirksamkeit getestet und eventuelle unerwünschte Wirkungen erkannt werden. An Tieren bezüglich ihrer Dosierung getestete Therapien lassen Rückschlüsse über Art und Dauer der Anwendung auf den Menschen zu (Joag, 2000). Jedoch können nicht alle Medikamente und Impfstoffe im SIV/Rhesusaffen-Modell getestet werden. Arzneimittel, die speziell gegen die vom humanen Immundefizienzvirus gebildeten viralen Enzyme gerichtet sind, zeigen natürlich beim SIV-infizierten Wirt keine Wirkung.

Trotz der genannten Einschränkungen steht mit dem SIV/Rhesusaffen-Modell ein geeignetes Tiermodell zur Verfügung, um die Pathogenese der HIV-Demenz, vor allem im frühen Stadium der Infektion, zu untersuchen. Das SIV/Rhesusaffen-Modell eignet sich zur Informationsgewinnung über die Virulenzfaktoren des HIV und ermöglicht es die beim Wirt ablaufenden Reaktionen auf das Virus detaillierter nachzuvollziehen.

1.4 Das dopaminerge System

1.4.1 Die drei wichtigsten dopaminergen Bahnen des Gehirns

Innerhalb des ZNS gliedert sich das dopaminerge System gemäß seiner unterschiedlichen Funktionen in verschiedene Bereiche. Die dopaminergen Nervenzellkörper liegen hauptsächlich im Mittel- und Zwischenhirn (Substantia nigra, ventrales Tegmentum und Hypothalamus) (siehe Abbildung 5). Mit ihren Fortsätzen bilden die Nervenzellkörper Bahnen. Diese unterteilen sich in

- das nigrostriatale Dopaminsystem,
- das mesolimbische/ mesokortikale Dopaminsystem
- und das tubero-infundibuläre System.

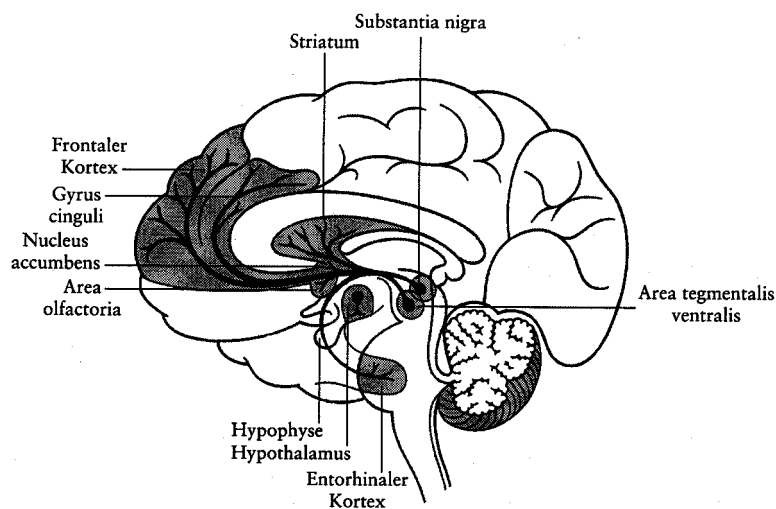


Abbildung 5: Die wichtigsten dopaminergen Neuronensysteme im menschlichen Gehirn

Die Fasern des nigrostriatalen Systems haben ihren Ursprung in der Substantia nigra und ziehen zum Corpus striatum (Putamen und Nucleus caudatus). Es gilt als oberste subkortikale Schaltstelle des extrapyramidal motorischen Systems. Die dopaminergen nigrostriatalen Fasern hemmen cholinerge Interneurone des Corpus striatum. Dadurch

können die weiterführenden GABAergen Neurone nicht mehr stimuliert werden. Somit verringert sich deren hemmender Einfluss auf Bewegungsabläufe. Aufgabe des Corpus striatum ist es, willkürliche Bewegungsabläufe zu kontrollieren. Bei Überfunktion des Striatums, zum Beispiel aufgrund Dopaminmangels, treten der Parkinsonkrankheit ähnliche Symptome auf. Ein progressiver Neuronenverlust im Striatum führt hingegen zur hyperkinetischen Erkrankungen, wie Chorea.

Die Zellkörper des mesolimbisch-mesokortikalen Systems liegen im Mittelhirn, in der Area tegmentalis ventralis, nahe bei der Substantia nigra. Ihre Axone projizieren zu Strukturen des limbischen Systems – wie zum Beispiel zum Corpus amygdaloideum, zum Nucleus accumbens, zur frontalen, zingulären und entorhinalen Hirnrinde und zum Tuberculum olfactorium. Diese Neuronen sind bei der Empfindung von Lust oder Freude vermehrt aktiv, weshalb auch von der mesolimbischen dopaminergen „Belohnungsbahn“ gesprochen wird. Neben der Kontrolle des motivationsbedingten Verhaltens ist das mesolimbisch-mesokortikale System wahrscheinlich auch an der Gedächtnis- und Lernfunktion beteiligt. Eine Überfunktion dieses dopaminergen Systems wird als eine mögliche Ursache von Psychosen angesehen. Stimulantien (zum Beispiel Kokain oder Amphetamin) steigern die Freisetzung von Dopamin in den limbischen Innervationsgebieten. Beim Opiatentzug hingegen ist die Freisetzung von Dopamin vermindert.

Die dopaminergen Neurone des tubero-infundibulären Systems haben ihre Zellkerne im Nucleus arcuatus und im Nucleus periventricularis des Hypothalamus. Von hier aus ziehen Axone zur Hypophyse und regulieren dort die Freisetzung von Hypophysenhormonen, wie zum Beispiel die Hemmung der Prolaktinsekretion (siehe Tabelle 5).

Dopaminsysteme	nigro-striatal	mesolimbisch/ mesokortikal	tubero-infundibulär
Ursprung	Substantia nigra (Pars compacta)	Mittelhirn (Area tegmentalis ventralis)	Hypothalamus (Nucleus arcuatus, Nucleus periventricularis)
Ende	Corpus striatum (Putamen und Nucleus caudatus)	Corpus amygdaloideum, Nucleus accumbens, frontale, zinguläre und entorhinale Hirnrinde, Tuberculum olfactorium	Hypophyse
Funktion	Extrapyramidal motorisches System	Empfindung von Lust oder Freude; Gedächtnis- und Lernfunktion	Regulation der Freisetzung von Hypophysenhormonen
Dysfunktion	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Parkinson ▪ Chorea 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Psychosen ▪ bei Opiatentzug 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hyperprolaktinämie

Tabelle 5: Übersicht über die drei wichtigsten dopaminergen Neuronensysteme im Gehirn

1.4.2 Die dopaminerge Synapse

Eine Synapse ist eine Umschaltstelle für die Informationsübertragung zwischen zwei Neuronen, oder zwischen Neuron und Erfolgsorgan. Die dopaminerge Synapse ist eine chemische Synapse, die den Neurotransmitter Dopamin zur Signalübertragung benötigt. Dopamin gehört zur Gruppe der Katecholamine bzw. biogenen Amine und kommt sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem vor.

1.4.2.1 Dopaminaufbau in der dopaminergen Präsynapse – Dopaminausschüttung - Dopaminabbau

Die für die Synthese der einzelnen Neurotransmitter notwendigen Enzyme befinden sich im Zytoplasma des Neurons und sind für den jeweiligen Neuronentyp, der immer nur einen bestimmten Neurotransmitter synthetisiert, charakteristisch.

Ausgangsstoff der Dopaminsynthese ist die Aminosäure Tyrosin (siehe Abbildung 6). Die Neuronen nehmen Tyrosin überwiegend aus dem Extrazellulärraum auf. Sie haben aber auch die Möglichkeit Tyrosin mit Hilfe der Tyrosinhydroxylase aus der

Aminosäure Phenylalanin selbst zu bilden. Die gesamte Dopaminsynthese findet im Zytoplasma des terminalen Endes des Neurons statt. Die für die Synthese notwendigen Enzyme, werden im Zellkörper der Nervenzelle synthetisiert und entlang des Axons zum terminalen Nervenende transportiert.

Tyrosin wird durch das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH) in 3,4-Dihydroxy-L-Phenylalanin (L-DOPA) umgewandelt. Als weiteres Substrat wird hierfür molekularer Sauerstoff (O_2) und als Kofaktor Biopterin benötigt. Die TH ist das für die Dopaminsynthese geschwindigkeitsbestimmende Enzym, sie liegt vorwiegend im Zytoplasma gelöst vor. Ihre Aktivität ist abhängig von der Endkonzentration des Dopamins im Zytoplasma. Somit erfolgt die steuernde Wirkung der TH im Rahmen einer negativen Rückkopplung. Die TH kann ebenfalls mit Hilfe einer Proteinkinase, durch reversible Phosphorylierung aktiviert werden.

Der nächste Schritt, die Umwandlung von L-DOPA zu Dopamin, wird durch das Enzym DOPAdecarboxylase (DDC) katalysiert. Hierfür wird Pyridoxin als Kofaktor benötigt. Die DDC ist ebenfalls im Zytoplasma gelöst.

Dopamin wird anschließend in Speichervesikel aufgenommen, im Zytoplasma ist Dopamin gewöhnlich nur in geringer Konzentrationen vorhanden. Die Aufnahme in die Vesikel erfolgt über einen vesikulären Membrantransporter (VMAT2), und ist an eine ATP-abhängige Protonenpumpe gekoppelt. Dopamin wird im Austausch gegen Protonen in das Innere des Vesikels transportiert. Durch die Anreicherung von Dopamin in den Vesikeln steht es in ausreichender Menge für die Dopaminfreisetzung zur Verfügung und wird gleichzeitig, vor weiterer Metabolisierung durch Enzyme des Zytoplasmas, geschützt. Außerdem übernehmen die Speichervesikel bei der Dopaminfreisetzung eine Mediatorfunktion.

Erreicht ein Aktionspotential das Axonende, öffnen sich spannungsabhängige Kalziumkanäle. Dadurch kommt es zu einem vermehrten Kalziumeinstrom. Die erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration bewirkt ein Verschmelzen des Speichervesikels mit der neuronalen Zellmembran. Die Vesikel entleeren ihren Inhalt in den synaptischen Spalt. Diesen Vorgang bezeichnet man als Exozytose. Die Dopaminmoleküle diffundieren nun durch den synaptischen Spalt zur postsynaptischen Membran des signalempfangenden Neurons. Dort sind die spezifischen Dopaminrezeptoren eingebaut.

Die Dopaminmoleküle bilden zusammen mit den Rezeptoren einen reversiblen Dopamin-Rezeptor-Komplex. Dadurch werden intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden aktiviert. Hier endet die Signalrolle des Transmitters.

Um eine Dauerstimulation der Rezeptoren zu vermeiden, muss Dopamin wieder aus dem synaptischen Spalt entfernt werden. Dies geschieht primär durch Aufnahme in Neuronen oder Gliazellen. Dabei ist die Wiederaufnahme (engl. reuptake) in das präsynaptische, dopaminerge Neuron mit Hilfe eines spezifischen Na⁺-cotransportierenden Transportproteins, dem Dopamintransporter (DAT), vorherrschend. In der Zelle wird das wiederaufgenommene Dopamin entweder erneut in Vesikeln gespeichert oder metabolisiert. Das in die Gliazellen aufgenommene Dopamin wird dort nicht gespeichert, sondern ausschließlich metabolisiert.

Die Metabolisierung ist beim Dopaminabbau immer ein sekundärer Inaktivierungsschritt, d.h. sie erfolgt erst nach Aufnahme des Dopamins in eine Zelle. Für die Metabolisierung stehen im wesentlichen zwei Enzyme,

- die Monoaminoxidase (MAO) und
- die Katecholamin-O-Methyltransferase (COMT) zur Verfügung.

Die MAO sitzt an der äußeren Membran der Mitochondrien. Die COMT ist im Zytoplasma gelöst und befindet sich in den Gliazellen. Sie fehlt in dopaminergen Neuronen. Im präsynaptischen Neuron findet demzufolge nur die oxidative Desaminierung des Dopamins durch die MAO, und die weitere Umwandlung zur 3,4-Dihydroxyphenylethylsäure (DOPAC) statt. Erst in den Gliazellen wird DOPAC, durch die COMT, zu Homovanillinsäure (HVA) methyliert. Dopamin kann von den Gliazellen auch direkt mit Hilfe der COMT, in 3-Methoxytyramin (3-MT) umgewandelt werden, das dann weiter zur Homovanillinsäure abgebaut werden kann (siehe Abbildung 6).

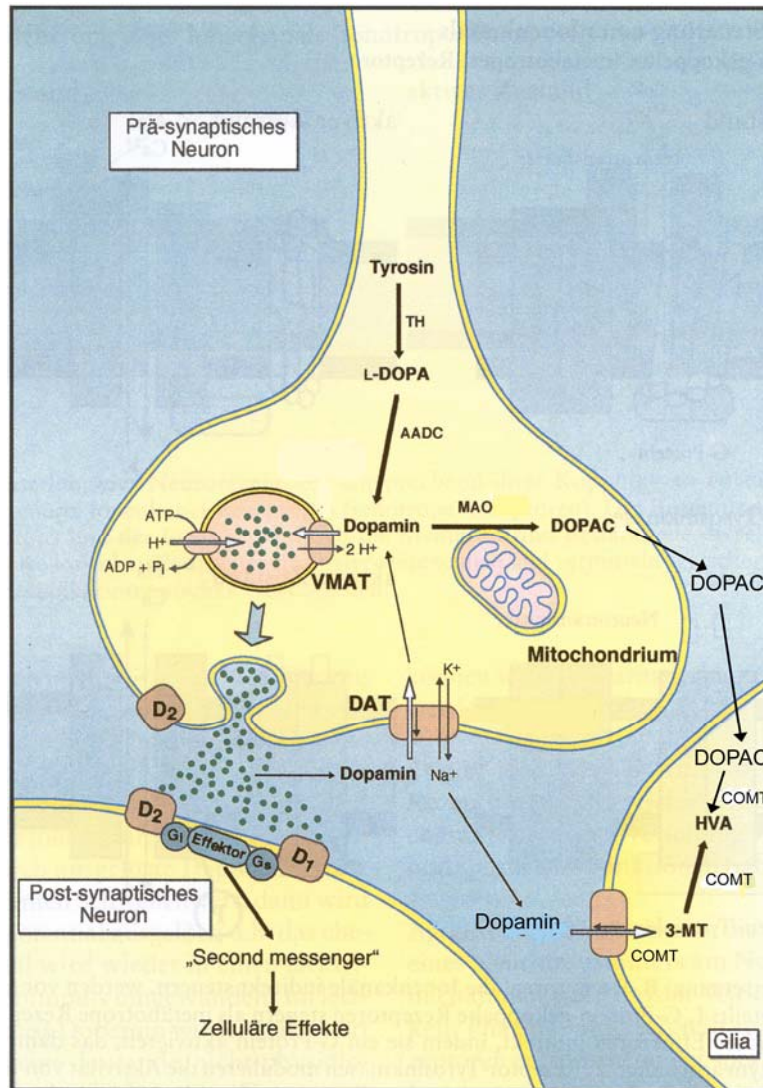


Abbildung 6: Die dopaminerge Synapse: Wesentliche molekulare Schritte der dopaminergen Neurotransmission. AADC, aromatische Aminosäuredecarboxylase (anderer Name DOPA-Decarboxylase); COMT; Katecholamin-O-Methyl-Transferase; D₁, D₂, Dopamin-Rezeptorsubtypen; DAT, Dopamin-Transporter; DOPAC, 3,4-Dihydroxyphenylethylsäure; G_i, Adenylatzyklase-inhibierendes G-Protein; G_s, Adenylatzyklase stimulierendes G-Protein; HVA, Homovanillinsäure; MAO, Monoaminoxidase; 3-MT, 3-Methoxytyramin; TH, Tyrosinhydroxylase; VMAT, vesikulärer Monoamin-Transporter (Gerlach et al., 2001).

1.4.2.2 Dopaminerge Postsynapse: Dopaminrezeptoren und Signaltransduktion

An der postsynaptischen Membran unterscheidet man fünf Dopaminrezeptoren (D₁ bis D₅). Sie lassen sich in zwei Gruppen einteilen, D₁ und D₅ bilden eine, D₂, D₃ und D₄ die andere Gruppe. Diese Einteilung gilt sowohl für pharmakologische Eigenschaften, als auch für die Transduktionsmechanismen. Zahlenmäßig überwiegen die Rezeptoren D₁ und D₂. Dopamin besitzt eine höhere Affinität zur D_{2/3/4}-Gruppe als zur D_{1/5}-Gruppe. Die beiden Gruppen unterscheiden sich weiterhin durch ihren Einfluss auf den „second messenger“.

messenger“ cAMP. Die D_{1/5}-Gruppe aktiviert die Bildung von cAMP, wohingegen die D_{2/3/4}-Gruppe eine inhibierende Wirkung auf die cAMP-Bildung hat. Ein Transmitter kann demnach über die verschiedenen Rezeptoren eine divergierende Wirkung entfalten.

D₁ und D₂ Rezeptoren haben ein ähnliches Verteilungsmuster im Gehirn. Die größte Dichte weisen sie in den Basalganglien (Striatum, Globus pallidus, Substantia nigra) auf, gefolgt vom Nucleus accumbens. Im frontalen Cortex sind sie nur in geringer Dichte zu finden. Über D₂-Rezeptoren erfolgt die Hemmung der cholinergen Interneurone im Corpus striatum, d.h. sie haben Einfluss auf die Motorik. Weiterhin wirkt Dopamin an den D₂-Rezeptoren hemmend auf die Prolaktinfreisetzung im Hypophysenvorderlappen.

Die am präsynaptischen Neuron sitzenden D₂-Rezeptoren werden als Autorezeptoren bezeichnet. Durch einen lokalen negativen rückkoppelnden Mechanismus wird über diese Autorezeptoren die Dopaminsyntheserate gesenkt und die Transmitterfreisetzung inhibiert. Diese Autoregulation, ausgelöst durch das im synaptischen Spalt vorhandene Dopamin, bezeichnet man auch als negatives „feedback“. D₃-Rezeptoren sind vor allem im limbischen System, einschließlich dem Nucleus accumbens, vorhanden. D₄-Rezeptoren wurden im frontalen Cortex, im Mittelhirn, in der Amygdala sowie in der Medulla gefunden.

Alle Dopaminrezeptoren sind G-Protein gekoppelt, d.h. sie geben die Information über ein guaninnucleotidbindendes Protein (G-Protein) an einen Effektor weiter. G-Protein gekoppelte Rezeptoren sind langsame Rezeptoren. D₁- und D₅-Rezeptoren stimulieren den Effektor, das Enzym Adenylatzyklase, über das G_s-Protein (s steht für stimulieren). Die D₂-, D₃- und D₄-Rezeptoren hingegen hemmen die Adenylatzyklase über das G_i-Protein (i steht für inhibieren) und können Kalium-Kanäle öffnen.

Wird die Adenylatzyklase aktiviert, führt dies zu einer vermehrten Umwandlung von ATP in zyklisches (cyclic) AMP (cAMP). Eine Möglichkeit der Signalweiterleitung durch das cAMP besteht in der Stimulation der cAMP abhängigen Proteinkinase A (PKA), deren freie katalytische Untereinheit (PKA-C) anschließend in den Zellkern hinein transloziert. Danach wird das cAMP durch die Phosphodiesterase zu 5'-AMP abgebaut (siehe Abbildung 7).

Im Zellkern erfolgt die Phosphorylierung des CREB (engl. cyclicAMP response element binding protein) durch die PKA-C. An das phosphorylierte CREB kann sich nun ein weiteres Protein, das CBP (engl. CREB-binding protein) binden. Das CBP beeinflusst wiederum den RNA Polymerase II Komplex, der die Transkription einleitet. In den meisten Fällen wird dadurch die Transkription aktiviert, es ist aber auch möglich, dass die Expression einiger Gene unterdrückt wird.

Die Dephosphorylierung von CREB wird durch die Proteinphosphatase-1 (PP1), und eventuell auch durch die Proteinphosphatase-2A katalysiert. Es wird angenommen, dass die PKA-C, nachdem sie CREB phosphoryliert hat, das Inhibitorprotein der PP1 (NIPP-1) ebenfalls phosphoryliert und damit inaktiviert. Somit wird die PP1 nicht mehr länger inhibiert und kann nun das phosphorylierte CREB dephosphorylieren (Nestler und Greengard, 1998).

CREB ist also ein Transkriptionsfaktor, über den cAMP Einfluss auf die Genexpression hat. Es ist im Zellkern an eine spezifische DNS-Sequenz „CRE“ (engl. cyclicAMP response element) gebunden. Diese befindet sich in den Promotorregionen der Gene und kann somit die Transkriptionsrate beeinflussen.

Die Zahl der neuronalen Gene, die CRE beinhalten, wächst mit der Anzahl der neu entschlüsselten Gene. Einige Beispiele hierfür sind die Gene für Tyrosinhydroxylase, Proenkephaline, Somatostatin und das vasoaktive Protein (VIP).

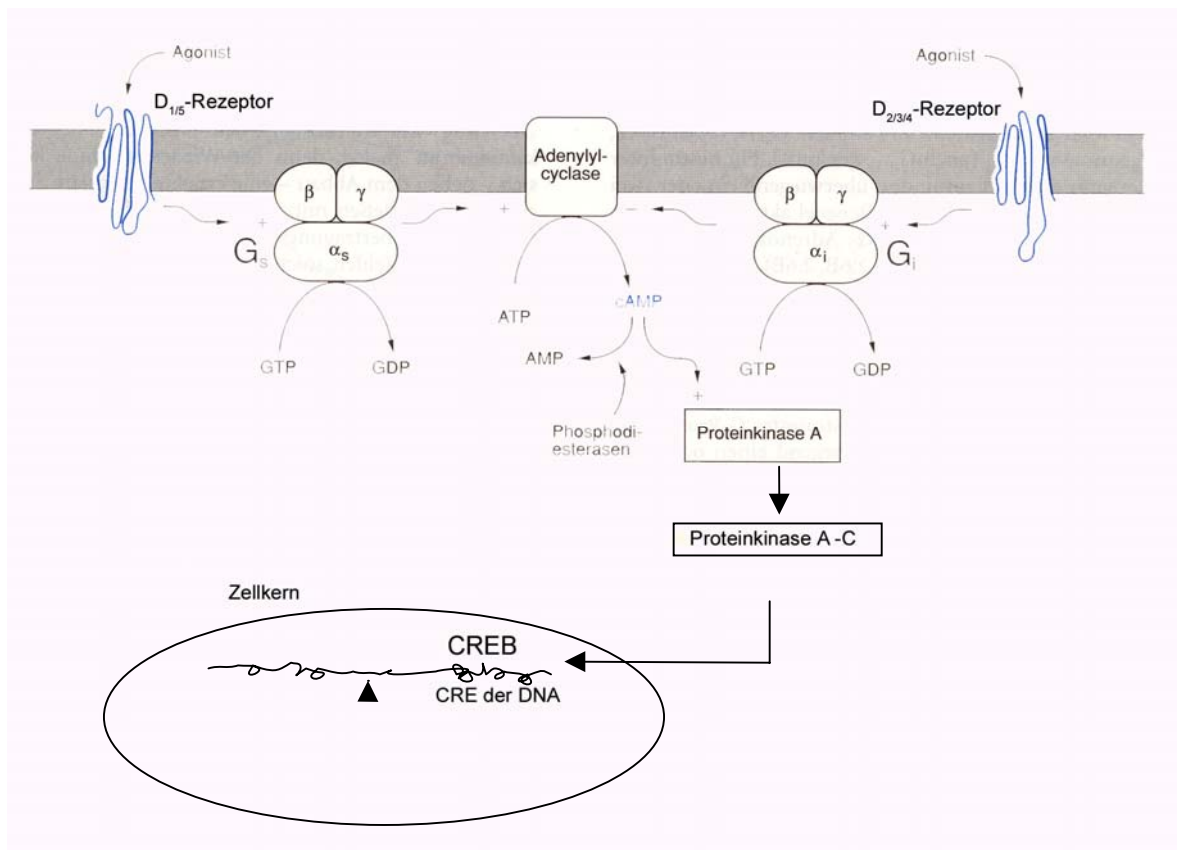


Abbildung 7: Signaltransduktion an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Der Extrazellulärraum ist oberhalb, der Intrazellulärraum unterhalb der Zellmembran zu denken. Pfeile bedeuten Stoffbewegungen, Stoffumwandlungen oder Beeinflussung. Die Dopaminrezeptoren sind durch Peptidketten symbolisiert. G_s steht für stimulierendes G-Protein, G_i für inhibierendes G-Protein. α, β, γ sind Proteinuntereinheiten (Forth et al., 2001).

1.5 Involvierung des dopaminergen Systems in die HIV-Demenz

Ein direkter Beweis für die Beteiligung des dopaminergen Systems an der HIV-Infektion ist die Abnahme von Dopamin und seinem Hauptabbauprodukt Homovanillinsäure im Liquor von AIDS Patienten (Berger et al., 1994). Es gibt weitere Hinweise, die den Einfluss des Immundefizienzvirus auf das dopaminerge System bekräftigen und an einen Zusammenhang der Veränderungen im dopaminergen System mit der Ausbildung der HIV-Demenz denken lassen (siehe Tabelle 6). So wurden bereits 1986 in Autopsiestudien von AIDS-Patienten Infiltrate von HIV-infizierten Makrophagen und mehrkernigen Riesenzellen in den dopaminreichen Basalganglien beschrieben (Navia et al., 1986b). Eine neuronale Degeneration in der dopaminergen Neurone enthaltenden Substantia Nigra ist in Gehirnen von AIDS-Patienten nachgewiesen worden (Itoh et al., 2000).

Humane Glioblastom- und Neuroblastomzellen, die zunächst mit HIV infiziert und anschließend mit Dopamin behandelt wurden, zeigten eine stark reduzierte Zellvitalität. Dieser Prozess konnte durch Antioxidantien, wie Ascorbinsäure, gehemmt werden (Koutsilieri et al., 1997b). Die toxische Wirkung von Dopamin auf HIV-infizierte Neuronen, sowie der Einfluss von Dopamin auf die HIV-Genexpression wurde in Versuchen bestätigt (Rohr et al., 1999). Darüber hinaus aktiviert Dopamin HIV in chronisch infizierten T-Lymphozyten, was durch Zugabe von Antioxidantien verhindert wird (Scheller et al., 2000). Hieraus kann man folgern, dass die Aktivierung des HIV in enger Verbindung mit intrazellulärem oxidativen Stress steht und dass eine hohe Dopaminkonzentration die Empfindlichkeit der Zelle für HIV erhöhen kann.

Aufgrund der Vielzahl ähnlicher Symptome, die HIV-Demenz und Parkinsonkrankheit gemeinsam sind - wie zum Beispiel Gang- und Haltungstörungen, psychomotorische Verlangsamung, Tremor, Apathie und motorische Sprachstörungen - kann man von ähnlichen pathogenetischen Mechanismen beider Erkrankungen ausgehen. Die Parkinsonkrankheit beruht auf dem Untergang dopaminerger Neurone des nigrostriatalen Systems, einer Neuronenschädigung, die auch bei der HIV-Demenz denkbar ist. Auf die Behandlung extrapyramidalen Symptome mit Dopaminrezeptorantagonisten reagieren HIV-infizierte Patienten hypersensitiv (Hriso et al., 1991). Bereits bestehende Veränderungen im dopaminergen System könnten diese empfindliche Reaktion erklären.

Drogen zeigten in Verbindung mit den viralen Proteinen Tat und gp120 in *in vitro* Versuchen synergistische neurotoxische Eigenschaften (Nath et al., 2000). Bei HIV-infizierten und zugleich drogenabhängigen Patienten besteht eine höhere Inzidenz der HIV-Demenz (Bell et al., 1996) und der Ausbildung neurologischer Ausfallerscheinungen (Shapshak et al., 1996). Die bei diesen Patienten vorliegenden pathologischen Veränderungen des Gehirns ähneln den bei SIV-infizierten Makaken durch die Gabe dopaminerger Substanzen ausgelösten neurodegenerativen Veränderungen. Drogenmissbrauch führt zu einer Dysregulation der Dopaminfunktion im Gehirn. Dopaminerge Neurone des mesolimbischen/mesokortikalen Systems werden aktiviert, womit sich die Dopaminkonzentration im synaptischen Spalt erhöht. Die Kombination von HIV und erhöhter Dopaminkonzentration im ZNS könnte eine

mögliche Erklärung für das vermehrte Auftreten der HIV-Demenz bei drogenabhängigen HIV-Infizierten sein.

Liquoruntersuchungen an SIV-infizierten Makaken ergaben einen Anstieg der DOPAC bereits in der asymptomatischen Phase der SIV-Infektion. Die Konzentration der HVA blieb im Vergleich zu uninfizierten Tieren konstant (Koutsilieri et al., 1997a). Diese alleinige Erhöhung der DOPAC-Konzentration deutet auf Pathomechanismen im präsynaptischen Teil der dopaminergen Synapse hin, da nur dort DOPAC als Abbauprodukt von Dopamin entstehen kann.

In weiteren Studien konnte bei SIV-infizierten Rhesusaffen in den Hirnregionen Putamen, Hippocampus und im frontalen Kortex im Vergleich zu uninfizierten Tieren eine Verringerung der Dopaminkonzentration bereits in der asymptomatischen Phase der Infektion nachgewiesen werden. Die verringerte Dopaminkonzentration im Putamen im Vergleich zur unveränderten Dopaminkonzentration in der Substantia Nigra bei infizierten Rhesusaffen weist auf eine primäre Veränderung an den dopaminergen Nervenendigungen im postsynaptischen Bereich des Neurons hin (Czub et al., 2001). Möglicherweise könnte eine retrograde Degeneration der dopaminergen Neurone zu den - in späteren Stadien der HIV-Demenz bei AIDS-Patienten sichtbaren - Veränderungen der Substantia nigra führen.

Werden SIV-infizierte Makaken mit Selegilin behandelt, normalisiert sich zwar die Dopaminkonzentration im Gehirn, gleichzeitig ist jedoch in histologischen Untersuchungen eine starke Schädigung des ZNS sichtbar. Das Gewebe weist diffuse vakuoläre Degenerationen, sowie mannigfaltig verbreitete Lymphozytenansammlungen auf. Diese Veränderungen sind bisher nur aus dem AIDS-Stadium der Infektion bekannt. Sie lagen bei den mit Selegilin behandelten Tieren bereits in der früheren Phase der Infektion vor. Diese histopathologischen Veränderungen wurden vor allem in den dopaminreichen Basalganglien gefunden. Zudem war die Zahl der SIVmRNA exprimierenden Zellen bei den SIV-infizierten, mit Selegilin behandelten Tieren ebenfalls erhöht (Czub et al., 2001). Selegilin fördert also die virale Replikation im Gehirn SIV-infizierter Makaken. Die gleichen Resultate wurden bei der Behandlung SIV-infizierter Makaken mit L-DOPA erzielt. Dies bedeutet, dass eine erhöhte Verfügbarkeit von Dopamin in einem mit Retrovirus infizierten Gehirn eher mit der

Induktion neuropathologischer Veränderungen in Verbindung gebracht werden kann, als mit einer neuroprotektiven Funktion. Dopamin kann möglicherweise sogar die Neurodegeneration während einer Retrovirusinfektion beschleunigen.

<i>In vitro</i> Experimente	HIV-Infektion	SIV-Infektion
<ul style="list-style-type: none"> • Dopamin erhöht die HIV-Genexpression 	<ul style="list-style-type: none"> • Infiltrate von HIV-infizierten Zellen in Basalganglien 	<ul style="list-style-type: none"> • Anstieg der DOPAC Konzentration im Liquor von SIV-inf. Rhesusaffen
<ul style="list-style-type: none"> • Antioxidantien wirken der durch Dopamin erhöhten HIV-Replikation entgegen 	<ul style="list-style-type: none"> • Abnahme der Dopaminkonz. und der Homovanillinsäurekonz. im Liquor von AIDS Patienten 	<ul style="list-style-type: none"> • Verringerung der Dopaminkonzentration in Putamen, Hippocampus und im frontalen Kortex bei SIV-inf. Rhesusaffen
<ul style="list-style-type: none"> • Synergistische Wirkung von Dopamin und HIV auf die Neurodegeneration 	<ul style="list-style-type: none"> • Neurodegeneration der Substantia Nigra in Gehirnen von AIDS Patienten 	<ul style="list-style-type: none"> • Histopathologische Schädigung des ZNS bei Behandlung von SIV-inf. Rhesusaffen mit Selegilin oder L-DOPA
<ul style="list-style-type: none"> • Synergistische Wirkung von Drogen und HIV auf die Neurodegeneration 	<ul style="list-style-type: none"> • Symptome der HIV-Demenz ähneln denen der Parkinsonkrankheit • Höhere Inzidenz der HIV-Demenz bei Drogenabhängigen 	<ul style="list-style-type: none"> • Förderung der viralen Replikation im Gehirn von SIV-infizierten Rhesusaffen durch Selegilin oder L-DOPA

Tabelle 6: Hinweise für die Involvierung des dopaminergen Systems bei der HIV-Demenz

Viele verschiedene Aspekte deuten demnach auf eine Involvierung des dopaminergen Systems in der Pathogenese der HIV-Demenz hin. Dopamin könnte als Kofaktor die Bildung von freien Radikalen und Zytokinen wie TNF- α , IL-1, IL-6 fördern und zu einer beschleunigten Entwicklung der HIV-Demenz führen. Ebenso könnte Dopamin selbst oder in Wechselwirkung mit Glutamat eine Neurodegeneration sowie eine Dysregulation der Neurotransmitter hervorrufen (siehe Abbildung 8). Die Therapie der HIV-Demenz mit dopaminsteigernden Medikamenten könnte somit den Verlauf der Erkrankung negativ beeinflussen.

Es stellt sich die Frage, welchen Einfluss Dopamin auf die HIV-Infektion hat und vor allem, wie und in welchem Ausmaß das dopaminerge System im Rahmen der HIV-Demenz mitbetroffen ist.

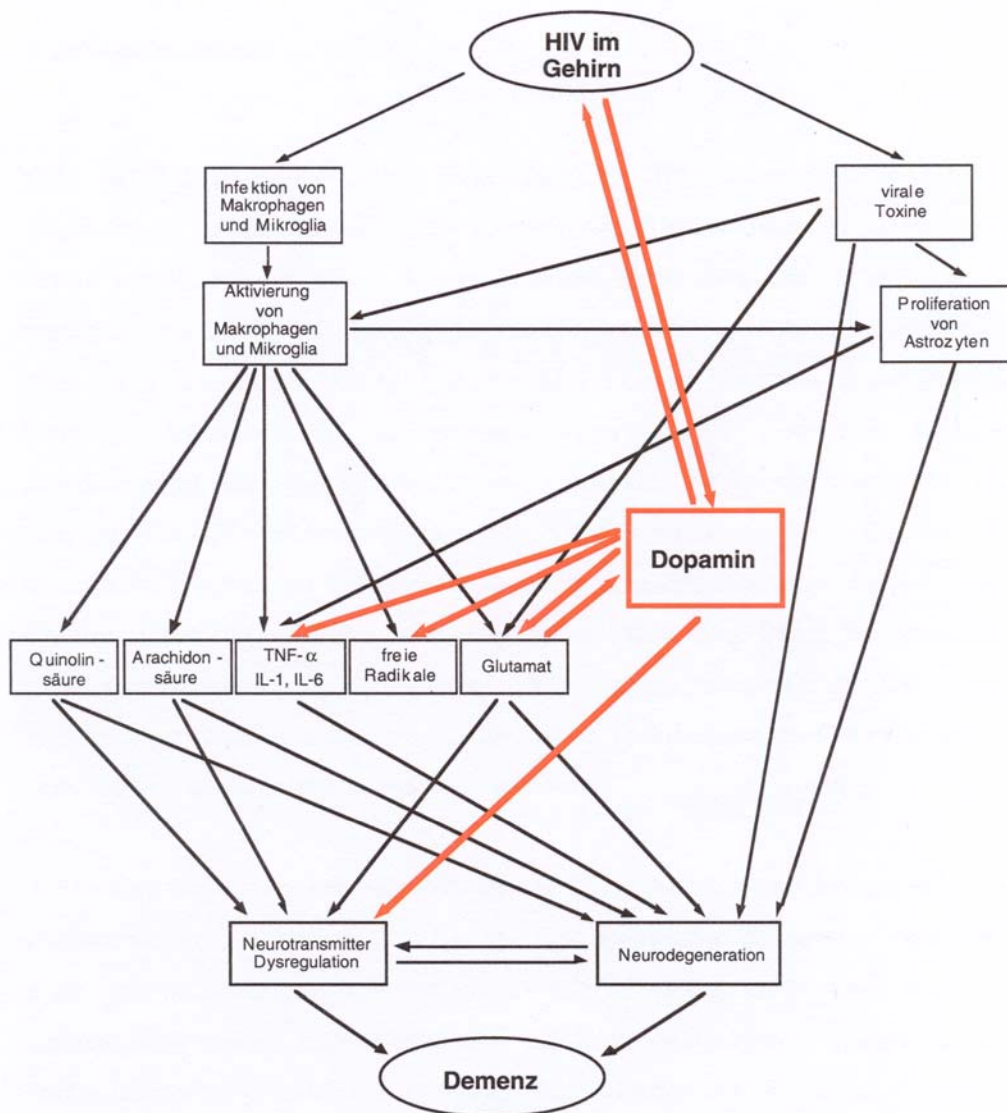


Abbildung 8 : Hypothetische Darstellung der Pathogenese der HIV-Demenz: Einfluss des Neurotransmitters Dopamin, als Kofaktor bei der Demenzentwicklung (Koutsilieri et al., 2002a).

1.6 Offene Fragen

Trotz Anwendung der HAART bei HIV-infizierten Patienten sank die Prävalenz der HIV-Demenz nicht in dem Maße wie die anderer AIDS-definierender Erkrankungen (Dore et al., 1999) (siehe 1.2.4). Die HAART schützt offenbar nur ungenügend vor dem Auftreten der HIV-Demenz, deshalb ist die Entwicklung neuer zielgerichteter Therapiemöglichkeiten, die dem Auftreten und der Progredienz der HIV-Demenz entgegenwirken, notwendig. Hierfür ist es unerlässlich, die Pathogenese der HIV-Demenz, gerade in der frühen Phase der Infektion besser zu verstehen, und somit eine Grundlage für die Entwicklung neuer Therapieansätze zu schaffen.

In der frühen Phase der HIV-Infektion ist es kaum möglich Versuche an menschlichem Hirngewebe durchzuführen, da die Infektion in diesem Stadium meistens noch nicht bekannt ist. Ebenso ist auch die Gewinnung von Biopsiematerial von Menschen für Forschungszwecke unter ethischen Gesichtspunkten problematisch. Zur Erforschung grundsätzlicher Fragestellungen eignet sich das SIV/Rhesusaffen-Modell als hervorragende Alternative (siehe 1.3).

Es gibt Hinweise, dass das dopaminerge Neurotransmittersystem eine Rolle in der Entwicklung der HIV-Demenz spielt. Eine erniedrigte Konzentration von Dopamin und seinen Abbauprodukten lässt sich schon in der frühen Phase der Retrovirusinfektion nachweisen. Dopaminerge Substanzen, wie L-DOPA oder Selegilin, die die Dopaminkonzentration im ZNS steigern, haben ambivalente Auswirkungen auf das ZNS. Einerseits können dopaminerge Substanzen die symptomatischen - der Parkinsonkrankheit ähnlichen - Erscheinungen der HIV-Demenz mildern. Andererseits wird bei SIV-infizierten und mit dopaminergen Substanzen behandelten Rhesusaffen die Progression des Krankheitsverlaufes beschleunigt. Eine Erhöhung der Dopaminkonzentration fördert die Neurodegeneration und steigert die Virusreplikation im ZNS. Dopamin kann also als Kofaktor die Entwicklung der HIV-Demenz beschleunigen (siehe 1.5).

Allerdings ist der genaue Wirkmechanismus des dopaminergen Systems auf die Entwicklung der HIV-Demenz noch nicht geklärt. Bisher sind diesbezüglich nur Studien über die Präsynapse vorhanden wie zum Beispiel über Synthese und

Metabolismus von Dopamin. Es ist nicht bekannt wie sich im synaptischen Spalt die veränderte Dopaminkonzentration auf das postsynaptische Neuron auswirkt, insbesondere ob es zu einer veränderten Signaltransduktion kommt und welche Folgen dies auf die Neurodegeneration hat. Aus diesen Gründen sind genauere Untersuchungen zur Signaltransduktion in Hirnarealen, in denen Dopamin freigesetzt wird, unerlässlich. Hierzu zählen Nucleus Accumbens, Corpus amygdaloideum und Putamen (siehe 1.4).

Zur Analyse eignen sich hierfür der „second messenger“ cAMP und das Protein CREB, welche in der dopaminergen Signalkaskade wichtige Elemente darstellen. Ein Nachweis der Konzentration von CREB in SIV-infizierten und uninfizierten Tieren kann Aufschluss über den möglichen Einfluss einer veränderten Dopaminkonzentration auf die Genexpression des Neurons geben. Dadurch wäre die Möglichkeit eines Erklärungsansatzes für die neuropsychologischen Veränderungen gegeben.

Durch Konzentrationsbestimmung von cAMP und CREB in mit L-DOPA oder Selegilin behandelten Rhesusaffen lässt sich der direkte Einfluss der veränderten Dopaminkonzentration auf die untersuchten Hirnareale beurteilen.

Eine Beurteilung der Auswirkung dopaminergere Medikamente auf die dopaminerge Signaltransduktion SIV-infizierter Rhesusaffen ist durch den Vergleich des cAMP- und CREB-Spiegels in SIV-infizierten, unbehandelten Rhesusaffen, mit dem in SIV-infizierten und mit dopaminergen Medikamenten behandelten Tieren möglich.

In dieser Arbeit soll die Signaltransduktion von Dopamin in den dopaminergen Arealen des Gehirns SIV-infizierter Rhesusaffen, mit Hilfe der Analyse von cAMP und CREB, untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

- Anti-CREB [rabbit polyclonal IgG (polyklonales Kaninchen IgG)], (Biomol, Hamburg, Deutschland) Cat.: 06-863
- Anti-rabbit-IgG (Anti-Kaninchen IgG), HRP-linked Antibody (Meerrettichperoxidase-gebundener Antikörper), (Cell Signaling, BioLabs, Frankfurt am Main, Deutschland) Cat.: 7074
- Aqua bidest.
- Bio-Rad Protein Assay – Farbstoff Konzentrat, (Bio-Rad, München, Deutschland) Cat.: 500-0006
- BOA-Best of All-Protein Marker, (Biomol, Hamburg, Deutschland) Cat.: 55875
- Calyculin A, (Sigma, St. Louis, USA) Cat.: C-5552
- Color Marker, wide range, (Sigma, St. Louis, USA) Cat.: C-3437
- Cyclic AMP (low pH) Immunoassay, (R&D Systems, Minneapolis, USA) Cat.: DE0355 mit folgenden Bestandteilen:
 - Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (Part R80060)
 - cAMP conjugate (enzymmarkiertes cAMP) (Part R80193)
 - cAMP Standard (Part R80056)
 - cAMP Antikörper Lösung (Part R80604)
 - HCl (Part R80080)
 - Neutralizing Reagent (Neutralisierungsreagenz) (Part R80190)
 - Wasch Puffer Konzentrat (Part R80016)
 - pNPP Substrat (Part R80075)
 - Stop Lösung (Part R80247)
- DTT, (Sigma, St. Louis, USA) Cat.: D-9163
- ECL–Nachweisreagenz: Western blotting detection Reagenz (Western Blot Nachweis Reagenz) [Anti-rabbit-IgG, peroxidase-linked species-specific F(ab')₂

Fragment (from donkey) (Anti-Kaninchen-IgG, Peroxidase-gebundenes Spezies-spezifisches F(ab')₂ Stück vom Esel)], (Amersham , Piscataway, USA) Cat.: RPN 2106

- EGTA, (Sigma, St. Louis, USA) Cat.: E-4378
- Entwicklerkonzentrate für Entwicklerlösung, (Adefo, Nürnberg, Deutschland) Cat.: 03152
- Fixierkonzentrate für Fixierlösung, (Adefo, Nürnberg, Deutschland) Cat.:03153
- HEPES, (Sigma, St. Louis, USA) Cat.: H-3375
- Magermilchpulver, (Heirler, Radolfzell, Deutschland)
- Magnesiumchlorid, (Sigma, St. Louis, USA) Cat.: M-8266
- Mark 12 Unstained Standard, (ungefärbeter Standard), (Invitrogen, Novex, , Carlsbad, USA) Cat.: LC5677
- Natriumchlorid, (Merck, Darmstadt Deutschland) Cat.:1.06400
- Natronlauge, (Merck, Darmstadt Deutschland) Cat.: 1.05588
- Okadaic Acid (OA), (Sigma, St. Louis, USA) Cat.: O-4511
- PMSF, (Sigma, St. Louis, USA) Cat.: P-7626
- Protein Standard II: Bovine Plasma Albumin (Rinder Plasma Albumin), (Bio-Rad, München, Deutschland) Cat.: 500-0007
- Saccharose, (Merck, Darmstadt Deutschland) Cat.: 1.07687
- Salzsäure, (Merck, Darmstadt Deutschland) Cat.: 1.09911
- Seablue Prestained Standard (vorgefärbter Standard), (Invitrogen, Novex, Carlsbad, USA) Cat.: 45625
- Tris Gly SDS Running Buffer (Laufpuffer) (10 x), (Novex, Invitrogen, Carlsbad, USA) Cat.: LC2675
- Tris Gly Transfer Buffer (Transferpuffer) (25 x), (Novex, Invitrogen, Carlsbad, USA) Cat.: LC 3675
- TRIZMA®-Base, (Tris(hydromethyl)aminomethane), (Sigma, St. Louis, USA) Cat.: T-1503
- Tris-Glycine SDS Sample Buffer (Probenpuffer), (Novex, Invitrogen, Carlsbad, USA) Cat.: LC2676
- Tween 20, (Aldrich, Steinheim, Deutschland) Cat.: 27,434-8

2.1.2 Geräte und Sonstiges

- AGFA Medical X-Ray Film, Curix, (AGFA, Mortsel, Belgien) Cat.: HT1.000G Plus
- Chemische Waage Mettler HL 52, (Mettler, Geissen, Schweiz), Messgenauigkeit $\pm 0,01\text{mg}$
- Chemische Waage Mettler PM 300, (Mettler, Geissen, Schweiz), Messgenauigkeit $\pm 0,01\text{g}$
- Platten-Spektralphotometer: MR 4000, (Dynatech, Virginia, USA)
- Gefrierschrank: REVCO, (Genheimer, Hettstadt, Deutschland)
- Gel Loading Tips (Gelbeladespitzen), (Novex, Invitrogen, Carlsbad, USA) Cat.: LC1010
- Kühlplatte: Haake K, (Haake, Karlsruhe, Deutschland)
- Küvetten (10x4x45mm), (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) Cat.: REF67.742
- Netzgerät: Microcomputer Electrophoresis Power Supply, (Consort, Belgien)
- Nitrocellulose Membran, (Novex, Invitrogen, Carlsbad, USA) Cat.: LC2001
- Multi-Reagenz-Waschgerät, (Dynatech, Virginia, USA)
- PH- Meter: PH 530, (WTW, Weilheim, Deutschland)
- PP-Handmikrohomoenisator für 1,5 ml Reaktionsgefäße
- Schüttler: KS501 digital, (IKA Labortechnik, Stauffen, Deutschland)
- Spektrophotometer, (Perkin – Elmer, Überlingen, Deutschland)
- Gel: 10 % Tris-Glycine Gel, (1,0 mm x 12 well), (Novex, Invitrogen, Carlsbad, USA) Cat.: EC60752
- Thermomixer comfort, (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Thermoschüttler Thermostar, (BMG, Offenburg, Deutschland)
- Vortex: Genie 2, (Hartenstein, Würzburg, Deutschland)
- Tischzentrifuge, (Heinse + Ziller, Würzburg, Deutschland)

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

2.2.1.1 Haltung

Im Deutschen Primaten Zentrum in Göttingen wurden Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) gehalten. Ihr Alter betrug durchschnittlich $3,7 \pm 0,6$ Jahre. Die Tiere lebten in

Einzelkäfigen bei einem circadianen Rhythmus mit 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit. Wasser stand ihnen ständig zur Verfügung, zu fressen bekamen sie zweimal täglich Trockenfutter mit frischen Früchten.

Die Tierversuche wurden von der Ethikkommission für Tierversuche der Bezirksregierung Braunschweig genehmigt (604.42502/08-02.95) und nach deren Richtlinien durchgeführt.

2.2.1.2 Pharmakologische Darstellung

Die Rhesusaffen wurden in sechs Gruppen aufgeteilt: Es gab eine Kontrollgruppe (uninfiziert/unbehandelt); eine mit SIV-infizierte/unbehandelte; eine SIV-infizierte/mit Selegilin behandelte; eine uninfizierte/ mit Selegilin behandelte; eine SIV-infizierte/mit L-DOPA behandelte; sowie eine uninfizierte/ mit L-DOPA behandelte Gruppe.

2.2.1.3 Infektion

Unter Ketaminnarkose (10 mg/kg) wurden chinesische Rhesusaffen mit einem Virenstamm mit bevorzugt makrophagotroper Wirkung, dem Virus SIVmac251MPBMC infiziert. Rhesusaffen aus Indien wurden mit Virustyp SIVmac239, einem lymphotropen Virenstamm, infiziert.

Zwei Wochen nach der Infektion war die maximale Virämie erreicht. Die Rhesusaffen der Gruppe „SIV-infiziert, mit Selegilin behandelt“, bekamen von diesem Zeitpunkt an einmal täglich bis zur ihrer Tötung Selegilin (2 mg/kg) i.m. injiziert. Uninfizierte Tiere der Selegilingruppe wurden mit dergleichen Dosis Selegilin behandelt.

Die Behandlung SIV-infizierter Rhesusaffen mit L-DOPA begann ebenfalls zwei Wochen nach der Infektion. Die Tiere beider Gruppen, SIV-infiziert und uninfiziert, wurden zweimal täglich mit 50 mg/kg L-DOPA p.o. (mit Hilfe von Bananen) behandelt. L-DOPA wurde zusammen mit 12 mg/kg Benserazid gegeben um die periphere Verstoffwechslung von L-DOPA zu Dopamin zu verhindern.

2.2.1.4 Tötung

Unbehandelte Tiere wurden zusammen mit behandelten Tieren jeweils zu unterschiedlichen Zeitpunkten der SIV-Infektion (acht bis 57 Wochen nach Infektion) getötet. Die betäubten Tiere starben durch Ausbluten und wurden mit RPMI 1640

perfundiert. Das Gehirn wurde möglichst schnell entfernt, in größere Teilstücke geschnitten und bis zur weiteren Sektion bei -70°C tiefgefroren.

2.2.1.5 Sektion

Die weitere Sektion erfolgte auf einer auf -20°C gekühlten Teflonplatte, da das Gewebe bei -70°C zu hart zum Schneiden ist. Mit Hilfe eines Skalpells wurden aus den entsprechenden Hirnteilen die einzelnen Gehirnregionen präpariert. Diese wurden mit Hilfe eines Standardatlasses (z.B. Heimer, 1983, Nieuwenhuys et al, 1988) identifiziert. Anschließend wurde die weiße Substanz entfernt und die erhaltenen Gewebeproben bis zur neurochemischen Analyse bei -70°C gelagert.

2.2.2 Archivierung

Die einzelnen Hirnregionen der Affen wurden jeweils in einem Eppendorf-Cup in Kryoboxen im Gefrierschrank bei -70°C aufbewahrt.

Anmerkung 1: Legt man sich für jede Kryobox eine Tabelle (Kreuzgitter) an, in der alle Proben der Box protokolliert sind, erspart man sich viel Zeit beim Suchen der einzelnen Proben.

In einer den Anforderungen der vorliegenden Arbeit angepassten Microsoft Access Datenbank wurden Daten wie Affennummer, Herkunft des Affen, die Behandlung und Infektion des Affen, die vorhandenen Hirnregionen etc. archiviert (siehe Abbildung 9).

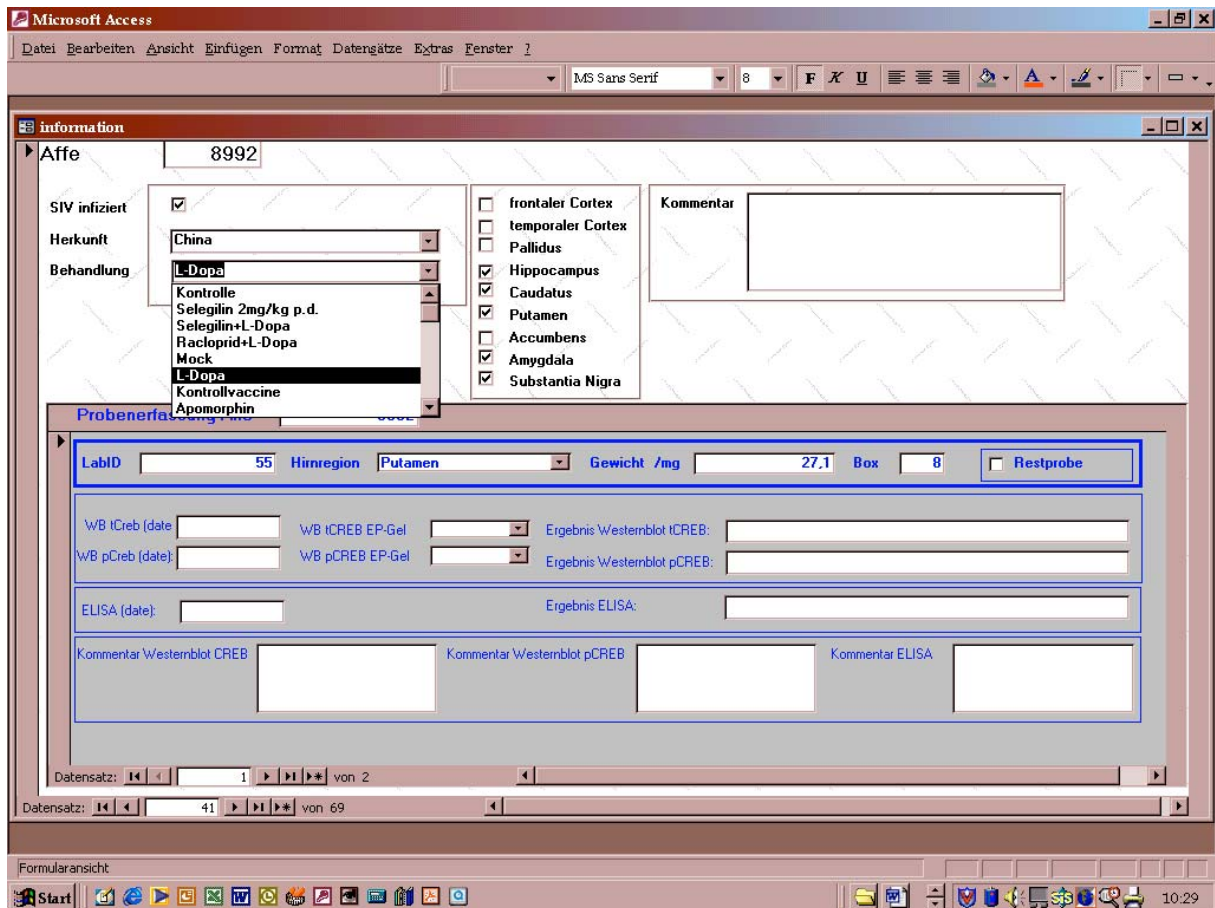


Abbildung 9: Eingabebildschirm der Datenbank

2.2.3 cAMP Messung

2.2.3.1 Probengewinnung

Von den tiefgefrorenen Gewebestücken der jeweiligen Hirnregionen wurde eine Gewebemenge von 15-20 mg abgewogen. Die abgewogenen Proben und die ursprünglichen Gewebeproben wurden anschließend wieder im Gefrierschrank bei -70°C aufbewahrt.

Anmerkung 2: Vor dem Wiegen muss erst vom vorliegenden Gewebestück mit Hilfe von Pinzette und Skalpell ein kleines Stückchen – am besten in einer Petrischale - abgeschnitten werden. Dabei legt man die Petrischale auf einen Trockeneisblock, der mit 4-5 Zellstofftüchern bedeckt ist. Somit wird das tiefgefrorene Gewebe soweit erwärmt, dass es schneidbar ist, aber dennoch nicht auftaut.

Die abgewogenen Gewebestücke wurden im Verhältnis 1:20 (Gewicht : Volumen) mit 0,1 N Salzsäure (HCl) homogenisiert und anschließend bei 600 g und 0°C für 5 Minuten zentrifugiert (Tischzentrifuge, Heinse + Ziller, 3000 Umdrehungen/min). Der Überstand

wurde abpipettiert, das Pellet verworfen. Im Anschluss daran wurden die Proben im Gefrierschrank bei -70°C aufbewahrt.

Anmerkung 3: Die entsprechende Menge des Puffers wurde zum Gewebe in das Eppendorf Cup pipettiert. Mit Hilfe des PP-Handmicrohomogenisators wurde das Gewebestück im Eppendorf Cup homogenisiert bis keine Gewebestücke mehr im Cup zu erkennen waren. Das Cup wurde dabei in ein Becherglas mit Eiswasser gehalten.

2.2.3.2 Prinzip des Enzymimmunassays

Die verwendete Methode basiert auf dem Prinzip der kompetitiven Bindungstechnik (siehe Abbildung 10). Hierbei konkurriert eine unbekannte Menge Antigen der zu untersuchenden Probe (natürliches Antigen) mit einer konstanten Menge desgleichen, jedoch enzymmarkierten Antigens um dieselbe Bindungsstelle eines Antikörper, der das Antigen spezifisch bindet. Dafür muss dieser Antikörper im Unterschuss vorliegen.

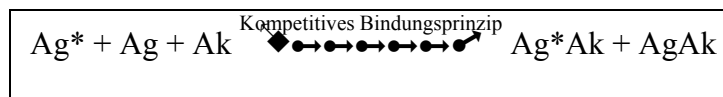


Abbildung 10: Reaktionsschema des kompetitiven Enzymimmunassays. Eine konstante Menge enzymmarkiertes Antigen (Ag^*) und eine variable Menge Antigen der zu untersuchenden Probe (Ag) konkurrieren um eine definierte, im Unterschuss vorliegende Menge Antikörper (AK) (Bruhn und Fölsch, 1999).

Dieser antigenspezifische Antikörper bindet an einen zweiten Antikörper, der wiederum an die verwendete Mikrotiterplatte gebunden ist. Um die Aktivität der enzymmarkierten Antigen-Antikörper-Komplexe bestimmen zu können, wird eine spezifische Substratlösung dazugegeben. Dadurch kommt es zu einer Farbentwicklung, die durch Zugabe einer Stop-Lösung abgebrochen wird. Die Farbintensität ist umgekehrt proportional zur Konzentration des zu bestimmenden Antigens in der Probe. An einem Spektralphotometer wird die Extinktion einer jeden Vertiefung der Mikrotiterplatte gemessen. Die Auswertung erfolgt über eine Standardkurve. Dabei werden die gemessenen Extinktionen der Proben mit den Extinktionen der Verdünnungsreihe des Standards (= Lösung mit bekannter Konzentration des nichtmarkierten Antigens) verglichen. Somit kann man auf die Konzentration des zu bestimmenden Antigens der Proben schließen (siehe Abbildung 11).

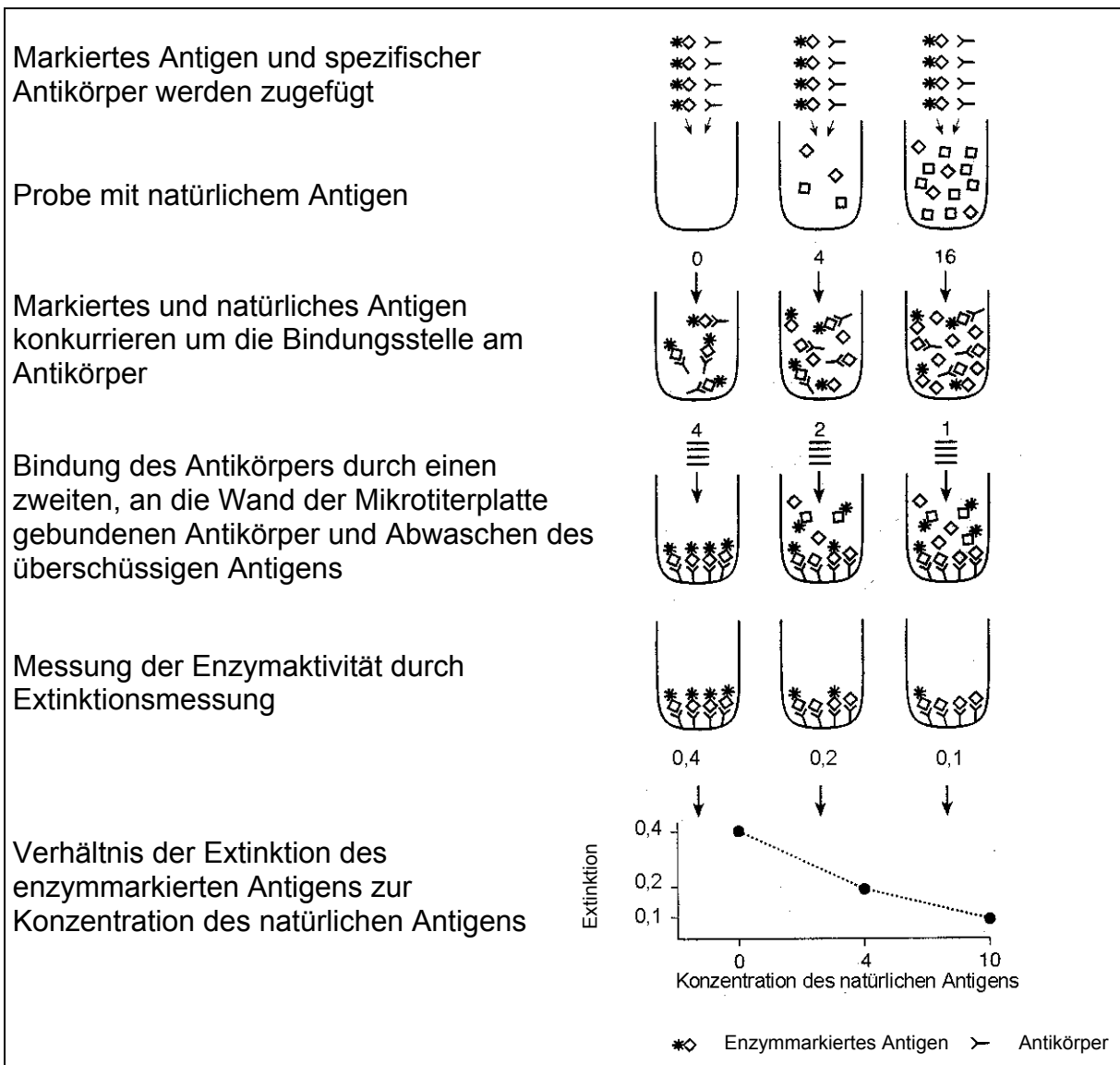


Abbildung 11: Schematische Darstellung eines Enzymimmunoassays (Bruhn und Fölsch, 1999)

Dieser Assay eignet sich zur Bestimmung der cAMP-Konzentration. Dafür wird die Probe mit dem zu bestimmenden cAMP mit einer konstanten Menge eines mit alkalische Phosphatase markierten cAMP („cAMP-conjugate“) und einer konstanten geringen Menge eines für cAMP spezifischen polyklonalen Kaninchen-Antikörpers zur Einstellung eines Gleichgewichts miteinander inkubiert. Das in der Probe enthaltene cAMP konkurriert nun mit dem enzymmarkierten cAMP um die Bindungsstelle am polyklonalen Kaninchen-Antikörper.

Außerdem bindet sich während der Inkubationszeit der polyklonale Kaninchen-Antikörper an den Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper, der wiederum an die Mikrotiterplatte gebunden ist. Der anschließende Waschvorgang entfernt das überschüssige Konjugat und die überschüssige ungebundene Probe.

Um die Aktivität der mit alkalischer Phosphatase markierten cAMP-Antikörper-Komplexe bestimmen zu können, wird nun eine spezifische Substratlösung [pNPP (p-Nitrophenylphosphat) Substrat] dazugegeben. Dadurch kommt es zu einer gelben Farbentwicklung, die durch Zugabe einer Stop-Lösung abgebrochen wird. Die Farbintensität ist umgekehrt proportional zur Konzentration des cAMP in der jeweiligen Probe. Die Extinktion wird an einem Platten-Spektralphotometer bei 405 nm gemessen und über die Standardkurve ausgewertet (siehe Abbildung 12).

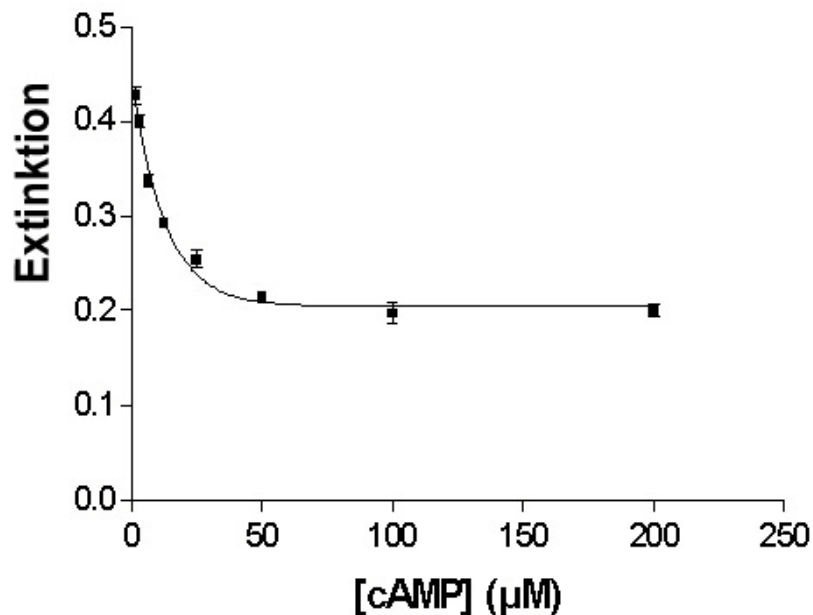


Abbildung 12: Standardkurve eines cAMP-Immunoassays

2.2.3.3 cAMP Immunoassay

Die Durchführung des cAMP Immunoassays erfolgte nach den Angaben des Herstellers (R&D Systems). Alle Kitreagenzien wurden bei 4°C im Kühlraum gelagert. Vor Versuchsbeginn wurden alle Testkomponenten auf Raumtemperatur gebracht. Die Homogenatüberstände wurden langsam im Eisbad aufgetaut, bis sie keine Eisbröckchen mehr enthielten. Aus dem cAMP-Standard wurde die nachfolgende Verdünnungsreihe hergestellt (siehe Tabelle 7):

Standard Cups	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Konz. in pmol/ml	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56

Tabelle 7: Verdünnungsreihe für cAMP-Messung

In jedem Assay wurden die Gesamtaktivität [Total Activity (TA)], die unspezifische Bindung [Non-Specific Binding (NSB)], die maximale Bindung [Maximum Binding (MB)] und eine substratfreie Aktivität [Substrate Blank (SB)] mitbestimmt. Dabei entsprach die maximale Bindung dem Zerostandard, d.h. einer Konzentration von 0 pmol/ml. Es erfolgte eine Zweifachbestimmung der Standardlösungen und aller Proben (siehe Tabelle 8).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	P1	P1	P9	P9	P17	P17	P25	P25	P33	P33
B	S2	S2	P2	P2	P10	P10	P18	P18	P26	P26	P34	P34
C	S3	S3	P3	P3	P11	P11	P19	P19	P27	P27	P35	P35
D	S4	S4	P4	P4	P12	P12	P20	P20	P28	P28	P36	P36
E	S5	S5	P5	P5	P13	P13	P21	P21	P29	P29	MB	MB
F	S6	S6	P6	P6	P14	P14	P22	P22	P30	P30	NSB	NSB
G	S7	S7	P7	P7	P15	P15	P23	P23	P31	P31	SB	SB
H	S8	S8	P8	P8	P16	P16	P24	P24	P32	P32	TA	TA

Tabelle 8: Schematische Darstellung der Mikrotiterplatte. Jedes Kästchen stellt eine Vertiefung dar. S steht für Standard, P für Probe, SB für Substrate Blank, MB für Maximum Binding, NSB für Non-Specific Binding und TA für Total Activity.

Zunächst wurden 50 µl des Neutralisierungsreagenz in jede Vertiefung, mit Ausnahme der Vertiefungen für die Gesamtaktivität und für die substratfreie Aktivität, pipettiert. 150 µl der 0,1 N Salzsäure wurden in die Vertiefungen für die unspezifische Bindung, 100 µl in die Vertiefung für die maximale Bindung aufgetragen. In die restlichen Vertiefungen wurden von den Standardlösungen oder den Proben jeweils 100 µl dazupipettiert (siehe Tabelle 8). Zuvor wurde jede Probe oder Standardlösung mit dem Vortex gut durchmischt. Überall, außer in die Vertiefungen für die Gesamtaktivität und für die substratfreie Aktivität, wurden 50µl „cAMP conjugate“ und anschließend 50 µl der cAMP Antikörper Lösung aufgetragen. In die Vertiefungen für die unspezifische

Bindung, die Gesamtaktivität, sowie für die substratfreie Aktivität kam keine cAMP Antikörper Lösung.

Danach wurde die Mikrotiterplatte mit selbstklebender Folie abgedeckt und 2 Stunden mit 500 rpm (rotations per minute) bei Raumtemperatur auf dem Thermoschüttler (Thermostar, BMG) geschüttelt. Währenddessen wurde der Waschpuffer vorbereitet, indem das Waschpufferkonzentrat (10fach konzentriert) im Verhältnis 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt wurde. Nach der Inkubationszeit wurden die Vertiefungen dreimal mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen. Es wurde dazu ein Multireagenzwaschgerät (Dynatech) verwendet. Um den restlichen Waschpuffer zu entfernen wurde die Mikrotiterplatte umgedreht auf Zellstofftüchern ausgeklopft.

In die Vertiefungen für die Gesamtaktivität wurden 5 µl cAMP Konjugat pipettiert. Somit konnte später die Menge aller polyklonalen cAMP-Antikörper, die während der Inkubationszeit in den Vertiefungen gebunden wurden, festgestellt werden. Anschließend wurde das pNPP Substrat auf die Platte aufgetragen (200 µl/Vertiefung). Die Proben zeigten eine, je nach enzymgebunden cAMP Anteil, eine stärkere oder schwächere Gelbfärbung. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe der Stop Lösung (50 µl/Vertiefung) abgebrochen. Die Extinktion in einer jeden Vertiefung wurde nun unmittelbar in einem Platten-Spektralphotometer (MR 4000, Dynatech) bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt. Durch die Software Graph Pad Prism wurde die Standardkurve und durch die Software Excel die entsprechenden Konzentrationen an nachzuweisendem cAMP in den einzelnen Proben berechnet.

2.2.4 CREB Messung

2.2.4.1 Probengewinnung und Proteinbestimmung nach Bradford

Von der tiefgefrorenen Gewebeprobe der jeweiligen Hirnregion wurde eine Gewebemenge von 15-25 mg abgewogen. Für den internen Standard wurde ein Gewebestück mit 100 mg abgewogen. Das Restgewebe der ursprünglichen Probe und die gewogenen Proben wurden bis zur weiteren Aufarbeitung im Gefrierschrank bei -70°C aufbewahrt.

Anmerkung 4: Während der gesamten Aufarbeitung dürfen die Proben nie vollständig auftauen, da ansonsten die Proteine zerstört werden würden. Um dies zu vermeiden, werden die Proben ständig in einem Eisbad gekühlt.

Die abgewogenen Gewebestücke wurden im Verhältnis 1:10 (Gewicht : Volumen) mit Homogenisierungspuffer (siehe Tabelle 9) homogenisiert (siehe Anmerkung 3).

Homogenisierungspuffer	
Saccharose	0,25 M
HEPES	20 mM, pH 7,5
MgCl ₂	1 mM
DTT	1 mM
EGTA	1 mM
PMSF	0,3 mM (frisch zugeben)
Okadaic Acid	1 µM (frisch zugeben)
Calycalin A	5 nM (frisch zugeben)
Aqua bidest.	

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

Tabelle 9: Zusammensetzung des Homogenisierungspuffers

Das Homogenat wurde bei 9500 g und 0°C für 5 Minuten zentrifugiert (Tischzentrifuge, Heinse + Ziller, 12000 Umdrehungen/min). Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet verworfen. Die Probenüberstände wurden sofort tiefgefroren (-70°C). Zuvor wurden für die Proteinbestimmung nach Bradford vom Probenüberstand 10 µl entnommen und mit Aqua bidest. verdünnt. In Abhängigkeit vom Proteingehalt in den einzelnen Hirnregionen wurden die Proben unterschiedlich stark verdünnt, so dass die gemessene Extinktion bei 595 nm im Bereich von 0,2 bis 0,5 lag. Enthielt eine Probe zu viel Protein, wurde eine Extinktion > 0,5 angezeigt. Solch hohe Extinktionswerte lagen außerhalb des linearen Bereichs der Standardkurve und konnten deshalb nicht ausgewertet werden. Diese Proben mussten weiter verdünnt und einer erneuten Proteinbestimmung unterzogen werden.

Anmerkung 5: Hier kann der Vorgang ohne Einschränkung der Ergebnisse unterbrochen und auch die verdünnten Proben für die Proteinbestimmung im Gefrierschrank bei -70°C aufbewahrt werden. Das Wiederauftauen sollte im Eisbad erfolgen und es muss darauf geachtet werden, dass keine Eisbröckchen mehr in der Probe sind. Erst dann kann die Probe für den weiteren Vorgang verwendet werden. Das Auftauen der Probe kann durch das Durchmischen mit dem Vortex - Rührgerät beschleunigt werden. Die aufgetaute Probe muss immer in einem Eisbad stehen.

Proteinassay:

Im Proteinassay wurde die Proteinkonzentration aller Proben und Standardlösungen in einer Dreifachbestimmung ermittelt. Aus der BSA - Proteinstandardlösung (1,35 mg/ml) wurde nachfolgende Verdünnungsreihe hergestellt (siehe Tabelle 10):

Küvette	1	2	3	4	5	6	7
Aquq bidest. in μl	798	796	794	792	790	788	786
Proteinstandard in μl	2	4	6	8	10	12	14
Konz. in $\mu\text{g/ml}$	2,7	5,4	8,1	10,8	13,5	16,2	18,9

Tabelle 10: Verdünnungsreihe für Proteinbestimmung

Von den verdünnten Proben wurden jeweils 10 μl in je eine Küvette mit 790 μl Aqua bidest. gegeben. Für den Referenzwert und Nullausgleich wurden in 2 Küvetten 800 μl Aqua bidest. pipettiert. Anschließend wurden 200 μl des Bio-Rad Protein Assay – Farbstoff Konzentrats in alle Küvetten pipettiert und mit einem Kunststoffführstäbchen gut durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten konnte die Extinktion der Probe bei 595 nm im Photometer (Perkin – Elmer) gemessen werden. Durch Vergleich mit der Standardkurve konnte die Proteinkonzentration in den Proben bestimmt werden (siehe Abbildung 13).

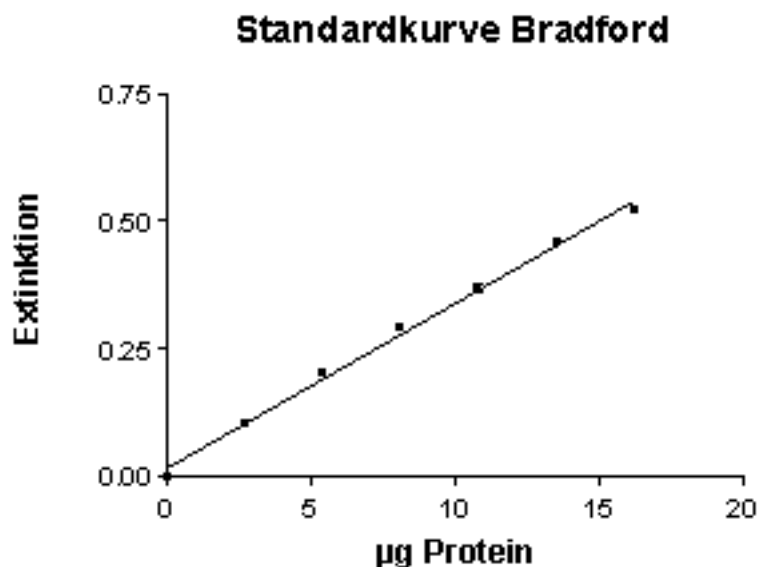


Abbildung 13: Standardkurve des Proteinassays

Der Homogenatüberstand des internen Standards wurde so mit Homogenisierungspuffer weiterverdünnt, dass in 10 µl Probe 10 µg Protein enthalten waren. Der verdünnte Überstand wurde anschließend in Aliquots von 75 µl auf Eppendorf Cups verteilt und bei -70°C eingefroren.

Anmerkung 6: Ein solches Eppendorf Cup mit internem Standard wird bei jedem Western Blot Assay zusammen mit den zu messenden Proben weiter aufgearbeitet und auf jedes Gel mit aufgetragen. Somit kann man auch Proben verschiedener Gele miteinander vergleichen.

Eine kleine Menge aus dem Homogenatüberstand der Proben wurde mit Homogenisierungspuffer so weiterverdünnt, dass je nach Hirnregion entweder 10 oder 20 µg Protein in 10 µl der verdünnten Probe enthalten waren (siehe Tabelle 11).

Hirnregion	Proteinmenge in 10 µl Probe
Amygdala	10 µg Protein
Accumbens	20 µg Protein
Putamen	20 µg Protein

Tabelle 11: Verwendete Proteinmenge in den einzelnen Hirnregionen

2.2.4.2 Prinzip des Western-Blots

Western-Blots erlauben es, ein bestimmtes Protein in einer komplexen Mischung – die sprichwörtliche Nadel im Heuhaufen – aufzuspüren (Stryer, 1999). Die einzelnen Komponenten einer Proteinmischung werden durch eine SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) getrennt. Dazu durchlaufen die Proteine eine Gelmatrix in Richtung Anode und trennen sich dabei nach ihrem Molekulargewicht. Die Polypeptide werden vorher in „SDS-Probenpuffer“ hitzedenaturiert. Durch den Zusatz des anionischen SDS werden die Proteine in eine negative Gesamtladung gebracht, es entsteht ein einheitliches Verhältnis von Ladung zu Masse. Das Dithiothreitol (DTT) im Probenpuffer bewirkt eine Reduzierung von Disulfidbrücken in den Polypeptidketten. Dadurch hängt die elektrophoretische Beweglichkeit allein vom Gewicht des Moleküls und der Porengröße des Gels ab. Die Elektrophorese eignet sich zur Ermittlung der molekularen Massen von Proteinen, da sich bei der Trennung im SDS-Polyacrylamidgel eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der jeweiligen Molekulargewichte und den relativen Wanderungstrecken der Proteine ergibt (Gassen und Schrimpf, 1999). Durch das im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau bildet sich bei der Gelelektrophorese eine blaue Lauffront, anhand derer man erkennen kann, wie weit sich

die Probe schon im Gel aufgetrennt hat. Somit ist es möglich die Elektrophorese zum gegebenen Zeitpunkt zu beenden.

Anschließend werden die getrennten Proteine auf eine proteinbindende Membran überführt. Der Transfer muss immer senkrecht zur Trennrichtung erfolgen, damit das Muster der getrennten Proteine auf der Membran exakt dem Trennmuster des Gels entspricht (Gassen und Schrimpf, 1999).

Zu Beginn der Nachweisreaktion muss der Protein Blot blockiert werden, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern. Durch eine Blockierlösung werden hierbei die unspezifischen Proteinbindestellen der Membran abgesättigt. Das nachzuweisende Protein wird durch Zugabe eines für das Protein spezifischen Antikörpers gekennzeichnet. Der gebildete Antigen–Antikörper–Komplex wiederum wird an einen zweiten enzymmarkierten Antikörper gebunden. Dieser kann mit Hilfe des Nachweisreagenz über Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm indirekt visualisiert werden. Das Nachweisreagenz bildet mit dem Enzym des markierten zweiten Antikörpers ein Licht emittierendes Produkt. Dieses strahlt am Ort seiner Entstehung Licht aus und signalisiert so die Position des Antigen-Antikörper-Komplexes. Dieser wird nun durch Exposition eines Röntgenfilms sichtbar gemacht (Gassen und Schrimpf, 1999) (siehe Abbildung 14).

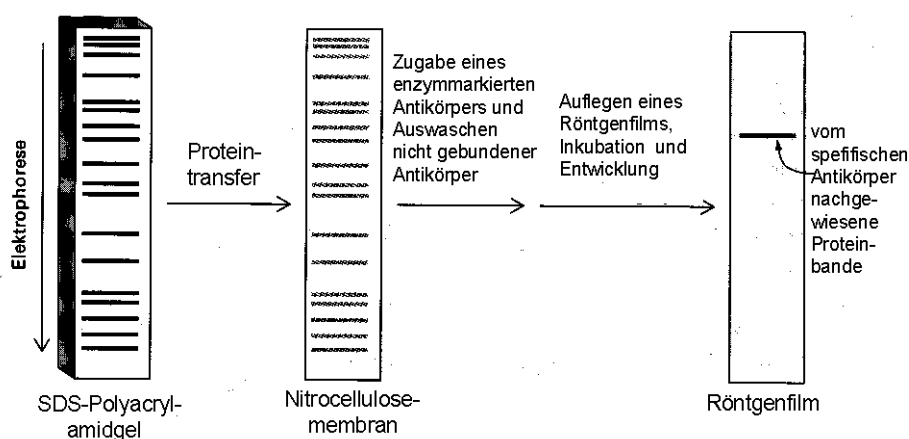


Abbildung 14: Nachweis eines Proteins durch Western–Blotting. Die auf einem SDS-Polyacrylamidgel getrennten Proteine werden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit einem enzymmarkierten Antikörper gekennzeichnet. Über ein Nachweisreagenz erscheint dann eine Bande auf dem Röntgenfilm, die dem gesuchten Protein entspricht (Stryer, 1999).

Die sichtbare Banden spezifischer Proteine können aufgrund der unterschiedlichen Grauwerte der Bilddarstellung mit Hilfe eines Scanners und der entsprechenden Software semiquantitativ analysiert werden. Somit eignet sich diese Methode zur semiquantitativen Bestimmung der CREB-Konzentration im Hirngewebe von Rhesusaffen.

2.2.4.3 Western-Blot-Assay

Protokoll

SDS-Gelelektrophorese

Die für den Western-Blot verdünnten Proben und ein Aliquot des internen Standards wurden im Verhältnis 1:1 mit dem Probenpuffer (2-fach konzentriert) verdünnt und im Thermomixer (comfort, Eppendorf) 10 Minuten lang bei 95°C und 600 rpm gekocht. Damit sich das Kondenswasser absetzen kann, wurden die Proben anschließend für 3 Minuten bei 30°C und 9500 g zentrifugiert (Tischzentrifuge, Heinse + Ziller, 12000 Umdrehungen/min).

50 ml des Running Buffers (10-fach konzentriert) wurden im Verhältnis 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt und mit Hilfe des Magnetrührers gemischt. In einer Novex Kammer ist Platz für zwei Gele. Die Fertiggele (10 % Tris-Glyzin Gel, 1,0 mm dick mit 12 Taschen) waren von einer Kunststoffhülle umgeben. Von den beiden Gelen wurde oben der Kunststoffkamm und unten der Klebestreifen entfernt. Der Boden der Taschen wurde auf der Kunststoffhülle mit wasserfestem Filzstift nachgezogen, damit die Taschen - auch nachdem sie sich mit Laufpuffer gefüllt haben – erkennbar waren. Beide Gele wurden mit dem Kammereinsatz in die Novex-Kammer eingesetzt, so dass die Taschen zur Mitte und die Beschriftung der Gele nach außen zeigen. Nun wurde der Laufpuffer in die Mitte eingegossen bis die Taschen gerade mit Lösung bedeckt waren. Der restliche Puffer wurde an der Seite eingefüllt.

Mit Hilfe der Gelbeladespitzen und der 10 µl Pipette wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Die Proben wurden unmittelbar vorher auf dem Vortex-Rührgerät gut durchgemischt. In jede Tasche wurden 20 µl einer Probe pipettiert. Dies entsprach jeweils 10 µg für die Hirnregion Corpus amygdaloideum und jeweils 20 µg für die

Hirnregionen Nucleus accumbens und Putamen. Es erfolgte eine Zweifachbestimmung einer jeden Probe. Das Gel wurde nach folgendem Schema beladen (siehe Tabelle 12):

Reagenz	SB	Probe 1		Probe 2		Probe 3		Probe 4		Interner Stand.		
Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Menge [μ l]	10	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

Tabelle 12: Pipettierschema für Gelelektrophorese. SB steht für Seablue (Marker), Interner Stand. für Interner Standard.

Der Deckel der Novex-Kammer wurde aufgesetzt und die Kammer mit dem Netzgerät (Microcomputer Electrophoresis Power Supply, Consort) verbunden. Es wurde eine Spannung von 125-130 V, ein Strom von 70 mA und somit eine elektrische Leistung von 7 W angelegt.

Anmerkung 7: Der Marker Seablue wurde aufgetragen, um zu sehen wie weit die Proteine im Gel schon gelaufen sind und um sicher zu sein, dass auch alle Proteine auf die Nitrocellulosemembran geblottet wurden.

Nach 90 bis 120 Minuten waren die Proben bis fast ganz unten durchgelaufen – was an der Höhe der Bromphenolblaubande (entspricht dem untersten Rand der Probe) zu erkennen war. Die Elektrophorese konnte nun beendet werden, denn das Proteingemisch war im erforderlichen kDa (kiloDalton)-Bereich ausreichend getrennt.

Elektroblot

40 ml des Transferpuffers (25-fach konzentriert) wurden im Verhältnis 1:25 mit Aqua bidest. verdünnt, mit Parafilm bedeckt und 5–6 mal durch Auf- und Abschnwenken gemischt. Die Blottingmembran aus Nitrocellulose wurde beschriftet und zusammen mit dem Filterpapier in Transferpuffer eingeweicht. Ein Gel wurde aus der Novexkammer entnommen, mit Hilfe eines speziellen Gelmessers vorsichtig aus der Kunststoffhülle befreit und in eine mit Transferpuffer gefüllte Schale gelegt. Darin wurde das Blottingsandwich nach folgendem Muster gebaut: Filterpapier – Gel – Nitrocellulosemembran – Filterpapier.

In das Blottingmodul wurden erst drei bis vier mit Transferpuffer getränkte Schwämme, dann das Sandwich mit der Nitrocellulosemembran nach oben und anschließend wiederum vier mit Transferpuffer getränkte Schwämme gelegt (siehe Abbildung 15). Das Blottingmodul wurde nun in die Novexkammer eingesetzt und mit Transferpuffer aufgefüllt. Circa 500 ml Kühlflüssigkeit (Aqua dest.) wurden außen in die

Novexkammer gegossen. Der Deckel wurde auf die Kammer gesetzt und die Kammer an das Netzgerät angeschlossen.

Derselbe Vorgang wurde mit dem zweiten Gel wiederholt.

Anmerkung 8: Damit das zweite Gel nicht zu sehr austrocknet, kann es zwischenzeitlich in eine mit dem Laufpuffer der Gelelektrophorese gefüllte Kunststoffschale gelegt werden.

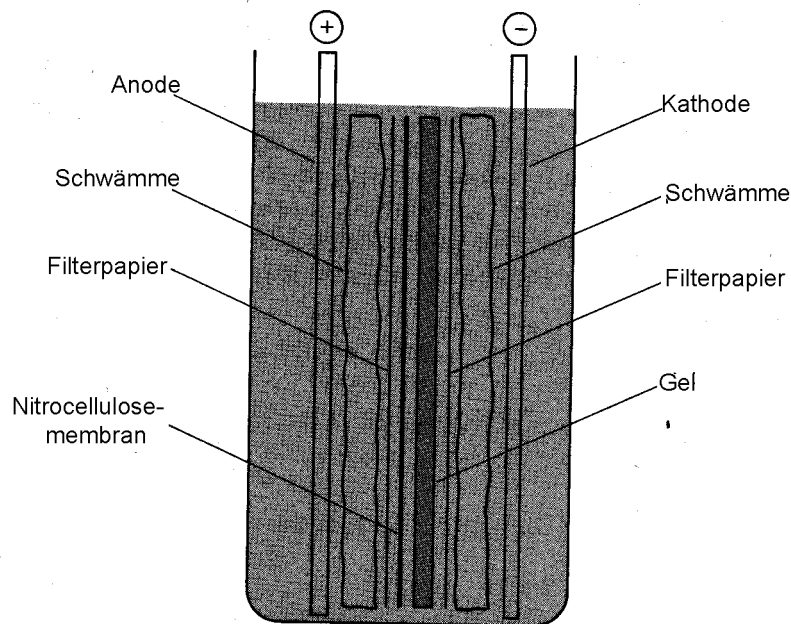


Abbildung 15: Aufbau eines Elektrobloths (Maniatis und Fritsch, 1989)

Es wurde eine Spannung von 30 Volt, ein Strom von 170 mA und somit eine elektrische Leistung von 5 W angelegt. Nach 75 min war der Elektroblobt beendet.

Die Nitrocellulosemembran wurde aus dem Blottingmodul entnommen und - damit die Membran nicht trocknet - in ein Schälchen mit „Low Salt Washing Buffer“ (LSWB) gelegt. Nun wurde überprüft, ob keine Gelreste auf der Membran hängengeblieben sind, die die gleichmäßige Bindung der Antikörper verhindern könnten.

Immunfärbung: Bindung des Erst- und Zweitantikörpers und Visualisierung

Die Membran wurde für 30 min in 20 ml Milchlösung blockiert. Durch das in der Milchlösung enthaltene Proteingemisch wurden dadurch die unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Membran abgesättigt.

Der erste Antikörper (Anti-CREB, Biomol) wurde im Verhältnis 1:1000 in der Milchlösung verdünnt. Darin wurde die Membran für eine Stunde inkubiert und anschließend dreimal für je 10 Minuten mit „High Salt Washing Buffer“ (HSWB) gewaschen.

Danach wurde der zweite an Meerrettichperoxidase gekoppelte Antikörper (Anti-Kaninchen-IgG von Cell Signaling) im Verhältnis 1:3000 in der Milchlösung verdünnt und die Membran darin für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Membran für je 10 min zweimal mit HS WB und viermal mit LS WB gewaschen und für eine Minute in ECL (enhanced chemiluminescence/verstärkte Chemilumineszenz) - Nachweisreagenz geschwenkt. Die feuchte Membran wurde in eine Klarsichtfolie gelegt. In der Dunkelkammer wurde die markierte Bande mit Hilfe von Filmkassette, Entwickler- und Fixierlösung auf einen Röntgenfilm projiziert.

Anmerkung 9: Während aller Inkubationszeiten befanden sich die Schälchen in denen die Nitrocellulosemembran lag auf einem Schüttler, der auf circa 50 rpm eingestellt war.

Lösungen

Die für den Western-Blot-Assay verwendeten Lösungen setzen sich jeweils wie folgt zusammen:

Probenpuffer (2-fach konzentriert)

DTT	100 mM (zum „Sample Buffer“ von Novex dazugeben)
<u>„Sample Buffer“ (Novex)</u>	
Tris-HCl	63 mM, pH 6,8
Glycerol	10 % (w/v)
SDS	2 % (w/v)
Bromphenolblau	0,0025 % (w/v)
Aqua bidest.	

Milchlösung

Magermilchpulver	3 % (w/v)
Tween 20	1,5 % (v/v)
in HS WB	

HSWB (High Salt Washing Buffer)

TRIZMA®-Base	10 mM
NaCl	500 mM
Tween 20	0,1 % (v/v)

Aqua bidest.

Der pH - Wert wurde mit 25 % HCl auf 7,5 eingestellt.

LSWB (Low Salt Washing Buffer)

TRIZMA®-Base	10 mM
NaCl	150 mM

Aqua bidest.

Der pH - Wert wurde mit 25 % HCl auf 7,5 eingestellt.

ECL – Nachweisreagenz

Detection reagent 1	50 % (v/v)
Detection reagent 2	50 % (v/v)

Entwickler

Entwicklerkonzentrat Part 1 (enthält 1-10 % Hydrochinon und Kaliumhydroxid)	25 % (v/v)
Entwicklerkonzentrat Part 2	5 % (v/v)
Entwicklerkonzentrat Part 3 (enthält 25-50 % Essigsäure)	2,5 % (v/v)

Aqua bidest.

Fixierer

Fixierkonzentrat Part 1	25 % (v/v)
Fixierkonzentrat Part 2 (enthält 5-10 % Schwefelsäure)	5 % (v/v)

Aqua bidest.

Nach dem Entwickeln wurde die feuchte Nitrocellulose erst in Frischhaltefolie, dann in Alufolie verpackt, mit Klebeband verklebt und bei – 20°C eingefroren.

Anmerkung 10: Die Immunfärbung kann vor dem Blockieren, nach dem Blockieren und nach dem Abwaschen des ersten Antikörpers unterbrochen werden. In dieser Zeit wird die Nitrocellulosemembran in ein Schälchen mit LSBW auf einem Schüttler (ca. 150 rpm) im Kühlraum aufbewahrt.

Auswertung des Western-Blot

Die Blots wurden mit einem Durchlichtscanner mit 250 dpi (dots per inch) und 300 % True Color eingescannt. Die Dichten und Stärken der einzelnen Banden wurde mit der Software NIH-Image 6.0 ausgewertet. Hierfür wurde die Bandenstärke graphisch dargestellt und die Fläche unter der Kurve für jede einzelne Bahn berechnet (siehe Abbildung 16).

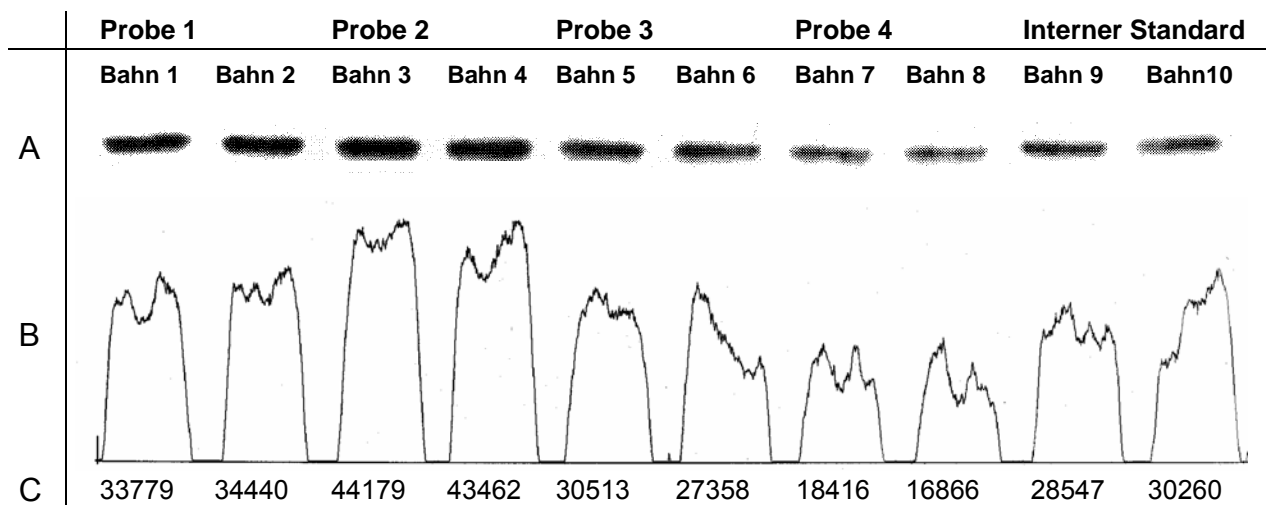


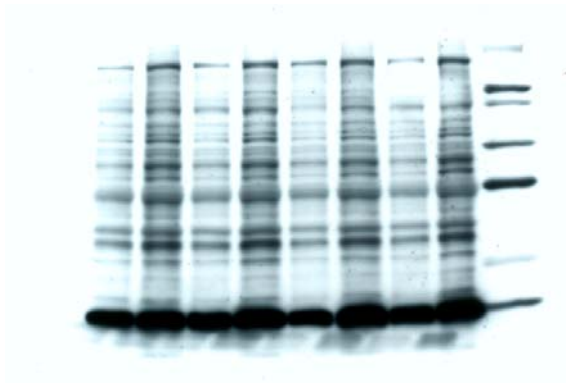
Abbildung 16: A: Darstellung eingescannten Banden. B: Graphische Darstellung der einzelnen Bahnen. C: Ergebnis der Berechnung der Fläche unter jeder in B dargestellten Kurve.

Mit dem für jede Bande berechneten Zahlenwert (siehe Zeile C in Abbildung 8) wurde nun die mittlere Bandenstärke, der in Doppelbestimmung gemessenen Werte, ermittelt. Um die Werte verschiedener Gele vergleichen zu können, wurden die Einzelwerte zum Wert des Internen Standard (Bahn 9 und 10) – welcher auf jedem Gel in gleicher Menge aufgetragen wurde - in Beziehung gesetzt. Der Anteil an CREB im Gewebe konnte damit semiquantitativ bestimmt werden.

2.2.4.4 Troubleshooting

Bevor der Western-Blot-Assay zur semiquantitativen Beurteilung der Expression von CREB verwendet werden konnte, galt es einige methodische Probleme zu lösen (siehe Abbildung 17).

Vorher



Nachher

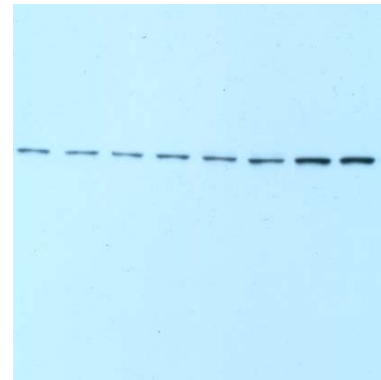


Abbildung 17: Vor der Optimierung waren zahlreiche Banden auf dem Röntgenfilm zu sehen, danach nur noch die eine spezifische Bande für das CREB.

Western-Blot vor der Optimierung

Auf dem Röntgenfilm meines ersten Western-Blots waren sehr viele Banden zu sehen. Ein Antikörper hatte nicht nur an das spezifische Protein, sondern auch noch an zahlreiche unspezifische Proteine gebunden. Die spezifische Bande für CREB konnte mit diesem Western-Blot (siehe Abbildung 17) nicht eindeutig identifiziert werden. Bei diesem Blot wurden folgende Lösungen und Antikörper - Konzentrationen verwendet:

Blockierlösung

BSA	5 % (w/v)
in HSWB	

Tabelle 13: Zusammensetzung der anfangs verwendeten Blockierlösung

Lösung für ersten und zweiten Antikörper

BSA	3 % (w/v)
Tween 20	1,5 % (v/v)
in HSWB	

Tabelle 14: Zusammensetzung der Lösung, in der erster und zweiter AK anfangs verdünnt wurden.

Erster Antikörper: CREB-1 (SantaCruz) in der Verdünnung 1:1000

Zweiter Antikörper: Anti-rabbit-Ig (Amersham) in der Verdünnung 1:4000

Optimierung:

Für die Optimierung wurde Hirngewebe aus dem temporalen Kortex eines unbehandelten Rhesusaffen verwendet.

Hintergrund:

Der starke Hintergrund (die vielen unspezifischen Banden) sollte verringert werden. Zunächst wurden andere Blockierlösungen verwendet und die Antikörper ebenfalls in dieser Blockierlösung verdünnt.

Getestete Blockierlösungen:

- Caseinlösung: 0,2 % in LSBW
- Milchlösung: Magermilchpulver 2 % in LSBW
- Kaninchen-Serum Albumin: 2 % in LSBW
- Esel Serum-Albumin: 2 % in LSBW

Die Milchlösung eignete sich am besten für die Blockierung.

Als nächstes wurden die Konzentrationen der Blockierlösungen variiert. Es wurden Milchlösungen aus Magermilchpulver mit den Konzentrationen von 0,1%, 0,2%, 0,5%, 1%, 3%, 5% getestet. Zusätzlich wurde Tween 20 (1,5%) zur Milchlösung dazugegeben. Die 3%ige Milchlösung brachte das beste Ergebnis.

Anmerkung 11: Um an einer Nitrocellulosemembran mehrere Versuchsbedingungen zu testen, wurde die Membran in mehrere (meist 4) Stücke geschnitten. Zum Schneiden wurde die Membran nach dem Elektrobplot mit der Ponceau S - Proteinfärbung gefärbt. Dadurch wurden alle geblotteten Proteine rot angefärbt. So konnte man die Membran exakt entlang der Bahnen zerschneiden. Anschließend wurde die Färbung durch mehrere Waschkvorgänge mit LSBW wieder entfernt und mit der Nachweisreaktion begonnen.

Antikörper:

Erster Antikörper: Anstatt CREB-1 (SantaCruz) wurde Anti-CREB (Biomol) verwendet.

Zweiter Antikörper: Anstatt Anti-rabbit-Ig (Amersham) wurde Anti-Rabbit-Ig G (Cell Signaling) verwendet.

Identifikation der CREB-Bande:

Das Protein CREB hat ein Molekulargewicht von 43 kDa. Die durch die Gewebeproben erhaltene Bande lag zwischen den 40 kDa und 50 kDa Banden des Markers BOA („Best of All“) (Biomol), zwischen den 36,5 kDa und 55,4 kDa Banden des Mark12

(invitrogen), sowie an der Grenze zur 45 kDa Bande des Farbmarkers „Color Marker Wide Range“ (Sigma).

Um sicher zu sein, dass die gezeigte Bande auch wirklich durch die spezifische Bindung des Anti-CREB hervorgerufen wurde, wurde in einem weiteren Vorversuch in der Nachweisreaktion bei einer Bahn der Nitrocellulosemembran kein erster Antikörper zugegeben. Diese Bahn zeigte auf dem Röntgenfilm auch kein Signal. Die Bahn daneben wurde dagegen mit erstem Antikörper behandelt und zeigte ein Signal (siehe Abbildung 18).

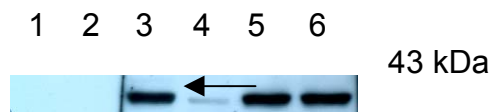


Abbildung 18: Western-Blot zur Identifikation der CREB-Bande: Bahn eins und zwei wurden ohne den ersten Antikörper inkubiert, die Bahnen drei bis sechs wurden mit dem ersten Antikörper inkubiert. Bahn 1: Farbmarker (nur auf der Nitrocellulosemembran sichtbar); Bahn 2: temporaler Cortex eines unbehandelten Rhesusaffen; Bahn 3: menschliches Hirngewebe; Bahn 4: Nuklearer Extrakt aus HeLa – Zellen ; Bahn 5 und 6: temporaler Cortex eines unbehandelten Rhesusaffen.

Bandenbreite und Bandenstärke:

Die spezifische Bande sollte in eine für die graphische Auswertung optimalen Breite und Stärke abgebildet werden. Sie sollte nach oben und unten einen Spielraum gestatten, so dass auch noch Proben mit deutlich geringerem bzw. erhöhtem CREB Anteil auswertbar waren. War die Bande zu schwach und zu dünn, konnte sie nicht richtig gescannt werden. Dafür wurden die Konzentrationen der Antikörper variiert (siehe Tabelle 15):

	Erster Antikörper	Zweiter Antikörper
▪	1:2500	1:1000
▪	1:1000	1:5000
▪	1:1000	1:3000
▪	1:1000	1:2000

Tabelle 15: Getestete Antikörperkonzentration

Mit Konzentrationen von 1:1000 für den ersten Antikörper und 1:3000 für den zweiten Antikörper konnte eine optimale Bandenbreite erzielt werden.

Unterschiedliche Möglichkeiten der Aufarbeitung des Hirngewebes wurden getestet:

- Homogenisierung durch Ultraschall
- Homogenisierung durch Pottern
- Homogenat unzentrifugiert verwenden
- Homogenat zuerst zentrifugieren und den Überstand verwenden

Hierbei ergab die Homogenisierung mit Hilfe des Potters und die anschließende Zentrifugation mit Weiterverarbeitung des Überstandes das beste Resultat.

In einer Konzentrationsreihe mit unterschiedlichen Mengen (5 µg, 10 µg, 20 µg und 30 µg) an aufgetragenem Protein, wurde für jede Hirnregion die optimale Menge an Protein ermittelt, um eine auswertbare Bandendicke zu erhalten (siehe Abbildung 11).

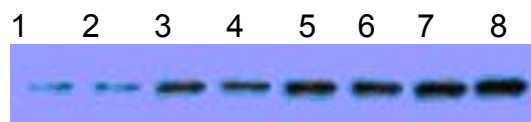


Abbildung 19: Western-Blot zur Bestimmung der optimalen Proteinmenge: In den Bahnen eins und zwei wurden jeweils 5 µg Protein aufgetragen, in den Bahnen drei und vier jeweils 10 µg, in den Bahnen fünf und sechs jeweils 20 µg und in den Bahnen sieben und acht jeweils 30 µg.

Abbildung 19 zeigt, dass die ideale Proteinmenge zwischen 10 µg und 20 µg lag. Diese Werte variierten von Hirnregion zu Hirnregion. Auch unterschiedliche Belichtungszeiten des Röntgenfilms hatten Einfluss auf die Bandendicke.

Western-Blot nach der Optimierung:

Die Optimierung für den Western Blot von CREB mit Hirngewebe von Rhesusaffen ergab folgendes Ergebnis:

Blockierlösung und Lösung für ersten und zweiten Antikörper

Magermilchpulver	3 % (w/v)
Tween 20	1,5 % (v/v)
in HSWB	

Tabelle 16: Zusammensetzung der Blockierlösung

Erster Antikörper: Anti-CREB (Biomol) in der Verdünnung 1:1000

Zweiter Antikörper: Anti-rabbit Ig G (Cell Signaling) in der Verdünnung 1:3000.

Somit erhielt ich einen Blot, bei dem nur noch die gesuchte spezifische Bande für das CREB auf dem Röntgenfilm dargestellt war (siehe Abbildung 17).

2.2.5 Statistik und Graphische Darstellung der Ergebnisse

Die Auswertung der Rohwerte erfolgte mit Excel 2000. Für die Statistik und die graphische Darstellung wurde das Programm GraphPadPrism verwendet. Um zu überprüfen, ob die Differenz der Mittelwerte zwischen den jeweiligen Gruppen signifikant ist ($\alpha = 0,05$), wurde der ungepaarte t-Test mit Welch's Korrektur angewandt. Es wurden

- die Kontrollgruppe mit SIV-infizierten, unbehandelten Rhesusaffen verglichen,
- sowie SIV-infizierte, unbehandelte Tiere mit SIV-infizierten und mit Selegilin bzw. L-DOPA behandelten
- und Kontrolltiere mit den uninfizierten, mit Selegilin bzw. L-DOPA behandelten Tieren (siehe Tabelle 17).

	SIV	SIV+Selegilin	Selegilin	SIV+L-DOPA	L-DOPA
Kontrollen	X		X		X
SIV		X		X	

Tabelle 17: Darstellung der einzelnen Gruppen von Rhesusaffen, die miteinander verglichen wurden (X)

3. Ergebnisse

3.1 cAMP

Die Konzentration des cAMP wurde mittels Enzymimmunoassay gemessen. Die Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen des cAMP der einzelnen Behandlungsgruppen wurden untereinander und mit einer Kontrollgruppe verglichen.

3.1.1 cAMP Konzentration im Gehirn SIV-infizierter Rhesusaffen

Alle SIV-infizierten Tiere zeigten einen für eine langsame Krankheitsentwicklung charakteristischen Infektionsverlauf. Die hier untersuchten Tiere entwickelten keine Zeichen der Immunschwäche und es zeigten sich keine klinisch offensichtlichen neurologischen Zeichen. Für den Vergleich der cAMP Konzentration zwischen Kontrollen und SIV-infizierten Tieren wurden nur Tiere chinesischer Herkunft verwendet.

Zunächst wurden uninfizierte, unbehandelte Kontrolltiere mit SIV-infizierten, unbehandelten Tieren verglichen. Dabei war im Nucleus accumbens der cAMP Spiegel um 38,13% signifikant erniedrigt. Im Corpus amygdaloideum konnte kein Unterschied in den cAMP Konzentrationen gefunden werden. Im Putamen war die cAMP Konzentration bei den SIV-infizierten Tiere um 21,28% reduziert. Hier war der Unterschied jedoch nicht signifikant (siehe Abbildung 20).

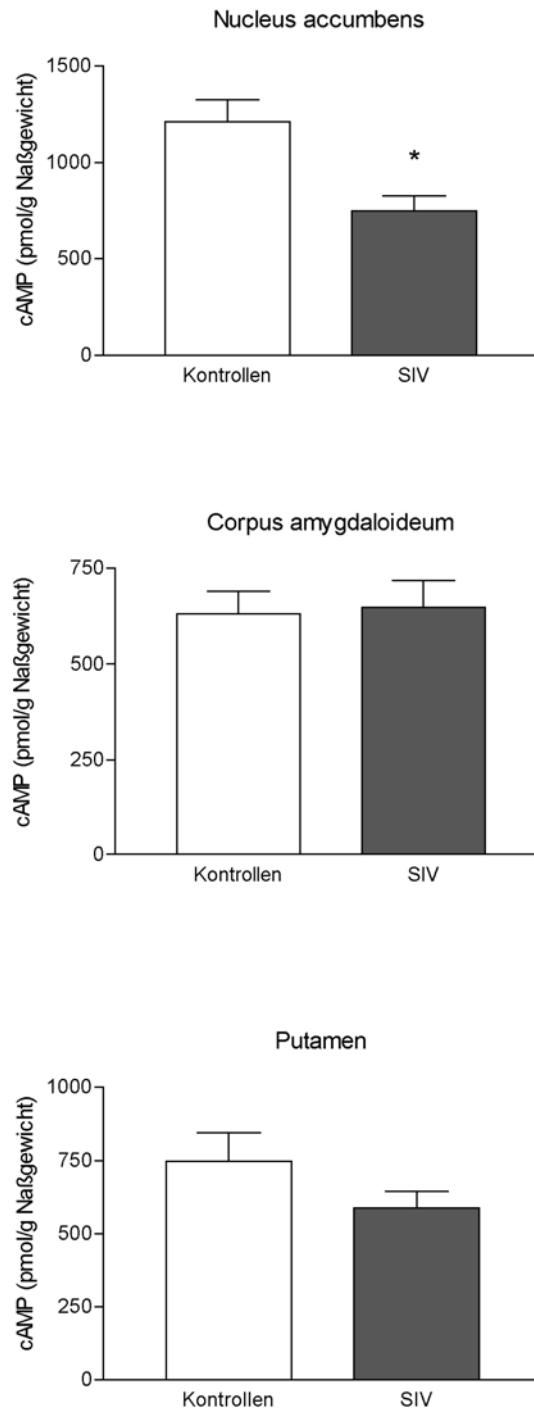


Abbildung 20: Intrazelluläre cAMP Konzentration im Gehirn von SIV-infizierten, unbehandelten (SIV) und uninfizierten, unbehandelten (Kontrollen) Rhesusaffen: oberer Graph: Nucleus accumbens (Kontrollen, n=5; SIV, n=6), mittlerer Graph: Corpus amygdaloideum (Kontrollen, n=5; SIV, n=6), unterer Graph: Putamen (Kontrollen, n=5; SIV, n=6). Die Daten zeigen Mittelwerte \pm S.E.M., * $p < 0,05$, signifikante Differenz im Vergleich zu den Kontrollen (ungepaarter t Test mit Welch's Korrektur).

3.1.2 cAMP Konzentration im Gehirn von SIV-infizierten, an AIDS erkrankten Rhesusaffen

Manche Versuchstiere, hauptsächlich die Rhesusaffen indischer Herkunft, wurden mit einem anderen Virusstamm (SIVmac239) infiziert. Bei diesen Tieren entwickelte sich das AIDS Stadium der SIV-Infektion sehr schnell. Einige Affen wurden erst im AIDS Stadium der Erkrankung getötet. Alle anderen Tiere wurden noch im asymptomatischen Stadium der SIV-Infektion getötet.

In den Hirnregionen Nucleus accumbens und Corpus amygdaloideum sind in der Kontrollgruppe nur Tiere chinesischer Herkunft. In der Gruppe der an AIDS erkrankten Affen hingegen sind fast ausschließlich Tiere indischer Herkunft, diese Gruppe enthält nur ein chinesisches Tier.

3.1.2.1 cAMP Konzentration im Nucleus accumbens SIV-infizierter, an AIDS erkrankten Rhesusaffen

Im Nucleus accumbens war die cAMP Konzentration der Kontrolltiere verglichen mit den SIV-Infizierten am höchsten. Bei den SIV-infizierten Tieren fiel der cAMP Spiegel statistisch signifikant um 30,89% verglichen mit den Kontrolltieren. Die an AIDS erkrankten Rhesusaffen zeigten die niedrigste Konzentration an cAMP im Nucleus accumbens, von nur noch 51,69% des Referenzwertes der Kontrolltiere. Die cAMP Konzentration der AIDS-Gruppe ist gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt. Im Vergleich der AIDS-Gruppe mit der SIV-Gruppe zeigt sich eine Verringerung der cAMP Konzentration, die allerdings nicht signifikant ist (siehe Abbildung 21).

Vergleicht man die Tiere nach ihrem Herkunftsland, so fällt auf, dass in der Gruppe der SIV-infizierten Tiere, die cAMP-Konzentration bei den Indern durchschnittlich etwas höher ist als bei den Chinesen, sich jedoch nicht signifikant unterscheidet. Für die Gruppe der Tiere mit AIDS ist aufgrund der geringen Anzahl der chinesischen Tiere ein solcher Vergleich nicht möglich.

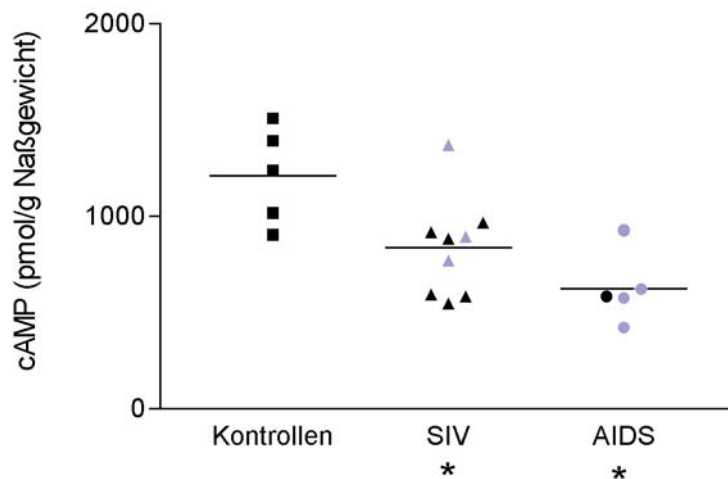


Abbildung 21: Intrazelluläre cAMP Konzentration im Nucleus accumbens von SIV-infizierten sowie an AIDS erkrankten Rhesusaffen: ■ uninfizierte, unbehandelte Rhesusaffen (Kontrollen); □ SIV-infizierte, unbehandelte Tiere (SIV); ● SIV-infizierte Tiere mit AIDS (AIDS); blau, Tiere indischer Herkunft; schwarz, Tiere chinesischer Herkunft. * $p < 0,05$, signifikante Differenz im Vergleich zu den Kontrollen (ungepaarter t Test mit Welch's Korrektur).

3.1.2.2 cAMP Konzentration im Corpus amygdaloideum SIV-infizierter, an AIDS erkrankten Rhesusaffen

Im Corpus amygdaloideum zeigten die Kontrolltiere die niedrigste cAMP Konzentration. Bei den SIV-infizierten Tieren zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei den an AIDS erkrankten Rhesusaffen entsprach der cAMP Spiegel in etwa dem der SIV-Gruppe (siehe Abbildung 22).

Vergleicht man die Tiere nach ihrem Herkunftsland, so ist auch hier die cAMP Konzentration der Tiere indischer Herkunft in der Gruppe der SIV-infizierten Tiere tendenziell etwas höher im Vergleich zu denen chinesischen Ursprungs, ohne sich jedoch signifikant zu unterscheiden. Für die Gruppe der Tiere mit AIDS ist aufgrund der geringen Anzahl der chinesischen Tiere ein solcher Vergleich nicht möglich.

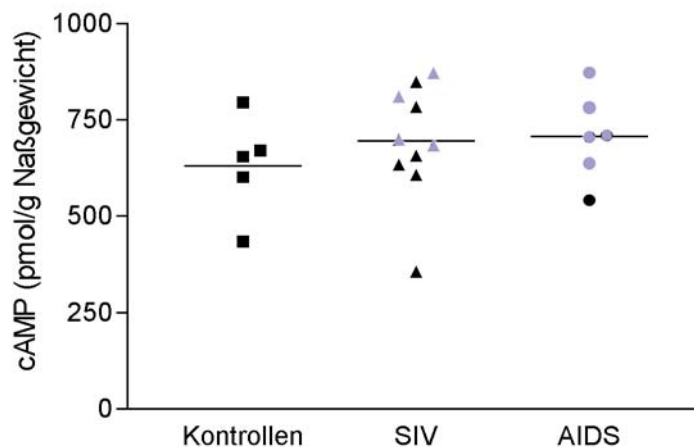


Abbildung 22: Intrazelluläre cAMP Konzentration im Corpus amygdaloideum von SIV-infizierten sowie an AIDS erkrankten Rhesusaffen: ■ uninfizierte, unbehandelte Rhesusaffen (Kontrollen); □ SIV-infizierte, unbehandelte Tiere (SIV); ● SIV-infizierte Tiere mit AIDS (AIDS); blau, Tiere indischer Herkunft; schwarz, Tiere chinesischer Herkunft.

3.1.2.3 cAMP Konzentration im Putamen SIV-infizierter, an AIDS erkrankten Rhesusaffen

Im Putamen war die cAMP Konzentration SIV-infizierter Rhesusaffen im Vergleich zu den Kontrolltieren tendenziell erniedrigt, jedoch zeigte sich keine statistische Signifikanz. Bei den an AIDS erkrankten Tieren blieb der cAMP Spiegel im Vergleich zu den Kontrolltieren unverändert und erhöhte sich demzufolge im Vergleich zu den SIV-infizierten Tieren, jedoch nicht signifikant (siehe Abbildung 23).

Die Versuchstiere aus Indien in der Kontrollgruppe und der SIV-Gruppe zeigen keine wesentlichen Unterschiede in der cAMP Konzentration verglichen mit den Tieren chinesischer Herkunft der jeweiligen Gruppe. Für die Gruppe der Tiere mit AIDS ist aufgrund der geringen Anzahl der chinesischen Tiere ein solcher Vergleich nicht möglich.

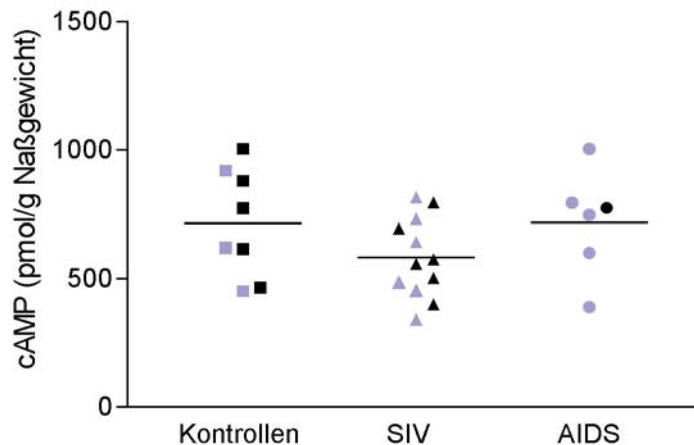


Abbildung 23: Intrazelluläre cAMP Konzentration im Putamen von SIV-infizierten sowie an AIDS erkrankten Rhesusaffen: ■ uninfizierte, unbehandelte Rhesusaffen (Kontrollen); □ SIV-infizierte, unbehandelte Tiere (SIV); ● SIV-infizierte Tiere mit AIDS (AIDS); blau, Tiere indischer Herkunft; schwarz, Tiere chinesischer Herkunft.

3.1.3 Effekte von Selegilin und L-DOPA auf die cAMP Konzentration im Gehirn SIV-infizierter Rhesusaffen

Untersucht wurden die Hirnregionen Nucleus accumbens, Corpus amygdaloideum und Putamen. In dieser Auswertung wurden nur Rhesusaffen chinesischen Ursprungs berücksichtigt.

In den Tabellen über den Abbildungen sind die einzelnen Gruppen, die miteinander verglichen wurden nochmals bildlich dargestellt.

3.1.3.1 Effekte von Selegilin auf cAMP im Nucleus accumbens von SIV-infizierten Rhesusaffen

Im Nucleus accumbens blieb der cAMP Spiegel trotz der Behandlung der SIV-infizierten Rhesusaffen mit Selegilin unverändert. Die cAMP Konzentration der uninfizierten, mit Selegilin behandelten Tieren lag bei 89,69% im Vergleich zu den Mittelwerten der Kontrolltiere (siehe Abbildung 24).

	SIV	SIV+Selegilin	Selegilin
Kontrollen	X		X
SIV		X	

Tabelle 18: Darstellung der einzelnen Gruppen von Rhesusaffen, die in dieser Hirnregion miteinander verglichen wurden (X).

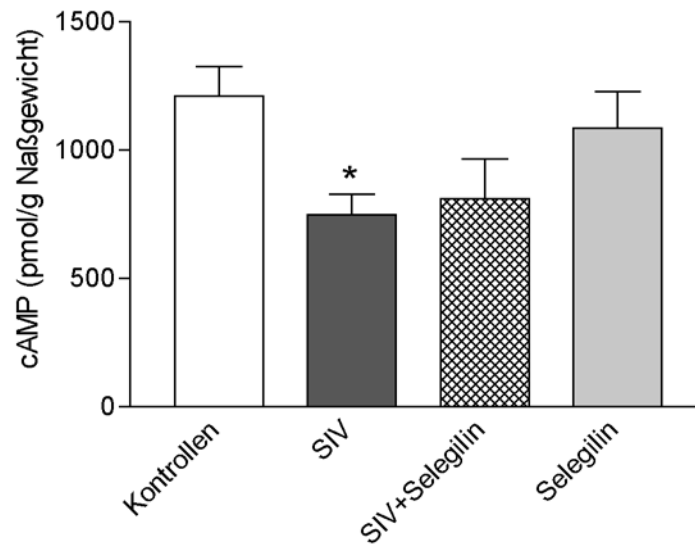


Abbildung 24: Effekte von Selegilin auf die cAMP Konzentration im Nucleus accumbens SIV-infizierter Rhesusaffen. Die Tiere wurden in vier Gruppen eingeteilt: uninfizierte/ unbehandelte (Kontrollen, n=5); SIV-infizierte/ unbehandelte (SIV, n=6); SIV-infizierte/ mit Selegilin behandelte (SIV+Selegilin, n=4) sowie uninfizierte/ Selegilin behandelte (Selegilin, n=3). Die Daten zeigen Mittelwerte \pm S.E.M., * $p < 0,05$, signifikante Differenz im Vergleich zu den Kontrollen (ungepaarter t Test mit Welch's Korrektur).

3.1.3.2 Effekte von Selegilin und L-DOPA auf cAMP im Corpus amygdaloideum von SIV-infizierten Rhesusaffen

Die Behandlung von SIV-infizierten Rhesusaffen mit Selegilin bzw. L-DOPA führte im Corpus amygdaloideum nur zu einer geringen Erhöhung des cAMP Spiegels im Vergleich zu den mit SIV-infizierten, unbehandelten Tieren. Allerdings gab es in dieser Hirnregion auch keinen Unterschied in der cAMP Konzentration zwischen SIV-infizierten Tieren und uninfizierten Kontrolltieren. Die Behandlung uninfizierter Tiere mit Selegilin rief jedoch eine signifikante Senkung des cAMP Spiegels hervor. Bei der Behandlung uninfizierter Rhesusaffen mit L-DOPA kam es zu einem Ansteigen des cAMP Spiegels (siehe Abbildung 25).

	SIV	SIV+Selegilin	Selegilin	SIV+L-DOPA	L-DOPA
Kontrollen	X		X		X
SIV		X		X	

Tabelle 19: Darstellung der einzelnen Gruppen von Rhesusaffen, die in dieser Hirnregion miteinander verglichen wurden (X).

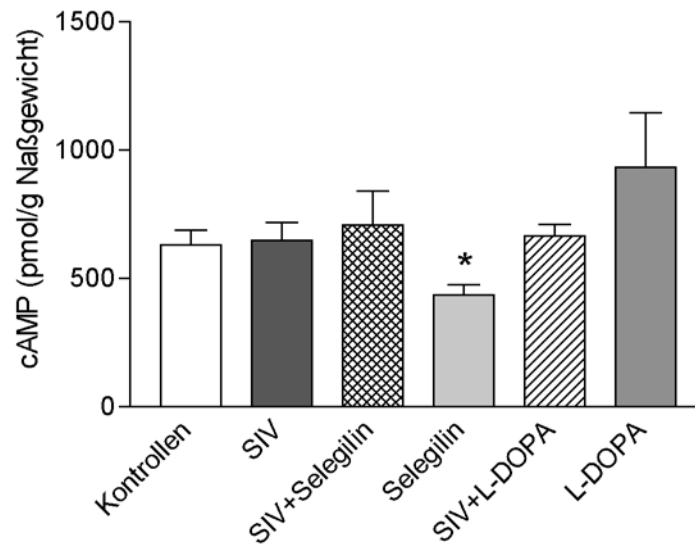


Abbildung 25: Effekte von Selegilin und L-DOPA auf die cAMP Konzentration im Corpus amygdaloideum SIV-infizierter Rhesusaffen. Die Tiere wurden in sechs Gruppen eingeteilt: uninfizierte/ unbehandelte (Kontrollen, n=5); SIV-infizierte/ unbehandelte (SIV, n=6); SIV-infizierte/ mit Selegilin behandelte (SIV+Selegilin, n=7); uninfizierte/ mit Selegilin behandelte (Selegilin, n=3); SIV-infizierte/ mit L-DOPA behandelte (SIV+ L-DOPA, n=4) sowie uninfizierte/ mit L-DOPA behandelte (L-DOPA, n=3). Die Daten zeigen Mittelwerte \pm S.E.M, * $p < 0,05$, signifikante Differenz im Vergleich zu den Kontrollen (ungepaarter t Test mit Welch's Korrektur).

3.1.3.3 Effekte von Selegilin und L-DOPA auf cAMP im Putamen von SIV-infizierten Rhesusaffen

Die Behandlung SIV-infizierter Rhesusaffen mit Selegilin bzw. L-DOPA führte im Putamen zu keinem Anstieg der cAMP Konzentration. Die uninfizierten, mit Selegilin bzw. L-DOPA behandelten Tiere haben, verglichen mit den Kontrolltieren, ebenfalls keine signifikanten Veränderungen in der cAMP Konzentration (siehe Abbildung 26).

	SIV	SIV+Selegilin	Selegilin	SIV+L-DOPA	L-DOPA
Kontrollen	X		X		X
SIV		X		X	

Tabelle 20: Darstellung der einzelnen Gruppen von Rhesusaffen, die in dieser Hirnregion miteinander verglichen wurden (X).

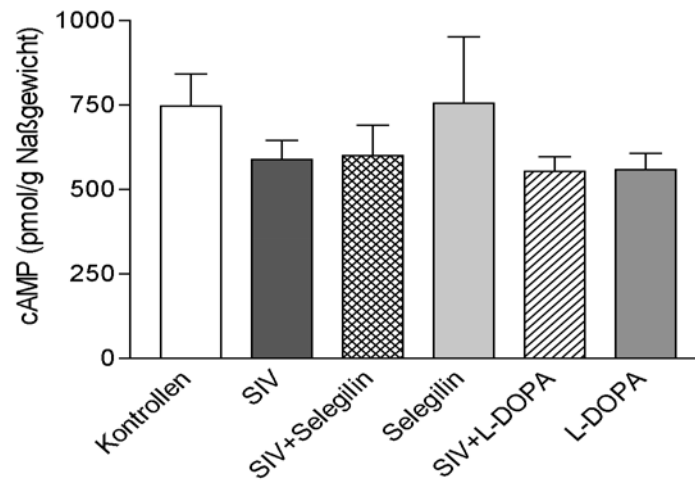


Abbildung 26: Effekte von Selegilin und L-DOPA auf die cAMP Konzentration Putamen SIV-infizierter Rhesusaffen. Die Tiere wurden in sechs Gruppen eingeteilt: uninfizierte/ unbehandelte (Kontrollen, n=5); SIV-infizierte/ unbehandelte (SIV, n=6); SIV-infizierte/ mit Selegilin behandelte (SIV+Selegilin, n=10); uninfizierte/ mit Selegilin behandelte (Selegilin, n=5); SIV-infizierte/ mit L-DOPA behandelte (SIV+ L-DOPA, n=4) sowie uninfizierte/ mit L-DOPA behandelte (L-DOPA, n=3). Die Daten zeigen Mittelwerte \pm S.E.M.

3.2 CREB

Um die Expressionsstärke des Transkriptionsfaktors CREB zu bestimmen, wurden die Gehirnproben der zu untersuchenden Tiere mit Hilfe des Western-Blot Verfahrens analysiert. Die phosphorylierte Form des CREB Proteins war im Western-Blot nicht detektierbar. Nur das gesamte CREB (gesamt CREB = total CREB im Englischen) war nachweisbar. Es wurden die Hirnregionen Nucleus accumbens, Corpus amygdaloideum und das Putamen untersucht.

Da es sich bei der Messung des CREB um eine semiquantitative Methode handelt, wurde der Mittelwert der Kontrollgruppe als 100% Wert angenommen. Die Tiere der Kontrollengruppe waren weder mit SIV infiziert, noch waren sie behandelt worden. Die Ergebnisse aller anderen Behandlungsarten wurden im Verhältnis zur entsprechenden Kontrollgruppe angegeben.

3.2.1 Gesamt CREB im Gehirn SIV-infizierter Rhesusaffen

In allen untersuchten Hirnregionen war die Konzentration des gesamten CREB Proteins in der Gruppe der mit SIV-infizierten, unbehandelten Rhesusaffen signifikant niedriger als in den uninfizierten, unbehandelten Kontrolltieren. Zu den Tieren chinesischer

Herkunft wurden hierfür auch Affen indischer Herkunft mit hinzugenommen, falls deren Ergebnisse – auf das Herkunftsland bezogen - sich entweder nicht signifikant unterschieden, oder aber die gleiche Tendenz zeigten.

3.2.1.1 Gesamt CREB im Nucleus accumbens SIV-infizierter Rhesusaffen

Im Nucleus accumbens betrug die Konzentration des gesamt CREB in den mit SIV-infizierten Rhesusaffen durchschnittlich 57,55% der gesamt CREB Konzentration der Kontrolltiere (siehe Abbildungen 27 und 28). Dieser Unterschied ist statistisch signifikant. Bereits auf dem Röntgenfilm des Western-Blot sind die Banden der Kontrolltiere deutlich stärker ausgeprägt als die der SIV-infizierten Rhesusaffen.

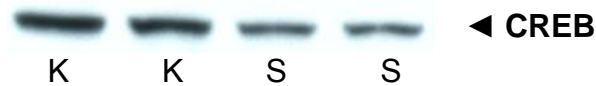


Abbildung 27: Repräsentativer Western-Blot des gesamt CREB im Nucleus accumbens von Kontrolltieren (K) und SIV-infizierten Tieren (S). In jeder Bahn wurden 20 µg Protein aufgetragen. Die Immunreaktivität zeigte sich in Höhe der molekularen Masse von 43 kDa.

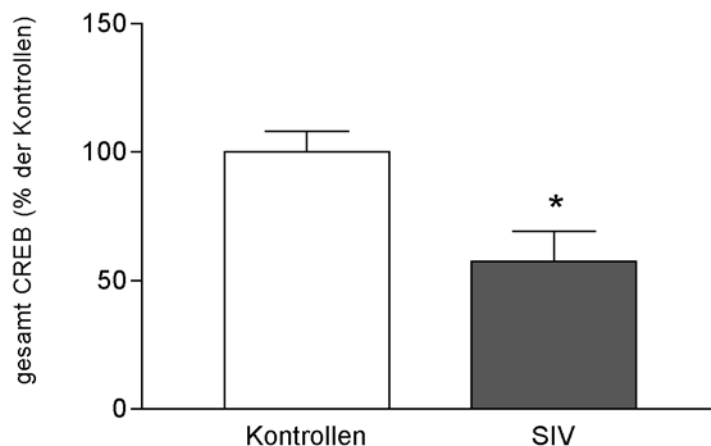


Abbildung 28: Dichtemessungs-Analyse des gesamt CREB Spiegels im Nucleus accumbens von uninfizierten, unbehandelten (Kontrollen, n=6) und mit SIV-infizierten (SIV, n=5) Rhesusaffen. Die Daten sind Mittelwerte \pm S.E.M. und sind in % der Kontrollen dargestellt, * $p < 0,05$, signifikante Differenz im Vergleich zu den Kontrollen (ungepaarter t Test mit Welch's Korrektur).

3.2.1.2 Gesamt CREB im Corpus amygdaloideum SIV-infizierter Rhesusaffen

Auch in dieser Hirnregion zeigte sich die Konzentration des gesamt CREB bei SIV-infizierten Rhesusaffen mit durchschnittlich 55,17% niedriger als bei den uninfizierten, unbehandelten Kontrolltieren (siehe Abbildungen 29 und 30). Der Unterschied ist ebenfalls signifikant und ist anhand der Bandenstärke bereits auf dem Röntgenfilm des Western-Blot zu erkennen.

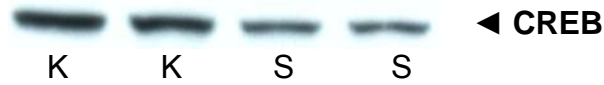


Abbildung 29: Repräsentativer Western-Blot des gesamt CREB im Corpus amygdaloideum von Kontrolltieren (K) und SIV-infizierten Tieren (S). In jeder Bahn wurden 10 µg Protein aufgetragen. Die Immunreaktivität zeigte sich in Höhe der molekularen Masse von 43 kDa.

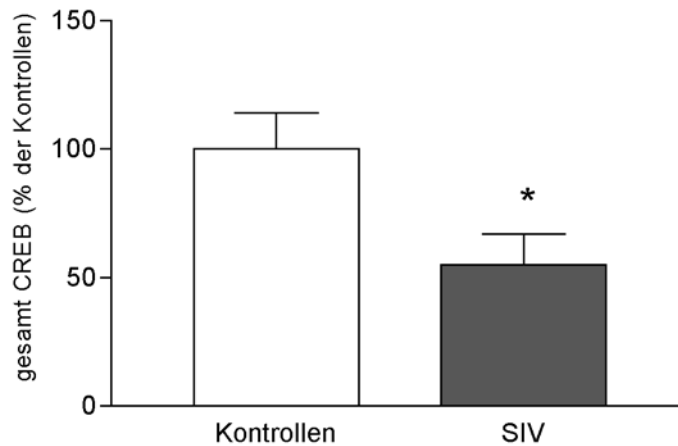


Abbildung 30: Dichtemessungs-Analyse des gesamt CREB Spiegels im Corpus amygdaloideum von uninfizierten, unbehandelten (Kontrollen, n=7) und mit SIV-infizierten (SIV, n=5) Rhesusaffen. Die Daten sind Mittelwerte ± S.E.M. und sind in % der Kontrollen dargestellt, * $p < 0,05$, signifikante Differenz im Vergleich zu den Kontrollen (ungepaarter t Test mit Welch's Korrektur).

3.2.1.3 Gesamt CREB im Putamen SIV-infizierter Rhesusaffen

Im Vergleich zu den Kontrolltieren betrug die Konzentration des gesamt CREB von SIV-infizierten Rhesusaffen im Putamen 41,22% (siehe Abbildungen 31 und 32). Der Unterschied erwies sich als statistisch signifikant. Ein Affe der SIV-Gruppe war an AIDS erkrankt. Auch auf dem Röntgenfilm des Western-Blot lässt sich eine Differenz in der Bandenstärke deutlich erkennen.

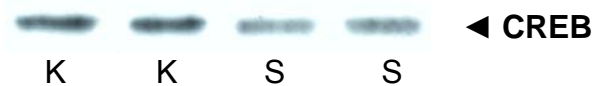


Abbildung 31: Repräsentativer Western-Blot des gesamt CREB im Putamen von Kontrolltieren (K) und SIV-infizierten Tieren (S). In jeder Bahn wurden 20 µg Protein aufgetragen. Die Immunreaktivität zeigte sich in Höhe der molekularen Masse von 43 kDa.

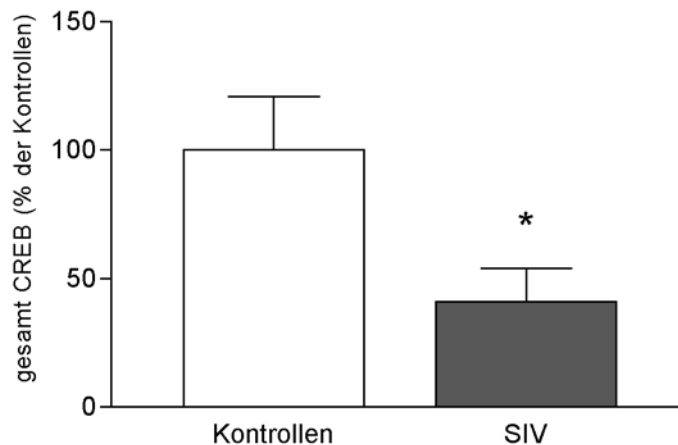


Abbildung 32: Dichtemessungs-Analyse des gesamt CREB Spiegels im Putamen von uninfizierten, unbehandelten (Kontrollen, n=6) und mit SIV-infizierten (SIV, n=4) Rhesusaffen. Die Daten sind Mittelwerte \pm S.E.M. und sind in % der Kontrollen dargestellt, * $p < 0,05$, signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Kontrollen (ungepaarter t Test mit Welch's Korrektur).

3.2.2 Effekte von Selegilin und L-DOPA auf das CREB Protein im Gehirn SIV-infizierter Rhesusaffen

Untersucht wurden die Hirnregionen Nucleus accumbens, Corpus amygdaloideum und Putamen. In den Hirnregionen Nucleus accumbens und Putamen war die Konzentration des gesamt CREB in den mit SIV-infizierten, unbehandelten Rhesusaffen - im Vergleich

- zu den Kontrolltieren,
- zu den SIV-infizierten, mit Selegilin behandelten Tieren,
- zu den uninfizierten, mit Selegilin behandelten Tieren
- sowie zu den SIV-infizierten, mit L-DOPA behandelten Tieren
- und zu den uninfizierten, mit L-DOPA behandelten Tieren -

am niedrigsten. Im Corpus amygdaloideum zeigte sich jedoch kein Unterschied in der Konzentration des gesamt CREB zwischen SIV-infizierten, unbehandelten Rhesusaffen und SIV-infizierten mit Selegilin bzw. L-DOPA behandelten Tieren.

In den Tabellen über den Abbildungen sind die einzelnen Gruppen, die miteinander verglichen wurden, nochmals bildlich dargestellt.

3.2.2.1 Effekte von Selegilin auf CREB im Nucleus accumbens von SIV-infizierten Rhesusaffen

Die Daten der Tiere chinesischer Herkunft wurden mit denen der Tiere indischer Herkunft gepoolt, da zwischen diesen kein signifikanter Unterschied bestand.

Im Nucleus accumbens war bei den SIV-infizierten, mit Selegilin behandelten Rhesusaffen die Konzentration des gesamten CREB Proteins mit 78,88% deutlich höher als in den SIV-infizierten, unbehandelten Rhesusaffen. Dort lag die Konzentration des gesamt CREB nur bei 57,55% (siehe Abbildungen 33 und 34).

Die Konzentration des gesamten CREB Proteins der uninfizierten, mit Selegilin behandelten Rhesusaffen entsprach dem der SIV-infizierten, mit Selegilin behandelten Rhesusaffen, konnte aber nicht das Niveau der Kontrolltiere erreichen.

	SIV	SIV+Selegilin	Selegilin
Kontrollen	X		X
SIV		X	

Tabelle 21: Darstellung der einzelnen Gruppen von Rhesusaffen, die in dieser Hirnregion miteinander verglichen wurden (X).

Auch auf dem Röntgenfilm des Western-Blot sind die oben beschriebenen Unterschiede schon zu erkennen.

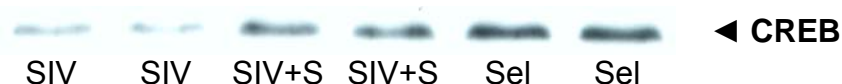


Abbildung 33: Repräsentativer Western-Blot des gesamt CREB im Nucleus accumbens von SIV-infizierten, unbehandelten (SIV); SIV-infizierten, mit Selegilin behandelten (SIV+S) und uninfizierten, mit Selegilin behandelten (Sel) Rhesusaffen. In jeder Bahn wurden 20 µg Protein aufgetragen. Die Immunreaktivität zeigte sich in Höhe der molekularen Masse von 43 kDa.

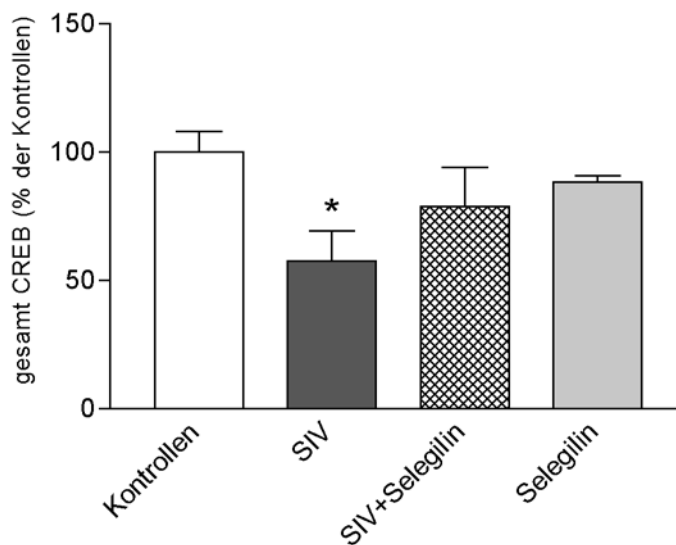


Abbildung 34: Dichtemessungs-Analyse des gesamt CREB Spiegels im Nucleus accumbens von SIV-infizierten Rhesusaffen. Die Tiere wurden in vier Gruppen eingeteilt: uninfizierte/ unbehandelte (Kontrollen, n=6); SIV-infizierte/ unbehandelte (SIV, n=5); SIV-infizierte/ mit Selegilin behandelte (SIV+Selegilin, n=4) sowie uninfizierte/ mit Selegilin behandelte (Selegilin, n=2). Die Daten zeigen Mittelwerte \pm S.E.M. und werden als % der Kontrollen dargestellt, * $p < 0,05$, signifikante Differenz im Vergleich zu den Kontrollen (ungepaarter t Test mit Welch's Korrektur).

3.2.2.2 Effekte von Selegilin und L-DOPA auf CREB im Corpus amygdaloideum von SIV-infizierten Rhesusaffen

Es wurden nur Tiere chinesischer Herkunft in der Auswertung verwendet. Zwischen der Kontrollgruppe und den SIV-infizierten, unbehandelten Tieren zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der CREB Konzentration.

Die Behandlung von SIV-infizierten Tieren mit Selegilin führte zu keinen Veränderungen des gesamt CREB Spiegels im Corpus amygdaloideum. Bei den uninfizierten, mit Selegilin behandelten Tieren zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe kein statistisch signifikanter Unterschied, die Werte waren tendenziell erniedrigt.

Die Behandlung mit L-DOPA zeigte bei SIV-infizierten Tieren ebenfalls keinen Anstieg des gesamt CREB Spiegels. Bei den uninfizierten, mit L-DOPA behandelten Tieren war die Konzentration tendenziell niedriger als die der Kontrollen. Es zeichnete sich aber kein signifikanter Unterschied ab (siehe Abbildung 35).

	SIV	SIV+Selegilin	Selegilin	SIV+L-DOPA	L-DOPA
Kontrollen	X		X		X
SIV		X		X	

Tabelle 22: Darstellung der einzelnen Gruppen von Rhesusaffen, die in dieser Hirnregion miteinander verglichen wurden (X).

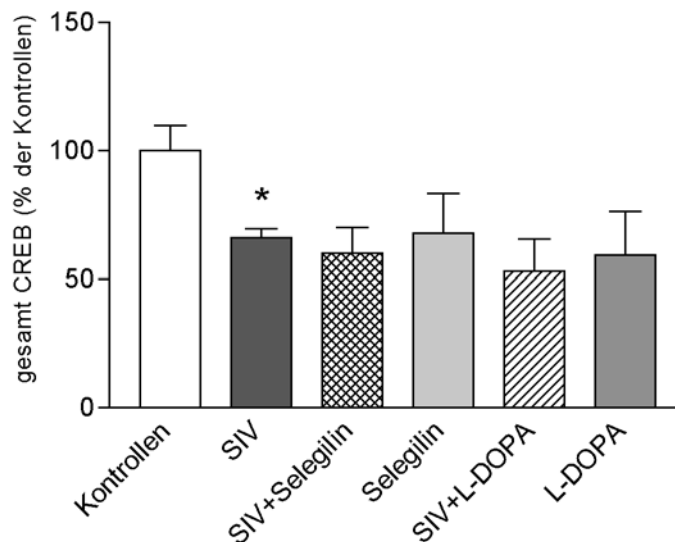


Abbildung 35: Dichtemessungs-Analyse des gesamt CREB Spiegels im Corpus amygdaloideum von SIV-infizierten Rhesusaffen. Die Tiere wurden in sechs Gruppen eingeteilt: uninfizierte/ unbehandelte (Kontrollen, n=4); SIV-infizierte/ unbehandelte (SIV, n=2); SIV-infizierte/ mit Selegilin behandelte (SIV+Selegilin, n=3); uninfizierte/ mit Selegilin behandelte (Selegilin, n=3); SIV-infizierte/ mit L-DOPA behandelte (SIV+ L-DOPA, n=2) sowie uninfizierte/ mit L-DOPA behandelte (L-DOPA, n=3). Die Daten zeigen Mittelwerte \pm S.E.M. und werden als % der Kontrollen dargestellt, * $p < 0,05$, signifikante Differenz im Vergleich zu den Kontrollen (ungepaarter t Test mit Welch's Korrektur).

3.2.2.3 Effekte von Selegilin und L-DOPA auf CREB im Putamen von SIV-infizierten Rhesusaffen

Auch in der Hirnregion Putamen wurde ein statistisch signifikanter Unterschied in der CREB Konzentration zwischen Kontrolltieren und SIV-infizierten Tieren festgestellt. Die Behandlung SIV-infizierter Rhesusaffen mit Selegilin führte zu einem signifikanten Anstieg der gesamt CREB Konzentration im Vergleich zu den SIV-infizierten, unbehandelten Tieren. Bei den uninfizierten, mit Selegilin behandelten Rhesusaffen zeigte sich kein signifikanter Unterschied des gesamt CREB Spiegels im Vergleich zu den uninfizierten, unbehandelten Kontrolltieren.

Die Behandlung mit L-DOPA rief ebenfalls einen Anstieg der reduzierten gesamt CREB Konzentration im Putamen von SIV-infizierten Tieren hervor. Bei den uninfizierten Tieren konnte ebenso eine Erhöhung des gesamt CREB Spiegels durch die Behandlung mit L-DOPA nachgewiesen werden. Eine statistische Signifikanz bestand jedoch nicht (siehe Abbildungen 36 und 37).

Ein Affe der SIV-Gruppe war an AIDS erkrankt.

	SIV	SIV+Selegilin	Selegilin	SIV+L-DOPA	L-DOPA
Kontrollen	X		X		X
SIV		X		X	

Tabelle 23: Darstellung der einzelnen Gruppen von Rhesusaffen, die miteinander verglichen wurden (X).

Die Bandenbreite auf dem Röntgenfilm des Western-Blots zeigt bereits die oben beschriebenen Veränderungen.

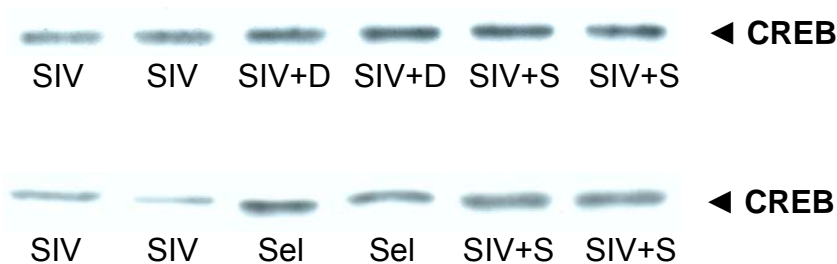


Abbildung 36: Repräsentativer Western-Blot des gesamt CREB im Putamen von SIV-infizierten Rhesusaffen. Die obere Abbildung zeigt die Banden von SIV-infizierten, unbehandelten (SIV); SIV-infizierten, mit L-DOPA behandelten (SIV+D) sowie SIV-infizierten, mit Selegilin behandelten (SIV+S) Rhesusaffen. In der unteren Abbildung sind die Banden von SIV-infizierten, unbehandelten (SIV), uninfizierten, mit Selegilin behandelten (Sel) und SIV-infizierten, mit Selegilin behandelten (SIV+S) Rhesusaffen gezeigt. In jeder Bahn wurden 20 µg Protein aufgetragen. Die Immunreaktivität zeigte sich in Höhe der molekularen Masse von 43 kDa.

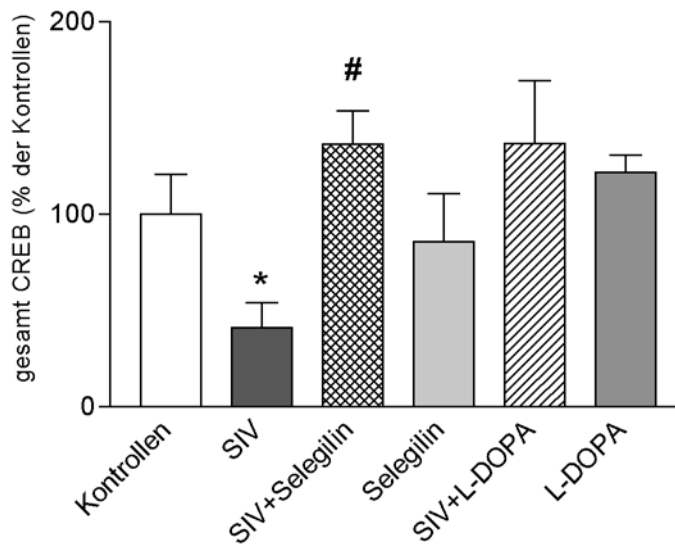


Abbildung 37: Dichtemessungs-Analyse des gesamt CREB Spiegels im Putamen von SIV-infizierten Rhesusaffen. Die Tiere wurden in sechs Gruppen eingeteilt: uninfizierte/ unbehandelte (Kontrollen, n=6); SIV-infizierte/ unbehandelte (SIV, n=4); SIV-infizierte/ mit Selegilin behandelte (SIV+Selegilin, n=3); uninfizierte/ mit Selegilin behandelte (Selegilin, n=3); SIV-infizierte/ mit L-DOPA behandelte (SIV+ L-DOPA, n=2) sowie uninfizierte/ mit L-DOPA behandelte (L-DOPA, n=3). Die Daten zeigen Mittelwerte \pm S.E.M. und werden als % der Kontrollen dargestellt, * $p < 0,05$, signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Kontrollen (ungepaarter t Test mit Welch's Korrektur), # $p < 0,05$, signifikanter Unterschied im Vergleich zu den SIV-infizierten, unbehandelten Tieren (ungepaarter t Test mit Welch's Korrektur).

3.3 Tabelle der verwendeten Versuchstiere

Nr.	Land	Virustyp	Infekt.dauer in Wo	Infektionsverlauf	Behandlung
9329	China	-	0	uninfiziert	keine
9332	China	-	0	uninfiziert	keine
9341	China	-	0	uninfiziert	keine
1943	Indien	-	0	uninfiziert	keine
7990	Indien	-	0	uninfiziert	keine
8161	Indien	-	0	uninfiziert	keine
8162	Indien	-	0	uninfiziert	keine
8993	China	-	0	uninfiziert	Mock
9824	China	-	0	uninfiziert	Mock
9825	China	-	0	uninfiziert	Mock
8179	China	251 MPBMC	12,3	asymptomatisch	keine
8183	China	251 MPBMC	20,1	asymptomatisch	keine
8881	China	251 MPBMC	19,1	asymptomatisch	keine
8991	China	251 MPBMC	8	asymptomatisch	keine
8994	China	251 MPBMC	16,3	asymptomatisch	keine
8159	Indien	251 MPBMC	18	asymptomatisch	keine
8649	Indien	239	66	asymptomatisch	keine
8771	Indien	251 MPBMC	4,1	asymptomatisch	keine
8779	Indien	239 334P@L	73,6	asymptomatisch	keine

Nr.	Land	Virustyp	Infekt.dauer in Wo	Infektionsverlauf	Behandlung
8784	Indien	239 334P@L	72,7	asymptomatisch	keine
8484	Indien	251 MPBMC	16,3	asymptomatisch	keine
9541	Indien	251 MPBMC	8,3	rapid	keine
9544	Indien	251 MPBMC	6,3	rapid	keine
1863	Indien	239	19,1	rapid AIDS	keine
1819	Indien	239	29,4	AIDS	keine
1962	Indien	239	14,1	rapid AIDS	keine
8482	Indien	251 MPBMC	67,4	AIDS	keine
8657	Indien	239	66	AIDS	keine
8665	Indien	251 MPBMC	28,9	AIDS	keine
9034	Indien	239	28,4	AIDS	keine
9828	China	251 MPBMC	11,9	asymptomatisch	Mock
9829	China	251 MPBMC	15,9	asymptomatisch	Mock
9830	China	251 MPBMC	32,4	asymptomatisch	Mock
9340	China	251 MPBMC	31,9	AIDS	Mock
8178	China	251 MPBMC	15,1	asymptomatisch	Selegilin
8180	China	251 MPBMC	20,1	asymptomatisch	Selegilin
8182	China	251 MPBMC	12,3	asymptomatisch	Selegilin
8500	China	251 MPBMC	8	asymptomatisch	Selegilin
8502	China	251 MPBMC	12	asymptomatisch	Selegilin
8989	China	251 MPBMC	16,3	asymptomatisch	Selegilin
9335	China	251 MPBMC	33	asymptomatisch	Selegilin
9826	China	251 MPBMC	11,9	asymptomatisch	Selegilin
9827	China	251 MPBMC	15,9	asymptomatisch	Selegilin
9832	China	251 MPBMC	32,4	asymptomatisch	Selegilin
8501	China	-	0	uninfiziert	Selegilin
8503	China	-	0	uninfiziert	Selegilin
9822	China	-	0	uninfiziert	Selegilin
9823	China	-	0	uninfiziert	Selegilin
9331	China	-	0	uninfiziert	Selegilin
8880	China	251 MPBMC	12,1	asymptomatisch	L-DOPA
8882	China	251 MPBMC	15,1	asymptomatisch	L-DOPA
8990	China	251 MPBMC	14,9	asymptomatisch	L-DOPA
8992	China	252 MPBMC	14,9	asymptomatisch	L-DOPA
8879	China	-	0	uninfiziert	L-DOPA
8883	China	-	0	uninfiziert	L-DOPA
8884	China	-	0	uninfiziert	L-DOPA

Tabelle 24: Verwendete Versuchstiere. Mock bedeutet die Affen erhielten ebenfalls eine Injektion, gleich den Affen mit Behandlung, nur dass bei den Affen der Mockgruppe keine Medikation in der Injektionslösung war.

4. Diskussion

In den letzten Jahren gibt es zunehmend Beweise dafür, dass viele klinische Zeichen der HIV-Demenz mit Veränderungen im dopaminergen System assoziiert sind (Lopez et al., 1999; Berger und Arendt, 2000; Nath et al., 2000; Koutsilieri et al., 2002a). Auch bei SIV-infizierten Rhesusaffen findet man schon in der frühen Phase der Infektion eine Reduktion der Dopaminkonzentration im Vergleich zu uninfizierten Tieren (Czub et al., 2001; Jenuwein et al., 2004). Um herauszufinden, ob diese Unterschiede im dopaminergen System auch zu Veränderungen der dopaminergen Signaltransduktion führen, wurden in Rhesusaffen Hirnregionen in denen dopaminerge Bahnen enden, wie zum Beispiel Kerngebiete des limbischen Systems sowie das Putamen, untersucht. Dazu wurden die intrazellulären Konzentrationen von cAMP – einem „second messenger“ unter anderem auch von Dopamin - und die Expressionsstärke des Transkriptionsfaktors CREB – ein in der Signalkaskade Dopamin/cAMP nachgeschaltetes Protein - gemessen.

Der cAMP Spiegel war im Nucleus accumbens und im Putamen von SIV-infizierten Rhesusaffen im Vergleich zu uninfizierten Kontrolltieren reduziert, blieb aber im Corpus amygdaloideum derselben Tiere unverändert. Bei der Expression von CREB zeigte sich im Nucleus accumbens, im Corpus amygdaloideum und im Putamen eine deutliche Minderung der Expressionstärke in SIV-infizierten Tieren im Vergleich zur uninfizierten Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse können durch eine unterschiedliche Verteilung von D1/D2–Rezeptorgruppen zwischen diesen Hirnregionen erklärt werden, da die verschiedenen Dopaminrezeptoren auf unterschiedliche Arten an die cAMP „second messenger“ Kaskade gekoppelt sind. D1-Rezeptoren stimulieren die Effektorenzyme der Adenylatzyklase, wohingegen die D2-Rezeptoren diese inhibieren (Senogles et al., 1988). Weiterhin sollte in Betracht gezogen werden, dass Aussagen über die Synthese von Dopamin direkt mit dopaminergen Zellen assoziiert sind. Allerdings können die Aussagen der vorliegenden Arbeit über cAMP und CREB nicht nur auf eine veränderte dopaminerge Signaltransduktion zurückzuführen sein, sondern vielleicht auch Ergebnis eines Zusammenspiels der unterschiedlichen Zellarten des Gehirns sein.

Der Einfluss von Dopaminetika auf die dopaminerge Signaltransduktion, wurde bei SIV-infizierten und uninfizierten Rhesusaffen untersucht. Die Tiere wurden entweder

mit Selegilin oder L-DOPA behandelt. Selegilin ist ein Medikament, das durch die irreversible Hemmung der Monoaminoxidase (MAO) den Dopaminabbau im Gehirn solange verzögert, bis das Neuron wieder neue MAO synthetisiert hat. In hoher Konzentration kann Selegilin die Wiederaufnahme von Dopamin in die präsynaptische Zelle hemmen (Knoll, 1978). Bei Patienten mit HIV-Demenz führt die Gabe von Selegilin zur Verbesserung kognitiver Fähigkeiten (Dana Consortium, 1998). Zur medikamentösen Dopaminsubstitution im zentralen Nervensystem haben wir L-DOPA verabreicht, da Dopamin selbst kaum liquorgängig ist. In Kombination mit L-DOPA haben wir einen peripher wirkenden, nicht liquorgängigen DOPAdecarboxylase (DDC)-Hemmstoff gegeben, so dass möglichst viel L-DOPA in das ZNS gelangen konnte. Die Behandlung mit L-DOPA steigert die Dopaminkonzentration im Gehirn und bewirkt bei HIV-Demenz-Patienten eine Milderung der Parkinsonsymptomatik (Mintz et al., 1996).

Im Corpus amygdaloideum bewirkt die dopaminerge Medikation keine Veränderungen der cAMP Konzentration, diese war aber bei den SIV-infizierten Tieren im Vergleich zu den Kontrollen auch nicht erniedrigt. Bei den Kontrolltieren führte die Gabe von Selegilin im Corpus amygdaloideum zu einem Abfall der cAMP Konzentration, wohingegen die Gabe von L-DOPA ein tendenzielles Ansteigen der cAMP Konzentration hervorrief. Jedoch auch im Nucleus accumbens und im Putamen waren weder bei den uninfizierten, noch bei den SIV-infizierten Affen wesentliche Veränderungen der cAMP Konzentration durch die Behandlung mit dopaminergen Medikamenten zu erkennen.

Der CREB Spiegel der SIV-infizierten Rhesusaffen stieg in den Hirnregionen Nucleus accumbens und Putamen durch die Behandlung mit Selegilin an. Im Corpus amygdaloideum kam es weder durch die Behandlung SIV-infizierter Tiere mit Selegilin noch mit L-DOPA zu einer Veränderung des CREB Spiegels. L-DOPA führte hingegen im Putamen zu einer Erhöhung des CREB Spiegels. Dies deutet darauf hin, dass die Veränderungen der CREB Konzentration bei SIV-infizierten Rhesusaffen, zumindest teilweise, mit einem Dopamindefizit in denselben Hirnregionen einhergehen.

Bei den uninfizierten Rhesusaffen hatten Selegilin und L-DOPA keinen Einfluss auf die CREB Konzentration. Bei diesen Tieren bestand initial natürlich auch kein Dopamin-respektive CREB Mangel.

Unter den Versuchstieren gab es eine Gruppe von Rhesusaffen die das AIDS Stadium der SIV-Infektion erreicht hatten.

- Zwischen den an AIDS erkrankten SIV-infizierten Rhesusaffen und
- den SIV-infizierten Rhesusaffen mit bis zur Tötung asymptomatischen Krankheitsverlauf,

konnte in der cAMP Konzentration kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Es ist anzumerken, dass die zum Vergleich herangezogenen SIV-infizierten Tiere aus einem Pool an Tieren stammen, die mit verschiedenen (makrophagotropen und lymphotropen) Virusstämmen infiziert waren. Dennoch wird - durch die ähnliche cAMP Konzentration in SIV-infizierten Rhesusaffen mit asymptomatischen Infektionsverlauf und in Rhesusaffen mit AIDS - die Annahme verstärkt, dass bereits im noch asymptomatischen Stadium der HIV-Infektion, den weiteren Krankheitsverlauf wesentlich beeinflussende, pathologische Prozesse im Gehirn stattfinden.

Bisher gibt es keine Daten über intrazelluläre Konzentrationen von cAMP im Gehirn von HIV-infizierten Patienten bzw. SIV-infizierten Affen. Betrachtet man die direkten Effekte von HIV auf die Signaltransduktion durch cAMP in Zellen des Nervensystems, so gibt es nur Informationen aus *in-vitro* Versuchen: In PC12 Zellen führt das HIV Tat-Protein nach zwei Stunden zu einem Abfall der intrazellulären cAMP Konzentration (Zauli et al., 2001). Zudem wird die Expression der Tyrosinhydroxylase - dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym in der Dopaminsynthese - verhindert.

Proteine aus der Familie der Transkriptionsfaktoren, die das cAMP-responsive Element modulieren, inhibieren auch die Produktion und Freisetzung von Dopamin in das Kulturmedium (Zauli et al., 2000). Es wird außerdem von einem Rückgang der cAMP Synthese in Mikrogliazellen durch die Behandlung mit dem Tat-Protein berichtet (Patrizio et al., 2001).

Die intrazelluläre cAMP Konzentration ist bei einer Infektion mit Immundefizienzviren von Bedeutung: *In vitro* Untersuchungen zeigen, dass die von aktivierten Gliazellen produzierten Substanzen durch die intrazelluläre Konzentration des „second messenger“ cAMP zu regulieren sind: cAMP verstärkt die Produktion von potentiell neuroprotektiven Molekülen wie Interleukin 10 (IL-10) (Aloisi et al., 1999) und Prostaglandin (PG) (Minghetti et al., 1997) in der Mikroglia. Des Weiteren führt cAMP

zu einem Abfall von potentiell neurotoxischen Substanzen wie TNF- α (Aloisi et al., 1999; Suzumura et al., 1999) und Stickstoff (Minghetti et al., 1997). Diese Substanzen werden im Gehirn von HIV-Infizierten als erhöht beschrieben (Tyor et al., 1992; Adamson et al., 1996; Nuovo und Alfieri, 1996). Pharmaka, wie Pentoxifylin oder Rolipram, die den intrazellulären cAMP Spiegel erhöhen, haben eine inhibierende Wirkung auf die Replikation des HIV-1 Virus und beeinflussen seine Genexpression (Biswas et al., 1994). Der Rückgang der intrazellulären cAMP Konzentration im Nucleus accumbens und im Putamen bei den in dieser Arbeit untersuchten SIV-infizierten Tieren kann somit einen Defekt der schützenden zellulären Mechanismen zur Folge haben. Dies kann wiederum zu einer neuronalen Dysfunktion in diesen Hirnregionen bereits während des asymptomatischen Stadiums der SIV-Infektion führen. Eine Beeinträchtigung in Regionen des limbischen Systems kann zu Änderungen in den Verhaltensweisen, zu Störungen im System der Belohnung, zu Psychosen sowie zu affektiven Beeinträchtigungen führen. Veränderungen im Putamen äußern sich in motorischer Dysfunktion.

Über den Transkriptionsfaktor CREB, einem Protein in der dem cAMP nachgeschalteten Kaskade der Signaltransduktion, kann cAMP das Transkriptionsmuster von Genen beeinflussen (Montminy, 1997). CREB ist an der Regulation von Genen, welche für die Funktion des Neurons essentiell sind sowie an der Produktion von Proteinen beteiligt, die für das Überleben der Zelle von großer Bedeutung sind (Zafra et al., 1992), insbesondere für das dopaminerge Zellen (Hyman et al., 1991). Es wird auch berichtet, dass CREB im Zusammenhang mit der unmittelbaren postsynaptischen Übermittlung von neuronalen Veränderungen bei Affektstörungen steht (Duman et al., 1997). Im Gehirn depressiver Patienten, die im Vergleich zu Kontrollpatienten, keine Antidepressiva erhielten, kam es zu einem Abfall des CREB Spiegels (Dowlathshahi et al., 1998; Yamada et al., 2003). Der Abfall der CREB Konzentration in SIV-infizierten Rhesusaffen kann deshalb eine Störung der Affektivität innerhalb der Infektion mit dem Immundefizienzvirus anzeigen. Durch eine dopaminerge Medikation ist nur im Putamen, welches den motorischen Hirnregionen zugeordnet wird, eine signifikante Steigerung der CREB Expression nachzuweisen. In den dem limbischen System zugehörigen untersuchten Hirnregionen konnte nur im Nucleus accumbens eine tendenzielle Erhöhung der CREB Expression durch

Selegilinmedikation gezeigt werden. Im Corpus amygdaloideum führten die dopaminergen Substanzen zu keinen Veränderungen in der CREB Expression. Die Ergebnisse des CREB Spiegels dieser Arbeit müssen jedoch mit der gebotenen Vorsicht interpretiert werden. Die Konzentration des phosphorylierten CREB konnte im postmortem Hirngewebe nicht verlässlich nachgewiesen werden, was die Beurteilung der funktionellen Bedeutung des Abfalls der CREB Konzentration in Hinsicht auf die neuronale Genexpression erschwert.

Bei der Beurteilung der Ergebnisse dieser Arbeit ist außerdem die, durch die geringe Anzahl der Versuchstiere, möglicherweise eingeschränkte Aussagekraft der festgestellten Veränderungen zu berücksichtigen. Zur Verifizierung der Ergebnisse sind Studien ähnlichen Charakters mit erheblich größeren Fallzahlen empfehlenswert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen einen Einfluss der Veränderungen in der Signaltransduktion auf die Pathophysiologie der mit der Immunschwäche assoziierten neuropsychiatrischen Erkrankungen vermuten, da in den motorischen und den Affekt betreffenden dopaminergen Hirnregionen SIV-infizierter Rhesusaffen das Vorkommen von CREB und auch von cAMP vermindert ist. Die Resultate deuten zudem auf die Existenz eines biologischen Hintergrundes neuropsychiatrischer Störungen bei Patienten mit einer HIV-Infektion hin.

Somit wären die eingangs gestellten Fragen nach Veränderungen der cAMP Konzentration und der CREB Expression in Hirnarealen mit veränderter Dopaminkonzentration SIV-infizierter Rhesusaffen beantwortet. Die dopaminerge Medikation führte jedoch nur teilweise zum Rückgang der Veränderungen, so dass ihre mögliche Anwendung in der Therapie der HIV-Demenz kritisch überdacht werden sollte.

5. Zusammenfassung

Obwohl das Krankheitsbild der HIV-Demenz schon seit über 20 Jahren bekannt ist, sind die Abläufe und Mechanismen, die zur Ausbildung neuropsychiatrischer Defizite führen, noch immer ungeklärt. Um die Ätiologie und Pathogenese der HIV-Demenz verstehen zu können, sind Untersuchungen in einer möglichst frühen, noch asymptomatischen Phase der HIV-Infektion notwendig. Deswegen bietet das SIV/Rhesusaffen-Modell beste Voraussetzungen um die Entstehung der HIV-Demenz genauer zu untersuchen.

Es gibt einige Hinweise, dass viele klinische Zeichen der HIV-Demenz mit Veränderungen im dopaminergen System des ZNS einhergehen. In diesem Zusammenhang wurden in der vorliegenden Arbeit die Signaltransduktion von Dopamin in den dopaminergen Arealen des Gehirns SIV-infizierter Rhesusaffen untersucht. Die Konzentration des cAMP und die Expression des CREB Proteins erwiesen sich als geeignete Untersuchungsparameter. cAMP dient unter anderem dem Neurotransmitter Dopamin in der postsynaptischen Zelle als sogenannter „second messenger“. CREB ist in der darauffolgenden Transduktionskaskade ein Protein, das die Expression zahlreicher Gene beeinflusst. Die Daten wurden für die Hirnregionen Nucleus accumbens, Corpus amygdaloideum und Putamen erhoben. Nucleus accumbens und Corpus amygdaloideum sind Teile des limbischen Systems, die auch in der Pathophysiologie psychiatrischer Störungen und Suchterkrankungen eine Rolle spielen. Das Putamen ist Teil des Corpus striatum, welches extrapyramidale Bewegungsabläufe beeinflusst.

Neben dem Vergleich zwischen Kontrolltieren und SIV-infizierten Rhesusaffen wurden auch die Veränderungen der cAMP bzw. CREB Konzentration bei SIV-infizierten und uninfizierten jeweils mit dopaminergen Medikamenten behandelten Rhesusaffen erfasst. Hierfür wurden einige Tiere mit Selegilin bzw. L-DOPA behandelt. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: Die Konzentration des gesamt CREB war bei SIV-infizierten Tieren in allen untersuchten Hirnregionen reduziert. Die intrazelluläre Konzentration von cAMP war im Nucleus accumbens sowie im Putamen verringert, blieb im Corpus amygdaloideum SIV-infizierter Rhesusaffen jedoch unverändert. Im Nucleus accumbens stieg der CREB Spiegel bei den SIV-infizierten mit Selegilin

behandelten Tieren tendenziell an, die cAMP Konzentration blieb jedoch nahezu unverändert. Im Putamen rief die Behandlung SIV-infizierter Tiere mit Selegilin und L-DOPA eine Erhöhung der CREB Expression hervor. Der cAMP Spiegel im Putamen SIV-infizierter Rhesusaffen wurde von der dopaminergen Medikation nicht beeinflusst. Die mit dopaminergen Medikamenten behandelten Kontrolltiere zeigten im Nucleus accumbens und im Putamen keine wesentlichen Veränderungen, weder in der cAMP Konzentration, noch in der CREB Expression. Im Corpus amygdaloideum blieb die cAMP Konzentration durch die Behandlung SIV-infizierter Rhesusaffen mit Selegilin bzw. L-DOPA unverändert. Die cAMP Konzentration fiel bei den mit Selegilin behandelten Kontrolltieren signifikant ab, stieg jedoch bei den mit L-DOPA behandelten Kontrolltieren an. Der CREB Spiegel hingegen zeigte bei den Kontrolltieren sowie auch bei den SIV-infizierten Tieren mit dopaminergem Behandlung im Corpus amygdaloideum keine signifikanten Veränderungen.

Einige Versuchstiere wurden erst im AIDS-Stadium der Infektion getötet. Diese Tiere zeigten verglichen mit den SIV-infizierten Tieren, die bereits im asymptomatischen Stadium der Erkrankung getötet wurden, im Nucleus accumbens, im Corpus amygdaloideum und auch im Putamen bezüglich der cAMP Konzentration keinen signifikanten Unterschied. Diese Ähnlichkeit weist auf pathologische Veränderungen des ZNS hin, die schon im frühen Stadium der Infektion entstehen und möglicherweise den Krankheitsverlauf entscheidend beeinflussen.

Die Analyse der Ergebnisse zeigt, dass das Immundefizienzvirus in manchen Hirnregionen erwiesenermaßen Veränderungen der dopaminergen Signaltransduktion hervorruft, die sich allerdings nicht in allen Hirnregionen gleich gestalten. Dies könnte auf die unterschiedliche Verteilung der Dopaminrezeptorgruppen in den untersuchten Hirnregionen zurückzuführen sein. Vor allem das Absinken der CREB Konzentration in Regionen des limbischen Systems und im Putamen in SIV-infizierten Rhesusaffen, weist darauf hin, dass die neuropsychiatrischen Veränderungen im Rahmen der HIV-Infektion einen biologischen Hintergrund haben.

Teile der Arbeit wurden bereits veröffentlicht (Jenuwein et al., 2004).

6. Literaturverzeichnis

- Achim, C. L., Heyes, M. P., Wiley, C. A. (1993). "Quantitation of human immunodeficiency virus, immune activation factors, and quinolinic acid in AIDS brains." *J Clin Invest* 91(6): 2769-75.
- Achim, C. L., Wang, R., Miners, D. K., Wiley, C. A. (1994). "Brain viral burden in HIV infection." *J Neuropathol Exp Neurol* 53(3): 284-94.
- Adamson, D. C., Dawson, T. M., Zink, M. C., Clements, J. E., Dawson, V. L. (1996). "Neurovirulent simian immunodeficiency virus infection induces neuronal, endothelial, and glial apoptosis." *Mol Med* 2(4): 417-28.
- Aloisi, F., De Simone, R., Columba-Cabezas, S., Levi, G. (1999). "Opposite effects of interferon-gamma and prostaglandin E2 on tumor necrosis factor and interleukin-10 production in microglia: a regulatory loop controlling microglia pro- and anti-inflammatory activities." *J Neurosci Res* 56(6): 571-80.
- Arendt, G., Maecker, H. P., Purrmann, J., Homberg, V. (1994). "Control of posture in patients with neurologically asymptomatic HIV infection and patients with beginning HIV-1-related encephalopathy." *Arch Neurol* 51(12): 1232-5.
- Bell, J. E., Donaldson, Y. K., Lowrie, S., McKenzie, C. A., Elton, R. A., Chiswick, A., Brettell, R. P., Ironside, J. W., Simmonds, P. (1996). "Influence of risk group and zidovudine therapy on the development of HIV encephalitis and cognitive impairment in AIDS patients." *AIDS* 10(5): 493-9.
- Berger, J. R., Arendt, G. (2000). "HIV dementia: the role of the basal ganglia and dopaminergic systems." *J Psychopharmacol* 14(3): 214-21.
- Berger, J. R., Kumar, M., Kumar, A., Fernandez, J. B., Levin, B. (1994). "Cerebrospinal fluid dopamine in HIV-1 infection." *AIDS* 8(1): 67-71.
- Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K., Seitenberger, F. (1973). "Brain dopamine syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations." *J Neurol Sci* 20: 415-455.
- Biswas, D. K., Ahlers, C. M., Dezube, B. J., Pardee, A. B. (1994). "Pentoxifylline and other protein kinase C inhibitors down-regulate HIV-LTR NF-kappa B induced gene expression." *Mol Med* 1(1): 31-43.
- Brew, B. J., Rosenblum, M., Cronin, K., Price, R. W. (1995). "AIDS dementia complex and HIV-1 brain infection: clinical-virological correlations." *Ann Neurol* 38(4): 563-70.

- Bruhn, H. D., Fölsch, U. R. (1999) "Lehrbuch der Labormedizin: Grundlagen, Diagnostik, Klinik, Pathobiochemie". Stuttgart, New York: Schattauer.
- Budka, H., Wiley, C. A., Kleihues, P., Artigas, J., Asbury, A. K., Cho, E. S., Cornblath, D. R., Dal Canto, M. C., DeGirolami, U., Dickson, D., al., e. (1991). "HIV-associated disease of the nervous system: review of nomenclature and proposal for neuropathology-based terminology." *Brain Pathol* 1(3): 143-52.
- Burudi, E. M. E., Fox, H. S. (2001). "Simian immunodeficiency virus model of HIV-induced central nervous system dysfunction." *Adv Vir Res* 56: 435-468.
- Czub, S., Koutsilieri, E., Sopper, S., Czub, M., Stahl-Hennig, C., Müller, J. G., Pedersen, V., Gsell, W., Heeney, J. L., Gerlach, M., Gosztanyi, G., Riederer, P., ter Meulen, V. (2001). "Enhancement of CNS pathology in early simian immunodeficiency virus infection by dopaminergic drugs." *Acta Neuropathol.* 101: 85-91.
- Czub, S., Muller, J. G., Czub, M., Muller-Hermelink, H. K. (1996). "Nature and sequence of simian immunodeficiency virus-induced central nervous system lesions: a kinetic study." *Acta Neuropathol (Berl)* 92(5): 487-98.
- da Cunha, A., Eiden, L. E. (1993). "Neuro-AIDS: Primate lentivirus infection and the brain." *Adv. Neuroimmunol.* 3: 97-127.
- Demuth, M., Czub, S., Sauer, U., Koutsilieri, E., Haaft, P., Heeney, J., Stahl-Hennig, C., Meulen, V., Sopper, S. (2000). "Relationship between viral load in blood, cerebrospinal fluid, brain tissue and isolated microglia with neurological disease in macaques infected with different strains of SIV." *J Neurovirol* 6(3): 187-201.
- Desrosiers, R. C. (1990). "The simian immunodeficiency viruses." *Annu Rev Immunol* 8: 557-78.
- Dore, G. J., Correll, P. K., Li, Y., Kaldor, J. M., Cooper, D. A., Brew, B. J. (1999). "Changes to AIDS dementia complex in the era of highly active antiretroviral therapy." *AIDS* 13(10): 1249-53.
- Dowlatsahi, D., MacQueen, G. M., Wang, J. F., Young, L. T. (1998). "Increased temporal cortex CREB concentrations and antidepressant treatment in major depression." *Lancet* 352(9142): 1754-5.
- Dressler, S. (2002). "HIV-Infektion und AIDS". *Exaplan.* Abdolvahab-Emminger, H., München, Jena, Urban&Fischer.
- Duman, R. S., Heninger, G. R., Nestler, E. J. (1997). "A molecular and cellular theory of depression." *Arch Gen Psychiatry* 54(7): 597-606.
- Ehringer, H., Hornykiewicz, O. (1960). "Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems." *Wien Klin Wochenschr* 38: 1236-1239.

Ellis, R. J., Gamst, A. C., Capparelli, E., Spector, S. A., Hsia, K., Wolfson, T., Abramson, I., Grant, I., McCutchan, J. A. (2000). "Cerebrospinal fluid HIV RNA originates from both local CNS and systemic sources." *Neurology* 54(4): 927-36.

Falke, D., Gerken, G. (2001). "Retro-Viren". *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Hahn, H., Falke, D., Kaufmann, S. H. E. Ullmann, U., Berlin, Heidelberg, Springer Verlag.

Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Förstermann, U., Starke, K. (2001) "Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie". München, Jena: Urban und Fischer.

Gallo, P., Laverda, A. M., De Rossi, A., Pagni, S., Del Mistro, A., Cogo, P., Piccinno, M. G., Plebani, A., Tavolato, B., Chieco-Bianchi, L. (1991). "Immunological markers in the cerebrospinal fluid of HIV-1-infected children." *Acta Paediatr Scand* 80(6-7): 659-66.

Gassen, H. G., Schimpf, G. (1999) "Gentechnische Methoden". Heidelberg, Berlin: Spektrum, Akademischer Verlag GmbH.

Gelbard, H. A., Nottet, H. S., Swindells, S., Jett, M., Dzenko, K. A., Genis, P., White, R., Wang, L., Choi, Y. B., Zhang, D., et, a. l. (1994). "Platelet-activating factor: a candidate human immunodeficiency virus type 1-induced neurotoxin." *J Virol* 68(7): 4628-35.

Gerlach, M., Reichmann, H., Riederer, P., Götz, W. (2001) "Die Parkinson-Krankheit, Grundlagen, Klinik, Therapie". Wien, New York: Springer-Verlag.

Gisslen, M., Larsson, M., Norkrans, G., Fuchs, D., Wachter, H., Hagberg, L. (1994). "Tryptophan concentrations increase in cerebrospinal fluid and blood after zidovudine treatment in patients with HIV type 1 infection." *AIDS Research and human Retroviruses* 10: 947-951.

Gray, F. (1993) "Atlas of the Neuropathology of HIV infection". New York: Oxford Science Publications.

Griffin, D. E., McArthur, J. C., Cornblath, D. R. (1991). "Neopterin and interferon-gamma in serum and cerebrospinal fluid of patients with HIV-associated neurologic disease." *Neurology* 41(1): 69-74.

Hahn, B., Shaw, G., Cock, K. D., Sharp, P. (2000). "AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications." *Science* 287: 607-614.

Harrison, M. J. G., McArthur, J. (1995). "HIV associated dementia complex." *AIDS and Neurology*. New York, Churchill Livingstone.

- Hirsch, M. S., Curran, J. W. (1996). "Human Immunodeficiency Viruses". Fields Virology. Fields, B. N., Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers.
- Hriso, E., Kuhn, T., Masdeu, J. C., Grundman, M. (1991). "Extrapyramidal symptoms due to dopamine-blocking agents in patients with AIDS encephalopathy." *Am J Psychiatry* 148(11): 1558-61.
- Hyman, C., Hofer, M., Barde, Y. A., Juhasz, M., Yancopoulos, G. D., Squinto, S. P., Lindsay, R. M. (1991). "BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra." *Nature* 350(6315): 230-2.
- Itoh, K., Mehraein, P., Weis, S. (2000). "Neuronal damage of the substantia nigra in HIV-1 infected brains." *Acta Neuropathol (Berl)* 99(4): 376-84.
- Janssen, R. S., Nwanyanwu, O. C., Selik, R. M., Stehr-Green, J. K. (1992). "Epidemiology of human immunodeficiency virus encephalopathy in the United States." *Neurology* 42(8): 1472-6.
- Jenuwein, M., Scheller, C., Neuen-Jacob, E., Sopper, S., Tatschner, T., ter Meulen, V., Riederer, P., Koutsilieri, E. (2004). "Dopamine deficits and regulation of the cAMP second messenger system in brains of SIV-infected rhesus monkeys." *J Neurovirol im Druck*.
- Joag, S. V. (2000). "Primate models of AIDS." *Microbes and Infection* 2: 223-229.
- Knoll, J. (1978). "The possible mechanisms of action of (-)deprenyl in Parkinson's disease." *J Neural Transm* 43(3-4): 177-98.
- Koutsilieri, E., Gotz, M. E., Sopper, S., Sauer, U., Demuth, M., ter Meulen, V., Riederer, P. (1997b). "Regulation of glutathione and cell toxicity following exposure to neurotropic substances and human immunodeficiency virus-1 in vitro." *J Neurovirol* 3(5): 342-9.
- Koutsilieri, E., Gotz, M. E., Sopper, S., Stahl-Hennig, C., Czub, M., ter Meulen, V., Riederer, P. (1997a). "Monoamine metabolite levels in CSF of SIV-infected rhesus monkeys (*Macaca mulatta*)." *Neuroreport* 8(17): 3833-6.
- Koutsilieri, E., Sopper, S., Heinemann, T., Scheller, C., Lan, J., Stahl-Hennig, C., ter Meulen, V., Riederer, P., Gerlach, M. (1999). "Involvement of microglia in cerebrospinal fluid glutamate increase in SIV-infected rhesus monkeys (*Macaca mulatta*)." *AIDS Res Hum Retroviruses* 15(5): 471-7.
- Koutsilieri, E., Sopper, S., Scheller, C., Meulen, V., Riederer, P. (2002a). "Involvement of dopamine in the progression of AIDS Dementia Complex." *J Neural Transm* 109: 399-410.

- Lackner, A. A., Smith, M. O., Munn, R. J., Martfeld, D. J., Gardner, M. B., Marx, P. A., Dandekar, S. (1991). "Localization of simian immunodeficiency virus in the central nervous system of rhesus monkeys." *Am J Pathol* 139(3): 609-21.
- Laverda, A. M., Gallo, P., De Rossi, A., Sivieri, S., Cogo, P., Pagliaro, A., Chieco-Bianchi, L., Tavolato, B. (1994). "Cerebrospinal fluid analysis in HIV-1-infected children: immunological and virological findings before and after AZT therapy." *Acta Paediatr* 83(10): 1038-42.
- Levy, J. A. (1994). "HIV and the pathogenesis of AIDS." ASM Press, Washington, DC.
- Lipton, S. A. (1994). "HIV-related neuronal injury. Potential therapeutic intervention with calcium channel antagonists and NMDA antagonists." *Mol Neurobiol* 8(2-3): 181-96.
- Lipton, S. A. (1998). "Neuronal injury associated with HIV-1: approaches to treatment." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38: 159-77.
- Lopez, O. L., Smith, G., Meltzer, C. C., Becker, J. T. (1999). "Dopamine systems in human immunodeficiency virus-associated dementia." *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol* 12(3): 184-92.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. (1989) "Molecular Cloning". New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- McArthur, J. C., Hoover, D. R., Bacellar, H., Miller, E. N., Cohen, B. A., Becker, J. T., Graham, N. M., McArthur, J. H., Selnes, O. A., Jacobson, L. P., et al. (1993). "Dementia in AIDS patients: incidence and risk factors. Multicenter AIDS Cohort Study." *Neurology* 43(11): 2245-52.
- McGuire, D., Marder, K. (2000). "Pharmacological frontiers in the treatment of AIDS dementia." *J Psychopharmacol* 14(3): 251-7.
- Miller, R. J., Meucci, O. (1999). "AIDS and the brain: is there a chemokine connection?" *Trends Neurosci* 22(10): 471-9.
- Minghetti, L., Nicolini, A., Polazzi, E., Creminon, C., Maclouf, J., Levi, G. (1997). "Inducible nitric oxide synthase expression in activated rat microglial cultures is downregulated by exogenous prostaglandin E2 and by cyclooxygenase inhibitors." *Glia* 19(2): 152-60.
- Mintz, M., Tardieu, M., Hoyt, L., McSherry, G., Mendelson, J., Oleske, J. (1996). "Levodopa therapy improves motor function in HIV-infected children with extrapyramidal syndromes." *Neurology* 47(6): 1583-5.
- Mirsattari, S. M., Power, C., Nath, A. (1998). "Parkinsonism with HIV infection." *Mov Disord* 13(4): 684-9.

Montminy, M. (1997). "Transcriptional regulation by cyclic AMP." *Annu Rev Biochem* 66: 807-22.

Murray, E. A., Rausch, D. M., Lendvay, J., Sharer, L. R., Eiden, L. E. (1992). "Cognitive and motor impairments associated with SIV infection in rhesus monkeys." *Science* 255(5049): 1246-9.

Nath, A., Anderson, C., Jones, M., Maragos, W., Booze, R., Mactutus, C., Bell, J., Hauser, K. F., Mattson, M. (2000). "Neurotoxicity and dysfunction of dopaminergic systems associated with AIDS dementia." *J Psychopharmacol* 14(3): 222-7.

Navia, B., Dafni, U., Simpson, D., Tucker, T., Singer, E., McArthur, J., Yiannoutsos, C., L., Z., Lipton, S. A. (1998). "A phase I/II trial of nimodipine for HIV-related neurologic complications." *Neurology* 51(1): 221-228.

Navia, B. A., Cho, E. S., Petit, C. K., Price, R. W. (1986b). "The AIDS dementia complex: II. Neuropathology." *Ann Neurol* 19(6): 525-35.

Navia, B. A., Jordan, B. D., Price, R. W. (1986a). "The AIDS dementia complex: I. Clinical features." *Ann Neurol* 19(6): 517-24.

Nestler, E. J., Greengard, P. (1998). "Serine and Threonine Phosphorylation". *Basic Neurochemistry*. Siegel, G. J., Arganoff, B. W., Albers, R. Q., Fisher, S. K. Uehler, M. D., Philadelphina, New York, Lippincott-Raven.

Norley, S., Kurth, R. (1997). "Simian immunodeficiency virus as a model of HIV pathogenesis." *Springer Seminars in Immunopathology* 18: 391-405.

Nuovo, G. J., Alfieri, M. L. (1996). "AIDS dementia is associated with massive, activated HIV-1 infection and concomitant expression of several cytokines." *Mol Med* 2(3): 358-66.

Pantaleo, G., Graziosi, C., Fauci, A. S. (1993). "New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection." *N Engl J Med* 328(5): 327-35.

Patrizio, M., Colucci, M., Levi, G. (2001). "Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein decreases cyclic AMP synthesis in rat microglia cultures." *J Neurochem* 77(2): 399-407.

Price, R. W. (1996). "Neurological complications of HIV infection." *Lancet* 348(9025): 445-52.

Rausch, D. M., Heyes, M. P., Murray, E. A., Lendvay, J., Sharer, L. R., Ward, J. M., Rehm, S., Nohr, D., Weihe, E., Eiden, L. E. (1994). "Cytopathologic and neurochemical correlates of progression to motor/cognitive impairment in SIV-infected rhesus monkeys." *J Neuropathol Exp Neurol* 53(2): 165-75.

Rohr, O., Sawaya, B. E., Lecestre, D., Aunis, D., Schaeffer, E. (1999). "Dopamine stimulates expression of the human immunodeficiency virus type 1 via NF-kappaB in cells of the immune system." *Nucleic Acids Res* 27(16): 3291-9.

Sacktor, N. C., Lyles, R. H., Skolasky, R. L., Kleeberger, C., Selnes, O. A., Miller, E. N., Becker, J. T., Cohen, B., McArthur, J. C. (2001). "HIV-associated neurologic disease incidence changes: Multicenter AIDS Cohort Study, 1990-1998." *Neurology* 56: 257-260.

Scheller, C., Sopper, S., Jassoy, C., ter Meulen, V., Riederer, P., Koutsilieri, E. (2000). "Dopamine activates HIV in chronically infected T lymphoblasts." *J Neural Transm* 107: 1483-9.

Senogles, S. E., Amlaiky, N., Berger, J. G., Caron, M. G. (1988). "Biochemical properties of D1 and D2 dopamine receptors." *Adv Exp Med Biol* 235: 33-41.

Shapshak, P., Crandall, K. A., Xin, K. Q., Goodkin, K., Fujimura, R. K., Bradley, W., McCoy, C. B., Nagano, I., Yoshioka, M., Petito, C., Sun, N. C., Srivastava, A. K., Weatherby, N., Stewart, R., Delgado, S., Matthews, A., Douyon, R., Okuda, K., Yang, J., Zhangl, B. T., Cao, X. R., Shatkovsky, S., Fernandez, J. B., Shah, S. M., Perper, J. (1996). "HIV-1 neuropathogenesis and abused drugs: current reviews, problems, and solutions." *Adv Exp Med Biol* 402: 171-86.

Simpson, D. (1998). "HIV rounds at Cornell: selected neurlologic comlication of HIV disease." *AI DS Patient Care STDS* 12(3): 209-15.

Sopper, S., Demuth, M., Stahl-Hennig, C., Hunsmann, G., Plesker, R., Coulibaly, C., Czub, S., Ceska, M., Koutsilieri, E., Riederer, P., Brinkmann, R., Katz, M., ter Meulen, V. (1996). "The effect of simian immunodeficiency virus infection in vitro and in vivo on the cytokine production of isolated microglia and peripheral macrophages from rhesus monkey." *Virology* 220(2): 320-9.

Sopper, S., Koutsilieri, E., Scheller, C., Czub, S., Riederer, P., ter Meulen, V. (2002). "Macaque animal model for HIV-induced neurological disease." *J Neural Transm* 109(5-6): 747-66.

Stryer, L. (1999) "Biochemie". Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.

Suzumura, A., Ito, A., Yoshikawa, M., Sawada, M. (1999). "Ibudilast suppresses TNFalpha production by glial cells functioning mainly as type III phosphodiesterase inhibitor in the CNS." *Brain Res* 837(1-2): 203-12.

Takahashi, K., Wesselingh, S. L., Griffin, D. E., McArthur, J. C., Johnson, R. T., Glass, J. D. (1996). "Localization of HIV-1 in human brain using polymerase chain reaction/in situ hybridization and immunocytochemistry." *Ann Neurol* 39(6): 705-11.

Tyor, W. R., Glass, J. D., Griffin, J. W., Becker, P. S., McArthur, J. C., Bezman, L., Griffin, D. E. (1992). "Cytokine expression in the brain during the acquired immunodeficiency syndrome." *Ann Neurol* 31(4): 349-60.

Wesselingh, S. L., Glass, J., McArthur, J. C., Griffin, J. W., Griffin, D. E. (1994). "Cytokine dysregulation in HIV-associated neurological disease." *Adv Neuroimmunol* 4(3): 199-206.

Westmoreland, S. V., Rottman, J. B., Williams, K. C., Lackner, A. A., Sasseville, V. G. (1998). "Chemokine receptor expression on resident and inflammatory cells in the brain of macaques with simian immunodeficiency virus encephalitis." *American Journal of Pathology* 152(3): 659-665.

Wiley, C. A., Soontornniyomkij, V., Radhakrishnan, L., Masliah, E., Mellors, J., Hermann, S. A., Dailey, P., Achim, C. L. (1998). "Distribution of brain HIV load in AIDS." *Brain Pathol* 8(2): 277-84.

Woodruff, G. N., Foster, A. C., Wong, E. H. F., Gill, R., Kemp, J. A., Iversen, L. L. (1988) "Excitatory amino acids and neurodegenerative disorders: Possible therapeutic indications." New York: John Wiley & Sons.

Yamada, S., Yamamoto, M., Ozawa, H., Riederer, P., Saito, T. (2003). "Reduced phosphorylation of cyclic AMP-responsive element binding protein in the postmortem orbitofrontal cortex of patients with major depressive disorder." *J Neural Transm* 110(6): 671-80.

Zafra, F., Lindholm, D., Castren, E., Hartikka, J., Thoenen, H. (1992). "Regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor mRNA in primary cultures of hippocampal neurons and astrocytes." *J Neurosci* 12(12): 4793-9.

Zauli, G., Milani, D., Mirandola, P., Mazzoni, M., Secchiero, P., Miscia, S., Capitani, S. (2001). "HIV-1 Tat protein down-regulates CREB transcription factor expression in PC12 neuronal cells through a phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/cyclic nucleoside phosphodiesterase pathway." *Faseb J* 15(2): 483-91.

Zauli, G., Secchiero, P., Rodella, L., Gibellini, D., Mirandola, P., Mazzoni, M., Milani, D., Dowd, D. R., Capitani, S., Vitale, M. (2000). "HIV-1 Tat-mediated inhibition of the tyrosine hydroxylase gene expression in dopaminergic neuronal cells." *J Biol Chem* 275(6): 4159-65.

Zink, M. C., Amedee, A. M., Mankowski, J. L., Craig, L., Didier, P., Carter, D. L., Munoz, A., Murphey-Corb, M., Clements, J. E. (1997). "Pathogenesis of SIV encephalitis. Selection and replication of neurovirulent SIV." *Am J Pathol* 151(3): 793-803.

Zink, M. C., Spelman, J. P., Robinson, R. B., Clements, J. E. (1998). "SIV infection of macaques--modeling the progression to AIDS dementia." *J Neurovirol* 4(3): 249-59.

Ich danke

Frau Priv.-Doz. Dr. E. Koutsilieri, für die freundliche Überlassung des Themas, sowie für die hervorragende und zuverlässige Betreuung meiner Arbeit;

Herrn Prof. Dr. A. Rethwilm sehr herzlich, für die Übernahme des Koreferats;

Herrn Dr. C. Scheller, für die exzellente, stets zur Verfügung stehende Hilfe bei der Optimierung, der Durchführung sowie der Auswertung der Versuche;

allen Mitarbeitern des neurochemischen Labors, insbesondere Herrn R. Burger und Frau S. Pohli, für die stets freundliche und geduldige Unterstützung bei der Ausführung meiner Versuche;

Herrn Dr. S. Sopper, für die freundliche Zusammenarbeit;

dem Leiter des Neurochemischen Labors, Herrn Prof. Dr. P. Riederer, für die ausgezeichneten Forschungsbedingungen in seinem Labor;

Herrn Prof. Dr. V. ter Meulen, für die großzügige Unterstützung meiner Arbeit;

dem Primatenzentrum in Göttingen für das Halten der Versuchstiere;

Herrn S. Fiedler für seine andauernde Mühe und Hilfsbereitschaft bei jeglichen Problemen, sowie Frau B. Ziesel und Frau C. Binderberger für ihre hilfreichen Ratschläge.

Lebenslauf

Name	Meta Jenuwein
Geburtsdatum	17.11.1976
Geburtsort	Illertissen
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Anschrift	Mozartstr. 10 89257 Illertissen
Eltern	Heinz Jenuwein Rosemarie Jenuwein, geb. Rittler
Sept. 1983 – Juli 1987	Grundschule Illertissen
Sept. 1987 – Juli 1994	Gymnasium „Kolleg der Schulbrüder“ Illertissen
Aug. 1994 – Juli 1995	Evergreen High School, Colorado, USA
Sept. 1995 – Juni 1997	Gymnasium „Kolleg der Schulbrüder“ Illertissen
Juni 1997	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
seit Jan. 1998	Sanitätsoffizieranwärter der Bundeswehr
Jan. 1998 – Sept. 1998	Militärische Ausbildung
seit Okt. 1998	Beurlaubung zum Studium der Humanmedizin
Okt. 1998 – Sept. 2000	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
August 2000	Ärztliche Vorprüfung
Okt. 2000	Studium der Humanmedizin an der Julius- Maximilians-Universität in Würzburg
August 2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
September 2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
November 2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Meta Jenuwein

Illertissen, 17. November 2004